

**AZURİN PROTEİNİNİN *Pichia pastoris*  
İLE REKOMBİNANT ÜRETİMİ**

**Büşra ŞENSOY GÜN**

**Yüksek Lisans Tezi  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı  
Biyoteknoloji Bilim Dalı  
Dr. Öğr. Üyesi Yağmur ÜNVER  
2019  
Her Hakkı Saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AZURİN PROTEİNİNİN *Pichia pastoris* İLE REKOMBİNANT  
ÜRETİMİ

Büşra ŞENSOY GÜN

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI  
Biyoteknoloji Bilim Dalı

ERZURUM

2019

Her hakkı saklıdır



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**AZURİN PROTEİNİNİN *Pichia pastoris* İLE REKOMBİNANT ÜRETİMİ**

Dr. Öğr. Üyesi Yağmur ÜNVER danışmanlığında, Büşra ŞENSOY GÜN tarafından hazırlanan bu çalışma, 09/05/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Biyoteknoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Mesut TAŞKIN

Üye : Doç Dr. Serkan ÖRTÜCÜ

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Yağmur ÜNVER

İmza :

İmza :

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun **30.05.2019** tarih ve **.23.../.10.....** nolu kararı ile onaylanmıştır.

**Prof. Dr. Mehmet KARAKAN**  
Enstitü Müdürü

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

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### AZURİN PROTEİNİNİN *Pichia pastoris* İLE REKOMBİNANT ÜRETİMİ

Büşra ŞENSOY GÜN

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

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Yağmur ÜNVER

Bu çalışmada *Pichia pastoris* ekspresyon sisteminde sıklıkla kullanılan ve metanolle indüklenebilen AOX (alkol oksidaz) promotörünün kontrolü altında azurin proteininin üretimi gerçekleştirilmiştir. *Pseudomonas aeruginosa* genomik DNA'sı kullanılarak amplifiye edilen ve pPICZαA ekspresyon vektörüne yerleştirilen azurin geni, *E. coli* One Shot TOP10 hücrelerinde klonlanmış ve lineer hale getirilen rekombinant vektör, *P. pastoris* X-33 hücrelerine transfer edilmiştir. Genomlarında azurin geninin çoklu kopyasını taşıyan kolonilerin seleksiyonu için antibiyotik direnç testi ve koloni PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Seçilen rekombinant transformantların protein üretim kapasiteleri karşılaştırılmıştır. Katı besiyerinde 48-72 saat inkübasyona bırakılan hücreler, gliserol içeren ön kültür besiyerlerine inoküle edilmiştir. İnkübasyon sonrası santrifüjle çöktürülen hücreler, %0,5 metanol ve %1 sorbitol içeren üretim besiyerlerine aktarılarak 48 saat boyunca çalkalamalı inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonra kültür ortamlarına promotör indükleyicisi olarak %0,5 metanol ilave edilmiştir. İnkübasyon sonrası elde edilen kültür süpernatantları ve hücre lizatları ile gerçekleştirilen Western blot analizi ile transformantların tümünde rekombinant proteinin hem ekstrasellüler hem de intrasellüler üretimi gözlenmiştir. Ayrıca her iki üretim tipine göre, 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 kütlelerinin yaklaşık 20 kDa olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada, *P. pastoris* hücrelerinde azurin proteininin ekspresyonu ilk kez gerçekleştirilmiştir.

**2019, 87 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Azurin, *Pseudomonas aeruginosa*, pPICZαA, ekspresyon, *Pichia pastoris*

## ABSTRACT

Master's Thesis

### RECOMBINANT PRODUCTION OF AZURIN PROTEIN BY *Pichia pastoris*

Büşra ŞENSOY GÜN

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

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Yağmur ÜNVER

In this study, the production of azurin protein under the control of the AOX (alcohol oxidase) promoter, which is frequently used in the *Pichia pastoris* expression system and can be induced by methanol, was performed. The azurin gene amplified using the *Pseudomonas aeruginosa* genomic DNA and inserted into the pPICZ $\alpha$ A expression vector was cloned in *E. coli* One Shot TOP10 cells and linearized recombinant vector was transferred to the *P. pastoris* X-33 cells. Antibiotic resistance test and colony PCR reaction were performed for the selection of colonies containing multicopy of the azurin gene in their genomes. Protein production capacity of selected recombinant transformants was compared. The cells incubated for 48-72 hours in solid medium were inoculated into pre-culture media containing glycerol. After incubation, centrifuged cells were transferred to the production media containing 0.5% methanol and 1% sorbitol, and incubated for 48 hours. After 24 hours, 0.5% methanol, as promoter inducer, was added to the culture media. Both extracellular and intracellular production of the recombinant protein was observed in all of the transformants by Western blot analysis performed using culture supernatants and cell lysates which were obtained after incubation. In addition, according to both types of production, it was observed that the protein production capacity of the cells constituting the 1st colony was higher than the production capacity of the other colonies. The molecular mass of the extracellular azurin protein produced by recombinant *P. pastoris* cells was found to be about 20 kDa. Expression of azurin protein in *P. pastoris* cells was performed for the first time in this study.

**2019, 87 pages**

**Keywords:** Azurin, *Pseudomonas aeruginosa*, pPICZ $\alpha$ A, expression, *Pichia pastoris*

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde yapılmıştır. Tez çalışmalarının yürütülmesi için her türlü imkanı sağlayan bölüm başkanı Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e ve çalışmada kullanılan *Pseudomonas aeruginosa* bakterisinin teminini sağlayan Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Bülent ÇETİN'e teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca, laboratuvar çalışmalarım ve deneyler süresince yardımını eksik etmeyen, bilgi ve tecrübeleri ile yol gösteren, her türlü konuda maddi manevi desteği ile yanımda olan çok değerli danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Yağmur ÜNVER'e ve her türlü konuda yardımcı olan değerli hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Melike YILDIZ'a teşekkürlerimi sunarım. Çalışmam boyunca deneylerimde her zaman yanımda olan desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Sayın Melek ACAR ve Sayın Şeyda YILDIZ'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteği ile yanımda olan ve bana sevgilerini eksik etmeyen anneme, babama, abime, ablama ve kardeşime teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince her konuda sabrıyla, ilgisiyle ve maddi manevi desteği ile yanımda olan sevgili eşim Sayın Hasan GÜN'e ve biricik oğlum Kaan Alp'e en içten duygularıyla minnetlerimi sunarım.

**Büşra ŞENSOY GÜN**

**Mayıs, 2019**

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	x
<b>1.GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1. Terapötik Bakteriyel Ürünler.....	2
1.1.1. Azurin.....	4
1.1.2. <i>Pichia pastoris</i> ekspresyon sistemi.....	6
1.1.3. <i>Pichia pastoris</i> 'in metanol kullanım metabolizması.....	10
1.1.4. Ekspresyon İçin Uygun Vektörün seçilmesi.....	11
<b>2.KAYNAK ÖZETLERİ.....</b>	<b>13</b>
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>21</b>
3.1. Materyal.....	21
3.1.1. Kimyasallar ve besiyerler.....	21
3.1.2. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar.....	21
3.1.3. Tasarlanan primerler.....	21
3.1.4. Çalışmada kullanılan pPICZ $\alpha$ A vektörü .....	22
3.1.5. Çalışmada kullanılan restriksiyon enzimleri.....	24
3.1.6. pPICZ $\alpha$ A vektörüne ait primerler.....	24
3.1.7. Çalışmada kullanılan besiyerleri.....	24
3.1.8. Çalışmada kullanılan tampon ve stok çözeltiler.....	25
3.2. Yöntem.....	25
3.2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> genomik DNA'sının izolasyonu.....	25
3.2.1.a. Genomik DNA'nın agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi.....	26
3.2.2. Gen bölgesine ait sekansın çoğaltılması.....	26
3.2.2.a. PCR ürününün agaroz jel elektroforezi .....	27
3.2.2.b. PCR ürününün jelden saflaştırılması.....	27

3.2.3. pPICZ $\alpha$ A vektörünün ve genin enzimlerle kesilmesi.....	28
3.2.3.a. Restriksiyon endonükleazlar ile genin kesilmesi.....	28
3.2.3.b. Kesilen genin fenol/kloroform ekstraksiyonu.....	29
3.2.3.c. pPICZ $\alpha$ A vektörünün kesilmesi.....	29
3.2.3.d. Kesilen vektör DNA'nın jelden ekstraksiyonu.....	30
3.2.4. Ligasyon.....	30
3.2.5. Kompetent <i>E. coli</i> One Shot TOP10 hücrelerinin transformasyonu.....	30
3.2.6. Koloni PCR.....	31
3.2.7. Seçilen transformantlardan plazmit DNA izolasyonu.....	32
3.2.7.a. Vektöre ait primerler ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonu.....	33
3.3. Bakterilerin gliserolde stoklanması.....	33
3.4. Rekombinant pPICZ $\alpha$ A-Azu vektörünün sekans analizi.....	33
3.5. İzole edilen rekombinant pPICZ $\alpha$ A-Azu vektörünün lineer hale getirilmesi.....	34
3.5.1. Lineer rekombinant pPICZ $\alpha$ A-Azu vektörünün fenol/kloroform ile ekstraksiyonu.....	35
3.5.2. <i>P. pastoris</i> X-33 hücrelerinin transformasyonu.....	35
3.5.2.a. <i>P. pastoris</i> X-33 hücrelerinin kompetent hale getirilmesi.....	35
3.5.2.b. Transformasyon işlemi.....	36
3.5.2.c. Transforme edilen mayaların antibiyotik içeren besiyerinde seçilimi.....	36
3.6. Rekombinant <i>P. pastoris</i> hücrelerinin stoklanması.....	38
3.7. Rekombinant protein üretimi.....	38
3.8. Western blot analizi.....	38
3.8.1. TCA (Trikloroasetik Asit) ile protein çöktürme.....	39
3.8.2. Hücre lizatının hazırlanması.....	39
3.8.3. SDS PAGE ile proteinleri yürütme.....	39
3.8.4. Blotlama.....	40
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</b>	<b>42</b>
4.1. <i>P. aeruginosa</i> 'nın Genomik DNA'sının İzolasyonu ve Agaroz Jel Elektrofrezinde Görüntülenmesi.....	42
4.2. Azurin Genine Spesifik Primerlerle Gerçekleştirilen Gradient PCR Reaksiyonu.....	42
4.3. Vektör DNA ile Genin Kesilmesi ve Görüntülenmesi.....	43



4.4. Bakteri Hücrelerinin Transformasyonu.....	44
4.5. Geni Taşıyan Transformantların Belirlenmesi.....	44
4.6. Vektör DNA Primerleri ile Gerçekleştirilen PCR Reaksiyonu.....	45
4.7. Bakteri Hücrelerinden Saflaştırılan Plazmitin Sekans Analizi.....	46
4.8. Saflaştırılan Rekombinant Vektörün Lineer Hale Getirilmesi.....	48
4.9. Rekombinant Protein Üretimi İçin Transformantların Seçilimi.....	48
4.10. Seçilen Rekombinant Maya Transformantlarının Protein Üretim Kapasitelerinin Karşılaştırılması.....	50
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>	<b>53</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>68</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>75</b>
EK 1.....	75
EK 2.....	78
EK 3.....	83
EK 4.....	85
EK 5.....	86
EK 6.....	87
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>88</b>

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

aa	Aminoasit
°C	Santigrat Derece
dk	Dakika
g	Gram
His	Histidin
kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
nm	Nanometre
pg	Pikogram
%	Yüzde
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
sn	Saniye
V	Volt

## Kısaltmalar

AOX	Alkol oksidaz
bç	Baz çifti
BMGY	Tamponlanmış karmaşık gliserol besiyeri (Buffered glycerol complex medium)
BMMY	Tamponlanmış karmaşık metanol besiyeri (Buffered methanol complex medium)
CIAP	Sığır Bağırsak Alkalın Fosfataz (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase)
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
dH <sub>2</sub> O	Distile su
gDNA	Genomik Deoksiribonükleik asit
LB	Luria Bertani
LSLB	Düşük Tuzlu Luria Bertani (Low Salt Luria Bertani)
LiCl	Lityum Klorid
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
PEG	Polietilen glikol
RNA	Ribonükleik asit
rDNA	Rekombinant Deoksiribonükleik asit
rpm	Dakikadaki devir sayısı (Rotation per minute)
SOC Broth	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. Azurin proteininin üç boyutlu yapısı.....	4
Şekil 3.1. pPICZ $\alpha$ A vektörü.....	22
Şekil 3.2. pPICZ $\alpha$ A plazmitinde mevcut olan çoklu klonlama bölgesine ait nükleotid sekansı.....	23
Şekil 3.3. Rekombinant pPICZ $\alpha$ -Azu plazmiti.....	34
Şekil 4.1. <i>P. aeruginosa</i> genomik DNA'sının agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	42
Şekil 4.2. Gradient PCR reaksiyon ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	43
Şekil 4.3. Kesilen Vektör DNA'nın agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	43
Şekil 4.4. LSLB-zeosin agarda gelişen transformantların görüntüsü.....	44
Şekil 4.5. Koloni PCR sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	45
Şekil 4.6. PCR Reaksiyonu sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	45
Şekil 4.7. Forward pimerle gerçekleştirilen sekans analizi ile elde edilen nükleotid sekansının blast sonucu.....	46
Şekil 4.8. Reverse pimerle gerçekleştirilen sekans analizi ile elde edilen nükleotid sekansının blast sonucu.....	47
Şekil 4.9. Amino asit sekansının blast sonucu.....	47
Şekil 4.10. Lineer rekombinant vektörün agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	48
Şekil 4.11. Farklı zeosin konsantrasyonlarında gelişen transformantların görüntüsü....	49
Şekil 4.12. Koloni PCR sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	50
Şekil 4.13. İnkübasyon sonrası elde edilen kültür sıvısına ait örneklerin Western blot analizi.....	51
Şekil 4.14. İnkübasyon sonrası elde edilen hücre lizatına ait örneklerin Western blot analizi.....	52

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Azurin geninin amplifikasyonu için tasarlanan primerler.....	22
Çizelge 3.2. Kesim enzimlerinin tanıma dizileri ve kesim bölgeleri.....	24
Çizelge 3.3. PCR reaksiyon karışımı.....	26
Çizelge 3.4. PCR şartları.....	27
Çizelge 3.5. Kesim reaksiyon karışım içeriği.....	28
Çizelge 3.6. Vektör DNA'nın kesim reaksiyonu karışımı.....	29
Çizelge 3.7. Vektör DNA ve insört genin ligasyon reaksiyon karışımı.....	30
Çizelge 3.8. Koloni PCR reaksiyon karışım içeriği.....	31
Çizelge 3.9. Koloni PCR reaksiyon şartları.....	32
Çizelge 3.10. Rekombinant plazmit kesim reaksiyon karışım içeriği.....	35
Çizelge 3.11. Koloni PCR reaksiyon karışım içeriği.....	37
Çizelge 3.12. PCR reaksiyon şartları.....	37

## 1.GİRİŞ

Rekombinant DNA teknolojisi, nükleik asitlerin keşfiyle başlamış, asıl olarak 1970’de Smith’in mikroorganizmalarda bulunan ve DNA’yı spesifik dizilerinden kesen restriksiyon endonükleaz enzimlerini keşfetmesiyle ortaya çıkmıştır. Bu keşifler sonucunda ve gelişen moleküler genetik teknikler sayesinde farklı kaynaklardan gelen DNA moleküllerinin *in vitro* ortamlarda birleştirilebilmesi sağlanmıştır. Rekombinant DNA teknolojisi, doğada kendiliğinden bir arada olması mümkün olmayan, genetik mühendisliği teknikleri ile farklı organizmalardan elde edilen DNA parçalarının kesilip birleştirilmesini kapsar. Bu işlemler sonucu oluşan DNA’ya rekombinant DNA (rDNA) adı verilir. Bu teknoloji, genomda bulunan binlerce gen arasından istenen özellikteki genin ayrıştırılıp elde edilmesini ve bu genin tanımlanmasının ardından Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile büyük ölçekte çoğaltılan DNA molekülü olarak üretilmesini mümkün kılmaktadır (Smith 1985). Bu teknoloji ile istenen gen bölgesi, orjinal DNA’dan restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesilip alındıktan sonra bir vektöre aktarılıp konak hücrede çoğaltılmaktadır. Yapılacak olan çalışmanın amacına göre, çoğaltılmış olan bu genler doğrudan kullanılabilirdiği gibi genin bir konak hücrede ekspresyonu ile elde edilen proteinler de kullanılabilir (Yıldırım vd 2010).

Rekombinant DNA teknolojisinin genel prensiplerinin başında istenen genin hangi organda, dokuda ya da hücre bölümlerinde daha fazla bulunduğu bilinmesi gelir. Daha sonra sırasıyla yapılması gereken işlemler şunlardır; istenen gen bölgesini içeren doku veya hücreden DNA’nın ya da RNA’nın saf olarak izole edilmesi, gen bölgesinin belirlenmesi, istenen gen bölgesinin restriksiyon enzimleriyle kesilip çıkarılması veya PCR ile çoğaltılması, vektör DNA’nın elde edilmesi ve gen ile vektör DNA ligasyonunun ardından oluşan ürünün konak hücreye transfer edilmesi, doğru transformantların seleksiyonu ve oluşan gen ürününün kontrol edilmesidir (Arda 2000).

Bu teknoloji ile keşfedildiği günden bu yana çok sayıda protein, hormon ve enzimlerin üretimi gerçekleştirilmektedir. Örneğin, tip 1 ile tip 2 diyabet hastalıklarının sebebi olan insülin hormonunun eksikliği veya yokluğu durumunda bu hormonun üretiminin

kolaylaştırılması amacıyla insülin üretimine ilk defa 1978-1981 yılları arasında başlanmıştır (Crea 1978; Keefer 1981). İnsülin geninin ekspresyonu için *Escherichia coli* bakterisi konak hücre olarak kullanılmıştır. Tek bir mutasyona bağlı olarak vücudun birçok organında yağ birikimine sebep olan Gaucher hastalığının tedavisi için plesantada bulunan lizozomal enzim olan  $\beta$ -glukoserebrosidaz gereklidir. Tek bir doz enzim için 400-2000 plesantaya ihtiyaç duyulur. Ancak rDNA teknolojisi ile bu enzimin üretimi tütün bitkisinde gerçekleştirilmiştir. Bunlarla birlikte kanser, AIDS, romatizma, hemofili ve anemi gibi birçok hastalığın tedavisi günümüzde rekombinant proteinlerin kullanımıyla gerçekleştirilmektedir. Örneğin; anemi hastalığının tedavisi için eritropoietinler, kanser, AIDS vb hastalıklar için interlökinler, kanser ve romatizma için monoklonal antikorlar, çocuklarda büyüme geriliğini önlemek için insan büyüme faktörü, hemofili ve benzer pıhtılaşma hastalıklarının tedavisi için kan pıhtılaşma faktörleri üretilmektedir (Barnum 2006).

Rekombinant DNA teknolojisi sadece hastalıkların tedavisi için değil, tarım, gıda sanayisi, deterjan ve temizlik sanayisi, kağıt yapımı ve geri dönüşüm gibi birçok sektörde kullanılmaktadır (Barnum 2006).

### **1.1. Terapötik Bakteriyel Ürünler**

Günümüzde modern biyoteknoloji, hayvansal ve mikroorganizma temelli geleneksel biyoteknolojinin aksine kısaca "biyofarmasötikler" olarak adlandırılan yeni ilaç sistemlerine yönelmiştir. Biyofarmasötikler, iki ana sınıfa ayrılır: Küçük moleküllerden meydana gelen "kimyasal ilaçlar" ve daha büyük moleküllerden meydana gelen "terapötik proteinler". Terapötik proteinler, doğrudan bir biyolojik kaynaktan elde edilmeyen herhangi bir işlem ya da yöntemle üretilen ve tedavi amaçlı kullanılabilen proteinleri kapsamaktadır (Ommaty 2003). Bu proteinlerin büyük bir bölümü rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak üretilmektedir. Tedavi amaçlı kullanılmak istenen protein, memeli hücre kültüründe, maya veya bakterilere ait fermentasyon kültürlerinde yüksek miktarlarda üretilmektedir. Daha sonra üretilen proteinler, üretim ortamından veya hücrelerden saflaştırılmaktadır (Ommaty 2003). Son yıllarda bu üretim

sistemlerinden en fazla kullanılanlardan biri bakteri ekspresyon sistemleridir. Bu ekspresyon sistemleri, bakterilerin kolay kültüre edilebilmeleri, kültür ortamında hızlı gelişebilmeleri ve yüksek miktarda rekombinant protein üretebilmeleri sebebiyle sıklıkla tercih edilirler. Fakat prokaryotik sistemler ile üretilen ökaryotik rekombinant proteinler, prokaryotlarda bulunmayan post-translasyonel modifikasyonların gerçekleşmemesi nedeniyle fonksiyonel bir ürün olamamaktadır. Ek olarak inklüzyon cisimcikleri olarak üretilen proteinlerin elde edilmesi için bu cisimciklerini parçalayan ağır denatürantların kullanılması verimin azalması ve istenmeyen katlanmalar olması prokaryotların en büyük dezavantajlarından biridir (Yin vd 2007).

Bakteriyel terapötik proteinlerden biri olan, *Pseudomonas aeruginosa* tarafından üretilen PA-MSHA (insana duyarlı hemaglutinin) molekülü, yapılan denemeler sonucu insan mesane kanser hücre hattında EGFR sinyal yolunu inaktif etmiş, yapılan *in vivo* çalışma sonucunda apoptozu indükleyerek tümör büyümesini önemli ölçüde azaltmıştır (Chang vd 2013). Aynı mikroorganizma tarafından üretilen yeni tanımlanmış İndolin-3-on birleştiği ise kombinasyon kemoterapisinde farklı etki mekanizmalarına imkan verebilmekte, böylece kanser hücresi direncini azaltmada daha etkili olmaktadır (Milanez vd 2018). *Escherichia coli* gibi gram negatif bazı bakterilerden elde edilen L-asparaginaz enzimi başta çocuk lösemisi olmak üzere, melanosarkoma, lenfosarkoma, non-Hodkin gibi birçok kanser türünde tedavi için kullanılmaktadır. Bu enzimin anti-lösemik etkisi, sirkülasyon sırasında L-asparagin aminoasidini hızlı bir şekilde yıkarak asparagini aspartat ve amonyağa çevirmektir. Böylece kanser hücrelerinde önemli olan essansiyel aminoasitten yoksun bırakarak kanser tedavisinde yüksek terapötik etkisi ile önem kazanmaktadır (Platt vd 2000; Geckil ve Gencer 2004). Diğer yandan IL-4 toksin bileştiği, IL-4 (İnterlökin 4) ve *Pseudomonas* ekzotoksininin birleştirilmesiyle elde edilip bir kateter yardımıyla tümöre uygulanmaktadır. Bu bileşik, IL-4 reseptörlerine yüksek afinite ile bağlanarak normal beyin hücrelerine zarar vermeden kötü huylu beyin tümörlerini yok etmektedir (Laske vd 1997).

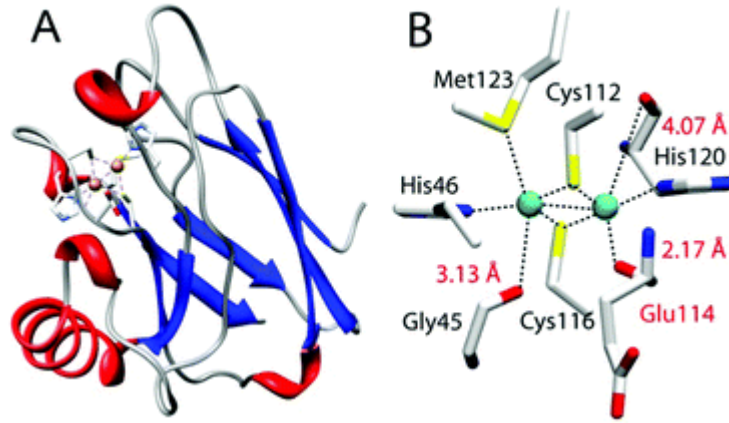
Son zamanlarda çalışılan bakteriyel terapötik proteinlerden biri de azurindir. *P. aeruginosa* tarafından üretilen bu protein, bazı kanser hücre tiplerini baskılamaktadır.



Bu yüzden, anti kanser ajan olarak yoğun ilgi çekmektedir (Zaborina vd 2000; Yamada vd 2002; Punj vd 2004).

### 1.1.1. Azurin

*P. aeruginosa* azurin geni 148 amino asitten oluşan proteini kodlar. Olgun (mature) azurin proteini 128 amino asit içeren 14 kDa (128 aa-mature peptid) gibi düşük moleküler kütleye sahip, suda çözünebilir ve bakır içeren protein (cupredoxin) ailesine ait bir proteindir. (Tang vd 1968; Naguleswaran vd 2008; Yamada vd 2009; Bernardes vd 2010). Bu protein karakteristik tek bir domain yapısına sahip, katı bir  $\beta$ -sandviç çekirdekten oluşan ve bir disülfür köprüsü ile stabilize sekiz antiparalel iplikçikler (Greek key  $\beta$ -barrel structure) tarafından oluşturulan 3 boyutlu yapıya sahiptir. Bunlara ek olarak, bakır bölgesini çevreleyen nötr bir hidrofobik parça bulundurur (Bernardes vd 2010; Fialho vd 2012) (Şekil 1.1).



