



Pectobacterium chrysanthemi
PEKTİN METİLESTERAZ ENZİMİNİN
Pichia pastoris ile REKOMBİNANT ÜRETİMİ

Melek ACAR

Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Gen Mühendisliği Bilim Dalı
Dr. Öğr. Üyesi Yağmur ÜNVER
2020
Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Pectobacterium chrysanthemi
PEKTİN METİLESTERAZ ENZİMİNİN
Pichia pastoris ile REKOMBİNANT ÜRETİMİ

Melek ACAR

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI
Gen Mühendisliği Bilim Dalı

ERZURUM
2020
Her hakkı saklıdır



TEZ ONAY FORMU

***Pectobacterium chrysanthemi* PEKTİN METİLESTERAZ ENZİMİNİN *Pichia pastoris* ile REKOMBİNANT ÜRETİMİ**

Dr. Öğr. Üyesi Yağmur ÜNVER danışmanlığında, Melek ACAR tarafından hazırlanan bu çalışma, 07/01/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Gen Mühendisliği Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (3/0.)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Arzu GÖRMEZ

İmza : 

Üye : Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

İmza : 

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Yağmur ÜNVER

İmza : 

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun **16.01/2020** tarih ve **03.../...64** nolu kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Mehmet KARAKAN
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2018-6853

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

***Pectobacterium chrysanthemi* PEKTİN METİLESTERAZ ENZİMİNİN *Pichia pastoris* ile REKOMBİNANT ÜRETİMİ**

Melek ACAR

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Gen Mühendisliği Bilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Yağmur ÜNVER

Bitkilerin hücre duvarının en önemli bileşeni olan, tüm canlı bitkilerin hücre duvarında ve hücreleri arasında bulunan pektini degrade eden pektinazlar, gıda enzimlerinin küresel satışında %25'lik bir paya sahiptirler. Bu enzimlerden biri olan pektin metilesteraz (PME) enzimi, yüksek bitkilerde yaygın olarak bulunur ve metil ester gruplarını hidroliz ederek pektini deesterifiye eder. Bu tez çalışmasında *Pichia pastoris* ekspresyon sistemi kullanılarak GAP (Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz) promotörünün kontrolü altında PME enziminin ekstrasellüler üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda, öncelikle ekstrasellüler üretim için pGKB ekspresyon vektörüne α -faktör sinyal sekansı yerleştirilerek pGKB α vektörü elde edilmiştir. Daha sonra *Pectobacterium chrysanthemi* PME gen dizisi, ticari olarak temin edilen sentetik DNA'dan amplifiye edilerek pGKB α vektörüne yerleştirilmiştir. *E. coli* JM109 hücrelerinde klonlanarak elde edilen rekombinant vektör (pGKB α -PME), lineer hale getirilerek LiCl metodu ile *P. pastoris* hücrelerine transfer edilmiştir. Genomlarında PME genini taşıyan maya transformantlarının belirlenebilmesi için seçilen kolonilerden saflaştırılan genomik DNA'lar kullanılarak PCR yapılmıştır. PME genini taşıyan pozitif kolonilerin üretim besiyerinde 72 saatlik inkübasyonu ile protein üretimi gerçekleştirilmiştir. Konsantre edilen kültür sıvıları agaroz plak kuyularına yüklenerek aktivite zonu oluşumuna bakılmıştır. En büyük zon oluşumuna sahip koloniye ait kültür sıvısında SDS-PAGE analizi ile proteinin varlığı belirlenmiştir.

2020, 98 sayfa

Anahtar Kelimeler: Pektin metilesteraz, pGKB α , genetisin, ekspresyon, *Pichia pastoris*

ABSTRACT

Master's Thesis

RECOMBINANT PRODUCTION OF PECTIN METHYLESTERASE FROM *Pectobacterium chrysanthemi* BY *Pichia pastoris*

Melek ACAR

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics
Discipline of Gene Engineering

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Yağmur ÜNVER

Pectinases which degrade pectin, the most important component of the cell wall of plants and exist in between cells of all living plants, account for 25% of the global food enzymes. One of these enzymes, pectin methylesterase (PME) exists widely in higher plants and de-esterifies pectin by hydrolyzing methyl ester groups. In this thesis study, PME enzyme was produced extracellularly under the control of GAP (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) promoter using *Pichia pastoris* expression system. Accordingly, the pGKB α vector was obtained by inserting the α -factor signal sequence into the pGKB expression vector for extracellular production. Then, *Pectobacterium chrysanthemi* PME gene sequence was amplified from synthetic DNA and inserted into the pGKB α vector. The recombinant vector (pGKB α -PME) obtained by cloning in *E. coli* JM109 cells was linearized and transferred into *P. pastoris* cells by LiCl method. PCR was performed using genomic DNA purified from selected colonies to identify the yeast transformants carrying the PME gene in their genomes. Positive colonies carrying the PME gene were used to produce protein in the production medium for 72 hours. Concentrated culture solutions were filled in the wells of agarose plate to determine activity haloes. The presence of protein was determined by SDS-PAGE analysis in the culture solution of the colony with the largest halo.

2020, 98 pages

Keywords: Pectin methylesterase, pGKB α , geneticin, expression, *Pichia pastoris*

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde ve Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (DAYTAM) yapılmıştır.

Yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda bana yardımcı olan, her türlü imkânı sağlayan ve desteğini her an hissettiğim çok değerli danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Yağmur ÜNVER'e, yardımlarını hiç esirgemeyen değerli hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Melike YILDIZ'a, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e ve öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca deneylerimde yanımda olan ve laboratuvar ortamını eğlenceli hale getiren sevgili arkadaşlarım Sayın Şeyda YILDIZ, Sayın Kübra SOLAK, Sayın Büşra ŞENSOY GÜN, Sayın Betül ARI ve Sayın Saadet KALAKENGER'e teşekkür ederim.

Çalışmalarımın büyük kısmını yürüttüğüm DAYTAM'a, bana bu fırsatı tanıyan DAYTAM Müdürü Sayın Prof. Dr. Hamdullah KILIÇ'a, Müdür Yardımcısı Sayın Dr. Öğretim Üyesi Nihal ŞİMŞEK ÖZEK'e, Sayın Dr. Öğretim Üyesi Ferhunde AYSİN'e, Sayın Dr. Öğretim Üyesi Aslı YILMAZ'a, Sayın Öğr. Gör. Hasan CAN'a, Sayın Öğr. Gör. Osman Nuri ASLAN'a ve tüm DAYTAM öğretim üyeleri, öğretim görevlileri ve çalışanlarına yardımlarından ve verdikleri pozitif enerjiden ötürü çok teşekkür ederim.

Bugüne kadar her daim yanımda duran, tam da istediğim gibi biri olabilmem için beni her koşulda destekleyen, varlıklarıyla hayatıma anlam katan canım aileme ve en önemlisi neşe kaynaklarım bal yeğenlerime var oldukları için sonsuz kere teşekkür ederim.

Desteklerini her an hissettiğim can dostlarım Şeyda ALBAYRAK, Fatma KARAGÖL, Merve BAYOĞLU, Ece Gülşah ABBASOĞULLARI ve M. Olcay TERCANLI'ya teşekkür ederim.

Ayrıca yüksek lisans eğitimim boyunca beni destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu-Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na (TÜBİTAK-BİDEB) ve bu çalışmayı FYL-2018-6853 nolu proje ile destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi'ne teşekkür ederim.

Melek ACAR

Ocak, 2020

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Pektin	1
1.2. Pektik Enzimler	2
1.2.1. Pektin metilesteraz.....	5
1.3. <i>Pectobacterium chrysanthemi</i>	7
1.4. Rekombinant Protein Üretimi.....	8
1.4.1. <i>Pichia pastoris</i> ekspresyon sistemi.....	11
1.4.1.1. Genel bilgi	11
1.4.1.2. <i>P. pastoris</i> 'in fizyolojisi	14
1.4.1.3. Promotörler	14
1.4.1.4. Seçilebilir markırlar	18
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	21
2.1. Çalışmanın Amacı	27
3. MATERYAL ve YÖNTEM	28
3.1. Materyal.....	28
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	28
3.1.2. Kimyasallar ve besiyerler	28
3.1.3. Kullanılan mikroorganizmalar	28

3.1.4. Tasarlanan primerler	29
3.1.5. Çalışmada kullanılan pGKB vektör DNA'sı	29
3.1.6. Çalışmada kullanılan restriksiyon enzimleri	31
3.1.7. pGKB vektör DNA'sına ait primerler	32
3.1.8. Çalışmada kullanılan besiyerleri.....	32
3.1.9. Çalışmada kullanılan tampon ve stok çözeltiler	33
3.2. Yöntem	33
3.2.1. pGKB vektör DNA'sının doğrulanması	33
3.2.1.1. <i>E. coli</i> hücrelerinden plazmit izolasyonu.....	33
3.2.1.2. İzole edilen plazmitin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi	34
3.2.1.3. Vektör DNA'nın PCR reaksiyonu ile doğrulanması	35
3.2.1.4. pGKB vektörünün restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi.....	36
3.2.1.5. Kesim ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi	36
3.2.2. pGKBα ekspresyon vektörünün elde edilmesi	36
3.2.2.1. α-faktör sinyal sekansının PCR ile amplifikasyonu	36
3.2.2.1.a. PCR ürünlerinin saflaştırılması.....	38
3.2.2.1.b. PCR ürünlerinin restriksiyon enzimleri ile kesimi	38
3.2.2.1.c. PCR ürünlerinin fenol-kloroform ekstraksiyonu	39
3.2.2.2. Vektör DNA (pGKB)'nın kesimi	39
3.2.2.2.a. Vektör DNA'nın jelden ekstraksiyonu	40
3.2.2.3. Ligasyon reaksiyonu	40
3.2.2.4. <i>E. coli</i> JM109 hücrelerinin transformasyonu.....	41
3.2.2.4.a. Kompetent <i>E. coli</i> hücrelerinin hazırlanması.....	41
3.2.2.4.b. Transformasyon	41
3.2.2.5. Koloni PCR.....	42

3.2.2.5.a. Gene ait primerler kullanılarak gerçekleştirilen koloni PCR reaksiyonu.....	42
3.2.2.5.b. Vektör DNA'ya ait primerler kullanılarak gerçekleştirilen koloni PCR reaksiyonu.....	43
3.2.2.6. Muhtemel rekombinant vektörlerin sekans analizi ile doğrulanması	44
3.2.3. Rekombinant pGKB α -PME vektörünün elde edilmesi	45
3.2.3.1. PME genine ait nükleotid sekansının PCR ile amplifikasyonu	45
3.2.3.2. PCR ürünlerinin saflaştırılması.....	46
3.2.3.3. PCR ürünlerinin restriksiyon enzimleri ile kesimi	46
3.2.3.4. pGKB α vektör DNA'sının kesimi	47
3.2.3.4.a. Vektör DNA'nın jelden ekstraksiyonu	48
3.2.3.5. Ligasyon reaksiyonu.....	48
3.2.3.6. <i>E. coli</i> JM109 hücrelerinin transformasyonu.....	49
3.2.3.7. Koloni PCR.....	49
3.2.3.7.a. Gene ait primerler kullanılarak gerçekleştirilen koloni PCR reaksiyonu.....	49
3.2.3.7.b. Vektör DNA'ya ait primerler kullanılarak gerçekleştirilen koloni PCR reaksiyonu.....	50
3.2.3.8. <i>E. coli</i> hücrelerinden saflaştırılan muhtemel rekombinant vektörlerin sekans analizi ile doğrulanması.....	51
3.2.4. pGKB α -PME rekombinant vektörünün <i>P. pastoris</i> 'e transfer edilmesi.....	51
3.2.4.1. Rekombinant vektörün (pGKB α -PME) izolasyonu ve lineer hale getirilmesi	51
3.2.4.2. Kompetent <i>P. pastoris</i> hücrelerinin hazırlanması	52
3.2.4.3. <i>P. pastoris</i> hücrelerinin transformasyonu.....	52
3.2.5. PME genini taşıyan maya transformantlarının tespiti	53
3.2.5.1. <i>P. pastoris</i> transformantlarından genomik DNA (gDNA) izolasyonu	53

3.2.5.2. PCR reaksiyonu	54
3.2.6. Rekombinant protein üretimi	55
3.2.6.1. PME enzim aktivitesinin agaroz plak aktivite yöntemi ile tayini	55
3.2.6.2. SDS-PAGE analizi	56
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	58
4.1. pGKB Vektör DNA'sının Doğrulanması	58
4.2. α -faktör Sinyal Sekansının PCR ile Amplifikasyonu	60
4.3. α -faktör Sinyal Sekansının ve pGKB Vektör DNA'sının Kesilmesi ve Görüntülenmesi	60
4.4. <i>E. coli</i> JM109 Hücrelerinin Transformasyonu	61
4.5. Geni Taşıyan Transformantların Belirlenmesi	62
4.6. Muhtemel Rekombinant Plazmitlerin Sekans Analizi	63
4.7. PME Genine Ait Nükleotid Sekansının PCR ile Amplifikasyonu	65
4.8. <i>E. coli</i> JM109 Hücrelerinin Transformasyonu	66
4.9. PME Genini Taşıyan Transformantların Belirlenmesi	67
4.10. Muhtemel Rekombinant Plazmitlerin Sekans Analizi	68
4.11. pGKB α -PME Rekombinant Vektörünün Lineer Hale Getirilmesi	70
4.12. <i>P. pastoris</i> Hücrelerinin Transformasyonu ve Doğru Transformantların Tespiti	71
4.12.1. <i>P. pastoris</i> hücrelerinden gDNA izolasyonu ve PCR reaksiyonu	72
4.13. Rekombinant Protein Üretimi	73
4.13.1. PME Enzim Aktivitesinin Agaroz Plak Aktivite Yöntemi ile Tayini	74
4.13.2. SDS-PAGE Analizi	75
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	77
KAYNAKLAR	86
EKLER	91

EK 1. BESİYERLERİN HAZIRLANMASI	91
EK 2. TAMPON VE STOK SOLÜSYONLARIN HAZIRLANMASI	93
EK 3. MOLEKÜLER MARKIRLAR	97
EK 4. STANDART GRAFİK.....	98
ÖZGEÇMİŞ.....	99



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%	Yüzde
°C	Santigrat Derece
µg	Mikrogram
aa	Aminoasit
His	Histidin
kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
nm	Nanometre
pg	Pikogram
sn	Saniye
V	Volt
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre

Kısaltmalar

AOX	Alkol oksidaz
GAP	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
bç	Baz çifti
CIAP	Sığır Bağırsak Alkalın Fosfataz (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase)
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
ddH ₂ O	Ultra saf su
gDNA	Genomik Deoksiribonükleik Asit
LB	Luria Bertani
LiCl	Lityum klorür
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
PEG	Polietilen glikol
rpm	Dakikadaki devir sayısı (Revolutions per minute)
SOC	Super Optimal Broth with Catabolite repressor
TCA	Trikloroasetik asit
TE	Tris EDTA
TAE	Tris Asetik asit EDTA
UV	Ultraviyole ışını
YPD	Maya ekstraktı pepton dekstroz (Yeast Extract Peptone Dextrose)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Pektin molekülünün yapısı	1
Şekil 1.2. Pektinin pektin metilesterazlar (PME) tarafından demetilesterifikasyonu	2
Şekil 1.3. Farklı pektinaz tipleri ve pektik maddeler üzerindeki etki şekilleri	5
Şekil 1.4. Pektin polimerinin pektin metilesteraz enzimi ile katalizlenmesi	6
Şekil 1.5. PME enziminin pektin zincirinde etki ettiği bölgeler.....	7
Şekil 1.6. <i>Pectobacterium chrysanthemi</i> pektin metilesterazın protein sekonder yapısı..	8
Şekil 3.1. pGKB vektörü.....	30
Şekil 3.2. pGKB vektöründe bulunan çoklu klonlama bölgesine ait nükleotid sekansı .	31
Şekil 3.3. Bakteri stabı	33
Şekil 4.1. pGKB vektör DNA'sına ait agaroz jel elektroforez görüntüsü	58
Şekil 4.2. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	59
Şekil 4.3. Kesim reaksiyon ürününün agaroz jel elektroforez görüntüsü	59
Şekil 4.4. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	60
Şekil 4.5. Kesilen vektör DNA'nın agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	61
Şekil 4.6. İnkübasyon sonrası gelişen bakteri kolonileri	61
Şekil 4.7. Koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	62
Şekil 4.8. Koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	63
Şekil 4.9. Muhtemel rekombinant plazmitlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü	63
Şekil 4.10. Vektör DNA'ya ait forward primer ile gerçekleştirilen sekans analizi ile elde edilen nükleotid sekansının blast sonucu.....	64
Şekil 4.11. pGKB α vektörü.....	65
Şekil 4.12. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	66
Şekil 4.13. İnkübasyon sonrası gelişen bakteri kolonileri	66
Şekil 4.14. Koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	67
Şekil 4.15. Koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	68
Şekil 4.16. Vektör DNA'ya ait forward ve reverse primer ile gerçekleştirilen sekans analizi ile elde edilen nükleotid sekansının blast sonucu.....	69
Şekil 4.17. pGKB α -PME rekombinant vektörü.....	70

Şekil 4.18. Kesim reaksiyonu sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü	70
Şekil 4.19. Transformasyon sonrası gelişen koloniler	71
Şekil 4.20. Seçilen kolonilerin YPD genetisin agar besiyerindeki seçilimi	71
Şekil 4.21. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	73
Şekil 4.22. PCR ürünlerine ait bant yoğunlukları	73
Şekil 4.23. Rutenyum kırmızısı ile boyama sonucu kuyular etrafında oluşan zonlar.....	74
Şekil 4.24. Rutenyum kırmızısı ile boyama sonucu aktivite zonu oluşumu.....	74
Şekil 4.25. Rutenyum kırmızısı ile boyama sonucu aktivite zonu oluşumu.....	75
Şekil 4.26. Ekstrasellüler rekombinant proteinin SDS-PAGE analizi.....	76

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Rekombinant protein üretiminde kullanılan metilotrofik ve metilotrofik olmayan mayalar	11
Çizelge 1.2. Proteini hücre dışına salgılamak için kullanılan sinyal dizileri	13
Çizelge 1.3. <i>P. pastoris</i> 'te heterolog protein üretiminde sıklıkla kullanılan yapısal promotörler	15
Çizelge 1.4. <i>P. pastoris</i> 'te heterolog protein üretiminde sıklıkla kullanılan indüklenebilir promotörler	16
Çizelge 1.5. <i>P. pastoris</i> 'te kullanılan dominant seçim markırları	18
Çizelge 1.6. <i>P. pastoris</i> 'te kullanılan resesif seçim markırları	19
Çizelge 3.1. α -faktör sinyal sekansının amplifikasyonu için dizayn edilen primerler	29
Çizelge 3.2. PME sekansının amplifikasyonu için dizayn edilen primerler	29
Çizelge 3.3. Kesim enzimlerinin tanıma sekansları ve kesim noktaları	32
Çizelge 3.4. pGKB vektör DNA'sına ait primerler ve Tm sıcaklıkları	32
Çizelge 3.5. pGKB vektör DNA'sının gradiyent PCR ile amplifikasyonu	35
Çizelge 3.6. Gradyent PCR şartları	35
Çizelge 3.7. Vektör DNA kesim reaksiyonu karışım içeriği	36
Çizelge 3.8. α -faktör sinyal sekansının gradiyent PCR ile amplifikasyonu	37
Çizelge 3.9. Gradyent PCR şartları	37
Çizelge 3.10. PCR ürünü kesim reaksiyonu karışım içeriği	38
Çizelge 3.11. Vektör DNA'nın kesim reaksiyonu karışım içeriği	39
Çizelge 3.12. Ligasyon reaksiyonu	40
Çizelge 3.13. Koloni PCR için reaksiyon karışım içeriği	42
Çizelge 3.14. PCR reaksiyon şartları	43
Çizelge 3.15. Koloni PCR için reaksiyon karışım içeriği	43
Çizelge 3.16. PCR reaksiyon şartları	44
Çizelge 3.17. PME sekansının gradiyent PCR ile amplifikasyonu	45
Çizelge 3.18. Gradyent PCR şartları	46
Çizelge 3.19. PCR ürünü kesim reaksiyonu karışım içeriği	47
Çizelge 3.20. Vektör DNA'nın kesim reaksiyonu karışım içeriği	47

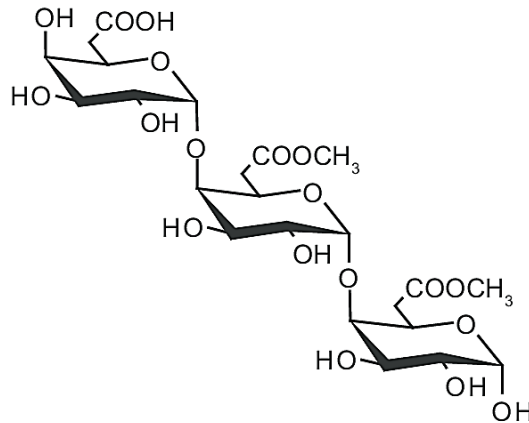
Çizelge 3.21. Ligasyon reaksiyonu	48
Çizelge 3.22. Koloni PCR için reaksiyon karışım içeriği	49
Çizelge 3.23. PCR reaksiyon şartları	50
Çizelge 3.24. Koloni PCR için reaksiyon karışım içeriği	50
Çizelge 3.25. PCR reaksiyon şartları	51
Çizelge 3.26. Vektör DNA'nın kesim reaksiyonu karışım içeriği	52
Çizelge 3.27. PME sekansının PCR ile amplifikasyonu	54
Çizelge 3.28. PCR şartları	55
Çizelge 4.1. İzole edilen gDNA'ların konsantrasyonları	72

1. GİRİŞ

1.1. Pektin

Bitkilerin hücre duvarının en önemli bileşenlerinden olan pektin, tüm yüksek yapılı bitkilerin orta lamelinde birincil hücre duvarı ve hücrelerarası bölgeler içinde yer alır. Kompleks yapılı bu heteropolisakkarit, ilk kez Fransız kimyager Louis Nicolas Vauquelin tarafından 1790 yılında elma suyunda tespit edilmiştir. 1825 yılında ise Fransız kimyager Henri Braconnot izole ederek pektikos (Yunanca'da katılaştırıcı ve sertleştirici anlamına gelir) kelimesini türeterek "pektin" olarak adlandırmıştır (Atalay vd 2018).

Pektik maddelerde, D-galakturonik asit birimleri, α -1,4 glikozidik bağları ile birbirine bağlanarak ana zinciri oluşturur (Güzel ve Akpınar 2017). Karbonil yan grupları ise metanol ile %60-90 esterlenmektedir. Ramnoz birimleri ana zincirine bağlanabilirken, arabinan, galaktan veya arabinogalaktanın yan zincirleri ise ramnoza bağlanır. Bu, bitki hücrelerinde çeşitli pektik madde formlarının bulunduğunu ve bu nedenle de çeşitli formlarda pektinazların varlığını gösterir. Pektin, protopektin ve pektik asitler gibi pektik maddeler bitki dokularına sıklık ve yapı kazandırır (Gummadi and Panda 2003). Pektin molekülünün yapısı Şekil 1.1'de verilmiştir.

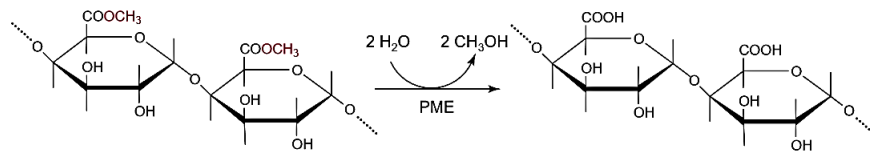


Şekil 1.1. Pektin molekülünün yapısı

Pektin, kozmetik, gıda, biyomedikal ve ilaç endüstrisinde yaygın bir şekilde kullanılmasının yanında; gıdalarda jelleştirici ajan ve kıvam arttırıcı olarak da kullanılır. Aynı zamanda lipaz aktivitesini azaltıcı, yara iyileştirici, hücre apoptozunu uyarıcı, kanser hücrelerinin gelişmesini ve metastazını inhibe edici, kolesterol seviyesini azaltıcı, anti-ülser aktivite ve bağışıklığı uyarıcı gibi biyolojik aktivitelere de sahiptir (Thakur *et al.* 1997; Güzel ve Akpınar 2017).

Ticari pektin üretimi için yaygın olarak portakal kabuğu ve elma posası kullanılır. Bununla birlikte farklı bitki türlerinin de pektin içerikleri incelenmiştir. Ayçiçeği, muz, pomelo, domates, nar, karpuz, kavun, enginar, havuç ve balkabağının da pektin içerdiği bildirilmekle birlikte, portakal, greyfurt, limon, misket limonu, şeker pancarı posasının içerdikleri pektin yüzdeleri sırasıyla %11-25, %22-28, %21-31, %9-34, %25'tir (Atalay vd 2018).

Pektinler, yüksek oranda metilesterleşmiş formlar olarak hücre duvarına salınır. Daha sonra, asidik pektinler ve metanol salgılayan homogalakturonanların demetilesterifikasyonunu katalize eden pektin metilesterazlar (PME) gibi pektinazlar ile modifiye edilebilir. Pektinin, pektin metilesterazlar (PME) tarafından demetilesterifikasyonu Şekil 1.2'de verilmiştir (Micheli 2001).



Şekil 1.2. Pektinin pektin metilesterazlar (PME) tarafından demetilesterifikasyonu

1.2. Pektik Enzimler

Pektik maddeler, selüloz, hemiselüloz, nişasta ve lignin gibi polimerler, proteinler, polifenoller, tanenler, metaller ve arabanlar gibi maddeler meyve suyunda bulanıklığa yol

açtığından berrak bir meyve suyu için polisakkaritlerin küçük moleküllerine kadar parçalanması gerekmektedir. Pektin, meyve suyunda bulunan pektin ve diğer polisakkaritleri uzaklaştırmak için uygulanan önemli bir adım olan durultmanın depektinizasyon aşamasında parçalanmaktadır. Meyve suyunun durultulmasının amacı, pektinin varlığında filtrasyon zorlaştığından filtrasyonun daha ekonomik, hızlı ve kolay olmasını sağlamak, bulanmayı önlemek ve bu arada pektini parçalayarak konsantride jel oluşumunu engellemektir. Daha berrak bir meyve suyu üretimi için pektinin dallı bölgelerine etki etmek gerektiğinden özellikle enzimler bu amaca ulaşmada çok önemlidir. Bu enzimlerin başında ise pektinazlar yani pektin parçalayan enzimler gelmektedir. Bu amaçla kullanılan pektik enzimler; poligalakturonazlar, pektin esterazlar, pektin liyazlar ve pektat liyazlardır. Bu enzimlere ilaveten selülazlar, hemiselülazlar, arabanazlar ve amilazlar gibi diğer enzimler de kullanılmaktadır. Böylece meyve suyu ve durultma verimi artarken filtrasyon kolaylaşır ve bu sayede daha berrak bir ürün elde edilir (Uçan ve Akyıldız 2012; Domingues *et al.* 2012).

Pektinazlar, bitki patogenezinin sorumludur (Gummadi and Panda 2003). Pektinazların bakteri, mantar, böcek, nematod ve protozoa gibi çok sayıda organizma ve bitki tarafından üretildiği bildirilmiştir (Uçan ve Akyıldız 2012). 1940'lardan bu yana pek çok endüstriyel uygulama için pektinazlar kullanılmıştır. Novozymes (Danimarka), Novartis (İsviçre), Roche (Almanya) ve Biocon (Hindistan) gibi firmalar bazı önemli pektinaz üreticileridir (Gummadi and Panda 2003).

Pektik enzimler etki mekanizmalarına göre dört sınıfa ayrılmaktadırlar:

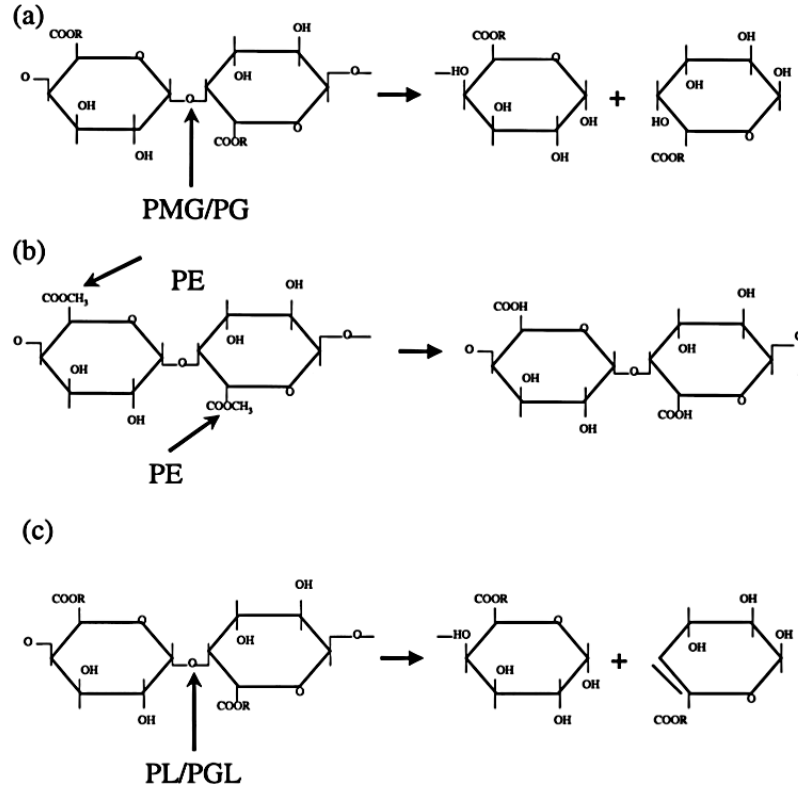
(a) **Poligalakturonaz (PG):** α -1,4-glikozidik bağlarını hidrolitik olarak parçalamaktadır. Endo ve ekzo olmak üzere iki tipi olan bu enzimin ekzo-PG tipi, substrata indirgen olmayan uçtan, endo-PG ise rastgele etki etmektedir. Bu depolimerizasyon sonunda meyve suyunun viskozitesi düşmektedir (Uçan ve Akyıldız 2012). Poligalakturonazlar, tüm pektinolitik enzimler arasında en bol bulunanları olup poligalakturonik asit zincirini su ilavesiyle hidrolize etme yeteneğine sahiptir (Jayani *et al.* 2005).

