

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

***Pichia pastoris* ETANOL METABOLİZMASI ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

**Mert KARAOĞLAN**

**DOKTORA TEZİ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**2016**



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

***Pichia pastoris* ETANOL METABOLİZMASI ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

**Mert KARAOĞLAN**

**DOKTORA TEZİ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**Bu tez TÜBİTAK Araştırma Destek Programları Başkanlığı (ARDEB) tarafından  
1001-Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı  
kapsamında 111T905 no'lu proje ile desteklenmiştir.**

**2016**



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

***Pichia pastoris* ETANOL METABOLİZMASI ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

**Mert KARAOĞLAN**

**DOKTORA TEZİ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

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

Prof. Dr. Mehmet İNAN (Danışman)

.....

Prof. Dr. Pınar ÇALIK

.....

Doç. Dr. İrfan TURHAN

.....

Doç. Dr. Muhittin ARSLANYOLU

.....

Yrd. Doç. Dr. Cengiz İKTEN

.....



## ÖZET

### *Pichia pastoris* ETANOL METABOLİZMASI ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

Mert KARAOĞLAN

Doktora Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet İNAN

Haziran 2016, 109 sayfa

*Pichia pastoris*, biyoteknoloji, ilaç endüstrisi ve akademik araştırmacılar tarafından rekombinant protein üretimi kullanılan 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 uygundur. Buna ilaveten proteolitik işlemler, disülfid köprüsü oluşumu ve glukozilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonları gerçekleştirme yeteneğine sahiptir.

Son zamanlarda, iki akademik araştırma laboratuvarı tarafından, iki farklı *P. pastoris* suşunun genom sekansı belirlenmiştir. *P. pastoris* GS115 genom sekansında *ADH3* geni ile yapılan homoloji analizi, etanol metabolizmasında rol oynayan altı muhtemel *ADH* genini ortaya koymuştur. Literatürde bu genlerin hiçbiri üzerine moleküler düzeyde çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada, *P. pastoris* etanol metabolizmasında rol oynadığı düşünülen *ADH3* geni inaktif edilerek, glukoz ve etanol içeren minimal besiyerinde üreme davranışları izlenmiştir. *ADH3* mutant suşunun etanol içeren besiyerinde üremediği ancak glukoz içeren besiyerinde hala etanol ürettiği tespit edilmiştir. Sonuçlar, *ADH3* geninin etanolün tüketiminden sorumlu tek gen olduğunu göstermiştir. Çalışmalara etanol üretiminden sorumlu olması muhtemel beş gen ile devam edilmiştir. Glukoz ve etanolde geliştirilen yabancı suş ve  $\Delta adh3$  suşunda bu muhtemel genlerin qRT-PCR metodu ile gen ekspresyon seviyesine bakılmış ve öne çıkan üç gen ile çalışmalara devam edilmiştir (*adhI*, *adhII* ve *adhV*). Bu genlerin zeosin antibiyotik dayanıklılık geni kullanılarak  $\Delta adh3$  suşunda ikili mutantları elde edilmiştir. Elde edilen suşlar glukoz içeren minimal besiyerinde geliştirilerek etanol üretme yetenekleri test edilmiş ve etanol üretiminden sorumlu olan gen *adhII* olarak tespit edilmiştir. Tespit edilen gen *ADH2* olarak isimlendirilmiştir. *ADH2* geni karakterizasyonu için yapılan analizler sonucu, *ADH2* geninin *P. pastoris* etanol metabolizmasında etanol üretiminden sorumlu majör gen olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, *ADH2* geninin inaktif olduğu suşta etanol üretiminde *ADH3* geninin de minör rol oynadığı tespit edilmiştir. Buna ilaveten, *ADH3* ve *ADH2* promotorları ile erlenmayer ve fermentör ortamında rekombinant ksilanaz üretimi denemeleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar, *ADH3* promotorunun fermentör ölçeğinde rekombinant protein üretimi için *AOX1* ve *GAP* promotorlarına alternatif bir promotor olarak kullanılabilineceğini göstermiştir.

**ANAHTAR KELİMELER:** *Pichia pastoris*, Alkol dehidrogenaz, Etanol metabolizması, Ksilanaz, Fermentasyon, Rekombinant protein üretimi.

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





## ABSTRACT

### STUDIES ON *Pichia pastoris* ETHANOL METABOLISM

Mert KARAOĞLAN

**PhD Thesis in Food Engineering**  
**Supervisor: Prof. Dr. Mehmet INAN**  
**June 2016, 109 pages**

*Pichia pastoris* is an expression system for the production of recombinant proteins used 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.

Recently, the genomes of two different strains of *P. pastoris* have been sequenced by two academic research laboratories. Six possible genes that might play role in ethanol metabolism was identified based on the homology to *ADH3* gene. In literature, none of them has been studied at the molecular level.

In this study, *ADH3* gene thought to be involved in *P. pastoris* ethanol metabolism was inactivated and growth characteristics were monitored in minimal medium containing glucose and ethanol. It was determined that *ADH3* mutant strain failed to grow on ethanol, but it was able to produced ethanol in minimal medium containing glucose. This showed that the *ADH3* gene is the only gene responsible for ethanol consumption. Thus, studies proceeded with five possible *ADH* genes. Expression levels of these genes in wild-type and  $\Delta adh3$  strain on glucose and ethanol medium were analyzed by qRT-PCR method, and three possible *ADH* genes (*adhI*, *adhII* and *adhV*) were further studied. These genes were inactivated by zeocin resistance gene in  $\Delta adh3$  strain, and double knock-out mutants were generated. The mutant strains were tested for their ability to produce ethanol on minimal medium containing glucose. The gene responsible for production of ethanol was determined and named as *ADH2*. Studies on characterization of *ADH2* showed that *ADH2* is major gene responsible for ethanol production. Also it was determined that *ADH3* gene plays minor role in ethanol production in case *ADH2* is inactive. Furthermore, the recombinant xylanase production under control of the *ADH3* and *ADH2* promoters was tested in shake-flask and fermenter conditions. The xylanase production yield with the *ADH3* promoter was higher than that of the *AOX1* and *GAP* promoter at fermentor scale. These results showed that the *ADH3* promoter can be utilized to produce recombinant proteins at large scale as an alternative to the *AOX1* and *GAP* promoters.

**KEYWORDS:** *Pichia pastoris*, Alcohol Dehydrogenase, Ethanol metabolism, Xylanase, Fermentation, Recombinant protein production.

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



## ÖNSÖZ

Moleküler biyoloji uygulamalarından tıp, ilaç, gıda ve tarım gibi geniş bir alanda faydalanılmaktadır. Bu nedenle moleküler biyoloji biliminde yapılan gelişmeler, kullanıldığı alanlardaki rolüne bağlı olarak büyük imkanlar sağlamaktadır.

Bu çalışmada, *P. pastoris* etanol metabolizmasında rol alan alkol dehidrogenaz (*ADH*) genlerinin fizyolojik rolleri araştırılmıştır. Literatürde rolü bilinmeyen ve *P. pastoris* mayasında etanol tüketiminden (katabolizma) sorumlu gen ilk defa bu çalışma ile ortaya konulmuş ve karakterize edilmiştir. Buna ilaveten, daha önce *P. pastoris* etanol metabolizmasında varlığı dahi bilinmeyen ve etanol üretiminden (anabolizma) sorumlu gen de bu çalışma ile karakterize edilerek literatürde önemli bir açık kapatılmıştır. Ayrıca, araştırılan genlerin promotorları kullanılarak fermentör koşullarında rekombinant protein üretimleri gerçekleştirilmiştir. İlgili promotorlar ile üretimler, *P. pastoris AOX1* (alkol oksidaz) ve *GAP* (gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz) promotorları ile karşılaştırılmış ve özellikle *ADH3* promotoru ile yüksek ölçekte rekombinant protein üretimin yapılabileceği gösterilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, yapılacak olan benzer çalışmalara ışık tutacak niteliktedir.

Bu çalışma süresince, bilgi ve tecrübeleri ile beni yönlendiren ve desteğini hiç esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet İNAN'a gösterdiği emek ve ayırdığı zaman için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın gerçekleşmesi sürecinde göstermiş oldukları ilgi, destek ve yönlendirmeleri için Tez izleme komite üyeleri Sayın Doç. Dr. İrfan TURHAN ve Yrd. Doç. Dr. Cengiz İKTEN'e ve diğer jüri üyeleri Prof. Dr. Pınar ÇALIK ve Doç. Dr. Muhittin ARSLANYOLU'na teşekkür ederim.

Ayrıca laboratuvar çalışmalarında desteğini ve yardımlarını benden esirgemeyen başta hayat arkadaşım Fidan ERDEN KARAOĞLAN'a ve çalışma arkadaşlarıma desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

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

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

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ .....	v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xvi
1. GİRİŞ .....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI .....	3
3. MATERYAL ve METOT .....	9
3.1. Materyal.....	9
3.1.1. Suşlar ve plazmitler .....	9
3.1.2. Kimyasallar.....	10
3.1.3. Primerler .....	10
3.2. Metot.....	11
3.2.1. Genomik DNA izolasyonu .....	11
3.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu .....	11
3.2.3. Agaroz jel elektroforezi ve jelin görüntülenmesi .....	12
3.2.4. PZR ürünlerinin saflaştırılması.....	13
3.2.5. Jelden DNA parçalarının ekstraksiyonu .....	13
3.2.6. Ligasyon ve transformasyon işlemleri.....	13
3.2.7. Plazmit izolasyonu.....	14
3.2.8. DNA ve plazmit konsantrasyonlarının ölçülmesi.....	14
3.2.9. Southern blot analizi .....	14
3.2.10. Erlenmayer deneyleri.....	15
3.2.11. Adh enzim aktivite analizi .....	16
3.2.12. Toplam protein ölçümü.....	16
3.2.13. qRT-PCR analizi ve RNA izolasyonu .....	17
3.2.14. Fermentör çalışmaları .....	18
3.2.15. Kesikli fermentasyon şartları.....	18
3.2.16. Gelişim kinetiğinin hesaplanması.....	19
3.2.17. Fermentör şartlarında rekombinant protein üretimi.....	21
3.2.18. Ksilanaz aktivitesi ölçümü.....	22
3.2.19. SDS-PAGE analizi.....	22
3.2.20. Etanol miktarının tayini .....	23

3.2.21. Glukoz miktarının tayini .....	23
3.2.22. Hücre özütünden protein saflaştırılması .....	23
3.2.23. İstatistiksel analiz.....	24
4. BULGULAR .....	25
4.1. Biyoinformatik Analiz .....	25
4.2. <i>ADH3</i> Geninin İnaktif Edilmesi ve Karakterizasyonu.....	27
4.3. <i>ADH</i> Geninin İnaktif Edilmesi.....	40
4.4. qRT-PCR Metodu ile Gen Ekspresyon Analizleri.....	47
4.5. Adh Aktivitesi Göstermesi Muhtemel Genlerin İnaktif Edilmesi .....	53
4.6. <i>ADH2</i> Geninin Karakterizasyonu ve Etanol Metabolizmasındaki Rolünün Belirlenmesi .....	59
4.7. Fermentör Şartlarında Farklı Çözünmüş Oksijen Seviyelerinde <i>ADH3</i> ve <i>ADH2</i> Genlerinin Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi.....	62
4.8. <i>Pichia pastoris ADH3</i> Promotoru ile Rekombinant Protein Üretimi .....	69
4.8.1. Ekspresyon vektörleri ve klonlama çalışmaları .....	69
4.8.2. Erlenmayer şartlarında rekombinant protein üretimleri.....	74
4.8.3. Fermentör şartlarında <i>ADH3</i> promotoru ile rekombinant protein üretimleri.....	76
4.9. <i>ADH2</i> Promotor Bölgesinin Belirlenmesi ve Rekombinant Protein Üretiminde Test Edilmesi .....	81
4.9.1. <i>ADH2</i> promotor bölgesinin belirlenmesi.....	81
4.9.2. Erlenmayer koşullarında protein üretimi .....	83
4.9.3. Fermentör şartlarında <i>ADH2</i> promotoru ile rekombinant protein üretimleri.....	85
5. TARTIŞMA.....	89
6. SONUÇ .....	93
7. KAYNAKLAR.....	94
8. EKLER .....	99
EK 8.1. Çalışmada Kullanılan Primerlerin Listesi.....	99
EK 8.2. Adh3 Enzimini Kodlayan Açık Okuma Dizisi .....	100
EK 8.3. Adh2 Enzimini Kodlayan Açık Okuma Dizisi .....	101
EK 8.4. Çalışmada Kullanılan <i>ADH3</i> ve <i>ADH2</i> Promotorlarının DNA Dizisi.....	102
EK 8.5. Ksilanaz Aktivite Hesaplamalarında Kullanılan Ksiloz Standart Kurvesi ..	103
EK 8.6. Toplam Protein Miktarının Hesaplanmasında Kullanılan Standart Protein (BSA) Kurvesi .....	104
EK 8.7. Adh enzim aktivitesi ölçümü için kullanılan standart kurvesi.....	105

EK 8.8. Erlenmayer koşullarında <i>ADH3</i> , <i>AOX1</i> ve <i>GAP</i> promotorları ile protein üretimi sonuçları ve istatistiksel analizi.....	106
EK 8.9. Erlenmayer koşullarında <i>ADH2</i> ve <i>GAP</i> promotorları ile protein üretimi sonuçları ve istatistiksel analizi .....	107
EK 8.10. Fermentör koşullarında <i>ADH3</i> , <i>AOX1</i> ve <i>GAP</i> promotoru ile protein üretimi sonuçları ve istatistiksel analizi.....	108
EK 8.11. Fermentör koşullarında <i>ADH2</i> ve <i>GAP</i> promotorları ile protein üretimi sonuçları ve istatistiksel analizi .....	109
ÖZGEÇMİŞ	



## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

dak	dakika
L	Litre
$\mu$	mikro ( $10^{-6}$ )
m	mili ( $10^{-3}$ )
M	molar
n	nano ( $10^{-9}$ )
OD	optik yoğunluk (optical density)
g	göreceli santrifüj kuvveti (relative centrifugal force, rcf)
s	saniye
sa.	saat
t	süre (saat cinsinden)
Tm	erime sıcaklığı (melting temperature)
kDa	Kilo dalton

### Kısaltmalar

bç	baz çifti
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
NCBI	National Center of Biotechnology Information
Amp	Amfisilin
BMGY	tamponlanmış kompleks gliserol besiyeri (buffered glycerol complex medium)
BMMY	tamponlanmış kompleks metanol besiyeri (buffered glycerol complex medium)
BMDY	tamponlanmış kompleks glukoz besiyeri (buffered glycerol complex medium)
BMEY	tamponlanmış kompleks etanol besiyeri (buffered glycerol complex medium)
DIG	digoksjenin (digoxigenin)
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
MD	temel glukoz besiyeri (minimal dekstroz)
ME	temel etanol besiyeri (minimal ethanol)
SDS	sodyum dodesil sülfat
PAGE	poliakrilamid jel elektroforezi
PZR	polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	ribonükleik asit
SSC	tuzlu sodyum sitrat (saline sodium citrate)
YNB	maya azot kaynağı (Yeast Nitrogen Base)
YPD	maya pepton dekstroz (yeast peptone dextrose)
TE	Tris-EDTA
TAE	Tris-Asetat-EDTA

TGS	Tris-Glisin-EDTA
ADH	Alkol dehidrogenaz
AOX	Alkol oksidaz
GAP	Gliseraldehit-3-fosfat
V	Volt
KVolt	Kilovolt





## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Mayalarda etanol metabolizması .....	5
Şekil 2.2. Mayalarda etanolün anabolize edilmesi.....	5
Şekil 2.3. Mayalarda etanolün katabolize edilmesi.....	6
Şekil 3.1. Küt uçlu PZR ürünlerinin klonlanmasında kullanılan pJET1.2 plazmiti.....	9
Şekil 3.2. Protein ekspresyonu için kullanılan pPICZαA ve pGAPZαA vektörleri.....	10
Şekil 3.3. Fermentasyon besleme profili.....	22
Şekil 4.1. <i>P. pastoris</i> Adh3 amino asit diziliminin farklı mayalardaki mevcut Adh amino asit dizilimleri ile homolojisi. Sc: <i>S. cerevisiae</i> ; Pa: <i>Pichia anamola</i> ; Cb: <i>Candida boidinii</i> ; Ps: <i>Pichia stipitis</i> ; Pp: <i>Pichia pastoris</i> .....	25
Şekil 4.2. <i>P. pastoris</i> Adh3 amino asit diziliminin GS115 genomunda bulunan muhtemel Adh amino asit dizilimleri ile homolojisi.....	26
Şekil 4.3. <i>P. pastoris</i> ADH3 geninin PZR ile eldesinin jelde görüntülenmesi. 1kb: GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas); 2-5.Sütunlar: 54-64°C arası farklı sıcaklıklarda oluşan ADH3 geni (1053 bç).....	27
Şekil 4.4. Plazmit izolasyonu sonrası elde edilen 6 plazmitin HindIII ile restriksiyon analizi. 1kb: GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas); C1-C6: seçilen kolonilerden edilen plazmitlerin HindIII enzimi ile kesilmesi .....	28
Şekil 4.5. ADH3 geninin iç bölgesinden lineer hale getirilen pJET-ADH3 plazmiti ve gen yer değiştirme işleminde kullanılacak olan HIS4 geninin jelde kesilmesi.....	29
Şekil 4.6. Koloni PZR ile tarama yapılan örneklerin jel görüntüsü. M:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas), C1-C16:Farklı koloniler, PK:Pozitif kontrol, NK:Negatif kontrol .....	30
Şekil 4.7. Plazmit izolasyonu sonrası restriksiyon enzimleri ile kontrolün jel görüntüsü. M:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas), C1, C6,C7:Farklı kolonilerden elde edilen plazmit .....	30
Şekil 4.8. ADH3 geninin plazmit üzerinde gen yer değiştirme ile inaktif edilmesinin şematik gösterimi .....	31
Şekil 4.9. $\Delta adh3::HIS4$ fragmantinin PZR ile eldesini gösteren jel görüntüsü ve şematik anlatımı. (A): $\Delta adh3::HIS4$ fragmantinin PZR ürünü, (B): $\Delta adh3::HIS4$ fragmantinin eldesinin şematik anlatımı.....	32
Şekil 4.10. Transformant GS115 genomik DNA'larından inaktif DNA parçası ( $\Delta adh3::HIS4$ ) varlığının PZR ile kontrol edilmesi. M:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas), C1-C16: MD plakalardan seçilen transformant koloniler .....	33
Şekil 4.11. <i>P. pastoris</i> ADH3 geninin HIS4 geni ile inaktif edilmesi ve Southern analizi .....	33
Şekil 4.12. Southern blot analizinde kullanılan DIG prob için ADH3 geninin EcoRI enzimi ile kesilmesi ve 422 bç uzunluğundaki probun jelden özütlenmesi. 1kb:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas).....	34

Şekil 4.13. <i>ADH3</i> geni içinden dizayn edilen ve etiketlenen DIG probun etkinlik ölçümü.....	34
Şekil 4.14. <i>Adh3</i> inaktif suşun Southern blot analizi ile doğrulanması için genomik DNA'ların <i>BglIII</i> enzimi kesimini gösteren jel görüntüsü. 1kb:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas), DIG: DIG etiketli markır, K: GS115 konukçu, C1-C3:Seçilen farklı klonlar.....	35
Şekil 4.15. Transformant GS115 suşunda yapılan Southern blot analizi sonucu X-ray filmin görüntüsü. 1kb:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas), DIG: DIG etiketli markır, K: GS115 konukçu, C1-C3:Seçilen farklı klonlar .....	35
Şekil 4.16. <i>P. pastoris</i> Adh3 ve 38 kDa değerindeki bilinmeyen proteinin amino asit sekansının karşılaştırması .....	36
Şekil 4.17. Ni-NTA 6xHis saflaştırması. M: Pageruler protein markır, 1a ve 2a: <i>P. pastoris</i> X33 Kontrol suşundan elde edilen elüsyonlar, 1b ve 2b: MK115 ( <i>Adh3</i> ) suşundan elde edilen elüsyonlar .....	37
Şekil 4.18. X33 ve MK115 ( <i>Adh3</i> ) suşlarının glukoz ve etanol içeren besiyerinde gelişimi, glukoz ve etanol değişimi, Adh enzim aktivite değişim grafiği (A): X33 glukoz besiyeri, (B): MK115 glukoz besiyeri, (C): X33 etanol besiyeri, (D): MK115 etanol besiyeri.....	39
Şekil 4.19. <i>P. pastoris ADH1</i> geninin inaktif edilme işleminin şematik gösterimi .....	40
Şekil 4.20. <i>P. pastoris ADH1</i> geninin PZR ile eldesinin jelde görüntülenmesi. 2-5.Sütunlar: 55-65°C arası farklı sıcaklıklarda oluşan <i>ADH1</i> geni (1050 bç).....	41
Şekil 4.21. Plazmit izolasyonu sonrası elde edilen 5 plazmitin <i>XhoI</i> ile restriksiyon analizi. C1-C5: seçilen farklı kolonilerden elde edilen plazmitlerin restriksiyon sonrası jelde yürütülen DNA parçaları.....	42
Şekil 4.22. Seçilen 4 koloniden elde edilen plazmitlerin <i>NcoI</i> ile restriksiyon analizi. C1-C4: seçilen kolonilerden edilen plazmitlerin <i>NcoI</i> enzimi ile kesilmesi.....	43
Şekil 4.23. <i>Adh1::ZEO</i> frangmentinin PZR ile eldesini gösteren jel görüntüsü.....	43
Şekil 4.24. Transformant X33 ve MK115 genomik DNA'larından nakavt fragment olan <i>Adh1::ZEO</i> varlığının PZR ile kontrol edilmesi. (A): X33, (B): MK115 ( <i>Adh3</i> ). 1kb:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas), C1-C15: MD plakalardan seçilen transformant koloniler, NK Negatif kontrol (X33 ve MK115 genomik DNAsı). PK:Pozitif kontrol (pJET- <i>adh1::ZEO</i> ), MM: PZR master mix kontrolü.....	44
Şekil 4.25. İnaktif suşların glukoz (MD) ve etanol (ME) içeren besiyerlerinde gelişim eğrileri .....	46
Şekil 4.26. X33, MK115, MK215 ve MK330 suşlarının glukoz içeren besiyerinde gelişimi sırasında ortamdaki etanol miktarlarının zaman ile değişimi.....	47
Şekil 4.27. X33 ve MK115 ( <i>Adh3</i> ) hücrelerinden elde edilen RNA'ların jel görüntüsü.....	48

Şekil 4.28. cDNA'lardan 2 primer seti ile yapılan PZR sonrası elde edilen ürünlerin jel görüntüsü.....	49
Şekil 4.29. X33 ve MK115 hücrelerinden elde edilen cDNA örneklerinin qRT-PCR analizi sonrası elde edilen Floresans-Döngü grafikleri. (A): MD besiyeri, (B): ME besiyeri .....	50
Şekil 4.30. X33 ve MK115 hücrelerinden elde edilen cDNA örneklerinin qRT-PCR amplifikasyonu sonrası Melting curve analizinden edilen dF/dT-Sıcaklık grafiği (A): MD besiyeri, (B): ME besiyeri .....	51
Şekil 4.31. qRT-PCR sonuçlarının sütun grafiğinde gösterimi ( <i>adhI-adhV</i> : Adh aktivitesi göstermesi muhtemel genler, <i>ADH3</i> : Tanımlı olan gen, <i>ADH1</i> : Rapor döneminde dahil edilen gen) .....	52
Şekil 4.32. <i>P. pastoris adhI, adhII ve adhV</i> geninin PZR ile eldesinin jelde görüntülenmesi. 2-5.Sütunlar: 52-62°C arası farklı sıcaklıklarda oluşan (A) <i>adhI</i> geni (1074 bp), (B) <i>adhII</i> (1083 bp) ve (C) <i>adhV</i> (1077 bp) .....	53
Şekil 4.33. Plazmit izolasyonu sonrası elde edilen plazmitlerin pJET- <i>adhI</i> 'in <i>HindIII</i> , pJET- <i>adhII</i> 'nin <i>HindIII</i> ve <i>BstXI</i> , pJET- <i>adhV</i> 'in <i>HindIII</i> ile restriksiyon analizi. C1-C5: seçilen farklı kolonilerden elde edilen plazmitlerin restriksiyon sonrası jelde yürütülen DNA parçaları. (A) pJET- <i>adhI</i> (B) pJET- <i>adhII</i> (C) pJET- <i>adhV</i> .....	54
Şekil 4.34. <i>ADH</i> genlerini içeren lineer plazmitlerin elde edilmesi için jelden kesilmesi ve ekstraksiyonu.....	55
Şekil 4.35. Plazmit izolasyonu sonrası elde edilen plazmitlerin restriksiyon analizi .....	55
Şekil 4.36. $\Delta adhI::ZEO$ , $\Delta adhII::ZEO$ ve $\Delta adhV::ZEO$ fragmentlerinin PZR ile eldesini gösteren jel görüntüsü.....	56
Şekil 4.37. Transformant MK115 genomik DNA'larından nakavt fragment olan $\Delta adhI::ZEO$ , $\Delta adhII::ZEO$ ve $\Delta adhV::ZEO$ varlığının PZR ile kontrol edilmesi. C1-C10: YPD+zeosin (100 µg/mL) plakalardan seçilen transformant koloniler, NK:Negatif kontrol (MK115 genomik DNAsı) .....	57
Şekil 4.38. <i>P. pastoris adhI, adhII ve adhV</i> genleri inaktif suşların gelişim grafikleri, etanol ve glukoz ölçümleri. A. OD grafiği, B. Glukoz miktarı ve C. Etanol miktarı .....	58
Şekil 4.39. X33 ve inaktif suşların glukoz içeren besiyerinde gelişimi, glukoz ve etanol değişimi, Adh enzim aktivite değişim grafiği .....	60
Şekil 4.40. X33 ve $\Delta adh2$ suşlarının etanol içeren besiyerinde gelişimi etanol tüketimi ve Adh enzim aktivite değişim grafiği.....	61
Şekil 4.41. <i>P. pastoris ADH2</i> ve <i>ADH3</i> genlerinin farklı karbon kaynağı içeren besiyerlerin ekspresyon seviyeleri grafiği.....	62
Şekil 4.42. Glukoz içeren fermentasyon ortamından alınan örneklerden izole edilen RNA'ların jel görüntüsü.....	63
Şekil 4.43. qRT-PCR analizi sonrası elde edilen Floresans-Döngü grafikleri.....	64
Şekil 4.44. Glukoz içeren besiyerinde %5 çözülmüş oksijen seviyesinde yürütülen fermentasyonun DO grafiği ve örnek alınan noktaları.....	64

Şekil 4.45. Glukoz içeren besiyerinde %30 çözülmüş oksijen seviyesinde yürütülen fermentasyonun DO grafiği ve örnek alınan noktaları.....	65
Şekil 4.46. Glukoz içeren besiyeri ile fermentör ortamında yapılan fermentasyondan elde edilen örneklerde zamana karşı <i>ADH2</i> geninin ekspresyon seviyesi .....	65
Şekil 4.47. Glukoz içeren besiyeri ile fermentör ortamında yapılan fermentasyondan elde edilen örneklerde zamana karşı <i>ADH3</i> geninin ekspresyon seviyesi .....	66
Şekil 4.48. Glukoz ve etanol konsantrasyonlarının HPLC ile tespitinden elde edilen kromotogram .....	66
Şekil 4.49. <i>P. pastoris</i> X33 suşu ile fermentasyon ortamında glukoz tüketimi ve etanol üretimi grafiği.....	67
Şekil 4.50. İnaktif suşların fermentasyon ortamında glukoz tüketimi ve etanol üretimi grafiği.....	67
Şekil 4.51. <i>XylB</i> geninin <i>XhoI</i> ve <i>XbaI</i> restriksiyon enzimleri ile kesilen pUC57- <i>XylB</i> plazmitinden düşürülmesi ve jelden kesilmesini gösteren agaroz jel görüntüsü.....	69
Şekil 4.52. pPICZ $\alpha$ A- <i>XylB</i> transformantlarının plazmit izolasyonu sonrası <i>BglIII</i> restriksiyon enzimi ile kontrolünü gösteren agaroz jel görüntüsü .....	70
Şekil 4.53. pGAPZ $\alpha$ A- <i>XylB</i> transformantlarının plazmit izolasyonu sonrası <i>BglIII</i> restriksiyon enzimi ile kontrolünü gösteren agaroz jel görüntüsü .....	70
Şekil 4.54. pADH3Z $\alpha$ A- <i>XylB</i> transformantlarının plazmit izolasyonu sonrası <i>XhoI</i> ve <i>XbaI</i> restriksiyon enzimi ile kontrolünü gösteren agaroz jel görüntüsü.....	71
Şekil 4.55. pADH3Z $\alpha$ A- <i>XylB</i> , pPICZ $\alpha$ A- <i>XylB</i> ve pGAPZ $\alpha$ A- <i>XylB</i> plazmitlerinin şematik gösterimi .....	71
Şekil 4.56. Tek kopya ekspresyon plazmiti içeren klonların Southern blot analizi ile doğrulanması için genomik DNA'ların restriksiyon enzimi kesimini gösteren jel görüntüsü A) <i>ADH3</i> klonları, B) <i>AOX1</i> klonları C) <i>GAP</i> klonları. M: DIG markır, K: Kontrol (transform edilmemiş), C1-C5: Farklı klonlar .....	72
Şekil 4.57. Transformant ekspresyon klonlarında yapılan Southern blot analizi sonucu X-ray filmin görüntüsü (A) <i>ADH3</i> klonları (B) <i>AOX1</i> klonları (C) <i>GAP</i> klonları. M: DIG etiketli markır, C: Kontrol (gen transform edilmemiş), C1-C5:Seçilen farklı klonlar .....	73
Şekil 4.58. Erlenmayer koşullarında Optik yoğunluğun (OD) zamanla değişimi .....	74
Şekil 4.59. Erlenmayer koşullarında alınan süpernatant örneklerinde ölçülen ksilanaz aktivitesi değerlerinin zamanla değişimi.....	75
Şekil 4.60. Fermentasyon besleme programı .....	77
Şekil 4.61. Fermentasyonlar esnasında çekilen fotoğraf (Sistem; Sartorius stedim Biostat® B 2x5 L Bioreactor) .....	77
Şekil 4.62. Fermentasyon boyunca yaş hücre ağırlığının (WCW) zamanla değişimi ....	78

Şekil 4.63. Fermentasyon boyunca alınan süpernatant örneklerinde ölçülen toplam protein değerlerinin zamanla değişimi .....	78
Şekil 4.64. Fermentasyon boyunca alınan süpernatant örneklerinde ölçülen ksilanaz aktivitesi değerlerinin zamanla değişimi .....	79
Şekil 4.65. Fermentasyondan alınan örneklerin zamana karşı SDS-PAGE analizi. A) <i>ADH3</i> promotoru ile üretim, B) <i>AOX1</i> promotoru ile üretim (C) <i>GAP</i> promotoru ile üretim.....	80
Şekil 4.66. Farklı uzunluktaki <i>ADH2</i> promotorlarının <i>P. pastoris</i> genomundaki kopya sayısını gösteren X-Ray film görüntüsü .....	82
Şekil 4.67. <i>ADH2</i> promotor bölgesinin 2000-500 bp uzunluktaki bölgelerinin analizi ile elde edilen aktivite değerleri.....	82
Şekil 4.68. <i>ADH2</i> promotor bölgesinin 1000-500 bp uzunluktaki bölgelerinin analizi ile elde edilen aktivite değerleri.....	83
Şekil 4.69. Erlenmayer koşullarında Optik yoğunluğun (OD) zamanla değişimi .....	84
Şekil 4.70. Erlenmayer koşullarında alınan süpernatant örneklerinde ölçülen ksilanaz aktivitesi değerlerinin zamanla değişimi.....	84
Şekil 4.71. Fermentasyon boyunca yaş hücre ağırlığının (WCW) zamanla değişimi ....	86
Şekil 4.72. Fermentasyon boyunca alınan süpernatant örneklerinde ölçülen toplam protein değerlerinin zamanla değişimi .....	86
Şekil 4.73. Fermentasyon boyunca alınan süpernatant örneklerinde ölçülen ksilanaz aktivitesi değerlerinin zamanla değişimi.....	87
Şekil 4.74. Fermentasyondan alınan örneklerin zamana karşı SDS-PAGE analizi. A) <i>ADH2</i> promotoru ile üretim, B) <i>GAP</i> promotoru ile üretim .....	87

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. PZR reaksiyon karışımı .....	12
Çizelge 3.2. PZR ısı döngü programı için süre ve sıcaklık koşulları.....	12
Çizelge 3.3. qRT-PCR sıcaklık ve süre değerleri. ....	17
Çizelge 3.4. BMGY besiyerinin bileşimi.....	18
Çizelge 3.5. PTM1 tuzlarının bileşimi.....	19
Çizelge 4.1. Potansiyel <i>ADH</i> genleri ve tanımlanan genlerin NCBI erişim kodları ve NCBI isimlendirilmesi.....	26
Çizelge 4.2. qRT-PCR analizi ön denemelerinde kullanılan primer setleri.....	49
Çizelge 4.3. qRT-PCR sonucunda elde edilen Cp ve Amplifikasyon verimleri.....	52
Çizelge 4.4. Fermentasyon kinetik parametrelerinin hesaplaması.....	68
Çizelge 4.5. Erlenmayer koşullarında ksilanaz enzimi üretimi .....	75
Çizelge 4.6. Fermentör koşullarında zamana karşı Yaş hücre ağırlığı, Toplam protein miktarı ve Ksilanaz aktivite değişimi .....	79
Çizelge 4.7. Fermentör koşullarında <i>ADH3</i> , <i>AOX1</i> ve <i>GAP</i> promotorları ile rekombinant protein üretimlerinin 72. saat fermentasyon parametreleri....	81
Çizelge 4.8. Erlenmayer koşullarında ksilanaz enzimi üretimi .....	85
Çizelge 4.9. Fermentör koşullarında zamana karşı Yaş hücre ağırlığı, Toplam protein miktarı ve Ksilanaz aktivite değişimi .....	88

## 1. GİRİŞ

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 kullanımı 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 transkripsiyon sonrası modifikasyonlarını gerçekleştirebilmek gibi bazı avantajlar sunmaktadır (Cregg vd 2007).

*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).

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 mekanizmasında rol alan genler ve bu genlerin regülasyonu ve farklı karbon kaynaklarının mikroorganizmanın metabolizmasındaki etkileri üzerine yoğunlaşmıştır (İnan ve Meagher 2001a, 2001b).

*P. pastoris* fermentör ortamında çok yüksek hücre yoğunluğuna çıkabildiği için 1970'li yıllarda tek hücre proteini üretimi için geliştirilmiştir. Bu mayanın yüksek hücre yoğunluğuna çıkabilmesi Crabtree-negatif olmasından kaynaklanmaktadır. Diğer bir ifadeyle, aerobik ortamda yüksek karbon konsantrasyonunda etanol üretimi gerçekleştirmez. Crabtree-pozitif olarak sınıflandırılan ekmek mayasında (*S. cerevisiae*) aerobik şartlarda yüksek şeker (glukoz) konsantrasyonunda etanol üretimi gerçekleştirir (van Urk vd 1989). Bu mekanizmayı bulduran mayalar Crabtree-pozitif olarak sınıflandırılır. *P. pastoris* ise crabtree-negatif bir mayadır. Fakat tarafımızdan yapılan önceki çalışmalarda ve literatürde ulaşılan diğer çalışmalarda, *P. pastoris*'te oksijenli (aerobik) fermentasyon ortamında az da olsa etanol üretiminin gerçekleştiği ve bu yan ürün olarak üretilen etanolün, alkol oksidaz promotörünü baskıladığı ve rekombinant protein üretimini olumsuz etkilediği ortaya konulmuştur (İnan ve Meagher 2001a; Sohn vd. 2010). Fakat *GAP* promotörü kontrolü altında rekombinant protein üretimi esnasında, oksijen seviyesinin hipoksik (hypoxic) şartlara düştüğü anda (oksijen seviyesinin aerobik organizmalar için kritik seviyeye indiği zaman), ortamda etanol oluştuğu ve etanolün ilerleyen safhalarda katabolize edildiği gözlenmiştir. Bu şartların da rekombinant protein üretimini arttırdığı ortaya konulmuştur (Baumann vd 2008).

Fakat etanol üretiminde rol oynayan alkol dehidrogenaz enziminin rolü bu çalışmalarda araştırılmamıştır.

Bu çalışma kapsamında, *P. pastoris* etanol metabolizmasında rol oynayan *ADH* genleri belirlenmiş ve karakterize edilmiştir. Ayrıca, *P. pastoris* ilgili genlerin promotorları kontrolü altında *Aspergillus niger* Ksilanaz (*XylB*) geni kullanılarak rekombinant protein üretimi denemeleri yapılmıştır. Ayrıca bu promotorların rekombinant protein üretimlerinde kullanılabilirliği gerek laboratuvar çalışmalarında gerekse sanayi ölçeğinde en yaygın kullanılan *P. pastoris* *AOX1* ve *GAP* promotorları ile karşılaştırılarak araştırılmıştır.



## 2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI

Rekombinant protein ekspresyon sistemleri içerisinde, prokaryotik ekspresyon (örn. *Escherichia 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 olan 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.

Mikrobiyal ökaryotik konukçu sistemi olarak *P. pastoris*, hem zengin olmayan (minimal media) besiyerinde üretildiğinde yüksek hücre yoğunluklarına ulaşılabilen, hem de metanol kullanımı için gerekli olan alkol oksidaz gibi enzimlere yüksek gereksinim duymaktadır. Ayrıca çok kuvvetli ve sıkı denetimde bulunan promotörlere (*AOX1*) sahip olduğu için rekombinant protein üretiminde avantaj sağlamaktadır (Porro vd 2005). *P. pastoris*'in genomunda alkol oksidaz geninin iki kopyası bulunmaktadır. *AOX1* promotörü hücrede alkol oksidaz enzim aktivitesinin %85'inin regülasyonundan sorumlu iken, *AOX2* promotörü alkol oksidaz enzim aktivitesinin %15'inden sorumludur. Bu sebeple, rekombinant protein üretiminde *AOX1* promotörü daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Buna ilaveten glikolitik bir enzim olan *GAP* enziminin promotörü de rekombinant protein üretiminde kullanılmaktadır (İnan ve Meagher 2001b, Cregg 2007).

Son yıllarda, özellikle endüstriyel ve tıbbi kullanımlara yönelik rekombinant protein üretimi oldukça önem kazanmıştır. Rekombinant protein üretimi sırasında üretim seviyesi ve kalitesi konukçu mikroorganizmanın fermentasyon mekanizması ile 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, 2001b).

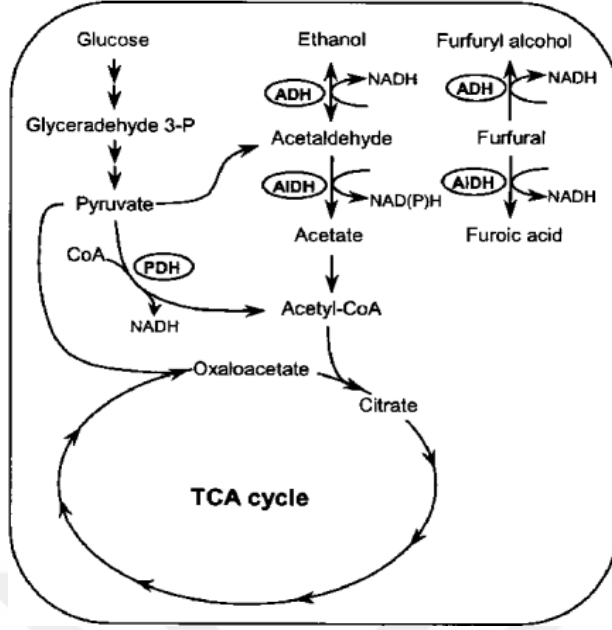
*P. pastoris* mayası üremesi sırasında çok farklı karbon kaynaklarından yararlanabilmektedir. Başta glukoz ve metanol olmak üzere gliserol, etanol, mannitol, sorbitol, trehaloz, alanin vb. karbon kaynaklarını kullanabilmektedir. Ancak bazı karbon kaynaklarının ortamda bulunması (glukoz, etanol, gliserol, asetat) diğer karbon kaynaklarının (metanol) kullanımını baskılamaktadır (Tshopp vd 1987, İnan ve Meagher 2001a). Fakat sorbitol, mannitol, trehaloz ve alaninin *AOX1* promotörü 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 bulunması alkol oksidaz aktivitesi üzerine baskılayıcı etki yaptığı ortaya konulmuştur. Ayrıca bu baskılayıcı etkinin katabolit represyon ve katabolit inaktivasyon olarak iki regülasyon mekanizması tarafından gerçekleştiği bildirilmiştir (Sahm 1980, Bruinenberg vd 1982,

Eggeling ve Veenhuis vd 1983). Klei vd (1991), *Hansenula polymorpha* (*P. angusta*) mayasında *MOX1* promotorunun glukoz ve etanol tarafından baskılandığını, Cregg vd (1989) aynı şekilde *P. pastoris*'in metanol tarafından indüklenen *AOX1* 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 *AOX1* 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 *AOX1* promotorunun kullanımının en önemli dezavantajı, bu promotorun indüksiyonu için metanole gerek duyması nedeniyle, yüksek ölçekli üretimlerde kullanıldığında yangın tehlikesine karşı depolanması için gerekli önlemlerin pahalı olmasıdır. Bu sebeple yüksek ölçeklerde kullanımı sınırlıdır.

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

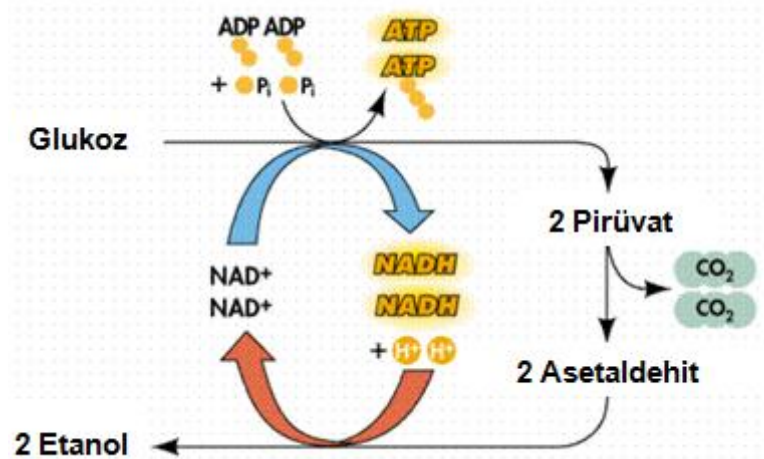
*P. pastoris*, metanolün yanında etanolü de karbon kaynağı olarak kullanabilmektedir. Ancak etanolün karbon kaynağı olarak kullanıldığı *ADH3* promotoru ile rekombinant protein üretimi üzerine patent alınmasına rağmen (US 8,222,386) bu çalışmada promotorun gücü ve kontrol suşu ile ilgili bir veri bulunmamaktadır. Ayrıca, *ADH3* promotorunun diğer promotorlara göre gücü de bilinmemektedir. Bu nedenle *ADH3* promotorunun rekombinant protein üretimlerinin kullanılabilirliği ve üretim seviyesi halen bilinmemekte ve bu açıdan promotor ile ilgili her hangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Mayalarda ortaya çıkarılmış genel glukozdan etanol üretimi Şekil 2.1'de şematik olarak gösterilmiştir. *P. pastoris*'e yakın bazı mayalarda *ADH* genlerinin nasıl bulunduğu ve görevleri ile ilgili bilgiler verilmiştir.

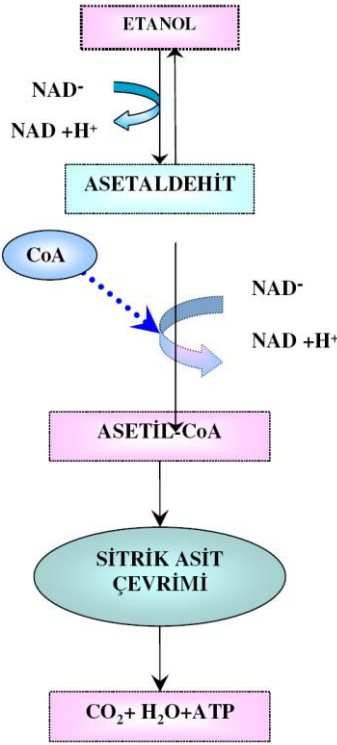


Şekil 2.1. Mayalarda etanol metabolizması

Etanol üretimindeki en son basamak asetaldehitin etanole indirgenmesidir (Şekil 2.2). Bunun tersi olarak etanolün yıkımındaki ilk basamak etanolün asetaldehite oksidasyonudur (Şekil 2.2). Etanol üretimi esnasında oluşan  $\text{NAD}^+$ 'in, gliseraldehit 3-fosfat'ın 1,3-Bifosfogliserat'a yıkımı esnasında kullanılan  $\text{NAD}^+$ 'ı takviye etmesi sonucu *GAP* promotorunun etkisini artırıcı etkiye (indüklenme miktarının artması) sebep olmaktadır (Şekil 2.3). Dolayısı ile *GAP* promotorunun kullanıldığı sistemde etanol üretimi rekombinant protein üretimine pozitif etki yapmaktadır.



Şekil 2.2. Mayalarda etanolün anabolize edilmesi



Şekil 2.3. Mayalarda etanolün katabolize edilmesi

Bu mekanizmada görev alan *ADH* genleri üzerine en fazla *S. cerevisiae* ile çalışılmıştır. *S. cerevisiae* 'da başlıca üç *ADH* geni karakterize edilmiştir. *S. cerevisiae*'nın alkol dehidrogenaz (EC 1.1.1.1) genlerinden *ADH1*, glikolitik iz yolundaki son basamak olan asetaldehitin etanole indirgenmesinden sorumlu gen iken (Lutstorf ve Megnet 1968, Ciriacy 1975), *ADH2* geni etanolün asetaldehite oksidasyonundan sorumludur (Ciriacy 1975). *S. cerevisiae*'da *ADH2* geni etanol üretimi aşamasında (*ADH1* geninin aktif olduğu sırada) baskı altında bulunmaktadır (Leskovac vd 2002). *ADH3* geninin ise mitokondriyal bir gen olduğu bildirilmiştir (Bakker vd 2000). *P. pastoris* genomunda tanımlanan *ADH3* geninin ise, etanol metabolizmasının hangi basamağında (oksidasyon veya indirgeme basamağı) görev aldığı hala tam olarak bilinmemektedir.

Cho ve Jeffries (1998) çalışmalarında, *S. cerevisiae* *ADH* genlerini prob olarak kullanarak, *Pichia stipitis* CBS 6054 genomik DNA'sında, Southern hibridizasyonu yöntemi ile iki *ADH* geni (*PsADH1* ve *PsADH2*) tanımlamış ve izole etmiştir. Ayrıca bu genler inaktifleştirilerek, genlerin işlevleri karakterize edilmiştir. Bu iki *Adh* enzimi; protein seviyesinde %80,5, nükleotit seviyesinde %79,5 özdeşlik göstermiştir. Gen inaktivasyonu çalışmaları, ksilozdan etanol üretimi test edilerek incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, *PsADH1*'in ksiloz fermentasyonunda major rol oynadığını göstermiştir. *PsADH1* geninin inaktivasyonu, ksiloz üzerinde gelişen hücrelerde gelişim hızının ve etanol üretiminin önemli ölçüde düşmesine neden olurken, hücrenin redoks dengesinin bozulmasına bağlı olarak ksilitol üretimi önemli ölçüde artmıştır. Aynı koşullarda

*PsADH2* inaktivasyonunun, önemli bir farklılığa sebep olmadığı görülmüştür. Ancak, *PsADH1* ve *PsADH2* genlerinin ikisinin de inaktif olduğu ikili inaktif suşta ksiloz üzerinde gelişme durmuş, fakat az da olsa etanol üretimi devam etmiştir. Bu sonuç, *PsADH2* enziminin de ksiloz fermentasyonunda ve gelişme de görev aldığını ancak *PsADH1* enzimine göre minör bir rol olduğunu göstermiştir. Ayrıca tamamen aerobik şartlarda, mutantların etanolü tek karbon kaynağı olarak kullanabilirliği test edilmiştir. Etanolün asetaldehite dönüştürülmesinde iki enzimin de eşdeğer yeteneğe sahip olduğu görülmüştür. Tekli inaktif suşlar, tek karbon kaynağı olarak etanol üzerinde gelişebilmiştir fakat ikili nakavt suş etanol üzerinde gelişme yeteneğini kaybetmiştir.

*Kluyveromyces lactis*, *P. pastoris* gibi crabtree-negatif bir mayadır. *K. lactis*'in *ADH* aktivitesinin regülasyonu karmaşıktır. *S. cerevisiae ADH2* geninin prob olarak kullanıldığı Southern hibridizasyonu, *K. lactis*'te dört muhtemel *ADH* geni göstermiştir (Saliola vd 1990). *KIADH1* ve *KIADH2* sitoplazmik aktivite gösteren, fermentasyon sırasında etanol üretiminden sorumlu *Adh* enzimlerini kodlamaktadır (Saliola vd 1990, Shain vd 1992). *KIADH3* ve *KIADH4* ise mitokondriyal aktivite göstermektedir (Saliola vd 1991). *KIADH3* geni etanol tarafından baskılanırken, *KIADH4* geni etanol tarafından indüklenmektedir ve bu gen glukoz represyonuna duyarlı değildir (Mazzoni vd 1992). *S. cerevisiae* ve *K. lactis* mitokondriyal *Adh* aktivitelerinin, mitokondriyal-sitozolik NAD(P)H redoks dengesi için etanol-asetaldehit mekiğinin parçası olabileceği öne sürülmektedir (Bakker vd 2001).

