

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

*Pichia pastoris* ALKOL OKSİDAZ (*AOX1* ve *AOX2*) GENLERİNİN İNAKTİF  
EDİLMESİ VE ELDE EDİLEN SUŞUN REKOMBİNANT PROTEİN  
ÜRETİMİNDE KULLANILMASI

MERT KARAOĞLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

2012

***Pichia pastoris* ALKOL OKSİDAZ (AOX1 ve AOX2) GENLERİNİN İNAKTİF  
EDİLMESİ VE ELDE EDİLEN SUŞUN REKOMBİNANT PROTEİN  
ÜRETİMİNDE KULLANILMASI**

**MERT KARAOĞLAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**Bu tez 2011.02.0121.031 proje numarasıyla Akdeniz Üniversitesi Bilimsel  
Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.**

**2012**

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

*Pichia pastoris* ALKOL OKSİDAZ (AOX1 ve AOX2) GENLERİNİN İNAKTİF  
EDİLMESİ VE ELDE EDİLEN SUŞUN REKOMBİNANT PROTEİN  
ÜRETİMİNDE KULLANILMASI

MERT KARAOĞLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu tez 19/07/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından (100) not takdir edilerek  
Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Mehmet İNAN (Danışman)

\_\_\_\_\_

Yrd. Doç. Dr. Barçın KARAKAŞ

\_\_\_\_\_

Yrd. Doç. Dr. Cengiz İKTEN

\_\_\_\_\_

## ÖZET

### ***Pichia pastoris* ALKOL OKSİDAZ (*AOX1* ve *AOX2*) GENLERİNİN İNAKTİF EDİLMESİ VE ELDE EDİLEN SUŞUN REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİMİNDE KULLANILMASI**

**MERT KARAOĞLAN**

**Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Danışman: Doç. Dr. Mehmet İNAN**

**Haziran 2012, 86 sayfa**

*Pichia pastoris*, biyoteknoloji, ilaç endüstrisi ve akademik araştırmacılar tarafından rekombinant protein üretimi için ihtiyaç duyulan bir ekspresyon sistemidir. *P. pastoris*, bakteriler gibi, tek karbon kaynağı olarak metanol, glukoz, gliserol veya etanol içeren ucuz besiyerlerinde hızla gelişme gösterebilmektedir. Ayrıca, insanlar gibi, ökaryotik bir organizmadır ve böylece hücre içi ortamı ökaryotik proteinlerin katlanması bakterilere göre daha iyi olanak sağlamaktadır. Buna ilaveten proteolitik işlemler, disülfid köprüsü oluşumu ve glikozilasyon gibi translasyon sonrası modifikasyonları gerçekleştirme yeteneğine sahiptir.

*P. pastoris*'in genomunda alkol oksidaz geninin iki kopyası bulunmaktadır. *AOX1* geni hücrede alkol oksidaz aktivitesinin %85'inin regülasyonundan sorumlu iken, *AOX2* geni alkol oksidaz aktivitesinin %15'inden sorumludur. Bu sebeple, rekombinant protein üretiminde *AOX1* promotörü daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Metanol kullanım yeteneklerine göre 3 tip *P. pastoris* konukçu suşu bulunmaktadır. Çoğu suş metanolde doğal tip oranında gelişir (Mut<sup>+</sup>, metanol kullanımı pozitif fenotip). Diğer konukçu suşların (Mut<sup>s</sup> ve Mut<sup>-</sup>) bir veya iki *AOX* geni de silinmiştir. Bazen *AOX* genleri silinmiş suşlar, rekombinant protein üretiminde doğal tip suşlardan daha iyi olabilmektedir. Ayrıca bu suşlar ekspresyon tetikleme için daha az metanol gerektirmektedir. Büyük ölçekli fermentasyonlar için az miktarda metanol gereksinimi, Mut<sup>-</sup> suşunu diğer suşlara göre avantajlı kılmaktadır.

Çalışma iki bölümden oluşmaktadır. İlk bölümü, *P.pastoris*'te *AOX* genlerinin (*AOX1* ve *AOX2*) inaktif edilmesidir. *AOX1* ve *AOX2* genleri, sırası ile *ADE1* ve *HIS4* genlerinin entegrasyonu ile inaktif edilmiştir. *ADE1* ve *HIS4*, aynı zamanda seçici markırlardır. Bu bölümün sonucu olarak, *P. pastoris* MK321 (*his4::PHIS4*, *aox1::ADE1*), MK431 (*ade1::PADE1 aox2::HIS4*) ve MK500 (*aox1::ADE1 aox2::HIS4*) suşları elde edilmiştir.

İkinci bölümde, bu suşların protein üretimi üzerine çalışılmıştır. EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) 'nin hücre dışında üretimi için suşlara pPICZαA vektörü kullanılarak model protein olan EGFP geni aktarılmıştır. Ayrıca, rekombinant protein üretiminde sık kullanılan, *P. pastoris* X33 ve KM71H ticari suşlarına da aynı gen aktarılmıştır. Protein üreten X33, KM71H, MK321, MK431 ve MK500 suşlarından tek kopya plazmid içeren klonlar Southern Blot tekniği ile seçilmiş ve bu klonlarda protein üretimleri karşılaştırılmıştır.

Bu çalışmada elde edilen *P. pastoris* MK500 suşunun rekombinant protein üretimlerinde yaygın olarak kullanılan *P. pastoris* X33 suşundan daha yüksek spesifik verimlilikle protein üretme (FU/OD) yeteneğine sahip olduğu görülmüştür. EGFP 'nin hücre dışına salgılandığı SDS-PAGE ve Western Blot teknikleri ile doğrulanmıştır.

Sonuç olarak, yeni geliştirilen konukçu sistem olan *P. pastoris* MK500, metanolü metabolize edememektedir ve bu yüzden metanole sadece tetikleyici olarak ihtiyaç duymaktadır. Böylece bu suş, endüstriyel ölçekte rekombinant protein üretimlerinin çok düşük miktarda metanol ile gerçekleştirilmesine olanak sağlayacaktır.

**ANAHTAR KELİMELER:** *Pichia pastoris*, *AOX* inaktif suş, EGFP, yeni konukçu sistem

**JÜRİ:**

**Doç. Dr. Mehmet İNAN (Danışman)**

**Yrd. Doç. Dr. Barçın KARAKAŞ**

**Yrd. Doç. Dr. Cengiz İKTEN**

## ABSTRACT

### INACTIVATION OF ALCOHOL OXIDASE GENES (*AOX1* and *AOX2*) IN *Pichia pastoris* AND UTILIZATION OF THE AOX-DEFECTIVE STRAIN IN RECOMBINANT PROTEIN PRODUCTION

MERT KARAOGLAN

M.Sc. Thesis in Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Mehmet INAN

June 2012, 86 pages

*Pichia pastoris* is an expression system for the production of recombinant proteins needed by the biotechnology and pharmaceutical industries and by academic researchers. Like bacteria, *P. pastoris* grows rapidly on inexpensive media containing methanol, glucose, glycerol or ethanol as a sole carbon source. Furthermore, like humans, it is also a eukaryotic organism with a subcellular environment more conducive to the folding of eukaryotic proteins and with an ability to perform post-translational modifications such as proteolytic processing, disulfide bridge formation and glycosylation.

The genome of *P. pastoris* contains two copies of the alcohol oxidase gene. The *AOX1* gene is responsible for 85% of alcohol oxidase regulation within the cell while *AOX2* gene is responsible for %15. Therefore it is the *AOX1* promoter which is more widely used in recombinant protein production. *P. pastoris* has three different phenotypes depending on methanol utilization ability. Mut<sup>+</sup> strain is indistinguishable from wild-type methanol utilizing strain. Mut<sup>s</sup> (*AOX1* gene is defective) and Mut<sup>-</sup> (*AOX1* and *AOX2* genes are defective) strains can be better than wild-type in recombinant protein production. In addition, these strains require less methanol for induction of expression. Less methanol requirement is an advantage of Mut<sup>-</sup> strains in large scale fermentation.

This research consists of two parts. In the first part the objective was the inactivation of *AOX* genes (*AOX1* and *AOX2*) in *P. pastoris*. *AOX1* and *AOX2* were inactivated by inserting *ADE1* and *HIS4* genes, respectively. *ADE1* and *HIS4* genes were also selection markers. As a result of this part, *P. pastoris* MK321 (*his4::PHIS4*, *aox1::ADE1*), MK431 (*ade1::PADE1 aox2::HIS4*) and MK500 (*aox1::ADE1 aox2::HIS4*) strains have been developed.

In the second part, recombinant protein production of these strains was studied. Therefore, model protein EGFP gene was transformed into the strains by using pPICZ $\alpha$ A as a vector for extracellular expression. Commercial strains *P. pastoris* X33 and KM71H which are mostly-used in recombinant protein production were also transformed with EGFP, simultaneously. Single copy gene containing clones were selected from protein producing X33, KM71H, MK321, MK431 and MK500 strains using Southern Blot method and protein production of these strains were compared.

Results showed that *P. pastoris* MK500 is capable of producing higher specific yield of protein (FU/OD) compared to *P.pastoris* X33 which is the most commonly used in recombinant protein production. Extracellular production of EGFP have been confirmed using SDS-PAGE and Western Blot methods.

As a result, *P. pastoris* MK500 which is newly developed host system is unable to metabolize methanol so requires methanol only as inducer. Consequently, this strain allows to carry out large scale protein production with small amounts of methanol.

**KEY WORDS:** *Pichia pastoris*, *AOX*-Defective strain, EGFP, new host system

**COMMITTEE:**

**Assoc. Prof. Dr. Mehmet INAN (Adviser)**

**Asst. Prof Dr.Barçın KARAKAŞ**

**Asst. Prof Dr. Cengiz IKTEN**

## ÖNSÖZ

Moleküler biyoloji uygulamalarından tıp, ilaç gıda, tarım, biyomedikal gibi geniş bir alanda faydalanılmaktadır. Bu nedenle moleküler biyoloji biliminde yapılan gelişmeler, kullanıldığı alanlardaki rolüne bağlı olarak büyük imkanlar sağlamaktadır. Ülkemizde bu alana yapılan yatırımlar sayesinde hayat kalitemizi yükseltmeye yönelik uygulamalarda yeni ufuklar açılmaktadır.

Bu çalışmada, yeni bir konukçu sistem geliştirilmiştir. Bu konukçunun rekombinant protein üretiminde kullanılabilirliği, protein üretim miktarı ve kalitesi araştırılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler, geliştirilen konukçunun doğal tipinden elde edilen veriler ile karşılaştırılmıştır. Araştırma sonuçlarının benzeri çalışmalara ışık tutmasını ve elde edilen yeni konukçu sistemin, yapılacak başka çalışmalarda da kullanılarak bu alanda yapılacak gelişmelere katkı sağlamasını dilerim.

Bu çalışma süresince, bilgi ve tecrübeleri ile beni yönlendiren ve desteğini hiç esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Mehmet İNAN'a gösterdiği emek ve ayırdığı zaman için ne kadar teşekkür etsem azdır. Ayrıca bazı analizlerin gerçekleşmesinde laboratuvarını açarak bana yardımcı olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Cengiz İKTEN'e ve bu tezin hazırlanmasında gösterdiği ilgi ve önerilerinden dolayı Sayın Yrd. Doç. Dr. Barçın KARAKAŞ'a teşekkür ederim.

Ayrıca, laboratuvar çalışmalarında desteğini ve yardımlarını benden esirgemeyen başta Fidan ERDEN'e ve diğer çalışma arkadaşlarıma desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Gerek maddi gerekse manevi, hiçbir desteği esirgemeyen ve benim bu noktalara gelmemde en büyük katkıyı sağlayan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ .....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xv
1. GİRİŞ .....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI .....	3
2.1. <i>Pichia pastoris</i> .....	3
2.2. Metanol Metabolizması ve Metanol Kullanım Fenotipleri.....	4
2.3. Rekombinant Protein Üretiminde Kullanılan <i>Pichia pastoris</i> Promotorları .....	6
2.4. <i>Pichia pastoris</i> Seleksiyon Markırları .....	9
2.5. Seleksiyon Stratejisi.....	9
2.6. Ekspresyon Suşları.....	10
2.7. Ekspresyon Vektörleri, Transformasyon ve <i>Pichia pastoris</i> Genomuna Entegrasyonu.....	12
2.8. <i>Pichia pastoris</i> Fermentasyonu.....	14
2.9. EGFP (enhanced green fluorescent protein) .....	15
3. MATERYAL VE METOT .....	17
3.1. Materyal .....	17
3.1.1. Konukçu suşlar ve plazmitler.....	17
3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler ve restriksiyon enzimleri.....	19
3.2. Metot.....	19
3.2.1. Genomik DNA izolasyonu.....	19
3.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR-Polimerase Chain Reaction).....	20
3.2.3. Agaroz jel elektroforezi ve jelin görüntülenmesi.....	21
3.2.4. Ligasyon ve transformasyon işlemleri .....	22
3.2.5. Plazmit izolasyonu .....	23
3.2.6. PZR ürünlerinin saflaştırılması .....	23
3.2.7. Jelden DNA parçalarının ekstraksiyonu .....	24

3.2.8.	SDS-PAGE ve Western Blot analizi .....	24
3.2.9.	DNA ve plazmit miktarlarının ölçülmesi .....	25
3.2.10.	Southern Blot analizi.....	25
4.	BULGULAR ve TARTIŞMA.....	27
4.1.	<i>Pichia pastoris</i> AOX1 ve AOX2 Genlerinin İnaktivasyonu Çalışmaları.....	27
4.1.1.	AOX1 ve AOX2 genlerinin PZR ile çoğaltılması .....	31
4.1.2.	AOX1 ve AOX2 genlerinin inaktif edilmesinde kullanılacak ADE1 ve HIS4 genlerinin elde edilmesi .....	32
4.1.3.	AOX1 ve AOX2 inaktif plazmitlerinin elde edilmesi ve klonlama çalışmaları .....	33
4.1.4.	JC304 ve MK201 suşlarında AOX1 geninin inaktif edilmesi ve doğrulama işlemleri.....	37
4.1.5.	MK111 ve MK300 suşlarında AOX2 geninin inaktif edilmesi ve doğrulanması.....	41
4.1.6.	Metanol içeren besiyerinde gelişim eğrisinin çıkartılması.....	45
4.1.7.	Rekombinant protein ekspresyonu için ekspresyon vektörünün oluşturulması ve transformasyonu .....	46
4.1.8.	EGFP üretimi ve protein üretim yeteneklerinin taranması .....	47
4.1.9.	Southern Blot analizi ile EGFP gen kopya sayısının belirlenmesi .....	49
4.1.10.	Çalkalamalı erlenmayerde EGFP ekspresyonu çalışmaları .....	51
4.1.11.	SDS-PAGE ve Western Blot analizi ile EGFP kalitesinin belirlenmesi.....	55
5.	SONUÇ .....	58
6.	KAYNAKLAR .....	59
7.	EKLER.....	67
	ÖZGEÇMİŞ	

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

d	devir
dak	dakika
kbç	kilo baz çifti
L	litre
$\mu$	mikro ( $10^{-6}$ )
m	mili ( $10^{-3}$ )
M	molar
n	nano ( $10^{-9}$ )
OD	optik yoğunluk (optical density)
<i>g</i>	göreceli santrifüj kuvveti (relative centrifugal force, rcf)
s	saniye
sa.	saat
t	süre (saat cinsinden)
T <sub>m</sub>	erime sıcaklığı (melting temperature)
FU	Floresans Ünitesi
$\infty$	sonsuz
örn.	Örneğin
EC	Enzyme code

## **Kısaltmalar**

bç	baz çifti
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
Amp	amfisilin
BMGY	tamponlanmış karmaşık gliserol besiyeri (buffered glycerol complex medium)
BMMY	tamponlanmış karmaşık metanol besiyeri (buffered methanol complex medium)
DIG	digoksjenin (digoxygenin)
DNA	deoksiribonükleik asit
FDA	ABD Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration)
GRAS	genel olarak güvenli kabul edilen (Generally Regarded As Safe)
LB	Luria-Bertani
MA	molekül ağırlığı
MM	temel metanol (minimal methanol)
MMH	minimal metanollü histidin içeren besiyeri
MD	minimal dekstrozu besiyeri
MDH	minimal dekstrozu histidin içeren besiyeri
PAGE	poliakrilamid jel elektroforezi
PZR	polimeraz zincir tepkimesi (PCR-polymerase chain reaction)
RNA	ribonükleik asit
SDS	sodyum dodesil sülfat
SSC	tuzlu sodyum sitrat (saline sodium citrate)

YNB	maya azot kaynağı (Yeast Nitrogen Base Sulfate without amino acids)
YPD	maya pepton dekstroz (yeast peptone dextrose)
TE	Tris-EDTA
TAE	Tris-Asetat-EDTA
TGS	Tris-Glisin-SDS
EGFP	enhanced green fluorescent protein
AOX	alkol oksidaz
GAP	gliseraldehit-3-fosfat
FLD	formaldehit dehidrogenaz
DHAS	dihidroksiaseton sentaz
DHA	dihidroksiaseton
FDH	format dehidrogenaz

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>P. pastoris</i> 'te metanol kullanım izyolu (Krainer vd 2012).....	5
Şekil 3.1. Yapışkan uçlu PZR ürünlerinin klonlanmasında kullanılan pTZ57R/T plazmiti.....	17
Şekil 3.2. Küt uçlu PZR ürünlerinin klonlanmasında kullanılan pJET1.2 plazmiti.....	18
Şekil 3.3. Protein ekspresyonu için kullanılan PPICZ $\alpha$ A plazmiti.....	18
Şekil 4.1. <i>AOX1</i> geninin inaktivasyon basamaklarının şematik gösterimi .....	27
Şekil 4.1.'in devamı. <i>AOX1</i> geninin inaktivasyon basamaklarının şematik gösterimi.....	28
Şekil 4.2. <i>AOX2</i> geninin inaktivasyon basamaklarının şematik gösterimi .....	29
Şekil 4.2.'nin devamı. <i>AOX2</i> geninin inaktivasyon basamaklarının şematik gösterimi.....	30
Şekil 4.3. PZR ile elde edilen <i>P. pastoris AOX1</i> ve <i>AOX2</i> genlerinin agaroz jel görüntüsü (1): <i>AOX1</i> ve (2): <i>AOX2</i> , M:1kb markır (a)-(d):Farklı sıcaklık uygulamaları. ....	31
Şekil 4.4. Elde edilen <i>P. pastoris ADE1</i> (1) ve <i>HIS4</i> (2) genlerinin agaroz jel görüntüsü M: 1kb markır, (a)-(d):Farklı sıcaklık uygulamaları. ....	32
Şekil 4.5. pTZ57R- <i>AOX1</i> doğrusal plazmitin ve <i>ADE1</i> geninin jelden kesilmesi ve özütlenmesi.....	33
Şekil 4.6. pJET- <i>AOX2</i> doğrusal plazmitin jelden kesilmesi ve özütlenmesi. M:1kb markır.....	34
Şekil 4.7. Koloni PZR ile tarama yapılan örneklerin jel görüntüsü (A):pTZ57R- <i>aox1-ADE1</i> ve (B):pJET- <i>aox2-HIS4</i> . M:1kb markır, C1-C12:Farklı klonlar, PK:Pozitif kontrol.....	35
Şekil 4.8. Plazmit izolasyonu sonrası restriksiyon enzimleri ile kontrolün jel görüntüsü (A):pTZ57R- <i>aox1-ADE1</i> ve (B):pJET- <i>aox2-HIS4</i> . M:1kb markır, C1-C12:Farklı klonlar, PK:Pozitif kontrol. ....	35
Şekil 4.9. <i>P. pastoris</i> hücrelerine transform edilecek gen bölgelerinin PZR ile edilmesine ait jel görüntüsü (A): <i>aox1::ADE1</i> ve (B): <i>aox2::HIS4</i> DNA parçaları, M:1kb markır.....	36

Şekil 4.10. <i>P. pastoris</i> transformantlarının tarandığı MMH ve MDH plakalarının görüntüsü (A):MMH plaka ve (B):MDH replika plaka .....	37
Şekil 4.11. <i>AOX1</i> geni inaktif olma ihtimali olan suşların genomik DNA'ların jelde görüntülenmesi (A):JC304 ve (B):MK201 suşları. M:1kb markır, C1-C8:Farklı klonlar.....	38
Şekil 4.12. <i>AOX1</i> geni inaktif olma ihtimali olan transformant JC304 ve MK201 suşlarının genomik DNA'ları kullanılarak yapılan PZR jel görüntüsü (A):JC304 ve (B):MK201 suşları. M:1kb markır, C1-C8:Farklı klonlar, PK:Pozitif kontrol.....	38
Şekil 4.13. <i>AOX1</i> geni içinden dizayn edilen prop ve probun etkinliği (A):Prop eldesi için yapılan PZR görüntüsü, (B):Prop etkinlik ölçümünün görüntüsü.....	39
Şekil 4.14. Transformant JC304 ve MK201 genomik DNA'larının Southern Blot analizi için BamHI enzimi ile kesilmesi ve jelde yürütülmesi (A):JC304 ve (B):MK201 suşları 1kb:1kb markır, DIG:DIG etiketli markır, K:Negatif kontrol, C1-C4:Farklı klonlar, PK:Pozitif kontrol. ....	40
Şekil 4.15. Transformant JC304 ve MK201 suşlarında yapılan southern Blot analizi sonucu X-ray filmin görüntüsü (A):JC304 ve (B):MK201 suşları. 1kb: 1kb markır, DIG:DIG etiketli markır, K:Negatif kontrol, C1-C4:Farklı klonlar, PK:Pozitif kontrol. ....	41
Şekil 4.16. <i>AOX2</i> inaktif olma ihtimali olan suşların genomik DNA'ların jelde görüntülenmesi (A):MK111 ve (B):MK300 suşları. M:1kb markır, C1-C7:Farklı klonlar. ....	42
Şekil 4.17. <i>AOX2</i> inaktif olma ihtimali olan transformant MK111 ve MK300 suşlarının genomik DNA'ları kullanılarak yapılan PZR jel görüntüsü (A):MK111 ve (B):MK300 suşları. M:1kb markır, C1-C8:Farklı klonlar, NK:Negatif kontrol.....	42
Şekil 4.18. <i>AOX2</i> geni içinden dizayn edilen prob ve probun etkinliği (A):Prob eldesi için yapılan PZR görüntüsü, (B):Prob etkinlik ölçümünün görüntüsü.....	43

Şekil 4.19. Transformant MK111 ve MK300 genomik DNA'larının Southern Blot analizi için EcoRI enzimi ile kesilmesi ve jelde yürütülmesi (A):MK111 ve (B):MK300 suşları. 1kb:1kb markır, DIG:DIG etiketli markır, K:Negatif kontrol, C1-C4:Farklı klonlar, PK:Pozitif kontrol. ....	44
Şekil 4.20. Tranformant MK111 ve MK300 suşlarında yapılan southern Blot analizi sonucu X-ışını filminin görüntüsü (A):MK111 ve (B):MK300 suşları. 1kb: Fermentas markır, DIG:DIG etiketli markır, K:Negatif kontrol, C1-C4:arklı klonlar, PK:Pozitif kontrol.....	44
Şekil 4.21. İnaktif suşların metanol içeren (MM) besiyerinde gelişim eğrisi.....	45
Şekil 4.22. EGFP geni için PZR ürünlerinin jel görüntüsü ve jelden özütlenmesi. (a)-(d):Farklı sıcaklık uygulamaları. ....	46
Şekil 4.23. EGFP geninin klonlandığı pPICZαEGFP plazmitlerinin kontrolü. M:1kb markır, C1-C4:farklı klonlar.....	47
Şekil 4.24. Transformant suşların EGFP üretim yeteneklerini gösteren SDS-PAGE jeli görüntüleri (A):X33, (B):MK431, (C):KM71H, (D):MK321 ve (E):MK500 suşları. M: protein markır, K:Negatif kontrol, C1-C7:Farklı klonlar.....	48
Şekil 4.25. EGFP üretim suşlarının gen kopya sayısının belirlenmesi için genomik DNA'larının EcoRV enzimi ile kesilmesi ve jelde yürütülmesi. 1kb:1kb markır, DIG:DIG etiketli markır, K:Negatif kontrol, C1-C5:Farklı klonlar.....	49
Şekil 4.26. EGFP gen kopya sayılarının belirlendiği southern Blot analizinin X-ışını filminin görüntüsü. 1kb:1kb markır, DIG:DIG etiketli markır, K:Negatif kontrol, C1-C6:Farklı klonlar.....	50
Şekil 4.27. Bir ekspresyon kasetine sahip X33 suşu için yapılan southern Blot analizinin jel görüntüsü ve X-ışını filmi. 1kb:1kb markır, K:Negatif kontrol, C1-C11:Farklı klonlar.....	51
Şekil 4.28. EGFP üretim suşlarına ait Floresans ünitesi-zaman grafikleri .....	52
Şekil 4.29. Üretim suşlarının 72. saat floresans ünitesinin grafiksel gösterimi .....	53
Şekil 4.30. OD değerleri dahil edilmiş EGFP üretim suşlarına ait Floresans Ünitesi-Zaman grafikleri .....	54



Şekil 4.31. OD değerleri göz önüne alınmış üretim suşlarının 72. saat floresans ünitesinin grafiksel gösterimi .....	54
Şekil 4.32. <i>P. pastoris</i> X33-MK500 ve KM71H-MK321 suşlarının EGFP üretimlerinin zamana bağlı değişimini gösteren SDS-PAGE görüntüsü. M:Protein markırı, 0-72:süre (saat).....	55
Şekil 4.33. <i>P. pastoris</i> X33-MK500 suşlarının karşılaştırılması ve tüm suşlarda 72. saat örneklerinin western Blot analizi. M:Protein markırı, 0-72:Saate aralığı, K:Kontrol, S1-S5:Standard EGFP (S1:10ng, S2:50ng, S3:100ng,S4:250ng ve S5:500ng) .....	56

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Metilotrofik mayalarda karbon kaynaklarının <i>AOX</i> geni üzerine represyon ve derepresyon etkisi (Hartner ve Glieder (2006)'ın çalışmasından birebir alınmıştır).....	6
Çizelge 2.2. <i>P. pastoris</i> konakçı suşları (Cregg 2007).....	10
Çizelge 2.3. PTM1 tuzlarının bileşimi .....	14
Çizelge 3.1. PZR ısı döngü programı için süre ve sıcaklık koşulları.....	20
Çizelge 4.1. EGFP üretiminin 72. Saat OD değerleri .....	53

## 1. GİRİŞ

Rekombinant DNA (rDNA), farklı kaynaklardan elde edilen genetik materyallerin genetik mühendisliği metotları ile bir araya getirilmesi sonucu elde edilen ve aksi halde biyolojik organizmalarda bulunmayan DNA molekülleridir. Bu moleküllerin elde edilmesi sırasında gerçekleştirilen, genetik moleküllerin kesilmesi ve birleştirilmesi işlemlerini kapsayan teknoloji rekombinant DNA teknolojisidir. Elde edilen rDNA'nın ekspresyonuyla üretilen protein de rekombinant protein olarak adlandırılmaktadır.

1970'li yılların ortalarında gelişmeye başlayan rekombinant DNA teknolojileri ile birlikte, mikroorganizmaların, doğal halleri ile üretmedikleri peptit ve/veya proteinleri üretir hale gelmeleri mümkün kılınmıştır. Endüstriyel olarak çeşitli konukçu organizmalar kullanılarak üretilen rekombinant proteinlerin, özellikle gıda, tarım ve sağlık sektörlerinde kullanımını giderek artış göstermektedir. Yıllar içerisinde, sürekli artış gösteren rekombinant protein ihtiyacını karşılayabilmek için çok çeşitli heterolog ekspresyon sistemleri geliştirilmiştir. Bu sistemler arasında, mayalar, prokaryotik organizmalara göre, ökaryotik proteinlerin translasyon sonrası modifikasyonlarını gerçekleştirebilmek gibi bazı avantajlar sunmaktadır (Cregg vd 2007).

Son yıllarda, özellikle endüstriyel ve tıp alanlarında rekombinant protein üretimi oldukça önem kazanmıştır. Rekombinant protein üretimi sırasında üretim seviyesi ve kalitesi konukçu mikroorganizmanın fermentasyon mekanizmasına bağlı olarak önemli ölçüde değişim göstermektedir. Fermentasyon metodunun optimum şartlarda yürütülmesi ve fermentasyonun yüksek verimlilik ve kalitede sonuçlanması için rekombinant protein üretiminde kullanılan konukçu mikroorganizmaların metabolizmalarının iyi bilinmesi gerekmektedir. Bu sebeple yapılan çalışmalar, özellikle karbon kaynağını kullanım mekanizması ve farklı karbon kaynaklarının mikroorganizmanın metabolizmasındaki etkileri üzerine yoğunlaşmıştır (İnan ve Meagher 2001a, İnan ve Meagher 2001b).