(b) **Pektin metilesteraz (PME) (Pektin pektinhidrolaz, pektin esteraz):** Metil ester gruplarını hidrolize ederek pektini deesterifiye eder (Uçan ve Akyıldız 2012). PME, pektin zincirindeki esterleşmiş karboksil gruplarındaki metoksil gruplarını ayırarak, pektinin esterleşme derecesini düşürmektedir. Böylece pektin omurgasının metil ester bağlantılarının deesterleştirilmesiyle metanol açığa çıkmaktadır (Özler 2009; Karagöz ve Demirdöven 2016).

(c) **Pektat liyaz (PEL):** β -eliminasyonla esterleşmemiş galakturonat birimlerinin kırılmasını katalizlemektedir. Hem ekzo-PEL ve hem de endo-PEL türleri vardır. Bu enzimler için tercih edilen substratlar pektat ve düşük metoksilli pektinlerdir (Payasi *et al.* 2006; Uçan ve Akyıldız 2012).

(d) **Pektin liyaz (PNL):** β -eliminasyonla esterleşmiş galakturonat birimlerinin kırılmasını katalizlemektedir (Jacob and Prema 2006; Uçan ve Akyıldız 2012).

Bu pektinazların pektik maddeler üzerindeki etki şekilleri Şekil 1.3'te gösterilmiştir (Gummadi and Panda 2003).



Şekil 1.3. Farklı pektinaz tipleri ve pektik maddeler üzerindeki etki şekilleri. (a) PG için R=H, PMG ve (b) PE için CH₃, (c) PGL için R=H ve PL için CH₃. Ok, pektinazların, pektik maddelerle reaksiyona girdiği yeri gösterir. PMG: polimetil galakturonaz, PG: poligalakturonaz (EC 3.2.1.15), PE: pektin esteraz (EC 3.1.1.11), PL: pektin liyaz (4.2.2.10) (Gummadi and Panda 2003).

Pektinazlar ayrıca şarap yapımında ve meyve suyu endüstrilerinde kullanılan asidik pektinazlar ve kâğıt üretiminde, kahve ve çay fermantasyonunda, yağ ekstraksiyonunda, ve meyve suyu endüstrisindeki pektik atık suların ön muamelesinde kullanılan bazik pektinazlar dikkate alınarak asidik ve bazik özelliklerine göre de sınıflandırılabilir (Özler 2009).

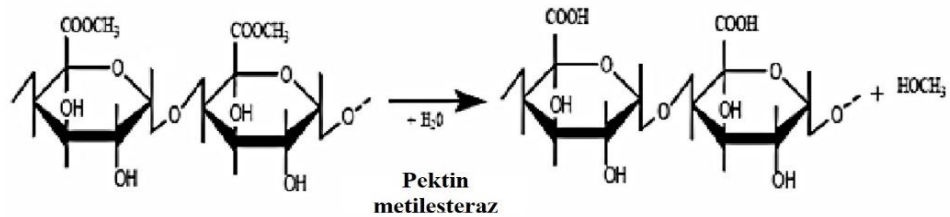
1.2.1. Pektin metilesteraz

Pektin metilesteraz (PME), birçok bitki, bakteri ve patojen küf ile turunçgiller, elma, üzüm, muz, domates, armut, fasulye, havuç, salatalık, pırasa, soğan, patates ve bezelyede bulunan, bitki hücrelerinden elde edilen veya bakteri ve mantar gibi mikroorganizmaların sentezlediği pektik bir enzimdir (Karagöz ve Demirdöven 2016).

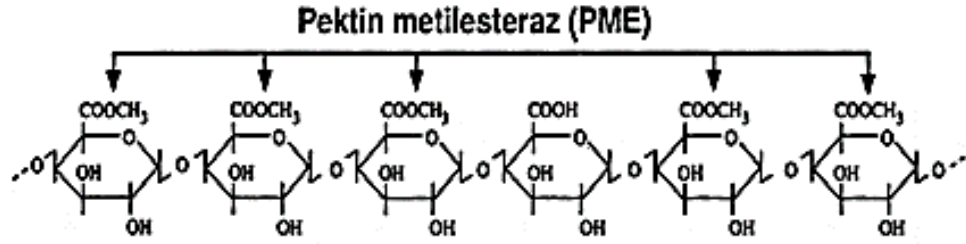
Pektin metilesteraz hücre gelişimi sırasında hücre duvarının büyümesinde ve meyvelerin olgunlaşmasında rol oynar. Olgunlaşmadaki ve hücre duvarının büyümesindeki rolleri sırasıyla metilasyon derecesi düşük pektin oluşturmak ve otoliz ve büyümede rol oynayan enzimleri aktive eden lokal pH düşmesine neden olmaktadır. PME aktivitesinin kontrolü meyve suyu üretimi ile ilgili biyoteknolojik süreçler bakımından çok önemlidir (Özler 2009).

Pektin metilesterazlar (PME) diğer bir enzimin faaliyetine bağlı olmaksızın, pektindeki metil ester gruplarını parçalar. Pektin zincirindeki metoksil gruplarını hidrolizleyerek pektini poligalakturonik aside dönüştürmekte ve böylece metanol oluştururken pektinin esterleşme derecesini %10'un altına kadar düşürebilmektedir (Şekil 1.4) (Arpaç 2006). Doğada yaygın olarak bulunan pektin metilesterazlar (PME; EC.3.1.1.11), metillenmiş galakturonat polimerlerini hidroliz ederek yüksek metoksilli pektinin düşük metoksilli pektin haline çevrilmesini sağlar. Reaksiyonun ilerlemesi durumunda tüm metoksil grupları hidrolizlendiğinde poligalakturonik asit ve metanol açığa çıkar (Özler 2009). Pektin polimerinin pektin metilesteraz enzimi ile katalizlenmesi ve PME enziminin etki ettiği bölgeler Şekil 1.4 ve Şekil 1.5'te verilmiştir.

PME, galakturonik asitlerdeki metil gruplarını deesterifiye edip, Ca^{2+} ile kompleks oluşturacakları bölgeye atak yaparak meyve suyunu berrak hale getirir (Özler 2009). Esterleşen pektin ise kalsiyum iyonları ile birleşerek çözünmeyen pektat bileşiklerini oluşturur ve bunlar da meyve ve sebze sularında pulp partikülleri ile birleşerek bulanıklığın ortadan kalkmasını sağlar (Karagöz ve Demirdöven 2016).



Şekil 1.4. Pektin polimerinin pektin metilesteraz enzimi ile katalizlenmesi



Şekil 1.5. PME enziminin pektin zincirinde etki ettiği bölgeler

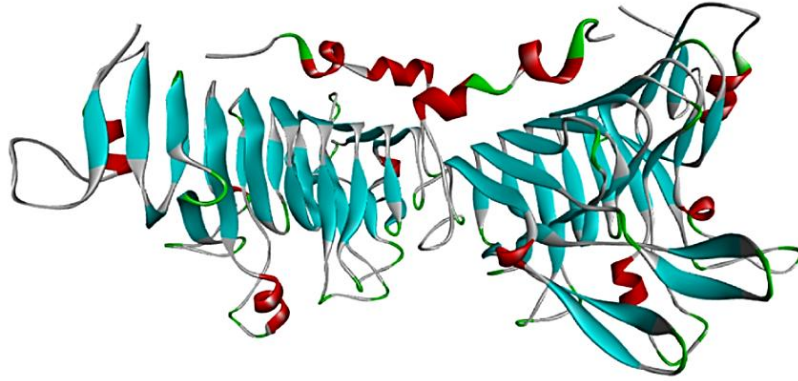
1.3. *Pectobacterium chrysanthemi*

Pectobacterium chrysanthemi (*Erwinia chrysanthemi*), kökler, yumru kökler ve kalın yapraklar gibi etli bitki organlarını parçalayan, aynı zamanda ksilemi kolonize eden ve bitki içerisinde sistemik hale gelen, vasküler solgunluk patojenidir. *P. chrysanthemi* hareketli, Gram-negatif, spor oluşturmayan, yuvarlatılmış uçlu düz bir çubuktur ve tek başına ya da çiftler halinde oluşur. Boyutları 0.8-3.2 x 0.5-0.8 μm (ortalama 1.8 x 0.6 μm) arasında değişir (EPPO 1990).

P. chrysanthemi tarafından üretilen pektin metilesteraz enzimi (PME) (EC 3.1.1.11), bitki dokularının bakteriyel istilasındaki önemli ilk basamak olan, bitki hücre duvarının pektik polisakaritlerinde metilesterlenmiş D-galakturonat (GalA) kalıntılarının de-esterleştirilmesini katalize eder. PME'nin aktivitesi, daha sonra pektat liyaz ve poligalakturonaz enzimleriyle depolimerize edilebilen kompleks pektin polimeri içinde poligalakturonik asit bölgelerini meydana getirir. Bitki hücre duvarının bu şekilde bozulması, bakteriyel patojenin bitki dokusunu istila etmesini ve hastalığın daha fazla yayılmasına neden olur (Fries *et al.* 2007). Bu bakteri tarafından üretilen PME enziminin yapısı Şekil 1.6'da verilmiştir (Kumar *et al.* 2018).

PME, sadece bakteriyel patojenler tarafından kullanılmaz, aynı zamanda hücreden hücreye hareket için bir araç olarak endojen bitki PME'sini kullanan tütün mozaik virüsü gibi bitki virüslerinin yayılması için de önemlidir. Bakteriyel istilada önemli *P.*

chrysanthemi tarafından salgılanan PME'nin aksine, endojen bitki PME'leri, büyüme ve gelişme sırasında bitki hücre duvarının yeniden yapılandırılması için gereklidir (Fries *et al.* 2007).



Şekil 1.6. *Pectobacterium chrysanthemi* pektin metilesterazın protein sekonder yapısı

1.4. Rekombinant Protein Üretimi

Rekombinant DNA (rDNA) teknolojileri (genetik, protein ve metabolik mühendislik), hücrelerin doğal olarak üretmedikleri çok çeşitli peptitleri, proteinleri ve biyokimyasalları üretebilmesine izin verir. 1970'lerin ortalarında moleküler klonlamanın ortaya çıkmasıyla, yeni konaklarda yabancı proteinler üretmek mümkün hale gelmiş olup, farmasötik ürünler (insülin, interferonlar, eritropoietin, hepatit B aşısı vb) ve endüstriyel enzimler (gıda, yem, deterjan, kâğıt hamuru, sağlık bakımı için kullanılan) dünya pazarında rDNA ile yapılan ilk biyoteknoloji ürünleridir (Porro *et al.* 2005).

Genetiği değiştirilen organizmalardan yüksek seviyede protein üretimi, doğal kaynaklardan protein ekstraksiyonuna önemli bir alternatif sağlar. Doğal protein kaynakları genellikle sınırlıdır, ayrıca istenilen ürünün konsantrasyonu da genellikle düşüktür. Bu da ürünün ekstraksiyonunu çok pahalı ve hatta imkansız kılar. Ek olarak, ekstraksiyon, proteinin doğal orjinine bağlı olarak toksik veya kontamine olma tehlikesi taşıyabilir (Porro *et al.* 2005).

Günümüzde, yüksek organizmalardan (örneğin memeli, böcek veya bitki gibi) kültürlenmiş hücreler kadar, mikroorganizmalar da homolog proteinlerin yanı sıra heterolog protein üretimi için en sık kullanılan konaklar arasındadır. Mikroorganizmalar (prokaryotik ve ökaryotik), yüksek büyüme oranlarına sahip olmaları ve genetik manipülasyonlarının kolaylığı sebebiyle avantajlı konaklardır. Bu bakımdan, genetiği, moleküler biyolojisi, biyokimyasal, fizyolojik ve fermentasyon teknolojileri hakkındaki mevcut bilgilerinin fazla olması heterolog proteinlerin üretimi için *E. coli*'yi önemli bir konakçı haline getirmiştir. Ancak, bakteri konakçılarının doğru protein işleme kabiliyetine sahip olmadığı ve çoğu durumda heterolog proteinlerin bakteri hücrelerinde inklüzyon cisimciklerinde biriktirildiği ve çoğunlukla proteinlerin enzimatik aktivitelerini veya üç boyutlu yapılarını yitirmelerine neden olduğu belirtilmektedir. *In vitro* olarak doğru bir şekilde katlanamadıkları sürece insanlarda hatalı yapıya sahip bu tür proteinlerin kullanımı kabul edilmez (Porro *et al.* 2005).

Mikrobiyal ökaryotik konak sistemleri arasında, mayalar, tek hücreli organizmaların avantajlarını (genetik manipülasyon ve büyüme kolaylığı) ve ökaryotik organizmalar için özgün protein işleme kapasitesini (protein katlanması, birleşmesi ve translasyon sonrası modifikasyonlar) birleştirir. 1980'lerin başından itibaren, mayalarda üretilen rekombinant proteinlerin çoğu ABD Gıda ve İlaç İdaresi (Food and Drug Administration (FDA)) tarafından genellikle güvenli olarak kabul edilen (Generally Recognized as Safe (GRAS)) bir organizma olan *Saccharomyces cerevisiae*'da ifade edilmiştir (Porro *et al.* 2005).

Bununla birlikte, bazen, bu mayanın yüksek derecede gelişmiş ekipman gerektiren fermentasyon ihtiyaçları nedeniyle, yabancı proteinlerin büyük ölçekli üretimi için optimal bir konakçı olmadığı söylenebilir. Ek olarak, *S. cerevisiae* tarafından üretilen proteinler genellikle hiperglikozile edilir ve ürünlerin periplazmik boşluk içinde tutulması ile sıklıkla kısmi bir bozulma gözlenir. Bu bozulan ürünlerin genellikle istenen üründen uzaklaştırılması çok zordur. Bu gibi dezavantajlar, 1980'lerin ortalarından bu yana, mayalar arasında var olan büyük biyoçeşitliliği kullanmaya ve "geleneksel olmayan" mayaları kullanarak ekspresyon sistemlerinin geliştirilmesine katkı sağlayacak alternatif konakçı arayışlarını teşvik etmiştir. Geleneksel olmayan mayaların en öne çıkanları;

Hansenula polymorpha, *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia stipitis*, *Pichia methanolica*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Schwanniomyces (Debaryomyces) occidentalis* ve *Candida boidinii*'dir. Maya konukçusunun seçimi, tüm sürecin başarısı için büyük önem taşımaktadır (Porro *et al.* 2005).

Heterolog protein üretim sistemlerinin son zamanlardaki gelişmeleri göz önüne alındığında mayalar, metilotrofik ve metilotrofik olmayan mayalar olmak üzere iki kategoride gruplandırılmaktadır:

Metilotrofik Mayalar; bir karbon bileşimini, karbon ve enerji kaynağı olarak (örneğin metanol) metabolize etmek için temel bir yolu paylaşan bir grup maya türüdür (Porro *et al.* 2005; Wittmann 2017).

Metilotrofik Olmayan Mayalar; Çizelge 1.1'de yer alan vahşi tip (wild-type) mayaların birçoğu, etanol, içecekler, tat vericiler, enzimler, vitaminler, organik asitler ve tek hücreli proteinlerin (biyokütle) üretimi için belirli uygulamalarıyla bilinmektedir.

Metilotrofik mayalara biyoteknolojik açıdan gösterilen ilgi, 1970'lerin başında, metanolün ucuz bir şekilde elde edilebildiği fosil kaynaklarına dayandığından neredeyse sınırsız olarak kabul edildiği ve metanolden tek hücreli protein üretimi (metan oksidasyonundan sonra) işleminin geliştirilmesine yol açtığı zaman ortaya çıkmıştır. Ancak, 1970'lerin ortalarındaki petrol krizi, tek hücreli protein projelerinin sona ermesine neden olmuş, bununla birlikte, metilotrofik mayaların genetik karakterizasyonu, onların protein üretim platformları olarak "ikincil" kullanımlarına yol açmıştır (Wittmann 2017).

Çizelge 1.1. Rekombinant protein üretiminde kullanılan metilotrofik ve metilotrofik olmayan mayalar

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

Metilotrofik mayalardan iki tür, temel olarak heterolog protein ekspresyonu için kullanılır. Bunlardan biri *Pichia pastoris* (*Komagataella pastoris*), diğeri ise *Hansenula polymorpha* (*Pichia angusta*)'dır. Ek olarak, *Pichia methanolica* ve *Candida boidinii* de maya ekspresyon sistemleri olarak kullanılmaktadır (Porro *et al.* 2005).

1.4.1. *Pichia pastoris* ekspresyon sistemi

1.4.1.1. Genel bilgi

Metilotrofik bir maya olan *P. pastoris* (*K. phaffii*), 1-5 µm çapında, 5-30 µm uzunluğunda, oval şekilli, tek hücreli, karbon ve enerji kaynağı olarak metanolü kullanabilen bir organizmadır (Cregg 1999; Ünver 2014). Heterolog protein üretimi için en yaygın kullanılan ökaryotik ekspresyon sistemlerinden biridir (Vogl *et al.* 2018). Özellikle biyofarmasötiklerin ve endüstriyel enzimlerin üretimi için kurulmuş bir sistemdir (Looser *et al.* 2015). *P. pastoris*, genellikle güvenilir olarak tanınan (GRAS) bir organizma olarak tanımlanmıştır ve 2009'dan beri 500'den fazla farmasötik protein ve 1000'den fazla rekombinant protein üretimi için kullanılmıştır (Yang and Zhang 2018). Bu maya, çok yüksek hücre yoğunluklarına kadar büyütülebilir ve hücre içi olarak eksprese edilebilen

veya kültür ortamına salgılanabilen yüksek rekombinant protein üretimini gerçekleştirebilir (Spohner *et al.* 2015).

P. pastoris, 1980'lerde rekombinant proteinler için bir üretim sistemi olarak geliştirilmiştir. Glikoz ve diğer karbon kaynaklarının yanı sıra metanolde de büyüme kabiliyetine sahip olmasının biyoteknolojik uygulamalar için önemli etkileri vardır. Metanol kullanımı, heterolog genlerin ekspresyonu için kullanılan güçlü, sıkı düzenlenmiş promotörlerin gelişimine yol açmıştır. Sınırlı glikoz alımı ve etkili respirasyon, yüksek biyomas verimine ve dolayısıyla rekombinant proteinler gibi biyomas ile ilgili ürünlerin yüksek verimine izin verir (Wittmann 2017).

P. pastoris'in, *E. coli*'den sonra, tek protein ekspresyonu için en sık kullanılan ikinci ifade sistemi olduğu ortaya koyulmuştur (Vogl *et al.* 2018). Bu sistemin bazı avantaj ve dezavantajları aşağıda özetlenmiştir (Ünver 2014; Vogl *et al.* 2018; Yang and Zhang 2018).

Avantajları;

- Ökaryotik post-translasyonel modifikasyonları gerçekleştirebilir.
- Yüksek üretim kapasitesine sahiptir.
- Metanolü kullanabilir.
- Heterolog genlerin ekspresyonu için kullanılan güçlü, sıkı düzenlenmiş promotörlere sahiptir.
- Yüksek biyokütle verimi sağlar.
- Yüksek hücre yoğunluklu biyoreaktör üretimi için uygundur.
- Büyük miktarlarda heterolog proteinlerin salgılanmasını sağlar.
- Genetik modifikasyonlara müsaittir.
- Bir ekspresyon kasetinin çoklu kopyalarını taşıyabilir.
- Patojen değildir.
- Proteinleri hücre içi veya hücre dışı olarak yüksek miktarlarda eksprese edebilir.

Dezavantajları;

- Memeli proteinlerinin hipermannozilasyonuna sebep olabilir.
- AOX1 promotörünü indüklemek için işlem boyunca metanolü izlemek zordur.
- Metanol, yanıcıdır ve petrokimyasal bir madde olduğundan gıda endüstrisinde kullanımını uygun değildir.

P. pastoris'te eksprese edilen yabancı proteinler, hücre içi (intraselüler) veya hücre dışı (ekstraselüler) olarak üretilebilir. Bu maya yalnızca düşük seviyelerde endojen protein salgıladığından, salgılanan heterolog protein, ortamdaki total proteinin büyük çoğunluğunu oluşturur. Ayrıca saflaştırma işleminde hücre lizisi ve hücre kalıntıları istenmediğinden heterolog bir proteinin kültür ortamına salgılanması istenen bir durumdur (Cereghino and Cregg 2000). Proteinler, bir konakçı organizmadan N-terminali salgılama sinyalleri yardımıyla salgılanabilir. Bu amaç için kullanılan salgı sinyalleri Çizelge 1.2'de verilmiştir (Ahmad *et al.* 2014). *P. pastoris* için en yaygın kullanılan salgılama sinyali ise *S. cerevisiae* α -eşleşme faktörü (α -MF) sinyalidir (Ünver 2014; Duan *et al.* 2019).

Çizelge 1.2. Proteini hücre dışına salgılamak için kullanılan sinyal dizileri

Salgılama sinyali	Kaynak	Hedef protein
α -MF	<i>S. cerevisiae</i> α -eşleşme faktörü (<i>S. cerevisiae</i> α -mating factor)	<i>P. pastoris</i> 'te en yaygın kullanılan salgılama sinyali
PHO1	<i>P. pastoris</i> asit fosfataz	Fare 5-HT5A, domuz pepsinojen
SUC2	<i>S. cerevisiae</i> invertaz	İnsan interferon, α -amilaz, α -1-antitripsin
PHA-E	Phytohemagglutinin	GNA, GFP ve native protein
KILM1	K1 toksin	CM selüla
pGKL	pGKL killer protein	Fare α -amilaz

Çizelge 1.2. devamı...

CLY ve CLY-L8	C-lizozim ve lösin-zengin peptide	İnsan lizozim
K28 pre-pro-toxin	K28 virüs toksin	Green fluorescent protein (GFP)
Scw, Dse ve Exg	<i>P. pastoris</i> endojen sinyal peptidleri	CALB ve EGFP
<i>Pp</i> Pir1	<i>P. pastoris</i> Pir1p	EGFP ve insan α 1-antitripsin
HBFI ve HBFII	<i>Trichoderma reesei</i> hidrofobinleri	EGFP

1.4.1.2. *P. pastoris*'in fizyolojisi

Yaygın olarak *P. pastoris* olarak bilinen maya, Fransız mikolog ve sitolog Alexandre Guilliermond tarafından ilk olarak *Zygosaccharomyces pastori* olarak tanımlanmıştır (Peña *et al.* 2018). Dünyadaki ilk izolat, Fransa'daki bir kestane ağacının eksüdasından izole edilmiştir (Wittmann 2017). 1950'lerde Herman Phaff, Kaliforniya'daki meşe ağaçlarından ilgili birkaç suşu izole etmiş ve türü *Pichia pastoris* olarak yeniden adlandırmıştır (Peña *et al.* 2018). 1980'lerde yaşanan yoğun çabaların bir sonucu olarak, *P. pastoris*, temel ve uygulamalı araştırmalar için en gelişmiş moleküler ve hücresel bir biyolojik sistem olarak öne çıkmıştır. *P. pastoris* üzerindeki biyoteknolojik çalışma, 1970'lerde Phillips Petrol Şirketi'ndeki (Phillips Petroleum Company) araştırmacıların Kuzey Bölgesel Araştırma Laboratuvarı'nda (Northern Regional Research Laboratory) metilotrofik bir suş ve karbon kaynağı olarak metanolü kullanarak yüksek yoğunluklu maya fermantasyonunu test etmek ve geliştirmek için diğer koleksiyonları elde etmeleriyle başlamıştır (Cregg *et al.* 2010).

1.4.1.3. Promotörler

P. pastoris'te rekombinant protein ekspresyonu için, plazmit, promotör, seçim markırı, salgılama sinyal sekansı ve konakçı suşu içeren uygun rekombinant sistemi tasarlamak çok önemlidir. Rekombinant protein ekspresyonu için kullanılan promotörler, kontrol edilen gen ekspresyonunun biçimine bağlı olarak farklı tiplerdedir (Juturu and Chuan

2018). *P. pastoris*'te heterolog protein üretimi için kullanılan yapısal ve indüklenebilir promotörler, bu promotörlerle ilgili genler ve düzenlenme şekilleri Çizelge 1.3 ve Çizelge 1.4'te verilmiştir (Ahmad *et al.* 2014; Juturu and Chuan 2018).

Çizelge 1.3. *P. pastoris*'te heterolog protein üretiminde sıklıkla kullanılan yapısal promotörler

Promotör adı	İlgili Gen	Düzenlenme
GAP	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (Glyceraldehyde-3-P dehydrogenase)	Glikozda yapısal ekspresyon, gliserol ve metanolde daha az ekspresyon
TEF1	Translasyon uzama faktörü 1 (Translation elongation factor 1)	Gliserol ve glikozda yapısal ekspresyon
PGK1	3-Fosfogliserat kinaz (3-Phosphoglycerate kinase)	Glikozda yapısal ekspresyon, gliserol ve metanolde daha az ekspresyon
GCW14	Potansiyel glikozil fosfatidil inozitol (GPI) bağlı protein (Potential glycosyl phosphatidyl inositol (GPI)-anchored protein)	Gliserol, glikoz ve metanolde yapısal ekspresyon
G1	Yüksek afiniteli glikoz taşıyıcı (High affinity glucose transporter)	Gliserolde baskılanır, glikoz sınırının üzerinde indüklenebilir.
G6	Muhtemel aldehit dehidrogenaz (Putative aldehyde dehydrogenase)	Gliserolde baskılanır, glikoz sınırının üzerinde indüklenebilir.

Çizelge 1.4. *P. pastoris*'te heterolog protein üretiminde sıklıkla kullanılan indüklenebilir promotörler

Promotör adı	İlgili gen	Düzenlenme
AOX1	Alkol oksidaz 1 (Alcohol oxidase 1)	Metanol ile indüklenebilir, glikoz ve gliserol ile baskılanır.
DAS	Dihidroksiaseton sentaz (Dihydroxyacetone synthase)	Metanol ile indüklenebilir.
FLD1	Formaldehit dehidrogenaz 1 (Formaldehyde dehydrogenase 1)	Metanol veya metilamin ile indüklenebilir.
ICL1	İzositrat liyaz (Isocitrate lyase)	Glikoz ile baskılanır, Glikoz yokluğunda veya etanol ile indüklenebilir.
THI1	Tiamin biyosentezis geni (Tiamin biosynthesis gene)	Tiamin ile baskılanır.
ADH1	Alkol dehidrogenaz (Alcohol dehydrogenase)	Glikoz ve metanol ile baskılanır, Gliserol ve etanol ile indüklenebilir.
ENO1	Enolaz (Enolase)	Glikoz, metanol ve etanol ile baskılanır, Gliserol ile indüklenebilir.
GUT1	Gliserol kinaz (Glycerol kinase)	Metanol ile baskılanır, gliserol, glikoz ve etanol ile indüklenebilir.

Alkol oksidaz (AOX) promotörü

P. pastoris'in genomu, iki alkoloksidaz enzimini kodlayan iki AOX genini (AOX1 ve AOX2) içerir. AOX1, tek karbon kaynağı olarak metanol üzerinde büyüyen maya ekstraktındaki toplam çözümlü proteinlerin %30'unu oluşturan ana enzimi üreten güçlü bir promotördür. AOX2 ise zayıf bir promotör tarafından kontrol edilir ve hücre içindeki toplam AOX aktivitesinin %15'ine katkıda bulunur (Juturu and Chuan 2018).