**Şekil 1.1.** (A) Azurin proteininin üç boyutlu yapısı. (B) Azurin proteininin bakır bulunan domaini (Clark vd 2016).

Azurin ile ilgili yeni ve ilginç bir bilgiye ilk defa 2000 yılında Zaborina ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışma ile ulaşılmıştır. Bu çalışmada azurinün sıçan makrofaj hücre hattında (J774) sitotoksik etki gösterdiği ve apoptozu indüklediği bildirilmiştir (Zaborina vd 2000). Sonraki çalışmalarda meme kanseri (MCF-7),

melanom (UISO-Mel-2) ve osteosarkom (U2OS) hücreleri gibi farklı insan tümör hücre tiplerinde azurinin apoptozu indükleyebileceği gibi önemli düzeyde sitotoksositeye de yol açabileceği bildirilmiştir (Yamada vd 2002; Punj vd 2004; Yang vd 2005). Ayrıca azurin bahsedilen bu hücre tiplerinde, hücre içi p53 ve pro-apoptotik Bax proteinlerinin seviyesinin artmasına ve mitokondriyal sitokrom c'nin sitozole salınımına yol açmıştır. Bu işlemin hücre sel gelişimde ve hücre sel homeostazinin devamında temel süreç olan apoptozu başlatan kaspaz kaskadını (kaspaz-7 ve 9) aktive ettiği bildirilmiştir (Punj vd 2004). MCF-7 hücrelerinde azurin tedavisi sürecinde sadece Bax proteinlerinin seviyesinde artışın meydana gelmesi değil, aynı zamanda anti-apoptotik Bcl2 proteinlerinin seviyesinde azalmanın olduğu gösterilmiştir (Punj vd 2004).

Azurinin tümör hücrelerini yıkma yeteneği, kanser gelişimini inhibe eden p53 proteininin stabilitesini sağlamasından kaynaklanır. Azurin, p53 ile kompleks oluşturan ilk bakteriyel protein olarak bildirilmiştir. Çoğu viral ve memeli proteinleri fiziksel etkileşim ile p53 fonksiyonunu düzenleyebilir. Yapılan çalışmalar, azurinin tercihen meme kanseri hücrelerine girdiğini ve apoptozu indüklediğini ortaya çıkarmıştır (Yamada vd 2002). Ayrıca DU145 (insan prostat kanser hücre hattı) hücrelerinde, hücre döngüsünü durduğu gözlenmiştir (Chaudhari vd 2007). Azurinin özellikle hücre içine girişinden sorumlu PTD'yi (protein iletim alanı) içeren 50-77 aminoasitlerine karşılık gelen p28 peptidinin farklı moleküller ile etkileşerek apoptozu indükleyebildiği ve anjiyogenezi de inhibe edebildiği gösterilmiştir (Yamada vd 2009; Mehta vd 2011). Ayrıca bu peptidin sorumlu olduğu düşünülen bir diğer durum, sağlıklı hücrelere nazaran tümürlü hücrelere daha etkili bir şekilde girmesidir (Bernardes vd 2010). Diğer yandan azurin proteini, farklı bölgeleriyle ilişkili olarak antikanser, antiparaziter ve anti-HIV özellikleri barındırdığından umut verici bir terapötik peptid kaynağı olarak değerlendirilmektedir (Fialho vd 2008). Azurin gibi bakır içeren redoksinler, efrin adı verilen bir ökaryotik ligand ailesine topolojik benzerlik gösterirler (Chaudhari vd 2007). Efrinler, en büyük reseptör protein tirozin kinaz ailesini oluşturan, efrin reseptörlerine (Eph) bağlanan endojen ligandlardır (Hafner vd 2004). Bir efrin ve onun reseptörü arasındaki bağlanma ve heterodimerizasyon, Eph reseptörünün tirozin kinaz alanlarının otofosforilasyonuna yol açar, buda gelişimsel süreçlerde yer alan birkaç sinyalleme

transdüksiyon kaskadına yol açar. Ayrıca ephrinlerin, tümör gelişimi, anjiyogenez, göç ve invazyon gibi patolojik süreçlerle de bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Chaudhari vd 2007). Sonuç olarak, 88 - 113 aminoasitlerine tekabül eden azurin türevi p26 peptidi, EphB2 ligandı olan ephrinB2'ye yapısal olarak benzer olduğundan, kanser gelişimine katkıda bulunan hücrel sinyal yollarını inhibe eden EphB2'ye rekabet edebilir şekilde bağlanabilir. Böylelikle hücre sinyallemesi ve kanser büyümesi ile etkileşime girebilir (Chaudhari vd 2007).

Ayrıca azurinin sıvı kanserler üzerine de *in vitro* anti-tümör etkileri araştırılmıştır. Bu protein kronik miyeloid lösemi hücre dizisi olan K562'ye ve akut miyeloid lösemi hücre hattı olan HL60'a seçici giriş ve sitotoksik etki göstermiştir (Kwan vd 2009). K562 hücrelerinin apoptozun indüklenmesine yol açan G2/M kontrol noktasında durdurulmasında belirgin bir etki göstermiştir. Kanser hücrelerindeki seçici giriş özelliğine ek olarak, azurinden türetilen peptid p28'in, insan umbilikal ven endotel hücrelerinde (HUVEC) kılcal tüp oluşumunu engelleyerek anjiyogenez oluşumuna müdahale edebildiği gösterilmiştir (Mehta vd 2011). Diğer yandan, ilginç bir şekilde azurinin sadece kanserdeki büyüme üzerine değil, virüsler gibi farklı patojenler (AIDS virüsü; HIV-1) ve parazit protozoonlar (*Plasmodium falciparum* ve *Toxoplasma gondii*) üzerinde de etkili olduğu görülmüştür (Naguleswaran vd 2008). Bu özellikler, azurini onkoloji ve mikrobik enfeksiyonlar için terapötik peptidlerin iyi bir kaynağı haline getirmiştir. Özet olarak, anti-tümör azurin; p53 stabilizasyonu ile apoptozun indüklenmesi, anjiyogenezin inhibisyonu ve bağlayıcı efrin reseptör kinaz özellikleri sayesinde farklı yollar üzerinde bazı kanser hücrelerine karşı daha etkili olabileceği için mevcut anti-tümör ilaçlardan ayrılmaktadır (Silva 2013).

### **1.1.2. *Pichia pastoris* ekspresyon sistemi**

*Pichia pastoris* mayası, Fungi alemi, *Ascomycota* şubesi, *Saccharomycetes* sınıfı, *Saccharomycetales* takımını, *Saccharomycetaceae* familyası, *Komagataella* cinsinin bir türüdür. Metilotrofik özelliğe sahip olan bu mikroorganizma, 1-5 µm çapında, 5-30 µm uzunluğuna sahip, oval şekilli ve tek hücreli ökaryotik bir canlıdır (Higgins ve Cregg

1998; Cregg 1999). *P. pastoris*'in gelişim evresinde oksijenli solunumu tercih etmesi, onu fermentatif olan *Saccharomyces cerevisiae* gibi organizmalardan ayıran bir özelliktir. Fermentatif organizmaların güçlü fermentasyonu sonucu ürettiği etanol ve asetik asit türevi fermentasyon yan ürünleri, hızlı bir şekilde toksik seviyeye ulaşır. Fermentatif olmayan *P. pastoris*'te ise böyle bir durum ortaya çıkmaz (Cereghino vd 2002). Rekombinant protein üretimi için kullanılan *S. cerevisiae*'ye göre metilotrofik mayaların üstün yönleri bulunmaktadır. Bunlar; yüksek protein üretim imkanı, 10-100 kat daha fazla hiperglikolizasyonun engellenmesi, yüksek seviyedeki metanol konsantrasyonunda gelişebilmeleri sayesinde kültür ortamındaki diğer mikroorganizmaların elimine edilmesi, düşük maliyetli olması ve çok sayıda kopya transformasyonu gerçekleştirebilmesi olarak sayılabilir (Buckholz ve Geelson 1991; Gellison vd 1992; Romanos vd 1992).

*P. pastoris*, fermentör ortamında fazla miktarda hücre yoğunluğuna sahip olduğu için 1970'li yıllarda tek hücre proteini üretimi için geliştirilmiştir. Öncelikle endüstriyel alanda rekombinant protein üretimi için tercih edilen mükemmel bir konakçı durumundadır (Daly ve Hearn 2005; Jungo vd 2007). Bu mayanın manipülasyonu ve kültüre edilebilmesi kolaydır. Ayrıca ökaryotik bir organizma olduğundan yüksek yapıllı ökaryotik canlı hücreleri tarafından gerçekleştirilen proteolitik işlemler, disülfid bağ oluşumu, katlanma ve glikozilasyon gibi birçok posttranslasyonel modifikasyonları gerçekleştirebilir. Bu özelliği sayesinde birçok proteini bakteri ekspresyon sistemlerine göre biyolojik olarak aktif moleküller olarak üretebilme yeteneğine sahiptir. Ayrıca birçok yüksek ökaryotik sisteme göre (böcek ve memeli hücre ekspresyon sistemleri vb) daha kolay, daha hızlı, maliyeti düşüktür ve genellikle daha yüksek ekspresyon düzeyleri gösterir (Buckholz ve Geelson 1991; Romanos vd 1992).

*P. pastoris* ekspresyon sistemi, araştırma amaçlı ve endüstriyel alanda çok sayıda rekombinant protein üretimi için kullanılmaktadır (Higgins ve Cregg, 1998). *P. pastoris*'te yabancı bir genin ekspresyonu, genin bir ekspresyon vektörüne yerleştirilmesi, ekspresyon vektörünün *P. pastoris* genomuna yerleştirilmesi ve yabancı gen ürününü ifade etme potansiyeline sahip suşların belirlenmesi olmak üzere üç temel

aşamayı gerektirir. Daha önce bahsedildiği gibi *P. pastoris*, karbon ve enerji kaynağı olarak metanolü kullanır. Maya tarafından metanolün kullanılabilmesi için birkaç özel enzim gerekmektedir. Reaksiyonlar peroksizomlarda başlayıp, metabolik olaylar sitoplazmada devam eder. Peroksizomlarda gerçekleşen tepkimelerden üç enzim sorumludur. Bunlar alkol oksidaz, katalaz ve dihidroksiaseton sentazdır. Sitozolde bu enzimler sayesinde metanol asimilasyonu ve disimilasyonu gerçekleşir (Patrick vd 2005).

*P. pastoris*, AOX1 ve AOX2 olarak adlandırılan, alkol oksidaz proteinini kodlayan iki gene sahiptir. Bu mikroorganizmaya ait ekspresyon sisteminde heterolog proteinlerin ekspresyonu, AOX1 promotörünün kontrolünde gerçekleşir. Bu promotörün bilimsel çalışmalarda sıklıkla tercih edilen promotör olmasının nedeni, *P. pastoris*'te karakterize edilen ilk promotör olması, çok güçlü olması ve karbon kaynakları tarafından çok sıkı bir şekilde düzenlenmesidir. AOX1 promotörünün kontrolünde ekspresyon gerçekleştirebilen suşlar gen indüksiyonu, biyokütlenin artırılması ve protein üretiminin sağlanabilmesi için genellikle metanolü kullanırlar (Looser vd 2015). Gen indüksiyonu için kullanılan AOX1 promotörü, metanol tarafından çok kuvvetli şekilde indüklenmekte ama gliserol, glukoz, asetat ve etanol gibi karbon kaynakları tarafından baskılanmaktadır. Alanin, mannitol ve sorbitol ile baskılanmamakta ancak indüksiyon için metanole ihtiyaç duyulmaktadır (İnan ve Meagher 2001).

*P. pastoris*'e ait ekspresyon sisteminde sıklıkla kullanılan AOX1 promotörünün haricinde AOX2, DAS, GAP, ICL1, FLD1, PEX8, TEF1, PGK1 ve YPT1 gibi indüklenebilir promotörler de bulunur. FLD1 promotörü, AOX1 promotörüne göre iyi bir seçenek olarak görülse de indüksiyon için toksik ve yanıcı madde olan formaldehit veya metilamine gerek duyulmaktadır. Diğer promotörlerin AOX1 promotörü kadar yaygın kullanılmama sebebi ise heterolog genin düşük ekspresyon seviyesine neden olmalarıdır. Yapılan bir çalışmada  $\alpha$ -glukuronidazın üç farklı promotör kullanılarak ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. YPT1 promotörü kullanıldığında genin ekspresyon seviyesi GAP promotörü kullanıldığında 10 kat daha az, metanol ile

indüklenen AOX1 promotörü kullanıldığından ise 80 kat daha az bulunmuştur (Sears vd 1998).

*P. pastoris*'te heterolog proteinler AOX1 promotörünün kontrolü altında, hücre içi (intraseküler) ifade edilebildiği gibi kültür ortamına da (ekstraseküler) salgılanabilir. *P. pastoris*, sadece endojen proteinleri az miktarda salgıladığından kültür ortamında mevcut proteinin büyük çoğunluğunu heterolog proteinler oluşturmaktadır (Liu vd 1995; Brierley 1998). Rekombinant protein üretimi sırasında proteinlerin kültür ortamına salgılanması için sekresyon sinyal dizileri kullanılır. Bu diziler konakçı hücreye sıklıkla vektörler vasıtasıyla aktarılır. *P. pastoris* ekspresyon sisteminde sekresyon sinyal sekansı taşıyan vektörler; pHIL-S1, pPIC9, pPIC9K, pPICZ $\alpha$  (A,B,C) ve GAPZ $\alpha$  (A,B,C) şeklindedir. Bu vektörler, öncelikle *E. coli* hücrelerinde seçim geni, *P. pastoris* hücrelerinde seçim geni ve sekresyon sinyal dizisi taşımaktadır. İntraseküler protein üretimi gerçekleştiren vektörlerde sekresyon ile ilgili herhangi bir sinyal sekansı bulunmamaktadır (Ahmad vd 2014). Bu sayede hücresel proteinlerin rekombinant proteinlere karışmasını önlemek için gerçekleştirilen sekresyon olayı, proteinlerin saflaştırılmasındaki ilk adım olarak düşünülmektedir. Bu ekspresyon sisteminde birçok sinyal sekansının protein ekspresyonundaki başarısı farklıdır. Bunlardan en başarılısı, 85 aminoasitten oluşan *S. cerevisiae*'ye ait olan alfa-mating prepro sinyal sekansıdır (Cereghino ve Cregg 2000). Maya hücrelerinde bu sinyal sekansından ayrı olarak genellikle *P. pastoris*'e ait asit fosfataz (PHO1) sinyal sekansı da sıklıkla kullanılmaktadır (Higgins ve Cregg 1998).

*P. pastoris* mayasında beş binden daha fazla proteinin başarılı şekilde ekspresyonunun gerçekleştirilmesi, bu sistemin bilinen en iyi heterolog protein ekspresyon sistemlerinden biri olduğunu göstermiştir (Kurtzman 2009; Ahmad vd 2014; Spohner vd 2015). Birçok çalışma, *P. pastoris* ekspresyon sisteminin litrede 20-30 gram düzeyinde rekombinant protein üretebileceği sonucuna varmıştır (Morrow 2007). Mayanın gelişimi için gerekli ortam ve kültür koşullarının basitliği, genetik modifikasyonun sağlanması için kullanılan tekniklerin kolaylığı, intraseküler ve ekstraseküler protein ekspresyon seviyelerinin yüksek olması, translasyon sonrası

ökaryotik proteinlerin glikozilasyonu, disülfid bağlarının oluşması gibi modifikasyonları gerçekleştirebilme özelliğine sahip olması ve ticari olarak ekspresyon kitlerinin bulunması, endüstriyel rekombinant protein üretiminde *P. pastoris* ekspresyon sisteminin popüleritesinin artmasını sağlayan avantajlarıdır (Cereghino ve Cregg 2000).

*P. pastoris* ekspresyon sistemi, yabancı proteinlerin ekspresyonunu ekstrasellüler olarak gerçekleştirebilme yeteneğine sahip olduğundan, yabancı proteininin ekstrasellüler üretiminde, parçalanmış hücre peletini ve hücre içeriğini uzaklaştırma gibi saflaştırmanın gerek görülmeyen ilk basamağına ihtiyaç duyulmadığından çoğunlukla tercih edilir. Ayrıca *P. pastoris*, mevcut proteinlerini az miktarda salgıladığından bütün hücrelerin fermentasyon kültüründen filtrasyon veya santrifügasyonla ayrılması sayesinde salgılanan yabancı proteinin elde edilmesi kolaylaşır (Cereghino ve Cregg 2000). *P. pastoris* ekspresyon sisteminin bir diğer avantajı da GRAS (Generally Recognized As Safe, genel olarak güvenli kabul edilen) statüsünde yer almasıdır (Kjeldsen vd 1999; Cregg vd 2000).

### **1.1.3. *Pichia pastoris*'in metanol kullanım metabolizması**

*Pichia* gibi metilotrofik mayalar, metanolü karbon kaynağı olarak kullanır, güçlü ve kontrol edilebilir promotörleri bünyelerinde barındırırlar. Bu özelliklerinden dolayı da rekombinant protein üretiminde oldukça rağbet gören konakçı hücrelerdir. Metanol kullanabilen bütün suşlar, *Hansenula*, *Pichia*, *Candida* ve *Torulopsis* cinslerine aittir (Faber vd 1995). Bu tür mikroorganizmalar, reaksiyonları özelleşmiş mikrobadilerde ve peroksizomlarda başlayan, birkaç enzim içeren, spesifik olarak metanol kullanılan metabolik yolağı sahiptir. Büyüme sırasında önemli rol oynayan peroksizomlar, metanol metabolizmasında kilit öneme sahip olan alkol oksidaz ve katalaz gibi enzimleri barındırır. Sitozolda ise asimilasyon ve disimilasyonun devam eden reaksiyonları gerçekleşir (Patrick vd 2005). Metanol metabolizmasının birinci adımı, alkol oksidaz enziminin moleküler oksijeni kullanmasıyla metanolün formaldehite yükseltgenmesidir. Bu reaksiyon sonucu açığa çıkan hidrojen peroksitin toksik etkisinden kaçmak için, reaksiyon peroksizomlarda gerçekleşir. Toksik olan hidrojen

peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), katalaz enzimi sayesinde oksijen ve suya ayrışır. Bu tepkime sayesinde toksik etkinin sitoplazmaya geçişi engellenmektedir (Veenhuis vd 2006). Meydana gelen formaldehitin bir kısmı, peroksizomdan uzaklaşarak sitoplazmada mevcut olan formaldehit dehidrogenaz (FLD) veya format dehidrogenaz (FDH) tarafından oksitlenir ve hücreye enerji sağlanır. Diğer kısmı ise ksiluloz-5-fosfat ve dihidroksiaseton sentaz (DHAS) tarafından katalizlenen kondensasyon reaksiyonuyla 3-karbonlu iki bileşik oluşur. Bunlar dihidroksiaseton (DHA) ve gliseraldehit-3-fosfattır (GAP). Bu iki bileşiğin metabolize olması sitozolde gerçekleşir (Veenhuis vd 2006).

*P. pastoris* suşları, metanol kullanım durumlarına göre üç farklı fenotip gösterir; Mut<sup>+</sup>, Mut<sup>s</sup> ve Mut<sup>-</sup>. Mut<sup>+</sup> fenotipindeki suşlar, ortamda metanol olduğunda büyür ve yüksek ölçekli fermentasyon üretiminde yüksek metanol seviyesi gerektirir. Mut<sup>s</sup> fenotipine sahip suşlar, yavaş büyür ve yavaş metanol kullanım metabolizmasına sahiptir. Bunun sebebi ise AOX1 geni silindiğinden metanol metabolizması, AOX2 geni sayesinde yürütülür. Mut<sup>-</sup> fenotipindeki suşlarda ise AOX1 ve AOX2 genleri bozulduğu için metanol varlığında gelişim gösteremezler (Looser vd 2015).

#### 1.1.4. Ekspresyon için uygun vektörün seçilmesi

Mikroorganizmalarda gen klonlanması için birçok vektörden yararlanılmaktadır. Bu vektörlerin hedefe yönelik, bilinçli şekilde seçilmesi ve kullanılması gereklidir. Özellikle, baz sıralarının, restriksiyon haritalarının, gen fonksiyonlarının, hücre içi replikasyon mekanizmalarının, spesifik markırları gibi diğer birçok özelliklerinin iyi bir şekilde bilinmesi ve tanınması klonlamanın başarılı olabilmesi için çok önemli bir durumdur (Arda 2000). *P. pastoris* mayasında protein ekspresyonu için pPICZ ve pGAPZ vektörleri uygundur (The Recombinant Protein Handbook). pPICZ A, B ve C *Pichia* vektörleri, basit klonlama ve seçilim, yüksek seviyede protein ifadesi ve rekombinant proteinin hızlı tespiti ve saflaştırılması için tasarlanmıştır. Bu vektörler, çoklu kopya bütünleyici (multi copy integrant) suşların doğrudan seçilmesi için zeosin direnç genini içerir. Artan zeosin miktarlarında, genoma entegre edilmiş genin çoklu kopyalarını taşıyan suşlar elde edilir. Bir rekombinant *Pichia* suşunda ilgilenilen genin



kopya sayısının arttırılması, daha yüksek ekspresyon seviyelerine neden olabilmektedir (İnvitrogen 2010).

Bu çalışmada *P. aeruginosa*'ya ait azurin geninin AOX promotörünün kontrolünde pPICZ $\alpha$ A vektörüne klonlanması, rekombinant azurin proteinin *P. pastoris*'te AOX promotörünün kontrolünde ekstrasellüler üretiminin gerçekleştirilmesi ve en iyi üretim yapan klonun belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Yapılan literatür taraması sonucunda *P. pastoris* tarafından gerçekleştirilen çeşitli rekombinant proteinlerin üretimi ile ilgili çalışmalardan bazıları özet olarak aşağıda verilmiştir.

Wang vd (2007) tarafından fibroblast büyüme faktörü ailesinin bir üyesi olan keratinosit büyüme faktörü-2 (KGF-2) çalışılmıştır. Çalışmada tam uzunlukta sentezlenen insan KGF-2 kodlama dizisi, pPICZ $\alpha$ A vektörüne klonlanmış ve *P. pastoris* GS115 suşuna entegre edilmiştir. Metanol ile indüklenen hücreler, çalkalamalı kültürde inkübe edilmiş ve rekombinant insan KGF-2 protein (rhKGF-2) içeriği, ortama salınan toplam proteinlerin yaklaşık %17,5'ini oluşturmuştur. Optimal koşullar altında rhKGF-2'nin yaklaşık 1 g/l üretimi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca rekombinant protein, heparin afinite kromatografisi ile saflaştırılarak rhKGF-2'nin başarılı bir şekilde eksprese edildiği hem Western blot analizi hem de biyolojik aktivite analizi ile kanıtlamıştır.

Mu vd (2008) tarafından temel fibroblast büyüme faktörü (FGF; Fibroblast Growth Factor) ailesinin önemli bir üyesi olan *in vivo* ve *in vitro* düz kas hücresi büyümesini, yara iyileşmesini ve doku tamirini teşvik eden güçlü bir anjiyojenik molekül bFGF (Basic Fibroblast Growth Factor) çalışılmıştır. RT-PCR ile elde edilen tam zincir uzunluğundaki hbFGF (Human Fibroblast Growth Factor) kodlama dizisi, pPICZ $\alpha$ A vektörüne klonlanmış ve *P. pastoris* X-33 suşuna entegre edilmiştir. Bu mayada rhbFGF'nin yüksek seviyede ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Metanolla indüklenen, kültür ortamına salgılanan rhbEGF (Recombinant Human Basic Fibroblast Growth Factor) proteininin molekül kütlelerinin 18 kDa olduğu, SDS-PAGE ve Western blot analizi ile doğrulanmıştır. Rekombinant mayanın optimum büyüme koşulları, metanol konsantrasyonu, pH ve indükleme süresi çalışılarak belirlenmiştir. Belirlenen optimal koşullar altında, rhbFGF'nin 150 mg/l civarında üretimi sağlanmıştır. Maya tarafından eksprese edilen rhbFGF proteini, SP Sepharose iyon değişimi kromatografisi ile % 94'ten daha fazla saflıkta elde edilmiştir.

Yang vd (2009) tarafından ovalbümin geni, Çin bildirciminin (*Coturnix coturnix*) yumurta kanalından RT-PCR ile elde edilmiş ve pPIC9 vektörüne klonlanmıştır. Elde edilen rekombinant DNA, *P. pastoris* genomuna entegre edilmiştir. Bildircin ovalbüminine spesifik bir poliklonal antikor kullanılarak yapılan ELISA analizi sonucu, *P. pastoris*'in bildircin ovalbüminini etkili bir şekilde kültür ortamına salgıladığı gözlenmiştir. Sonuçlar, Kültür sıvısının 48 saat boyunca %0,75 metanol indüksiyonu ile bildircin ovalbümin veriminin 5,45 g/l olduğu tespit edilmiştir. Rekombinant ovalbümin, iyon değişimi ve jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılarak SDS-PAGE'de doğal ovalbümin ile karşılaştırıldığında, rekombinant proteininin *P. pastoris*'te benzer ölçüde glikozillenebileceği gösterilmiştir.

Lin vd (2009) tarafından *P. aeruginosa*'nın elastaz proteinini kodlayan lasB geni klonlanmış ve bu rekombinant proteinin üretimi, AOX promotörünün kontrolü altında *P. pastoris* KM71 suşunda başarıyla gerçekleştirmiştir. Farklı pH, farklı sıcaklıklar ve farklı metal iyonlarının rekombinant elastaz aktiviteleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Rekombinant elastaz, lasB sinyal dizisi kullanılarak kültür ortamına salgılanmış ve SDS-PAGE ile yaklaşık 34 kDa ağırlığında olduğu belirlenmiştir. Rekombinant elastaz ekspresyonu, yaklaşık 450 mg/l'lik verim ile en yüksek seviyeye ulaşmış ve bu enzimin spesifik elastolitik aktivitesinin, *P. aeruginosa*'dan elde edilen elastazinkinden yaklaşık 26 kat daha yüksek (130 U/ml) olduğu bildirilmiştir. Rekombinant elastazın optimum sıcaklığı ve pH'sı sırasıyla 28°C ve 7,4 olarak tespit edilmiştir. Enzimin ısıya karşı yüksek dirençli olduğu ve Ca<sup>+2</sup> iyonu ile aktive edilebildiği saptanmıştır. Sonuç olarak, bu enzimin, endüstriyel ölçekte üretilebileceği ve ticari bir enzim olma potansiyeline sahip olduğu bildirilmiştir.