*P. pastoris* özellikle endüstriyel alanda rekombinant protein üretimi için mükemmel özelliklere sahip konukçu organizmalardan biridir (Daly ve Hearn 2005,

Jungo vd 2007). *P. pastoris*'de bugüne kadar 550 'nin üzerinde rekombinant proteinin üretimi gerçekleştirilmiştir. *P. pastoris*'de anjiyoödeme karşı üretilen rekombinant bir protein olan KALBITOR® (ecallantide) FDA (US Food and Drug Administration) tarafından onaylanmıştır (Anonim 2009). Buna ilaveten, *P. pastoris* GRAS (Generally Regarded as Safe) statüsünde olmamasına rağmen, *P. pastoris*'te üretilen bir enzim preparatının GRAS statüsünde olduğu FDA tarafından kabul edilmiştir (Anonim 2006).

Bu çalışmanın amacı, moleküler teknikler kullanılarak *P. pastoris* JC304 (*adeI*, *his4*) okzotrofik suşundan alkol oksidaz (*AOX1* ve *AOX2*) genleri inaktif edilmiş mutant *P. pastoris* suşunun elde edilmesidir. Ayrıca bu suşun rekombinant protein üretiminde konakçı organizma olarak kullanılabilirliğinin model bir protein olan EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) üretimi ile araştırılmasıdır.

EGFP kullanımının önemli avantajı belirli bir dalga boyundaki UV ışık altında floresan özellik sergilemesidir. Özellikle hücre dışı EGFP, proteaz enzimine dirençli stabil bir proteindir ve sadece ekstrem koşullar altında denatüre olmaktadır (Brejc vd 1997). İlk kez 1962 yılında *Aequorea Victoria* isimli bir deniz anasında gözlenen bu protein, modern biyolojinin en önemli araçlarından biri haline gelmiştir. Bu çalışmada da mutant suş ve kontrol suşları ile üretilen EGFP'nin floresanlık değerleri karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucunda mutant suşun kararlı üretim gösteren rekombinant protein üretimlerinde konakçı olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır.

## 2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI

### 2.1. *Pichia pastoris*

Metilotrofik bir maya olan *P. pastoris* rekombinant protein üretiminde kullanımı oldukça yaygın olan bir ökaryotik konukçu sistemdir (Higgins ve Cregg 1998). *P. pastoris* yabancı proteinlerin üretiminde gerek akademik olarak gerekse endüstriyel boyutta oldukça fazla ilgi gören bir organizmadır (Cereghino and Cregg 1999, 2000). Aynı zamanda, *P. pastoris*'in peroksizom biyosentez kontrol mekanizması ve karbon kaynağı kullanım ile ilgili üzerinde yoğun şekilde çalışılan model bir sistemdir (Waterham vd 1997; Subramani 1998).

Rekombinant protein ekspresyon sistemleri içerisinde, prokaryotik ekspresyon (örn. *Esherichia coli*) sistemleri genellikle ekonomik olduğu için diğer ekspresyon sistemlerine (maya, böcek, Chinese Hamster Ovary (CHO)) göre daha fazla tercih edilirler. Fakat prokaryotik sistemlerde ökaryotik orijinli proteinler üretildiği zaman bazı durumlarda biyolojik aktivitelerini kaybedebilirler ve inklüzyon cisimcikleri oluştururlar. Buna karşın, ökaryotik ekspresyon sistemi olarak kullanılan mayalar, ökaryotik proteinler için elzem olan translasyon sonrası biyokimyasal reaksiyonları da (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. Cos vd (2006) rekombinant protein üretimlerinde yaygın olarak kullanılan *P. pastoris*'in endüstriyel üretimde kullanılacak fenotipleri, çeşitli promotorları, kültür besiyeri ve işlem basamakları hakkında bir derleme hazırlamıştır.

Mikrobiyal ökaryotik konukçu sistemi olarak *P. pastoris*, hem zengin olmayan (minimal media) besiyerinde üretildiğinde yüksek hücre yoğunluklarına ulaşılabilenkte, hem de metanol kullanımı için gerekli olan alkol oksidaz gibi enzimlere yüksek gereksinim duymaktadır. Ayrıca çok kuvvetli ve katı denetimde bulunan promotorlara (*AOX1*) sahip olduğu için rekombinant protein üretiminde de avantaj sağlamaktadır (Porro vd 2005). Rekombinant protein üretiminde konukçu suş olarak bu avantajlar şu

şekilde sıralanabilir; *Pichia pastoris* de son 20 yıl süresince bu şekilde geliştirilen ve heterolog protein üretimi amaçlı gen aktarımları için tercih edilen konukçu organizmalardan biri haline gelen, metanolü karbon kaynağı olarak değerlendirebilen bir maya türüdür (Zhang vd 2005). *P. pastoris* kullanımının sağladığı bazı avantajlar şöyle sıralanabilir; (1) verimli ve sıkı denetim altında çalışan *AOX1* promotorunun mevcut oluşu, (2) glikozilasyonun genellikle en fazla 20 adet kalıntı ile ve nispeten daha kısa zincirli N bağlı yüksek-mannozlu oligosakaritlerle gerçekleşmesi, (3) entegrasyonu sağlanan genlerin çoklu kopyalar halinde bulunduğu kararlı yapıda transformantların elde edilebilmesi, (4) yabancı proteinleri yüksek seviyelerde salgılayabilme yeteneği ve (5) yüksek hücre yoğunluklu üretime uygunluğu ve ölçek büyütmenin kolay oluşudur (Demain 2005).

## 2.2. Metanol Metabolizması ve Metanol Kullanım Fenotipleri

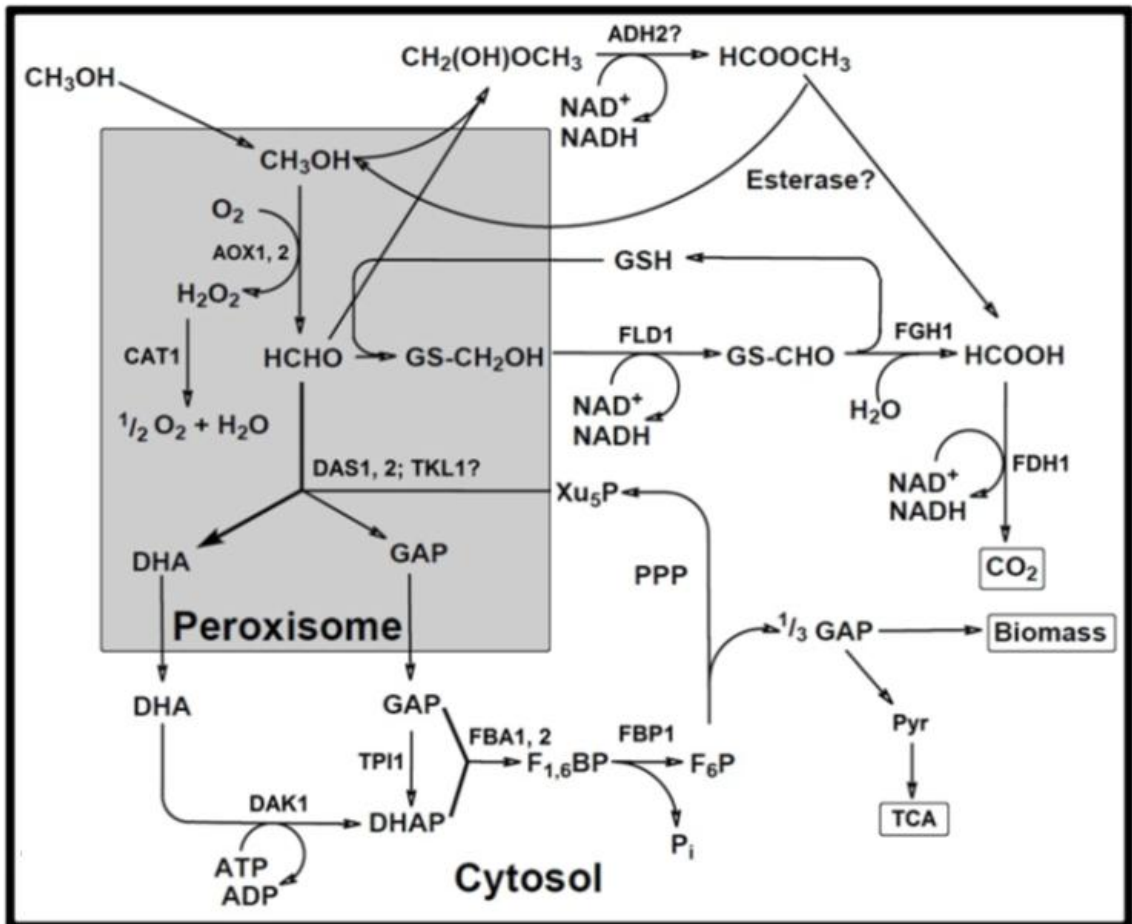
Metanol kullanım yeteneklerine göre 3 tip *P.pastoris* konukçu suşu bulunmaktadır. Çoğu suş metanolde doğal tip oranında gelişir ( $Mut^+$ , metanol kullanımı pozitif fenotip). Diğer konukçu suşların ( $Mut^s$  ve  $Mut^-$ ) bir veya iki *AOX* geni de silinmiştir. Bazen *AOX* genleri silinmiş suşlar, doğal tip suşlardan daha iyi yabancı protein üreticisi olabilmektedir (Veenhuis vd 1983, Tschopp vd 1987). Ayrıca bu suşlar ekspresyon tetiklemesi için daha az metanol gerektirmektedir. Bu, yüksek miktarda metanolün yangın tehlikesi yarattığı yerlerde, büyük ölçekli fermentasyonlar için avantajdır.

Metilotrofik mayalarda, ekspresyonu transkripsiyon seviyesinde sıkı şekilde kontrol edilen benzersiz bir metanol kullanım izyolu bulunmaktadır. Bu izyolunun bir kısmı peroksizomlarda gerçekleşmektedir. Bu organeller metanol tetiklemesi ile hızla artmaktadır (Hartner ve Glieder 2006).

Metanol kullanımında, izyolunun ilk aşamasında metanol, alkol oksidazlar (*AOX*, EC 1.1.3.13) tarafından oksitlenir, formaldehit ve hidrojen peroksit açığa çıkar. Toksik hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), katalaz (Cat, EC 1.11.1.6) enzimi ile oksijen ve suya yıkımlanır. Her iki enzim de peroksizomlarda bulunmaktadır. Tüm ökaryotlarda bulunan peroksizomların tipik özelliği, birbirleri ile çok alakalı olan, hidrojen peroksit

üreten oksidazların ve açığa çıkan bu toksik maddeyi yıkımlayan katalazların varlığıdır. Bu sayede, bu zararlı bileşiğin sitoplazmaya difüzyonu engellenmektedir (Veenhuis vd 2006).

Oluşan formaldehit ise iki yoldan birini izlemektedir. Bir kısmı peroksizomdan ayrılır, sitoplazmada bulunan formaldehit dehidrogenaz (*FLD*) veya format dehidrogenaz (*FDH*) tarafından oksitlenerek, hücreye enerji sağlanır. Kalan formaldehit ise ksiluloz-5-fosfat ile, bir peroksizom enzimi olan dihidroksiaseton sentaz (*DHAS*) tarafından katalizlenen kondensasyon reaksiyonuna girer ve 3-karbonlu iki bileşik: dihidroksiaseton (*DHA*) ve gliseraldehit-3-fosfat (*GAP*) oluşur. Bu bileşiklerin metabolize edilmesi sitozolde devam eder (Veenhuis vd 2006).



Şekil 2.1. *P. pastoris*'te metanol kullanım izyolu (Krainer vd 2012).

Genelde, metanol izyolunun ekspresyonunu glikoz ve etanol baskılamakta, metanol ise güçlü şekilde tetikleemektedir. Metilotrofik mayaların *AOX* genleri üzerine, karbon kaynaklarının represyon veya derepresyon etkisi tabloda görülmektedir. Derepresyonun etkisi ve seviyesi metanol ile tetiklenmiş seviyelere göre verilmiştir. Her bir genin metanol ile indüksiyonu %100 olarak kabul edilmiştir (Hartner ve Glieder 2006).

Çizelge 2.1. Metilotrofik mayalarda karbon kaynaklarının *AOX* geni üzerine represyon ve derepresyon etkisi (Hartner ve Glieder (2006)'ın çalışmasından birebir alınmıştır).

Suş	Gen	Glukoz, Etanol	Gliserol	Metanol	Gliserol+Metanol
<i>P. pastoris</i>	<i>AOX1</i>	Represyon	Represyon	İndüksiyon	Represyon
	<i>AOX2</i>	Represyon	Represyon	İndüksiyon	Represyon
<i>H. polymorpha</i>	<i>MOX</i>	Represyon	Derepresyon (~ %60-70)	İndüksiyon	İndüksiyon (~ %100)
	<i>FMD</i>	Represyon	Derepresyon (~ %60)	İndüksiyon	İndüksiyon
<i>C. boidinii</i>	<i>AOD1</i>	Represyon	Derepresyon (~ %3-30)	İndüksiyon	İndüksiyon (~ %90)
	<i>FLD</i>	Aktivite yok	Derepresyon (~ %20)	İndüksiyon	İndüksiyon (~ %70)
	<i>FDH</i>	Represyon	Aktivite yok	İndüksiyon	İndüksiyon (~ %30)
<i>P. methanolica</i>	<i>DAS</i>	Represyon	Derepresyon (~ %2)	İndüksiyon	İndüksiyon (~ %70)
	<i>MOD1</i>	Represyon	Derepresyon (~ %60-70)	İndüksiyon	İndüksiyon (~ %100)
	<i>MOD2</i>	Represyon	Aktivite yok	İndüksiyon	İndüksiyon (~ %100)
	<i>FLD</i>	Aktivite yok	Derepresyon (~ %20)	İndüksiyon	İndüksiyon (~ %70)

### 2.3. Rekombinant Protein Üretiminde Kullanılan *Pichia pastoris* Promotorları

Heterolog protein üretiminde *P. pastoris* ekspresyon sistemlerinin kullanımı, kolay genetik manipulasyon olanağı ile birlikte ölçeklendirilebilir hücre yoğunluklarına da ulaşılabilmesini sağlar. *S. cerevisiae* ile karşılaştırıldığında, *P. pastoris* sisteminde, daha



iyi bir sekresyon verimi yanı sıra daha yüksek miktarlarda doğru katlanmış ve glikozillenmiş rekombinant protein üretimi gerçekleştirilir (Cereghino ve Cregg 2000, Macauley-Patrick vd 2005). Bunun yanında, çok güçlü tetiklenebilir *AOXI* ve yapısal *GAP* gibi promotorlara sahip vektörlerin varlığı, rekombinant protein üretiminde konakçı-vektör dizaynı yaparken çok büyük esneklik ve kolaylıklar sağlamaktadır.

*P. pastoris* mayası besiyerinde gelişimi sırasında çok farklı karbon kaynaklarından yararlanabilmektedir. Başta glukoz ve metanol olmak üzere gliserol, etanol, mannitol, sorbitol, trehaloz, alanin vb. karbon kaynaklarını kullanabilmektedir. Ancak bazı karbon kaynaklarının ortamda bulunması (glukoz, etanol, gliserol, asetat) diğer karbon kaynaklarının (metanol) kullanımını baskılamaktadır (Tshopp vd 1987, İnan ve Megaher 2001a). Fakat sorbitol, mannitol, trehaloz ve alaninin *AOXI* promotoru üzerine katabolit represyonu etkisi yapmadığı gözlenmiştir (İnan ve Meagher 2001a). *P. pastoris* ve diğer metilotrofik mayalarda katabolit represyonu ve alkol oksidaz aktivitesi üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde, glukoz ve etanolün ortamda bulunmasının alkol oksidaz aktivitesi üzerine baskılayıcı etki yaptığı ortaya konulmuştur. Ayrıca bu baskılayıcı etkinin katabolit represyonu ve katabolit inaktivasyonu olmak üzere iki farklı regülasyon mekanizması tarafından gerçekleştiği bildirilmiştir (Bruinenberg vd 1982, Eggeling ve Sahn 1980, Veenhuis vd 1983). Van Der Klei vd (1991) *Hansenula polymorpha* (*P. angusta*) mayasında *AOXI* promotorunun glukoz ve etanol tarafından baskılandığını, Cregg vd (1989) ise benzer şekilde *P. pastoris*'in metanol tarafından indüklenen *AOXI* promotorunun, glukoz, etanol ve gliserol gibi karbon kaynakları tarafından baskılandığını belirtmişlerdir. Fakat *GAP* promotoru kontrolü altında yapılan rekombinant protein ekspresyonu sırasında üretilen bir miktar etanolün *AOXI* promotorunun tersine, *GAP* promotoru üzerine her hangi bir represif etkisinin olmadığı, hatta *GAP* promotoru kullanılarak yapılan rekombinant protein üretiminde ekspresyon seviyesinin arttığı belirtilmiştir (Baumann 2008). Sonuç olarak, rekombinant protein üretiminde *AOXI* promotorunun kullanımının en önemli avantajı, *AOXI* promotorunun indüksiyonu sonucu yüksek hücre yoğunluklarına çıkılması nedeni ile yüksek verimlilik ile sonuçlanan rekombinant proteinin üretimini gerçekleştirebilmesidir. Yapısal ekspresyon gösteren *GAP* promotoru ile yapılan rekombinant protein üretiminde *AOXI* promotoruna göre verim daha düşük olmaktadır. Sonuç olarak güçlü ekspresyon

gösteren ve katı denetimde bulunan *AOX1* promotörü rekombinant protein üretiminde daha fazla tercih edilmektedir.

*P. pastoris*'te rekombinant protein üretiminde yaygın olarak kullanılan diğer bir promotör da *GAP* promotörüdür. *GAP* promotörü, *AOX1* promotörüne göre glukoz içeren ortamda güçlü yapısal ekspresyon gösterir. Gliserol ve metanolde gelişen hücrelerin *GAP* promotör aktivite seviyesi, glukozda gelişen hücrelere göre sırasıyla 2/3 ve 1/3 seviyesindedir. *GAP* promotörü kullanımının avantajı induksiyonu için metanol gerektirmemesidir. Ayrıca kolay gelişim için bir karbon kaynağından başka bir karbon kaynağına değişime ihtiyaç duyulmamaktadır. Fakat *GAP* promotörü yapısal (constitutive) olarak ifade edildiği için, maya hücresine toksik olan bir proteinin üretimi için iyi bir seçim değildir (Cereghino ve Cregg 2000).

*P. pastoris*'te kullanımı yaygın olmayan ancak alternatif promotör olarak kullanılabilen farklı promotörler da bulunmaktadır. *FLD1* promotörü (tek karbon kaynağı olarak) metanol yada (tek azot kaynağı olarak) metilamin varlığında tetiklenir (Shen vd 1998). *FLD1* promotörünün metanol ile induksiyon seviyesi kullanılan azot kaynağına bağlıdır (Resina vd 2004). Karbon kaynağı- azot kaynağı: metanol-amonyum sülfat ya da glukoz-metilamin olarak düzenlenir. Fakat Glukoz ve amonyum sülfat içeren besiyerinde baskılanır. Ucuz bir azot kaynağı olan metilamin ile yüksek seviyede protein ekspresyonu için bu promotör önerilebilir. *PEX8* ve *YPT1* promotörleri daha düşük ekspresyon seviyeleri tercih edildiğinde kullanışlıdır (Brierley 1998). *PEX8* geni, peroksizom biyogenezi için gerekli olan, peroksizomal matriks proteinini kodlamaktadır (Liu vd 1995). Metanolde *PEX8* promotörü ile ekspresyonun seviyesi, *FLD1* ve *AOX1* promotörlerinden önemli oranda daha düşüktür. *YPT1* geni salgılamada rol alan GTPaz enzimini kodlamaktadır. *YPT1* promotörü, karbon kaynağı olarak glikoz, metanol veya mannitol içeren besiyerinde, düşük seviyede fakat yapısal ekspresyon sağlamaktadır (Sears vd 1998).

## 2.4. *Pichia pastoris* Seleksiyon Markırları

*P. pastoris* için klasik ve moleküler genetik teknikler oldukça iyi geliştirilmiş olmasına rağmen, mayaların moleküler genetik işlenmesi için sadece birkaç seçici markır tanımlanmıştır. Var olan markırlar biyosentetik izyolu genleri ile sınırlıdır. Bunlar, *HIS4* (*P. pastoris* ve *S. cerevisiae*), *ARG4* (*S. cerevisiae*), bakteriyel kanamisin direnç geni (*kan<sup>R</sup>*) ve zeosin direnç genleridir.

Son zamanlarda, *P. pastoris*'ten yeni biyosentetik markırlar izole edilerek ve karakterize edilmiştir. Bunlar; *ADE1* (PR-amidoimidazole succinocarboxamide synthase), *ARG4* (argininosuccinate lyase) ve *URA3* (orotidine 5'-phosphate decarboxylase) genleridir. Bu seleksiyon markırlarının her biri ekspresyon vektörlerine uyarlanarak kullanımı mümkün olmuştur (Cereghino vd 2001b).

## 2.5. Seleksiyon Stratejisi

Doğru transformantların belirlenmesinde etkili bir seleksiyon stratejisi olarak bu farklı markırların kombinasyonları kullanılmaktadır. *P.pastoris* transformantlarının etkin seleksiyonunun önemli yönü çoklu kopya transformantların seçilmesidir ve sonra gerçek kopya sayılarının belirlenmesidir. Transformantları görüntülemek için, hücre lizatlarının hızı ve yarı kantitatif DNA Dot Blot metodu kullanılabilir. Bu seleksiyon yöntemi G418 ile seleksiyondan farklıdır. Bu metotla çok yüksek sayıda klon tanımlanabilir (Sreerishna vd 1988).

Vektörün kesin kopya sayısını belirlemek için transformasyon işlemi yapılmış suşlardan, ilk olarak toplam genomik DNA izolasyonu yapılır. Sokulmuş vektör DNA'sının kromozomal yapısını belirlemek için Southern Blot analizi kullanılır. Bazen, kantitatif Dot-Blot analizi daha doğru sonuçlar vermektedir (Clare vd 1991). Bazen de, ifade edilen protein için iyi bir analiz mevcutsa, transformantların önce yüksek ekspresyon görüntülemeleri ile direkt olarak seleksiyonu yapılabilir (Laroche vd 1994).

## 2.6. Ekspresyon Suşları

Rekombinant protein üretimlerinde ve konukçu sistemler üzerine çalışmalarda kullanılan *P. pastoris* suşları çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2. *P. pastoris* konakçı suşları (Cregg 2007)

Suş Adı	Genotipik yapısı
<b>Okzotrofik suşlar</b>	
Y-11430	Doğal tip (NRRL*)
X-33	Doğal tip (Invitrogen)
GS115	<i>his4</i>
GS190	<i>arg4</i>
JC220	<i>ade1</i>
JC254	<i>ura3</i>
GS200	<i>arg4 his4</i>
JC227	<i>ade1 arg4</i>
JC304	<i>ade1 his4</i>
JC305	<i>ade1 ura3</i>
JC306	<i>arg4 ura3</i>
JC307	<i>his4 ura3</i>
JC300	<i>ade1 arg4 his4</i>
JC301	<i>ade1 his4 ura3</i>
JC302	<i>ade1 arg4 ura3</i>
JC303	<i>arg4 his4 ura3</i>
JC308	<i>ade1 arg4 his4 ura3</i>
YJN165	<i>ura5</i>
KM71	$\Delta$ <i>aox1</i> : :SARG4 <i>his4 arg4</i>
KM71H	$\Delta$ <i>aox1</i> : :SARG4 <i>his4 arg4 his4::PHIS4</i>
MC100-3	$\Delta$ <i>aox1</i> : :SARG4 $\Delta$ <i>aox2</i> : : <i>Phis4 his4 arg4</i>
<b>Proteaz eksikliği olan suşlar</b>	
SMD1168	$\Delta$ <i>pep4</i> : :URA3 <i>his4 ura3</i>
SMD1165	<i>prb1 his4</i>
SMD1163	<i>pep4 prb1 his4</i>
SMD1168 <i>kex1</i> : :SUC2	$\Delta$ <i>pep4</i> : :URA3 $\Delta$ <i>kex1</i> : :SUC2 <i>his4 ura3</i>
<b>Diğer suşlar</b>	
GS241	<i>fld1</i>
MS105	<i>his4 fld1</i>

\*Northern Regional Research Laboratories, Peoria, IL.

Çizelge 2.2’de bulunan tüm okzotrofik ve proteaz eksikliği olan *P. pastoris* suşları doğal tip olan NRRL-Y 11430 suşundan türetilmiştir. Bu suşların çoğu bir veya daha fazla okzotrofik özelliğe sahiptir. Okzotrofik olmaları seçici markır içeren uygun

vektörler kullanılarak transformantların seçimini mümkün kılmaktadır. Ancak bu özelliğe sahip suşların minimal besiyerinde gelişmesi için ortamda ihtiyaç duyulan besin(ler)in bulunması gerekmektedir. Rekombinant protein ekspresyonlarında en yaygın olarak kullanılan ekspresyon konukçusu *P. pastoris* GS115 (*his4*) suşudur. Bu suş *AOX1* ve *AOX2* genleri bakımından doğal tip oranında metanolde gelişme göstermektedir ( $mut^+$ ) (Cregg vd 1985). *P. pastoris* KM71 (*his4 arg4 aox1Δ : SARG4*) suşunun kromozomal *AOX1* geni geniş olarak silinmiş ve yerine *S. cerevisiae*' dan *ARG4* geni yerleştirilmiştir (Cregg ve Madden 1987). Sonuç olarak bu suşun alkol oksidaz üretimi için daha güçsüz olan *AOX2* geni çalışmaktadır ve metanolde yavaş oranda gelişmektedir ( $Mut^s$ ). *P. pastoris* KM71 suşuna bozuk olan *HIS4* geni geri kazandırılarak KM71H suşu elde edilmiştir. Proteaz eksikliği olan suşlar, üretilen rekombinant proteinlerin degradasyonunu önlemeye yönelik geliştirilmiştir. *P. pastoris* MC100-3 (*his4 arg4 aox1Δ::SARG4 aox2Δ::Phis4*) her iki *AOX* geni de inaktif edilmiş suştur ( $Mut^s$ ). Bu suş, Cregg vd'nin (1989) yaptıkları bir çalışma ile *P. pastoris* PPF1 (*arg4 his4*) ve *P. pastoris* KM7121 (*arg4 his4 Δaox1::SARG4 Δaox2:-PHIS4*) suşlarının çiftleştirilmesi sonucu elde edilmiştir. Ancak MC100-3 suşu dahil bütün *P. pastoris* suşlarının *AOX1* promotörü ile indüklenen rekombinant protein üretebilme yeteneklerini koruduğunu belirtmişlerdir (Chiruvolu vd 1997). MC100-3 mutant suşunun genetik stabilitesinin çok düşük olması nedeniyle rekombinant protein üretimlerinde konukçu suş olarak tercih edilmemektedir.

*P. pastoris* ile yapılan protein üretimlerinde üretilmek istenen proteinin kararlılığına göre proteaz eksikliği olan konukçu suşlara ihtiyaç duyulmaktadır. Kültür besiyerine salgılanan rekombinant proteinler, proteazlar tarafından hızlı bir şekilde parçalanmaya müsait oldukları için stabil değildirler. Kofullarda bulunan proteazlar ise özellikle fermentör kültürlerinde yüksek hücre yoğunluğuna ulaşılmasına bağlı olarak, küçük bir oranda hücre lizatının oluşması ile birlikte, protein degradasyonunda önemli bir faktör olarak ortaya çıkmaktadır. *P. pastoris* *PEP4* geni, proteinaz A enzimini kodlayan gendir. *PEP4*, kofullarda bulunan diğer proteazların (karboksipeptidaz Y ve proteinaz B) aktivasyonu için gerekmektedir. Proteinaz B, proteinaz A tarafından işlenmeden ve aktif hale gelmeden önce yarısı kadar aktiviteye sahiptir. *PRB1* geni proteinaz B enzimini kodlamaktadır. Bu yüzden, *pep4* mutant suşlarda, proteinaz A ve

karboksipeptidaz Y aktiviteleri azalmıştır yada sona ermiştir; proteinaz B aktivitesi azalmıştır. *prb1* mutantlarında, sadece proteinaz B aktivitesi sona ermiştir. *pep4 prb1* çift mutantlarında, tüm bu proteaz aktiviteleri azalmıştır yada sona ermiştir. *PEP4* veya *PRB1* gen(ler)i silinmiş farklı genotiplerde üç *P. pastoris* suşu bulunmaktadır. Bu suşlar, *P. pastoris* SMD1163 (*his4 pep4 prb1*), *P. pastoris* SMD1165 (*his4 prb1*) *P. pastoris* SMD1168 (*his4 pep4*) suşlarıdır ve bazı yabancı proteinlerin degradasyonunu azaltmada etkili olduğu belirlenmiştir.