AOX1 gen ürünü, metanol kullanım yolağının (Methanol utilization-MUT) başlatılmasında en önemli proteindir. *P. pastoris* MUT yoluna göre enerji üretimi için metanolü bir karbon kaynağı olarak metabolize eder. Maya hücresindeki metanolün metabolizması hem peroksizom hem de sitozolde gerçekleşir. AOX1 promotörünü kullanmanın avantajları şu şekildedir; bu promotörün kontrolü altındaki yabancı proteinlerin transkripsiyonu sıkı bir şekilde düzenlenir ve baskılanma / geri-baskılanma mekanizması tarafından kontrol edilir, yüksek seviyelerde heterolog protein ekspresyonu sağlanabilir, AOX1 geninin metanol dışındaki çoğu karbon kaynağı tarafından baskılanması, gen ekspresyonundan önce yüksek hücre büyümesini sağlar ve transkripsiyonun indüklenmesi, bir indükleyici olarak basit metanol ilavesiyle kolayca elde edilir (Juturu and Chuan 2018).

Bu promotör sistemini kullanmanın dezavantajları arasında; fermantasyon sırasında metanol kullanımının izlenmesinin zor olması, metanolün oldukça yamcı olması, bu nedenle metanolün büyük ölçekli depolanmasının istenmemesi, metanolün petrokimyasal bir ürün olması nedeniyle, terapötik ve gıda uygulamaları için protein üretiminde kullanımının istenmeyen bir durum olması ve iki karbon kaynağının kullanımından dolayı (glüközün büyüme fazında, metanolün indüksiyon fazında kullanımı) kesin bir zamanda birinden diğerine geçiş zorluğunun varlığı yer alır (Juturu and Chuan 2018).

Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAP) promotörü

GAP promotörü, glikoz, gliserol, etanol ve oleik asit dahil olmak üzere tüm karbon kaynaklarında proteinleri sürekli olarak eksprese eden yapısal bir promotördür. GAP promotörü, *P. pastoris*'te heterolog protein üretimi için AOX1 promotörü yerine kullanılabilir. GAP promotörünü kullanmanın avantajları; metanol içermeyen protein ekspresyonu gerçekleştirilmesi ve indüksiyon için kültürün bir karbon kaynağından diğerine geçme zorunluluğunun olmamasıdır. Bununla birlikte, heterolog toksik proteinlerin sürekli üretimi, maya hücreleri için toksik olabilir ve ölümlerine yol açabilir. Bu yüzden bu tip proteinlerin üretimi indüklenebilir promotörler ile kontrol edilebilir (Juturu and Chuan 2018).

1.4.1.4. Seçilebilir markırlar

P. pastoris, moleküler genetik manipülasyon için birkaç seçilebilir marker gene sahiptir. Rekombinant protein ekspresyonu için kullanılan plazmitler, zeosin, blastisidin ve kanamisine direnç sağlayan *Shble*, *bsr* ve *nptII* veya *nptIII* gibi antibiyotik direnç markerleri içerir. *P. pastoris*'te kullanılan dominant ve resesif seçim markırları Çizelge 1.5 ve Çizelge 1.6'da verilmiştir (Wittmann 2017; Juturu and Chuan 2018).

Çizelge 1.5. *P. pastoris*'te kullanılan dominant seçim markırları

Direnç	Gen	Seçici kimyasal
Kan ^R	Neomisin fosfotransferaz (Neomycin phosphotransferase)	G418/genetisin
Zeo ^R	<i>ShBle</i> geni	Zeosin (<i>E.coli</i> ve maya)
Bsd ^R	Blastisidin S deaminaz (Blasticidin S deaminase)	Blastisidin (<i>E.coli</i> ve maya)

Çizelge 1.5. devamı...

HygMX	Higromisin fosfotransferaz (Hygromycin phosphotransferase)	Higromisin (<i>E.coli</i> ve maya)
KanMX	Neomisin fosfotransferaz (Neomycin phosphotransferase)	Kanamisin (<i>E.coli</i>), G418 (maya)
ARS	<i>S. cerevisiae</i> ARR3	Arsenik
NatMX	<i>sat1</i> -nurseotrisin asetil transferaz <i>sat1</i> -nurseothricin acetyltransferase	Nurseotrisin (<i>E. coli</i> ve maya)

Çizelge 1.6. *P. pastoris*'te kullanılan resesif seçim markırları

Biyosentetik markır	Gen
HIS4	Histinidol dehidrogenaz (Histinidol dehydrogenase)
ARG4	PR-amid imidazol süksinik karboksamid sentaz (PR-amidoimidazolesuccinocarboxamide synthase)
ADE1	Argininosüksinat liyaz (Argininosuccinate lyase)
URA3	Orotidin 5'-fosfat dekarboksilaz (Orotidine 5'-phosphate decarboxylase)
URA5	Orotat fosforibosil transferaz (Orotate phosphoribosyl transferase)
ADE2	Fosforibosilaminoimidazol karboksilaz (Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase)

Çizelge 1.6. devamı...

HIS1, HIS2, HIS5, HIS6	Histidin biyosentezi genleri (Histidine biosynthesis genes)
ARG1, ARG2, ARG3	Arginin biyosentezi genleri (Arginine biosynthesis genes)
MET2	Homoserin O-transasetilaz (Homoserine O-transacetylase)
FLD1	Formaldehit dehidrogenaz (Formaldehyde dehydrogenase)

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Lin-Cereghino *et al.* (2008), modifiye bir Tn903kanr geni kullanarak G418 (genetisin) direnci ile *P. pastoris* transformantlarının direkt seçilimi için kullanılabilecek yeni bir ekspresyon vektörü elde etmişlerdir. Çalışmada, zeosin ve G418 direncine sahip pAC1 vektörünü oluşturmak için pPIC3K plazmitindeki kanamisin direnç genini uygun primerlerle çoğaltarak pGAPZ B vektörüne klonlamışlardır. Elde edilen pAC1 vektöründen GAP promotör sekansını, kanamisin direnç genini kodlayan sekansı ve AOXI transkripsiyonel sonlanma sekansını içeren bölgeyi pPICZ B ve pPICZ α B vektörüne klonlayarak pKAN B ve pKAN α B vektörlerini elde etmişlerdir. Daha sonra pAC1, pKAN B ve pKAN α B vektörlerini AOXI promotör bölgesinden *Xma*JI veya *Sac*I restriksiyon enzimleri ile lineer hale getirerek *P. pastoris*'e gönderip, bir saatlik YPD besiyerinde inkübasyona bırakılan hücreleri daha sonra seçici plaklara almışlardır. G418 direncine sahip koloniler 96 saat boyunca YPD plaklarda büyütülüp daha sonra YPD-G418 plaklara alınarak 48 saatlik inkübasyon sonrası her bir plakta gözlenen koloni sayısı belirlenmiştir.

Jiang *et al.* (2013), yaptıkları çalışmada *Aspergillus niger* pektin metilesteraz (PME) genini pGAPZ α A vektörünün çoklu klonlama bölgesine yerleştirmiş ve *P. pastoris* GS115 suşuna elektroporasyon ile transfer etmişlerdir. GAP promotörü altında ekspresyonu gerçekleştirilen rekombinant PME'nin maksimum ekspresyon seviyesi ve aktivitesi 96. saatte gözlenmiştir. Bu nedenle saflaştırma için 30 °C'de 96 saat boyunca PME ekspresyonu gerçekleştirmişlerdir. Agaroz plak aktivite yöntemi için kültür süpernatantlarını kullanmışlardır ve pGAPZ α A-PME içeren hücrelerin kültür süpernatantlarında aktivite gözlenirken pGAPZ α A içeren hücrelerin kültür süpernatantlarında aktivite zonu gözlenmemiştir. Ayrıca yapmış oldukları aktif boyama sonucunda pGAPZ α A-PME içeren hücrelerin kültür süpernatantlarında 50 kDa'luk protein bandı gözlenirken pGAPZ α A içeren hücrelerin kültür süpernatantlarında bant gözlenmemiştir. Anyon değişimi kromatografisi ve katyon değişimi kromatografisi ile yapılan PME saflaştırılması HPLC'de tek bant görülmesi ile de doğrulanmıştır. Son kromatografi aşamasından sonra elde edilen saf PME'nin spesifik aktivitesi ve genel geri

kazanımı sırasıyla 342 U/mg ve %28,0 olarak belirlenmiştir. Ayrıca rekombinant PME'nin pH 4,7 ve 50 °C'de optimum aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir.

Liu *et al.* (2014), yapmış oldukları çalışmada maya ekspresyon vektörü pPICZ α A'ya yerleştirdikleri EGFP (Enhanced green fluorescent protein) geniyle elde ettikleri pPICZ α -EGFP rekombinant plazmitini *SacI* nükleazı ile lineer hale getirerek kompetent *P. pastoris* X33 hücrelerine transforme etmişlerdir. 100 μ g/mL zeosin içeren plaklarda seçilen koloniler PCR ile doğrulandıktan sonra ikinci bir transformasyon için kompetent hale getirilmiş ve çok kopya transformantlar elde etmek için 1,000 ve 2,000 μ g/mL zeosin içeren YPD plaklarda seçim yapıp PCR ile doğrulamışlardır. Elde ettikleri transformantlarda kopya sayısı belirlemek amacıyla yaptıkları Real Time PCR'da referans gen olarak *P. pastoris*'te tek kopya olarak bulunan homoserin O-transasetilaz geni (MET2) kullanıp 1'den 6'ya kadar kopya sayısına sahip kolonileri belirlemişlerdir. GFP ekspresyonuna bakıldığında 3 kopyaya kadar, kopya sayısı ve salgılanan protein arasında pozitif bir korelasyon olduğu görülürken, 4 ve 5 kopyaya sahip olanlarda GFP'nin hücre içinde birikiminin gözlemlendiği, 6 kopyaya sahip olan kolonide ise negatif bir korelasyon görüldüğü bildirilmiştir. Dolayısıyla, çalışmada gen dozunun artırılmasının belirgin etkisinin bir kopyadan dört kopyaya kadar, GFP geninin transkripsiyon seviyesinde artış olduğunu ve daha fazla gen dozajının artmasının, transkripsiyonun azalmasına yol açtığını belirlemişlerdir.

Lu *et al.* (2016), *P. pastoris*'te ksilanaz ekspresyon seviyesini arttırmak için bu proteini kodlayan gende toplam 139 nükleotidi *P. pastoris* kodon eğilimine göre optimize etmişlerdir. Kodon optimizasyonu sonrası GC içeriği %42,41'den %39,60'e değişmiştir. Optimize geni *E. coli* DH5 α 'ya transfer ederek ampisilin içeren LB plaklarda seçim yaptıktan sonra elde edilen rekombinant plazmiti *SalI* enzimi ile lineer hale getirmiş ve *P. pastoris* GS115'e elektroporasyon ile transfer etmişlerdir. Histidin içermeyen MD plaklarda transformant seçilimi yaptıktan sonra pozitif transformantları, %0,5 Remazol Brilliant Blue (RBB)-xylan içeren BMMY plaklarda tanımlamışlardır. RBB-xylan plaklarda seçim yapılarak en büyük zona sahip koloninin (Y16) en yüksek kopya sayısına, en küçük zona sahip koloninin (P81) ise tek kopya gene sahip olduğunu varsayarak fermantasyona tabi tutmuşlardır. Y16 ve P81 kültür süpernatantlarının SDS-

PAGE analizi sonucunda yaklaşık 29,6 kDa ve 32,2 kDa moleküler ağırlıkta iki protein bandı görmüşlerdir. Y16 suşunun protein verimi, P81'inkinden 10 kat daha fazlayken, P81 kültür sıvısındaki ksilanaz aktivitesinin 907 U/ml, Y16 kültür sıvısındaki ksilanaz aktivitesinin ise 6,403 U/ml olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca genomdaki kopya sayısını belirlemek amacıyla Real Time PCR yapmışlardır. En küçük zona sahip olan koloni (P81) kalibratör suş olarak kullanılırken GAP geni referans gen olarak kullanmışlar ve Y16 suşunun kopya sayısını 9,15 olarak belirlemişlerdir. Sonuç olarak Y16 suşuna ait ham enzim çözeltisinin, saflaştırılmaksızın doğrudan ağartma işleminde kullanılmak için uygun olduğunu belirlemişlerdir.

Wahyuni *et al.* (2016), termostabilitesini ve katalitik etkinliğini arttırmak amacıyla *Candida antarctica* lipase B kodlayan wild-type CALB (CALB-wt) geninde farklı pozisyonlarda üç amino asitte değişim yapmışlardır. Elde ettikleri *CalBsyn* sentetik genini *XhoI* restriksiyon enzimi ile keserek *E. coli* TOP10F' hücrelerine transfer edip pGAPZα-*CalBsyn* rekombinant vektörünü elde etmişlerdir. Plazmit DNA'nın transformasyon etkinliğini ise $4,11 \times 10^3$ cfu/μg olarak belirlemişlerdir. Transformant *E. coli* hücrelerini doğrulamak için koloni PCR yapmışlardır. Daha sonra doğrulanan rekombinant vektörü, *BspHI* (*PagI*) restriksiyon enzimi ile lineer hale getirerek elektroporasyon metodu ile *P. pastoris* SMD1168H hücrelerine $1,01 \times 10^2$ cfu/μg DNA transformasyon etkinliğiyle göndermişlerdir. Transformantları 100, 200, 500, ve 1000 μg/mL konsantrasyonlarındaki zeosin plaklarda taramışlardır. 100 μg/mL zeosin plakta kolonilerin %90'nının büyüme gösterdiğini görürken; bu oranın 200 ve 500 μg/mL zeosin plaklarda %40 olduğunu belirlemişlerdir. 1000 μg/mL zeosin plakta ise koloni gözlenmemiştir. Lipaz aktivitesi için substrat olarak p-nitrofenil bütirat (PNPB), pozitif kontrol olarak *Candida rugosa* lipazı (CRL) kullanmışlardır. Maksimum lipaz aktivitesini 48 saat sonunda 6,35 U/mL olarak belirlemişlerdir. Ayrıca kültür süpernatantıyla yapmış oldukları SDS-PAGE analizi sonucunda yaklaşık 45 kDa moleküler kütleye sahip olan CALB proteinini görüntülemişlerdir.

Yang *et al.* (2016), *P. pastoris* GS115 suşunda proteinase K'yı yüksek seviyede üretmeyi amaçlamışlardır. Bunun için, *P. pastoris*'in kodon kullanımına göre optimize ettikleri

proteinaz K genini *E. coli* XL10-Gold hücrelerinde klonladıktan sonra pHBM905BDM-MPK1 rekombinant plazmitini elde etmişlerdir. Hedef genin çoklu kopyalarını taşıyan rekombinant ekspresyon vektörlerini oluşturmak için, farklı yapışkan uçlara sahip iki ekspresyon kaseti veren *EcoRI/SpeI* veya *XbaI/BamHI* kullanılarak hedef genin bir kopyasını taşıyan rekombinant pHBM905BDM plazmitinden, promotör, öncü sinyal sekansı, hedef ORF ve terminatör içeren ekspresyon kaseti elde edilip ekspresyon kasetleri ve vektör ligasyon yapılarak 2, 3, 4 ve 5 kopyası olan ve sırasıyla pHBM905BDM-MPK2, pHBM905BDM-MPK3, pHBM905BDM-MPK4 ve pHBM905BDM-MPK5 olarak adlandırılan vektörleri elde edilmiştir. Elde edilen bu beş vektörü (MPKS1, MPKS2, MPKS3, MPKS4 ve MPKS5) *SalI* restriksiyon enzimi ile lineer hale getirerek *P. pastoris* GS115 suşuna elektroporasyon ile transfer etmişlerdir. Transformantları histidin içermeyen MD plaklarda seçmişlerdir. Seçilen kolonilerden eşit miktarda BMGY kültürüne inoküle edilip gece boyu inkübe edildikten sonra BMMY kültürüne alınarak her 24 saatte bir metanol indüksiyonu ile Proteinaz K proteini üretilmiştir. Yapılan SDS-PAGE analizi sonucunda 30 kDa moleküler ağırlığa sahip tek bant gözlenmiştir. MPKS2, MPKS3, MPKS4 ve MPKS5 suşlarının eşit miktarda hücre tarafından üretilen enzim aktivitelerinin, tek kopya sahip MPKS1'den sırasıyla 1,68, 1,95, 2,23 ve 2,30 kat daha yüksek olduğu görülmüştür. Kopya sayısı belirlemek için yapılan qPCR sonucuna göre; mpk-P gen kopya sayısının, MPKS1, MPKS2, MPKS3, MPKS4 ve MPKS5 suşlarında GAP gen kopya sayısına kıyasla sırasıyla 0,82, 1,80, 2,65, 4,05 ve 4,75 kat olduğu görülmüştür. MPKS2, MPKS3 ve MPKS4 suşlarındaki mRNA seviyelerinin gen kopya numarası ile anlamlı şekilde ilişkili olduğu ve sırasıyla her bir suşun gen kopya sayısının MPKS1 suşunun yaklaşık 1,4, 2,9 ve 4,3 katı olduğu görülmüştür. MPKS5 suşunun fermantasyonu sonucu, sırasıyla yaklaşık 8,069 mg/mL ve 108,295 U/mL olan en yüksek protein verimine ve enzim aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak; bu çalışma ile Proteinaz K, *P. pastoris*'te ilk kez üretilmiş ve üretimde çoklu kopya ekspresyon stratejisi kullanılmıştır. 108,295 U/mL'nin üzerinde gözlenen verim, bu ekspresyon sisteminin proteinazların yüksek seviyede ekspresyonu için güçlü bir araç olduğunu da göstermiştir.

Ünver vd (2018), bir telomeraz inhibitörü olan insan PinX1 genini (hPinX1) *P. pastoris*'e göndererek over-ekspresyonunu sağlamışlardır. Bu amaçla hPinX1'i pPICZ α A vektörüne yerleştirildikten sonra *E. coli* One Shot TOP10 hücrelerinde klonlayarak pPICZ α A-hPinX1 rekombinant vektörünü elde etmişlerdir. Elde edilen rekombinant vektörün *P. pastoris*'e transformasyonu için LiCl metodunu kullanmışlardır. 100 μ g/mL zeosin içeren YPD plaklara yayarak 2-3 gün sonra elde ettikleri transformantları koloni PCR ile doğrularak seçilen koloninin üretimine geçmişlerdir. 48 saatlik üretim sonunda hücre peleti ve kültür süpernatantından yaptıkları western blot analizinde sadece hücre ekstraktında bant gözlemlemişlerdir. Bu proteinin üretimi için yaptıkları optimizasyon çalışmalarında ise üretimin en fazla olduğu süre 48 saat olarak belirlenirken; indükleme için gerekli metanol konsantrasyonu ve başlangıç kültür pH'ı ise sırasıyla %3 ve 5,0 olarak belirlenmiştir.

Wang *et al.* (2019), yaptıkları çalışmada, α -L-ramnosidaz üreten bir tür olan *A. niger* CCTCC M 2018240'ı çürümüş portakal kabuklarından izole etmiş, bu mikroorganizmaya ait α -L-ramnosidaz kodlayan geninin (*rha*) *P. pastoris* GS115 suşunda başarıyla ifade edilmesini sağlamışlardır. *E. coli* JM109'a transfer işlemi için hem geni hem de pPIC9K vektörünü *EcoRI* and *AvrII* restriksiyon enzimleriyle kesmişlerdir. Elde ettikleri pPIC9K-*rha* rekombinant vektörünü *SalI* enzimi ile lineer hale getirerek *P. pastoris*'e elektroporasyon ile göndermişlerdir. MD plaklarda elde edilen rekombinantların genetisin (G418) (0,5–4,0 mg/mL) içeren YPD plaklarda çok kopyaları taranmıştır. 4,0 mg/mL G418-YPD plaklarda büyüyen 4, 9, 10 ve 14. koloniler alınıp BMMY besiyerinde ön kültüre edilerek OD₆₀₀ değeri 2-4'e ulaşınca BMMY üretim kültürüne alınmıştır. α -L-rha üretimini sağlamak için her 24 saatte bir kültür ortamına %0,5 oranında metanol ilave edilmiştir. Enzim aktivitesi için p-Nitrofenil- α -L-ramnopiranosid (pNPR)'i substrat olarak kullanarak aktivite tayini yapmışlardır. GS115/pPIC9K-*rha*-14'ün 0,47 U/mL Rha aktivitesine ve 0,57 U/mg spesifik aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca *rha* aktivitesinin doğal suş olan *A. niger* CCTCC M 2018240'den 3,13 kat daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Daha sonra maksimum enzim aktivitesinin 3 litrelik fermentörde 46,87 U/mL'ye ulaştığını ve bu enzimin çalkalamalı flaskta üretilenden 99,72 kat daha aktif olduğunu görmüşlerdir.

Türkanoglu Özçelik vd (2019), *Streptomyces mobaraensis* mikrobiyal pro-transglutaminaz (pro-MTGase) enziminin *P. pastoris*'te yapısal GAP promotörü kontrolünde rekombinant üretimini gerçekleştirmişlerdir. Bunun için pGAPZ α A vektörünü ve pro-MTGase genini *XhoI* ve *XbaI* restriksiyon enzimleriyle keserek ligasyon ürünlerini kompetent *E. coli* XL1Blue hücrelerine transfer etmişlerdir. Elde ettikleri pGAPZ α -pro-MTGase plazmitini *AvrII* enzimi ile lineer hale getirip elektroporasyon ile *P. pastoris* X33 suşuna göndermişlerdir. 100 mg/L ve 500 mg/L zeosin plaklarda seçtikleri 7 koloni için Southern Blot analizi yaparak tek kopyaya sahip transformantı belirlemişlerdir. Belirlenen tek-kopya transformant pro-MTGase enzimin ekspresyonu için optimum şartları belirlemede kullanılmış; optimum sıcaklık ve pH sırasıyla 20 °C ve 7,5 olarak belirlenmiştir.

Tang *et al.* (2019), β -mannanaz'ın *P. pastoris*'te GAP promotörü kontrolü altında yüksek seviyede ekspresyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu amaçla *A. niger* β -mannanaz genini pGAPZ α A vektörüne klonlayarak elde ettikleri pGAPZ α A-man rekombinant plazmitini *P. pastoris* X33 suşuna göndermişlerdir. Farklı sayıda gen kopyasına sahip transformantları 100, 200, 500, 1000 ve 2000 μ g/mL zeosin içeren YPD plaklarda taramışlardır. Kopya sayısını belirlemek için izole ettikleri genomik DNA'ları kalıp olarak kullanarak qRT-PCR yapmışlardır. GAP geni *P. pastoris* genomunda tek kopya olarak bulunduğundan man/GAP oranını genoma entegre olan gen kopya sayısını hesaplamak için kullanmışlardır. Sonuç olarak 1, 3, 4, 5 ve 7 kopyaya sahip kolonileri üretim şartlarını karşılaştırmak üzere kültür ortamına almışlardır. Üretim sonunda farklı kopyaya sahip transformantların hücre yoğunluğuna bakıldığında 1 kopyaya sahip olan koloninin (M1) hücre yoğunluğunun 7 kopyanınkinden (M7) daha fazla olduğunu görmüşlerdir. Bu da kopya sayısı yüksek olan eksojen genin hücre büyümesi üzerinde önemli bir olumsuz etkiye sahip olduğunu göstermiştir. β -mannanaz aktivitesine baktıklarında ise aktivitenin 50 U/mL'den (M1 suşuna ait), 202 U/mL'a (M4 suşuna ait) doğru arttığını belirlemişlerdir. M5 ve M7 suşlarından elde edilen enzim aktivitelerinde ise M4'den önemli bir artışı olmadığını görmüşlerdir. Yapılan kültür ortamı için sıcaklık denemelerinde (22 °C, 26 °C, 30 °C) ise düşük sıcaklığın, yüksek gen kopya sayısına sahip suşlarda β -mannanaz ekspresyonunu arttırmada düşük gen kopya sayısına sahip

suşlara göre daha etkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca, 5 L'lik fermentasyon kültüründe en yüksek rekombinant β -mananaz aktivite seviyesini 2124 U/mL olarak belirlemişlerdir.

Şensoy Gün (2019), *P. pastoris* ekspresyon sistemini kullanarak AOX (alkol oksidaz) promotörünün kontrolü altında azurin proteininin üretimini amaçlamıştır. Bu amaçla, *Pseudomonas aeruginosa* gDNA'sından elde ettiği azurin genini pPICZ α A vektörüne yerleştirip *E. coli* One Shot TOP10 hücrelerinde klonlamıştır. Daha sonra elde ettiği rekombinant plazmidi (pPICZ α A-Azu), *PmeI* enzimi ile lineer hale getirerek *P. pastoris* X33 hücrelerine LiCl metodunu kullanarak transfer etmiştir. Çok sayıda kopya taşıyan kolonileri belirlemek için, YPD-zeosin plaklarda gelişen kolonilerden 6 tanesini seçerek farklı konsantrasyonlarda zeosin (0,1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1 mg/mL ve 2 mg/mL) içeren plaklarda seçim yapmıştır. Seçilen dört farklı koloninin protein üretim kapasitelerini karşılaştırmak için, transformantlar gliserol içeren ön kültür besiyerlerinde gece boyu inkübe edildikten sonra %0,5 metanol ve %1 sorbitol içeren üretim besiyerlerine aktarılarak 48 saat boyunca çalkalamalı inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrası elde edilen kültür süpernatantları ve hücre lizatları ile yapılan Western blot analizi ile transformantların tümünün rekombinant proteini hem ekstrasellüler hem de intrasellüler ürettiği gözlenmiştir. Ayrıca 1. koloniyi oluşturan hücrelerin protein üretim kapasitesinin diğer kolonileri oluşturan hücrelerin üretim kapasitesinden daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Rekombinant *P. pastoris* hücreleri tarafından üretilen ekstrasellüler azurin proteininin molekül kütlesinin yaklaşık 20 kDa olduğu tespit edilmiştir.

2.1. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı; *Pichia pastoris* ile rekombinant protein üretimini ekstrasellüler olarak gerçekleştirebilmek için *S. cerevisiae* α -faktör sinyal sekansını pGKB'ye yerleştirerek pGKB α vektörünü elde etmek ve pGKB α vektörünü kullanarak *Pectobacterium chrysanthemi* PME enzimini GAP promotörü kontrolünde ekstrasellüler olarak üretmektir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Çalkalayıcı inkübatör (IKA KS 3000 i ve JSR), Gradyent PCR cihazı (SensoQuest), Hassas terazi (Shimadzu-ATX224), Isıtıcıli manyetik karıştırıcı (Heidolph), İnkübatör (Memmert), Mikroplate okuyucu (BioTek Epoch), Mikroskop (ZEISS), Mini santrifüj (IKA mini G), Otoklav (HMC HIRAYAMA), PCR cihazı (Applied Biosystems ProFlex), pH metre (Mettler Toledo), Saf su cihazı (MILLIPORE Direct-Q 8 UV), Santrifüj (Beckman Coulter-Allegra X30R), Soğutmalı sirkülatörlü su banyosu (Vivo iTherm Polyscience), Steril kabin (ESCO), SDS-PAGE sistemi (BIO-RAD), Su banyosu (Memmert), UV görüntüleme cihazı (BIO-RAD Gel Doc™ XR+), UV spektrofotometre (SHIMADZU UV 1800), Vorteks (Heidolph), - 80 °C dondurucu (NUAIRE).

3.1.2. Kimyasallar ve besiyerler

Çalışmada kullanılan besiyerler, kitler, DNA ve protein markırları ile diğer tüm kimyasallar, ThermoFisher Scientific, Sigma, Invitrogen, Merck, Fluka, ChemCruz, Gibco, Intron ve Oxoid firmalarından tedarik edildi.

3.1.3. Kullanılan mikroorganizmalar

Çalışmada kullanılan *P. pastoris* X33 mayası Invitrogen, *E. coli* JM109 bakterisi ise Promega firmasından temin edildi.

3.1.4. Tasarlanan primerler

α -faktör sinyal sekansına ve PME genine ait restriksiyon kesim enzimlerinin tanıma dizilerini içeren forward ve reverse primerler www.thermofisher.com (Tm calculator) adresinden uygun Tm sıcaklıkları hesaplanarak tasarlandı (Çizelge 3.1, Çizelge 3.2).

Çizelge 3.1. α -faktör sinyal sekansının amplifikasyonu için dizayn edilen primerler

Primer Adı	Sekansı	Taq Pol. Tm (°C)	HF Pol. Tm (°C)	%GC	Uzunluk (bp)
<i>AsuII</i> -Alpha-F	5'-CGCTTCGAAATGAGATTCCTTCAA-3'	54.0	58.6	40.0	25
<i>EcoRI</i> -Alpha-R	5'-TTGGAATTCAGCTTCAGCCTCTCTT-3'	56.0	61.1	44.0	25

*altı çizili sekanslar enzim tanıma bölgelerini içerir.