Chen vd (2011) tarafından yapılan bir çalışmada *Trichoderma reesei*'den β-glukosidaz geni (bglI), pPIC9 vektörüne klonlanmış ve rekombinant DNA *P. pastoris* GS115 suşunun genomuna entegre edilmiştir. Rekombinant β-glukosidaz proteininin metanol ile indüklenebilir AOX promotörünün kontrolü altında ve *S. cerevisiae* sinyal peptidi (α-faktörü) kullanılarak kültür ortamına salgılanması sağlanmıştır. Elde edilen maksimum rekombinant β-glukosidaz miktarı 0,3 mg/ml ve aktivitesi 60 U/ml olarak

bulunmuştur. Rekombinant proteinin molekül kütlesinin 76 kDa olduğu ve bu enzimin % 26 verimle *Trichoderma reesei*'den 1,8 kat daha fazla ve 197 U/mg spesifik aktivite ile saflaştırıldığı bildirilmiştir. Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık, 70°C, pH ise 5,0 olarak belirlenmiştir.

Li vd (2011) tarafından multipotent hematopoietik hücrelerinin canlılığı, proliferasyonu ve farklılaşmasında rol oynayan hematopoietik bir büyüme faktörü olan İnterlökin-3 (IL-3)'ün *P. pastoris* X-33 suşunda ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Yetişkin insan IL-3 dizisini içeren bir DNA parçası, N-terminal kısmında alfa faktör sinyal dizisi ve C-terminalinde 6xHis'in yanı sıra c-Myc etiketleri ile bir füzyon protein üretimini sağlayan pPICZαA'ya klonlanmıştır. Elde edilen rekombinant plazmit, *P. pastoris* X-33 suşunun genomuna entegre edilmiştir. Yüksek seviyede rekombinant insan interlokin 3 (rhIL-3) üreten rekombinant mayaların 96 saat boyunca metanol ile indüksiyonu sonunda 26 mg/l'ye kadar rhIL-3 üretimi gözlenmiştir. rhIL-3, DEAE-sefaroze anyon değişim kromatografisi ve sonrasında Ni<sup>2+</sup>-NTA afinite kromatografisi ile %95'in üzerindeki saflıkla yaklaşık 21 mg/l verimle saflaştırılmıştır. Ayrıca rhIL-3 proteinlerinin biyolojik aktivitesi, ba/f3 hücrelerinin proliferasyonunu desteklemesi ve ERK sinyalizasyon yollarını aktive etmesi ile doğrulanmıştır. Sonuçlar, geliştirilen deney prosedürü ile, *P. pastoris*'te büyük miktarda aktif rekombinant insan IL-3'ün üretilbildiğini göstermiştir.

Latiffi vd (2013) endüstriyel uygulamalar için yüksek bir potansiyele sahip olan *Bacillus stearothermophilus* F1 tarafından üretilen termostabil alkalın proteaz enzimini mayada daha yüksek verimle elde etmeye çalışmışlardır. Çalışmada F1 proteazının maya ekspresyon sisteminde ekstrasellüler üretim kapasitesini arttırmak ve böylece saflaştırma aşamalarını basitleştirmek amaçlanmıştır. F1 proteaz geni, *P. pastoris* ekspresyon vektörlerine (pGAPZαB ve pPICZαB) klonlanmış ve *P. pastoris* suşlarının (GS115 ve SMD1168H) elektroporasyon yöntemi ile transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda F1 proteaz üretimi için yapısal ekspresyon stratejisinin, uyandırılabilir sistemden daha iyi olduğu kanıtlanmıştır. Plazmitte yer alan α-sekresyon sinyali, GS115 suşundaki (GE6GS) açık okuma çerçevesi (ORF)

ile karşılaştırıldığında, F1 proteazın  $\alpha$ -sekresyon sinyali ile daha yüksek ekspresyon seviyesine ulaştığı ve en yüksek 4,13 U/ml verimle elde edildiği gözlenmiştir. Protein, yaklaşık 34 kDa molekül kütleyle sahip His-etiketli füzyon proteini olarak ifade edilmiştir.

Ünver (2014) tarafından metanolla indüklenen AOX promotörünün kontrolü altında *P. pastoris* ekspresyon sistemi kullanılarak insan paraoksonaz1 (PON1) enziminin ekstrasellüler üretimi gerçekleştirilmiştir. Çalışmada insan PON1 geni pPICZ $\alpha$ A ekspresyon vektörüne klonlanmış ve elde edilen rekombinant vektör, *P. pastoris* X-33 suşunun genomuna entegre edilmiştir. Böylece *S. cerevisiae* alfa faktör sinyal sekansı ile enzimin ekstrasellüler üretimi gerçekleştirilmiştir. Rekombinant protein üretimi için karbon kaynağı olarak sorbitol ve proteaz inhibitörü olarak %1 kazamino asit kullanılan kültür ortamına her 24 saatte bir %0,5 metanol ilave edilmiştir. SDS-PAGE ve Western blot analizi sonucu PON1 enziminin molekül kütlesi 59,1 kDa bulunmuştur. 96 saatlik inkübasyon sonrası ekstrasellüler olarak üretilen enzim, afinite tekniği ile saflaştırılmış ve saf enzimin biyokimyasal karakterizasyonu yapılmıştır.

Luo vd (2016) tarafından yapılan çalışmada, yak (sığır) kimozin geninin mayada üretimi için rekombinant *P.pastoris* suşunun yeni bir kaynak olarak kullanılabilmesi bildirilmiştir. Total RNA, bir yakın açılmamış abomasumundan (mide bölümü) ekstrakte edilmiş ve cDNA kütüphanesi elde edilmiştir. Bu kütüphaneden yak preprokimozin, prokimozin ve kimozin genleri, sırasıyla sığır kimozin gen dizisine ait her bir enzim için ayrı gene spesifik primerler kullanılarak izole edilmiştir. Ekspresyon modelleri real time-polimeraz zincir reaksiyonu ile analiz edilmiş ve bu sonuçlara göre süt emen yakların kimozin geninin ekspresyon seviyesinin yetişkin yakların birinden 11,45 kat daha yüksek seviyede olduğu ve yak kimozinin filogenetik analizde *Bovidae* familyasına ait olduğu bulunmuştur. Her birinin ekspresyonu için, preprokimozin, prokimozin ve kimozin genleri sırasıyla pPICZ $\alpha$ A vektörüne entegre edilmiş ve *P. pastoris* X-33'te ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, preprokimozin, prokimozin veya kimozin genlerini içeren *P. pastoris*'in tüm rekombinant klonların kültür sıvısında aktif rekombinant kimozin enzimini üretebildiğini göstermiştir. Heterolog sentezlenen

prokimozinin (14,55 Soxhlet birimi/ml), eksprese edilen üç kimozin enziminden en yüksek enzim aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Bu nedenle, yak kimozin geni taşıyan rekombinant *P. pastoris* suşunun alternatif bir kimozin üretim kaynağı olabileceği sonucuna varılmıştır.

Yue vd (2016) tarafından yapılan çalışmada, araştırmalarda ve birçok sanayide oligosakkaritlerin üretilmesi için yaygın olarak kullanılan ve aljinat hidrolizi için çevre dostu bir biyokatalizör olan, bakterilerden sağlanan aljinat liyazın (AlgL) rekombinant olarak *P. pastoris*'te üretimi gerçekleştirilmiştir. Düşük ekspresyon seviyelerine ve bakteriyel hücrelerden saflaştırma zorluğuna bağlı olarak, AlgL enzim üretiminin maliyeti fazladır. Bu sebeple yapılan çalışmada, *P. pastoris*'te *Pseudomonas aeruginosa* AlgL (paAlgL) enzimini aşırı eksprese etmede etkili bir yöntem bulunmuştur. Salgılayıcı bir peptitle bileştirilen rekombinant paAlgL (rpaAlgL), ekstrasellüler olarak eksprese edilmiş ve kültür süpernatantından saflaştırılmıştır. Saflaştırılan rekombinant enzim, maksimum 2,440 U/mg aktivite ile sodyum aljinat için oldukça spesifik bulunmuştur. Enzimatik aktivite, 45°C'nin altında ve pH değeri 4 ila 10 arasında sabit kalmıştır. rpaAlgL,  $Zn^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  ve  $Fe^{+2}$  tarafından inhibe edilmiş,  $Ca^{+2}$  ve  $Co^{+2}$  tarafından aktivite edilmiştir. İlginç bir şekilde, rpaAlgL'nin ampisilin ve kanamisinine *P. aeruginosa*'ya karşı antimikrobiyal aktivitesini önemli ölçüde arttırdığı da gözlenmiştir. Sonuç olarak, verimli şekilde üretilen AlgL'nin karakterizasyonu gerçekleştirilmiş ve rekombinant paAlgL'nin *P. aeruginosa*'ya karşı antibiyotik güçlendirici olarak yeni bir özelliği ortaya çıkarılmıştır.

Li ve Xia (2018) tarafından tarımsal böcek zararlılarına karşı kullanılma potansiyeli bulunan akrebe ait uzun zincirli böcek seçici nörotoksin AaIT çalışılmıştır. AaIT'yi etkili bir şekilde ifade edebilen bir heterolog gen ekspresyon sistemi eksikliğinin *P. pastoris* X-33 suşu ve pPICZαA ekspresyon vektörü kullanılmasıyla ortadan kaldırılması amaçlanmıştır. Rekombinant AaIT'nin (rAaIT) en yüksek seviyede ekspresyonunu gerçekleştiren transformant tespit edilmiş ve bu transformantın kesikli kültür fermentasyonu sonucunda rAaIT, 240 mg/l gibi yüksek bir miktarda saflaştırılmıştır. rAaIT enjekte edilen ipekböceği (*Bombyx mori* Linnaeus) ve *Galleria*

*mellonella* larvalarında belirgin bir şekilde nörotoksin semptomlarına bağlı ölüm gerçekleşmiştir. Sonuç olarak, büyük miktarlarda anti-böcek aktivitesine sahip rAiIT elde edilebileceği bildirilmiştir.

Chan vd (2018) tarafından insan topoizomeraz I (*TopoI*) kodlama bölgesi MDA-MB-231'den izole edilmiş ve dört farklı *P. pastoris* (X-33, GS115, SMD1168H ve KM71H) suşlarında çoklu kopya rekombinant genlerin ekspresyonu çalışılmıştır. Öncelikle, enzim kodlama bölgesinin PCR amplifikasyonu gerçekleştirilerek elde edilen PCR ürünü, pPICZ $\alpha$ A vektörüne klonlanmış ve sekans analizi ile doğrulanmıştır. Daha sonra elde edilen rekombinant vektör, *Pichia*'nın X-33, GS115, SMD1168H ve KM71H suşlarına transfer edilmiştir. Pozitif klonlar için PCR taraması yapılmış ve artan zeosin konsantrasyonlarını içeren agar plaklar kullanılarak her bir *Pichia* suşunda çoklu kopya sayısı tahmin edilmiştir. Çoklu kopya genleri taşıyan seçilmiş maya klonları daha sonra çalkalamalı kültürde *TopoI* ekspresyonu için indüklenmiştir. GS115 ve SMD1168 suşlarının *TopoI*'nin ekstrasellüler ekspresyonu için daha iyi olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte, sadece GS115 suşuna ait *TopoI* kültür süpernatantlarındaki hedef enzimin, DNA sarmalının gevşemesinde tutarlı bir enzim aktivitesi sergilediği bildirilmiştir. Enzimin aktivitesi camptothecin tarafından inhibe edilmiş ve bu inhibitörün kanser hastalarının iyileştirilmesine katkı sağlayacağı düşünülmüştür.

Chen vd (2018) tarafından yapılan çalışmada, tümörün tutulumu ve kan temizlemesi ile birlikte, boyut, stabilite, çözünürlük, immünojenite ve üretim maliyetleri açısından geleneksel antikora göre birçok avantaj sunan nanobadilerden biri olan anti-CEACAM5'in yaygın ekspresyon sistemi olarak kullanılan *P. pastoris*'te ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz (GAP) promotörünün kontrolü altında anti-CEACAM5 nanobadisinin ekspresyon sistemi oluşturulmuştur. Farklı karbon kaynaklarının ve pH'nın, nanobadi ekspresyonu üzerindeki etkileri çalkalamalı kültürlerde değerlendirilmiştir. Çalkalamalı kültürde 96 saat boyunca gerçekleştirilen kültürasyon sonunda bu nanobadi, 51,71 mg/l'lik bir verim elde edilmiştir. Ayrıca bu ekspresyon sistemi, metanol ile indüklenen ekspresyon sistemine göre eşdeğer bir verim ve afinite nanobadi üretimi gerçekleştirmiştir. Sonuç olarak bu çalışmanın yapısal bir

ekspresyon sistemi ile kanser teşhisi ve tedavisinde kullanılan nanobadilerin, üretimi için umut verici bir alternatif olduğu bildirilmiştir.

Zhao vd (2018) tarafından karboksil terminal asparajin kalıntılarında (yan zincir) sonra proteinleri spesifik olarak hidrolize edebilen bir lizozomal proteaz olan Legumain'ın (LGMN), birçok insan tümöründe yüksek oranda ekspresyonunun gerçekleştiği, kanser hücrelerinin göç ve invaziv aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir. Daha çok fonksiyonel çalışmalarda kullanmak, bol miktarda ve uygun maliyetle elde etmek amacı ile bu proteininin *P. pastoris*'te rekombinant olarak üretimi gerçekleştirilmiştir. Çalışmada elde edilen pPICZ $\alpha$ -LGMN ekspresyon plazmitinin *P. pastoris*'e transformasyonu gerçekleştirilmiş ve pozitif rekombinantlar tespit edilmiştir. Fermentasyon koşullarının optimize edilmesi sonucunda Legumain'ın en yüksek ekspresyonunun pH 6 kültür ortamında gerçekleştiği bildirilmiştir. Ayrıca, saflaştırılmış Legumain enzim aktivitesi, bir florojenik substrat (Z-Ala-Ala-Asn-AMC) testi kullanılarak test edilmiş ve rekombinant Legumain'ın otokatalitik aktivasyonu için optimum pH değeri, 3 olarak bulunmuştur. Daha sonra yeniden rekombinant protein, bir bileşik kütüphanesini taramak için kullanılmış ve küçük molekül 1773'ün (Terramisin) Legumain enzimini etkili bir şekilde inhibe ettiği bildirilmiştir. Bu sonuçlara göre *P. pastoris* ekspresyon sistemi ile High-throughput tarama (HTS) uygulamalarında kullanmak için, yüksek derecede aktif rekombinant Legumain proteini üretilebileceği bildirilmiştir.

Ersöz ve İnan (2018) tarafından glikozillenmiş ve glikozillenmemiş yak kimozin formlarının *P. pastoris*'te ekstrasellüler üretimi gerçekleştirilmiştir. Sentetik yak prokimozin genleri, pPICZ $\alpha$ A vektörüne klonladıktan sonra *P. pastoris* GS115 (strong increase of the ER-resident disulfide isomerase, PDI) suşunda ifade edilmiştir. Aktif kimozin, metanol ile indüklenebilir AOXI promotörünün kontrolü altında,  $\alpha$ -mating faktörü yardımıyla salgılandığı kültür sıvısından elde edilmiştir. Çalkalamalı kültürde üretilen Yak kimozinin glikozilasyonu, enzimin verim ve aktivitesi üzerine önemli bir etki göstermemiştir. 5 litrelik bir fermentörde, doğal yak-kimozin üretimi gerçekleştirilmiş ve enzim aktivitesi, 214 IMCU/ml olarak tespit edilmiştir. Enzim için pH 6-7 ve 40°C sıcaklık optimum bulunmuştur. Rekombinant yak kimozinle yapılan



laboratuvar ölçekli beyaz peynir üretim veriminin, ticari bir sığır kimozinine çok benzer olduğu gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda *P. pastoris* ekspresyon sisteminin, peynir endüstrisinin ihtiyaçlarını gidermede rekombinant yak kimozin üretimi için çok uygun bir ekspresyon sistemi olduğu bildirilmiştir.

Ünver vd (2018) tarafından yapılan bir çalışmada, son yıllarda klinik olarak dikkat çekici bir tümör baskılayıcı olan ve telomeraz inhibitörü olarak bilinen PinX1 geninin *P. pastoris*'te ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Çalışmada insan PinX1 geni (hPinX1) içeren vektör DNA, *E. coli* One Shot TOP10 hücrelerinde klonlanmış ve hPinX1 proteini *P. pastoris* X-33 suşunda intrasellüler olarak ifade edilmiştir. Yüksek seviyelerde hPinX1 protein üretimi için kültür şartları optimize edilmiştir. Rekombinant protein üretimi, Western blot analizi ile doğrulanmış ve üretilen hPinX1'in moleküler kütlesi 47,5 kDa olarak belirlenmiştir. Optimizasyon çalışmalarının sonunda en iyi fermentasyon koşulları, indüksiyon zamanı 48 saat, metanol konsantrasyonu %3 ve başlangıç kültürü pH'sı 5 olarak belirlenmiştir.

### **3. MATERYAL ve YÖNTEM**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Kimyasallar ve besiyerler**

Çalışmada kullanılan besiyerler, kitler, antikorlar, DNA ve protein markırları ile diğer tüm kimyasallar, Invitrogen Ltd., Sigma Ltd., ThermoFisher Scientific, Sicgen, Abcam, Difco Lab., Fluka Ltd., İnvitrogen Ltd. ve Merck Ltd. firmalarından tedarik edildi.

##### **3.1.2. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar**

Çalışmada kullanılan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027 bakterisi, Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarından temin edildi. *Pichia pastoris* X-33 mayası ve *E. coli* One Shot TOP10 bakterisi ise Invitrogen firmasından temin edildi.

##### **3.1.3. Tasarlanan primerler**

*P. aeruginosa* azurin genine ait restriksiyon kesim enzimlerinin tanıma dizilerini içeren forward ve reverse primerler, [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com) ( $T_m$  calculator) adresinden uygun  $T_m$  sıcaklıkları hesaplanarak tasarlandı (Çizelge 3.1) ve İnvitrogen Firması tarafından sentezlendi.

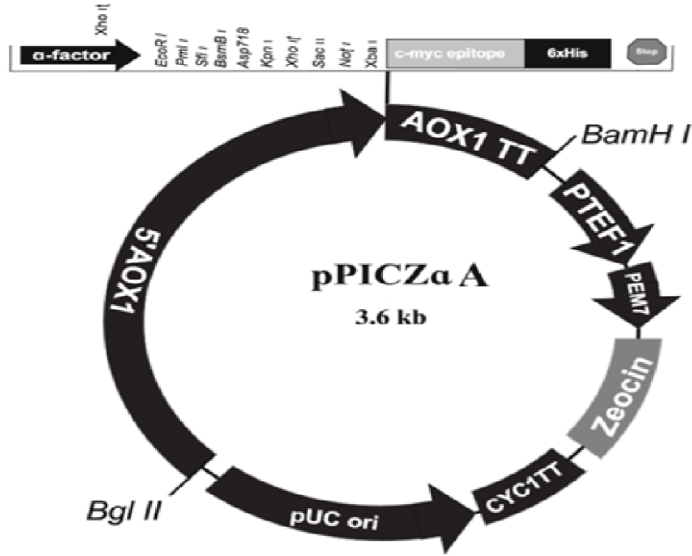
**Çizelge 3.1.** Azurin geninin amplifikasyonu için tasarlanan primerler

Primer Adı	Sekansı	T <sub>m</sub> (°C)	%GC	Uzunluk(bç)
<i>Eco</i> RI-Azu Forward Primer	CGAG <u>GAATTC</u> ATGCTACGTAAACTC	49	42	24
<i>Xba</i> I-Azu Reverse Primer	TAAT <u>TCTAGA</u> CTTCAGGGTCAGGGT	51	46	24

\*Altı çizili diziler restriksiyon enzim tanıma bölgesini gösterir.

### 3.1.4. Çalışmada kullanılan pPICZαA vektörü

pPICZαA vektörü, Invitrogen firmasından temin edildi (Şekil 3.1).

**Şekil 3.1.** pPICZαA vektörü

Vektörde yer alan bölgeler ve işlevleri;

- 5' fragmentte bulunan AOX1 promotörü; metanolla indüklenir ve rekombinant genin ekspresyonunu sağlar.
- α sekresyon sinyal faktörü; üreme kültürüne rekombinant proteinin salgılanmasını sağlar.

- Zeosin antibiyotik direnç geni; *E. coli* ve *P. pastoris*'te transformantların seçimini sağlar.
- PUC orjin bölgesi; *E.coli*'de yüksek kopya replikasyonunu sağlar.
- Çoklu klonlama bölgesi; on iki kesim enziminin tanıma sekansı içerir.
- AOX1 terminatör bölgesi; transkripsiyonun etkili terminasyonu için gereklidir.
- Polihistidin (6xHis) kuyruğu bulunduran C-terminal peptid ve C-myc epitop bölgesi; rekombinant gen ürününün kültür ortamından kolay bir şekilde saflaştırılmasında gereklidir (Invitrogen 2010b).

```

                    5' end of AOX1 mRNA
                    |
811 AACCTTTTTT TTTATCATCA TTATTAGCTT ACTTTCATAA TGCGGACTGG TCCAATTGA
                    |
                    5' AOX1 priming site
                    |
871 CAAGCTTTTG ATTTAACGA CTTTAACGA CAACTTGAGA AGATCAAAAA ACAACTAATT
                    |
931 ATTCGAAACG ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCT GTT TTA TTC GCA GCA
                    |
                    Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala
                    |
983 TCC TCC GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA ACG GCA
                    |
                    Ser Ser Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala
                    |
                    α-factor signal sequence
1034 CAA ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT TTC
                    |
                    Gln Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
1085 GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG TTT
                    |
                    Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu Phe
                    |
                    XhoI*
1136 ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA TCT CTC
                    |
                    Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Val Ser Leu
                    |
                    Kex2 signal cleavage
1187 GAG AAA AGA GAG GCT GAA GCT GAATTCAC GTGGCCCGAG CCGGCCGTC TCGGATCGGT
                    |
                    Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala
                    |
                    Ste13 signal cleavage
                    KpnI XhoI SecII NorI XbaI
1244 ACCTCGAGCC GCGGCGGCC GCCAGCTTTC TA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG
                    |
                    Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu
                    |
                    c-myc epitope
                    |
                    polyhistidine tag
1299 GAT CTG AAT AGC GCC GTC GAC CAT CAT CAT CAT CAT CAT TGA GTTTGTAGCC
                    |
                    Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His ***
1351 TTAGACATGA CTGTTCTCA GTTCAAGTTG GGCACCTACG AGAAGACCGG TCTTGCTAGA
                    |
                    3' AOX1 priming site
1411 TTCTAATCAA GAGGATGTCA GAATGCCATT TGCCTGAGAG ATGCAGGCTT CATTTTTGAT
                    |
                    3' polyadenylation site
1471 ACTTTTTTAT TTGTAACCTA TATAGTATAG GATTTTTTTT GTCATTTTGT TCCTTCTCGT

```

**Şekil 3.2.** pPICZαA vektöründe mevcut olan çoklu klonlama bölgesine ait nükleotid sekansı (Invitrogen 2010b)

### 3.1.5. Çalışmada kullanılan restriksiyon enzimleri

www.restrictionmapper.org adresinden vektöre aktarılacak gen bölgesini kesmediği tespit edilen *EcoRI*, *XbaI* ve *PmeI* enzimleri, ThermoFisher Scientific firmasından temin edildi (Çizelge 3.2)

**Çizelge 3.2.** Kesim enzimlerinin tanıma dizileri ve kesim bölgeleri

Enzim İsimleri	Hedef bölge dizileri
<i>EcoRI</i>	5'-G <sup>A</sup> AATTC-3'
<i>XbaI</i>	5'-T <sup>A</sup> CTAGA-3'
<i>PmeI</i>	5'-GTTT <sup>A</sup> AAAC-3'

### 3.1.6. pPICZ $\alpha$ A vektörüne ait primerler

Muhtemel rekombinant pPICZ $\alpha$ A-Azu (rpPICZ $\alpha$ A-Azu) vektörünü PCR'da amplifiye ederek kontrol etmek ve sekans analizi yapmak üzere aşağıdaki primerler kullanıldı.

5'AOX1 primer; 5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'

3'AOX1 primer; 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'

### 3.1.7. Çalışmada kullanılan besiyerleri

Muhtemel rekombinant vektörün, *E. coli* One Shot TOP10 hücrelerine transformasyonunun ardından doğru transformantların belirlenmesi ve geliştirilmesi için içerisinde zeosin antibiyotiği bulunduran LSLB (Low Salt Luria Bertani) agar ve LSLB sıvı besiyerleri (**EK 1**), rekombinant *E. coli* transformantlarından saflaştırılan, pPICZ $\alpha$ A-Azu vektörünün *P. pastoris*'e transformasyonunun ardından hücrelerin gelişmesi için içerisinde zeosin antibiyotiği bulunduran YPD (Yeast Pepton Dextrose) agar ve YPD sıvı besiyerleri (**EK 1**) ve azurin proteininin ekspresyonu için ön kültür besiyeri olarak BMGY (Tamponlanmış karmaşık gliserol besiyeri-buffered glycerol complex medium) ve üretim besiyeri olarak BMMY (Tamponlanmış karmaşık metanol

besiyeri-buffered methanol complex medium) (**EK 1**) besiyerleri kullanıldı (Invitrogen 2010a).

### **3.1.8. Çalışmada kullanılan tampon ve stok çözeltiler**

Çalışmada kullanılan tampon ve stok çözeltilerin hazırlanması **EK 2**'de verildi.