## **2.7. Ekspresyon Vektörleri, Transformasyon ve *Pichia pastoris* Genomuna Entegrasyonu**

*P. pastoris*'de yabancı bir genin ekspresyonu 3 temel aşamada gerçekleşir: (a) Ekspresyonun vektörüne genin sokulması, (b) ekspresyon vektörünün *P.pastoris* genomuna sokulması ve (c) yabancı geni potansiyel olarak ekspres eden suşların seçilmesidir (Lin-Cereghino vd 2001a).

Tüm *P. pastoris* ekspresyon vektörlerinin paylaştığı temel özelliklerden biri ekspresyon kasetidir. Ekspresyon kaseti, promotor sekansı (genelde *AOXI*), transkripsiyonel sonlandırma sekansından oluşur ve *AOXI*'in türevidir. Ayrıca sonlandırma sekansı etkili bir 3' işleme ve mRNA'ların poliadenilizasyonunu yönetir. Bu iki bölgenin arasında bulunan tek veya çoklu klonlama bölgesinden oluşmaktadır (Romanos vd 1992).

Yabancı sekansın ekspresyon vektörüne sokulması genelde *E.coli*'de yapılmaktadır. Bu yüzden *P.pastoris*'in tüm ekspresyon vektörleri *E. coli/P. pastoris* mekik (shuttle) vektörüdür. Bakteride kalabilmesi için bakteriyel replikasyon orijini içerir ve her iki organizmada (*E. coli* ve *P. pastoris*) vektörün transformasyonu için seçici markırlar (zeosin, amfisilin veya kanamisin direnç genleri) içerir.

Yabancı proteinlerin salgılanması için bazı ekspresyon vektörleri salgılama sinyalini kodlayan sekanslar içerir. Bunlar yabancı gen ile aynı çerçeve içindedir. Genellikle bu

salgılama sinyalleri; *P. pastoris* asit fosfataz (PHO1) ve *S. cerevisiae*  $\alpha$ -çiftleşme faktörü ( $\alpha$ -MF) olmaktadır.

*P. pastoris*'in DNA aracılığıyla transformasyonu için kullanılan metotlar, *S. cerevisiae* için kullanılanlara benzerdir ve benzer sonuçlar vermektedir.

*P. pastoris*'e transformasyon sferoplast kaynaşması ile, elektroporasyon gibi tam hücre metotları ile veya lityum klorit, lityum asetat, kalsiyum klorit veya polietilen glikol ile DNA'nın eşzamanlı presipitasyonu metotlarıyla sağlanabilir. Elektroporasyon *P. pastoris* transformasyonu için basit ve hızlı bir metottur. Sferoplast tekniğine göre daha az sıklıkla çoklu kopya vermesine rağmen, G418 seleksiyon ile kombine edildiğinde genel laboratuvar kullanımı için çoklu kopyalı transformantların hızlı izolasyonu için idealdir.

Pratikte elektroporasyon/G418 seleksiyon metodu en iyi *AOX1* tek çaprazlama entegrasyon kullanılarak, KM71 suşunda çalışır. Çünkü bu suşla, 2-4 kat daha yüksek transformant frekansı elde edilmektedir (1000-2000 koloni/ $\mu$ g DNA).

Elektroporasyonla elde edilen transformasyon frekansı; (gene replacement) gen değişimi ile entegrasyonda, tek çaprazlama metotuna göre 20 kat daha düşüktür. Bu yüzden gen değişim ile entegrasyonda, özellikle çok yüksek kopya sayılı transformantlar gerektiğinde, sferoplast transformasyon önerilmektedir.

İlk ve en basit olan entegrasyon metodu, vektörü, markır gen veya *AOX1* promotor sekansları içinden, bir restriksiyon enzimi ile tek bir bölgeden kesmek ve doğrusal hale getirilmiş bu vektörü uygun okzotrofik mutant suşa (*his4*<sup>-</sup>) aktarmaktır. DNA bölgelerinin vektörü uyarması sonucu yüksek olasılıkla (*HIS4* transformantların %50-80'i) tek çaprazlama ile homolog rekombinasyon gerçekleşmektedir. Geriye kalan transformantlar, gen dönüşüm olaylarına uğrarlar. Bu şekilde, vektörün diğer sekansları haricinde sadece markır geni, mutant konukçuya sokulmaktadır. Alternatif olarak *P.pastoris* ekspresyon vektörü benzer şekilde kesilir ve elde edilen doğrusal DNA fragmentlerinde ekspresyon kaseti ve markır gen (*HIS4* veya antibiyotik geni), *AOX1* 5'

ve 3' terminal sekansları arasına dahil edilmektedir. Transformantların önemli bir oranı entegrasyonu istenen *AOX1* gen lokusunda ekspresyon vektörünü içermeyebilir. Transformant kolonilerde, istenilen genin varlığı “Southern Blot” veya “PCR analizleri”; yabancı mRNA ekspresyonunun varlığı Northern Blot; proteinlerin varlığı ise immunoBlot veya fonksiyonel deneyler ile mutlaka doğrulanmalıdır.

## 2.8. *Pichia pastoris* Fermentasyonu

Fermentasyon, salgılanan protein miktarı için gereklidir çünkü verim, hücre yoğunluğuna büyük ölçüde bağlıdır. Bazen fermentasyon ortamında, çalkalamalı inkübasyonla ekspresyona göre 10 kata kadar ciddi bir verim artışı gözlenebilir.

*P. pastoris* fermentasyonunda kesik faz, yarı kesikli faz, geçiş fazı ve üretim fazı olarak genellikle dört aşamalı fermentasyon uygulanmaktadır. Kesikli fazda, temel tuzlu besiyeri (basal salts medium, BSM) ve 4.55 mL/L PTM1 tuzlarından oluşan besiyeri kullanılmaktadır. BSM besiyerinin içeriği, litrede, 40 g 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 şeklinde olmaktadır. PTM1 tuzlarının içeriği Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 2.3. 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



Besiyerinin pH'sı PTM1 tuzlarının ilavesinden sonra ayarlanmaktadır. Kesikli faz sonunda 100g/L civarında bir (yaş) hücre yoğunluğuna ulaşılması hedeflenmektedir. Gliserolün tükenmesi, çözünmüş oksijen miktarındaki ani ve keskin bir artışla tespit edilmekte, bu noktadan sonra yarı kesikli fazda üretime geçilmektedir.

Yarı kesikli fazda, kesikli fazda fazında kullanılan karbon kaynağı gliserol, ikincil metabolitlerin değerlendirilmesini (kullanımını) en üst seviyelerde tutabilmek için kısıtlı seviyelerde tutularak beslenilmektedir.

Geçiş fazı, yaklaşık olarak üç saatlik süreyi kapsamaktadır. 1 g/L metanol ilave edilmekte ve ortamda bulunan gliserol beslemesi bu üç saat boyunca doğrusal olarak azaltılmakta ve sıfıra indirilmektedir. Gliserolün bitmesi ile hücreler ortamdaki tek karbon kaynağı olan metanole adapte olmakta, alkol oksidaz (AOX) sentezine başlamakta ve istenilen rekombinant proteinin üretimine hazırlanması sağlanmaktadır.

Üretim fazında ise, metanol beslemesi suşun fenotipine bağlı olarak gerçekleştirilir. Genellikle 2 mL/L olacak şekilde besleme yapılmaktadır. Metanol beslemesi doğrusal veya üreme hızına bağlı olarak üssel olarak yapılmaktadır. Bazı durumlarda sadece metanol beslemesi yerine karma besleme (gliserol:metanol, sorbitol:metanol) tercih edilmektedir (Zhang vd. 2007, Sohn vd. 2010).

## **2.9. EGFP (enhanced green fluorescent protein)**

Yeşil floresan proteini, Shimomura vd (1962) tarafından Pasifik sahillerinde yaşayan ve mavi ışık yayan *Aequoria victoria* deniz anasında keşfedilmiştir. Moleküler ağırlığı 27-30 kDa arasında değişen bu protein, 238 aminoasit molekülünden oluşmaktadır. Bu proteinin absorpsiyon spektrumu, 395 nm ve 470 nm'de olmak üzere iki maksimuma sahiptir. Floresans emisyon spektrumunun ise 509 nm'de pik yaptığı ve 540 nm'ye doğru düşüş gösterdiği görülür. EGFP, pH ve ısı değişimlerine karşı kararlı bir proteindir. Proteolitik sindirime karşı da oldukça dirençlidir. Bu sıradışı kararlılığı sıkı tersiyer yapısından kaynaklanmaktadır (Karaboz vd 2004).

*Aequorea victoria*'dan elde edilen EGFP'nin cDNA ve genomik klonlarının dizisini ilk olarak Prasher vd (1992) ortaya çıkarmıştır. EGFP'nin bakterilerde fonksiyonel olarak ekspres edilebilmesinin, hücre ve moleküler biyolojide ilgi çekici araştırmalara olanak sağlayacağını ise Chalfie vd (1994) göstermiştir.

Rekombinant DNA teknolojisinde, EGFP geninin markır (yada raportör) gen olarak kullanımı ilk olarak model organizmalar olan *E. coli* bakterisi ve *Caenorhabditis elegans* nematodunda (yuvarlak solucan) gösterilmiştir (Chalfie vd 1994). Bu tarihten sonra EGFP geni çeşitli organizmalarda (bakteri, maya, çeşitli memeliler vb.) raportör gen olarak kullanılmıştır. Bu sayede hücre içinde gözlenemeyen birçok olay ortaya çıkarılmıştır.

EGFP ile etiketlenen proteinler tanımlanıp yerleri belirlenebilmekte ve böylece hücre bağlantıları izlenebilir, gen ekspresyonu rapor edilebilir, protein-protein etkileşimleri gözlenebilir ve sinyal oluşturan olaylar ortaya çıkarılabilir duruma gelmektedir. Örneğin *Drosophila*'da, bicoid mRNA lokalizasyonu için gerekli exuperantia geninin üretimini belirlemek için Wang vd (1994) EGFP'yi kullanmışlardır. Hopkins vd (1995), EGFP'yi zebra balığı embriyolarının gelişimi sırasında gen ekspresyonun özelliklerini gözlemek için kullanmışlardır. Bir araştırmada (Chishima ve ark, 1997) ise insanlardaki karaciğer kanserinin metastazını izlemek için EGFP kullanılmıştır.

Bu çalışmada, yeni konukçu sistemin protein üretimini değerlendirmek için model bir protein olan EGFP kullanımının daha uygun olduğu düşünülmüştür. EGFP kullanımının en önemli sebebi stabil bir protein olması, verdiği floresans sayesinde kolay bir şekilde belirlenmesidir.

### 3. MATERYAL VE METOT

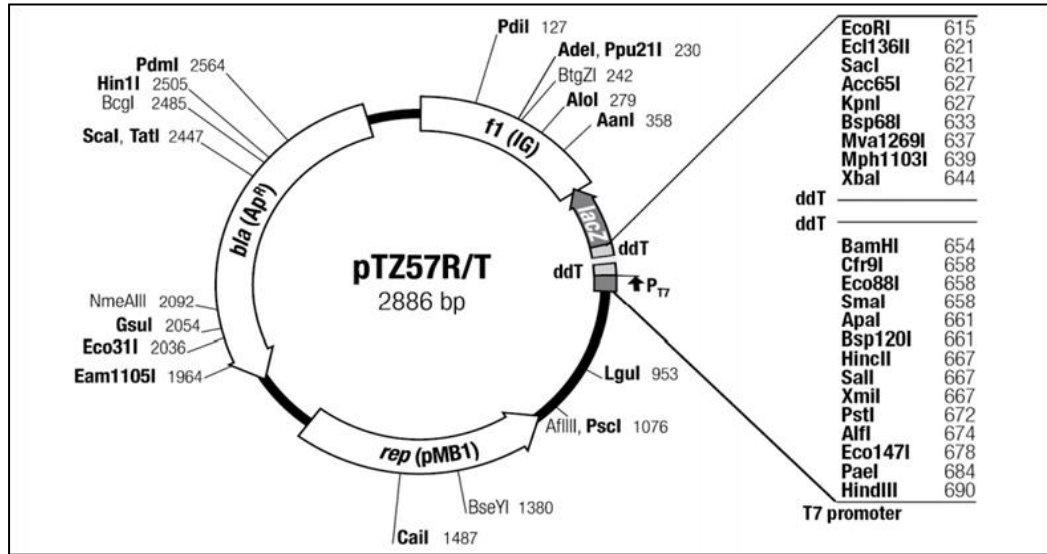
#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Konukçu suşlar ve plazmitler

Yapılan çalışmalarda plazmitlerin çoğaltılması amacıyla kimyasal transformasyona elverişli konukçu *E. coli* suşu olan DH5 $\alpha$  (Invitrogen, CA, ABD) kullanılmıştır. AOX geni inaktif suşların elde edilmesi için *P. pastoris* JC304 (*ade1, his4*), MK111 (*ade1::PADE1 his4*) ve MK201 (*his4::PHIS4 ade1*) suşları kullanılmıştır.

Ekspresyon çalışmaları için bu çalışma sonucunda elde edilen inaktif *P. pastoris* suşları ve bunlara ilaveten *P. pastoris* X33 ve KM71H (Invitrogen, CA, ABD) suşları kullanılmıştır.

PZR ürünlerinin klonlanmasında yapışkan uçlu DNA parçalarının ligasyonu için pTZ57R/T (Fermentas, MD, ABD) (Şekil 3.1) ve küt uçlu DNA parçalarının ligasyonu için pJET 1.2 (Fermentas, MD, ABD) (Şekil 3.2) klonlama vektörleri kullanılmıştır. EGFP proteininin ekspresyonu için *P. pastoris* pPICZ $\alpha$ A (Invitrogen, CA, ABD) (Şekil 3.3) ekspresyon vektörü kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Yapışkan uçlu PZR ürünlerinin klonlanmasında kullanılan pTZ57R/T plazmiti



### 3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler ve restriksiyon enzimleri

Çalışmada kullanılan restriksiyon endonükleazları ve bunların tampon çözeltileri Fermentas (MD, ABD) firmasından temin edilmiştir. Endonükleazlar kullanılırken üretici firmanın talimatları uygulanmıştır. Farklı şekilde belirtilmediği takdirde kullanılan kimyasalların tamamı Sigma-Aldrich (MO, ABD) ve Merck (Darmstadt, Almanya) firmalarından temin edilmiştir.

### 3.2. Metot

Çalışmalarda kullanılan moleküler biyoloji teknikleri Sambrook ve Russel (2001)'a göre gerçekleştirilmiştir. Buna ek olarak, *P. pastoris*'de klonlama çalışmalarında İnan vd (2007) kaynak olarak kullanılmıştır.

#### 3.2.1. Genomik DNA izolasyonu

PZR reaksiyonlarında ve Southern Blot uygulamalarında kullanılacak toplam genomik DNA izolasyonu maya hücrelerinden DNA izolasyonu için uygun MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit (Epicentre Biotechnologies, WI, ABD) kullanılmıştır.

Maya hücrelerinden DNA izolasyonu için YPD agar (%2 Pepton, %1 Yeast Extract, %2 Dekstroz, %2 Agar) üzerinde geliştirilen saf kültürdeki tek koloniden alınarak ekim yapılan ve bir gece 4 mL YPD sıvı besiyerinde geliştirilen kültürler kullanılmıştır. Çalkalamalı inkübatörde (Innova 44R, New Brunswick Scientific, NJ, ABD) inkübasyonu sonucu geliştirilen kültürden alınan 1.5 mL örneğin santrifüjlenmesi ile elde edilen hücre peleti kit talimatları doğrultusunda zimolaz enzimi içeren liziz solüsyonu ile muamele edilmiş ve maya hücre duvarının parçalanması sağlanmıştır. Daha sonra protein çöktürme çözeltilisi ile proteinler çöktürülerek uzaklaştırılmış ve süpernatantda bulunan DNA çöktürülerek TE tamponunda çözülmüştür. Genomik DNA izolasyonu aşamasında üretici firmanın sağladığı talimatlara uygun şekilde çalışılmış ve

bütün santrifüj işlemleri >10,000 rcf hızlarda Centrifuge 5424 (Eppendorf, Almanya) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen genomik DNA izolatları çalışmalarda kullanılmak üzere 4°C’de muhafaza edilmiştir.

### 3.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR-Polimerase Chain Reaction)

Çalışmalarda gerçekleştirilen tüm PZR reaksiyonları için TGradient (Biometra Biomedizinische Analytik GmbH, Almanya) thermocycler (ısı döngü cihazı) ve KOD HotStart DNA Polymerase (Novagen, Almanya) enzim kiti kullanılmıştır.

Kullanılan gradient PZR cihazında, reaksiyon için kullanılacak primerlerin bağlanma sıcaklık aralıkları, primerlerden düşük erime sıcaklığına sahip olan primerin bağlanma sıcaklığının ( $T_m$ )  $\pm 5^\circ\text{C}$  olacak şekilde programlanmıştır. Yürütülen çalışmada PZR analizlerinde kullanılan primerler ve bunlara ait bazı özellikler Ek 1’de verilmiştir.

PZR cihazında amplifikasyon basamağı için öngörülen süre beklenen PZR ürünün kbç cinsinden büyüklüğü göz önünde tutularak belirlenmiştir. Kapak sıcaklığı tepkime suresince  $99^\circ\text{C}$ ’de tutulmuş ve tepkime sonrasında tüplerin bekletileceği sıcaklık ise  $4^\circ\text{C}$  olacak şekilde ayarlanmıştır. Gradient PZR denemelerinde 35 döngü içeren düz program kullanılmıştır. Çizelge 3.1’de uygulanan döngü programı için uygulanan şartlar verilmiştir.

Çizelge 3.1. PZR ısı döngü programı için süre ve sıcaklık koşulları

Isı Döngü Program Akışı			
Sıra	Sıcaklık ( $^\circ\text{C}$ )	Süre (sn.)	Döngü Komutu
1	94	120	
2	94	30	
3	$T_m \pm 5$	30	
4	70	15-150	35 kere 2.’ye git.
5	72	300	
6	4	$\infty$	

Primerlerin optimum bağlanma sıcaklığı, PZR ürünleri %1'lik agaroz jelde 1×TAE tamponu içinde yürütüldükten sonra en yoğun tek bant halinde gözlemlendiği sıcaklık olarak belirlenmiştir. Daha sonraki reaksiyonlar tespit edilen bu optimum sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. PZR ürünleri klonlama çalışmalarında kullanılmadan önce MinElute PZR Purification Kit (Qiagen, CA, ABD) yardımıyla veya gerekli görülmesi halinde jelde yürütülüp hedef bant kesilerek MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen, CA, ABD) ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda uygun tampon çözelti içine elüsyon edilmiştir.

### 3.2.3. Agaroz jel elektroforezi ve jelin görüntülenmesi

*P. pastoris* genomik DNA izolasyonlarının kalitesi, PZR ürünlerinin varlığı ve doğruluğu, restriksiyon endonükleazlar ile yapılan kesim analizlerinin doğruluğunun kontrolünde agaroz jel elektroforezi kullanılmıştır. Agaroz jel hazırlanırken, 1×TAE tampon çözeltisine (Tris-Asetat-EDTA, 40 mM Tris, 20 mM asetik asit, 1 mM EDTA) %1 oranında agaroz (SeaChem, FMC Bioproducts, ME, ABD) ilave edilerek çözündürülmüştür. Hazırlanan bu çözeltiye 1µl/50 mL 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. Daha sonra elektroforez uygulaması ile DNA örnekleri jel içinde yürütülmüştür. Elektroforez uygulamaları 120V doğru akım altında, 45-90 dak süreyle gerçekleştirilmiştir. Agaroz jel içinde moleküler büyüklüklerine göre yatay bantlara ayrılan DNA molekülleri etidiyum bromür varlığında UV ışık (312nm) kaynağından yararlanılarak jel görüntüleme sistemi (Vilber Lourmant E-Box-VX2) ile görüntülenmiştir. Agaroz jel işemlerinde markır olarak (M) GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas) kullanılmıştır.

### 3.2.4. Ligasyon ve transformasyon işlemleri

Transformasyon işlemlerinde, CaCl<sub>2</sub> metodu ile kimyasal transformasyona yetenekli hale getirilmiş *E.coli* DH5 $\alpha$  suşu kullanılmıştır. Kimyasal transformasyon işlemleri buz üzerinde gerçekleştirilmiştir.

*E.coli* DH5 $\alpha$  suşu kimyasal transformasyona uygun hale getirilmesi için CaCl<sub>2</sub> metodu ile transformasyona yetenekli hale getirilmiştir. Buz üstünde tutulan hücelere 1-5  $\mu$ L plazmit çözeltisi veya ligasyon karışımı doğrudan ilave edilmiş ve 30 dak. süre ile inkübe edilmiştir. Hücelere 42°C'ye ayarlanmış ısı bloğunda (Techne Dri-Block DB-2D) 60 sn tutularak ısı şoku uygulanmış ve tekrar buz üzerinde 5 dak inkübe edilmiştir. Daha sonra 200  $\mu$ L sıvı Luria-Bertani (LB) Miller (5 g/L maya ekstraktı, 10 g/L pepton, 10 g/L NaCl) veya sıvı Luria-Bertani (LB) Lennox besiyerinden 5 g/L maya ekstraktı, 10 g/L pepton, 5 g/L NaCl ilave edilen hücelere, 1 saat süreyle 37°C'de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen hücre sıvısı 100  $\mu$ g/mL Amfisilin içeren LB Miller agar veya 25  $\mu$ g/mL Zeosin içeren LB Lennox agar petrilere yayma yöntemi ile ekilmiştir. Petriler bir gece 37 °C'de üremeye bırakılmıştır.

*P. pastoris* hücrelerinin elektroporasyona uygun hale getirilmesi için Lityum asetat metodu kullanılmıştır (Wu ve Letchworth, 2004). Maya hücrelerine yapılan elektrokimyasal transformasyonda hücelere buz üstünde bekletilerek çözündürülmüştür. Üzerine doğrusallaştırılmış hale getirilmiş DNA parçası veya plazmitlerden 1-10  $\mu$ L olacak şekilde ilave edilmiştir. Ardından buz üstünde bekletilerek soğutulmuş 2mm yüzey genişliğine sahip elektroporasyon kuvvetlerine aktarılmıştır. Eppendorf Eporator (Eppendorf Eporator 4309) cihazında 1500 V gerilimde ve 5 ms süre ile elektrotransformasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Akım uygulanan hücelere derhal buz üzerine alınarak 1 mL soğuk 1 M sorbitol çözeltisi ilave edilmiştir. Temiz 1.5 mL hacimli mikro santrifüj tüplerine alınan karışım 1 saat 30°C'de inkübe edildikten sonra 100  $\mu$ g/mL Zeosin ilaveli MD (1.34% YNB, Protein üretimi çalışmaları ve 2% dekstroz) veya MDH (1.34% YNB, 4 $\times$ 10<sup>-5</sup> % biotin, 2% dekstroz ve 4 $\times$ 10<sup>-3</sup> histidin) plakalarına



yayma ekim yapılmış ve transformasyon petripleri kolonilerin gelişimi için 2-3 gün süre ile 30°C'de inkübe edilmiştir.

Ligasyon işlemlerinde üretici firmanın önerdiği kullanım talimatları doğrultusunda plazmit ve ligasyonu yapılmak istenen DNA parçasının molar oranları 1:3 veya 1:5 olacak şekilde ayarlanmıştır. Tüm ligasyon reaksiyonları 15-25 µL toplam hacimde gerçekleştirilmiştir. Ligasyon işlemlerinde Fermentas (Fermentas, MD, ABD) ve Roche (Roche, Almanya) ligasyon kitleri kullanılmıştır.

### **3.2.5. Plazmit izolasyonu**

Plazmit izolasyonu yapılacak bakteriler 3-4 mL uygun antibiyotikli sıvı besiyerinde 37°C'de 18-24 saat geliştirilmiştir. Plazmit izolasyonu işlemlerinde QIAprep®Spin Miniprep Kiti (Qiagen, CA, ABD) kullanılmıştır. Plazmit izolasyonu üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Elüsyon işlemleri 50 µL 10 mM Tris (pH 8.0) ile yapılmıştır. Plazmit izolasyonu esnasında santrifüj işlemleri >20,000 g hızda Centrifuge 5424 (Eppendorf, Almanya) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Plazmit izolasyonlarının kalitesi ve doğruluğu restriksiyon endonükleazlar ile yapılan uygulamalar ile agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiş ve daha sonra DNA miktarları belirlenmiştir.

### **3.2.6. PZR ürünlerinin saflaştırılması**

PZR saflaştırılma işlemlerinde MinElute PZR Purification Kiti (Qiagen, CA, ABD) kullanılmıştır. İşlemler üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Elüsyon 10-20 µL 10 mM Tris (pH 8.0) ile yapılmıştır. Saflaştırma esnasında santrifüj işlemleri >20,000×g hızda Centrifuge 5424 (Eppendorf, Almanya) cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.7. Jelden DNA parçalarının ekstraksiyonu

DNA parçaları %1'lik düşük erime noktalı agaroz jelde (SeaKem, FMC Bioproducts, ME, ABD) yürütülmüş ve istenen bant jelden kesilmiştir. Jel özütleme işlemleri MinElute Gel Extraction Kiti (Qiagen, CA, ABD) ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda yapılmıştır. Elüsyon işlemi 10 mM Tris (pH 8.0) çözeltisi ile gerçekleştirilmiştir. Uygulama sırasında kullanılan santrifüj işlemleri >20,000×g hızında gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.8. SDS-PAGE ve Western Blot analizi

SDS-Poliakrilamid Jel Elektforezi (SDS-PAGE) OWL P8D8 (Thermo Scientific) cihazı ile %5 polyakrilamid yükleme jeli ve %10 poliakrilamid ayırma jeli olacak şekilde hazırlanarak yürütülmüştür. EGFP üretiminden alınan süpernatantlardan 25 µl olacak şekilde 3:1 oranında 4X SDS jel yükleme tamponu (200 mM Tris-Cl, pH 6.8, %8 SDS, %0.4 bromphenol blue, %40 glycerol, 100 mM DTT) ile karıştırılarak 70 °C'de 10 dakika denatüre edilmiştir. Ardından 20µl'lik kısmı jele yüklenmiştir. Elektforez işlemi, 1XTGS (0.025 M Tris base, 0.192 M Glycine, %0.1 SDS, pH 8.3) tamponunda 150 V değerinde 60 dakika yürütülmesi ile gerçekleştirilmiştir. Daha sonra jel, IRDye Blue Protein Stain (Licor Odyssey) ile 1 saat orbital çalkalayıcı üzerinde boyanmış, saf su ile 15 dakika yıkandıktan sonra LiCor (Odyssey) ile görüntülenmiştir.

Western Blot analizi ise NuPAGE® Bis-Tris Precast (Invitrogen) hazır jeller kullanılarak yapılmıştır. *P. pastoris* kültürlerinden hücrelerin hasat süpernatantları, SDS-PAGE analizinde olduğu gibi örnek hazırlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından 10µl'lik kısmı jele yüklenmiştir. Elektforez işlemi, 1xNuPAGE® MES SDS Running Buffer (Invitrogen) içinde 200V değerinde 20 dakika yürütülmesi ile gerçekleştirilmiştir. Jelde ayrılmış proteinler, Owl HEP-1 ElectroBlotter (Thermo Scientific) ile 20V değerinde 60 dakika süre ile PVDF membrana (Millipore) aktarılmış ve geceboyu kapatma tamponu (0.2xPBS+%0.5 Casein) içinde orbital çalkalayıcının üzerinde oda sıcaklığında bırakılmıştır. EGFP'ye ait bantı tespit

edebilmek için birincil antikor olarak 1:1000 dilüsyonda Rabbit anti-GFP antibody (Abcam ab6556) ve 1:15.000 dilüsyonda ikinci antibody olan Licor Mouse anti-Rabbit IRDye 680 kullanılmıştır. Antikorlarla hibridizasyonu tamamlanan membran Licor'da (Odyssey) 700nm dalga boyunda taranmıştır.

### 3.2.9. DNA ve plazmit miktarlarının ölçülmesi

Elde edilen genomik DNA, PZR ürünlerinin ve plazmit izolatlarındaki DNA konsantrasyonu (miktarı) PicoGreen boya (Molecular Probes®, Invitrogen, CA, ABD) yardımıyla Qubit Fluorometer (Invitrogen, ABD) kullanılarak fluorometrik olarak ölçülmüştür. Standart kurve 0-100 ng/μL DNA dilüsyonları kullanılarak hazırlanmış ve DNA miktar tayini otomatik olarak gerçekleştirilmiştir. Standart ve örneklerin dilüsyonlarının hazırlanmasında 1×TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) tampon çözeltisi kullanılmıştır.

