

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
(DOKTORA TEZİ)

***Pichia pastoris* KULLANILARAK REKOMBİNANT
ANTİ TROPONİN I ANTİKOR PARÇASININ
ÜRETİMİ VE KISMİ KARAKTERİZASYONU**

Cengiz AKKALE

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Gaye ÖNGEN

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 03.02.2016

Bornova-İZMİR

2016

Cengiz AKKALE tarafından Doktora tezi olarak sunulan “*Pichia pastoris* Kullanılarak Rekombinant Anti Troponin I Antikor Parçasının Üretimi Ve Kısmi Karakterizasyonu” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 03/02/2016 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Gaye ÖNGEN

.....

Raportör Üye : Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ

.....

Üye : Prof. Dr. Ayşe Semra KOÇTÜRK

.....

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ali Oğuz BÜYÜKKİLECI

.....

Üye : Yrd. Doç. Dr. Seval DAĞBAĞLI

.....

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “*Pichia pastoris* Kullanılarak Rekombinant Anti Troponin I Antikor Parçasının Üretimi Ve Kısmi Karakterizasyonu” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

03/02/2016

İmzası

Adı-Soyadı

Cengiz AKKALE

ÖZET***Pichia pastoris* KULLANILARAK REKOMBİNANT ANTİ-TROPONİN I ANTİKOR PARÇASININ ÜRETİMİ VE KİSMİ KARAKTERİZASYONU****AKKALE, Cengiz**

Doktora Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Gaye ÖNGEN

Şubat 2016, 78 sayfa

Kalp ve damar hastalıkları %30 ile tüm ölüm sebepleri arasında ilk sırada yer almaktadır. Kalp krizinin teşhis edilmesi, müdahale imkânını ve hastanın hayatta kalma şansını çok büyük oranda artırmaktadır. İmmünoloji temelli hızlı teşhis test kitleri bu noktada önemli bir role sahiptir. Bu test kitleri akut miyokardiyal enfarktüsün tanısı için kardiyak biyomarkörlerin antikorlarından faydalanır. Kardiyak troponin I molekülünün kandaki varlığının tespit edilmesi için yararlanılan anti-cTnI antikoruna ağırlıkla Çin Hamstır Yumurtası (Chinese Hamster Ovary – CHO) hücrelerinde rekombinant olarak ve/veya kısmen fare ve tavşan gibi konukçu hayvanlarda *in vivo* üretilmektedir. Ancak bu yöntemle üretilen antikorlar arasında görülen heterojenite, tanı testi kitlerinin oluşturulmasında sorunlar çıkarmaktadır. İyi tanımlanmış bir genetik yapıya sahip olması, güçlü ve teşvik edilebilir bir promotor ile rekombinant protein ifadesi üzerinde yüksek seviyede kontrol sağlanması, ökaryotik sistem olarak posttranslasyonel modifikasyonları yapabilmesi gibi önemli avantajlara sahip *Pichia pastoris* ekspresyon sistemini ekonomik ve etkin bir rekombinant protein üretim aracı kılmaktadır.

Bu tez kapsamında anti-cTnI antikorunun hafif zincir değişken bölgesi *Pichia pastoris* ekspresyon sisteminde bir fragment olarak 12,3 mg/l konsantrasyonda biyoreaktörde üretilmiş ve immobilize metal afinitesi kromatografisi yöntemi ile saflaştırılmıştır. Troponin I proteini kullanılarak yapılan tespit çalışmasında pozitif sonuç alınmıştır. Altın nanopartikül ile konjuge ve konjuge olmayan rekombinant

antikor fragmentlerinin troponin I proteinini tespit etme yetenekleri arasında belirgin bir fark gözlenmemiştir.

Yapılan bu çalışma ile hızlı tanı kitlerinde kullanılmaya aday bir anti-cTnI antikor fragmentinin üretimi gerçekleştirilmiştir. Ulaşılan literatüre göre *Pichia pastoris* konukçu organizması kullanılarak rekombinant anti-kardiyak troponin I antikor fragmentinin ScFv formunda üretimi ve saflaştırılması ilk defa gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler bu üretim sisteminin diğer tanı kitlerinde kullanılan antikorların da bu yöntemle üretilip kullanılabilmesine ilişkin bilgi kaynağı oluşturmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Pichia pastoris*, Anti-kardiyak Troponin I Antikoru, Rekombinant protein üretimi, Tanı kiti.

ABSTRACT

**RECOMBINANT EXPRESSION AND PARTIAL
CHARACTERIZATION OF ANTI CARDIAC TROPONIN ScFv IN
*Pichia pastoris***

AKKALE, Cengiz

Ph.D. in Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Gaye ÖNGEN

February 2016, 78 pages

Heart and vascular diseases are one of the major cause of all deaths around the world with 30% incidence. Therefore, detection of myocardial infarction has a great importance in responding to emergence cases for increasing the survival rate. Immune dependent quick diagnostic kits have a key role in this point. Anti-cTnI antibody is mostly produced in recombinant Chinese Hamster Ovary (CHO) cell lines and partly in host animals such as mouse and rabbit. However, heterogeneity of antibodies produced with these seras exhibit some disadvantageous difficulties for development of diagnostic test kits.

In this study anti-cardiac troponin I (anti-cTnI) antibody, which is one of the best diagnostic antibodies used in myocardial infarct diagnosis overall the world, was recombinantly expressed as an antibody fragment (hypervariable region) in *Pichia pastoris* at a concentration of 12.3 mg/l. Recombinant ScFv was purified using immobilized metal ion affinity chromatography. Its applicability in these diagnostic kits before and after conjugation to gold nanoparticles was evaluated by enzyme linked immunosorbent assay. By utilization of *Pichia* expression system, it is intended to reduce variations (antibody heterogeneity) among whole antibodies.

According to the literature, this is the first study where a recombinant anti-troponin I antibody fragment has been expressed to use in diagnostic kit development. The data obtained serve a guideway for a technology aiming to produce similar antibody fragments for diagnostic purposes.

Keywords: *Pichia pastoris*, Anti-cardiac Troponin I Antibody, Recombinant protein production, Diagnostic Kit.

TEŞEKKÜR

Bu tezin meydana geliş sürecinde tez konusunun belirlenmesinden yazımına kadar hiçbir konuda yardımlarını esirgemeyen, tecrübesi ile doğru soruları sormamı ve cevaplarını aramaya yönelmemi sağlayan, çalışmanın bilimsel bütünlüğünü oluşturmamda her türlü desteği sağlayan olan tez danışmanım, değerli Hocam Prof. Dr. Gaye ÖNGEN'e teşekkür ederim.

Tez izleme komitesinde yer alan, değerlendirme ve yorumları ile yapıcı önerilerde bulunan Prof. Dr. Kemal Sami KORMAZ ve Prof. Dr. Ayşe Semra KOÇTÜRK'e teşekkür ederim.

Cornell Üniversitesi'ndeki çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübesi ile çalışmalarına yön veren, laboratuvarındaki tüm imkânları kullanmamı sağlayan, Prof. Dr. Carl A. BATT'e teşekkür ederim

Cornell Üniversitesi'ndeki laboratuvar arkadaşlarım Dr. Jaime Maria Tome AMAT, Dr. Cameron L. BARDLIVING, Dr. Chavez CARTER, Dr. Stephanie A. PARKER'a tez çalışmalarına değerli katkıları ve Ithaca'daki yaşantımızda gösterdikleri misafirperverlik ve arkadaşlık için, BATT Lab ekibine de tez uygulamalarımındaki yardımları için teşekkür ederim.

Sadece yazışma aracılığı ile dahi tez çalışmalarına önemli katkıda bulunan Dr. Leonardo M. Damasceno'ya teşekkür ederim.

Bu alana attığım ilk adımlarda bilgi ve tecrübelerini paylaşan ve hızlı bir başlangıç yapmamı sağlayan Prof. Dr. Mehmet İNAN ve laboratuvar ekibine teşekkür ederim.

Başta Dr. Bilge DEBELEC BÜTÜNER olmak üzere Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Kanser Genetiği laboratuvarı ekibine yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Ayrıca gerek linsans, gerekse lisans üstü eğitimime önemli katkılarda bulunan Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Hocalarıma teşekkür ederim.

Bu çalışmanın gerçekleşebilmesi için 114S773 proje numarası ile finansal destek sağlayan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Her zaman olduğu gibi eğitim hayatımda da tđm kararlarımda beni destekleyen, akademik kariyerimi bir adım öteye taşımam için ellerinden gelen her türlü yardım ve desteği sağlayan kardeşim Turan AKKALE'ye, ablam Sevda AKKALE'ye, annem Gülseren AKKALE'ye ve babam Enver AKKALE'ye teşekkür ederim.

Son olarak, tđm akademik hayatım boyunca çalışmalarımın uygulama ve yazımlarında yardımcı olan, farklı bir bakış açısını görmemi sağlayan, verdiğim tđm kararlarda bana destek olan, her derdimi paylaşabildiğim, her zaman yanımda olduğunu bildiğim, en iyi arkadaşım, sevgili eşim Hilâl Betül KAYA AKKALE'ye teşekkür ederim.

Cengiz AKKALE

İzmir – 2016

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	VII
ABSTRACT	IX
TEŞEKKÜR	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ	XVI
ÇİZELGELER DİZİNİ	XXIII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XXV
1 GİRİŞ	1
2 LİTERATÜR ÖZETİ.....	9
2.1 Monoklonal antikor üretim sistemlerinin gelişimi	9
2.2 Rekombinat hücre kültürleri ile güncel monoklonal antikor üretim sistemleri.....	10
2.3 Rekombinant mikroorganizmaların kullanımı ile monoklonal antikor ve antikor fragmenti üretimi.....	11
2.4 <i>Pichia pastoris</i> 'te rekombinant protein üretimi.....	12
2.4.1 <i>Pichia pastoris</i> 'te monoklonal antikor ve antikor fragmenti üretimi	16
2.4 Kodon optimizasyonu ile protein ifadesinin artırılması	17
2.5 Altın nanopartikülleri ile konjuge monoklonal antikorların teşhis testlerinde kullanımı	18
2.6 Anti-cTnI antikorü üretimi	19
3 MATERYAL VE YÖNTEM.....	20
3.1 Materyal.....	20

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.1.1 Mikroorganizmalar.....	20
3.1.2 Kullanılan besiyerleri, çözeltiler ve kimyasallar.....	20
3.1.3 Kullanılan cihazlar	23
3.2 Yöntem.....	25
3.2.1 Konstrükt Tasarımı ve Eldesi.....	25
3.2.2 Ön çalışma kapsamında denenen diğer konstrüktler.....	27
3.2.3 Konstrükt Çoğaltımı ve <i>Pichia pastoris</i> Suşlarının Transformasyonu	28
3.2.4 <i>Pichia pastoris</i> 'in elektroporasyonu	29
3.2.5 Transforme Kolonilerin Doğrulanması ve Gen İfadesinin Belirlenmesi ..	30
3.2.6 Mikroskopik İnceleme	30
3.2.7 “Yeastern” Yöntemi ile Protein İfadesinin Taranması	30
3.2.8 Kültür Süpernatantlarında Rekombinant Protein Aranması	32
3.2.9 Küçük Ölçek (20 ml) Sıvı Kültürde Rekombinant Protein Saflaştırılması33	33
3.2.10 Rekombinant protein miktarının farklı fraksiyonlarda belirlenmesi.....	33
3.2.11 Saflaştırılan Rekombinant ScFv ile Kardiyak Troponin I Proteininin Tespit Edilmesi	34
3.2.12 Antikor fragmentinin altın nanopartiküllerle konjugasyonu.....	37
3.2.13 Biyoreaktörde 1,5 L Ölçekte Üretim.....	38
3.2.14 Orta Ölçek (1,5 L) Sıvı Kültürde Rekombinant Protein Saflaştırılması39	39
3.2.15 Saflaştırılan Rekombinant ScFv ile Troponin I Proteininin Tespit Edilmesi	40
4 BULGULAR VE TARTIŞMA	40
4.1 pPICZαA-antiTNNI3 Konstrüktü Kullanılarak Elde Edilen Bulgular	40
4.1.1 Konstrükt eldesi	40
4.1.2 <i>Pichia pastoris</i> 'in transformasyonu	42
4.1.3 Mikroskopik inceleme.....	43
4.1.4 Küçük ölçekte rekombinant protein üretimi	43
4.2 pPIC9K ve pPIC9 Plazmitleri Kullanılarak Elde Edilen Bulgular	45

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.2.1 Konstrukt eldesi	45
4.2.2 <i>Pichia pastoris</i> 'in transformasyonu.....	46
4.2.3 “Yeastern” Yöntemi ile Protein İfadesinin Taranması	47
4.2.4 Küçük Ölçekte Rekombinant Protein Üretimi.....	48
4.2.5 1.5 l Ölçekte Biyoreaktörde Rekombinant Protein Üretimi	49
4.3 Protein Saflaştırması	52
4.4 Protein Analiz Sonuçları ve Altın Nanopartiküllerle Konjugasyonun Etkisi	55
5 SONUÇ VE ÖNERİLER.....	61
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	63
ÖZGEÇMİŞ	78

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1. 1 Hastanın kanındaki troponin ve CK-MB seviyelerinin miyocardial enfarktüsü takip eden günlerde değişimleri (Bonow et al., 2006).	2
1. 2 <i>Pichia pastoris</i> 'te rekombinant protein üretimi için göz önünde bulundurulması gereken genel özellikler. İlgili geni içeren ifade plazmitleri transformasyondan önce linearize edilir. E. coli'de plasmit çoğaltımı için seçici markırlara ve replikasyon başlangıcı bölgesine gerek duyulur. İlgili genin ifade edilme seviyesi, genin kromozomda yerleştiği lokusa ve gen kopya sayısına bağlıdır. Şekilde promotör (P) ve transkripsiyon sonlandırıcısı (TT) gösterilmiştir. Uygun sinyal peptitleri, proteinin hücre içi, hücre dışı veya membran proteini olarak üretilmesini sağlar (Ahmad et al., 2014).	5
Şekil 1. 3 <i>Pichia pastoris</i> 'te metanol yolizi.	6
Şekil 1. 4 <i>Pichia pastoris</i> genomu içerisine ekspresyon vektörünün entegrasyonu (Invitrogen, 2010).	7
Şekil 1. 5 pPICZ α A ekspresyon vektör haritası (Invitrogen, 2010).....	7

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3. 1 <i>Pichia pastoris</i> 'te gen ifadesi için tasarlanan konstrüktün genel görünümü (Çizim: SnapGene Viewer). AOX1: <i>Pichia</i> 'da metanol ile teşvik edilen promotor bölge. α -factor: proteinin hücre dışına etkin salınımını sağlar. 6xHis: protein saflaştırmada ve spesifik tanıma deneylerinde yararlanılan altı adet Histidin aminoasidi kodlayan bölge. AOX1 Terminator: Transkripsiyon sonlama ve poliadenilasyon bölgesi. TEF1: Transkripsiyon uzama faktörü 1 geni promotörü, <i>Pichia</i> 'da Zeocin ®'e dayanıklılıkla ilişkili Sh ble geninin ifadesini sağlar. EM7 Sh bl geninin <i>E. coli</i> 'de sürekli ifadesini sağlar. BleoR: Zeocin ® antibiyotiğine dayanıklılık geni. CYC1 terminatör: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CYC1 geni, Sh bl geninin uygun şekilde işlenmesini ve stabilize olmasını sağlar. Ori: <i>E. coli</i> 'de plazmit replikasyonu ve devamlılığını sağlar. SacI: konstrüktün AOX1 bölgesinde linearizasyonunu sağlayan restriksiyon bölgesi. <i>EcoRI</i> ve <i>SalI</i> : Sentezlenen genin sırasıyla 5' ve 3' bölgelerindeki kesim bölgesi ve plazmit üzerindeki klonlama bölgesi.....	27
Şekil 3. 2 Yeastern yönteminde kolonilerin yerleşimini gösteren şablon.	31
Şekil 3. 3 Yeastern yönteminin uygulanması sırasında kullanılan agar, membran, filtre kağıdı ve koloni düzeni. Nitroselülöz membranın hidrofilik olması besin ortamındaki nütrientlerin ve suyun mikroorganizmaya ulaştırılmasında önemli bir rolü vardır.	32
Şekil 3. 4 Kardiyak Troponin I proteininin tespiti için yapılan ELISA çalışmasının basamakları. 1) ELISA kuyucuğunun Kardiyak Troponin I proteini ile kaplanması; 2) Rekombinant antikor fragmentinin cTnI proteinine bağlanması; 3) Alkalen fosfataz işaretli anti-polihistidin antikorunun rekombinant protein üzerindeki 6x Histidin işaretine bağlanması; 4) Renk reaksiyonu substratının eklenmesi ile kuyucuk içerisinde sarı renk oluşumu reaksiyonunun gerçekleşmesi.	36
Şekil 3. 5 Çalışmada kullanılan biyoreaktör ve kontrol ünitesi.....	39

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3. 6 100 ml hacme sahip Nikel afinite kolonu kullanılarak yapılan protein saflaştırma işleminde kolona beslenen çözeltilerin grafiksel gösterimi (Grafik: Unicorn programı). Şekil üzerinde gösterilmemesiyle birlikte “Örnek” yüklemesi öncesinde kolon, 4 kolon hacmi bağlanma tamponu ile şartlandırılmıştır.	40
Şekil 4. 1 Transforme E. coli’den izole edilen pPICZA-anti TNNI3 konstrüktünün. EcoRI-SalI enzimleri ile çift restriksiyonu (1-4) ve aynı plazmitlerin süper sarmal durumlarının (5-8) agaroz jeldeki görünüşleri.	41
Şekil 4. 2 1 numaralı koloniden elde edilen plazmidin SacI enzimi ile lineerizasyonu sonucunda elde edilen yaklaşık 4500 bp büyüklüğündeki DNA’nın %1’lik agaroz jeldeki görünümü.	42
Şekil 4. 3 <i>Pichia pastoris</i> GS115 suşunun pPICZαA-antiTNNI3 konstrüktü ile transformasyonu sonucu elde edilen kolonilerde yapılan PCR ile elde edilen ürünlerin agaroz jeldeki görünüşleri. 1-18: Farklı kolonilerden elde edilen sonuçlar. 19-20: Doğrudan konstrüktün PCR’da kalıp DNA olarak kullanılması ile elde edilen sonuçlar. 21: Kalıp DNA kullanılmadan gerçekleştirilen negatif kontrol sonucu. 22: Linnerize edilmiş konstrüktün jeldeki görünümü.....	42
Şekil 4. 4 Sıvı kültürden alınan <i>Pichia pastoris</i> örneğinin mikroskopta, 100X objektif ile görünümü.....	43
Şekil 4. 5 Küçük ölçekte protein ifadesi denemelerinde 4 kolonide metanol beslemesinin 0 (1-0 – 4-0) ve 24. (1-24 – 4-24) saatlerinde alınan örneklerin kültür süpernatantlarındaki protein profilleri. Yaklaşık 30 kDa büyüklüğünde görülmesi gereken bant görülmemektedir.....	44
Şekil 4. 6 Kültür süpernatantındaki protein profilinin zamanla değişimini gösteren SDS-PAGE görüntüsü. Örnekler her bir şeridin başında belirtilen saatlerde alınmıştır.	44

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4. 7 Transforme <i>E. coli</i> 'den izole edilen pPIC9-anti TNNI3a, pPIC9-anti TNNI3b ve konstruktünün ilgili enzim çiftleri ile restriksiyonu (1-3) ve aynı plazmitlerin aşırı sargılı durumlarının (4-6) agaroz jeldeki görünüşleri.	45
Şekil 4. 8 Transforme kolonilerden elde edilen plazmitlerin SacI enzimi ile lineerizasyonu sonucunda elde edilen yaklaşık 8800 bp büyüklüğündeki pPIC9antiTNNI3a ve pPIC9antiTNNI3b konstruktleri (1-2) ve yaklaşık 10000 bp büyüklüğündeki pPIC9k-antiTNNI3 konstruktünün %1lik agaroz jeldeki görünüşü.	46
Şekil 4. 9 <i>Pichia pastoris</i> GS115 suşunun pPIC9K-antiTNNI3 konstruktü ile transformasyonu sonucu elde edilen kolonilerde yapılan PCR ile elde edilen ürünlerin agaroz jeldeki görünüşleri (diğer konstruktlerin PCR sonuçları gösterilmemiştir).	47
Şekil 4. 10 Yeastern yönteminde kolonilerin petri üzerinde görünüşü (A) ve kolonilerin izdüşümlerinde nitroselülöz membran üzerinde koyu renkli lekeler (B) olarak görülen rekombinant proteinler.	48
Şekil 4. 11 Çalkalamalı erlende 96 saatlik inkübasyon sonrasında kültür süpernatantlarındaki protein profilinin SDS-PAGE jelindeki görünüşü. 1-5 numaraları denemede kullanılan kolonilerin numaralarını, "M" protein markırını göstermektedir. Jel üzerindeki ok rekombinant antikor fragmentini göstermektedir. Çerçeve içinde gösterilen 1 numaralı koloni ise biyoreaktörde üretim için seçilen kolonidir ve bu noktadan itibaren çalışmaya bu koloni kullanılarak devam edilmiştir.	49
Şekil 4. 12 Metanol teşvikine karşı yaş hücre ağırlığı grafiği.	50

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4. 13 Seçilen bir kolonide yapılan 1,5 litre üretim süresince farklı zamanlarda alınan örneklerdeki protein içeriğinin %15'lik poliakrilamid jelde 20 V/cm gerilim altında 45 dk boyunca ayırılması ve Coomassie mavisi ile boyanması sonucu elde edilmiş jel görüntüsü. 1-6 numaralı şeritler sırası ile 0., 12., 24., 48., 72. ve 96. saatlerde alınan örnekler. Bu örneklerdeki yaş hücre ağırlıkları sırası ile 93, 120, 168, 462, 578, 545 gram yaş hücre/ litre kültür olarak belirlenmiştir.....	51
Şekil 4. 14 Biyoreaktörde üretim sırasında kaydedilen oksijen konsantrasyonu ve karıştırma hızı verileri ile elde edilen grafik. 1: biyoreaktöre aşı kültürün eklenmesi, 2: çözünmüş oksijen konsantrasyonunun işletme koşulu olan %40 seviyesine inmesi ve kaskat sisteminin devreye girerek karıştırma hızının kademeli olarak artması, 3: biyokütle üretimi fazında gliserolün bitmesine bağlı olarak oksijen talebinin hızla azalması, 4: hücrelerin adapte olması ve metanol teşvikinin başlaması, 5: karıştırma hızının en yüksek seviyeye ulaşması ve saf oksijen takviyesinin başlaması, 6: üretimin sonlandırılması.	52
Şekil 4. 15 Protein saflaştırmanın farklı aşamalarından alınan örneklerin protein içerikleri. 1: Kolona yükleme aşamasında kolona bağlanmayan proteinler. Az miktarda rekombinant protein görülmektedir. 2-5: Yıkama basamağı ile kolondan 20 mM imidazole ile uzaklaştırılan proteinler. Rekombinant proteinin bu basamakta da bir miktar kaybedildiği görülmektedir. 6: Elüsyon basamağının ilk kısmında elde edilen protein içeriği. Bu noktada rekombinant protein yüksek miktarda elde edilmesine karşın yüksek saflıkta elde edilmediği görülmektedir. 7: Elüsyonun ikinci kısmında rekombinant proteinin yüksek saflıkta elde edildiği görülmektedir. 8: Kolona yüklenen örnekteki toplam protein içeriği. 9: Western blot için pozitif kontrol olarak kullanılan, 6XHistidin ile işaretli J591 proteini.	53
Şekil 4. 16 Şekil 4.12'de belirtilen örneklerin aynı düzende gerçekleştirilmiş Western blot çalışması. Görüldüğü gibi tüm basamaklarda rekombinant protein anti polihistidin antikoru ile tespit edilmiş ve alkalen fosfataz enzim reaksiyonu ile boyanmıştır.....	53

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4. 17 İmmobilize metal afinitesi kromatografisi kolon çıkışı UV absorbans profili ve diğer parametreler. Grafik üzerinde numaralar ile gösterilen aşamalarda örnek alınmış ve SDS-PAGE ile görüntülenmiştir (Grafik: Unicorn Software). ..	54
Şekil 4. 18 Düzenleme sonrası yapılan protein saflaştırma işleminin farklı basamaklarındaki protein içerikleri. 1: Kolona yükleme sonrasında kolona bağlanmayan protein içeriği. Bir miktar rekombinant protein kaybının gerçekleştiği görülmektedir. 2-4: 50 mM imidazole ile yıkanan kolon çıkışındaki protein içerikleri. Rekombinant protein kaybı büyük oranda önlenmiştir. 5-7: Ortalama 300 mM imidazol ile elüsyonu yapılan rekombinant protein. 8-9: 500 mM İmidazol ile devam eden elüsyon sonrasında herhangi bir proteinn bandı görülmemiştir. Bu uygulamada safsızlıkların büyük oranda azaltıldığı görülmektedir.....	54
Şekil 4. 19 6XHistidin hedefli ELISA çalışmasında rekombinant antikor fragmenti ile daha önce üretilmiş J591 antikor fragmentinin protein konsantrasyonu (405 nm'de absorbans) bakımından karşılaştırılması.	56
Şekil 4. 20 Rekombinant antikor fragmentinin kardiyak Troponin I tespit yeteneği ve altın nanopartiküllerle konjugasyonun etkisi. A: Seyreltilmemiş, konjuge edilmemiş antikor fragmenti. B: Seyreltilmemiş, altın nanopartikül ile konjuge edilmiş antikor fragmenti, C: 1/10 seyreltilmiş, konjuge edilmemiş antikor fragmenti, D: 1/10 seyreltilmiş, altın nanopartikül ile konjuge antikor fragmenti. 1/500-1/8000: Kardiyak troponin I (35mg/ml) protein seyreltme faktörü.	57
Şekil 4. 21 pPICZ α A, pPIC9 ve pPIC9k plazmitlerinde yer alan Kex2 kesim bölgesi kırmızı dikdörtgen ile belirtilmiştir (Şekil: SnapGene Viewer 2.8.3).	58
Şekil 4. 22 Antikor fragmenti DNA ve amino asit dizisinden bir kesit. Kex2 tanıma bölgeleri kırmızı dikdörtgen ile gösterilmiştir (Şekil: SnapGene Viewer 2.8.3)...	59
Şekil 4. 23 Antikor fragmenti DNA ve amino asit dizisinden bir kesit. Değiştirilen Kex2 tanıma bölgelerinin güncellenmiş hali kırmızı dikdörtgen ile gösterilmiştir (Şekil: SnapGene Viewer 2.8.3).	59

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)ŞekilSayfa

Şekil 4. 24 Anti cTnI antikor fragmentinin hafif zincirindeki iki adet KR bölgesinin KH ile değiştirilmesi sonrasında (A, C) ve değiştirilmesden önceki (B, D) aminoasit dizileri ile Phyre² servisi kullanılarak elde edilmiş moleküler modelleri. Sağ ve sol taraftaki molekül modelleri görsel olarak karşılaştırıldığında aralarında belirgin bir fark görülememektedir.60

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2. 1 <i>Pichia pastoris</i> rekombinant protein üretim sisteminde, gen ifadesi için kullanılan promotorların en çok kullanılanları ve son yıllarda geliştirilenlerinden örnekler.....	13
Çizelge 2. 2 2014 yılı itibarı ile <i>Pichia pastoris</i> kullanılarak üretilmiş ve ticarileştirilmiş/ ticarileştirme sürecinde olan bazı rekombinant protein ürünleri, ticari ürün hakkına sahip firma ve kullanım alanları (www.pichia.com).	15
Çizelge 3. 1 Rekombinant antikor fragmenti DNA dizisi.	25
Çizelge 3. 2 Troponin I tespitinde uygulanan ELISA yöntemi için kullanılan pleyt yerleşimi şablonu.....	37

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar

AOX1: Alkol oksidaz 1 promotoru

AOX2: Alkol oksidaz 2 promotoru

BCIP-NBT: 5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt - nitro-blue tetrazolium chloride

BMG: Tamponlanmış gliserol ortamı

BMGY: Maya ekstraktlı tamponlanmış gliserol ortamı

BMM: Tamponlanmış metanol ortamı

BMMY: Maya ekstraktlı tamponlanmış metanol ortamı

BSA: Sığır serum albümini (Bovine Serum Albumin)

CDR: Tamamlayıcılığı belirleyen bölge (Complementarity Determining Region)

CHO: Çin Hamstır Yumurtası (Chinese Hamster Ovary)

CKMB: Kreatin kinaz kas-beyin tipi enzim (Creatin Kinase Muscle Brain Type Enzyme)

cTnI: Kardiyak troponin I

DNA: Deoksiribonükleik asit

ELISA: Enzime Dayalı İmmunosorban Deney (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Fab: Antikorda antijen bağlayıcı kısım (Fragment Antigen Binding)

HAS: İnsan Serum Albümini (Human Serum Albumin)

IgG: İmmün Globulin G

LS-LB: Düşük Tuzlu Luria Bertani (Low Salt Luria Bertani)

NEB: New Englan Biolabs

PBS: Fosfat tamponlu tuzlu su çözeltisi (Phosphate Buffer Saline)

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction)

PMSF: Fenilmetilsülfonil florür (Phenylmethysulfonyl floride)

PNPP: p-nitrophenyl phosphate disodium salt

PSMA: Prostat Spesifik Membran Antijeni

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Kısaltmalar

RNA: Ribonükleik asit

ScFv: Tek Zincir Değişken Kısım (Single Chain Variable Fragment)

SDS-PAGE: Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (Sodium Dodecylsulphate-polyacrilamide gel electrophoresis)

V_H: Antikor ağır zincir değişken bölgesi (Variable heavy)

V_L: Antikor hafif zincir değişken bölgesi (Variable light)

YNB: Maya Azot Temeli (Yeast Nitrogen Base)

YPD: Maya ekstraktı Pepton Dekstroz (Yeast Pepton Dextrose)

YPDS: YPD Sorbitol

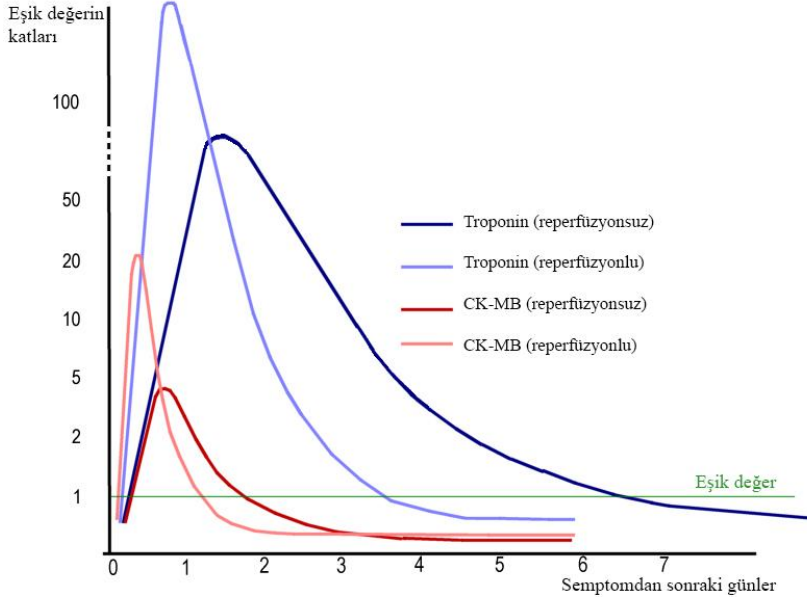
1 GİRİŞ

Kronik hastalıkların etkisinin gelişmekte olan ve gelişmiş ülkelerde yıldan yıla giderek artmasıyla birlikte kronik hastalıkların insan sağlığına etkilerinin öngörülmesi, anlaşılması ve gerekli olduğu durumlarda hızla müdahale edilmesi hayati bir önem taşımaktadır. Kalp ve damar hastalıkları %30 ile tüm ölüm sebepleri arasında ilk sırada yer almaktadır (Dünya Sağlık Örgütü, 2006). Her yıl 7,6 milyon kişi koroner kalp hastalıklarından, 5,71 milyon kişi inme ve diğer kardiyovasküler hastalıklardan dolayı hayatını kaybetmektedir (Dünya Sağlık Örgütü, 2008). Bu hastalıkların içinde kalp krizi önemli bir paya sahiptir. Kalp krizinin teşhisi müdahale imkânını dolayısı ile hastanın hayatta kalma şansını çok büyük oranda artırmaktadır.