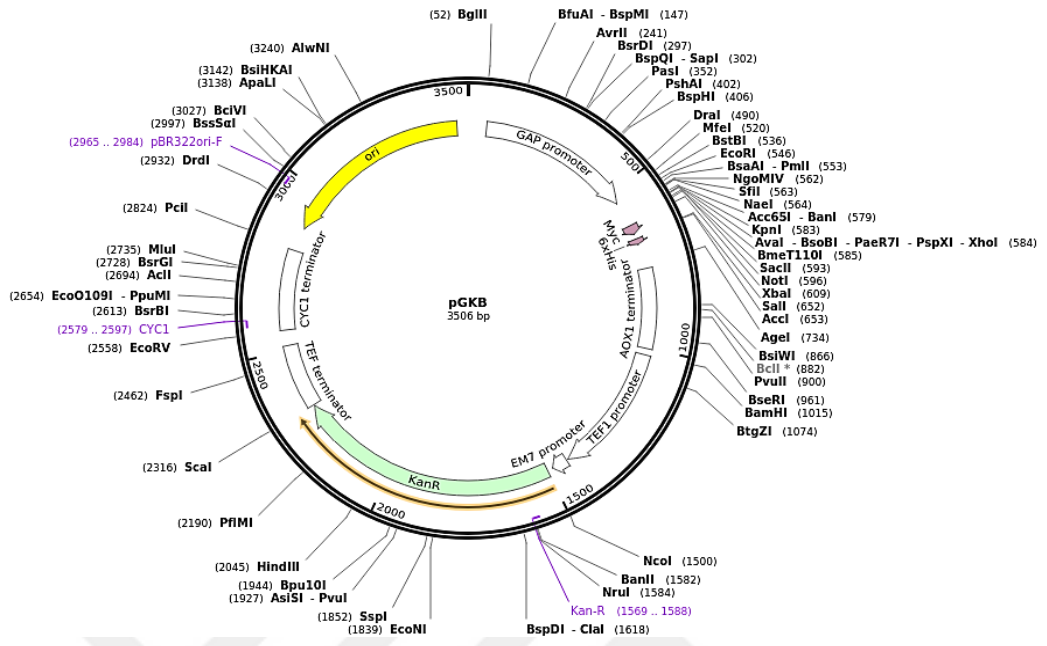
Çizelge 3.2. PME sekansının amplifikasyonu için dizayn edilen primerler

Primer Adı	Sekansı	Taq Pol. Tm (°C)	HF Pol. Tm (°C)	%GC	Uzunluk (bp)
<i>EcoRI</i> -PME-F	5'-CGCGAATTCGCGACAACCTACAACG-3'	61.0	65.0	56.0	25
<i>KpnI</i> -PME-R	5'-ATAGGTACCGGGTAATGTCGGCGTC-3'	61.0	64.4	56.0	25

*altı çizili sekanslar enzim tanıma bölgelerini içerir.

3.1.5. Çalışmada kullanılan pGKB vektör DNA'sı

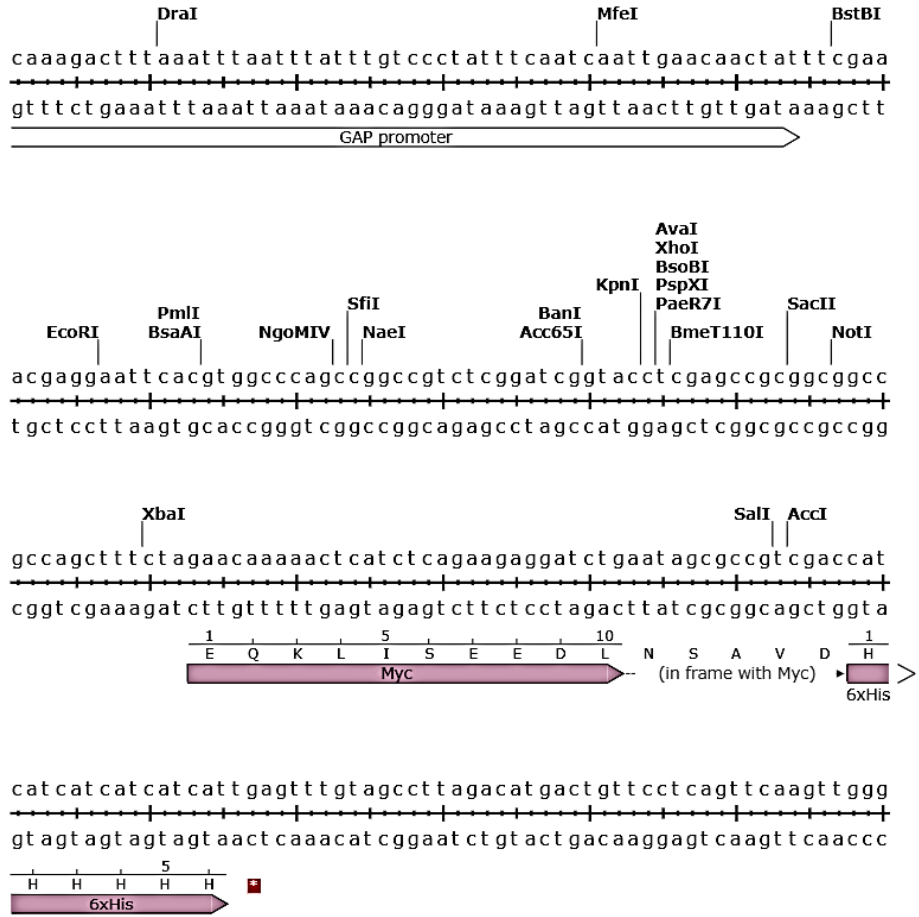
Çalışmada kullanılan pGKB vektörü, Addgene'den (USA, <https://www.addgene.org/85077/>) temin edildi. Vektör DNA'nın şekli ve gen haritası, Şekil 3.1 ve Şekil 3.2'de verildi.



Şekil 3.1. pGKB vektörü (Addgene)

Vektörde yer alan bölgeler ve işlevleri;

- ◆ GAP promotörü: Yapısal bir promotördür ve rekombinant genin ekspresyonunu sağlar.
- ◆ Myc ve 6xHis: Rekombinant gen ürününün kültür ortamından kolay bir şekilde saflaştırılması için gereklidir.
- ◆ AOX1 terminatör bölgesi: Transkripsiyonun etkili terminasyonu için gereklidir.
- ◆ Kanamisin direnç geni (KanR): *E. coli*'de transformantların seçimini sağlar.
- ◆ Çoklu klonlama bölgesi: Restriksiyon enzimlerinin tanıma sekansını içerir.
- ◆ pUC orijini (ori): *E. coli*'de yüksek kopya replikasyonu sağlar (Invitrogen 2010a).



Şekil 3.2. pGKB vektöründe bulunan çoklu klonlama bölgesine ait nükleotid sekansı (Addgene)

3.1.6. Çalışmada kullanılan restriksiyon enzimleri

İlgili genleri vektör DNA'ya yerleştirmek ve rekombinant vektörü maya genomuna entegre etmek için www.restrictionmapper.org adresinden vektöre aktarılacak gen bölgesini kesmediği tespit edilen *EcoRI*, *HindIII*, *KpnI*, *AsuII* (*BstBI*), *AvrII* (*XmaJI*) ve *PagI* (*BspHI*) enzimleri, ThermoFisher Scientific firmasından temin edildi (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Kesim enzimlerinin tanıma sekansları ve kesim noktaları

Enzim	Hedef bölge
<i>EcoRI</i>	5'-G [^] AATTC-3'
<i>HindIII</i>	5'-A [^] AGCTT-3'
<i>KpnI</i>	5'-GGTAC [^] C-3'
<i>AsuII (BstBI)</i>	5'-TT [^] CGAA-3'
<i>AvrII (XmaJI)</i>	5'-C [^] CTAGG-3'
<i>PagI (BspHI)</i>	5'-T [^] CATGA-3'

3.1.7. pGKB vektör DNA'sına ait primerler

PCR reaksiyonu ile pGKB α ve pGKB α -PME plazmitlerini taşıyan doğru bakteri transformantlarını tespit etmek ve bu vektörlere klonlanan genlerin nükleotid dizisini belirlemek amacıyla Çizelge 3.4'teki primerler kullanıldı.

Çizelge 3.4. pGKB vektör DNA'sına ait primerler ve Tm sıcaklıkları

Primer Adı	Sekansı	Tm (°C)	%GC	Uzunluk (bç)
pGAP-F	5'-GTCCCTATTTCAATCAATTGAA-3'	47.0	32.0	22
3'AOX-R	5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'	59.0	47.6	21

3.1.8. Çalışmada kullanılan besiyerleri

Muhtemel rekombinant vektörün, bakteri hücrelerine transfer edilmesinin ardından doğru transformantların belirlenmesi ve geliştirilmesi için kanamisin antibiyotiği içeren LB (Luria Bertani) agar ve LB sıvı besiyerleri, rekombinant *E. coli* transformantlarından saflaştırılan pGKB α -PME vektörü ile *P. pastoris* hücrelerinin transformasyonunun ardından hücrelerin gelişmesi için genetisin antibiyotiği içeren YPD (Yeast Pepton Dextrose) agar ve sıvı besiyerleri, PME enziminin ekspresyonu için ön kültür ve üretim besiyerlerinin hazırlanışı EK 1'de verildi.

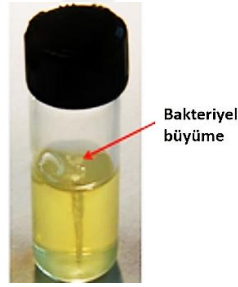
3.1.9. Çalışmada kullanılan tampon ve stok çözeltiler

Çalışmada kullanılan tampon ve stok çözeltilerin hazırlanışı EK 2’de verildi.

3.2. Yöntem

3.2.1. pGKB vektör DNA’sının doğrulanması

Katı besiyerinde (bakteriyel stab) *E. coli* hücreleri (Şekil 3.3) içerisinde gönderilen pGKB vektörü bakterilerden izole edildi. Saf olarak elde edilen plazmit, hem vektöre ait primerlerle PCR reaksiyonu, hem de vektöre ait tüm nükleotid dizisinden yola çıkılarak belirlenen restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim reaksiyonu gerçekleştirilerek doğrulandı.



Şekil 3.3. Bakteri stabı

3.2.1.1. *E. coli* hücrelerinden plazmit izolasyonu

pGKB plazmitlerini taşıyan *E. coli* hücreleri stab kültürden alınarak antibiyotik (kanamisin) içeren LB agara transfer edildi. 37 °C’de gece boyu inkübe edildikten sonra çoğalan bakteri hücreleri öze ile toplanarak plazmit izolasyonu için 300 mL LB sıvı besiyerine inoküle edildi. 37 °C’de gece boyu çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilen inkübasyonun ardından ‘PureLink™ HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit’ protokolüne göre izolasyon yapıldı. İzolasyon için, öncelikle kolona 30 mL dengeleme tamponu (EQ1) eklenerek kolon hazırlandı. Gece boyu LB sıvı besiyerinde büyütülen hücreler

steril falkon tüpe alındı, 4000 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak RNase içeren 10 mL resüpsansiyon tamponu (R3) pelet üzerine eklendi. Hücre süpsansiyonu homojen oluncaya kadar hafifçe alt üst edilerek vortekslendi. 10 mL lizis tamponu (P2) eklenerek karışım homojen oluncaya kadar hafifçe alt üst edildi. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildikten sonra üzerine 10 mL çöktürme tamponu (N3) eklendi. Karışım homojen oluncaya kadar hızlıca alt üst edildi ve elde edilen lizat kolona transfer edildi. Lizat kolondan geçtikten sonra 10 mL yıkama tamponu (W8) eklendi. Yıkama tamponu aktıktan sonra kolonun üst kısmı atıldı ve kolona 50 mL yıkama tamponu (W8) eklendi. Yıkama tamponu aktıktan sonra kolonun altına steril falkon tüp yerleştirilerek kolona 15 mL elüsyon tamponu (E4) eklendi. Solüsyon kolondan tamamen aktıktan sonra kolon uzaklaştırıldı. Tüpteki elüata 10,5 mL izopropanol eklendi. İyice karıştırıldı. >12000 x g'de 4 ° C'de 30 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pelet, 5 mL %70'lik etanol ile yıkandı. >12000 x g'de 4 ° C'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve pelet oda sıcaklığında 10 dakika kurumaya bırakıldı. 100 µL TE tamponunda süspanse edilen DNA'nın konsantrasyonu ve saflığı, nanodrop spektrofotometrede belirlendi.

3.2.1.2. İzole edilen plazmitin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi

Bu basamakta %1'lik agaroz jel hazırlamak için toplam hacime göre %1 oranında olacak şekilde tartılan agaroz, gerekli miktardaki 1xTAE içerisine alındı, mikrodalga fırında kaynatıldıktan ve 35-40 °C'ye soğutulduktan sonra bu karışıma son konsantrasyon 0,5 µg/mL olacak şekilde RedSafe™ nükleik asit boyama solüsyonu (iNtRON) eklenip jel katılaştırmaya bırakıldı. Jel katılaştıktan sonra plazmit DNA yükleme boyası ile karıştırıldı ve kuyucuğa yüklenerek 60 V'de markırla birlikte 90 dakika yürütüldü. Yürütme işlemi tamamlandığında bantlar, jel görüntüleme cihazı ile görüntülendi (Sambrook and Russell 2001).

3.2.1.3. Vektör DNA'nın PCR reaksiyonu ile doğrulanması

pGKB vektör DNA'sının doğrulanması için vektöre ait primerler ile Çizelge 3.5'teki gibi PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Primer bağlanma sıcaklıkları arasında fark olduğundan aynı zamanda uygun primer bağlanma sıcaklığını belirleyebilmek amacıyla gradiyent PCR yapıldı (Çizelge 3.6). Reaksiyon sonrası elde edilen PCR ürünleri agaroz jelde yürütülerek bantlar jel görüntüleme cihazında görüntülendi.

Çizelge 3.5. pGKB vektör DNA'sının gradiyent PCR ile amplifikasyonu

PCR reaksiyon karışım içeriği	Miktar
Kalıp DNA (vektör DNA)	1 µL (~180 ng)
dNTP mix (10 mM)	0,5 µL
MgCl ₂ (50 mM)	1µL
pGAP-F primer (10 pmol/µL)	1 µL
3' AOX-R primer (10 pmol/µL)	1 µL
10xPCR tamponu	2 µL
ddH ₂ O	7,9 µL
Taq DNA polimeraz	0,6 µL
Toplam hacim	15 µL

Çizelge 3.6. Gradiyent PCR şartları

Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)
1	94	4
35	94	1
	48-52-56	1
	72	1
1	72	5
	4	∞

3.2.1.4. pGKB vektörünün restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi

pGKB vektörünü doğrulayabilmek için vektör DNA, *EcoRI* ve *HindIII* enzimleri ile kesildi. Çizelge 3.7'deki gibi hazırlanan kesim reaksiyon karışımı, 37 °C'de 15 dakika inkübe edilip, 80 °C'de 10 dakika bekletilerek enzim inaktivasyonu gerçekleştirildi.

Çizelge 3.7. Vektör DNA kesim reaksiyonu karışım içeriği

Reaksiyon karışım içeriği	Miktar
ddH ₂ O	12,6 µL
10xFast Digest Tamponu	2 µL
Vektör DNA (pGKB)	3,84 µL (~500 ng)
Fast Digest <i>EcoRI</i>	1 µL
Fast Digest <i>HindIII</i>	1 µL
Toplam hacim	20 µL

3.2.1.5. Kesim ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi

Agaroz jel hazırlanarak kesim ürünleri 60 V'de 80 dakika yürütüldü. Yürütme işlemi tamamlandığında bantlar, jel görüntüleme cihazında görüntülendi.

3.2.2. pGKB α ekspresyon vektörünün elde edilmesi

PME enziminin ekstrasellüler üretimini gerçekleştirebilmek amacıyla *S. cerevisiae* α -eşleşme faktörü (α -MF) sinyali, pPICZ α A vektöründen elde edilerek pGKB vektörüne yerleştirildi ve pGKB α ekspresyon vektörü elde edildi.

3.2.2.1. α -faktör sinyal sekansının PCR ile amplifikasyonu

α -faktör sinyal sekansının amplifikasyonu için dizayn edilen F ve R primerler (Çizelge 3.1) ile uygun PCR protokolü (Çizelge 3.8 ve Çizelge 3.9) ve kalıp DNA olarak pPICZ α A

plazmiti (Invitrogen) kullanıldı. Phusion High-Fidelity (HF) DNA polimeraz enzimi ile amplifikasyon sırasında aynı zamanda doğru primer bağlanma sıcaklığını belirleyebilmek amacıyla gradiyent PCR yapıldı.

Çizelge 3.8. α -faktör sinyal sekansının gradiyent PCR ile amplifikasyonu

PCR reaksiyon karışım içeriği	Miktar
Kalıp DNA (pPICZ α plazmiti)	1 μ L (4 ng)
dNTP mix (40 mM)	1,6 μ L
MgCl ₂ (50 mM)	0,3 μ L
<i>Asu</i> II-Alpha-F primer (10 pmol/ μ L)	1 μ L
<i>Eco</i> RI-Alpha-R primer (10 pmol/ μ L)	1 μ L
5X Phusion HF tamponu	4 μ L
ddH ₂ O	10,9 μ L
Phusion High-Fidelity (HF) DNA Polimeraz	0,2 μ L
Toplam hacim	20 μL

Çizelge 3.9. Gradiyent PCR şartları

Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre (sn)
1	98	30
35	98	10
	59-60-61	30
	72	15
1	72	300
	4	∞

Reaksiyon sonucu elde edilen ürünler hazırlanan agaroz jele yüklendi ve 60 V'de markırla birlikte 90 dakika yürütüldü. Yürütme işlemi tamamlandığında bantlar, jel görüntüleme cihazı ile görüntülendi.

3.2.2.1.a. PCR ürünlerinin saflaştırılması

Jelde yürütülerek doğruluğu teyit edilen PCR ürünleri, kesim reaksiyonuna hazır hale getirilmek için ‘MEGAquick-spin™ Total Fragment DNA Purification Kit’ kullanılarak saflaştırıldı. Saflaştırma işlemi kısaca şu şekilde yapıldı; PCR ürünlerinin üzerine toplam hacminin 5 katı kadar BNL tamponu eklenerek vortekslendi. Karışım, MEGAquick-spin™ kolonuna transfer edildi. 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilip, kolondan inen sıvı uzaklaştırıldı. Kolona 700 µL yıkama tamponu eklendi ve 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Kolondan inen sıvı uzaklaştırıldı ve kurutmak için kolon boş olarak 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Kolon, steril mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. Kolonun merkezine 30 µL elüsyon tamponu eklenerek 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildikten sonra kolon uzaklaştırıldı. Elüsyon tüpündeki DNA konsantrasyonu nanodrop spektrofotometrede ölçüldü.

3.2.2.1.b. PCR ürünlerinin restriksiyon enzimleri ile kesimi

Kesim enzimlerinin tanıma sekanslarını içeren α -faktör sinyal sekansına ait PCR ürünleri saflaştırıldıktan sonra diziyi kesmediği tespit edilen *EcoRI* ve *AsuII* (*BstBI*) enzimleri ile kesildi. Çizelge 3.10’deki gibi hazırlanan karışım, 37 °C’de 30 dakika inkübe edilip, 80 °C’de 5 dakika bekletilerek enzim inaktivasyonu gerçekleştirildi.

Çizelge 3.10. PCR ürünü kesim reaksiyonu karışım içeriği

Reaksiyon karışım içeriği	Miktar
ddH ₂ O	16 µL
10xFast Digest Tamponu	2 µL
DNA (PCR ürünü)	10 µL (~100 ng)
Fast Digest <i>EcoRI</i>	1 µL
Fast Digest <i>AsuII</i> (<i>BstBI</i>)	1 µL
Toplam hacim	30 µL

3.2.2.1.c. PCR ürünlerinin fenol-kloroform ekstraksiyonu

Her iki enzim ile kesilen DNA solüsyonu, steril saf su ile 100 µL'ye tamamlandı. Üzerine toplam hacmin yarısı kadar fenol/kloroform/izoamil alkol (25/24/1) ilave edilerek 20 saniye vortekslendi. 14500 rpm'de oda sıcaklığında 10 dakika santrifüj edilmesinin ardından üst faz, temiz bir tüpe alındı. Alınan fazın 1/10 hacmi kadar 3 M sodyum asetat ve 2,5 hacim saf etanol ilave edildi. Vorteksleme işleminin ardından 14500 rpm'de 5 dakika santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılarak oda sıcaklığında kurutulan pelet, 20 µL TE tamponunda çözüldü.

3.2.2.2. Vektör DNA (pGKB)'nin kesimi

PCR ürünlerinin kesimi ve saflaştırılmasının ardından vektör DNA da aynı enzimlerle (*EcoRI* ve *AsuII*) kesilerek 5' ucundaki fosfat gruplarını uzaklaştırmak için CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) enzimi ile muamele edildi. Çizelge 3.11'deki gibi hazırlanan karışımlar, 37 °C'de 30 dakika inkübe edilip, 80 °C'de 5 dakika enzim inaktivasyonu yapıldı. Ardından 1 µL CIAP ilave edilerek 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Reaksiyon sonucunda kesim işleminin gerçekleşip gerçekleşmediğini teyit etmek ve kesilen plazmiti jelden ekstraksiyonla saf olarak elde etmek için agaroz jelde yürütüldü.

Çizelge 3.11. Vektör DNA'nın kesim reaksiyonu karışım içeriği

Reaksiyon karışım içeriği	Miktar
ddH ₂ O	20 µL
10xFast Digest Green Tampon	3 µL
Vektör DNA (pGKB)	4 µL (~1,5 µg)
Fast Digest <i>EcoRI</i>	1,5 µL
Fast Digest <i>AsuII</i> (<i>BstBI</i>)	1,5 µL
Toplam hacim	30 µL

3.2.2.2.a. Vektör DNA'nın jelden ekstraksiyonu

Kesim reaksiyonu sonrası %1'lik agaroz jelle yüklenip yürütülen örnekler, jelden ekstrakte edildi. Böylece hem CIAP uzaklaştırılmış hem de kesilen vektör DNA saflaştırılmış oldu. Vektör DNA'nın jelden ekstraksiyonu PureLink® Quick Gel Extraction Kit kullanılarak yapıldı. Özetle jelde yürütülen DNA, UV altında kesilerek jelden alındı ve bant ağırlığı belirlendi. 3 hacim jel çözme tamponu (L3) eklendi. 50 °C'de 10 dakika su banyosunda inkübe edildi, her 3 dakikada bir karıştırmak ve çözündüğünden emin olmak için tüplere hafifçe vuruldu. Jel çözündükten sonra 5 dakika daha 50 °C'de inkübe edildi. 1 jel hacmi kadar izopropanol eklendi ve karıştırıldı. 14000 x g'de 1 dakika santrifüj edilip, kolondan inen sıvı uzaklaştırıldı. Kolona 500 µL yıkama tamponu (W1) eklenerek 14000 x g'de 1 dakika santrifüj edilip, kolondan inen sıvı uzaklaştırıldı. Kolon boş olarak maksimum hızda (20000 x g) 2 dakika santrifüj edildi. Yeni bir steril tüpe yerleştirilen kolonun merkezine 50 µL elüsyon tamponu (E5) eklendi. 14000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Elüe edilen DNA'nın konsantrasyonu nanodrop spektrofotometrede ölçüldü.

3.2.2.3. Ligasyon reaksiyonu

Vektöre yerleştirilecek (insört) gen (α -faktör sinyal sekansı) ve vektör DNA (pGKB), restriksiyon enzimleriyle kesildikten sonra Çizelge 3.12'de verilen ligasyon reaksiyon karışımına gen/vektör DNA miktarı eşit hacimde olacak şekilde ilave edildi. Son hacmi 20 µL olan karışım, 16 °C'de 16 saat boyunca inkübe edilerek ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi.

Çizelge 3.12. Ligasyon reaksiyonu

Reaksiyon karışım içeriği	Miktar
10X ligasyon tamponu	4 µL
İnsört DNA	5 µL (50 ng)
Kesilmiş vektör DNA (pGKB)	5 µL (74 ng)
T4 DNA ligaz	1 µL

Steril dH ₂ O	5 µL
Toplam hacim	20 µL

3.2.2.4. *E. coli* JM109 hücrelerinin transformasyonu

3.2.2.4.a. Kompetent *E. coli* hücrelerinin hazırlanması

Katı besiyerinde büyütülen *E. coli* hücreleri 10 mL LB sıvı besiyerine inoküle edildi ve 37 °C'de, 150 rpm'de gece boyu inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası, kültürden 500 µL alınarak 50 mL LB sıvı besiyerine inoküle edilip, 37 °C'de, 150 rpm'de inkübasyona bırakıldı. Kültürün OD₆₀₀ değeri 0,5'e ulaştınca sıvı kültür alınıp buz üzerine konuldu. Bu kültürden 44 mL steril falkon tüpe konularak 6000 rpm'de, +4 °C'de, 8 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücrelere 20 mL buzda soğutulmuş (ice-cold) CaCl₂ çözeltisi (50 mM) ilave edilip yavaşça pipetaj ile resüspanse edildi. Steril falkon tüpe 10 mL hücre alınarak 20 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra 6000 rpm'de, +4 °C'de, 8 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Hemen kullanım için peletin üzerine 1,25 mL buzda soğutulmuş CaCl₂ çözeltisi eklenerek süspanse edildi. Süspansiyon 100'er µL'lik alikatlara ayrıldı. Kompetent hale getirilen *E. coli* hücreleri transformasyon işlemi için buz üzerinde bekletildi (Anonymous 2019).

3.2.2.4.b. Transformasyon

Elde edilen ligasyon ürünlerinin bakteri hücrelerine transfer edilmesi için buz üzerinde bekletilen kompetent hücrelerin üzerine 5 µL DNA (ligasyon karışımı; 10 pg-100 ng) ilave edilerek yavaşça karıştırıldıktan sonra tüp, buz üzerinde 30 dakika inkübe edildi. Isı şoku için hücreler çalkalamadan 42 °C'de 30 saniye bekletildi. Süre sonunda 42 °C'den alınarak buz üzerinde 2 dakika bekletildikten sonra tüp steril ortamda önceden ısıtılmış S.O.C besiyerinden 250 µL ilave edilip kapağı sıkıca kapatılarak çalkalayıcı inkübatörde 37 °C'de 225 rpm'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Önceden ısıtılmış LB-kanamisin

plaklarına transformasyon karışımından 150 µL yayılarak 37 °C’de 1 gece inkübasyona bırakıldı (Invitrogen 2010a).

3.2.2.5. Koloni PCR

İnkübasyon sonrası gelişen antibiyotik direncine sahip kolonilerden rastgele 12 tanesi seçilip insört gene (α -faktör sinyal sekansı) ve vektör DNA’ya ait primerler kullanılarak koloni PCR yapıldı. PCR reaksiyonu için koloniden çok küçük miktar mikropipet ucu ile alınarak pipet ucu, PCR reaksiyon karışımı üzerine yerleştirilip etrafında sabitçe çevrildikten sonra reaksiyon başlatıldı (Kaymak 2008). Reaksiyon sonrası elde edilen PCR ürünleri agaroz jelde yürütülerek görüntülendi.

3.2.2.5.a. Gene ait primerler kullanılarak gerçekleştirilen koloni PCR reaksiyonu

Seçilen kolonilerle gerçekleştirilen koloni PCR reaksiyonu için reaksiyon karışım içeriği ve PCR reaksiyon şartları Çizelge 3.13 ve Çizelge 3.14’te verildi. Reaksiyon sonucu elde edilen ürünler, agaroz jelde 80 V’de 45 dakika yürütülerek görüntülendi.

Çizelge 3.13. Koloni PCR için reaksiyon karışım içeriği

PCR reaksiyon karışım içeriği	Miktar
dNTP mix (10 mM)	0,8 µL
MgCl ₂ (50 mM)	1µL
<i>AsuII</i> -Alpha-F primer (10 pmol/µL)	1 µL
<i>EcoRI</i> -Alpha-R primer (10 pmol/µL)	1 µL
10xPCR tamponu	1 µL
ddH ₂ O	6,6 µL
Taq DNA polimeraz	0,6 µL
Toplam hacim	12 µL

Çizelge 3.14. PCR reaksiyon şartları

Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)
1	94	10
35	94	1
	55	1
	72	30 sn
1	72	5
	4	∞

3.2.2.5.b. Vektör DNA'ya ait primerler kullanılarak gerçekleştirilen koloni PCR reaksiyonu

Önceki basamakta seçilen kolonilerle gen primerleri kullanılarak gerçekleştirilen koloni PCR reaksiyonu sonucuna göre seçilen 6 koloni ile (2,3,4,6,7 ve 12 numaralı koloniler) vektör DNA'ya ait primerler kullanılarak PCR yapıldı. Koloni PCR için reaksiyon karışım içeriği ve PCR reaksiyon şartları Çizelge 3.15 ve Çizelge 3.16'da verildi. Reaksiyon sonucu elde edilen ürünler agaroz jelde 60 V'de 90 dakika yürütülerek görüntülendi.