### 3.2.10. Southern Blot analizi

*P. pastoris* transformasyonu sonrası MDH ve MD plakalarda seleksiyonu yapılan kolonilerin inaktif suş olup olmadığının belirlenmesi ve doğrulanması amacıyla Southern Blot analizi yapılmıştır. Transformasyon sonrası seçilen koloniler YPD besiyerinde geliştirilerek genomik DNA izolasyonları yapılmış ve daha önceden belirlenen enzimle DNA izolatları kesilmiştir. Enzim ile muameleden sonra %0.8 agaroz jele yüklenen örnekler yaklaşık 120V değerinde 2 saat 1×TAE tamponu içinde yürütülmüştür. Elektroforezi takiben jel, 45 dakika denatürasyon çözeltisiyle (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) ve ardından 30 dakika nötralizasyon çözeltisi (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA) ile orbital çalkalamalı üzerinde muamele edilmiştir. naylon membran (20×20 cm Positively Charged Nylon Membran, Roche, ABD) 10×SSC Blotlama tamponuyla (3 M NaCl, 0.3 M sodyum sitrat, 1 mM EDTA) ıslatılmıştır. Membran jelin alt yüzü ile temas edecek şekilde yerleştirilmiş ve Southern Blot uygulamasına hazır hale getirilmiştir. Blotlama işlemleri yaklaşık olarak 2 saatte tamamlanarak hibridizasyon aşamasına geçilmiştir. Kısa süreliğine kuruması için kağıt

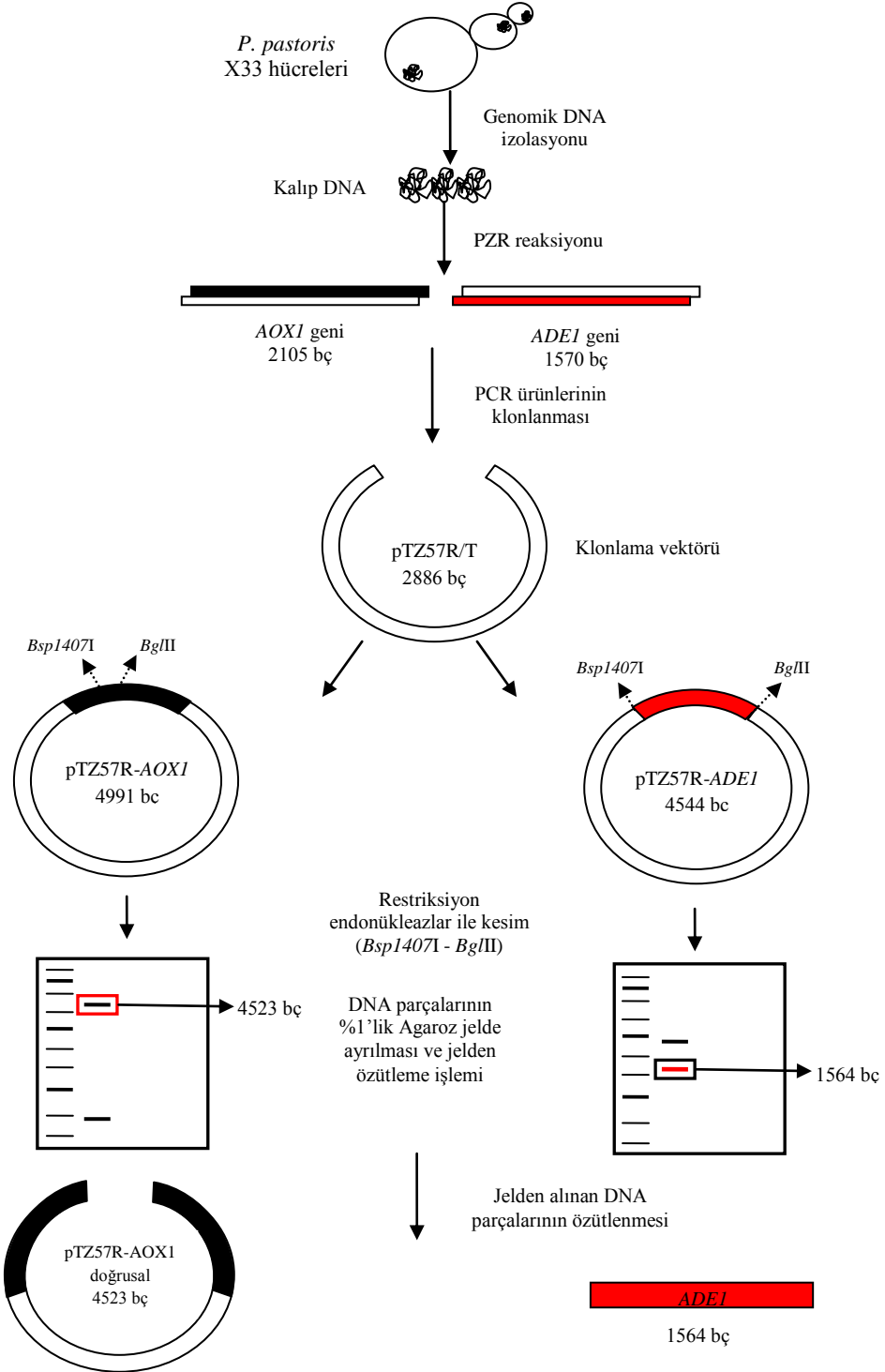
havlu üzerinde bekletilen membran, ultraviyole çapraz bağlayıcı (CL-1000 Ultraviolet Crosslinker, UVP, CA, ABD) içinde 120mJ enerji seviyesinde 6 dakika muamele edilmesiyle DNA molekülleri membran üzerine bağlanmıştır. Membran hibridizasyon tüpüne yerleştirilerek üzerine ön hibridizasyon çözeltisi eklenerek 1 saat 41°C'de muamele edilmiş ve ardından DIG etiketli probu içeren hibridizasyon çözeltisi eklenerek aynı sıcaklıkta bir gece hibridizasyona bırakılmıştır.

İmmünolojik dedeksiyon için membran kap içine alınarak ve orbital çalkalayıcı üzerinde sırasıyla ilk yıkama çözeltisi (2XSSC+%0,1 SDS) ve ikinci yıkama çözeltisi (0,5XSSC + %0,1 SDS) ile yıkamaları gerçekleştirilmiş ve kapatma tamponunda (1xDIG blocking solution) 1 saat, 2 kez 5'er dak yıkama tamponunda (0.1 M maleik asit pH 7.5, 0.3% (v/v) Tween 20), anti-DIG antikor çözeltisinde 1 saat, 4 kere 5'er dak yıkama tamponunda ve 5 dak dedeksiyon tamponunda (0.1M Tris pH 9.5 ve 0.1M NaCl) gerçekleştirilmiştir. Daha sonra membran şeffaf polipropilen zar içine yerleştirilerek üzerine birkaç damla CSPDR (alkali fosfataz substratı) çözeltisi damlatılmıştır. Dosyanın içindeki hava boşlukları çıkartılarak 10 dak 37°C'de inkübe edilmiş ve karanlık odada X-ışını film kaseti içinde X-ışını filmiyle üst üste gelecek şekilde 20-60 dak arasında bekletilmiştir. Süre sonunda elde edilen X-ışını filmi karanlık odada Kodak film geliştirme çözeltileriyle muamele edilerek geliştirilmiştir.

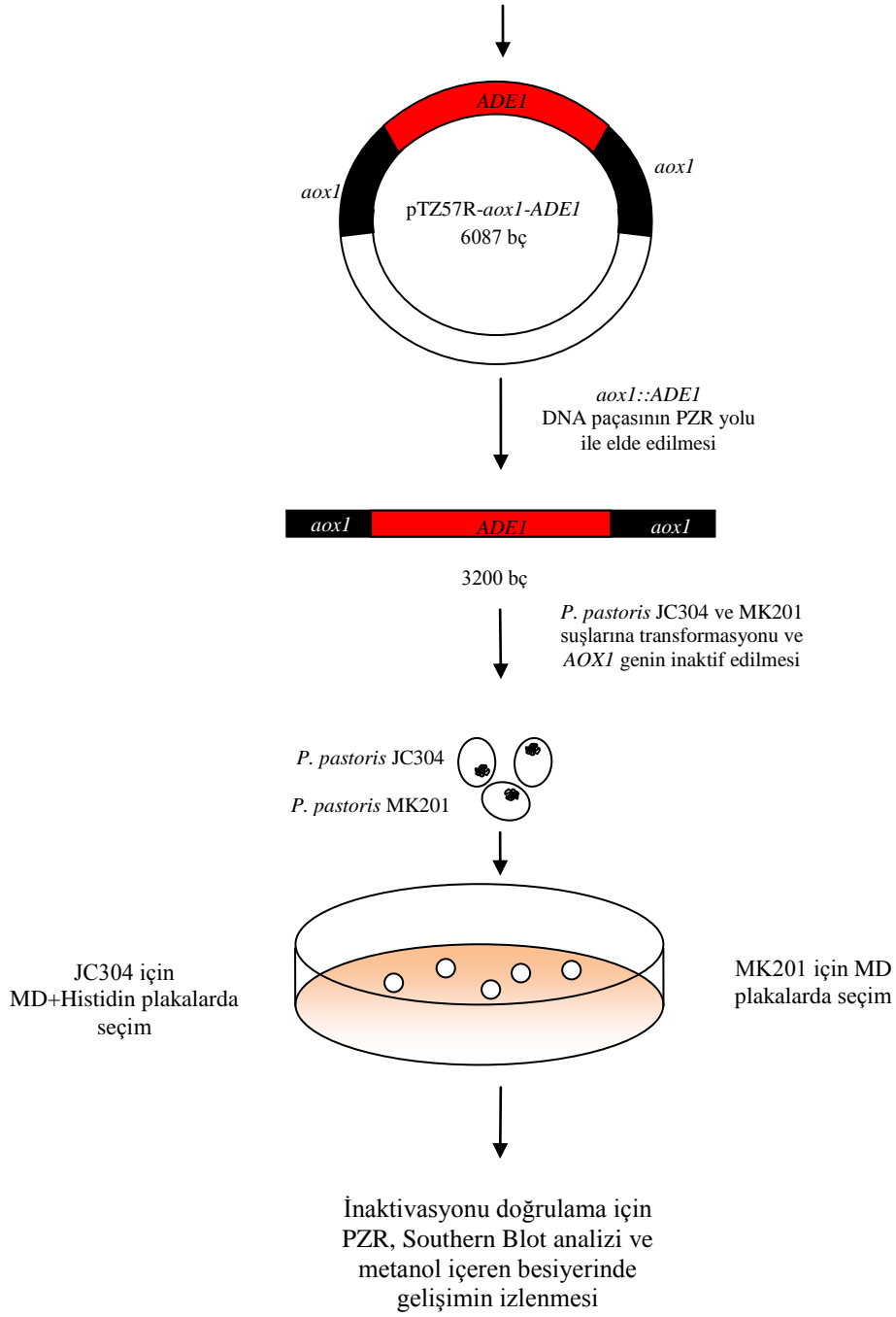
## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1. *Pichia pastoris* AOX1 ve AOX2 Genlerinin İnaktivasyonu çalışmaları

*P. pastoris* AOX1 geninin inaktif edilmesi için uygulanan işlem basamakları Şekil 4.1’de şematik olarak verilmiştir.



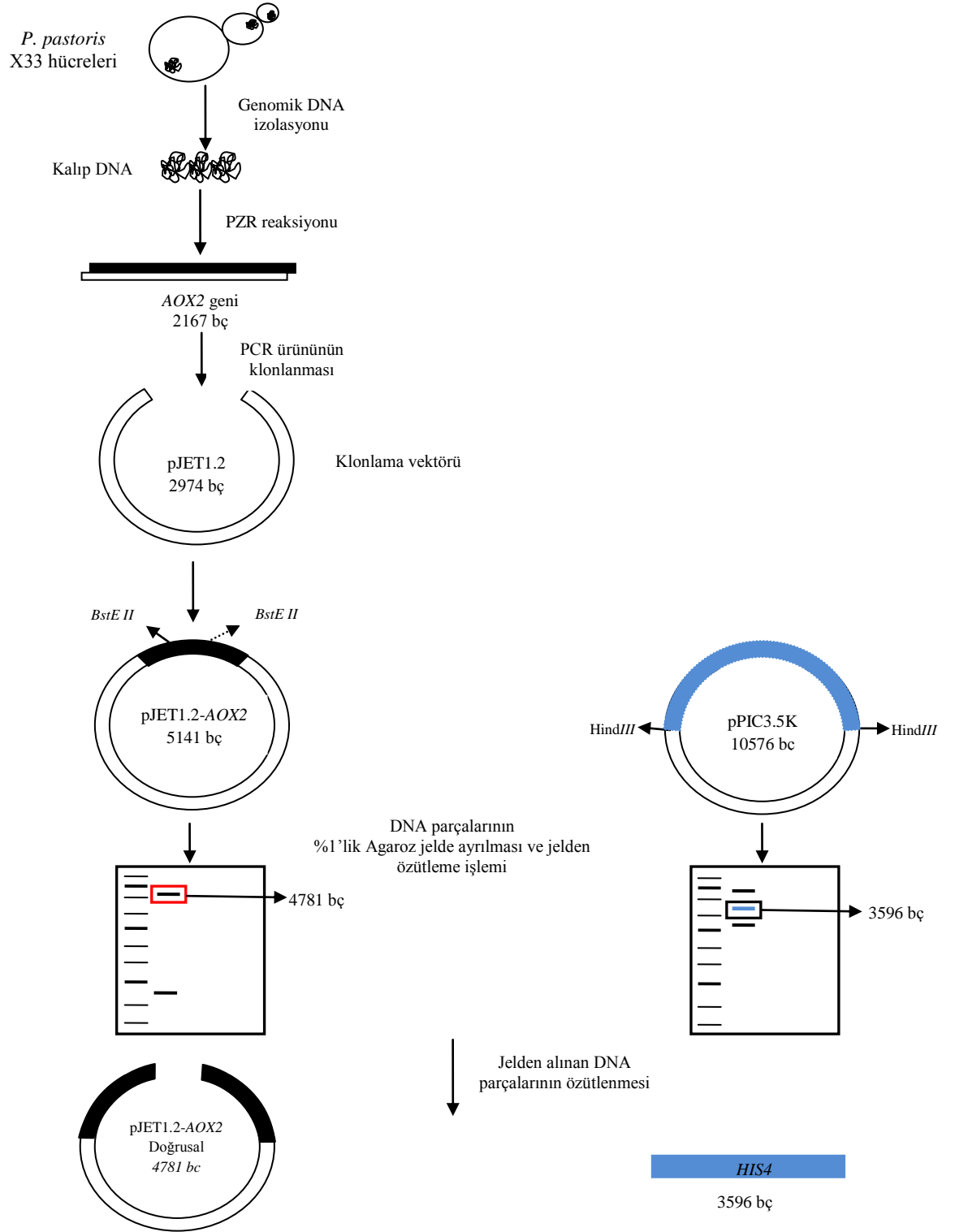
Şekil 4.1. AOX1 geninin inaktivasyon basamaklarının şematik gösterimi



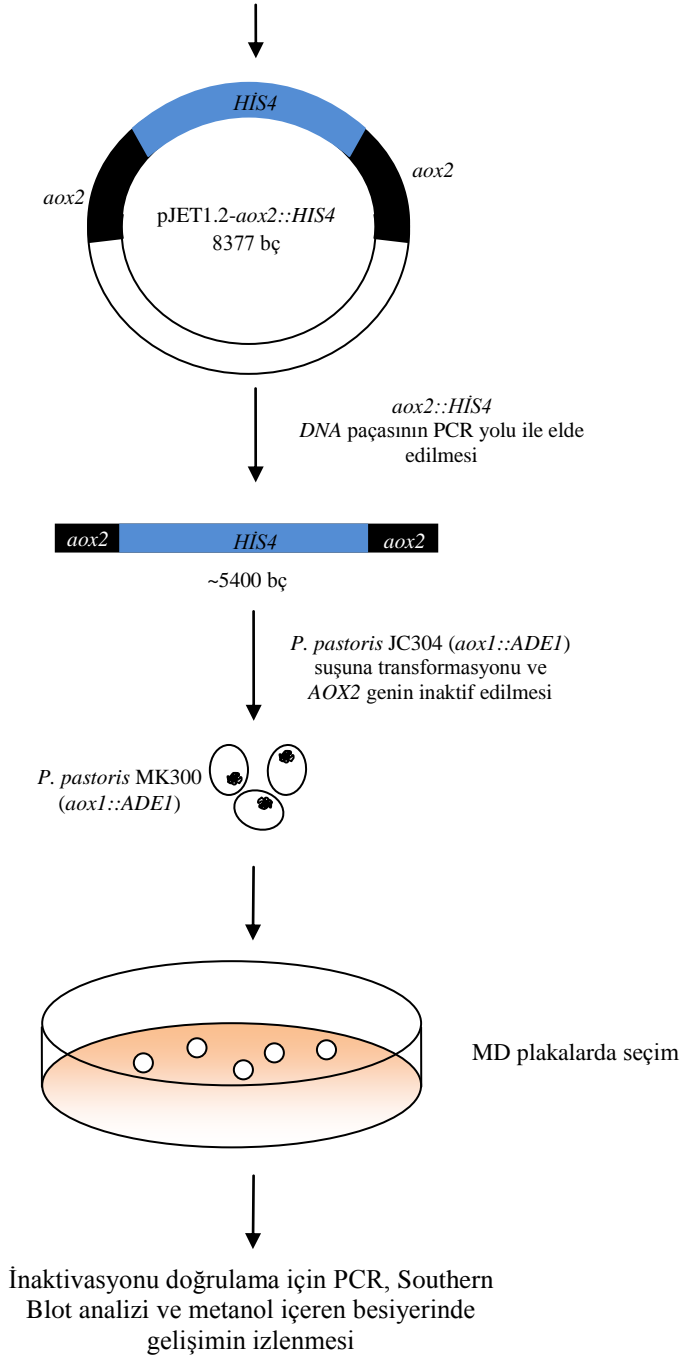
Şekil 4.1.'in devamı. *AOX1* geninin inaktivasyon basamaklarının şematik gösterimi

*AOX1* geninin inaktif edilmesinde sırasıyla *AOX1* ve *ADE1* genleri PCR ile amplifiye edilmiş, klonlama vektörlerine klonlanmış, *AOX1* geninin iç bölgesinden enzim bölgelerinden kesilerek *ADE1* geni *AOX1* geninin içine dahil edilmiştir. Elde edilen plazmitin kalıp olarak kullanıldığı PZR ile *aox1*::*ADE1* gen parçası elde edilmiş, *P. pastoris* hücrelerine transform edilmiş ve *AOX1* geninin inaktivasyonu çeşitli analizlerle doğrulanmıştır.

*P. pastoris* AOX2 geninin inaktif edilmesi için yapılan işlem basamakları Şekil 4.2’de şematik olarak verilmiştir.



Şekil 4.2. AOX2 geninin inaktivasyon basamaklarının şematik gösterimi



Şekil 4.2.'nin devamı. *AOX2* geninin inaktivasyon basamaklarının şematik gösterimi

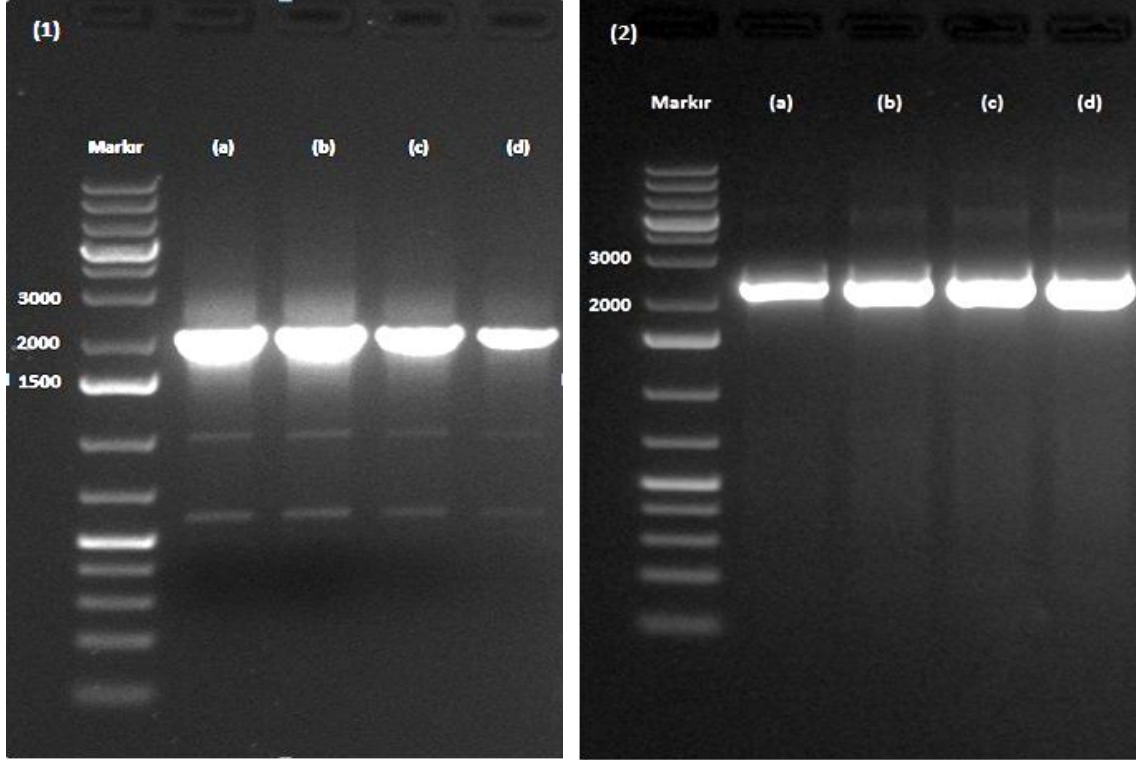
*AOX2* geninin inaktif edilmesinde sırasıyla *AOX2* geni PCR ile *HIS4* geni pPIC3.5K plazmitinden elde edilmiş, klonlama vektörlerine klonlanmış, *AOX2* geninin iç bölgesinden enzim bölgelerinden kesilerek *HIS4* geni *AOX2* geninin içine dahil edilmiş, elde edilen plazmitin kalıp olarak kullanıldığı PCR ile *aox2*::*HIS4* gen parçası elde edilmiş, *P. pastoris* hücrelerine transform edilmiş ve *AOX2* geninin inaktivasyonu çeşitli analizler ile doğrulanmıştır.



#### 4.1.1. *AOX1* ve *AOX2* genlerinin PZR ile çoğaltılması

*AOX1* geni (Genbank Acc. No:U96967), 5'AOX1, 3'AOX1 primer çifti ve *P. pastoris* X33 suşunun genomik DNA'sı kalıp olarak kullanılarak PZR ile çoğaltılmıştır. PZR reaksiyonu için 54-64°C aralığında dört farklı bağlanma sıcaklığı denenmiştir. Sıcaklık değerleri yaklaşık (a) 54°C, (b) 58°C, (c) 61°C, (d) 64°C olarak uygulanmıştır. Reaksiyon sonucunda 2,105 bp uzunluğundaki *AOX1* geni elde edilmiştir (Şekil 4.3).

*AOX2* geni (Genbank Acc. No:U96968), AOX2FSspI, AOX2RSspI primer çifti ve *P. pastoris* X33 suşunun genomik DNA'sı kalıp olarak kullanılarak PZR ile çoğaltılmıştır. PZR reaksiyonu için 50-60°C aralığında dört farklı bağlanma sıcaklığı denenmiştir. Sıcaklık değerleri yaklaşık (a) 50°C, (b) 53°C, (c) 56°C, (d) 60°C olarak uygulanmıştır. Reaksiyon sonucunda 2,167 bp uzunluğundaki *AOX2* geni elde edilmiştir (Şekil 4.3). Elde edilen PZR ürünleri PZR pürifikasyonu yapılarak bir sonraki aşamaya geçilmiştir.

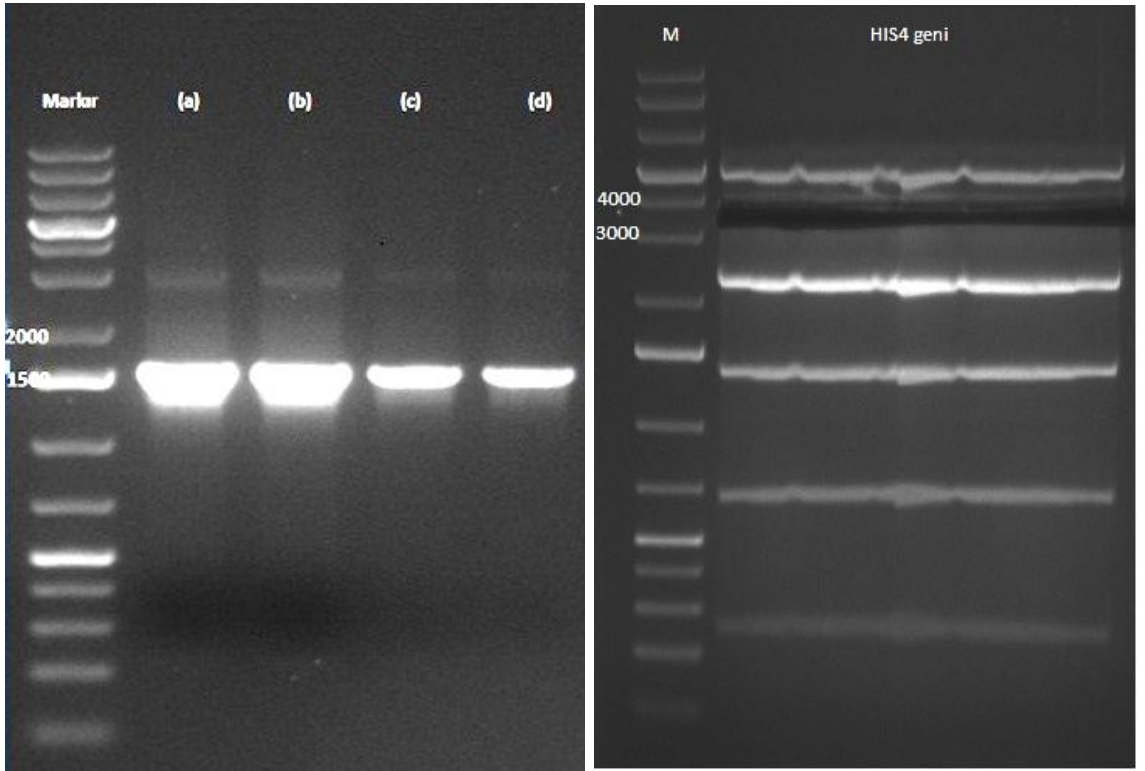


Şekil 4.3. PZR ile elde edilen *P. pastoris* *AOX1* ve *AOX2* genlerinin agaroz jel görüntüsü (1):*AOX1* ve (2):*AOX2*, M:1kb markır (a)-(d):Farklı sıcaklık uygulamaları.

#### 4.1.2. *AOX1* ve *AOX2* genlerinin inaktif edilmesinde kullanılacak *ADE1* ve *HIS4* genlerinin elde edilmesi

*AOX1* geninin inaktif edilmesi için kullanılacak olan *P. pastoris ADE1* (N-succinyl-5-aminoimidazole-4-carboxamide ribotide synthetase) geni, ADEFBsp1407I ve ADE1RBglII primer çifti kullanılarak *P. pastoris X33* genomik DNA'sından PZR ile çoğaltılmıştır. PZR reaksiyonu için 56-66°C aralığında dört farklı bağlanma sıcaklığı denenmiştir. Sıcaklık değerleri yaklaşık (a) 56°C, (b) 59°C, (c) 63°C, (d) 66°C olarak uygulanmıştır. Reaksiyon sonucunda 1,570 bp uzunluğundaki *ADE1* geni elde edilmiştir (Şekil 4.4). Elde edilen PZR ürünleri PZR pürifikasyonu yapılarak bir sonraki aşamaya geçilmiştir.

*AOX2* geninin inaktif edilmesi için kullanılacak olan yaklaşık 3,600 bp uzunluğundaki *P. pastoris HIS4* (histidinol dehydrogenase) geni, laboratuvarımızda bulunan ve *HIS4* genini içeren pPIC3.5k plazmitinden restriksiyon enzimleri ile kesilerek elde edilmiştir (Şekil 4.4).