Günümüzde kalp krizi teşhisi kardiyak biyomarkörlere dayalı olarak yapılmaktadır (McLean and Huang, 2012). Kardiyak biyomarkörlerin kandaki düzeylerinin tespit edilmesi günümüze kadar farklı yöntemlerle gerçekleştirilmiştir. (Korff, 2006; Lewandrowski et al., 2002; Skeik and Patel, 2007). Kalp krizi sırasında kalp kaslarının zarar görmesi ile kan dolaşımına katılan kreatin kinaz MB enzimi (creatin kinase muscle brain type - CKMB) bu alanda kullanılan ilk biyomarkörlere dendir (McLean and Huang, 2012) CKMB önceleri enzim aktivitesi tayini yöntemiyle tespit edilse de daha sonra monoklonal antikörlerin geliştirilmesiyle immünolojik testlerle çok daha hızlı ve hassas bir şekilde tespit edilmiştir (Dolci and Panteghini, 2006). Ancak daha sonra yapılan çalışmalar CKMB'nin iskelet kası dokusunda meydana gelen hasarlanmalar sonucu kanda yapılan analizlerde tespit edildiğini, dolayısıyla yeterince özgül olmadığını ve yanlış pozitif sonuçlar verebildiğini ortaya koymuştur (Dolci and Panteghini, 2006; Ladenson, 2007; Ruzich, 1992). 2000 yılında akut miyokardial enfarktüs (AMI) teşhisi amacıyla kardiyak troponin I (cTn)'nin tercih edilmesinin daha uygun olacağı bildirilmiştir (Alpert et al., 2000). Bu özellikleri ile iyi bir kardiyak markör adayı olduğunu gösteren cTn "Miyokardial Enfarktüsün Yeniden Tanımlanması için Dünya Kalp Federasyonu Görev Gücü" tarafından 2007 yılında tekrar kullanıma konulmuştur (Thygesen et al., 2007).

Kardiyak enfarktüs durumunda kandaki troponin I seviyesi birinci günün sonunda hızla yükselerek tepe noktasına ulaşır. Bu aşamadan itibaren normal koşullarda troponin I seviyesi kademeli olarak azalır ve yaklaşık 10-14 gün

boyunca kanda tespit edilebilir seviyede kalır (Şekil 1). Bu özelliğinden dolayı ilk semptomdan günler sonra dahi yapılan testlerde kardiyak enfarktüs bulgusuna raslanabilmekte ve farkında olmadan kalp krizi geçirilmesi durumunda teşhis ve tedavi şansı artmaktadır (Kupari et al., 2005; Nunes, 2010).



Şekil 1. 1 Hastanın kanındaki troponin ve CK-MB seviyelerinin miyocardial enfarktüsü takip eden günlerde değişimleri (Bonow et al., 2006).

Kardiyak markör olarak yaygın bir şekilde kabul gören cTnI'nin kanda tespit edilmesi immünojenik yöntemlerle yapılmaktadır. Bu yöntemlerde anti-cTnI antikorları kullanılarak kan numunesindeki troponin moleküllerine bağlanması ve hızlı testlerin hemen hemen tamamında olduğu gibi antikorlara altın nanopartiküllerin konjuge edilmesi ile görünür hale gelmesi sağlanmaktadır. Bu yöntem WO2007085411 A1 patent numarası ile Hallermayer et al. (2007) tarafından patentlenmiştir. Anti-cTnI antikorunun kardiyak enfarktüs tanı kitlerinde bu kadar yaygın bir şekilde kullanılması üretilebilecek alternatif bir proteinin ticari değerini göstermektedir. *Pichia pastoris* kullanılarak rekombinant anti-cTnI antikorunun fragment formunda üretilmesinin avantajlarının gösterilmesi gerekmektedir.

Tek zincir antikor fragmentleri (scFv), kısa esnek bir bağlayıcı yoluyla tek polipeptid zincirinin içerisine birlikte kaynaşan antikorun ağır (VH) ve hafif (VL) zincirlerinin değişken bölgelerini içermektedir. Bunlar, minimum boyutta (-30 kDa) tek bir polipeptid zinciri içinde, tam bir antijen-bağlanma bölgesini taşırlar.

Buna ek olarak, düşük konsantrasyon ve fizyolojik sıcaklıklarda bile kararlı kalabilen monomerik bir yapıya sahiptirler (Devaux et al., 2001).

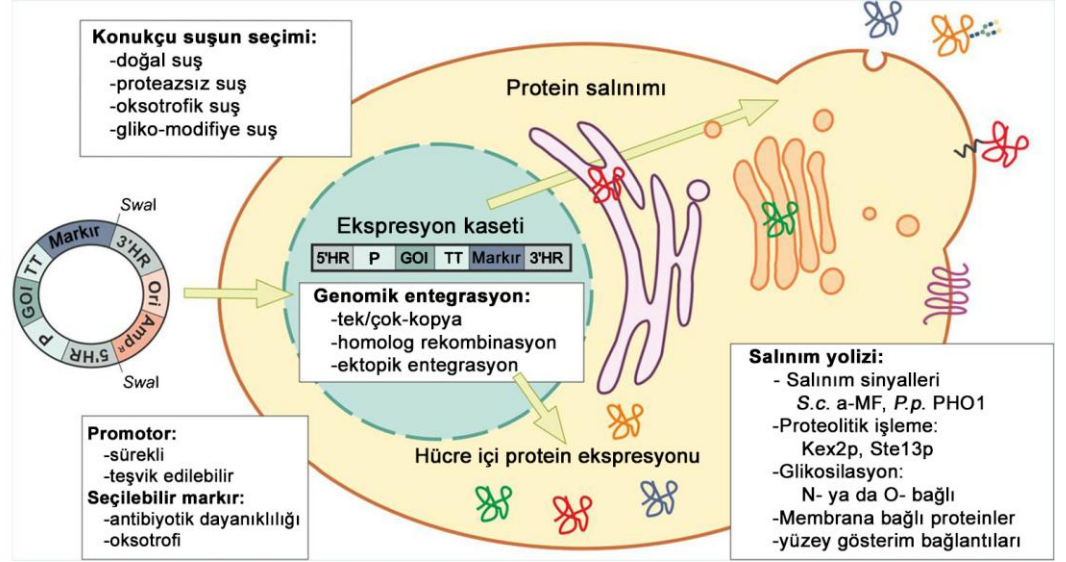
Kardiak enfarktüs teşhis testlerinde kullanılan antikorların üretimi konvansiyonel olarak hibridoma hücrelerinde yapılmaktadır (Tyagi et al., 2011; Zola, 2001). Çin hamster yumurtası (Chinese hamster's ovary - CHO) hücre hatları da son yıllarda rekombinant monoklonal antikor üretiminde yoğunlukla kullanılmaktadır (Li et al., 2010). Ancak her iki yöntemin de bir takım dezavantajları bulunmaktadır. Hibridoma hücrelerinin antikor üretimi için en uygun sistemlerden biri olmasına karşın bu yöntemin maliyetli olması, fare ve tavşan gibi konukçu hayvanların kullanılması ve üretilen antikor konsantrasyonunun düşük olması bu dezavantajlardan bazılarıdır (Lonberg, 2008). Ayrıca bu üretim sistemlerinde üretilen antikorların bütün olarak elde edilmesi, antikor molekülünün büyüklüğü ve karmaşıklığından dolayı ürün kararlılığını önemli ölçüde azaltmaktadır (Chames et al., 2009; Ghosh and Ansar, 2013). Bunlara ek olarak hücre kültüründe en iyi koşulların sağlandığı proseslerde dahi *in vivo* üretilen antikor konsantrasyonuna (1-5 mg/ml) oranla çok düşük konsantrasyonlarda (1-20 µg/ml) kalmakta ve ayırma saflaştırma işlemlerini güçleştirerek ek maliyet yükü getirmektedir (Ghosh and Ansar, 2013, Zola, 2001). Diğer yandan *in vivo* üretimin ascites sıvısının içinde gerçekleştirilmesi hayvansal proteinlerin, olası virüslerin ve diğer mikroorganizmaların üretim ortamına karışmasına sebep olmaktadır (Aghehati Maleki et al., 2013; Leenaars and Hendriksen, 2005). CHO hücre hatları kullanılarak üretilen antikorlarda ise, farklı üretimler arasında üretim konsantrasyonu ve antikor glikozilasyonu bakımından heterojenite görülmektedir. Bu durum rekombinant CHO hücre hatlarında üretilen antikorların antijen afinitesi ve özgüllüğü bakımından farklılıklar göstermesine sebep olmaktadır. Üretilen monoklonal antikorlar arasındaki bu heterojenite, kullanılacakları tanı testlerinin tespit limiti, tekrarlanabilirlik, doğruluk gibi özellikler bakımından gerekli standartlara ulaşılmasında zorluklara sebep olmaktadır (Chames et al., 2009; Chan and Carter, 2010; Ghosh and Ansar, 2013).

In vivo üretimlerde karşılaşılan bu problemler monoklonal antikorların *in vitro* üretimlerinin iyileştirilerek daha yüksek konsantrasyonlarda monoklonal antikor elde edilmesine öncü olmuştur.

Mayalar genel olarak ucuz üretim ortamlarında yüksek hücre konsantrasyonlarına ulaşabilmeleri, hızlı büyüme ile genetik manipülasyon kolaylığını kombine etmeleri ve karmaşık posttranslasyonel modifikasyon kapasitesine sahip olmalarından dolayı (Faber et al., 1995; Romanos, 1995) ökaryotik heterolog proteinlerin üretimi için uygun konukçu organizmalardır. Ayrıca ürettikleri rekombinant ürünlerin endotoksin, onkogenik ve viral DNA içermemeleri de önemli bir avantajdır. *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha* ve *Kluyveromyces lactis* gibi maya türleri rekombinant üretimler amacıyla en yaygın kullanılan maya türlerindedir (Lin-Cereghino et al., 2000). Maya ekspresyon sistemleri yaklaşık olarak 25 yıldan fazladır temel araştırmalar ve biyoteknoloji endüstrisinde insan, hayvan, bitki, mantar, bakteri ve viral kökenli rekombinant proteinlerin üretimi ve salınımında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Bir çok durumda mayalar konvansiyonel yöntemlerle üretimi mümkün olmayan, doğal kaynaklardan yeterli oranlarda izole edilemeyen ve/veya doğada bulunmayan heterolog proteinlerin üretiminde kullanılmışlardır. Bu durum aynı zamanda tıbbi ve farmakolojik benzer proteinlerin yapısal ve fonksiyonel çalışmalarının yapılmasını da sağlamıştır (Damasceno et al., 2009, 2007).

Sınırlı sayıda maya türü enerji ve karbon kaynağı olarak metanolü kullanabilmektedir. Bunlar *H. polymorpha* (*Pichia angusta*), *P. pastoris*, *Candida boidinii*, ve *Pichia methanolica* (Gellissen, 2000) türleridir. Bunlar içerisinde en önemli olanı *Pichia pastoris*'tir. 1960'ların sonlarında doğal metandan metanol sentezinin ucuz olmasından dolayı, ilk olarak *Pichia pastoris* metanol içeren ortamda verimli büyüme özelliğinden tek hücre proteinleri (Single Cell Protein-SCP) üretimi için seçilmiştir (Higgins and Cregg, 1998). Bu durum Phillips Petroleum Şirketi'nin *Pichia pastoris*'in yüksek hücre yoğunluklarında kültüre alınması için gelişmiş ortam ve protokol geliştirmesine ön ayak olmuştur. 1980'ler de Phillips Petroleum Şirketi ve Salk Institute Biotechnology/Industrial Associates, Inc. (SIBIA, La Jolla, CA) rekombinant proteinlerin ekspresyonu için *Pichia pastoris* temelli sistem geliştirmeye başlamışlardır. Geliştirilen yeni ekspresyon sistemi, ekspresyonu indükleyen alkol oksidaz promotorunun güçlü ve sıkı bir şekilde kontrol edilebilmesinden dolayı yüksek seviyede heterolog protein üretimini mümkün kılmıştır (Sreekrishna et al., 1988; Tschopp et al., 1987). Bu sistem kullanılarak 500'den fazla protein klonlanmış ve ekspresyonu sağlanmıştır.

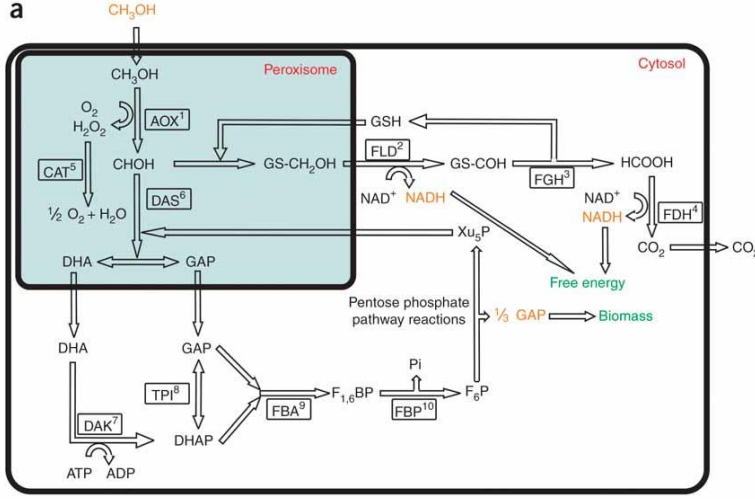
İyi tanımlanmış bir genetik yapıya sahip olması, güçlü ve teşvik edilebilir bir promotor ile rekombinant protein ifadesi üzerinde maksimum kontrol sağlaması, ökaryotik sistem olarak posttranslasyonel modifikasyonları yapabilmesi (Cereghino et al., 2002; Lin-Cereghino et al., 2000) gibi önemli avantajlara sahip *Pichia pastoris* ekspresyon sistemi ekonomik ve etkin bir rekombinant protein üretim aracıdır (Li et al., 2007; Rabert et al., 2013).



Şekil 1. 2 *Pichia pastoris*'te rekombinant protein üretimi için göz önünde bulundurulması gereken genel özellikler. İlgili geni içeren ifade plazmitleri transformasyondan önce linearize edilir. *E. coli*'de plasmid çoğaltımı için seçici markırlara ve replikasyon başlangıcı bölgesine gerek duyulur. İlgili genin ifade edilme seviyesi, genin kromozomda yerleştiği lokusa ve gen kopya sayısına bağlıdır. Şekilde promotor (P) ve transkripsiyon sonlandırıcısı (TT) gösterilmiştir. Uygun sinyal peptitleri, proteinin hücre içi, hücre dışı veya membran proteini olarak üretilmesini sağlar (Ahmad et al., 2014).

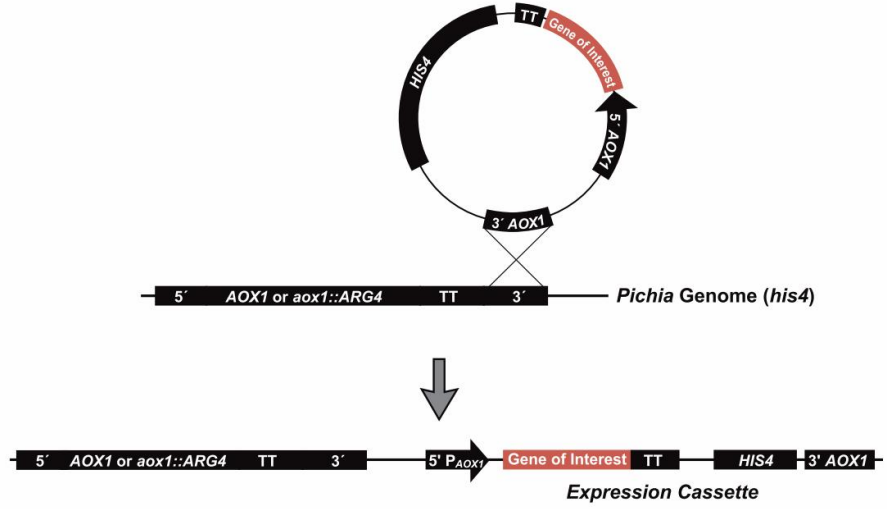
Pichia pastoris'te rekombinant proteinlerin üretiminin başarısı, metanol kullanım yolizinin ilk enzimini, alkol oksidaz I (AOX1), kodlayan genin promotorunun güçlü ve sıkı bir şekilde kontrol edilmesiyle doğrudan ilişkilidir (Şekil 1.2). Bu enzim metanol kullanım yolizinin diğer bileşenleri ile birlikte transkripsiyon seviyesinde kontrol edilmektedir (Cregg et al., 1989; Ellis et al., 1985). Metanol kullanım yolizinin bir bölümünün peroksizomlarda meydana gelmesinden dolayı bu organel, hücreler metanolü karbon kaynağı olarak kullandıklarında sayılarını arttırmakta ve sitoplazmik boşluğun %80'den fazlasına karşılık gelmektedirler (Gleeson and Sudbery, 1988). *Pichia pastoris*'te metanol kullanım yolizi Şekil 1.3'te gösterilmektedir. *Pichia pastoris*'te metanol yolizi

genlerinin ekspresyonu, özellikle AOX1 ve AOX2 genleri için, glukoz, gliserol ve etanol tarafından baskılanırken, metanol tarafından güçlü bir şekilde teşvik edilmektedir.



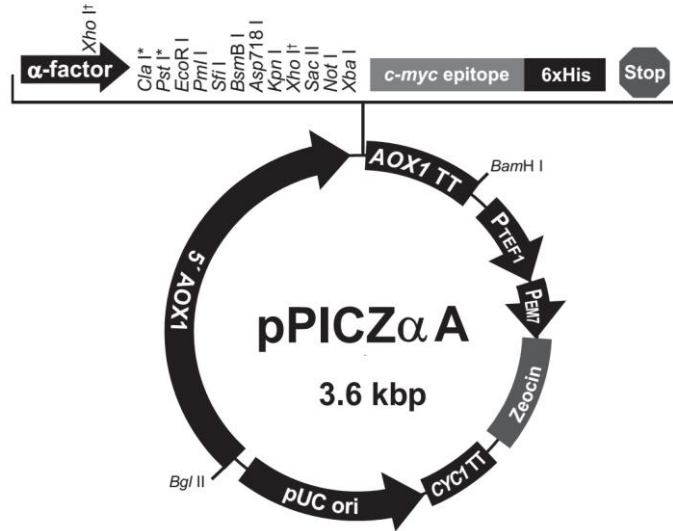
Şekil 1. 3 *Pichia pastoris*'te metanol yolizi (De Schutter et al., 2009).

Rekombinant protein üretiminde kullanılan bütün *Pichia pastoris* suşları NRRL-Y-11430 (Northern Regional Research Laboratories, IL) (Cregg et al., 2000) suşundan geliştirilmiştir. Başlangıçta bağımsız çok kopyalı epizomal vektörleri kullanılmıştır (Cregg et al., 1985). Genom içerisine entegrasyonun en kolay yolu, vektörü lineerleştirmek ve sonrasında lineerize plazmidi uygun mutant suşa aktarmaktır (Şekil 1.4). Şekil 1.4'te lineerleştirilmiş olan plazmidin 3' ucuna eklenen AOX1 geninin 3' ucu ile transkripsiyon terminasyon bölgesinin 5' ucu arasında homolog rekombinasyon sonucu entegrasyonu şematize edilmiştir (Romanos et al., 1998).



Şekil 1. 4 *Pichia pastoris* genomu içerisine ekspresyon vektörünün entegrasyonu (Invitrogen, 2010).

Genellikle, *Pichia pastoris*'te ekspresyon ve entegrasyon vektörleri, prokaryotik ve maya DNA elementlerinden oluşmaktadır. Bu vektörler çoklu klonlama bölgesi tarafından ayrılan transkripsiyon sonlandırma sekansıyla AOX1 fragmenti ve P_{AOX1} 'den oluşan bir ekspresyon kaseti içermektedir (Şekil 1.5).



Şekil 1. 5 pPICZ α A ekspresyon vektör haritası (Invitrogen, 2010).

Sonuç olarak prokaryotlar gibi, mayalar da ucuz ve hızlı bir şekilde üretilebilirler ve yüksek hücre yoğunluklarında üretimleri

gerçekleştirilebilmektedir (>400g/L) (Damasceno et al., 2004b). Karmaşık posttranslasyonel modifikasyon yapma kapasitesine sahip olmalarının yanısıra, pirojenik ve patojenik olmamaları ve verimli üretim sağlamaları avantaj sağlamaktadır. *Saccharomyces cerevisiae*'nin genetik olarak en iyi karakterize edilen maya olması ve farmasötik üretim proseslerinde yaygın olarak kullanılan maya türü olmasına rağmen, *Pichia pastoris* heterolog protein üretiminde günümüzde en sık kullanılan maya türüdür.

Bu tez kapsamında kalp krizi tanısında kullanılan en belirleyici antikorlardan, anti-cTnI antikorunun değişken bölgesi *Pichia pastoris*'te rekombinant olarak üretilmiş ve tanı kitinde kullanılabilirliğini belirleyen antijen afinitesi ve özgüllük (benzer molekülleri ayırt etme) özellikleri altın nanopartiküllerle konjugasyon öncesi ve sonrasında tespit edilerek sonuçlar karşılaştırılmıştır. Bu çalışma kapsamında ilk olarak ilgili antikor fragmentini kodlayan DNA dizisini içeren vektör temin edilmiş, *Pichia pastoris*'e aktarılabilen antikorun değişken bölgesinin analitik düzeyde ifade edilmesi sağlanmıştır.

2 LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Monoklonal antikor üretim sistemlerinin gelişimi

Antikor molekülünün keşfedilmesi ve aktivitesinin ortaya konması sağlık alanında önemli bir kilometre taşıdır. Kitasato, von Behring ve Calmette 1890 yılında, difteri ve tetanoz toksinlerine karşı antikor aktivitesini tanımladıklarından bu yana antikor üretimi ve kullanımı alanında çok sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir. Önceleri hastalıkların tedavisi amacıyla kullanılan antikorlar ilerleyen yıllarda teşhis alanında da yer bulmuştur. Giderek kullanım alanının artması ile daha fazla ihtiyaç duyulan antikorların üretim yöntemleri üzerine de çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bunlardan en önemlisi miyeloma hücresi ve B-lenfositlerinin füzyonu ile hibridoma hücrelerinin elde edilmesi olmuştur (Köhler and Milstein, 1975). Bu sayede tek tip epitopa sahip “monoklonal antikor” üretilmiş ve antikor temelli araçların özgüllüğü artırılmıştır. Mürin kökenli hücrelerle elde edilen hibridomalarda üretilen mürin monoklonal antikorları 1980’lerde klinik ilaç geliştirme çalışmalarına konu olmuş ancak bu alanda önemli sorunlar yaşanmıştır. Mürin monoklonal antikorları genellikle alerjik reaksiyonlara ve anti-ilaç antikorlarının teşvikine yol açar. İnsan Fc reseptörlerine daha zayıf bağlanmaları ise kısa yarı ömre sahip olmalarına neden olur (Ober et al., 2001). Mürin antikorları, antikora dayalı hücrel sitotoksosite ve komplemente dayalı sitotoksosite görevlerini yeteri kadar yerine getirmediğinden, özellikle onkolojik vakalarda, efektör fonksiyonu etkisinin çok düşük seviyede kaldığı bildirilmiştir (Stern and Herrmann, 2005).

Tam antikorların proteolitik papain enzimi ile antikor bağlayıcı kısım (Fragment antigen binding – Fab) ve sabit kısım (Fragment crystallizable – Fc) olarak alt birimlerine ayrılabilirdiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Inbar et al., 1972). Gen aktarımı teknikleri ile bu alt birimlerde bulunan değişken bölgelerinin birleştirilmesi ve Fab (Better et al., 1988) ve ikinci nesil tek zincir varyabl fragment (scFv) (Bird et al., 1988) gibi rekombinant antijen bağlayıcı fragmentlerin elde edilmesi sağlanmıştır. Antikorların bu fragmentli doğası, alerjik reaksiyon ve düşük efektör fonksiyonu sorunlarının giderilmesi amacıyla kimerik fare-insan antikorları geliştirilmesinde araştırmacılara kolaylık sağlamıştır. Bu işlem fare antikorlarının antijene özgü değişken bölgesinin insan antikorlarına rekombinant DNA teknikleri

ile bağlanması ve yaklaşık %65 insansılaştırılmış antikörlerin elde edilmesi ile gerçekleştirilmiştir (Morrison et al., 1984). Elde edilen kimerik antikörler daha uzun yarı ömre sahip olmuş ve daha düşük immünite göstermiştir ancak immün yanıt oluşturma problemi tamamen ortadan kaldırılamamıştır (Presta, 2006). Morrison et al. (1984)'nin kaydettiği bu gelişmeyi bir adım ileriye taşımak için fare B1-8 antikörünün sadece ağır zincir tamamlayıcılığını belirleyici bölgesi (*complementarity determining region* – CDR) insan miyeloma proteinindeki eşdeğer CDR bölgesi ile değiştirilmiş ve yaklaşık %95 insansılaştırılmış olan antikörleri rekombinant tekniklerle elde edilmiştir (Jones et al., 1986).

Bu gelişmelerin ardından monoklonal antikörler tanı, tedavi ve bilimsel araştırma amaçlı kullanım alanları bulmuşlardır. Giderek daha fazla alanda kullanılmaya başlayan monoklonal antikörlerin hızlı ve pratik üretimleri için yöntem ve konukçu organizma geliştirme çalışmaları devam etmiştir. Bu süreçte monoklonal antikör ve antikör fragmentlerinin üretilmesi için rekombinant memeli hücre kültürleri ve rekombinant mikroorganizmalara yapılan çalışmaları hızlandırmıştır.

2.2 Rekombinat hücre kültürleri ile güncel monoklonal antikör üretim sistemleri

Monoklonal antikör üretimi alanında yapılan çalışmalar ve elde edilen sonuçlar araştırmacıların CHO hücre kültürleri üzerinde yoğunlaşmasına sebep olmuştur. Baskın monoklonal antikör üretim platformu olan CHO hücrelerinin bu gelişmelerle birlikte çok büyük ilgi çeken bir alan haline geldiği bildirilmiştir (De Jesus and Wurm, 2011). 2006-2010 yılları arasında onaylanan, yarısı monoklonal antikör olan 25 farmasötik ürünün üretiminde esas araç memeli (çoğunlukla CHO) hücre kültürleri olmuştur (Walsh, 2010) Günümüzde ise 47 adet monoklonal antikör Avrupa Birliği ve Amerika Birleşik Devletleri'nde terapötik olarak kullanımı onaylanmıştır ve her yıl ortalama dört monoklonal antikörün onaylanması ile bu sayının 2020 yılında 70'i bulması beklenmektedir (Ecker et al., 2015).