Fredlund vd. (2006) çalışmalarında *Pichia anomala ADH1* geninin (*PaADH1*) hem aerobik koşullarda glukoz ve etanolde gelişen hücrelerde hem de fermentatif koşullarda (sınırlı oksijen) glukoz üzerinde gelişen hücrelerde ekspresyonu güçlü gerçekleşen *ADH* geni olduğunu tespit etmişlerdir. Bu durumda *PaADH1* geninin hem etanol üretiminden hem de etanol tüketiminden sorumlu, iki fonksiyonlu bir gen olduğu sonucuna varmışlardır.

Marx vd (2009) yaptıkları çalışmada, *P. pastoris*'te insan süperoksit dismutaz (hSOD) üretimini yüksek kopya sayılı ekspresyon kaseti ile arttırmışlardır. Ancak bu üretim, hücrelerin birincil metabolizması üzerinde direkt etkili olduğundan, biyokütle veriminin %75 seviyesine düşmesine neden olmuştur. Bunun üzerine Nocon vd (2014), genom ölçeğinde metabolik modelleme ile protein üretimini artırma üzerine çalışmışlardır. Çalışmalarında, mekanizmada etkili olacağını düşündükleri yüksek seviyede ekspres olan suşları ve delesyon mutantları geliştirmişlerdir. Bu çalışma kapsamında inaktivasyonu araştırılan genlerden biri *P. pastoris ADH2* (PIPA ID: PIPA03313) genidir. Ancak elde ettikleri  $\Delta adh2$  mutant suş etanol üretmeye devam etmiştir. Homoloji analizi sonucu, çalışmada PIPA kodu verilen genin, bizim çalışmamızda *adhIV* olarak tanımlanan gen olduğunu göstermiştir.

Başta *S. cerevisiae* olmak üzere *P. stipitis*, *P. anomala* ve *K. lactis* gibi *P. pastoris*'e yakın mayalarda en az iki *ADH* geni karakterize edilmiştir (Cho ve Jeffries 1998, Fredlund vd 2004). *P. pastoris* GS115 ve *P. pastoris* DSMZ 70382 suşlarının genom dizilişleri yakın zamanda ortaya çıkarılmış ve sadece bir tane alkol dehidrogenaz enzimini kodlayan gen tanımlanabilmiştir (De Schutter vd 2009, Mattanovich vd 2009). Tanımlanmış olan bu gen GS115 genomunda *ADH3* olarak (XP\_002491382), DSMZ 70382 genomunda *ADH2* olarak isimlendirilmiştir. Çalışmamızda bu gen *ADH3* olarak isimlendirilmiştir. *P. pastoris ADH3* geni ile moleküler seviyede çalışılmamış olup,

genomda birden fazla alkol dehidrogenaz enzimi olup olmadığı da bilinmemektedir. Ön çalışmalar sonucunda bilgisayar analizleri ile *P. pastoris* GS115 genomunda yer alan protein kodlayan dizilerden Adh3 proteinine en yüksek homolojiyi gösteren beş protein sekansı tespit edilmiştir. Bu protein sekanslarının NCBI erişim kodları ilerleyen bölümlerde biyoinformatik analiz başlığı altında verilmiştir (Çizelge 4.1). Bu proteinler GS115 genomunda alkol dehidrogenaz enzimleri olarak isimlendirilmesine rağmen deneysel her hangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Ayrıca, Vanz vd (2012) tarafından yapılan proteom çalışmasında *P. pastoris*'te etanol metabolizmasında görev aldığı düşünülen iki gen bildirilmiştir. Makalede etanol metabolizmasındaki genler *ADH3* (tanımlı olan gen) ve *ADH* olarak isimlendirilmiştir. Bu çalışma kapsamında tanımlanan *ADH* geninin karakterizasyonu da yapılmıştır ve *ADH* olarak isimlendirilen bu gen *ADH1* olarak isimlendirilmiştir.

Ayrıca *P. pastoris* *ADH* genlerinin promotorları kullanılarak yurt içinde ve yurt dışında yapılmış herhangi bir çalışma ya da literatür bilgisi bulunmamaktadır. Bunun nedeni ise promotor regülasyonunun bilinmemesi ve fermentasyon stratejisinin geliştirilmemesidir. Bu çalışma ile, *P. pastoris* *ADH* genlerinin tanımlanması ve kinetik parametrelerinin belirlenmesi, *ADH* promotoru kullanılarak rekombinant protein üretiminin yaygınlaşması ve fermentasyon profilinde optimum şartların sağlanması gerçekleştirilmiştir. *ADH* promotorları ile rekombinant protein üretimlerinde raportör gen olarak *Aspergillus niger* ksilanaz geni kullanılmıştır.

### 3. MATERYAL ve METOT

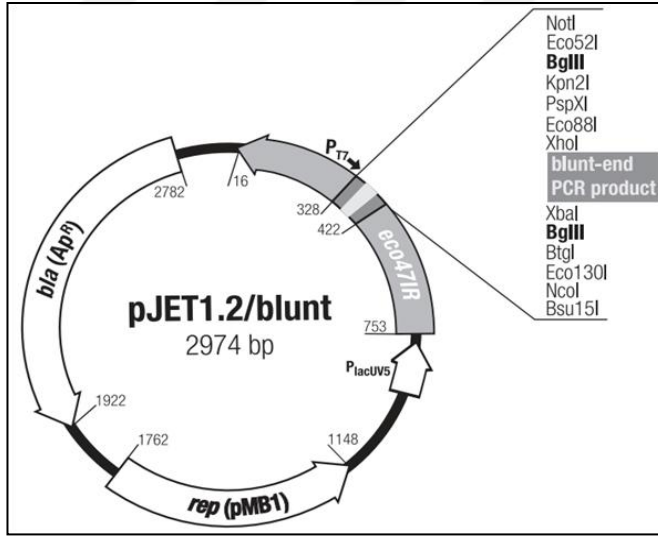
#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Suşlar ve plazmitler

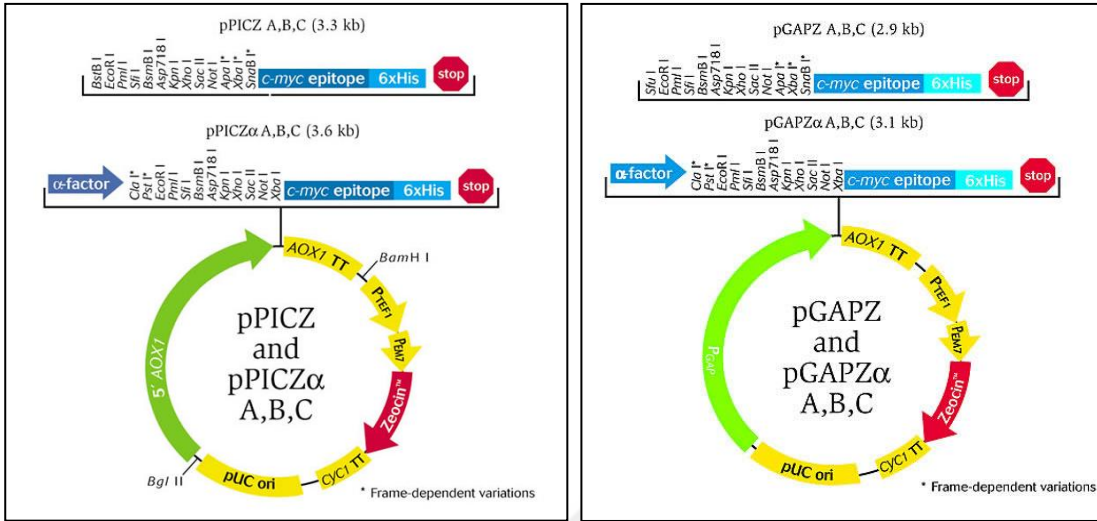
Yapılan çalışmalarda plazmitlerin çoğaltılması amacıyla kimyasal transformasyona elverişli konukçu *E. coli* suşu olan XL1-Blue, *ADH* genleri inaktif suşların elde edilmesi için *P. pastoris* GS115 (*his4<sup>-</sup>*) suşu ve *ADH* promotorları ile rekombinant protein üretimi çalışmalarında *P. pastoris* X33 (yabani tip) suşu konukçu olarak kullanılmıştır.

Gen klonlama vektörü olarak pJET1.2 (Fermentas) klonlama vektörü kullanılmıştır (Şekil 3.1). *ADH3* geninin inaktif edilmesinde seleksiyon markırı olarak kullanılmış olan *P. pastoris* histidin geni (*HIS4*) pPIC3.5K plazmitinden elde edilmiştir. Adh aktivitesi göstermesi muhtemel genlerin inaktif edilmesinde seleksiyon markırı olarak kullanılmış olan Zeosin antibiyotik dayanıklılık geni pPICZ $\alpha$ A plazmitinden uygun restriksiyon enzimleri kullanılarak elde edilmiştir.

Rekombinant ksilanaz üretimi ve *P. pastoris* *AOX1* ve *GAP* promotorları ile karşılaştırılması için pPICZ $\alpha$ A, pGAPZ $\alpha$ A (Invitrogen, CA, ABD) (Şekil 3.3) ekspresyon vektörü kullanılmıştır (Şekil 3.2). *ADH* genlerinin promotorlarını içeren ekspresyon vektörü pPICZ $\alpha$ A vektöründe *AOX1* promotoru yerine *ADH* promotorlarının klonlanması ile elde edilmiştir.



Şekil 3.1. Küt uçlu PZR ürünlerinin klonlanmasında kullanılan pJET1.2 plazmiti



Şekil 3.2. Protein ekspresyonu için kullanılan pPICZαA ve pGAPZαA vektörleri

### 3.1.2. Kimyasallar

*P. pastoris* için kullanılan besiyerleri: YPD (%1 maya ekstraktı, %2 pepton, %2 glukoz), MD (%1,34 YNB, % $4 \times 10^{-5}$  biyotin, %2 glukoz), MG (%1,34 YNB, % $4 \times 10^{-5}$  biyotin, %2 gliserol), ME (%1,34 YNB, % $4 \times 10^{-5}$  biyotin, %1 Etanol) ve ME (%1,34 YNB, % $4 \times 10^{-5}$  biyotin, %1 Etanol).

*Escherichia coli* XL1-Blue suşlarının geliştirilmesinde LB Miller (%0,5 maya ekstraktı, %1 pepton ve %1 NaCl) veya LB Lennox (%0,5 maya ekstraktı, %1 pepton ve %0,5 NaCl) uygun antibiyotik eklemeleri ile kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan restriksiyon endonükleazları ve bunların tampon çözeltileri Fermentas (MD, ABD) firmasından temin edilmiştir. Endonükleazlar kullanılırken üretici firmanın talimatları uygulanmıştır. Ligasyon işlemlerinde Fermentas (Fermentas, MD, ABD) ve Roche (Roche, Almanya) ligasyon kitleri kullanılmıştır. Farklı şekilde belirtilmediği takdirde kullanılan kimyasalların tamamı Sigma-Aldrich (MO, ABD) ve Merck (Darmstadt, Almanya) firmalarından temin edilmiştir. PZR analizleri KOD HotStart DNA Polymerase (Novagen, Almanya) enzim kiti ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda kullanılmıştır.

Gen ve protein homoloji taramalarında Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi Network Servisi (Bethesda, MD, USA; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) kullanılmıştır.

### 3.1.3. Primerler

Tüm primer dizaynları ve DNA analizleri için DNAMAN 7.0 (Lynnon Corporation) programı kullanılmıştır. Çalışmalarda kullanılan oligonükleotitler (primer) Macrogen Inc. (Seul, Güney Kore) firmasından temin edilmiştir. Kullanılan primerlerin listesi EK 8.1'de verilmiştir.



### 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 genomik DNA'lar maya hücrelerinin DNA'sının izolasyonu için MasterPure™ Yeast DNA Purification Kiti (Epicentre Biotechnologies, WI, ABD) kullanılmıştır.

Maya hücrelerinden DNA izolasyonu için YPD agar (%2 pepton, %1 maya ekstraktı, %2 glukoz, %1,5 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) geliştirilen kültürden alınan 2.0 mL örneğin santrifüjlenmesi ile elde edilen hücre peleti kit talimatları doğrultusunda zimolaz enzimi içeren lizis solüsyonu ile muamele edilmiş ve maya hücre duvarının parçalanması sağlanmıştır. Daha sonra protein çöktürme çözeltisi ile proteinler çöktürülerek uzaklaştırılmış ve süpernatantta bulunan DNA %100 etanol ile çöktürülerek ardından (Tris-EDTA tamponu pH 7,5) tamponunda çözülmüştür. Genomik DNA izolasyonu aşamasında üretici firmanın talimatları doğrultusunda çalışılmıştır ve bütün santrifüj işlemleri >20,000 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

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.

Yürütülen PZR çalışmalarında kullanılan primerlerin listesi Ek 1'de verilmiştir. Primer bağlanma sıcaklıkları, düşük bağlanma sıcaklığına sahip primerin bağlanma sıcaklığına göre  $\pm 5^{\circ}\text{C}$  olacak şekilde programlanmıştır.

PZR cihazında amplifikasyon basamağı için öngörülen süre beklenen PZR ürünün kbç cinsinden büyüklüğü göz önünde tutularak enzim kitinin önerdiği süreye göre 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. PZR reaksiyon karışımı ve konsantrasyonları Çizelge 3.1'de verilmiştir. Gradient PZR denemelerinde 35 döngü içeren düz program kullanılmıştır. Çizelge 3.2'de uygulanan döngü programı için uygulanan şartlar verilmiştir.

Çizelge 3.1. PZR reaksiyon karışımı

Bileşen	Final Konsantasyon	Hacim
ddH <sub>2</sub> O	-	130 µl
10XKOD Reaksiyon Tamponu	1x	20 µl
2mM dNTP Mix	0.2 mM	20 µl
25 mM MgSO <sub>4</sub>	1.5 mM	12 µl
10 µM ADH3WGF (T <sub>m</sub> :64)	15 pmol	6 µl
10 µM ADH3WGR (T <sub>m</sub> :58)	15 pmol	6 µl
Kalıp DNA (5ng/ µl)	-	2 µl
KOD polimeraz (1U/µl)	0.02U/µl	4 µl
<b>Toplam</b>		<b>200 µl</b>

Çizelge 3.2. PZR ısı döngü programı için süre ve sıcaklık koşulları

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

Primerlerin optimum bağlanma sıcaklığı, PZR ürünleri %1'lik agaroz jelde 1×TAE (Tris-Asetat-EDTA tampomu pH 8,3) 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 PCR Purification Kit (Qiagen, CA, ABD) yardımı ile veya gerekli görülmesi halinde jelde yürütülüp hedef bant kesilerek MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen, CA, ABD) ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda ekstrakte edilerek uygun tampon çözelti içine elüsyon edilmiştir.

### 3.2.3. Agaroz jel elektroforezi ve jelin görüntülenmesi

*P. pastoris* genomik DNA izolasyonlarının kalitesi, PZR ürünlerinin ve restriksiyon endonükleazlar ile yapılan kesim analizlerinin doğrulanmasında 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 6× 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 (312 nm) kaynağından yararlanılarak jel görüntüleme sistemi (Vilber Lourmant E-Box-VX2) ile görüntülenmiştir. Agaroz jel işlemlerinde markır olarak (M) GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas) kullanılmıştır.

### 3.2.4. PZR ürünlerinin saflaştırılması

PZR saflaştırılma işlemlerinde MinElute PCR 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.

### 3.2.5. Jelden DNA parçalarının ekstraksiyonu

DNA parçaları %1'lik düşük erime noktalı agaroz jelde (SeaKem, FMC Bioproducts, ME, ABD) yürütülmüş ve istenen bant jelden kesilmiştir. Jelden DNA 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.

### 3.2.6. Ligasyon ve transformasyon işlemleri

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.

Transformasyon işlemlerinde, CaCl<sub>2</sub> metodu ile kimyasal transformasyona yetenekli hale getirilmiş *E.coli* XL1-Blue suşu kullanılmıştır. Kimyasal transformasyon işlemleri buz üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Buz üstünde tutulan hücrelere 1-5 µL plazmit çözeltisi veya ligasyon karışımı doğrudan ilave edilmiş ve 30 dak. süre ile inkübe edilmiştir. Hücreler, 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 µL 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 hücreler, 1 saat süreyle 37°C'de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen hücre sıvısı 100 µg/mL Amfisilin içeren LB Miller agar veya 25 µg/mL Zeosin içeren LB Lennox agar petrilere yayma yöntemi ile ekilmiştir. Petriler bir gece 37 °C'de üremeye bırakılmıştır.

*P. pastoris* hücrelerinin elektroporasyonla transformasyona uygun hale getirilmesi için Lityum asetat metodu kullanılmıştır (Wu ve Letchworth 2004). Maya

hücrelerine yapılan elektrokimyasal transformasyonda hücreler buz üstünde bekletilerek çözündürülmüştür. Üzerine lineer hale getirilmiş plazmit veya DNA parçası 1-10 µL olacak şekilde ilave edilmiştir. Ardından buz üstünde bekletilerek soğutulmuş 2mm yüzey genişliğine sahip elektroporasyon kuvvetlerine aktarılmıştır. Eppendorf Eporator (Eppendorf Eporator 4309) cihazında 1500V gerilimde ve 5ms süre ile elektrotransformasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Akım uygulanan hücreler 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 µg/mL Zeosin ilaveli MD (%1,34 YNB, %2 glukoz) veya YPD plakalarına yayma ekim yapılmış ve transformasyon petripleri kolonilerin gelişimi için 2-3 gün süre ile 30°C'de inkübe edilmiştir.

### 3.2.7. 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 edilmiştir ve ardından DNA miktarları belirlenmiştir.

### 3.2.8. DNA ve plazmit konsantrasyonlarının 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 0-1000 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.

### 3.2.9. Southern blot analizi

*P. pastoris* transformasyonu sonrası MD veya YPD 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 dak. denatürasyon çözeltisiyle (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) ve ardından 30 dak. 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 içermektedir) ıslatılmıştır. Membran jelin alt yüzü ile temas edecek şekilde yerleştirilmiş ve Southern

blot uygulamasına hazır hale getirilmiştir. Blotlama işlemleri yaklaşık olarak 2-3 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 3 defa 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. Dosaanın 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.

### 3.2.10. Erlenmayer deneyleri

*P. pastoris* İnaktif ve kontrol suşları ile yapılan erlenmayer analizlerinde glukoz ve etanol içeren minimal besiyerinde üreme davranışlarına (Gelişim eğrisi, Glukoz tüketimi, Etanol üretimi ve adh aktivitesi) bakılmıştır. Suşlar 3 mL YPD içeren test tüplerinde 28°C de 250 rpm de çalkalamalı inkübatörde (Innova 44R, New Brunswick, NJ ABD) 18 saat geliştirilmiştir. Gelişen kültürlerin 100 mL MD ve ME besiyerine yaklaşık 0,1 OD olacak şekilde inokülasyonu yapılmış ve belirli saat aralıklarında örnekler alınarak OD<sub>(600nm)</sub> değerleri, süpernatantlarından glukoz, etanol içerikleri, hücre örneklerinden de Adh enzim aktivitesi analizleri yapılmıştır.

*ADH* promotorları ile *AOX1* ve *GAP* promotor ile rekombinant protein üretiminin erlenmayer şartlarında karşılaştırması işleminde tek kopya ksilanaz ekspresyon plazmiti içeren klonlar donuk kültürden YPD sıvı besiyerine ekilmiş, 30°C çalkalamalı inkübatörde bir gece inkübe edilmiş ve ertesi gün hücre yoğunluğunu artırmak amacıyla BMGY besiyerine (BMGY-% 2 pepton, % 1 maya ekstrakt, % 2 gliserol, 100 mM pH 6 fosfat tamponu) 0,1 OD olacak şekilde inoküle edilmiştir. Yaklaşık 18 saat geliştirilen hücreler (~13-15 OD) 2000xg'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve gliserol yerine *ADH3* promotoru için %1 etanol, *AOX1* promotoru için %1 metanol ve *GAP* promotoru için %2 glukoz içeren aynı özellikteki besiyerinde tekrar çözülerek 72 saat boyunca 30°C 250 rpm çalkalamalı inkübatörde indüksiyona bırakılmıştır. Her 12 saatte bir ortama son konsantrasyonu %1 olacak şekilde etanol, metanol ve %2 olacak şekilde glukoz eklenmiştir. Belirli aralıklarla süpernatantlardan örnekler alınarak OD ve ksilanaz aktiviteleri analiz edilmiştir. Erlenmayer denemeleri 3 paralelli olarak yürütülmüştür.

### 3.2.11. Adh enzim aktivite analizi

Adh enzimi hücre içi bir enzim olduğu için aktivitesinin ölçümü için hücreler kırılmış, hücre içi proteinlerin uygun tampon içine alınarak ölçüm gerçekleştirilmiştir. Adh aktivitesi için kontrol suşu olarak X33 seçilmiştir. MK115 (*Δadh3*) inaktif suşun etanolde üreyememesi nedeniyle X33 ve MK115 hücreleri ilk olarak 25 mL MG besiyerinde 28°C 250 rpm çalkalamalı inkübatörde 12 saat boyunca geliştirilmiştir. İnkübasyon sonunda hasat edilen hücreler MD ve ME besiyerleri ile birer defa yıkanarak gliserol uzaklaştırılmıştır. Daha sonra hücre peletleri analizin yapılacağı besiyerleri olan 25 mL MD ve ME besiyerlerinde çözülmüş ve 28°C 250 rpm çalkalamalı inkübatörde 12 saat boyunca geliştirilmiştir. İnkübasyon sonunda 10000xg 4°C'de 5 dak. santrifüj ile toplanan hücre peleti 2 kez 20 mL 1M sorbitol ile yıkanmıştır. 2mL hacimli tüplere 200 mg yaş hücre peleti tartılarak alınmış ve üzerlerine 1 ml hücre kırma tamponu (0,2 mM EDTA, 20 mM HEPES, 0,5 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 0,42 M NaCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, %5 gliserol) eklenerek hücreler resüspanse edilmiştir. Hazırlanan hücrelere yaklaşık 0,5 mL boncuk (0,5 mm çapında, Zirconia/SILICA, Biospec Products, ABD) eklenmesi yapılarak Tissue Lyser II (Qiagen, CA, ABD) cihazında 5 kez 1'er dakikalık 30 frekansındaki çalkalamalarla kırılmıştır. Tüpler, sıcaklığın yükselmemesi için aralarda 5'er dak. buz üzerinde bekletilmiştir. 20000xg 4°C'de 10 dak. santrifüjlenen tüplerden alınan süpernatantlar yapılacak analize kadar ve analiz süresince buz üzerinde bekletilmişlerdir.

Adh enzim aktivitesi, Sigma'nın protokolü kullanılarak spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir (Enzymatic assay of alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1), Sigma). Testin esasını etanolün alkol dehidrogenaz enzimi tarafından asetaldehite indirgenirken β-NAD elektron akseptörünün β-NADH'a yükseltgenmesi ile değişen absorbansın ölçümü oluşturmaktadır.

Adh aktivitesi, UV-spektrofotometre ile 340 nm dalga boyunda absorbansta meydana gelen değişiklik gözlenerek tespit edilmiştir. Tüm kinetik çalışmalar oda sıcaklığında (25°C), 22 mM Sodyum pirofosfat, %3,2 (v/v) etanol, 7,5 mM β-NAD, 0,3 mM sodyum fosfat, %0,003 (w/v) BSA ve 0,05-0,10 unite alkol dehidrogenaz enzimi içeren reaksiyon karışımı ile gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımının hazırlanması için 1,5 mL Sodyum pyrofosfat solüsyonu (50 mM), 0,1 %95'lik etanol solüsyonu ve 1,5 mL β-NAD (15 mM) solüsyonu karıştırılmış, oda sıcaklığında bir süre bekletilmiş ve küvetlere alınarak 340 nm'de absorbansı sabitlenene kadar gözlenmiştir. Daha sonra 0,1 mL örnek eklenerek reaksiyon başlatılmış ve absorbanstaki değişiklik 6 dak. boyunca 60 saniyelik aralıklarla kaydedilmiştir. 1 unite enzim, 25°C sıcaklıkta ve pH 8.8'de, 1,0 μmol etanolü 1 dakikada asetaldehite dönüştüren enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

### 3.2.12. Toplam protein ölçümü

Süpernatant örneklerinde toplam protein konsantrasyonları Coomassie (Bradford) Protein Assya kit ile ölçülmüştür. 900 μL Bradford çözeltisi içine 100 μL örnek koyulmuş ve oda sıcaklığında 10 dak. inkübe edilerek 595 nm dalga boyunda spektrofotometride okuma yapılmıştır. Protein standart kurvesi 0-500 μg/mL protein standartı ile hazırlanmıştır.

### 3.2.13. qRT-PCR analizi ve RNA izolasyonu

Örnek hazırlama işlemi; Hücre örnekleri kültür ortamından 50 mg olacak şekilde alınmış ve 2 mL'lik vida kapaklı tüplerde 5000xg'de 5 dak. santrifüjlenerek çöktürülmüştür. Daha sonra hücre peleti RNA izolasyonuna kadar -80°C'de etanol banyosunda muhafaza edilmiştir.

RNA izolasyonu; Dondurulan 50 mg hücre peletinin üzerine 1 mL soğuk TRI solüsyonu eklenerek hücreler çözülmüştür. Hazırlanan hücrelere yaklaşık 0,5 mL boncuk (0,5 mm çapında, Zirconia/SILICA, Biospec Products, ABD) eklenerek Tissue Lyser II (Qiagen, CA, ABD) cihazında 5 kez 1'er dakikalık maksimum hızda çalkalamalarla kırılmıştır. Tüpler, sıcaklığın yükselmemesi için aralarda 2'şer dak. buz üzerinde bekletilmiştir.

Faz ayrımı; Kırma işlem sonrası oluşan homejenizat oda sıcaklığında 5 dak. inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası üzerine 200µL kloroform eklenmiş ve 15 sn. güçlü şekilde vorteks edilmiştir. İyiye karıştırılan homejenizat faz ayrımının gerçekleşmesi için 10 dak. oda sıcaklığında tekrar inkübe edilmiştir. 12000xg 4°C'de 15 dak. santrifüjlenen tüplerde üst kısımda oluşan berrak faz (~400-500 µL) yeni bir mikro santrifüj tüpüne alınmıştır.

RNA çöktürme işlemi; Temiz bir tüpe alınan üst fazın üzerine 500 µL isopropanol eklenerek 5 dak. oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 12000xg 4°C'de 15 dak. santrifüjlenmiş ve RNA peleti elde edilmiştir. RNA peletine 1 mL %75 etanol eklenerek 7500xg 25°C'de 5 dak. santrifüj edilmiş ve yıkanmıştır.

RNA'nın çözülmesi ve DNase uygulaması; RNA peleti 5 dak. eppendorf Concentrator'de kurutulmuş ve 50 µL Nuclease Free suda çözülmüştür. DNA kalıntısına karşı RNA'lara DNase uygulaması yapılmıştır (Fermentas MD, ABD). RNA örnekleri tekrar isopropanol ile çöktürülmüş ve Nuclease Free suda çözülmüştür.

Elde edilen mRNA'lardan ProtoScript® Taq RT-PCR Kit (NEB) kullanılarak kit protokolü doğrultusunda cDNA sentezi yapılmıştır. Elde edilen cDNA üç aşamalı qRT-PZR analizleri için kalıp olarak kullanılmıştır. qRT-PZR analizleri Rotor Gene Q (Qiagen) cihazı ile Quantitect SYBR Green PCR kiti kullanılarak yapılmıştır. PZR koşulları Çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. qRT-PCR sıcaklık ve süre değerleri.

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95°C	10 dakika	
Denatürasyon	95°C	30 saniye	
Bağlanma	60°C	30 saniye	40 döngü
Uzama	72°C	30 saniye	

qRT-PCR verilerinin hesaplaması Pfaffl metoduna göre yapılmıştır. Her bir cDNA için *GAP* geninin ekspresyon seviyesi "referans gen" olarak kabul edilmiştir.

### 3.2.14. Fermentör çalışmaları

Yabani suş ve mutant suşların glukoz kullanımı ve etanol üretimi fermentasyon boyunca ölçülmüştür. Bunun için bölümümüzde bulunan Sartorius Stedim B Plus fermentör sistemi ile kesikli yöntem kullanarak, kinetik parametreler sabit zaman aralıklarında alınan örneklerden yola çıkarak analiz edilmiştir. Glukoz konsantrasyonları GOPOD kiti kullanılarak etanol konsantrasyonları ise YSI 2700 cihazı analiz edilmiştir. Hücre yoğunluğu spektrofotometre ile belirlenmiştir. Bu parametreler:

- Hücre yoğunluğu;  $X$  (g/L),
- Şeker tüketimi (g/L)
- Etanol üretimi (g/L)
- Glukoz tüketimi oranı;  $S_g$  (g/L/h),
- Etanol üretimi oranı;  $P$  (g/L/h),
- Etanol tüketimi oranı;  $S_e$  (g/L/h),
- Ürün verimi;  $Y_{P/S}$  (g ürün miktarı/g substrat tüketimi),
- Biyokütle verimi;  $Y_{X/S}$  (g hücre miktarı/g substrat tüketimi),
- İkiye katlanma süresi;  $t_d$  (h),
- Spesifik gelişme hızı;  $\mu$  ( $h^{-1}$ ).

Elde edilen verilerle fermentasyonun izlediği yol ile ilgili değerler hesaplanmış ve fermentasyon kinetiği ortaya konulmuştur.

Çizelge 3.4. BMGY besiyerinin bileşimi.

Maya özütü	%1
Soytone	%2
Potasyum fosfat tamponu	0,1M / pH 6,0
Yeast nitrogen base	%1,34
Gliserol	%2

### 3.2.15. Kesikli fermentasyon şartları

Kullanılan besiyeri ve inokulumun hazırlanması: Donuk kültür çözülerek steril BMGY besiyeri (Çizelge 3.4) içeren engelli erlenlere ilave edilmiştir. Maya kültürü, 600 nm'deki optik yoğunluğu 10 oluncaya kadar çalkalamalı inkübatörde geliştirilmiştir. Çalışmalarda 5L hazneli fermentör kullanılmıştır (Sartorius B Plus). Başlangıç fermentasyon hacmi 2L'dir. Fermentörün 5L'lik haznesi kullanıldığında fermentöre ön kültürden 100 ml aseptik olarak aktarılmıştır.

Fermentasyonlar 30 °C'de ve pH 5,0'de gerçekleştirilmiş, pH kontrolü %25'lik (w/v) amonyum hidroksit çözeltisi ile yapılmıştır. Çözünmüş oksijen seviyesi (DO) %30 (aerobik) ve %5 (hipoksik) seviyesinde, % 4 glukoz konsantrasyonunda kesikli fermentasyon şartlarında uygulanmıştır. Fermentasyon süresince bu değerler karıştırma hızı ve saf oksijen beslemesi ile otomatik olarak sabit tutulmuştur.



Kesikli fazda kullanılan besiyeri temel tuzlu besiyeri (basal salts medium, BSM) ve 4,55 mL/L PTM1 tuzlarından oluşmaktadır. BSM besiyerinin içeriği, litrede, %4 gliserol, 26,7 mL %85 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0,93 g CaSO<sub>4</sub>, 18,2 g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 14,9 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 4,13 g KOH ve 2 mL %5'lik köpük kırıcı şeklindedir. PTM1 tuzlarının içeriği Çizelge 3.5'de verilmiştir. Kesikli faz sonunda yaklaşık 100 g/L civarında yaş hücre yoğunluğuna ulaşılması hedeflenmiştir. Gliserol kesikli fazının bitimi çözünmüş oksijen seviyesindeki (DO) ani artış ile takip edilmiştir. Bu noktada fermentasyon kültüründen örnek alınarak etanol olmadığı tespit edilmiştir. Gliserol kesikli fazı takiben, bu aşamadan sonra fermentasyon ortamına son konsantrasyonu %5 olacak şekilde %50'lik steril glukoz çözeltisinden peristaltik pompa yardımı ile eklenmiş ve glukoz kesikli faz başlatılmıştır. Fermentasyon ortamında glukozun tükenmesi çözünmüş oksijendeki ani artış ile takip edilmiş ve fermentasyon boyunca sık aralıklarla örnekler alınmıştır.

Çizelge 3.5. 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

### 3.2.16. Gelişim kinetiğinin hesaplanması

Hücre yoğunluğunun belirlenmesi: Hücrelerin optik yoğunluğu (OD) 600 nm'de spektrofotometre ile belirlenmiştir. Ayrıca hücrelerin yaş hücre ağırlığı da ölçülmüştür. Örnekler santrifüj edilmiş ve üst faz ayrılıp glukoz ve etanol konsantrasyonu analizleri için kullanılmıştır.

Glukoz ve etanol konsantrasyonlarının belirlenmesi: Glukoz konsantrasyonlarının analizinde GOPOD glukoz analiz kiti, etanol konsantrasyonlarının belirlenmesinde de YSI 2700 cihazı kullanılmıştır.

Statik bir kültürde belli bir miktarda substrat (S) kullanılarak inokülasyon ile besiyerine dahil olan  $X_0$  hücre kütlesi gelişmenin sonunda (durma fazında) en yüksek değer olan  $x_{max}$  hücre kütlesine, bununda yanında başlangıçtaki substrat miktarı en düşük değere ve mikroorganizma faaliyeti ile üretilen ürün (product) en yüksek seviyeye ulaşmaktadır. Bunun sonucunda,

Gelişmenin sonunda popülasyonun artan kütlesi;

$$x = x_{max} - x_0$$

olup gram yaş ağırlık olarak ifade edilmiştir.

Şeker tüketimi, gelişmenin sonunda;

$$S = S_1 - S_0$$

olup g/L olarak ifade edilmiştir.

Ürün miktarı, gelişmenin sonunda;

$$P = P_1 - P_0$$

olup g/L olarak hesaplanmıştır.

Bunun yanında mikroorganizma ürün verimi ve kütle verimi;

$$Verim (Y_{P/S})(\%) = \frac{Etanol\ miktarı\ (g/L)}{Toplam\ şeker\ tüketimi\ (g/L)} * 100$$

$$Verim (Y_{X/S})(\%) = \frac{Biyokütle\ miktarı\ (g/L)}{Toplam\ şeker\ tüketimi\ (g/L)} * 100$$

eşitliklerinden faydalanılarak saptanmıştır.

Ayrıca maksimum üretim ve tüketim, spesifik gelişme ve gelişme oranı da;

Gelişme oranı (g/L/gün) = Biyokütle kurvesinin en dik kısmının eğimi,

Üretme oranı (g/L/gün) = Etanol kurvesinin en dik kısmının eğimi,

Tüketme oranı (g/L/gün) = Şeker kurvesinin en dik kısmının eğimi,

Spesifik gelişme oranı (gün<sup>-1</sup>) =  $\ln x$ 'e karşı zaman grafiğinin eğimi, kullanılarak hesaplanmıştır.

Bir mikroorganizma popülasyonda sabit zaman aralıklarıyla bölünür veya sabit bir bölünme hızıyla çoğalır. Mikroorganizma kütlelerinin ( $x$ ) gelişme hızı da gelişme katsayısına ( $\mu$ ) bağlı olarak artar. Gelişme kinetiği çalışmalarında mikroorganizma kütlesi denilince hücre sayısı ile absorbe edilen besinlerle sağlanan hücre materyali toplamı anlaşılır.  $x$  büyüklüğündeki değişim hızı,  $x$ 'in her anındaki büyüklüğü ile orantılıdır.

$$\frac{dx}{dt} = \mu x$$

$\mu$  : gelişme hızı katsayısı

$x$  : hücre kütlesi olarak ifade edilmektedir.

Burada;

$x = x_0 e^{\mu t}$ , yani  $x$ 'in iki katına ulaşması için,

$2x_0 = x_0 e^{\mu t_d}$  olur, eşitlik sadeleştirildiğinde;

$$2 = e^{\mu t_d}$$

$\ln 2 = \mu t_d$  elde edilmektedir.

Buradan kütleinin **iki katına çıkma süresi** ( $t_d$ ) hesaplanmıştır.

Besiyeri ortamındaki mikroorganizma miktarına ait değerlerin ( $X$ ) doğal logaritması alındıktan sonra zamana karşı grafik oluşturulduğunda elde edilen denklemin eğimi mikroorganizmanın spesifik gelişme hızının hesaplanmasını sağlamaktadır (Shuler ve Kargi 2008).

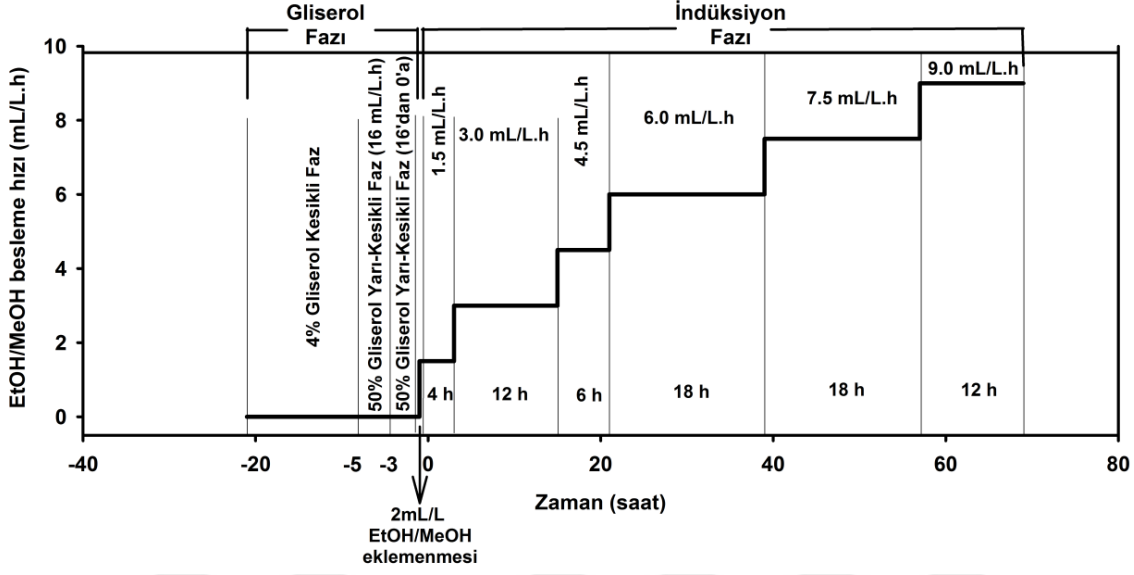
Yukarıdaki fermentasyon şartlarından düzenli olarak alınan örnek hücrelerden toplam RNA izole edilmiş, qRT-PZR metodu ile *ADH3* ve *ADH2* genlerinin transkripsiyon seviyesi belirlenmiştir. Bu aşamada özellikle aerobik ve hipoksik şartlardaki ekspresyon seviyeleri kısa aralıklarla (1 saat) ölçülmüştür.

### 3.2.17. Fermentör şartlarında rekombinant protein üretimi

Fermentör koşullarında ilgili *ADH* promotorları, *AOX1* ve *GAP* promoturu ile rekombinant protein üretimi ve ilgili promotorların karşılaştırılması standart *Pichia* fermentasyonu uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon işlemi, 3 aşamalı yarı-kesikli sistemle yürütülmüştür.

İnokulum olarak 100 mL BMGY besiyerinde geliştirilmiş (yaklaşık 10 OD) kültür kullanılmıştır. Fermentasyonun ilk aşaması olan kesikli faz (batch), %4 gliserol içeren 2L temel tuz besiyerinde (BSM) gerçekleştirilmiştir ve yaklaşık 16 saat sürmüştür. Ortamda gliserolün varlığı, çözülmüş oksijen düzeyi takip edilerek izlenmiştir. Gliserolün tükenmesi sonucu, çözülmüş oksijen miktarında ani artış gözlenmekte ve böylece kesikli faz sona ermektedir. Bu aşamadan sonra fermentasyonun ikinci aşaması olan gliserol besleme fazı (fed-batch) başlatılmıştır. Bu fazda, 2 saat boyunca %50 gliserol kullanılarak 16 mL/L.sa olacak şekilde gliserol beslemesi yapılmıştır. Bu sürenin sonunda, ortama *AOX1* promotoru için 2 mL/L metanol, *ADH3* promotoru için 2mL/L etanol ilave edilmiş ve gliserol besleme hızı 0 mL/L.sa düzeyine 3 saatlik süre içinde lineer olarak düşürülmüştür. Ortamdaki karbon kaynaklarının tükenmesi ile çözülmüş oksijen miktarında ani artış gözlenmiş ve fermentasyonun 3. aşaması olan indüksiyon fazına geçilmiştir. Bu fazda 72 saat boyunca *ADH3* promotoru için etanol, *AOX1* promotor için metanol ve *GAP* promotoru için de glukoz beslemesi yapılmıştır. Besleme yapılan indükleyici karbon kaynakları 12 mL/L PTM1 tuzları içermektedir. İndüksiyon fazı 72 saat sürdürülmüş ve besleme hızı 1,5 mL/L.sa'den 9 mL/L.sa düzeyine kadar kademeli olarak yükseltilmiştir. Besleme hızı, indüksiyon fazının 0-4 saati aralığında 1,5 mL/L.h, 4-16 saati aralığında 3,0 mL/L.h, 16-22 saati aralığında 4,5 mL/L.h, 22-40 saati aralığında 6,0 mL/L.h, 40-58 aralığında 7,5 mL/L.h ve 58-72 saati aralığında 9,0 mL/L.h değerlerine yükseltilmiştir. Ancak, *GAP* promotoru için yapılan fermentasyonlarda %50'lik glukoz çözeltisi ile besleme yapıldığı için besleme hızı 3,0 mL/L.sa'den 18 mL/L.sa uygulanmış ve besleme hızı artış zamanları *ADH3* ve *AOX1* fermentasyonlarında olduğu gibi uygulanmıştır. Fermentasyon işleminin zamana karşı besleme profili Şekil 3.3'de verilmiştir. İşlem boyunca; sıcaklık 30°C, pH değeri 5,0, karıştırma hızı 1000 rpm ve hava beslemesi 1,5 vvm olacak şekilde sabit tutulmuştur. Çözülmüş oksijen miktarı ise,

gerektiğinde saf oksijen eklenerek, %30 olacak şekilde kontrol edilmiştir.



Şekil 3.3. Fermentasyon besleme profili

### 3.2.18. Ksilanaz aktivitesi ölçümü

Enzim aktivitesi, ksilandan serbest bırakılan indirgen şekerin Dinitrosalisilik asit (DNSA) kimyasalı ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan renk değişiminin spektrofometrik olarak ölçülmesi ile tespit edilmiştir (Miller 1959).

Deney öncesi test edilerek belirlenen dilüsyon faktörü kadar dilüsyon edilen örnek (0,1 mL), 0,9 mL %1'lik (ağırlık/hacim) brenchwood ksilan içeren 0,05M sodyum sitrat tamponuna (pH 5) eklenmiştir. Reaksiyon karışımı 50°C' de 5 dakika inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda reaksiyon karışımından 100 µL alınmış ve 900 µL DNSA (reaksiyon durdurma çözeltisi) çözeltisi içine eklenmiştir. Karışım 5 dakika süre ile kaynatılmış ve bu üzerinde 5 dak. soğutulduktan sonra 540 nm dalga boyunda spektrofometrik olarak değerler okunmuştur. Okuma sonucu açığa çıkan indirgen şeker miktarı Dinitrosalisilik asit (DNSA) metodu ile tespit edilmiştir. Kör örnekler substrata enzimin eklenmesinden hemen sonra reaksiyonun durdurulması ile hazırlanmıştır.

Bir ünite ksilanaz aktivitesi, 1 dakikada, deney koşullarında, 1µmol indirgen şekeri (glukoza eşdeğer) üretmek için gereken enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Standart kurve 1-10 µmol ksiloz ile çizilmiştir.

### 3.2.19. SDS-PAGE analizi

SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) OWL P8D8 (Thermo Scientific) cihazı ile %5 polyakrilamid yükleme jeli ve %10 poliakrilamid ayırma jeli olacak şekilde hazırlanarak yürütülmüştür. Paralelli çalışılan deneylerde örnekler hazırlanırken, elde edilen süpernatant örneklerinin her bir paraleli eşit hacimde karıştırılmıştır. Bu şekilde hazırlanan süpernatant örnekleri 25 µl olacak şekilde 3:1

kısım olacak şekilde 4X SDS jel yükleme tamponu (200 mM Tris-Cl, pH 6,8, %8 SDS, %0,4 bromphenol blue, %40 glycerol, 100 mM DTT) ile karıştırılmış ve 70 °C’de 10 dak. denatüre edilmiş ve oda sıcaklığına soğutulmuştur. Ardından hazırlanan örneğin 20µl’lik kısmı jele yüklenmiştir. Elektroforez işlemi, 1XTGS (0,025 M Tris base, 0,192 M Glycine, %0,1 SDS, pH 8,3) tamponunda 150 V değerinde 60 dak. yürütülmesi ile gerçekleştirilmiştir. Daha sonra jel, IRDye Blue Protein Stain (Licor Odyssey) ile 1 saat orbital çalkalayıcı üzerinde boyanmış, saf su ile 15 dak. yıkandıktan sonra LiCor (Odyssey) ile görüntülenmiştir.

### 3.2.20. Etanol miktarının tayini

Süpernatant örneklerinde etanol miktarının tespit edilmesinde YSI 2700 biyokimya analizörü (Yellow Springs, ABD) ve HPLC (High liquid pressure chromatography) cihazı (Shimadzu, Japonya) kullanılmıştır. Etanol miktarı YSI analizörü ile etanol oksidaz enzimi (EC 1.1.3.13) immobilize edilmiş membran kullanılarak analiz edilmiştir. Örneklerde etanol miktarı standart kurveye girecek şekilde seyreltilerek ölçülmüştür.

HPLC analizleri fermentasyon kolonu (ICSep ORH-801, Transgenomic, ABD) ve refraktif indeks dedektörü kullanılarak 0,025 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> taşıyıcı faz ile 0,6 mL/dak akış hızında ve 60°C kolon sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Uygun şekilde seyreltilen örnekler 0,45µm’lik filtreden süzildikten sonra HPLC ile analiz edilmiştir.

### 3.2.21. Glukoz miktarının tayini

Süpernatant örneklerinde glukoz miktarı kit ve HPLC olmak üzere iki farklı şekilde analiz edilmiştir. D-Glukoz Assay Kit (GOPOD Format, Megazyme, İrlanda) kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda analiz edilmiştir.

HPLC ile glukoz analizinde fermentasyon kolonu (ICSep ORH-801, Transgenomic, ABD) ve refraktif indeks dedektörü kullanılmıştır. Kromatografik ayırım 0,025 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> taşıyıcı faz ile 0,6 mL/dak akış hızında ve 60°C kolon sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Uygun şekilde seyreltilen örnekler 0,45µm’lik filtreden süzildikten sonra HPLC ile analiz edilmiştir.

### 3.2.22. Hücre özütünden protein saflaştırılması

Laboratuvarımızda histidin etiketli proteinlerin saflaştırılması sırasında kontaminant bant olarak gözlenen Adh3 proteininin,  $\Delta adh3$  suşunda üretilmediği protein saflaştırma analizi ile de doğrulanmıştır. Bu amaçla X33 ve  $\Delta adh3$  suşlarının hücre özütleri elde edilmiştir ve hücre toplam proteini ile saflaştırma işlemine geçilmiştir. Saflaştırma koşulları histidin etiketli proteinlerin saflaştırılmasında uygulanan standart koşullardır ve beklenen sonuç, X33 toplam proteininde Adh3 proteininin histidin etiketli olmamasında rağmen bağlanması ancak bu bağlanmanın  $\Delta adh3$  toplam proteini ile yapılan saflaştırma işlemi gözlenmemesidir.

Saflaştırma işlemi HisPur Ni-NTA Purification Kit (Thermo Scientific Pierce, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda

proteinler nikel kolona bağlanmış ve 25 mM imidazol içeren 100 mM PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7,4) ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkama işleminin ardından proteinler 50, 100 ve 200 mM imidazol içeren 100 mM PBS ile nikel kolondan toplanmıştır. Saflaştırma işlemi SDS-PAGE analizi ile kontrol edilmiştir.