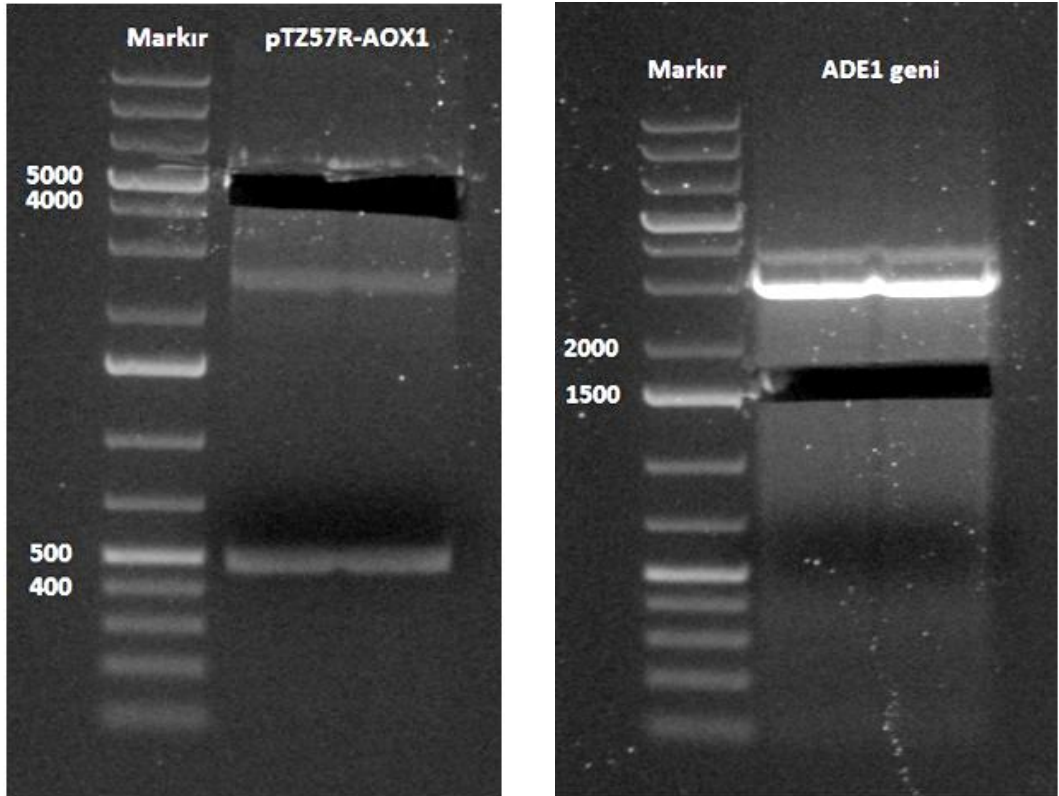


Şekil 4.4. Elde edilen *P. pastoris ADE1* (1) ve *HIS4* (2) genlerinin agaroz jel görüntüsü  
M: 1kb markır, (a)-(d):Farklı sıcaklık uygulamaları.

#### 4.1.3. *AOX1* ve *AOX2* inaktif plazmitlerinin elde edilmesi ve klonlama çalışmaları

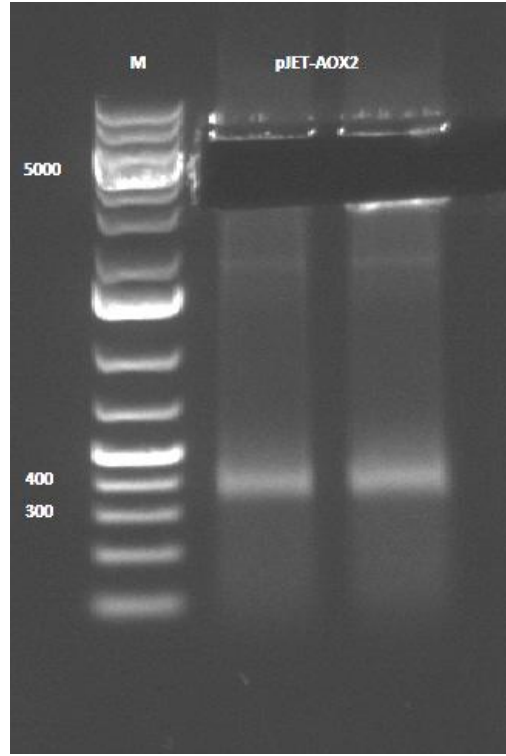
PZR ile elde edilen *AOX1* geni pTZ57R/T, *AOX2* ve *ADE1* genleri pJET1.2 klonlama vektörlerine klonlanmıştır. Elde edilen plazmitler sırası ile pTZ57R-*AOX1*, pJET-*AOX2* ve pJET-*ADE1* olarak isimlendirilmiştir.

pTZ57R-*AOX1* plazmiti, *AOX1* geninde bulunan *Bgl*II ve *Bsp*I407I restriksiyon bölgelerinden kesilerek, genin 385-853 bp arasındaki bölgesi düşürülmüştür. Elde edilen 4523 bp uzunluğunda ve her iki ucunda *AOX1* gen bölgelerini içeren doğrusal plazmit jelden ekstrakte edilmiştir (Şekil 4.5). *Bgl*II ve *Bsp*I407I restriksiyon bölgeleri eklenmiş primerler ile çoğaltılmış ve klonlanmış olan *ADE1* geni, klonlandığı pTZ57R-*ADE1* plazmitinden bu restriksiyon bölgelerinden kesilerek jelden özütlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. pTZ57R-*AOX1* doğrusal plazmitinin ve *ADE1* geninin jelden kesilmesi ve özütlenmesi

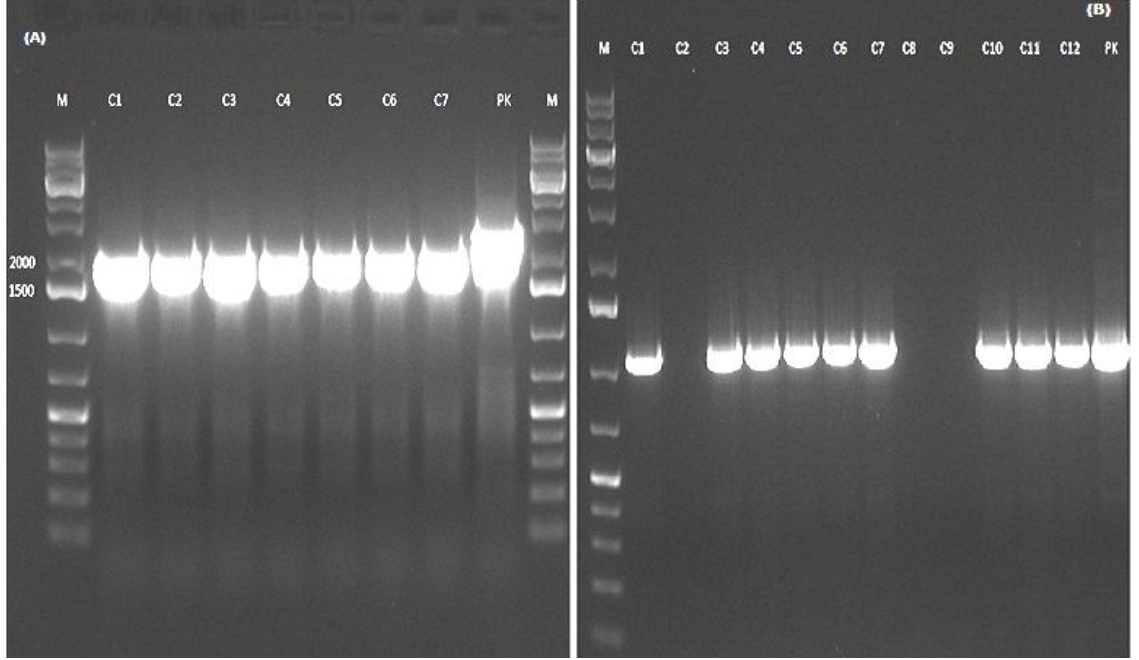
pJET-AOX2 plazmiti, *AOX2* geninde bulunan *BstEII* restriksiyon bölgelerinden kesilerek, genin 999-1,359 bp arasındaki bölgesi düşürülmüştür. Elde edilen 4781 bp uzunluğunda ve her iki ucunda *AOX2* gen bölgelerini içeren doğrusal plazmit jelden ekstrakte edilmiştir (Şekil 4.6).



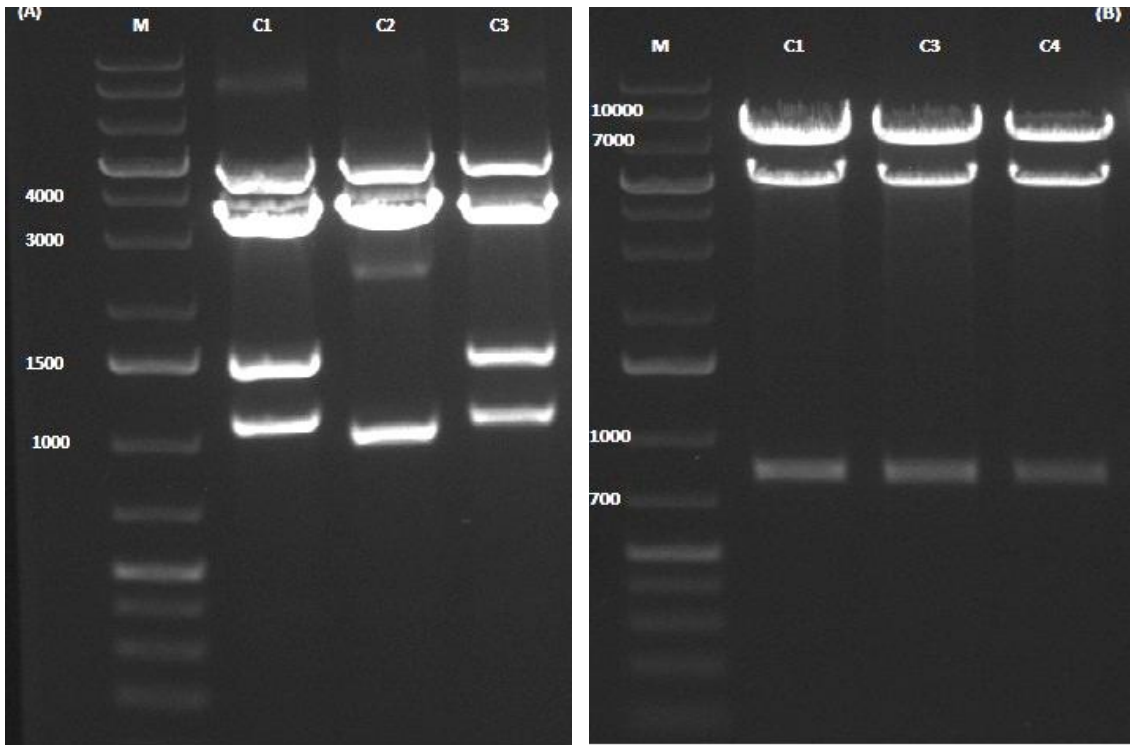
Şekil 4.6. pJET-AOX2 doğrusal plazmitin jelden kesilmesi ve özütlenmesi. M:1kb markır.

Elde edilen doğrusal plazmitlerin pTZ57R-AOX1 *ADE1* geni ile pJET-AOX2 plazmitinin de *HIS4* geni ile ligasyonu yapılmıştır. Bu sayede *AOX1* geninin içine *ADE1* geni, *AOX2* geninin içine de *HIS4* geni dahil edilmiştir. Daha sonra plazmitler *E. coli* DH5 $\alpha$  kompatent hücrelerine transform edilmiştir. Plazmitlerde bulunan rezistans geni olan amfisilin eklenmiş (100  $\mu$ g/mL) LB Miller plakalarda gelişen transformant hücrelerin istenen plazmiti içerip içermediğinin tespiti için koloni PZR ile ön tarama gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.7). Koloni PZR sonucu pozitif çıkan klonlardan üçer adet seçilerek plazmit izolasyonu yapılmıştır. Ardından restriksiyon enzimleri ile kesilerek kesin olarak doğrulanmıştır. pTZ57R-aox1-ADE1 plazmitinin kontrolü *XbaI* restriksiyon enzimi ile pJET-aox2-HIS4 plazmiti de *ScaI* ve *NotI* enzimleri ile kontrol edilmiştir. DNAMAN 7.0 (Lynnon Corporation) DNA programında yapılan analiz sonucu teorik olarak pTZ57R-aox1-ADE1 plazmiti için 1091, 1484, 3512 bp ve pJET-

aox2-HIS4 plazmiti için 828bp ve 7558 bp uzunluğunda beklenen DNA parçaları jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.8). Sonuç olarak her iki *AOX* geni de plazmit üzerinde inaktif edilmiştir.



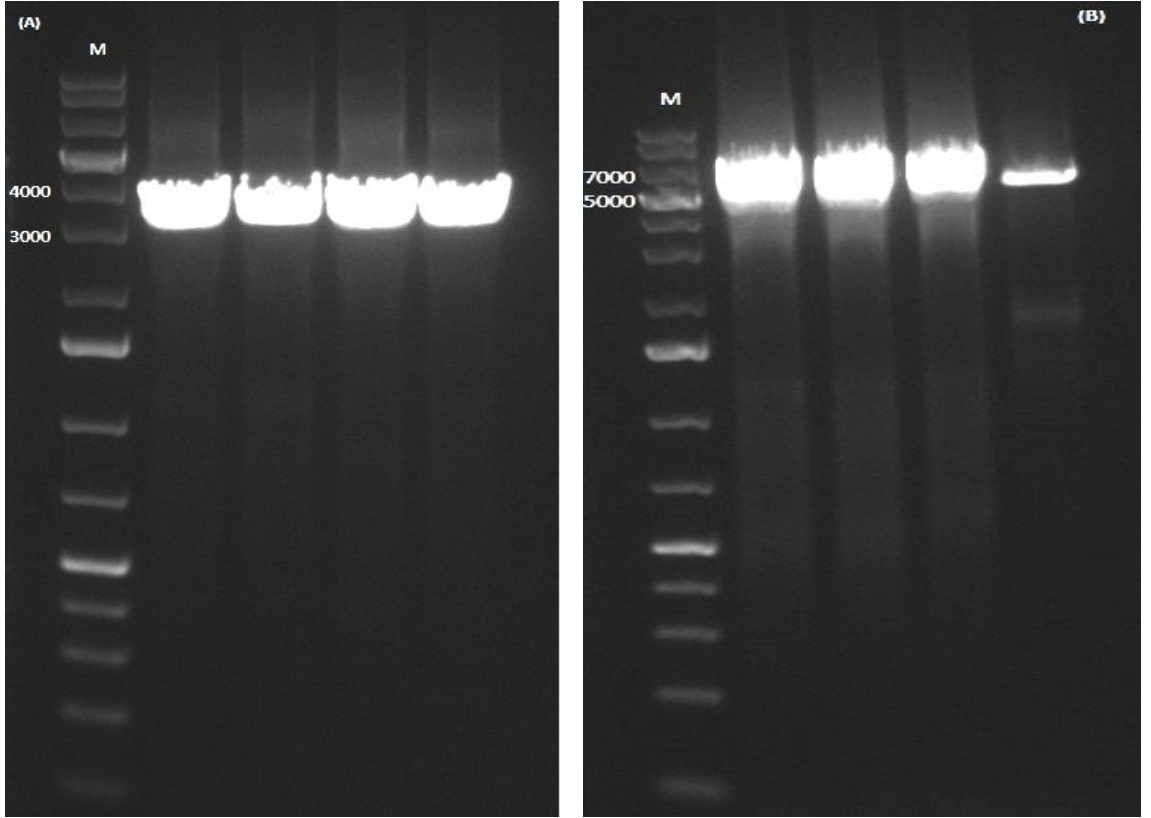
Şekil 4.7. Koloni PZR ile tarama yapılan örneklerin jel görüntüsü (A):pTZ57R-aox1-ADE1 ve (B):pJET-aox2-HIS4. M:1kb markır, C1-C12:Farklı klonlar, PK:Pozitif kontrol.



Şekil 4.8. Plazmit izolasyonu sonrası restriksiyon enzimLeri ile kontrolün jel görüntüsü (A):pTZ57R-aox1-ADE1 ve (B):pJET-aox2-HIS4. M:1kb markır, C1-C12:Farklı klonlar, PK:Pozitif kontrol.

Restriksiyon enzimleri ile kesilerek kontrol edilen pTZ57R-*aox1*-ADE1 C1 ve C3 plazmitlerinde; pJET-*aox2*-HIS4 plazmitlerin tümünde istenen DNA parçaları gözlenmiştir. Her iki plazmit için C1 klonları ile devam edilmiştir.

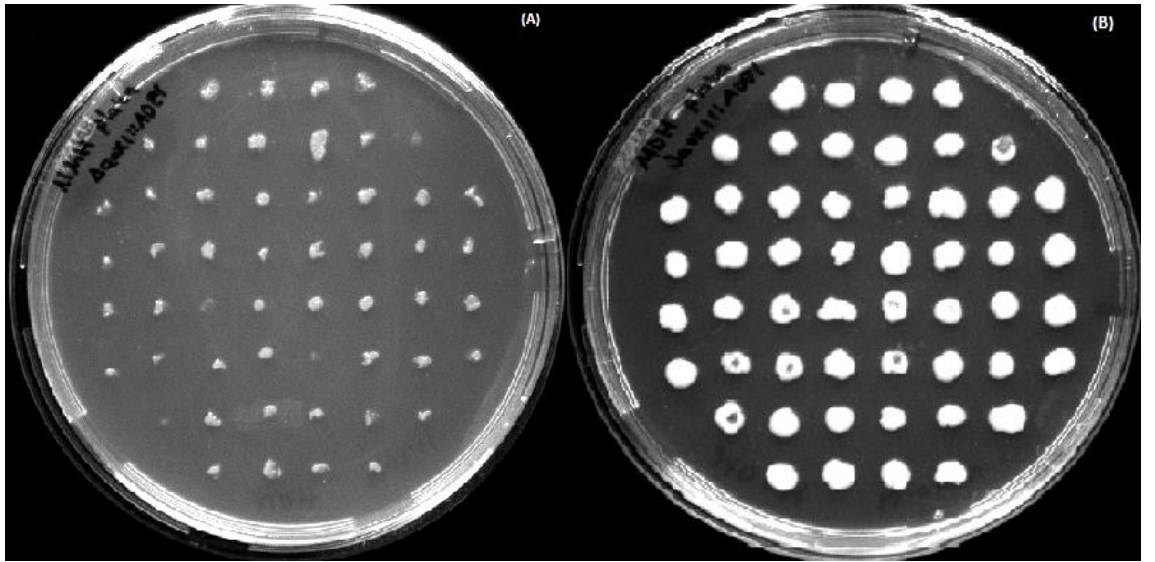
pTZ57R-*aox1*-ADE1 plazmitinden 5'AOX ve 3'AOX primerleri kullanılarak *aox1::ADE1* gen parçası (3,200 bç), aynı şekilde pJET-*aox2*-HIS4 plazmitinden AOX2-230F ve AOX2-1618R primerleri kullanılarak *aox2::HIS4* gen bölgesi (5,400 bç) elde edilmiştir. PZR ürünleri jelde kontrol edilmiş ve PZR pürifikasyonu yapılarak transformasyon işlemine hazır hale getirilmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. *P. pastoris* hücrelerine transform edilecek gen bölgelerinin PZR ile edilmesine ait jel görüntüsü (A):*aox1::ADE1* ve (B):*aox2::HIS4* DNA parçaları, M: 1kb markır.

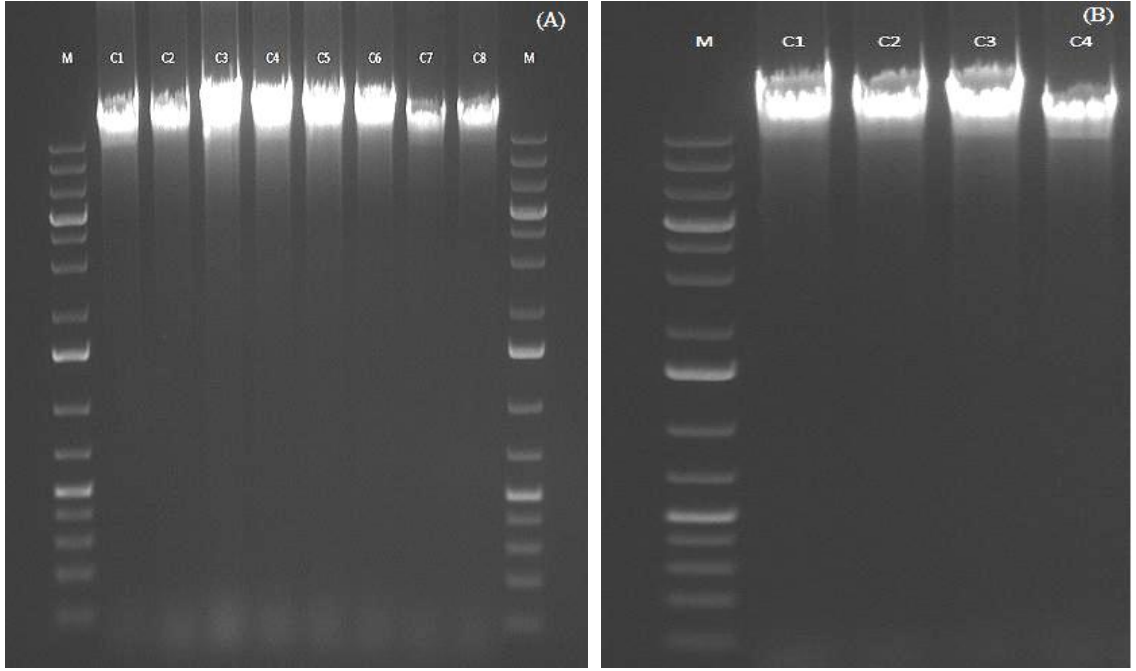
#### 4.1.4. JC304 ve MK201 suşlarında *AOX1* geninin inaktif edilmesi ve doğrulama işlemleri

PZR yolu ile elde edilen *aox1::ADE1* DNA parçası elektroporasyon tekniği kullanılarak *P. pastoris* JC304 ve MK201 hücrelerine transform edilmiştir. Transformasyon sonrası JC304 için seçici olan MDH ve MK201 için seçici olan MD plakalarda transformantların seleksiyonu yapılmıştır. *AOX1* geninin, hücrenin AOX aktivitesinin %85'inden sorumlu olması göz önünde bulundurularak, seçilen transformantlar ilk olarak MMH ve MM plaklarda taranmış ve üremesi yavaş olan veya üreme olmayan klonlar seçilmiştir. Bu şekilde geliştirilen plakalardan birine örnek Şekil 4.10'da verilmiştir.



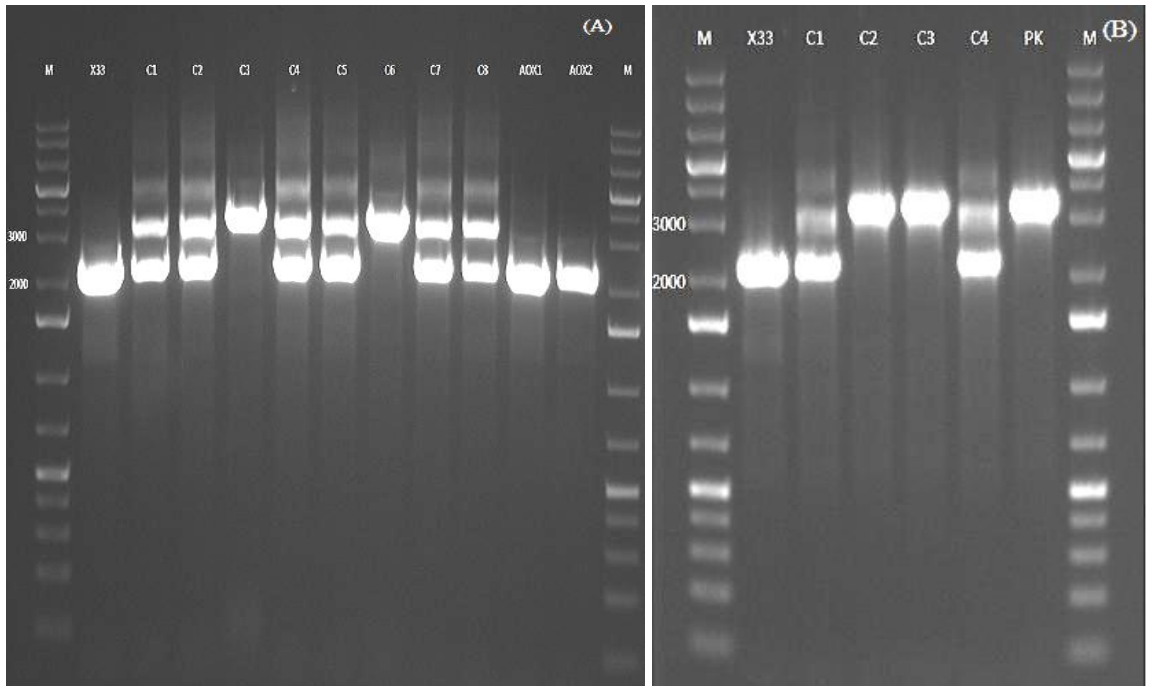
Şekil 4.10. *P. pastoris* transformantlarının tarandığı MMH ve MDH plakalarının görüntüsü (A):MMH plaka ve (B):MDH replika plaka

MMH ve MM plakalarından seçilen klonlardan genomik DNA izolasyonu yapılmış ve jelde yürütülmüştür (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. *AOX1* geni inaktif olma ihtimali olan suşların genomik DNA'ların jelde görüntülenmesi (A):JC304 ve (B):MK201 suşları. M:1kb markır, C1-C8:Farklı klonlar.

Elde edilen genomik DNA kalıp olarak kullanılarak *AOX1* geni primerleri olan 5'AOX ve 3'AOX ile PZR yapılmış ve transform edilmiş DNA parçalarının kromozomda istenen gen lokusuna entegre olup olmadığı kontrol edilmiştir (Şekil 4.12).

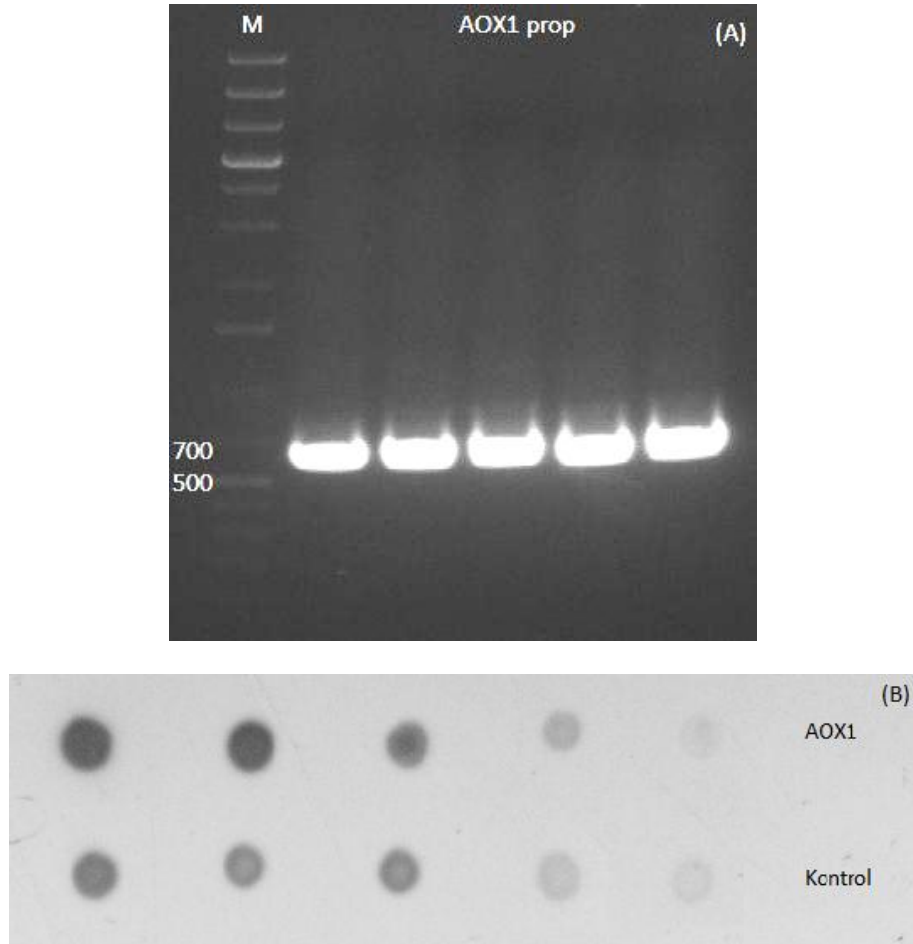


Şekil 4.2. *AOX1* geni inaktif olma ihtimali olan transformant JC304 ve MK201 suşlarının genomik DNA'ları kullanılarak yapılan PZR jel görüntüsü (A):JC304 ve (B):MK201 suşları. M:1kb markır, C1-C8:Farklı klonlar, PK:Pozitif kontrol.