Rekombinant CHO hücreleri yönetmeliklerce güvenli olarak kabul edilirler (Mader et al., 2013), serumsuz süspansiyon kültürlerde büyük ölçek

biyoreaktörlerde üretilebilirler ve etkin posttranslasyonel modifikasyon yapma kapasitesine sahiptirler. Ancak genellikle düşük olan spesifik verimlerini (1-20 µg/ml) (Ghosh and Ansar, 2013) iyileştirmek için aktarılan gen kopyası sayısının artırılması yoluna gidilmiştir (Kim et al., 2012). Buna rağmen yüksek gen kopya sayıları her zaman aynı oranda yüksek verimde rekombinant protein üretimi sağlanamamıştır (Lattenmayer et al., 2007; Reisinger et al., 2008). Gen kopya sayısının artırılmasında kullanılan metotreksat bileşiği ile muamele edilmiş CHO hücrelerinde gen kopya sayısı, transkript seviyesi ve spesifik protein üretim hızı bakımından kararsızlık ortaya çıkmıştır (Chusainow et al., 2009). Düşük verim ve kararsızlık gibi olumsuzluklar hayvan hücre hatlarının ile yapılan çalışmaları zorlaştırmıştır (Wilson et al., 1990).

2.3 Rekombinant mikroorganizmaların kullanımı ile monoklonal antikor ve antikor fragmenti üretimi

CHO hücrelerinde üretilen monoklonal antikorlar arasındaki heterojenitenin klonlar arasında çok yüksek seviyede olabileceği ve üretim modu ile kültür koşullarına bağlı olduğu bildirilmiştir (Jefferis, 2005). Belirli bir monoklonal antikor üretiminde aynı hücre hattının kullanılmasına rağmen ürünlerde heterojenite görülmesi üretimde standardizasyonu son derece zorlaştırmaktadır. Memeli hücre kültürlerinde karşılaşılan bu sorunun önüne geçilmesi amacıyla stabil ve homojen rekombinant protein ifadesi sistemleri olan mikroorganizmalarda monoklonal antikor üretimi çalışmaları yapılmıştır.

Rekombinant protein üretiminde sıklıkla kullanılan *Escherichia coli* prokaryotik mikroorganizma olarak antikor ya da antikor fragmenti gibi proteinlerin üretilmesinde, postranslasyonel modifikasyonlarının eksikliğinden dolayı yetersiz kalmıştır. Bununla birlikte Valderrama-Rincon et al., (2012) *E. coli*'de üretilen ökaryotik proteinlerin doğru bir şekilde glikozillenmesi amacıyla glikozilasyon metabolik yol izini geliştirmiş ve bakteri periplazmında proteinlerin ökaryotik desene uygun olarak glikozillenmesini sağlamıştır. Diğer taraftan mayaların ökaryotik hücre olmaları nedeni ile hücre dışına etkin protein salımı, proteinlerin doğru katlanması ve ökaryotik glikozilasyon yolağına sahip olmaları gibi önemli avantajlara sahip olduğu bilinmektedir. Rekombinasyon çalışmalarında mayalardan *Pichia pastoris*, *Candida boidinii*, *Hansenula polymorpha* (*Pichia*

angusta) ve *Pichia methanolica* gibi metilotrofik mayalar kullanılmışlardır (Gellissen, 2000; Houard et al., 2002). Mikroorganizmaların dayanıklı olması, minimal besi ortamında hızlı büyümesi ve endotoksin veya viral DNA üretmemesi gibi özellikleri de tercih edilme sebeplerindedir (Damasceno et al., 2012).

2.4 *Pichia pastoris*'te rekombinant protein üretimi

Pichia pastoris, biyoteknolojide, özellikle heterolog proteinlerin üretiminde en çok kullanılan mikroorganizmalardan biri haline gelmiştir (Kurtzman, 2009). Çok yüksek biyokütle konsantrasyonlarına (400 g/l) kadar üreyebilmesi (Damasceno et al., 2007) ve heterolog proteinleri yüksek konsantrasyonlarda (1-10 g/l) ifade edebilmesi diğer mayalar arasında ön plana çıkmasını sağlamıştır (Lin-Cereghino et al., 2000). Yaklaşık 40 yıl önce, hayvan yemi katkısı amacı ile tek hücre proteini üretiminde Phillips Petroleum tarafından değerlendirilen *Pichia pastoris* düşük maliyetli olan metanolü kullanabilmesinden dolayı tercih edilmiş fakat 1973'teki petrol krizinden dolayı artan metanol maliyeti ile kârlılığı ortadan kalkmıştır (Ahmad et al., 2014). 1980'lerde, gen ifadesinin iyi bir kontrolünü sağlayan, güçlü AOX1 promotörü kullanılarak heterolog proteinlerin üretiminde faydalanılmıştır (Cregg et al., 1985). Halihazırda geliştirilmiş tek hücre üretim süreçleri sayesinde son derece yüksek konsantrasyonlarda protein üretimi gerçekleştirilmiştir. Endüstriyel ölçekte yapılan ilk üretimlerden biri 1990'lardaki bitki kaynaklı enzim hidrosinitril liyazın 1 litre kültür ortamında 20 gramdan fazla protein elde edildiği çalışma olmuştur (Hasslacher et al., 1997). *Pichia pastoris* ile ilgili en önemli gelişmelerden bazıları; ilk heterolog protein üretimi suşları GS115 (De Schutter et al., 2009) ve DSMZ 70382'nin (Gasser and Mattanovich, 2007; Mattanovich et al., 2009) geliştirilmesi, bu sistemde üretilen hayvan yemi katkısı fosfolipaz C enziminin FDA tarafından GRAS (genel olarak güvenli) olarak kabul edilmesi (Ciofalo et al., 2006) ve rekombinant biyofarmasotik ürün Kalbitor®'un FDA tarafından onaylanması (Thompson, 2010) şeklinde sıralanabilir.

Rekombinant proteinlerin üretiminde promotor geliştirilmesi ve promotorların üretilecek rekombinant proteine göre seçimi önemli bir konudur. AOX1 gibi sıkı kontrol edilen bir promotörün kullanımı ile aşırı gen ifadesinde avantaj sağlanabilir. Biyokütle oluşumu sürecinin protein üretimi sürecinden ayrılması ile gen ifadesi öncesinde yüksek miktarda biyokütle birikimi sağlanmış

olur ve hücrelerin, üretilen yabancı proteinden dolayı strese girmeleri önlenmiş olur (Ahmad et al., 2014). Diğer yandan, GAP1 gibi sürekli bir promotörün kullanımı ile süreç uygulaması kolaylaştırılabilir. Sürekli promotörler ayrıca seleksiyon markırlarının da ifadesinde sıklıkla kullanılırlar (Ahmad et al., 2014). Genellikle tercih edilen ve yeni geliştirilen promotörlerden bazıları Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2. 1 *Pichia pastoris* rekombinant protein üretim sisteminde, gen ifadesi için kullanılan promotörlerin en çok kullanılanları ve son yıllarda geliştirilenlerinden örnekler.

Teşvik edilebilir promotör	İlgili gen	Kontrol	Kaynak
AOX1	Alkol oksidaz I	Metanol ile teşvik	(Tschopp et al., 1987)
DAS	Dihidroksiaseton sentaz	Metanol ile teşvik	(Ellis et al., 1985; Tschopp et al., 1987)
FLD1	Formaldehid dehidrogenaz 1	Metanol veya metilamin ile teşvik	(Shen et al., 1998)
ICL1	İzositrat liyaz	Glikoz ile baskılama, glikozun yokluğu veya etanol ile teşvik	(Menéndez et al., 2013)
PHO89	Na ⁺ /fosfat simporteri	Fosfat yoksunluğu ile teşvik	(Ahn et al., 2009)
THI11	Tiamin biyosentez geni	Tiamin ile baskılama	(Stadlmayr et al., 2010)
ADH1	Alkol dehidrogenaz	Glikoz ve metanol ile baskılama, gliserol ve etanol ile teşvik	(Cregg and Tolstorukov, 2012)
ENO1	Enolaz	Glikoz, metanol ve etanol ile baskılama, gliserol ile teşvik	(Cregg and Tolstorukov, 2012)
GUT1	Gliserol kinaz	Metanol ile baskılama, glikoz, gliserol ve etanol ile teşvik	(Cregg and Tolstorukov, 2012)
Sürekli promotör	İlgili gen	Kontrol	Kaynak
GAP	Gliseraldehit-3-P dehidrogenaz	Glikozda sürekli ifade, gliserol ve metanolde daha düşük	(Waterham et al., 1997)
TEF1	Translasyon uzama faktörü 1	Gliserol ve glikoz ile sürekli ifade	(Ahn et al., 2007)
PGK1	3-fosfogliserat kinaz	Glikozda sürekli ifade, gliserol ve metanolde daha düşük	(de Almeida et al., 2005)
GCW14	Potansiyel glikosil fosfadihil inositol bağlı proteini	Gliserol, glikoz ve metanol ile sürekli ifade	(Liang et al., 2013)
G1	Yüksek afinite glikoz taşıyıcı	Gliserol ile baskılama, glikoz kısıtlaması ile teşvik	(Prielhofer et al., 2013)
G6	Aldehit dehidrogenaz	Gliserol ile baskılama, glikoz kısıtlaması ile teşvik	(Prielhofer et al., 2013)

Pichia pastoris'in diğer bir önemli özelliği hücre dışına, doğru katlanmış, posttranslasyonel olarak işlenmiş ve aktif rekombinant protein salımı yapabilmesidir (Ahmad et al., 2014; Jiang et al., 2011). Temel olarak bir proteinin doğal hali hücre dışına salgılanıyorsa *Pichia pastoris*'te de hücre dışına salgılanması beklenmektedir. Buna ek olarak hücre içi olan GFP (Eiden-Plach et

al., 2004) ya da insan katalazı (Shi et al., 2007) gibi proteinler başarılı bir şekilde hücre dışı olarak üretilebilmişlerdir. *Pichia pastoris*'te en çok kullanılan salınım sinyalleri *S. cerevisiae* α -MF (alfa eşleşme faktörü), *S. cerevisiae* invertaz (SUC2) ve *Pichia pastoris* endojen asit fosfatazdan türetilmiştir (Daly and Hearn, 2005). α -MF sinyal sekansı pre- ve pro- bölgelerden oluşmuştur ve rekombinant proteinlerin *Pichia pastoris* salınım sisteminde en iyi şekilde taşınmasını sağladığı kanıtlanmıştır (Ahmad et al., 2014). Pre- bölge yeni ifade edilmiş proteinin endoplazmik retikulumla iletmesinden sorumludur ve bu olayın hemen ardından sinyal peptidaz tarafından kesilir (Waters et al., 1988). Pro- bölgenin ise proteinin endoplazmik retikulumdan golgi cisimciğine taşınmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bu kısım son olarak dibazik KR (lizin-arginin) bölgesinden endo proteaz Kex2p ile kesilir (Julius et al., 1984). KR bölgesinin hemen ardından iki adet EA (Glutamik asit-alanin) aminoasit tekrarları gelir ve bu kısım da STE13 gen ürünü olan enzim ile kesilir (López-Marzo et al., 2013; Waters et al., 1988). α -MF kullanımındaki bir problem, STE13 işleminin tam olarak gerçekleşmemesidir. Bu sorunun aşılması için AE tekrarları içermeyen konstrüktlerin tasarlanması önerilmiştir (Ahmad et al., 2014). İyileştirilmiş STE13 ko-ekspresyonu üzerine bir çalışmaya raslanmamakla beraber, katlanmamış protein yolizindeki bir transkripsiyon faktörü olan HAC1 ile birlikte hücre zarı proteini adozin A2 reseptörünün eşzamanlı aşırı ekspresyonunun α -MF sinyal sekansının işlenmesinde olumlu etkisinin olduğu belirlenmiştir (Guerfal et al., 2010). Bunların dışında Kex2 P1 bölgesindeki aminoasitlerin optimize edilmesinin, hücre dışı protein üretimini iyileştirdiği gösterilmiştir (Yang et al., 2013). Bu girişimleri takiben α -MF sinyal peptidinin potansiyelinin artırılması için çok sayıda çalışma yapılmıştır; kodon optimizasyonu (Kjeldsen et al., 1998), yönlendirilmiş evrim (Rakestraw et al., 2009), ekleme/silme mutajenezi (Lin-Cereghino et al., 2013) bu girişimlerdendir.

Genel olarak bu özellikleri göz önünde bulundurulduğunda, *Pichia pastoris* geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Enzim alanında, hayvan yemi endüstrisinde fosfor alımını iyileştiren fitaz (Chen et al., 2004) gıda endüstrisinde süt koagülasyon ajanı olan aspartik proteinaz (Yegin and Fernandez-Lahore, 2013), immünolojik tanı sistemlerinde antikorların konjugasyonunda sık kullanılan at turbu peroksidazı C1A (Capone et al., 2015) başarılı bir şekilde üretilmiştir. *Pichia pastoris* en fazla biyomedikal alanda gerçekleştirilen çalışmalar ile gündeme

gelmiştir. Sentetik gen kullanılarak elastin benzeri protein (Sallach et al., 2009), rejeneratif özelliklere sahip kolajen (Silva et al., 2011), koloni uyarıcı faktör-1 (CSF1) (Mashkani et al., 2013), antibakteriyel ve antikanser etkisi gösteren REG3 α (Regenerating islet-derived 3-alpha) proteini (Fan et al., 2015) üretimleri yapılmıştır. Tome-Amat et al. (2014) kanser aşısı olarak kullanılma potansiyeline sahip Norovirüs virüs benzeri partikülü (Norovirus virüs-like particle) 1,5 litrelik havalandırılmalı-karıştırmalı biyoreaktörde 0,6 g/l konsantrasyonda üretmişlerdir. Parker et al. (2016) bu çalışmayı bir adım ileriye taşıyarak NY-ESO-1 kanser testis antijeni taşıyan NoV-VLP füzyon proteinini yine 1,5 l biyoreaktörde 0,85 g/l konsantrasyonda üretmişlerdir. *Pichia pastoris*'te üretilen bazı proteinler ticari ürüne dönüştürülmüştür (Çizelge 2.2).

Çizelge 2. 2 2014 yılı itibarı ile *Pichia pastoris* kullanılarak üretilmiş ve ticarileştirilmiş/ticarileştirme sürecinde olan bazı rekombinant protein ürünleri, ticari ürün hakkına sahip firma ve kullanım alanları (Research Corporation Technologies, 2014).

Ürün	Firma	Kullanımı
Kalbitor® (DX-88 ecallantide, rekombinant kallikrein inhibitör proteini)	Dyax (Cambridge, MA)	Kalıtımsal angiodema tedavisi
Insugen® (rekombinant insan insülini)	Biocon (Hindistan)	Diyabet tedavisi
Medway (rekombinant insan serum albümin,)	Mitsubishi Tanabe Pharma (Japonya)	Kan hacmi artırılması
Shanvac™ (rekombinant hepatit B aşısı)	Shantha/Sanofi (Hindistan)	Hepatit B'nin önlenmesi
Shanferon™ (rekombinant interferon-alfa 2b)	Shantha/Sanofi (Hindistan)	Hepatitis C & Kanser tedavisi
Ocriplasmin (rekombinant mikropasmin)	ThromboGenics (Belçika)	Vitreomakular adhezyon (VMA) tedavisi
Nanobody® ALX-0061 (rekombinant anti-IL6 reseptör tek kısım antikör fragmenti)	Ablynx (Belçika)	Römatoid artrit tedavisi
Nanobody® ALX00171 (rekombinant anti-RSV tek kısım antikör fragmenti)	Ablynx (Belçika)	Solunum yolu sinsitiyal virüsü (RSV) enfeksiyonu tedavisi
Heparin-bağlayıcı EGF-benzeri büyüme faktörü (HB-EGF)	Trillium (Kanada)	Treatment of doku içi sistit/mesane ağrısı sendromu (IC/BPS) tedavisi
Purifine (rekombinant fosfolipaz C)	Verenium/DSM (San Diego, CA/Hollanda)	Yüksek fosfor içerikli yağların zamklanması
Rekombinant tripsin	Roche Applied Science (Almanya)	Proteinlerin sindirimi
Rekombinant kolajen	Fibrogen (San Francisco, CA)	Medikal araştırma kimyasalları/dermal dolgu
AQUAVAC IPN (rekombinant enfeksiyöz pankreatik nekroz virüsü kapsid proteinleri)	Merck/Schering Plough Animal Health (Summit, NJ)	Somon balığında enfeksiyöz pankreatik nekroza karşı aşilar
Rekombinant fitaz	Phytex, LLC (Sheridan, IN)	Hayvan yemi katkısı
Superior Stock rekombinant nitrat redüktaz	The Nitrate Elimination Co. (Lake Linden, MI)	Su analizi ve su arıtımı için enzim-temelli ürünler
Rekombinant insan sistatin C	Scipac (Birleşik Krallık)	Araştırma kimyasalı

Pichia pastoris kullanılarak yapılan rekombinant protein üretim çalışmaları sonucunda bir kısmı geliştirme aşamasının sonlarında olan 70'in üzerinde ürün elde edilmiştir .

2.4.1 *Pichia pastoris*'te monoklonal antikor ve antikor fragmenti üretimi

1988 (Better et al., 1988) yılında yapılan bir çalışmada ilk kez *Saccharomyces cerevisiae* mayasında anti-tümör antikor ve antikor fragmentinin hücre dışı olarak üretildiği bildirilmiştir. Bu çalışmada 10 litrelik karıştırmalı biyoreaktörde üretim yapılmış ve yaklaşık 100 ng/ml konsantrasyonda monoklonal antikor elde edilmiştir. Monoklonal antikorların *Pichia pastoris*'te fragment olarak üretilmesi ise 1990'larda yapılan çalışmalarla başlamıştır (Cregg et al., 2000). *Pichia pastoris*, tek zincir antikor fragmentleri (scFv) ile iki antijenik determinanta bağlanan bispesifik "diabody" gibi daha uzun proteinlerin üretiminde de kullanılmıştır (Eldin et al., 1997; FitzGerald et al., 1997; Luo et al., 1997, 1995; Ridder et al., 1995). Takip eden yıllarda *Pichia pastoris*, protein ifadesi sisteminin daha iyi anlaşılması, karakterize edilmesi ve modifiye edilmesi ile CHO hücre kültürlerinin yerine önemli bir alternatif olmuştur (Li et al., 2007). Genetik modifikasyon ile *Pichia pastoris*'in glikozilasyon yol izi değiştirilmiş GFI5.0 suşunda, tamamen işlevsel ve insansılaştırılmış glikozilasyon desenine sahip anti-HER2 monoklonal antikorları elde edilmiş ve CHO hücrelerinde üretilen ticari eşdeğeri Trastuzumab ile benzer farmakokinetik özelliklere sahip olduğu ifade edilmiştir (Jiang et al., 2011). İnsansılaştırılmış *Pichia pastoris*'te üretilen anti-CD20 (anti-tümör) antikor CHO hücrelerinde üretilen kimerik ritixumab monoklonal antikor ile Fc reseptörlerine bağlanma özellikleri bakımından benzer *in vitro* aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Li et al., 2006a). Glikozilasyon mühendisliği ile elde edilmiş glikoform kütüphanelerinin kullanımı ile üretilen monoklonal antikorların çözünürlük, *in vivo* yarı ömür doku dağılımı ve tamamlayıcı proteinlerle etkileşimlerinin geliştirilebileceği belirtilmiştir (Li et al., 2006b). Üniform glikozilasyon desenine sahip işlevsel bir tam monoklonal antikor, dayanıklı ve ölçeklendirilebilir bir biyoproseste 1 g/l konsantrasyonunda üretilirken (Potgieter et al., 2009) suş geliştirme ve proses optimizasyonunun kombinasyonu ile monoklonal antikor fragmentinin üretiminde 8g/l gibi yüksek ürün konsantrasyonuna ulaşılmıştır (Damasceno et al., 2007). Yapılan başka bir karşılaştırmalı çalışmada *Pichia*

pastoris ve CHO hücreleri kullanılarak 3D6scFv-Fc antikor fragment ve insan serum albümini (HSA) üretilmiş ve *Pichia pastoris*'in daha az kompleks proteinleri (HSA) daha yüksek verimlilikle ürettiği ortaya konmuştur (Maccani et al., 2014).

Farklı konfigürasyonlardaki monoklonal antikor fragmentlerinin *Pichia pastoris*'te üretilmesi alanında bugüne kadar kaydedilmiş gelişmeler hâlihazırda iki antikor fragmentinin, Nanobody ALX0061 (patent no: WO2012056000 A1) ve Nanobody ALX00171 (patent no: WO2012056000 A1)(Brige et al., 2012), ticari olarak üretilmesini sağlamıştır. Sırasıyla romatoid artrit ve *respiratory syncytial* virüs (RSV) enfeksiyonu tedavilerinde kullanılan bu terapötik antikor fragmentlerinin yanında teşhis amaçlı antikor fragmenti çalışmaları da sürdürülmektedir (Spadiut et al., 2014).

2.4 Kodon optimizasyonu ile protein ifadesinin artırılması

Protein sentezi sırasında aynı aminoasitlerin farklı mRNA kodonları ile eşleşmesi aynı protein için farklı gen dizilerinin kullanılabilmesini sağlamıştır. Organizmalar arasında kodon kullanımı farklılık gösterebilmektedir (de Marco, 2015). Rekombinant protein üretiminde, konukçu organizmanın genomunda sık görülmeyen kodonları içeren bir genin ifadesi sırasında durma, terminasyon, amino asit değişimi ve gen çerçevesi kayması gibi sorunlar ortaya çıkabilmektedir (Fan et al., 2015; Kane, 1995). *Pichia* ekspresyon sisteminde de yüksek seviyede protein ifadesi için aktarılan gende kodon optimizasyonu yapılması kritik bir öneme sahiptir. Bu işlemde aktarılacak genin en iyi şekilde ifade edilebilmesi için bilgisayar programı aracılığıyla gendeki kodon kullanımı aminoasit dizisini değiştirmeyecek şekilde konukçu organizmaya göre yeniden düzenlenir. Bu uygulamaya örnek olarak Tian vd. (2012) kodon optimizasyonu ile *Pichia pastoris*'te alkalın asetil ksilan esteraz enziminin ifadesini tespit edilemeyecek kadar düşük seviyelerden ticari olarak rekabetçi olabilecek kadar yüksek konsantrasyonlara (100 kata kadar) çıkarmayı başarmışlardır.

Rekombinant protein üretiminde, aktarılan gen dozajının artırılması da protein ifadesini önemli derecede artırmada yardımcı olmaktadır. Norden vd. (2011) doğal koşullarda hücrede çok düşük seviyelerde üretilen akuaporinleri

Pichia pastoris'te gen dozajını artırarak aynı genin her hücrede çok daha fazla tekrarda ifade edilmesini sağlayarak yüksek seviyelerde üretmeyi başarmışlardır.

Kodon optimizasyonu ve gen dozajının artırılması yöntemleri *Pichia pastoris*'te monoklonal antikor üretiminde de kullanılmıştır. Parker vd. (2013) yaptıkları çalışmada, prostat spesifik membran antijeni (PSMA)'ne bağlanan J591 SCFv (tek zincir değişken kısım) monoklonal antikor fragmentini *Pichia pastoris*'te kodon optimizasyonundan yararlanarak rekombinant olarak üretmişlerdir. Yaptıkları fonksiyonellik analizlerinde antikor fragmentinin PSMA bulunduran hücrelere bağlanma afinitesi gösterdiğini belirlemişlerdir. Başka bir çalışmada glikozilleme yol izlerine müdahale edilmiş ve doğal tip *Pichia pastoris*'te rekombinant monoklonal antikor üretilmiş ve CHO hücrelerinden elde edilmiş ticari monoklonal antikor ile karşılaştırma yapılmıştır. Karşılaştırma sonuçlarındaki benzerlikler *Pichia pastoris*'in klinik olarak kullanılabilir monoklonal antikor üretimine uygun bir sistem olduğunu ortaya koymuştur (Liu et al., 2011).

2.5 Altın nanopartikülleri ile konjuge monoklonal antikorların teşhis testlerinde kullanımı

Temel anlamda nanopartiküller, birkaç yüz nanometreye kadar olan ölçüleri ile enzim, reseptör, antikor gibi proteinlere yakın büyüklüklere sahip altın veya diğer soy metallerden elde edilen partiküllerdir (Cai et al., 2008) Bunlardan altın nanopartiküller üzerinde en çok çalışılan ve teşhis alanında en çok tercih edilenlerdir (Huang et al., 2007). Altın nanopartiküller 1950'lerden itibaren *in vivo* görüntüleme için radyoaktif işaretlemede, 1980'lerden itibaren elektron mikroskopisinde biyolojik boyamada kullanılmıştır (Boisselier and Astruc, 2009). Altın nanopartiküllerin düşük toksisite, görüntüleme için yüksek kontrast oluşturabilme, yüzey geliştirme ve optik kırılma endeksine bağlı spektroskopik özellikleri gibi önemli avantajları quantum dot ve organik boyaların önüne geçmelerini sağlamıştır (Boisselier and Astruc, 2009). İmmün deneyleri içeren klinik teşhis yöntemlerinden ELISA temelli immünokromatografik test çubuklarında, sinyal güçlendirmesi amacıyla altın nanopartiküllerin kullanılması önemli gelişmeler sağlamıştır (Tanaka et al., 2006). Bu yöntemle gonadotropin hormonu 1 pg/ml gibi düşük konsantrasyonlardaki proteinler dahi tespit

edilebilmektedir (Boisselier and Astruc, 2009). Bu testlerin kan serumu ve tam kanda mililitrede bir nanogramdan daha az miktarlardaki analitleri tespit edebilmesi ve uygulama kolaylığı geleneksel ELISA testlerinin önüne geçmesini sağlamıştır (Hirsch et al., 2003).

2.6 Anti-cTnI antikoru üretimi

Haider ve Stimson (1995) sığır kardiyak troponin I proteinini izole etmiş ve yüksek özgüllükte anti-cTnI antikoru üreten fare hibridoma hatları elde etmişlerdir. Elde ettikleri monoklonal antikorun özgüllüğünü ELISA ve Western blot ile doğrulayan araştırmacılar bu moleküllerin miyokardiyal enfarktüsün *in vivo* görüntülemesinde kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir.

Kardiyak anti-troponin I antikoru günümüzde Millipore (kat no: MAB3150), Abcam (kat no: ab47003), HyTest (kat no: 4T21), GeneTex (kat no: GTX112770), Abbiotech (kat no: 251112), Fitzgerald (kat no: 10-T79G) gibi dünya çapındaki firmalar tarafından konukçu hayvanlarda (fare, tavşan) veya memeli hücre hatlarında (hibridoma, CHO) IgG formunda üretilmektedir. Bu antikorlar saflaştırılmış formda veya asites sıvısı içerisinde temin edilerek kardiyak troponin ile ilgili çalışmalarda ELISA, Western blotting, radioimmünassay gibi uygulamalarda araştırma amaçlı olarak kullanılabilir. Hedef kitleleri araştırma hastaneleri ve medikal alanda araştırma yapan üniversite ve enstitü gibi kurumlar olan bu monoklonal antikor ürünlerinin saklanma sıcaklıkları -20°C veya -80°C olarak belirtilmektedir.

Bunların yanında yukarıda da açıklandığı gibi anti-cTnI antikoru hızlı tanı test kitlerinde de yer almaktadır ve bu kitlerin hedef kitlesi kalp krizi riski yüksek olan kişiler ve hastanelerin acil servisleridir. Bu test kitleri Novamed (R-6505), bi-1-st of FINLAND (2TRO,) NOVAtest (cTnI 721), CTK Biotech, Inc. (R3001C), HOMEMED (Myoglobin/CK-M8/Troponin I Test kit) gibi firmalardan temin edilebilmektedir ve oda sıcaklığında saklanabilmektedirler. Görüldüğü gibi anti-troponin I monoklonal antikoru hem doğrudan son kullanıcı hem de araştırma amaçlı kullanıcılar alanında büyük bir pazar payına sahiptir. Bu testlerdeki anti-cTnI antikorları büyük oranda hayvanların (tavşan, keçi, sıçan) asites sıvılarında ve nadir olarak CHO hücre hatlarında üretilmektedirler (Ezzatifar et al., 2015).

Anti-cTnI antikoru konukçu hayvanlarda üretimi devam eden diğer pek çok antikordan sadece bir tanesidir. Endüstriyel ölçekte üretim için konukçu hayvanların kullanılması önemli bir etik kaygıyı da gündeme getirmektedir. Konukçu hayvan kullanımının azaltılması yönünde rekabetçi olma potansiyeline sahip monoklonal antikor üretim sistemlerinin geliştirilmesi büyük öneme sahiptir.

Geçmişten günümüze bu alanda yapılan çalışmalar incelendiğinde anti-troponin I antikor fragmentinin *Pichia pastoris*'te üretilmesinin ve teşhis testi kitinde kullanılmasının mümkün olduğu ve üretilecek molekülün test başarısı ve maliyet anlamında pazarda bulunan diğer ürünlerle rekabet edebileceği öngörülebilir.

3 MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Mikroorganizmalar

NEB 5- α kompetan *Escherichia coli* (genotip: *fhuA2* Δ (*argF-lacZ*)*U169 phoA glnV44* Φ 80 Δ (*lacZ*)*M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*) sentetik gen dizisini ifade vektörüne klonlamak amacıyla kullanılmıştır.