### 3.2.23. İstatistiksel analiz

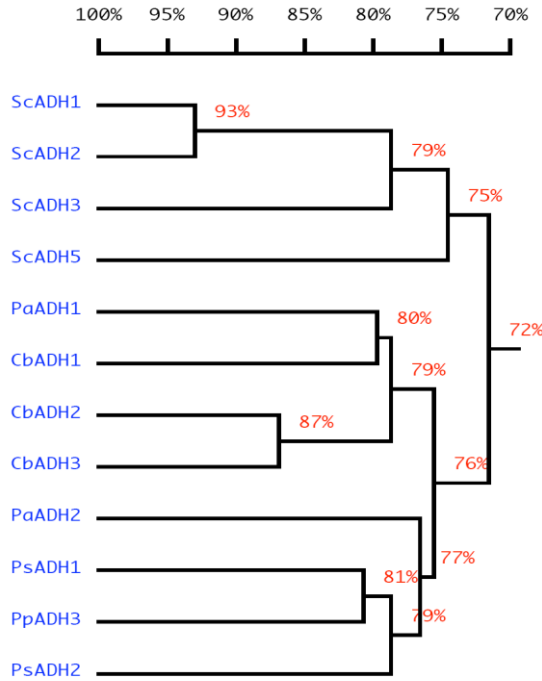
Erlenmayer ve fermentör koşullarında rekombinant protein üretimleri 2 paralel ve 2 tekrür olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler, SigmaPlot v.11 (systat software) programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi ile analiz edilmiş ve elde edilen verilerin ortalamaları arasındaki fark %95 güven aralığında ( $p<0.05$ ) Duncan çoklu aralık testi ile belirlenmiştir. İstatistiksel analiz sonuçları çizelge olarak Ek 8.8, Ek 8.9, Ek 8.10 ve Ek 8.11'de verilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Biyoinformatik Analiz

*ADH3* enzimini kodlayan Açık Okuma Dizisi (Open Reading Frame) 1051 baz çiftinden ve 350 amino asitten oluşmaktadır. *P. pastoris ADH3* geninin DNA dizisi EK 8.2’de verilmiştir.

*P. pastoris Adh3* enziminin amino asit dizilimi, diğer mayalarda bulunan alkol dehidrogenaz enzimlerinin amino asit dizilimi DNAMAN 7.0 programı kullanılarak karşılaştırılmış (Şekil 4.1), *P. stipitis* ve *P. anamola* ’nın Adh enzimleri ile yüksek benzerlik gösterdiği görülmüştür. Bu sebeple *P. pastoris*'te de farklı *ADH* genlerinin varlığının olası olduğu sonucu çıkarılmıştır.

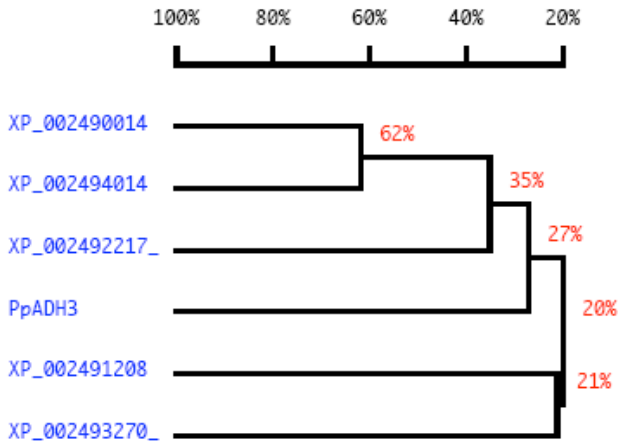


Şekil 4.1. *P. pastoris Adh3* amino asit diziliminin farklı mayalardaki mevcut Adh amino asit dizilimleri ile homolojisi. Sc: *S. cerevisiae*; Pa: *Pichia anamola*; Cb: *Candida boidinii*; Ps: *Pichia stipitis*; Pp: *Pichia pastoris*

*P. pastoris* GS115 genomunda Blast (Basic Local Alignment Search Tool) ile yapılan taramada, *P. pastoris*'te rapor edilen Adh3 amino asit dizilimine düşük benzerlik gösteren beş amino asit dizilimi DNAMAN 7.0 programı kullanılarak benzerlik ağacı (homology tree) Şekil 4.2’de verilmiştir. Bu genlerin de muhtemel Adh aktivitesi gösterebileceği göz önünde bulundurularak çalışma kapsamında başta gen ekspresyonu seviyesinde analiz edilmiştir. Bu çalışmada analiz edilen genlerin NCBI erişim kodları ve isimlendirilmesi Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Potansiyel *ADH* genleri ve tanımlanan genlerin NCBI erişim kodları ve NCBI isimlendirilmesi

Gen	NCBI Erişim kodu	İsmlendirme (NCBI)
<i>adhI</i>	XP_002490014	NADPH-dependent medium chain alcohol dehydrogenase with broad substrate specificity
<i>adhII</i>	XP_002491208	Bifunctional enzyme with alcohol dehydrogenase and glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase
<i>adhIII</i>	XP_002492217	NADPH-dependent medium chain alcohol dehydrogenase
<i>adhIV</i>	XP_002493270	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase
<i>adhV</i>	XP_002494014	NADPH-dependent medium chain alcohol dehydrogenase with broad substrate specificity
<i>ADH3</i>	XP_002491382	Mitochondrial alcohol dehydrogenase isozyme III
<i>ADH</i>	CAY67035	Alcohol dehydrogenase



Şekil 4.2. *P. pastoris* Adh3 amino asit diziliminin GS115 genomunda bulunan muhtemel Adh amino asit dizilimleri ile homolojisi

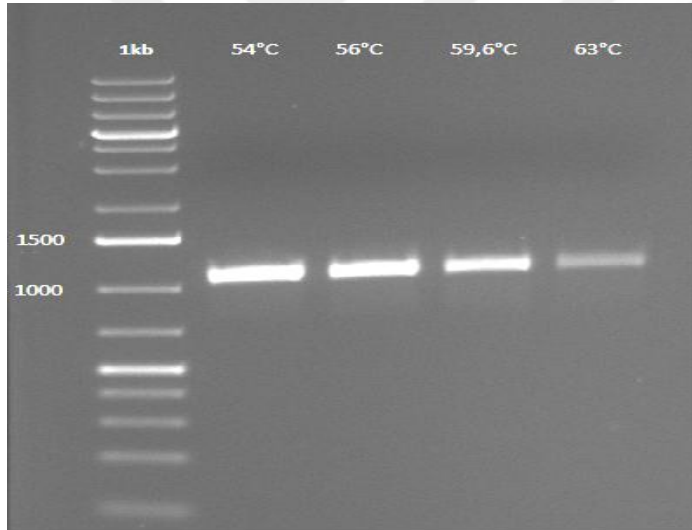
Bu çalışmanın *ADH* promotorları ile rekombinant protein üretimi aşamasında kullanılan *ADH3* promotorunun DNA dizisi EK 8.3'de verilmiştir.



#### 4.2. *ADH3* Geninin İnaktif Edilmesi ve Karakterizasyonu

*P. pastoris* GS115 suşu genomik DNA'sından Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile *ADH3* geninin (1053 bç) izolasyonu yapılmıştır. YPD sıvı besiyerinde geliştirilen *P. pastoris* GS115 suşu genomik DNA'sı Yeast Genomic DNA Isolation Kit (Epicentre, Madison, WI, ABD) kullanılarak kit protokolüne göre izole edilmiştir. DNA konsantrasyonu Qubit Fluorometer (Invitrogen) ile ölçülmüş ve 5 ng/μL olacak şekilde seyreltilerek PZR reaksiyonunda kullanılmıştır. PZR reaksiyonu ile *ADH3* genin eldesi için Forward *ADH3*-WGF 5'-ATGTCTCCAACACTATCCCAACTACAC ve reverse *ADH3*-WGR 5'-TTATTGGGAAGT GTCCACAACG primer çifti kullanılmıştır. Primerler, NCBI GenBank XM\_002491337 accession no'lu *P. pastoris* GS115 *ADH3* gen dizisi baz alınarak dizayn edilmiştir.

PZR reaksiyonu 50'şer μL olacak şekilde 4 farklı sıcaklık değerinde gradient PZR olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PZR ürünlerinin 5'er μL'si kontrol için %1 agarose jelde yürütülmüş ile 1053 bç uzunluğunda beklenen *ADH3* geninin elde edildiği görülmüştür (Şekil 4.3).

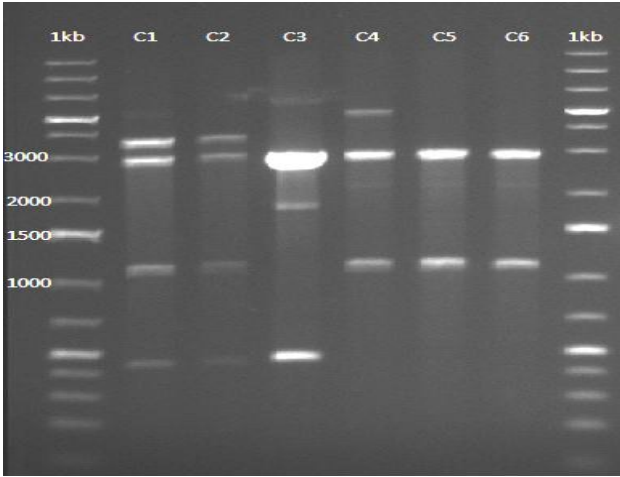


Şekil 4.3. *P. pastoris ADH3* geninin PZR ile eldesinin jelde görüntülenmesi. 1kb: GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas); 2-5.Sütunlar: 54-64°C arası farklı sıcaklıklarda oluşan *ADH3* geni (1053 bç)

Elde edilen *ADH3* geninin saflaştırılması MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) kullanılarak kit protokolüne uygun bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen *ADH3* geninin pJET1.2 plazmitine (CloneJet Cloning Kit, Fermentas) (Şekil 3.1) ligasyonu yapılmış ve oluşturulan yeni plazmit pJET-*ADH3* (4027 bç) olarak adlandırılmıştır. pJET-*ADH3* plazmiti daha sonra kompetent *E. coli* XL1-Blue hücrelerine transfer edilmiş, 100 μg/mL ampisilin içeren LB Miller agar plakalarına ekilerek transformant kolonilerin seleksiyonu gerçekleştirilmiştir. 37°C'de geceboyu inkübasyon sonucunda plakalarda gelişen kolonilerden 6 tanesi seçilerek 100 μg/mL ampisilin içeren 3 mL LB Miller sıvı besiyerinde ekilerek 37°C'de 1 gece inkübasyona

birakılmıştır. Daha sonra kolonilerden Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) ile izole edilen plazmitlerin restriksiyon analizi ile kontrolleri yapılmıştır.

Elde edilen plazmitlerden doğru olanının tespiti için restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. *ADH3* genini ve plazmiti, içinden ve tek noktadan kesen *HindIII* enzimi ile kesilmiş ve oluşan DNA parçaları %1 agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir (Şekil 4.4).

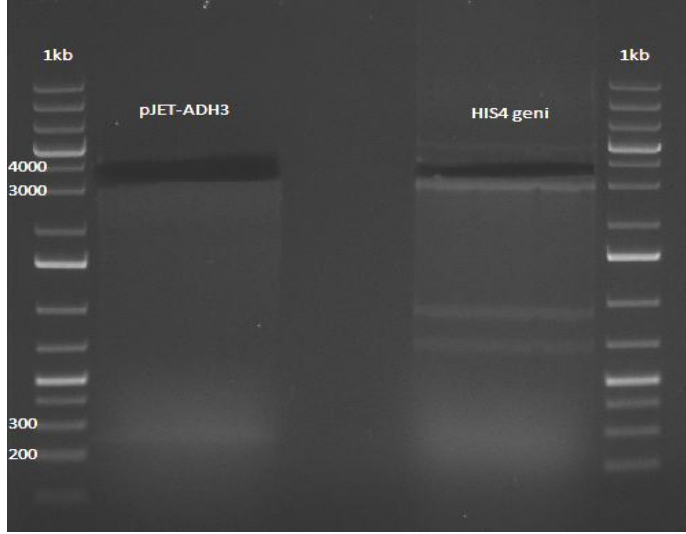


Şekil 4.4. Plazmit izolasyonu sonrası elde edilen 6 plazmitin *HindIII* ile restriksiyon analizi. 1kb: GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas); C1-C6: seçilen kolonilerden edilen plazmitlerin *HindIII* enzimi ile kesilmesi

Restriksiyon enzimleri ile kesilen plazmitler jelde yürütülmüş ve teorik olarak 1122 bç ve 2905 bç uzunluğunda olması beklenen DNA bantlarının C1, C2, C4, C5 ve C6 olarak isimlendirilen plazmitlerde olduğu görülmüştür. Ancak C1, C2 ve C4 plazmitlerinde beklenen DNA bantlarının yanında bilinmeyen farklı bantlarda görülmektedir. Bu nedenle C5 ve C6 plazmitleri seçilmiştir. *ADH3* genin gen yer değiştirme tekniği ile inaktif edilmesi aşamasına C5 plazmiti ile devam edilmiştir.

Seçilen pJET-ADH3 plazmiti (C5), *ADH3* geninin (1053 bç) orta bölgesinde yer alan *EcoRI* (422. bç) ve *SalI* (664. bç) restriksiyon enzimleri ile çiftli kesilmiştir. *ADH3* geninin inaktif edilmesi için kullanılan olan *HIS4* geni pPIC3.5K plazmitinden *HindIII* restriksiyon enzimi ile elde edilmiştir.

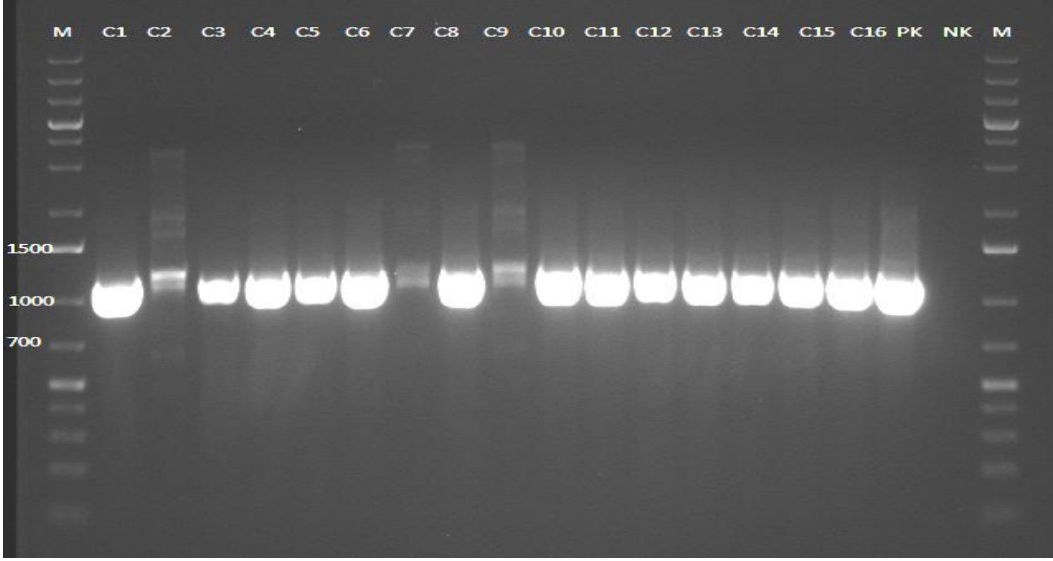
*EcoRI* ve *SalI* restriksiyon enzimleri ile kesilen pJET-ADH3 plazmitin içerdiği *ADH3* geninin orta bölgesinden 242 bç uzunluğunda DNA parçası düşürülerek lineer hale getirilmiştir. Aynı şekilde *HindIII* enzim ile kesilen pPIC3.5K plazmitinden de *HIS4* geni düşürülmüştür. Elde edilen DNA parçaları jelle yüklenmiş ve hedef bantlar kesilerek jelden özütlenmiştir. Kesim yapılan jelin görüntüsü Şekil 4.5’de verilmiştir.



Şekil 4.5. *ADH3* geninin iç bölgesinden linear hale getirilen pJET-ADH3 plazmiti ve gen yer değiştirme işleminde kullanılacak olan *HIS4* geninin jelde kesilmesi

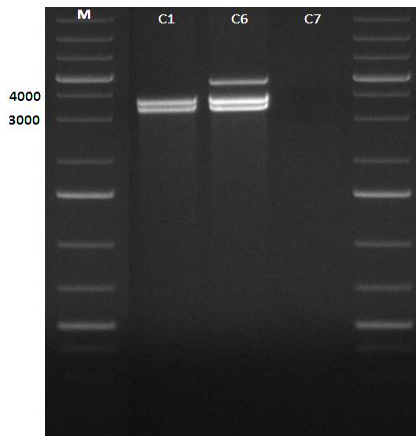
Jelden özütlenen linear pJET-ADH3 (4027 bp) plazmiti ve *HIS4* geni, DNA blunting enzimi (Fermentas) ile küt uçlu hale getirilmiş ve Rapid DNA Dephos&Ligation Kit (Roche) kullanılarak fragmentlerin ligasyonları gerçekleştirilmiştir. Ligasyon reaksiyonları kompetent *E. Coli* XL1-Blue hücrelerine transform edilmiştir. Transformasyonun ardından hücreler LB-Amp (Miller) agar plakalarına ekilmiştir. Transformasyon sonrası plakalarda oluşan kolonilerden *HIS4* genini içeren plazmiti bulmak için koloni PZR analizi yapılmıştır. Koloni PZR reaksiyonunda kullanılan primer çifti *HIS4* geninin iç bölgesinden yaklaşık 1000 bp uzunluğunda ürün verecek şekilde tasarlanmıştır.

Koloni PZR reaksiyonları için ilk olarak 75 µL LB Miller Broth (Ampisilin 100 µg/mL) içeren besiyerine koloniler öze ile inokulum yapılmıştır. Daha sonra çalkalamalı vorteks ile yaklaşık 15 dak. çalkalanarak hücreler koloni PZR analizine hazır hale getirilmiştir. PZR reaksiyon hacmi her bir koloni için 20 µL olarak ayarlanmış ve 75 µL sıvı besiyerinde geliştirilen kolonilerden direkt olarak 0,8 µL sıvı kalıp DNA olarak eklenmiştir. Koloni PZR ile toplam 16 koloni taranmıştır. PZR ürünlerinin kontrol edildiği agaroz jel görüntüsü Şekil 4.6'da verilmiştir.

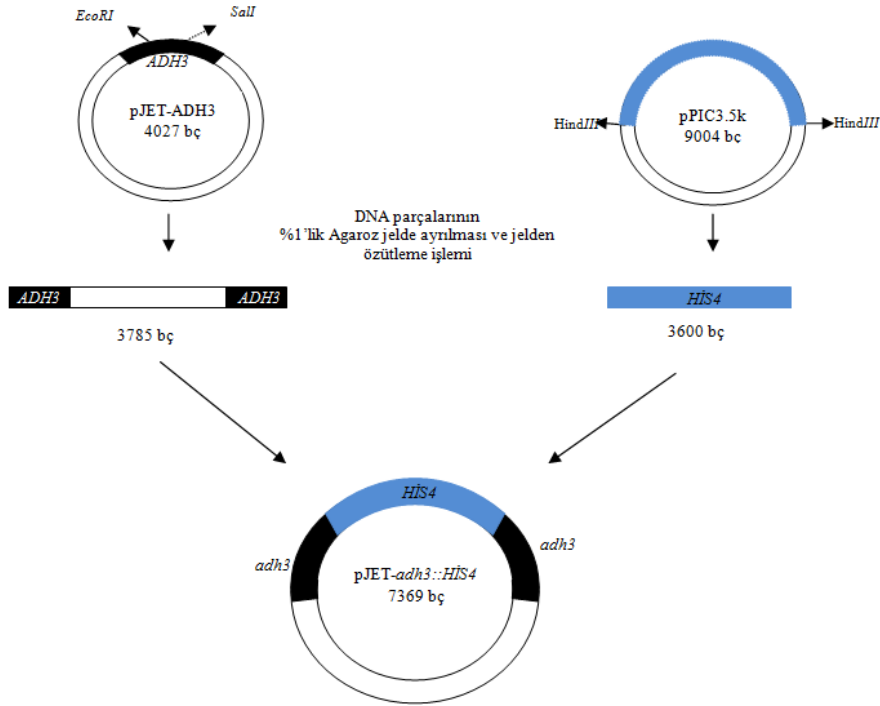


Şekil 4.6. Koloni PZR ile tarama yapılan örneklerin jel görüntüsü. M:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas), C1-C16:Farklı koloniler, PK:Pozitif kontrol, NK:Negatif kontrol

Elde edilen jel görüntüsünden C2, C7 ve C9 hariç diğer klonlarda beklenen PZR ürününün olduğu görülmüştür. Elde edilen kolonilerden pozitif görünen ve bir adet negatif rastgele seçilen C1, C6 ve C7 kolonilerinden plazmit izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen plazmit DNA'lar *Xba*I restriksiyon enzimi ile kesilerek jelde kontrol edilmiştir. Jel görüntüsü Şekil 4.7'de verilmiştir. Enzim ile kesim sonucu beklenen 3544 ve 3825 bp DNA parçaları koloni PZR sonucunu doğrulamıştır. C1 ve C6 olarak isimlendirilen plazmitler beklenen DNA parçalarını verirken, jel görüntüsünde C6 plazmidini yaklaşık 5000 bp değerinde başka bir bant içermektedir. Bu bantın enzim tarafından kesilmemiş plazmit olduğu düşünülmüştür. İnaktivasyon işlemine pJET-*adh3::HIS4* olarak isimlendirilen C1 plazmiti ile devam edilmiştir. *ADH3* geninin plazmit üzerinde gen yer değiştirme ile inaktif edilmesinin (Dux ve İnan 2006) şematik gösterimi Şekil 4.8'de verilmiştir.

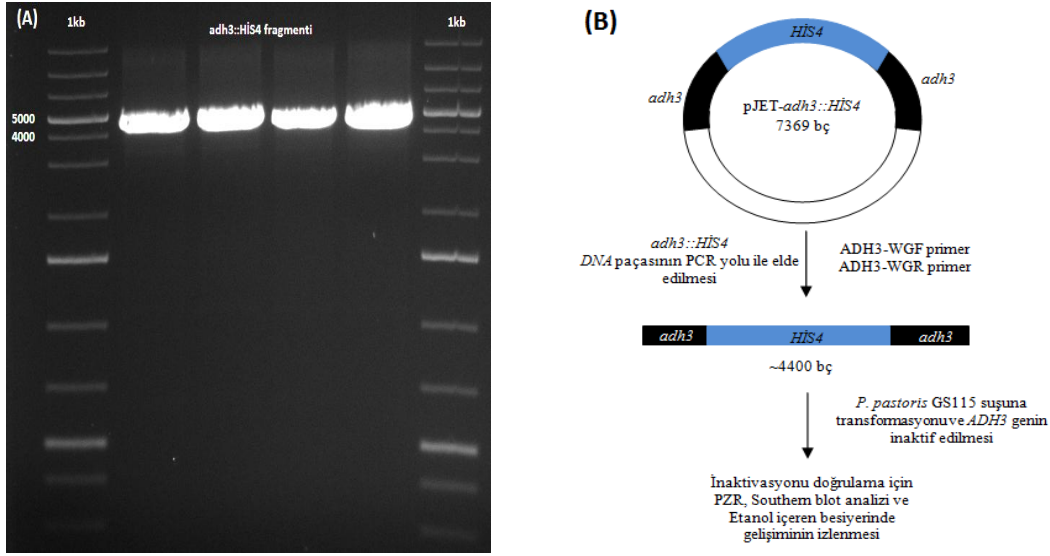


Şekil 4.7. Plazmit izolasyonu sonrası restriksiyon enzimleri ile kontrolün jel görüntüsü. M:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas), C1, C6,C7:Farklı kolonilerden elde edilen plazmit



Şekil 4.8. *ADH3* geninin plazmit üzerinde gen yer değiştirme ile inaktif edilmesinin şematik gösterimi

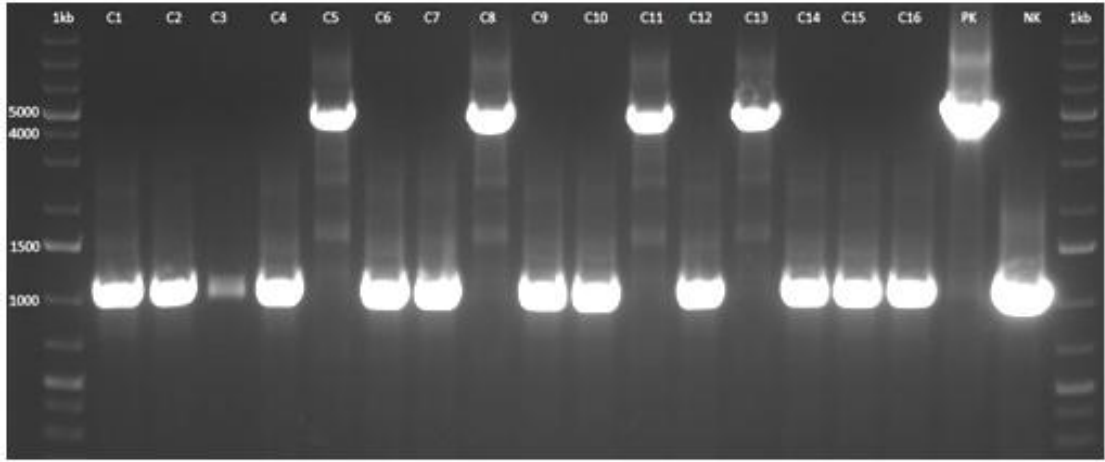
*ADH3* geninin inaktif edilmesi için *adh3::HIS4* DNA fragmenti pJET-*adh3::HIS4* plazmitinin kalıp olarak kullanıldığı PZR ile elde edilmiştir. PZR primerleri olarak *ADH3*-WGF ve *ADH3*-WGR primer seti kullanılmış ve PZR sonucunda yaklaşık 4400 bp uzunluğundaki *adh3::HIS4* fragmenti elde edilmiştir. PZR ürünlerinin jel görüntüsü şekil 4.9A'da, inaktivasyonun şematik anlatımı ise Şekil 4.9B'de verilmiştir. Elde edilen *adh3::HIS4* fragmenti *P. pastoris* mayasına transformasyon için kullanılmıştır.



Şekil 4.9.  $\Delta adh3::HIS4$  frangmentinin PZR ile eldesini gösteren jel görüntüsü ve şematik anlatımı. (A):  $\Delta adh3::HIS4$  fragmentinin PZR ürünü, (B):  $\Delta adh3::HIS4$  fragmentinin eldesinin şematik anlatımı

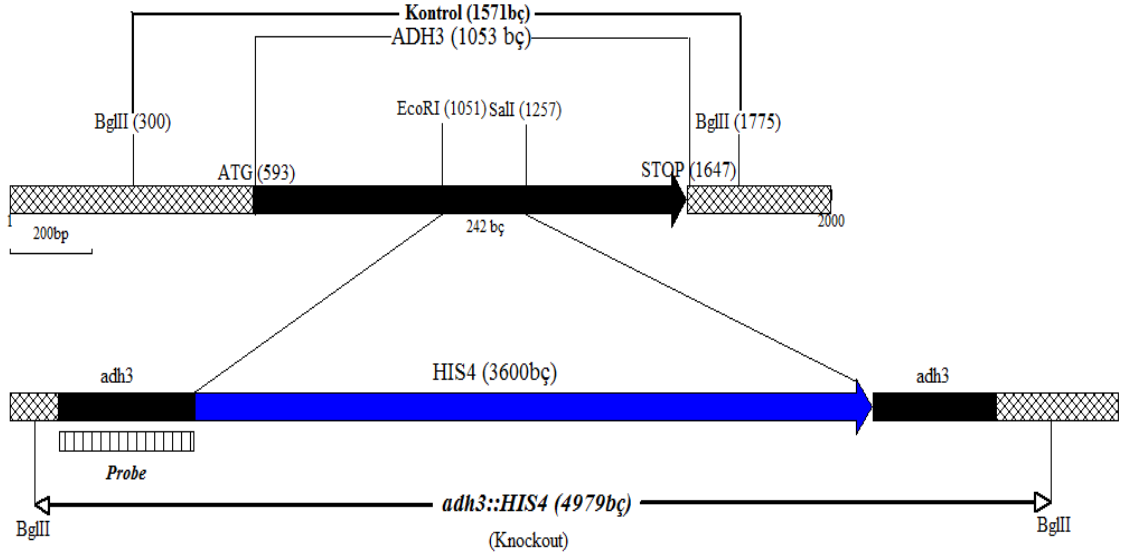
*ADH3* geni *P. pastoris* GS115 suşunda inaktif edilmiştir. İnaktivasyonun GS115 suşunda yapılmasının sebebi, GS115 suşunda, seleksiyon markırı olarak kullanılacak olan *HIS4* geninin inaktif olması ve minimal besiyerinde gelişebilmesi için histidine ihtiyaç duymasıdır. Bu nedenle  $\Delta adh3::HIS4$  DNA parçası içinde transform ettiğimiz sağlam *HIS4* geni eğer genoma (*ADH3* geninin orta bölgesine) entegre olursa; minimal besiyerinde histidine gerek duymadan gelişebilen koloniler, *adh3* geni histidin ile inaktif edilmiş olan koloniler olacaktır.

pJET-*adh3::HIS4* nakavt plazmitinden PZR yolu ile elde edilen  $\Delta adh3::HIS4$  nakavt fragmentinin MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) ile saflaştırılmasından sonra, yaklaşık 3 µg kadarı Lityum asetat metodu ile kompotent hale getirilen *P. pastoris* GS115 suşuna (histidin okzotrof) elektroporasyon yöntemi ile transform edilmiştir. Transformasyon işlemi 1.5 kV/5ms şartlarında Electroporator (Eppendorf) ile gerçekleştirilmiştir. Transformantlar MD plakalara ekilmiş, 30°C'de 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. 3 gün sonrasında MD plakalarda gelişen tek kolonilerden 14 tanesinden YPD sıvı besiyerine ekim yapılarak 30°C çalkalamalı inkübatörde bir gece inkübe edilmiş ve ertesi gün Masterpure Yeast DNA Kit (Epicentre) ile DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Konsantrasyonları 5 ng/µL olarak ayarlanan genomik DNA'lar *ADH3* geninin *HIS4* geni ile inaktif olup olmadığının kontrolü için yapılan PZR'de kalıp olarak kullanılmıştır. *ADH3*-WGF ve *ADH3*-WGR primerleri ile yapılan PZR sonucunun %1'lik agaroz jelde yürütülmesi ile, beklenen 4400 bp fragmentin C5, C8, C11 ve C13 olarak isimlendirilen genomik DNA'dan elde edildiği gösterilmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Transformant GS115 genomik DNA'larından inaktif DNA parçası ( $\Delta adh3::HIS4$ ) varlığının PZR ile kontrol edilmesi. M:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas), C1-C16: MD plakalardan seçilen transformant koloniler

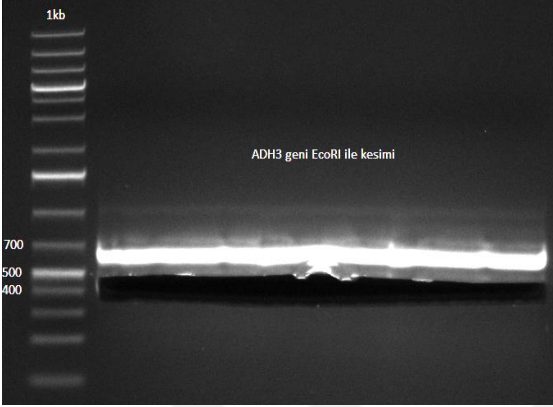
PZR ile inaktif olduğu doğrulanan klonlardan C5, C8 ve C11'den Southern blot analizi için genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Southern blot analiz kiti olarak radyoaktif olmayan DIG HighPrime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche) kullanılmıştır. Southern blot analizinin şematik gösterimi Şekil 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.11. *P. pastoris* ADH3 geninin HIS4 geni ile inaktif edilmesi ve Southern analizi

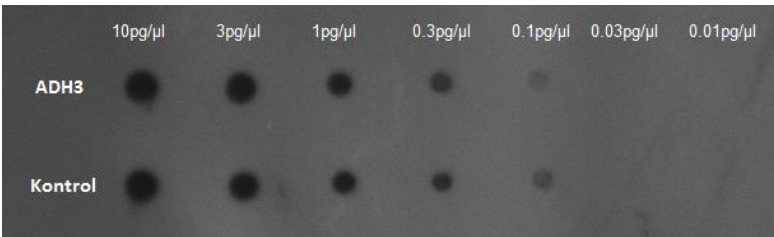
Elde edilen  $\Delta adh3::HIS4$  fragmenti *P. pastoris* genomuna entegre olduğu takdirde, ADH3 geni içinden düşürülen 242 bp uzunluğundaki DNA'nın yerini 3600 bp uzunluğundaki HIS4 geni alacaktır. PZR yolu ile inaktivasyonu görülen klonların Southern blot analizi ile kesin doğrulaması yapılmıştır. Southern blot için kullanılacak DNA probu ADH3 geninin ilk 422 bp uzunluğundaki bölgesinden tasarlanmış ve DIG

ile etiketlenmiştir. Etiketlenecek prob PZR yolu ile elde edilmiştir. PZR ile çoğaltılan *ADH3* geninin *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Daha sonra oluşan 422 bp uzunluğundaki DNA parçası jelden kesilip özütlenmiş ve DIG etiketlemeye hazır hale getirilmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Southern blot analizinde kullanılan DIG prob için *ADH3* geninin *EcoRI* enzimi ile kesilmesi ve 422 bp uzunluğundaki probun jelden özütlenmesi. 1kb:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas)

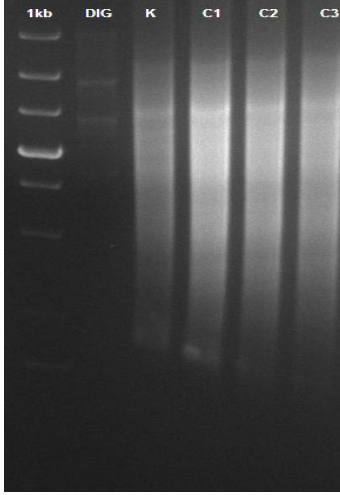
Toplamda 3 µg DNA etiketleme işlemine alınmıştır. Reaksiyon karışımı DIG kitin talimatlarına doğrultusunda hazırlanmış ve bir gece boyunca etiketlemek üzere inkübasyona bırakılmıştır. Yaklaşık 20 saat inkübasyona bırakılan probun etkinlik ölçümü Şekil 4.13’de verilmiştir. Kit talimatlarına göre etkinlik ölçümünde probun dilüsyonlarından 0.1ng/µL yani 5.nokta görünür olmalıdır. Yapılan probun etkinliğinin istenildiği gibi olduğu Şekil 4.13’de görülmektedir.



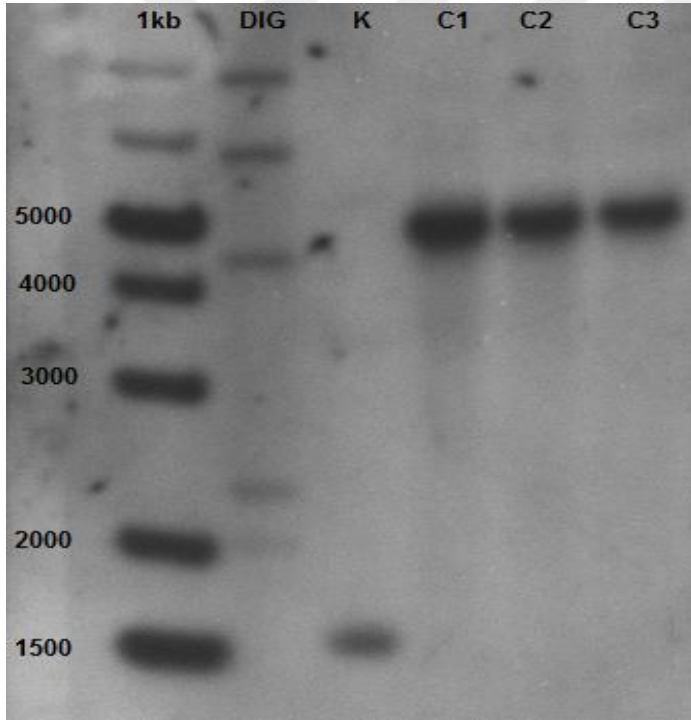
Şekil 4.13. *ADH3* geni içinden dizayn edilen ve etiketlenen DIG probun etkinlik ölçümü

Transformant GS115 suşu ve negatif kontrol olarak GS115 konukçu suşlarından elde edilen genomik DNA’lar *BglII* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir (Şekil 4.14). DNAMAN programı ile daha önceden yapılan analizde teorik olarak negatif kontrol suşlarında 1571 bp, *Δadh3* geni inaktif suşlarda 4979 bp büyüklüğünde bantlar beklenmektedir. Protokole uygun olarak gerçekleştirilen Southern blot analizi ile inaktif suşlar tespit edilmiştir (Şekil 4.15). Seçilen 3 klonunda *Δadh3* geninin inaktif olduğu görülmüştür. Gelecek çalışmalara C1 klonu ile devam edilmiş ve C1 klonu MK115 olarak isimlendirilmiştir.





Şekil 4.14.  $\Delta adh3$  inaktif suşun Southern blot analizi ile doğrulanması için genomik DNA'ların *Bgl*III enzimi kesimini gösteren jel görüntüsü. 1kb:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas), DIG: DIG etiketli markır, K: GS115 konukçu, C1-C3:Seçilen farklı klonlar



Şekil 4.15. Transformant GS115 suşunda yapılan Southern blot analizi sonucu X-ray filmin görüntüsü. 1kb:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas), DIG: DIG etiketli markır, K: GS115 konukçu, C1-C3:Seçilen farklı klonlar

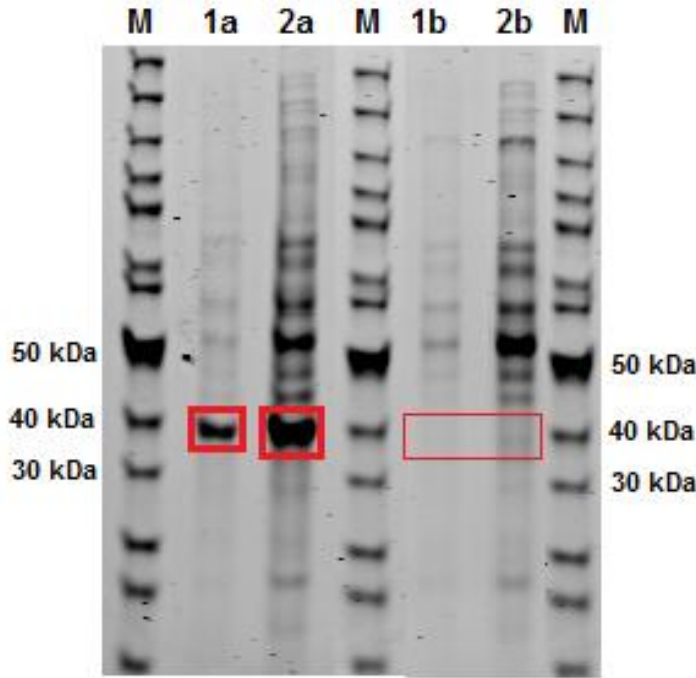
Ayrıca, laboratuvarımızda *P. pastoris* ile çalkalamalı erlenmayer üretimlerinde, hücre içi rekombinant protein üretimi sonrası 6xHis etiketli proteinin nikel resin ile saflaştırılmasında bazı problemler yaşanmaktadır. Hücre içi toplam proteinden yapılan Ni-NTA 6xHis protein saflaştırmasında, saflaştırılmak istenen protein ile birlikte

yaklaşık 38 kDa moleküler ağırlıkta ve oldukça yüksek yoğunlukta bir başka protein bandı görülmektedir. Protein bandının 6xHis protein saflaştırılmasında nikel resine bağlandığı SDS-PAGE analizinde görülmekte, ancak Anti-6xHis antibody ile yapılan western blot analizlerinde tanımlanmayan protein bandı görülmemektedir. Daha önce yapılan bir çalışmada bu proteinin N-Terminal Amino asit sekansı yapılmış ve alkol dehidrogenaz aktivitesine sahip olduğu belirtilmiştir (Law vd 2001). 2001 yılında *P. pastoris* genom sekansı bilinmediği için kontamine proteini metil format sentaz olarak tanımlamışlardır. Fakat çalışmada elde edilen sekans *P. pastoris* proteinleri ile karşılaştırıldığında sekansın *P. pastoris* Adh3 proteinine ait olduğu görülmüştür (Şekil 4.16).

Unknown protein	.SPTIPTTQKAVIFETNGGPLEYKDI.....	25
<i>Pichia pastoris</i> Adh3	MSPTIPTTQKAVIFETNGGPLEYKDI PVPKPKSNELLINVKYSGVCHTDLHAWKGDWPLD	60
Consensus	sptipttqkavifetnggpleykdi	

Şekil 4.16. *P. pastoris* Adh3 ve 38 kDa değerindeki bilinmeyen proteinin amino asit sekansının karşılaştırması

Literatürde yer alan bu çalışma doğrultusunda kontamine olarak belirtilen bant gerçekten Adh3 proteini ise bu çalışma ile elde edilmiş *adh3* geni inaktif edilmiş MK115 (*Δadh3*) suşunda *ADH3* geninden kaynaklı protein bandının yapılan 6xHis saflaştırmasında çıkmaması gerektiği düşünülmüştür. Tarafımızdan yapılan saflaştırmanın görüntüsü Şekil 4.17’de verilmiştir. Görüntüde kontrol suşu ile yapılan saflaştırmada 1a ve 2a olarak isimlendirilen ve kırmızı çerçeve içine alınan bandlar Adh3 bandlarıdır. MK115 suşu ile yapılan saflaştırmada MK115 suşunda Adh3 protein bantının ortadan kalktığı görülmüştür. Sonuç olarak kontamine olarak belirtilen bantın Adh3 proteini olduğu ve bu çalışmamızda elde edilen inaktif suşta *ADH3* geninden protein üretilmediği doğrulanmıştır.



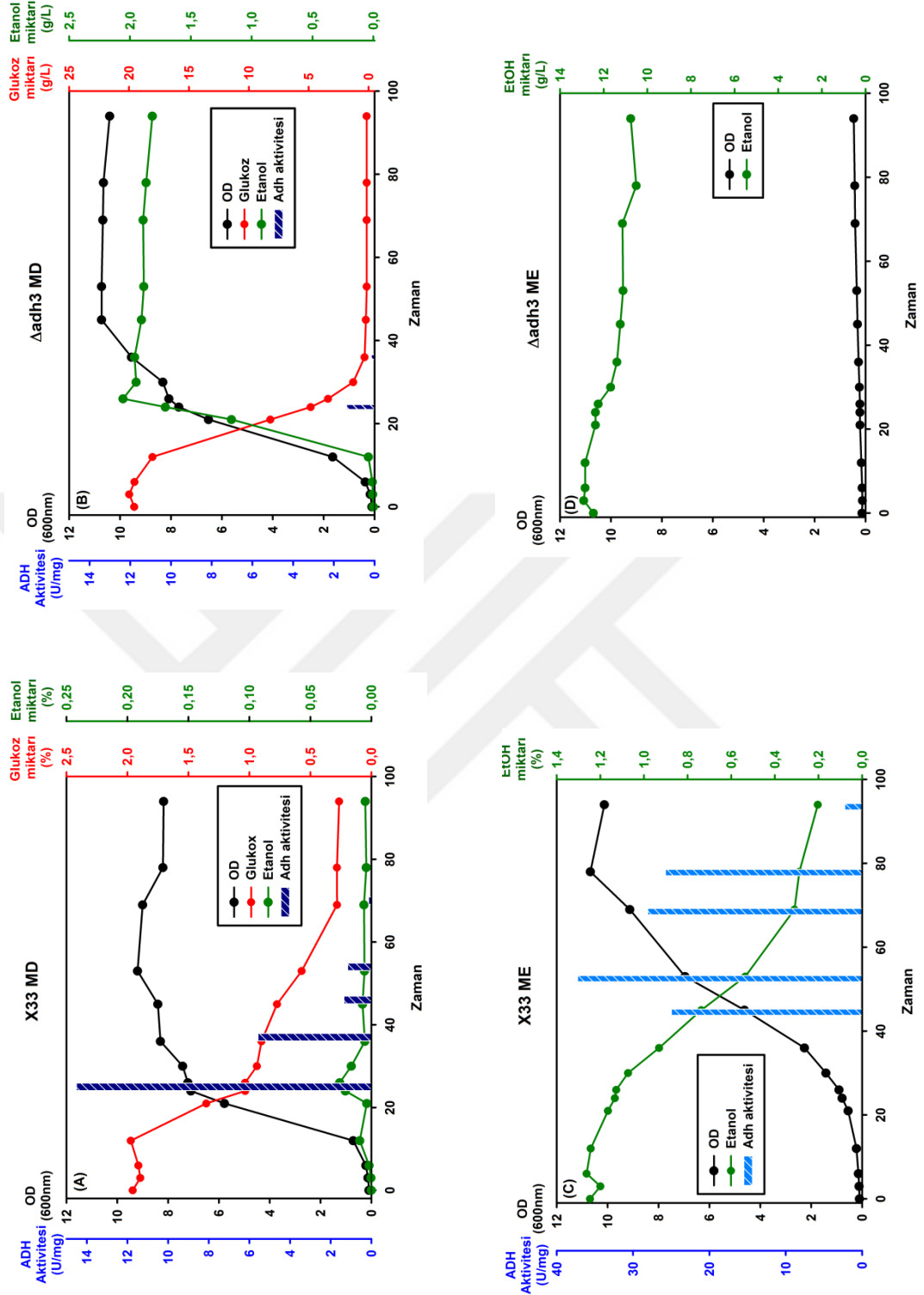
Şekil 4.17. Ni-NTA 6xHis saflaştırması. M: Pageruler protein markır, 1a ve 2a: *P. pastoris* X33 Kontrol suşundan elde edilen elüsyonlar, 1b ve 2b: MK115 ( $\Delta adh3$ ) suşundan elde edilen elüsyonlar

Southern blot ile inaktif olduğu doğrulanan MK115 ( $\Delta adh3$ ) ve kontrol olarak kullanılan *P. pastoris* suşlarının glukoz ve etanol içeren minimal besiyerinde üreme davranışlarına (Gelişim eğrisi, Glukoz tüketimi, Etanol üretimi ve Adh aktivitesi) bakılmıştır. Her iki suş 3 mL YPD içeren test tüplerinde 28°C de 250 rpm de çalkalamalı inkübatörde (Innova 44R, New Brunswick, NJ ABD) 18 saat geliştirilmiştir. Gelişen kültürlerin 100 mL MD ve ME besiyerine yaklaşık 0,1 OD olacak şekilde inokülasyonu yapılmış ve 96 saat boyunca örnekler alınarak OD<sub>(600nm)</sub> değerleri, glukoz, etanol içerikleri ve hücrelerden Adh enzim aktivite analizleri yapılmıştır.

Şekil 4.18A ve 4.18B'de X33 ve MK115 ( $\Delta adh3$ ) suşlarının MD besiyerinde üreme eğrilerinde (OD) farklılık gözlenmemesine rağmen, etanol konsantrasyonlarında büyük farklılık gözlenmiştir. En yüksek etanol konsantrasyonu MK115 ( $\Delta adh3$ ) suşunda %0,2 olmasına rağmen X33 suşuda %0,04 olarak bulunmuştur. Bunun sebebinin ise ethanol üretimi değil, etanol tüketiminden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. X33 suşu MD besiyerinde üretilen etanolü tükettiği için ortamda birikme olmamasına rağmen, MK115 ( $\Delta adh3$ ) suşunun üretilen etanolü katabolize edememesinden dolayı, ortamda ethanol konsantrasyonu artmıştır. Bu sonucu, Adh aktivelerindeki farklılıklar ve MK115 ( $\Delta adh3$ ) suşunun ME besiyerinde ürememesi de desteklemektedir (Şekil 4.18D). MK115 ( $\Delta adh3$ ) suşunun MD besiyerinde maksimum Adh aktivitesi aynı besiyerinde X33 suşunun Adh aktivitesinin yaklaşık %10'u kadardır (14U/mg karşı 1,4U/mg).

X33 suşu MD ve ME besiyerlerinde karşılaştırıldığı zaman Adh aktivitelerinde farklılıklar gözlenmiştir (Şekil 4.18A ve 4.18C). X33 suşu ME besiyerinde yaklaşık 2,7 kat daha fazla Adh aktivitesi göstermiştir. *P. pastoris*'te MD besiyerinde toplam Adh aktivitesinin büyük bir kısmından *ADH3* geninin sorumlu olduğu anlaşılmaktadır (Şekil 4.18A ve 4.18B). MK115 ( $\Delta adh3$ ) suşu etanol (ME) besiyerinde üremediği için adh aktivitesi tespit edilememiştir. MK115 ( $\Delta adh3$ ) suşu gerek tek karbon kaynağı olarak etanolü gerekse MD besiyerinde üretilen etanolü kullanamamaktadır. İnaktif edilen *ADH3* geninin *P. pastoris* etanol metabolizmasında etanolün katabolize (parçalanması) edilmesinde görev alan tek gen olduğunu göstermektedir.