Çizelge 3.15. Koloni PCR için reaksiyon karışım içeriği

PCR reaksiyon karışım içeriği	Miktar
dNTP mix (10 mM)	0,8 µL
MgCl ₂ (50 mM)	1 µL
pGAP-F primer (10 pmol/µL)	1 µL
3' AOX-R primer (10 pmol/µL)	1 µL
10xPCR tamponu	1 µL
ddH ₂ O	6,6 µL

Taq DNA polimeraz

0,6 μ L**Toplam hacim****12 μ L****Çizelge 3.16.** PCR reaksiyon şartları

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

3.2.2.6. Muhtemel rekombinant vektörlerin sekans analizi ile doğrulanması

pGKB vektör DNA'sına yerleştirilen sekansın doğruluğunu kontrol etmek için LB-kanamisin sıvı besiyerlerinde çoğaltılan 2 ve 4 numaralı kolonilerden 'PureLink-Hi-Pure plazmit DNA saflaştırma kiti' (Invitrogen) kullanılarak plazmitler saflaştırıldı, ardından bu vektörlere yerleştirilen sekansın nükleotid dizilemesi yaptırıldı.

Plazmit saflaştırma işlemi özetle şu şekilde yapıldı. 37 °C'de 150 rpm'de gece boyu inkübe edilen 2. ve 4. kolonileri oluşturan bakterilere ait ön kültürlerden 500'er μ L alınarak 25 mL kanamisin içeren LB sıvı besiyerlerine aktarıldı. Gece boyu 37 °C'de 150 rpm'de inkübe edildi. Bir gecelik kültürlerden steril mikrosantrifüj tüpüne 4,5'er mL alınıp 4000 x g'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre peletlerine 0,4'er mL RNaz içeren 'resüspansiyon tamponu' ilave edilerek hücreler, homojen oluncaya kadar süspanse edildi. Üzerlerine 0,4'er mL 'lisis tamponu' ilave edilen lizat karışımları, yavaşça alt üst edilerek tamamen homojen oluncaya kadar karıştırılıp oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. 0,4'er mL 'presipitasyon tamponu' ilave edilip tüpler ters çevrilerek tamamen homojen oluncaya kadar karıştırıldı. Elde edilen lizatlar, 16000 x g'de oda sıcaklığında 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar

dengelenen kolonlara yüklenip, kolonlardaki solüsyonun akıp kuruması beklendi. Kolonlar, iki kez 2,5'er mL 'yıkama tamponu' ile yıkanıp her yıkamadan sonra kolonlardaki solüsyonun akıp kuruması beklendikten sonra alttaki sıvılar uzaklaştırıldı. Kolonların altına steril elüsyon tüpleri yerleştirildi. 0,9'ar mL 'elüsyon tamponu' eklenecek solüsyonun akıp kuruması beklendikten sonra kolonlar uzaklaştırılarak elüsyon tüplerine 0,63'er mL izopropanol ilave edilip iyice karıştırıldı. Tüpler, 16000 x g'de, 4 °C'de, 30 dakika santrifüj edilip, süpernatantlar dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. DNA içeren peletler, 1 mL %70'lik etanol ile süspanse edilip 16000 x g'de 4 °C'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. 10 dakika süreyle oda sıcaklığında kurutulan DNA peletleri, 50 µL nükleaz içermeyen suda süspanse edildi. Saflaştırılan plazmit DNA'ların konsantrasyonları nanodrop spektrofotometrede ölçüldü. Plazmitler agaroz jelde yürütülerek görüntülendi. Saf olarak elde edilen plazmitlerin vektöre ait forward primer ile tek yönlü Sanger sekans analizi MedSan-Tek firması (İstanbul) tarafından yapıldı.

3.2.3. Rekombinant pGKB α -PME vektörünün elde edilmesi

P. chrysanthemi pektin metilesteraz (PME) geni pGKB α vektörüne yerleştirilerek pGKB α -PME rekombinant vektörü elde edildi.

3.2.3.1. PME genine ait nükleotid sekansının PCR ile amplifikasyonu

Integrated DNA Technologies (IDT, USA) tarafından sentezlenen *P. chrysanthemi*'ye ait olgun (mature) pektin metilesteraz enzimini kodlayan gen (GenBank: Y00549.1), PCR reaksiyonu ile (Çizelge 3.17 ve Çizelge 3.18) amplifiye edildi. Öncelikle primerlerin doğru bağlanma sıcaklığını belirleyebilmek amacıyla gradiyent PCR yapıldı.

Çizelge 3.17. PME sekansının gradiyent PCR ile amplifikasyonu

PCR reaksiyon karışım içeriği	Miktar
Kalıp DNA (pUCIDT-PME plazmit)	1 µL (4 ng)

dNTP mix (40 mM)	1,6 µL
MgCl ₂ (50 mM)	0,3 µL
<i>EcoRI</i> -PME-F primer (10 pmol/µL)	1 µL
<i>KpnI</i> -PME-R primer (10 pmol/µL)	1 µL
5X Phusion HF tamponu	4 µL
ddH ₂ O	10,9 µL
Phusion High-Fidelity (HF) DNA Polimeraz	0,2 µL
Toplam hacim	20 µL

Çizelge 3.18. Gradyent PCR şartları

Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre (sn)
1	98	30
35	98	10
	64-65	30
	72	60
1	72	300
	4	∞

Reaksiyon sonucu elde edilen PCR ürünleri hazırlanan agaroz jele yüklenerek 60 V'de markırla birlikte 90 dakika yürütüldü. Yürütme işlemi tamamlandığında bantlar, jel görüntüleme cihazı ile görüntülendi.

3.2.3.2. PCR ürünlerinin saflaştırılması

Jelde yürütme ve görüntüleme sonucu doğruluğu teyit edilen PCR ürünleri kesim reaksiyonuna hazır hale getirilmek için 'MEGAquick-spin™ Plus Total Fragment DNA Purification Kit' kullanılarak saflaştırıldı.

3.2.3.3. PCR ürünlerinin restriksiyon enzimleri ile kesimi

Kesim enzimlerinin tanıma sekanslarını içeren PME sekansına ait PCR ürünleri saflaştırıldıktan sonra diziyi kesmediği tespit edilen *EcoRI* ve *KpnI* enzimleri ile kesildi. Çizelge 3.19'deki gibi hazırlanan karışımlar, 37 °C'de 30 dakika inkübe edilip, 80 °C'de

5 dakika bekletilerek enzim inaktivasyonu gerçekleştirildi. Her iki enzim ile kesilen DNA (PCR ürünü) solüsyonundan fenol-kloroform ekstraksiyonu yapıldı.

Çizelge 3.19. PCR ürünü kesim reaksiyonu karışım içeriği

Reaksiyon karışım içeriği	Miktar
ddH ₂ O	24,8 µL
10xFast Digest Tamponu	2 µL
DNA (PCR ürünü)	1,2 µL (~200 ng)
Fast Digest <i>EcoRI</i>	1 µL
Fast Digest <i>KpnI</i>	1 µL
Toplam hacim	30 µL

3.2.3.4. pGKBα vektör DNA'sının kesimi

PCR ürünlerinin kesimi ve saflaştırılmasının ardından vektör DNA da aynı enzimlerle (*EcoRI* ve *KpnI*) kesilerek 5' ucundaki fosfat gruplarını uzaklaştırmak için CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) enzimi ile muamele edildi. Çizelge 3.20'deki gibi hazırlanan karışımlar, 37 °C'de 30 dakika inkübe edilip, 80 °C'de 5 dakika bekletilerek enzim inaktivasyonu gerçekleştirildi. Ardından 1 µL CIAP ilave edilerek 50 °C'de 60 dakika inkübe edildi. Reaksiyon sonucunda kesim işleminin gerçekleşip gerçekleşmediğini teyit etmek ve kesilen plazmiti jelden ekstraksiyonla saf olarak elde etmek için agaroz jelde yürütüldü.

Çizelge 3.20. Vektör DNA'nın kesim reaksiyonu karışım içeriği

Reaksiyon karışım içeriği	Miktar
ddH ₂ O	21,1 µL

10xFast Digest Green Tamponu	3 µL
Vektör DNA (pGKBα)	2,9 µL (~1,5 µg)
Fast Digest <i>EcoRI</i>	1,5 µL
Fast Digest <i>KpnI</i>	1,5 µL
Toplam hacim	30 µL

3.2.3.4.a. Vektör DNA'nın jelden ekstraksiyonu

Kesim reaksiyonu sonrası %1'lik agaroz jele yüklenip yürütülen örnekler, jelden ekstrakte edildi. Böylece hem CIAP uzaklaştırılmış hem de kesilen vektör DNA saflaştırılmış oldu. Vektör DNA'nın jelden ekstraksiyonu 'MEGAquick-spin™ Plus Total Fragment DNA Purification Kit' kullanılarak gerçekleştirildi.

3.2.3.5. Ligasyon reaksiyonu

Vektöre yerleştirilecek (insört) gen (PME) ve vektör DNA (pGKBα), restriksiyon enzimleriyle kesildikten sonra reaksiyon karışımına gen/vektör DNA miktarı eşit hacimde olacak şekilde ilave edildi (Çizelge 3.21). Son hacmi 20 µL olan karışımın 16 °C'de 16 saat boyunca inkübe edilmesiyle ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi.

Çizelge 3.21. Ligasyon reaksiyonu

Reaksiyon karışım içeriği	Miktar
10X ligasyon tamponu	4 µL
İnsört DNA	6 µL (~120 ng)
Kesilmiş vektör DNA (pGKBα)	6 µL (~74 ng)
T4 DNA ligaz	1,5 µL
Steril dH ₂ O	2,5 µL
Toplam hacim	20 µL

3.2.3.6. *E. coli* JM109 hücrelerinin transformasyonu

Elde edilen ligasyon ürünlerinin *E. coli* hücrelerine transfer edilmesi için öncelikle hücreler kompetent hale getirildi. Daha sonra buzda bekletilen kompetent hücreler üzerine 5 µL DNA (ligasyon karışımı) ilave edilerek transformasyon işlemi gerçekleştirildi.

3.2.3.7. Koloni PCR

İnkübasyon sonrası gelişen antibiyotik direncine sahip kolonilerden rastgele 10 tanesi seçilip gene (PME) ve vektör DNA'ya ait primerler kullanılarak koloni PCR yapıldı. Reaksiyon sonrası elde edilen ürünler agaroz jelde yürütülerek görüntülendi.

3.2.3.7.a. Gene ait primerler kullanılarak gerçekleştirilen koloni PCR reaksiyonu

Seçilen kolonilerle gerçekleştirilen koloni PCR reaksiyonu için reaksiyon karışım içeriği ve PCR reaksiyon şartları Çizelge 3.22 ve Çizelge 3.23'te verildi. Reaksiyon sonucu elde edilen ürünler agaroz jelde 60 V'de 90 dakika yürütülerek görüntülendi.

Çizelge 3.22. Koloni PCR için reaksiyon karışım içeriği

PCR reaksiyon karışım içeriği	Miktar
dNTP mix (10 mM)	0,8 µL
MgCl ₂ (50 mM)	1µL
<i>EcoRI</i> -PME-F primer (10 pmol/µL)	1 µL
<i>KpnI</i> -PME-R primer (10 pmol/µL)	1 µL
10xPCR tamponu	1 µL
ddH ₂ O	6,6 µL
Taq DNA polimeraz	0,6 µL
Toplam hacim	12 µL

Çizelge 3.23. PCR reaksiyon şartları

Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)
1	94	10
35	94	1
	61	1
	72	1
1	72	5
	4	∞

3.2.3.7.b. Vektör DNA'ya ait primerler kullanılarak gerçekleştirilen koloni PCR reaksiyonu

Önceki basamakta seçilen kolonilerle gen primerleri kullanılarak gerçekleştirilen koloni PCR reaksiyonu sonucuna göre seçilen 6 koloni ile (1,2,3,4,5 ve 6 numaralı koloniler) vektör DNA'ya ait primerler kullanılarak PCR yapıldı. Koloni PCR için reaksiyon karışım içeriği ve PCR reaksiyon şartları Çizelge 3.24 ve Çizelge 3.25'te verildi. Reaksiyon sonucu elde edilen ürünler agaroz jelde 60 V'de 90 dakika yürütülerek görüntülendi.

Çizelge 3.24. Koloni PCR için reaksiyon karışım içeriği

PCR reaksiyon karışım içeriği	Miktar
dNTP mix (10 mM)	0,8 µL
MgCl ₂ (50 mM)	1 µL
pGAP-F primer (10 pmol/µL)	1 µL
3' AOX-R primer (10 pmol/µL)	1 µL
10xPCR tamponu	1 µL
ddH ₂ O	6,6 µL
Taq DNA polimeraz	0,6 µL
Toplam hacim	12 µL

Çizelge 3.25. PCR reaksiyon şartları

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

3.2.3.8. *E. coli* hücrelerinden saflaştırılan muhtemel rekombinant vektörlerin sekans analizi ile doğrulanması

Klonlamanın doğruluğunu kontrol etmek için LB-kanamisin (50 µg/mL) sıvı besiyerlerinde çoğaltılan 3. ve 5. kolonilerinden plazmit saflaştırma işlemi, ‘PureLink-Hi-Pure plazmit DNA saflaştırma kiti’ kullanılarak gerçekleştirildi. Saf olarak elde edilen plazmitlerin vektöre ait forward ve reverse primerler ile çift yönlü Sanger sekans analizi yapıldı.

3.2.4. pGKBα-PME rekombinant vektörünün *P. pastoris*’e transfer edilmesi

3.2.4.1. Rekombinant vektörün (pGKBα-PME) izolasyonu ve lineer hale getirilmesi

Rekombinant vektör ‘PureLink™ HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit’ kullanılarak izole edildi. Saf olarak elde edilen rekombinant vektör *AvrII* (*XmaII*) veya *PagI* (*BspHI*) enzimleri ile lineer hale getirildi. Çizelge 3.26’daki gibi hazırlanan karışımlar, *AvrII* enzimi için, 37 °C’de 10 dakika inkübe edildikten sonra 1 µL CIAP ilave edilerek 37 °C’de 30 dakika inkübe edildi. *PagI* enzimi için, 37 °C’de 10 dakika inkübe edildikten sonra 80 °C’de 5 dakikada enzim inaktivasyonu gerçekleştirildi. Ardından 1 µL CIAP ilave edilerek 37 °C’de 30 dakika inkübe edildi. Reaksiyon sonucunda plazmitler jelde yürütülerek kesildikleri teyit edildi. Kesilen vektör DNA solüsyonlarının fenol-kloroform ekstraksiyonu yapıldı. Böylece saf olarak elde edilen lineer rekombinant vektörler, 50 µL nükleaz içermeyen suda çözülerek maya hücrelerine transfer için hazır hale getirildi.

Çizelge 3.26. Vektör DNA'nın kesim reaksiyonu karışım içeriği

Reaksiyon karışım içeriği	Miktar
ddH ₂ O	16 µL
10xFast Digest Tamponu	2 µL
DNA (Rekombinant pGKBα-PME vektörü)	1 µL (1 µg)
FastDigest Enzim	1 µL
Toplam	20 µL

3.2.4.2. Kompetent *P. pastoris* hücrelerinin hazırlanması

Yaklaşık iki gün boyunca 30 °C'de YPD katı besiyerinde inkübasyona bırakılan *P. pastoris* X33 hücreleri özeye alınarak 50 mL YPD sıvı besiyerine inoküle edildi. 30 °C'de 100 rpm'de gece boyu inkübasyona bırakılan hücreler OD₆₀₀ değeri 0,8-1'e ulaşınca +4 °C'de, 1500 x g'de, 4 dakika santrifüjlenerek toplandı. Hücre peletine 25 mL steril saf su eklenerek pelet yıkandı ve 1500 x g'de 10 dakika santrifüjlendi. Pelete 1 mL 100 mM LiCl eklenerek süspansedildi ve steril mikrosantrifüj tüpüne alındı. 15 saniye maksimum hızda (16000 rpm) 24 °C'de santrifüj edilerek LiCl uzaklaştırıldı. Pelete 400 µL 100 mM LiCl eklenerek hücreler tekrar süspansedildi. Süspansedilen hücreler transformasyonda kullanılmak üzere 50 µL'lik alikuatlara ayrıldı (Invitrogen 2010b).

3.2.4.3. *P. pastoris* hücrelerinin transformasyonu

Maya hücrelerinin transformasyon işlemi kompetent hücre hazırlandıktan sonra derhal yapıldı. Bunun için, 2 mg/mL salmon sperm DNA'sı (50 µL) 5 dakika kaynatıldı ve hızlı bir şekilde buz üzerinde soğutuldu. 50 µL kompetent hücre alikuatı 4000 x g'de 2 dakika santrifüjlendi ve LiCl pipet ile uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine sırasıyla aşağıdakiler ilave edildi;

- 240 µL %50 PEG (polietilen glikol)
- 36 µL 1 M LiCl
- 25 µL 2 mg/mL salmon sperm DNA (denatüre edilmiş)

- 50 µL plazmit DNA

Karışım, hücre peleti tamamen çözününceye kadar hızlıca vortekslendi (~1 dakika). Ardından hücreler, 30 °C’de 30 dakika çalkalamadan inkübe edildi. Daha sonra 42 °C’ye ayarlanmış su banyosuna konularak 20-25 dakika inkübe edildi. Süre sonunda 4000 x g’de 2 dakika santrifüjlenerek süpernatant uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine 1 mL antibiyotik içermeyen YPD sıvı besiyeri ilave edilerek hücreler süspansedilip steril cam tüpe alındı ve 30 °C’de 200 rpm’de inkübasyona bırakıldı. 12, 24 ve 36 saatlik inkübasyondan sonra 200 µg/mL genetisin (G418) antibiyotiği içeren YPD plaklara 100’er µL yayılarak plaklar 30 °C’de inkübasyona bırakıldı (Invitrogen 2010b). Rekombinant vektörün (pGKBα-PME) yanı sıra pGKBα vektörü (PME geni taşımayan) de hücrelere transfer edilerek elde edilen rekombinant hücreler kontrol olarak kullanıldı.

3.2.5. PME genini taşıyan maya transformantlarının tespiti

İkinci bir seçim için transformasyon sonrası gelişen kolonilerden rastgele seçilen 15 maya kolonisi, YPD-genetisin (200 µg/mL) besiyerine transfer edilerek inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra gelişen kolonilerin bazılarında (1, 2, 3, 6, 7 ve 10 numaralı koloniler) genomik DNA (gDNA) izolasyonu gerçekleştirildi. PME geninin genoma entegrasyonunu doğrulamak için ise gene ait primerler ile PCR yapıldı.

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

İnkübasyon sonrası gelişen antibiyotiğe dirençli *P. pastoris* kolonilerinden altı tanesi seçilip gen ve vektör primerleri ile PCR yapıldı. PCR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılan gDNA’lar ‘GeneJET Genomic DNA Purification Kit’ (Thermo Scientific™) kiti kullanılarak izole edildi. Bunun için, seçilen her bir koloniyi oluşturan transforme maya hücreleri YPD sıvı besiyerinde 30 °C’de 150 rpm’de gece boyu inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında OD₆₀₀ değeri 0,8-1,0’e ulaşan kültürlerden 1’er mL alınarak hücreler maksimum hızda (≥12000 x g) 5-10 saniye santrifüjlenerek toplandı. Süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre peletine 500 µL ‘SCED tamponu’ (EK 2) eklendi ve süspansedilen hücrelerin üzerine 66 µL zimoliyaz (3 mg/mL stok) ve asitle yıkanmış

cam boncuk (425-600 μm) eklenerek vortekslendi. 1 saat boyunca 37 °C’de inkübe edilen hücreler daha sonra 3000 x g’de 10 dakika santrifüjlendi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Pelete 180 μL ‘parçalama solüsyonu’ eklenerek süspanse edildi ve üzerine 20 μL ‘proteinase K solüsyonu’ eklendi, homojen oluncaya kadar iyice vortekslendikten sonra 56 °C’de 45 dakika inkübasyona bırakıldı ve ara ara vortekslendi. Üzerine 20 μL RNase A Solution eklenerek iyice vortekslendi ve karışım 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Karışımın üzerine 200 μL ‘lizis solüsyonu’ eklendi ve homojen oluncaya kadar 15 saniye boyunca iyice vortekslendi. 400 μL %50’lik etanol eklendi ve vortekslendi. Hazırlanan lizat kolona transfer edildi. 1 dakika 6000 x g’de santrifüj edildi. Atık içeren toplama tüpü atılarak kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. Kolona 500 μL ‘yıkama tamponu I’ eklenerek 1 dakika 8000 x g’de santrifüjlendi. Toplama tüpündeki atık uzaklaştırılarak kolon aynı toplama tüpüne tekrar yerleştirildi. Kolona 500 μL ‘yıkama tamponu II’ eklenerek 3 dakika maksimum hızda (≥ 12000 x g) santrifüjlendi. Toplama tüpündeki atık uzaklaştırılarak kolon aynı toplama tüpüne tekrar yerleştirildi. Kolon boş olarak maksimum hızda 1 dakika santrifüjlendi. Atık içeren toplama tüpü uzaklaştırılarak kolon yeni bir steril mikrosantrifüj tüpe yerleştirildi. Kolonun merkezine 80 μL ‘elüsyon tamponu’ eklendi ve 1 dakika 8000 x g’de santrifüjlendi. Elüe edilen gDNA’ların konsantrasyonları nanodrop spektrofotometrede ölçüldü.

3.2.5.2. PCR reaksiyonu

İzole edilen gDNA’lar, kalıp olarak kullanılıp gene (PME) ait primerler ile PCR yapıldı. PCR reaksiyonu için reaksiyon karışım içeriği ve PCR reaksiyon şartları, Çizelge 3.27 ve Çizelge 3.28’de verildi. Gene ait primerler kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyon sonrası elde edilen PCR ürünleri, agaroz jelde 80 V’de 45 dakika yürütülerek görüntülendi. Bant yoğunlukları ImageJ software programı ile ölçüldü.

Çizelge 3.27. PME sekansının PCR ile amplifikasyonu

PCR reaksiyon karışım içeriği	Miktar
Kalıp DNA (gDNA)	x μL (50 ng)

dNTP mix (10 mM)	0,8 µL
MgCl ₂ (50 mM)	1 µL
<i>EcoRI</i> -PME-F primer (10 pmol/µL)	1 µL
<i>KpnI</i> -PME-R primer (10 pmol/µL)	1 µL
10x PCR tamponu	1 µL
ddH ₂ O	hacmi 12 µL'ye tamamlayacak miktar
Taq DNA Polimeraz	0,6 µL
Toplam hacim	12 µL

Çizelge 3.28. PCR şartları

Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)
1	94	4
35	94	1
	61	1
	72	1
1	72	5
	4	∞

3.2.6. Rekombinant protein üretimi

YPD plaklarda 48 saat boyunca inkübasyona bırakılan hemen hemen aynı büyüklüğe sahip pGKB α -PME ve pGKB α plazmitlerini taşıyan rekombinant *P. pastoris* kolonilerinden 20 mL YPD besiyerine inoküle edilerek 30 °C'de, 250 rpm'de gece boyu inkübe edildi. İnkübasyon sonrası OD₆₀₀ değeri 2 olan kültür sıvısı (12,5 mL) 5000 x g'de 5 dakika santrifüj edilerek toplanan hücreler 50 mL YPD üretim besiyerine (%1 kazamino asit, %1 KH₂PO₄ pH:6, %1 YNB içeren) inoküle edilip, 30 °C'de, 250 rpm'de ve 72 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası alınan örnekler, 4 °C'de, 5000 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen kültür sıvılarınının 10'ar mL'si Amicon (Milipore) filtre ile konsantre edilerek enzim aktivitesi ve SDS-PAGE analizi için kullanıldı.

3.2.6.1. PME enzim aktivitesinin agaroz plak aktivite yöntemi ile tayini

Rekombinant maya hücreleri tarafından kültür ortamına salgılanan PME enziminin aktivite tayini için substrat olarak pektinin kullanıldığı agaroz plaklar kullanıldı. Plaklar

şu şekilde hazırlandı; 0,02 mol/L sitrik asit, 0,04 mol/L Na₂HPO₄ ve 1 g/L turunçgil pektini (pH: 5) içeren 20 g/L agaroz çözeltisi agaroz tamamen çözününceye kadar ısıtıldıktan sonra petrilere döküldü. Daha sonra soğuyarak katılaştıran agaroz plaklarda 2 mm'lik kuyular açıldı. Her bir kuyuya konsantre edilen kültür sıvılarından (kontrol ve rekombinant hücrelere ait) 25'er µL konularak 30 °C'de 16 saat inkübe edildi. Ardından plaklar, steril saf suyla yıkanarak 0,2 g/L rutenyum kırmızısı ile 45 dakika boyunca boyandı. Daha sonra kuyular steril saf su ile yıkanarak görüntülendi (Peng *et al.* 2005; Jiang *et al.* 2013).

Ayrıca agaroz yerine agar kullanılarak YPD-pektin agar besiyeri hazırlandı. Hazırlanan besiyerine rekombinant hücreler (1. koloni) ve boş vektör içeren hücrelerden eşit miktarda ekim yapılarak 72 saat boyunca 30 °C'de inkübasyona bırakıldı. Ardından plaklar, steril saf suyla yıkanarak 0,2 g/L rutenyum kırmızısı ile 45 dakika boyunca boyandı. Daha sonra plak steril saf su ile yıkanarak görüntülendi (Peng *et al.* 2005; Jiang *et al.* 2013).

3.2.6.2. SDS-PAGE analizi

Agaroz plak aktivite yöntemi ile en büyük zon oluşumuna sahip koloniyi oluşturan hücrelerin ekstraselüler olarak ürettiği PME enziminin varlığının ispatlanması ve proteinin moleküler kütlelerinin hesaplanabilmesi için SDS-PAGE analizi yapıldı. Bunun için 1. koloniye ait kültür sıvısı 5-10-20 kat olacak şekilde konsantre edildi. Ayrıca PME genini içermeyen boş vektör (pGKBα) taşıyan hücrelerin kültür sıvısı da kontrol olarak kullanıldı.

Bu işlem için öncelikle elektroforez plakaları ve aparatları su ve alkol ile temizlenerek jel hazırlama aparatına konuldu. Cam plakalar arasına hazırlanan ayırma jeli (EK 2) pipetle döküldü ve jelin üst kısmının düz bir şekilde olabilmesi için izopropanol ile tabaka oluşturuldu. Ayırma jeli polimerleştikten sonra izopropanol uzaklaştırılarak polimerleşen jelin üzerine yığma jeli (EK 2) ilave edildi. Yığma jeline tarak yerleştirildi ve polimerleşmesinden sonra tarak çıkarılarak cam plakalar elektroforez tankına konularak

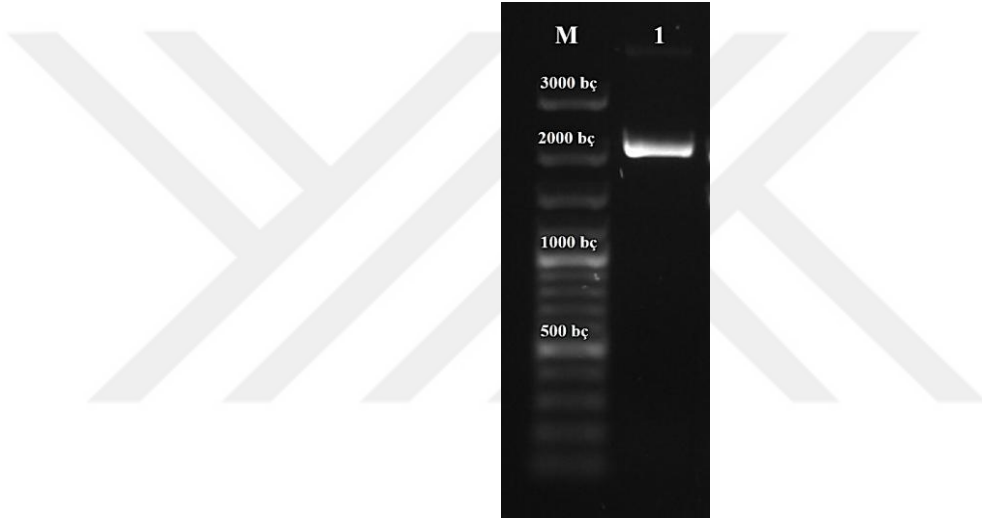
üzerine yürütme tamponu ilave edildi. Hazırlanan örneklerden kuyulara 14'er μL yüklendi. Örnekler ilk önce 60 V'de 30 dakika, daha sonra 120 V'de 75 dakika oda sıcaklığında yürütüldü (Laemmli 1970). Örnekler yürütüldükten sonra cam plakalar arasındaki jel dikkatli bir şekilde çıkarılarak boyama işlemi gerçekleştirildi. Boyama için öncelikle jel, 'sabitleştirme çözeltisi'ne alınarak 45 dakika yavaşça çalkalandı. Süre sonunda jel, 'boyama çözeltisi'ne alınarak 2 saat boyunca çalkalanarak boyandı. Boyamadan sonra 'yıkama çözeltisi'ne alınan jel 2 saat boyunca çalkalandıktan sonra saf su ile yıkanarak görüntüleme cihazı ile görüntülendi (Kullanılan solüsyonlar EK 2'de verildi).