Gen ifadesi için *Pichia pastoris* GS115, (Pichia Expression Kit, Version M, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), suşu kullanılmıştır.

3.1.2 Kullanılan besiyerleri, çözeltiler ve kimyasallar

Düşük tuzlu Luria-Bertani (LS-LB) Ortamı: Aşağıdakilerin deiyonize suda çözülerek 121°C'ta 20 dk otoklavlanması ile hazırlanmıştır.

- %1 Tripton
- %0,5 Maya Ekstraktı
- %0,5 NaCl
- pH: 7,5 (NaOH ile)

LS-LB agar: LS-LB ortam karışımına %1,5 oranında agar eklenerek aynı koşullarda otoklavlanması ile hazırlanmıştır.

%13,4 Yeast Nitrogen Base (10X YNB):

- Amonyum sülfat içeren, aminoasit içermeyen maya için azotlu besi yeri tabanı deiyonize su içerisinde ağırlıkça %13,4 oranında çözülmüştür. 0,22 um filtre ile sterilize edilerek 4°C'ta saklanmıştır.

500X B

20 mg biyotin 100 ml deiyonize suda çözülerek filtre ile sterilize edilmiştir. 4°C'ta saklanmıştır.

100X H

400 mg L-histidin 100 ml deiyonize suda çözülerek filtre ile sterilize edilmiştir. 4°C'ta saklanmıştır.

10X D

200 g D-glukoz 1000 ml deiyonize suda çözülerek 121°C'ta 15 dk otoklavlanmıştır.

10X M

%5'lik metanol çözeltisi filtre ile sterilize edilerek 4°C'ta saklanmıştır.

10X GY

%10'luk gliserol-su karışımı 121°C'ta 15 dk otoklavlanarak hazırlanmıştır.

1 M potasyum fosfat tamponu, pH 6.0

132 ml 1 M K₂HPO₄ ile 868 ml 1 M KH₂PO₄ karıştırılarak pH fosforik asit ile 6,0'a ayarlanmıştır. 121°C'ta 20 dk otoklavlanarak oda sıcaklığında saklanmıştır.

YPD besi ortamı ve YPD agar

%1 maya ekstraktı, %2 g pepton içeren sulu çözelti 121°C'ta 20 dk otoklavlandıktan sonra 10X D ile 9:1 oranında karıştırılarak 4°C'ta saklanmıştır. YPD agar için otoklavlamadan önce %2 oranında agar eklenmiştir.

BMGY ve BMMY besi ortamları

1000 ml BMGY için; 10 g maya ekstraktı ve 20 g pepton 700 ml deiyonize suda çözülerek 121°C'ta 20 dk otoklavlanarak oda sıcaklığına soğutulmuştur. 100 ml 1 M potasyum fosfat çözeltisi, 100 ml 10X YNB, 2 ml 500X B ve 100 ml 10X GY eklenerek 4°C'ta saklanmıştır. BMMY için 10X GY yerine 100 ml 10X M

kullanılmıştır.

PBS

Fosfat tamponlu tuzlu çözelti, 2,55 g Na_2HPO_4 ve 0.63 g NaH_2PO_4 bir litre ultra saf su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

Bazal tuzlar ortamı (tüm kimyasallar mikrobiyolojik kültür saflığında kullanılmıştır)

26.7 ml H_3PO_4 , 85%

0.93 g CaSO_4

18.2 g K_2SO_4

14.9 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

4.13 g KOH

40.0 g Gliserol

1 l su içerisinde çözülerek biyoreaktöre aktarılmıştır. 750 μl köpük kırıcı (Antifoam 204, Sigma, kat. no: A6426) doğrudan biyoreaktörün içine eklenerek bekletilmeden 121°C 'da 25 dk otoklavlanmıştır.

PTMI

5,0 mL H_2SO_4 (95-98 %)

65,0 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

20,00 g ZnCl_2

6,00 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

3,36 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

0,82 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

0,20 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0,08 g NaI

0,02 g H_3BO_3

0,2 g Biotin

1 l saf su içinde çözülerek 0,2 µm por çaplı filtre ile sterilize edilmiştir. 4°C’da saklanmıştır.

3.1.3 Kullanılan cihazlar

3.1.3.1 Hassas terazi

Mettler Toledo marka AE 163 model hassas terazi, kullanılan besiyeri ve diğer çözümlerin hazırlanmasında kullanılmıştır.

3.1.3.2 pH metre

Mettler Toledo Seven Easy pH metre, hazırlanan besiyeri ve diğer karışımların pH değerlerinin kontrol edilerek ayarlanması amacı ile kullanılmıştır.

3.1.3.3 Isıtmalı manyetik karıştırıcı

Heidolph MR Hei-Standard ısıtmalı manyetik karıştırıcı, kullanılan besiyeri ve diğer karışımların istenilen koşullarda ve istenilen özelliklerde olması için homojenizasyonun sağlanmasında kullanılmıştır.

3.1.3.4 Otoklav

Hirayama Hiclave HV-110L marka ve model numaralı otoklav, gerekli ortamların hazırlanmasında sterilizasyonun sağlanması amacı ile ayrıca işlemler sonucunda ortaya çıkan mikrobiyolojik olarak bulaşık haldeki materyalin tekrar kullanılabilir hale getirilmesi, tüm mikroorganizmaların öldürülmesi amacı ile kullanılmıştır.

3.1.3.5 İnkübatör

Sanyo MIR-153 marka ve model numaralı soğutmalı inkübatör kullanılmıştır.

3.1.3.6 Mikroskop

Nikon marka, dijital fotoğraf makinası takılabilen tri-oküler mikroskop, mikroskopik incelemelerde kullanılmıştır.

3.1.3.7 Elektroporatör

BioRad marka Gene Pulser Pulse Generator model elektroporatör, *Pichia pastoris*'in transformasyonu işlemlerinde kullanılmıştır.

3.1.3.8 Su banyosu

Memmert marka su banyosu, DG-18 agarlı besi ortamlarının uygun sıcaklıklarda tutulmasında kullanılmıştır.

3.1.3.9 Biyoreaktör ünitesi

New Brunswick marka Bioflo3000 model biyoreaktör ünitesi ünitesi ve bu üniteye ait 2 l toplam hacme sahip cam biyoreaktör kullanılmıştır.

3.1.3.10 Protein saflaştırma ünitesi

AKTA Explorer 100 (Amersham Biosciences, Pittsburgh, PA, USA) cihazı protein protein saflaştırma işlemlerinde kolon a tamponların ve protein numunesinin beslenmesi ile kolon çıkışı iletkenlik, UV absorbans, pH gibi değerlerin ölçümünde kullanılmıştır.

3.1.3.11 ELISA pleyt okuyucusu

BIOTEK marka ELx800 model ELISA pleyt okuyucu ELISA çalışmalarının sonuçlarını değerlendirmede kullanılmıştır.

3.1.3.12 Metanol sensörü

Raven Biotech marka metanol sensörü üretim sırasında metanol seviyesinin ölçümü ve metanol beslenmesi için kullanılmıştır.

3.1.3.13 Peristaltik pompa

Masterflex marka I/P serisi peristaltik pompalar teğet akım filtrasyonu ve kültür süpernatantının kaba filtrasyonu gibi işlemlerde kullanılmıştır.

3.1.3.14 Vorteks

Fisher Scientific marka Vortex Genie 2 model vorteks küçük ölçekteki çözeltilerin hazırlanmasında ve reaksiyon tüplerinin karıştırılmasında kullanılmıştır.


```

CCC GGT CAG TCC CCC AAA CAT TTG ATT TAC CTT GTT TCT AAA CTG
GAC AGT GGG GTT CCA GAT AGA TTT ACC GGT TCC GGT TCT GGA ACG
GAC TTT ACT CTA AAA ATT TCT CGT GTG GAA GCA GAA GAC CTT GGC
GTC TAC TAC TGC TGG CAG GGA ACA CAC TTT CCC TTG ACG TTT GGA
GCC GGA ACG AAA TTG GAA ATC AAG CAT GGT GGA GGA GGC AGT GGT
GGT GGA GGC TCT GGA GGT GGT GGT AGT CAA CTA CAA CTG CAG CAA
TCC GGT GCT GAA TTA GTT AGA TCC GGC GCT AGT GTA AAG TTG TCT
TGT ACT GCA TCA GGT TTC AAC ATA AAG GAT TAC TAC ATG AAT TGG
GTT AAG CAG AGG CCT GAA CAA GGA CTG GAA TGG ATT GGT TGG ATT
GAC CCC GCA AAT GGT GAC ACC GCA TAC GCT CCA AGA TTC CAG GTA
AAG GCT GAT ATG ACC GCC GAT AAG GAT TCA GAT ACT GCA TAC CTG
CAA CTA AGT TCA CTT ACG TCC GAA GAC ACA GCT GTA TAT TAC TGT
AAC GCT GAC TTA CCA ATG GAT CAA TGG GGA CAG GGA ACT TCA GTT
ACG GTC TCT TCA GCT GCA GCT CTT GAA

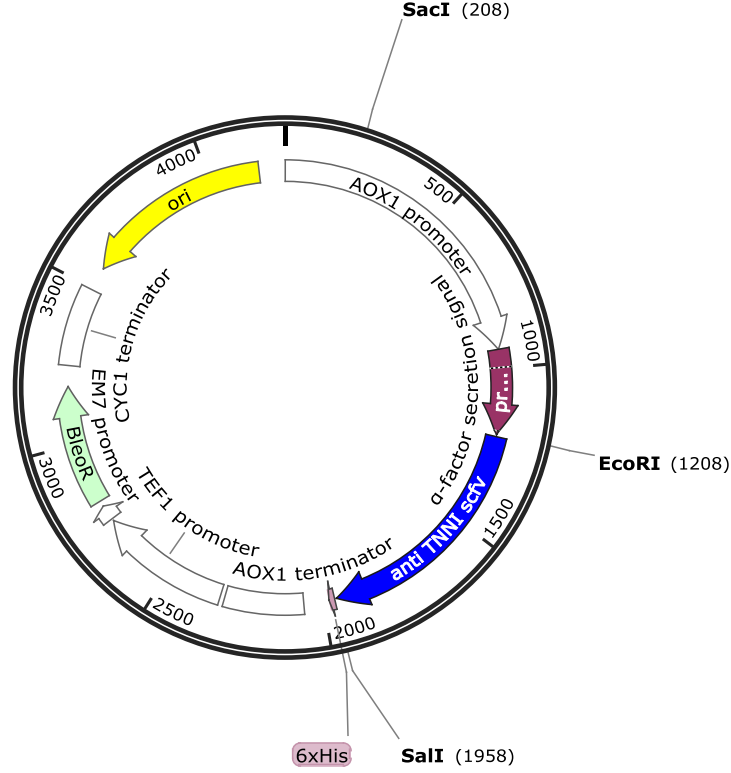
GTCGAC
CATCATCATCACCACCAC
TAA
GCGGCCGC
TAACTAAC

SalI
6X HIS
Stop codon
NotI

```

Dizinin bu açık halinde görüldüğü gibi restriksiyon enzimi kesim bölgeleri antikor fragmentini kodlayan dizinin 5' ve 3' uçlarına yerleştirilmiştir. Yukarıda belirtilen enzimlere ek olarak bu dizinin farklı plazmitlerde farklı stratejilerle klonlanmasını sağlamak amacıyla farklı restriksiyon bölgeleri ve 6XHistidin dizisi eklenmiştir. Bu sayede pPICZ α A plazmidinde protein üretiminin başarılı olamaması halinde farklı plazmitlerle çalışma imkanı önceden sağlanmıştır.

Temin edilen gen üretici talimatları doğrultusunda suda çözdürülmüştür. 10 ng gen ve 50 ng pPICZ α A plazmidi belirtilen restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Plazmitte kendine ligasyon olmasının önlenmesi amacı ile Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP, Thermo Fisher Scientific, kat no: 18009-019) enzimi ile muamele edilmiş ve DNA'nın 5' uçlarındaki fosfat grupları alınmıştır. Elde edilen lineer plazmit ve gen aynı tüpe alınarak Quick Ligation Kit (New England Biolabs Inc., Ipswich, Massachusetts, ABD., kat. no M2200S) kullanılarak birleştirilmiştir.



Şekil 3. 1 *Pichia pastoris*'te gen ifadesi için tasarlanan konstrüktün genel görünümü (Çizim: SnapGene Viewer). AOX1: *Pichia*'da metanol ile teşvik edilen promotor bölge. α -factor: proteinin hücre dışına etkin salınımını sağlar. 6xHis: protein saflaştırmada ve spesifik tanıma deneylerinde yararlanan altı adet Histidin aminoasidi kodlayan bölge. AOX1 Terminator: Transkripsiyon sonlama ve poliadenilasyon bölgesi. TEF1: Transkripsiyon uzama faktörü 1 geni promotörü, *Pichia*'da Zeocin ®'e dayanıklılıkla ilişkili Sh ble geninin ifadesini sağlar. EM7 Sh bl geninin *E. coli*'de sürekli ifadesini sağlar. BleoR: Zeocin ® antibiyotiğine dayanıklılık geni. CYC1 terminatör: *Saccharomyces cerevisiae* CYC1 geni, Sh bl geninin uygun şekilde işlenmesini ve stabilize olmasını sağlar. Ori: *E. coli*'de plazmit replikasyonu ve devamlılığını sağlar. SacI: konstrüktün AOX1 bölgesinde linearizasyonunu sağlayan restriksiyon bölgesi. *EcoRI* ve *SalI*: Sentezlenen genin sırasıyla 5' ve 3' bölgelerindeki kesim bölgesi ve plazmit üzerindeki klonlama bölgesi.

3.2.2 Ön çalışma kapsamında denenilen diğer konstrüktler

Çalışma kapsamında iş akışı süresince, elde edilen ara sonuçlar değerlendirilerek konstrükt tasarımında değişikliklere gidilmiştir. Bu bağlamda pPICZ α A plazmidinin yanı sıra pPIC9 ve pPIC9K plazmitleri ile konstrüktler oluşturulmuştur. Bu plazmitler kullanıldığında *Pichia pastoris*'te transformasyon seçimi için seçici besiyeri olarak antibiyotikli ortam yerine Histidin içermeyen bazal ortam kullanılmıştır. Bunların yanında antikor fragmentini kodlayan gen olarak farklı kombinasyonlar denenmiştir. Öncelikle hafif ve ağır zincirin öncelik sırası değiştirilmiş ardından NCBI veri tabanından temin edilen dizi yerine

US8663933 numaralı patente belirtilen DNA dizisi iki farklı versiyonda kullanılmıştır. Bu ön çalışmalar sonucunda elde edilen bulgular Bölüm 4.1’de verilmiştir.

3.2.3 Konstrukt Çoğaltımı ve *Pichia pastoris* Suşlarının Transformasyonu

Ligasyon ürünü üretici talimatları doğrultusunda kompetan NEB 10 beta *E. coli*’ye (New England Biolabs Inc., Ipswich, Massachusetts, ABD., kat. no: C3019H) aktarılmıştır. 25 ug/ml Zeocin içeren düşük tuzlu Laury Bertani (LB) agar petrilerinde 37°C’ta 16 saat inkübe edilmiştir. Oluşan kolonilerden 8 adet seçilerek koloni PCR yapılmıştır. Koloni PCR işlembasamakları şu şekildedir:

- Koloniden iğne ucu kadar bir örnek aseptik koşullarda steril kürdan yardımı ile alınarak PCR tüpünün en alt kısmına yaydırılmıştır.
- Her örnek için toplam 25’er µl reaksiyon karışımı (12,5 µl BioMix™ (Bioline, kat no: BIO-25012), 10 µM AOX1 Forward Primer, 10 µM AOX1 reverse primer içerecek şekilde 12,5 µL steril saf su) hazırlanarak her bir PCR tüpüne dağıtılmıştır.
- Thermal Cycler (MJ Research) cihazında PCR şu sıcaklık döngüleri uygulanmıştır: 95°C’de 5 dk, 32 defa 95°C’de 30 sn – 51°C’de 30 sn – 72°C’de 45 sn döngüsü, 72°C’de 5 dk.
- PCR ürünleri %1’lik agaroz jelde yürütülerek beklenen büyüklükteki fragmentin varlığı kontrol edilmiştir.

Transfer edilen geni içerdiği tespit edilen koloniler 5 ml ölçekte 25 ug/ml Zeocin içeren düşük tuzlu LB sıvı kültürde 37°C’ta 16 saat inkübe edilmiştir. Elde edilen sıvı kültürde Zymo Research Zippy Plasmid Mini kiti kullanılarak plazmit izolasyonu yapılmış ve elde edilen plazmitler daha önce belirtilen enzimlerle kesilerek ikinci bir doğrulama yapılmıştır. Bunlardan geni içerdiği doğrulanan 4 adet plazmitte dizi analizi yapılmıştır.

Doğrulanmış plazmid içeren koloni aynı sıvı kültürde 100 ml ölçekte 37°C’ta 16 saat inkübe edilmiştir. Qiagen Plasmid Midi kiti kullanılarak üretici talimatlarına göre plazmit izolasyonu yapılmıştır. Her bir transformasyon işlemi için 10 µg (~9 ul) başlangıç plazmit miktarı kullanılmıştır. Plazmit SacI restriksiyon enzimi ile lineerize edilmiştir üretici talimatlarına göre (2,5 µl 10x reaksiyon tamponu içerecek şekilde toplam 25 µl içerisinde 37°C de 2 saat) kesilerek lineerize

edilmiştir. Lineer plazmit elektroporasyon yöntemi ile *Pichia pastoris*'in GS115 suşuna aktarılmıştır.

3.2.4 *Pichia pastoris*'in elektroporasyonu

Hücrelerin hazırlanması ve transformasyonu aşamalarından oluşan bu işlem tüm suşlara aynı şekilde uygulanmıştır.

Hücrelerin hazırlanması.

- YPD besi ortamında 5 ml'lik maya kültürleri 30°C'da bir gece inkübe edilmiştir.
- Bu kültürler kullanılarak 100 ml taze YPD besi ortamına başlangıç OD600= 0,1-0,2 olacak şekilde aşı yapılmıştır. Kültürün büyümesi takip edilerek OD600= 1,5'e ulaştığında kültür 4°C'ta 1500Xg'de santrifüj edilerek hasat edilmiştir.
- Hücre peleti buz soğukluğundaki 100 ml buz soğukluğundaki steril saf su içerisinde süspanse edilmiş ve bir önceki basamaktaki gibi tekrar santrifüj edilmiştir.
- Hücre peleti 50 ml buz soğukluğundaki 1 M sorbitol çözeltisi içerisinde süspanse edilmiş ve bir önceki basamaktaki gibi santrifüj edilmiştir.
- Hücre peleti 5 ml buz soğukluğundaki 1M sorbitol çözeltisi içerisinde süspanse edilmiş ve bir önceki basamaktaki gibi santrifüj edilmiştir.
- Hücre peleti 0,5 ml buz soğukluğundaki 1 M sorbitol çözeltisi içerisinde süspanse edilmiştir.
- Bu süspansiyondan 80 µl'lik alikotlar hazırlanarak transformasyon işlemine geçilmiştir. Aynı gün transformasyon yapılmayacak alikotlar daha sonra kullanılmak üzere -80°C'ta derin dondurucuda saklanmıştır.

Transformasyon

- 80 ul'lik hücre süspansiyonuna 10 ug lineer plazmit eklenmiş ve yavaşça karıştırıldıktan sonra 2 mm genişliğindeki elektroporasyon küvetine aktarılmıştır. Negatif kontrol kültürü elde etmek amacıyla ilgili geni içermeyen lineerize edilmiş "boş plazmit" kullanılarak aynı transformasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.
- Buz üzerinde 5 dk soğutulduktan sonra elektroporasyon cihazında 5 ms'lik 2000 V gerilim ile elektroşok uygulanmıştır.

- Hiç bekletilmeden buz soğukluğundaki 1 ml 1 M steril sorbitol çözeltisi eklenmiş ve kültür tüpüne aktarılmıştır.
- Transforme edilen hücreler 100 ug/ml Zeocin içeren YPDS petrilere yayılarak 30°C'ta karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır.
- Antibiyotik seleksiyonunun çalıştığına doğrulanması amacıyla plazmit eklenmeden elektroşok uygulanan bir kültür oluşturulmuştur.
- 3-4 gün boyunca inkübe edilen petrilere beliren koloniler steril tahta çubuklarla 100 ug/ml Zeocin içeren YPDS petrilere aktarılmıştır.

3.2.5 Transforme Kolonilerin Doğrulanması ve Gen İfadesinin Belirlenmesi

Seçilen koloniler kullanılarak koloni PCR yapılmış ve aktarılan geni içerdiği tespit edilen kolonilerden 4'er adet seçilerek gen ifadesinin belirlenmesi çalışması yapılmıştır. Gen ifadesinin belirlenmesi için 250ml'lik şaşırtıcı erlenlerde 30 ml'lik BMGY (pH: 6,0) besi ortamına her bir koloniden aşılama yapılmıştır. Kültürler çalkalamalı inkübatörde 250 rpm çalkalama hızında 28°C'da 24 saat inkübe edilmiştir. Kültürler 4°C'ta 1500Xg hızında santrifüj edilerek %0,5 metanol içeren 30 ml taze BMMY (pH6,0) ortamda süspanse edilmiştir. Aynı koşullarda inkübasyona devam edilmiştir. Kültürlere dört gün boyunca 12 saatte bir son konsantrasyon %0,5 olacak şekilde metanol eklemesi yapılmış ve her kültürden 1ml örnek alınmıştır. Örnekler 3000Xg'de 2dk santrifüj edilmiştir. Hücre peleti ve kültür süpernatantı ayrılarak analiz edilene kadar -20°C'ta saklanmıştır.

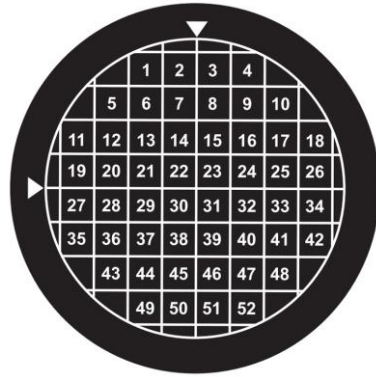
3.2.6 Mikroskopik İnceleme

Pichia pastoris kültürlerinin tamamından en az birer defa örnek alınarak ışık mikroskopunda incelemesi yapılmıştır. 100x büyütmede immersiyon yağı yardımı ile görüntülenerek genel hücre görünümü incelenmiş ve farklı mikroorganizma kontaminasyonu olup olmadığı kontrol edilmiştir.

3.2.7 “Yeastern” Yöntemi ile Protein İfadesinin Taranması

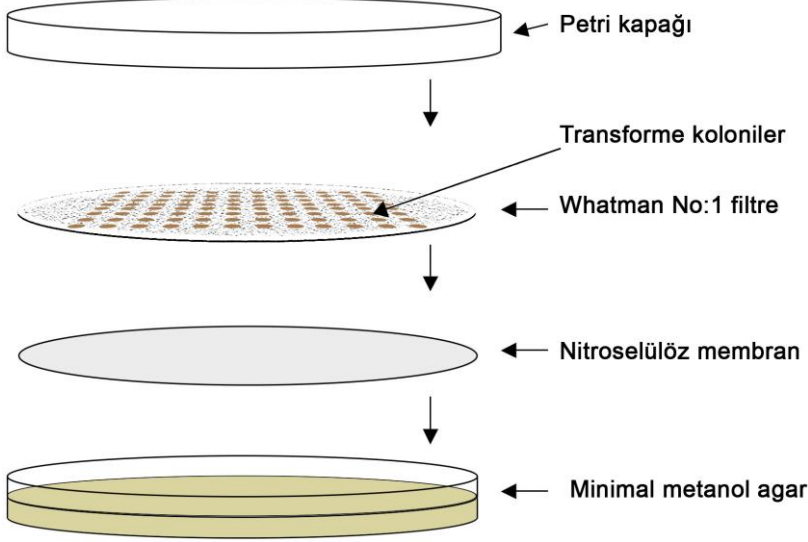
Çok sayıda koloninin hızlı bir şekilde protein ifadesinin taranmasını sağlayan bu yöntem hem seçici transformasyon seçici besiyerlerinde uygulanmıştır. İşlem basamakları şu şekildedir:

- Transformasyon işlemi sonrasında elde edilen çok sayıda koloniden 48 adet seçilerek steril kürdan yardımı ile Şekil 3.2'de gösterilen şablona uygun şekilde taze seçici besiyerine aktarılmıştır.
- 24 saat 30°C'ta inkübasyon yapıldıktan sonra tam olarak petrinin içini kaplayacak büyüklükte kesilmiş ve steril Whatman No:1 kağıdı yardımı ile koloniler %0.5 metanol içeren ve üzerinde steril nitroselülöz membran bulunan teşvik edici besiyeri petrisine aktarılmıştır (Şekil 3.3)
- Parafilm ile petrilerin etrafı sarılarak metanolün buharlaşma ile kaybedilmesi önlenmiştir.
- 72 saat süre ile 30°C'ta inkübasyon sonrasında kolonilerin üzerinde bulunduğu Whatman kağıdı taze bir seçici besiyerine aktarılmıştır.
- Nitroselülöz membran su ile yıkandıktan sonra bloklama tamponunda (%4 BSA içeren PBS) oda sıcaklığında 2 saat çalkalamalı olarak inkübe edilmiştir.
- Ardından 1/1000 seyreltmede alkalaen fosfataz ile konjuge anti-polihistidin antikoru ve %0.01 Tween 20 içeren bloklama tamponuna aktarılmıştır.
- 4°C'ta bir gece çalkalamalı olarak inkübe edildikten sonra membran %0.25 Tween 20 içeren PBS içerisinde yıkanmıştır.
- Saf su ile durulanan membran alkalen fosfataz substratı olan BCIP-NBT solüsyonu içine aktarılmıştır. Alkalen fosfataz enziminin substrat ile reaksiyonu sonrasında membran üzerinde koyu renkli benek oluşumu gözlenmiştir.
- Kolonilerin membrandaki izdüşümlerinde oluşan renklenme takip edilerek protein ifadesi yapan koloniler tespit edilmiştir.



Şekil 3. 2 Yeastern yönteminde kolonilerin yerleşimini gösteren şablon.

Protein ifadesini gerçekleştirdiği belirlenen kolonilerden en güçlü renk değişimi sağlayanlar seçilerek sıvı kültüre aktarılmış ve protein ifadesinin doğrulanması için küçük ölçekte (250 ml'lik erlen içerisinde 30 ml teşvik edici ortam (BMMY) rekombinant protein üretimi yapılmıştır.



Şekil 3.3 Yeastern yönteminin uygulanması sırasında kullanılan agar, membran, filtre kağıdı ve koloni düzeni. Nitroselülöz membranın hidrofilik olması besin ortamındaki nütrientlerin ve suyun mikroorganizmaya ulaştırılmasında önemli bir rolü vardır.

3.2.8 Kültür Süpernatantlarında Rekombinant Protein Aranması

Çalkalamalı erlen kültürlerinden alınan örneklerde öncelikle SDS-PAGE yöntemi ile proteinler denatüre edici koşullarda ayrılmıştır. Poliakrilamid jel Coomassie mavisi ile 10 dk boyanmıştır. Boya giderici çözeltilde (%30 MeOH, %15 asetik asit) 2 saat çalkalandıktan sonra jeller görünür ışıkta fotoğraflanmıştır. Beklenen büyüklükteki (~30 kDa) proteini ifade eden kültürler belirlenmiştir.

Bu proteinin spesifik olarak beklenen protein olup olmadığının belirlenmesi için Western Blot analizi yapılmıştır. Bu teknikte birincil antikör olarak rekombinant proteinin altı adet histidin aminoasit uzantısını tanıyan, Alkalin fosfataz ile konjuge edilmiş monoklonal anti-polihistidin antikoru (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, ABD, kat. no: A5588-.5ML) kullanılmıştır. Western blot membranında renk değişimi substratı olarak BCIP-NBT (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Teksas, ABD, kat no: sc-358798) kullanılmıştır.

3.2.9 Küçük Ölçek (20 ml) Sıvı Kültürde Rekombinant Protein Saflaştırılması

Saflaştırma işleminden önce kültür süpernatantında diyaliz yöntemi ile tampon değişimi yapılmıştır. Diyalizde 12-14 kDa cut-off por çaplı membran (Spectra/Por 4 Dialysis Tubing, kat no: 132703) kullanılmış ve saflaştırmada kullanılacak bağlama tamponu (50 mM sodyum fosfat, pH=7,5, 0,3 M NaCl) ile diyaliz gerçekleştirilmiştir. Protein saflaştırılmasında immobilize metal afinitesi kromatografisi (IMAC) (HisTrap HP 1 ml, GE Healthcare Life Sciences, PA, USA, kat no: 17-5247-01) kullanılmıştır. Saflaştırma işleminde ÄKTA Explorer 100 (GE Healthcare Life Sciences, PA, USA) cihazından yararlanılmıştır.

Üretici talimatlarından yeniden düzenlenerek belirlenen saflaştırma işlem basamakları aşağıdaki gibidir.

- Tüm basamaklarda 1ml/dk akış hızı kullanılmıştır.
- Kolon 10 kolon hacmi (10 ml) bağlama tamponu ile şartlandırılmıştır.
- Bağlama tamponu ile değiştirilmiş kültür süpernatantı kolona yüklenmiştir.
- Kolon 10 mM imidazol içeren bağlama tamponu ile yıkanmıştır.
- UV280 absorbansı ~0,100 değerinde sabitlendikten sonra lineer gradient yöntem ile imidazol konsantrasyonu 10 kolon hacmine (10 ml) yayılacak şekilde 500 mM'a kadar yükseltilmiştir.
- Tüm aşamalarda kolon çıkışları toplanarak işaretlenmiş ve analiz edilmek üzere 4°C'ta saklanmıştır.
- Toplanan örnekler protein saflaştırmanın ön değerlendirmesi için SDS-PAGE'de ayrılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre sonraki saflaştırma işlemlerinin stratejileri optimize edilmiştir.

