

**İNSAN PARAOKSONAZ 1 (PON1) GENİNİN  
KLONLANMASI, *Pichia pastoris*'TE EKSPRESYONU,  
REKOMBİNANT ENZİMİN  
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

**Yağmur ÜNVER**

**Doktora Tezi**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Genel Biyoloji Bilim Dalı**

**Prof. Dr. Esabi Başaran KURBANOĞLU**

**Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN**

**2014**

**Her Hakkı Saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

İNSAN PARAOKSONAZ 1 (PON1) GENİNİN KLONLANMASI,  
*Pichia pastoris*'TE EKSPRESYONU, REKOMBİNANT ENZİMİN  
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Yağmur ÜNVER

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
Genel Biyoloji Bilim Dalı

ERZURUM  
2014

Her hakkı saklıdır



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**İNSAN PARAOKSONAZ 1 (PON1) GENİNİN KLONLANMASI, *Pichia pastoris*'TE EKSPRESYONU, REKOMBİNANT ENZİMİN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Prof. Dr. Esabi Başaran KURBANOĞLU danışmanlığında, Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN ortak danışmanlığında Yağmur ÜNVER tarafından hazırlanan bu çalışma 21/11/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı – Genel Biyoloji Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak ~~oybirliği/oy çokluğu (.../...)~~ ile kabul edilmiştir.

Başkan	: Prof. Dr. İsmail ÇELİK	İmza	:
Üye	: Prof. Dr. Esabi Başaran KURBANOĞLU	İmza	:
Üye	: Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN	İmza	:
Üye	: Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR	İmza	:
Üye	: Prof. Dr. Fatime GEYİKOĞLU	İmza	:
Üye	: Doç. Dr. Turgay ŞİŞMAN	İmza	:
Üye	: Doç. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN	İmza	:

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 11/12/2014 tarih ve 49/1631 nolu kararı ile onaylanmıştır.

**Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU**  
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.  
Proje No: 2012/481

**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

Doktora Tezi

### İNSAN PARAOKSONAZ 1 (PON1) GENİNİN KLONLANMASI, *Pichia pastoris*'TE EKSPRESYONU, REKOMBİNANT ENZİMİN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Yağmur ÜNVER

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Genel Biyoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Esabi Başaran KURBANOĞLU  
Ortak Danışman: Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

Bu çalışmada metanolla indüklenen AOX (alkol oksidaz) promotörünün kontrolü altında *Pichia pastoris* ekspresyon sistemi kullanılarak insan paraoksonaz1(PON1) enziminin ekstrasellüler üretimi hedeflenmiş, böylece mikroorganizmanın üreme ortamına salgıladığı protein, hücreyi parçalamaya gerek kalmadan ortamdan saflaştırılabilmektedir. Bu amaçla insan PON1 geni pPICZαA ekspresyon vektörüne klonlanmış, elde edilen rekombinant vektör *P. pastoris* X-33 genomuna entegre edilmiştir. Böylelikle ekstrasellüler PON1 enzimi güçlü AOX promotörünün kontrolü altında eksprese edilmiş, *Saccharomyces cerevisiae* alfa faktör sinyal sekansı aracılığıyla enzimin fermentasyon ortamına salgılanması sağlanmıştır. Katı besiyerinde 48-72 saat geliştirilen rekombinant hücreler, gliserol içeren ön kültür besiyerine inoküle edilmiş, gelişen hücreler santrifüjle ayrıldıktan sonra metanol içeren çalkalamalı erlenmayer üretim besiyerine transfer edilerek 96 saat geliştirilmiştir. PON1 üretimi için karbon kaynağı olarak sorbitol ve AOX promotörünün indükleyicisi olarak her 24 saatte bir metanol ilave edilmiştir. SDS-PAGE ve western blot analizi, rekombinant *P. pastoris* tarafından üretilen ekstrasellüler PON1 enziminin molekül kütlesinin 59,1 kDa olduğunu göstermiş, Probond™ afinite kolonu ile saflaştırıldıktan sonra enzimin biyokimyasal karakterizasyonu yapılmıştır. Bu çalışmada PON1 enzimi, ilk kez *P. pastoris* ekspresyon sisteminde eksprese edilmiştir.

**2014, 128 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** *Pichia pastoris* X-33, PON1, rekombinant protein, saflaştırma, karakterizasyon

## ABSTRACT

Ph. D. Thesis

### **HUMAN PARAOXONASE 1 (PON1) GENE CLONING, EXPRESSION IN *Pichia pastoris*, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT ENZYME**

Yağmur ÜNVER

Atatürk University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Discipline of General Biology

Supervisor: Prof. Dr. Esabi Başaran KURBANOĞLU

Co-Supervisor: Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

In this study, extracellular production of human paraoxonase 1 (PON1) enzyme under the control of AOX (alcohol oxidase) promoter inducing with methanol by using *Pichia pastoris* expression system was aimed. So, protein which is secreted to fermentation medium by microorganism was purified without the need to cell lysis. For this purpose, human PON1 gene was cloned into an expression vector pPICZ $\alpha$ A and the recombinant vector was integrated to *P. pastoris* X-33 genome. In this way, extracellular PON1 enzyme was expressed under the control of the strong AOX promoter and the secretion of the enzyme in the fermentation medium was achieved by means of *Saccharomyces cerevisiae* alpha factor signal sequence. The recombinant cells grown for 48-72 hours in solid medium were inoculated in glycerol containing precultivation medium. After being separated by centrifugation, cells were grown for 96 hours by transferring into the methanol containing shake flask production medium. In order to produce PON1, sorbitol as a carbon source and methanol as an inducer of AOX promoter were added to the medium in every 24 hours. SDS-PAGE and western blot analyses illustrated that the molecular mass of extracellular PON1 enzyme produced by the recombinant *P. pastoris* strain was 59.1 kDa and after the enzyme purification with Probond™ affinity column, biochemical characterization was done. This was the first time PON1 is expressed in *P. pastoris* expression system.