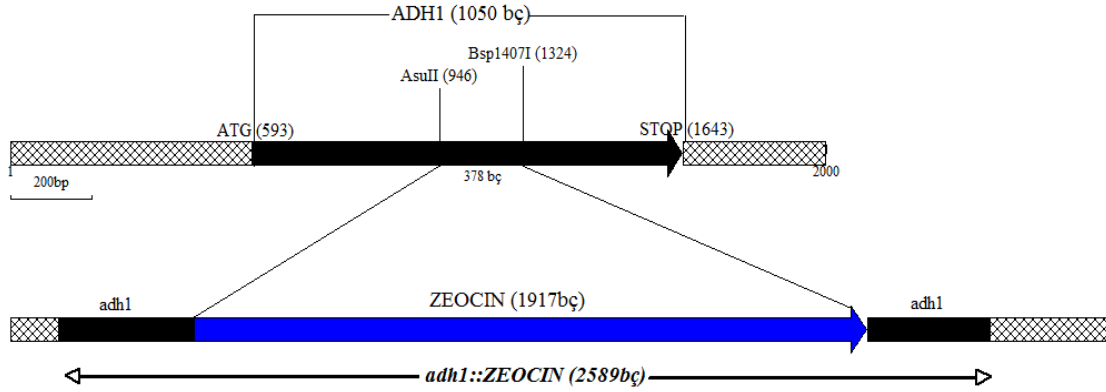


Şekil 4.18. X33 ve MK115 ( $\Delta adh3$ ) suşlarının glukoz ve etanol içeren besiyerinde gelişimi, glukoz ve etanol değişimi, Adh enzim aktivite değişim grafiği (A): X33 glukoz besiyeri, (B): MK115 glukoz besiyeri, (C): X33 etanol besiyeri, (D): MK115 etanol besiyeri

### 4.3. *ADH* Geninin İnaktif Edilmesi

Çalışmalar yürütülmekte iken Vanz vd (2012) tarafından yapılan proteom çalışmasında *P. pastoris*'te etanol metabolizmasında görev aldığı düşünülen iki gen bildirilmiştir. Makalede etanol metabolizmasındaki genler *ADH3* (tanımlı olan gen) ve *ADH* olarak isimlendirilmiştir. Bu çalışma kapsamında *ADH3* geninin karakterize edilmesi ve etanolün tüketiminde görev aldığı tespitini, *ADH* geninin üretimden sorumlu gen olma ihtimalini düşündürmüştür. Bu nedenle çalışma kapsamında analiz edilecek diğer muhtemel 5 genden daha güçlü bir aday olmasından dolayı, *ADH1* geni de çalışmalara eklenmiş ve karakterize edilmiştir. Rapor edilen *ADH* geni bu çalışmada *ADH1* olarak isimlendirilmiştir.

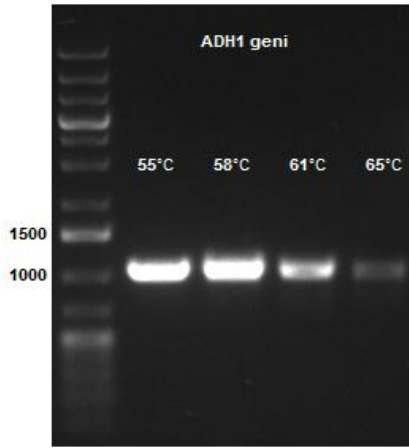
*ADH1* geni ilk olarak inaktif edilerek MD, ME besiyerlerinde gelişimi izlenmiştir. İnaktivasyon işlemi Şekil 4.19'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.19. *P. pastoris* *ADH1* geninin inaktif edilme işleminin şematik gösterimi

*P. pastoris* X33 suşu genomik DNA'sından Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile *ADH1* geninin (1050 bç) izolasyonu yapılmıştır. YPD sıvı besiyerinde geliştirilen *P. pastoris* X33 suşu genomik DNA'sı Yeast Genomic DNA Isolation Kit (Epicentre, Madison, WI, ABD) ile kit protokolüne göre izole edilmiştir. Kalıp DNA 5 ng/μL olacak şekilde seyreltilerek PZR reaksiyonunda kullanılmıştır. PZR reaksiyonu ile *ADH1* genin eldesi için Forward ADH1ATGF 5'-ATGGCTAATCACGCAATTG ve reverse ADH1STPR 5'-CTAGAGGGTGTA AACCAGCTTG primer çifti kullanılmıştır. Primerler, NCBI GenBank CAY67035 accession no'lu *P. pastoris* GS115 gen dizisi baz alınarak dizayn edilmiştir.

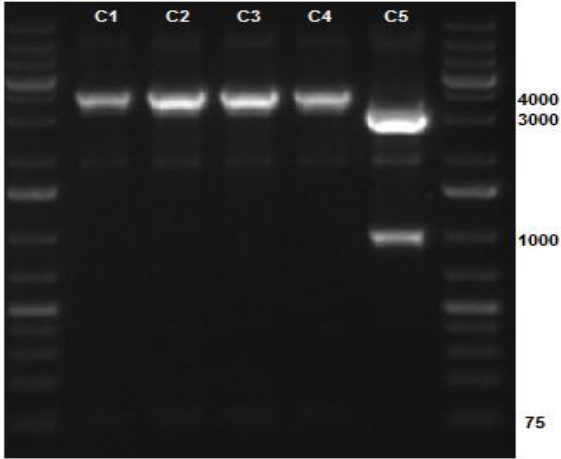
PZR reaksiyonu 50'şer μL olacak şekilde 4 farklı sıcaklık değerinde gradient PZR olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PZR ürünlerinin 5'er μL'si kontrol için %1 agarose jelde yürütülmüş ile 1050 bç uzunluğunda beklenen *ADH1* geninin elde edildiği görülmüştür (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. *P. pastoris* *ADH1* geninin PZR ile eldesinin jelde görüntülenmesi. 2-5.Sütunlar: 55-65°C arası farklı sıcaklıklarda oluşan *ADH1* geni (1050 bç)

Elde edilen *ADH1* geninin PZR sonrası saflaştırılması MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) kullanılarak kit protokolüne uygun bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen *ADH1* geninin pJET1.2 plazmitine (CloneJet Cloning Kit, Fermentas) ligasyonu yapılmış ve oluşturulan yeni plazmit pJET-ADH1 (4024 bç) olarak adlandırılmıştır. pJET-ADH1 plazmiti daha sonra kompetent *E. coli* XL1-Blue hücrelerine transfer edilmiş, 100 µg/mL ampisilin içeren LB Miller agar plakalarına ekilerek transformant kolonilerin seçilimi gerçekleştirilmiştir. 37°C’de geceboyu inkübasyon sonucunda plakalarda gelişen kolonilerden 5 tanesi seçilerek 100 µg/mL amfisilin içeren 3 mL LB Miller sıvı besiyerinde ekilerek 37°C’de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra kolonilerden Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) ile izole edilen plazmitlerin restriksiyon analizi ile kontrolleri yapılmıştır.

Elde edilen plazmitlerden doğru olanının tespiti için restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. *ADH1* genini ve plazmiti içinden ve tek noktadan kesen *XhoI* enzimi ile kesilmiş ve oluşan DNA parçaları %1 agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir (Şekil 4.21).



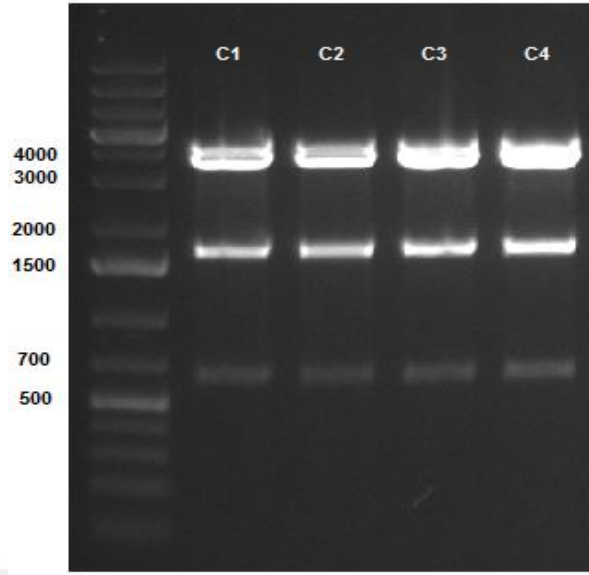
Şekil 4.21. Plazmit izolasyonu sonrası elde edilen 5 plazmitin *XhoI* ile restriksiyon analizi. C1-C5: seçilen farklı kolonilerden elde edilen plazmitlerin restriksiyon sonrası jelde yürütülen DNA parçaları

Restriksiyon enzimleri ile kesilen plazmitler jelde yürütülmüştür. Küt uçlu ligasyon reaksiyonu olması nedeniyle genin düz ya da ters girme ihtimallerinde beklenen DNA parçalarının büyüklükleri farklı olacaktır. Düz girmesi durumunda 992 bç ve 3032 bç, ters girmesi durumunda 92 bç ve 3932 bç uzunluğundaki DNA bantları beklenmektedir. C1, C2, C3, C4 olarak isimlendirilen plazmitlere genin ters, C5'e ise genin düz girdiği görülmüştür. *ADHI* genin gen yer değiştirme tekniği (Dux ve İnan 2006) ile inaktif edilmesi aşamasına C5 plazmiti ile devam edilmiştir.

Seçilen pJET-ADH1 plazmiti (C5), *ADHI* geninin (1050 bç) orta bölgesinde yer alan *AsuII* (353. bç) ve *BspI407I* (731. bç) restriksiyon enzimler ile çiftli kesilmiştir. *ADHI* geninin inaktif edilmesi için kullanılan olan zeosin dayanıklılık geni (1917 bç) pPICZ $\alpha$ A plazmitinden *BglIII* ve *BamHI* restriksiyon enzimi ile elde edilmiştir.

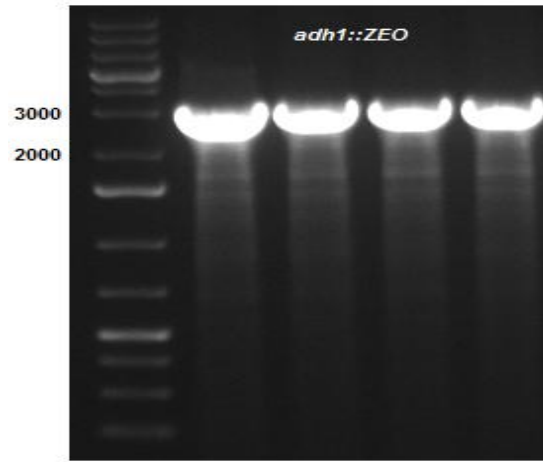
Jelden özütlenen lineer hale geldiği doğrulanan pJET-ADH1 (3647 bç) plazmitinin ve zeosin dayanıklılık geninin, DNA blunting enzimi (Fermentas) ile uçları kütleştirilmiş ve Rapid DNA Dephos&Ligation Kit (Roche) kullanılarak fragmentlerin ligasyonları gerçekleştirilmiştir. Ligasyon reaksiyonları kompetent *E. coli* XL1-Blue hücrelerine aktarılmış ve ardından hücreler, LB-Amp (Miller) agar plakalarına ekilmiştir. Transformasyon sonrası plakalarda oluşan kolonilerden zeosin genini içeren plazmiti bulmak için 4 adet koloni seçilmiş ve plazmit izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen plazmitler zeosin, *ADHI* ve plazmitin içinde olmak üzere üç noktadan kesen *NcoI* restriksiyon enzimi ile kesilmiş ve %1 Agaroz jelde yürütülmüştür (Şekil 4.22). Plazmitlerin *NcoI* restriksiyon enzimi ile kesiminde 584 bç, 1793 bç ve 3192 bç uzunluğundaki DNA parçaları beklenmektedir.





Şekil 4.22. Seçilen 4 koloniden elde edilen plazmitlerin *NcoI* ile restriksiyon analizi. C1-C4: seçilen kolonilerden edilen plazmitlerin *NcoI* enzimi ile kesilmesi

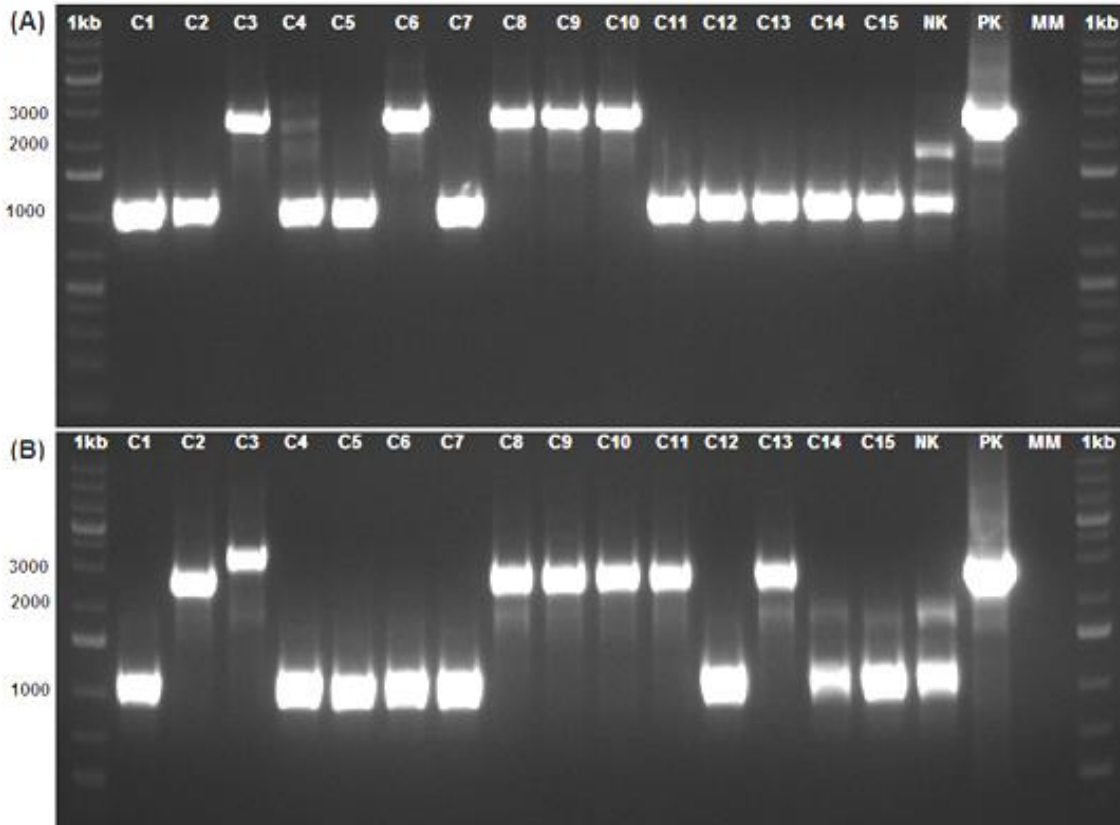
Seçilen 4 plazmitin de zeosin dayanıklılık genini içerdiği doğrulanmıştır. Elde edilen yeni plazmit pJET-*adh1::ZEO* olarak isimlendirilmiştir. *Δadh1::ZEO* inaktif DNA parçası, *ADH1* geninin elde edilmesinde kullanılan forward ADH1ATGF 5'-ATGGCTAATCACGCAATTG ve reverse ADH1STPR 5'-CTAGAGGGTGTAACCAAGCTTG primer çifti ile tekrar PZR yapılmıştır. PZR sonrası elde edilen *Δadh1::ZEO* DNA parçaları %1 Agaroz jelde yürütülmüştür. Jel görüntüsü Şekil 4.23'de verilmiştir.



Şekil 4.23. *Δadh1::ZEO* fragmentinin PZR ile eldesini gösteren jel görüntüsü

Elde edilen *Δadh1::ZEO* fragmenti, *P. pastoris* X33 ve MK115 (*Δadh3*) hücrelerine aktarılmıştır. Böylece, sırası ile *Δadh1* tekli inaktif ve *Δadh3Δadh1* ikili inaktif suş elde edilmiştir. Bunun için, PZR yolu ile pJET-*adh1::ZEO* nakavt plazmitinden elde edilen *Δadh1::ZEO* nakavt fragmentinin MinElute PCR Purification

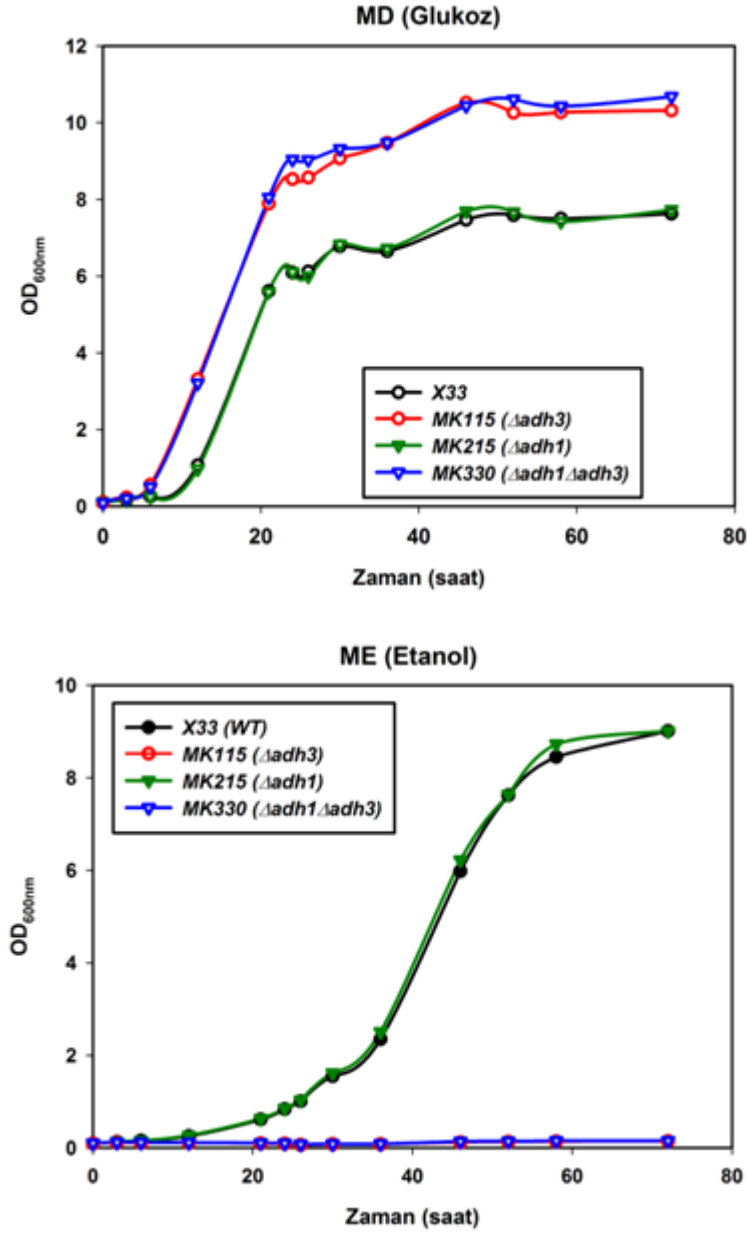
Kit (Qiagen) ile saflaştırıldıktan sonra, yaklaşık 3 µg kadarı Lityum asetat metodu ile kompetent hale getirilen *P. pastoris* X33 ve MK115 ( $\Delta adh3$ ) suşlarına elektroporasyon yöntemi ile transform edilmiştir. Transformasyon işlemi 1.5 kVolt/5ms şartlarında Electroporator (Eppendorf) ile gerçekleştirilmiştir. Transformantlar 100µg/mL zeosin içeren YPD plakalara ekilmiş, 30°C'de 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. 3 gün sonrasında zeocin içeren YPD plakalarda gelişen her bir suş için (X33 ve MK115 ( $\Delta adh3$ )) 15 adet farklı koloni YPD sıvı besiyerine ekim yapılarak, 30°C çalkalamalı inkübatörde bir gece inkübe edilmiş ve ertesi gün Masterpure Yeast DNA Kit (Epicentre) ile genomik DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Konsantrasyonları 5 ng/µL olarak ayarlanan genomik DNA'lar *ADH1* geninin zeosin dayanıklılık geni ile inaktif olup olmadığının kontrolü için yapılan PZR'de kalıp olarak kullanılmıştır. ADH1ATGF ve ADH1STPR primerleri ile yapılan PZR sonucunun %1'lik agaroz jelde yürütülmesi ile, beklenen 2589 bp fragmentin X33 transformantlarında C3, C6, C8, C9 ve C10, MK115 ( $\Delta adh3$ ) transformantlarında ise C2, C8, C9, C10, C11 ve C13 olarak isimlendirilen genomik DNA'dan elde edildiği görülmüştür (Şekil 4.24).



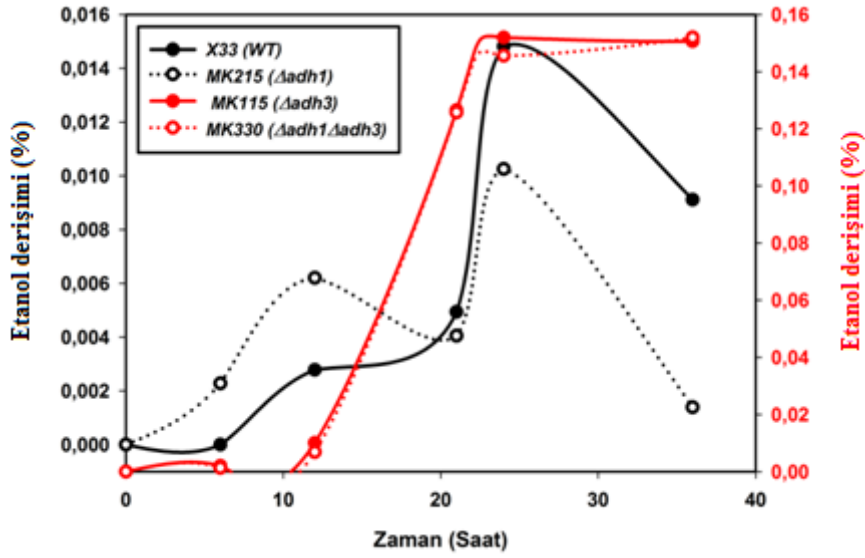
Şekil 4.24. Transformant X33 ve MK115 genomik DNA'larından nakavt fragment olan *Δadh1::ZEO* varlığının PZR ile kontrol edilmesi. (A): X33, (B): MK115 ( $\Delta adh3$ ). 1kb:GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas), C1-C15: MD plakalardan seçilen transformant koloniler, NK Negatif kontrol (X33 ve MK115 genomik DNAsı). PK:Pozitif kontrol (pJET-*adh1::ZEO*), MM: PZR master mix kontrolü

Suşların MD ve ME besiyerinde gelişimini izlemek için seçilen klonlardan X33 için C3, MK115 için C2 olarak isimlendirilenler seçilmiş ve bir sonraki adıma geçilmiştir. Elde edilen  $\Delta adh1$  suşu **MK215**,  $\Delta adh3$  ve  $\Delta adh1$  ikili inaktif suşu da **MK330** olarak isimlendirilmiştir. Suşlarının glukoz ve etanol içeren besiyerinde gelişimleri izlenmiştir. Karşılaştırma yapılabilmesi için daha önceki çalışmada kontrol olarak kullanılmış olan *P. pastoris* X33 ile daha önceki çalışmalarda elde edilen MK115 ( $\Delta adh3$ ) suşlarının da glukoz ve etanol içeren besiyerinde aynı anda üreme yeteneklerine bakılmıştır. Suşlar tek koloniden 3 mL YPD içeren test tüplerinde 28°C'de 250 rpm'de çalkalamalı inkübatörde (Innova 44R, New Brunswick, NJ ABD) 18 saat geliştirilmiştir. Gelişen kültürler 75 mL MD ve ME besiyerine yaklaşık 0,1 OD olacak şekilde inokülasyonu yapılmış ve 72 saat boyunca örnekler alınarak OD<sub>600nm</sub> değerleri ölçülmüş, etanol miktarlarının tespiti için süpernatantlardan örnekler alınmıştır.

*P. pastoris* X33 ile MK215 ( $\Delta adh1$ ) ve MK115 ( $\Delta adh3$ ) ile MK330 ( $\Delta adh1\Delta adh3$ ) suşları karşılaştırıldığında MD besiyerinde hücrelerin gelişimlerinde herhangi bir fark görülmemiştir (Şekil 4.25-MD). Etanol içeren besiyerinde ise X33 ve MK215 suşunun geliştiği, fakat MK115 ( $\Delta adh3$ ) ve MK330 ( $\Delta adh1\Delta adh3$ ) suşunun aynı besiyerinde gelişmediği tespit edilmiştir (Şekil 4.25-ME). Yine de glukoz içeren besiyerinde gelişim eğrisinin aynı noktalarından alınan süpernatant örneklerinde etanol miktarı ölçümleri yapılmış ve X33 ile (yabani suş) yaklaşık olarak aynı miktarda etanol üretildiği tespit edilmiştir. Bu nedenle *ADH1* geninin hücrede etanol üretiminden sorumlu gen olmadığı sonucuna varılmıştır. Etanol değişimlerini gösteren grafik Şekil 4.26'da verilmiştir.



Şekil 4.25. İnaktif suşların glukoz (MD) ve etanol (ME) içeren besiyerlerinde gelişim eğrileri



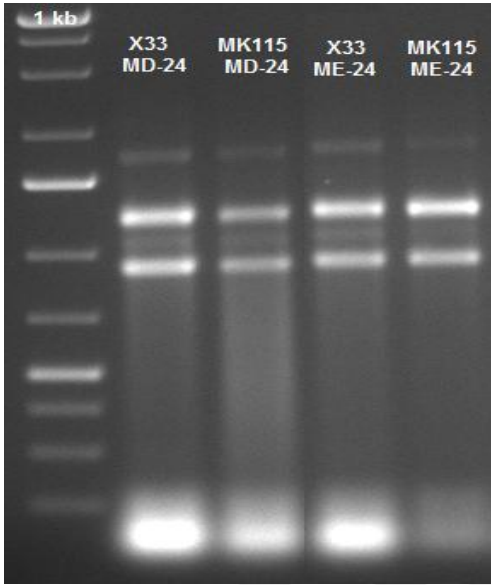
Şekil 4.26. X33, MK115, MK215 ve MK330 suşlarının glukoz içeren besiyerinde gelişimi sırasında ortamdaki etanol miktarlarının zaman ile değişimi

Sonuç olarak, *ADH3* geninin inaktif edilmesi ile hücrelerin etanol içeren minimal besiyerinde üreyemediği tespit edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda *P. pastoris ADH3* geninin hücrede etanolün katabolize edilmesinde rol aldığı ortaya konulmasına rağmen, glukoz içeren minimal besiyerinde etanol üretimi devam etmiştir. Çalışmalar devam ederken literatür doğrultusunda Vanz vd (2012) tarafından *P. pastoris*'te ikinci bir *ADH* geninin varlığı belirtilmiştir. *ADH3* geninin tüketimde rol oynaması belirtilen bu geninin üretimden sorumlu olma ihtimalini ortaya çıkarmıştır. İlgili genin zeosin dayanıklılık geni kullanılarak tekli ve ikili inaktif suşları elde edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda literatürde belirtilen bu genin etanol metabolizmasında rol almadığı ortaya konulmuştur. *P. pastoris*'te etanol üretiminden sorumlu genin bulunamaması ve karakterize edilememesi sonucu çalışmalara NCBI homoloji taramalarına göre belirlenen ve *Adh* aktivitesi göstermesi muhtemel beş *ADH* geninin glukoz ve etanol besiyerinde gen ekspresyonu çalışmaları ile devam edilmiştir.

#### 4.4. qRT-PCR Metodu ile Gen Ekspresyon Analizleri

Bilinen *ADH3* geni ve *Adh* aktivitesi göstermesi muhtemel 5 genin ekspresyon oranları qRT-PCR (Quantative Real-Time PCR) tekniği ile belirlenmiştir. Çalışmalara literatür doğrultusunda *ADH1* geni de dahil edilmiştir. *ADH3* aktif (X33) ve inaktif suşu (MK115) MD minimal besiyerinde 0,1 OD değerinden başlatılmış ve log faza denk gelen 24. saat hücre örnekleri alınarak RNA izolasyonu için -80°C'de etanol banyosuna konulmuştur. ME besiyerinde MK115 (*Δadh3*) inaktif suşun ürememesi nedeni ile hücreler etanol besiyerindeki analizler için X33 ve MK115 (*Δadh3*) suşları 0,1 OD MG minimal (gliserol) besiyerinde 4-5 OD değerine kadar geliştirilmiş (logaritmik faz içinde olacak şekilde) ve hücreler yıkanarak ME besiyerine aktarılmıştır. ME besiyerine transfer edilen hücrelerden 24. saat örnekleri alınarak -80°C'de etanol banyosuna konulmuştur. Metot bölümünde anlatılan RNA izolasyon tekniği ile toplam RNA'ları izole edilen örneklerin RNA konsantrasyonları Qubit® RNA BR Assay kit (OR, ABD)

ile ölçülmüştür. RNA konsantrasyonları 1,5µg olacak şekilde ayarlanmış ve %1'lik agaroz jelde 1xTAE tamponunda yürütülmüştür (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. X33 ve MK115 (*Adh3*) hücrelerinden elde edilen RNA'ların jel görüntüsü

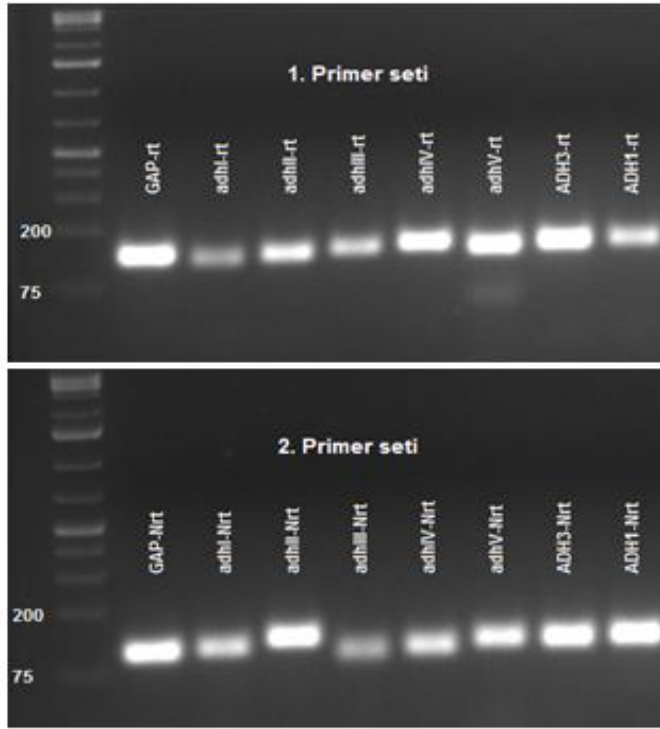
Elde edilen toplam RNA'dan ProtoScript® Taq RT-PCR Kit (NEB) kullanılarak kit protokolü doğrultusunda cDNA sentezi yapılmıştır. Elde edilen cDNA üç aşamalı qRT-PZR analizleri için kalıp olarak kullanılmıştır. qRT-PZR analizleri Rotor Gene Q (Qiagen) cihazı ile Quantitect SYBR Green PCR kiti kullanılarak yapılmıştır.

qRT-PZR uygulamasında her bir gen için 2 primer seti hazırlanmış ve ön denemeleri yapılarak her bir gen için en iyi çalıştığı görülen primer çifti ile devam edilmiştir. Kullanılan primer listesi Çizelge 4.2'de verilmiştir. Primer denemeleri için, elde edilen cDNA'lar kalıp olarak kullanılmıştır. Geleneksel PZR ile elde edilen ve %2'lik agaroz jelde yürütülen örnekler Şekil 4.28'de verilmiştir. Kullanımına karar verilen primer seti Çizelge 4.2'de koyu ve altı çizili olarak gösterilmiştir. Her bir reaksiyon iki paralelli yapılmış ve hesaplamada ortalama değerler kullanılmıştır.

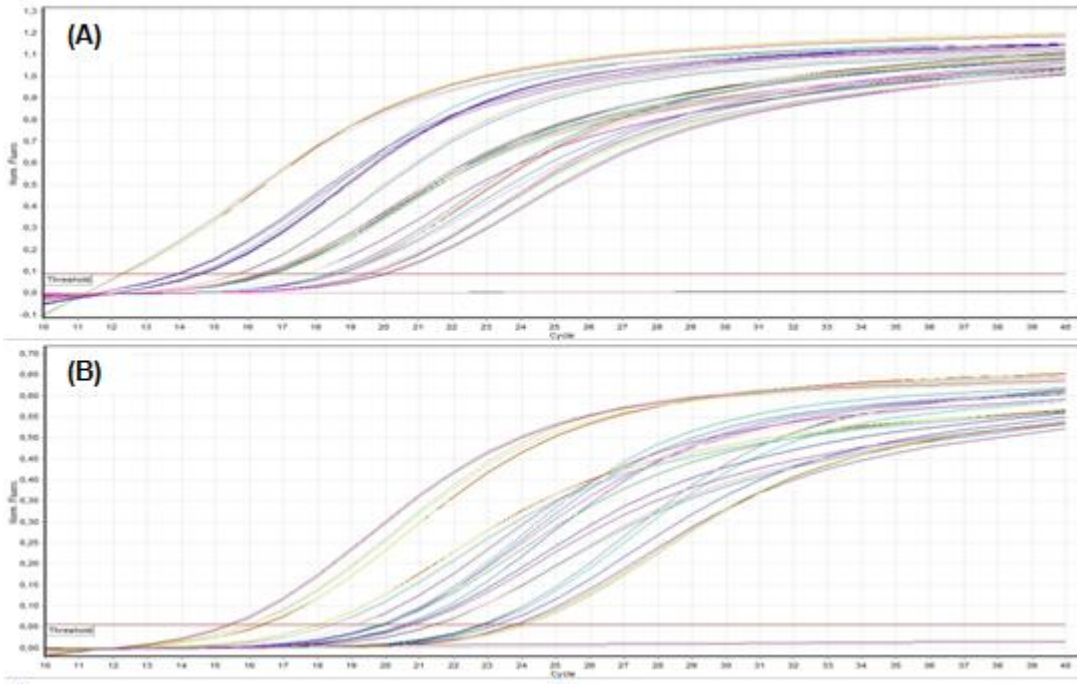
qRT-PCR analizi, Rotor GeneQ cihazında 40 döngü olarak gerçekleştirilmiştir. MD besiyerinde gelişen hücrelerin ve ön geliştirme yapılarak ME besiyerine aktarılan hücrelerin 24. saat örnekleri ile qRT-PCR analizi yapılmıştır. Analiz sonrası elde edilen Floresans-Döngü grafikleri Şekil 4.29'da verilmiştir.

Çizelge 4.2. qRT-PCR analizi ön denemelerinde kullanılan primer setleri

	Forward Primerler	Reverse Primerler
<b><u>adhI-rt</u></b>	TGGGAGCAATGTGTTGGGCT	CCATCGGGATAAGCGTCATCA
<b><u>adhII-rt</u></b>	TCAACCCAACCAAGGTCAGCAG	AGTGCCGTGAACACCAACATTG
<b><u>adhIII-rt</u></b>	ACCCACTTGTTCAGGACACGA	TTTGCGGTCATCAGCGTCATAA
<b><u>adhIV-rt</u></b>	TGCCACACTGATGCTTACACGC	ACAACGGAAACGAGAAGTCCCG
<b><u>adhV-rt</u></b>	TGGTAAACTCATTTCGTCGGC	TCAGCCCTTCCTCAGAGATTGG
<b><u>ADH3-rt</u></b>	AGACCGCTGACTTGCGTATTGG	CTTGTCGGCACCACCATCAA
<b><u>ADH1-rt</u></b>	GACCTCTTGGCTAGTGGCA	CCGCTAACTTTACCCTCTCG
<b><u>GAP-rt</u></b>	CGGTGTCAACGAGGAGAAATAC	GAATGATGTTACCAGAAGCCGT
<b><u>adhI-Nrt</u></b>	TCTCATTTGGGTAACCGTGA	GCAACTTCTCCAGTCCGTTT
<b><u>adhII-Nrt</u></b>	TTCCTGACACGTTTGCAACT	CGGTGGTGATAGCAATGTTT
<b><u>adhIII-Nrt</u></b>	CCCGTACCTGAGCCTACTTC	TATCCCTCCAATTCCTGAGC
<b><u>adhIV-Nrt</u></b>	TGTTGGGTTGTGGTGTACC	TAATCTCGCTTGCACCTTTG
<b><u>adhV-Nrt</u></b>	GCTCTTGGTTGCGAAGTGTA	AAGTCCAGCTTTCTGCCAAT
<b><u>ADH3-Nrt</u></b>	AGGCTGACTTGGCTGAAGTT	CGTATTGAACGGCAAGAGAA
<b><u>ADH1-Nrt</u></b>	TTTCGACTGCATTCAGAGG	GCCAATGTCATATTGTTGGTG
<b><u>GAP-Nrt</u></b>	GGAATTGAGTCCGGTTTGAT	CACCAGTGGAAGATGGAATG



Şekil 4.28. cDNA'lardan 2 primer seti ile yapılan PZR sonrası elde edilen ürünlerin jel görüntüsü



Şekil 4.29. X33 ve MK115 hücrelerinden elde edilen cDNA örneklerinin qRT-PCR analizi sonrası elde edilen Floresans-Döngü grafikleri. (A): MD besiyeri, (B): ME besiyeri

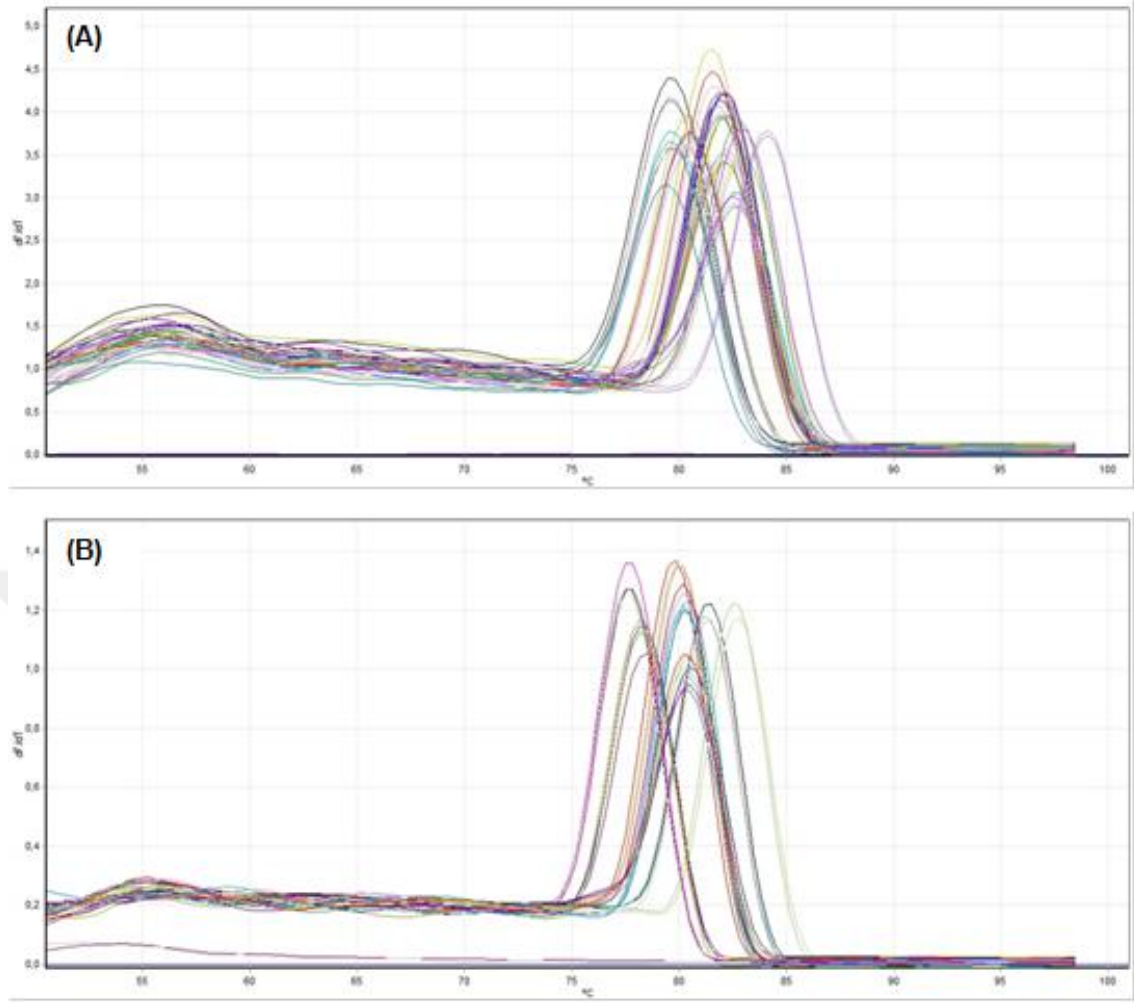
X33 suşu ile glukoz (MD) ve etanol (ME) üretim yapılmıştır. Bu iki farklı besiyerinde; toplam 7 genin ekspresyonu, *GAP* geni referans alınarak oransal değişimleri Pfaffl metoduna göre hesaplanmıştır (Pfaffl 2004, Quintero vd 2009).

Çalışma kapsamında test edilen toplam sekiz genin amplifikasyon verim (*E*: Efficiency) değerleri farklı olması nedeni ile qRT-PCR verilerinin hesaplaması Pfaffl metoduna göre yapılmıştır. Her bir cDNA için *GAP* geninin ekspresyon seviyesi “referans gen” olarak kabul edilmiştir. **E**: efficiency (amplifikasyon verimi), **Hedef**: X33 glukoz, *adhI*, *adhII*, *adhIII*, *adhIV*, *adhV*, *ADH3* ve *ADH1* genleri; **Referans**: X33 etanol besiyeri. Glukoz içeren besiyerinde etanol üretiminden sorumlu gen/genlere bakılması nedeniyle qRT-PCR hesaplamalarında X33 glukoz hedef, X33 etanol referans olarak alınmış ve aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır.

$$\text{Değişim Oranı} = \frac{(E_{\text{Hedef}})^{\Delta C_p \text{Hedef} (\text{Referans gen} - \text{Hedef gen})}}{(E_{\text{Referans}})^{\Delta C_p \text{Referans} (\text{Referans gen} - \text{Hedef gen})}}$$

qRT-PCR amplifikasyon sonrası deneylerin kalitesini denetlemek amacıyla, “Melting Curve” analizi uygulanarak spesifik olmayan başka bir PZR ürününün olmadığı teyit edilmiştir (Şekil 4.30).



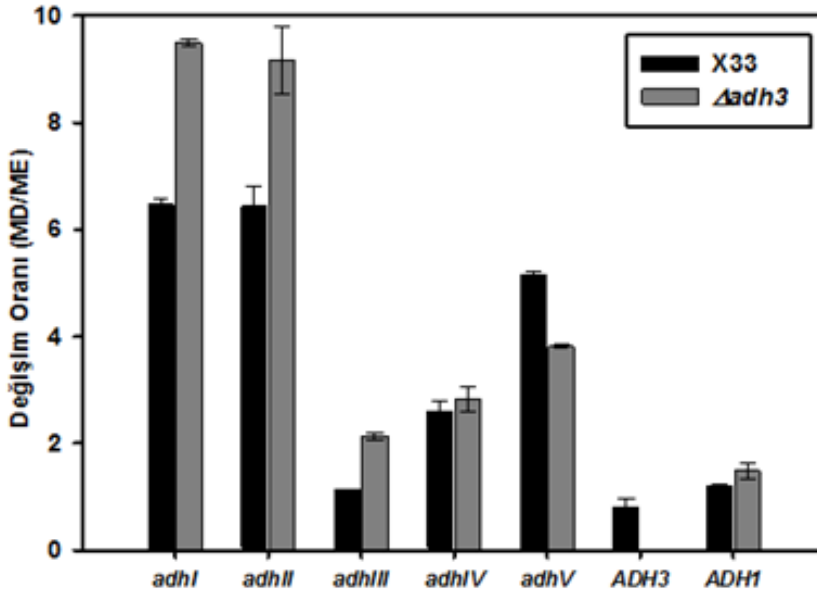


Şekil 4.30. X33 ve MK115 hücrelerinden elde edilen cDNA örneklerinin qRT-PCR amplifikasyonu sonrası Melting curve analizinden edilen  $dF/dT$ -Sıcaklık grafiği (A): MD besiyeri, (B): ME besiyeri

qRT-PCR sonrası elde edilen  $C_p$  ve amplifikasyon verimi Çizelge 4.3'de verilmiştir. Hesaplama sonuçları; Adh aktivesi göstermesi muhtemel genlerin, *ADH3* ve *ADH1* genlerinin, glukoz besiyerindeki ekspresyonlarının etanol besiyerindeki ekspresyonlarına oranlanması ile verilmiştir (Şekil 4.31).

Çizelge 4.3. qRT-PCR sonucunda elde edilen Cp ve Amplifikasyon verimleri

	MD besiyeri (24. saat)				ME besiyeri (24. saat)			
	X33		MK115 ( $\Delta adh3$ )		X33		MK115 ( $\Delta adh3$ )	
	C <sub>p</sub>	Amp. verimi	C <sub>p</sub>	Amp. verimi	C <sub>p</sub>	Amp. verimi	C <sub>p</sub>	Amp. verimi
GAP	15,0	1,76	15,0	1,77	15,5	1,73	15,0	1,67
<i>adhI</i>	18,2	1,80	18,6	1,8	22,0	1,78	22,5	1,79
<i>adhII</i>	15,8	1,79	15,0	1,75	19,7	1,74	19,0	1,74
<i>adhIII</i>	19,5	1,74	18,1	1,75	19,8	1,84	19,2	1,81
<i>adhIV</i>	16,3	1,82	16,1	1,81	18,6	1,75	17,9	1,79
<i>adhV</i>	18,9	1,81	19,4	1,83	22,1	1,82	22,0	1,77
ADH3	15,0	1,75	-	-	15,1	1,70	-	-
ADH1	16,1	1,77	15,9	1,74	16,9	1,77	16,6	1,75



Şekil 4.31. qRT-PCR sonuçlarının sütun grafiğinde gösterimi (*adhI-adhV*: Adh aktivitesi göstermesi muhtemel genler, ADH3: Tanımlı olan gen, ADH1: Rapor döneminde dahil edilen gen)

X33 ve MK115 ( $\Delta adh3$ ) suşlarında MD ve ME besiyerlerinde ilgili genlerin ekspresyon seviyelerinde önemli farklılıklar tespit edilmiştir. Özellikle X33 suşunda glukoz içeren besiyerinde gelişen hücrelerde etanol besiyerine göre *adhI* ve *adhII* ~6.5 kat, *adhV* ~5 kat daha fazla ekspres olmuştur. Aynı şekilde MK115 ( $\Delta adh3$ ) suşunda glukoz içeren besiyerinde gelişen hücrelerde etanol besiyerine göre *adhI* ve *adhII* ~9.5 kat, *adhV* ~4 kat daha fazla ekspres olmuştur. Diğer genlerin (*adhIII*, *adhIV* ve *adhV*) ve bu çalışma döneminde dahil edilen ADH1 geninin ekspresyon seviyelerinde önemli bir değişiklik olmamıştır. Etanol tüketiminden sorumlu olarak tanımladığımız ADH3 geni, X33 suşunda etanol besiyerine göre glukoz besiyerinde daha az ekspres olmuştur.

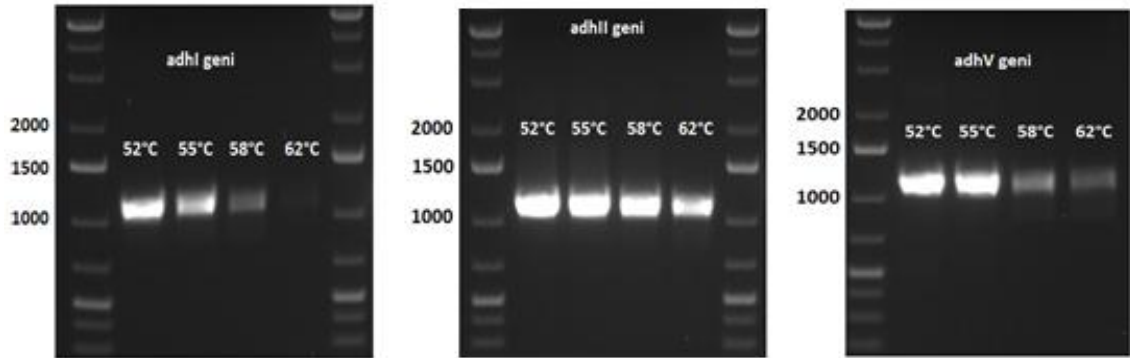
MK115 ( $\Delta adh3$ ) suşunda *ADH3* geni ekspresyonu gözlenmemiş ve bu genin inaktif olduğu mRNA seviyesi ile de teyit edilmiştir.

Elde edilen qRT-PCR sonuçları, glukoz içeren besiyerinde etanol üretiminden sorumlu gen/genlerin, ekspresyon seviyelerindeki artış çalışma kapsamındaki muhtemel genlerden *adhI*, *adhII* ve *adhV* olma olasılığını açığa çıkarmıştır. Bu nedenle çalışmalara, muhtemel genlerden *adhI*, *adhII* ve *adhV* genlerinin zeosin dayanıklılık geni kullanılarak ayrı ayrı ve tek tek inaktivasyonları yapılarak devam edilmiştir.