3.2.10 Rekombinant protein miktarının farklı fraksiyonlarda belirlenmesi

Farklı saflaştırma basamaklarında kolon çıkışından alınan örneklerde protein konsantrasyonu belirlenmiştir. Ayrıca bu örnekler SDS-PAGE yöntemi ile ayrımlanarak protein saflaştırmanın başarısı belirlenmiştir. Buna ek olarak histidin hedefli Western çalışması yapılarak farklı fraksiyonlarda kalan, saflaştırma işleminde kaybedilen ve elüsyon basamağında elde edilen rekombinant proteinler tespit edilmiştir. Yine histidin hedefli olarak ELISA çalışması yapılarak elde edilen

protein konsantrasyonları belirlenmiştir. ELISA çalışması şu basamaklardan oluşmaktadır:

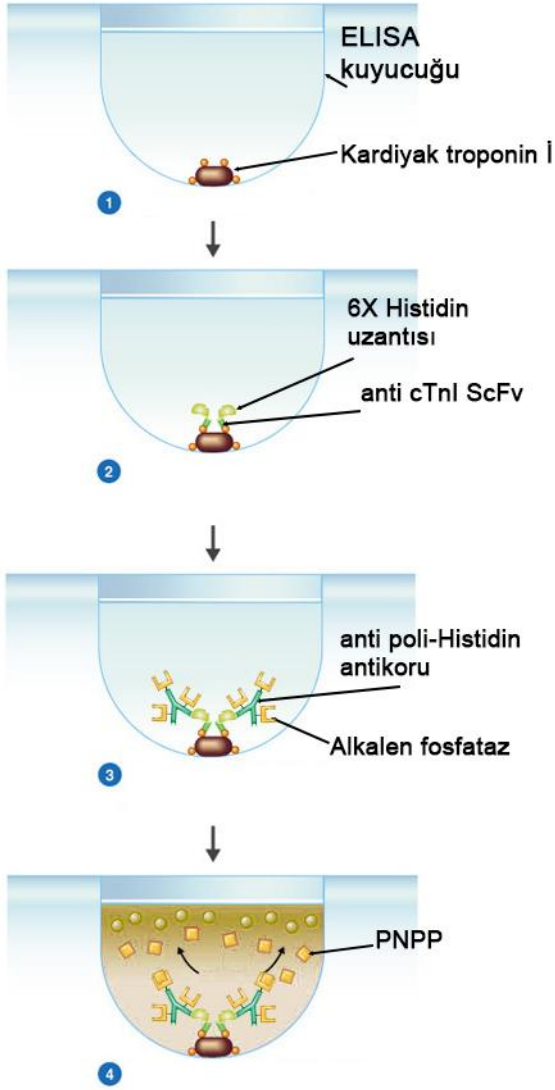
- Üretilen rekombinant antikor fragmentinin seri seyreltmeleri (1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160) bikarbonat tamponu (NaCO_3 , pH: 9,4) içerisinde hazırlanarak her bir kuyuya 200 μl olacak şekilde ELISA pleytine dağıtılmıştır.
- Pleyt parafilm ile sarılarak 4°C 'ta bir gece sabit olarak inkübe edilmiştir.
- Yıkama tamponu (%0,25 Tween 20 içeren PBS) ile üç defa yıkandıktan sonra bloklama tamponu ile kuyular doldurulmuş ve 37°C 'ta 1 saat inkübe edilmiştir.
- Yıkama işlemi aynı şekilde tekrarlandıktan sonra bloklama tamponu içerisinde 1/1000 seyreltilmiş alkalen fosfataz ile konjuge anti poli histidin antikoru eklenmiştir.
- Yine 37°C 'ta 1 saat inkübasyon yapılmıştır.
- Yıkama işlemi tekrarlandıktan sonra renk değişimi için PNPP solüsyonu eklenmiştir.
- Pleyt okuyucuda 405 nm'de plate okuması yapılmıştır.

3.2.11 Saflaştırılan Rekombinant ScFv ile Kardiyak Troponin I Proteininin Tespit Edilmesi

Üretilen ve saflaştırılan rekombinant anti kardiyak troponin I antikor fragmentinin (ScFv) kardiyak troponin I proteinini tespit etme yeteneği ELISA tekniği ile belirlenmiştir (Şekil 3.4). Özet olarak 96'lık ELISA pleyti öncelikle troponin I proteini ile kaplanmıştır. Ardından sırası ile anti troponin I ScFv ve alkalın fosfataz ile konjuge monoklonal anti polihistidin antikoru bağlanmıştır. Renk değişimi reaksiyonu için PNPP (p-nitrophenyl phosphate disodium salt) substratı kullanılmıştır. Renk değişimi ELISA pleyt okuyucusunda değerlendirilmiştir. Detaylı olarak ELISA işlem basamakları aşağıdaki gibidir:

- Rekombinant olarak temin edilen Troponin I proteininin seri seyreltmeleri bicarbonat tamponu (NaCO_3 , pH: 9,4) içerisinde hazırlanarak her bir kuyuya 200 μl olacak şekilde ELISA pleytine dağıtılmıştır.
- Pleyt parafilm ile sarılarak 4°C 'ta bir gece sabit olarak inkübe edilmiştir.

- Yıkama tamponu (%0,25 Tween 20 içeren PBS) ile üç defa yıkandıktan sonra bloklama tamponu ile kuyular doldurulmuş ve 37°C'ta 1 saat inkübe edilmiştir.
- Yıkama işlemi aynı şekilde tekrarlandıktan sonra üretilen antikor fragmentinin seri seyreltmeleri hazırlanarak 3'lü tekrarlar halinde kuyulara 100'er µl eklenmiştir. 37°C'ta 1 saat inkübe edilmiştir.
- Yıkama işlemi aynı şekilde tekrarlandıktan sonra bloklama tamponu içerisinde 1/1000 seyreltilmiş alkalen fosfataz ile konjuge anti poli histidin antikoru eklenmiştir.
- Yine 37°C'ta 1 saat inkübasyon yapılmıştır.
- Yıkama işlemi tekrarlandıktan sonra renk değişimi için PNPP solüsyonu eklenmiştir.
- Pleyt okuyucuda 405 nm'de plate okuması yapılmıştır.



Şekil 3. 4 Kardiyak Troponin I proteininin tespiti için yapılan ELISA çalışmasının basamakları. 1) ELISA kuyucuğunun Kardiyak Troponin I proteini ile kaplanması; 2) Rekombinant antikor fragmentinin cTnI proteinine bağlanması; 3) Alkaleen fosfataz işaretli anti-poli-histidin antikorunun rekombinant protein üzerindeki 6x Histidin işaretine bağlanması; 4) Renk reaksiyonu substratının eklenmesi ile kuyucuk içerisinde sarı renk oluşumu reaksiyonunun gerçekleşmesi.

ELISA pleytinde farklı seyreltmelerin yerleşim planı Tablo 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3. 2 Troponin I tespitinde uygulanan ELISA yöntemi için kullanılan pleyt yerleşimi şablonu..

35.3 µg/ml konsantrasyonundaki troponin I proteininin seyreltme oranları									
Konjuge edilmiş antikor fragmenti	Seyreltilmiş antikor fragmenti	Troponin 1/500	Troponin 1/500	Troponin 1/500	Troponin 1/1000	Troponin 1/1000	Troponin 1/1000	Troponin 1/2000	Troponin 1/2000
		Troponin 1/2000	Troponin 1/4000	Troponin 1/4000	Troponin 1/4000	Troponin 1/8000	Troponin 1/8000	Troponin 1/8000	BSA
	1/10 seyreltilmiş antikor fragmenti	Troponin 1/500	Troponin 1/500	Troponin 1/500	Troponin 1/1000	Troponin 1/1000	Troponin 1/1000	Troponin 1/2000	Troponin 1/2000
		Troponin 1/2000	Troponin 1/4000	Troponin 1/4000	Troponin 1/4000	Troponin 1/8000	Troponin 1/8000	Troponin 1/8000	BSA
Altın nanopartikül ile konjuge edilmiş antikor fragmenti	Seyreltilmiş antikor fragmenti	Troponin 1/500	Troponin 1/500	Troponin 1/500	Troponin 1/1000	Troponin 1/1000	Troponin 1/1000	Troponin 1/2000	Troponin 1/2000
		Troponin 1/2000	Troponin 1/4000	Troponin 1/4000	Troponin 1/4000	Troponin 1/8000	Troponin 1/8000	Troponin 1/8000	BSA
	1/10 seyreltilmiş antikor fragmenti	Troponin 1/500	Troponin 1/500	Troponin 1/500	Troponin 1/1000	Troponin 1/1000	Troponin 1/1000	Troponin 1/2000	Troponin 1/2000
		Troponin 1/2000	Troponin 1/4000	Troponin 1/4000	Troponin 1/4000	Troponin 1/8000	Troponin 1/8000	Troponin 1/8000	BSA

3.2.12 Antikor fragmentinin altın nanopartiküllerle konjugasyonu

Kolloid çözelti olarak temin edilen altın nanopartiküller (15 nm, 3nM hesaplanmış konsantrasyon) 15000XG'de 25 dk santrifüj edilerek çöktürülmüştür. PBS (5 mM, pH: 7,2) içinde aynı hacimde tekrar çözündürülmüştür. Ardından 1 ml altın nanopartikül çözeltisine 200 µl rekombinan antikor fragmenti eklenerek karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 24 saat inkübe edildikten sonra altın nanopartiküllere bağlanmayan antikor fragmentlerinin uzaklaştırılması için 8000XG'de 20 dk santrifüj yapılmıştır. Antikor bağlı altın nanopartiküller tekrar PBS (5 mM, pH: 7,2) içinde çözündürülmüştür. Elde edilen çözelti bir önceki bölümde belirtilen şekilde kullanılarak altın nanopartikül konjugasyonunun etkisi incelenmiştir.

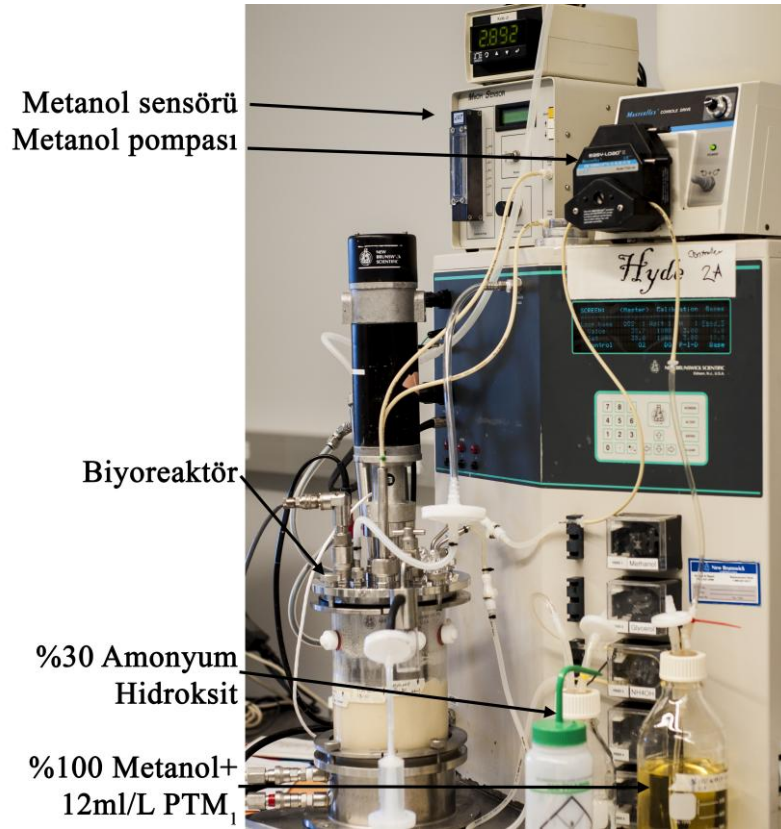
3.2.13 Biyoreaktörde 1,5 L Ölçekte Üretim

YPD agar petrisinden alınan tek koloni 5 ml YPD ortam içine ekilerek 250 rpm çalkalamalı inkübatörde 30°C'ta bir 16 saat inkübe edilmiştir. Elde edilen kültür başlangıç OD₆₀₀ 0,01 ile 0,1 arasında olacak şekilde 100 ml'lik BMGY ortamı aşılama için kullanılmıştır. Bu kültür OD₆₀₀=20 oluncaya kadar aynı koşullarda şaşırtıcı erlen içerisinde inkübe edilmiştir. Yeterli hücre yoğunluğuna ulaşan kültür çalışma Şekil 3.5'te görülen 2 l toplam hacimli biyoreaktör (BioFlo 3000, New Brunswick Scientific, NJ, USA) içerisindeki 1 litre bazal ortamı aşılama için kullanılmıştır.

Biyoreaktör işletme koşulları şu şekildedir:

- Sıcaklık: 25°C (üretilen proteinin biyoreaktör koşullarında korunması için sıcaklık düşürülmüştür)
- Çözünmüş oksijen konsantrasyonu: %40
- Havalandırma hızı 2 vvm
- Karıştırma stratejisi: Çözünmüş oksijen konsantrasyonuna bağlı olarak minimum 300 rpm, maksimum 1000 rpm.
- Saf oksijen besleme stratejisi: Karıştırma hızı 1000 rpm'e ulaştığında ve çözünmüş oksijen konsantrasyonunu %40'ta tutmak için yeterli olmadığı devreye girecek şekilde kaskat sistemi ayarlanmıştır.
- pH stat: Üretim sırasında pH'ın 3,0'da sabit tutulması için %30 amonyum hidroksit beslemesi biyoreaktör ünitesi kontrolünde yapılmıştır.
- Metanol besleme stratejisi: başlangıçta ortamda bulunan gliserolün bitmesinin ardından görülen ani çözünmüş oksijen konsantrasyonu artışı ile birlikte metanol sensörü kontrolünde 12 ml/l oranında PTM₁ içeren metanol beslemesi başlatılmış ve üretim süresince devam ettirilmiştir.
- 12 saatte bir yaklaşık 1 ml örnek darası alınmış 1,5 ml'lik ependorf tüpe alınarak oda sıcaklığında, 6000Xg'de 3 dk santrifüj edilmiştir. Yaş hücre ağırlığı hesaplaması için brüt ağırlıktan dara ağırlığı çıkarılarak net ağırlık bulunmuştur. Kültür süpernatantı hücre peletinden ayrılarak hücre peletinin ayrıca ağırlığı ölçülmüştür.
- Alınan kültür süpernatantı örnekleri -20°C'da analiz edilinceye kadar saklanmıştır.

- 72 saatlik metanol teşviki sonrasında üretim durdurularak santrifüj ile hücre hasadı yapılmıştır. Kültür süpernatantına 5mM EDTA eklenerek protein saflaştırılması işlemine geçilmiştir.
- 1,1 l ile başlayan kültür hacmi metanol beslemesi ile 1,5 l'ye ulaştığında biyoreaktörden 400 ml'lik örnekler alınarak biyoreaktörün taşması önlenmiştir.

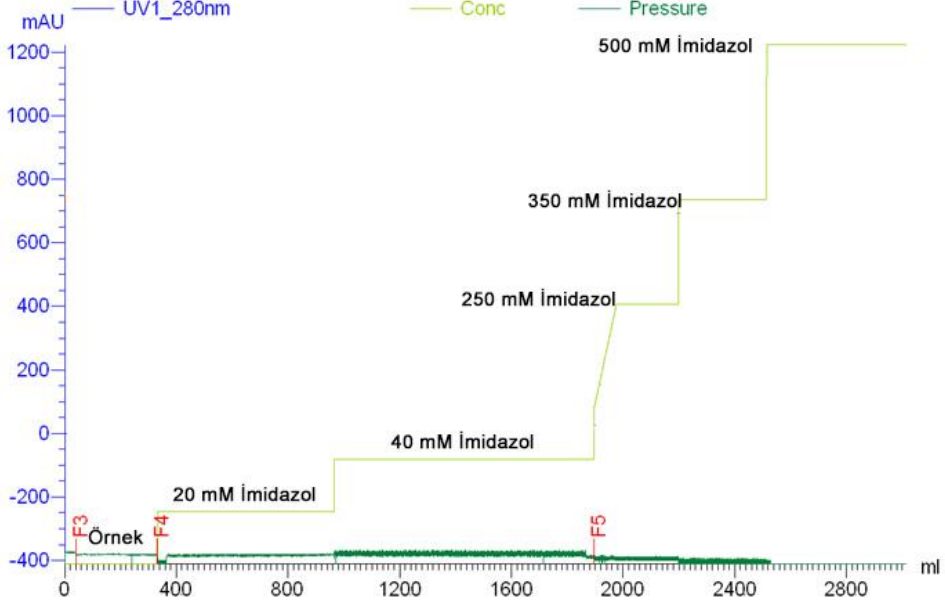


Şekil 3. 5 Çalışmada kullanılan biyoreaktör ve kontrol ünitesi.

3.2.14 Orta Ölçek (1,5 L) Sıvı Kültürde Rekombinant Protein Saflaştırılması

Öncelikle üretim sonunda elde edilen kültür 4°C'ta 5000Xg'de 45 dk boyunca santrifüjlenerek biyokütle ile süpernatant ayrılmıştır. Süpernatantın hücre kalıntılarında tamamen arındırılması için 0,5 µm nominal çaplı filtre ile filtrasyonu yapılmıştır. Tampon değişimi için küçük ölçekten farklı olarak teğet akışlı filtrasyon (Omega Centramat, kat no: OS010T12, Life Technologies CA/USA) uygulanmış ve 1 litre olan kültür süpernatantı konsantre edilerek 350 ml'ye indirilmiştir. Konsantre süpernatantın 10 katı (3.5 l) hacimde bağlama tamponu sistemden geçirilerek tampon değişimi tamamlanmıştır. Protein saflaştırma işleminde küçük ölçekte olduğu gibi AKTA Explorer 100 cihazı

kullanılmıştır. Kolon hacmi artırılarak 100 ml paketlenmiş kolon ile çalışılmıştır. Farklı aşamalarda kolon yükleme stratejisi Şekil 3.6'daki grafikte görülmektedir.



Şekil 3. 6 100 ml hacme sahip Nikel afinite kolonu kullanarak yapılan protein saflaştırma işleminde kolona beslenen çözeltilerin grafiksel gösterimi (Grafik: Unicorn programı). Şekil üzerinde gösterilmemesiyle birlikte “Örnek” yüklemesi öncesinde kolon, 4 kolon hacmi bağlama tamponu ile şartlandırılmıştır.

3.2.15 Saflaştırılan Rekombinant ScFv ile Troponin I Proteininin Tespit Edilmesi

1,5 l çalışma hacminde biyoreaktörde üretilen ve IMAC yöntemi ile saflaştırılan rekombinant anti kardiyak troponin i antikor fragmentinin (ScFv) kardiyak troponin I proteinini tespit etme yeteneği Bölüm 3.2.9’da anlatılan şekilde ELISA tekniği ile belirlenmiştir.

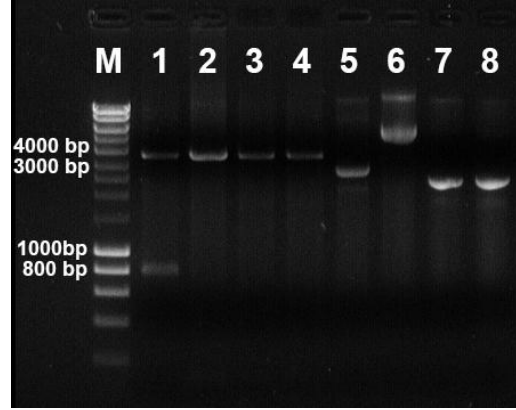
4 BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1 pPICZαA-antiTNNI3 Konstrüktü Kullanılarak Elde Edilen Bulgular

4.1.1 Konstrükt eldesi

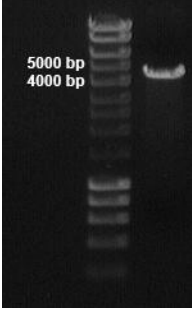
Bölüm 3.2.1’de belirtilen konstrükt öncelikle *Escherichia coli*’ye (NEB 10 β) aktarılmıştır. Transforme kolonilerden izole edilen plazmitlerin klonlama sırasında

kullanılan restriksiyon enzimleri ile kesilmesi sonucunda elde edilmiş agaroz jel bant profili Şekil 4.1’de görülmektedir. 1 numaralı kolonide tespit edilen yaklaşık 800 bp büyüklüğündeki bant genin plazmite aktarılabildiğini göstermiştir. Diğer kolonilere aktarılan plazmilerin antikor fragmenti genini içermediği tespit edilmiştir. Aktarılan geni taşıdığı belirlenen 1 numaralı koloniden elde edilen plazmit sekanslama ile doğrulanmıştır.



Şekil 4. 1 Transforme *E. coli*'den izole edilen pPICZA-anti TNNI3 konstrüktünün. EcoRI-SalI enzimleri ile çift restriksiyonu (1-4) ve aynı plazmitlerin süper sarmal durumlarının (5-8) agaroz jeldeki görünüşleri.

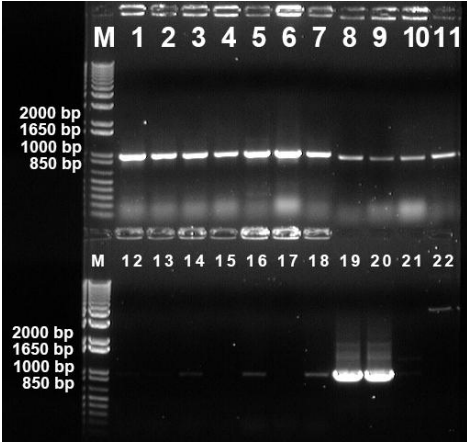
Tespit edilen 1 numaralı koloni yüksek miktarda plazmit elde edilebilmesi için Bölüm 3.2.3'te açıklandığı gibi inkübe edilmiş ve toplam 500 µl steril saf su içerisinde 400 µg plazmit elde edilmiştir. Bu plazmit üretici (Life Technologies) talimatları doğrultusunda *Pichia pastoris*'e transformasyonun yapılabilmesi için *SacI* enzimi ile lineerize edildiğinde, agaroz jelde yaklaşık 4,5 kb uzunluğunda tek bir bant olarak görülmüştür (Şekil 4.2). Bu bant beklendiği gibi rekombinant genin ve pPICZαA toplam büyüklüğünü sağlamıştır.



Şekil 4. 2 1 numaralı koloniden elde edilen plazmidin SacI enzimi ile lineerizasyonu sonucunda elde edilen yaklaşık 4500 bp büyüklüğündeki DNA'nın %1'lik agaroz jeldeki görünümü.

4.1.2 *Pichia pastoris*'in transformasyonu

Bölüm 3.2.4'te belirtildiği gibi yapılan transformasyondan sonra YPD-S petrilere ekim yapılmış ve 3 gün içinde koloni oluşumu gözlenmiştir. Petri üzerinde komşu kolonilerine uzakta olan kolonilerden seçilerek koloni PCR yapılmıştır. Şekil 4.3'te koloni PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görünümü verilmiştir. Gen transferi gerçekleşmiş olan koloniler yaklaşık 1000 bp büyüklüğünde bir PCR ürünü ortaya çıkarmıştır. Burada kullanılan primerler, alfa faktörü dizisinin ve AOX terminator bölgesinin bir kısmını da kapsayacak şekilde tasarlandığından dolayı 770 bp büyüklüğündeki genden daha büyük (944 bp) bir PCR ürünü ortaya çıkmıştır.

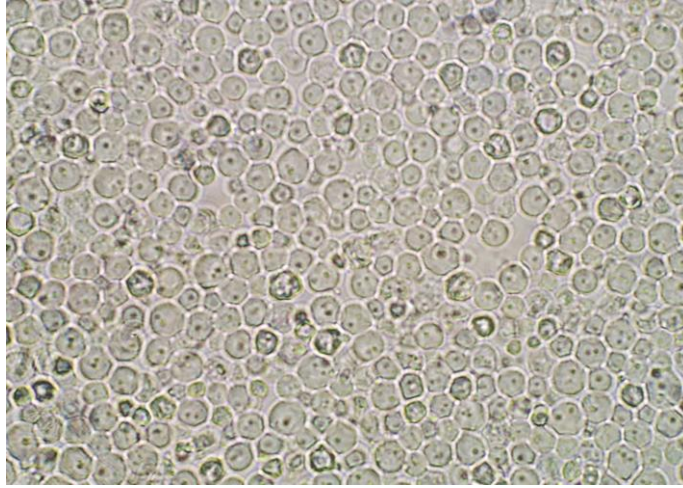


Şekil 4. 3 *Pichia pastoris* GS115 suşunun pPICZαA-antiTNNI3 konstrüktü ile transformasyonu sonucu elde edilen kolonilerde yapılan PCR ile elde edilen ürünlerin agaroz jeldeki görünümü. 1-18: Farklı kolonilerden elde edilen sonuçlar. 19-20: Doğrudan konstrüktün PCR'da

kalıp DNA olarak kullanılması ile elde edilen sonuçlar. 21: Kalıp DNA kullanılmadan gerçekleştirilen negatif kontrol sonucu. 22: Linnerize edilmiş konstrüktün jeldeki görünümü.

4.1.3 Mikroskopik inceleme

Transforme *Pichia pastoris* kolonileri ile yapılan sıvı kültürlerden alınan örneklerde mikroskopik inceleme sonucunda görünür bir kontaminasyona raslanmamıştır. Literatürdeki (Damasceno et al., 2007) görüntüler referans alınarak hücrelerin büyüklük ve şekillerinin normal olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.4).

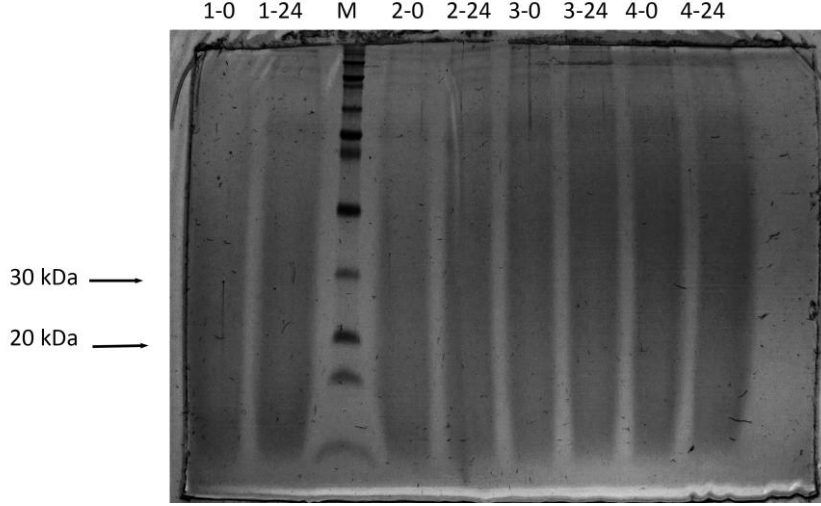


Şekil 4. 4 Sıvı kültürden alınan *Pichia pastoris* örneğinin mikroskopta, 100X objektif ile görünümü.

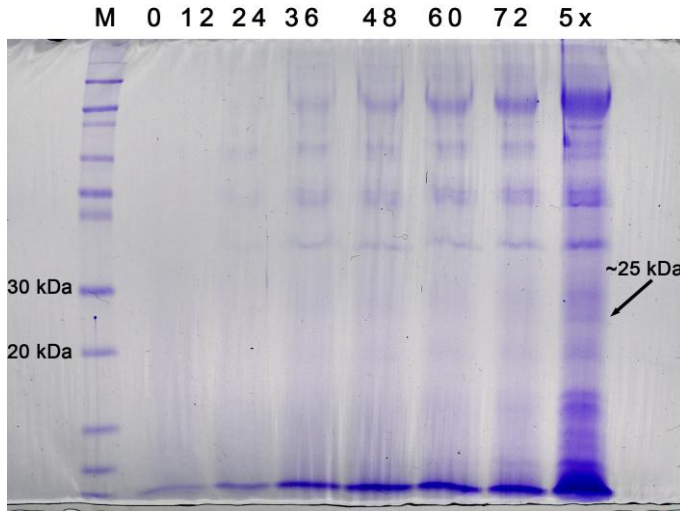
4.1.4 Küçük ölçekte rekombinant protein üretimi

Genotip olarak pozitif olduğu belirlenen kolonilerden 24 adet seçilerek protein ifadesi taraması yapılmıştır. Yapılan kültürlerden 0, 24, 48, 72, 96. saatlerde örnek olarak kültür süpernatantı hücrelerden santrifüj ile ayrılmıştır. Kültür biyokütlesinde beklenen şekilde artış (96. saatte ortalama ~100 g yaş hücre/litre kültür) tespit edilmiş fakat SDS-PAGE analizlerinde doğru büyüklükte protein üretimine rastlanmamıştır. Şekil 4.5'te 24'lü kültürden alınan 1-4 numaralı örneklerin kültür süpernatantlarındaki protein profili gösterilmiştir. 24'lü kültür kaplarında beklenen büyüklükte bir protein tespit edilmemiştir. Şekil 4.6'da 1 numaralı koloni ile yapılan biyoreaktör üretimi sırasında 12 saatte bir alınan örneklerin protein profilleri görülmektedir. 5x ile belirtilen şerit 72. saatte alınan örneğin 5 kat konsantre edilmesi sonucunda elde edilen görüntüdür. Burada yaklaşık 25 kDa büyüklüğünde düşük miktarda bir bant görülse de 6X Histidin hedefli western blot denemesinde bir bant görülmemesi (veri gösterilmemiştir)

kültür süpernatantlarında rekombinant protein bulunmadığı sonucunu ortaya çıkarmıştır. Bunun üzerine bir sonraki alternatif olarak pPIC9 plazmitlerinin kullanıldığı konstrüktler ile deneme yapılmıştır.