**2014, 128 pages**

**Keywords:** *Pichia pastoris* X-33, PON1, recombinant protein, purification, characterization

## TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu alışma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakóltesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü ve Biyoloji Bölümü'nde yapılmıştır.

Çalışmalarım süresince görüş ve bilgi birikimlerinden yararlandığım değerli hocalarım, Sayın Prof. Dr. Esabi Başaran KURBANOĞLU'na, Sayın Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN'a ve Sayın Prof. Dr. şükrü BEYDEMİR'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen, görüş ve tecrübelerinden faydalandığım değerli hocam, Sayın Doç. Dr. Mesut TAşKIN'a ve sürekli yanımda olan, her konuda yardımlarını gördüğüm ve manevi desteklerini hissettiğim çok kıymetli dostlarım, Sayın Arş. Gör. Melike YILDIZ'a ve Sayın Arş. Gör. Deryanur KILIÇ'a en derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

Ayrıca Sayın Yrd. Doç. Dr. Harun BUDAK'a, Sayın Arş. Gör. Zuhâl ALİM'a, Sayın Yeliz DEMİR'e, Sayın Nurdan GÖNÜL'e, Sayın Arş. Gör. Hamid CEYLAN'a, Sayın Arş. Gör. M. Özkan BALTACI'ya ve Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Araştırma Laboratuvarlarında alışan arkadaşlarıma her türlü yardım ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca maddi, manevi desteklerini, ilgilerini ve sabırlarını esirgemeyen çok kıymetli anneme, babama, abime ve kardeşlerime teşekkür ederim.

Ayrıca doktora eğitimim boyunca beni destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu-Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na (TÜBİTAK-BİDEB) ve bu çalışmayı 2012/481 no'lu proje ile destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi'ne teşekkür ederim.

**Yağmur ÜNVER**

**Ekim, 2014**

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1. Paraoksonaz 1 (PON1) Enzimi.....	1
1.2. Konak Mikroorganizma Seçimi.....	4
1.2.1. <i>Pichia pastoris</i> .....	5
1.2.2. <i>Pichia pastoris</i> ekspresyon sistemi.....	6
1.2.3. <i>Pichia pastoris</i> 'in metanol kullanım metabolizması.....	9
1.2.4. Post-translasyonel modifikasyonlar ve proteinlerin salgılanması.....	11
1.2.4.a. Protein katlanması ve disülfid bağ oluşumu.....	12
1.2.4.b. Glikozilasyon.....	12
1.2.5. Salgılama sinyalleri.....	13
1.3. Proteolitik Parçalanma.....	14
1.4. pPICZ $\alpha$ A Ekspresyon Vektörü.....	15
1.5. Gen Mühendisliği Teknikleri.....	15
1.5.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile klonlama.....	17
1.5.1.a. PCR'in temel basamakları.....	18
1.5.1.b. Primer dizaynının temelleri.....	20
1.5.2. Restriksiyon kesim enzimleri.....	21
1.5.3. Ligasyon reaksiyonu.....	21
1.5.4. Transformasyon.....	22
1.6. Rekombinant Protein Üretiminde Biyoproses Parametreleri.....	22
1.6.1. Mikroorganizma seçimi.....	22
1.6.2. <i>P. pastoris</i> 'te rekombinant protein üretimi ve biyomas üzerine biyoproses parametrelerinin etkisi.....	23

1.6.2.a. Sıcaklık .....	23
1.6.2.b. pH .....	24
1.6.2.c. Oksijen .....	25
1.6.2.d. Besiyeri dizaynı .....	25
1.7. Proteinlerin Sodyum Dodesil Sülfat Poli Akrilamid Jel Elektroforezi .....	26
1.8. Western Blotlama .....	27
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ .....</b>	<b>29</b>
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM .....</b>	<b>43</b>
3.1. Materyal .....	43
3.1.1. Kimyasallar .....	43
3.1.2. Kullanılan mikroorganizmalar .....	43
3.1.3. İnsan karaciğer cDNA kütüphanesi .....	43
3.1.4. Gene spesifik primerler .....	43
3.1.5. pPICZ $\alpha$ A vektörü .....	44
3.1.6. Kesim enzimleri (Restriksiyon Endonükleazlar) .....	46
3.1.7. Vektöre ait primerler .....	47
3.1.8. Kullanılan besiyerler .....	47
3.1.9. Tampon ve stok solüsyonlar .....	47
3.2. Yöntem .....	48
3.2.1. PON1 genine ait sekansın çoğaltılması .....	48
3.2.2. Rekombinant vektörün elde edilmesi .....	49
3.2.2.a. PCR ürününün agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi .....	49
3.2.2.b. PCR ürününün jelden ekstraksiyonu .....	49
3.2.2.c. PCR ürününün restriksiyon enzimleri ile kesimi .....	50
3.2.2.d. Kesilen ürünün fenol/kloroform ekstraksiyonu .....	50
3.2.2.e. Vektör DNA'nın kesimi .....	51
3.2.2.f. Vektör DNA'nın jelden ekstraksiyonu .....	51
3.2.3. Ligasyon reaksiyonu .....	51
3.2.4. Rekombinant vektörün kompetent <i>E. coli</i> TOP10 hücrelerine transformasyonu .....	52
3.2.5. PON1 genine ve vektör DNA'ya ait primerler kullanılarak ilgili sekansların koloni PCR ile amplifikasyonu .....	53