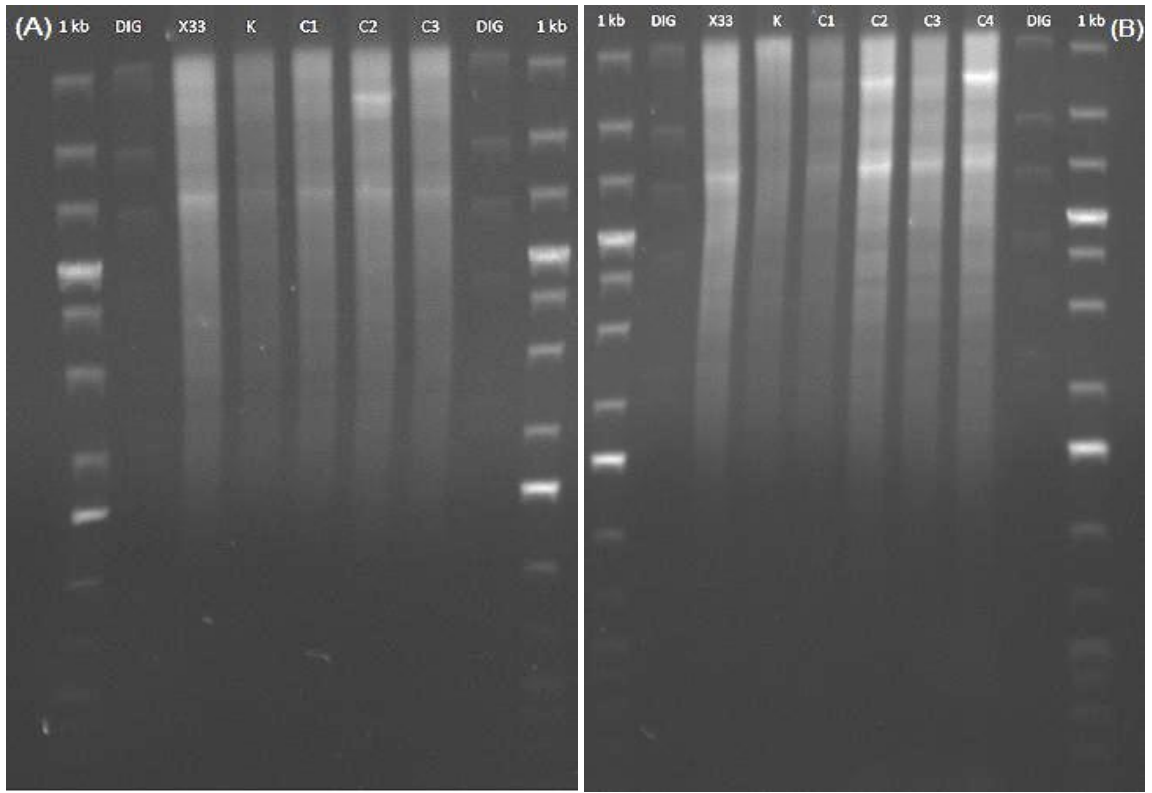
Transformant JC304 ve MK201 genomik DNA'larının kalıp olarak kullanıldığı PZR 'nin sonucunda, JC304 suşlarından C3 ve C6, MK201 suşlarından da C2 ve C3 olarak isimlendirilen klonların beklenen 3,200 bp uzunluğundaki DNA parçasını verdiği görülmüştür.

Bu aşamanın devamında inaktivasyonun kesin olarak doğrulanması amacı ile southern Blot analizine geçilmiştir. Southern Blot analizinde *AOX1* gen bölgesinden hazırlanan DIG etiket prob kullanılmıştır. Prop olarak kullanılacak olan DNA parçası *AOX1*probeF ve *AOX1*probeR primerleri kullanılarak PZR yolu ile elde edilmiştir. Etiketleme sonrası probun etkinliği belirlenmiştir (Şekil 4.13).

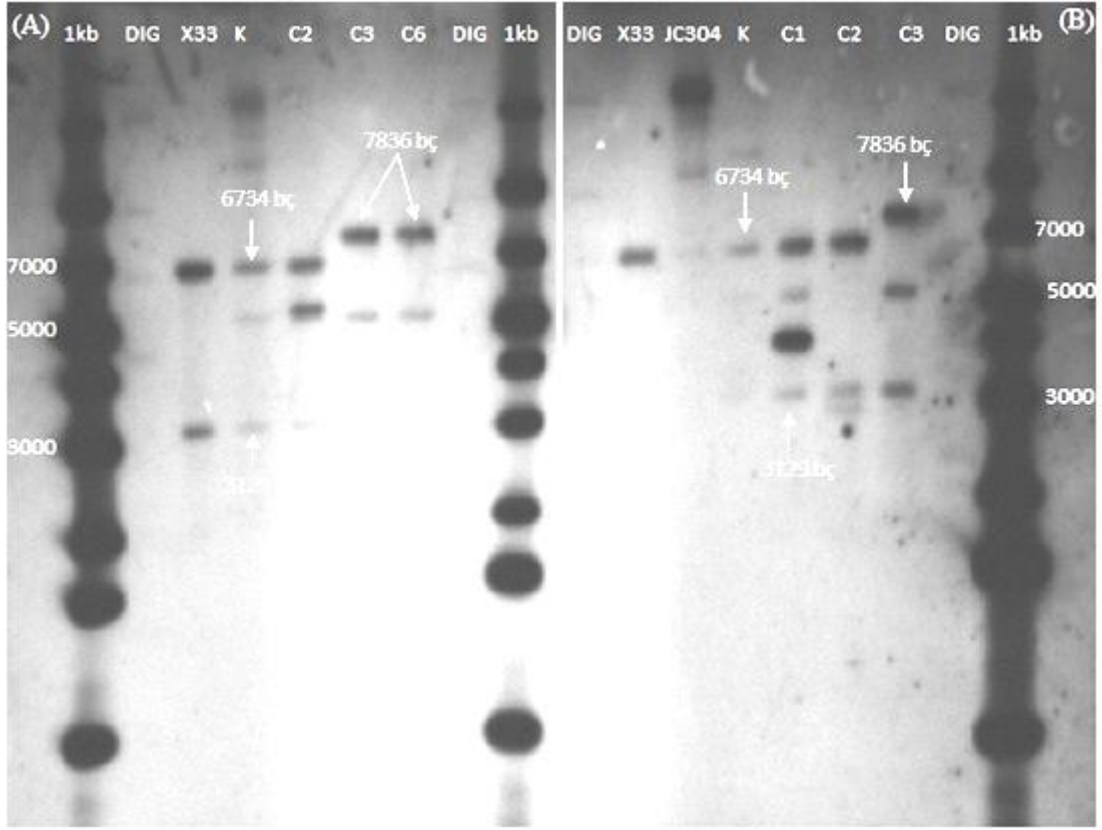


Şekil 4.13. *AOX1* geni içinden dizayn edilen prob ve probun etkinliği (A):Prob eldesi için yapılan PZR görüntüsü, (B):Prob etkinlik ölçümünün görüntüsü.

Transformant JC304 ve MK201 suşları ve negatif kontrol olarak X33 ve JC304 suşlarından elde edilen genomik DNA'lar *Bam*HI restriksiyon enzimi ile kesilmiştir (Şekil 4.14). DNAMAN programı ile daha önceden yapılan analizde negatif kontrol suşlarında 6,734 bç, inaktif suşlarda 7,836 bç ve *AOX2* genine olan homolojiden dolayı *AOX2* genine bağlanması durumunda 3,129 bç büyüklüğünde bantlar gözlenecektir. Protokole uygun olarak gerçekleştirilen southern Blot analizi ile inaktif suşlar tespit edilmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.2. Transformant JC304 ve MK201 genomik DNA'larının Southern blot analizi için *Bam*HI enzimi ile kesilmesi ve jelde yürütülmesi (A):JC304 ve (B):MK201 suşları 1kb:1kb markır, DIG:DIG etiketli markır, K:Negatif kontrol, C1-C4:Farklı klonlar, PK:Pozitif kontrol.

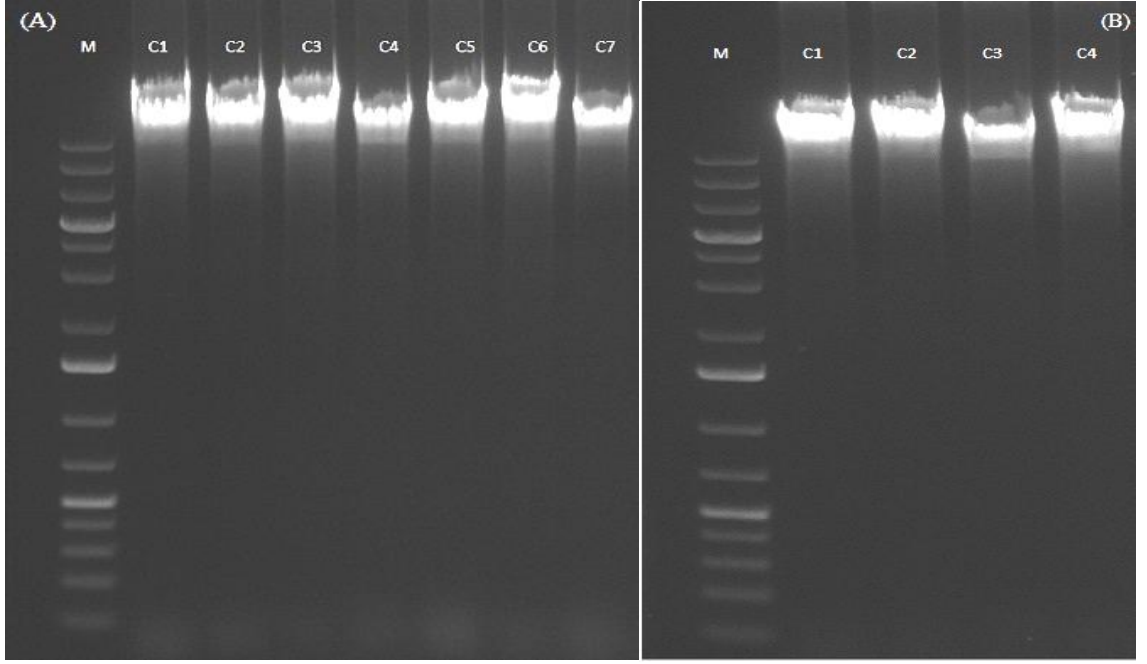


Şekil 4.15. Transformant JC304 ve MK201 suşlarında yapılan southern blot analizi sonucu X-ray filmin görüntüsü (A):JC304 ve (B):MK201 suşları. 1kb: 1kb markır, DIG:DIG etiketli markır, K:Negatif kontrol, C1-C4:Farklı klonlar, PK:Pozitif kontrol.

Southern Blot sonucunda JC304 C3 klonu MK300, MK201 C3 klonu ise MK321 olarak isimlendirilmiş ve isimlendirilen bu suşlar ile çalışmalara devam edilmiştir.

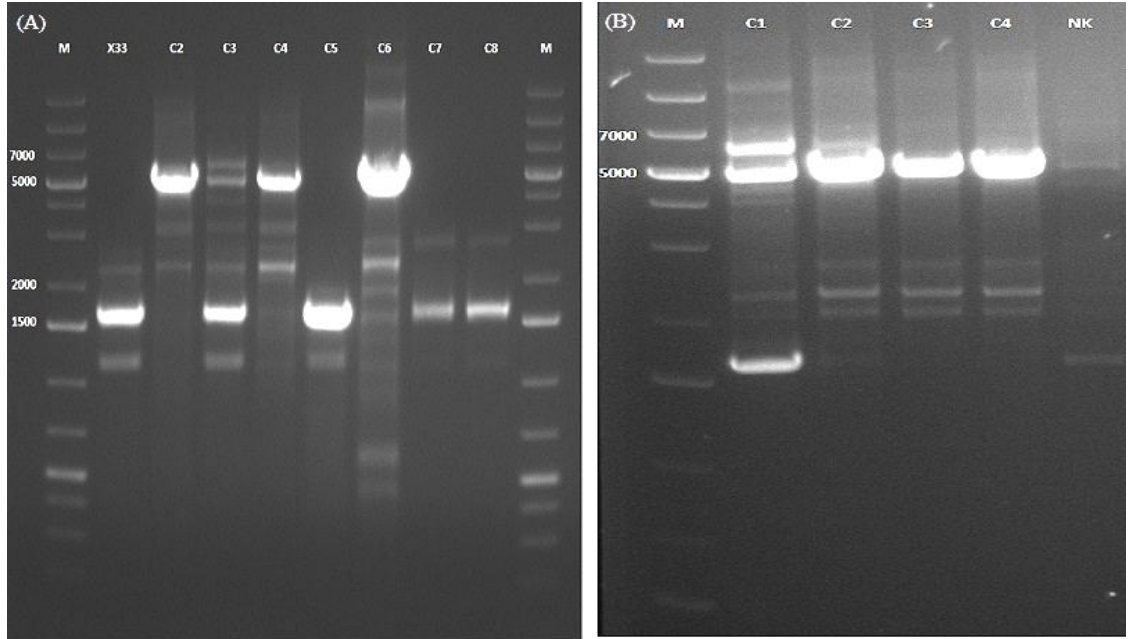
#### 4.1.5. MK111 ve MK300 suşlarında *AOX2* geninin inaktif edilmesi ve doğrulanması

PZR yolu ile elde edilen *aox2::HIS4* DNA parçası elektroporasyon tekniği kullanılarak *P. pastoris* MK300 ve MK111 hücrelerine transform edilmiştir. Transformasyon sonrası transformantların seleksiyonu MD plakalarda yapılmıştır. MD plakalardan seçilen klonlardan ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere genomik DNA izolasyonu yapılmış ve jelde yürütülmüştür (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. *AOX2* inaktif olma ihtimali olan suşların genomik DNA'ların jelde görüntülenmesi (A):MK111 ve (B):MK300 suşları. M:1kb markır, C1-C7:Farklı klonlar.

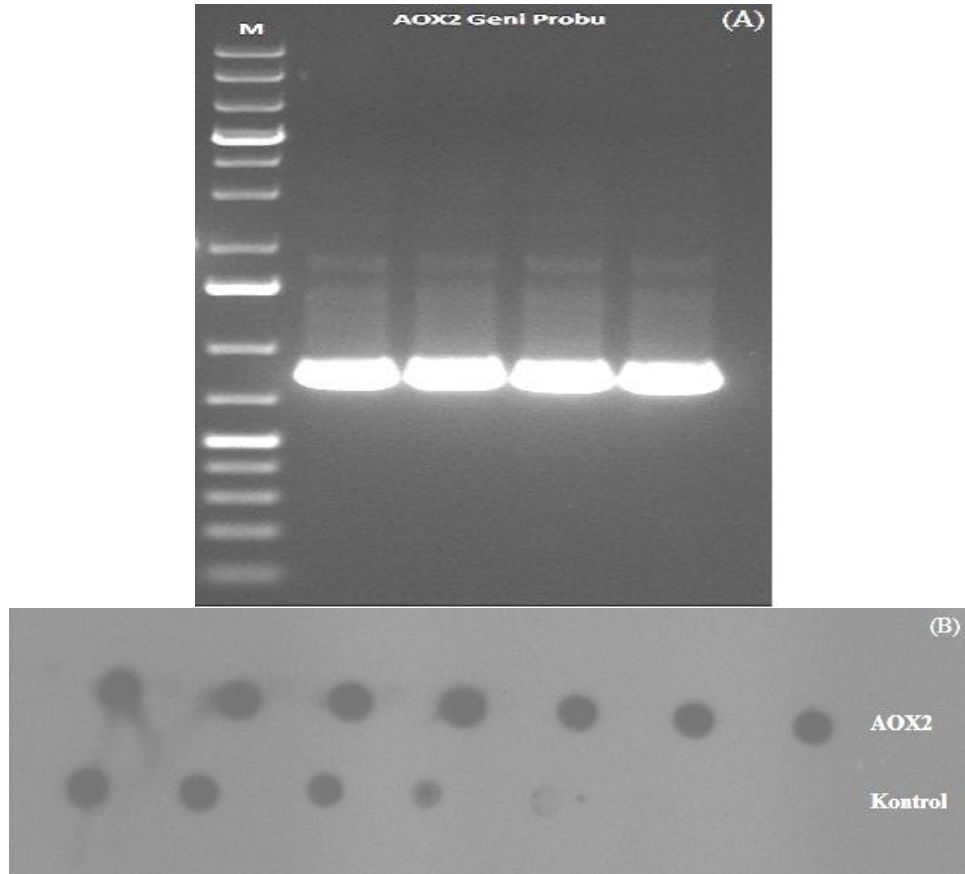
Elde edilen genomik DNA kalıp olarak kullanılarak *AOX2* geni primerleri olan *AOX2230F* ve *AOX21618R* ile PZR yapılmış ve transform edilen DNA parçalarının kromozomda istenen gen lokusuna entegre olup olmadığı kontrol edilmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. *AOX2* inaktif olma ihtimali olan transformant MK111 ve MK300 suşlarının genomik DNA'ları kullanılarak yapılan PZR jel görüntüsü (A):MK111 ve (B):MK300 suşları. M:1kb markır, C1-C8:Farklı klonlar, NK:Negatif kontrol.

Transformant MK111 ve MK300 genomik DNA'larının kalıp olarak kullanıldığı PZR 'nin sonucunda, MK111 suşlarından C2, C4 ve C6, MK300 suşlarından da seçilen tüm klonların beklenen 5000 bç uzunluğundaki DNA parçasını verdiği görülmüştür.

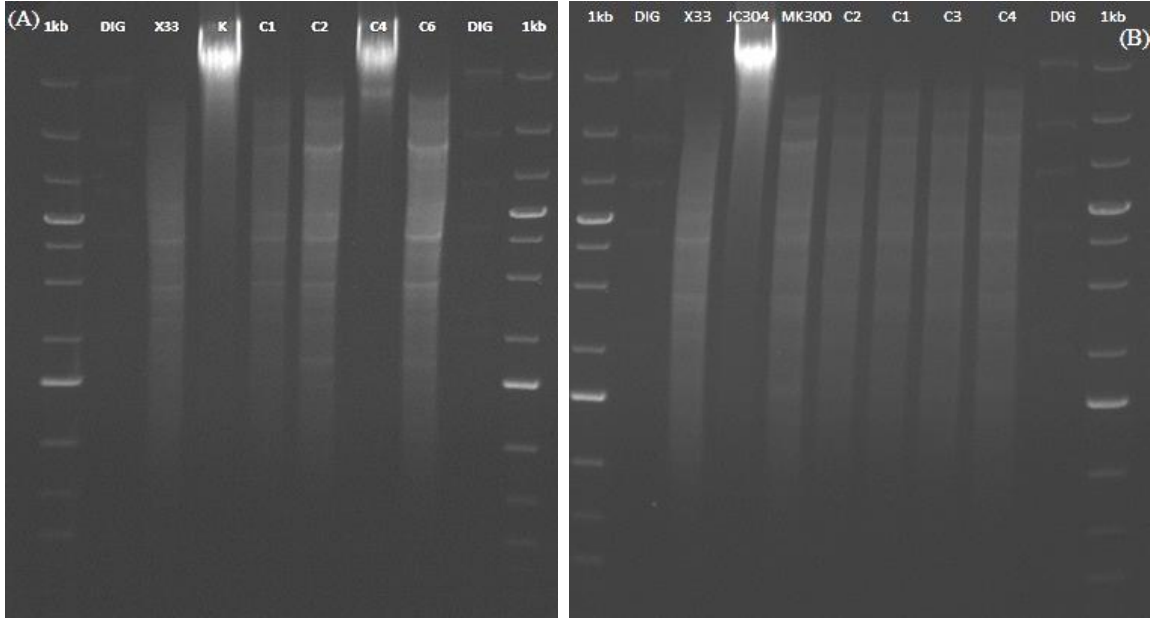
Bu aşamanın devamında *AOX2* gen inaktivasyonunun kesin olarak doğrulanması amacı ile southern Blot analizine geçilmiştir. Southern Blot analizinde *AOX2* gen bölgesinden hazırlanan DIG etiketli prob kullanılmıştır. Prop olarak kullanılacak olan DNA parçası *AOX2*probeF ve *AOX2*1618R primerleri kullanılarak PZR yolu ile elde edilmiş ve etiketleme sonrası probun etkinliği belirlenmiştir (Şekil 4.18).



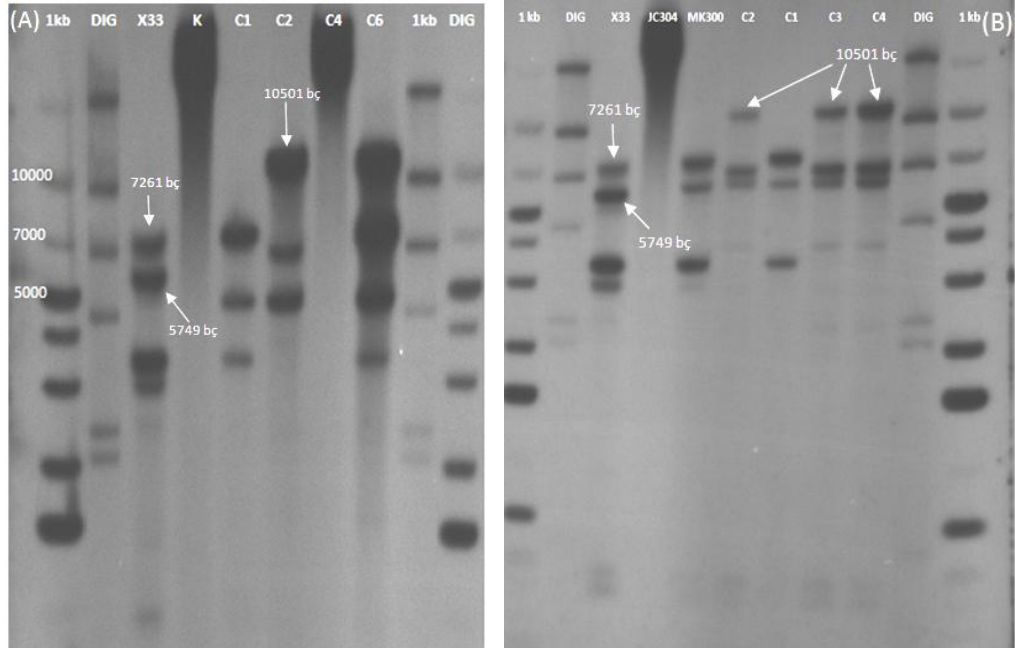
Şekil 4.18. *AOX2* geni için dizayn edilen prop ve probun etkinliği (A):Prop eldesi için yapılan PZR görüntüsü, (B):Prop etkinlik ölçümünün görüntüsü.

Transformant MK111 ve MK300 suşları ve negatif kontrol olarak X33 ve JC304 suşlarından elde edilen genomik DNA'lar *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir (Şekil 4.19).

DNAMAN programı ile daha önceden yapılan analizde negatif kontrol suşlarında 7,261 bç, inaktif suşlarda 10,501 bç ve *AOXI* genine olan homolojiden dolayı *AOXI* genine bağlanması durumunda 5749 bç büyüklüğünde bantlar gözlenecektir. Southern Blot analizi ile inaktif suşlar tespit edilmiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.19. Transformant MK111 ve MK300 genomik DNA'larının Southern blot analizi için *EcoRI* enzimi ile kesilmesi ve jelde yürütülmesi (A):MK111 ve (B):MK300 suşları. 1kb:1kb markır, DIG:DIG etiketli markır, K:Negatif kontrol, C1-C4:Farklı klonlar, PK:Pozitif kontrol.



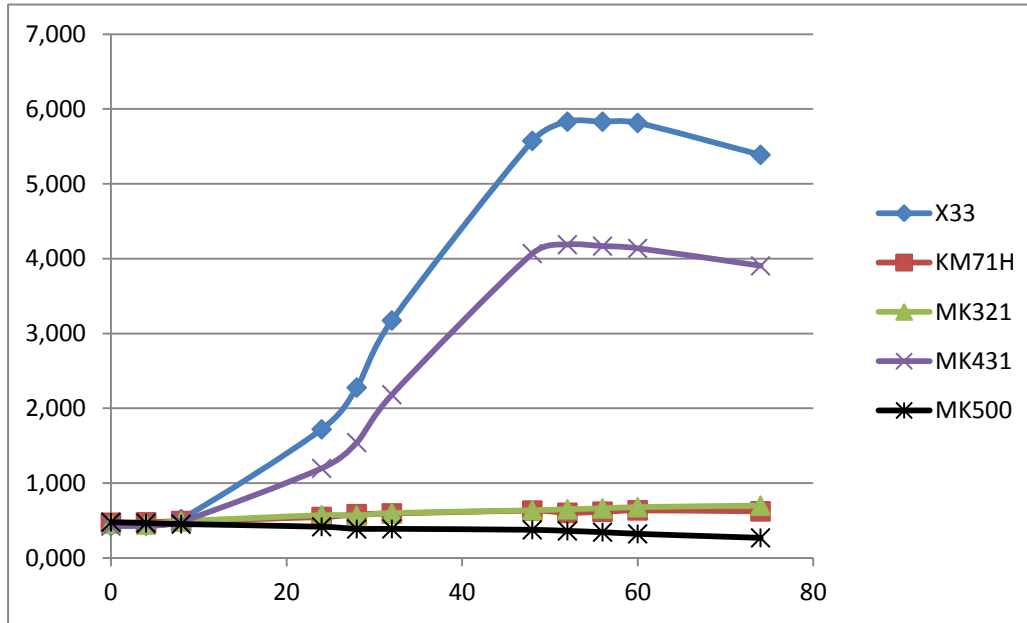
Şekil 4.20. Tranformant MK111 ve MK300 suşlarında yapılan southern blot analizi sonucu X-ışını filminin görüntüsü (A):MK111 ve (B):MK300 suşları. 1kb: Fermentas markır, DIG:DIG etiketli markır, K:Negatif kontrol, C1-C4:Farklı klonlar, PK:Pozitif kontrol.

Southern Blot sonucunda MK111 C6 klonu MK431, MK300 C3 klonu ise MK500 olarak isimlendirilmiş ve isimlendirilen bu suşlar ile devam edilmiştir.

Bu çalışma ile elde edilen ve protein üretimlerinde kullanılacak MK321 (*his4::PHIS4 aox1::ADE1*) suşunun sadece *AOX1* geni inaktif edilmiş, MK431 (*ade1::PADE1 aox2::HIS4*) suşunun *AOX2* geni inaktif edilmiş ve MK500 (*aox1::ADE1, aox2::HIS4*) suşunun ise her iki *AOX* geni de inaktif edilmiştir.