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. *Pseudomonas aeruginosa* genomik DNA'sının izolasyonu**

Azurin genini çoğaltmak için kalıp olarak kullanılmak üzere *P. aeruginosa* genomik DNA'sının izolasyonu, PureLink™ Genomik DNA Mini Kit (İnvitrogen) üretici protokolüne göre yapıldı. Özetle; LB sıvı besiyerinde bir gece inkübe edilen bakteri kültüründen 1 ml alınarak hücreler santrifüjle toplandı, hücre peletine 180 µl 'PureLink™ Genomik parçalama tamponu' ilave edilerek süspanse edildi. Ardından 20 µl proteinaz K ilave edildi. İyice karıştırıldıktan sonra tüpler ara sıra vortekslenerek 55°C'de 30 dk boyunca inkübasyona bırakıldı. Ardından 20 µl RNase A ilave edilip iyice karıştırılarak oda sıcaklığında 2 dk boyunca inkübasyona bırakıldı. Ardından 200 µl 'PureLink™ Genomik lizis/bağlama tamponu' ilave edilip homojen solüsyon elde edilinceye kadar iyice karıştırıldı. Lizata 200 µl, %96-100 etanol ilave edilip 5 sn iyice karıştırıldıktan sonra saflaştırma basamağına geçildi. Bu işlem için hazırlanan lizat (yaklaşık 640 µl) kolona yerleştirilerek oda sıcaklığında 10000g'de 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj edilen kolon, yeni bir toplama tüpüne yerleştirilerek üzerine 500 µl etanol içeren 'yıkama tamponu 1' ilave edildi. Oda sıcaklığında 10000g'de 1 dk santrifüj edilen kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. Üzerine 500 µl 'yıkama tamponu 2' ilave edilip oda sıcaklığında maksimum hızda 3 dk santrifüj edildi. Daha sonra kolon, 1,5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüpüne alınarak üzerine 25-200 µl 'genomik elüsyon tamponu' ilave edildi. Oda sıcaklığında 1 dk boyunca inkübasyona bırakıldıktan sonra 1 dk santrifüj edildi. Elde edilen DNA solüsyonunun saflığı ve konsantrasyonu, Nanodrop spektrofotometrede (Thermo-Multiskan GO) belirlendi.

### 3.2.1.a. Genomik DNA'nın agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi

Yürütme işlemi için %1'lik agaroz jel hazırlandı. Hazırlamak istenen miktara göre %1 oranında olacak şekilde hesaplanan agaroz tartılarak yeterli miktarda 1xTAE içerisine eklendi. Mikrodalga fırında eritildikten sonra yaklaşık 40°C'ye kadar soğutulan karışıma son konsantrasyon 0,5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromür eklendi. Kasetlere taraklar takıldıktan sonra jel döküldü ve jelin katılaşmasının ardından taraklar çıkarıldı. Oluşan kuyucuklara yükleme boyası ile karıştırılan gDNA yüklenip 70 V'de DNA markırıyla birlikte yaklaşık 60 dk yürütüldü. Yürüme işleminin sona ermesiyle bantlar, jel görüntüleme cihazında (Quantum Vılber Lourtmat) görüntüledi.

### 3.2.2. Gen bölgesine ait sekansın çoğaltılması

NCBI'da (National Center for Biotechnology Information) bulunan '*P. aeruginosa* azurin'(Accession number M30389.1) genine (wild-type) (**EK 3**) ait sekansın amplifikasyonu, tasarlanan forward ve reverse primerler ile Çizelge 3.3'deki gibi reaksiyon karışımı kullanılarak Çizelge 3.4'deki gradient PCR protokolü uygulanarak bu gene ait sekans çoğaltıldı.

**Çizelge 3.3.** PCR Reaksiyon karışımı

PCR reaksiyon karışım içeriği	Miktar
gDNA (~1 µg)	3 µl
dNTP mix (10 mM)	0,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1 µl
<i>EcoRI</i> -Azu F primer (10 pmol/µl)	1 µl
<i>XbaI</i> -Azu R primer (10 pmol/µl)	1 µl
10xPCR buffer	2 µl
ddH <sub>2</sub> O	6 µl
Taq DNA polimeraz	0,6 µl
<b>Toplam</b>	<b>15,1 µl</b>

**Çizelge 3.4. PCR şartları**

Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)
1	94	4
	94	1
35	50-51	1
	72	0,5
	72	5
1	4	∞

**3.2.2.a. PCR ürününün agaroz jel elektroforezi**

Reaksiyon sonrası elde edilen PCR ürünleri, 3.2.1.a'da anlatıldığı gibi agaroz jel hazırlanarak yürütüldü ve yürütme sonrası bantlar jel görüntüleme cihazında görüntülendi.

**3.2.2.b. PCR ürününün jelden saflaştırılması**

PCR reaksiyonu sonrası elde edilen azurin geni, kesim işlemine başlamadan önce jelden ekstraksiyonla saflaştırıldı. Ekstraksiyon işlemi, Sigma firmasından temin edilen 'Gen Elute™ Jel Ekstraksiyon Kiti' ile gerçekleştirildi. Agaroz jelde yürütülüp, görüntülenen bantlar, jelden kesilerek alındı. Elde edilen bantların ağırlığı hesaplandı. Her 100 mg jel için 300 µl 'jel çözme solüsyonu' eklenip oluşan karışımlar, her 2-3 dk'da bir vortekslenecek şekilde 55°C'de 10 dk boyunca inkübasyona bırakıldı. 2 ml'lik ependorf tüpe kolon yerleştirilerek üzerine 500 µl 'kolon hazırlama solüsyonu' eklendi. 1 dk 12000 g'de santrifüjlendikten sonra supernatant atıldı. 1 jel hacmi kadar saf izopropanol eklendi ve homojen hal alınca kadar karıştırıldı. Elde edilen homojen karışım, önceden hazırlanan kolona aktarılıp 1 dk 12000 g'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra üzerine 700 µl 'yıkama solüsyonu' eklenerek 1 dk 12000 g'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve kolon 1 dk 12000 g'de santrifüj edildi. Kolon, yeni bir tüpe



alındı ve üzerine 50 µl ‘elüsyon tamponu’ eklendi. 1 dk 12000 g’de santrifüj edildi. Saflaştırılan PCR ürünü kesim reaksiyonunda kullanıldı.

### 3.2.3. pPICZαA vektörünün ve genin enzimlerle kesilmesi

Azurin proteininin üretimi ile ilgili gen bölgesi, tasarlanan forward ve reverse primerler ile PCR’da çoğaltılmasının ardından uygun restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesildi. Genin insört edileceği pPICZαA vektörü aynı enzimlerle kesildi. Elde edilen ürünler ligasyon işlemi için hazır hale getirilmiş oldu.

#### 3.2.3.a. Restriksiyon endonükleazlar ile genin kesilmesi

Jelden ekstraksiyonla saflaştırılan PCR ürünü (azurin geni) Fast Digest *EcoRI* ve *XbaI* enzimleri ile Çizelge 3.5’teki reaksiyon karışımı kullanılarak kesildi.

**Çizelge 3.5.** Kesim reaksiyon karışım içeriği

Reaksiyon karışım içeriği	Miktar
dH <sub>2</sub> O	18 µl
10xFast Digest Buffer	3 µl
DNA (PCR ürünü)	7 µl (~200 ng)
<i>EcoRI</i>	1 µl
<b>Toplam</b>	<b>29 µl</b>

Karışım, Çizelge 3.5’teki gibi hazırlanarak 37°C’de 30 dk inkübe edildi. 80°C’de 5 dk enzim inaktivasyonunun gerçekleştirilmesinden sonra tüpe 1µl *XbaI* enzimi eklendi. Karışım, 37°C’de 30 dk inkübe edildi ve 65°C’de 20 dk enzim inaktivasyonu gerçekleştirildi. Kesilen genin fenol/kloroform ile ekstraksiyonu gerçekleştirildi.

### 3.2.3.b. Kesilen genin fenol/kloroform ekstraksiyonu

Kesim yapılan geni içeren solüsyon, steril saf su ile 100 µl'ye tamamlandı. Solüsyona yarım hacim fenol/kloroform/izoamil alkol (25/24/1) eklendi ve 20 sn vortekslendi. Oda sıcaklığında 10 dk 14500 rpm'de santrifüj edildi. Üst faz, temiz bir tüpe aktarıldı ve üzerine 1/10 hacmi kadar 3 M sodyum asetat ve 2,5 hacim saf etanol eklendi. Karışım vortekslendikten sonra 14500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak pelet, 10-20 µl TE (Tris EDTA) tamponunda çözüldü.

### 3.2.3.c. pPICZαA vektörünün kesilmesi

Kesilen genin insört edilebilmesi için pPICZαA vektörü *EcoRI* ve *XbaI* enzimleriyle kesildi. Kesilen plazmitin 5' ucundaki fosfat grupları CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) enzimi ile uzaklaştırıldı. Kesim için Çizelge 3.6'daki reaksiyon karışımı kullanıldı.

**Çizelge 3.6.** Vektör DNA'nın kesim reaksiyonu karışımı

Reaksiyon karışım içeriği	Miktar
dH <sub>2</sub> O	14 µl
10xFast Digest Green Buffer	2 µl
DNA	2 µl (1µg)
<i>EcoRI</i>	1 µl
<b>Toplam</b>	<b>19 µl</b>

Karışım Çizelge 3.6'daki gibi hazırlanarak 37°C'de 30 dk inkübe edildi. 80°C'de 5 dk enzim inaktivasyonunun gerçekleştirilmesinden sonra karışıma 1µl *XbaI* enzimi eklendi. 37°C'de 30 dk inkübe edilip, 65°C'de 20 dk enzim inaktivasyonu gerçekleştirildi. Ardından 1µl CIAP (Calf İntestinal Alkaline Phosphasate) ilave edilerek 37°C'de 5 dk inkübe edildi. Reaksiyon sonrası plazmit, jelde görüntülenerek kesilip kesilmediği tespit edildi.

### 3.2.3.d. Kesilen vektör DNA'nın jelden ekstraksiyonu

3.2.2.b'de anlatıldığı gibi kesilen vektör DNA jelden saflaştırıldı.

### 3.2.4. Ligasyon

Vektöre insört edilecek gen ve vektör DNA, kesim işleminin ardından vektör DNA / gen oranı 1/3 olacak şekilde aşağıda verilen formüle göre hesaplanarak ligasyon reaksiyon karışımına eklendi.

$$\text{Vektöre yerleştirilecek gen miktarı (ng)} = \frac{\text{vektöre yerleşecek gen uzunluğu (bç)}}{\text{vektör DNA uzunluğu (bç)}} \times \frac{3}{1} \times \text{vektör miktarı (ng)}$$

**Çizelge 3.7.** Vektör DNA ve insört genin ligasyon reaksiyon karışımı

Reaksiyon karışım içeriği	Miktar
dH <sub>2</sub> O	19,5 µl
5x ligasyon tamponu	8 µl
Vektör DNA (pPICZαA)	2 µl (61,6 ng)
Vektöre yerleştirilecek insört gen (Azurin geni)	8 µl (23,8 ng)
T4 DNA ligaz	2,5 µl
Toplam	19 µl

Karışım, Çizelge 3.7'deki gibi hazırlandı ve 16°C'de 16 saat boyunca inkübasyona bırakılarak ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi.

### 3.2.5. Kompetent *E. coli* One Shot TOP10 hücrelerinin transformasyonu

-86°C'de stoklanan kompetent hücreler buz üzerine alınarak çözüldü. Çözülen hücrelere 1-5 µl ligasyon ürünü (10 pg-100 ng) eklenerek hafif bir şekilde karıştırıldı. Karışım,

buz üzerinde 30 dk boyunca inkübasyona bırakıldı. Ardından tüp, çalkalamadan 42°C’de 30 sn bekletildi ve 30 sn ardından 42°C’den alınarak buz üzerinde 2 dk bekletildi. Tüpe 250 µl S.O.C sıvı besiyerinden eklenerek kapağı kapatıldıktan sonra çalkalayıcı inkübatörde 37°C’de 225 rpm’de 1 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası LSLB-zeosin seçim plaklarına 100-200 µl kadar transformasyon karışımından yayıldı. 37°C’de 1 gece boyunca inkübasyona bırakıldı (Invitrogen 2010a).

### 3.2.6. Koloni PCR

Bir gecelik inkübasyonun ardından gelişen kolonilerden 18 tanesi rastgele seçilerek vektöre aktarılan azurin genine ait primerler ve Çizelge 3.8 ve 3.9’deki PCR protokolü kullanılarak koloni PCR yapıldı. Bu işlem için her bir koloniden çok küçük miktarda mikropipet ucu ile alınarak ayrı tüplerdeki reaksiyon karışımı içerisine yerleştirildi. Yerleştirilen pipet ucu birkaç tur kendi etrafına döndürülerek hücrelerin karışıma geçmesi sağlandı ve tüpler cihaza yerleştirilerek PCR reaksiyonu başlatıldı.

**Çizelge 3.8.** Koloni PCR reaksiyon karışım içeriği

PCR reaksiyon karışım içeriği	Miktar
dNTP mix (10 mM)	0,8 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1 µl
<i>EcoRI</i> - Azu F primer (10 pmol/µl)	1µl
<i>XbaI</i> - Azu R primer (10 pmol/µl)	1 µl
10xPCR buffer	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	6,6 µl
Taq DNA polimeraz	0,6 µl
Toplam	12 µl

**Çizelge 3.9.** Koloni PCR reaksiyon şartları

Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)
1	94	4
	94	1
35	51	1
	72	0,5
	72	5
1	4	∞

PCR ürünleri agaroz jele yüklenerek 60V' da 1 saat yürütüldü. Jelin görüntülenmesi sonucu geni taşıdığı belirlenen 1., 4., 9., ve 10. kolonilerden plazmit saflaştırıldı. Elde edilen plazmitler PCR reaksiyonunda kalıp DNA olarak kullanıldı.

### 3.2.7. Seçilen transformantlardan plazmit DNA izolasyonu

'Invitrogen-PureLink-Hi-Pure plazmit DNA saflaştırma kiti' kullanılarak üreticinin tarif ettiği şekilde seçilen kolonilerden (1., 4., 9. ve 10.) plazmit izolasyonu gerçekleştirildi. Koloni PCR reaksiyonu sonucu pozitif sonuç veren *E. coli* hücreleri 1 gece boyunca LSLB-zeosin sıvı besiyerinde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası 1 gecelik kültürden mikrosantrifüj tüpüne 1-3 ml alındı ve 4000 g'de 5-10 dk santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Pelet üzerine içerisinde 0,4 ml RNase bulunduran 'resüspanسیون tamponu' eklenerek hücreler homojen hale getirildi. Süspanse edilen karışıma 0,4 ml 'lisis tamponu' ilave edildi ve karışım yavaşça ters çevrilerek homojen hale getirildi. Homojen karışım oda sıcaklığında 5 dk boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 0,4 ml 'presipitasyon tamponu' ilave edilerek tüpler ters çevrilip tamamen homojen oluncaya kadar karıştırıldı. Karışım, 12000 g'de oda sıcaklığında 10 dk santrifüj edildi. Dengelenen kolona elde edilen süpernatant yüklenerek kolondaki solüsyonun kurumasının ardından kolon iki defa 2,5 ml 'yıkama tamponu' ile yıkandı ve her yıkamanın ardından solüsyonun kuruması beklendi ve alttaki sıvı uzaklaştırıldı. Kolon steril bir elüsyon tüpüne aktarıldı ve 0,9 ml 'elüsyon tamponu' eklendi. Kolondaki

solüsyonun kuruması ardından kolon atıldı. Elüsyon tüpü içerisine 0,63 ml izopropanol eklenerek iyice karıştırıldı. Ardından elüsyon tüpü 12000 g'de 4°C'de 30 dk santrifüj edildi. Süpernatant dikkatlice atıldı. Pelet, 1 ml %70'lik etanol ile süspansiyon edilerek 12000 g'de 4°C'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant dikkatlice atıldı. Pelet, 10 dk boyunca kurutuldu. Kurutulan pelet üzerine 50 µl 'TE tamponu' eklenerek süspansiyon edildi. Elde edilen plazmit +4°C'de saklandı.

### **3.2.7.a. Vektöre ait primerler ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonu**

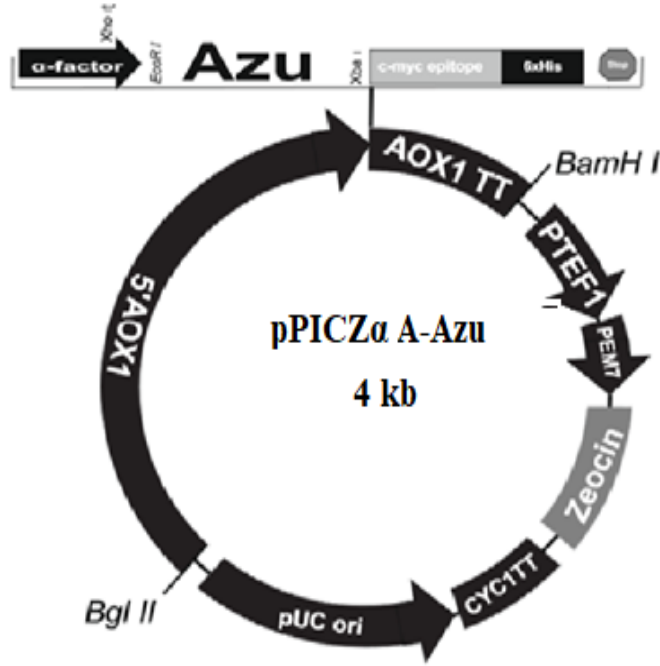
1., 4., 9., ve 10. kolonilerden izole edilen plazmitler ve vektöre ait forward ve reverse primerler ile Çizelge 3.3'teki reaksiyon karışımı ve Çizelge 3.4'de protokol kullanılarak PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Farklı olarak uzama basamağı 90 sn, primer bağlanma sıcaklığı ise 59°C olarak ayarlandı.

### **3.3. Bakterilerin gliserolde stoklanması**

Doğru transformantların tespit edilmesinin ardından rekombinant plazmiti taşıyan bakteri hücreleri 25 µg/ml zeosin içeren LSLB plağa ekildi ve 37°C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı. Gelişim gösteren kolonilerden biri seçildi. Seçilen koloni 10 ml, LSLB-zeosin sıvı besiyerine inoküle edildi. OD<sub>600</sub> değeri, 0,5-0,7 oluncaya kadar hücreler büyümeye bırakıldı. 0,85 ml kültür sıvısı, 0,15 ml steril gliserol ile karıştırıldıktan sonra -86°C'de stoklandı.

### **3.4. Rekombinant pPICZαA-Azu vektörünün sekans analizi**

Rekombinant plazmiti taşıyan 1. koloniyi oluşturan *E.coli* hücreleri, LSLB-zeosin sıvı besiyerinde üretildi ve 3.2.7'deki gibi vektöre ait primerler kullanılarak rekombinant plazmit izole edildi. Azurin geninin nükleotid sekans analizi MedSanTek firması İstanbul laboratuvarlarında, DNA sekans analiz cihazı ile yapıldı.



Şekil 3.3. Rekombinant pPICZαA-Azu plazmiti

### 3.5. İzole edilen rekombinant pPICZαA-Azu vektörünün linear hale getirilmesi

*E.coli* hücrelerinden izole edilen rekombinant plazmit (pPICZαA-Azu), maya genomuna entegrasyonu için Fast Digest *PmeI* enzimi kullanılarak AOX promotör bölgesinden linear hale getirildi. Bu işlem için karışım Çizelge 3.10'daki gibi hazırlanarak, 37°C'de 30 dk inkübe edildi. Ardından 65°C'de 10 dk enzim inaktivasyonu gerçekleştirildi. Karışıma 1 µl CIAP ilave edilip 50°C'de 5 dk inkübe edildi. Kesim işleminin gerçekleştiğini görmek için reaksiyon karışımlarından 2'şer µl agaroz jele yüklendi ve yürütüldü.

**Çizelge 3.10.** Rekombinant plazmit kesim reaksiyon karışım içeriği

<b>Reaksiyon karışım içeriği</b>	<b>Miktar</b>
dH <sub>2</sub> O	15 µl
10xFast Digest Green Buffer	2 µl
Plazmit	2 µl (1µg)
<i>PmeI</i>	1 µl
Toplam	20 µl

### 3.5.1. Lineer rekombinant pPICZαA-Azu vektörünün fenol/kloroform ile ekstraksiyonu

Lineer hale getirilen pPICZαA-Azu vektörünün 3.2.3.b'deki gibi fenol/kloroform ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Ekstrakte edilen vektör nükleaz içermeyen steril saf su ile çözüldü.

### 3.5.2. *P. pastoris* X-33 hücrelerinin transformasyonu

Maya hücrelerinin transformasyonu, LiCl metodu ile gerçekleştirildi (Invitrogen 2010a). *PmeI* enzimi ile lineer hale getirilen pPICZαA-Azu vektörün, fenol/kloroform ile ekstraksiyon işleminin ardından kompetent hale getirilen maya hücrelerine transferi gerçekleştirildi.

#### 3.5.2.a. *P. pastoris* X-33 hücrelerinin kompetent hale getirilmesi

Transformasyon işlemi öncesi hücreleri kompetent yapmak için ilk olarak *P. pastoris* X-33 hücreleri YPD agar besiyerinde 30°C'de 60 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Agar plaktan tek bir koloni seçilerek YPD sıvı besiyerine ekim yapıldı. YPD sıvı besiyerinde gelişen hücrelerin OD<sub>600</sub> değeri 0,8-1'e ulaştığında 50 ml'lik kültür, 4°C'de, 1500 g'de 4dk santrifüj yapıldı. Süpernatant atılarak geride kalan hücre peletine steril



saf su eklenerek yıkandı. Yıkanan hücreler 1500 g'de 6 dk santrifüj yapıldı. Pelete 1 ml 100 mM LiCl solüsyonu eklenerek hücreler süspansiyon edildi. Elde edilen karışım 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı. 15 sn maksimum hızda santrifüj edildi. LiCl'nin pipetle uzaklaştırılmasından sonra hücre peleti, 400 µl, 100 mM LiCl ile süspansiyon edildi. Oluşan hücre süspansiyonu, mikrosantrifüj tüplerine 50 µl'lik alikuatlar halinde ayrıldı. Tek bir alikuat bir transformasyon işleminde kullanıldı.

### **3.5.2.b. Transformasyon işlemi**

Kompetent hücreler hazır olduğu anda transformasyon işlemi derhal gerçekleştirildi. Öncelikle 25 µl sperm (som balığı) DNA'sı (2 mg/ml) 5 dk kaynatıldı ve hemen buz üzerine alındı. 50 µl'lik kompetent hücre alikuatı, 4000 g'de 2 dk santrifüj edildi. LiCl pipetle uzaklaştırıldı. Hücre peletinin üzerine sırasıyla 240 µl %50 PEG, 36 µl 1 M LiCl, 25 µl sperm (som balığı) DNA'sı ve 50 µl steril saf su içinde lineer rekombinant plazmit DNA eklendi. Hücre peleti, tamamen homojen oluncaya kadar hızlıca vortekslendi. 30°C'de 30 dk çalkalamadan inkübe edildi. 42°C'ye ayarlanan su banyosunda 20-25 dk bekletildi. Ardından 4000 g'de santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre peletinin üzerine 1 ml YPD sıvı besiyeri eklenerek süspansiyon edildi ve hücreler 30°C'de çalkalanarak inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun başlamasından 1 saat ve 4 saat sonra 0,1 mg/ml zeosin içeren YPD plaklarına 50-100 µl süspansiyon yayılıp plaklar, 30°C'de 48-60 saat boyunca inkübasyona bırakıldı.

### **3.5.2.c. Transforme edilen mayaların antibiyotik içeren besiyerinde seçilimi**

Farklı seviyelerde zeosine dirençli kolonilerin (çoklu kopya taşıyanların) belirlenmesi için YPD-zeosin besiyerinde gelişen kolonilerden 6 tanesi rastgele seçildi. Seçilen koloniler, 0,1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1 mg/ml ve 2 mg/ml zeosin içeren YPD agar plaklara ekilerek 30°C'de 48 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası gelişim gösteren kolonilerin fotoğrafları çekildi. Diğer yandan, seçilen kolonilerin genomlarında azurin genini taşıyıp taşımadıklarını belirlemek için 0,1 mg/ml zeosin içeren seçim plağında gelişen koloniler, antibiyotik içermeyen YPD plağa transfer edilerek 30°C'de

48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası gelişen koloniler ile koloni PCR yapıldı. Bu işlem için seçilen kolonilerden mikropipet ucuyla az miktarda alındıktan sonra PCR tüplerine yerleştirilerek mikrodalga fırının son sıcaklık derecesinde 3 dakika ısıtıldıktan sonra Çizelge 3.11'deki reaksiyon karışımı kullanılarak ve Çizelge 3.12'deki protokole göre PCR reaksiyonu gerçekleştirildi.

**Çizelge 3.11.** Koloni PCR reaksiyon karışım içeriği

<b>PCR reaksiyon karışım içeriği</b>	<b>Miktar</b>
dNTP mix (10 mM)	0,8 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1 µl
<i>EcoRI</i> - Azu F primer (10 pmol/µl)	1 µl
<i>XbaI</i> - Azu R primer (10 pmol/µl)	1 µl
10xPCR buffer	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	6,6 µl
Taq DNA polimeraz	0,6 µl
Toplam	12 µl

**Çizelge 3.12.** PCR reaksiyon şartları

<b>Döngü sayısı</b>	<b>Sıcaklık (°C)</b>	<b>Süre (dk)</b>
1	94	4
	94	1
35	51	1
	72	0,5
	72	5
1	4	∞

### **3.6. Rekombinant *P. pastoris* hücrelerinin stoklanması**

Koloni PCR sonuçlarına göre doğruluğu belirlenen tek koloniler, YPD agardan alınarak YPD sıvı besiyerine ekildi ve bir gece boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası kültür sıvısına %15 gliserol eklenerek vortekslendi ve -80°C'de saklandı.