3.2.6. Muhtemel rekombinant kolonilerden plazmit DNA izolasyonu .....	54
3.2.6.a. Kolonilerden izole edilen muhtemel rekombinant plazmitlerin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi .....	55
3.2.6.b. Vektöre ait primerler kullanılarak izole edilen plazmit sekansının PCR ile amplifikasyonu .....	55
3.2.6.c. Muhtemel rekombinant plazmitin <i>EcoRI</i> ve <i>XbaI</i> ile kesilmesi.....	56
3.3. Gliserolde stoklama.....	57
3.4. <i>E. coli</i> hücrelerinden saflaştırılan rekombinant vektörün sekans analizi .....	57
3.5. <i>E. coli</i> hücrelerinden saflaştırılan rekombinant vektörün lineer hale getirilmesi.....	57
3.5.1. Kesilen rekombinant vektörün fenol/kloroform ile ekstraksiyonu.....	58
3.5.2. Lineer rekombinant vektörün <i>P. pastoris</i> 'e transformasyonu ve seleksiyonu .	58
3.5.2.a. Kompetent <i>P. pastoris</i> hücrelerinin hazırlanması .....	58
3.5.2.b. Transformasyon.....	59
3.6. Doğru transformant seçimi için koloni PCR ile kontrol analizi.....	61
3.7. Rekombinant <i>P. pastoris</i> 'in gliserolde stoklanması.....	62
3.8. Rekombinant PON1 enziminin üretimi .....	62
3.8.1. Rekombinant protein analizi .....	62
3.8.2. Western blot tekniğinin uygulanması.....	63
3.8.2.a. Protein örneklerini TCA (Trikloroasetik asit) ile çöktürme .....	63
3.8.2.b. SDS jelinin hazırlanması ve yüklenmesi .....	63
3.8.2.c. Blotlama.....	64
3.8.3. Kültür sıvısında enzim aktivite tayini .....	64
3.8.4.a. Probond™ kolonun hazırlanması .....	66
3.8.4.b. Fermentasyon sıvısının kolona yüklenmesi .....	66
3.8.4.c. Diyaliz .....	67
3.8.5. Bradford metodu ile protein miktarının belirlenmesi.....	67
3.9. Saflaştırılan Rekombinant PON1 Enzimiyle İlgili Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları .....	67
3.9.1. SDS-PAGE analizi ile enzimin molekül kütlesinin tayini .....	67
3.9.2. Saflaştırılan rekombinant PON1 enzim aktivitesi için optimum pH'nın bulunmasına yönelik çalışmalar.....	68

3.9.3. Safılaştırılan rekombinant PON1 enzim aktivitesi için optimum tampon konsantrasyonunun bulunmasına yönelik çalışmalar.....	68
3.9.4. Safılaştırılan rekombinant PON1 enzim aktivitesi için optimum sıcaklığın bulunmasına yönelik çalışmalar.....	69
3.9.5. Safılaştırılan rekombinant PON1 enzim aktivitesi için $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar .....	69
<b>4. ARAşTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>70</b>
4.1. PON1 Genine Ait Sekansın Çoğaltılması .....	70
4.2. Rekombinant Vektörün Elde Edilmesi.....	70
4.3. Rekombinant Vektörün Kompetent <i>E. Coli</i> TOP10 Hücrelerine Transformasyonu.....	71
4.4. Doğru Transformant Seçimi İçin Transformantlardan Kontrol Analizi.....	72
4.4.1. PON1 genine ve vektöre ait primerler kullanılarak sekansın koloni PCR ile amplifikasyonu.....	72
4.4.2. Muhtemel rekombinant kolonilerden plazmit saflaştırma.....	74
4.4.3. Vektöre ait primerler kullanılarak saflaştırılan plazmit sekansının PCR ile amplifikasyonu.....	75
4.4.4. Muhtemel rekombinant plazmitin <i>EcoRI</i> ve <i>XbaI</i> enzimleri ile kesimi.....	75
4.5. <i>E. coli</i> Hücrelerinden Safılaştırılan Rekombinant Vektörün Sekans Analizi.....	76
4.6. <i>E. coli</i> Hücrelerinden İzole Edilen Rekombinant Vektörün Lineer Hale Getirilmesi .....	76
4.6.1. Lineer rekombinant vektörün <i>P. pastoris</i> 'e transformasyonu ve seleksiyonu .	77
4.6.2. Doğru transformant seçimi için koloni PCR ile kontrol analizi .....	78
4.6.3. Rekombinant PON1 enziminin üretimi .....	78
4.6.3.a. Aktivite ölçümü .....	79
4.6.3.b. SDS-PAGE analizi .....	79
4.6.3.c. Western blotlama .....	81
4.7. Safılaştırılan Rekombinant PON1 Enzimi ile Yapılan Karakterizasyon Çalışmalarının Sonucu .....	81
4.7.1. Saflaştırma ile elde edilen elüsyonun SDS-PAGE analiz sonucu.....	81
4.7.2. Safılaştırılan rekombinant enzimin aktivite tayini .....	82
4.7.3. Saflaştırma ile elde edilen elüsyonun protein miktarının belirlenmesi .....	82

4.7.4. Safılaştırılan rekombinant PON1 enzimi için optimum pH'nın bulunmasına yönelik sonuçlar .....	82
4.7.5. Safılaştırılan rekombinant PON1 enzim aktivitesi için optimum tampon konsantrasyonunun bulunmasına yönelik sonuçlar .....	83
4.7.6. Safılaştırılan rekombinant PON1 enzim aktivitesi için optimum sıcaklığın bulunmasına yönelik sonuçlar.....	84
4.7.7. Paraokson substratı için $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerinin belirlenmesine yönelik sonuçlar .....	85
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>	<b>87</b>
KAYNAKLAR .....	105
EKLER.....	117
EK 1.....	117
EK 2.....	118
EK 3.....	122
EK 4.....	126
EK 5.....	127
EK 6.....	128
ÖZGEÇMİŞ .....	129