4. ARAŞTIRMA BULGULARI

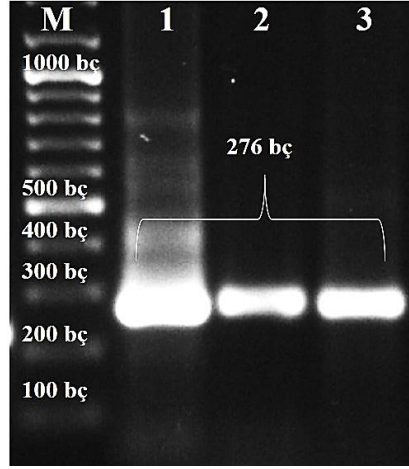
4.1. pGKB Vektör DNA'sının Doğrulanması

Addgene'den temin edilen ve LB-kanamisin agar besiyerinde büyütülen *E. coli* hücrelerinden pGKB plazmiti izole edildi. İzole edilen plazmit agaroz jelde yürütülerek görüntülendi (Şekil 4.1).



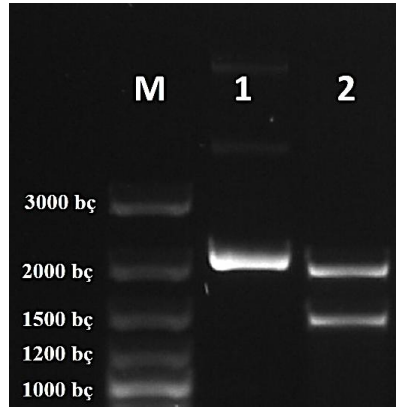
Şekil 4.1. pGKB vektör DNA'sına ait agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Markır; 1. kuyu: pGKB plazmiti)

İzole edilen vektör DNA'ya ait primerler ile PCR reaksiyonun gerçekleştirilmesi için öncelikle farklı bağlanma sıcaklıklarına sahip primerlerin optimum bağlanma sıcaklıkları belirlendi. Bunun için gradiyent PCR yapıldı. Reaksiyon sonrası PCR ürünleri, agaroz jelde yürütülerek görüntülendi. Sonuç olarak jelde beklenen boyutta bant (276 bp) gözlemlendi. Ayrıca vektör primerleri ile PCR yapılacağı zaman her üç primer bağlanma sıcaklığının da kullanılabilceği görüldü (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Markır; 1-3. Kuyular; sırasıyla, 56 °C, 52 °C ve 48 °C primer bağlanma sıcaklığı)

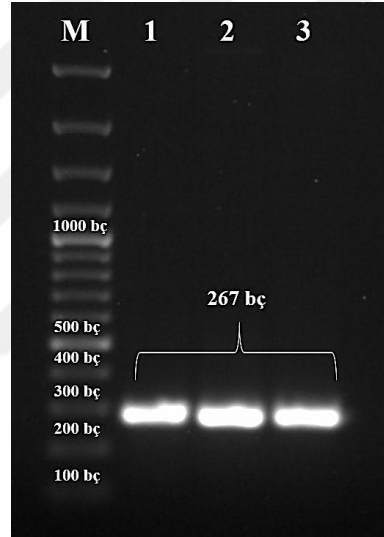
Diğer bir doğrulama yöntemi olarak izole edilen plazmitin *EcoRI* ve *HindIII* enzimleri ile kesim reaksiyonu tercih edildi. Reaksiyon sonucu elde edilen ürün agaroz jelde yürütülerek görüntülendi (Şekil 4.3). Yürütme sonucunda kesilen vektör DNA'da beklenildiği gibi 1499 bç ve 2007 bç uzunluğunda iki bant görüntülendi. Sonuç olarak, yapılan her iki doğrulama yöntemi ile temin edilen pGKB vektör DNA'sının doğruluğu teyit edilmiş oldu.



Şekil 4.3. Kesim reaksiyon ürününün agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Markır; 1. kuyu: kesilmemiş pGKB plazmiti; 2. kuyu: kesilmiş pGKB plazmiti)

4.2. α -faktör Sinyal Sekansının PCR ile Amplifikasyonu

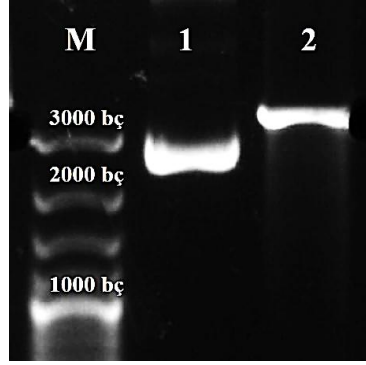
α -faktör sinyal sekansının Phusion High-Fidelity (HF) DNA Polimeraz enzimi ile amplifikasyonu için primerlerin doğru primer bağlanma sıcaklığını belirleyebilmek amacıyla gradiyent PCR yapıldı. PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntüledi (Şekil 4.4). Görüntüleme sonucunda denenen üç primer bağlanma sıcaklığında da beklenen boyutta bant (267 bç) görüldü. Bundan sonraki çalışmalar için primer bağlanma sıcaklığı 60 °C olarak belirlendi.



Şekil 4.4. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Markır; 1-3. kuyular; sırasıyla, 59 °C, 60 °C ve 61 °C primer bağlanma sıcaklığı)

4.3. α -faktör Sinyal Sekansının ve pGKB Vektör DNA'sının Kesilmesi ve Görüntülenmesi

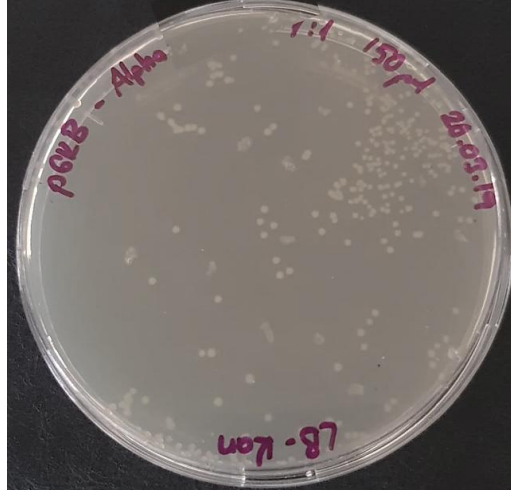
PCR sonucu elde edilen sinyal sekansı saflaştırılıp *EcoRI* ve *AsuII* restriksiyon enzimleri ile kesildi. Aynı restriksiyon enzimleri kullanılarak kesilen vektör DNA (pGKB), agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Jel elektroforezi sonucunda DNA'nın kesildiği teyit edildi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Kesilen vektör DNA'nın agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Markır; 1. kuyu: kesilmemiş pGKB plazmiti; 2. kuyu: kesilmiş pGKB plazmiti)

4.4. *E. coli* JM109 Hücrelerinin Transformasyonu

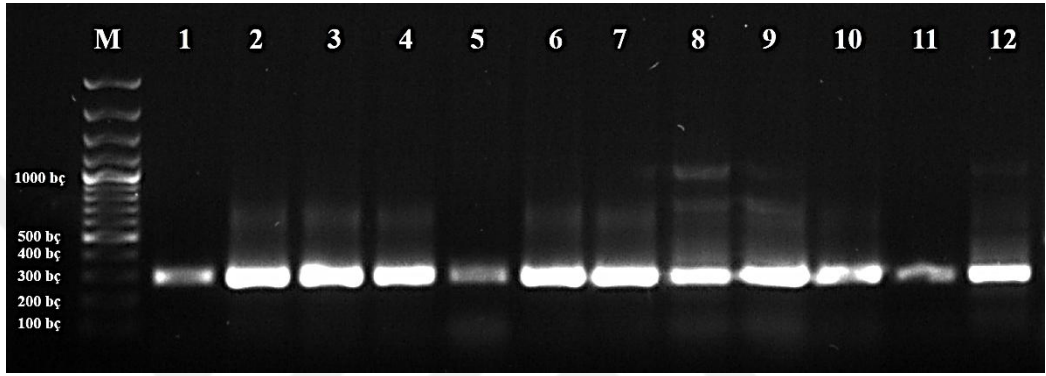
Gerçekleştirilen ligasyon reaksiyonunun ardından elde edilen ürün kompetent yapılan *E. coli* JM109 hücrelerine transfer edildi. Transformasyon işlemi sonucu, LB-kanamisin agar besiyerine yayılan hücreler, 37 °C'de gece boyu inkübasyona bırakılarak kolonilerin gelişimi gözlemlendi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. İnkübasyon sonrası gelişen bakteri kolonileri

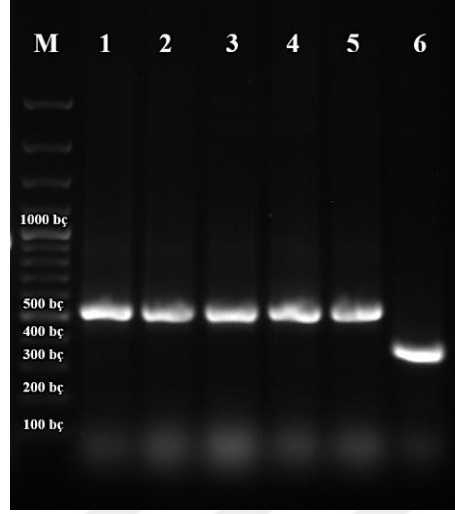
4.5. Geni Taşıyan Transformantların Belirlenmesi

Transformasyon işlemi sonrası besiyerinde gelişen kolonilerden 12 tanesi seçilerek koloni PCR reaksiyonu yapıldı. Reaksiyon sonrası PCR ürünleri, agaroz jelde 80 V'de 45 dakika yürütülerek görüntülendi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Markır; 1-12. kuyular: 1'den 12'ye kadar seçilen koloniler ile gerçekleştirilen PCR reaksiyon ürünleri)

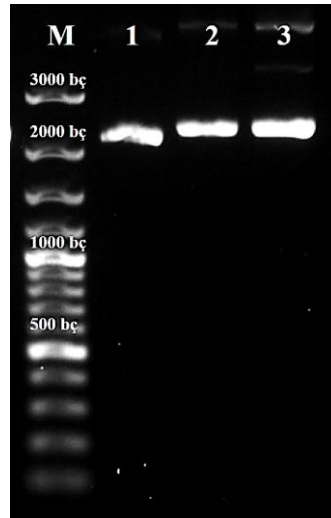
Ayrıca transformasyon sonrası gerçekleştirilen PCR reaksiyonu ile elde edilen sonuca göre seçilen 2, 3, 4, 6, 7, ve 12 numaralı koloniler ile vektör DNA primerleri kullanılarak PCR reaksiyonu yapıldı. Reaksiyon sonrası PCR ürünleri agaroz jelde yürütülerek görüntülendi. Görüntüleme sonucu 2, 3, 4, 6 ve 7 numaralı kolonilerde beklendiği gibi 551 bp uzunluğunda bant görülürken, 12. kolonide 276 bp'lik bant görüldü (Şekil 4.8). Sonuç olarak 2, 3, 4, 6 ve 7 numaralı kolonilerin muhtemel rekombinant plazmitleri taşıdığı, 12. koloninin ise boş (gen taşımayan) plazmiti taşıdığı belirlendi.



Şekil 4.8. Koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Markır; 1-6. kuyular; sırasıyla, 2, 3, 4, 6, 7 ve 12 numaralı koloniler)

4.6. Muhtemel Rekombinant Plazmitlerin Sekans Analizi

Klonlamanın doğruluğunu kontrol etmek için LB-kanamisin sıvı besiyerlerinde çoğaltılan 2 ve 4 numaralı kolonileri oluşturan bakterilerden plazmitler saflaştırıldı. Plazmitlere ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü Şekil 4.9’da verildi.

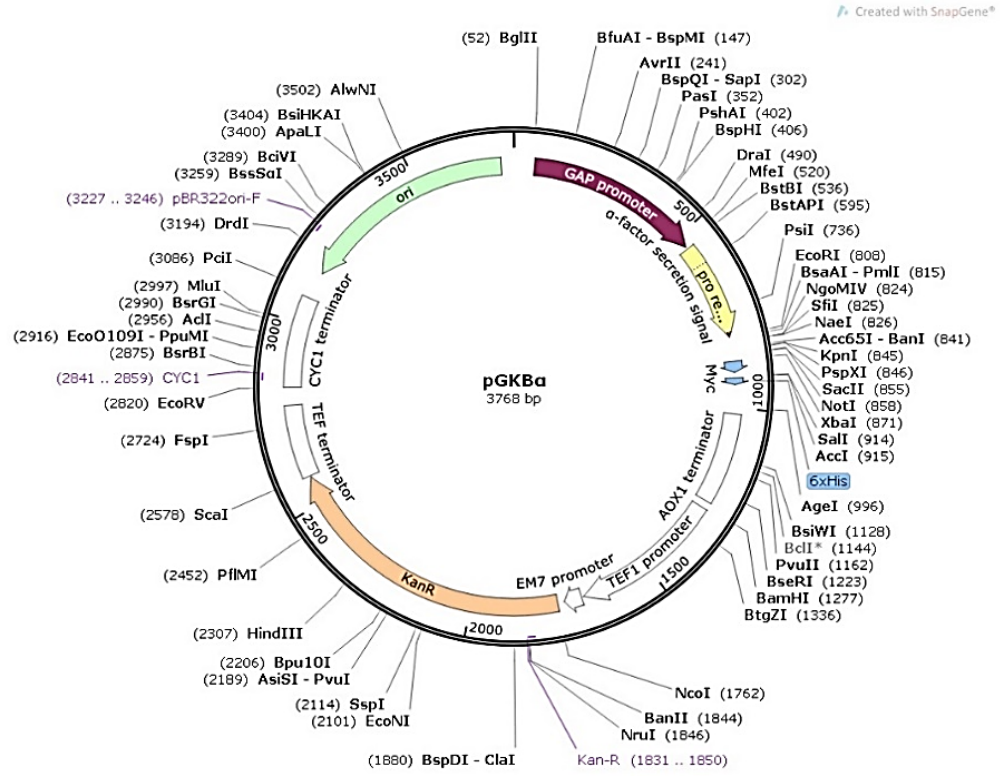


Şekil 4.9. Muhtemel rekombinant plazmitlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Markır; 1: pGKB plazmiti (kontrol); 2 ve 3. kuyular; sırasıyla, 2. ve 4. kolonilerden saflaştırılan plazmitler)

Görüntüleme ile saf oldukları belirlenen plazmitlerin sekans analizi sonucu elde edilen nükleotid sekansları, alfa faktör sinyal sekansı (pPICZαA plazmitindeki) ile blastlandığında 4. koloniden izole edilen plazmitte yer alan genin, alfa faktör sinyal sekansı ile %100 benzerlik gösterdiği görüldü (Şekil 4.10). Böylece pGKBα vektörü elde edilmiş oldu ve bundan sonraki çalışmalarda 4. koloniden izole edilen pGKBα vektörünün kullanılmasına karar verildi. Elde edilen rekombinant pGKBα plazmitinin şekli Şekil 4.11’de verildi.

Download		Graphics		
Sequence ID: Query_106843 Length: 1124 Number of Matches: 1				
Range 1: 201 to 467		Graphics		
▼ Next Match ▲ Previous Match				
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
494 bits(267)	5e-144	267/267(100%)	0/267(0%)	Plus/Minus
Query 1	ATGAGATTTCCCTCAATTTTACTGCTGTTTTATTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCT	60		
Sbjct 467	ATGAGATTTCCCTCAATTTTACTGCTGTTTTATTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCT	408		
Query 61	CCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAAATCCGGCTGAAGCTGTCATCGGT	120		
Sbjct 407	CCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAAATCCGGCTGAAGCTGTCATCGGT	348		
Query 121	TACTCAGATTTAGAAGGGGATTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAAAT	180		
Sbjct 347	TACTCAGATTTAGAAGGGGATTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAAAT	288		
Query 181	AACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTA	240		
Sbjct 287	AACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTA	228		
Query 241	TCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCT	267		
Sbjct 227	TCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCT	201		

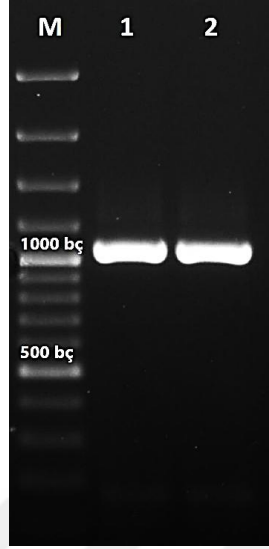
Şekil 4.10. Vektör DNA’ya ait forward primer ile gerçekleştirilen sekans analizi ile elde edilen nükleotid sekansının blast sonucu



Şekil 4.11. pGKBα vektörü

4.7. PME Genine Ait Nükleotid Sekansının PCR ile Amplifikasyonu

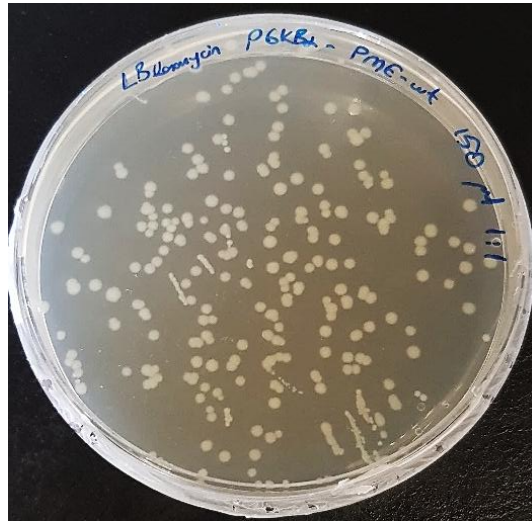
PME dizisinin ‘Phusion High-Fidelity (HF) DNA Polimeraz’ enzimi ile amplifikasyonu için doğru primer bağlanma sıcaklığını belirleyebilmek amacıyla gradiyent PCR yapıldı. Elde edilen PCR ürünleri, agaroz jel elektroforezinde 60 V’de 90 dakika yürütüldü. Görüntüleme sonucu beklenildiği gibi 1044 bp’lik gen bölgesi amplifiye edildi (Şekil 4.12). Ayrıca sonraki çalışmalarda gen primerleri ile PCR yapılacağı zaman her iki primer bağlanma sıcaklığının da kullanılabilceği görüldü.



Şekil 4.12. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Marker; 1 ve 2. kuyular; sırasıyla, 64 °C ve 65 °C primer bağlanma sıcaklığı)

4.8. *E. coli* JM109 Hücrelerinin Transformasyonu

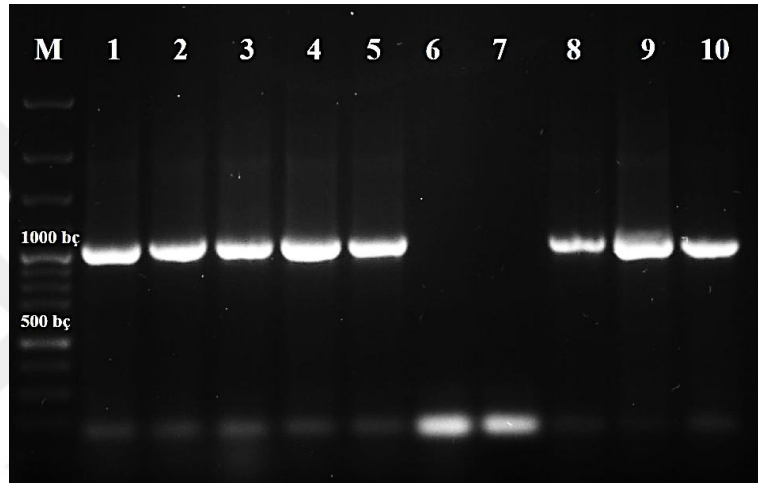
Gerçekleştirilen ligasyon reaksiyonun ardından elde edilen ürün, kompetent *E. coli* JM109 hücrelerine transfer edildi. Transformasyon işlemi sonucu, LB-kanamisin agar besiyerine yayılan hücreler, 37 °C'de gece boyu inkübasyona bırakılarak kolonilerin gelişimi gözlemlendi (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. İnkübasyon sonrası gelişen bakteri kolonileri

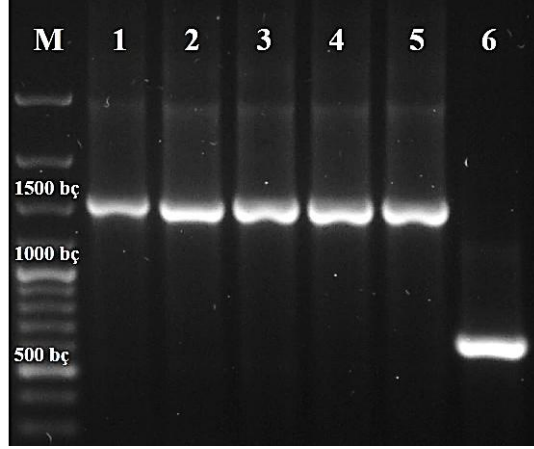
4.9. PME Genini Taşıyan Transformantların Belirlenmesi

Transformasyon işlemi sonrası besiyerinde gelişen kolonilerden 10 tanesi seçilerek koloni PCR reaksiyonu yapıldı. Reaksiyon sonrası PCR ürünleri, agaroz jelde 60 V'de 90 dakika yürütülerek görüntülendi. 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9 ve 10. kolonilerde beklenen uzunlukta bant (1044 bp) gözlenirken, 6 ve 7. kolonilerde gene ait bant gözlenmedi (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Markır; 1-10. kuyular: 1'den 10'a kadar seçilen koloniler ile gerçekleştirilen PCR reaksiyon ürünleri)

Önceki basamakta seçilen kolonilerle gen primerleri kullanılarak gerçekleştirilen koloni PCR reaksiyonu sonucuna göre seçilen 6 koloni ile (1, 2, 3, 4, 5 ve 6 numaralı koloniler) vektör DNA'ya ait primerler kullanılarak PCR yapıldı. Reaksiyon sonrası PCR ürünleri agaroz jelde yürütülerek görüntülendi. Görüntüleme sonucu 1, 2, 3, 4 ve 5 numaralı kolonilerde beklendiği gibi 1542 bp uzunluğunda bant görülürken, 6. kolonide 543 bp'lik bant görüldü (Şekil 4.15). Sonuç olarak 1-5 numaralı kolonilerin muhtemel rekombinant plazmitleri taşıdığı, 6. koloninin ise boş (gen taşımayan) plazmiti taşıdığı belirlendi.



Şekil 4.15. Koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Markır; 1-6. kuyular; sırasıyla, 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 numaralı koloniler)

4.10. Muhtemel Rekombinant Plazmitlerin Sekans Analizi

Klonlamanın doğruluğunu kontrol etmek için LB-kanamisin sıvı besiyerlerinde çoğaltılan 3 ve 5 numaralı kolonileri oluşturan bakterilerden plazmitler saflaştırıldı. Saf olarak elde edilen plazmitlerin sekans analizi sonucu elde edilen nükleotid sekansları, NCBI (National Center for Biotechnology Information)'da 'Y00549.1' accesion numaralı *P. chrysanthemi* PME gen sekansıyla blastlandığında her iki koloniden izole edilen plazmitte yer alan genin %100 benzerlik gösterdiği görüldü (Şekil 4.16). Böylece rekombinant pGKB α -PME plazmiti elde edildi. Plazmitin şekli Şekil 4.17'de verildi.

Sequence ID: Query_47115 Length: 1026 Number of Matches: 1

ARange 1: 1 to 1026 [Graphics](#)[Next Match](#) ▲

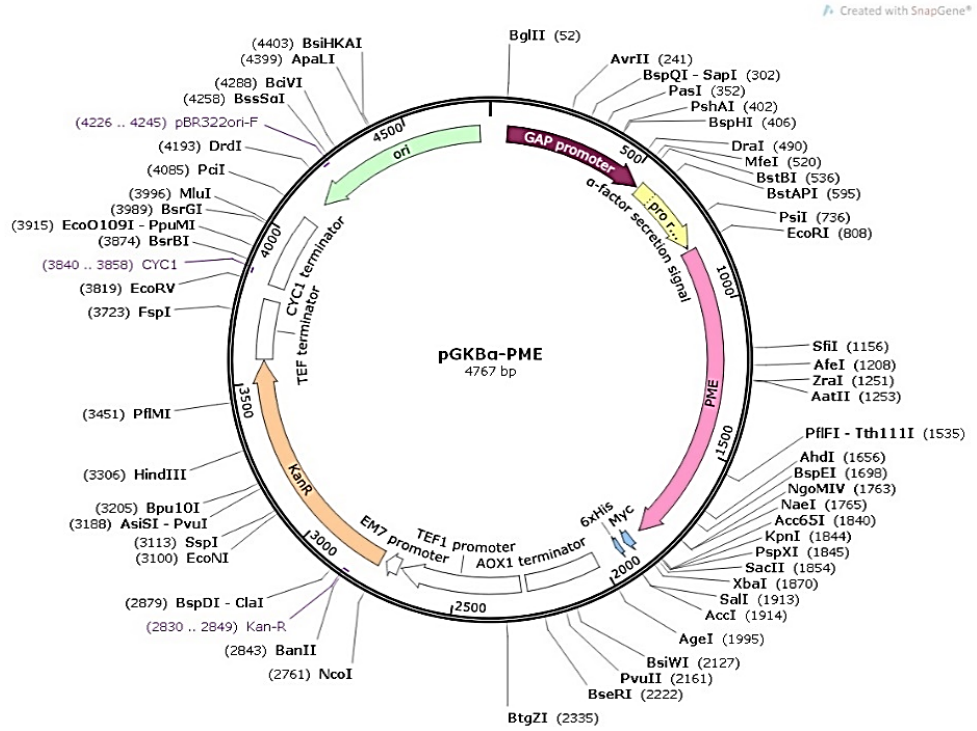
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1895 bits(1026)	0.0	1026/1026(100%)	0/1026(0%)	Plus/Plus
Query 1		GCGACAACCTACAACGCTGTGGTATCAAAATCTTCCAGCGACGGCAAAACGTTCAAAACT		60
Sbjct 1		GCGACAACCTACAACGCTGTGGTATCAAAATCTTCCAGCGACGGCAAAACGTTCAAAACT		60
Query 61		ATTGCCGACGCGATTGCCAGCGCCCCAGCAGGCAGCACGCCGTTTCGTCATTTTGATCAAG		120
Sbjct 61		ATTGCCGACGCGATTGCCAGCGCCCCAGCAGGCAGCACGCCGTTTCGTCATTTTGATCAAG		120
Query 121		AACGGCGTCTATAATGAACGCTGACGATTACCCGTAATAACCTGCTTCTGAAAGGCGAA		180
Sbjct 121		AACGGCGTCTATAATGAACGCTGACGATTACCCGTAATAACCTGCTTCTGAAAGGCGAA		180
Query 181		AGTCGTAACGGTGCGGTATTGCTGCTGCCACGGCGGCGGGCACCTGAAGTCGGACGGC		240
Sbjct 181		AGTCGTAACGGTGCGGTATTGCTGCTGCCACGGCGGCGGGCACCTGAAGTCGGACGGC		240
Query 241		AGCAAGTGGGGAACGGCAGGCAGCAGCACCATCACCATCAGCGCAAGGATTTACGCGCC		300
Sbjct 241		AGCAAGTGGGGAACGGCAGGCAGCAGCACCATCACCATCAGCGCAAGGATTTACGCGCC		300
Query 301		CAGTCGTCGACATTTCGCAACGACTTTGATTTCCCGGCCAATCAGGCCAAAAGCGACAGC		360
Sbjct 301		CAGTCGTCGACATTTCGCAACGACTTTGATTTCCCGGCCAATCAGGCCAAAAGCGACAGC		360
Query 361		GACAGCAGTAAAATCAAGGACACGCAGGCGGTAGCGCTCTATGTCACCAAAAGCGCGAC		420
Sbjct 361		GACAGCAGTAAAATCAAGGACACGCAGGCGGTAGCGCTCTATGTCACCAAAAGCGCGAC		420
Query 421		CGCGCCTACTTCAAAGACGTCAGCCTGGTCGGCTATCAGGACACGCTGTATGTTCCGGC		480
Sbjct 421		CGCGCCTACTTCAAAGACGTCAGCCTGGTCGGCTATCAGGACACGCTGTATGTTCCGGC		480
Query 481		GGCCGAGTTTCTTCCGACTGCCGTATCAGCGGCACGGTTGACTTTATCTTTGGCGAC		540
Sbjct 481		GGCCGAGTTTCTTCCGACTGCCGTATCAGCGGCACGGTTGACTTTATCTTTGGCGAC		540