### **3.7. Rekombinant protein üretimi**

Antibiyotik direnç testi ve koloni PCR sonuçlarına göre seçilen 1., 2., 3. ve 4. koloniler azurin protein üretim kapasitelerinin karşılaştırılması için YPD agarda 30°C'de 48-60 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası gelişim gösteren rekombinant hücreler, ön kültür için hazırlanan 12,5 ml'lik BMGY besiyerine inoküle edildi. 30°C'de 225 rpm'de OD<sub>600</sub> değeri yaklaşık 2,6 oluncaya kadar inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası kültür sıvısı 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası 25 ml BMMY üretim besiyeri ile süspanse edilen hücreler, 500 ml hacimli bölmeli erlenmayerlerde 280 rpm'de 30°C'de 48 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Genin indüksiyonu için kültür ortamına 24 saat sonra %0,5 saf metanol eklendi. İnkübasyon sonrası alınan örnekler, 4°C'de, 3000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatantlar ve hücre peletleri protein analizi için kullanıldı.

### **3.8. Western blot analizi**

Hücre dışı protein üretimini tespit etmek için seçilen 4 koloniye ait kültür ortamından alınan süpernatant örnekleri TCA ile çöktürüldü. Hücre içi protein üretiminin gerçekleşip gerçekleşmediğini anlamak için ise hücre peletleri cam boncuk ile parçalandı. Her iki şekilde hazırlanan örnekler, Western blot analizi için kullanıldı.

### 3.8.1. TCA (Trikloroasetik Asit) ile protein çöktürme

48. saatlik kültürlere ait örneklerden 1'er ml alınarak 4°C'de 13000 rpm'de 5 dk santrifüj gerçekleştirildi. Elde edilen süpernantantlar cam tüplere aktarıldı. 1 hacim TCA (**EK 2**) çözeltisi 4 hacim örnek üzerine eklenerek elde edilen karışımlar, 4°C'de 10 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası karışımlar yeni bir ependorf tüpe aktarıldı ve 13000 rpm'de 5 dk santrifüj gerçekleştirildi. Süpernantantlar uzaklaştırıldı ve peletler üzerine 200 µl soğuk aseton ilave edilerek yıkama işlemi için 13000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve peletler tekrar aynı şekilde 200 µl soğuk aseton ile yıkandı. Yıkanan örnekler kuruyuncaya kadar 95°C'de ısı bloğunda bekletildi. Elde edilen peletler, 40 µl yükleme tamponu ile süspanse edildi. 95°C'de 5 dk kaynatılan örneklerin 15'er µl'si jele yüklendi.

### 3.8.2. Hücre lizatının hazırlanması

48. saatte kültür ortamlarından santrifüjle elde edilen 0,1'er gram hücre peletlerinin üzerine 200 µl parçalama tamponu (**EK 2**) ilave edilip vorteksledi. Karışıma son hacmi iki katı olacak şekilde cam boncuk ilave edildi. 8 defa 30 sn'de bir hem vorteksledi hem de buz üzerinde bekletildi. 4°C'de 13000 rpm'de 5 dk santrifüj gerçekleştirildi. Süpernantantlar yeni ependorf tüpe alındı. Boya eklenene kadar buz üzerinde bekletildi. Bire bir oranında yükleme boyası ile seyreltilen karışım 95°C'de 5dk su banyosunda bekletildi. Hazırlanan örneklerin 15'er µl jele yüklendi.

### 3.8.3. SDS PAGE ile proteinleri yürütme

Cam plakalar ve aparatlar sırasıyla su ve alkol ile temizlendi. Cam plakalar üstüste konuldu. Jel hazırlama aparatına konularak sıkıştırıldı. Ardından hazırlanan ayırma jeli (**EK 2**) sıkıştırılan plakalar arasına dikkatli bir şekilde pipetle döküldü. Jelin üst kısmı düz bir şekilde olması için izopropanol ile yıkandı. Polimerleşmenin ardından izopropanol uzaklaştırıldı. Ayırma jelinin üzerine yığıma jeli (**EK 2**) ilave edildi. Yığıma jeline tarak takıldı ve polimerleşmesinden sonra tarak çıkarıldı. Cam plakalar

elektroforez tankına konularak üzerine yürütme tamponu ilave edildi. Hazırlanan örneklerden kuyulara 15'er µl yüklendi. Elektroforez işlemi oda sıcaklığında İlk başta 60 V'de 30 dk daha sonra 120 V'de 90 dk boyunca gerçekleştirildi (Laemmli 1970). Elektroforez işleminin ardından cam plakalar arasındaki jel dikkatli bir şekilde çıkarıldı.

### 3.8.4. Blotlama

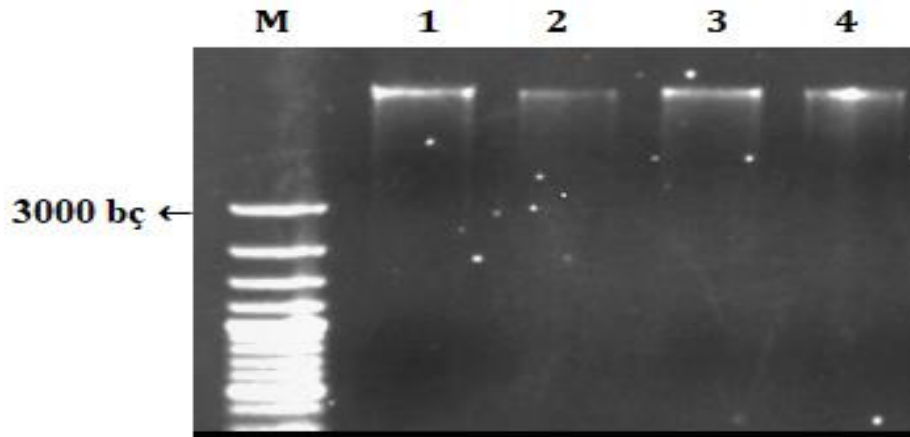
Elektroforez işlemi sonrası cam plakalar arasından çıkarılan jel, musluk suyu ile yıkandıktan sonra 1x transfer tamponunda (**EK 2**) 5 dk çalkalanarak bekletildi. PVDF (Polyvinylidene difluoride) membran ilk önce metanolde 5 dk ardından 1x transfer tamponunda 5 dk çalkalanarak bekletildi. Hazırlanan jel ve membran semidry blotlama cihazına (Bio-Rad TransBlot<sup>R</sup> Turbo<sup>TM</sup> Transfer System) sırayla 1x transfer tamponu ile ıslatılan blotlama kağıdı, jel ve membran konuldu. Membran üzerine 1x transfer tamponu ile ıslatılan blotlama kağıdı konularak 1 watt elektriksel alanda 90 dk boyunca blotlama işlemi yapıldı. Blotlama işleminin ardından hazırlanan membran, bantların bulunduğu yüze gelecek şekilde 30 ml bloklama tamponu (**EK 2**) içerisine konuldu. Bloklama tamponu içerisinde bulunan membran oda sıcaklığında çalkalanarak 1 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası membran, 20 ml PBST (**EK 2**) ile 2 kere 5 dk çalkalanarak yıkandı. Bloklama tamponuna (**EK 2**) ilk önce 1:5000 oranında Anti-His (C-term)-HRP antikoru (Invitrogen<sup>TM</sup>) eklendi ve membran bu solüsyonda 1 gece boyunca +4°C'de çalkalanarak inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası membran 20 ml PBST ile 2 kere 5 dk çalkalanarak yıkandı. Antikorum kimyasal sinyal oluşturmasını sağlayan Femto ve Pico substratları (ECL reagent) ile membran BIO-RAD görüntüleme (ChemiDoc<sup>TM</sup>. Touch İmaging System) cihazında görüntülendi. Ayrıca bu deney proteine spesifik Anti-Azurin antikoru ile tekrar edildi. Western blot analizi için gereklidiğer işlemlerden farklı olarak bloklama tamponuna Anti-Azurin (1. antikor) antikoru eklendi ve membran bu solüsyonda 1 gece boyunca +4°C'de çalkalanarak inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası membran 20 ml PBST ile 2 kere 5 dk çalkalanarak yıkandı. Süre sonundan bloklama tamponuna 0,5 µl Anti-Goat IgG H&L (HRP) (2. antikor) antikoru eklendi ve 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası membran 20 ml PBST ile çalkalanarak 2 kez

5 dk yıkandı. Membran, antikorun kimyasal sinyal oluşturmasını sağlayan Femto ve Pico substratlar (ECL reagent) ile görüntülendi. Western blot yöntemi ile görüntülenen rekombinant proteinlerin kemilüminesans sinyal yoğunluğunu ölçmek için ImageJ software programı ve sonuçların istatistiksel değerlendirmeleri için GraphPad Prism version 5 kullanıldı. Tukey testi (One Way ANOVA) ile p değerleri belirlendi.  $p > 0,05 = ns$  (not significant) nemsiz,  $p < 0,05 = *$  (significant) nemli,  $p < 0,01 = **$  ve  $p < 0,001 = ***$  (highly significant) yüksek derecede önemli olarak değerlendirildi.

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

##### 4.1. *P. aeruginosa*'nın Genomik DNA'sının İzolasyonu ve Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi

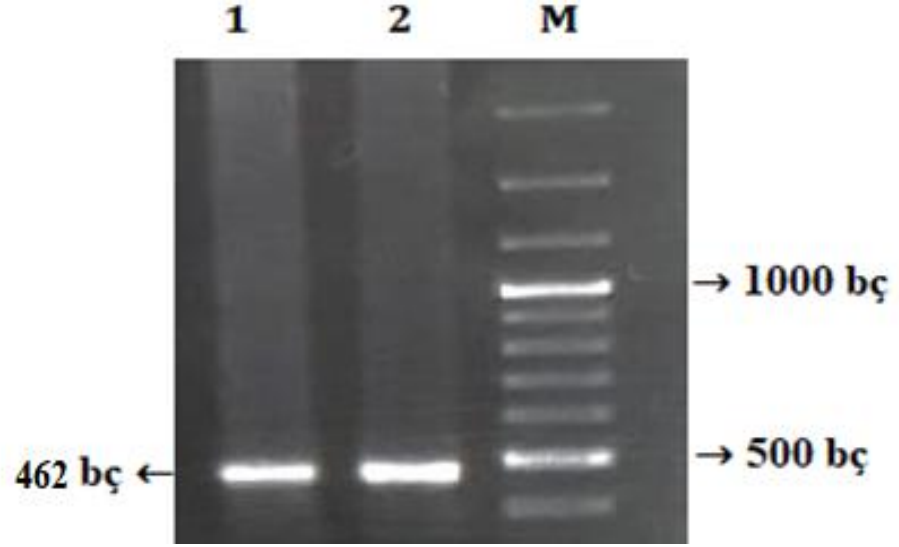
*P. aeruginosa*'nın genomik DNA'sı izole edildi. İzole edilen genomik DNA agaroz jele yüklendi ve yürütüldü. Yürütülen jel, UV görüntüleme cihazında (Quantum Vılber Lourmat) görüntülendi. Yapılan 4 farklı izolasyon sonucu jelde gDNA'ya ait bantlar gözlemlendi (Şekil 4.1).



**Şekil 4.1.** *P. aeruginosa* genomik DNA'sının agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Markır, 1- 4. kuyular, genomik DNA)

##### 4.2. Azurin Genine Spesifik Primerlerle Gerçekleştirilen Gradient PCR Reaksiyonu

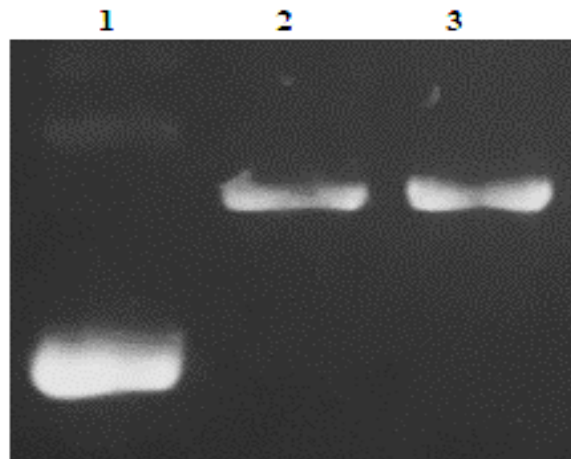
Eşit miktarda genomik DNA ile gene spesifik primerler kullanılarak gradient PCR reaksiyonu yapıldı. Reaksiyon sonrası PCR ürünleri, agaroz jele yüklendi ve 60V'de 1 saat boyunca yürütüldü. Elektroforez sonrası görüntülenen jel sonucuna göre primerlerin en iyi bağlanma sıcaklığı 51°C olarak belirlendi (Şekil 4.2).



**Şekil 4.2.** Gradient PCR reaksiyon ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (1. kuyu: 50°C, 2. kuyu: 51°C)

#### 4.3. Vektör DNA ile Genin Kesilmesi ve Görüntülenmesi

4.2'deki PCR sonucu elde edilen gen ve vektör DNA (pPICZαA) *EcoRI* ve *XbaI* enzimleri ile kesildikten sonra agaroz jelde yürütüldü. UV görüntüleme cihazında alınan görüntüleme sonucuna göre vektör DNA'nın kesildiği teyit edildi (Şekil 4.3).

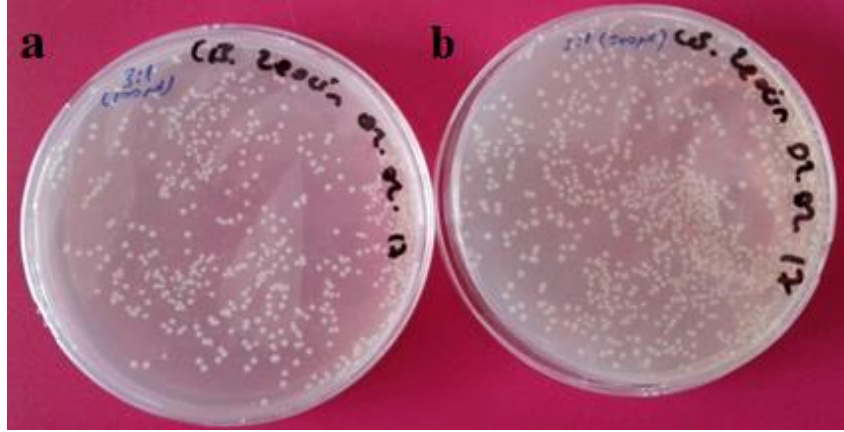


**Şekil 4.3.** Kesilen Vektör DNA'nın agaroz jel elektroforez görüntüsü (1. kuyu: Kesilmemiş vektör DNA, 2. ve 3. kuyu: Kesilmiş vektör DNA)



#### 4.4. Bakteri Hücrelerinin Transformasyonu

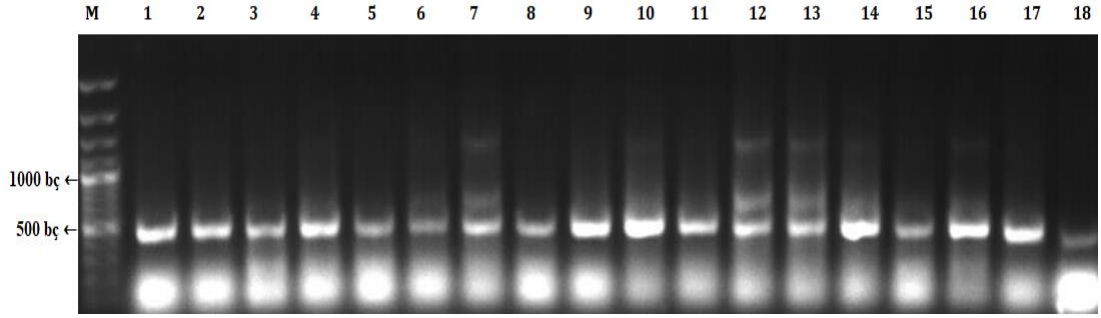
3.2.4'teki gibi gerçekleştirilen ligasyon reaksiyonunun ardından elde edilen ürünün kompetent *E.coli* One Shot TOP10 hücrelerine transfer ile 3.2.5'teki gibi transformasyon gerçekleştirildi. Transformasyon işlemi sonucu, hücreler LSLB-zeosin agar besiyerine yayılarak 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Bir gece inkübasyonun ardından kolonilerin gelişimi gözlemlendi (Şekil 4.4).



**Şekil 4.4.** LSLB-zeosin agarda gelişen transformantların görüntüsü (**a**; 100 µl transformasyon ürünü yayılan plak, **b**; 200 µl transformasyon ürünü yayılan plak)

#### 4.5. Geni Taşıyan Transformantların Belirlenmesi

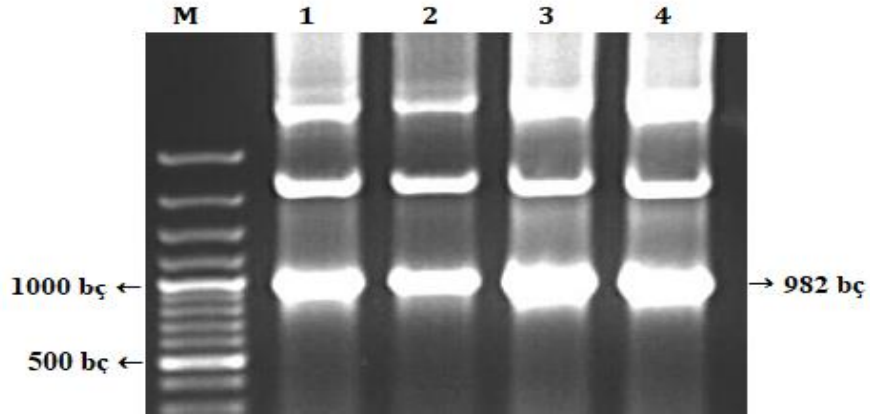
Transformasyon işlemi sonrası besiyerinde gelişen kolonilerden 18 tanesi seçildi. Seçilen kolonilerle 3.2.6'daki gibi koloni PCR reaksiyonu yapıldı. Reaksiyon sonrası PCR ürünleri agaroz jele yüklendi ve 60V'de 1 saat yürütüldü. Yürütülen jel, UV görüntüleme cihazında görüntülendi (Şekil 4.5).



**Şekil 4.5.** Koloni PCR sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Markır, 1-18. Kuyu; koloniler.)

#### 4.6. Vektör DNA Primerleri ile Gerçekleştirilen PCR Reaksiyonu

Transformasyon sonrası Şekil 4.5'teki sonuca göre seçilen 1., 4., 9. ve 10. kolonilerden saflaştırılan plazmitler ile vektör DNA primerleri kullanılarak 3.2.7.a'daki gibi PCR reaksiyonu yapıldı. Reaksiyon sonrası PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Yürütülen jel, UV görüntüleme cihazında görüntülendi. Görüntüleme sonucu ürünlerin beklendiği gibi 982 bç uzunlukta olduğu gözlemlendi (Şekil 4.6).



**Şekil 4.6.** PCR Reaksiyonu sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Markır, 1-4. kuyular sırası ile 1., 4., 9. ve 10. kolonilerden saflaştırılan plazmitlerle gerçekleştirilen PCR ürünleri.)

#### 4.7. Bakteri Hücrelerinden Saflaştırılan Plazmitin Sekans Analizi

3.3'te anlatıldığı gibi gliserolde stoklanan 1. koloniyi oluşturan bakteri hücrelerinden 3.2.7'deki gibi saflaştırılan plazmitin sekans analiz sonucu elde edilen nükleotid ve aminoasit sekansları, *P. aeruginosa*'ya ait azurin nükleotid ve aminoasit sekansları (Gene Bank No: M3038.1) ile blastlandığında (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?>) benzerliklerin sırasıyla %99 ve %100 olduğu görüldü (Şekil 4.7, 4.8 ve 4.9). Elde edilen rekombinant vektör, pPICZ $\alpha$ A-Azu olarak adlandırıldı.

Download [GenBank](#) [Graphics](#)

Pseudomonas aeruginosa azurin (azu) gene, complete cds  
Sequence ID: [M30389.1](#) Length: 1287 Number of Matches: 1

Range 1: 489 to 932 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand				
815 bits(441)	0.0	443/444(99%)	0/444(0%)	Plus/Plus				
Query 1	ATGCTACGTA	AACTCGCTG	CGGTATCC	CTGCTGTCC	CTGCTCAGT	GCGCCGCT	GCTGGCT	60
Sbjct 489	ATGCTACGTA	AACTCGCTG	CGGTATCC	CTGCTGTCC	CTGCTCAGT	GCGCCGCT	GCTGGCT	548
Query 61	GCCGAGTGCT	CGGTGGACAT	CCAGGGTA	ACGACCAGAT	GCAGTTCA	AACCAATG	CCATC	120
Sbjct 549	GCCGAGTGCT	CGGTGGACAT	CCAGGGTA	ACGACCAGAT	GCAGTTCA	AACCAATG	CCATC	608
Query 121	ACCGTCGACA	AAGAGCTG	CAAGCAGTT	CACCGTCA	AACTGTCC	CACCCGGC	AACTGCCG	180
Sbjct 609	ACCGTCGACA	AAGAGCTG	CAAGCAGTT	CACCGTCA	AACTGTCC	CACCCGGC	AACTGCCG	668
Query 181	AAGAACGTC	ATGGGCCA	CAACTGGG	TACTGAGC	ACCGCCG	CCGACATG	CAGGGCGT	240
Sbjct 669	AAGAACGTC	ATGGGCCA	CAACTGGG	TACTGAGC	ACCGCCG	CCGACATG	CAGGGCGT	728
Query 241	ACCGACGGC	ATGGCTT	CCGGCCT	GGACAAGG	ATTACCTG	AAGCCG	ACGACAGCC	300
Sbjct 729	ACCGACGGC	ATGGCTT	CCGGCCT	GGACAAGG	ATTACCTG	AAGCCG	ACGACAGCC	788
Query 301	ATCGCCAC	ACCAAGCT	GATCGGCT	CGGGCG	GAGAAGG	ACTCGGTG	ACCTTCG	360
Sbjct 789	ATCGCCAC	ACCAAGCT	GATCGGCT	CGGGCG	GAGAAGG	ACTCGGTG	ACCTTCG	848
Query 361	AAGCTGA	AGGAAGG	CGAGCAGT	TACATGTT	CTTCTG	CACCTTCC	CGGGCCACT	420
Sbjct 849	AAGCTGA	AGGAAGG	CGAGCAGT	TACATGTT	CTTCTG	CACCTTCC	CGGGCCACT	908
Query 421	ATGAAGGG	CACCCTG	ACCCTGAAG	444				
Sbjct 909	ATGAAGGG	CACCCTG	ACCCTGAAG	932				

Şekil 4.7. Forward primerle gerçekleştirilen sekans analizi ile elde edilen nükleotid sekansının blast sonucu

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

Pseudomonas aeruginosa azurin (azu) gene, complete cds  
Sequence ID: [M30389.1](#) Length: 1287 Number of Matches: 1

Range 1: 489 to 932 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
815 bits(441)	0.0	443/444(99%)	0/444(0%)	Plus/Minus
Query 1	CTTCAGGGTCAGGGTGCCCTTCATCAGCGCGGAGTGGCCGGGAAGGTGCAGAAGAACAT	60		
Sbjct 932	CTTCAGGGTCAGGGTGCCCTTCATCAGCGCGGAGTGGCCGGGAAGGTGCAGAAGAACAT	873		
Query 61	GTACTGCTCGCCTTCCCTTCAGCTTGGAGACGTCGAAGGTCACCGAGTCCTTCTCGCCCGA	120		
Sbjct 872	GTACTGCTCGCCTTCCCTTCAGCTTGGAGACGTCGAAGGTCACCGAGTCCTTCTCGCCCGA	813		
Query 121	GCCGATCAGCTTGGTGTGGGCGATGACGCGGCTGTCGTGGGCTTCAGGTAATCCTTGTC	180		
Sbjct 812	GCCGATCAGCTTGGTGTGGGCGATGACGCGGCTGTCGTGGGCTTCAGGTAATCCTTGTC	753		
Query 181	CAGGCCGGAAGCCATGCCGTCGGTGACACGCCCTGCATGTCGGCGGCGGTGCTCAGTAC	240		
Sbjct 752	CAGGCCGGAAGCCATGCCGTCGGTGACACGCCCTGCATGTCGGCGGCGGTGCTCAGTAC	693		
Query 241	CCAGTTGTGGCCATGACGTTCTTCGGCAGGTTGCCGGGGTGGGACAGGTTGACGGTGAA	300		
Sbjct 692	CCAGTTGTGGCCATGACGTTCTTCGGCAGGTTGCCGGGGTGGGACAGGTTGACGGTGAA	633		
Query 301	CTGCTTGCAGCTCTTGTGACGGTGATGGCATTGGTGTGAACTGCATCTGGTCGTTACC	360		
Sbjct 632	CTGCTTGCAGCTCTTGTGACGGTGATGGCATTGGTGTGAACTGCATCTGGTCGTTACC	573		
Query 361	CTGGATGTCCACCGAGCACTCGGCAGCCAGCAGCGGCGCACTGAGCAGGGACAGCAGGGA	420		
Sbjct 572	CTGGATGTCCACCGAGCACTCGGCAGCCAGCAGCGGCGCACTGAGCAGGGACAGCAGGGA	513		
Query 421	TACCGCAGCGAGTTTACGTAGCAT	444		
Sbjct 512	TACCGCAGCGAGTTTACGTAGCAT	489		

**Şekil 4.8.** Reverse primerle gerçekleştirilen sekans analizi ile elde edilen nükleotid sekansının blast sonucu

[Download](#) [Graphics](#)

unnamed protein product  
Sequence ID: Query\_231769 Length: 148 Number of Matches: 1