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

A	Adenin
A°	Angström
Asn	Asparagin
C	Sitozin
Cys	Sistein
°C	Santigrat Derece
dk	Dakika
G	Guanin
g	Gram
g/l	Gram/Litre
His	Histidin
kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
M	Molar
mg	Miligram
mg/l	Miligram/Litre
ml	Mililitre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
nm	Nanometre
T	Timin
%	Yüzde
µg/l	Mikrogram/Litre
µg/ml	Mikrogram/Mililitre
sa	Saat
sn	Saniye
V	Volt

## Kısaltmalar

AMP	Adenozin Mono Fosfat
AOX	Alkol oksidaz
bç	Baz çifti
BMGY	Tamponlanmış karmaşık gliserol besiyeri (buffered glycerol complex medium)
BMMY	Tamponlanmış karmaşık metanol besiyeri (buffered methanol complex medium)
cDNA	Komplementer DNA
CIAP	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase
DNA	Deoksiribonükleik asit
HDL	Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein (High Density Lipoprotein)
LSLB	Düşük Tuzlu Luria Bertani (Low Salt Luria Bertani)
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein (Low Density Lipoprotein)
LiCl	Lityum Klorid
NaCl	Sodyum Klorür
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
PEG	Polietilen glikol
PON	Paraoksonaz
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poli Akrilamid Jel Elektroforezi
TE	Tris EDTA
TAE	Tris Asetik asit EDTA
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
dH <sub>2</sub> O	Distile su
TCA	Trikloro Asetik asit
Mbç	Mega baz çifti
UV	Ultraviyole
YPD	Maya ekstraktı pepton dekstroz (Yeast Extract Peptone Dextrose)

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. PON1 proteininin üç boyutlu yapısı .....	3
Şekil 1.2. <i>P. pastoris</i> 'te metanolün metabolik yolu.....	10
Şekil 1.3. Çift zincirli DNA'nın denatürasyonu .....	18
Şekil 1.4. Dizayn edilen primerlerin denatüre edilmiş DNA zincirlerine bağlanması ...	19
Şekil 1.5. Yeni komplementer DNA zincirlerinin uzaması .....	19
Şekil 3.1. pPICZ $\alpha$ A,B,C vektörü .....	44
Şekil 3.2. pPICZ $\alpha$ A plazmitine ait çoklu klonlama bölgesinin nükleotid sekansı .....	46
Şekil 3.3. Transformasyon sonrası <i>Pichia</i> genomunda gerçekleşen basit crossing-over olayı .....	60
Şekil 3.4. pPICZ $\alpha$ A::PON1'in <i>P. pastoris</i> genomuna entegrasyonunun şematik gösterimi .....	60
Şekil 3.5. Paraoksonun paraoksonaz tarafından hidrolizi.....	65
Şekil 4.1. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü .....	70
Şekil 4.2. Vektör DNA'nın agaroz jel elektroforez görüntüsü .....	71
Şekil 4.3. İnkübasyon sonrası gelişen transforme edilmiş <i>E. coli</i> TOP10 kolonileri ....	72
Şekil 4.4. Koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	73
Şekil 4.5. Koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	74
Şekil 4.6. Muhtemel rekombinant plazmitlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü .....	74
Şekil 4.7. Muhtemel rekombinant plazmit primerleri ile PCR sonucu agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	75
Şekil 4.8. Restriksiyon kesimi sonucu yürütülen muhtemel rekombinant plazmitin agaroz jel elektroforezi görüntüsü .....	76
Şekil 4.9. <i>PmeI</i> enzimi ile kesilmiş rekombinant vektörün agaroz jel elektroforez görüntüsü .....	77
Şekil 4.10. İnkübasyon sonrası gelişen <i>P. pastoris</i> kolonileri.....	77
Şekil 4.11. Koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	78
Şekil 4.12. İnkübasyon sürelerine göre rekombinant PON1 enziminin aktivitesi ve hücre biyoması .....	79

<b>Şekil 4.13.</b> En iyi üretimi gerçekleştirecek koloni seçimi için yapılan 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrası SDS-PAGE sonucu .....	80
<b>Şekil 4.14.</b> <i>P. pastoris</i> 'e ait ekstrasellüler rekombinant proteinin SDS-PAGE analizi .....	80
<b>Şekil 4.15.</b> <i>P.pastoris</i> 'e ait ekstrasellüler rekombinant proteinin western blot analizi .....	81
<b>Şekil 4.16.</b> Saflaştırma sonucu farklı miktardaki örneklerle SDS-PAGE analizi.....	82
<b>Şekil 4.17.</b> 50 mM potasyum fosfat, tris/HCl ve glisin/NaOH tamponları kullanılarak rekombinant PON1 enzimi için yapılan optimum pH ç alışma sonucuna yönelik pH-Aktivite grafiği .....	83
<b>Şekil 4.18.</b> Rekombinant PON1 enzimi için yapılan glisin/NaOH tamponu optimum konsantrasyon çalışma sonucuna yönelik iyonik şiddet-aktivite grafiği .....	84
<b>Şekil 4.19.</b> Rekombinant PON1 enzimi için 100 mM glisin/NaOH tamponu kullanılarak yapılan optimum sıcaklık çalışma sonucuna yönelik sıcaklık-aktivite grafiği .....	85
<b>Şekil 4.20.</b> Paraokson substratı için $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerinin belirlenmesine yönelik grafik .....	86
<b>Şekil 5.1.</b> Ekstrasellüler PON1 enzimini üreten rekombinant <i>P. pastoris</i> hücrelerinin gelişimi için araştırma planı .....	94