#### 4.1.6. Metanol içeren besiyerinde gelişim eğrisinin çıkartılması

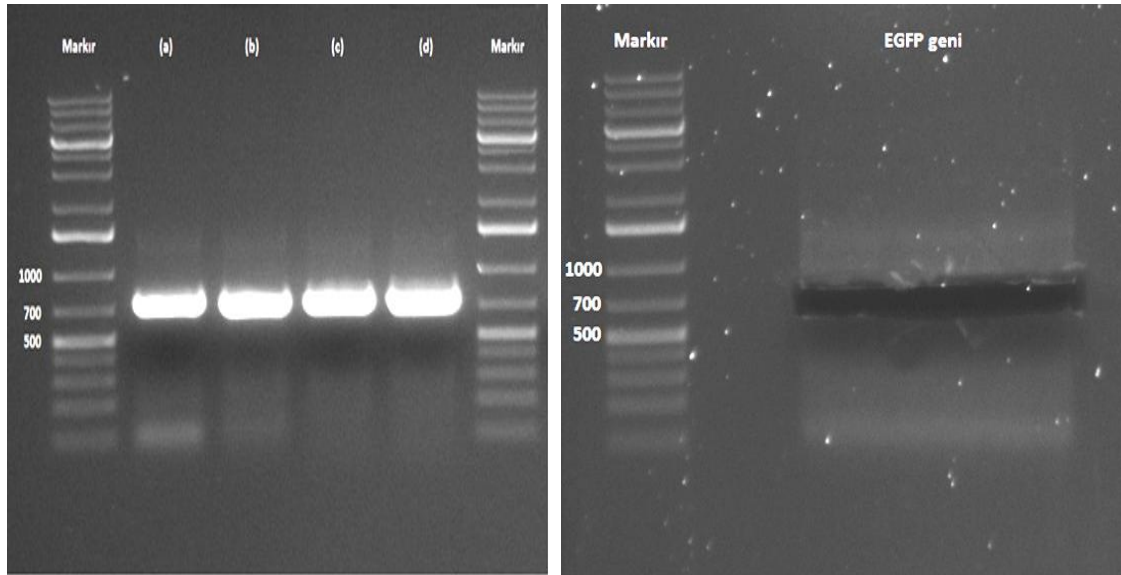
Kontrol ve karşılaştırma olarak kullanılmış olan *P. pastoris* X33 ve KM71H suşları ile bu çalışmada elde edilen MK321, MK431 ve MK500 suşlarının metanol içeren besiyerinde üreme yeteneklerine bakılmıştır. Bunun için 30 mL MM besiyerine yaklaşık 0.5 OD olacak şekilde inokülasyonu yapılan suşlardan 72 saat boyunca örnekler alınmış ve OD değerleri ölçülmüştür. Analiz 3 paralelli yürütülmüştür. Elde edilen OD-Zaman grafiğinde MK431 suşunun doğal tip olarak kabul edilen X33 ile aynı şekilde *AOX1* geni inaktif KM71H'nin de elde etmiş olduğumuz MK321 ile benzer gelişim gösterdiği görülmüştür. Her iki *AOX* geni inaktif MK500 suşunun ise metanol içeren besiyerinde gelişmediği tespit edilmiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. İnaktif suşların metanol içeren (MM) besiyerinde gelişim eğrisi

#### 4.1.7. Rekombinant protein ekspresyonu için ekspresyon vektörünün oluşturulması ve transformasyonu

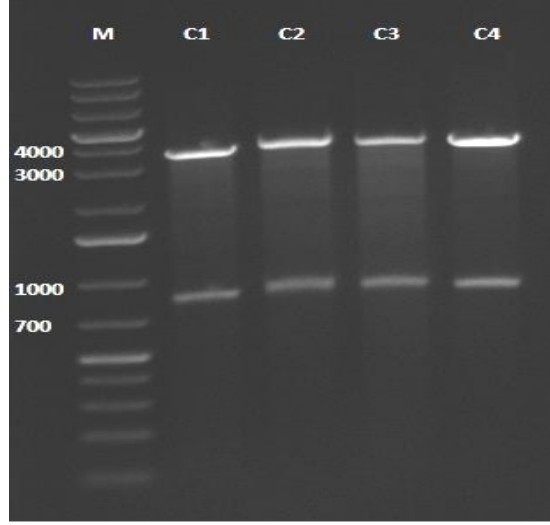
Protein üretimi için kullanılarak olan 720 bp uzunluğundaki EGFP'yi kodlayan geni laboratuvarımızda mevcut başka bir plazminin kalıp olarak kullanıldığı PZR ile elde edilmiştir. PZR primerleri olarak üzerinde enzim bölgeleri olan EGFPXhoIF ve EGFPNotIR kullanılmıştır. PZR reaksiyonu için 56-66°C aralığında dört farklı bağlanma sıcaklığı denenmiştir. Sıcaklık değerleri yaklaşık (a) 56°C, (b) 59°C, (c) 63°C, (d) 66°C olarak uygulanmıştır. EGFP geni, farklı boyutlarda başka bantlarında olması nedeni ile jelden ekstrakte edilmiştir (Şekil 4.22). Elde edilen PZR ürünleri PZR pürifikasyonu yapılarak bir sonraki aşamaya geçilmiştir.



Şekil 4.22. EGFP geni için PZR ürünlerinin jel görüntüsü ve jelden özütlenmesi. (a)-(d):Farklı sıcaklık uygulamaları.

Jelden özütlenen EGFP geni ve ekstraselüler bir ekspresyon vektörü olan PPICZ $\alpha$ A vektörü *XhoI* ve *NotI* kesilmiş ve PZR pürifikasyonu yapılarak ligasyon işlemine hazır hale getirilmiştir. E.coli hücrelerine transformasyon sonrası 25  $\mu$ g/mL zeosin içeren LB Lennox agar plakalarında gelişen tek kolonilerden test tüplerine alınarak aynı özellikleri taşıyan sıvı besiyerinde geliştirilmiştir. Daha sonra geliştirilen hücrelerden plazmit izolasyonu yapılmıştır. Plazmitler klonlanan *XhoI* ve *NotI* enzimleri ile kesilerek kontrol edilmiştir (Şekil 4.23).





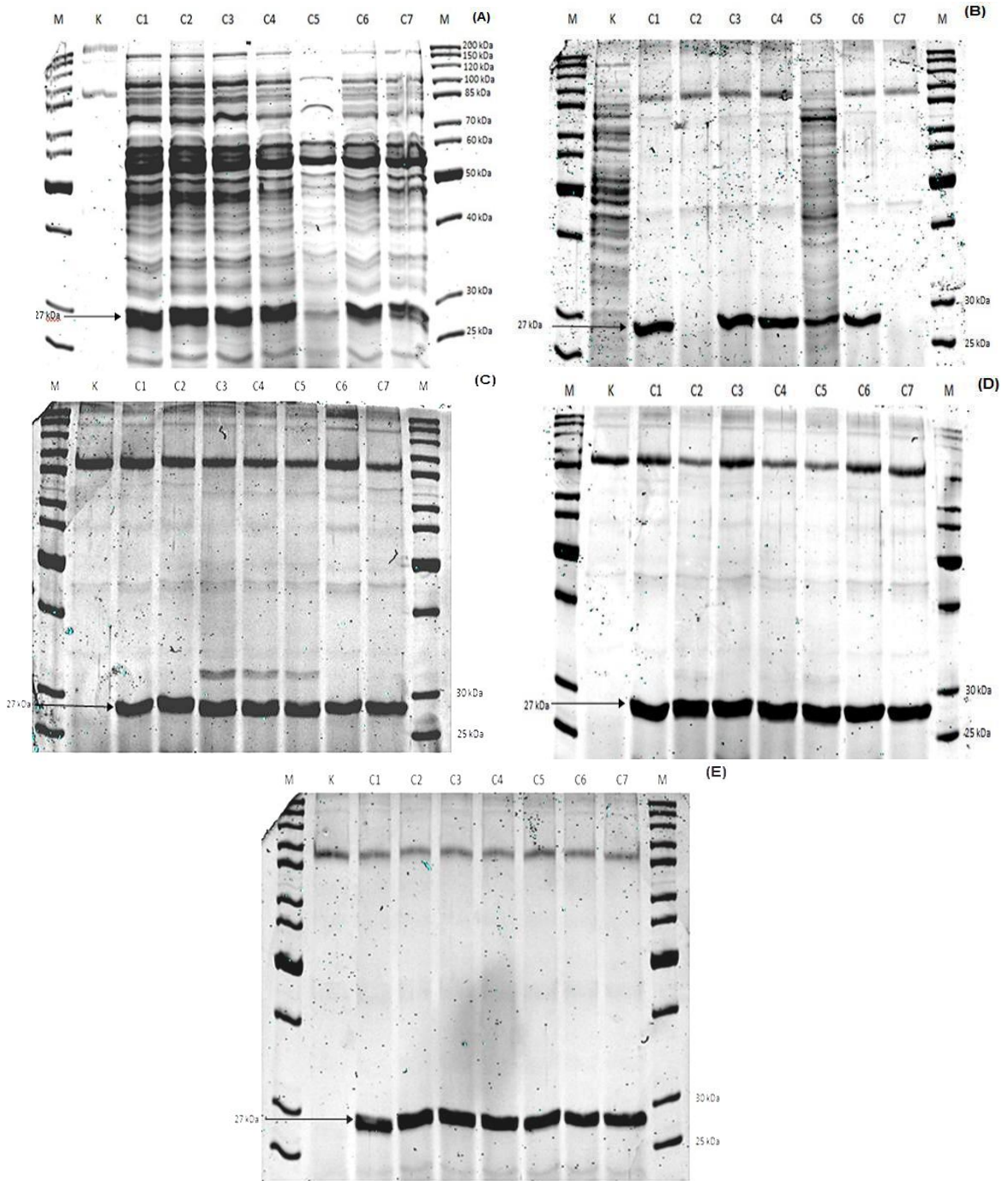
Şekil 4.23. EGFP geninin klonlandığı pPICZαEGFP plazmitlerinin kontrolü. M:1kb markır, C1-C4:farklı klonlar.

Doğrulaması yapılan PPICZαEGFP plazmitlerinden C1 olarak isimlendiren klon ile protein üretimlerine devam edilmiştir. Plazmit *SacI* enzimi ile doğrusal hale getirmiş ve kompatent hale getirilmiş *P. pastoris* X33, KM71H, MK321, MK431 ve MK500 suşlarına transform edilmiştir.

#### 4.1.8. EGFP üretimi ve protein üretim yeteneklerinin taranması

PPICZαA-EGFP plazmitinin transform edildiği suşların seleksiyonu 100 µg/mL zeosin içeren YPD plakalarda yapılmıştır. Plakalar, hücrelerin gelişimi için 30°C’de yaklaşık iki gün inkübe edilmiştir. Gelişen hücreler tek koloni eldesi için tekrar ancak zeosin içermeyen YPD besiyerine çizgi ekim yapılmıştır. YPD plakalarda gelişen hücrelerden tek koloni alınarak 3 mL sıvı YPD besiyerinde geliştirilmiştir. Sıvı besiyerinde bulunan hücreler 0.1 OD olacak şekilde BMGY (%2 Pepton, %1 Yeast Extract, %1.34 YNB,  $4 \times 10^{-5}$  % biotin, 100mM Fosfat Tamponu pH 6.0 ve %1 Gliserol) besiyerine inokülasyonu yapılmış ve 18-20 saat 12-15 OD değerine kadar gelişimi sağlanmıştır. Sürenini sonunda hücreler  $3000 \times g$ ’de 5 dak santrifüj edilerek sorbitol eklenmiş BMMY besiyerinde çözülmüştür. Sorbitol eklenmiş BMMY (%2 Pepton, %1 Yeast Extract, %1.34 YNB,  $4 \times 10^{-5}$  % biotin, 100mM Fosfat Tamponu pH 6.0 ve %1

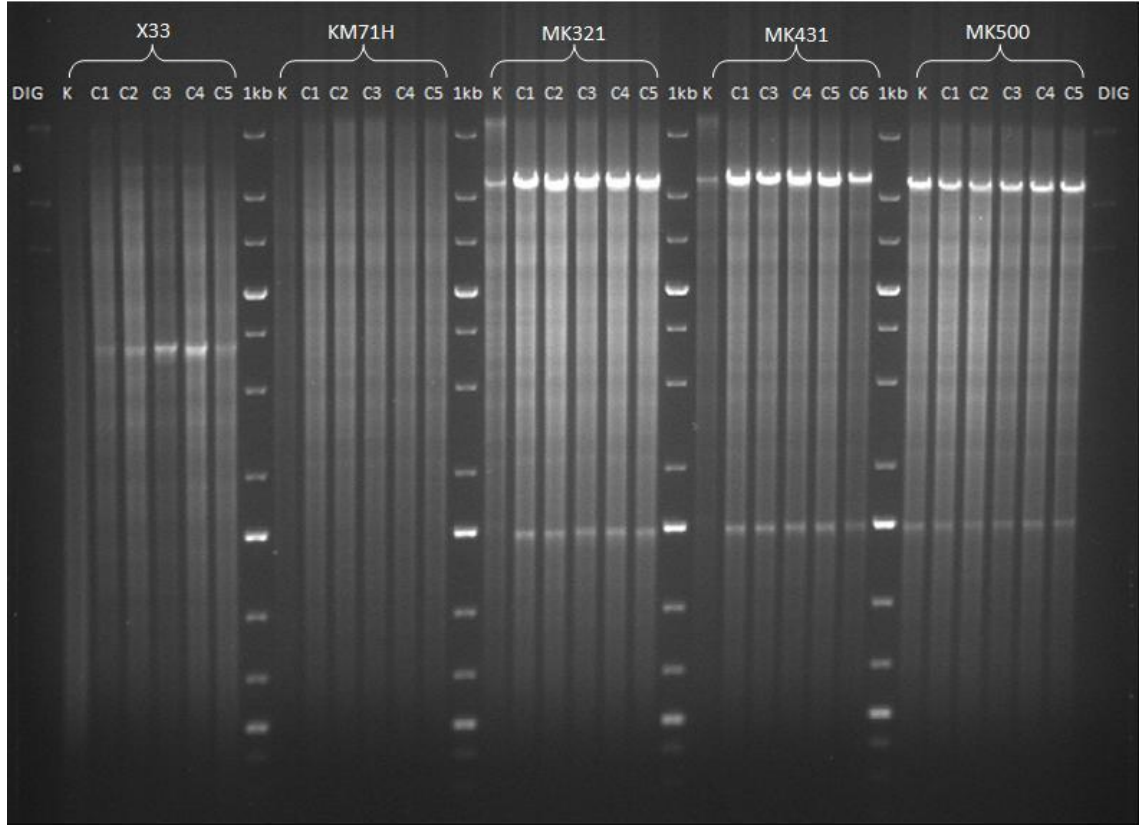
Metanol) besiyerine geçirilen hücelere 12 saat sonra konsantrasyonu %1 olacak şekilde metanol ilavesi yapılmıştır. 24 saat sonunda süpernatantlar hasat edilmiş ve her bir süştan yedi klon alınarak SDS-PAGE analizi ile EGFP üretim yetenekleri belirlenmiştir (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. Transformant süştlerin EGFP üretim yeteneklerini gösteren SDS-PAGE jeli görüntüleri (A):X33, (B):MK431, (C):KM71H, (D):MK321 ve (E):MK500 süştleri. M: protein markırı, K:Negatif kontrol, C1-C7:Farklı klonlar.

#### 4.1.9. Southern Blot analizi ile EGFP gen kopya sayısının belirlenmesi

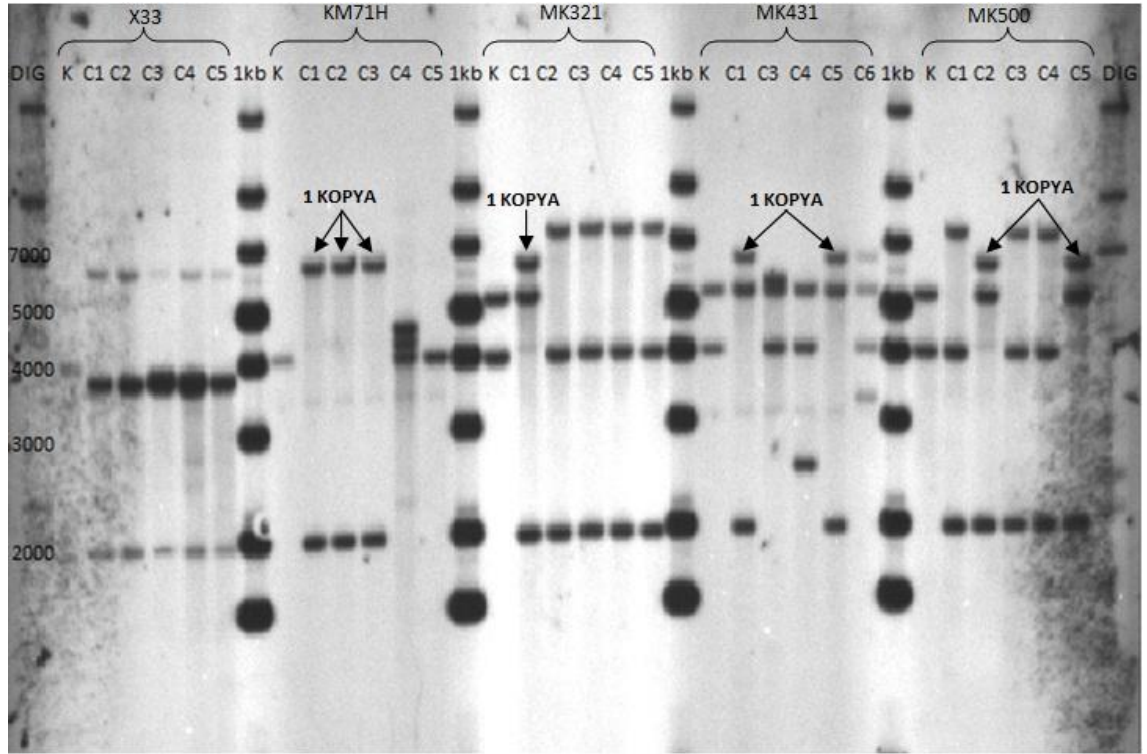
Seçilen klonların kopya sayıları İnan vd (2006, 2007)'ye göre Southern Blot analizi ile belirlenmiştir. Seçilen klonların genomik DNA'ları Yeast DNA Extraction Kit (Epicentre, Madison, WI, ABD) kullanılarak izole edilmiş ve 1 µg olacak şekilde genomik DNA'lar *EcoRV* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Enzim ile kesim sonrası %0.8 TAE agaroz jelde yürütülmüştür (Şekil 4.25).



Şekil 4.3. EGFP üretim suşlarının gen kopya sayısının belirlenmesi için genomik DNA'larının *EcoRV* enzimi ile kesilmesi ve jelde yürütülmesi. 1kb:1kb markır, DIG:DIG etiketli markır, K:Negatif kontrol, C1-C5:Farklı klonlar.

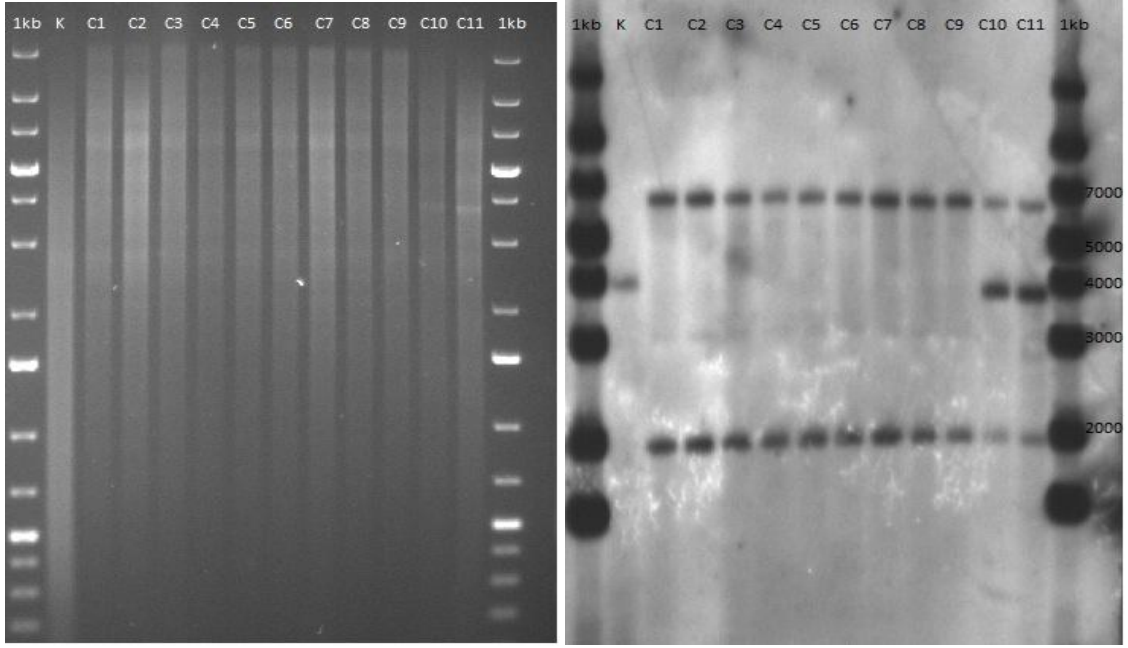
Jelde yürütülen DNA fragmentleri pozitif yüklü naylon membrana transfer edilmiş ve membran *AOX1* promotorundan tasarlanan DIG-etiketli (Roche) prop ile hibridize edilmiştir. Kontrol suşlarında bulunan yaklaşık 3800 bç büyüklüğündeki bandın ekspresyon vektörünün integrasyonu sonucu 6500 bç büyüklüğüne çıkması ve *EcoRV* enzim bölgesinin vektörün içinde tek yerde olması nedeni ile de 2000 bç değerinde ikinci bir bandın oluşması gerekmektedir. Buna göre Southern Blot X-ışını

filmi kullanılarak EGFP ekspresyon kaseti kopya sayısı bant sayısına göre belirlenmiştir (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. EGFP gen kopya sayılarının belirlendiği southern blot analizinin X-Ray filmi görüntüsü. 1kb:1kb markır, DIG:DIG etiketli markır, K:Negatif kontrol, C1-C6:Farklı klonlar.

Bunun sonucu olarak X33 suşu dışında diğer bütün suşlarda bir kopya sayısına sahip klonlar bulunmuştur. X33 suşunda bir kopya sayısına sahip suşu elde etmek için düşük zeosin (50 µg/mL) konsantrasyonuna sahip YPD agar plakalarda ikinci defa transformasyon yapılmıştır. Transformasyon sonrası seçilen klonlardan tekrar genomik DNA izolasyonu yapılmış ve *EcoRV* enzimi ile kesilerek southern Blot analizi tekrarlanmıştır. Elde edilen X-ışını filmi ile bir ekspresyon kasetine sahip suş bulunmuştur (Şekil 4.27). Protein ekspresyon denemelerinde her konukçudan bir ekspresyon kaseti içeren klonlar ile devam edilmiştir.



Şekil 4.4. Bir ekspresyon kasetine sahip X33 suşu için yapılan southern blot analizinin jel görüntüsü ve X-ışını filmi. 1kb:1kb markır, K:Negatif kontrol, C1-C11:Farklı klonlar.

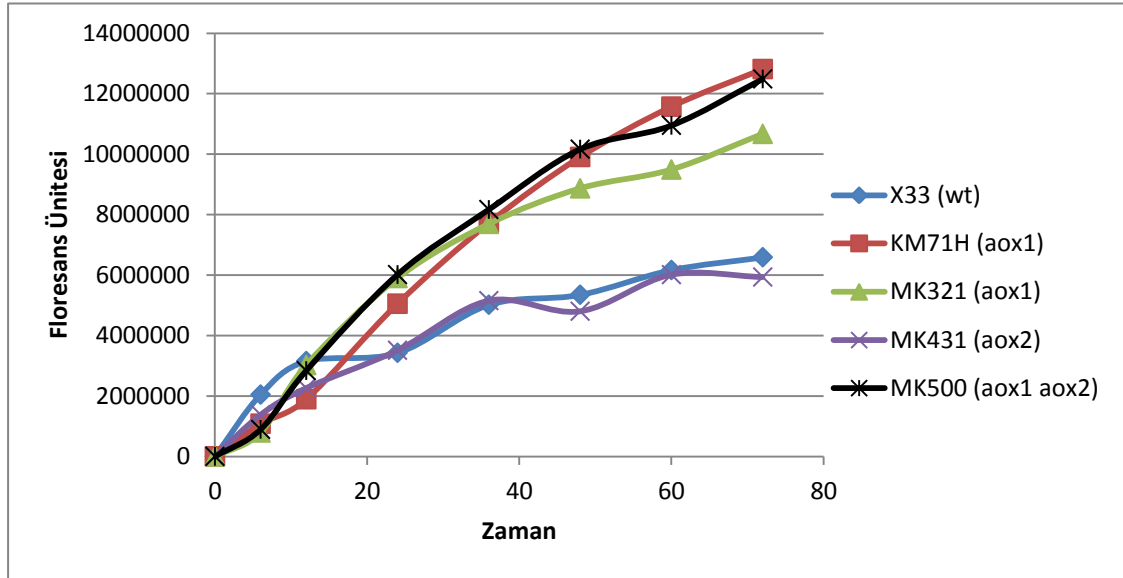
Southern Blot gen kopya sayısı ile elde edilen tek kopya sayısına sahip klonlardan X33, KM71H, MK321 ve MK431 suşları için C1, MK500 suşu için de C2 klonları seçilmiştir. Her suştan seçilen tek bir klon ile protein üretimi çalışmalarına geçilmiştir.

#### 4.1.10. Çalkalamalı erlenmayerde EGFP ekspresyonu çalışmaları

Aynı gen kopya sayısına sahip olacak şekilde seçilen transformant hücreler ve aynı suşların transformant olmayan kontrol suşları ilk olarak 3 mL YPD besiyeri içeren test tüplerine inoküle edilmiş ve 28°C'de 24 saat 250 dev/dak'de inkübe edilmiştir. YPD besiyerinde geliştirilen hücreler, başlangıç OD<sub>600nm</sub> yoğunluğu 0.1 olacak şekilde 250 mL hacimli 30 mL BMGY içeren erlenmayerlere inokülasyonu yapılmıştır. İnkübasyon 30°C'de 18 sa. 250 dev/dak'de gerçekleştirilmiştir. Sürenini sonunda hücreler 3000×g'de 5 dak santrifüj edilerek sorbitol eklenmiş BMMY besiyerinde çözülmüştür. Çalışma ile elde edilmiş olan MK500 suşunun her iki AOX geninin de inaktif olması nedeni ile metanolü kullanamamaktadır. Bu nedenle BMMY besiyerine AOX1 promotorunu baskılamayan bir karbon kaynağı olan sorbitol eklenmiştir (İnan ve Meagher 2001b). Sorbitol eklenmiş BMMY besiyerine geçirilen hücrelere 24 saat sonra

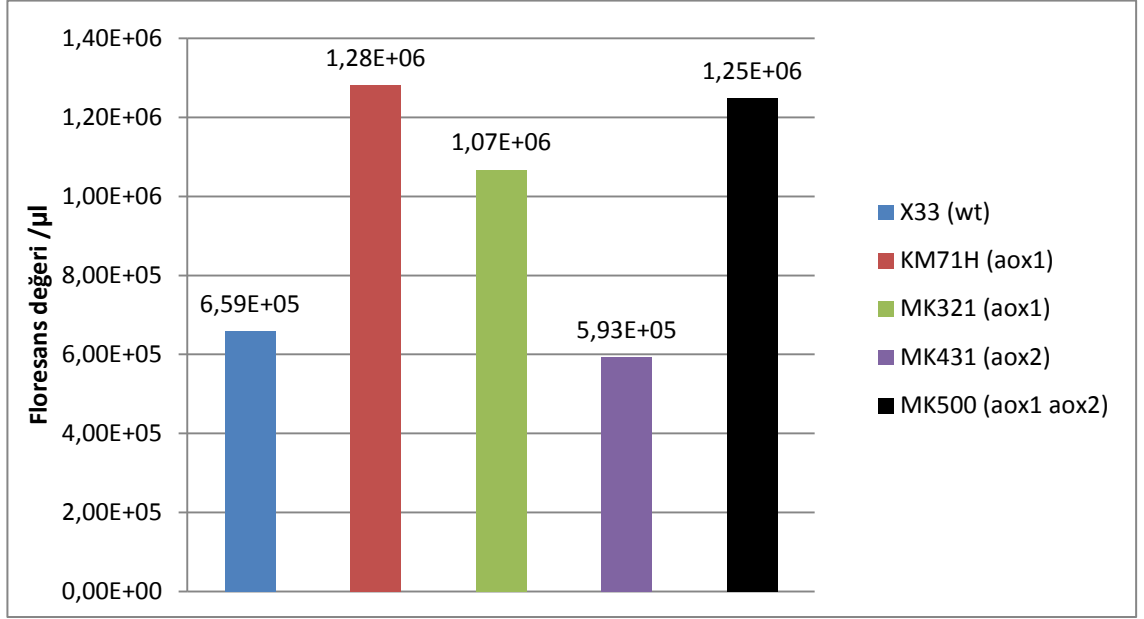
konsantrasyonu %1 olacak şekilde metanol ilavesi yapılmıştır. İndüksiyon süresi boyunca 0., 6., 12., 24, 36., 48., 60. Ve 72. saatlerde 1'er mL örnekler alınarak hücreler çöktürülmüş ve süpernatantlar ekspresyonu yapılmış EGFP floresans miktarının tespiti için +4°C'de muhafaza edilmiştir. EGFP üretim analizi 3 paralelli olarak yürütülmüştür.

Kontrol ve EGFP üretim suşlarından elde edilen süpernatantlar 20 kat seyreltilmiş ve EGFP floresans değeri florometre (VICTOR™ X3 Multilabel Plate Reader) yardımıyla ölçülmüştür. Bir suş için 3 paralelin ortalaması alınmış ve kontrolün floresans miktarından çıkartılarak sahip olduğu floresans miktarı göreceli olarak elde edilmiştir. Elde edilen floresans ünitesinin fermentasyon süresi boyunca zamana bağlı değişimleri Şekil 4.28'de verilmiştir.



Şekil 4.28. EGFP üretim suşlarına ait floresans Ünitesi-Zaman grafikleri

Üretim suşlarınının 72. saat floresans ünitelerinin OD değeri göz önüne alınmaksızın değerlendirilmesi ile elde edilen sonuçlar karşılaştırmalı olarak şekil 4.29'da verilmiştir.