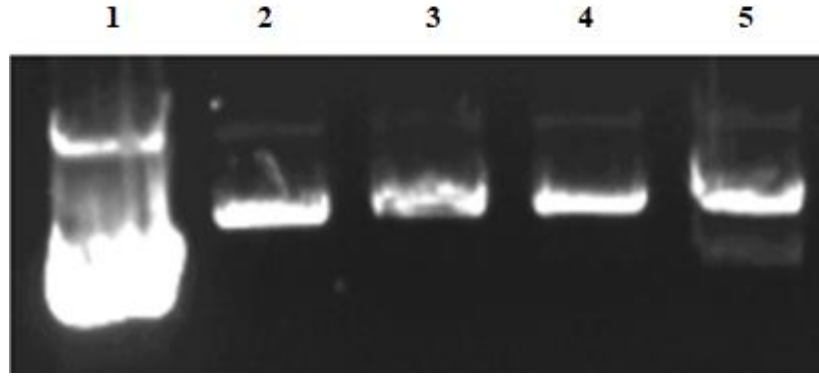
Range 1: 1 to 148 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
306 bits(785)	3e-114	Compositional matrix adjust.	148/148(100%)	148/148(100%)	0/148(0%)
Query 1	MLRKLAAVSLLSLLSAPLLAAECSVDIQGNDQMÖFNTNAITVDKSKÖFTVNL SHPGNLP	60			
Sbjct 1	MLRKLAAVSLLSLLSAPLLAAECSVDIQGNDQMÖFNTNAITVDKSKÖFTVNL SHPGNLP	60			
Query 61	KNVMGHNWVLSTAADMÖGVVTDGMASGLDKDYLPDSDRVIAHTKLIÖSGEKDSVTFDVS	120			
Sbjct 61	KNVMGHNWVLSTAADMÖGVVTDGMASGLDKDYLPDSDRVIAHTKLIÖSGEKDSVTFDVS	120			
Query 121	KLKEGEÖYMFCTFPGHSALMKGTLTLK	148			
Sbjct 121	KLKEGEÖYMFCTFPGHSALMKGTLTLK	148			

**Şekil 4.9.** Amino asit sekanslarının blast sonucu

#### 4.8. Saflaştırılan Rekombinant Vektörün Lineer Hale Getirilmesi

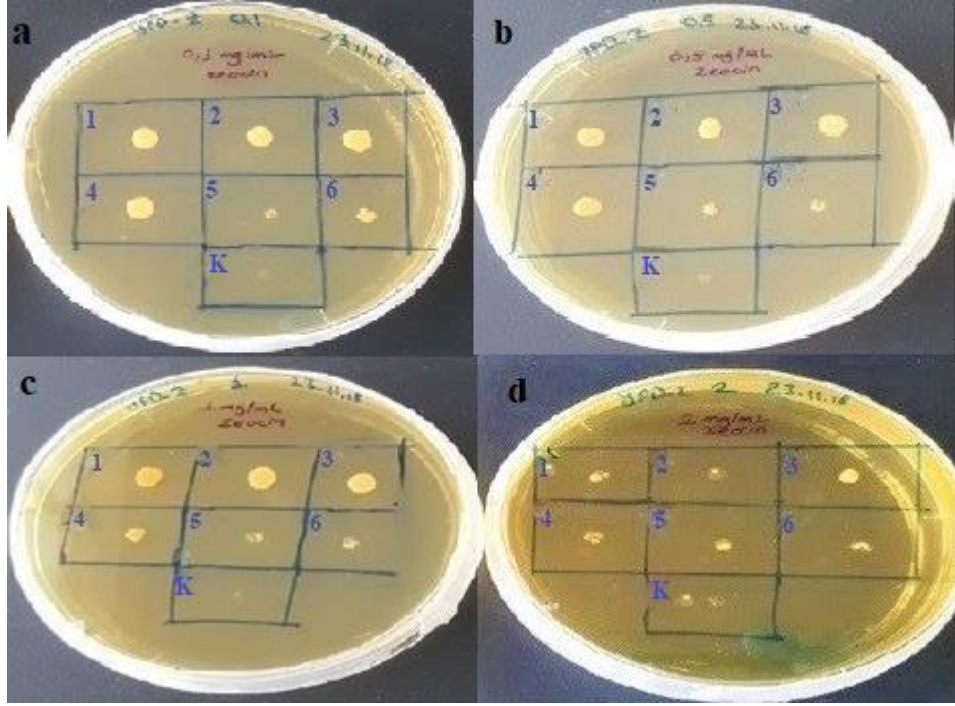
*P. pastoris* X-33 hücrelerinin transformasyonu için saf olarak elde edilen rekombinant vektör (pPICZ $\alpha$ A-Azu), 3.5'teki gibi *Pme*I enzimi kullanılarak 5' AOX1 promotör bölgesinden kesildi. Kesim ürünlerinden 2'şer  $\mu$ l agaroz jele yüklendi ve yürütüldü. Yürütülen jel, UV görüntüleme cihazında görüntülendi. Görüntüleme sonucu rekombinant plazmitlerin kesildiği teyit edildi (Şekil 4.10).



**Şekil 4.10.** Lineer rekombinant vektörün agaroz jel elektroforez görüntüsü (1. kuyu: kesilmemiş rekombinant vektör, 2-5. kuyu: kesilmiş rekombinant vektör)

#### 4.9. Rekombinant Protein Üretimi İçin Transformantların Seçilimi

3.5.2'deki gibi LiCl metodu ile gerçekleştirilen transformasyon işlemi sonrası 0,1 mg/ml zeosin içeren YPD agar plaklarda gelişen maya transformantlarından altı koloni seçilerek antibiyotik direnç testi gerçekleştirildi. Bu işlem için seçilen altı koloni, steril kürdan ile farklı konsantrasyonlarda (0,1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1 mg/ml ve 2 mg/ml) zeosin içeren YPD agar plaklara transfer edildi. 30°C'de 48 saatlik inkübasyonun ardından plakların fotoğrafı çekildi (Şekil 4.11).



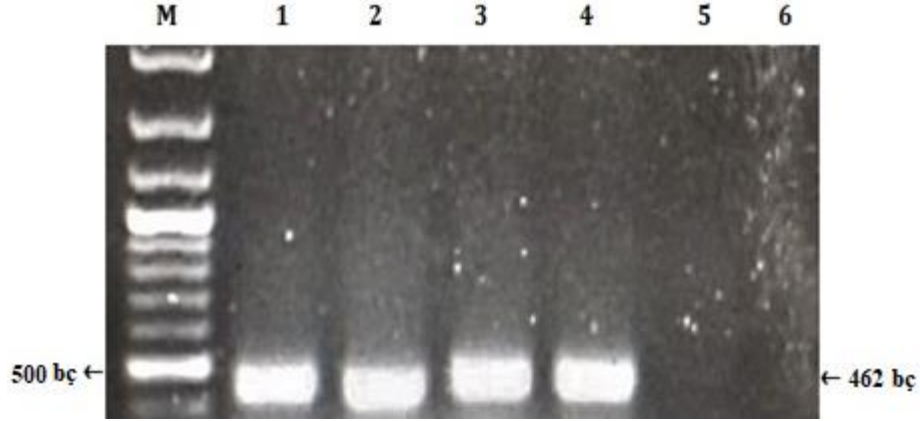
**Şekil 4.11.** Farklı zeosin konsantrasyonlarında gelişen transformantların görüntüsü

(a; 0,1 mg/ml zeosin içeren YPD agar plakta gelişen koloniler. b; 0,5 mg/ml zeosin içeren YPD agar plakta gelişen koloniler. c; 1 mg/ml zeosin içeren YPD agar plakta gelişen koloniler. d; 2 mg/ml zeosin içeren YPD agar plakta gelişen koloniler. K (Kontrol) ; *P. pastoris* X-33, 1-6; *P. pastoris* transformantları)

İnkübasyon sonrası 1., 3. ve 4. kolonilerin, 2 mg/ml konsantrasyona kadar direnç gösterirken 2. koloninin 1 mg/ml konsantrasyona kadar direnç gösterdiği görüldü. Ayrıca 5. ve 6. koloninin 0,1 mg/ml ve üzerindeki konsantrasyonlarda diğerlerinden daha az gelişim gösterdiği gözlemlendi (Şekil 4.11).

Antibiyotik direnç testi sonrası 0,1 mg/ml zeosin içeren YPD agar seçim plaklarında gelişen altı koloni, antibiyotiksiz YPD agar plaklara ekildi. Plaklar 48 saat inkübe edildikten sonra gelişim gösteren koloniler için gene spesifik primerler ile 3.5.2.c'deki gibi koloni PCR reaksiyonu yapıldı. Reaksiyon sonrası PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Yürütülen jel, UV görüntüleme cihazında görüntülendi (Şekil 4.12). Görüntüleme sonucu 1-4. kolonilerle yapılan PCR reaksiyonunda azurin

geninin amplifiye edildiği, 5. ve 6. koloniler ile yapılan PCR reaksiyonunda amplifiye edilmediği görüldü.

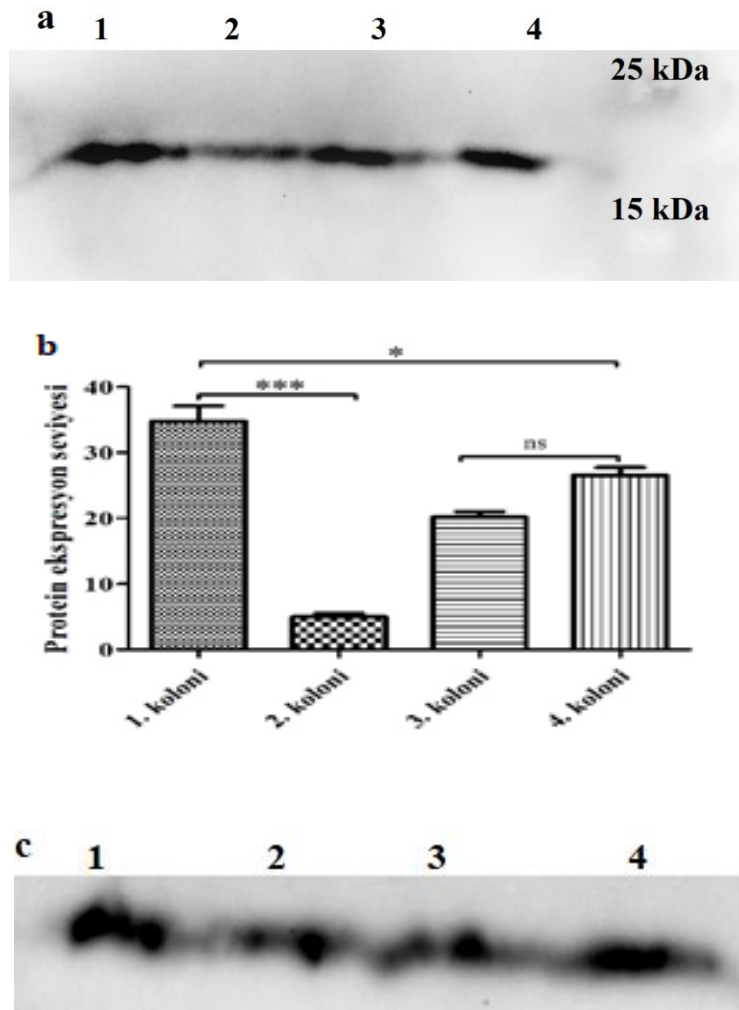


**Şekil 4.12.** Koloni PCR sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Makır, 1-6. kuyular: 1-6. kolonilere ait PCR ürünleri)

#### 4.10. Seçilen Rekombinant Maya Transformantlarının Protein Üretim Kapasitelerinin Karşılaştırılması

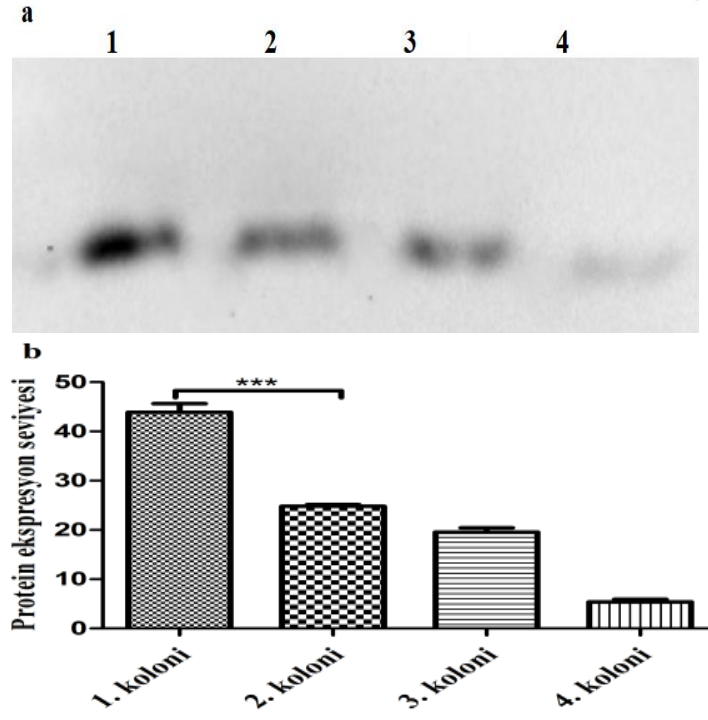
Seçilen altı rekombinant maya kolonisi arasından antibiyotik direnç testi ve gen spesifik primerlerle yapılan PCR sonuçlarına göre genomlarında azurin genini taşıdığı tespit edilen dört koloni, rekombinant protein üretim kapasitelerini karşılaştırmak için hazırlanan BMGY besiyerine inoküle edilerek 24 saat boyunca 30°C’de 225 rpm’de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası çoğalan hücreler santrifüj edilerek protein üretimi için hazırlanan BMMY besiyerine transfer edildi ve 48 saat boyunca 30°C’de 280 rpm’de inkübasyona bırakıldı. Kültür ortamlarına 24 saat sonra %0,5 saf metanol ilave edildi. Üretim kültüründen 48. saatte alınan örneklerin hücre dışı (ekstrasellüler) ve hücre içi (intraseellüler) protein üretimlerine bakmak için iki farklı antikor ile Western blot analizi gerçekleştirildi. Anti-His (C-term)-HRP ve Anti-Azurin antikorları ile yapılan Western blot analiz sonuçlarına göre, dört koloninin hücre dışı protein üretimine sahip olduğu ve en iyi üretimi gerçekleştiren koloninin 1. koloni olduğu tespit edildi. 3. ve 4. kolonilerin hücre dışı protein üretimleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı ( $p>0,05$ ) ve en düşük protein seviyesine 2. koloninin sahip olduğu belirlendi ( $p<0,001$ )

(Şekil 4.13 ). Diğer yandan, dört koloninin de hücre dışı üretimin yanı sıra hücre içi protein üretimine sahip olduğu gözlemlendi. En az hücre içi protein seviyesine 4. koloninin sahip olduğu gözlenirken, en yüksek protein seviyesine 1. koloninin sahip olduğu belirlendi ( $p < 0,001$ ) (Şekil 4.14). Anti-Azurin antikoru ile gerçekleştirilen Western blot görüntüsüne göre ekstrasellüler rekombinant azurin proteininin yaklaşık 20 kDa (19,95 kDa ) moleküler kütleyle sahip olduğu gözlemlendi.



**Şekil 4.13.** İnkübasyon sonrası elde edilen kültür sıvısına ait örneklerin Western blot analizi **a)** Anti-Azurin antikoru ile gerçekleştirilen analiz sonucu (1-4. Kuyu;1-4. koloni) **b)** Hücre dışı rekombinant azurin proteininin göreceli ekspresyon seviyesi **c)** Anti-His (C-term)-HRP antikoru ile gerçekleştirilen analiz sonucu (1-4. Kuyu;1-4. koloni)





**Şekil 4.14.** İnkübasyon sonrası elde edilen hücre lizatına ait örneklerin Western blot analizi **a)** Anti-His (C term) HRP antikoruna ile gerçekleştirilen analiz sonucu (1-4. Kuyu;1-4. koloni) **b)** Hücre içi rekombinant azurin proteininin göreceli ekspresyon seviyesi

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Rekombinant DNA Teknolojisi, nükleik asitlerin ve DNA'nın keşfiyle başlamış, asıl olarak 1970'de Smith'in mikroorganizmalarda mevcut olan ve DNA'yı spesifik dizi bölgelerinden kesebilen restriksiyon endonükleaz enzimlerini keşfetmesiyle ortaya çıkmıştır. Bu keşifler sonucunda ve gelişen moleküler genetik teknikler sayesinde farklı kaynaklardan gelen DNA moleküllerinin *in vitro* ortamlarda birleştirilebilmesi sağlanmıştır. Rekombinant DNA teknolojisi, doğada kendiliğinden bir arada olması mümkün olmayan, genetik mühendisliği teknikleri ile farklı organizmalardan alınan DNA parçalarının kesilip birleştirilmesini kapsar. Bu işlemler sonucunda oluşan DNA'ya rekombinant DNA (rDNA) adı verilir. Bu teknoloji, genomda bulunan binlerce gen arasından istenen özellikteki genin ayrıştırılıp elde edilmesini ve bu genin tanımlanmasının ardından PCR ile büyük ölçekte klonlanan DNA molekülü olarak üretilmesini mümkün kılmaktadır (Smith 1985). Bu teknoloji ile istenen gen bölgesi, orjinal DNA'dan restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesilip alındıktan sonra bir vektöre aktarılıp konak hücrede çoğaltılmaktadır (Yıldırım vd 2010). Bu teknolojiye kullanılan konak organizmalardan biri de mayadır. Birçok maya türü rekombinant ürün üretimi için tercih edilmektedir. Başlıca tercih edilen mayalar, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Pichia pastoris*'tir. *P. pastoris*'in gelişim evresinde oksijenli solunumu tercih etmesi, onu fermentatif olan *S. cerevisiae* gibi organizmalardan ayıran bir özelliktir. Fermentatif organizmaların güçlü fermentasyonu sonucu ürettiği etanol ve asetik asit benzeri fermentasyon yan ürünleri, hızlı bir şekilde toksik seviyeye ulaşır. *P. pastoris*'te ise böyle bir durum söz konusu olmaz (Cereghino vd 2002). *P. pastoris* gibi metilotrofik mayaların rekombinant protein üretimi için kullanılan *S. cerevisiae*'ye göre üstün yönleri bulunmaktadır. Bunlar; yüksek protein üretim imkanı, 10-100 kat daha fazla olan hiperglikolizasyonun önlenmesi, yüksek metanol konsantrasyonunda gelişim gösterebilmeleri sayesinde ortamdaki diğer mikroorganizmaların elimine edilmesi, düşük maliyetli olması ve çok sayıda kopya transformasyonu sağlaması şeklinde sayılabilir (Buckholz ve Geelson 1991; Gellison vd 1992; Romanos vd 1992).

*P. pastoris* fermentör ortamında fazla miktarda hücre yoğunluğuna sahip olduğu için 1970'li yıllarda tek hücre proteini üretimi için geliştirilmiştir. Öncelikle endüstriyel alanda rekombinant protein üretimi için tercih edilen mükemmel bir konakçı durumundadır (Daly ve Hearn 2005; Jungo vd 2007). Bu mayanın manipülasyonu ve kültüre edilmesi kolaydır. Ayrıca ökaryotik bir organizma olduğundan yüksek yapılı ökaryotik canlı hücreler tarafından gerçekleştirilen proteolitik işlemler, disülfid bağ oluşumu, katlanma ve glikozilasyon gibi birçok posttranslasyonel modifikasyonları gerçekleştirebilir. Bu özelliği sayesinde bakteri sistemlerine kıyasla birçok proteini biyolojik olarak aktif moleküller olarak üretebilme yeteneğine sahiptir. Ayrıca birçok yüksek yapılı ökaryotik sisteme göre (böcek ve memeli hücre ekspresyon sistemleri vb) daha kolay, daha hızlı, maliyeti düşüktür ve genellikle daha yüksek ekspresyon seviyeleri gösterir (Buckholz ve Geelson 1991; Romanos vd 1992).

Kanser, kontrolsüz hücre bölünmesi ve büyümesi ile ortaya çıkan, genetik ve çevresel şartlardan etkilenen kompleks bir hastalıktır. Kişiye ve kanser tiplerine göre birçok tedavi mevcuttur. Teknolojinin büyük bir hızla ilerlemesi ile mevcut bulunan tedavilere ek olarak yeni tedaviler geliştirilmektedir. Tedavi için rutin olarak uygulanan kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi yöntemler dışında son zamanlarda aşular, biyolojik, hormonal tedaviler, hedeflenmiş terapiler ve gen terapileri kullanılmaya başlanmıştır (Baykara 2016). Kanser tedavisinde yeni bir gelişme ise terapötik proteinlerin kullanılmasıdır. Terapötik proteinler, biyoteknolojik bir yöntem kullanılarak elde edilen tedavi edici proteinlerdir. Azurin proteini de terapötik protein olarak kullanılma potansiyeline sahiptir. Azurin, gram negatif, patojen bir bakteri olan *Pseudomonas aeruginosa* tarafından üretilen, 14 kDa (128 aa) gibi düşük moleküler kütleye sahip, suda çözünebilir ve bakır içeren protein (cupredoxin) ailesine ait bir proteindir (Tang vd 1968; Naguleswaran vd 2008; Yamada vd 2009; Bernardes vd 2010). Azurin proteininin, meme kanseri (MCF-7), melanom (UISO-Mel-2) ve osteosarkom (U2OS) hücrelerinde sitotoksik etki göstererek apoptozu indüklediği gözlenmiştir. Ayrıca azurin, bahsedilen bu hücrelerde hücre içi p53 ve pro-apoptotik Bax proteinlerinin seviyesinin artmasına ve mitokondriyal sitokrom c'nin sitozole salınımına yol açmıştır. Bu işlemin hücresel gelişimde ve hücresel homeostazinin devamında temel proses olan

apoptozu başlatan kaspaz kaskadını (kaspaz-7 ve 9) aktive ettiği bildirilmiştir (Punj vd 2004). MCF-7 hücrelerinde azurin tedavisi sürecinde sadece Bax proteinlerinin seviyesinde artışın meydana gelmesi değil, aynı zamanda anti-apoptotik Bcl2 proteinlerinin seviyesinde azalmanın olduğu gösterilmiştir (Punj vd 2004).

Bu çalışmada azurin geni pPICZ $\alpha$ A vektörüne klonlanmış elde edilen rekombinant vektör, *P. pastoris* hücrelerine transforme edilmiş, farklı kopya sayısında azurin geni taşıyan rekombinant maya kolonileri, farklı zeosin konsantrasyonları içeren besiyerlerinde seçilmiş ve seçilen transformantların rekombinant protein üretim kapasiteleri karşılaştırılmıştır. Böylece rekombinant azurin proteininin ekstrasellüler üretimi gerçekleştirilmiş ve en iyi üretim kapasitesine sahip transformant belirlenmiştir.

Yapılan çalışmada ilk olarak, *P. aeruginosa*'dan genomik DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen genomik DNA, agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi (Şekil 4.1). Ardından azurin gen bölgesine spesifik olarak dizayn edilen primerler ve izole edilen genomik DNA ile iki farklı primer bağlanma sıcaklığı (50 ve 51°C) kullanılarak gradient PCR yapıldı. PCR ürünleri, agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi. En iyi primer bağlanma sıcaklığının 51°C olduğu tespit edildi (Şekil 4.2). Daha sonra belirlenen şartlarda gerçekleştirilen PCR reaksiyonu ile çoğaltılan azurin geni, agaroz jelde yürütülerek jelden ekstraksiyonla saflaştırıldı ve saf olarak elde edilen gen, Çizelge 3.5'te belirtilen reaksiyon şartları gerçekleştirilerek *EcoRI* ve *XbaI* restriksiyon endonükleaz 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 yürüdüğü için kesim reaksiyonu sonrası görüntülenen jelde vektör DNA'nın kesildiği teyit edildi (Şekil 4.3). Kesilen vektör DNA, jelden ekstraksiyonla saflaştırıldı. Ligasyon işlemi için hazır hale gelen vektör DNA ve gen, T4 DNA ligaz enzimi ile birleştirildi. Ligasyon ürünü, kompetent *E. coli* One Shot TOP10 hücrelerine transfer edildi. Transformantlardan zeosin antibiyotigine dirençli olanların LSLB-zeosin agar besiyerinde gelişimi gözlemlendi (Şekil 4.4). Seçilen koloniler 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 4.5). Ayrıca bu kolonilerden plazmit izolasyonu yapıldı. Kalıp DNA olarak plazmitler ve vektöre ait primerler kullanılarak PCR yapıldı. Reaksiyon sonrası elde edilen PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütüldüğünde görüntülenen bantların tahmin edildiği gibi 982 bp uzunluğa sahip olduğu görüldü (Şekil 4.6). Her iki yöntemle geni doğru pozisyonda taşıdığı tespit edilen 1. koloniden plazmit izolasyonu gerçekleştirilerek sekans analizine gönderildi. Sekans analizi sonucuna göre klonlanan gene ait nükleotid dizisinin *P. aeruginosa* azurin genine ait dizi ile %99, bu nükleotid dizisine karşılık gelen aminoasit dizisinin ise *P. aeruginosa* azurin aminoasit dizisi ile %100 benzer olduğu görüldü (Şekil 4.7, 4.8 ve 4.9).

*P. pastoris* ekspresyon sistemi, çok sayıda heterolog (rekombinant) proteinlerin üretimi için başarıyla kullanılmaktadır (Rosenfeld vd 1999; Patrick vd 2005; Li vd 2007). Bu mayadaki rekombinant protein üretimi, diğer ökaryotik ve prokaryotik ekspresyon sistemlerine göre birkaç avantaja sahiptir. Bunlar; yüksek hücre yoğunluklu fermentasyon kolaylığı ile birlikte hızlı büyüme yeteneğine sahip olması, neredeyse proteinsiz bir ortamda yüksek seviyede verimlilik alınması, endotoksin ve bakteriyofaj kontaminasyonunun ortadan kaldırılabilmesi, iyi karakterize edilmiş maya ekspresyon vektörlerinde genetik manipülasyonun kolaylığı, *P. pastoris*'i enfekte eden litik virüslerin spektrumunda bilinen bir insan patojenitesinin olmaması, polipeptit katlanma, glikozilasyon, metilasyon, açılasyon, proteolitik parçalanma ve hücre altı bölümlere hedefleme (organeller, hücre zarı vb.) gibi çeşitli posttranslasyonel modifikasyonları gerçekleştirebilmesi ve protein sekresyonunu gerçekleştirdiği için maya hücrelerini parçalamaya gerek olmaksızın proteinin saflaştırılabilmesidir (Li vd 2007). Tüm bu özellikler, *P. pastoris*'i hem laboratuvar araştırmaları hem de endüstriyel üretim için kullanışlı bir ekspresyon sistemi yapmaktadır. Daha verimli protein üretiminin gerçekleştirilmesi, pH, havalandırma (O<sub>2</sub> düzeyi), sıcaklık ve karbon kaynaklı besleme hızı gibi protein üretkenliğini ve aktivitesini etkileyen parametreler kontrol edilerek sağlanabilir (Higgins ve Cregg 1998).