Sequence ID: Query_57893 Length: 1026 Number of Matches: 1

BRange 1: 1 to 1026 [Graphics](#)[Next Match](#) ▲

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1895 bits(1026)	0.0	1026/1026(100%)	0/1026(0%)	Plus/Plus
Query 1		GCGACAACCTACAACGCTGTGGTATCAAAATCTTCCAGCGACGGCAAAACGTTCAAAACT		60
Sbjct 1		GCGACAACCTACAACGCTGTGGTATCAAAATCTTCCAGCGACGGCAAAACGTTCAAAACT		60
Query 61		ATTGCCGACGCGATTGCCAGCGCCCCAGCAGGCAGCACGCCGTTTCGTCATTTTGATCAAG		120
Sbjct 61		ATTGCCGACGCGATTGCCAGCGCCCCAGCAGGCAGCACGCCGTTTCGTCATTTTGATCAAG		120
Query 121		AACGGCGTCTATAATGAACGCTGACGATTACCCGTAATAACCTGCTTCTGAAAGGCGAA		180
Sbjct 121		AACGGCGTCTATAATGAACGCTGACGATTACCCGTAATAACCTGCTTCTGAAAGGCGAA		180
Query 181		AGTCGTAACGGTGCGGTATTGCTGCTGCCACGGCGGCGGGCACCTGAAGTCGGACGGC		240
Sbjct 181		AGTCGTAACGGTGCGGTATTGCTGCTGCCACGGCGGCGGGCACCTGAAGTCGGACGGC		240
Query 241		AGCAAGTGGGGAACGGCAGGCAGCAGCACCATCACCATCAGCGCAAGGATTTACGCGCC		300
Sbjct 241		AGCAAGTGGGGAACGGCAGGCAGCAGCACCATCACCATCAGCGCAAGGATTTACGCGCC		300
Query 301		CAGTCGTCGACATTTCGCAACGACTTTGATTTCCCGGCCAATCAGGCCAAAAGCGACAGC		360
Sbjct 301		CAGTCGTCGACATTTCGCAACGACTTTGATTTCCCGGCCAATCAGGCCAAAAGCGACAGC		360
Query 361		GACAGCAGTAAAATCAAGGACACGCAGGCGGTAGCGCTCTATGTCACCAAAAGCGCGAC		420
Sbjct 361		GACAGCAGTAAAATCAAGGACACGCAGGCGGTAGCGCTCTATGTCACCAAAAGCGCGAC		420
Query 421		CGCGCCTACTTCAAAGACGTCAGCCTGGTCGGCTATCAGGACACGCTGTATGTTCCGGC		480
Sbjct 421		CGCGCCTACTTCAAAGACGTCAGCCTGGTCGGCTATCAGGACACGCTGTATGTTCCGGC		480
Query 481		GGCCGAGTTTCTTCCGACTGCCGTATCAGCGGCACGGTTGACTTTATCTTTGGCGAC		540
Sbjct 481		GGCCGAGTTTCTTCCGACTGCCGTATCAGCGGCACGGTTGACTTTATCTTTGGCGAC		540

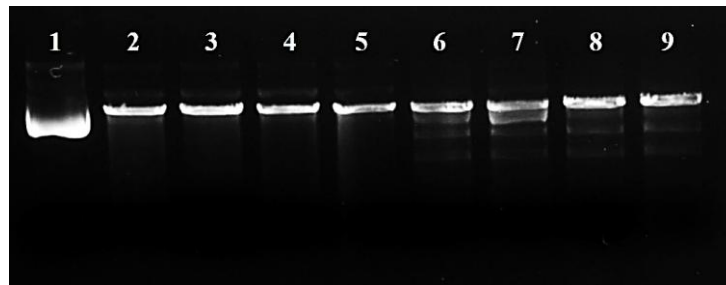
Şekil 4.16. Vektör DNA'ya ait forward ve reverse primer ile gerçekleştirilen sekans analizi ile elde edilen nükleotid sekansının blast sonucu (A: 3 nolu muhtemel rekombinant plazmit; B: 5 nolu muhtemel rekombinant plazmit)



Şekil 4.17. pGKB α -PME rekombinant vektörü

4.11. pGKB α -PME Rekombinant Vektörünün Lineer Hale Getirilmesi

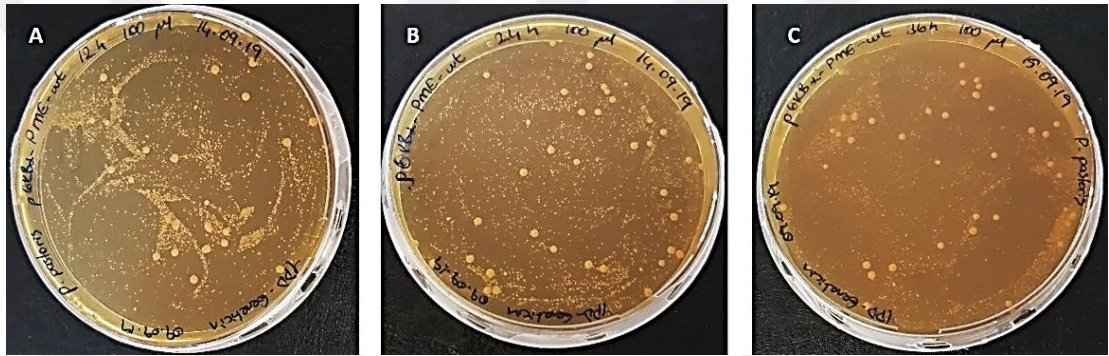
P. pastoris X33 hücrelerinin transformasyonu için saf olarak elde edilen rekombinant vektör (pGKB α -PME), *AvrII* (*Xma*JI) veya *PagI* (*Bsp*HI) enzimleri kullanılarak GAP promotör bölgesinden kesildi. Kesim ürünleri agaroz jele yüklendi ve yürütüldü. Yürütülen jel, UV görüntüleme cihazında görüntülendi. Görüntüleme sonucu rekombinant plazmitlerin kesildiği teyit edildi (Şekil 4.18).



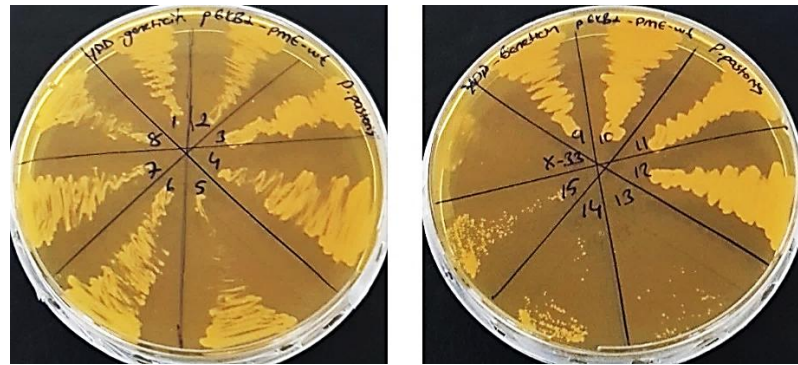
Şekil 4.18. Kesim reaksiyonu sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü (1: kesilmemiş plazmit; 2,3,4 ve 5: *AvrII* (*Xma*JI) ile kesilen plazmitler; 6, 7, 8 ve 9: *PagI* (*Bsp*HI) ile kesilen plazmitler)

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

LiCl metodu ile gerçekleştirilen transformasyon işleminden 12, 24 ve 36 saat sonra 200 µg/mL genetisin içeren YPD agar plaklara yayılan ve inkübasyon sonrası gelişen maya transformantlarından (Şekil 4.19) 15 koloni seçilerek YPD genetisin (200 µg/mL) plaklarda ikinci bir seçilim gerçekleştirildi ve 1-12. kolonilerin antibiyotiğe direnç gösterdiği gözlemlendi (Şekil 4.20).



Şekil 4.19. Transformasyon sonrası gelişen koloniler (A: 12 saat; B: 24 saat; C: 36 saat sonra yayılan plaklar)



Şekil 4.20. Seçilen kolonilerin YPD genetisin agar besiyerindeki seçilimi

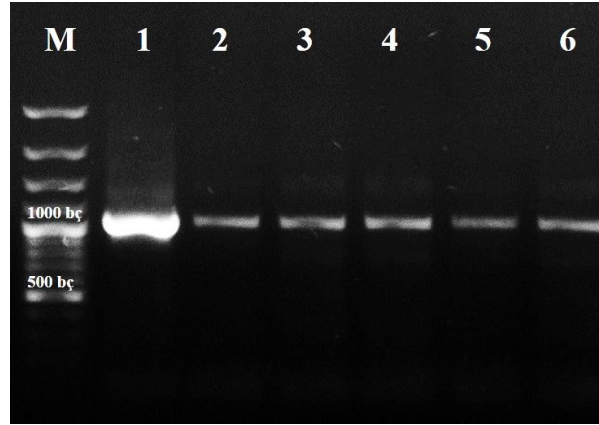
4.12.1. *P. pastoris* hücrelerinden gDNA izolasyonu ve PCR reaksiyonu

1, 2, 3, 6, 7 ve 10 numaralı kolonilerden genomik DNA (gDNA) izolasyonu yapıldı. Elüe edilen gDNA'ların konsantrasyonları nanodrop spektrofotometrede belirlendi (Çizelge 4.1).

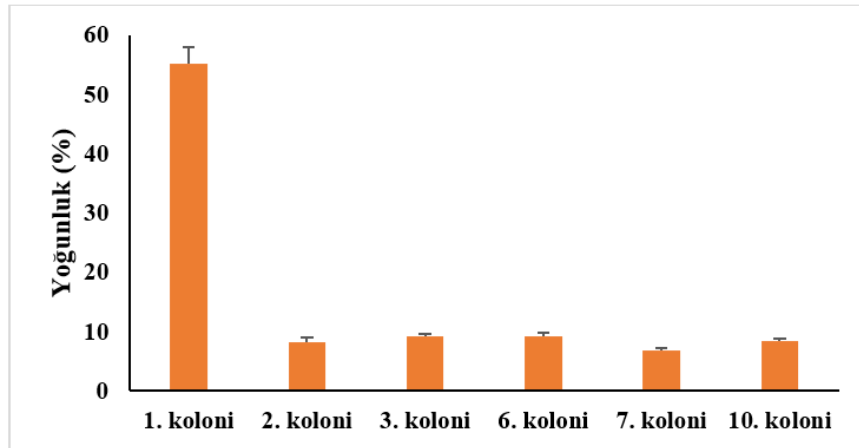
Çizelge 4.1. İzole edilen gDNA'ların konsantrasyonları

gDNA'ları izole edilen koloniler	gDNA konsantrasyonu (ng/ μ L)
1. koloni	9,06
2. koloni	13,03
3. koloni	10,18
6. koloni	12,84
7. koloni	13,35
10. koloni	11,84

Gene (PME) ait primerler ile gerçekleştirilen, izole edilen gDNA'ların kalıp olarak kullanıldığı PCR reaksiyonu sonrası elde edilen ürünler, agaroz jelde yürütülerek görüntüledi. Görüntüleme sonucunda kolonilerde beklenen boyutta bant (1044 bp) gözlemlendi (Şekil 4.21). Bant yoğunlukları ImageJ software programı ile ölçüldü (Şekil 4.22).



Şekil 4.21. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Markır; 1-6. kuyular; sırasıyla, 1, 2, 3, 6, 7 ve 10 numaralı kolonilere ait gDNA'lar ile gerçekleştirilen PCR ürünleri)



Şekil 4.22. PCR ürünlerine ait bant yoğunlukları

4.13. Rekombinant Protein Üretimi

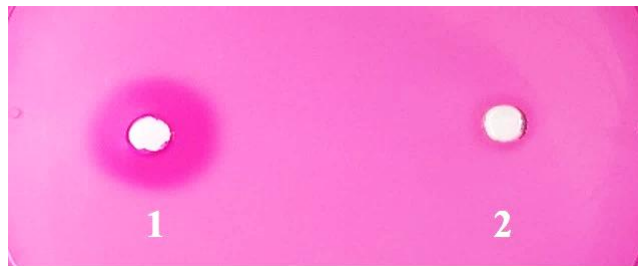
Ön kültürde gece boyu inkübe edilerek üretim kültürüne alınan rekombinant hücreler 72 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası konsantre edilen kültür sıvıları, PME enzim aktivitesi ve SDS-PAGE analizi için kullanıldı.

4.13.1. PME Enzim Aktivitesinin Agaroz Plak Aktivite Yöntemi ile Tayini

Hazırlanan agaroz plaklara 1, 2, 3, 6, 7 ve 10. kolonilere ait konsantre kültür sıvıları konuldu. Boyama sonucu 1. koloni etrafında zon oluşumu gözlenirken, daha küçük zon oluşumu sırasıyla 10. ve 2. koloni etrafında gözlemlendi. Diğer yandan, diğer kolonilerde zon oluşumu yok denecek kadar azdı (Şekil 4.23). Yapılan ikinci bir agaroz plak sonrası boyama sonucunda 20 kat konsantre edilmiş protein çözeltisinin konulduğu kuyu etrafında zon oluşumu gözlenirken, boş vektör taşıyan *P. pastoris* hücre kültür sıvısının konulduğu kuyuda zon oluşumu gözlenmedi (Şekil 4.24).

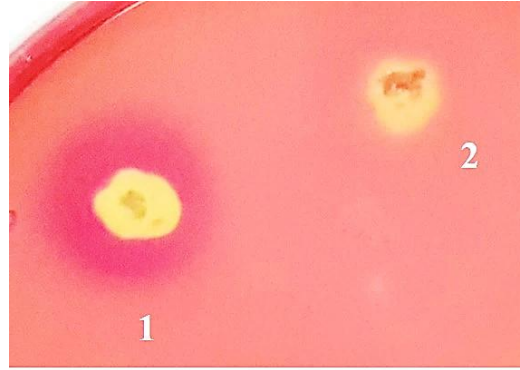


Şekil 4.23. Rutenyum kırmızısı ile boyama sonucu kuyular etrafında oluşan zonlar (V: Boş vektör taşıyan *P. pastoris*; 1, 2, 3, 6, 7 ve 10 nolu rekombinant *P. pastoris* kolonilerinin rekombinant üretimi sonucu elde edilen konsantre kültür sıvıları)



Şekil 4.24. Rutenyum kırmızısı ile boyama sonucu aktivite zonu oluşumu (1: 20 kat konsantre edilen kültür sıvısı; 2: Boş vektör taşıyan *P. pastoris* kültür sıvısı)

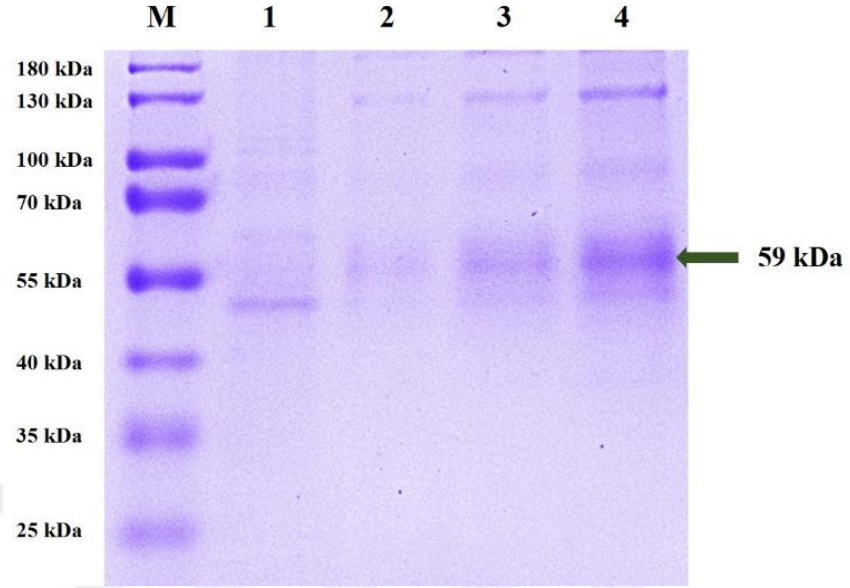
Ayrıca YPD-pektin agar besiyerinde gelişen 1. koloni etrafında zon oluşurken, boş vektör taşıyan *P. pastoris* hücreleri etrafında zon oluşumu gözlenmedi (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. Rutenyum kırmızısı ile boyama sonucu aktivite zonu oluşumu (1: 1 nolu rekombinant *P. pastoris* kolonisi; 2: Boş vektör taşıyan *P. pastoris* kolonisi)

4.13.2. SDS-PAGE Analizi

1. koloniyi oluşturan hücrelerin ve kontrol olarak pGKB α ile transforme edilen hücrelerin üretim besiyerinde 72 saatlik inkübasyon sonucu elde edilen kültür sıvıları konsantre edilerek SDS-PAGE analizi için kullanıldı. SDS-PAGE elektroforezinde yürütülen örnekler, Coomassie brilliant blue G-250 ile boyanarak görüntülendi (Şekil 4.26). Boyama sonucu elde edilen jel fotoğrafı kullanılarak standart proteinlerin Rf değerleri hesaplanıp logMK-Rf standart grafiği çizildi (EK 4). Daha sonra proteinin Rf değerleri de hesaplanarak rekombinant PME enziminin molekül kütlesinin yaklaşık 59 kDa olduğu belirlendi.



Şekil 4.26. Ekstrasellüler rekombinant proteinin SDS-PAGE analizi (M: Markır; 1: rekombinant hücrelerin konsantre kültür sıvısı (kontrol); 2, 3 ve 4. kuyular; sırasıyla, 5 kat, 10 kat ve 20 kat konsantre edilen kültür sıvısı)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Pektin, bitkilerin hücre duvarının en önemli bileşenlerindedir. Tüm yüksek yapılı bitkilerin orta lamelinde birincil hücre duvarı ve hücrelerarası bölgeler içinde yer alır (Atalay vd 2018). Pektik maddelerde, D-galakturonik asit birimleri, α -1,4 glikozidik bağları ile birbirine bağlanarak ana zinciri oluşturur. Pektin, kozmetik, gıda, biyomedikal ve ilaç endüstrisi gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Güzel ve Akpınar 2017). Ticari pektin üretiminde ise en yaygın olarak portakal kabuğu ve elma posası kullanılmaktadır (Atalay vd 2018). Pektik maddeler meyve suyunda bulanıklığa yol açtığından, meyve suyu üretiminde berraklığın elde edilebilmesi için polisakkaritlerin küçük moleküllerine kadar parçalanması gerekmektedir. Pektinin varlığında filtrasyon zorlaştığından ve meyve suyunda sonradan bulanmayı önlemek için pektin, durultma işleminin depektinizasyon aşamasında parçalanmaktadır. Bu amaçla pektinin dallı bölgelerine etki etmek gerektiğinden enzimler çok önemli bir rol alır. Bu enzimlerin başında ise pektinazlar yani pektin parçalayan enzimler gelmektedir (Uçan ve Akyıldız 2012). Bu enzimlerden biri olan pektin metilesterazlar (PME) pektindeki metil ester gruplarını parçalar. Pektin zincirindeki metoksil gruplarını hidrolizleyerek pektini poligalakturonik aside dönüştürür ve böylece metanol açığa çıkar (Arpaç 2006).

Rekombinant DNA (rDNA) teknolojileri (genetik, protein ve metabolik mühendislik), hücrelerin doğal olarak üretmedikleri çok çeşitli peptitleri, proteinleri ve biyokimyasalları üretebilmesine izin verir. Doğal protein kaynaklarının sınırlı olması ve ayrıca konsantrasyonun genellikle düşük olması nedeniyle istenilen ürünün ekstraksiyonu çok pahalı, hatta imkansızdır. Bu nedenle genetiği değiştirilen organizmalardan yüksek seviyede protein üretimi, doğal kaynaklardan protein ekstraksiyonuna önemli bir alternatiftir. Mikrobiyal ökaryotik konak sistemleri arasında, mayalar, tek hücreli organizmaların avantajlarını (genetik manipülasyon ve büyüme kolaylığı) ve ökaryotik organizmalar için özgün protein işleme kapasitesini (protein katlanması, birleşmesi ve translasyon sonrası modifikasyonlar) birleştirdiğinden rekombinant protein üretiminde yaygın olarak kullanılırlar (Porro *et al.* 2005). Metilotrofik bir maya olan *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) ise, heterolog protein üretiminde en yaygın kullanılan ökaryotik

ekspresyon sistemlerinden biridir (Vogl *et al.* 2018). *P. pastoris*, genellikle güvenilir olarak tanınan (GRAS) bir organizma olarak tanımlanır ve 2009'dan beri 500'den fazla farmasötik protein ve 1000'den fazla rekombinant protein üretimi için kullanılmıştır (Yang and Zhang 2018). Bu maya, çok yüksek hücre yoğunluklarına kadar büyütülebildiği gibi rekombinant protein üretimini hem hücre içi olarak hem de hücre dışına salgılayabilecek şekilde gerçekleştirebilir (Spohner *et al.* 2015). Elbette bu mayada yüksek miktarda rekombinant protein üretimi için plazmit, promotör, seçim markırı, salgılama sinyal sekansı ve konakçı suşu içeren uygun rekombinant sistemi tasarlamak çok önemlidir (Juturu and Chuan 2018).

Bu tez çalışmasında, rekombinant protein üretimi için konakçı organizma olarak *P. pastoris* X33 suşu ve protein üretimini, indüklemeye gerek duymadan gerçekleştirebilmek amacıyla yapısal GAP (Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz) promotörü seçilmiştir. GAP promotörü, glikoz, gliserol, etanol ve oleik asit dahil olmak üzere tüm karbon kaynaklarında proteinlerin sürekli olarak ekspresyonuna izin veren yapısal bir promotördür (Juturu and Chuan 2018). *P. pastoris*'te eksprese edilen yabancı proteinler, hücre içi üretilebildiği gibi hücre dışına da salgılanabilir. Protein saflaştırma işleminde hücre lizisi ve hücre kalıntıları istenmediğinden üretilen proteinin kültür ortamına salgılanması istenir (Cereghino and Cregg 2000). Bu amaç için çeşitli salgılama sinyal sekansları kullanılsa da *P. pastoris* için en yaygın olarak kullanılanı *S. cerevisiae* α -eşleşme faktörü (α -mating factor; α -MF) sinyalidir (Ünver 2014; Duan *et al.* 2019). 13 amino asit peptidi olan α -faktörü, prepro- α faktörü olarak adlandırılan daha büyük bir öncü olarak sentezlenir. *MF α 1* geni tarafından kodlanan öncül, 165 amino asit uzunluğundadır (Waters *et al.* 1988). Yapılan birçok çalışmada alfa faktör sinyal sekansının bulunduğu vektörler kullanılarak rekombinant proteinlerin hücre dışına salgılanması sağlanmıştır. Örneğin, Jiang *et al.* (2013) ve Wahyuni *et al.* (2016), pGAPZ α A vektörünü kullanarak GAP promotörü kontrolü altında sırasıyla *A. niger* pektin metilesteraz (PME) enziminin ve *C. antarctica* lipase B enziminin *P. pastoris*'te ekstrasellüler üretimini gerçekleştirirken, Şensoy Gün (2019), bir başka ekspresyon vektörü olan pPICZ α A vektörünü kullanarak azurin proteinini AOX promotörünün kontrolü altında ekstrasellüler olarak *P. pastoris*'te üretmiştir. Tüm bu bilgiler dikkate

alındığında, bu çalışma kapsamında üretilmek istenilen proteinin (PME), indüklenmeye gerek duyulmadan yapısal promotör kontrolünde, hücre dışına (kültür ortamına) salınımını gerçekleştirebilmek amacıyla çalışmaya GAP promotörüne sahip ve alfa faktör sinyal sekansını içeren pGKB α vektör DNA'sının elde edilmesiyle başlandı. Bunun için, pGKB vektörü *E. coli* hücrelerinden izole edilip doğruluğu teyit edildi. pPICZ α vektöründen PCR ile elde edilen alfa sinyal sekansı pGKB vektörüne yerleştirilerek pGKB α vektörü elde edildi ve bu vektöre pektin metilesteraz enzimini (PME) kodlayan gen yerleştirildi. Elde edilen rekombinant vektör (pGKB α -PME), *P. pastoris* X33'e transfer edildi. Birkaç kez tekrarlanan antibiyotik seçiminden sonra PME genini taşıyan maya transformantlarının tespiti için seçilen kolonilerden saflaştırılan gDNA'lar ile PCR yapıldı. PME genini ve boş vektörü taşıyan koloniler üretim besiyerinde inkübe edildi. Elde edilen konsantre kültür sıvıları ile agaroz plak yapılarak aktivite zonu oluşumuna bakıldı. En büyük zon oluşumuna sahip koloniye ait kültür sıvısında SDS-PAGE analizi ile proteinin varlığı belirlendi.

Bu çalışmada ilk olarak; pGKB vektörü, bakterilerden izole edilip, hem vektöre ait primerlerle gerçekleştirilen PCR reaksiyonu ile hem de restriksiyon endonükleaz enzimleri ile vektörün kesim reaksiyonunun gerçekleştirilmesiyle teyit edildi. Bakterilerden izole edilen plazmit, agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi (Şekil 4.1). Vektör primerlerinin bağlanma sıcaklıkları arasında fark olduğundan aynı zamanda uygun primer bağlanma sıcaklığını belirleyebilmek amacıyla üç farklı primer bağlanma sıcaklığı (48, 52 ve 56 °C) kullanılarak gradiyent PCR yapıldı. Reaksiyon sonrası elde edilen PCR ürünleri, agaroz jelde yürütülerek görüntülendi. Görüntüleme sonucu vektör primerleri ile gerçekleştirilecek PCR reaksiyonlarında her üç primer bağlanma sıcaklığının da kullanılabileceği görüldü (Şekil 4.2). Diğer yandan, vektör DNA, *EcoRI* ve *HindIII* enzimleri ile kesildi ve elde edilen ürün agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi (Şekil 4.3). Yürütme sonucunda *EcoRI* ve *HindIII* enzimleri ile kesilen DNA'da beklenildiği gibi 1499 bç ve 2007 bç'de bant gözlemlendi. Sonuç olarak yapılan her iki doğrulama yöntemi ile temin edilen pGKB vektörünün doğruluğu teyit edilmiş oldu.

PME enziminin ekstrasellüler üretimini gerçekleştirebilmek için pGKB vektörüne α -faktör sinyal sekansı yerleştirilerek pGKB α ekspresyon vektörü elde edildi. Bu amaçla, α -faktör sinyal sekansının amplifikasyonu için öncelikle primerlerin doğru bağlanma sıcaklığı belirlendi. Bunun için, üç farklı primer bağlanma sıcaklığı (59, 60 ve 61 °C) kullanılarak gradiyent PCR yapıldı. Agaroz jel elektroforezinde yürütülen PCR ürünlerinin görüntülenmesi sonucunda denenen üç primer bağlanma sıcaklığında da beklenen boyutta bant (267 bç) görüldü. Bundan sonraki çalışmalar için primer bağlanma sıcaklığı, 60 °C olarak belirlendi. Daha sonra belirlenen şartlarda gerçekleştirilen PCR reaksiyonu ile çoğaltılan α -faktör sinyal sekansı saflaştırıldı ve saf olarak elde edilen nükleotid sekansı, *EcoRI* ve *AsuII* (*BstBI*) restriksiyon enzimleri ile kesildi. Kesilen ürün, fenol/kloroform ekstraksiyonu sonrası ligasyon reaksiyonu için hazır hale getirildi. Aynı zamanda vektör DNA da aynı enzimlerle kesildi ve CIAP ile muamele edilerek agaroz jelde yürütüldü. Vektör DNA'nın kapalı formu, lineer formundan daha hızlı yürüdüğünden, kesilen vektör DNA için daha yukarıda bant gözlemlendi ve böylece vektör DNA'nın kesildiği teyit edildi (Şekil 4.5). Kesilen vektör DNA, jelden ekstraksiyonla saflaştırıldı. Ligasyon işlemi için hazır hale gelen vektör DNA ve nükleotid sekansı, T4 DNA ligaz enzimi ile birleştirildi. Ligasyon ürünü, CaCl₂ metodu ile kompetent hale getirilen *E. coli* hücrelerine transfer edildi. Transformantlardan kanamisin antibiyotiğine dirençli olanların LB-kanamisin (50 µg/mL) agar besiyerinde gelişimi gözlemlendi (Şekil 4.6). Seçilen 12 koloni ile α -MF nükleotid sekansına spesifik primerler kullanılarak koloni PCR reaksiyonu yapıldı. Reaksiyon sonucu elde edilen PCR ürünleri, agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve görüntüleme sonuçlarına göre α -MF sekansını taşıyan plazmiti içeren koloniler tespit edildi (Şekil 4.7). Daha sonra bu koloniler ile vektör DNA primerleri kullanılarak PCR reaksiyonu yapıldı. Reaksiyon sonrası PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi. Görüntüleme sonucu ürünlerin beklendiği gibi 551 bç uzunlukta olduğu gözlemlendi (Şekil 4.8). Klonlamanın doğruluğunu kontrol etmek için LB-kanamisin sıvı besiyerlerinde çoğaltılan 2. ve 4. kolonilerden plazmitler saflaştırıldı, ardından bu vektörlere yerleştirilen genin nükleotid dizilemesi yaptırıldı. 2. ve 4. koloniyi oluşturan bakteri hücrelerinden saflaştırılan plazmitin sekans analizi sonucu elde edilen nükleotid sekansları, alfa sinyal sekansı ile blastlandığında 4. koloniden izole edilen plazmitte yer alan sekansın, alfa sinyal sekansı ile %100 benzerlik gösterdiği görüldü (Şekil 4.10). Böylece pGKB α vektörü elde edilmiş oldu.