#### 4.5. Adh Aktivitesi Göstermesi Muhtemel Genlerin İnaktif Edilmesi

qRT-PCR sonucunda elde veriler doğrultusunda Adh aktivitesi göstermesi muhtemel gen sayısı üçe indirilmiştir. Genlerden hangisi ya da hangilerinin etanol üretiminden sorumlu olduğunun tespiti için genler zeosin dayanıklılık geni kullanılarak inaktif edilmiş ve MD besiyerinde etanol üretim seviyelerine bakılmıştır.

*P. pastoris* GS115 suşu genomik DNA'sından Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile *adhI* geni (1074 bç), *adhII* (1083 bç) ve *adhV* geni (1077 bç) izole edilmiştir. PZR reaksiyonları 50'şer  $\mu$ L olacak şekilde 4 farklı sıcaklık değerinde gradient PZR olarak gerçekleştirilmiştir. Genlerin çoğaltılmasında kullanılan primerler, sırasıyla NCBI GenBank XM\_002489969, XM\_002491163 ve XM\_002493969 accession no'lu *P. pastoris* GS115 gen dizileri temel alınarak dizayn edilmiştir. Elde edilen PZR ürünlerinin 5'er  $\mu$ L'si kontrol için %1 agaroz jelde yürütülmüş ve istenen bç uzunluğunda beklenen *adhI*, *adhII* ve *adhV* geninin elde edildiği görülmüştür (Şekil 4.32).



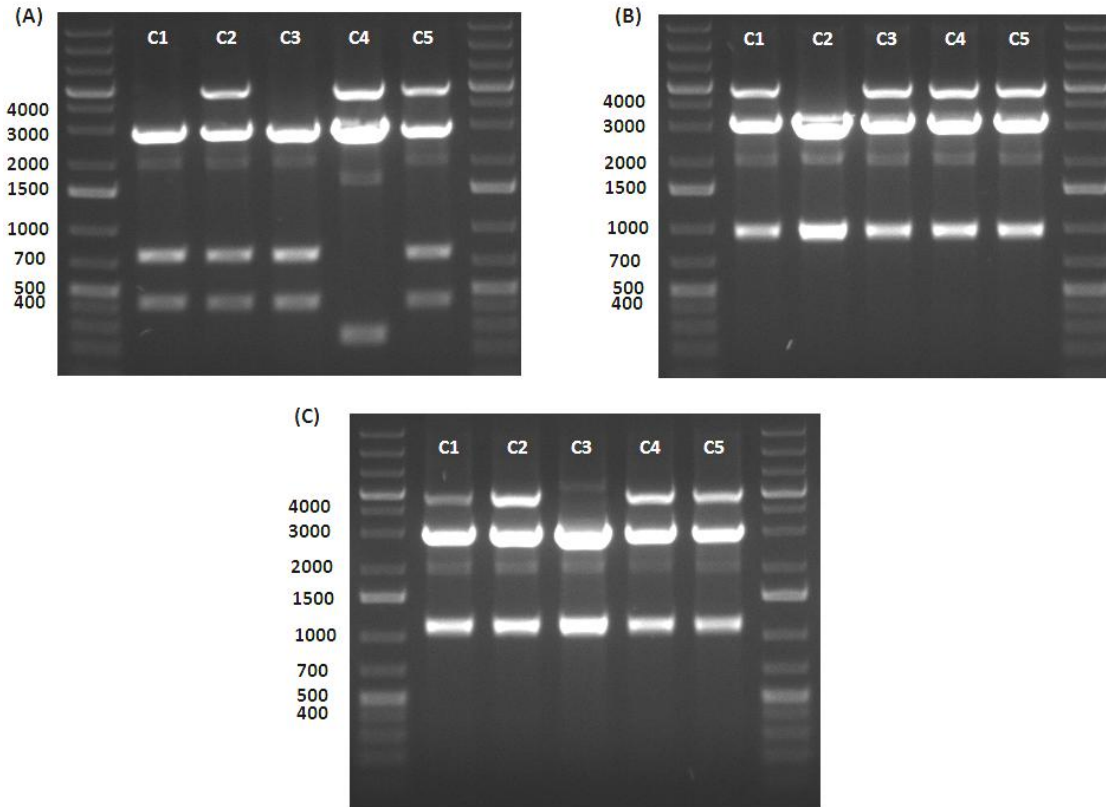
Şekil 4.32. *P. pastoris* *adhI*, *adhII* ve *adhV* geninin PZR ile eldesinin jelde görüntülenmesi. 2-5.Sütunlar: 52-62°C arası farklı sıcaklıklarda oluşan (A) *adhI* geni (1074 bç), (B) *adhII* (1083 bç) ve (C) *adhV* (1077 bç)

Elde edilen *adhI*, *adhII* ve *adhV* genlerinin PZR sonrası saflaştırılmasında MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) kullanılmıştır. Daha sonra genler pJET1.2 plazmitine (CloneJet Cloning Kit, Fermentas) ligasyonu yapılmış ve kompetent *E. coli* XL1-Blue hücrelerine transfer edilmiştir. Transformantların 100  $\mu$ g/mL amfisilin içeren LB Miller agar plakalarına ekilerek seçilimi gerçekleştirilmiştir. 37°C'de geceboyu gelişen kolonilerden 5'er tanesi seçilerek 100  $\mu$ g/mL amfisilin içeren 3 mL LB Miller

sıvı besiyerinde ekilerek 37°C'de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen kolonilerden Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) ile izole edilen plazmitlerin restriksiyon analizi ile kontrolleri yapılmıştır. Genlerin içinden ve plazmiti tek noktadan kesen restriksiyon enzimleri ile kesilmiş ve oluşan DNA parçaları %1 agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir (Şekil 4.32).

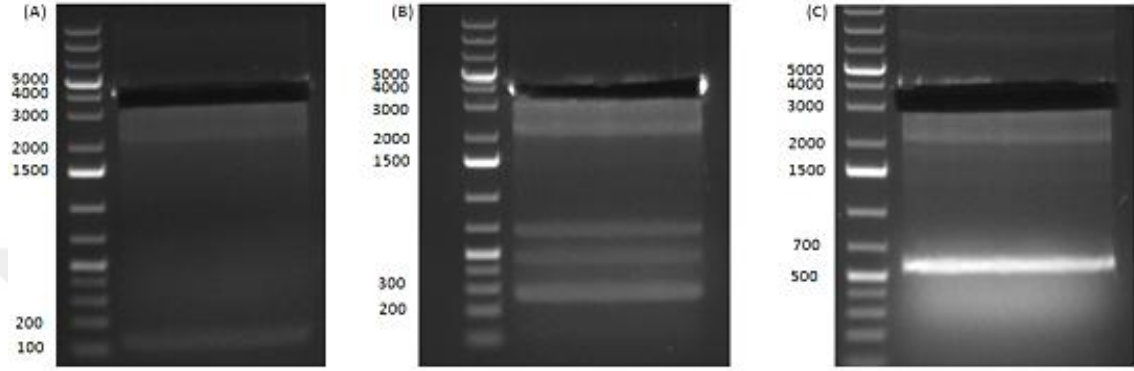
Restriksiyon analizi sonucu, *adhI*, *adhII* ve *adhV* plazmitlerinden hepsinde beklenen DNA uzunlukları görülmüş ve bir sonraki aşamaya C1 plazmitleri ile devam edilmiştir.

Seçilen pJET-*adhI* plazmiti (C1), *adhI* geninin (1074 bç) orta bölgesinde yer alan *SalI* (241. bç) ve *NdeI* (357. bç) restriksiyon enzimleri ile, pJET-*adhII* plazmidini (C1), *adhII* geninin (1083 bç) orta bölgesinde yer alan *NsiI* (261. bç) ve *EheI* (531. bç) restriksiyon enzimleri ile, pJET-*adhV* plazmiti ise, *adhV* geninin orta bölgesinde yer alan *ApaI* (235. bç) ve *EcoNI* (829. bç) restriksiyon enzimleri ile her biri çiftli kesilmiştir. Genlerinin inaktif edilmesi için kullanılacak olan zeosin dayanıklılık geni (1917 bç) pPPICZA plazmitinden *BglIII* ve *BamHI* restriksiyon enzimi ile elde edilmiştir.



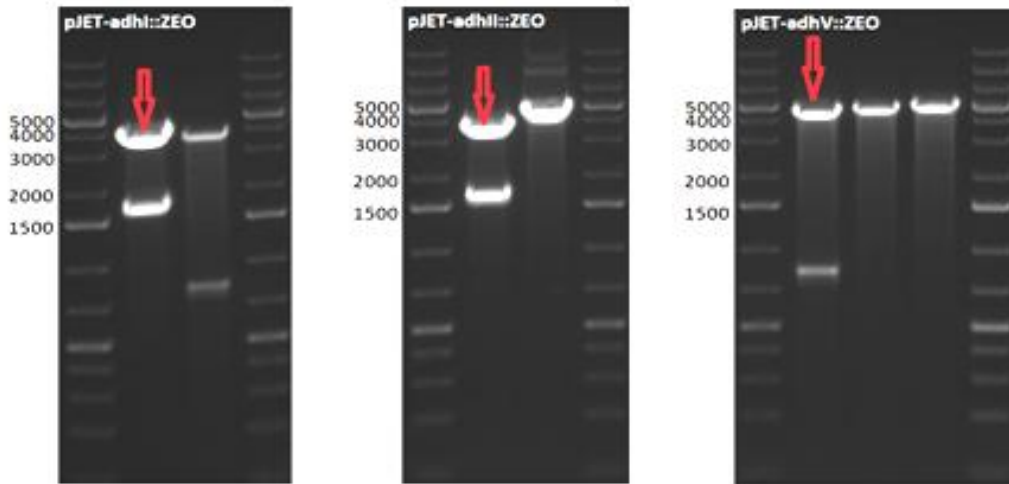
Şekil 4.33. Plazmit izolasyonu sonrası elde edilen plazmitlerin pJET-*adhI*'in *HindIII*, pJET-*adhII*'nin *HindIII* ve *BstXI*, pJET-*adhV*'in *HindIII* ile restriksiyon analizi. C1-C5: seçilen farklı kolonilerden elde edilen plazmitlerin restriksiyon sonrası jelde yürütülen DNA parçaları. (A) pJET-*adhI* (B) pJET-*adhII* (C) pJET-*adhV*

Genlerin iç bölgelerinden belirtilen enzimler ile eksilen plazmitler %1 agaroz jelde yürütülmüş ve jelden ekstraksiyonu yapılmıştır (Şekil 4.34). Jelden özütlenen lineer pJET-adhI (3934 bç), pJET-adhII (3794 bç) ve pJET-adhV (3457 bç) plazmitlerinin ve zeosin dayanıklılık geninin DNA End Repair Kit (Fermentas) ile uçları kütleştirilmiş ve Rapid DNA Dephos&Ligation Kit (Roche) kullanılarak plazmitlerin zeosin geni ile ayrı ayrı ligasyonları gerçekleştirilmiştir. Ligasyon reaksiyonları kompetent *E. Coli* XL1-Blue hücrelerine aktarılmıştır ve ardından hücreler, LB-Amp (Miller) agar plakalarına ekilmiştir.



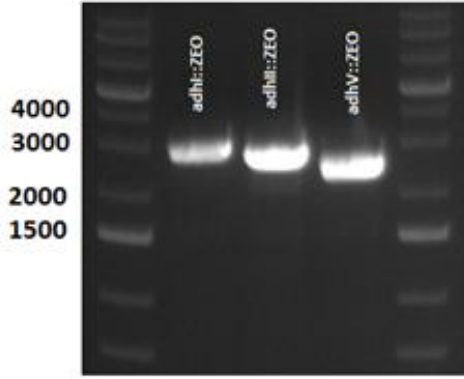
Şekil 4.34. *ADH* genlerini içeren lineer plazmitlerin elde edilmesi için jelden kesilmesi ve ekstraksiyonu

Transformasyon sonrası plakalarda oluşan kolonilerden zeosin genini içeren plazmiti bulmak için koloni PCR yapılmıştır. Koloni PCR sonrası içinde zeosin geni olduğu düşünülen koloniler alınarak plazmit izolasyonu yapılmıştır. Daha sonra elde edilen plazmitler zeosin ve *adh* genlerinin içinde olmak üzere iki noktadan kesen bir restriksiyon enzimi ile kesilmiş ve %1 Agaroz jelde yürütülmüştür (Şekil 4.35). Şekil 4.35’de de kırmızı okla gösterildiği gibi her bir farklı gen için 1’er adet inaktif plazmit elde edilmiştir. Seçilen plazmitlerin zeosin genini içerdiği bu şekilde doğrulanmıştır.



Şekil 4.35. Plazmit izolasyonu sonrası elde edilen plazmitlerin restriksiyon analizi

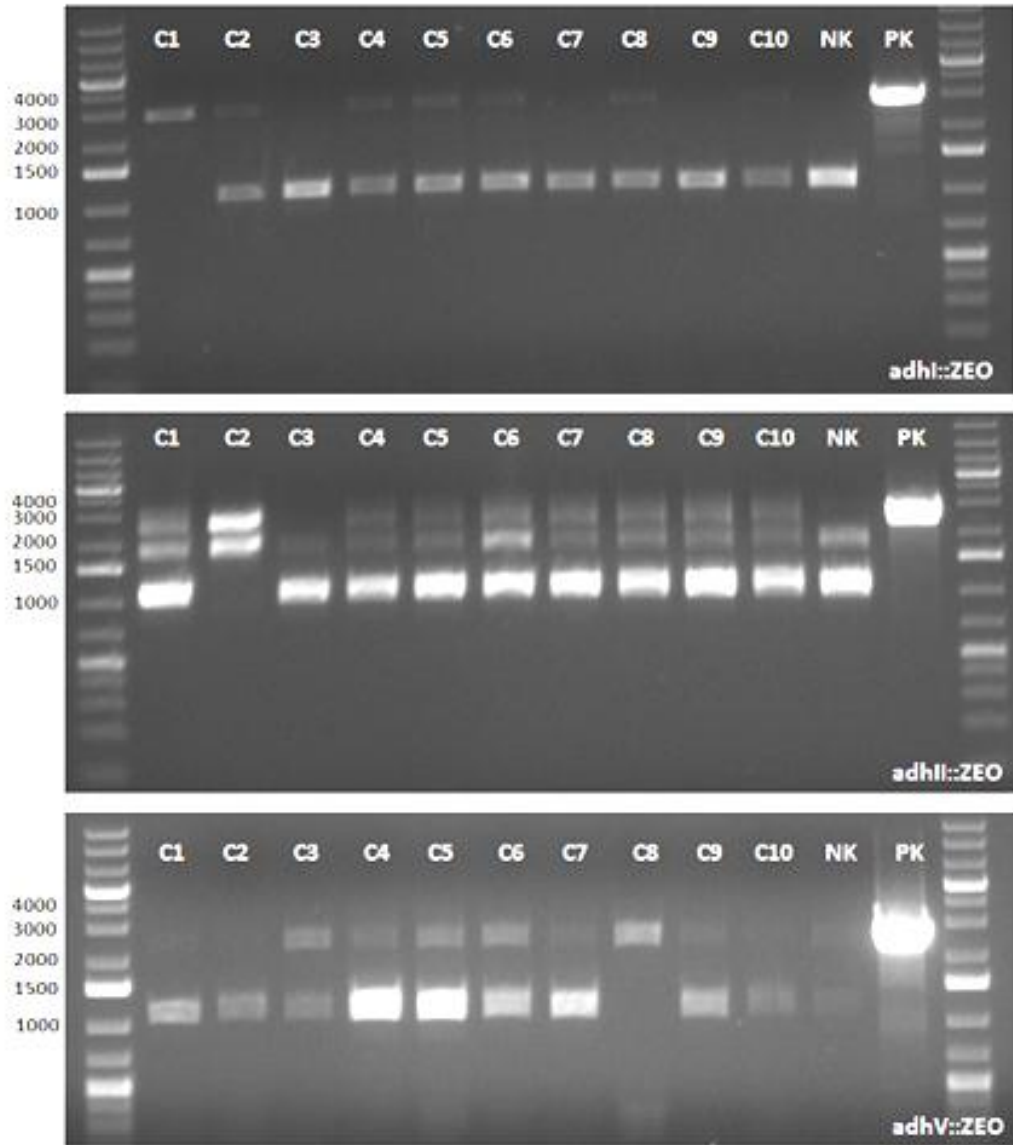
Elde edilen yeni plazmitler pJET-adhI::ZEO, pJET-adhII::ZEO ve pJET-adhV::ZEO olarak isimlendirilmiştir.  $\Delta adhI::ZEO$ ,  $\Delta adhII::ZEO$  ve  $\Delta adhV::ZEO$  inaktif DNA parçaları, *ADH* genlerinin elde edilmesinde kullanılan ATG-STP primer çiftleri ile tekrar PZR yapılmıştır. PZR sonrası elde edilen DNA parçaları %1 Agaroz jelde yürütülmüştür. Jel görüntüsü Şekil 4.36'da verilmiştir.



Şekil 4.36.  $\Delta adhI::ZEO$ ,  $\Delta adhII::ZEO$  ve  $\Delta adhV::ZEO$  fragmentlerinin PZR ile eldesini gösteren jel görüntüsü

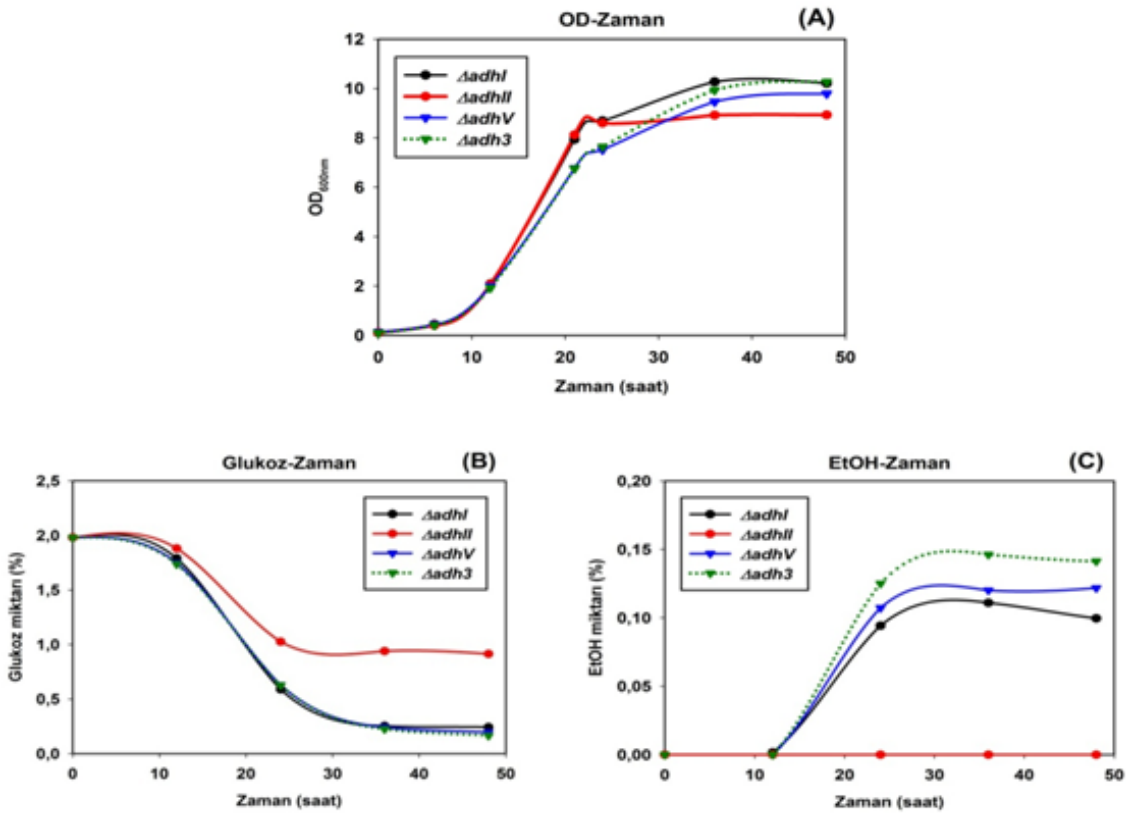
*P. pastoris* MK115 ( $\Delta adh3$ ) hücreleri MD besiyerinde üretilen etanolü kullanamamakta ve ortamda etanol yaklaşık %0,2 oranında birikmektedir. Yabani suş (X33) MD besiyerinde etanol üretmesine rağmen *ADH3* geni aktif olduğu ve üretilen etil alkolü katabolize ettiği için ortamda etanol birikmemektedir. Etanol seviyesi en yüksek %0,03 seviyesinde tespit edilmiş ve zamanla değişim göstermiştir (Şekil 4.18A). Bu nedenle elde edilen  $\Delta adhI::ZEO$ ,  $\Delta adhII::ZEO$  ve  $\Delta adhV::ZEO$  fragmentleri *P. pastoris* MK115 ( $\Delta adh3$ ) suşuna aktarılmış ve ikili mutant suşlar elde edilmiştir.

pJET-adhI::ZEO, pJET-adhII::ZEO ve pJET-adhV::ZEO nakavt plazmitlerinden PZR yolu ile elde edilen  $\Delta adhI::ZEO$ ,  $\Delta adhII::ZEO$  ve  $\Delta adhV::ZEO$  nakavt fragmentlerin MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) ile saflaştırması yapıldıktan sonra, yaklaşık 3 µg kadarı Lityum asetat metodu ile kompetent hale getirilen *P. pastoris* MK115 ( $\Delta adh3$ ) suşuna elektroporasyon yöntemi ile transform edilmiştir. Transformasyon işlemi 1.5 kV/5ms şartlarında Electroporator (Eppendorf) ile gerçekleştirilmiştir. Transformantlar 100µg/mL zeosin içeren YPD plakalara ekilmiş, 30°C'de 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. 3 gün sonrasında zeocin içeren YPD plakalarda gelişen her bir farklı gen transforme edilmiş suşlardan 10 tane farklı koloni YPD sıvı besiyerine ekim yapılmış, 30°C çalkalamalı inkübatörde bir gece inkübe edilmiş ve ertesi gün Masterpure Yeast DNA Kit (Epicentre) ile DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Konsantrasyonları 5 ng/µL olarak ayarlanan genomik DNA'lar *ADH* genlerinin zeosin geni ile inaktif olup olmadığının kontrolü için yapılan PZR'de kalıp olarak kullanılmıştır. Her gen için spesifik ATG-STP primerleri ile yapılan PZR sonucunun %1'lik agaroz jelde yürütülmesi ile, beklenen inaktif fragmentlerin  $\Delta adhI::ZEO$  transformantlarında C1,  $\Delta adhII::ZEO$  transformantlarında C2 ve  $\Delta adhV::ZEO$  transformantlarında C8 olarak isimlendirilen genomik DNA'dan elde edildiği görülmüştür (Şekil 4.37).



Şekil 4.37. Transformant MK115 genomik DNA'larından nakavt fragment olan  $\Delta adhI::ZEO$ ,  $\Delta adhII::ZEO$  ve  $\Delta adhV::ZEO$  varlığının PZR ile kontrol edilmesi. C1-C10: YPD+zeosin (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) plakalardan seçilen transformant koloniler, NK:Negatif kontrol (MK115 genomik DNAsı)

Elde edilen  $\Delta adhI$ ,  $\Delta adhII$  ve  $\Delta adhV$  inaktif MK115 ( $\Delta adh3$ ) suşlarının glukoz içeren besiyerinde gelişimleri izlenmiştir. Karşılaştırma yapılabilmesi için MK115 ( $\Delta adh3::HIS4$ ) suşu da glukoz içeren besiyerinde kontrol olarak kullanılmıştır. Suşlar tek koloniden 3 mL YPD içeren test tüplerinde 28°C'de 250 rpm'de çalkalamalı inkübatörde (Innova 44R, New Brunswick, NJ ABD) 18 saat geliştirilmiştir. Gelişen kültürler 75 mL MD besiyerine yaklaşık 0.1 OD olacak şekilde inokülasyonu yapılmış ve 48 saat boyunca örnekler alınarak OD<sub>600nm</sub> değerleri ölçülmüş, etanol ve glukoz miktarlarının tespiti için aynı kültürden süpernatant örnekleri alınmıştır (Şekil 4.38).



Şekil 4.38. *P. pastoris* *adhI*, *adhII* ve *adhV* genleri inaktif suşların gelişim grafikleri, etanol ve glukoz ölçümleri. A. OD grafiği, B. Glukoz miktarı ve C. Etanol miktarı

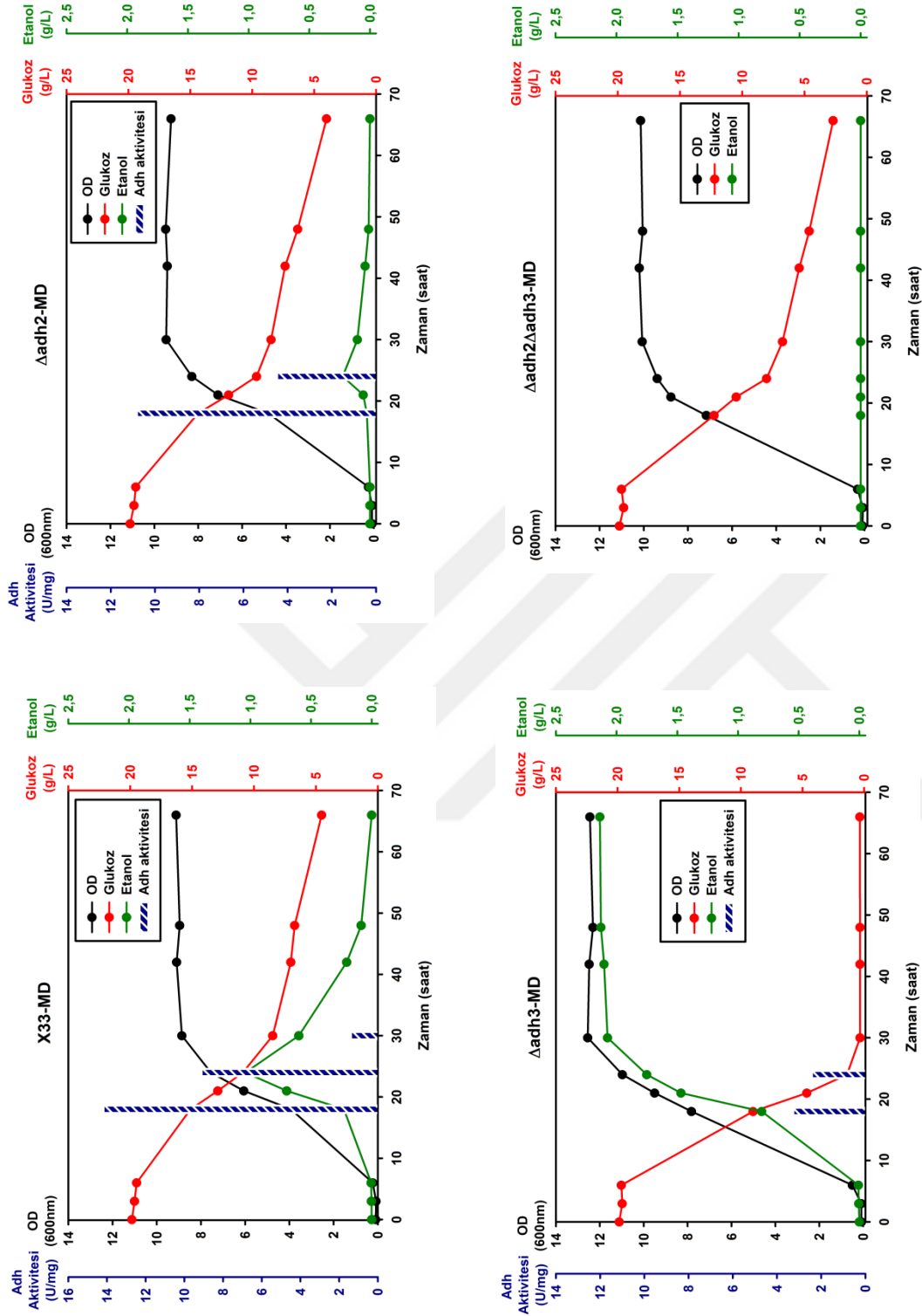
Glukoz içeren besiyerinde mutant suşların üremeleri 24. saate kadar farklılık göstermemelerine rağmen, 24. saatten sonra özellikle *adhII* suşu farklılık göstermektedir. Bu farklılık glukoz tüketim miktarları ile de teyit edilmektedir. *adhII* mutant suşunun glukozun ancak %1'lik kısmını kullandığı ve etanol üretmediği gözlenmiştir. Diğer suşlarda etanol üretimi 12. saatten sonra başlamakta ve 36. saatte maksimum seviyeye ulaşmaktadır. Ayrıca,  $\Delta adhII$  suşunun glukoz kullanımı diğer suşlardan farklı olduğu tespit edilmiştir.  $\Delta adhII$  klonunda tespit edilebilir seviyede etanol üretimi gerçekleşmediği için,  $\Delta adhII$  geninin *P. pastoris*'te etanol üretiminde rol oynadığı ortaya konulmuştur. Sonuç olarak çalışmada etanol metabolizmasında rol oynayan genler belirlenmiştir. Ancak bu iki genin (*ADH3* ve *adhII*) birbiri ile ilişkili olup olmadığının tespiti ve *adhII* geninin rolünün tam anlamıyla araştırılması ile çalışmalara devam edilmiştir. *P. pastoris*'te etanol üretiminde rol oynayan *adhII* geni bu çalışmada *ADH2* olarak isimlendirilmiştir.



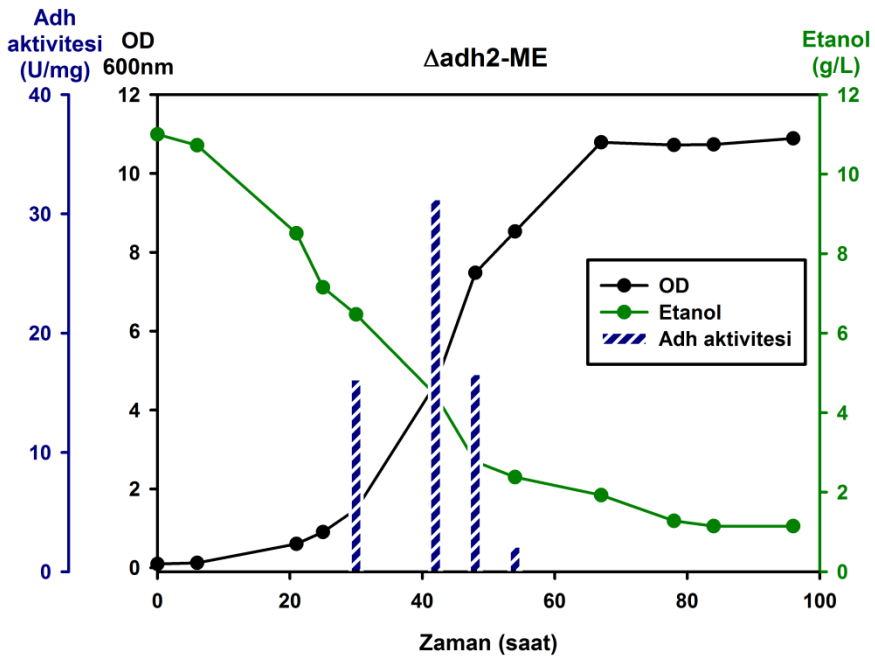
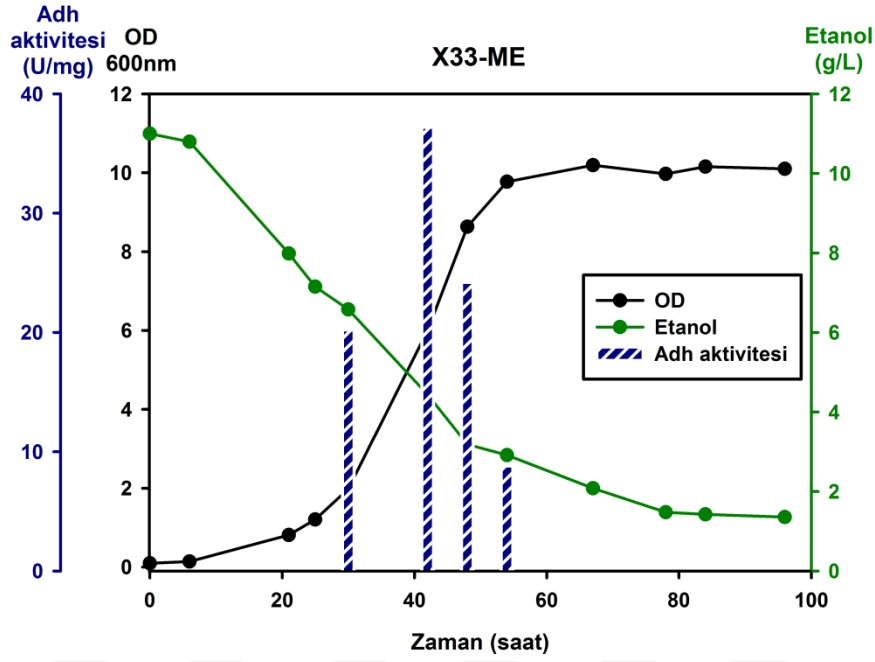
#### 4.6. *ADH2* Geninin Karakterizasyonu ve Etanol Metabolizmasındaki Rolünün Belirlenmesi

İkili inaktif suşun ( $\Delta adh2\Delta adh3$ ) glukoz içeren besiyerinde yapılan ön denemelerinde etanol üretme yeteneğini kaybettiği belirlenmiştir. *ADH2* geninin karakterizasyonu ve etanol metabolizmasındaki rolünün belirlenmesi için X33, *ADH2* tekli inaktif ( $\Delta adh2$ ),  $\Delta adh3$  ve ikili inaktif ( $\Delta adh2\Delta adh3$ ) suşlarının glukoz ve etanol içeren minimal besiyerinde üreme davranışlarına (Gelişim eğrisi, Glukoz tüketimi, Etanol üretimi ve Adh aktivitesi) bakılmıştır. Her iki suş 3 mL YPD içeren test tüplerinde 28°C de 250 rpm de çalkalamalı inkübatörde (Innova 44R, New Brunswick, NJ ABD) 18 saat geliştirilmiştir. Gelişen kültürlerin 100 mL MD ve ME besiyerine yaklaşık 0,1 OD olacak şekilde inokülasyonu yapılmış ve 96 saat boyunca örnekler alınarak OD<sub>(600nm)</sub> değerleri, glukoz, etanol içerikleri ve hücrelerden Adh enzim aktivite analizleri yapılmıştır.

Şekil 4.39'da X33 ve  $\Delta adh2$  suşlarının MD besiyerinde üreme eğrilerinde (OD) farklılık gözlenmemesine rağmen, etanol konsantrasyonlarında büyük farklılık gözlenmiştir. X33 suşunda üretilen en yüksek etanol konsantrasyonu 1,0 g/L olarak tespit edilmişken,  $\Delta adh2$  suşunda sadece 0,2 g/L etanol saptanmıştır. X33 ve  $\Delta adh2$  suşlarının *ADH3* geni aktif olduğundan MD besiyerinde üretilen etanolü tükettiği için ortamda birikme olmamakta ve ilerleyen zamanlarda etanol tüketilmektedir.  $\Delta adh3$  suşu *ADH3* geninin karakterizasyonu aşamasında olduğu gibi etanol üretmeye devam etmekte ve üretilen etanolü katabolize edememesinden dolayı, ortamda etanol konsantrasyonu sabit kalmaktadır. Fakat ikili inaktif suş ( $\Delta adh2\Delta adh3$ ) glukoz içeren besiyerinde üremesi boyunca alınan örneklerde etanol tespit edilememiştir. Sonuçlar,  $\Delta adh2\Delta adh3$  suşunun etanol üretme yeteneğini kaybettiğini ortaya koymaktadır. Ayrıca, diğer bir sonuç da *ADH2* geninin *P. pastoris* etanol metabolizmasında etanol üretiminden tek başına sorumlu olmadığını ve etanol üretiminde *ADH3* geninin de rol aldığını ortaya koymuştur. Bu çıkarım,  $\Delta adh2$  suşunda glukoz içeren besiyerinde az da olsa etanol üretiminin olması ile desteklenmektedir. Sonuç olarak, *P. pastoris* etanol metabolizmasında etanol üretiminden sorumlu majör gen *ADH2* iken, *ADH3* geni de *ADH2* geninin inaktif olduğu şartlarda etanol üretiminde rol almaktadır. Etanol üretiminin yaklaşık %80'inden *ADH2* sorumlu iken, %20'lik kısmından da *ADH3* sorumludur.



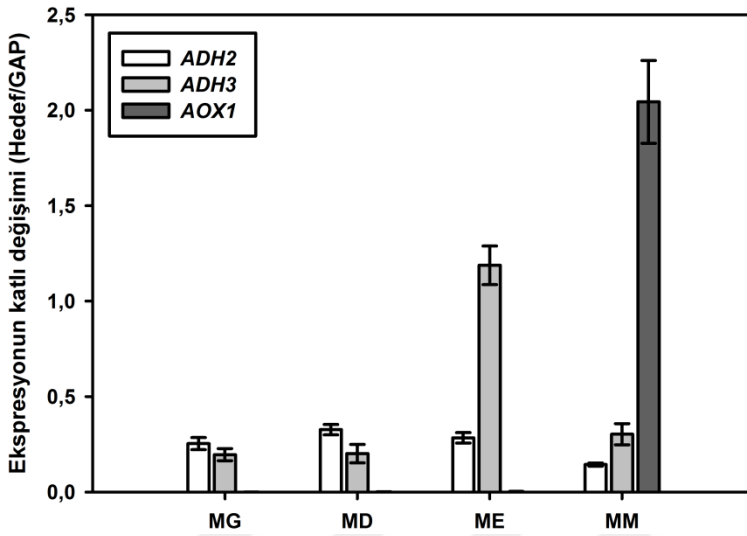
Şekil 4.39. X33 ve inaktif suşların glukoz içeren besiyerinde gelişimi, glukoz ve etanol değişimi, Adh enzim aktivite değişim grafiği



Şekil 4.40. X33 ve  $\Delta adh2$  suşlarının etanol içeren besiyerinde gelişimi etanol tüketimi ve Adh enzim aktivite değişim grafiği

X33 ve  $\Delta adh2$  suşlarının gelişimi etanol içeren besiyerinde de izlenmiştir. Ancak etanolde gelişimlerinde ve hücre için Adh aktivitelerinde önemli bir fark tespit edilememiştir (Şekil 4.40). MK115 ( $\Delta adh3$ ) ve ikili inaktif suşlarının etanol içeren besiyerinde üreme yeteneklerini kaybetmeleri sebebiyle bu analiz ilgili suşlarda gerçekleştirilememiştir.

Genlerin karakterizasyon çalışmalarına ilgili genlerin farklı karbon kaynaklarındaki ekspresyon seviyelerinin analizi ile devam edilmiştir. Bu amaçla, materyal metot kısmında anlatıldığı gibi hazırlanan hücrelerden RNA izolasyonu yapılmış, kit protokolleri doğrultusunda cDNA sentezleri yapılmış ve elde edilen cDNA'lar qRT-PCR analizlerinde kalıp olarak kullanılmıştır. Genlerin ekspresyon seviyeleri *GAP* genine göre normalize edilmiş ve ekspresyon seviyeleri *GAP* genine göre kat değişim olarak verilmiştir (Şekil 4.41). Elde edilen sonuçlar, *ADH3* geninin etanol ile indüklenen bir gen olduğunu, *ADH2* geninin ise yapısal bir gen olma ihtimalinin yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca çalışmada *AOX1* geninin analizi de kontrol amaçlı bu ekspresyon çalışmasına eklenmiştir.



Şekil 4.41. *P. pastoris* *ADH2* ve *ADH3* genlerinin farklı karbon kaynağı içeren besiyerlerin ekspresyon seviyeleri grafiği

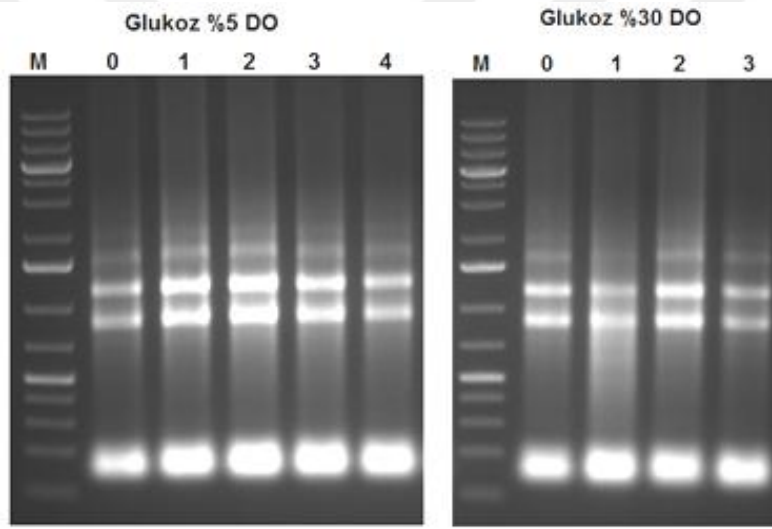
#### 4.7. Fermentör Şartlarında Farklı Çözünmüş Oksijen Seviyelerinde *ADH3* ve *ADH2* Genlerinin Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi

Fermentasyon ortamında *ADH* promotorları ile rekombinant protein üretimi için ayarlanacak olan çözünmüş oksijen seviyesinin belirlenmesi için *P. pastoris* X33 suşu ile *ADH* genlerinin ekspresyon seviyeleri analiz edilmiştir. Ayrıca, fermentör koşullarında suşu ile de ekspresyon analizi yapılmıştır. Hücreler YPD besiyerinden 0,5 OD olacak şekilde 100 mL BMGY besiyeri (Çizelge 3.4) içeren engelli erlenlere ekilmiştir. Kültür, 9-10 OD oluncaya kadar çalkalamalı inkübatörde 250 rpm 30°C'de geliştirilmiştir. Bu kültürler fermentör ortamına inokulum olarak kullanılmıştır. Çalışmalarda 5L hazneli fermentör kullanılmıştır (Sartorius B Plus).

Başlangıç fermentasyon hacmi 2L olarak ayarlanmış ve temel tuz besiyeri kullanılmıştır. Fermentasyonlar 1000 rpm karıştırma hızında, 30°C'de ve pH 5'de gerçekleştirilmiş, pH kontrolü %26'lık (w/v) amonyum hidroksit çözeltisi ile yapılmıştır. Fermentasyon, glukoz ile 2 farklı çözünmüş oksijen seviyesinde (%30 (aerobik), ve %5 (hipoksik)) gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon süresince çözünmüş oksijen seviyeleri saf oksijen beslemesi ile ayarlanmıştır.

Kesikli fazda kullanılan besiyeri temel tuz besiyeri (basal salts medium, BSM) ve 4,55 mL/L PTM1 tuzlarından oluşmaktadır. Fermentasyonun kesikli fazı (Gliserol fazı) *P. pastoris*'in standart protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Kesikli fazın bitişi (%4 gliserolün tükenmesi) DO probu ile izlenmiş ve bu noktadan sonra ortamda bulunan metabolitlerin tükenmesi için kültüre 1 saat boyunca her hangi bir karbon kaynağı beslemesi yapılmamıştır. Bu süre sonunda t=0 örneği alınmış ve ortamın glukoz içeriği 100 mL/dak besleme hızındaki peristaltik pompa ile %4'e çıkarılmıştır. Çözünmüş oksijen seviyesi (DO) %5 ve %30 olarak sabit tutulmuştur. Ortamdaki glukoz bitinceye kadar (yaklaşık 3-4 saat) belirli aralıklarla örnekler alınmıştır. Alınan örneklerden glukoz ve etanol ölçümleri yapılmıştır. Ayrıca örneklerden ekspresyon analizi için (RNA) hücre örnekleri alınarak analize kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

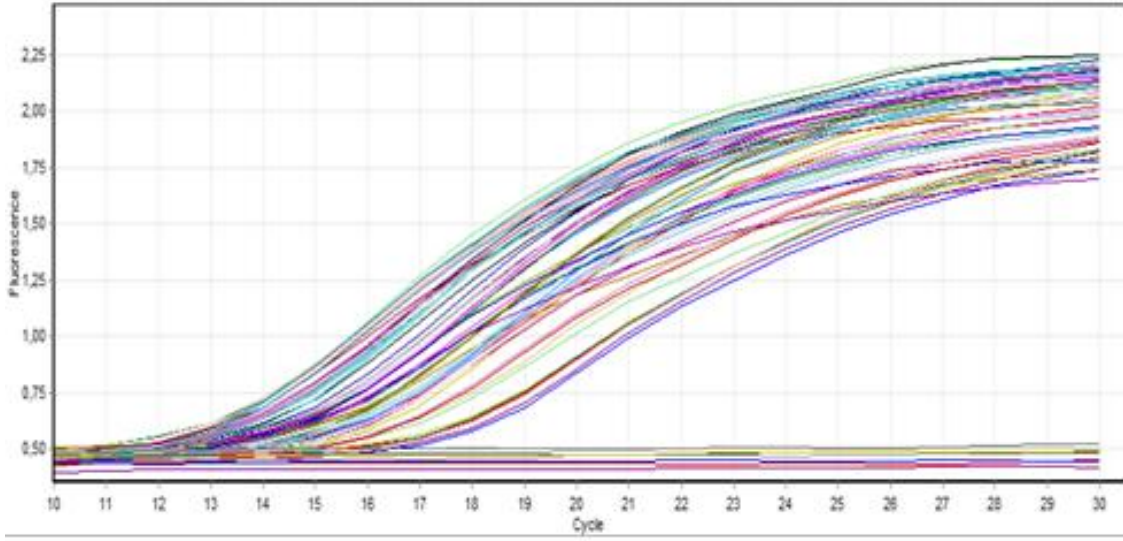
Glukoz ile yapılan fermentasyondan elde edilen örneklerden RNA izolasyonu yapılmış ve %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. RNA'ların jel görüntüsü Şekil 4.42'de verilmiştir.



Şekil 4.42. Glukoz içeren fermentasyon ortamından alınan örneklerden izole edilen RNA'ların jel görüntüsü

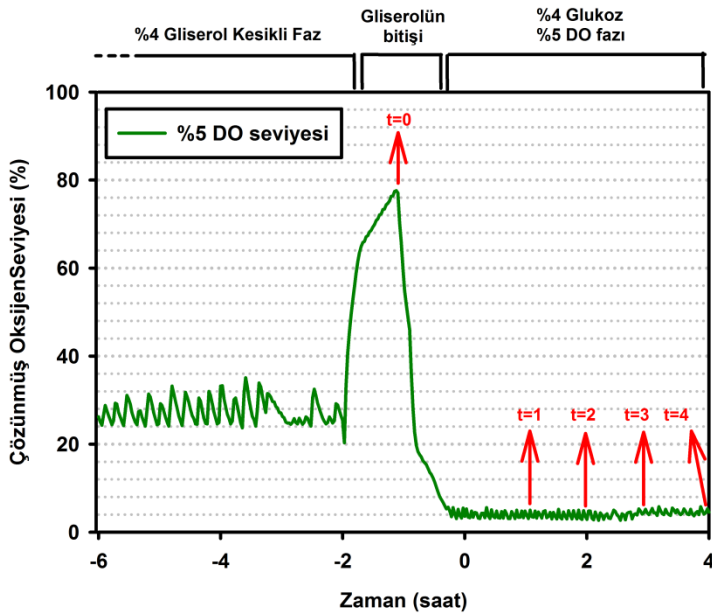
Elde edilen toplam RNA'lardan ProtoScript® Taq RT-PCR Kit (NEB) kullanılarak kit protokolü doğrultusunda cDNA sentezi yapılmıştır. Elde edilen cDNA üç aşamalı qRT-PZR analizleri için kalıp olarak kullanılmıştır. qRT-PZR analizleri Rotor Gene Q (Qiagen) cihazı ile Maxima SYBR Green PCR kiti kullanılarak yapılmıştır.

qRT-PCR analizi Rotor GeneQ cihazında 35 döngü olarak gerçekleştirilmiştir. Glukoz içeren besiyeri ile yapılan fermentasyonlarda *ADH2* ve *ADH3* genlerinin ekspresyon seviyeleri tespit edilmiştir. *P. pastoris* *GAP* geni de referans gen olarak kullanılmıştır. Analiz sonrası elde edilen Floresans-Döngü grafikleri Şekil 4.43'de verilmiştir.

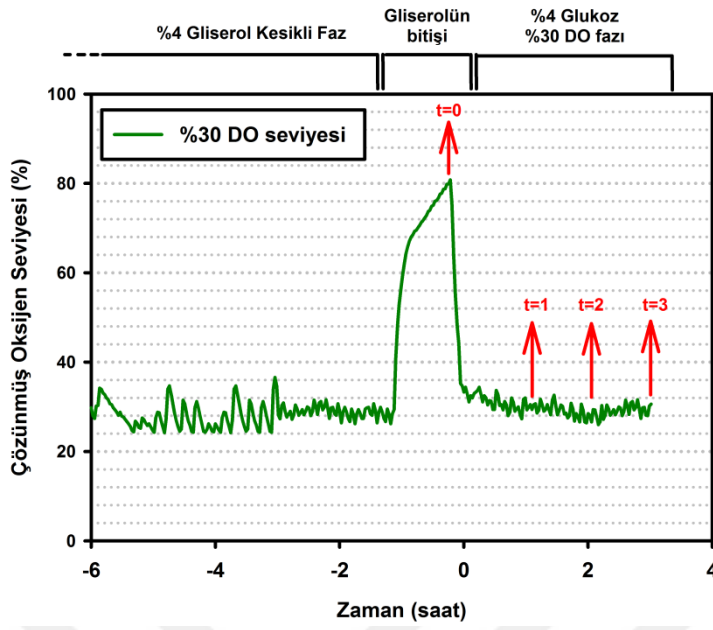


Şekil 4.43. qRT-PCR analizi sonrası elde edilen Floresans-Döngü grafikleri

Glukoz ile yapılan fermentasyondan elde edilen çözünmüş oksijen seviyeleri ve örnek alınan noktalar Şekil 4.44 ve Şekil 4.45’de verilmiştir.