Sekans analizi ile doğruluğu teyit edilen rekombinant plazmit (rpPICZ $\alpha$ A-Azu), bir gece LSLB-zeosin sıvı besiyerinde büyütülen bakterilerden izole edildi. İzole edilen plazmit, AOX1 promotör bölgesinden *PmeI* enzimi ile kesilerek lineer hale getirildi (Şekil 4.10). *P. pastoris* ekspresyon sisteminde kullanılan vektörlerin büyük kısmında 5'AOX1 promotör bölgesi ile AOX1 transkripsiyon terminasyon bölgesinin bulunduğu bir ekspresyon kaseti mevcuttur (Koutz vd 1989). Promotör ve terminatör bölgeleri arasında bulunan, yabancı sekansın insört edilebileceği bir bölge veya çoklu klonlama bölgesi yer alır (Cereghino ve Cregg 2000). pPICZ $\alpha$ A vektörü, çok güçlü ve ayarlanabilir AOX1 promotörünün kontrolü altında eksprese edilecek heterolog geni, genoma entegre ederek rekombinant proteinlerin ekspresyonunu ve salgılanmasını sağlar (Cereghino and Cregg 2000). Bu yüzden, lineer haldeki rpPICZ $\alpha$ A-Azu, LiCl ile kompetent hale getirilen *P. pastoris* X-33 hücrelerine transfer edildi. Transformasyon işlemi sonrası mayalar, 0,1 mg/ml zeosin içeren YPD agar plaklara yayıldı ve 48-60 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından gelişim gösteren kolonilerden altı tanesi rastgele seçilerek antibiyotik direnç testine tabi tutuldu. Bu testin amacı farklı gen kopyasına sahip maya transformantlarının belirlenmesidir. Çünkü antibiyotik direnç testi, maya genomuna gönderilen hedef genin kopya sayısının bir belirteci olarak düşünülmektedir. Maya hücrelerinin artan antibiyotik konsantrasyonlarında gelişim göstermeleri, genomlarında birden çok hedef genin kopya sayısına sahip olduklarını göstermektedir. Hedef gen kopya sayısının artması, heterolog protein üretiminin artmasını sağlar. Bu yüzden antibiyotik direnç testi ile fazla miktarda hedef gen kopya sayısına sahip kolonilerin belirlenmesi ile daha fazla miktarda rekombinant protein üretimi gerçekleştirilebilir (Karaaslan 2017).

Direnç testi için seçilen altı transformant, farklı konsantrasyonlarda (0,1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1 mg/ml ve 2 mg/ml) zeosin içeren YPD agar plaklara yayıldı. 48 saat boyunca gerçekleştirilen inkübasyon sonrası 1., 3. ve 4. koloniler 2 mg/ml konsantrasyona kadar direnç gösterirken, 2. koloninin 1 mg/ml konsantrasyona kadar direnç gösterdiği gözlemlendi. Ayrıca 5. ve 6. koloninin 0,1 mg/ml konsantrasyonda dahi diğerlerinden daha az direnç gösterdiği gözlemlendi (Şekil 4.11). Bu sonuç, transformasyon işleminin ardından hücrelerin sirküler (lineer olmayan kapalı form) DNA'yı aldıklarını ve bu yüzden

antibiyotik direnci kazandıklarını düşündürmektedir. Diğer yandan, 0,1 mg/ml zeosin içeren YPD agar seçim plağından alınan altı koloni, koloni PCR reaksiyonunda kullanılmak üzere antibiyotik içermeyen YPD agara transfer edildi. 48 saatlik inkübasyon sonrasında gelişen koloniler ile gene spesifik primerler kullanılarak koloni PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Reaksiyon sonrası elde edilen PCR ürünleri, agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntüledi (Şekil 4.12). Görüntüleme sonucu, 1., 2., 3. ve 4. kolonilerde gene ait bant oluşumu gözlenirken 5. ve 6. kolonilerde gene ait bant oluşumu gözlenmedi. Yani 5. ve 6. koloniler ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonu sonucu azurin geni amplifiye edilmedi. Bu durumda, rekombinant plazmitin hücreler büyüdükçe yavru hücrelere geçemediği, dolayısıyla sirküler plazmit genoma entegre olamayacağından azurin geninin bu kolonileri oluşturan hücrelerin genomlarına entegre olmadığı düşünülmektedir. Hem antibiyotik direnç testi hem de elde edilen PCR sonuçları ile 1., 2., 3. ve 4. kolonilerde rekombinant plazmitin hücrelerin genomlarına aktarıldığı sonucuna varılmıştır. Benzer şekilde, Karaaslan (2017)'ın yaptığı çalışmada pPIC9K-LeExp1 ve pHIL-S1-LeExp1 ekspresyon plazmitlerinin transfer edildiği *P. pastoris* hücreleri için antibiyotik direnç testi yapılmış ve bu teste göre, 4 mg/ml konsantrasyonda genetisin içeren plaklarda gelişen maya hücreleri, 0,5, 1 ve 2 mg/ml konsantrasyonlarda genetisin antibiyotiği içeren plakalarda gelişen maya hücrelerinden daha çok gen kopya sayısı içerdiği için seçilmiş ve bu konsantrasyonda gelişen maya hücreleri ile rekombinant ekspanzin protein üretimi gerçekleştirilmiştir. Athmaram vd (2012) tarafından yapılan çalışmada ise *P. pastoris* 'te rekombinant hemagglutinin (HA) proteininin ekspresyon seviyeleri üzerine kopya sayısının etkisi araştırılmıştır. Seçim plaklarında genetisin antibiyotik konsantrasyonu 0,25, 0,5 ve 0,75 mg/ml olan besiyerlerine ekilen *P. pastoris* transformantlarının gelişimi gözlenmiş ve bu plaklarda iyi yetişen klonların, sırasıyla düşük, orta ve yüksek kopya entegratörlerine sahip olduğu kabul edilmiştir. Çalışmada heterolog genin artan sayıda kopyalarını taşıyan *Pichia* klonları, genetisin direnç testi ve SYBR green kantitatif Real-Time PCR yaklaşımına dayanarak seçilmiştir. Bu stratejileri kullanarak, transgenin maksimum dört ila altı kopyasını taşıyan rekombinant *Pichia* transformantları belirlenmiş, optimize edilen kültür şartlarında HA rekombinant protein üretimine geçilmiştir. Sonuç olarak, gen kopya sayısındaki artışın, rekombinant proteinin ekspresyon seviyesinde orantılı bir yükselmeye sebep olduğu bildirilmiştir. Diğer yandan, Jain vd (2018) tarafından

gerçekleştirilen bir çalışmada *P. pastoris* X-33'te *Thermoascus aurantiacus* RCKK'nın termostabil endoglukanaz enziminin işlevsel ifadesi ve karakterizasyonu çalışılmıştır. Ekspresyon kasetinin *Pichia* genomuna entegrasyonu, yüksek antibiyotik içeren besiyerlerinde transformantların seçilimi ile doğrulanmıştır. 2 mg/ml zeosin içeren YPD agar plaklarında transformantların taranması gerçekleştirilmiş, gelişen otuz iki transformanttan beş tanesi seçilmiş ve rekombinant protein üretimi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, *Pichia* transformantlarının yüksek zeosin konsantrasyonunda hayatta kalmasının, ekspresyon kasetinin konakçı genomundaki yüksek kopya sayısına bağlı olduğu ve konakçı genomuna entegre edilen genin yüksek kopya sayısında olmasının, *Pichia* ekspresyon sisteminde üst düzey ifade için daha etkili olduğu bildirilmiştir (Lambertz vd 2014). Literatürde yer alan bu bilgiler doğrultusunda yapmış olduğumuz antibiyotik direnç testi ve koloni PCR sonuçlarına göre seçilen dört rekombinant maya kolonisinin (1., 2., 3. ve 4. koloniler) azurin protein üretimi kapasitelerini karşılaştırmak ve en iyi üretim yapan koloniyi belirlemek için protein üretimi aşamasına geçildi.

Fermente kültürlerde rekombinant protein üretimi için *P. pastoris* mayasının kullanılmasının çok sayıda avantajı vardır. Bu avantajlar; AOX1 promotöründen başlatılan transkripsiyon seviyesinin, yüksek metanol seviyelerinde büyütülen hücrelere kıyasla, belirli miktarlarda metanol ile büyütülen hücrelerde 3 ila 5 kat daha fazla olabilmesi, metanol metabolizmasının yüksek oranda oksijen kullanması ve kültür ortamında bulunabilecek mikroorganizmalardan kaynaklı yabancı genlerin ekspresyonunu negatif sınırlama ile olumsuz yönde etkilemesi, ekspresyon suşlarının küçük ölçekli çalkalamalı erlen mayerlerden büyük ölçekli fermentasyon kültürlerine doğru aktarılma kolaylığıdır (Brierley 1998; Stratton 1998; Clare vd 1998). Fermentasyon ile üretimi gerçekleştirilen ekstrasellüler proteinler için kültür ortamı önemlidir. Çünkü kültür ortamında başta bulunan ve sonradan oluşan ya da ilave edilen bileşenler ekstrasellüler proteinin kararlılığını ve saf olarak elde edilmesini etkiler. Genellikle *P. pastoris* suşları başlangıçta karbon kaynağı olarak gliserol içeren bir ortamda (ön kültür besiyeri) yetiştirilir. Bu üretimde biyokütle birikir, fakat heterolog gen ekspresyonu tamamen baskılanır. Ön kültürde geliştirilen hücreler, gen



ekspresyonunu sağlamak için metanol veya bir gliserol ve metanol karışımı içeren üretim kültürüne transfer edilir. *P. pastoris*'in büyüme koşulları, büyük ölçekli heterolog protein üretimi için idealdir. Besiyeri ortamında bulunan bileşenlerin maliyeti azdır. Bunlar, saf karbon kaynakları (gliserol ve metanol), biyotin, tuzlar, iz elementler ve su gibi maddelerdir. Ayrıca besiyeri ortamı, pirojen (ateş yükselten madde) veya toksin kaynağı olabilen tanımlanmamış bileşenler bulundurmadığı için insan ilaçlarının üretimi için uygundur. Diğer yandan, *P. pastoris*, düşük pH'ya sahip ve metanol içeren ortamlarda büyütüldüğünden, diğer birçok mikroorganizma tarafından besiyerinin kontaminasyon olasılığı düşüktür (Cereghino ve Cregg 2000). *P. pastoris* ekspresyon sisteminin bu avantajları ve fermentasyon bilgileri göz önüne alınarak BMGY ön kültür besiyerlerine ekim yapılan dört rekombinant maya kolonisine ait inkübasyon sonrası logaritmik fazda büyütülen hücreler, rekombinant protein üretimi için hazırlanan BMMY üretim besiyerlerinde 48 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Kültür ortamlarına 24 saat sonra indükleyici olarak %0,5 metanol ilave edildi.

*P. pastoris*'te rekombinant protein üretimi, metanol tarafından düzenlenen alkol oksidaz promotörlerine bağlıdır. Metanol, hem karbon kaynağı hem de rekombinant proteinlerin ekspresyonunun indükleyicisi olarak görev yapabilir. Fakat metanol kullanımının bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bu nedenle besiyerine eklenecek metanol miktarı önemlidir. Çünkü alkol oksidaz için yüksek bir substrat afinitesine sahip olan metanolün kültür ortamında yüksek miktarda bulunması, *P. pastoris*'in formaldehit, formik asit gibi metabolitlerle zehirlenmesine neden olur (Meyer vd 2008). Bu durumda organizmanın büyümesi engellenir, ayrıca düşük miktarda metanol ise transkripsiyonu başlatmak için yeterli olmayabilir (Patrick vd 2005). Dolayısıyla, metanol konsantrasyonunu toksik olacağı seviyenin altında tutmak için, kesikli beslemeli besiyerleri kullanılmalıdır. Ayrıca, daha az promotör baskılayıcı bir karbon kaynağının kullanılması ile daha yüksek spesifik üretim oranlarına ulaşılabilir (Sreekrishna 2013). *P. pastoris*'te AOX1 promotörünün kontrolü altında rekombinant proteinlerin üretimi, genellikle ortak substrat olarak gliserol veya sorbitol ile birlikte metanol kullanılarak gerçekleştirilir (Berrios vd 2017). Bunlar arasında gliserol, ortak substrat olarak kullanıldığında daha yüksek biyomas elde edilse de AOX promotörünü baskılayıcı

etkisinden dolayı rekombinant protein verimi düşük seviyede gerçekleşir. Sorbitol ise, *P. pastoris* için yaygın olarak kullanılan ve promotör için baskılayıcı olmayan bir karbon kaynağıdır (Jungo vd 2007). Azadia vd (2017), karışık besleme kültüründe metanol ilavesi ile birlikte farklı sorbitol konsantrasyonlarının hücre yoğunluğu üzerindeki etkisini 30 saat boyunca incelemişlerdir. Temel protokole göre, indüksiyon fazı, her bir litre için 12 PTM<sub>1</sub> iz tuzu içeren metanol beslemesi ile gerçekleştirilmiştir. Besleme hızı, ilk altı saat boyunca 3,65 ml/h/l olacak şekilde başlangıç fermentasyon hacmine göre ayarlanmış daha sonra, besleme hızı, 7,3 ml/h/l olacak şekilde başlangıç fermentasyon hacmine göre iki katına çıkarılmıştır. 6 saat sonra ise besleme hızı, ayrıca 10,9 ml/h/l olacak şekilde başlangıç fermentasyon hacmine yükseltilerek fermentasyonun geri kalanında ise sabit tutulmuştur. Metanolde beslenen kültürde hücre biyoması yaş ağırlık olarak 94,38 g/l olarak bulunurken 30, 40, 50 ve 60 g/l sorbitol konsantrasyonunda ise hücre biyoması sırasıyla 94,73, 96,83, 108,5 ve 108,38 g/l olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak, ortama sorbitol eklenmesinin biyokütle üretimini arttırdığı ve bu sayede daha yüksek seviyede rekombinant protein üretimi sağlandığı bildirilmiştir. Çalık vd (2010) ise *P. pastoris* için hazırlanan besi ortamına metanolün yanısıra sorbitol ilave edildiğinde mikroorganizmaların lag fazına ait sürenin sadece metanolün ilave edildiği süreden daha kısa olduğunu bildirmiştir. Literatürde yer alan bu bilgiler ışığında bu çalışmada rekombinant protein üretimi için gerçekleştirilen çalkalamalı kültürlerde maya hücrelerinin büyümeleri amacıyla besi ortamına %0,5 metanolün yanısıra %1 oranında sorbitol ilave edildi.

Rekombinant protein üretimi için kullanılan maya ekspresyon sisteminin birçok avantajının yanısıra dezavantajı da bulunmaktadır. Bu dezavantaj, rekombinant proteinlerin N ve C-terminal kısmının sıklıkla degradasyonudur. Bu tip degradasyonların nedeni olan proteolitik bozulma, kültür ortamına salgılanan rekombinant proteinler için kalıcı bir problem olmuştur (Van Del Hazel vd 1996). Besi ortamına proteaz inhibitörlerinin eklenmesi veya proteaz eksikliği (protease deficient) olan suşların kullanımı gibi birkaç önlemin alınması ile kültür ortamında proteolitik bozulma probleminin önüne geçilebilir (Goodrick vd 2001; Kurokawa vd 2002). Ayrıca bu problemin üstesinden gelmek için proteaz inhibitörleri dışında kültür şartlarının ve

besiyeri içeriğinin optimizasyonu, pepton, kazamino asit ve spesifik aminoasitlerin eklenmesi gibi öneriler de bulunmaktadır (Enfors 1992; Lopez vd 2002). Clare vd (1991) tarafından yapılan çalışmada besiyeri ortamına eklenen %1 kazamino asit (w/v), proteazları inhibe ederek *P. pastoris* tarafından üretilen rekombinant fare epidermal büyüme faktörünün miktarında artış sağlamıştır. Diğer yandan Kaushik vd (2016) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise *P. pastoris* 'te DENV-3 EDIII (Envelope domain-III dengue virus )'ün ekstrasellüler ekspresyonunun artırılması için kazamino asitin sıcaklıktan bağımsız bir şekilde EDIII sekresyonu üzerine arttırıcı etkisini kültür ortamında yer alan proteolitik aktivitedeki azalma ile ilişkilendirmeye çalışmıştır. Sonuçta 187 mg/l'lik maksimum EDIII (Envelope domain-III ) ekspresyon seviyesi, %1 kazamino asit (w/v) varlığında 20°C'de induksiyonla çalkalamalı kültür koşullarında elde edilmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda bu çalışmada kültür ortamına salgılanan rekombinant proteinlerin parçalanmasını önlemek için %1'lik kazamino asit (w/v) ilave edildi.

Çoğu proteinin aktivite gösterebilmesi için posttranslasyonel (translasyon sonrası) modifikasyona (PTM) uğraması gerekir. PTM, proteinlerin bölgesel ve zamansal düzenlenmesinde ve proteinler tarafından gerçekleştirilen hücresel faaliyetlerin kontrolünde kullanılan önemli bir araçtır (Yalçın 2012). *P. pastoris* ekspresyon sisteminin diğerlerine göre en büyük avantajı, bu maya tarafından yüksek yapılı ökaryot sistemlerdeki sinyal dizilerinin işlenmesi, katlanma, disülfid köprü oluşumu, bazı lipit tiplerinin eklenmesi ve O ve N-bağlı glikozilasyon gibi translasyon sonrası modifikasyonların meydana getirilmesidir (Cereghino ve Cregg 2000).

Ökaryotik hücreler, O-bağlı sakkariti, serin ve treoninin hidroksil grupları üzerine birleştirir. Memelilerde, O-bağlı oligosakkaritler, N-asetilgalaktozamin, galaktoz (Gal) ve sialik asit (NeuAc) dahil olmak üzere çeşitli şekerlerden oluşur. Buna karşılık, *Pichia*, diğer mayalar ve mantarlar gibi, salgılanmış proteinlerin serin ve treonin hidroksil gruplarına O-oligosakkaritler ekler. Bunlar sadece mannoz kalıntılarında oluşur (Cereghino ve Cregg 2000). Ayrıca farklı konak organizmalar aynı proteinde bulunan farklı bölgelere O-bağlantılı oligosakkaritler ekleyebilmektedir. Fakat proteinin

kendi ana konakçısı bu proteini glikozile etmese bile *P. pastoris* tarafından bu heterolog proteinin glikozile edilemeyeceği düşünülmemelidir. Örneğin, insülin benzeri büyüme faktörü I (IGF-I) insanlarda glikozile edilmese de, *P. pastoris* tarafından eksprese edilen IGF-I ürününün % 15'ine O-bağlantılı mannoz ilave edildiği bildirilmiştir (Brierley 1998). Bütün ökaryotik sistemlerde, N-glikozilasyon, endoplazmik retikulumda bir lipit bağlı oligosakkarit birimi olan Glc3Man9GlcNAc2'nin (Glc=glukoz; GlcNAc=N asetilglukozamin), Asn-X-Ser / Thr tanıma sekansında asparagine transferi ile başlar. Bu oligosakkarit çekirdeği daha sonra Man8GlcNAc2'ye kesilir. Bu noktada, düşük yapılı (*P. pastoris* vb) ve daha yüksek yapılı ökaryotların glikozilasyon parametreleri farklılaşmaya başlar. Memeli golgi organeli, Man5G6GlcNAc2 (yüksek mannoz tipi), birkaç farklı şeker karışımından (karmaşık tip) veya her ikisinin kombinasyonundan (hibrit tip) oluşan oligosakkaritler üreten bir dizi kırpma ve ilave reaksiyonu gerçekleştirir (Goochee vd 1991). *S. cerevisiae*'de, N'e bağlı çekirdek birimler, golgide mannoz dış zincirlerinin eklenmesiyle uzatılır. Bu dış zincirlerin uzunluğu değişiklik gösterdiğinden, *S. cerevisiae*'den endojen ve salgılanan heterolog proteinlerin çoğunluğu heterojendir. Bu zincirler, tipik olarak, hiperglikozilasyon olarak adlandırılan 50-150 arası uzunlukta mannoz rezidüsünden oluşur. *P. pastoris*'te salgılanan bazı yabancı proteinlerin, *S. cerevisiae*'de gözlenenlere benzer şekilde hiperglikozile olduğu görülmektedir. Diğer yandan maya ekspresyon sistemleri tarafından proteinlere eklenen N-bağlı yüksek mannozlu oligosakkaritler, farmasötik endüstrisi tarafından ekstrasellüler proteinlerin kullanımında önemli bir sorun teşkil etmektedir. Memelilere intravenöz olarak verildiğinde aşırı derecede antijenik olabilirler ve kan tarafından karaciğerden hızla temizlenirler. Maya ve memeli N-bağlantılı glikozilasyon paternleri arasındaki farklılıklardan kaynaklanan ilave bir problem, uzun dış zincirlerin yabancı bir proteinin katlanmasına veya işlevine potansiyel olarak müdahale edebilmesidir. *S. cerevisiae* ile salgılanan proteinler üzerindeki oligosakkarit yapılarına göre, *P. pastoris* tarafından üretilen proteinlerde farklılık görülür. Birincisi ve belki de en önemlisi, hiperglikozilasyonun sıkça olmamasıdır. Oligosakkarit hazırlama teknikleri kullanılarak, *P. pastoris* tarafından salgılanan proteinler üzerindeki tipik dış zincirin Man8GlcNAc2 veya Man9GlcNAc2 olduğu gösterilmiştir (Montesino vd 1998). Bir diğer avantajı da *P. pastoris* oligosakkaritlerinin herhangi bir terminal K-1,3 bağlantılı mannozilasyona sahip görünmüyor olmasıdır (Verostek ve Trimble 1995; Montesino vd

1998). Bu özellikleri, farmasötik alanda kullanılmak üzere üretilen rekombinant proteinlerin ekspresyonunda *P. pastoris*'i *S. cerevisiae*'den daha iyi bir konakçı yapmaktadır.

Yapılan bu çalışmada heterolog proteinlerde glikozilasyonu gerçekleştirebilen 4 farklı rekombinant *P. pastoris* kolonisi ile 48 saatlik inkübasyon boyunca elde edilen kültür ortamından alınan örneklerin süpernatant kısımlarının 1 ml'si TCA ile çöktürüldükten sonra proteinlerin indirgeyici ajan olan SDS ve ısı ile denatüre edilmesinin ardından poliakrilamid jel elektroforezi gerçekleştirildi. SDS-PAGE uygulaması sonucunda elde edilen jel, PVDF (Polyvinylidene difluoride) membrana aktarılarak hem proteine ilave edilen 6xHis uzantısına spesifik Anti-His (C-term)-HRP hem de azurin proteinine spesifik Anti-Azurin antikoru kullanılarak Western blot analizi yapıldı. BIO-RAD (ChemiDoc Touch imaging system) görüntüleme cihazı ile görüntülenen bantların rekombinant azurin proteinine ait olduğu ve dört koloniye ait kültür ortamında  $\alpha$  sekresyon sinyal sekansının downstream bölgesine yerleştirilen genin ekspresyonu sonucu ekstrasellüler proteinin varlığı tespit edildi. Ayrıca en iyi hücre dışı protein üretimini gerçekleştiren koloninin 1. koloni olduğu tespit edildi. 3. ve 4. kolonilerin hücre dışı protein üretimleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı ( $p>0,05$ ) ve en düşük protein seviyesine 2. koloninin sahip olduğu belirlendi ( $p<0,001$ ) (Şekil 4.13). Besiyerine %1 oranında eklenen kazamino asit sayesinde kültür ortamına salgılanan rekombinant proteinlerin proteazlar tarafından yıkıma uğratılmadığı görüldü. Diğer yandan, dört koloninin de hücre dışı üretimin yanı sıra hücre içi protein üretimine sahip olup olmadığını anlamak için 48 saatlik kültür ortamlarından santrifüjle toplanan hücre pelletlerinden 0,1'er gram alındı. Cam boncukla parçalanarak elde edilen hücre lizatları ile Anti-His (C-term)-HRP antikoru kullanılarak Western blot analizi yapıldı. En az hücre içi protein seviyesine 4. koloninin sahip olduğu gözlenirken, en yüksek protein seviyesine 1. koloninin sahip olduğu belirlendi ( $p<0,001$ ) (Şekil 4.14). Dolayısıyla, 4. koloninin hücre içi protein üretiminin diğer kolonilerden daha düşük seviyede olması, bu klonun proteini kültür ortamına salgılama yeteneğinin daha fazla olduğunu, her iki üretim tipinde de 1. koloninin diğerlerinden daha yüksek seviyede protein üretimine sahip olması, antibiyotik direnç testi sonucu 2 mg/ml konsantrasyonda

direnç gösteren bu klonun genomunda diğerlerinden daha yüksek kopya sayısına sahip azurin geni taşıdığını düşündürmektedir.