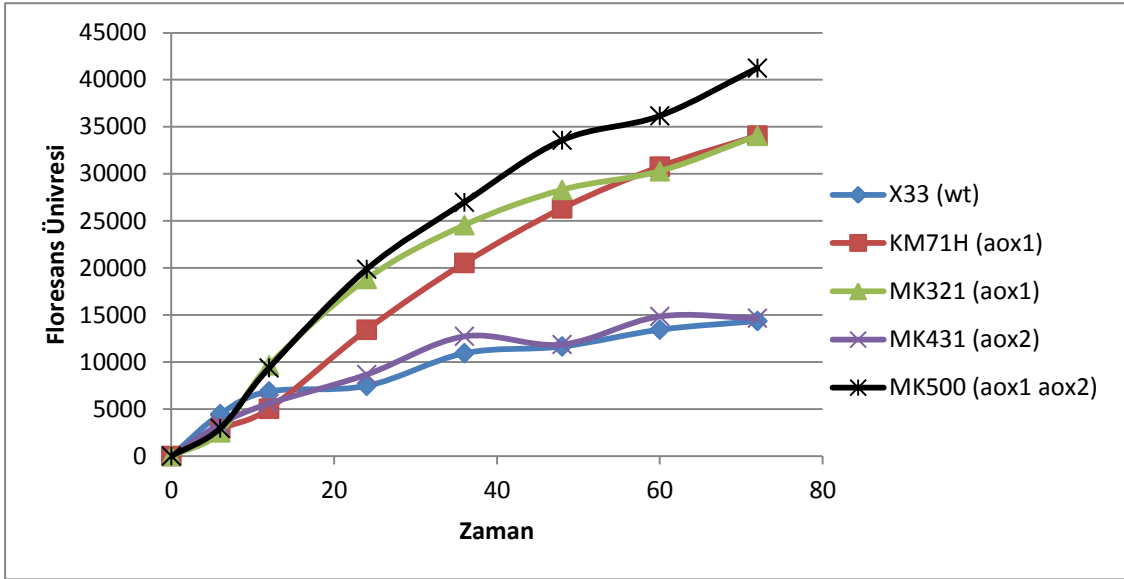
Şekil 4.29. Üretim suşlarının 72. saat floresans ünitesinin grafiksel gösterimi

EGFP üretim miktarına en büyük etkiyi hücrelerin OD değerleri etki etmektedir. Bu nedenle örneklerin OD değerleri düzenli olarak ölçülmüştür. Suşlar arasındaki OD farklılığına örnek olarak 72. saat OD değerleri çizelge 4.1’de verilmiştir.

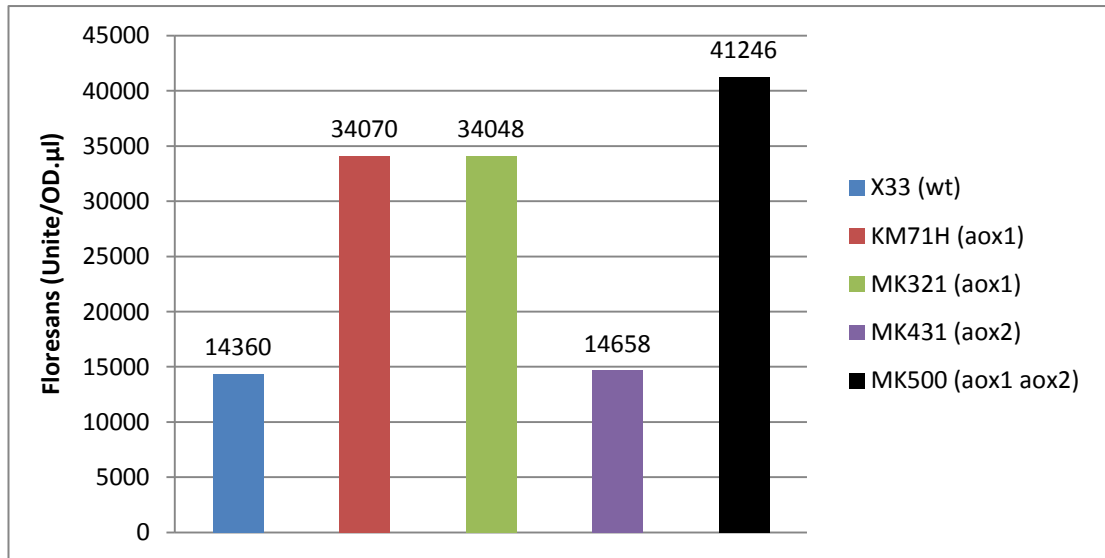
Çizelge 4.1. EGFP üretiminin 72. Saat OD değerleri

Suş	72. saat OD Değeri
X33	46
KM71H	38
MK321	31
MK431	40
MK500	30

EGFP floresans ünitesinin hesaplanması işleminde hücrelerin OD değerleri göz önünde tutulduğunda Şekil 4.32 ve Şekil 4.33'deki grafikler elde edilmiştir.



Şekil 4.5. OD değerleri dahil edilmiş EGFP üretim suşlarına ait Floresans Ünitesi-Zaman grafikleri

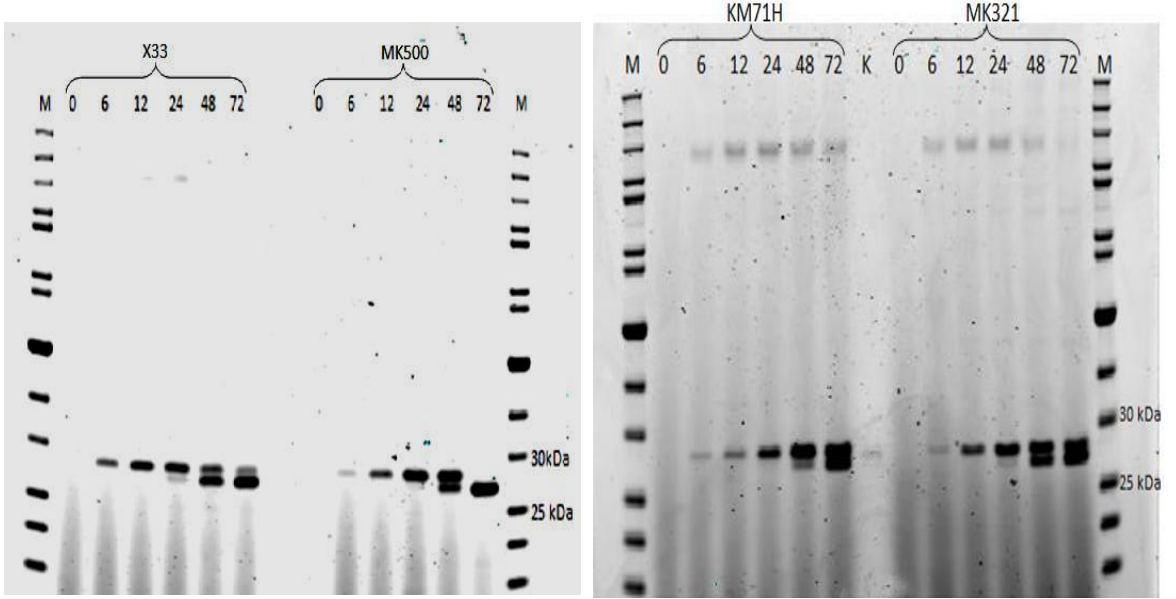


Şekil 4.31. OD değerleri göz önüne alınmış üretim suşlarının 72. saat floresans ünitesinin grafiksel gösterimi



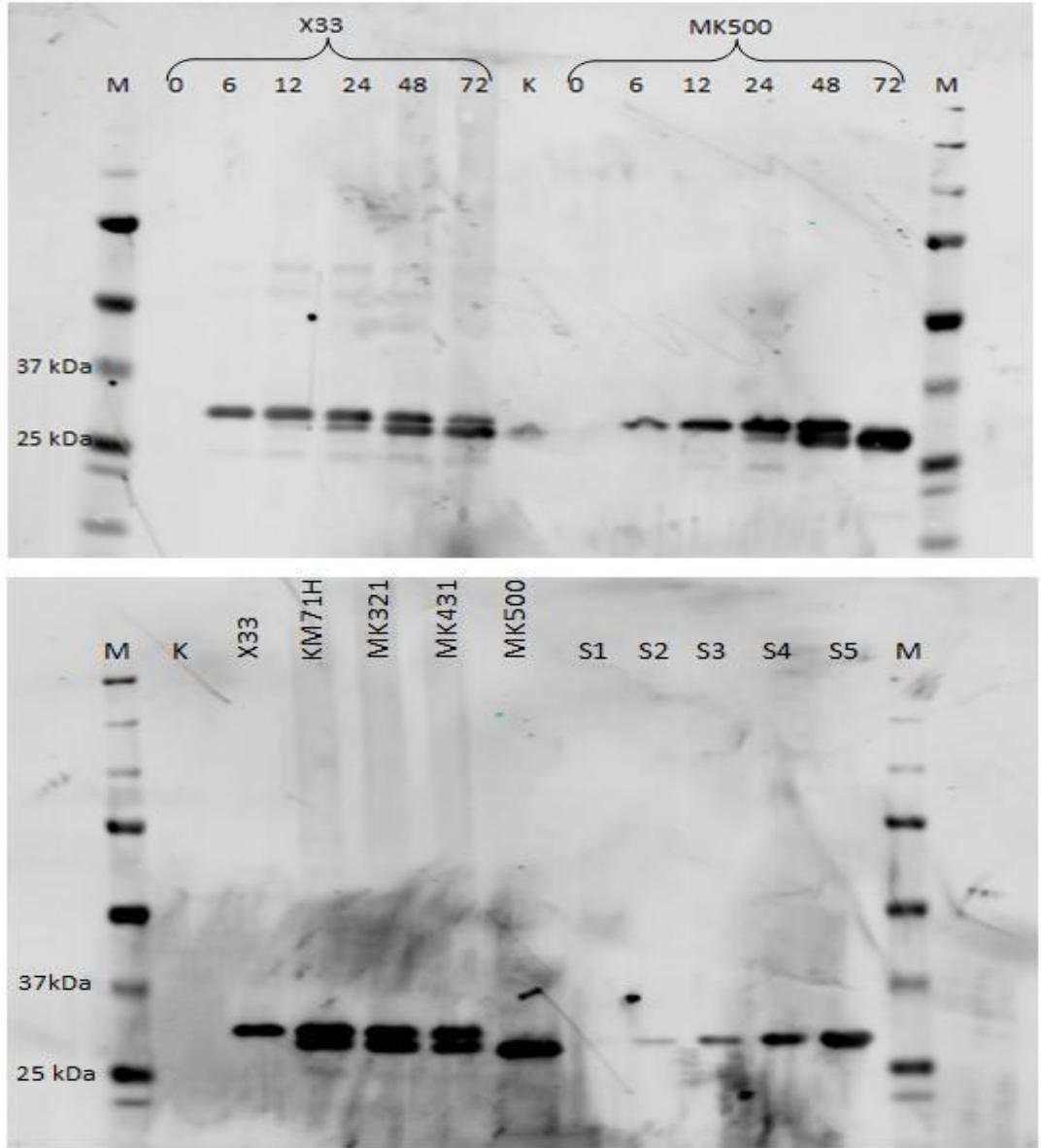
#### 4.1.11. SDS-PAGE ve Western Blot analizi ile EGFP kalitesinin belirlenmesi

SDS-PAGE analizi ile *P. pastoris* X33-MK500 ve KM71H-MK321 suşlarının EGFP üretimlerinin zamana bağlı değişimi karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmanın en doğru şekilde yapılabilmesi için her bir örnekten eşit hacimde yüklenmiştir (Şekil 4.32).



Şekil 4.32. *P. pastoris* X33-MK500 ve KM71H-MK321 suşlarının EGFP üretimlerinin zamana bağlı değişimini gösteren SDS-PAGE görüntüsü. M:Protein markırı, 0-72:süre (saat).

EGFP üretimi kalitesi, EGFP'ye spesifik olan Rabbit anti-GFP antibody (Abcam ab6556) ve ikinci antibody olan Licor Mouse anti-Rabbit IRDye 680 ile belirlenmiştir. Buna göre rekombinant protein üretimde yaygın olarak kullanılan *P. pastoris* X33 suşu ile bu çalışmada elde edilen MK500 suşu karşılaştırılmıştır (Şekil 4.32). Ayrıca kontrol amaçlı kullanılan ve tarafımızdan geliştirilen tüm suşların induksiyon aşamasında alınan 72. saat örnekleri de aynı analize tabii tutulmuştur (Şekil 4.33).



Şekil 4.33. *P. pastoris* X33-MK500 suşlarının karşılaştırılması ve tüm suşlarda 72. saat örneklerinin western blot analizi. M:Protein markırı, 0-72:Saat aralığı, K:Kontrol, S1-S5:Standard EGFP (S1:10ng, S2:50ng, S3:100ng, S4:250ng ve S5:500ng)

Western Blot analizi sonucu olarak, bu çalışma ile elde edilen *P. pastoris* MK500 suşunun rekombinant protein üretimlerinde kullanılan *P. pastoris* X33 suşundan daha yüksek spesifik verimlilik ile protein üretme yeteneğine sahip olduğu görülmüştür. Ancak, standartlar ile karşılaştırıldığında daha düşük moleküler ağırlığa sahip ikinci bir bant oluşmuştur. Bunun sebebinin hücre dışı proteazların aktivitesinin etkisi ile EGFP'nin degradasyona uğradığı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda,

rekombinant protein üretimlerinde proteinlerin aktif degradesyonunu engellemek veya en aza indirmek için proteaz üretmeyen suşların kullanımının daha iyi sonuç verdiği belirtilmiştir (Rios vd 2007, Tolstorukov ve Cregg 2007). Bu nedenle moleküler teknikler kullanılarak yapılacak çalışmalar ile MK500 suşunda proteaz aktivitesinden sorumlu genler inaktif edilerek, rekombinant protein üretimlerinde daha iyi sonuçların sağlanacağı öngörülmektedir. Ayrıca, bu durumun üretilen EGFP proteinine özgü olup olmadığı MK500 suşunda farklı proteinlerin ekspresyonunun denenmesi ile anlaşılabilir.

## 5. SONUÇ

Bu çalışmanın sonucu olarak:

- 1- *P. pastoris* MK500 suşunun, rekombinant protein üretiminde yaygın olarak tercih edilen *P. pastoris* X33 suşundan daha yüksek spesifik verimlilik ile EGFP ürettiği görülmüştür. Bunun sonucu olarak, rekombinant protein üretimlerinde X33 suşuna alternatif konukçu bir suş geliştirilmiştir.
- 2- Genetik metotlar kullanılarak elde edilen MK321 (*his4::PHIS4 aox1::ADE1*) suşu ile aynı fenotipe sahip ticari KM71H (*Δaox1: :SARG4 his4 arg4 his4::PHIS4*) suşu arasında EGFP üretimi açısından bir fark görülmemiştir. Western Blot analizi sonucunda MK431 (*ade1::PADE1 aox2::PHIS4*) suşunun X33 (doğal tip) suşuna göre daha yüksek spesifik verimlilik ile EGFP ürettiği gözlenmiştir. Ancak floresans ünitesi olarak, iki suş (MK431 ve X33) arasında kayda değer bir fark görülmemiştir.
- 3- Western Blot analizi sonucu, daha düşük moleküler ağırlığa sahip ekstra ikinci bir bant oluşmuştur. Bunun sebebinin hücre dışı proteazların aktivitesinden kaynaklı olarak EGFP degradasyona uğradığı düşünülmektedir. Bu durumun proteine özgü olup olmadığı MK500 (*aox1::ADE1 aox2::HIS4*) suşunda farklı proteinlerin ekspresyonu ile anlaşılabilir.
- 4- Sonuç olarak, elde edilen yeni konukçu sistem, rekombinant protein üretiminin yapıldığı çalışmalara farklı bir konukçu sistem olarak katkıda bulunacaktır. Ayrıca hücre dışı proteaz aktivitesi elemine edildiği takdirde, MK500 suşu ile rekombinant protein üretiminden daha iyi sonuçlar elde edilebilecektir.
- 5- Bu araştırma ile elde edilen veriler, daha üstün özelliklere sahip konukçu sistem geliştirmeye yönelik ileride yapılacak çalışmalara da ışık tutacaktır.

## 6. KAYNAKLAR

- AMSTERDAM, A., LIN, S. and HOPKINS N. 1995. The *Aequorea victoria* Green Fluorescent Protein can be used as a reporter in live zebrafish embryos. *Developmental Biology*. Vol. 171:1-12.
- ANONİM 2006. Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000204. (<http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASListings/ucm153734.htm>)
- BAUMANN, K., MAURER, M., DRAGOSITS, M., COS, O. and FERRER, P. 2008. Hypoxic fed-batch cultivation of *Pichia pastoris* increases specific and volumetric productivity of recombinant proteins. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 100:177-183.
- BREJC, K., SIXMA, T.K., KITTS, P.A., KAIN, S.R., TSIEN, R.Y., ORMO, M. and REMINGTON, S.J. 1997. Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the *Aequorea Victoria* green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. Vol. 94: 2306-2311, March. Biophysics.
- BRIERLEY, R. A. 1998. Secretion of recombinant human insulin-like growth factor I (IGF-I). *Methods Molecular Biology*. Vol. 103:149-177.
- BRUINENBERG, P. G., M. VEENHUIS, J. P. VAN DIJKEN, J. A. DUINE, and W. HARDER. 1982. A quantitative analysis of selective inactivation of peroxisomal enzymes in the yeast, *Hansenula polymorpha*, by high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiology Letters*. Vol. 15:45-50.

- CEREGHINO, G.P. and CREGG, J.M., 1999. Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Current Opinion Biotechnology*. Vol. 10:422-427.
- CEREGHINO, J.L and CREGG, J.M. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*. Vol. 24:45-66.
- CEREGHINO, G. P., SUNGA, A. J., CEREGHINO, J. and CREGG, J. M. 2001a. Expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*, in *Genetic Engineering: Principles and Methods*, Editor: Setlow, J. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY. Vol. 23:157-169.
- CEREGHINO, G.P.L., CEREGHINO, J.L., SUNGA, A.J., JOHNSON, M.A., LIM, M., MARTINA A.G. GLEESON, M.A.G. and Cregg, J.M. 2001b. New selectable marker/auxotrophic host strain combinations for molecular genetic manipulation of *Pichia pastoris*. *Gene* Vol. 263:159-169.
- CHALFIE, M., TU, Y., EUSKIRCHEN, G., WARD W.W. and PRASHER, D.C. 1994. Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. *Science*. Vol. 263: 802-805.
- CHIRUNOLU, V., CREGG, J.M. and MEAGHER, M.M. 1997. Recombinant Protein Production in an Alcohol Oxidase-defective Strain of *Pichia pastoris* in Fedbatch Fermentations. *Enzyme Microbial Technology*. Vol. 21:277-283.
- CHISHIMA, T., MIYAGI, Y., WANG, X., BARANOV, E., TAN, Y., SHIMADA, H., MOOSSA, A. R. and HOFFMAN, R. M. 1997. Metastatic patterns of lung cancer visualized live and in process by green fluorescence protein expression. *Clinical and Experimental Metastasis*. Vol. 15(5):547-552.

- 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*. Vol. 105:205-212.
- CODY, C. W., PRASHER, D. C., WESTLER, W. M., PRENDERGAST, F. G. and WARD W. W. 1993. Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein. *Biochemistry*. 32:1212-1218.
- COS, O., RAMON, R., MONTESINO, J.L. and VALERO, F. 2006. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methyltrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review. *Microbial Cell Factories*. 5:17.
- CREGG, J.M. 2007. *Pichia* Protocols, *Methods in Molecular Biology Series*. 2nd edition. Vol. 389:1-10.
- CREGG, J. M., MADDEN, K. R., BARRINGER, K. J., THILL, G. P., and STILLMAN, C. A. 1989. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Molecular and Cellular Biology*. Vol. 9:1316-1323.
- CREGG, J.M., SHEN, S., JOHNSON, M. and WATERHAM, H.R. 1998. Classical genetic manipulation. *Methods of Molecular Biology*. Vol. 103:17-26.
- DALY, R. and HEARN, M.T.W. 2005. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition*. Vol. 18:119-138.
- DEMAIN, A.L. 2005. Industrial mycology: past, present and future. Editor: An, Z. *Handbook of Industrial Mycology*. Marcel Dekker, pp. 1-25, New York.

- EGGELING, L., and SAHM, H. 1980. Direct enzymatic assay for alcohol oxidase, alcohol dehydrogenase, and formaldehyde dehydrogenase in colonies of *Hansenula polymorpha*. *Applied and Environment Microbiology*. Vol. 39:268-269.
- HARTNER, F.S. and GLIEDER, A. 2006. Regulation of Methanol Utilisation Pathway Genes in Yeasts. *Microbial Cell Factories*. Vol. 5:39.
- HIGGINS, D.R. and CREGG, J.M., 1998. Introduction to *Pichia pastoris*. *Methods of Molecular Biology*. Vol. 103:1-15.
- INAN M., ARYSOMAYAJULA, D., SINHA, J., and MEAGHER, M.M. 2006. Enhancement of protein secretion in *Pichia pastoris* by overexpression of protein disulfide isomerase. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 93:771-778.
- INAN, M, FANDES S.A. and ZHANG, W. 2007. Saturation of the secretory pathway by overexpression of a hookworm (*Necator americanus*) protein (Na-ASP1). *Pichia Protocols, Methods in Molecular Biology Series*. 2nd edition. Vol. 389:65-75.
- INAN, M. and MEAGHER, M.M. 2001a. The Effect of Ethanol and Acetate on Protein Expression in *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol. 92(4):337-341.
- INAN, M. and MEAGHER, M.M. 2001b. Non-Repressing Carbon Sources for Alcohol Oxidase (*AOX1*) Promoter of *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol. 92(6):585-589.



- JUNGO, C., MARISON I., and STOCKAR U.V. 2007. Regulation of alcohol oxidase of a recombinant *Pichia pastoris* Mut<sup>+</sup> strain in transient continuous cultures. *Journal of Biotechnology*. Vol. 130:236-246.
- KARABOZ, I., SUKATAR, A. and PARLAKAY, A. 2004. Denizsel Organizmalardan Elde edilen Yeşil Floresans Protein (GFP) ve Kullanım Alanları.E.U. *Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*. Vol. 21 (3-4):383-388.
- KRAINER, F.W., DIETZSCH, C., HAJEK, T., HERWING, C., SPADIUT, O. and GLIEDER, A. 2012. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains with an engineered methanol utilization pathway. *Microbial Cell Factories*. Vol. 11:22.
- LAROCHE, Y., STORME, V., De MEUTTER, J., MESSENS, J., and LAUWEREYS, M. 1994. High-level secretion and very efficient isotopic labeling of tick anticoagulant peptide (TAP) expressed in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Bio/Technology*. Vol. 12:1119-1124.
- LIU, H., TAN, X., RUSSELL, K. A., VEENHUIS, M. and CREG, J. M. 1995. PER3, a gene required for peroxisome biogenesis in *Pichia pastoris*, encodes a peroxisomal membrane protein involved in protein import. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 270:10940-10951.
- MACAULEY-PATRICK, S, FAZENDA, M.L. and McNEIL B. 2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*. Vol. 22: 249-270.
- PORRO, D., SAUER, M., BRANDUARDI, P. and MATTANOVICH, D. 2005. Recombinant protein production in yeasts. *Molecular Biotechnology*. Vol. 31: 245-259.

- RESINA, D., SERRANO, A., VALERO, F. and Ferrer, P. 2004. Expression of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* under control of the nitrogen source-regulated formaldehyde dehydrogenase promoter. *Journal of Biotechnology*. Vol. 109(1-2):103-113.
- RIOS, S.E., ERIN M. GIACCONE, and TILLMAN U. 2007. Rapid Screening of Chromatography Resins for the Purification of Proteins. *Methods of Molecular Biology*. Vol. 389:99-106.
- ROMANOS, M.A., SCORER, C.A., and CLARE, J.J. 1992. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*. Vol. 8:423-488.
- SAMBROOK, J. and RUSSEL, D. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor.
- SEARS, I. B., O'CONNOR, J., ROSSANESE, O. W., and GLICK, B. S. 1998. A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris* *Yeast*. Vol. 14:783-790.
- SREEKRISHNA, K., POTENZ, R. B., CRUZE, J. A., McCOMBIE, W. R., PARKER, K. A., NELLES, L., MAZZAFERRO, P. K., HOLDEN, K. A R. and G HARRISON, P. 1988. High level expression of heterologous proteins in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Journal of Basic Microbiology*. Vol. 28:265-278.
- 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*. Vol. 216:93-102.
- SHIMOMURA, O., JOHNSON F.H. and SAIGA, Y. 1962. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous

hydromedusan, *Aequorea*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*. Vol. 59:223-39.

SOHN, S.B., GRAF, A.B., KIM, T.Y., GASSER, B., MAURER, M., FERRER, P., MATTANOVICH, D. and LEE, S.Y. 2010. Genome-scale metabolic model of methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and its use for *in silico* analysis of heterologous protein production. *Biotechnology Journal*. Vol. 5:705-715.

SUBRAMANI, S. 1998. Components involved in peroxisome import, biogenesis, proliferation, turnover, and movement. *Physiology Reviews*. Vol. 78:171-188.

TSCHOPP, JF, SVERLOW, G, KOSSON, R, CRAIG, W., and GRINNA, L. 1987. High-level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Bio/Technology*. Vol. 5:1305-1308.

TOLSTORUKOV, I. and CREGG, J.M. 2007. *Pichia* protocols, *Methods of Molecular Biology*. Vol. 389:189-201.

VAN DER KLEI, I.J., HARDER, W. and VEENHUIS, M. 1991. Selective Inactivation of Alcohol Oxidase in Two Peroxisome-Deficient Mutants of the Yeast *Hansenula polymorpha*. *Yeast*. Vol. 7:813-821.

WANG, S. and HAZELRIGG, T. 1994. Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila oogenesis*. *Nature*. Vol. 369: 400-403.

VEENHUIS, M., VAN DER KLEI I.J., YURIMOTO, H., SAKAI Y. 2006. The Significance of Peroxisomes in Methanol Metabolism in Methylotrophic Yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol. 1763:1453-1462.

- VEENHUIS, M., J. P. VAN DIJKEN, and W. HARDER. 1983. The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeasts. *Advances in Microbial Physiology*. Vol. 24:1-82.
- WATERHAM, H.R., DIGAN, M.E., KOUTZ, P.J., LAIR, S.V. and CREGG, J.M., 1997. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene*. Vol. 186: 37-44.
- WU, S. and LETHWORTH G.J. 2004. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *BioTechniques*. Vol. 36:152-154.
- ZHANG, N., DAUBARAS, D.L. and SUEN, W.C. 2005. Heterologous protein expression in yeasts and filamentous fungi. Editor: An, Z. *Handbook of Industrial Mycology*. Marcel Dekker, pp. 667-687, New York, NY.
- ZHANG, W., INAN, M. and MEAGHER, M.M. 2007. Rational Design and Optimization of Fed-Batch and Continuous Fermentations. *Pichia Protocols, Methods in Molecular Biology Series*. 2nd edition. Vol. 389:65-75.

## 7. EKLER

Ek- 7.1 Çalışma süresince çeşitli PZR denemelerinde kullanılan primerler ve özellikleri

Primer Adı	Sekans (5' →3')	T <sub>m</sub> (°C)
AOX2FSspI	<u>GAATATT</u> GTCTTAAAACGGGC	55
AOX2RSspI	<u>AATATTC</u> CTAGATACCACATAAACTAG	61
AOX1KNOF	ATGGCTATCCCCGAAGAG	56
AOX1KNOR	CGGTCTTGCTAGATTCTAA	53
ADEFBsp1407I	<u>TGTACAG</u> GGTGCTATCGTTTTGTGC	66
ADE1RBglII	<u>AGATCTC</u> TTTTCTGACGAACCAC	61
5' AOX	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	59
3' AOX	GCAAATGGCATTCTGACATCC	59
ADE1-491F	ATCTCCGCTTACGATGTGA	55
ADE1-537R	CCCTTATCAGGAATACCGTTTG	60
ADE1-1120F	CCAAGTGGGTAAATCGCA	54
ADE1-1143R	CTCTCTTGCGATTTACCCA	55
AOX2230F	CAACTTGGACCACTCCTTGAA	59
AOX21618R	TCGGATGAGTATGGGAACAGA	59
EGFPXhoIF	<u>TTCTCTC</u> GAGAAGAGAATGGTGAGCAAGGGCGAG	76
EGFPNotIR	<u>TTGCGGCCG</u> CTTACTTGTACAGCTCGTCCATG	76
EGFPNotIHISR	<u>TTGCGGCCG</u> CTTAATGATGATGATGATGATGCTTG TACAGCTCGTCCATG	82
EGFP432F	CAACTACAACAGCCACAACG	58
EGFP451R	CGTTGTGGCTGTTGTAGTTGT	59
AOX1probeF	AGTCCAAGAACCGTGAGCAA	58
AOX1probeR	TTCTAGCGGTTTCTCTAGAC	56
AOX2probeF	CGCAAAGAAGCCAACCTCA	54

## ÖZGEÇMİŞ

Mert KARAOĞLAN, 1986 yılında Aksaray'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İzmir'de tamamladı. 2005 yılında girdiği Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden 2010 yılında fakülte birincisi ve yüksek onur öğrencisi olarak, Gıda Mühendisi ünvanı ile mezun oldu. Aynı yıl Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı. Halen aynı kurumda öğrenimine devam etmektedir.