Rekombinant proteinin kültür ortamına salgılanmasını sağlayacak pGKB α vektörünün elde edilmesinin ardından, *P. chrysanthemi* PME geni pGKB α vektörüne yerleştirilerek pGKB α -PME rekombinant vektörü elde edildi. ‘pUCIDT-AMP+-ECPME-WT’ vektörü içerisinde sentetik olarak temin edilen PME geninin amplifikasyonu için öncelikle primerlerin doğru bağlanma sıcaklığı belirlendi. Bunun için, iki farklı primer bağlanma sıcaklığı (64 ve 65 °C) kullanılarak gradiyent PCR yapıldı. Agaroz jel elektroforezinde yürütülen PCR ürünlerinin görüntülenmesi sonucu beklenildiği gibi 1044 bp uzunluğa sahip gen bölgesi amplifiye edildi (Şekil 4.12). Ayrıca sonraki çalışmalarda gen primerleri ile PCR yapılacağı zaman her iki primer bağlanma sıcaklığının da kullanılabilmesi görüldü. Daha sonra belirlenen şartlarda gerçekleştirilen PCR reaksiyonu ile çoğaltılan PME geni saflaştırıldı ve saf olarak elde edilen gen, *EcoRI* ve *KpnI* restriksiyon enzimleri ile kesildi. Kesilen ürün, fenol/kloroform ekstraksiyonu sonrası ligasyon reaksiyonu için hazır hale getirildi. Aynı zamanda vektör DNA da aynı enzimlerle kesildi ve CIAP ile muamele edilerek agaroz jelde yürütüldü. Kesilen vektör DNA, jelden ekstraksiyonla saflaştırıldı. Ligasyon işlemi için hazır hale gelen vektör DNA ve gen, T4 DNA ligaz enzimi ile birleştirildi. Ligasyon ürünü, CaCl₂ metodu ile kompetent hale getirilen *E. coli* hücrelerine transfer edildi. Transformantlardan kanamisin antibiyotikine dirençli olanların LB-kanamisin (50 µg/mL) agar besiyerinde gelişimi gözlemlendi (Şekil 4.13). Seçilen 10 koloni ile gene spesifik primerler kullanılarak koloni PCR reaksiyonu yapıldı. Reaksiyon sonucu elde edilen PCR ürünleri, agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve görüntüleme sonuçlarına göre geni taşıyan plazmiti içeren koloniler tespit edildi (Şekil 4.14). Daha sonra bu koloniler ile vektör DNA primerleri kullanılarak PCR reaksiyonu yapıldı. Reaksiyon sonrası PCR ürünleri, agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntüledi. Görüntüleme sonucu ürünlerin beklendiği gibi 1542 bp uzunlukta olduğu gözlemlendi (Şekil 4.15). Klonlamanın doğruluğunu kontrol etmek için LB-kanamisin sıvı besiyerlerinde çoğaltılan 3. ve 5. kolonilerden rekombinant plazmitler saflaştırıldı, ardından bu vektörlere yerleştirilen genin nükleotid dizilemesi yaptırıldı. Sekans analizi sonucuna göre her iki koloniden de izole edilen plazmitte yer alan genin, *P. chrysanthemi* PME gen sekansı ile %100 benzerlik gösterdiği görüldü (Şekil 4.16). Böylece pGKB α -PME rekombinant plazmiti elde edilmiş oldu.

Transformasyon, ekzojen DNA'nın bir hücreye aktarıldığı ve genetik değişikliğe yol açtığı önemli bir tekniktir (Kawai *et al.* 2010). Genetik transformasyon ilk olarak 1928'de Griffith tarafından tanımlanmış ve o zamandan beri birçok mantar türü de dahil olmak üzere çeşitli organizmalarda gösterilmiştir (Gietz and Woods 2001). Fungal genetik transformasyonda kullanılan pek çok metod bulunmaktadır. Bunlar elektroporasyon, biyolistik (partikül bombardımanı veya gen tabancası tekniği), cam boncuklarla çalkalama, şok dalgaları, sferoplast ve lityum (LiAc; lityum asetat, LiCl; lityum klorür) yöntemidir (Griffith 1966; Gietz and Woods 2001; Kawai *et al.* 2010). Bu yöntemlerden biriyle lineer (doğrusal) hale getirilen DNA'nın hücrelere transfer edilmesi sonucu genomda homoloji gösteren bölgeler arasındaki homolog rekombinasyon yoluyla *P. pastoris*'in kalıcı transformantları oluşturulabilir (Cregg *et al.* 1985; Cregg *et al.* 1989; Invitrogen 2010a). GAP promotörü lokusundaki gen ekleme olayları, vektör üzerindeki lokus ve GAP bölgesi arasındaki tek bir çaprazlama olayından kaynaklanır (Invitrogen 2010a). Wahyuni *et al.* (2016), çalışmalarında elde ettikleri pGAPZ α -*CalBsyn* rekombinant vektörünü *BspHI* (*PagI*) restriksiyon enzimi ile lineer hale getirerek elektroporasyon metodu ile *P. pastoris*'e transfer ederken, Türkanoglu Özçelik *et al.* (2019), elde ettikleri pGAPZ α -pro-MTGase plazmitini *AvrII* (*XmaI*) enzimi ile lineer hale getirip aynı yöntemle transfer etmişlerdir. Benzer şekilde bu çalışmada elde edilen rekombinant pGKB α -PME plazmiti, *P. pastoris* X33 hücrelerinin transformasyonu için GAP promotör bölgesinden *AvrII* veya *PagI* enzimi ile lineer hale getirildi (Wu *et al.* 2003; See *et al.* 2019). Kesim ürünlerinden agaroz jele 2'şer μ L yüklenip yürütülerek görüntülendi ve görüntüleme sonucu rekombinant plazmitlerin kesildiği teyit edildi (Şekil 4.18). Beklenildiği gibi kesilerek lineer hale getirilen plazmitler, kesilmemiş plazmitten (kapalı form) daha yavaş yürüdüğünden daha yukarıda bant gözlemlendi. Lineer haldeki pGKB α -PME plazmiti, sıklıkla kullanılan metodlardan biri olan, Vellanki *et al.* (2009), Yang *et al.* (2013), Liang *et al.* (2013) ve Lee *et al.* (2014)'in da çalışmalarında kullandıkları LiCl metodu ile maya hücrelerine transfer edildi. Transformasyon işlemi sonrası 200 μ g/mL genetisin içeren YPD agar plaklarda (Yang *et al.* 2014) gelişen maya transformantlarına ait koloniler gözlemlendi (Şekil 4.19). pGKB α ekspresyon vektöründe bulunan antibiyotik direnç geni bakterilerde kanamisin antibiyotiğine direnç sağlarken, mayalarda genetisin antibiyotiğine direnç sağladığından mayalarda koloni seçilimi için genetisin antibiyotiği kullanıldı. Gelişen bu koloniler arasında küçük kolonilerin

gözlenmesinin, 200 µg/mL konsantrasyonda genetisin içeren ortamda *P. pastoris* hücrelerinin kendiliğinden direnç geliştirmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Scorer *et al.* 1994; Papakonstantinou *et al.* 2009). Transforme edilen kolonilerden 15 tanesi seçilerek 200 µg/mL genetisin içeren YPD agar plaklarda ikinci bir seçim gerçekleştirildi (Şekil 4.20) ve 1-12. kolonilerin antibiyotiğe direnç gösterdiği görüldü. Bu koloniler arasında iyi gelişim gösteren 1, 2, 3, 6, 7 ve 10 numaralı kolonilerden genomik DNA (gDNA) izolasyonu yapıldı. Gene ait primerler ile gerçekleştirilen, izole edilen gDNA'ların kalıp olarak kullanıldığı PCR reaksiyonu sonrası elde edilen ürünler, agaroz jelde yürütülerek görüntülendi. Görüntüleme sonucunda beklenen bantlar (1044 bp) gözlemlendi (Şekil 4.21). Böylece belirlenen kolonilerin PME genini taşıdığı teyit edildi. Ayrıca eşit miktarda (50 ng) gDNA'ların kullanıldığı PCR reaksiyonu sonucunda 1 numaralı kolonideki bant yoğunluğunun diğerlerinden çok daha yüksek olduğu görüldü. Literatürde (Lu *et al.* 2016), eşit miktarda gDNA kullanılarak genoma entegre olan genin kopya sayısının belirlenebileceği bildirilmiştir. Dolayısıyla, 1 numaralı koloniye ait gDNA ile yüksek bant yoğunluğunun gözlenmesi, bu koloninin genomunda diğerlerinden daha yüksek miktarda PME genini içerdiği anlamına gelmektedir.

P. pastoris'te üretimi gerçekleştirilen rekombinant PME'nin fonksiyonel olarak aktif olup olmadığını incelemek için plak aktivite yöntemi kullanıldı. Pektin metilesterazlar (PME), pektindeki metil ester gruplarını parçaladığından aktivite tayininde substrat olarak pektin kullanıldı (Arpaç 2006). Peng *et al.* (2005) ve Jiang *et al.* (2013) yapmış oldukları çalışmalarda rekombinant pGAPZα-PME içeren hücrelerin kültür süpernatantlarını, pektin içeren plaklara uygulayarak aktivite zonu gözlemlenmişlerdir. Bu amaçla çalışmamızda, *P. pastoris* pGKBα-PME ve pGKBα (kontrol) taşıyan *P. pastoris* kolonilerinden rekombinant protein üretimi gerçekleştirilerek konsantre edilen kültür sıvıları ile agaroz plak yapıldı. Boyama sonucunda hazırlanan agaroz plaklardaki kuyulara konulan konsantre sıvıların etrafında oluşan zonlar, kuyulardaki sıvılarda bulunan PME enziminin aktif olduğunu göstermektedir (Jiang *et al.* 2013). En büyük aktif zon oluşumu 1. koloni etrafında gözlenirken, daha küçük zon oluşumu sırasıyla 10. ve 2. koloni etrafında gözlemlendi. Diğer kolonilerde ise zon oluşumunun yok denecek kadar az olduğu görüldü (Şekil 4.23). Yapılan bazı çalışmalarda hücre içi üretimin hücre dışı

üretimden daha fazla olduğu görülmüştür. Örneğin, Boy (2011), *Pyrococcus furiosus* α amilaz enziminin (PFA) *P. pastoris* X-33 suşunda ekstrasellüler olarak rekombinant üretimini gerçekleştirdiğinde, enzimin N-terminal kısmına eklenen α sekresyon sinyalinin varlığına rağmen rekombinant proteinin hücre içi üretiminin daha fazla gerçekleştirildiği gözlenmiştir. Bunun sebebi olarak da rekombinant maya hücrelerinde endoplazmik retikulumdaki oksidatif stres sonucu proteinlerin yanlış katlanması ve oluşan oksidatif stres sonucu hücrenin tepki oluşturarak protein salınımının bozulması gösterilmiştir (Massahi 2017). Bu nedenle üretilen proteinin hücre içine yığılmış olabileceği düşünülmüştür. Benzer şekilde rekombinant kolonilerden bazılarının PME genini taşımalarına rağmen agaroz plakta iyi düzeyde zon oluşumu gözlenmemesinin sebebi, hücre içi yığılma olarak düşünülebilir.

Agaroz plak aktivite yöntemi ve gDNA ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonu sonucu ile en yüksek gen kopya sayısına sahip olduğu görülen 1. koloni ve pGKB α (kontrol) taşıyan *P. pastoris* kolonilerinin inkübasyonu sonucu elde edilen kültür sıvıları ile SDS-PAGE analiz yapıldı. Poliakrilamid jelde yürütülen örnekler, Coomassie brilliant blue G-250 ile boyanarak görüntülendi (Şekil 4.26). Görüntüleme sonucu rekombinant PME enziminin molekül kütlelerinin yaklaşık 59 kDa olduğu belirlendi. D'Avino *et al.* (2003), yapmış oldukları çalışmada *E. chrysanthemi* PME enziminin molekül kütlelerini 36,9 kDa olarak belirlemişlerdir. Ayrıca Heikinheimo *et al.* (1991), *Bacillus subtilis*'te eksprese ettiği *E. chrysanthemi* B374 PME enziminin molekül kütlelerini 36 kDa bulurken, Laurent *et al.* (2000), *E. chrysanthemi* 3937 PME enzimini *E. coli*'de eksprese ettiğinde 37 kDa molekül kütleyle sahip olduğunu görmüştür. Ekspresyon plazmitinde yer alan myc epitopu ve histidin kuyruğunun (6xH) rekombinant proteine 2,5 kDa ilave ettiği üretici firma (Invitrogen) tarafından bildirilmiştir. Ayrıca Bretthauer *et al.* (1999), proteinlerin C-terminal yakınındaki tandem (ardışık) bölgelerin varlığı ve hiperglikozilasyon nedeniyle molekül kütlelerinin 9-15 kDa kadar artabileceğini de belirtmişlerdir. Bu nedenle *P. pastoris* tarafından üretilen PME'nin molekül kütlelerinin beklendiğinden daha fazla olması, rekombinant proteinin glikozillenmiş olduğunu düşündürmektedir. Benzer şekilde, Peng *et al.* (2005), *F. awkeotsang* asidik pektin metilestrazını (38 kDa) *P. pastoris*'te eksprese ettiğinde doğal PME'nin molekül kütlelerini hiperglikozilasyondan

dolayı 45 kDa olarak belirlemiştir. Athmaram *et al.* (2012), yaptıkları çalışmada *P. pastoris*'te ekstrasellüler üretim sonucunda 60 kDa moleküler kütleyle sahip hemaglutinin (HA) proteininin moleküler kütlelerini yaklaşık 80 kDa olarak belirlemişlerdir. Bir diğer çalışmada *B. subtilis* α -amilaz proteininin (54 kDa) moleküler kütleleri, *P. pastoris*'te ekstrasellüler üretimi sonucu yaklaşık 60 kDa olarak bulunmuştur (Arruda *et al.* 2016).

Sonuç ve Öneriler

1. pGKB vektörüne *S. cerevisiae* α -faktör sinyal sekansı (α -MF) yerleştirilerek pGKB α vektörü elde edilmiştir.
2. *P. chrysanthemi* pektin metilesteraz enzimi, *P. pastoris* ekspresyon sisteminde ilk kez rekombinant olarak üretilmiştir.
3. Rekombinant PME proteininin *S. cerevisiae* alfa faktör sinyal sekansı aracılığıyla kültür ortamına salgılanması mümkün olmuştur. Böylece rekombinant proteinin kültür ortamından hücre içeriğini parçalamaya gerek duyulmadan saflaştırılması sağlanabilir.
4. Rekombinant PME-cMyc-His tag füzyon proteini afinite kromatografisi ile kolaylıkla saflaştırılabilir.

KAYNAKLAR

- 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), 5301–5317.
- Anonymous., 2019. Transformation of *E. coli* (calcium chloride method). http://kuchem.kyoto-u.ac.jp/seika/shiraishi/protocols/competent_cell.html (04.04.2019).
- Arpaç, Ş., 2006. Elma suyu üretiminde uygulanan işlemlerin galakturonik asit içeriğine etkisi. Y. Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli.
- Arruda, A., Reis, V., Batista, V. D., Daher, B. S., Piva, L. C., De Marco, J. L., De Moraes, L. M. and Torres, F. A., 2016. A constitutive expression system for *Pichia pastoris* based on the PGK1 promoter. *Biotechnol Lett*, 509-17.
- Atalay, D., Türken, T. and Erge, H. S., 2018. Pektin; kaynakları ve ekstraksiyon yöntemleri. *Gıda the journal of food*, 43 (6), 1002–1018.
- Athmaram, T. N., Saraswat, S., Singh, A. K., Kameswara, R. M., Gopalan, N., Suryanarayana, V. V. S. and Rao, P. V. L., 2012. Influence of copy number on the expression levels of pandemic influenza hemagglutinin recombinant protein in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Virus Genes*, 45,440–451.
- Boy, E., 2011. Recombinant *Pyrococcus furiosus* extracellular alpha amylase expression in *Pichia pastoris*. MS Thesis, The Graduate School Of Natural And Applied Sciences, Ankara, Turkey.
- Bretthauer, R. K., Castellino, F. J. and Dame, N., 1999. Glycosylation of *Pichia pastoris* derived proteins. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 30, 193–200.
- Cereghino, J. L. and Cregg, J. M., 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, (24), 45-66.
- Cregg, J. M., Madden, K. R., Barringer, K. J., Thill, G. P. and Stillman, C. A., 1989. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Molecular and Cellular Biology*, 9 (3), 1316–1323.
- Cregg, 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), 3376–3385.
- Cregg, J.M., 1999. Gene expression systems, Ed: J.M. Fernandez and J.P. Hoeffler, Academic Press, San Diego, California.
- Cregg, J. M., Tolstorukov, I., Kusari, A., Jay, A., Madden, K. and Chappell, T., 2010. Expression of recombinant genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, John Wiley. Wiley Online Library., 1–14.
- D’Avino, R., Camardella, L., Giovane, A. and Servillo, L., 2003. Tomato pectin methyltransferase: modeling, fluorescence and inhibitor interaction studies-comparison with the bacterial (*Erwinia chrysanthemi*) enzyme. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 839, 830–839.
- Domingues, R. C. C., Junior, S. B. F., Silva, R. B., Cardoso, V. L., Reis, M. H. M., 2012. Clarification of passion fruit juice with chitosan: effects of coagulation process variables and comparison with centrifugation and enzymatic treatments. *Process Biochemistry*, 47 (3), 467–471.

- Duan, G., Ding, L., Wei, D., Zhou, H., Chu, J., Zhang, S. and Qian, J., 2019. Screening endogenous signal peptides and protein folding factors to promote the secretory expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 306, 193-202.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO), 1990. Data sheets on quarantine organisms No. 53, *Erwinia chrysanthemi*.
- Fries, M., Ihrig, J., Brocklehurst, K., Shevchik, V. E. and Pickersgill, R. W., 2007. Molecular basis of the activity of the phytopathogen pectin methylesterase. *EMBO Journal*, 26 (17), 3879–3887.
- Gietz, R. D. and Woods, R. A., 2001. Genetic transformation of yeast. *BioTechniques*, 30 (4), 816–831.
- Griffith, F., 1966. The significance of penumococcal types. *Journal of Hygiene*, 64 (2), 129–175.
- Gummadi, S. N. and Panda, T., 2003. Purification and biochemical properties of microbial pectinases-a review, 38, 987-996.
- Güzel, M. ve Akpınar, Ö., 2017. Turunçgil kabuklarından elde edilen pektinlerin karakterizasyonu ve karşılaştırılması. *Akademik Gıda*, 15 (1), 17–28.
- Heikinheimo, R., Hemila, H., Pakkanen, R. and Palva, I., 1991. Production of pectin methylesterase from *Ewinia chrysanthemi* B374 in *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35, 51–55.
- Invitrogen., 2010a. pGAPZ A, B, and C pGAPZ α A, B, and C *Pichia* expression vectors for constitutive expression and purification of recombinant proteins. *Invitrogen Manual*, (25), 25–0174.
- Invitrogen, 2010b. User manual - EasySelect™ *Pichia* Expression Kit. Cat. No. K1740-01, (25), 95.
- Jacob, N. and Prema, P., 2006. Influence of mode of fermentation on production of polygalacturonase by a novel strain of *Streptomyces lydicus*. *Food Technology and Biotechnology*, 44 (2), 263–267.
- Jayani, R. S., Saxena, S. and Gupta, R., 2005. Microbial pectinolytic enzymes : A review, process biochemistry, 40, 2931–2944.
- Jiang, X., Chen, P., Yin, M. and Yang, Q., 2013. Constitutive expression, purification and characterisation of pectin methylesterase from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris* for potential application in the fruit juice industry. *Society of Chemical Industry*, (2), 375–381.
- Juturu, V. and Chuan, J., 2018. Heterologous protein expression in *Pichia pastoris*: Latest Research Progress and Applications, 19, 7–21.
- Karagöz, Ş. ve Demirdöven, A., 2016. Termosonikasyon ve geleneksel ısıtma uygulamalarının havuç suyuna etkileri: pektin metilesteraz inaktivasyonu ve fizikokimyasal özellikler. *Gıda*, 41 (5), 345-350.
- Kawai, S., Hashimoto, W. and Murata, K., 2010. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi: methods and possible underlying mechanism. *Bioengineered Bugs*, 1 (6), 395–403.
- Kaymak, E., 2008. *Arabidopsis thaliana* lipases: cloning and expression in *Pichia pastoris*. Master Thesis, Graduate School of Engineering and Natural Sciences, Sabancı University, İstanbul.
- Kohli, P., Kalia, M. and Gupta, R., 2015. Pectin methylesterases: a review. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 5 (5), 227.

- Kumar, A., Kameshwar, S. and Qin, W., 2018. Structural and functional properties of pectin and lignin-carbohydrate complexes de-esterases: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, 5 (43), 1–16.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259), 680–685.
- Laurent, F., Kotoujansky, A. and Bertheau, Y., 2000. Overproduction in *Escherichia coli* of the pectin methylesterase A from *Erwinia chrysanthemi* 3937: one-step purification, biochemical characterization, and production of polyclonal antibodies. *Canadian Journal of Microbiology*, 46 (5), 474–480.
- Lee, P. Y., Yong, V. C., Rosli, R., Gam, L. H. and Chong, P. P., 2014. Cloning, expression and purification of squalene synthase from *Candida tropicalis* in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 94, 15–21.
- Liang, S., Zou, C., Lin, Y., Zhang, X. and Ye, Y., 2013. Identification and characterization of PGCW14: a novel, strong constitutive promoter of *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*, 35 (11), 1865–1871.
- Lin-Cereghino, J., Hashimoto, M. D., Moy, A., Castelo, J., Orazem, C. C., Kuo, P., Xiong, S., Gandhi, V., Hatae, C. T., Chan, A. and Lin-Cereghino, G. P., 2008. Direct selection of *Pichia pastoris* expression strains using new G418 resistance vectors. *NIH Public Access*. 25 (4), 293–299.
- Liu, H., Qin, Y., Huang, Y., Chen, Y., Cong, P. and He, Z., 2014. Direct evaluation of the effect of gene dosage on secretion of protein from yeast *Pichia pastoris* by expressing EGFP. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24 (2), 144–151.
- Looser, V., Bruhlmann, B., Bumbak, F., Stenger, C., Costa, M., Camattari, A., Fotiadis, D. and Kovar, K., 2015. Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: a review. *Biotechnology Advances*, 33 (6), 1177–1193.
- Lu, Y., Fang, C., Wang, Q., Zhou, Y., Zhang, G. and Ma, Y., 2016. High-level expression of improved thermo-stable alkaline xylanase variant in *Pichia Pastoris* through codon optimization, multiple gene insertion and high-density fermentation. *Scientific Reports*, 6, 1–10.
- Massahi, A., 2017. Effect of signal sequences and promoters in recombinant extracellular protein production by *Pichia pastoris*. Doctoral thesis, The Graduate School Of Natural And Applied Sciences, Ankara, Turkey.
- Micheli, F., 2001. Pectin methylesterases: Cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends in Plant Science*, 6 (9), 414–419.
- Özler, A., 2009. Malatya kayısısından (*Prunus armeniaca* L.) pektinesteraz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Y. Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Papakonstantinou, T., Harris, S. and Hearn, M. T. W., 2009. Expression of GFP using *Pichia pastoris* vectors with zeocin or G-418 sulphate as the primary selectable marker. *Yeast*, 26, 311–321.
- Payasi, A., Misra, P. C. and Sanwal, G. G., 2006. Purification and characterization of pectate lyase from banana (*Musa acuminata*) fruits. *Phytochemistry*, 67, 861–869.
- Peña, D. A., Gasser, B., Zanghellini, J. and Steiger, M. G., 2018. Metabolic engineering of *Pichia pastoris*. *Metabolic Engineering*, 1–14.
- Peng, C. C., Hsiao, E. S. L., Ding, J. L. C. and Tzen, J. T. C., 2005. Functional expression in *Pichia pastoris* of an acidic pectin methylesterase from jelly fig (*Ficus awkeotsang*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (14), 5612–5616.

- Porro, D., Sauer, M., Branduardi, P. and Mattanovich, D., 2005. Recombinant protein production in yeasts recombinant protein production in yeasts. *Molecular Biotechnology*, 31 (3), 245-260.
- Sambrook J. and Russell D.W., 2001. Agarose gel electrophoresis, in molecular cloning, 3rd ed., Ed: J. Sambrook and D.W. Russell. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Scorer, C. A., Clare, J. J., McCombie, W. R., Romanos, M. A. and Sreekrishna, K., 1994. Rapid selection using G418 of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high-level foreign gene expression. *Nature Biotechnology*, 12, 181-184.
- See, P. T., Iagallo, E. M., Oliver, R. P. and Moffat, C. S., 2019. Heterologous expression of the *Pyrenophora tritici-repentis* effector proteins ToxA and ToxB, and the prevalence of effector sensitivity in Australian cereal crops. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1–17.
- Spohner, S. C., Müller, H., Quitmann, H. and Czermak, P., 2015. Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 202, 118–134.
- Şensoy Gün, B., 2019. Azurin proteininin *Pichia pastoris* ile rekombinant üretimi. Y. Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Tang, S. Z., Lin, F. L., Zheng, J. and Zhou, H. B., 2019. Effect of gene dosage and incubation temperature on production of β -mannanase by recombinant *Pichia pastoris*. *Journal of Central South University*, 26 (1), 184–195.
- Thakur, B. R., Singh, R. K., Handa, A. K., Rao, M. A., 1997. Chemistry and uses of pectin - a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37 (1), 47-73.
- Türkanoğlu Özçelik, A., Ersöz, F. and İnan, M., 2019. Extracellular production of the recombinant bacterial transglutaminase in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 159, 83–90.
- Uçan, F. ve Akyıldız, A., 2012. Meyve suyu sanayiinde enzimatik uygulamalar. *Gıda*, 37 (6), 363–370.
- Ünver, Y., Yildiz, M., Kilic, D., Taskin, M., Firat, A. and Askin, H., 2018. Efficient expression of recombinant human telomerase inhibitor 1 (hPinX1) in *Pichia pastoris*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 48 (6), 535–540.
- Ünver, Y., 2014. İnsan paraoksonaz 1 (Pon1) geninin klonlanması, *Pichia pastoris*'te ekspresyonu, rekombinant enzimin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Vellanki, R. N., Potumarthi, R. and Mangamoori, L. N., 2009. Constitutive expression and optimization of nutrients for streptokinase production by *Pichia pastoris* using statistical methods. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 158 (1), 25–40.
- Vogl, T., Gebbie, L., Palfreyman, R. W. and Speight R., 2018. Effect of plasmid design and type of integration event on recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Applied and Environmental Microbiology*, 84 (6).
- Wahyuni, F. D., Fuad, A. M. and Suharsono., 2016. Constitutive expression of *Candida antarctica* lipase B (CALB) in *Pichia pastoris* using pGAPZ α vector. *Annales Bogorienses*, 20 (1), 29–36.
- Wang, D., Zheng, P. and Chen, P., 2019. Production of a recombinant α -l-Rhamnosidase from *Aspergillus niger* CCTCC M 2018240 in *Pichia pastoris*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 189 (3), 1020-1037.

- Waters, M. G., Evans, E. A. and Blobel, G., 1988. Prepro- α -factor has a cleavable signal sequence. *Journal of Biological Chemistry*, 263 (13), 6209–6214.
- Wittmann, C. , 2017. *Industrial Microorganisms: Pichia pastoris*, 687–714.
- Wu, J. M., Chieng, L. L., Hsu, T. A. and Lee, C. K., 2003. Sequential expression of recombinant proteins and their separate recovery from a *Pichia pastoris* cultivation. *Biochemical Engineering Journal*, 16 (1), 9–16.
- Yang, H., Zhai, C., Yu, X., Li, Z., Tang, W., Liu, Y., Ma, X., Zhong, X., Li, G., Wu, D. and Ma, L., 2016. High-level expression of Proteinase K from *Tritirachium album Limber* in *Pichia pastoris* using multi-copy expression strains. *Protein Expression and Purification*, 122, 38–44.
- Yang, J. and Liu, L., 2010. Codon optimization through a two-step gene synthesis leads to a high-level expression of *Aspergillus niger* lip2 gene in *Pichia pastoris*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 63 (3–4), 164–169.
- Yang, Z. and Zhang, Z., 2018. Engineering strategies for enhanced production of protein and bio-products in *Pichia pastoris*: A review. *Biotechnology Advances*, 36 (1), 182–195.
- Yang, J., Nie, L., Chen, B., Liu, Y., Kong, Y., Wang, H. and Diao, L., 2014. Hygromycin-resistance vectors for gene expression in *Pichia pastoris*. *Yeast*, 31, 115–125.
- 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), 1–11.

ÖZGEÇMİŞ

1993 yılında Erzurum’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Erzurum’da tamamladı. 2012 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nden 2016 yılında mezun oldu. 2016 yılında Atatürk Üniversitesi Yabancı Diller Yüksekokulu’nda Yüksek Lisans İngilizce Hazırlık öğrenimini tamamladıktan sonra 2017 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gen Mühendisliği Bilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimine başladı. Aynı zamanda Atatürk Üniversitesi Edebiyat Fakültesi İngiliz Dili ve Edebiyatı Bölümü öğrencisidir.