Rekombinant maya hücrelerinin proteini salgılamasına engel bir durum olarak endoplazmik retikulumdaki oksidatif stres sonucu proteinlerin yanlış katlanması, özellikle de disülfit bağlarına sahip olanların birikmesi, disülfit izomeraz gibi foldazların tekrarlayan oksidatif katlanma girişimlerinin bir sonucu olarak hücre içi ROS'un artması ile hücresel korumayı zorunlu kılan oksidatif stresin ortaya çıkması gösterilebilir. Şiddetli oksijen sınırlaması, hücreye uygulanan çevresel stres olarak kabul edilebilir, bu da beklenen hücresel stres tepkisine ve protein salgılanmasının muhtemel bozulmasına neden olabilmektedir (Massahı 2017). Boy (2011), *Pyrococcus furiosus*'un ekstrasellüler  $\alpha$  amilaz enziminin (PFA) *P. pastoris* X-33 suşunda pPICZ $\alpha$ A-PFA ekspresyon sistemini kullanarak rekombinant üretimini gerçekleştirmiştir. Fakat hücre dışı üretim için ekstrasellüler olan  $\alpha$  amilaz enziminin N-terminal kısmına eklenen  $\alpha$  sekresyon sinyalinin de bulunmasına rağmen rekombinant maya hücrelerinde proteinin hücre içi üretiminin daha fazla gerçekleştirildiği gözlenmiştir. Bunun sebebi olarak hidrofobik olan rekombinant protein, hücre içine yığılarak birikmiş veya hücre zarına istiflenmiş ve hücre içi ekspresyon ile sonuçlanmış olabileceği düşünülmüştür. Azurin proteininin de hidrofobik yama bulundurması, hücre içi birikiminin bir nedeni olabilir. Bunların sonucu olarak rekombinant koloniler ürettikleri proteini tümüyle hücre dışına salgılayamamış ve proteinin hücre içinde birikimi söz konusu olmuş olabilir. Anti-Azurin antikoru ile gerçekleştirilen Western blot analizi ile, ekstrasellüler rekombinant azurin-cMyc-His tag füzyon proteininin yaklaşık 20 kDa moleküler kütleyle sahip olduğu gözlendi. Üretici firma (Invitrogen) tarafından bildirildiği üzere myc epitopu (EQKLISEEDL) ve histidin kuyruğu (6XH) rekombinant proteine 2,5 kDa ilave ettiği için geri kalan farkın rekombinant proteinin glikozillenmiş kısmından kaynaklandığı düşünülmektedir. Benzer şekilde rekombinant üretim gerçekleştirilen diğer çalışmalarda da *P. pastoris*'te eksprese edilen ürünlerin gerçek moleküler kütlelerinin üzerinde bulunması, maya tarafından gerçekleştirilen glikozilasyon olayı ile açıklanmıştır. Athmaram vd (2012) yaptığı çalışmada 60 kDa moleküler kütleyle sahip hemaglutinin (HA) proteini *P. pastoris*'te ekstrasellüler

üretimi sonucu yaklaşık 80 kDa civarında bulunmuştur. Soyaslan (2010), 34-38,5 kDa moleküler kütleyle sahip olan insan eritropoietininin *P. pastoris*'te ekstrasellüler üretimi sonrası 43-55 kDa aralığında moleküler kütleyle sahip olduğunu bildirmiştir. Yine, Arruda vd (2016)'nin yaptığı çalışmada 54 kDa moleküler kütleyle sahip *Bacillus subtilis*  $\alpha$ -amylase proteininin *P. pastoris*'te ekstrasellüler üretimi sonucu moleküler kütlesi yaklaşık 60 kDa civarında bulunmuştur. Faraji vd (2017) tarafından yapılan çalışmada ise *Staphylococcus aureus* suşları tarafından üretilen, plazminojen aktivatörü olarak kullanılan stafilokinaz (SAK) enziminin *P. pastoris*'te ekstrasellüler üretimi gerçekleştirilmiştir. Rekombinant SAK-cMyc-His tag füzyon proteininin glikozillenmiş halinin moleküler kütlesi 22 kDa, deglikozile halinin ise 18,6 kDa moleküler kütleyle sahip olduğu bulunmuştur.

### Sonuç ve Öneriler

1. *P. aeruginosa* azurin proteini, *P. pastoris* ekspresyon sisteminde ilk kez rekombinant olarak üretilmiştir.
2. Çoklu kopya rekombinantlarının taranmasıyla elde edilen rekombinant azurin üretme yeteneğine sahip dört farklı klondan en iyi üretim yapan klon belirlenmiştir.
3. Rekombinant azurin proteininin *S. cerevisiae* alfa faktör sinyal sekansı aracılığıyla kültür ortamına salgılanması mümkün olmuştur. Bu sonraki aşamalarda rekombinant proteinin kültür ortamından hücre içeriğini parçalamaya gerek duyulmadan saflaştırılmasını sağlayabilir.
4. Rekombinant Azu-cMyc-His tag füzyon proteini afinite kromatografisi ile kolaylıkla saflaştırılabilir.
5. Azurin proteini özellikle meme kanseri hücreleri gibi bazı kanser hücreleri üzerinde sitotoksositeye yol açtığı ve apoptozu indükleyebildiği için terapötik protein olarak kullanılabilir. Bu durumda rekombinant maya hücreleri tarafından üretilen ve saf olarak elde edilen azurin proteini, üretim sırasında eklendiği

tahmin edilen ve antijenik olma ihtimali bulunan glikozil zincirlerinden arındırılıp, terapötik protein olarak kullanılabilirliği test edilebilir.



**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.
- Arda, M., 2000. Temel Mikrobiyoloji; "Genişletilmiş İkinci Baskı. Medisan Yayın Serisi no 46, 234 s.
- 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.
- 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.
- Azadia, S., Mahboubib, A., Naghdid, N., Solaimaniane, R. and Mortazavia, S.A., 2017. Evaluation of sorbitol-methanol Co-feeding strategy on production of recombinant human growth hormone in *Pichia Pastoris*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 16(4), 1555-1564.
- Barnum, R.S., 2006. *Biotechnology: An Introduction, Updated Edition (with InfoTrac) 2nd Edition*. 384 p.
- Baykara, O., 2016. Current modalities in treatment of cancer. *Balıkesir Health Sciences Journal*, 154.
- Bernardes, N., Seruca, R., Chakrabarty, A.M. and Fialho, A.M., 2010. “Microbialbased therapy of cancer: current progress and future prospects”, *Bioengineered bugs*, 1, 178–90.
- Berrios, J., Flores, M.O., Díaz-Barrera, A., Altamirano, C., Martínez, I. and Cabrera, Z., 2017. A comparative study of glycerol and sorbitol as co-substrates in methanol-induced cultures of *Pichia pastoris*: temperature effect and scale-up simulation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* March, 44(3), 407–411.
- 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.
- Brierley, R.A., 1998. Secretion of recombinant human insulin-like growth factor I (IGF-1). *Methods Mol. Biol*, 103, 149-177.
- Buckholz, R.G. and Gleeson, M.A., 1991. Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. *Biotechnology (N Y)*, 1067-72.
- Cereghino, J.L. and Cregg, J.M., 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24:45-66.
- Cereghino, G.P.L., Cereghino, J.L., Ilgen, C. and Cregg, J.M. 2002. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 329-332.
- Chan, M.K., Lim, S.K., Miswan, N., Chew, A.L., Noordin, R. and Khoo, B.Y., 2018. Expression of stable and active human DNA topoisomerase I in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 141, 52-62.

- Chang, L., Xiao, W., Yang, Y., Li, H., Xia, D., Yu, G., Guo, X., Guan, W., Hu, Z. and Xu, H., 2013. Department of Urology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030.
- Chaudhari, A., Mahfouz, M., Fialho, A.M., Yamada, T., Granja, A.T., Zhu, Y., Hashimoto, W., Schlarb, R.B., Cho, W. and Das Gupta, T.K., 2007. Cupredoxin-cancer interrelationship: azurin binding with EphB2, interference in EphB2 tyrosine phosphorylation, and inhibition of cancer growth. *Biochemistry*, 46, 1799-1810.
- Chen, P., Fu, X., Ng, T. B. and Ye, X. Y., 2011. Expression of a secretory  $\beta$ -glucosidase from *Trichoderma reesei* in *Pichia pastoris* and its characterization. *Biotechnology Letters*, 33, 2475–2479.
- Chen, Q., Zhou, Y., Yu, J., Liu, W., Li, F., Xian, M., Nian, R., Song, H. and Feng, D., 2018. An efficient constitutive expression system for Anti-CEACAM5 nanobody production in the yeast *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification*, 155, 43-47.
- Clare, J.J., Rayment, F.B., Ballantyne, S.P., Sreerkrishna, K. and Romanos, M.A., 1991. High level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Biotechnology*, 9, 455-460.
- Clare, J., Sreerkrishna K. and Romanos M., 1998. Expression of tetanus toxin fragment C. *Methods Molecular Biology*, 103, 193-208.
- Clark, K.M., Shiliang, T., Wilfred, A. van der Donk and Yi, L., 2016. Probing the Role of the Backbone Carbonyl Interaction with the Cu<sub>A</sub>Center in Azurin by Replacing the Peptide Bond with an Ester Linkage. *Camp*, 53(1), 224-227.
- Crea, R. and Kraszewski, 1978. A. Chemical synthesis of genes for human insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 5765–5769.
- Cregg, J.M., 1999. *Gene expression systems*, Ed: Fernandez, J.M. and Hoeffler, J.P. Academic Press, San Diego, California.
- Cregg, J.M., Cereghino, J.L., Shi, J. and Higgins, D.R., 2000. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, 16, 23–52.
- Çalık, P., Bayraktar, E., Soyaslan, E.Ş., Şahin, M. and Taşpınar, H., 2010. Influence of pH on recombinant human growth hormone production by *Pichia pastoris*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85, 1628-1635.
- Daly, R. and Hearn, M.T.W., 2005. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition*, 18, 119–138.
- Enfors, S., 1992. Control of proteolysis in fermentation of recombinant proteins. *Trends in Biotechnology*, 10, 310-315.
- Ersöz, F. and İnan, M., 2018. Large-scale production of yak (*Bos grunniens*) chymosin A in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification*, 154, 126-133.
- Faber, K.N., Harder, W., Ab, G. and Veenhuis, M., 1995. Review: methylotrophic yeasts as factories for the production of foreign proteins. *Yeast*, 11, 1331-1344.
- Faraji, H., Ramezani, M., Sadeghnia, H. R., Abnous, K., Soltani, F. and Mashkani, B., 2017. High-level expression of a biologically active staphylokinase in *Pichia pastoris*, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 47, 379-387.

- Fialho, A.M., Das Gupta, T.K. and Chakrabarty, A.M., 2008. Promiscuous drugs from pathogenic bacteria in the post-antibiotics era. In *Patho-Biotechnology*, R. Sleator, and C. Hill, eds. (Landes Bioscience), 145-162.
- Fialho, A.M., Salunkhe, P., Manna, S., Mahali, S. and Chakrabarty, A.M., 2012. "Glioblastoma multiforme: novel therapeutic approaches.," *ISRN neurology*, 1–10.
- Geckil, H. and Gencer, S., 2004. Production of L-asparaginase in *Enterobacter aerogenes* expressing *Vitreoscilla* hemoglobin for efficient oxygen uptake. *Appl Microbiol Biot*, 63, 691-697.
- Gellison, G., Janowicz, Z.A., Weydemann, U., Melber, K., Strasser, A.W.M. and Hollenberg, C.P., 1992. High-level expression of foreign genes in *Hansenula polymorpha*. *Biotechnology Advances*, 10, 179– 89.
- Goodrick, J.C., Shibui, T.D. and Sakaguchi, H., 2001. High-level expression and stabilization of recombinant human chitinase produced in a continuous constitutive *Pichia pastoris* expression system. *Biotechnol Bioeng.*, 74, 492-497.
- Goochee, C.F., Gramer, M.J., Andersen, D.C., Bahr, J.B. and Rasmussen, J.R., 1991. The oligosaccharides of glycoproteins: bioprocess factors affecting oligosaccharide structure and their effect on glycoprotein properties. *Biotechnology*, 9, 1347-1355.
- Hafner, G., Schmitz, S., Meyer, F., Bataille, P., Hau, T., Langmann, W., Dietmaier, M., Landthaler and Vogt, T., 2004. "Differential gene expression of Eph receptors and ephrins in benign human tissues and cancers.," *Clinical chemistry*, 50, 490–9.
- Higgins, D.R. and Cregg, J.M., 1998. Introduction to *Pichia pastoris*. *Pichia Protocols of the series Methods in Molecular Biology*, 103, 1-15.
- İnan, M. and Meagher, M.M., 2001. The Effect of Ethanol and Acetate on Protein Expression in *Pichia pastoris*, *Journal of bioscience and bioengineering*, 92(4), 337-341.
- Invitrogen, 2010a. EasySelect Pichia Expression Kit. <http://tools.inen.com/content/sfs/manuals/easyselectman.pdf> (11.10.2014).
- Invitrogen, 2010b, pPICZ alpha manual. [http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/ppiczalpha\\_man.pdf](http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/ppiczalpha_man.pdf) (11.10.2014).
- Jain, K.K., Kumar, S., Kailash, N., Bhardwaj and Kuhad, R.C., 2018. Functional Expression of a Thermostable Endoglucanase from *Thermoascus aurantiacus* RCKK in *Pichia pastoris* X-33 and Its Characterization. *Molecular Biotechnology*, 60, 736–748.
- Jungo, C., Marison, I. and Stockar., 2007. U.V. Regulation of alcohol oxidase of a recombinant *Pichia pastoris* Mut<sup>+</sup> strain in transient continuous cultures. *Journal of Biotechnology*, 130, 236-246.
- Jungo, C., Schenk, J., Pasquier, M., Marison, I. W. and von Stockar U., 2007. A quantitative analysis of the benefits of mixed feeds of sorbitol and methanol for the production of recombinant avidin with *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol*, 131, 57–66.
- Kaushik, N., Rohila, D., Arora, U., Raut, R., Lamminmäki, U., Khanna, N. and Batra, G., 2016. Casamino acids facilitate the secretion of recombinant dengue virus

- serotype-3 envelope domain III in *Pichia pastoris*. BMC Biotechnology, 16(12).
- Keefer, L.M., Piron, M. and De Meyts, 1981. Human insulin prepared by recombinant DNA techniques and native human insulin interact identically with insulin receptors. 78, 1391–5. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.
- Kjeldsen, T., Pattersson, A.F. and Hach, M., 1999. Secretory expression and characterization of insulin in *Pichia pastoris*. Biotechnol. Appl. Biochem, 29, 79–86.
- Kurtzman, C.P., 2009. Biotechnological strains of *Komagataella (Pichia) pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. Journal of Industrial Microbiology Biotechnology, 36, 1435–1438.
- Kurokawa, T., Lee, C., Shiomi, N., Nakano A. and Katoh, S., 2002. Secretion of  $\alpha$ -amylase from *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris* and characterization of its C-terminus with anti-peptide antibody J. Chem. Eng. Jpn., 35, 127-128.
- Koutz, P., Davis, G.R., Stillman, C., Barringer, K., Cregg, J. and Thill, G., 1989. Structural comparasion of the *Pichia pastorise* alcohol oxidase genes. Yeast, 5(3), 167-177.
- Kwan, J.M., Fialho, A.M., Kundu, M., Thomas J., Hong, C.S., Das Gupta, T.K. and Chakrabarty, A.M., 2009. “Bacterial proteins as potential drugs in the treatment of leukemia.,” Leukemia research, 33, 1392–9.
- Lambertz, C., Garvey, M., Klinger, J., Heesel, D., Klose, H., Fischer, R. and Commandeur, 2014. Challenges and advances in the heterologous expression of cellulolytic enzymes: a review. Biotechnol Biofuels.
- Laske, D.W., Youle, R.J. and Oldfield, E.H., 1997. Tumor regression with regional distribution of the targeted toxin TF-CRM107 in patients with malignant brain tumors. Nat Med, 3, 1362-1368.
- Latiffi, A.A., Salleh, A.B., Rahman, R.N., Oslan, S.N. and Basri, M., 2013. Secretory expression of thermostable alkaline protease from *Bacillus stearothermophilus* FI by using native signal peptide and  $\alpha$ -factor secretion signal in *Pichia pastoris*. Genes Genet Syst., 88(2), 85-91.
- Li, P., Anumanthan, A., Gao, X.G., Ilangovan, K., Suzara, V.V., Düzgünes, N., and Renugopalakrishnan, V., 2007. Expression of Recombinant Proteins in *Pichia Pastoris*. Appl Biochem Biotechnol, 142, 105–124.
- Li, H., Na, L., Xuefei, G., Kong, X., Li, S., Xu, A., Jin, S. and Wu, D., 2011. High level expression of active recombinant human interleukin-3 in *Pichia pastoris*. Protein Expression and Purification, 80, 185-193.
- Li, H. and Xia, Y., 2018. Improving the secretory expression of active recombinant AaIT in *Pichia pastoris* by changing the expression strain and plasmid. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 34(7), 104.
- Lin, X., Xu, W., Huang, K., Mei, X., Liang, Z., Li, Z., Guo, J. and Luo, Y., 2009. Cloning, expression and characterization of recombinant elastase from *Pseudomonas aeruginosa* in *Picha pastoris*. Protein Expression and Purification, 63, 69-74.
- Liu, H., Tan, X., Russell, K.A., Veenhuis, M. and Cregg, J.M., 1995. PER3, a gene required for peroxisome biogenesis in *Pichia pastoris*, encodes a peroxisomal

- membrane protein involved in protein import. *J. Biol. Chem.*, 270, 10940-10951.
- 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.
- Lopez, G., C.I., Szabo R., Blanchin-Roland, S. and Gaillardin, C., 2002. Genetic control of extracellular protease synthesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Genetics*, 160, 417-427.
- Luo, F., Wei, H.J., Yuan, X.Y., Jiang, L. and Ming, F.J., 2016. Cloning and Expression of Yak Active Chymosin in *Pichia pastoris*. *Asian Australas*, 9, 1363-1370.
- Massahı, 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.
- Mehta, R., Yamada, T., Taylor, B., Christov, K., King, M., Majumdar, D., Lekmine, F., Tiruppathi ,C., Shilkaitis, A. and Bratescu, L., 2011. A cell penetrating peptide derived from azurin inhibits angiogenesis and tumor growth by inhibiting phosphorylation of VEGFR-2, FAK and Akt. *Angiogenesis*, 14, 355-369.
- Meyer, H.P., Brass, J., Jungo, C., Kelin, J., Wenger, J. and Mommers, R., 2008. An emerging star for therapeutic and catalytic protein production. *BioProcess Int.*, 2, 10–21.
- Milanez, B. L., Simionato, A.S., Novello, C.R. , Guimarães, J.R., Felicidade, I., Gonçalves, O.A., Mello, J.C.P., Mantovani, M.S., Chrystafidis, A. L., Andrade, G., Colus, I.M S. and Oliveira, M.T., 2018. RNAm expression profile of cancer marker genes in HepG2 cells treated with different concentrations of a new indolin-3-one from *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, 8(1), 1278.
- Montesino, R., Garcia, R., Quintero, O. and Cremata, J.A., 1998. Variation in N-linked oligosaccharide structures on heterologous proteins secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.*, 14, 197-207.
- Morrow, J.R.K.J., 2007. Improving protein production processes. *Gen Eng News*, 27(5), 50–41.
- Mu, X., Kong, N., Chen, W., Zhang, T., Shen, M. and Yan, W., 2008. High-level expression, purification, and characterization of recombinant human basic fibroblast growth factor in *Pichia pastoris*. Department of Biochemistry, Institute of Frontier Medical Sciences, Jilin University, Xinmindajie Street 1163, Changchun, Jilin 130021, China.
- Naguleswaran, A., Fialho, A.M., Chaudhari, A., Hong C. S., Chakrabarty, A.M. and Sullivan, W.J., 2008. “Azurin-like protein blocks invasion of *Toxoplasma gondii* through potential interactions with parasite surface antigen SAG1” *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52, 402– 8.
- Ommaty, R., 2003. *Vademecum-Modern İlaç Rehberi i+ATC Index*.
- Patrick, M.S., Fazenda, M.L., McNeil, B. and Harvey, L.M., 2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 22, 249-270.
- Platt, J., Sodi, S., Kelley, M., Rockwell, S., Bermudes, D., Low, K.B. and Pawelek, J., 2000. Antitumour effects of genetically engineered *Salmonella* in combination with radiation. *Eur J Cancer*, 36, 2397-2402.

- Punj, V., Bhattacharyya, S., Saint-Dic, D., Vasu, C., Cunningham, E., Graves, J., Yamada, T., Constantinou, A.I., Christov, K., White, B., Li, G., Majumdar, D., Chakrabarty, A.M. and Das Gupta, T. K., 2004. "Bacterial cupredoxin azurin as an inducer of apoptosis and regression in human breast cancer.," *Oncogene*, 23, 2367–78.
- Romanos, M.A., Scorer, C.A. and Clare, I.J., 1992. Foreign gene expression in yeast. *Yeast*, 8, 423-488.
- Rosenfeld, S.A., Nadeau, D. and Tirado, J., 1999. Production and purification of recombinant hirudin expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Methods Enzymol*, 306, 154-169.
- Sears, I.B., O'Connor, J., Rossanese, O.W. and Glick, B.S., 1998. A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris*. *Yeast*, 14, 783-790.
- Silva, G.E.F.M., 2013. Discovering and exploiting bacterial proteins as anticancer agents. Universidade de Lisboa. Portugal.
- Smith, J.E., 1985. Aspects of Microbiology 11, Biotechnology Principles. American Society for Microbiology, 24-38.
- Sreekrishna, K., 2013. Gene expression in *pichia* and other methylotroph yeast. In: Flickinger MC, editor. *Upstream Industrial Biotechnology*, 205.
- Soyaslan, E.Ş., 2010. Effect of pH On Erythropoietin Production By Recombinant *Pichia pastoris* in Fed-Batch Operation. Master thesis, Middle East Technical University, The Graduate School Of Natural and Applied Sciences, Ankara.
- Spohner, S.C., Muller, 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.
- Stratton, J., Chiruvolu, V. and Meagher, M., 1998. High cell-density fermentation. *Methods Mol. Biol.*, 103, 107-120.
- Tang, S.P.W., Coleman, J.E. and Myer, Y.P., 1968. Conformational studies of copper proteins *J. BiolChem.*, 243, 4286-4297.
- 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*. *Prep Biochem Biotechnol.*, 48(6), 535-540.
- Ünver, Y., 2014. İnsan Paraoksonaz 1 (pon1) geninin klonlanması, *Pichia pastoris*'te ekspresyonu, rekombinant enzimin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri enstitüsü, Erzurum, Türkiye.
- Wang, Yanchun, Yuan, Shengling, Wang, Peng, Liu, Xiangxin, Zhan, Dewen, Zhang and Zhaoshan. 2007. Expression, purification, and characterization of recombinant human keratinocyte growth factor-2 in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 15, 44-48.
- Van Den Hazel, H.B., Kiellanbrandt, M.C. and Winther, J.R., 1996. Biosynthesis and function of yeast vacuolar proteases: review. *Yeast*, 12, 1-16
- Veenhuis, M., Van Der Klei, I.J., Yurimoto, H. and Sakai, Y., 2006. The significance of peroxisomes in methanol metabolism in methylotrophic yeast. *Biochim Biophys Acta.*, 1763(12), 1453-62.
- Verostek, M.F. and Trimble, R.B., 1995. Mannosyltransferase activity in membranes from various yeast strains. *Glycobiology*, 5, 671- 681.

- Yalçın, A., 2012. Posttranslasyonel Modifikasyon ve Protein Fonksiyonu. J. Fac. Vet. Med., 1: 29-37.
- Yamada, T., Goto, M., Punj, V., Zaborina, O., Kimbara, K., Das Gupta, T.K., and Chakrabarty, A.M. 2002. The Bacterial Redox Protein Azurin Induces Apoptosis in J774 Macrophages through Complex Formation and Stabilization of the Tumor Suppressor Protein p53. *Infection and Immunity*, 70, 7054-7062.
- Yamada, T., Mehta, R.R., Lekmine, F., Christov, K., King, M.L., Majumdar, D., Shilkaitis, A., Green, A., Bratescu, L., Beattie, C.W. and Das Gupta, T.K., 2009. A peptide fragment of azurin induces a p53-mediated cell cycle arrest in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther.*, 8(10), 2947-58.
- Yang, S., Chen, G., Yu, X., Li, M. and Wan, J., 2009. Cloning of a novel ovalbumin gene from quail oviduct and its heterologous expression in *Pichia pastoris*. *Journal of Basic Microbiology*, 1, 73-78.
- Yıldırım, A. and Bardakçı, F., 2010. Moleküler Biyoloji, geliştirilmiş 2. Baskı Rekombinant DNA teknolojisi bölüm 13, Nobel yayın 471-502.
- Yin, J, Li, G, Ren, X. and Herrler, G., 2007. Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *J Biotechnol*, 127(3), 335–47.
- Yue, M.M., Gong, W.W., Qiao, Y. and Ding, H., 2016. A method for efficient expression of *Pseudomonas aeruginosa* alginate lyase in *Pichia pastoris*. *Biochem Biotechnol*, 46(2), 165-70.
- Zaborina, O., Dhiman, N., Chen, M.L., Kostal, J., Holder, I.A. and Chakrabarty, A.M., 2000. “Secreted products of a nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* strain induce two modes of macrophage killing: external-ATP- dependent, P2Z-receptor-mediated necrosis apoptosis,” *Microbiology*, 146, 2521–2530.
- Zhao, T., Li, Z., Guo, Z., Wang, A., Liu, Z., Zhao, Q., Li, Y., McKenzie, E.A. and Diao, A., 2018. Functional recombinant human Legumain protein expression in *Pichia pastoris* to enable screening for Legumain small molecule inhibitors. *Protein Expression and Purification*, 150, 12-16.

## ÖZGEÇMİŞ

1993 yılında Ankara'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Kuşadası'nda, lise öğrenimini Samsun'da tamamladı. Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden 2015 yılında mezun oldu. 2016 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Biyoteknoloji Bilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine hak kazanmıştır.