Şekil 4. 5 Küçük ölçekte protein ifadesi denemelerinde 4 kolonide methanol beslemesinin 0 (1-0 – 4-0) ve 24. (1-24 – 4-24) saatlerinde alınan örneklerin kültür süpernatantlarındaki protein profilleri. Yaklaşık 30 kDa büyüklüğünde görülmesi gereken bant görülmemektedir.



Şekil 4. 6 Kültür süpernatantındaki protein profilinin zamanla değişimini gösteren SDS-PAGE görüntüsü. Örnekler her bir şeridin başında belirtilen saatlerde alınmıştır.

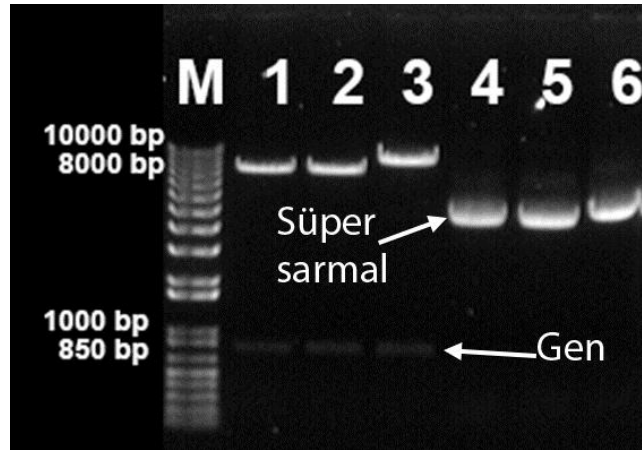
4.2 pPIC9K ve pPIC9 Plazmitleri Kullanılarak Elde Edilen Bulgular

4.2.1 Konstrükt eldesi

pPICZ α A plazmidinin kullanımı ile protein üretiminin gerçekleştirilememesinden dolayı pPIC9 ve pPIC9k plazmitleri ile ikinci deneme yapılmıştır. Konstrüktler şu şekilde tasarlanmıştır:

- 1- pPIC9antiTNNI3a: antikor fragmenti geninin *EcoRI* ve *NotI* klonlama bölgesine aktarılması sonucu elde edilen konstrükt
- 2- pPIC9antiTNNI3b: antikor fragmenti geninin *XhoI* ve *NotI* klonlama bölgesine aktarılması sonucu elde edilen konstrükt
- 3- pPIC9kantiTNNI: antikor fragmenti geninin plazmidin pPIC9k versiyonunda *XhoI* ve *NotI* klonlama bölgesine aktarılması sonucu elde edilen konstrükt

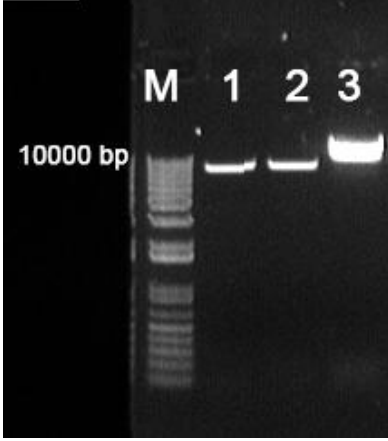
Önceki denemede olduğu gibi öncelikle *Escherichia coli*'ye (NEB 10 β) yukarıda belirtilen konstrüktler aktarılmıştır. Elde edilen transforme kolonilerden izole edilen plazmitlerin klonlama enzimleri ile restriksiyonu sonucu elde edilen DNA fragmentlerinin agaroz jelde ayrılmış görünüşleri Şekil 4.7'de verilmiştir. Ayrımlanan DNA fragmentlerinin boş plazmit ve klonlanan gen (777 bp) olmak üzere beklenen büyüklükte oldukları tespit edilmiştir. Aktarılan geni taşıdığı belirlenen numaralı kolonilerden elde edilen plazmit sekanslama ile doğrulanmıştır.



Şekil 4. 7 Transforme *E. coli*'den izole edilen pPIC9-anti TNNI3a, pPIC9-anti TNNI3b ve konstrüktünün ilgili enzim çiftleri ile restriksiyonu (1-3) ve aynı plazmitlerin aşırı sargılı durumlarının (4-6) agaroz jeldeki görünüşleri.

Pozitif oldukları tespit edilen koloniler yüksek miktarda plazmit elde edilebilmesi için antibiyotik içeren 50 ml sıvı ortamda 50 ml'lik engelli erlende

37°C'ta 16 saat çalkalamalı olarak inkübe edilmiştir. Midi kit kullanılarak 500 µl steril saf su içerisinde ortalama 650 µg plazmit izole edilmiştir. Bu plazmitler "Pichia expression kit" talimatları doğrultusunda *Pichia pastoris*'e transformasyonun yapılabilmesi için SacI enzimi ile lineerize edilmiştir (Şekil 4.8). Lineerizasyon işleminden sonra agaroz jelde görülen bantların beklendiği gibi plazmit büyüklüğü ile aktarılan gen büyüklüğünün toplamı kadar büyüklükte olduğu belirlenmiştir.

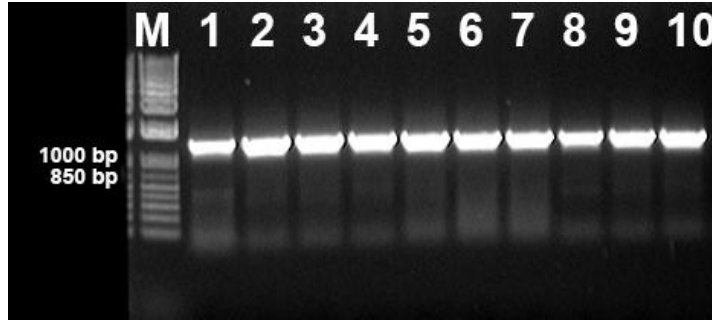


Şekil 4. 8 Transforme kolonilerden elde edilen plazmitlerin SacI enzimi ile lineerizasyonu sonucunda elde edilen yaklaşık 8800 bp büyüklüğündeki pPIC9antiTNNI3a ve pPIC9antiTNNI3b konstrüktleri (1-2) ve yaklaşık 10000 bp büyüklüğündeki pPIC9k-antiTNNI3 konstrüktünün %1lik agaroz jeldeki görünümü.

4.2.2 *Pichia pastoris*'in transformasyonu

Pichia pastoris GS115 suşunun transformasyonu yaklaşık 10 µg lineerleştirilmiş konstrükt kullanılarak yapılmıştır. Seri seyreltmeler ile Histidin içermeyen minimal dekstroz seçici petrilere ekim yapılmış ve 2-3 gün 30°C'ta inkübasyon sonrasında koloni oluşumu gözlenmiştir. Petri üzerinde komşu kolonilerine uzakta olan kolonilerden seçilerek Bölüm 3.2.3'te anlatıldığı gibi koloni PCR yapılmıştır. Şekil 4.9'da koloni PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görünümleri verilmiştir. Gen transferi gerçekleşmiş olan koloniler yaklaşık 1200 bp büyüklüğünde bir PCR ürünü ortaya çıkarmıştır. Burada kullanılan primerler önceki denemede olduğu gibi, AOX1 geninin bir kısmını, alfa faktörü dizisinin tamamını ve AOX terminator bölgesinin bir kısmını da kapsayacak şekilde tasarlandığından dolayı 770 bp büyüklüğündeki genden daha büyük, bir PCR ürünü agaroz jelde görülmüştür. Elde edilen bu görüntü elektroporasyon işlemi ile transfer edilen genin başarı ile mayaya aktarıldığını doğrulamıştır. Koloni PCR testinde,

seçici ortamda büyüyen koloniler test edildiği için aktarılan konstrüktün genomda entegre olmuş olması beklenmektedir. HIS4 geni ile aynı DNA parçası üzerinde bulunan antikor fragmenti geni, tüm koloni PCR testlerinde pozitif sonuç vererek gen transformasyonunun gerçekleştiği doğrulanmıştır. Öte yandan GS115 (his4) suşunun genetik özellikleri (Cregg et al., 1985) hem antibiyotik hem de besin elementi eksikliğine (oksotrofi) dayalı olarak seleksiyon yapılmasını sağlamaktadır. Ayrıca transformasyon sonucunda aktarılan plazmidin genomda AOX gen bölgesiniçin içine ya da öncesine entegre olmasına bağlı olarak hızlı metanol kullanımı yapabilen Mut⁺ veya yavaş metanol kullanımı yapan Mut^s fenotipinde elde edilebilmektedir.

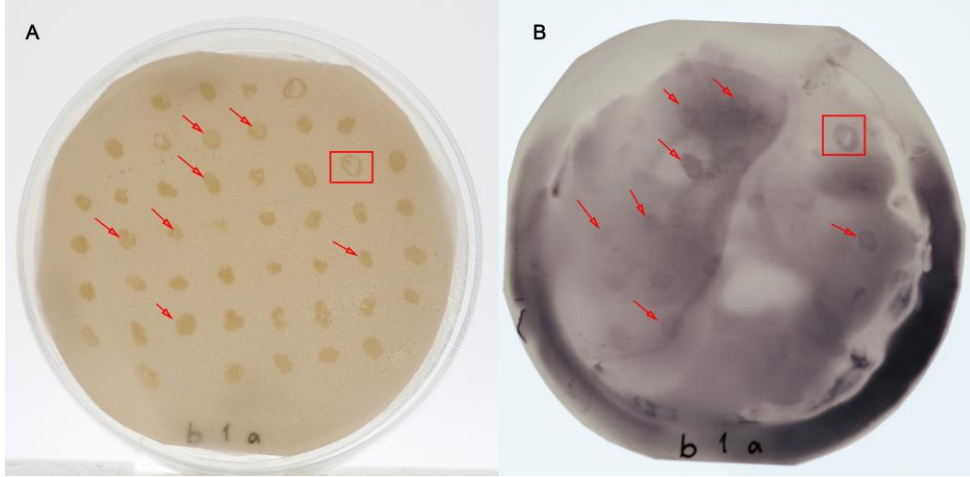


Şekil 4. 9 *Pichia pastoris* GS115 suşunun pPIC9K-antiTNNI3 konstrüktü ile transformasyonu sonucu elde edilen kolonilerde yapılan PCR ile elde edilen ürünlerin agaroz jeldeki görünüşleri (diğer konstrüktlerin PCR sonuçları gösterilmemiştir).

4.2.3 “Yeastern” Yöntemi ile Protein İfadesinin Taranması

Bölüm 3.2.7’de anlatıldığı gibi Yeastern yöntemi ile 48 adet kolonide protein ifadesi taranmıştır. Daha önce belirtildiği gibi çok sayıda kolonide protein ifadesinin hızlı bir şekilde taranmasını sağlayan bu yöntem ile protein ifadesi yapan koloniler belirlenmiştir. Deneme sonucunda Whatman kağıdı üzerindeki kolonilerin ve bu kolonilerin ifade ettiği rekombinant proteinlerin membran üzerinde Western renk reaksiyonu sonucunda beliren koyu renkli leke görünüşleri Şekil 4.10’da verilmiştir. Kolonilerin membran üzerindeki izdüşümleri incelendiğinde bazı kolonilerde hiç leke oluşumu görülmezken diğerlerinde farklı koyulukta leke oluşumu saptanmıştır. Bu yöntemde sadece pPIC9K-antiTNNI3 konstrüktü ile pozitif sonuç alınabilmiştir. Nitroselülöz membran üzerinde en belirgin şekilde görülen lekeler ve bunları oluşturan koloniler Şekil 4.10’da kırmızı

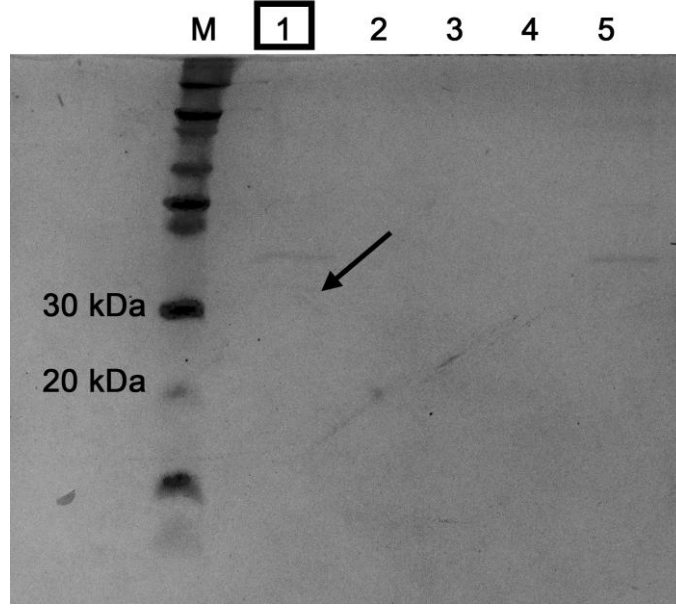
oklar ile gösterilmiştir. Kırmızı çerçeve ise ileriki bölümlerde görüleceği gibi protein üretimi ve saflaştırılması işlemlerinde kullanılmasına karar verilen koloniyi göstermektedir. Bu tarama sonucunda membran üzerinde en koyu lekeleri oluşturan beş adet koloni seçilerek protein ifadesinin doğrulanması sıvı kültür ile yapılmıştır (Bölüm 4.2.4).



Şekil 4. 10 Yeastern yönteminde kolonilerin petri üzerinde görünümü (A) ve kolonilerin izdüşümlerinde nitroselülöz membran üzerinde koyu renkli lekeler (B) olarak görülen rekombinant proteinler.

4.2.4 Küçük Ölçekte Rekombinant Protein Üretimi

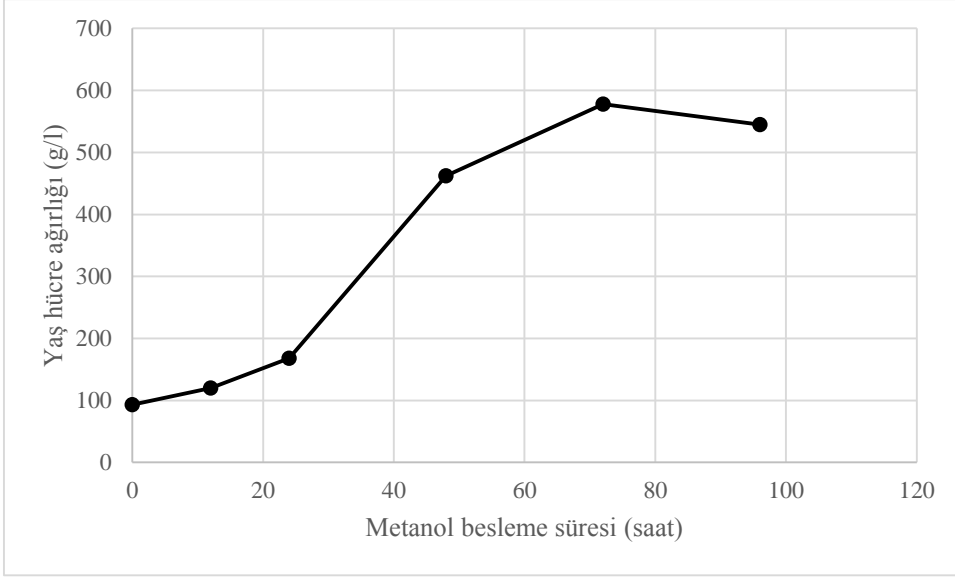
Hem genotip olarak koloni PCR yöntemi ile hem de yeastern yöntemi ile pozitif olduğu belirlenen kolonilerden beş adet en koyu renkli lekeyi oluşturan koloni seçilerek protein ifadesi taraması sıvı kültür ile doğrulanmıştır. Yapılan kültürlerden 0, 24, 48, 72, 96. saatlerde örnek alınarak kültür süpernatantı hücrelerden santrifüj ile ayrılmıştır. Kültür biyokütlesinde beklenen şekilde artış (96. saatte ortalama ~150 g yaş hücre / litre kültür) belirlenmiştir. Yalnızca pPIC9k-antiTNNI3 konstrüktünün aktarıldığı kolonilerden bazılarında yaklaşık 30 kDa büyüklüğünde proteinin hücre dışına diğer hücre dışı proteinlerle birlikte salgılandığı görülmüştür. Şekil 4.11’de bu kültürlerin sonlandırıldıkları 96. saatlerdeki örneklerin SDS-PAGE’deki protein profilleri görülmektedir. Benzer şekilde Damasceno et al. (2004) yaptıkları çalışmada rekombinant antikor fragmenti ifadesinin taranması için seçtikleri kolonilerin tamamı aktarılan geni içermelerine rağmen sadece az sayıda koloninin protein ifadesini gerçekleştirdiğini tespit etmiş ve SDS-PAGE görüntülerini temel alarak en yüksek protein ifadesi yapan koloniyi seçmişlerdir.



Şekil 4. 11 Çalkalamalı erlende 96 saatlik inkübasyon sonrasında kültür süpernatantlarındaki protein profilinin SDS-PAGE jelindeki görünümü. 1-5 numaraları denemede kullanılan kolonilerin numaralarını, “M” protein markırını göstermektedir. Jel üzerindeki ok rekombinant antikor fragmentini göstermektedir. Çerçeve içinde gösterilen 1 numaralı koloni ise biyoreaktörde üretim için seçilen kolonidir ve bu noktadan itibaren çalışmaya bu koloni kullanılarak devam edilmiştir.

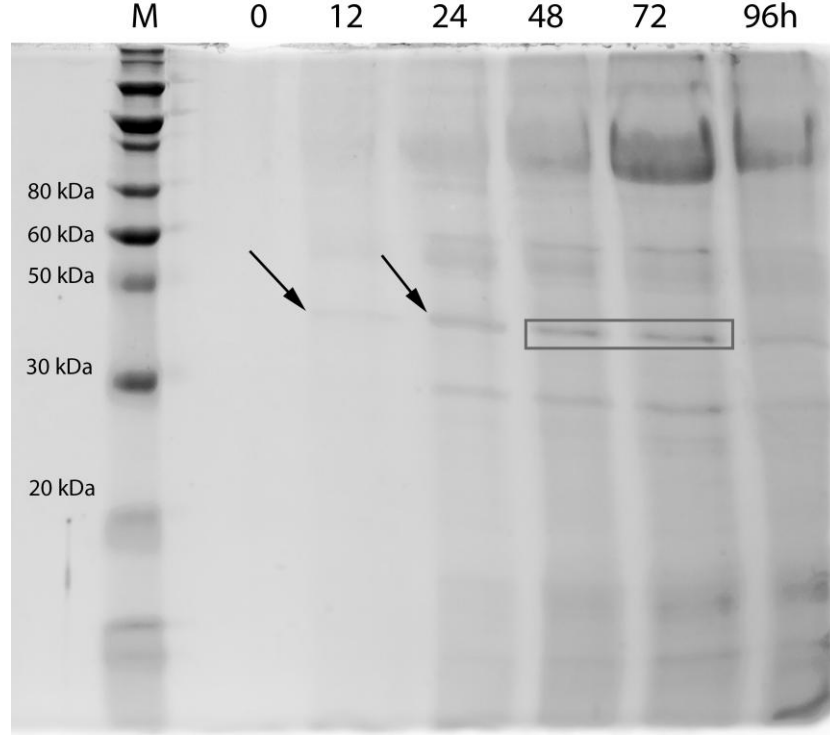
4.2.5 1.5 l Ölçekte Biyoreaktörde Rekombinant Protein Üretimi

Bölüm 4.3.4’te belirtilen koloni ile yapılan üretim sırasında yaş hücre ağırlığı sahip *Pichia pastoris* ile yapılan tipik bir biyoreaktör üretiminden (Damasceno et al., 2004, 2012) beklendiği gibi metanol teşvikinin başlangıcından itibaren 72 saatte yaklaşık 600 g/l’ye ulaşmıştır ve büyüme eğrisindeki durağan faza geçmiştir (Şekil 4.12).



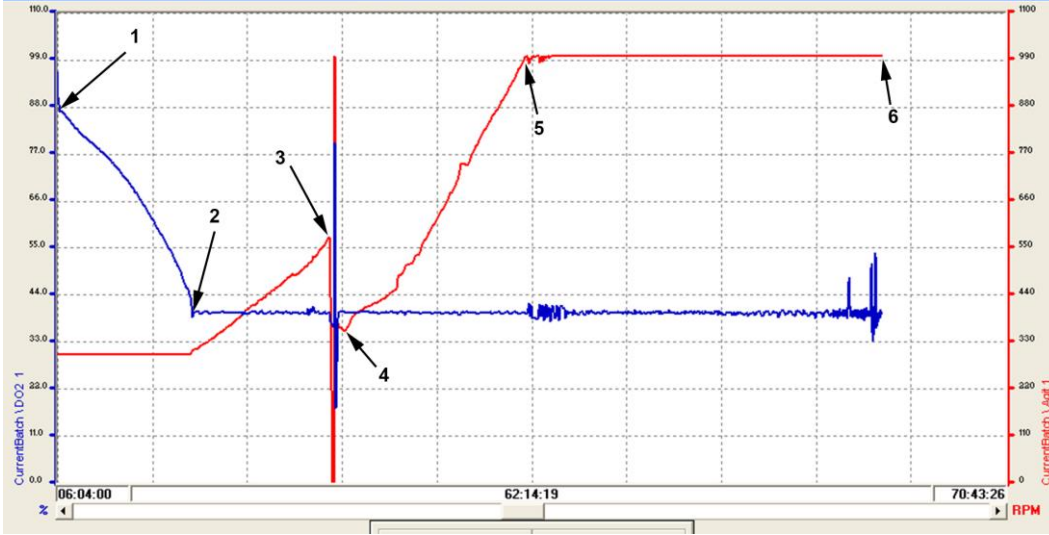
Şekil 4. 12 Metanol teşvikine karşı yaş hücre ağırlığı grafiği.

Üretim sırasında 0., 12., 24., 48., 72. ve 96. saatlerde alınan örneklerdeki protein profilleri Şekil 4.13’de gösterilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi yaklaşık 30 kDa büyüklüğündeki bir protein ilk olarak 24. saatte görülmüş ve 72. Saate kadar bantın belirginliği artmıştır. Ancak 96. saatte hücre yoğunluğunun artması ve hücre dışı proteaz aktivitesinden dolayı (Kobayashi et al., 2000; Sinha et al., 2003, 2005; Zhou and Zhang, 2002) hem 30 kDa büyüklüğündeki proteinin hem de diğer hücre dışı proteinlerin miktarında azalma saptanmıştır.



Şekil 4. 13 Seçilen bir kolonide yapılan 1,5 litre üretim süresince farklı zamanlarda alınan örneklerdeki protein içeriğinin %15'lik poliakrilamid jelde 20 V/cm gerilim altında 45 dk boyunca ayrılması ve Coomassie mavisi ile boyanması sonucu elde edilmiş jel görüntüsü. 1-6 numaralı şeritler sırası ile 0., 12., 24., 48., 72. ve 96. saatlerde alınan örnekler. Bu örneklerdeki yaş hücre ağırlıkları sırası ile 93, 120, 168, 462, 578, 545 gram yaş hücre/ litre kültür olarak belirlenmiştir.

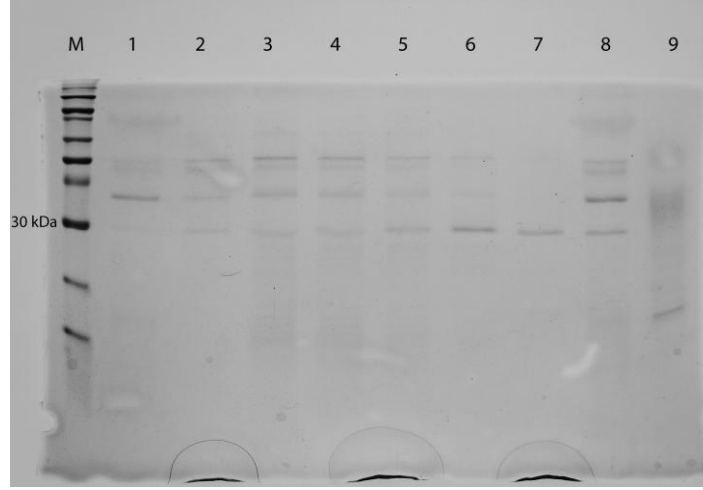
Üretim sırasında biyoreaktör kontrol ünitesinde kaydedilen işletme koşulları ile oluşturulmuş grafik Şekil 4.14'te gösterilmiştir. Grafikte belirgin olarak metanol teşvikinin başladığı zaman "4" numaralı ok ile görülebilmektedir.



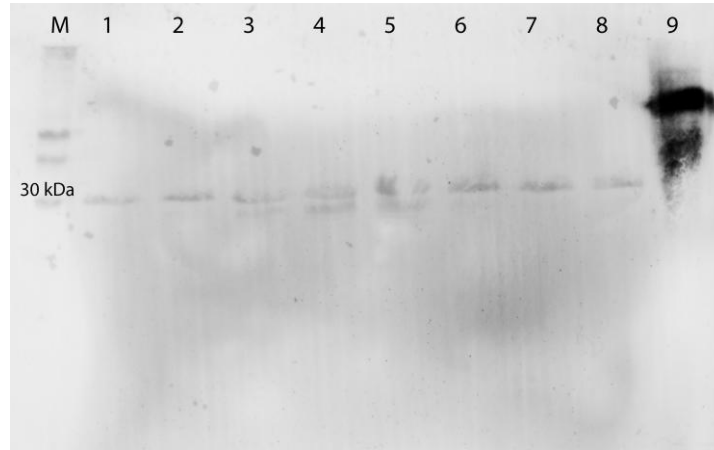
Şekil 4. 14 Biyoreaktörde üretim sırasında kaydedilen oksijen konsantrasyonu ve karıştırma hızı verileri ile elde edilen grafik. 1: biyoreaktöre aşı kültürün eklenmesi, 2: çözülmüş oksijen konsantrasyonunun işletme koşulu olan %40 seviyesine inmesi ve kaskat sisteminin devreye girerek karıştırma hızının kademeli olarak artması, 3: biyokütle üretimi fazında gliserolün bitmesine bağlı olarak oksijen talebinin hızla azalması, 4: hücrelerin adapte olması ve metanol teşvikinin başlaması, 5: karıştırma hızının en yüksek seviyeye ulaşması ve saf oksijen takviyesinin başlaması, 6: üretimin sonlandırılması.

4.3 Protein Saflaştırması

Protein saflaştırması sonucunda Şekil 4.13'te gösterilen yaklaşık 30 kDa büyüklüğündeki protein beklendiği gibi saflaştırma işleminin elüsyon basamağında elde edilmiştir. Fakat üretici talimatlarına göre yapılan saflaştırma işleminin farklı basamaklarında rekombinant protein kaybı olduğu görülmüştür (Şekil 4.15-16). Bunun önlenmesi için saflaştırmanın kolon yıkama ve elüsyon basamaklarındaki imidazol konsantrasyonu ve basamak uzunlukları değiştirilmiştir.



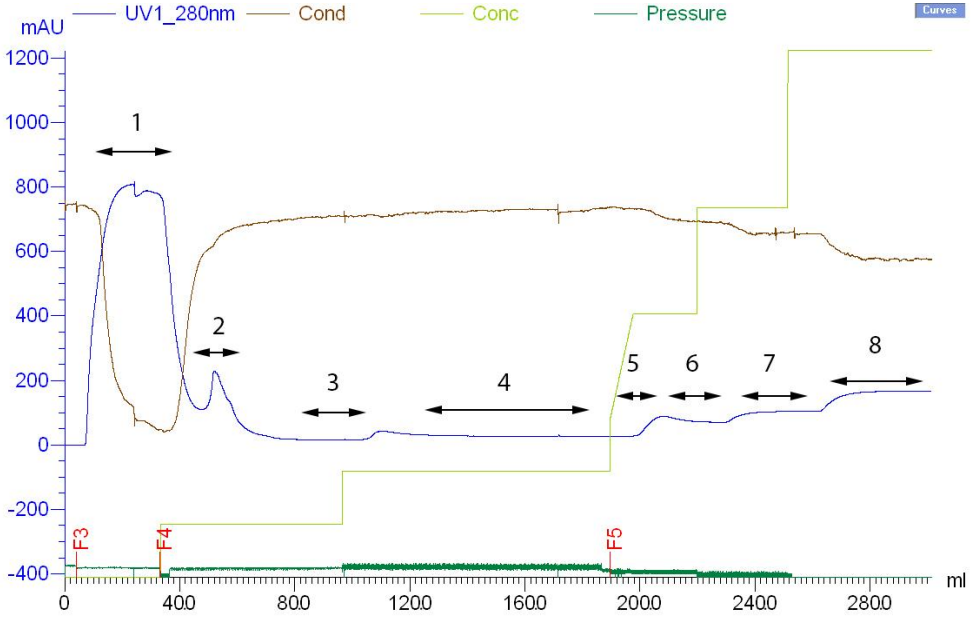
Şekil 4. 15 Protein saflaştırmanın farklı aşamalarından alınan örneklerin protein içerikleri. 1: Kolona yükleme aşamasında kolona bağlanmayan proteinler. Az miktarda rekombinant protein görülmektedir. 2-5: Yıkama basamağı ile kolondan 20 mM imidazole ile uzaklaştırılan proteinler. Rekombinant proteinin bu basamakta da bir miktar kaybedildiği görülmektedir. 6: Elüsyon basamağının ilk kısmında elde edile protein içeriği. Bu noktada rekombinant protein yüksek miktarda elde edilmesine karşın yüksek saflıkta elde edilmediği görülmektedir. 7: Elüsyonun ikinci kısmında rekombinant proteinin yüksek saflıkta elde edildiği görülmektedir. 8: Kolona yüklenen örnekteki toplam protein içeriği. 9: Western blot için pozitif kontrol olarak kullanılan, 6XHistidin ile işaretli J591 proteini.