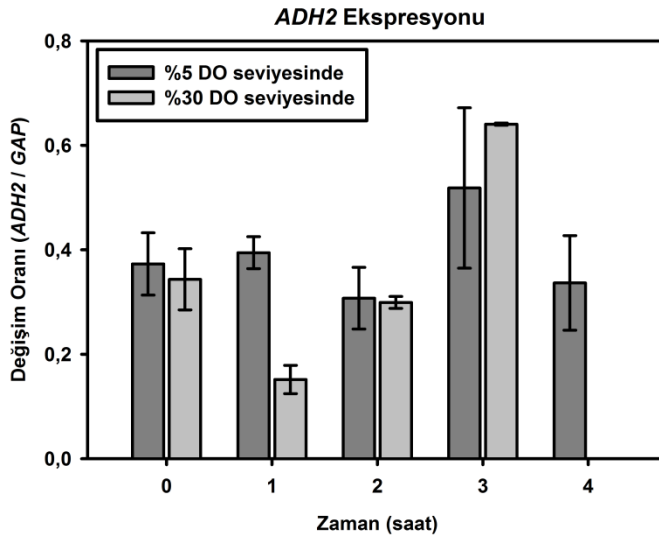


Şekil 4.44. Glukoz içeren besiyerinde %5 çözünmüş oksijen seviyesinde yürütülen fermentasyonun DO grafiği ve örnek alınan noktaları

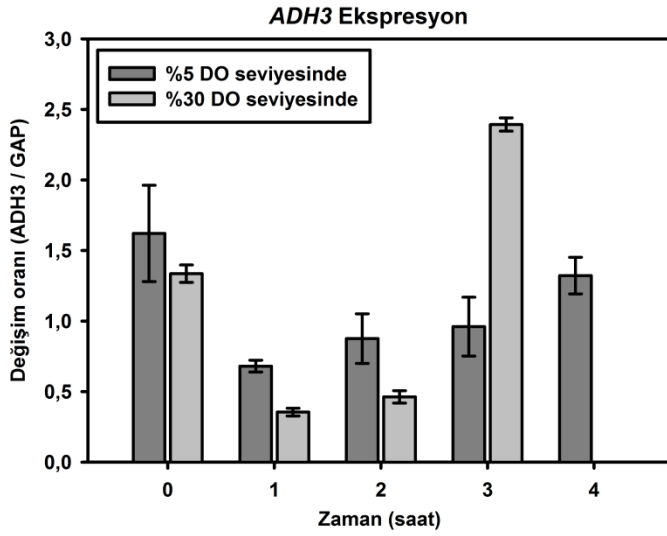


Şekil 4.45. Glukoz içeren besiyerinde %30 çözülmüş oksijen seviyesinde yürütülen fermentasyonun DO grafiği ve örnek alınan noktaları

Fermentör ortamından alınan örneklerde genlerin ekspresyon seviyelerinin zamanla değişimi; *ADH2* için Şekil 4.46'da, *ADH3* için Şekil 4.47'de verilmiştir.

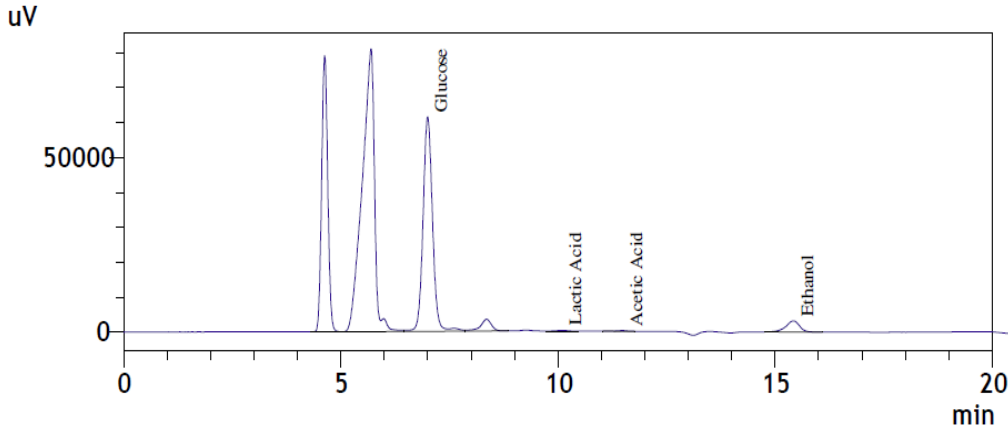


Şekil 4.46. Glukoz içeren besiyeri ile fermentör ortamında yapılan fermentasyondan elde edilen örneklerde zamana karşı *ADH2* geninin ekspresyon seviyesi



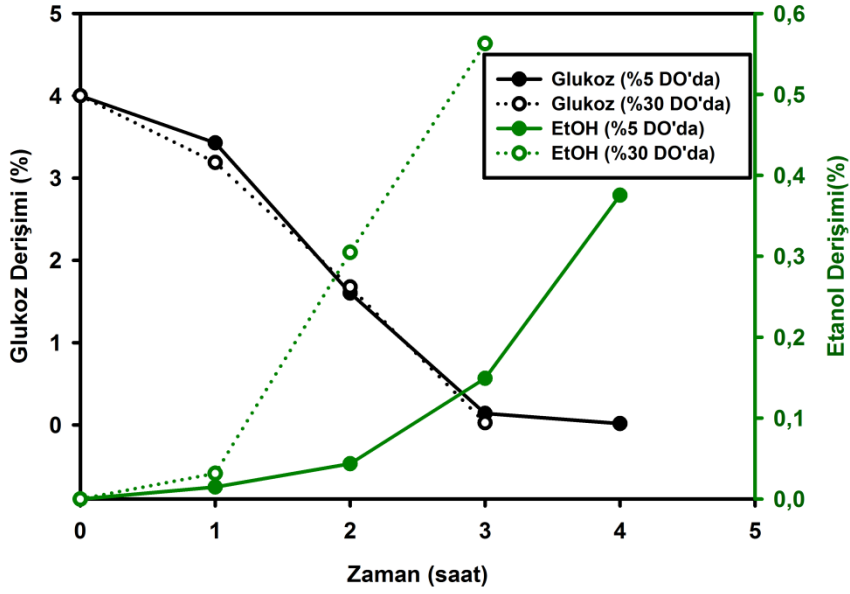
Şekil 4.47. Glukoz içeren besiyeri ile fermentör ortamında yapılan fermentasyondan elde edilen örneklerde zamana karşı *ADH3* geninin ekspresyon seviyesi

Fermentör ortamında, farklı çözünmüş oksijen seviyelerinde glukoz içeren besiyerinden belirli aralıklarla alınan örneklerde glukoz ve etanol miktarı ölçülmüştür. Glukoz ve etanol ölçümleri HPLC cihazında (Shimadzu, Japonya) fermentasyon kolonu (ICSep ORH-801, Transgenomic, ABD) kullanılarak 0.025 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> taşıyıcı faz ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kromotogramlardan biri temsili olarak Şekil 4.48’de verilmiştir. Yabani suş (X33) ile yapılan fermentörden elde edilen örneklerdeki glukoz ve etanol ölçümleri, farklı çözünmüş oksijen seviyelerine göre Şekil 4.49’da verilmiştir.



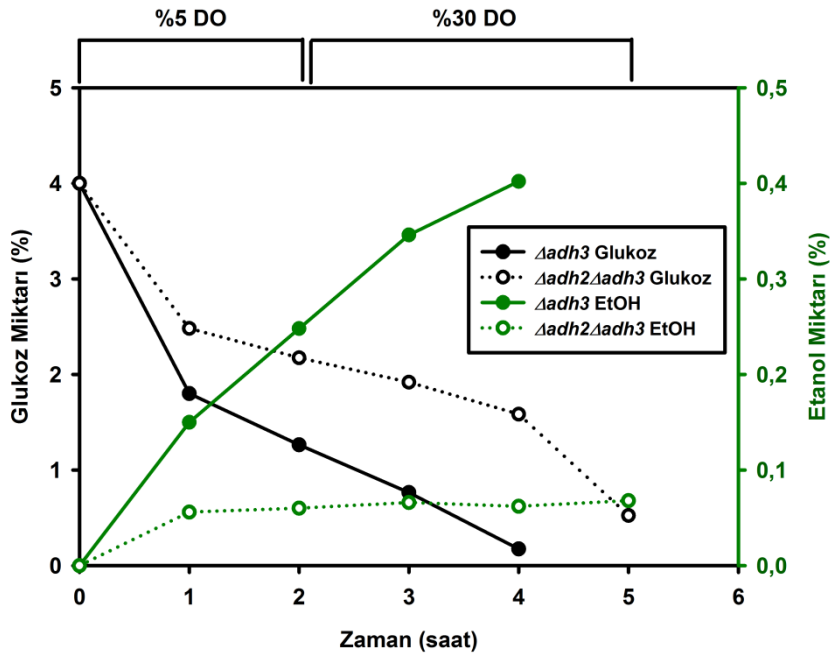
Şekil 4.48. Glukoz ve etanol konsantrasyonlarının HPLC ile tespitinden elde edilen kromotogram





Şekil 4.49. *P. pastoris* X33 suşu ile fermentasyon ortamında glukoz tüketimi ve etanol üretimi grafiği

Ayrıca,  $\Delta adh3$  ve  $\Delta adh2\Delta adh3$  suşlarının fermentör ortamında farklı çözünmüş oksijen seviyelerinde etanol üretme yetenekleri test edilmiştir. Sonuçlar, erlenmayerde yapılan analizlerde olduğu ve beklendiği gibi  $\Delta adh3$  suşu glukoz içeren besiyerinde etanol üretmeye devam ederken,  $\Delta adh2\Delta adh3$  suşunun farklı çözünmüş oksijen seviyelerinde de etanol üretmeme yeteneğini koruduğunu göstermiştir (Şekil 4.50)



Şekil 4.50. İnaktif suşların fermentasyon ortamında glukoz tüketimi ve etanol üretimi grafiği

Glukoz içeren besiyerinde %5 ve %30 çözünmüş oksijen seviyelerinde yapılan deneylerde, %30 çözünmüş oksijende fermentasyon 3 saat sürerken, %5 oksijen seviyesinde fermentasyon 4 saat sürmüştür (Şekil 4.44 ve Şekil 4.45). Bunun sebebinin, hücrelerin yüksek oksijen seviyesinde (%30) glukozu daha hızlı kullanması olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, ekspresyon analizi grafiklerinde (Şekil 4.46 ve Şekil 4.47) %30 DO'da 4. saat ekspresyon analizi bulunmamaktadır. Ekspresyon analizi değerlendirildiğinde *ADH2* geninin en yüksek ekspresyon seviyesine 3. saatte ulaştığı ve *ADH2* geninin bu noktada %30 DO değerinde %5 DO'ya göre azda olsa daha yüksek ekspresyon olduğu belirlenmiştir. *ADH3* geninin ise en yüksek ekspresyon seviyesi 3. saatte ve %30 DO değerinde gerçekleşmiştir. Glukoz içeren besiyerinde fermentasyon koşullarında yapılan ekspresyon analizleri, *ADH2* ve *ADH3* genlerinin %30 DO değerinde daha yüksek seviyede ekspresyon olduğunu göstermiştir. Fermentasyon ortamında 3. saatte %30 çözünmüş oksijen seviyesinde *ADH3* geni ekspresyonunun en yüksek seviyede olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, *ADH3* promotörü ile rekombinant protein üretimi için çözünmüş oksijen seviyesinin de %30 olması gerektiği tespit edilmiştir. Muhtemel genler ile yapılan ekspresyon analizlerinde *ADH3* geninin etanolde çok daha yüksek seviyede ekspresyon olduğu ortaya konmuştur. Bu nedenle fermentör üretimlerinde karbon kaynağı olarak etanol kullanılmıştır. Ayrıca, yapılan fermentasyonun büyüme kinetiği hesaplamaları ve bazı fermentasyon parametreleri Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Fermentasyon kinetik parametrelerinin hesaplaması

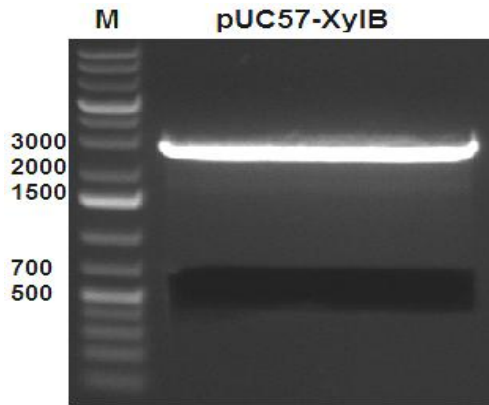
Parametre	Çözünmüş oksijen seviyesi	
	5%	30%
Çözünmüş oksijen seviyesi (%)		
Fermentasyon süresi, h (saat)	4	3
Hücre yoğunluğu, $X$ (g/L)	45,1	60,1
Glukoz tüketimi, $S$ (g/L)	32,9	31,6
Etanol üretimi, $P$ (g/L)	1,3	5,3
Glukoz tüketim oranı, $S_g$ (g/L/h)	16,4	15,8
Etanol üretim oranı, $P_e$ (g/L/h)	0,7	2,7
Spesifik Ürün verimi (%), $Y_{P/S}$ (g ürün/g substrat)	4,1	16,8
Spesifik biyokütle verimi (%); $Y_{X/S}$ (g hücre/g substrat)	137,2	190,1
İkiye katlanma süresi, $t_d$ (h)	4,6	3,7
Maksimum Spesifik gelişim hızı, $\mu_{max}$ ( $h^{-1}$ )	0,151	0,186
Hesaplama Zaman aralığı	1-3	1-3

#### 4.8. *Pichia pastoris* ADH3 Promotoru ile Rekombinant Protein Üretimi

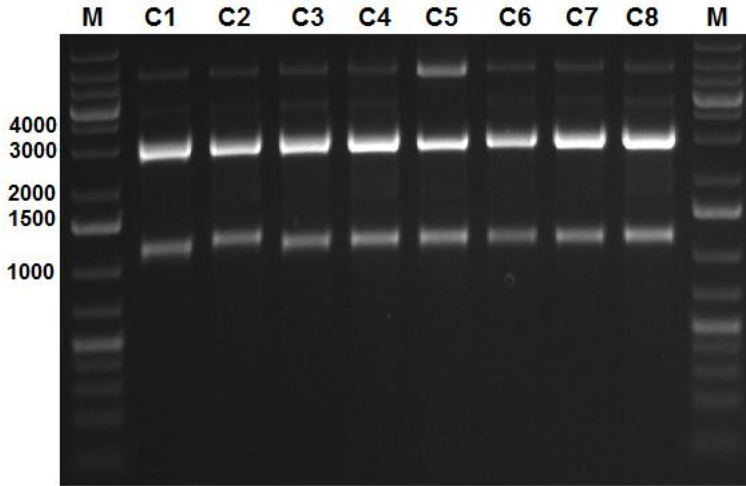
##### 4.8.1. Ekspresyon vektörleri ve klonlama çalışmaları

*ADH3* promotoru ile rekombinant protein üretilebilirliğinin ortaya konulabilmesi amacıyla, *P. pastoris*'te rekombinant protein üretimlerinde en yaygın kullanılan diğer promotorlar kullanılarak aralarında karşılaştırma yapılmıştır. Bu amaçla *P. pastoris* *AOX1* ve *GAP* promotorları seçilmiştir. Rekombinant protein üretimleri *Aspergillus niger* Ksilanaz geni (*XylB*) ile gerçekleştirilmiştir. Ksilanaz geninin seçilme sebebi, tarafımızdan yapılan önceki çalışmalarda, ksilanaz proteinin sıcaklık ve pH gibi değişimlere karşı oldukça stabil olmasıdır. Ksilanaz proteininin bu özelliği promotor aktivitelerini karşılaştırmada hata payını önemli ölçüde azaltmaktadır.

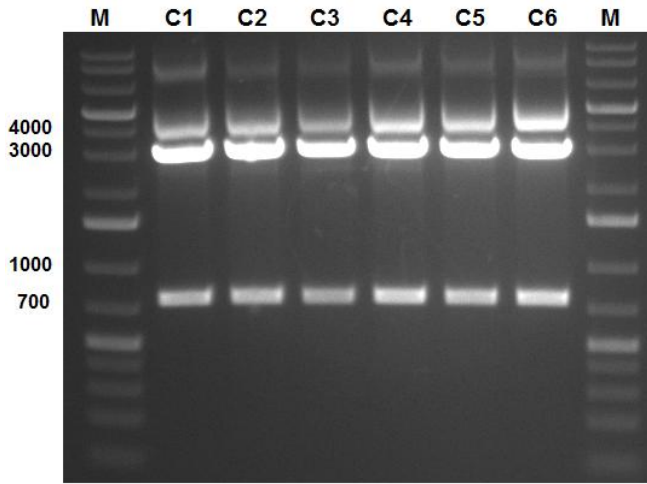
*ADH3*, *AOX1* ve *GAP* promotoru ile *XylB* geninin ekspresyon plazmiti için ilk olarak *AOX1* promotorunu içeren ticari pPICZ $\alpha$ A plazmiti, *XhoI* ve *XbaI* restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. *XylB* geni, bulunduğu pUC57-*XylB* plazmitinden aynı restriksiyon enzimleri ile kesilerek jelden kesilip alınmış (Şekil 4.51) ve lineer pPICZ $\alpha$ A plazmitine ligasyonu yapılmıştır. Ligasyon sonrası elde edilen ligasyon karışımı *E. coli* XL1-Blue hücrelerine transform edilerek LB Lennox (25 $\mu$ g/mL zeosin içeren) plakalara yayılmıştır. Elde edilen *AOX1* transformantlarından için 8 adet seçilmiş ve plazmit ve geni birer noktadan kesen *BglIII* restriksiyon enzimi ile kontrolü yapılmıştır (Şekil 4.52). *GAP* transformantları için de alınan 6 adet plazmit *BglIII* enzimi ile kesilerek kontrol edilmiştir (Şekil 4.53). Jelde yaklaşık olarak 1200 bç ve 3000 bç uzunluğunda DNA parçaları beklenmektedir. Seçilen tüm transformatların doğru olduğu tespit edilmiş ve ilerleyen çalışmalara, elde edilen plazmitlerden C1 olarak isimlendirilen klon ile devam edilmiştir. Elde edilen yeni ekspresyon plazmitleri pPICZ $\alpha$ A-*XylB* ve pGAPZ $\alpha$ A-*XylB* olarak isimlendirilmiştir.



Şekil 4.51. *XylB* geninin *XhoI* ve *XbaI* restriksiyon enzimleri ile kesilen pUC57-*XylB* plazmitinden düşürülmesi ve jelden kesilmesini gösteren agaroz jel görüntüsü

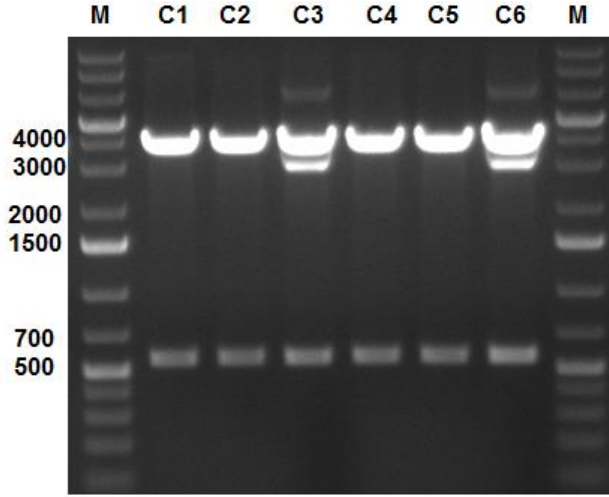


Şekil 4.52. pPICZ $\alpha$ A-XylB transformantlarının plazmit izolasyonu sonrası *Bgl*III restriksiyon enzimi ile kontrolünü gösteren agaroz jel görüntüsü

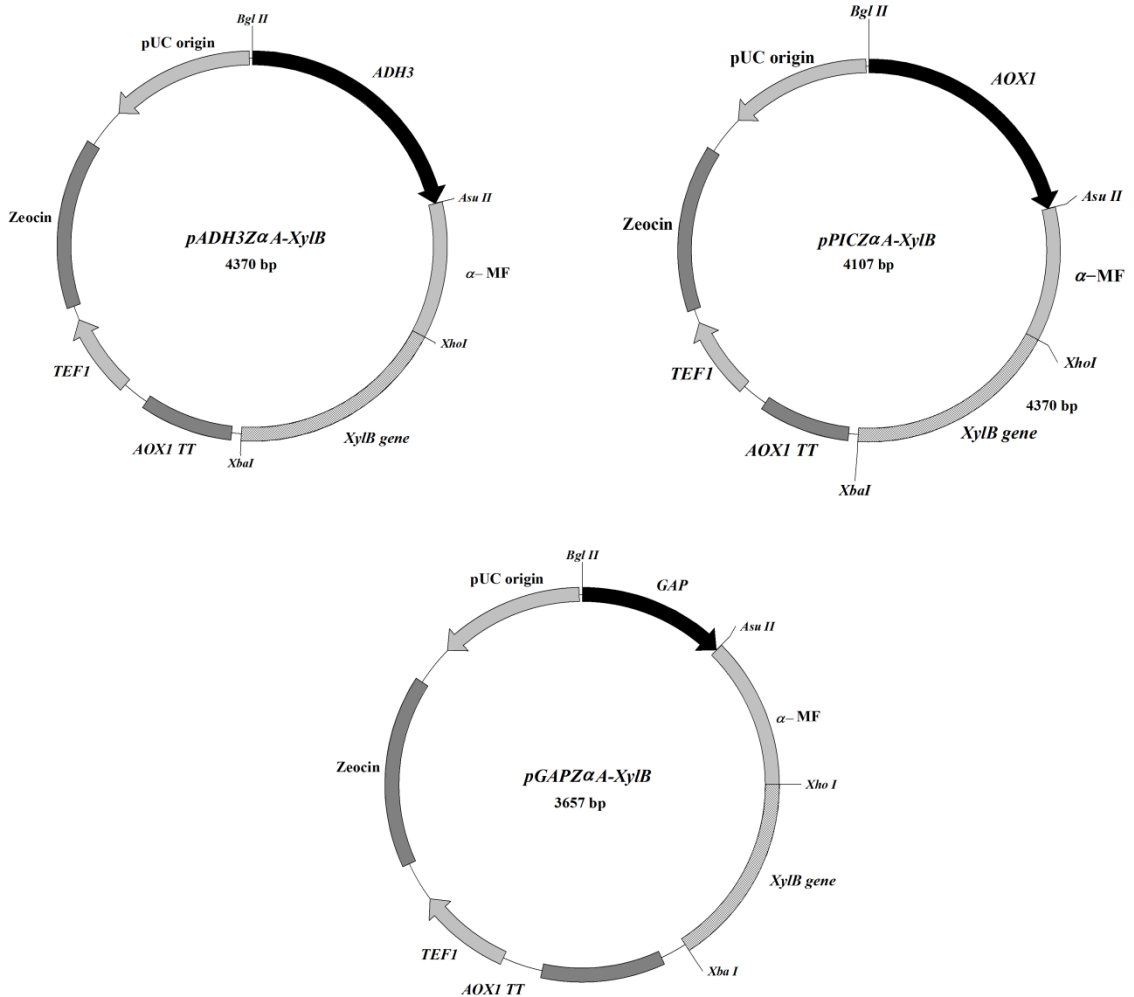


Şekil 4.53. pGAPZ $\alpha$ A-XylB transformantlarının plazmit izolasyonu sonrası *Bgl*III restriksiyon enzimi ile kontrolünü gösteren agaroz jel görüntüsü

*ADH3* promotorunu içeren ekspresyon vektörü yukarıda klonlanan plazmit kullanılarak elde edilmiştir. Bu amaçla, pPICZ $\alpha$ A-XylB plazmitinde bulunan *AOX1* promotoru *Bgl*III ve *Asu*II restriksiyon enzimleri ile düşürülmüş ve yerine 1200 bç uzunluğunda PZR reaksiyonu ile elde edilen *ADH3* promotorunun *Bam*HI ve *Asu*II enzim bölgeleri ile ligasyonu yapılmıştır. *Bgl*III ve *Bam*HI enzimleri birbirine uyumlu uç oluşturan enzimlerdir. Ligasyon sonrası elde edilen ligasyon karışımı *E. coli* X11-Blue hücrelerine aktarılarak LB Lennox (25 $\mu$ g/mL Zeocin içeren) plakalara yayılmıştır. Elde edilen transformantlardan 6 adet seçilmiş ve genin plazmite klonlamasının yapıldığı restriksiyon enzimleri (*Xho*I ve *Xba*I) ile kontrol edilmiştir (Şekil 4.54). Jelde yaklaşık olarak 600 bç uzunluğundaki *XylB* geni ve 3600 bç uzunluğunda plazmitten oluşan DNA parçaları beklenmektedir. Seçilen tüm transformatların doğru olduğu tespit edilmiş ve ilerleyen aşamalara C1 olarak isimlendirilen transformant ile devam edilmiştir. Elde edilen yeni ekspresyon plazmiti pADH3Z $\alpha$ A-XylB olarak isimlendirilmiştir. Elde edilen üç ekspresyon plazmitinin şematik gösterimleri Şekil 4.55’de verilmiştir.

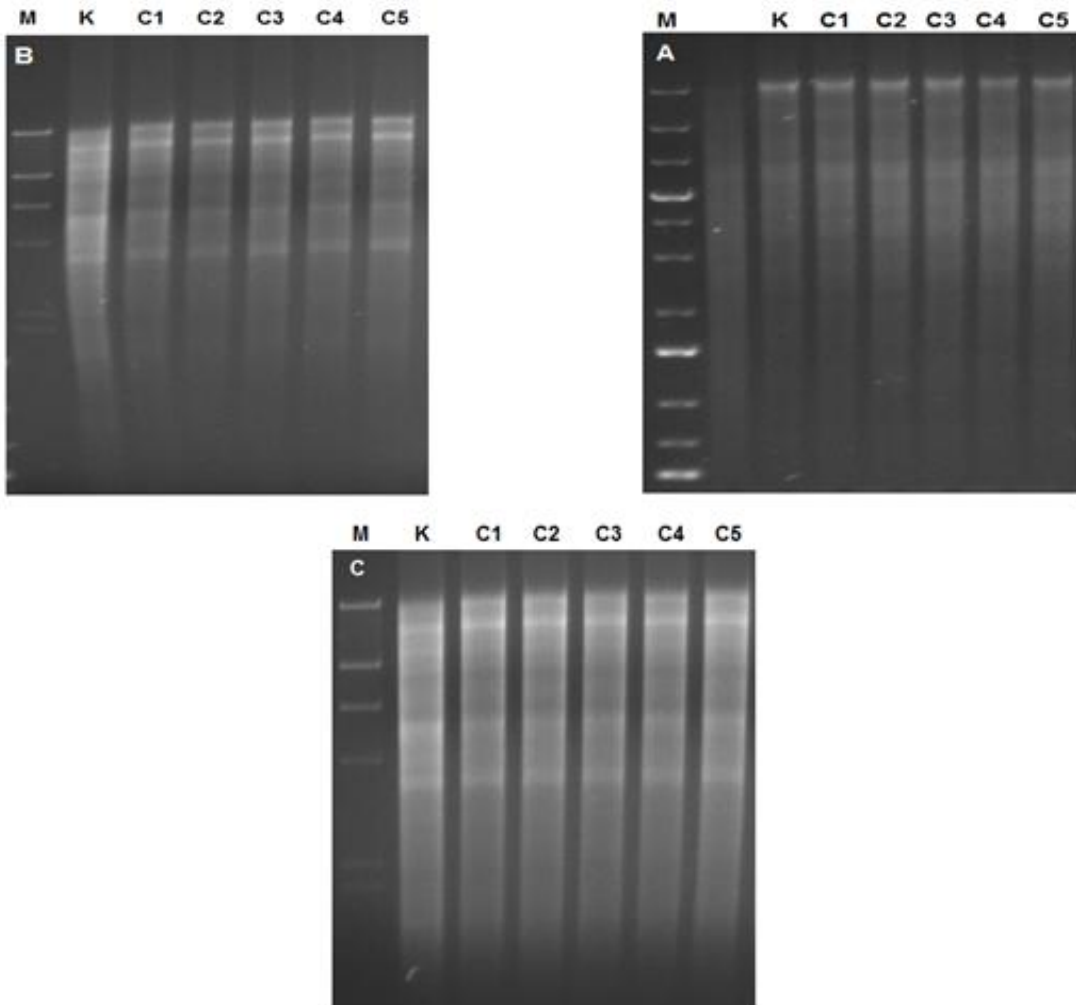


Şekil 4.54. pADH3Z $\alpha$ A-XylB transformantlarının plazmit izolasyonu sonrası *XhoI* ve *XbaI* restriksiyon enzimi ile kontrolünü gösteren agaroz jel görüntüsü



Şekil 4.55. pADH3Z $\alpha$ A-XylB, pPICZ $\alpha$ A-XylB ve pGAPZ $\alpha$ A-XylB plazmitlerinin şematik gösterimi

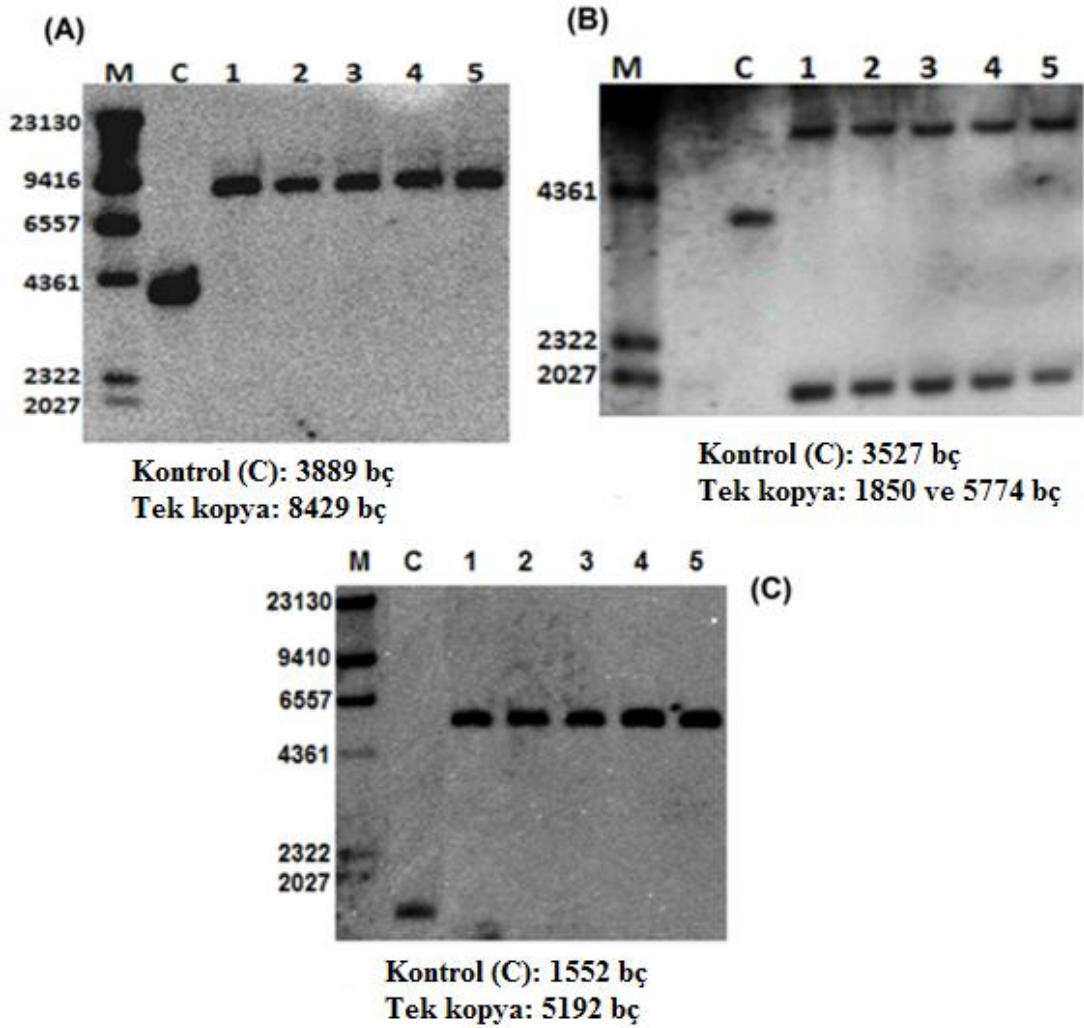
Elde edilen ekspresyon plazmitlerinden; pPICZ $\alpha$ A-XylB'yi tek bir noktadan ve *AOX1* promotorunun içinden kesen *MssI*, pGAPZ $\alpha$ A-XylB'yi tek bir noktadan ve *GAP* promotorunun içinden kesen *AvrII* ve pADH3Z $\alpha$ A-XylB'yi tek bir noktadan ve *ADH3* promotorunun içinden kesen *BglIII* enzimi ile kesilerek kompetent *P. pastoris* X33 suşlarına transformasyona hazır hale getirilmiştir. Transformasyon işlemi 1500V ve 5ms olacak şekilde elektroporasyon (ependorf eporator) tekniği ile gerçekleştirilmiştir. Transformantlar 100 $\mu$ g/mL zeosin içeren YPD plakalara ekilmiş, 30°C'de 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. 3 gün sonrasında zeosin içeren YPD plakalarda gelişen kolonilerin YPD sıvı besiyerine ekimi yapılmış, 30°C çalkalamalı inkübatörde bir gece geliştirilmiştir. Elde edilen klonların gen kopya sayısının belirlenmesi amacıyla Southern blot analizi yapılmıştır. Bu amaçla, *AOX1* klonlarından elde edilen genomik DNA'lar *EcoRV* ve *ADH3* ve *GAP* klonlarından elde edilen genomik DNA'lar *ClaI* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir (Şekil 4.56).



Şekil 4.56. Tek kopya ekspresyon plazmiti içeren klonların Southern blot analizi ile doğrulanması için genomik DNA'ların restriksiyon enzimi kesimini gösteren jel görüntüsü A) *ADH3* klonları, B) *AOX1* klonları C) *GAP* klonları. M: DIG markır, K: Kontrol (transform edilmemiş), C1-C5: Farklı klonlar

DNAMAN 7.0 programı kullanılarak yapılan restriksiyon analizi sonucu seçilen enzimler, *AOX1* klonları için teorik olarak tek kopyalarda 2 DNA bandı verirken, 2 ve üzeri kopyalarda 3 band verecek ve 3 bandın yoğunluğu kopya sayısı ile doğru orantılı olacaktır. *ADH3* ve *GAP* klonları için tek kopyalarda tek bir DNA bandı verirken 2 ve üzeri kopyalarda DNA bandı her bir kopya artışı için ekspresyon plazmitinin bç kadar büyüyecektir.

Protokole uygun olarak gerçekleştirilen Southern blot analizi ile ekspresyon suşlarının gen kopyaları tespit edilmiştir (Şekil 4.57). Beklenen DNA parçalarının uzunlukları şekillerin altında yazılmıştır. Her üç promotor için seçilen 5 klonunda tek kopya ekspresyon plazmiti içerdiği görülmüştür. Fermentasyon çalışmalarına 1.klonlar ile devam edilmiştir.

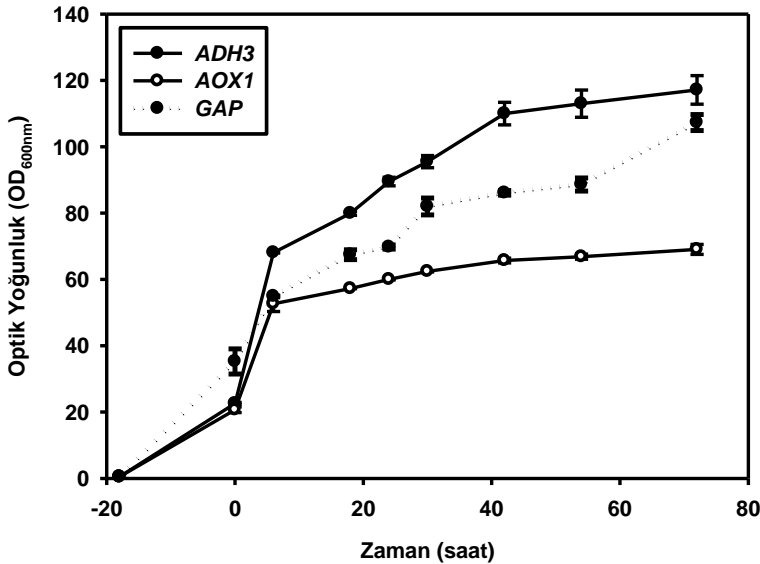


Şekil 4.57. Tranformant ekspresyon klonlarında yapılan Southern blot analizi sonucu X-ray filmin görüntüsü (A) *ADH3* klonları (B) *AOX1* klonları (C) *GAP* klonları. M: DIG etiketli markır, C: Kontrol (gen trasnform edilmemiş), C1-C5:Seçilen farklı klonlar

Karşılaştırma işlemi, aynı konukçu suşta (X33), aynı kopya sayısı içeren klonlar ile (tek kopya) gerçekleştirilmiştir. Ancak *ADH3* promotörü için tetikleyici karbon kaynağı olarak etanol, *AOX1* promotörü için tetikleyici karbon kaynağı olarak metanol ve *GAP* promotörü için de glukoz kullanılmıştır. Rekombinant protein üretimleri elde edilen ve tek kopya ekspresyon plazmiti içeren klonlar ilk olarak erlenmayer koşullarında test edilmiş ve ardından 3 aşamalı yarı-kesikli fermentasyon ile kontrollü (Sıcaklık, pH, Karıştırma hızı, Çözünmüş oksijen) fermentör denemeleri gerçekleştirilmiştir.

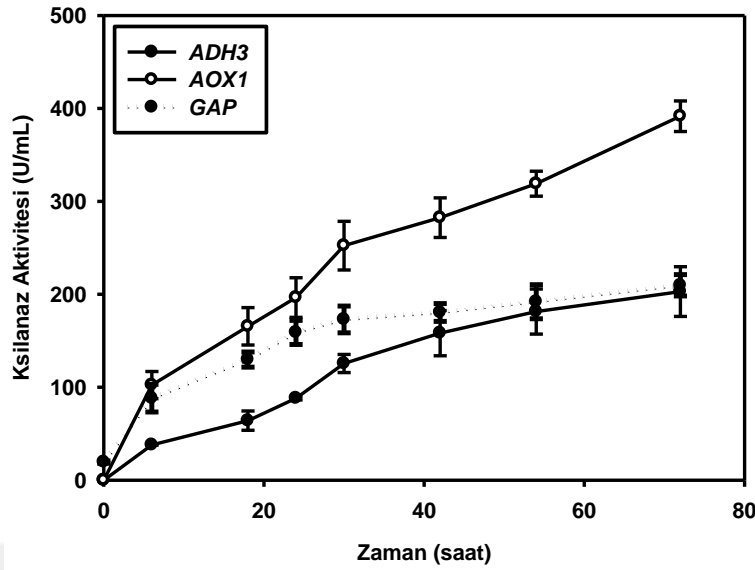
#### 4.8.2. Erlenmayer şartlarında rekombinant protein üretimleri

Tek kopya ksilanaz ekspresyon plazmiti içeren klonlar (*ADH3*, *AOX1* ve *GAP*) donuk kültürden YPD sıvı besiyerine ekilmiş, 30°C çalkalamalı inkübatörde bir gece inkübe edilmiş ve ertesi gün protein ekspresyonu için BMGY besiyerine (BMGY-%2 pepton, %1 yeast ekstrakt, %2 gliserol, %1,34 YNB, 100 mM pH 6 fosfat tamponu-yüksek hücre yoğunluğuna ulaşması için kullanılan besiyeridir) 0,1 OD olacak şekilde inoküle edilmiştir. Yaklaşık 18 saat geliştirilen hücreler 2000xg'de 5 dak. santrifüj edilmiş ve gliserol yerine *ADH3* klonu için etanol, *AOX1* klonu için metanol ve *GAP* klonları için de glukoz içeren aynı özellikteki besiyerinde resüspanse edilerek 72 saat boyunca 30°C 250 rpm çalkalamalı inkübatörde induksiyona bırakılmıştır. Her 12 saatte bir ortama son konsantrasyonu %1 olacak şekilde etanol, metanol ve %2 olacak şekilde glukoz eklenmiştir. Belirli aralıklarla süpernatantlardan örnekler alınarak OD ve ksilanaz aktiviteleri analiz edilmiştir. OD değerlerinin ölçümünden elde edilen grafik Şekil 4.58'de, ksilanaz aktivitesi grafiği ise Şekil 4.59'da verilmiştir. OD ve aktivite ölçüm değerleri Çizelge 4.5'de görülmektedir.



Şekil 4.58. Erlenmayer koşullarında Optik yoğunluğun (OD) zamanla değişimi





Şekil 4.59. Erlenmayer koşullarında alınan süpernatant örneklerinde ölçülen ksilanaz aktivitesi değerlerinin zamanla değişimi

Çizelge 4.5. Erlenmayer koşullarında ksilanaz enzimi üretimi

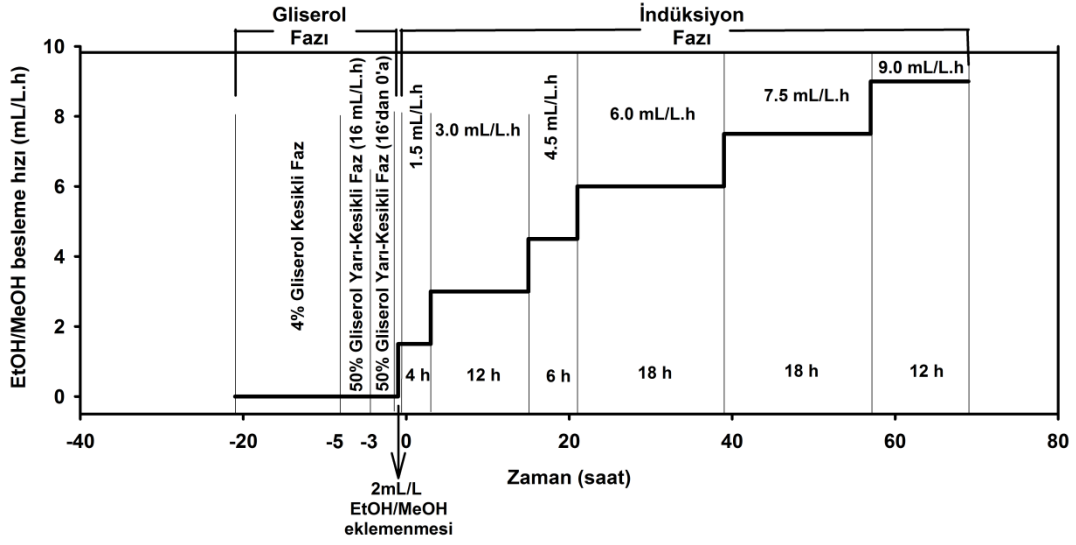
Zaman (saat)	OD değerleri (OD <sub>600nm</sub> )			Ksilanaz aktivitesi (U/mL)		
	ADH3	AOX1	GAP	ADH3	AOX1	GAP
0	22±1	20±1	21±1	0±0	0±0	0±0
6	68±2	52±1	54±1	38±1	102±16	88±15
18	79±2	57±2	67±4	57±10	166±20	130±8
24	89±3	60±1	70±2	89±10	196±21	159±13
30	95±3	62±1	82±1	132±24	252±26	173±14
42	110±3	65±1	86±3	175±24	282±21	180±10
54	113±4	66±1	89±1	199±27	319±14	192±12
72	117±5	69±2	107±3	222±22	392±15	209±6

Erlenmayer koşullarında, belirli aralıklarla alınan süpernatant örneklerinde ksilanaz aktivitesi ölçülmüştür. Ayrıca gelişim ve induksiyon boyunca hücre gelişimi optik yoğunluk (OD) ölçülerek takip edilmiştir. Şekil 4.58’de da görüldüğü gibi etanolde gelişim, metanolde gelişime göre aynı sürede daha yüksek değerler göstermiştir. Ancak enzim aktivitesi sonuçlarına bakıldığında, etanol induksiyonlu üretim ile elde edilen süpernatant örneklerinde ksilanaz aktivitelerinin yaklaşık 1.8 kat daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Rekombinant protein üretimi yaparken hücrelerin karbon kaynağı ve indükleyici aynı madde olduğunda, erlenmayer koşulları kontrolsüz koşullar olduğundan, verim konusunda dalgalanmalar olabilir. Farklı karbon kaynakları

erlenmayer koşullarında karşılaştırılırken hücrelerin bu iki karbon kaynağını kullanım hızı ve bu karbon kaynaklarında gelişim hızı da göz önünde bulundurulmalıdır. Karbon kaynağı aynı zamanda indükleyici de olduğundan, hücreler tarafından daha hızlı tüketilen karbon kaynağı tükendiğinde ortamda indüksiyon da sona erecektir ve belirli aralıklarla yapılan indüksiyon sonucunda adaptasyonlar da protein üretimlerinde dalgalanmalara sebep olmaktadır. Erlenmayer koşullarında etanol besiyerinde daha hızlı gelişim ancak daha düşük enzim aktivitesi bu sebeplere bağlı olabilir.

#### 4.8.3. Fermentör şartlarında *ADH3* promotörü ile rekombinant protein üretimleri

Fermentör koşullarında *ADH3*, *AOX1* ve *GAP* promotörü ile rekombinant ksilanaz ekspresyonu, standart *P. pastoris* fermentasyonu uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon işlemi, 3 aşamalı yarı-kesikli sistemle yürütülmüştür. İnokulum olarak 100 mL BMGY besiyerinde geliştirilmiş (yaklaşık 10 OD) kültür kullanılmıştır. Fermentasyonun ilk aşaması olan kesikli faz (batch), %4 gliserol içeren 2L temel tuz besiyerinde (BSM) gerçekleştirilmiştir ve yaklaşık 16 saat sürmüştür. Ortamda gliserolün varlığı, çözünmüş oksijen düzeyi takip edilerek izlenmiştir. Gliserolün tükenmesi sonucu, çözünmüş oksijen miktarında ani artış gözlenmekte ve böylece kesikli faz sona ermektedir. Bu aşamadan sonra fermentasyonun ikinci aşaması olan gliserol besleme fazı (fed-batch) başlatılmıştır. Bu fazda, 2 saat boyunca %50 gliserol kullanılarak 16 mL/L.sa olacak şekilde gliserol beslemesi yapılmıştır. Bu sürenin sonunda, ortama *AOX1* promotörü için 2 mL/L metanol, *ADH3* promotörü için 2mL/L etanol ilave edilmiş ve gliserol besleme hızı 0 mL/L.sa düzeyine 3 saatlik süre içinde lineer olarak düşürülmüştür. Ortamdaki karbon kaynaklarının tükenmesi ile çözünmüş oksijen miktarında ani artış gözlenmiş ve fermentasyonun 3. aşaması olan indüksiyon fazına geçilmiştir. Bu fazda 72 saat boyunca *ADH3* promotörü için etanol, *AOX1* promotör için metanol ve *GAP* promotörü için de glukoz beslemesi yapılmıştır. Besleme yapılan indükleyici karbon kaynakları 12 mL/L PTM1 tuzları içermektedir. 72 saat indüksiyon fazında, besleme hızı 1,5 mL/L.sa'den 9 mL/L.sa düzeyine kadar kademeli olarak yükseltilmiştir. Ancak, *GAP* promotörü için yapılan fermentasyonlarda %50'lik glukoz çözeltisi ile besleme yapıldığı için besleme hızı 3,0 mL/L.sa'den 18 mL/L.sa uygulanmış ve besleme hızı artış zamanları *ADH3* ve *AOX1* fermentasyonlarında olduğu gibi uygulanmıştır. Fermentasyon işleminin zamana karşı besleme programı Şekil 4.60'da şematik olarak gösterilmiştir. İşlem boyunca; sıcaklık 30°C, pH değeri 5,0, karıştırma hızı 1000 rpm ve hava beslemesi 1,5 vvm olacak şekilde sabit tutulmuştur. Çözünmüş oksijen miktarı ise, gerektiğinde saf oksijen eklenerek, %30 olacak şekilde kontrol edilmiştir. Fermentasyon sisteminin görüntüsü Şekil 4.61'de verilmiştir.