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. <i>P. pastoris</i> 'in rekombinant protein üretiminde kullanımının avantaj ve dezavantajları.....	6
Çizelge 1.2. Çeşitli konak hücrelerin gen ekspresyon yetenekleri .....	11
Çizelge 3.1. PON1 genini çoğaltmak için dizayn edilen primerler .....	44
Çizelge 3.2. Kesim enzimlerinin tanıma sekansları ve kesim noktaları .....	47
Çizelge 3.3. cDNA'nın PCR ile amplifikasyonu .....	48
Çizelge 3.4. PCR şartları.....	48
Çizelge 3.5. PCR ürünü kesim reaksiyonu karışım içeriği .....	50
Çizelge 3.6. Vektör DNA'nın kesim reaksiyonu karışım içeriği.....	51
Çizelge 3.7. Vektör DNA ve vektöre yerleştirilecek genin ligasyon reaksiyonu karışım içeriği.....	52
Çizelge 3.8. Koloni PCR için reaksiyon karışım içeriği.....	53
Çizelge 3.9. PCR reaksiyon şartları .....	53
Çizelge 3.10. Muhtemel rekombinant plazmit ile yapılan PCR reaksiyonu karışım içeriği.....	55
Çizelge 3.11. PCR reaksiyon şartları .....	56
Çizelge 3.12. Muhtemel rekombinant plazmit kesim reaksiyonu karışım içeriği .....	56
Çizelge 3.13. Rekombinant plazmit kesim reaksiyonu karışım içeriği .....	58
Çizelge 3.14. Koloni PCR reaksiyon karışım içeriği.....	61
Çizelge 3.15. PCR reaksiyon şartları .....	61
Çizelge 3.16. Enzim aktivite ölçümünde kullanılan çözelti miktarları.....	65



## 1. GİRİŞ

### 1.1. Paraoksonaz 1 (PON1) Enzimi

Paraoksonaz (PON, EC.3.1.8.1), insan serumunda HDL (yüksek yoğunluklu lipoprotein)'ye bağlı olarak bulunan, organofosfat ajanları ve sinir gazlarını hidroliz eden, LDL (düşük yoğunluklu lipoprotein)'nin oksidasyonu ile lipid peroksitlerin oluşumuna ve bakteri endotoksinlerine karşı koruyucu etkisi olan önemli bir karaciğer enzimidir (Durrington *et al.* 2001). İlk olarak 1946 yılında Abraham Mazur tarafından keşfedilen enzim, sonraki yıllarda insan serum paraoksonazı (PON1) olarak tanımlanmış olup (Aldridge 1953a,b) son derece zehirli organofosfat tarım ilacı parationun toksik metaboliti olan paraoksonu (organofosfat substratı), paranitrofenol ve dietilfosfata hidroliz edebilme özelliğinden dolayı bu ismi almıştır (Van Himbergen *et al.* 2006).

Paraoksonaz gen ailesi, insanlarda 7. kromozomun uzun kolunda, birbiriyle bağlantılı PON1, PON2 ve PON3 şeklinde üç üyeden oluşmaktadır. Bu üç proteinin amino asit dizileri arasında %65 oranında homoloji bulunmaktadır ve dokulardaki ekspresyonları ile dağılımları birbirinden farklılık göstermektedir. PON1 ve PON3'ün karaciğer ve plazmada, PON2'nin karaciğer, böbrek, kalp, testis ve beyin dokularında ve özellikle endotel tabakasında bulunduğu ayrıca atardamar düz kas hücrelerinde yer aldığı immünohistokimyasal yöntemlerle gösterilmiştir (Liang 2003). PON1, fizyolojik substratlarının ortaya çıkarılması ve aterosklerozis ile ilişkisinin ortaya konulması nedeniyle PON2 ve PON3'e göre nispeten daha iyi aydınlatılan genidir ve ortaya çıkarıldığı günden beri çalışılmaktadır.

İnsanda karaciğerde sentezlenip kana salınan PON1, glikozilasyon derecesine bağlı olarak yaklaşık 45 kDa moleküler kütleyle sahip 354 amino asitten oluşan, kalsiyum bağımlı bir glikoprotein olup serumda genellikle HDL üzerinde lokalizedir (Lenz 2010). Her molekül, total ağırlığın %15,8'ini içeren üç karbonhidrat zinciri

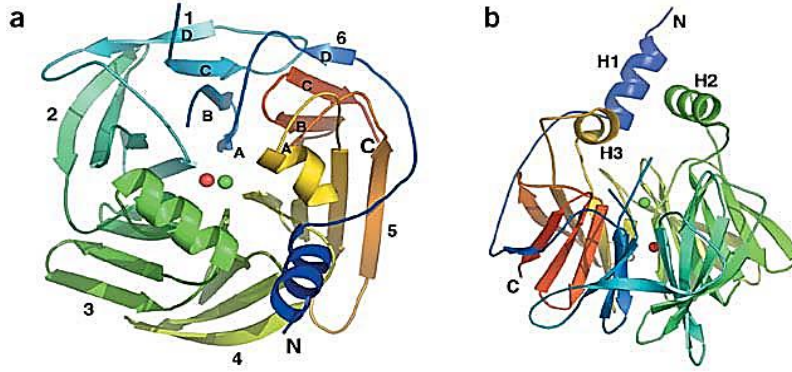
içermektedir. Yapısında bulunan üç sistein amino asidinden 284. pozisyondaki serbest iken, diğer ikisi (Cys42-353) arasında disülfid bağı bulunur. Serbest sistein, substrat tanınması ve bağlanması için gereklidir. Rekombinant PON1 (rPON1) ile yapılan çalışmalarda, 42. ve 353. pozisyonda bulunan disülfid bağının rPON1'in sekresyon ve aktivitesi için çok önemli olduğunu göstermişlerdir (Josse 1999).