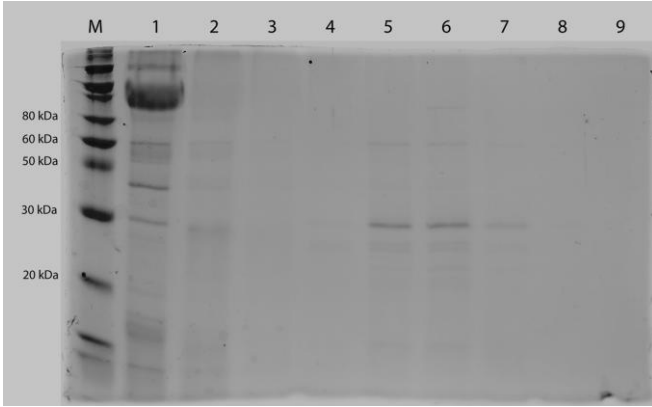
Şekil 4. 16 Şekil 4.12'de belirtilen örneklerin aynı düzende gerçekleştirilmiş Western blot çalışması. Görüldüğü gibi tüm basamaklarda rekombinant protein anti polihistidin antikoruna ile tespit edilmiş ve alkalen fosfataz enzim reaksiyonu ile boyanmıştır.

Protein saflaştırma basamakları rekombinant protein kaybını azaltmaya ve protein saflığını artırmaya yönelik olarak yeniden düzenlenmiştir. Bu amaçla daha düşük imidazol konsantrasyonu ile kolon yıkama işlemi başlatılmış ve kademeli olarak imidazol konsantrasyonu artırılarak rekombinant protein elüsyonu sırasında rekombinant olmayan protein safsızlıkları önlenmiştir. Şekil 4.17'de saflaştırma

sırasında kullanılan UNICORN programının ara yüzü gösterilmiştir. Şekil 4.18’de ise bu basamaklardan alınan örneklerdeki protein içeriklerini gösteren SDS-PAGE görüntüsü verilmiştir.



Şekil 4. 17 İmmobilize metal afinitesi kromatografisi kolon çıkışı UV absorbanz profili ve diğer parametreler. Grafik üzerinde numaralar ile gösterilen aşamalarda örnek alınmış ve SDS-PAGE ile görüntülenmiştir (Grafik: Unicorn Software).



Şekil 4. 18 Düzenleme sonrası yapılan protein saflaştırma işleminin farklı basamaklarındaki protein içerikleri. 1: Kolona yükleme sonrasında kolona bağlanmayan protein içeriği. Bir miktar rekombinant protein kaybının gerçekleştiği görülmektedir. 2-4: 50 mM imidazole ile yıkanan kolon çıkışındaki protein içerikleri. Rekombinant protein kaybı büyük oranda önlenmiştir. 5-7: Ortalama 300 mM imidazol ile elüsyonu yapılan rekombinant protein. 8-9: 500 mM İmidazol ile devam eden elüsyon sonrasında herhangi bir proteinn bandı görülmemiştir. Bu uygulamada safsızlıkların büyük oranda azaltıldığı görülmektedir.

4.4 Protein Analiz Sonuçları ve Altın Nanopartiküllerle Konjugasyonun Etkisi

Rekombinant proteinin SDS-PAGE ve Western blot ile tespiti (bkz. Bölüm 4.3) proteinin üretildiğini göstermiştir. Bu aşamadan sonra yapılan ELISA çalışmaları protein konsantrasyonunun ve fonksiyonelliğinin belirlenmesi amacı ile yapılmıştır. 6xHistidin hedefli ELISA çalışması ile rekombinant protein konsantrasyonunun belirlenmesinde standart protein olarak rekombinant J591 antikor fragmenti kullanılmıştır. Bu proteinin stok çözeltisinin konsantrasyonu 3,06 mg/ml'dir. Standart olarak kullanılan kuyucuklarda seri seyreltmeler ile elde edilen protein konsantrasyonları ile absorbansa karşı elde edilen doğru orantıdan faydalanılmıştır. J591 antikor fragmentinin 1/800 seyreltmesindeki absorbansına en yakın olan, rekombinant antikor fragmentinin 1/10 seyreltmesi arasındaki doğru orantıdan rekombinant anti kardiyak troponin I antikor fragmentinin (Şekil 4.16'daki jel görüntüsünde 6 numaralı şeritte bant profili görülen fraksiyon) 1/10 seyreltmedeki konsantrasyonunun 8 mg/l olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.19). Buna göre protein saflaştırması sonucu elde edilen 100 ml'lik fraksiyonun konsantrasyonu:

$$8 \times 10 = 80 \text{ mg/l'dir}$$

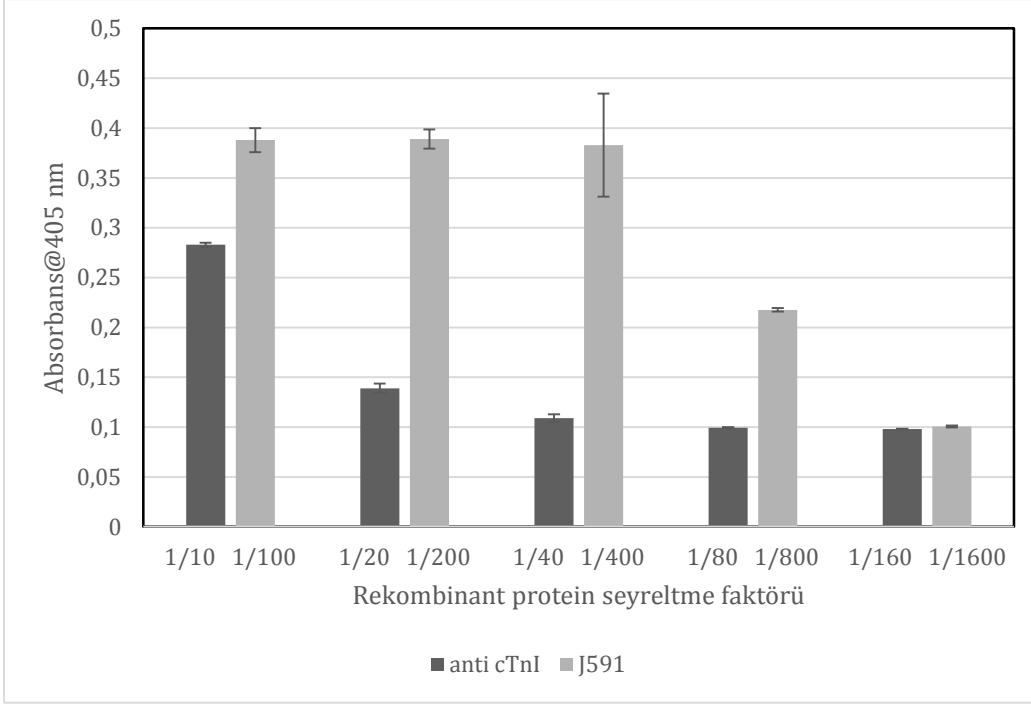
$$\text{Toplam rekombinant protein miktarı: } 80 \text{ mg/l} \times 0,11 = 8 \text{ mg}$$

Bradford yöntemi ile elde edilen sonuçlara göre 5. ve 6. fraksiyonlardaki protein konsantrasyonu eşit, 7. fraksiyondaki toplam protein konsantrasyonu bunlardan %70 daha düşüktür. Bu oranlar ve fraksiyonların hacimleri değerlendirildiğinde saflaştırma işlemi sonucunda elde edilen toplam rekombinant protein miktarı:

$$8 \text{ mg (5. fraksiyon)} + 8 \text{ mg (6. fraksiyon)} + (8 \times 0,3) \text{ mg (7. fraksiyon)} = 18,4 \text{ mg}$$

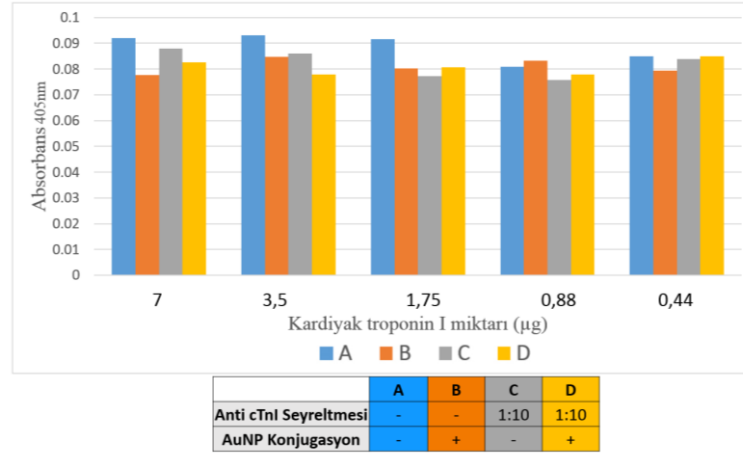
Toplam 1,5 litrelik üretim hacmi göz önünde bulundurulduğunda:

$$18,4 / 1,5 = \underline{12,3 \text{ mg/l}} \text{ rekombinant protein üretimi yapıldığı tespit edilmiştir.}$$



Şekil 4. 19 6XHistidin hedefli ELISA çalışmasında rekombinant antikor fragmenti ile daha önce üretilmiş J591 antikor fragmentinin protein konsantrasyonu (405 nm’de absorbans) bakımından karşılaştırılması.

Rekombinant antikor fragmentinin troponin I proteinini tespit etme yeteneği yine ELISA yöntemi ile belirlenmiştir. Aynı ELISA pleytinde altın nanopartiküllerle konjuge edilmiş rekombinant antikor fragmenti ile paralel bir çalışma yapılmıştır (Bölüm 3.2.3). Bu sayede bu işlemin rekombinant antikorun fonksiyonelliğine etkisi olup olmadığı belirlenmiştir. ELISA sonuçları incelendiğinde troponin I proteininin tespit edilebildiği görülmektedir. Konjuge ve konjuge olmayan rekombinant antikor fragmentlerinin troponin I proteinini tespit etme yetenekleri arasında belirgin bir fark gözlemlenmemiştir. Şekil 4.20’de karşılaştırmalı sonuçlar görsel olarak sunulmuştur. Elde edilen bilgiler, bu çalışmanın nihai amacı olan hızlı tanı test kitinde üretilen antikor fragmentinin kullanılabilirliği açısından önemli bilgi vermiştir.



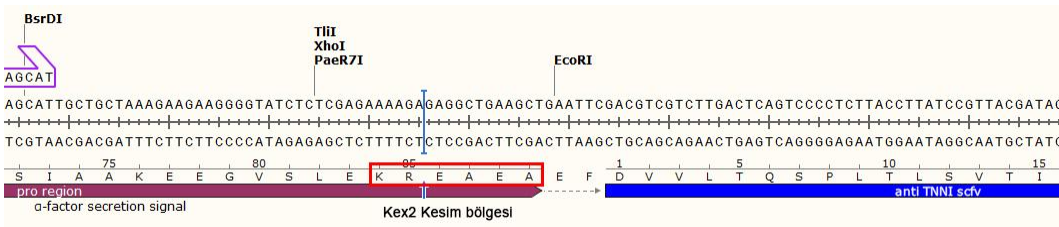
Şekil 4. 20 Rekombinant antikor fragmentinin kardiyak Troponin I tespit yeteneği ve altın nanopartiküllerle konjugasyonun etkisi. A: Seyreltilmemiş, konjuge edilmemiş antikor fragmenti. B: Seyreltilmemiş, altın nanopartikül ile konjuge edilmiş antikor fragmenti, C: 1/10 seyreltilmiş, konjuge edilmemiş antikor fragmenti, D: 1/10 seyreltilmiş, altın nanopartikül ile konjuge antikor fragmenti. 1/500-1/8000: Kardiyak troponin I (35mg/ml) protein seyreltme faktörü.

4.5 Genel Değerlendirme

Biyoteknoloji alanında rekombinant monoklonal antikor üretimi gün geçtikçe önem kazanmaktadır (Elena et al., 2014). Bu üretimlerde monoklonal antikorların gerek bütün halde gerekse çeşitli varyasyonlardaki fragmentlerinin mikroorganizmalarda yüksek miktarlarda üretilmesi sağlanmaktadır (Parker et al., 2013). Ayrıca gen sentezi teknolojisinin giderek daha ulaşılabilir olması belirli amaçlarla hali hazırda kullanılan proteinlerin kolayca modifiye edilebilmesi (kodon optimizasyonu veya aminoasit sekans modifikasyonu) veya diğer proteinlerle aynı çerçevede füzyon proteini olarak üretilmesini sağlamaktadır (Elena et al., 2014).

Pichia pastoris kullanılarak yapılan üretimlerde, amino asit dizisinde KR bölgesinin ardından AEAE (Alanin-Glutamin-Alanin-Glutamin) tekrarlarının yer alması Kex2 proteazının rekombinant proteini bu bölgelerde kesmesini gerçekleştirmektedir (Şekil 4.19). Bu çalışmada kullanılan plazmitlerde alfa salınım faktörü ve hemen sonrasında yer alan Kex2 tanıma bölgesi rekombinant olarak ifade edilen proteinin hücre dışına etkin salınımını sağlamaktadır (Laroche et al., 1994). Alfa sekresyon faktörü ve rekombinant protein arasındaki Kex2

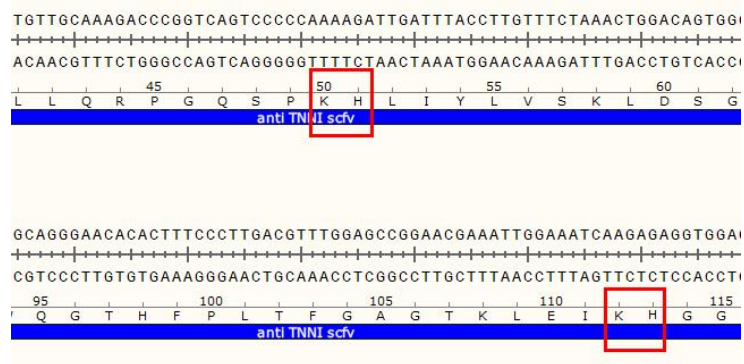
tanıma bölgesi, hücre içinde alfa faktörü ile füzyon halinde üretilen rekombinant proteinin hücre dışına taşınması sırasında, alfa faktörünün etkin bir şekilde kesilmesini gerçekleştirir (Contreras et al., 1991). Buna karşın rekombinant protein aminoasit dizisi içerisinde bu tanıma bölgesinin yer alması proteinin istenmeyen şekilde kesilmesine ve fonksiyonelliğinin kaybedilmesine sebep olabilmektedir. Çalışmamızda, ilk etapta tasarlanan ve antikorun hipervaryabl (aşırı değişken) bölgelerini kodlayan bu aminoasit dizisini içeren sekansta bulunan KR amino asitlerinin değişiklik yapılmasından, antikor afinitesi ve özgüllüğünü korumak amacı ile kaçınılmıştır. Ancak ilk protein ifadesi girişimlerinde pozitif sonuç alınamamıştır. Aminoasit dizisinin ileri şekilde incelenmesi için *Pichia pastoris*'te rekombinant protein üretimi alanında pek çok çalışması bulunan ve *Pichia pastoris* KM71 suşunu geliştiren Prof. Dr. Knut Madden ile iletişime geçilmiştir. İnceleme sonucunda aminoasit dizisinde 50-51 ve 112-113 (Şekil 4.21) konumlarında bulunan KR (lisin-arginin) ikililerinin Kex2 proteazı tarafından tanınıp proteinlerin kesilmesine sebep olabileceği vurgulanmış ve bu bölgelerin değiştirilmesi önerilmiştir. Yapılan araştırma sonucunda protein yapısını en az etkileyecek şekilde KR amino asitlerinin KH (Lisin-Histidin) olarak değiştirilmesine karar verilmiştir (Şekil 4.22-23). Bu noktada Arginin aminoasiti ile aynı aminoasit grubunda yer alan histidin amino asidi seçilerek bu değişikliğin etkisinin en aza indirilmiştir. Bu değişikliğin antikor fragmentinde konformasyonel değişikliğe sebep olup olmayacağı Phyre² servisi (Protein Homology/analogY Recognition Engine V 2.0) kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu servis ile elde edilen 3 boyutlu molekül modellerinin karşılaştırması Şekil 4.24'de gösterilmiştir.



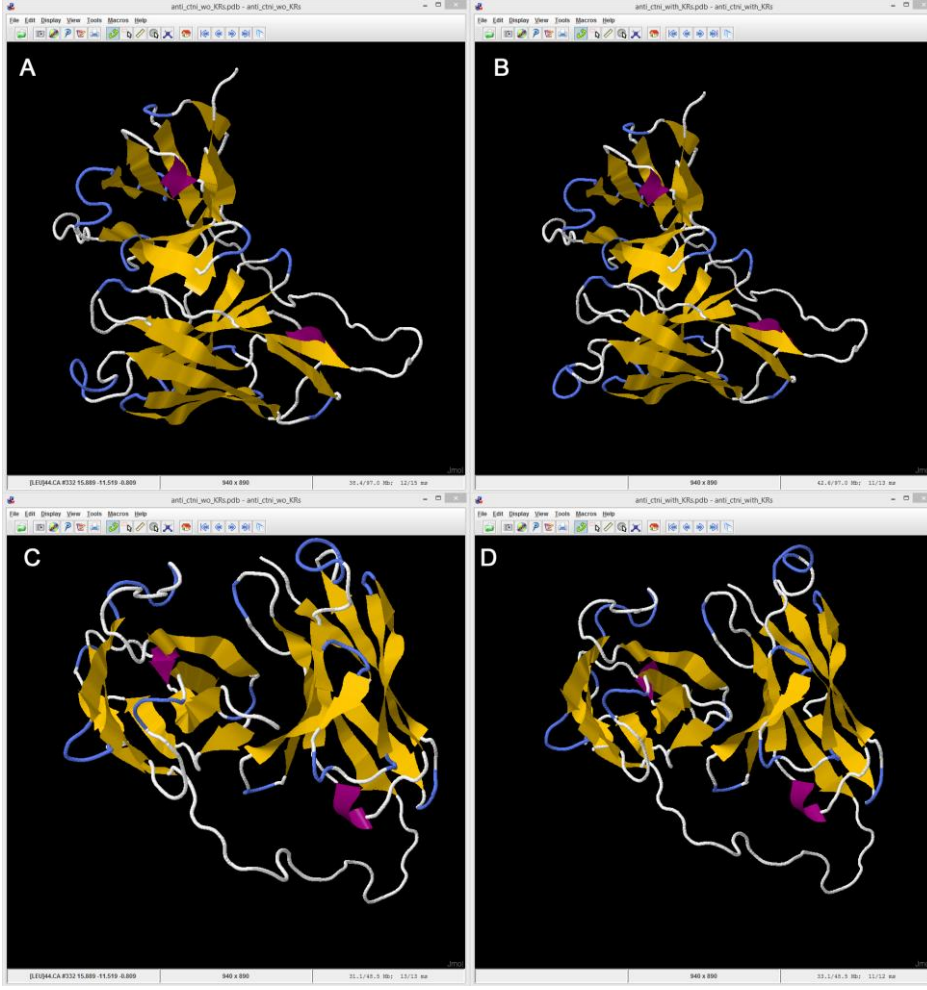
Şekil 4. 21 pPICZαA, pPIC9 ve pPIC9k plazmitlerinde yer alan Kex2 kesim bölgesi kırmızı dikdörtgen ile belirtilmiştir (Şekil: SnapGene Viewer 2.8.3).



Şekil 4. 22 Antikor fragmenti DNA ve amino asit dizisinden bir kesit. Kex2 tanıma bölgeleri kırmızı dikdörtgen ile gösterilmiştir (Şekil: SnapGene Viewer 2.8.3).



Şekil 4. 23 Antikor fragmenti DNA ve amino asit dizisinden bir kesit. Değiştirilen Kex2 tanıma bölgelerinin güncellenmiş hali kırmızı dikdörtgen ile gösterilmiştir (Şekil: SnapGene Viewer 2.8.3).



Şekil 4. 24 Anti cTnI antikor fragmentinin hafif zincirindeki iki adet KR bölgesinin KH ile değiştirilmesi sonrasında (A, C) ve değiştirilmeden önceki (B, D) aminoasit dizileri ile Phyre² servisi kullanılarak elde edilmiş moleküler modelleri. Sağ ve sol taraftaki molekül modelleri görsel olarak karşılaştırıldığında aralarında belirgin bir fark görülememektedir.

Phyre² servisi ile elde edilen modeller protein katlanması ile ilgili detaylı bir bilgi verirken aminoasit dizisi modifiye edilen antikor fragmentinin antijen afinitesinde ve özgüllüğünde bir değişiklik olup olmayacağı ile ilgili kesin bir bilgi vermemektedir.

Rekombinant protein üretiminde diğer bir önemli faktör olan protein ifadesinin miktarını etkileyen faktörlerden biri de plazmit seçimidir. Çalışılan proteinin büyüklüğüne ve aminoasit içeriği ve dizisi gibi özelliklerine bağlı olarak farklı plazmitler farklı seviyelerde protein ifadesi sağlamaktadır. Çalışmamızda pPIC9 serisi plazmitlerin kullanımı ile daha yüksek başarı elde edilmiştir. Bu plazmit ile histidin sentezini sağlayan geni (HIS4) susturulmuş (his4) *Pichia pastoris* suşları (GS115, KM71) kullanılabilir. Çalışmamızda kullandığımız

GS115 suşuna pPIC9k plazmiti hazırladığımız konstrüktü aktardığımızda transformasyon başına elde ettiğimiz koloni sayısı çok daha yüksek olmuştur (pPIC9k için 1 µg konstrükt başına ~600 koloni, pPICZαA için 1 µg konstrükt başına ~40 koloni). Daha fazla sayıda koloni elde edilmesi bir yandan çoklu gen entegrasyonu olasılığını artırırken taranması gereken transformant sayısı bakımından çok fazla iş yükü getirmektedir. Bu noktada “Yeastern” yöntemi ile çok sayıda koloni taranabilmiştir. Bu yöntemin avantajlarından biri de hemen transformasyon sonrasında doğrudan protein ifadesi sürecine geçilebilmesi ve kültür süpernatantını ayrılması, SDS-PAGE uygulanması gibi basamakların atlanarak doğrudan spesifik sonuç veren Western çalışmasının yapılmasına imkân vermesidir.

5 SONUÇ ve ÖNERİLER

Ulaşılan literatüre göre *Pichia pastoris* konukçu organizması kullanılarak rekombinant anti troponin I antikor fragmentinin ScFv formunda üretimi ve saflaştırılması ilk defa 1,5 l ölçekte 12,3 mg/l düzeyinde üretimi gerçekleştirilmiştir. Troponin I proteini kullanılarak yapılan çalışmada pozitif sonuç alınmıştır. Altın nanopartikül ile konjuge ve konjuge olmayan rekombinant antikor fragmentlerinin troponin I proteinini tespit etme yetenekleri arasında belirgin bir fark tespit edilememiştir. Bu sonuç altın nanopartiküllerin antikor fragmentinin fonksiyonelliği üzerinde önemli bir etkisinin olmadığını göstermektedir.

Troponin I proteinini tespit yeteneğini artırmak için bu çalışmada elde edilen bulgular göz önünde bulundurularak protein konsantrasyonunun artırılması yönünde düzenlemeler ve yeni denemeler ileriki süreçte yapılması planlanan çalışmalar arasındadır. Teşhis kitinde kullanılabilirliğini ortaya koymak için daha yüksek konsantrasyonda protein üretimine yönelik, besin ortamı kompozisyonunun değiştirilmesi, metanol konsantrasyonunun proses sırasında hücre yoğunluğuna oranla değiştirilmesi, karışık besleme seçeneklerinin denenmesi gibi biyoproses optimizasyonu çalışmalarının yapılması önerilmektedir. Bu bağlamda *Pichia pastoris*'e transfer edilen gen kopya sayısının in vitro veya in vivo yöntemlerle artırılması öneriler arasındadır. Ayrıca en yüksek seviyede rekombinant protein ifadesi yapan koloninin tespit edilmesi için protein ifadesi taraması aşaması

üzerinde daha fazla çalışılabilir. Pek çok endüstriyel enzim ve farmasötik proteinin başarı ile üretilmesi *Pichia pastoris*'i en güçlü ve uygun protein üretim sistemlerinden biri olduğunu göstermiştir. Farklı vektör sistemleri ve modifiye suşlar gibi önemli konularda gelişkin olmasına rağmen bu alanda hâlâ yapılabilecek optimizasyonlar bulunmaktadır. Endüstriyel ölçekte üretim odaklı olarak metanole alternatif, toksik olmayan, daha ekonomik teşvik substratlarının geliştirilmesi bu alan için iyi bir örnektir (Delic et al., 2013; Prielhofer et al., 2013; Stadlmayr et al., 2010).

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aghebati Maleki, L., Majidi, J., Baradaran, B., Abdolalizadeh, J., Kazemi, T., Aghebati Maleki, A. and Sineh Sepehr, K.**, 2013, Large Scale Generation and Characterization of Anti-Human CD34 Monoclonal Antibody in Ascetic Fluid of Balb/c Mice., *Advanced pharmaceutical bulletin*, 3:1, 211–6pp.
- Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H. and Schwab, H.**, 2014, Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98:12, 5301–5317pp.
- Ahn, J., Hong, J., Lee, H., Park, M., Lee, E., Kim, C., Choi, E., Jung, J. and Lee, H.**, 2007, Translation elongation factor 1-alpha gene from *Pichia pastoris*: molecular cloning, sequence, and use of its promoter, *Applied microbiology and biotechnology*, 74:3, 601–8pp.
- Ahn, J., Hong, J., Park, M., Lee, H., Lee, E., Kim, C., Lee, J., Choi, E., Jung, J. and Lee, H.**, 2009, Phosphate-responsive promoter of a *Pichia pastoris* sodium phosphate symporter, *Applied and environmental microbiology*, 75:11, 3528–34pp.
- Alpert, J. S., Thygesen, K., Antman, E. and Bassand, J. P.**, 2000, Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction, *Journal of the American College of Cardiology*, 36:3, 959–69pp.
- Better, M., Chang, C. P., Robinson, R. R. and Horwitz, A. H.**, 1988, *Escherichia coli* secretion of an active chimeric antibody fragment, *Science (New York, N.Y.)*, 240:4855, 1041–3pp.
- Bird, R. E., Hardman, K. D., Jacobson, J. W., Johnson, S., Kaufman, B. M., Lee, S. M., Lee, T., Pope, S. H., Riordan, G. S. and Whitlow, M.**, 1988, Single-chain antigen-binding proteins, *Science (New York, N.Y.)*, 242:4877, 423–6pp.
- Boisselier, E. and Astruc, D.**, 2009, Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity, *Chemical Society*

Reviews, 38:6, 1759pp.

Bonow, R. O., Carabello, B. a, Kanu, C., de Leon, A. C., Faxon, D. P., Freed, M. D., Gaasch, W. H., Lytle, B. W., Nishimura, R. a, O’Gara, P. T., O’Rourke, R. a, Otto, C. M., Shah, P. M., Shanewise, J. S., Smith, S. C., Jacobs, A. K., Adams, C. D., Anderson, J. L., Antman, E. M., Fuster, V., Halperin, J. L., Hiratzka, L. F., Hunt, S. a, Lytle, B. W., Nishimura, R., Page, R. L. and Riegel, B., 2006, ACC/AHA 2006 guidelines for the management of patients with valvular heart disease, *Circulation*, 114:5, e84–231pp.

Brige, A., Meyvis, Y., Sergi, M. and Walcarius, B., 2012, May 3 Method for the production of immunoglobulin single variable domains, Patent no: WO 2012056000 A1.

Cai, W., Gao, T., Hong, H. and Sun, J., 2008, Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology., *Nanotechnology, science and applications*, 1, 17–32pp.

Capone, S., Lejla, Ć., Bonifert, G., Murth, P. and Maresch, D., 2015, Combining Protein and Strain Engineering for the Production of Glyco-Engineered Horseradish Peroxidase C1A in *Pichia pastoris*, *Int. J. Mol. Sci.*, 16, 23127–23142pp.

Cereghino, G. P. L., Cereghino, J. L., Ilgen, C. and Cregg, J. M., 2002, Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*, *Current opinion in biotechnology*, 13:4, 329–32pp.

Chames, P., Van Regenmortel, M., Weiss, E. and Baty, D., 2009, Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future, *British journal of pharmacology*, 157:2, 220–33pp.

Chan, A. C. and Carter, P. J., 2010, Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation., *Nature reviews. Immunology*, 10:5, 301–16pp.