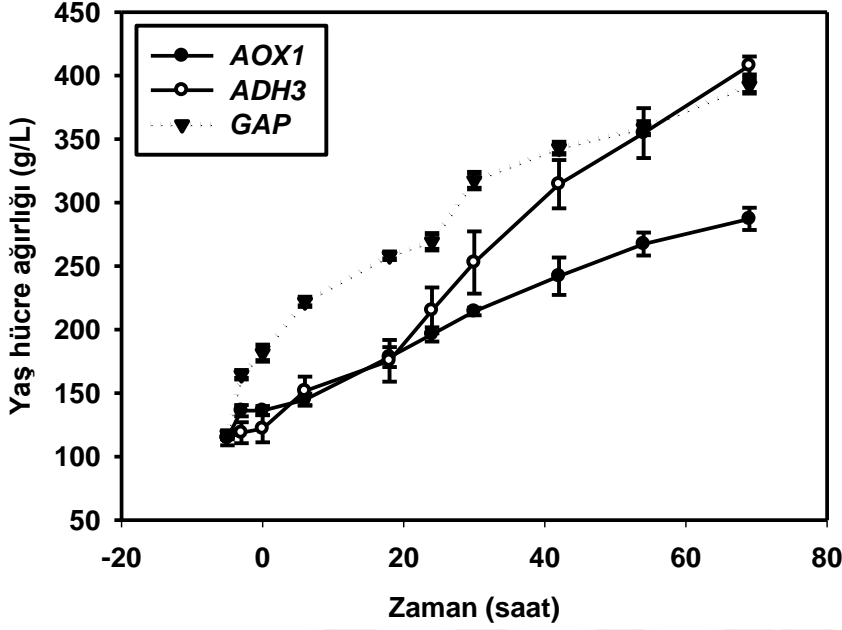
Şekil 4.60. Fermentasyon besleme programı



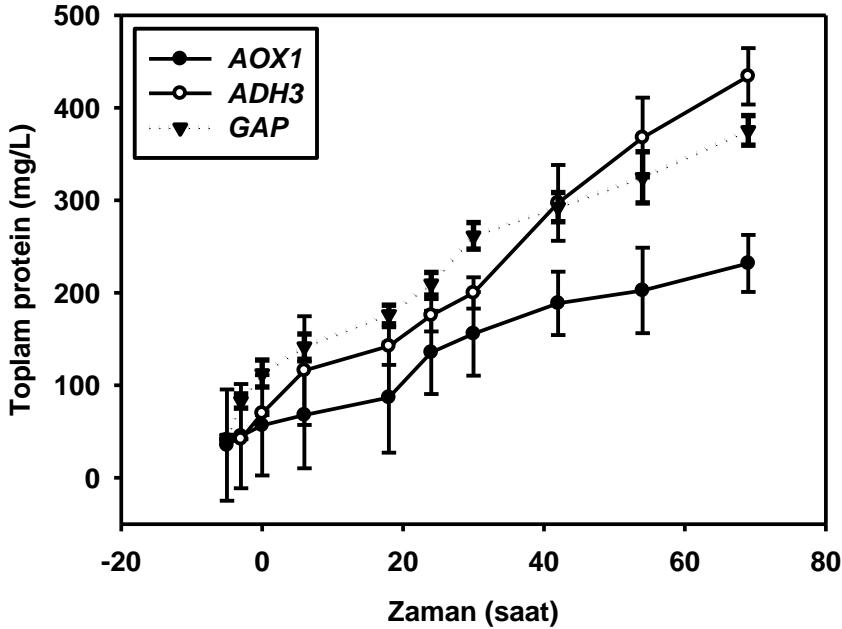
Şekil 4.61. Fermentasyonlar esnasında çekilen fotoğraf (Sistem; Sartorius stedim Biostat® B 2x5 L Bioreactor)

*ADH3*, *AOX1* ve *GAP* promotörü ile rekombinant ksilanaz üretimleri 72 saat sürdürülmüştür. Fermentasyonun belirli noktalarından alınan örneklerde yaş hücre ağırlığı (Wet Cell Weight (WCW)), süpernatantların toplam protein miktarı ve ksilanaz aktivite değerleri ölçülmüştür. Sonuçlar, paralelli yürütülen fermentasyonların ortalaması olarak verilmiştir. Şekil 4.62'de fermentasyon boyunca WCW değişimi gösterilmiştir. Şekil 4.63 ve Şekil 4.64'de ise süpernatant örneklerinde ölçülen toplam

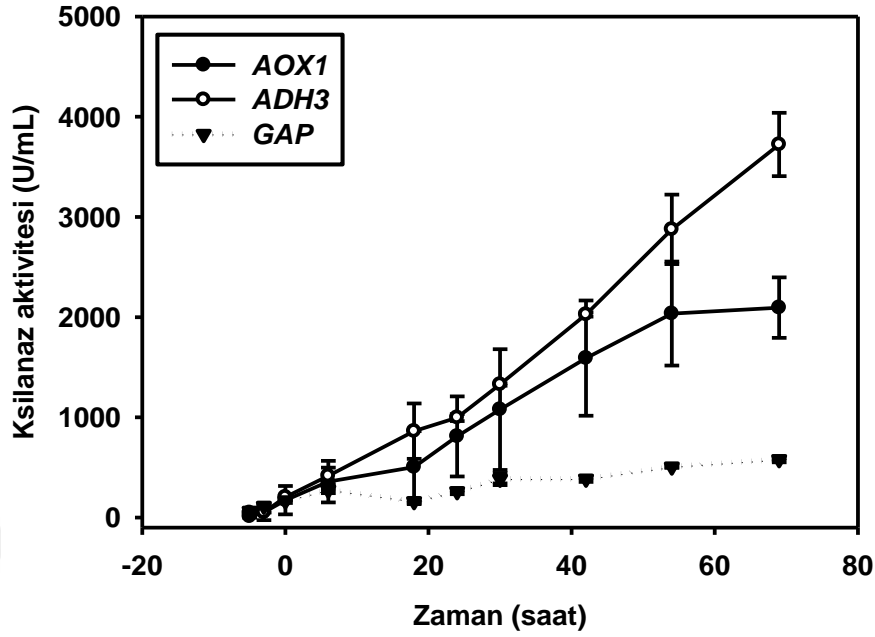
protein ve ksilanaz aktivite değerleri yer almaktadır. Sayısal değerler çizelge olarak aşağıda verilmiştir (Çizelge 4.6). Ayrıca süpernatant örneklerinde üretilen protein SDS-PAGE analizi ile analiz edilmiştir (Şekil 4.65).



Şekil 4.62. Fermentasyon boyunca yaş hücre ağırlığının (WCW) zamanla değişimi



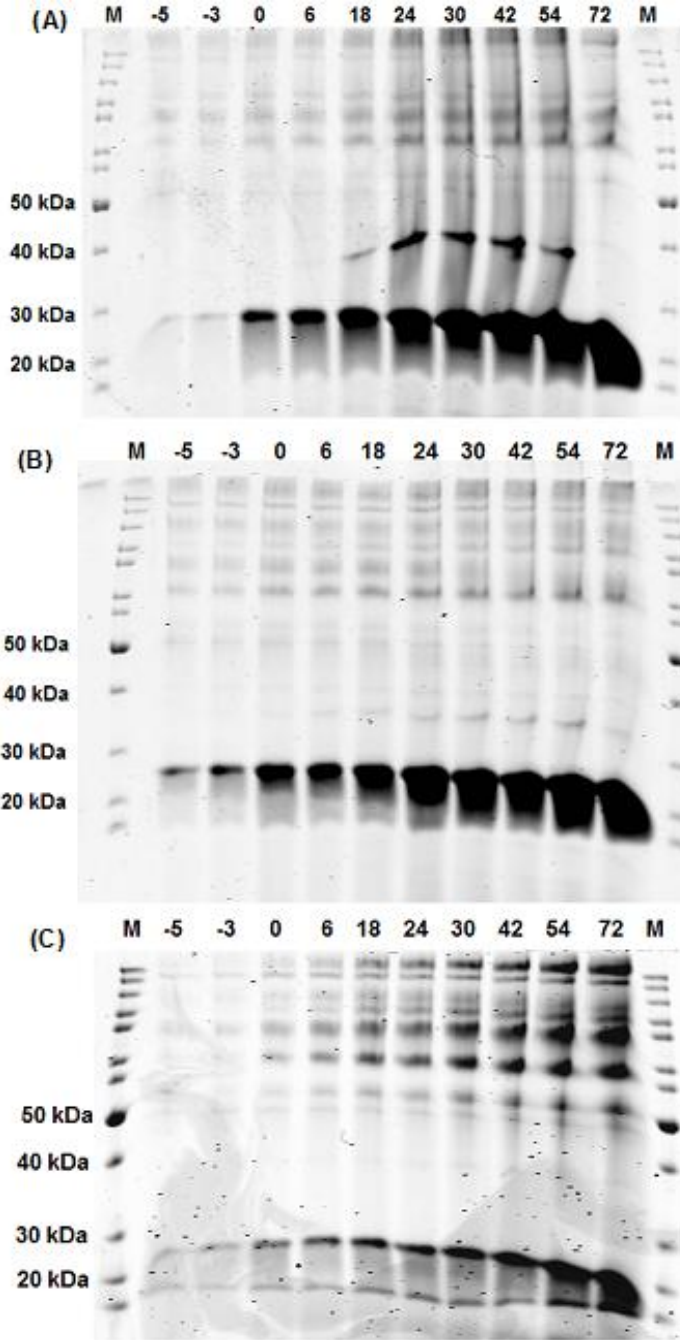
Şekil 4.63. Fermentasyon boyunca alınan süpernatant örneklerinde ölçülen toplam protein değerlerinin zamanla değişimi



Şekil 4.64. Fermentasyon boyunca alınan süpernatant örneklerinde ölçülen ksilanaz aktivitesi değerlerinin zamanla değişimi

Çizelge 4.6. Fermentör koşullarında zamana karşı Yaş hücre ağırlığı, Toplam protein miktarı ve Ksilanaz aktivite değişimi

Zaman (saat)	Yaş hücre ağırlığı (g/L)			Toplam protein (mg/L)			Ksilanaz aktivitesi (U/mL)		
	ADH3	AOX1	GAP	ADH3	AOX1	GAP	ADH3	AOX1	GAP
-5	114±6	114±1	117±2	40±1	35±18	43±2	47±4	11±12	65±1
-3	118±8	136±5	165±3	42±1	45±16	83±8	51±2	51±77	115±1
0	121±11	136±4	182±6	69±2	56±14	113±15	204±6	173±142	169±14
6	151±11	144±5	222±3	115±58	67±17	142±14	416±82	358±207	276±24
18	175±16	178±8	258±3	142±20	86±19	177±10	862±276	503±358	161±18
24	215±18	196±6	269±6	175±18	135±45	210±12	997±34	809±399	260±19
30	252±25	214±3	317±6	199±17	155±45	262±14	1328±12	1077±602	384±52
42	314±19	242±15	343±5	297±41	188±34	293±16	2027±21	1591±574	385±21
54	354±20	267±9	359±5	367±43	202±46	325±28	2876±346	2035±519	506±1
72	408±7	287±9	392±6	434±31	231±31	376±16	3723±316	2095±301	581±21



Şekil 4.65. Fermentasyondan alınan örneklerin zamana karşı SDS-PAGE analizi. A) *ADH3* promotörü ile üretim, B) *AOX1* promotörü ile üretim (C) *GAP* promotörü ile üretim

Fermentör koşullarında *ADH3*, *AOX1* ve *GAP* promotörleri ile yapılan rekombinant ksilanaz üretimlerinin 72. Saatinde elde edilen veriler ile hesaplanan fermentasyon parametreleri Çizelge 4.7'de verilmiştir. Fermentasyon boyunca *ADH3* ve *AOX1* için 850 mL, *GAP* için 1.7 L substrat beslemesi yapılmıştır. Ancak besleme kademeli olarak arttırıldığı lineer olarak besleme yapılmadığı için veriler,fermentasyonun bitirildiği 72.saat verileri ile hesaplanmıştır.

Çizelge 4.7. Fermentör koşullarında *ADH3*, *AOX1* ve *GAP* promotorları ile rekombinant protein üretimlerinin 72. saat fermentasyon parametreleri

Parametre	Promotorlar		
	<i>ADH3</i>	<i>AOX1</i>	<i>GAP</i>
Promotor			
Fermentasyon süresi, h (saat)	72	72	72
Fermentasyon hacmi (L)	3,5	3,5	4,5
Hücre yoğunluğu, <i>X</i> (g/L)	408	287	392
Enzim aktivitesi, <i>P</i> (U/L)	$3,72 \times 10^6$	$2,10 \times 10^6$	$5,81 \times 10^5$
Üretim oranı, <i>P<sub>e</sub></i> (U/L/h)	$14,77 \times 10^3$	$8,31 \times 10^3$	$1,79 \times 10^3$
Spesifik üretkenlik (U/g hücre/h)	126,73	101,38	20,58
Spesifik biyokütle verimi (%); <i>Y<sub>X/S</sub></i> (g hücre/g substrat)	0,61	0,43	0,46
Hesaplama zamanı	72. saat	72. saat	72. saat

Fermentörde yapılan *ADH3*, *AOX1* ve *GAP* promotorları altında ksilanaz üretimleri, farklı saatlerde alınan süpernatant örneklerinde aktivite ölçülerek karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, 72. saat örneklerinde *ADH3* promotoru altında yaklaşık 1,8 kat daha yüksek aktivite kaydedilmiştir. Alınan süpernatant örneklerinden toplam protein miktarı ölçülmüştür ve *ADH3* fermentasyon örneklerinde *AOX1* örneklerinin yaklaşık 1,8 katı daha yüksek protein içerdiği tespit edilmiştir. Fermentasyon boyunca hücrelerin yaş ağırlığındaki değişim de takip edilmiştir. Aynı OD ile başlatılan fermentasyonlar, gliserol fazının (ilk 2 faz; gliserol batch ve gliserol fed-batch) bitimine kadar yaş hücre ağırlığı bakımından benzer artış göstermiştir. Ancak induksiyon fazının sonunda (72. saat) etanolün kullanıldığı suşun yaş hücre ağırlığı (yaklaşık 400 g/L), metanol kullanılabildiğine göre (yaklaşık 290 g/L) daha yüksek değerlere ulaşmıştır. Bunun nedeni, etanolün metanole göre kullanılabilirliğinin daha yüksek olmasına bağlanmıştır.

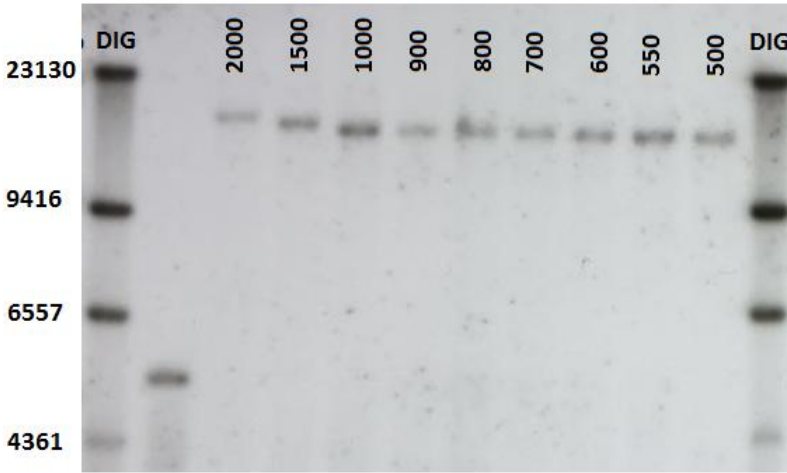
#### 4.9. *ADH2* Promotor Bölgesinin Belirlenmesi ve Rekombinant Protein Üretiminde Test Edilmesi

##### 4.9.1. *ADH2* promotor bölgesinin belirlenmesi

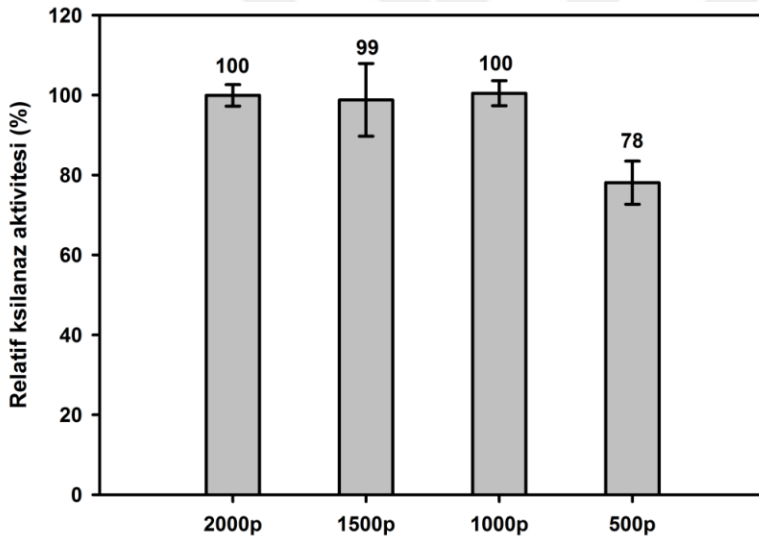
*ADH2* promotor bölgesinin belirlenmesi için ilk olarak promotor bölgesi 2000 bp uzunluğundan 500 bp'e kadar 500'er baz azaltılarak analiz edilmiştir. Analizlerde ksilanaz raportör gen olarak kullanılmıştır. *P. pastoris HIS4* geni içeren ekspresyon plazmitlerindeki *HIS4* geni kullanılarak ekspresyon plazmitleri *HIS4* lokusuna entegre edilmiştir.

Çalışmalarda tek kopya ekspresyon plazmiti içeren klonlar kullanılmıştır. Transformasyon sonrası tek kopya ekspresyon plazmiti içeren klonlar Southern blot analizi ile tespit edilmiştir. Çalışmada elde edilen farklı uzunluktaki promotor içeren tüm klonların Southern blot film görüntüsü Şekil 4.66'da verilmiştir. Aktivitenin değişmeden devam ettiği en kısa bölge tespit edilerek promotor bölgesi yaklaşık olarak belirlenmiştir. Analiz sonucunda, seçilen promotor uzunluklarından 100 bp DNA bölgesine kadar aktivite değişmeden kalmakta ve 500 bp alınan DNA bölgesinde aktivitede düşüş olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.67). Bu nedenle, *ADH2* promotor

bölgesinde 1000 bç'den 100'er baz olacak şekilde 500 bç'e kadar tekrar analiz edilmiştir.



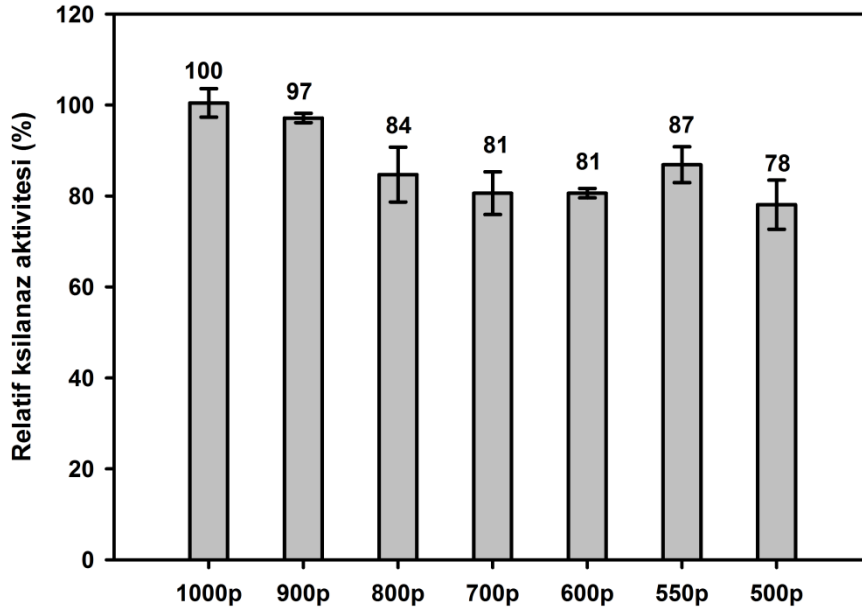
Şekil 4.66. Farklı uzunluktaki *ADH2* promotorlarının *P. pastoris* genomundaki kopya sayısını gösteren X-Ray film görüntüsü



Şekil 4.67. *ADH2* promotor bölgesinin 2000-500 bç uzunluktaki bölgelerinin analizi ile elde edilen aktivite değerleri

*ADH2* promotor bölgesinin 1000 bç'den 100'er baz azaltılarak yapılan analiz sonucunda *ADH2* promotor bölgesi 900 bç olarak belirlenmiş ve *ADH2* promotoru ile rekombinant protein üretimi çalışmalarında aktivitenin değişmeden kaldığı 900 bç promotor ile devam edilmiştir (Şekil 4.68).

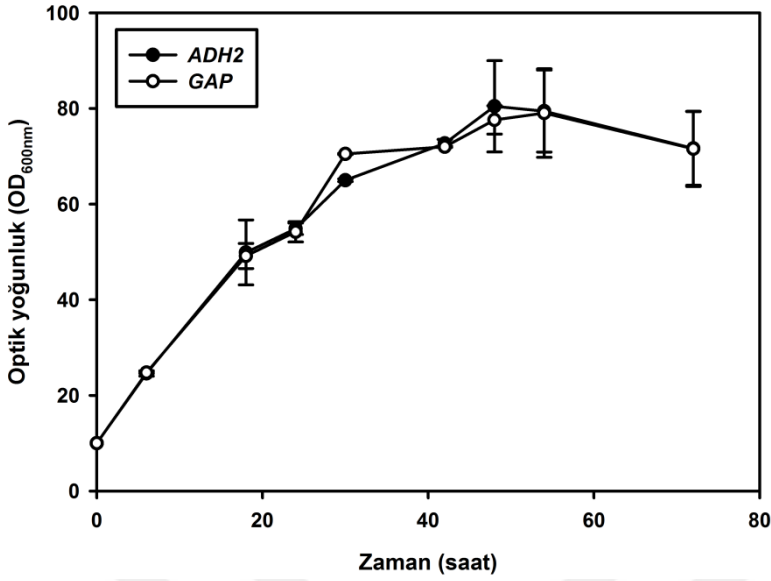




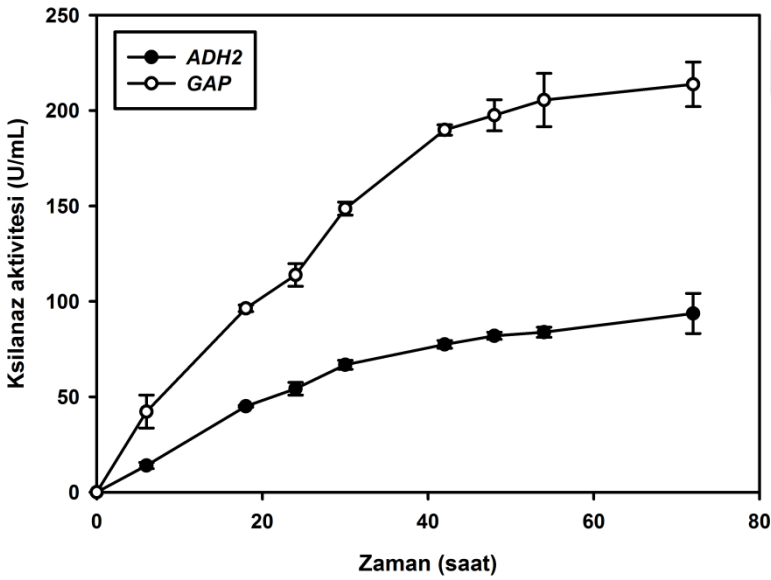
Şekil 4.68. *ADH2* promotor bölgesinin 1000-500 bp uzunluktaki bölgelerinin analizi ile elde edilen aktivite değerleri

#### 4.9.2. Erlenmayer koşullarında protein üretimi

*ADH2* promotoru ile rekobinant protein üretimi *P. pastoris GAP* promotoru ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma hem erlenmayer şartlarında hem de fermentör koşullarında gerçekleştirilmiştir. Tek kopya ksilanaz ekspresyon plazmiti içeren klonlar (*ADH2* ve *GAP*) donuk kültürden YPD sıvı besiyerine ekilmiş, 30°C çalkalamalı inkübatörde bir gece inkübe edilmiş ve ertesi gün protein ekspresyonu için BMGY besiyerine (BMGY-%2 pepton, %1 maya ekstraktı, %2 gliserol, %1,34 YNB, 100 mM pH 6 fosfat tamponu- yüksek hücre yoğunluğuna ulaşması için kullanılan besiyeridir) 0,1 OD olacak şekilde inoküle edilmiştir. Yaklaşık 18 saat geliştirilen hücreler 2000xg'de 5 dak. santrifüj edilmiş ve gliserol yerine glukoz içeren aynı özellikteki besiyerinde çözülerek edilerek 72 saat boyunca 30°C 250 rpm çalkalamalı inkübatörde indüksiyona bırakılmıştır. Her 12 saatte bir ortama son konsantrasyonu %2 olacak şekilde glukoz eklenmiştir. Belirli aralıklarla süpernatantlardan örnekler alınarak hücre optik yoğunluğu ve ksilanaz aktiviteleri analiz edilmiştir. Elde edilen zamana karşı hücre yoğunluğu grafiği Şekil 4.69'da ve süpernatant örneklerinde ölçülen ksilanaz aktivitesini gösteren grafik ise Şekil 4.70'de verilmiştir.



Şekil 4.69. Erlenmayer koşullarında Optik yoğunluğun (OD) zamanla değişimi



Şekil 4.70. Erlenmayer koşullarında alınan süpernatant örneklerinde ölçülen ksilanaz aktivitesi değerlerinin zamanla değişimi

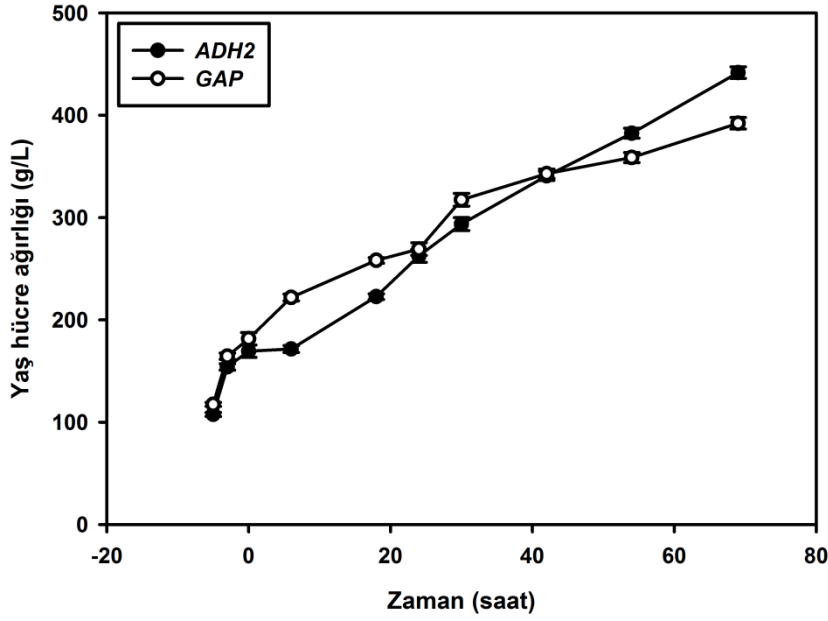
Erlenmayer koşullarında, belirli aralıklarla alınan süpernatant örneklerinde ksilanaz aktivitesi ölçülmüştür. Enzim aktivitesi sonuçlarına bakıldığında, iki promotörün farklı kuvvetlerde olduğu açıkça görülmektedir. *GAP* promotörü ile yapılan üretimlerde *ADH2* promotörüne göre yaklaşık 2 katı düzeyinde ksilanaz aktivite değerleri elde edilmiştir. İstatistiksel olarak *GAP* ve *ADH2* promotör aktivitelelerinden birbirinden farklıdır ( $p < 0,05$ ). Protein üretim seviyelerinde bu denli fark gözlenmesine rağmen hücre yoğunlukları arasında istatistiksel olarak fark tespit edilmemiştir ( $p < 0,05$ ). Zamana karşı elde edilen hücre yoğunlukları ve ksilanaz aktivitesi değerleri Çizelge 4.7’de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Erlenmayer koşullarında ksilanaz enzimi üretimi

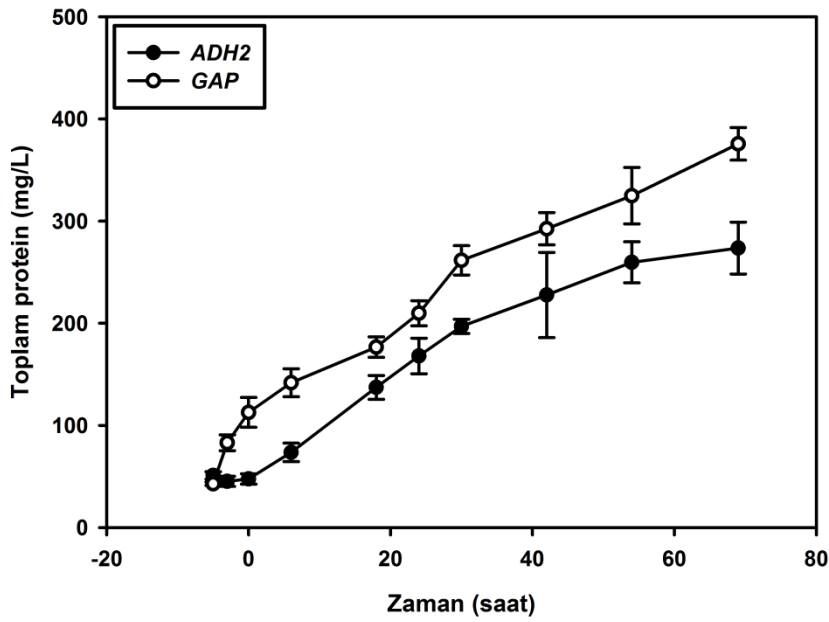
Zaman (saat)	OD değerleri (OD <sub>600nm</sub> )		Ksilanaz aktivitesi (U/mL)	
	<i>ADH2</i>	<i>GAP</i>	<i>ADH2</i>	<i>GAP</i>
0	10±1	10±1	0±0	0±0
6	24±1	25±1	14±2	42±9
18	50±7	49±3	45±1	96±2
24	55±1	54±2	54±3	114±6
30	65±1	71±1	67±2	149±3
42	73±1	72±1	77±2	190±3
48	80±10	78±3	82±2	198±8
54	79±9	79±9	84±3	205±14
72	72±8	72±8	94±7	214±12

#### 4.9.3. Fermentör şartlarında *ADH2* promotörü ile rekombinant protein üretimleri

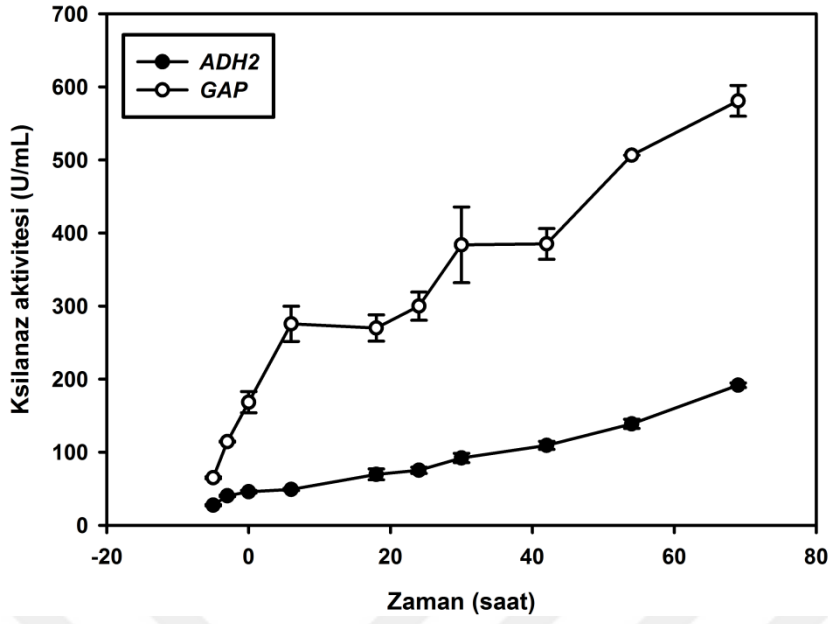
*ADH2* promotörü ile rekombinant protein üretimi fermentör şartlarında da test edilmiştir. *ADH2* promotörü ile rekombinant ksilanaz üretimleri 72 saat sürdürülmüştür. Fermentasyon *GAP* promotörü için yukarıda anlatıldığı gibi yürütülmüştür. Fermentasyonun belirli noktalarından alınan örneklerde yaş hücre ağırlığı (Wet Cell Weight (WCW)), süpernatantların toplam protein miktarı ve ksilanaz aktivite değerleri ölçülmüştür. Sonuçlar, paralelli yürütülen fermentasyonların ortalaması olarak verilmiştir. Şekil 4.71'de fermentasyon boyunca WCW değişimi gösterilmiştir. Şekil 4.72 ve Şekil 4.73'de ise süpernatant örneklerinde ölçülen toplam protein ve ksilanaz aktivite değerleri yer almaktadır. Toplam protein Bradford Comassie Blue Plus ile ölçülmüştür. Çizelge 4.8'de ise ham değerler gösterilmiştir. Ayrıca süpernatant örneklerinde üretilen protein SDS-PAGE analizi ile belirlenmiştir (Şekil 4.74).



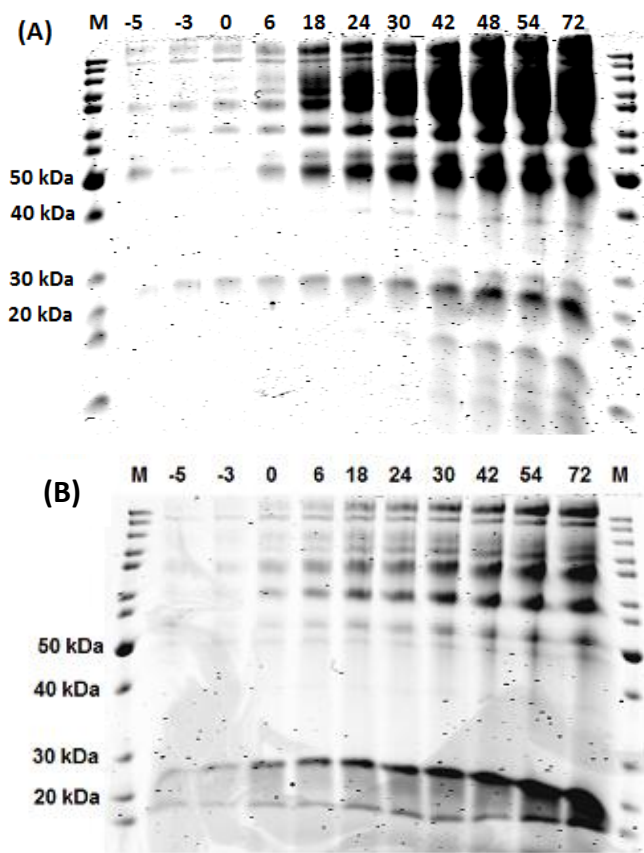
Şekil 4.71. Fermentasyon boyunca yaş hücre ağırlığının (WCW) zamanla değişimi



Şekil 4.72. Fermentasyon boyunca alınan süpernatant örneklerinde ölçülen toplam protein değerlerinin zamanla değişimi



Şekil 4.73. Fermentasyon boyunca alınan süpernatant örneklerinde ölçülen ksılanaz aktivitesi değerlerinin zamanla değişimi



Şekil 4.74. Fermentasyondan alınan örneklerin zamana karşı SDS-PAGE analizi. A) *ADH2* promotörü ile üretim, B) *GAP* promotörü ile üretim

Çizelge 4.9. Fermentör koşullarında zamana karşı Yaş hücre ağırlığı, Toplam protein miktarı ve Ksilanaz aktivite değişimi

Zaman (saat)	Yaş hücre ağırlığı (g/L)		Toplam protein (mg/L)		Ksilanaz Aktivitesi (U/mL)	
	<i>ADH2</i>	<i>GAP</i>	<i>ADH2</i>	<i>GAP</i>	<i>ADH2</i>	<i>GAP</i>
-5	107±2	117±2	51±6	43±2	27±1	65±1
-3	154±1	165±3	45±1	83±8	40±1	115±1
0	169±6	182±6	47±1	113±15	45±2	169±14
6	171±2	222±3	73±4	142±14	49±2	276±24
18	222±6	258±3	137±10	177±10	69±7	161±18
24	262±4	269±6	167±9	210±12	75±4	260±19
30	293±7	317±6	196±8	262±14	92±6	384±52
42	340±7	343±5	227±11	293±16	109±3	385±21
54	382±5	359±5	259±8	325±28	138±6	506±1
72	441±5	392±6	273±3	376±16	191±6	581±21

Fermentör şartlarında *ADH2* promotörü ile yapılan rekombinant ksilanaz üretimi *GAP* promotörü ile karşılaştırıldığında, elde edilen sonuçlara göre, 72. saat örneklerinde yaş hücre ağırlığı, toplam protein ve ksilanaz aktiviteleri *GAP* promotörü ile *ADH2* promotörüne göre daha yüksek değerlerde seyretmiştir. Bu sonuç istatistiksel olarak da doğrulanmıştır ( $p < 0,05$ ). Spesifik üretkenlik değerleri, *GAP* promotörü için 20,59 iken *ADH2* promotörü için 6,06 U/g<sub>WCW</sub>/h olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak, *ADH2* promotörünün rekombinant protein üretimi için *GAP* promotörüne göre daha güçsüz bir promotör olduğu ortaya konulmuştur.

## 5. TARTIŞMA

*P.pastoris* GS115 genomu dizilenmiş ve bir tane alkol dehidrogenaz geni tanımlanmıştır (De Schutter vd. 2009). *ADH3* (XM\_002491337) olarak tanımlanan bu gen ilk kez bu çalışmada araştırılmış ve fonksiyonu ortaya konmuştur. Mayalarda, Adh enzimi izoenzimler halinde bulunmakta ve bu genlerin sayısı ve fonksiyonu farklı mayalarda değişkenlik göstermektedir (Ciriacy 1975, Saliola vd 1990, Shain vd 1992, Mazzoni vd 1992, Fredlund vd 2006, Cho ve Jeffries 1998). *P. pastoris*'te bulunan diğer muhtemel *ADH* genlerinin tespit edilmesi için, *P. pastoris* genomunda *ADH3* genine düşük de olsa homoloji gösteren beş gen araştırılmıştır.

*ADH3* geni *P. pastoris* GS115 suşunda,  $\Delta adh3:HIS4$  kaseti ile inaktif edilmiştir ve transformantların seleksiyonunda *HIS4* geni markır olarak kullanılmıştır. Southern blot ile de inaktif olduğu doğrulanan MK115 ( $\Delta adh3$ ) ve kontrol olarak kullanılan *P. pastoris* suşlarının glukoz ve etanol içeren minimal besiyerinde üreme davranışları (Gelişim eğrisi, Glukoz tüketimi, Etanol üretimi ve adh aktivitesi) analiz edilmiştir. MD besiyeri üzerinde,  $\Delta adh3$  ve kontrol suşunun üreme eğrileri (OD) arasında farklılık gözlenmemiştir. Ancak MD besiyerinde etanol konsantrasyonlarında büyük fark olduğu tespit edilmiştir. En yüksek etanol konsantrasyonu MK115 ( $\Delta adh3$ ) suşunda %0,2 olmasına rağmen, X33 suşuda %0,04 olarak tespit edilmiştir. MK115 ( $\Delta adh3$ ) suşunun ME besiyerinde üreme yeteneğini kaybetmesi, etanol konsantrasyonlarında ortaya çıkan bu farkın; etanol üretimlerinin farklı olmasından değil, etanol tüketimlerinin farklı olmasından kaynaklandığını desteklemektedir. Dolayısıyla X33 suşu, MD besiyerinde üretilen etanolü tüketirken; MK115 ( $\Delta adh3$ ) suşunun, üretilen etanolü katabolize edememesine bağlı olarak ortamda etanol birikmektedir. Bu sonucu Adh aktivitesindeki farklılıklar da desteklemektedir (Şekil 4.18D). MK115 ( $\Delta adh3$ ) suşunun MD besiyerinde maksimum Adh aktivitesi, aynı besiyerinde X33 suşunun Adh aktivitesinin yaklaşık %10'u kadardır (14U/mg karşı 1.4U/mg).

X33 suşu MD ve ME besiyerlerinde karşılaştırıldığı zaman Adh aktivitelerinde farklılıklar gözlenmiştir (Şekil 4.18A ve 4.18C). X33 suşu ME besiyerinde (38U/mg) MD besiyerine göre (14U/mg) %270 daha yüksek Adh aktivitesi göstermiştir. *P. pastoris*'te MD besiyerinde toplam adh aktivitesinin büyük bir kısmından *ADH3* geninin sorumlu olduğu anlaşılmaktadır. MK115 ( $\Delta adh3$ ) suşu etanol (ME) besiyerinde üremediği için adh aktivitesi tespit edilememiştir.

MK115 ( $\Delta adh3$ ) suşu gerek tek karbon kaynağı olarak etanolü gerekse MD besiyerinde üretilen etanolü kullanamamaktadır. Sonuçlar, inaktif edilen *ADH3* geninin *P. pastoris* etanol metabolizmasında etanolün katabolize (parçalanması) edilmesinde görev alan tek gen olduğunu göstermektedir.

*P. pastoris*'de yapılan proteom çalışmasında gliserol üzerinde gelişen hücrelerde 2 alkol dehidrogenaz enzimi (*ADH3* ve *ADH*) tanımlanmıştır (Vanz vd 2012). Bu enzimlerden Adh3'ün, hücre içi proteomda göze çarpan bir bileşen olduğunu belirtmişlerdir. Nitekim, histag yöntemiyle, hücre içi protein saflaştırılması sırasında diğer çalışmalarımızda yoğun miktarda gözlenen kontaminant proteinin, MK115 ( $\Delta adh3$ ) suşunda ortadan kalkması bu bandın *ADH3* olduğunu göstermiştir (Şekil 4.17). Vanz vd (2012) çalışmasında *ADH* olarak tanımlanan gen, bu çalışmada *ADH1* olarak

adlandırılmış ve karakterize edilmiştir. Fakat elde edilen sonuçlar, yapılan deney şartlarında *ADH1* geninin etanol metabolizmasında gözlenebilir bir rol olmadığını ortaya koymuştur.

*ADH3* geni ve Adh aktivitesi göstermesi muhtemel 5 genin ekspresyon oranları qRT-PZR (Quantative Reverse Transcriptase PCR) tekniği ile belirlenmiştir. X33 ve MK115 (*Δadh3*) suşlarında MD ve ME besiyerlerinde ilgili genlerin ekspresyon seviyelerinde önemli farklılıklar tespit edilmiştir. Özellikle X33 suşunda glukoz içeren besiyerinde gelişen hücrelerde etanol besiyerine göre *adhI* ve *adhII* ~6.5 kat, *adhV* ~5 kat daha fazla ekspres olmuştur (Şekil 36). Aynı şekilde MK115 (*Δadh3*) suşunda glukoz içeren besiyerinde gelişen hücrelerde etanol besiyerine göre *adhI* ve *adhII* ~9.5 kat, *adhV* ~4 kat daha yüksek ekspresyon göstermiştir. Diğer genlerin (*adhIII* ve *adhIV*) ve literatür doğrultusunda çalışmaya sonradan dahil edilen *ADH1* geninin ekspresyon seviyelerinde önemli bir değişiklik olmamıştır. Etanol tüketiminden sorumlu olarak tanımladığımız *ADH3* geni, X33 suşunda etanol besiyerine göre glukoz besiyerinde daha az ekspres olmuştur. MK115 (*Δadh3*) suşunda *ADH3* geni ekspresyonu gözlenmemiş ve bu genin inaktif olduğu mRNA seviyesinde de teyit edilmiştir.

Elde edilen qRT-PCR sonuçları, glukoz içeren besiyerinde etanol üretiminden sorumlu gen/genlerin, ekspresyon seviyesindeki artış, çalışma kapsamındaki muhtemel genlerden *adhI*, *adhII* ve *adhV* olma ihtimalini arttırmıştır. Bu genlerin, zeosin dayanıklılık geni kullanılarak ayrı ayrı inaktivasyonları yapılmıştır. Yabani suş (X33) MD besiyerinde etanol üretmesine rağmen *ADH3* geni aktif olduğu ve üretilen etil alkolü katabolize ettiği için ortamda etanol birikmemektedir (en yüksek %0,03). Bu nedenle üretimden sorumlu genin tespit edilebilmesi için, muhtemel genlerin inaktivasyon işlemleri *P. pastoris* MK115 (*Δadh3*) suşunda yapılarak, ikili mutant suşlar oluşturulmuştur. Glukoz içeren besiyerinde, mutant suşların üremeleri incelenmiştir. İlk 24. saate kadar farklılık göstermemelerine rağmen, 24. saatten sonra özellikle *adhII* mutant suşu farklılık göstermiştir. Bu farklılık glukoz tüketim miktarları ile de teyit edilmiştir. *adhII* mutant suşun, glukozun ancak %1 lik kısmını kullandığı ve etanol üretmediği, dolayısıyla etanol üretiminde rol aldığı gözlenmiştir. Bu aşamadan itibaren *adhII* geni *ADH2* olarak isimlendirilmiştir. *ADH2* geninin tekli mutant suşu, *Δadh2* ile yapılan analizler *P. pastoris* etanol metabolizmasında *ADH2* geninin etanol üretiminden tek başına sorumlu olmadığını ve etanol üretiminde *ADH3* geninin de rol aldığını ortaya koymuştur. Bu çıkarım, *Δadh2* suşunda glukoz içeren besiyerinde az da olsa etanol üretiminin olması ile de desteklenmektedir. Sonuç olarak, *P. pastoris* etanol metabolizmasında etanol üretiminden sorumlu majör gen *ADH2* iken, *ADH3* geni de *ADH2* geninin inaktif olduğu şartlarda etanol üretiminde rol almaktadır. Etanol üretiminin yaklaşık %80'inden *ADH2* sorumlu iken, %20'lik kısmından da *ADH3* sorumlu olduğu görülmüştür. Nocon vd (2014) çalışmalarında, *P. pastoris*'te *adh2* genini sildiklerini ancak etanol üretiminin devam ettiğini bildirmişlerdir. Nocon vd.'nin çalışmalarında *adh2* olarak belirttikleri gen, bu çalışmada muhtemel genlerden *adhIV* olarak adlandırılan gen ile aynıdır.

*Δadh3* ve *Δadh2Δadh3* suşlarının fermentör ortamında, glukoz besiyerinde, farklı çözünmüş oksijen seviyelerinde (%5 ve %30 DO) etanol üretme yetenekleri test edilmiştir. Sonuçlar, *ADH2* ve *ADH3* genlerinin %30 DO değerinde daha yüksek seviyede ekspres olduğunu göstermiştir. Yapılan deneyler, %30 çözünmüş oksijende



fermentasyonun 3 saat, %5 oksijen seviyesinde ise 4 saat sürdüğünü göstermiştir. Bunun sebebinin, hücrelerin yüksek oksijen seviyesinde (%30) glukozu daha hızlı kullanması olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, bir sonraki aşama olan *ADH3* ve *ADH2* promotorları ile rekombinant protein üretiminde kullanılacak olan çözünmüş oksijen seviyesini belirlemek için, %5 ve %30 DO'da gelişen hücrelerden örnek alınarak toplam RNA izolasyonu yapılmış, *ADH2* ve *ADH3* genlerinin ekspresyon seviyeleri analiz edilmiştir. Sonuçlar, %30 DO seviyesinde gen ekspresyonlarının daha yüksek olduğunu göstermiştir.

Çalışma kapsamında, *ADH3* promotoru altında rekombinant protein üretimi, *P. pastoris*'te en yaygın kullanılan *AOX1* ve *GAP* promotorları ile karşılaştırılarak test edilmiştir. Karşılaştırma işlemi, erlenmayer ve fermentör ortamında, tek kopya ekspresyon kaseti içeren klonlarda, *A. niger* ksilanaz enzimi üretilerek gerçekleştirilmiştir. Erlenmayer koşullarında, etanolde gelişim, metanolde gelişime göre aynı sürede daha yüksek değerler göstermiştir. Ancak enzim aktivitesi sonuçlarına bakıldığında, etanol indüksiyonlu üretim ile elde edilen süpernatant örneklerinde ksilanaz aktivitelerinin *AOX1* promotoruna göre yaklaşık 1.8 kat daha düşük olduğu tespit edilmiştir. *GAP* promotoru ile (209 U/mL) ve *ADH3* promotoru ile (222 U/mL) elde edilen aktivite değerleri arasında kayda değer bir fark gözlenmemiştir ( $p < 0,05$ ). Ancak erlenmayer koşullarının kontrolsüz koşullar olması ile birlikte, karbon kaynağı ve indükleyicinin de aynı madde olması sebebiyle verim konusunda dalgalanmalar olabilmektedir. Bu nedenle, erlenmayer koşullarında elde edilen sonuçlar karşılaştırma açısından çok sağlıklı olmamaktadır. Dolayısıyla rekombinant protein üretiminde promotorların karşılaştırılmasına fermentör analizleri ile devam edilmiştir. Elde edilen sonuçlar ve sonuçların istatistiksel analizleri Ek 8.8-8.11'de sunulmuştur.