PON1'in ince yapısı 4 adet zincirden oluşmuş 6 adet  $\beta$ -kırmalı tabaka yapısından meydana gelmiştir (Şekil 1.1). Enzim 42. ve 353. sistein rezidüleri arasındaki disülfid köprüsü ile sonlanarak üç boyutlu yapısını kazanır (Jawad and Paoli 2002). Yapısında 3 tane  $\alpha$ -heliks (H1, H2 ve H3) vardır. H2 ve H3 aktif bölgede bulunmaktadır ve aktif bölgenin yapısının belirlenmesi, çözücülerden ayrılması ve enzimin HDL'ye bağlanması gibi kritik rollere sahiptir. PON1 enzimi üzerinde 4 tane potansiyel N-glikozillenme bölgesi vardır. İki tanesi (Asn227 ve Asn270)  $\beta$  tabakaların merkezinde, diğer ikisi yüzeye bakan bölgede (Asn253 ve Asn324) yer almaktadır. Enzim, memeli hücrelerinde sentezlendikten sonra bu noktalardan glikozillenir (Harel *et al.* 2004).

Üç boyutlu yapıda;  $\beta$ -kırmalı tabakaların merkezinde  $7,4 \text{ \AA}$  aralıklı iki adet  $\text{Ca}^{+2}$  bulunmaktadır. Bunlardan biri yapısal kalsiyum olup yapıdan uzaklaştırılması dönüşümsüz denatürasyona neden olmaktadır (Kuo and La Du 1998). Diğeri ise katalitik etkinlikte görev alan kalsiyumdur. Enzim, sentezlendiğinde monomerik yapı şeklindedir. Eğer HDL'ye bağlanmazsa oligomerizasyon yapabilir. (Josse 2002). Enzimin aktif bölgesinde yer alan kalsiyum iyonu, fosfat iyonu ve His115-His134 çifti esteraz aktivitesinde önemli rollere sahiptir. Yapıdaki Cys284, paraoksonazların hepsinde korunmuştur ve bu sisteinin PON1'in aterosklerozla ilişkili fonksiyonlarında rolü olduğu önerilmektedir. PON1'in organofosfat substratlarına karşı hidrolitik aktivitesi kalsiyuma bağımlı iken, lipid peroksitlerin birikimini önlemede kalsiyumun gerekli olmadığı bildirilmektedir (Harel *et al.* 2004).

PON1 karaciğerde sentezlendikten sonra hücrenin dış membranına bağlanmakta, hücre membranı ile HDL'nin kısa süreli etkileşimi sırasında HDL'ye transfer olmaktadır. İnsan PON1 geni transfekte edilen hücrelerle HDL'nin inkübasyonu sonucu hücreye

bağlı enzim aktivitesinde önemli derecede azalma görülürken kültür ortamındaki enzim aktivitesinde artış olduğu görülmüştür (Deakin *et al.* 2002).



**Şekil 1.1.** PON1 proteininin üç boyutlu yapısı

a) 6'lı β pervane yapısının üstten görünümü. N, C terminali ve merkezde iki Ca<sup>2+</sup> iyonu (Ca1, yeşil; Ca2, kırmızı) b) 6'lı β pervane yapısının yandan görünümü (Harel *et al.* 2004)

PON1'in bilinen en iyi koruyucu etkisi, organofosfat sinir ajanlarını, aromatik karboksilik asit esterlerini ve insektisitleri hidroliz etmesidir. Toksik organik molekülleri hidroliz etmesi, paraoksonazın tanımlanan ilk fizyolojik fonksiyonudur. Önceleri organofosfat bileşiklerini hidroliz etme özelliği nedeniyle toksikoloji alanında üzerinde çalışılan PON1, son yıllarda antioksidan etkileri nedeniyle önem kazanmıştır (Mackness *et al.* 1996).

PON1'in diğer önemli etkisi, antiaterojenik aktiviteye sahip olmasıdır. Plazmada HDL ile birlikte bulunan serum PON1'in, toksik bazı bileşiklerin metabolizmasında görev almasının yanısıra plazma lipoproteinlerinin oksidasyonunu önlemede etkili olduğu düşünülmektedir. Bu enzimin plazmada her zaman HDL ile birlikte bulunması HDL'nin antiaterojenik etkilerine önemli katkıda bulunur. Peroksidasyona uğramış olan lipidler bu enzim tarafından metabolize edildiğinden, lipid peroksidatların hem HDL'de hem de LDL'de birikimi önlenir. Bu özelliği nedeniyle, HDL'nin LDL'yi oksidasyona karşı koruyucu etkisinden PON1 sorumludur ve bu açıdan A ve E vitaminlerinden daha etkilidir (Rousselot *et al.* 1999; Lourdes *et al.* 2001). Bahsedilen bu özelliklerinden dolayı detoksifikasyonda büyük öneme sahip bu enzimin, kardiyovasküler hastalıklar,

diyabet, sepsis, alzheimer ve parkinson gibi pek çok hastalığın gelişmesine karşı koruyucu etki gösterebileceği düşünülmektedir (Bayrak 2009).

## 1.2. Konak Mikroorganizma Seçimi

Endüstriyel biyoproseslerin gelişmesinde uygun konak mikroorganizma seçimi önemlidir. Konak mikroorganizma seçerken güvenilir olarak tanımlanmış olması (GRAS; generally recognized as safe, genel olarak güvenli kabul edilen), kolay elde edilebilir olması, yüksek üretim kapasitesine sahip olması, az miktarda yan ürün üretmesi, ucuz besiyerinde ve ılımlı ortam koşullarında gelişebilmesi gibi özellikler aranmaktadır (Kirk and Othmer 1994; Soetart and Vandamme 2010). Çoğunlukla yüksek büyüme oranı ve yüksek üretim kapasitesi dolayısıyla mikroorganizmalar, bitki ve hayvan hücrelerinden daha fazla tercih edilmektedir.