Chen, C., Snedecor, B., Nishihara, J. C., Joly, J. C., McFarland, N., Andersen, D. C., Battersby, J. E. and Champion, K. M., 2004, High-level accumulation of a recombinant antibody fragment in the periplasm of *Escherichia coli* requires a triple-mutant (degP prc spr) host strain,

Biotechnology and bioengineering, 85:5, 463–74pp.

Chusainow, J., Yang, Y. S., Yeo, J. H. M., Toh, P. C., Asvadi, P., Wong, N. S. C. and Yap, M. G. S., 2009, A study of monoclonal antibody-producing CHO cell lines: what makes a stable high producer?, *Biotechnology and bioengineering*, 102:4, 1182–96pp.

Ciofalo, V., Barton, N., Kreps, J., Coats, I. and Shanahan, D., 2006, Safety evaluation of a lipase enzyme preparation, expressed in *Pichia pastoris*, intended for use in the degumming of edible vegetable oil, *Regulatory toxicology and pharmacology* : RTP, 45:1, 1–8pp.

Contreras, R., Carrez, D., Kinghorn, J. R., van den Hondel, C. A. and Fiers, W., 1991, Efficient KEX2-like processing of a glucoamylase-interleukin-6 fusion protein by *Aspergillus nidulans* and secretion of mature interleukin-6, *Bio/technology* (Nature Publishing Company), 9:4, 378–81pp.

Cregg, J. M., Barringer, K. J., Hessler, a Y. and Madden, K. R., 1985, *Pichia pastoris* as a host system for transformations, *Molecular and cellular biology*, 5:12, 3376–85pp.

Cregg, J. M., Cereghino, J. L., Shi, J. and Higgins, D. R., 2000, Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*, *Molecular biotechnology*, 16:1, 23–52pp.

Cregg, J. M., Madden, K. R., Barringer, K. J., Thill, G. P. and Stillman, C. A., 1989, Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*, *Molecular and cellular biology*, 9:3, 1316–23pp.

Cregg, J. M. and Tolstorukov, I., 2012, US8222386 B2 - *P. pastoris* ADH promoter and use thereof to direct expression of proteins, Patent no: US Patent US8222386 B2.

Daly, R. and Hearn, M. T. W., 2005, Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: A useful experimental tool in protein engineering and production, *Journal of Molecular Recognition*, 18:2, 119–138pp.

Damasceno, L. M., Anderson, K. a., Ritter, G., Cregg, J. M., Old, L. J. and Batt, C. a., 2007, Cooverexpression of chaperones for enhanced secretion of a single-chain antibody fragment in *Pichia pastoris*, *Applied Microbiology*

and Biotechnology, 74:2, 381–389pp.

Damasceno, L. M., Huang, C. and Batt, C. A., 2012, Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 93, 31–39pp.

Damasceno, L. M., Lee, F., Ritter, G., Old, L. and Batt, C., 2009, High-level expression of a phage display-derived scFv in *Pichia pastoris*., *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 562, 225–36pp.

Damasceno, L. M., Pla, I., Chang, H. J., Cohen, L., Ritter, G., Old, L. J. and Batt, C. a., 2004, An optimized fermentation process for high-level production of a single-chain Fv antibody fragment in *Pichia pastoris*, *Protein Expression and Purification*, 37:1, 18–26pp.

de Almeida, J. R. M., de Moraes, L. M. P. and Torres, F. A. G., 2005, Molecular characterization of the 3-phosphoglycerate kinase gene (PGK1) from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *Yeast* (Chichester, England), 22:9, 725–37pp.

De Jesus, M. and Wurm, F. M., 2011, Manufacturing recombinant proteins in kg-ton quantities using animal cells in bioreactors, *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceuticals : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 78:2, 184–8pp.

de Marco, A., 2015, Recombinant antibody production evolves into multiple options aimed at yielding reagents suitable for application-specific needs, *Microbial Cell Factories*, 14:1, 125pp.

De Schutter, K., Lin, Y.-C., Tiels, P., Van Hecke, A., Glinka, S., Weber-Lehmann, J., Rouz , P., Van de Peer, Y. and Callewaert, N., 2009, Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*, *Nature biotechnology*, 27:6, 561–566pp.

Delic, M., Valli, M., Graf, A. B., Pfeffer, M., Mattanovich, D. and Gasser, B., 2013, The secretory pathway: exploring yeast diversity, *FEMS microbiology reviews*, 37:6, 872–914pp.

Devaux, C., Moreau, E., Goyffon, M., Rochat, H. and Billiald, P., 2001, Construction and functional evaluation of a single-chain antibody fragment

that neutralizes toxin AahI from the venom of the scorpion *Androctonus australis hector*, *European journal of biochemistry / FEBS*, 268:3, 694–702pp.

Dolci, A. and Panteghini, M., 2006, The exciting story of cardiac biomarkers: from retrospective detection to gold diagnostic standard for acute myocardial infarction and more, *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 369:2, 179–87pp.

Ecker, D. M., Jones, S. D. and Levine, H. L., 2015, The therapeutic monoclonal antibody market, *mAbs*, 7:1, 9–14pp.

Eiden-Plach, A., Zagorc, T., Heintel, T., Carius, Y., Breinig, F. and Schmitt, M. J., 2004, Viral preprotoxin signal sequence allows efficient secretion of green fluorescent protein by *Candida glabrata*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Schizosaccharomyces pombe*, *Applied and environmental microbiology*, 70:2, 961–6pp.

Eldin, P., Pauza, M. E., Hieda, Y., Lin, G., Murtaugh, M. P., Pentel, P. R. and Pennell, C. A., 1997, High-level secretion of two antibody single chain Fv fragments by *Pichia pastoris*, *Journal of immunological methods*, 201:1, 67–75pp.

Elena, C., Ravasi, P., Castelli, M. E., Peirú, S. and Menzella, H. G., 2014, Expression of codon optimized genes in microbial systems: Current industrial applications and perspectives, *Frontiers in Microbiology*, 5:FEB, 1–8pp.

Ellis, S. B., Brust, P. F., Koutz, P. J., Waters, A. F., Harpold, M. M. and Gingeras, T. R., 1985, Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*, *Molecular and cellular biology*, 5:5, 1111–21pp.

Ezzatifar, F., Majidi, J., Baradaran, B., Maleki, L. A. and Abdolalizadeh, J., 2015, Large Scale Generation and Characterization of Anti-Human IgA Monoclonal Antibody in Ascitic Fluid of Balb / c Mice, , 5:1, 97–102pp.

Faber, K. N., Harder, W., Ab, G. and Veenhuis, M., 1995, Review: methylotrophic yeasts as factories for the production of foreign proteins, *Yeast (Chichester, England)*, 11:14, 1331–44pp.

Fan, K., Jiang, J., Wang, Z., Yin, W., Sun, Y. and Li, H., 2015, Expression and

purification of the recombinant murine REG3 α protein in *Pichia pastoris* and characterization of its antimicrobial and antitumour efficacy, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29, 4, 740-745pp.

FitzGerald, K., Holliger, P. and Winter, G., 1997, Improved tumour targeting by disulphide stabilized diabodies expressed in *Pichia pastoris*., *Protein engineering*, 10:10, 1221–1225pp.

Gasser, B. and Mattanovich, D., 2007, Antibody production with yeasts and filamentous fungi: On the road to large scale?, *Biotechnology Letters*, 29:2, 201–212pp.

Gellissen, G., 2000, Heterologous protein production in methylotrophic yeasts, *Applied microbiology and biotechnology*, 54:6, 741–50pp.

Ghosh, S. and Ansar, W., 2013, Monoclonal Antibodies: A Tool in Clinical Research, *Indian Journal of Clinical Medicine*, 9pp.

Gleeson, M. A. and Sudbery, P. E., 1988, The methylotrophic yeasts, *Yeast*, 4:1, 1–15pp.

Guerfal, M., Ryckaert, S., Jacobs, P. P., Ameloot, P., Van Craenenbroeck, K., Derycke, R. and Callewaert, N., 2010, The HAC1 gene from *Pichia pastoris*: characterization and effect of its overexpression on the production of secreted, surface displayed and membrane proteins, *Microbial cell factories*, 9, 49pp.

Haider, K. H. and Stimson, W. H., 1995, Production And Characterisation Of Anti-Cardiac Troponin-I Monoclonal Antibodies, *Disease Markers*, 12:1994, 187–197pp.

Hallermayer, K., Katus, H. and Kaya, Z., 2007, August 2 Anti-troponin antibodies and cardiovascular risk, Patent No: WO2007085411 A1.

Hasslacher, M., Schall, M., Hayn, M., Bona, R., Rumbold, K., Lückl, J., Griengl, H., Kohlwein, S. D. and Schwab, H., 1997, High-level intracellular expression of hydroxynitrile lyase from the tropical rubber tree *Hevea brasiliensis* in microbial hosts, *Protein expression and purification*, 11:1, 61–71pp.

Higgins, D. R. and Cregg, J. M., 1998, Introduction to *Pichia pastoris*, *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 103, 1–15pp.

- Hirsch, L. R., Jackson, J. B., Lee, A., Halas, N. J. and West, J. L.**, 2003, A whole blood immunoassay using gold nanoshells, *Analytical chemistry*, 75:10, 2377–81pp.
- Houard, S., Heinderyckx, M. and Bollen, A.**, 2002, Engineering of non-conventional yeasts for efficient synthesis of macromolecules: the methylotrophic genera., *Biochimie*, 84:11, 1089–93pp.
- Huang, X., Jain, P. K., El-Sayed, I. H. and El-Sayed, M. A.**, 2007, Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy., *Nanomedicine (London, England)*, 2:5, 681–93pp.
- Inbar, D., Hochman, J. and Givol, D.**, 1972, Localization of antibody-combining sites within the variable portions of heavy and light chains., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69:9, 2659–2662pp.
- Invitrogen**, 2010, Pichia Expression Kit, Integration The Vlsi Journal, :25.
- Jefferis, R.**, 2005, Glycosylation of natural and recombinant antibody molecules., *Advances in experimental medicine and biology*, 564, 143–8pp.
- Jiang, Y., Li, F., Zha, D., Potgieter, T. I., Mitchell, T., Moore, R., Cukan, M., Houston-Cummings, N. R., Nylén, A., Drummond, J. E., McKelvey, T. W., D’Anjou, M., Stadheim, T. a., Sethuraman, N. and Li, H.**, 2011, Purification process development of a recombinant monoclonal antibody expressed in glycoengineered *Pichia pastoris*, *Protein Expression and Purification*, 76:1, 7–14pp.
- Jones, P. T., Dear, P. H., Foote, J., Neuberger, M. S. and Winter, G.**, 1986, Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse, *Nature*, 321:6069, 522–5pp.
- Julius, D., Brake, A., Blair, L., Kunisawa, R. and Thorner, J.**, 1984, Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro-alpha-factor, *Cell*, 37:3, 1075–89pp.
- Kane, J. F.**, 1995, Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*, *Current opinion in biotechnology*, 6:5, 494–500pp.

- Kim, J. Y., Kim, Y.-G. and Lee, G. M.**, 2012, CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential., *Applied microbiology and biotechnology*, 93:3, 917–30pp.
- Kjeldsen, T., Hach, M., Balschmidt, P., Havelund, S., Pettersson, A. F. and Markussen, J.**, 1998, Prepro-leaders lacking N-linked glycosylation for secretory expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Protein expression and purification*, 14:3, 309–16pp.
- Kobayashi, K., Kuwae, S., Ohya, T., Ohda, T., Ohyama, M., Ohi, H., Tomomitsu, K. and Ohmura, T.**, 2000, High-level expression of recombinant human serum albumin from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* with minimal protease production and activation., *Journal of bioscience and bioengineering*, 89:1, 55–61pp.
- KÖHLER, G. and MILSTEIN, C.**, 1975, Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature*, 256:5517, 495–497pp.
- Korff, S.**, 2006, Differential diagnosis of elevated troponins, *Heart*, 92:7, 987–993pp.
- Kupari, M., Eriksson, S., Turto, H., Lommi, J. and Pettersson, K.**, 2005, Leakage of cardiac troponin I in aortic valve stenosis, *Journal of internal medicine*, 258:3, 231–7pp.
- Kurtzman, C. P.**, 2009, Biotechnological strains of *Komagataella* (*Pichia*) *pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36:11, 1435–1438pp.
- Ladenson, J. H.**, 2007, A personal history of markers of myocyte injury [myocardial infarction]., *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 381:1, 3–8pp.
- Laroche, Y., Storme, V., De Meutter, J., Messens, J. and Lauwereys, M.**, 1994, High-level secretion and very efficient isotopic labeling of tick anticoagulant peptide (TAP) expressed in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, *Bio/technology* (Nature Publishing Company), 12:11, 1119–24pp.
- Lattenmayer, C., Trummer, E., Schriebl, K., Vorauer-Uhl, K., Mueller, D., Katinger, H. and Kunert, R.**, 2007, Characterisation of recombinant CHO

cell lines by investigation of protein productivities and genetic parameters.,
Journal of biotechnology, 128:4, 716–25pp.

- Leenaars, M. and Hendriksen, C. F. M.**, 2005, General Introduction : Protocols for Antibody Production, ILAR Journal, 46:3, 269-279pp.
- Lewandrowski, K., Chen, A. and Januzzi, J.**, 2002, Cardiac markers for myocardial infarction. A brief review, American journal of clinical pathology, 118 Suppl, S93–9pp.
- Li, F., Vijayasankaran, N., Shen, A. (Yijuan), Kiss, R. and Amanullah, A.**, 2010, Cell culture processes for monoclonal antibody production, mAbs, 2:5, 466–477pp.
- Li, H., Sethuraman, N., Stadheim, T. a, Zha, D., Prinz, B., Ballew, N., Bobrowicz, P., Choi, B.-K., Cook, W. J., Cukan, M., Houston-Cummings, N. R., Davidson, R., Gong, B., Hamilton, S. R., Hoopes, J. P., Jiang, Y., Kim, N., Mansfield, R., Nett, J. H., Rios, S., Strawbridge, R., Wildt, S. and Gerngross, T. U.**, 2006, Optimization of humanized IgGs in glycoengineered *Pichia pastoris*, Nature biotechnology, 24:2, 210–215pp.
- Li, P., Anumanthan, A., Gao, X.-G., Ilangovan, K., Suzara, V. V, Düzgüneş, N. and Renugopalakrishnan, V.**, 2007, Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*, Applied biochemistry and biotechnology, 142:2, 105–124pp.
- Liang, S., Zou, C., Lin, Y., Zhang, X. and Ye, Y.**, 2013, Identification and characterization of P GCW14 : a novel, strong constitutive promoter of *Pichia pastoris*., Biotechnology letters, 35:11, 1865–71pp.
- Lin-Cereghino, G. P., Stark, C. M., Kim, D., Chang, J., Shaheen, N., Poerwanto, H., Agari, K., Moua, P., Low, L. K., Tran, N., Huang, A. D., Nattestad, M., Oshiro, K. T., Chang, J. W., Chavan, A., Tsai, J. W. and Lin-Cereghino, J.**, 2013, The effect of α -mating factor secretion signal mutations on recombinant protein expression in *Pichia pastoris*, Gene, 519:2, 311–7pp.
- Lin-Cereghino, J., Cregg, J. M., Cereghino, J. L. and Cregg, J. M.**, 2000, Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, FEMS Microbiology Reviews, 24:1, 45–66pp.

- Liu, L., Stadheim, A., Hamuro, L., Pittman, T., Wang, W., Zha, D., Hochman, J. and Prueksaritanont, T.**, 2011, Pharmacokinetics of IgG1 monoclonal antibodies produced in humanized *Pichia pastoris* with specific glycoforms: A comparative study with CHO produced materials, *Biologicals*, 39:4, 205–210pp.
- Lonberg, N.**, 2008, Human monoclonal antibodies from transgenic mice, *Handbook of experimental pharmacology*, :181, 69–97pp.
- López-Marzo, A. M., Pons, J., Blake, D. a. and Merkoçi, A.**, 2013, High sensitive gold-nanoparticle based lateral flow Immunodevice for Cd²⁺ detection in drinking waters, *Biosensors and Bioelectronics*, 47, 190–198pp.
- Luo, D., Geng, M., Noujaim, A. A. and Madiyalakan, R.**, 1997, An engineered bivalent single-chain antibody fragment that increases antigen binding activity, *Journal of biochemistry*, 121:5, 831–4pp.
- Luo, D., Mah, N., Krantz, M., Wilde, K., Wishart, D., Zhang, Y., Jacobs, F. and Martin, L.**, 1995, VI-linker-Vh orientation-dependent expression of single chain Fv-containing an engineered disulfide-stabilized bond in the framework regions, *Journal of biochemistry*, 118:4, 825–31pp.
- Maccani, A., Landes, N., Stadlmayr, G., Maresch, D., Leitner, C., Maurer, M., Gasser, B., Ernst, W., Kunert, R. and Mattanovich, D.**, 2014, *Pichia pastoris* secretes recombinant proteins less efficiently than Chinese hamster ovary cells but allows higher space-time yields for less complex proteins, *Biotechnology Journal*, 9:4, 526–537pp.
- Mader, A., Prewein, B., Zboray, K., Casanova, E. and Kunert, R.**, 2013, Exploration of BAC versus plasmid expression vectors in recombinant CHO cells, *Applied microbiology and biotechnology*, 97:9, 4049–4054pp.
- Mashkani, B., Odell, A. F., Byrnes, E. M., Griffith, R. and Ashman, L. K.**, 2013, Expression of biologically active human colony stimulating factor-1 in *Pichia pastoris*, *Protein expression and purification*, 88:1, 93–7pp.
- Mattanovich, D., Graf, A., Stadlmann, J., Dragosits, M., Redl, A., Maurer, M., Kleinheinz, M., Sauer, M., Altmann, F. and Gasser, B.**, 2009, Genome, secretome and glucose transport highlight unique features of the protein

production host *Pichia pastoris*, *Microbial cell factories*, 8, 29pp.

McLean, A. S. and Huang, S. J., 2012, Cardiac biomarkers in the intensive care unit., *Annals of intensive care*, 2, 8pp.

Menéndez, C., Martínez, D., Trujillo, L. E., Mazola, Y., González, E., Pérez, E. R. and Hernández, L., 2013, Constitutive high-level expression of a codon-optimized β -fructosidase gene from the hyperthermophile *Thermotoga maritima* in *Pichia pastoris*, *Applied microbiology and biotechnology*, 97:3, 1201–12pp.

Morrison, S. L., Johnson, M. J., Herzenberg, L. a and Oi, V. T., 1984, Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81:21, 6851–6855pp.

Nordén, K., Agemark, M., Danielson, J. Å., Alexandersson, E., Kjellbom, P. and Johanson, U., 2011, Increasing gene dosage greatly enhances recombinant expression of aquaporins in *Pichia pastoris*, *BMC Biotechnology*, 11:1, 47pp.

Nunes, J. P. L., 2010, Pseudo myocardial infarction - a condition in need to be redefined?, *Medical hypotheses*, 74:2, 219–21pp.

Ober, R. J., Radu, C. G., Ghetie, V. and Ward, E. S., 2001, Differences in promiscuity for antibody-FcRn interactions across species: implications for therapeutic antibodies, *International immunology*, 13:12, 1551–9pp.

Parker, S. A., Diaz, I. L.-C., Anderson, K. A. and Batt, C. A., 2013, Design, production, and characterization of a single-chain variable fragment (ScFv) derived from the prostate specific membrane antigen (PSMA) monoclonal antibody J591, *Protein expression and purification*, 89:2, 136–45pp.

Parker, S. A., Maloy, M. H., Tome-Amat, J., Bardliving, C. L., Lanz, K. J., Olesberg, J. T., Arnold, M. A. and Batt, C. A., 2016, Title: Optimization of Norovirus Virus-Like Particle Production in, .

Potgieter, T. I., Cukan, M., Drummond, J. E., Houston-Cummings, N. R., Jiang, Y., Li, F., Lynaugh, H., Mallem, M., McKelvey, T. W., Mitchell, T., Nylen, A., Rittenhour, A., Stadheim, T. a., Zha, D. and d'Anjou,

- M.**, 2009, Production of monoclonal antibodies by glycoengineered *Pichia pastoris*, *Journal of Biotechnology*, 139:4, 318–325pp.
- Presta, L. G.**, 2006, Engineering of therapeutic antibodies to minimize immunogenicity and optimize function, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58:5-6, 640–656pp.
- Prielhofer, R., Maurer, M., Klein, J., Wenger, J., Kiziak, C., Gasser, B. and Mattanovich, D.**, 2013, Induction without methanol: novel regulated promoters enable high-level expression in *Pichia pastoris*, *Microbial cell factories*, 12, 5pp.
- Rabert, C., Weinacker, D., Pessoa, A. and Fariás, J. G.**, 2013, Recombinants proteins for industrial uses: utilization of *Pichia pastoris* expression system, *Brazilian journal of microbiology* : [publication of the Brazilian Society for Microbiology], 44:2, 351–6pp.
- Rakestraw, J. A., Sazinsky, S. L., Piatasi, A., Antipov, E. and Wittrup, K. D.**, 2009, Directed evolution of a secretory leader for the improved expression of heterologous proteins and full-length antibodies in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnology and bioengineering*, 103:6, 1192–201pp.
- Reisinger, H., Steinfellner, W., Stern, B., Katinger, H. and Kunert, R.**, 2008, The absence of effect of gene copy number and mRNA level on the amount of mAb secretion from mammalian cells, *Applied microbiology and biotechnology*, 81:4, 701–10pp.
- Ridder, R., Schmitz, R., Legay, F. and Gram, H.**, 1995, Generation of rabbit monoclonal antibody fragments from a combinatorial phage display library and their production in the yeast *Pichia pastoris*, *Bio/technology* (Nature Publishing Company), 13:3, 255–60pp.
- Romanos, M.**, 1995, Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression, *Current Opinion in Biotechnology*, 6:5, 527–533pp.
- Romanos, M., Scorer, C., Sreekrishna, K. and Clare, J.**, 1998, The generation of multicopy recombinant strains, *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 103, 55–72pp.
- Ruzich, R. S.**, 1992, Cardiac enzymes. How to use serial determinations to confirm

acute myocardial infarction., *Postgraduate medicine*, 92:7, 85–9, 92pp.

Sallach, R. E., Conticello, V. P. and Chaikof, E. L., 2009, Expression of a recombinant elastin-like protein in *Pichia pastoris*, *Biotechnology Progress*, 25:6, 1810–1818pp.

Shen, S., Sulter, G., Jeffries, T. W. and Cregg, J. M., 1998, A strong nitrogen source-regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*, *Gene*, 216:1, 93–102pp.

Shi, X.-L., Feng, M.-Q., Shi, J., Shi, Z.-H., Zhong, J. and Zhou, P., 2007, High-level expression and purification of recombinant human catalase in *Pichia pastoris*., *Protein expression and purification*, 54:1, 24–9pp.

Silva, C. I. F., Teles, H., Moers, A. P. H. a, Eggink, G., De Wolf, F. a. and Werten, M. W. T., 2011, Secreted production of collagen-inspired gel-forming polymers with high thermal stability in *Pichia pastoris*, *Biotechnology and Bioengineering*, 108:11, 2517–2525pp.

Sinha, J., Plantz, B. A., Inan, M. and Meagher, M. M., 2005, Causes of proteolytic degradation of secreted recombinant proteins produced in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: Case study with recombinant ovine interferon- γ , *Biotechnology and Bioengineering*, 89:1, 102–112pp.

Sinha, J., Plantz, B. a., Zhang, W., Gouthro, M., Schlegel, V., Liu, C. P. and Meagher, M. M., 2003, Improved production of recombinant ovine interferon- τ by Mut⁺ strain of *Pichia pastoris* using an optimized methanol feed profile, *Biotechnology Progress*, 19, 794–802pp.

Skeik, N. and Patel, D. C., 2007, A review of troponins in ischemic heart disease and other conditions., *The International journal of angiology: official publication of the International College of Angiology, Inc*, 16:2, 53–8pp.

Spadiut, O., Capone, S., Krainer, F., Glieder, A. and Herwig, C., 2014, Microbials for the production of monoclonal antibodies and antibody fragments, *Trends in Biotechnology*, 32:1, 54–60pp.

Sreekrishna, K., Potenz, R. H., Cruze, J. A., McCombie, W. R., Parker, K. A., Nelles, L., Mazzaferro, P. K., Holden, K. A., Harrison, R. G. and Wood, P. J., 1988, High level expression of heterologous proteins in methylotrophic

yeast *Pichia pastoris*., Journal of basic microbiology, 28:4, 265–78pp.

Stadlmayr, G., Mecklenbräuker, A., Rothmüller, M., Maurer, M., Sauer, M., Mattanovich, D. and Gasser, B., 2010, Identification and characterisation of novel *Pichia pastoris* promoters for heterologous protein production, Journal of biotechnology, 150:4, 519–29pp.

Stern, M. and Herrmann, R., 2005, Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: present and promise, Critical reviews in oncology/hematology, 54:1, 11–29pp.

Tanaka, T., Sohmiya, K., Kitaura, Y., Takeshita, H., Morita, H., Ohkaru, Y., Asayama, K. and Kimura, H., 2006, Clinical evaluation of point-of-care-testing of heart-type fatty acid-binding protein (H-FABP) for the diagnosis of acute myocardial infarction, Journal of immunoassay & immunochemistry, 27:3, 225–38pp.

Thompson, C. A., 2010, FDA approves kallikrein inhibitor to treat hereditary angioedema, American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists, 67:2, 93pp.

Thygesen, K., Alpert, J. S., White, H. D., Jaffe, A. S., Apple, F. S., Galvani, M., Katus, H. A., Newby, L. K., Ravkilde, J., ... Al-Attar, N., 2007, Universal definition of myocardial infarction., Circulation, 116:22, 2634–53pp.

Tian, B., Chen, Y. and Ding, S., 2012, A combined approach for improving alkaline acetyl xylan esterase production in *Pichia pastoris*, and effects of glycosylation on enzyme secretion, activity and stability, Protein Expression and Purification, 85:1, 44–50pp.

Tomé-amat, J., Fleischer, L., Parker, S. A., Bardliving, C. L. and Batt, C. A., 2014, Secreted production of assembled Norovirus virus-like particles from *Pichia pastoris*, Microbial Cell Factories, 13, 134, 14–16pp.

Tschopp, J. F., Brust, P. F., Cregg, J. M., Stillman, C. A. and Gingeras, T. R., 1987, Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*, Nucleic acids research, 15:9, 3859–76pp.

Tyagi, S., Sharma, P. K., Kumar, N. and Visht, S., 2011, Hybridoma technique in pharmaceutical science, International Journal of PharmTech Research, 3:1,

459–463pp.

- Valderrama-Rincon, J. D., Fisher, A. C., Merritt, J. H., Fan, Y.-Y., Reading, C. A., Chhiba, K., Heiss, C., Azadi, P., Aebi, M. and DeLisa, M. P.**, 2012, An engineered eukaryotic protein glycosylation pathway in *Escherichia coli*, *Nature chemical biology*, 8:5, 434–6pp.
- Walsh, G.**, 2010, Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals, *Drug Discovery Today*, 15:17-18, 773–780pp.
- Waterham, H. R., Digan, M. E., Koutz, P. J., Lair, S. V and Cregg, J. M.**, 1997, Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter, *Gene*, 186:1, 37–44pp.
- Waters, M. G., Evans, E. A. and Blobel, G.**, 1988, Prepro-alpha-factor has a cleavable signal sequence, *The Journal of biological chemistry*, 263:13, 6209–14pp.
- Wilson, C., Bellen, H. J. and Gehring, W. J.**, 1990, Position effects on eukaryotic gene expression, *Annual review of cell biology*, 6, 679–714pp.
- Yang, S., Kuang, Y., Li, H., Liu, Y., Hui, X., Li, P., Jiang, Z., Zhou, Y., Wang, Y., Xu, A., Li, S., Liu, P. and Wu, D.**, 2013, Enhanced production of recombinant secretory proteins in *Pichia pastoris* by optimizing Kex2 P1' site, *PloS one*, 8:9, e75347pp.
- Yegin, S. and Fernandez-Lahore, M.**, 2013, A Thermolabile Aspartic Proteinase from *Mucor mucedo* DSM 809: Gene Identification, Cloning, and Functional Expression in *Pichia pastoris*, *Molecular biotechnology*, 54:2, 661–72pp.
- Zhou, X. S. and Zhang, Y. X.**, 2002, Decrease of proteolytic degradation of recombinant hirudin produced by *Pichia pastoris* by controlling the specific growth rate, *Biotechnology Letters*, 24:17, 1449–1453pp.
- Zola, H.**, 2001, *Encyclopedia of Life Sciences*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.

ÖZGEÇMİŞ

Cengiz AKKALE 1984 yılında Fergana/ÖZBEKİSTAN’da doğmuştur. Orta öğrenimini Bursa Turhan Tayan Anadolu Lisesi’nde tamamlamıştır. Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü’nden 2006 yılında mezun olmuştur. Yüksek lisansını Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı’nda “*Domateste Fusarium Çürüklüğüne Dayanıklılığın RAPD ve CAPS Markırları ile Belirlenmesi*” konulu tezi ile 2009 yılında tamamlamıştır. 2013 yılında Adana Bilim Ve Teknoloji Üniversitesi’nin açtığı kadro ilanına başvurarak Mimarlık ve Mühendislik Fakültesi’ne bağlı Biyomühendislik Bölümü’nde kadroya yerleştirilmeye hak kazanmıştır. Araştırma Görevlisi olarak atandıktan sonra aynı yıl Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı’na doktora eğitimi süresince görevlendirilmiştir.