Fermentör koşullarında; *ADH3* promotoru (3723U/mL) altında *AOX1* promotoruna (2095U/mL) göre 1,8 kat; *GAP* promotoruna (581U/mL) göre 6,4 kat düzeyinde ksilanaz aktivitesi elde edilmiştir. Fermentasyon kültüründen ölçülen yaş hücre ağırlıkları indüksiyon fazının 72.saatinde, *ADH3* promotoru ile 400 g/L iken, *AOX1* promotoru ile 290 g/L'ye ulaşabilmiştir. İstatistiksel olarak da analiz edilen sonuçlar yaş hücre ağırlığı bakımından *ADH3* ve *GAP* promotorları arasında önemli bir fark olmadığını ve bu promotorlar ile rekombinant protein üretimi sırasında *AOX1* promotoruna göre kayda değer düzeyde daha yüksek yaş hücre ağırlığına ulaşıldığını göstermiştir ( $p < 0,05$ ). Fermentasyon örneklerinden ölçülen toplam protein miktarları *ADH3* ve *GAP* promotorları arasında belirgin bir fark göstermezken, *AOX1* promotoruna göre daha yüksek gözlenmiştir. Spesifik üretkenlik değerleri *ADH3* promotoru için 126,73 U/gwcw/h, *AOX1* ve *GAP* promotorları için 101,38 ve 20,58 olarak hesaplanmıştır.

Bu çalışmada karakterize edilen yapısal *ADH2* geni promotoru da yukarıda tarif edilen aynı fermentör koşullarında rekombinant protein üretiminde kullanılabilirliğinin tespiti için yapısal *GAP* promotoru ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlarda, ksilanaz aktivitesi açısından *ADH2* promotoru ile üretimin 3 kat daha az olduğu görülmüştür. Sonuçlar, *ADH2* promotorunun rekombinant protein üretimi için *GAP* promotoruna göre güçsüz bir promotor olduğunu ortaya koymuştur. *ADH2* promotoru *GAP* promotoruna göre daha güçsüz bir promotor olmasına rağmen, gelecekteki

çalışmalarla fermentasyon koşulları optimize edilerek ve/veya gen kopya sayısı, sinyal sekansı vb. modifikasyonlarla daha iyi sonuçlar elde etmek mümkün olabilir.

Bu tez çalışması, *P. pastoris* etanol metabolizması ile ilgili yapılacak olan gelecekteki yeni çalışmalara temel veriler sunmaktadır. Etanol üretiminden ve tüketiminden sorumlu majör genler ilk kez bu çalışma ile ortaya konulmuştur. Bu genlerin promotorlarının rekombinant protein üretiminde karşılaştırmalı olarak test edilmesi de ilk defa bu çalışma ile gerçekleştirilmiştir. Ancak özellikle *ADH3* promotorunun moleküler regülasyon mekanizmasının (indüksiyon/represyon) açıklığa kavuşturulması endüstriyel kullanımlar için önemli katkı sağlayacaktır. Bu çalışma ile elde edilen sonuçlar, gelecekteki çalışmalara ışık tutacak niteliktedir.



## 6. SONUÇ

Sonuçlar, inaktif edilen *ADH3* geninin *P. pastoris* etanol metabolizmasında etanolün katabolize (parçalanması) edilmesinde görev alan tek gen olduğunu göstermektedir.

Elde edilen sonuçlar, yapılan deney şartlarında *ADH1* geninin etanol metabolizmasında gözlenebilir bir rol olmadığını ortaya koymuştur.

*P. pastoris*'te glukoz içeren besiyerinde etanol üretiminden sorumlu majör genin *Adh* aktivitesi göstermesi muhtemel genlerden *adhII* olduğu belirlenmiş ve bu gen *ADH2* olarak isimlendirilmiştir. Etanol üretiminin yaklaşık %80'inden *ADH2*'nin, %20'lik kısmından da *ADH3*'ün sorumlu olduğu ortaya konulmuştur.

*ADH2* ve *ADH3* genlerinin farklı karbon kaynaklarında ekspresyon seviyelerine bakılmış ve *ADH3* geninin etanol ile indüklenen, *ADH2* geninin ise yapısal bir gen olduğu tespit edilmiştir.

X33 suşu ile fermentör koşullarında, farklı çözünmüş oksijen seviyelerinde gen ekspresyon seviyeleri analiz edilmiş ve rekombinant protein üretimleri için her iki genin promotörü için de optimum çözünmüş oksijen seviyesi %30 olarak belirlenmiştir.

İnaktif suşların ( $\Delta adh3$  ve  $\Delta adh2\Delta adh3$ ) fermentör ortamında farklı çözünmüş oksijen seviyelerinde etanol üretme yetenekleri test edilmiştir. Sonuç,  $\Delta adh3$  suşunun etanol ürettiğini, etanolü katabolize edemediğini göstermiştir.  $\Delta adh2\Delta adh3$  suşu ise farklı çözünmüş oksijen seviyelerinde de etanol üretmemeye devam etmiştir.

*ADH3* promotörü ile fermentör şartlarında rekombinant ksilanaz üretimi, *P. pastoris*'te en yaygın kullanılan *AOX1* ve *GAP* promotörleri ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlardan, fermentör koşullarında *ADH3* promotörünün süpernatant örneklerinde yaklaşık 1.8 kat daha yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bu sonuç *ADH3* promotörünün *P. pastoris* ile rekombinant protein üretimlerinde alternatif olarak kullanılabilen başarılı bir promotör olduğunu göstermiştir.

Yapısal *ADH2* promotörü, *P. pastoris*'te en yaygın kullanılan yapısal promotör olan *GAP* promotörü ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlarda *ADH2* promotörünün *GAP* promotörüne göre güçsüz bir promotör olduğu görülmüştür. Ancak gelecekteki çalışmalarla fermentasyon koşulları optimize edilerek ve/veya gen kopya sayısı, sinyal sekansı vb. modifikasyonlarla daha iyi sonuçlar elde etmenin mümkün olabileceği düşünülmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

- ANONİM, 2006. Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000204 (<http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASListings/ucm153734.htm>)
- ANONİM, 2009. FDA Grants First Approval For A Product Derived From *Pichia pastoris* (<http://www.medicalnewstoday.com/articles/173506.php>).
- BAKKER, B.M., BRO, C., KOTTER, P., LUTTIK, M.A.H., VAN DIJKEN, J.P. and PRONK, J.T. 2000. The mitochondrial alcohol dehydrogenase Adh3p is involved in a redox shuttle in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 182:4730–4737.
- BAKKER, B.M., OVERKAMP, K.M., VAN MARRIS, A.J., KOTTER, P., LUTTIK, M.A., VAN DIJKEN, J.P. and PRONK, J.T. 2001. Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev*, 25:15-37.
- 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. *Biotechnol Bioeng*, 100:177-183.
- BAUMANN, K., CARNICER, M., DRAGOSITS, M., GRAF, A.B., STADLMANN, J., JOUHTEN, P., MAAHEIMO, H., GASSER, B., ALBIOL, J., MATTANOVICH, D. and FERRER, F. 2010. A multi-level study of recombinant *Pichia pastoris* in different oxygen conditions. *BMC Syst Biol*, 4:141.
- BRUINENBERG, P.G., M. VEENHUIS, J.P. VAN DIJKEN, DUINE, J.A and HARDER, W. 1982. A quantitative analysis of selective inactivation of peroxisomal enzymes in the yeast, *Hansenula polymorpha*, by high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol Lett*, 15:45-50.
- CEREGHINO, J.L. and CREGG J.M. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev*, 24:45-66.
- CHO, J.Y. and JEFFRIES, T.W. 1998. *Pichia pastoris* Genes for Alcohol Dehydrogenase with Fermentative and Respiratory Functions. *Appl Environ Microbiol*, 64:1350-1358.
- 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*. *Mol Cell Biol*, 9:1316–1323.
- CREGG, J.M. 2007. *Pichia* Protocols Methods in Molecular Biology Series, 389, 2nd edition, Humana Press Inc., pp. 1-10, Totowa, NJ.

- CREGG, J.M. and TOLSTORUKOV, I. 2008. Novel *P. pastoris* promoters, and the Use Thereof the use to direct expression of proteins in yeast, preferably using a haploid mating strategy. US patent Application No: 20080108108.
- CIRIACY, M. 1975. Genetics of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation of ADH mutants. *Mutat Res*, 29:315–325.
- DALY, R. and HEARN, M.T.W. 2005. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J Mol Recognit*, 18:119–138.
- DE SCHUTTER, K., LIN, Y.C., TIELS, P., VAN HECKE, A., GLINKA, S., WEBER-LEHMANN, J., ROUZE, P., PEER Y VAN DE and CALLEWAERT, N. 2009. Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nat Biotechnol*, 27:561-566.
- DENIS, C.L., CIRIACY, M. and YOUNG, E.T. 1981. A positive regulatory gene is required for accumulation of the functional messenger RNA for the glucose repressible alcohol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol*, 148:355–368.
- DUX, M.P. and INAN, M. 2006. Identification and Characterization of Calcium and Manganese Transporting ATPase (*PMRI*) Gene of *Pichia pastoris*. *Yeast*, 23:613-621.
- EGGELING, L. ve SAHM, H. 1980. Direct enzymatic assay for alcohol oxidase, alcohol dehydrogenase, and formaldehyde dehydrogenase in colonies of *Hansenula polymorpha*. *Appl Environ Microbiol*, 39:268-269.
- FREDLUND, E., BLANK, L.M., SCHNURER, J., SAUER, U. and PASSOTH, V. 2004. Oxygen- and glucose-dependent regulation of central carbon metabolism in *Pichia anomala*. *Appl Environ Microbiol*, 71:5905–5911.
- FREDLUND, E., BEERLAGE, C., MELIN, P., SCHNURER, J. and PASSOTH, V. 2006. Oxygen and carbon source-regulated expression of *PDC* and *ADH* genes in the respiratory yeast *Pichia anomala*. *Yeast*, 23:1137-1149.
- INAN, M. and MEAGHER, M.M. 2001a. The Effect of Ethanol and Acetate on Protein Expression in *Pichia pastoris*. *J Biosci Bioeng*, 4: 337-341.
- INAN, M. and MEAGHER, M.M. 2001b. Non-Repressing Carbon Sources for Alcohol Oxidase (*AOX1*) Promoter of *Pichia pastoris*. *J Biosci Bioeng*, 6:585-589.
- INAN, M., FANDERS, S. A., ZHANG, W., HOTEZ, P.J., ZHAN, B. and MEAGHER, M.M. 2007. Saturation of the Secretory Pathway by Overexpression of a Hookworm (*Necator americanus*) Protein (Na-ASP1). In *Pichia Protocols* 2nd Edition (Cregg, J. M., ed.), Humana Press, Totowa, New Jersey. pp. 65-75.

- JUNGO, C., MARISON, I. and STOCKAR, U.V. 2007. Regulation of alcohol oxidase of a recombinant *Pichia pastoris* Mut+ strain in transient continuous cultures. *J Biotechnol*, 130:236-246.
- KLEI, I.J.V.D., HARDER, W. and VEENHUIS, M. 1991. Selective Inactivation of Alcohol Oxidase in Two Preoxisome-Deficient Mutants of the Yeast *Hansenula polymorpha*. *Yeast*, 7:813-821.
- LAW, R.H.P., ROBINSON, H.C., ROWLEY M.J., and MACKAY I.R. 2001. The ubiquitous 38 kDa contaminant in glutamic acid decarboxylase preparation from the cytosol of *Pichia pastoris* after immobilised metal ion affinity chromatography is an alcohol dehydrogenase. *Biotechnol Lett*, 23:697–703.
- LESKOVAC, V., TRIVIT, S. and PERIBIN, D. 2002. The three zinc-containing alcohol dehydrogenases from baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Yeast Res*, 2:481-494.
- LUTSTORF, U. and MEGNET, R. 1968. Multiple forms of alcohol dehydrogenase in *S. cerevisiae*. I. Physiological control of ADH-2 and properties of ADH-2 and ADH-4. *Arch Biochem Biophys*, 126: 933–944.
- MARX, H., MECKLENBRÄUKER, A., GASSER, B., SAUER, M. and MATTANOVICH, D. 2009. Directed gene copy number amplification in *Pichia pastoris* by vector integration into the ribosomal DNA locus. *FEMS Yeast Res*, 9:1260-1270.
- MATTANOVICH, D., GRAF, A., STADIMANN, J., DRAGOSITS, M., REDL, A., MAURER, M., KLEINHEINZ, M., SAUER, M., ALTMANN, F. and GASSER, B. 2009. Genome, secretome and glucose transport highlight unique features of the protein production host *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact*, Jun 2 8:29.
- MAZZONI, C., SALIÓLA, M. and FALCONE, C. 1992. Ethanol induced and glucose-insensitive alcohol dehydrogenase activity in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Mol Microbiol*, 6:2279–2286.
- NOCON, J., STEIGER, M.S., PFEFFER, M., SOHN, S.B., KIM, T.Y., MAURER, M., RUßMAYER, H., PFLUGL, S., ASK, M., HABERHAUER-TROYER, C., ORTMAYR, K., HANN, S., KOELLENSPERGER, G., GASSER, B., LEE, S.Y. and MATTANOVICH, D. 2014. Model based engineering of *Pichia pastoris* central metabolism enhances recombinant protein production. *Metab Eng*, 24:129-138.
- PFAFFL, M. W. 2004. Quantification strategies in real-time PCR, Chapter 3, pages 87-112 in: A-Z of quantitative PCR (Editor: S.A. Bustin) International University Line (IUL) La Jolla, CA, USA.
- PORRO, D., SAUER, M., BRANDUARDI, P. and MATTANOVICH, D. 2005. Recombinant protein production in yeasts. *Mol Biotechnol*, 31:245- 259.

- QUINTERO, Y., POBLET, M., GUILLAMON J.M. and MAS, A. 2009. Quantification of the expression of reference and alcohol dehydrogenase genes of some acetic acid bacteria in different growth conditions. *J Appl Microbiol*, 106:666–674.
- SALIOLA, M., SHUSTER, J.R., and FALCONE, C. 1990. The alcohol dehydrogenase system in the yeast *Kluyveromyces lactis*, *Yeast*, 6:193–204.
- SALIOLA, M., GONNELLA, R., MAZZONI, C. and FALCONE, C. 1991. Two genes encoding putative alcohol dehydrogenases are present in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*, 7:391–400.
- SAMBROOK, J., and RUSSEL, D. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor.
- SHAIN, D.H., SALVATORE, C. and DENIS, C.L. 1992. Evolution of the alcohol dehydrogenase (ADH) genes in yeast: characterization of a fourth ADH in *Kluyveromyces lactis*. *Mol Gen Genet*, 232:479–488.
- SHULER, M.L. and KARGI, F. 2008. *Bioprocess Engineering Basic Concepts* 2. Edition. Prentice Hall PTR.
- 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. *Biotechnol J*, 5:705–715.
- TSCHOPP, J.F., BRUST, P.F., CREGG, J.M., STILLMAN, C.A. and GINGERAS, T.R. 1987. Expression of the LacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Res*, 15:3859–3876.
- VAN URK, H., POSTMA, E., SCHEFFERS, W.A. and VAN DIJKEN, J. 1989. Glucose transport in crabtree-positive and crabtree-negative yeasts. *J Gen Microbiol*, Issue: 9, 135:2399–2406.
- VANZ, A.L., LUNSDORF, H., ADNAN, A., NIMTZ, M., GURRAMKONDA, C., KHANNA, N. and RINAZ, U. 2012. Physiological response of *Pichia pastoris* GS115 to methanol-induced high level production of the Hepatitis B surface antigen: catabolic adaptation stress responses, and autophagic processes. *Microb Cell Fact*, 11:103.
- VEENHUIS, M., J.P. VAN DIJKEN, J. and HARDER, W. 1983. The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeasts. *Adv MicrobPhysiol*, 24:1–82.
- WU, S. and LETCHWORTH, G.J. 2004. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *Biotechniques*. 36: 152–154.

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, 389, 2nd edition, Humana Press Inc., pp. 65-75, Totowa, NJ.





## 8. EKLER

## EK 8.1. Çalışmada Kullanılan Primerlerin Listesi

Primer	Sekansı (5'→3')
ADH3-WGF	ATGTCTCCAACATATCCCAACTACAC
ADH3-WGR	TTATTTGGAAGTGTCACAACG
ADH-1rtF	GTATGGGAGCAATGTGTTGG
ADH-1rtR	TCGGGATAAGCGTCATCATA
ADH-2rtF	CGTGTACGGTGGTAAGAACG
ADH-2rtR	AGATGTGCAAGTCTGTTCCG
ADH-3rtF	GAGCTGCTTGACTTCTGTGC
ADH-3rtR	TTTGATAAGCCGCTCGTATG
ADH-4rtF	GGGCAAGGATTTGTTTCACT
ADH-4rtR	CCTTAGGAGCTTCGTCTTGG
ADH-5rtF	AGTGTGCTGAAGGTTTCATGG
ADH-5rtR	AGTGGGACGATCCCAAGTAG
ADH3rtF	TTGTCGCTTACGGTGAGAAC
ADH3rtR	TGGATTCAGCACCTTGGATA
GAPrtF	GATGCCGTTGTCTCTTCTGA
GAPrtR	CCAAGAGATCAGCTTGACGA
adhI-NrtF	TCTCATTTGGGTAACCGTGA
adhI-NrtR	GCAACTTCTCCAGTCCGTTT
adhII-NrtF	TTCCTGACACGTTTGCAACT
adhII-NrtR	CGGTGGTGATAGCAATGTTC
<u>adhIII-NrtF</u>	CCCGTACCTGAGCCTACTTC
<u>adhIII-NrtR</u>	TATCCCTCCAATTCTTGAGC
adhIV-NrtF	TGTTGGGTTGTGGTGTACC
adhIV-NrtR	TAATCTCGCTTGACCTTTG
<u>adhV-NrtF</u>	GCTCTTGTTGCGAAGTGTA
<u>adhV-NrtR</u>	AAGTCCAGCTTCTGCCAAT
<u>ADH3-NrtF</u>	AGGCTGACTTGGCTGAAGTT
<u>ADH3-NrtR</u>	CGTATTGAACGGCAAGAGAA
<u>ADH1-NrtF</u>	TTTCGACTGCATTTTCAGAGG
<u>ADH1-NrtR</u>	GCCAATGTCATATTGTTGGTG
GAP-NrtF	GGAATTGAGTCCGGTTTGT
GAP-NrtR	CACCAGTGGAAGATGGAATG
ADH1ATGF	ATGGCTAATCACGCAATTG
ADH1STPR	CTAGAGGGTGTAACCAGCTTG
adhIATGF	ATGGCTTACCCAGACACTTT
adhISTPR	CTATTCAAACGTGTTTTCCGTAATT
adhIIATGF	ATGTCTGTGATGAAAGCCCTC
adhIIISTPR	TTAATCGGCAGATAAGAAAATCTTG
adhVATGF	ATGGCGTACCCAGACACC
adhVSTPR	CTATTTGAATGCCTTATCGTAACC
ADH3prom-F	AAGGATCCTGACGGTACTAGAGGACTC
ADH3prom-R	TTTCGAAAGTAAATAAGATAAAAGCTAGTAG
ADH2-2000F	ACAAGATCTTACTGCCCTTACTTTTGCTC
ADH2-1500F	ACCAGATCTAGAATATTCAATACTGCTTTTAAC
ADH2-1000F	AAAAGATCTTCCAGTTGGGCCATTACCG
ADH2-900F	TTTAGATCTTTGGTTTTGACCTCGCTTTA
ADH2-800F	AAAAGATCTCCAGCCAGAAAATGTCCTTC
ADH2-700F	AAAAGATCTTGTGGACGTCGTGAAACATC
ADH2-600F	AAAAGATCTTGCAGCGGCTTGGTGGACTA
ADH2-550F	AAAAGATCTGGTCGTTGTGGTCACAAAC
ADH2-500F	ACAAGATCTCGGAGGCAATGCTTTTTGG

**EK 8.2. Adh3 Enzimini Kodlayan Açık Okuma Dizisi**

Translation of adh3 dna{RF+1} (1-1050)

Universal code

Total amino acid number: 350, MW=36811

Max ORF starts at AA pos 1(may be DNA pos 1) for 350 AA(1050 bases), MW=36811

```

1      ATGTCTCCAACATATCCCAACTACACAAAAGGCTGTTATCTTCGAGACCAACGGCGGTCCC
1      M S P T I P T T Q K A V I F E T N G G P

61     CTAGAGTACAAGGACATTCCAGTCCCAAAGCCAAAGTCAAACGAACTTTTGATCAACGTT
21     L E Y K D I P V P K P K S N E L L I N V

121    AAGTACTCCGGTGTCTGTACACTGATTTGCACGCCTGGAAGGGTACTGGCCATTGGAC
41     K Y S G V C H T D L H A W K G D W P L D

181    AACAAAGCTTCCTTTGGTTGGTGGTCACGAAGGTGCTGGTGTGCTGCTTACGGTGTGAG
61     N K L P L V G G H E G A G V V V A Y G E

241    AACGTCACTGGATGGGAGATCGGTGACTACGCTGGTATCAATGGTTGAACGGTCTTGT
81     N V T G W E I G D Y A G I K W L N G S C

301    TTGAACTGTGAGTACTGTATCCAAGGTGCTGAATCCAGTTGTGCCAAGGCTGACCTGTCT
101    L N C E Y C I Q G A E S S C A K A D L S

361    GGTTCACCCACGACGGATCTTTCCAGCAGTATGCTACTGCTGATGCCACCAAGCCGCC
121    G F T H D G S F Q Q Y A T A D A T Q A A

421    AGAATTCCAAAGGAGGCTGACTTGGCTGAAGTTGCCCAATTCTGTGTGCTGGTATCACC
141    R I P K E A D L A E V A P I L C A G I T

481    GTTTACAAGGCTCTTAAGACCGCTGACTTGGCTATTGGCCAATGGGTTGCCATTTCTGGT
161    V Y K A L K T A D L R I G Q W V A I S G

541    GCTGGTGGAGGACTGGGTTCTCTTGCCGTTCAATACGCCAAGGCTCTGGGTTTGAGAGTT
181    A G G G L G S L A V Q Y A K A L G L R V

601    TTGGGTATTGATGGTGGTCCCACAAGGTTGAATTTGTCAAGTCCTTGGGTGCTGAGGTC
201    L G I D G G A D K G E F V K S L G A E V

661    TTCGTCGACTTCACTAAGACTAAGGACGTCGTTGCTGAAGTCCAAAAGCTCACCAACGGT
221    F V D F T K T K D V V A E V Q K L T N G

721    GGTCCACACGGTGTATTAAACGTCCTCCGTTTCCCCACATGCTATCAACCAATCTGTCCAA
241    G P H G V I N V S V S P H A I N Q S V Q

781    TACGTTAGAAGTTTGGGTAAGGTTGTTTTGGTGGTCTGCCATCTGGTGCCGTTGTCAAC
261    Y V R T L G K V V L V G L P S G A V V N

841    TCTGACGTTTTCTGGCACGTTCTGAAGTCCATCGAGATCAAGGGATCTTACGTTGAAAC
281    S D V F W H V L K S I E I K G S Y V G N

901    AGAGAGGACAGTGCCGAGGCCATCGACTTGTTCCACAGAGGTTTGGTCAAGGCTCTATC
301    R E D S A E A I D L F T R G L V K A P I

961    AAGATTATCGGTCTGTCTGAACTTGCTAAGGTCTACGAACAGATGGAGGCTGGTGCCATC
321    K I I G L S E L A K V Y E Q M E A G A I

1021   ATCGGTAGATACGTTGTGGACACTTCCAATAA
341   I G R Y V V D T S K *
```

**EK 8.3. Adh2 Enzimini Kodlayan Açık Okuma Dizisi**

Translation of XM\_002491163{RF+1}(1-1084)  
 Universal code  
 Total amino acid number: 360, MW=38561  
 Max ORF starts at AA pos 1(may be DNA pos 1) for 360 AA(1080 bases),  
 MW=38561

```

1      ATGTCGTGATGAAAGCCCTCGTGTACGGTGGTAAGAACGTCTTCGCCTGGAAAACTTC
1      M S V M K A L V Y G G K N V F A W K N F

61     CCTAAACCAACTATCTTGCACCCAACAGATGTCATCGTTAAGACGGTGGCTACTACCATC
21     P K P T I L H P T D V I V K T V A T T I

121    TGCGGAACAGACTTGCACATCTTGAAAGGTGATGTTCCAGAGGTCAAACCTGAAACCGTC
41     C G T D L H I L K G D V P E V K P E T V

181    TTGGGTCATGAAGCAATTGGAGTCGTGCAATCTATCGGTGATAACGTCAAAAACCTCAGC
61     L G H E A I G V V E S I G D N V K N F S

241    ATTGGTGATAAGGTGCTGGTTTCATGCATCACCAGTTGTGGAAGCTGTTACTACTGTAA
81     I G D K V L V S C I T S C G S C Y Y C K

301    AGAAACTTGCAGAGTCATTGCAAGACCGGTGGATGGAAATTAGGTCACGATTTGAACGGT
101    R N L Q S H C K T G G W K L G H D L N G

361    ACGCAGGCTGAGTTTGTCCGTATCCCATATGGAGACTTCTCATTGCACCGTATTCCTCAT
121    T Q A E F V R I P Y G D F S L H R I P H

421    GAAGCAGATGAAAAGGCAGTTCTGATGCTGTCTGACATCTTACCTACTGCTTACGAAGTT
141    E A D E K A V L M L S D I L P T A Y E V

481    GGTGTCTTGGCCGAAATGTCCAAAAGGGAGACTCAGTTGCCATTGTCGGCGCCGGTCCA
161    G V L A G N V Q K G D S V A I V G A G P

541    GTTGGTCTTGGCCGCTGCTGACTGTCAAAGCCTTTGAGCCTTCTGAAATTATTATGATT
181    V G L A A L L T V K A F E P S E I I M I

601    GACACTAACGATGAAAGACTGAGTGCCTCCTTGAATTTGGGAGCCACCAAGGCAGTCAAC
201    D T N D E R L S A S L K L G A T K A V N

661    CCAACCAAGGTCAGCAGTGTCAAAGATGCTGTTTATGATATTGTCAATGCCACTGTCCGC
221    P T K V S S V K D A V Y D I V N A T V R

721    GTCAAGGAGAACGACCTGGAGCCAGGTGTCGATGTTGCCATTGAGTGTGTTGGTGTTCCT
241    V K E N D L E P G V D V A I E C V G V P

781    GACACGTTTGCAACTTGTGAAGAGATTATCGCCCCAGGTGGCCGTATTGCCAATGTTGGT
261    D T F A T C E E I I A P G G R I A N V G

841    GTTCAGGCACTAAAGTGGATTTACAACCTGCAAGACCTATGGATCAAGAACATTGCTATC
281    V H G T K V D L Q L Q D L W I K N I A I

901    ACCACCGGTTTGGTAGCCACATACTCCACTAAAGACCTGTTGAAGCGAGTCTCTGACAAG
301    T T G L V A T Y S T K D L L K R V S D K

961    TCTCTAGACCCTACACCACTGGTTACACATGAGTTCAAGTTCAGTGAATTTGAGAAGGCC
321    S L D P T P L V T H E F K F S E F E K A

1021   TATGAGACTTCTCAAAATGCTGCCACCACCAAAGCCATCAAGATTTTCTTATCTGCCGAT
341   Y E T S Q N A A T T K A I K I F L S A D

1081   TAA
361   *
```

**EK 8.4. Çalışmada Kullanılan *ADH3* ve *ADH2* Promotorlarının DNA Dizisi**

SEQ ADH3 Promotor: 1200 bç;  
 Composition 241 A; 287 C; 191 G; 281 T; 0 OTHER  
 Percentage: 24.1% A; 28.7% C; 19.1% G; 28.1% T; 0.0%OTHER  
 Molecular Weight (kDa): ssDNA: 306.64 dsDNA: 616.48

ORIGIN

```

1      AGATCCTGAC  GGTACTAGAG  GACTCTTAGG  GGAAGGTAGA  ATCAATAAAG  ATCATATTAG
61     GTAAGCAAAT  TTTGGATGGA  ATAGGAGACT  AGGTGTGGAT  GCGCGATCTC  GCCAAATGTC
121    ACGACCAGAG  TGGATGCCGG  ATGGTGGTAA  ACCGTTTCTT  CCTTTTACC   ACCCAAGTGC
181    GAGTGAAACA  CCCCATGGCT  GCTCTCCGAT  TGCCCCTCTA  CAGGCATAAG  GGTGTGACTT
241    TGTGGGCTTG  AATTTTACAC  CCCCTCCAAC  TTTTCTCGCA  TCAATTGATC  CTGTTACCAA
301    TATTGCATGC  CCGGAGGAGA  CTTGCCCCCT  AATTTCGCGG  CGTCGTCCCG  GATCGCAGGG
361    TGAGACTGTA  GAGACCCAC  ATAGTGACAA  TGATTATGTA  AGAAGAGGGG  GGTGATTCGG
421    CCGGCTATCG  AACTCTAACA  ACTAGGGGGG  TGAACAATGC  CCAGCAGTCC  TCCCCACTCT
481    TTGACAAATC  AGTATCACCG  ATTAACACCC  CAAATCTTAT  TCTCAACGGT  CCCTCATCCT
541    TGCACCCCTC  TTTGGACAAA  TGGCAGTTAG  CATTGGTGCA  CTGACTGACT  GCCCAACCTT
601    AAACCCAAAT  TTCTTAGAAG  GGGCCCATCT  AGTTAGCGAG  GGGTGAAAAA  TTCCTCCATC
661    GGAGATGTAT  TGACCGTAAG  TTGCTGCTTA  AAAAAATCA  GTTCAGATAG  CGAGACTTTT
721    TTGATTTGCG  AACGGGAGTG  CCTGTCCCAT  TCGATTGCAA  TTCTCACCCC  TTCTGCCCAG
781    TCCTGCCAAT  TGCCCATGAA  TCTGCTAAT  TCGTTGATTC  CCACCCCTCT  TTCCAACCTC
841    ACAAATGTCT  CAATCTCGTT  TTCCATTTGG  GAGAATCTGC  ATGTCGACTA  CATAAAGCGA
901    CCGGTGTCGG  AAAAGATCTG  TGTAGTTTTT  AACATTTTGT  GCTCCCCCGG  CTGTTTGAAA
961    ACGGGGGTGA  GCGCTCTCCG  GGGTGCGAAT  TCGTGCCCAA  TTCCTTTTAC  CCTGCCTATT
1021   GTAGACGTCA  ACCCGCATCT  GGTGCGAATA  TAGCGCACCC  CCAATGATCA  CACCAACAAT
1081   TGGTCCACCC  CTCCCCAATC  TCTAATATTC  ACAATTCACC  TCACTATAAA  TACCCCTGTC
1141   CTGCTCCCAA  ATTTCTTTTT  CCTTCTTCCA  TCAGCTACTA  GCTTTTATCT  TATTTACTTT

```

SEQ ADH2 promotor: 900 bp;  
 Composition 257 A; 218 C; 191 G; 234 T; 0 OTHER  
 Percentage: 28.6% A; 24.2% C; 21.2% G; 26.0% T; 0.0%OTHER  
 Molecular Weight (kDa): ssDNA: 277.42 dsDNA: 554.81

COLOURS

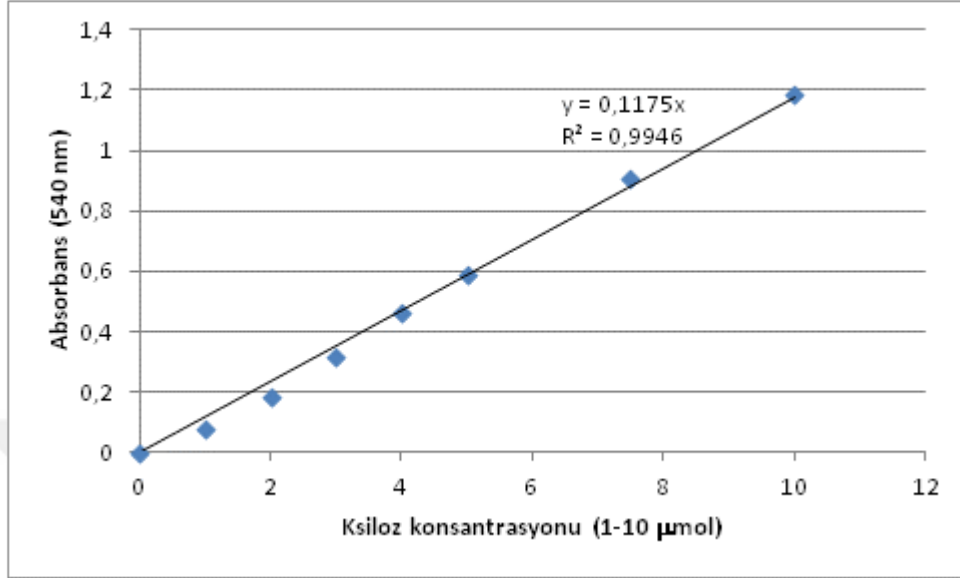
sequence = 1  
 features = 0

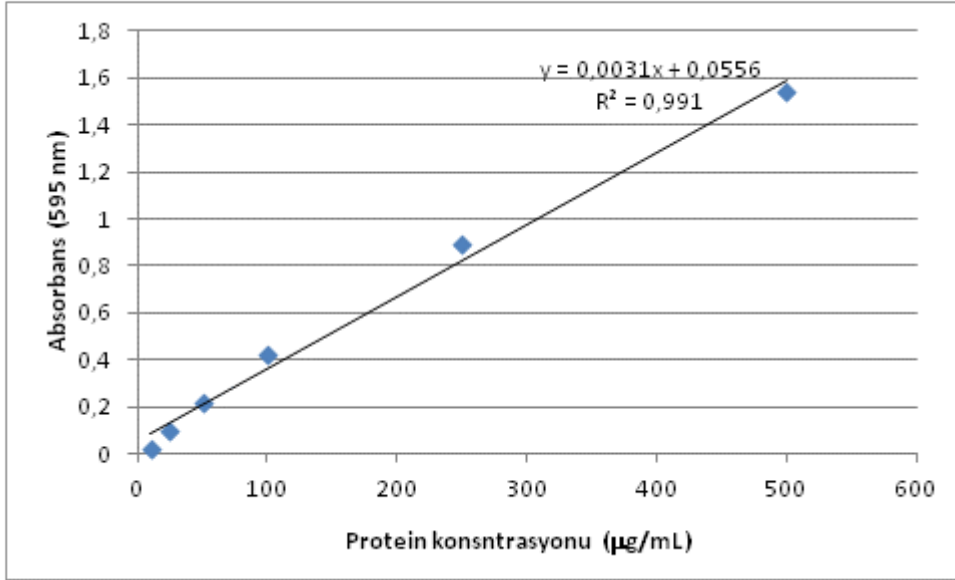
ORIGIN

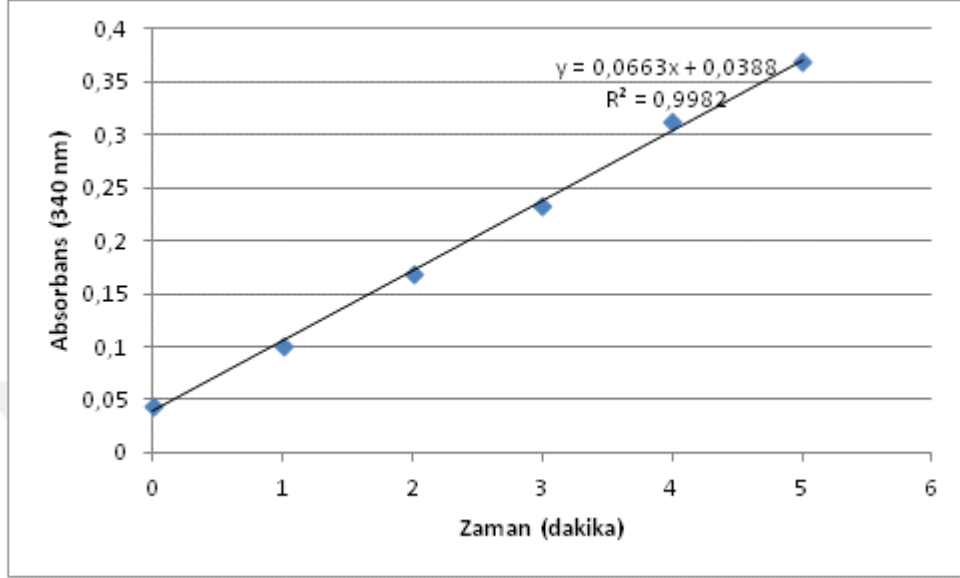
```

1      TTGGTTTTGA  CCTCGCTTTA  ATCAATTTTT  CAGACCTGAT  CCCACCTACT  TTTCTTCGGC
61     CTCAACTTCA  ATCTGACTCT  TCTCTCTCAA  TTGGTACCAA  CCAGCCAGAA  AATGTCCCTC
121    CGTTACTTGA  AACGGCATT  CTCTACAGCT  ACAAACGCAA  TTGCTCTCCT  TAGCAGACCT
181    GAATTCAAAA  TAGGTGCAAT  TGTGGACGTC  GTGAAACATC  CAAATGCAGA  CAAACTTTAT
241    GTCTCGTCGA  FTTCTGTGG  AAACAATTAT  GCCTCGGGTA  CATCCAACAC  CCTAACCGTT
301    TGCAGCGGCT  TGGTGGACTA  CTTTTCAGTT  CCCGAATTGC  TTCAGCGACG  GGTGCTTGTG
361    GTCACAAACC  TCAAGCCATC  GAAGATGAGA  GGTGTAACAT  CGGAGGCAAT  GCTTTTGCCA
421    GGGGAAAAGT  CGGGAAAAGT  GGAATTGGTC  GAGCCGCCAA  TGTCCGGGAG  AGAGGGCGAA
481    TCACTCCACT  TCGAAGGTGT  AGAAATTACA  TCAGAGGAGA  GCGCCAATCA  ATTGCATTTG
541    CCTGCTAAGC  GATTGAAGAA  GTCAGAGTGG  AGTCAACTGG  CCGAAGGTCT  ACAGACAAAT
601    GACCAGCGTG  AAGTGGTCTT  CCACAGCCAA  ATTTGGCTCCA  AACGAATTTA  CGCTTTAGTA
661    GGAGCGAGTA  CTGAAAAATG  CACGTTAGCG  ACTCTTGCGC  AGGCCGTCGT  ACGATAAGGG
721    CAATATGGTT  GAGAACGTTT  CTCACCCAAA  TAAAATCATC  ATATCACCTT  AACTGGGTAT
781    AAATACTATA  GTATATAAAA  AAGCTCAGGA  CCCCCGCCCT  CTACTCCCTG  CTCAATATCA
841    ATTTATATTT  TACTTCTACT  ATTGAACTTT  AACTCGAAGA  TAGTCAATTC  CCCATAACCA

```

**EK 8.5. Ksilanaz Aktivite Hesaplamalarında Kullanılan Ksiloz Standart Kurvesi**

**EK 8.6. Toplam Protein Miktarının Hesaplanmasında Kullanılan Standart Protein (BSA) Kurvesi**

**EK 8.7. Adh enzim aktivitesi ölçümü için kullanılan standart kurvesi**

**EK 8.8. Erlenmayer koşullarında *ADH3*, *AOX1* ve *GAP* promotorları ile protein üretimi sonuçları ve istatistiksel analizi**

Zaman (saat)	OD değerleri (OD <sub>600nm</sub> )			Ksilanaz aktivitesi (U/mL)		
	<i>ADH3</i>	<i>AOX1</i>	<i>GAP</i>	<i>ADH3</i>	<i>AOX1</i>	<i>GAP</i>
0	22±1 <sup>b</sup>	20±1 <sup>b</sup>	21±1 <sup>b</sup>	0±0 <sup>a</sup>	0±0 <sup>a</sup>	0±0 <sup>a</sup>
6	68±2 <sup>a</sup>	52±1 <sup>b</sup>	54±1 <sup>c</sup>	38±1 <sup>a</sup>	102±16 <sup>b</sup>	88±15 <sup>b</sup>
18	79±2 <sup>a</sup>	57±5 <sup>b</sup>	67±6 <sup>b</sup>	57±10 <sup>a</sup>	166±20 <sup>b</sup>	130±8 <sup>b</sup>
24	89±3 <sup>a</sup>	60±1 <sup>b</sup>	70±2 <sup>c</sup>	89±10 <sup>a</sup>	196±21 <sup>b</sup>	159±18 <sup>b</sup>
30	95±3 <sup>a</sup>	62±1 <sup>b</sup>	82±1 <sup>c</sup>	132±24 <sup>a</sup>	252±26 <sup>b</sup>	173±14 <sup>a</sup>
42	110±3 <sup>a</sup>	65±1 <sup>b</sup>	86±3 <sup>c</sup>	175±24 <sup>a</sup>	282±21 <sup>b</sup>	180±10 <sup>a</sup>
54	113±4 <sup>a</sup>	66±1 <sup>b</sup>	89±1 <sup>c</sup>	199±27 <sup>a</sup>	319±14 <sup>b</sup>	192±12 <sup>a</sup>
72	117±7 <sup>a</sup>	69±2 <sup>b</sup>	107±4 <sup>a</sup>	222±22 <sup>a</sup>	392±15 <sup>b</sup>	209±6 <sup>a</sup>



**EK 8.9. Erlenmayer koşullarında *ADH2* ve *GAP* promotorları ile protein üretimi sonuçları ve istatistiksel analizi**

Zaman (saat)	OD değerleri (OD <sub>600nm</sub> )		Ksilanaz aktivitesi (U/mL)	
	<i>ADH2</i>	<i>GAP</i>	<i>ADH2</i>	<i>GAP</i>
0	10±1 <sup>a</sup>	10±1 <sup>a</sup>	0±0 <sup>a</sup>	0±0 <sup>a</sup>
6	24±1 <sup>a</sup>	25±1 <sup>a</sup>	14±2 <sup>a</sup>	42±9 <sup>b</sup>
18	50±7 <sup>a</sup>	49±3 <sup>a</sup>	45±1 <sup>a</sup>	96±2 <sup>b</sup>
24	55±1 <sup>a</sup>	54±2 <sup>a</sup>	54±3 <sup>a</sup>	114±6 <sup>b</sup>
30	65±1 <sup>a</sup>	71±1 <sup>b</sup>	67±2 <sup>a</sup>	149±3 <sup>b</sup>
42	73±1 <sup>a</sup>	72±1 <sup>a</sup>	77±2 <sup>a</sup>	190±3 <sup>b</sup>
48	80±10 <sup>a</sup>	78±3 <sup>a</sup>	82±2 <sup>a</sup>	198±8 <sup>b</sup>
54	79±9 <sup>a</sup>	79±9 <sup>a</sup>	84±3 <sup>a</sup>	205±14 <sup>b</sup>
72	72±8 <sup>a</sup>	72±8 <sup>a</sup>	94±7 <sup>a</sup>	214±12 <sup>b</sup>

**EK 8.10. Fermentör koşullarında *ADH3*, *AOX1* ve *GAP* promotörü ile protein üretimi sonuçları ve istatistiksel analizi**

Zaman (saat)	Yaş hücre ağırlığı (g/L)			Toplam protein (g/L)			Ksılanaz aktivitesi (U/mL)		
	<i>ADH3</i>	<i>AOX1</i>	<i>GAP</i>	<i>ADH3</i>	<i>AOX1</i>	<i>GAP</i>	<i>ADH3</i>	<i>AOX1</i>	<i>GAP</i>
<b>-5</b>	114±6 <sup>a</sup>	114±1 <sup>a</sup>	117±2 <sup>a</sup>	40±1 <sup>a</sup>	35±18 <sup>a</sup>	43±2 <sup>a</sup>	47±4 <sup>a</sup>	11±12 <sup>b</sup>	65±1 <sup>a</sup>
<b>-3</b>	118±8 <sup>a</sup>	136±5 <sup>a</sup>	165±3 <sup>b</sup>	42±1 <sup>a</sup>	45±16 <sup>a</sup>	83±8 <sup>a</sup>	51±2 <sup>a</sup>	51±77 <sup>a</sup>	115±1 <sup>a</sup>
<b>0</b>	121±11 <sup>a</sup>	136±4 <sup>a</sup>	182±6 <sup>b</sup>	69±2 <sup>a</sup>	56±14 <sup>a</sup>	113±15 <sup>a</sup>	204±6 <sup>a</sup>	173±142 <sup>a</sup>	169±14 <sup>a</sup>
<b>6</b>	151±11 <sup>a</sup>	144±5 <sup>a</sup>	222±3 <sup>b</sup>	115±58 <sup>a</sup>	67±17 <sup>a</sup>	142±14 <sup>a</sup>	416±82 <sup>a</sup>	358±207 <sup>a</sup>	276±24 <sup>a</sup>
<b>18</b>	175±16 <sup>a</sup>	178±8 <sup>a</sup>	258±3 <sup>b</sup>	142±20 <sup>a</sup>	86±19 <sup>a</sup>	177±10 <sup>a</sup>	862±276 <sup>a</sup>	503±358 <sup>a</sup>	161±18 <sup>a</sup>
<b>24</b>	215±18 <sup>a</sup>	196±6 <sup>a</sup>	269±6 <sup>b</sup>	175±18 <sup>a</sup>	135±45 <sup>a</sup>	210±12 <sup>a</sup>	997±34 <sup>a</sup>	809±399 <sup>a</sup>	260±19 <sup>a</sup>
<b>30</b>	252±25 <sup>a</sup>	214±3 <sup>a</sup>	317±6 <sup>b</sup>	199±17 <sup>a</sup>	155±45 <sup>a</sup>	262±14 <sup>a</sup>	1328±12 <sup>a</sup>	1077±602 <sup>a</sup>	384±52 <sup>a</sup>
<b>42</b>	314±19 <sup>a</sup>	242±15 <sup>b</sup>	343±5 <sup>a</sup>	297±41 <sup>a</sup>	188±34 <sup>a</sup>	293±16 <sup>a</sup>	2027±21 <sup>a</sup>	1591±574 <sup>a</sup>	385±21 <sup>a</sup>
<b>54</b>	354±20 <sup>a</sup>	267±9 <sup>b</sup>	359±5 <sup>a</sup>	367±43 <sup>a</sup>	202±46 <sup>a</sup>	325±28 <sup>a</sup>	2876±346 <sup>a</sup>	2035±519 <sup>a</sup>	506±1 <sup>b</sup>
<b>72</b>	408±7 <sup>a</sup>	287±9 <sup>b</sup>	392±6 <sup>a</sup>	434±31 <sup>a</sup>	231±31 <sup>b</sup>	376±16 <sup>a</sup>	3723±316 <sup>a</sup>	2095±301 <sup>b</sup>	581±21 <sup>c</sup>

**EK 8.11. Fermentör koşullarında *ADH2* ve *GAP* promotorları ile protein üretimi sonuçları ve istatistiksel analizi**

Zaman (saat)	Yaş hücre ağırlığı (g/L)		Toplam protein (mg/L)		Ksilanaz Aktivitesi (U/mL)	
	<i>ADH2</i>	<i>GAP</i>	<i>ADH2</i>	<i>GAP</i>	<i>ADH2</i>	<i>GAP</i>
-5	107±2 <sup>a</sup>	117±2 <sup>b</sup>	51±6 <sup>a</sup>	43±2 <sup>a</sup>	27±1 <sup>a</sup>	65±1 <sup>b</sup>
-3	154±1 <sup>a</sup>	165±3 <sup>b</sup>	45±1 <sup>a</sup>	83±8 <sup>b</sup>	40±1 <sup>a</sup>	115±1 <sup>b</sup>
0	169±6 <sup>a</sup>	182±8 <sup>a</sup>	47±1 <sup>a</sup>	113±15 <sup>b</sup>	45±2 <sup>a</sup>	169±14 <sup>b</sup>
6	171±2 <sup>a</sup>	222±3 <sup>b</sup>	73±4 <sup>a</sup>	142±14 <sup>b</sup>	49±2 <sup>a</sup>	276±24 <sup>b</sup>
18	222±6 <sup>a</sup>	258±3 <sup>b</sup>	137±10 <sup>a</sup>	177±10 <sup>b</sup>	69±7 <sup>a</sup>	161±18 <sup>b</sup>
24	262±4 <sup>a</sup>	269±6 <sup>a</sup>	167±9 <sup>a</sup>	210±12 <sup>b</sup>	75±4 <sup>a</sup>	260±19 <sup>b</sup>
30	293±7 <sup>a</sup>	317±6 <sup>b</sup>	196±8 <sup>a</sup>	262±14 <sup>b</sup>	92±6 <sup>a</sup>	384±52 <sup>b</sup>
42	340±7 <sup>a</sup>	343±5 <sup>a</sup>	227±11 <sup>a</sup>	293±16 <sup>b</sup>	109±3 <sup>a</sup>	385±21 <sup>b</sup>
54	382±5 <sup>a</sup>	359±5 <sup>b</sup>	259±8 <sup>a</sup>	325±28 <sup>b</sup>	138±6 <sup>a</sup>	506±1 <sup>b</sup>
72	441±5 <sup>a</sup>	392±6 <sup>b</sup>	273±3 <sup>a</sup>	376±16 <sup>b</sup>	191±6 <sup>a</sup>	581±21 <sup>b</sup>

## 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. 2012 yılında ilgili anabilim dalından Bilim Uzmanı ünvanı ile mezun oldu. 2012 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Doktora eğitimine başladı. Halen aynı kurumda öğrenimine devam etmektedir.