Uygun mikroorganizma seçimi ile ilgili olarak, karbon kaynağı olarak metanolü tek başına kullanabilen metilotrofik maya, ilk defa Ogata *et al.* (1969) tarafından bildirilmiştir.

Taksonomik çalışmaları takiben *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* ve *Torulopsis* cinslerinin keşfedilmesinden sonra *Pichia pastoris*, hayvan yemi için potansiyel tek hücre proteini olarak gösterilmiştir (Lee and Komagata 1980). *P. pastoris* üretimi için besiyeri içeriği ve protokoller, ilk olarak 1970'lerde Phillips Petrol Şirketi tarafından bildirilmiştir. (Cereghino and Cregg 2000). Bu yanlış hipotez, araştırmacılara *P. pastoris*'in üreme ve kültür şartlarını geliştirme imkânı sağlamıştır. 1980'lerden sonra Phillips Petrol Şirketi ve Salk Biyoteknoloji Enstitüsü/Endüstriyel Birlik AŞ (SIBIA, La Jolla, CA) heterolog protein üretimi için *P. pastoris*'i ekspresyon sistemi olarak kullanmaya başlamış, bu denemeleri takiben SIBIA tarafından vektörler, suşlar ve protokoller geliştirilmiştir. Halen bu maya, rekombinant protein üretimi için genetik olarak tasarlanmaktadır.

### 1.2.1. *Pichia pastoris*

*Pichia pastoris*, 1-5 µm çapında, 5-30 µm uzunluğunda, oval şekilli, tek hücreli, karbon ve enerji kaynağı olarak metanolü kullanabilen, çeşitli rekombinant proteinlerin ekspresyonu için genetik olarak tasarlanabilen ve sıklıkla kullanılan metilotrofik bir maya türüdür (Higgins and Cregg 1998; Cregg 1999). %30-60 polisakkarit (beta-glukan ve mannan şeker polimerleri), %15-30 protein, %5-20 lipit ve az miktarda kitin içeren tipik ökaryotik hücre duvarına sahip olan bu mikroorganizma, 3-7 pH'da (Cereghino and Cregg 2000) ve 25-35°C sıcaklıkta yaşayabilir (Macauley-Patrick *et al.* 2005). Bu genel özelliklerine ek olarak gelişim sürecinde fermentasyondan ziyade oksijenli solunumu tercih etmesi, *P. pastoris*'i *S. cerevisiae* gibi fermentatif organizmalardan ayırır. Bu tip organizmaların güçlü fermentasyonu sonucu etanol ve asetik asit gibi fermentasyon yan ürünleri hızlı bir şekilde toksik seviyeye ulaşırken *P. pastoris* fermentatif olmadığından böyle bir durumla karşılaşmaz (Cereghino *et al.* 2002). Ayrıca bu maya, ucuz besiyerlerinde yüksek büyüme oranı gösterebilmektedir (Çelik and Çalık 2012; Krainer *et al.* 2012).

Metilotrofik maya olan *P. pastoris*'in, rekombinant proteini fermentasyon ortamına salgılama yeteneği ve potansiyel ekspresyon sistemine sahip olması dolayısıyla 1980 yılından beri yaklaşık 600'ün üzerinde protein bu mikroorganizma tarafından intrasellüler veya ekstrasellüler olarak üretilmektedir (Cereghino *et al.* 2002). Bu maya, endojenik proteinlerini çok düşük seviyede salgıladığından eksprese edilen rekombinant proteinler, besiyerindeki total proteinin büyük çoğunluğunu oluşturur. Bu durum ise kültür ortamındaki rekombinant proteinin saflaştırılmasına öncülük eden önemli bir basamaktır. Dolayısıyla bu mikroorganizmanın genetik olarak kolay bir şekilde manipüle edilebilir olması ve bazı ökaryotik post-translasyonel mekanizmalara sahip olması, onu ekspresyon konukçusu olarak popüler yapmaktadır (Cereghino and Cregg 2000). Bu bağlamda hem ökaryotik hem de tek hücreli mikroorganizma olmaları, heterolog protein üretimi için konak mikroorganizma olarak *P. pastoris* suşlarını önemli kılabilir (Cereghino and Cregg 1999; Macauley-Partrick *et al.* 2005). Çizelge 1.1'de bu sistemin avantaj ve dezavantajları özetlenmiştir.

**Çizelge 1.1.** *P. pastoris*'in rekombinant protein üretiminde kullanımının avantaj ve dezavantajları (Shuler and Kargi 2002).

Avantajları	Dezavantajları
*Yüksek verim sağlar.	*Proteolizis, doğal olmayan glikozilasyon ve hiperglikozilasyon potansiyeline sahiptir.
*Yüksek üretim kapasitesine sahiptir.	*Hücre kültürasyonu, bakteri kültürasyonuna göre uzun sürer.
*Kimyasal olarak tanımlanmış ucuz besiyerinde üretimi kolaydır.	*AOX1 promotörünü indüklemek için işlem boyunca metanolü izlemek zordur.
*Memeli hücrelerinde olduğu gibi ürün işleme gerçekleştirilebilir.	*Metanol, petrokimyasal bir madde olduğundan gıda endüstrisinde kullanımı uygun değildir. Ayrıca yanıcı olduğundan endüstriyel ölçekte stoklanması istenen bir durum değildir.
*Stabil üretim suşları bulunur.	
*Dayanıklısıdır (geniş ölçekli sürekli fermentörlerin olumsuz şartlarına dayanabilir. Bu özelliği, mayanın fermentasyon süreçlerinde beklenmedik parçalanmalara karşı canlı kalabilmesini sağlar).	
*Düşük maliyetli saflaştırma yapılabilir.	
*Yüksek seviyede intrasellüler ve ekstrasellüler ekspresyon sağlar.	
*Ökaryotik post-translasyonel modifikasyon yapar.	
*Endotoksin üretmez.	
*Patojen değildir.	
*Geniş pH aralığında yaşayabilir (pH 3-7).	
*Metanolü kullanabilir.	
*Ekspresyon kasetinin kopya sayısını artırarak eksprese edilen protein miktarını artırma yeteneğine sahiptir.	

### 1.2.2. *Pichia pastoris* ekspresyon sistemi

2002 yılından beri *P. pastoris* ekspresyon sistemi, çeşitli heterolog proteinlerin üretiminde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Bu sistemde herhangi bir yabancı genin ekspresyonu; genin bir ekspresyon vektörüne entegre edilmesi, ekspresyon vektörünün konak hücreye gönderilmesi ve yabancı geni eksprese eden suşların test edilmesi olmak üzere üç temel basamaktan oluşur (Macauley-Patrick *et al.* 2005).

*P. pastoris*, eksprese edilen yabancı proteinleri intrasellüler ve ekstrasellüler olarak üretebilme yeteneğindedir. Yabancı proteinin ekstrasellüler üretimi, parçalanmış hücre peletini ve hücre içeriğini uzaklaştırma gibi saflaştırmanın ilk basamağını bertaraf ettiği için çoğunlukla tercih edilen durumdur. Ayrıca *Pichia* yerel proteinlerini düşük seviyede salgıladığından tüm hücrelerin fermentasyon sıvısından filtrasyon veya santrifügasyonla ayrılması ile salgılanan yabancı proteinin elde edilmesi kolaylaşır. Hatta yabancı proteinin hücre dışına atılmasına yol açacak salgılama sinyali proteine ilave edilebilir. Yabancı genler, *S. cerevisiae*  $\alpha$ -faktör prepro-peptid veya *P. pastoris* asit fosfataz (PHO1) sinyali ile birlikte okuma bölgesine yerleştirilerek *P. pastoris* vektörlerine klonlanabilir (Cereghino and Cregg 2000). Ayrıca klonlanan genin ekspresyonu sonrasında inklüzyon cisimciklerinde disülfid bağlı proteinlerin yeniden katlanmasının gerekliliği sonucu sitoplazma miktarının azalması veya proteinlerin periplazmik boşluğa salgılanması nedeniyle prokaryotik sistemler bu işte genellikle başarısız olmaktadır. Dolayısıyla *P. pastoris* ekspresyon sistemi, disülfid bağlı proteinleri fazlaca üretmek için başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (White *et al.* 1995; Macauley-Patrick *et al.* 2005).

Hücreler, metanol içeren ortamda geliştirildiğinde *P. pastoris*'te heterolog protein üretiminin büyük çoğunluğu, sadece mevcut metanol metabolizması için gerekli olan enzimlere bağlıdır (Egli *et al.* 1980). Bu ise bir mikroorganizma için ifade edilen en başarılı sistemdir (Cereghino *et al.* 2001) ve bu yüzden AOX promotörleri yaygın bir şekilde kullanılırken *Pichia*'da yabancı protein üretimi için farklı promotörler de mevcuttur.

*P. pastoris*'te kullanılan AOX1 promotör sisteminin avantaj ve dezavantajları aşağıda belirtilmiştir.

Avantajları;

1. Mekanizmayı baskılayarak veya baskılamayarak yabancı proteinin transkripsiyonunu sıkı bir şekilde düzenler ve kontrol eder.

2. Yabancı protein hücre için toksik olsa bile yüksek seviyede eksprese edebilir.
3. Gen ürünü eksprese olmadan önce başlangıç karbon kaynakları ile transkripsiyon baskılanması sağlanarak iyi bir hücre gelişimi elde edilir.
4. Metanol ilavesi ile transkripsiyon induksiyonu kolay bir şekilde gerçekleşir.

Dezavantajları;

1. Yöntem boyunca metanolü izleme genellikle zordur.
2. Metanol yanıcı olduğundan işlem için gerekli olandan fazla miktarda stoklama istenmez.
3. Metanol başlıca petrokimyasal kaynaklıdır ve bazı gıdaların ve katkı maddelerinin üretiminde kullanılması uygun olmayabilir.

AOX1, *P. pastoris* için mevcut tüm promotörlerin en fazla tercih edileni (Cereghino *et al.* 2001) olup bunun yanı sıra tercih edilebilen diğer promotörler şunlardır:

AOX2 promotörü

AOX2 geni de alkol oksidaz enzimi (AOX) üretir, ancak AOX1 geninin ürününden 10-20 kat daha az AOX aktivitesine sahiptir (Cregg and Madden 1988). Yine de bu promotör kullanılarak ekspresyon artışının başarılı bir şekilde gerçekleştiği çalışmalar rapor edilmiştir (Mochizuki *et al.* 2001). Genel olarak AOX1 promotörünün kontrolü ile gerçekleştirilen yabancı protein ekspresyon seviyesi AOX2 promotörü ile elde edilenden daha yüksektir.

GAP (gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz) promotörü

Bu promotörün geniş şekilde kullanılmamasının nedeni *P. pastoris*'te yabancı protein üretiminde sitotoksik etkiye neden olmasıdır (Menendez *et al.* 2004).



### FLD1 (formaldehit dehidrogenaz) promotörü

Metanolla indüklenen ve amonyum sülfat gibi bir azot kaynağı gerektiren promotördür (Gellisen 2000).

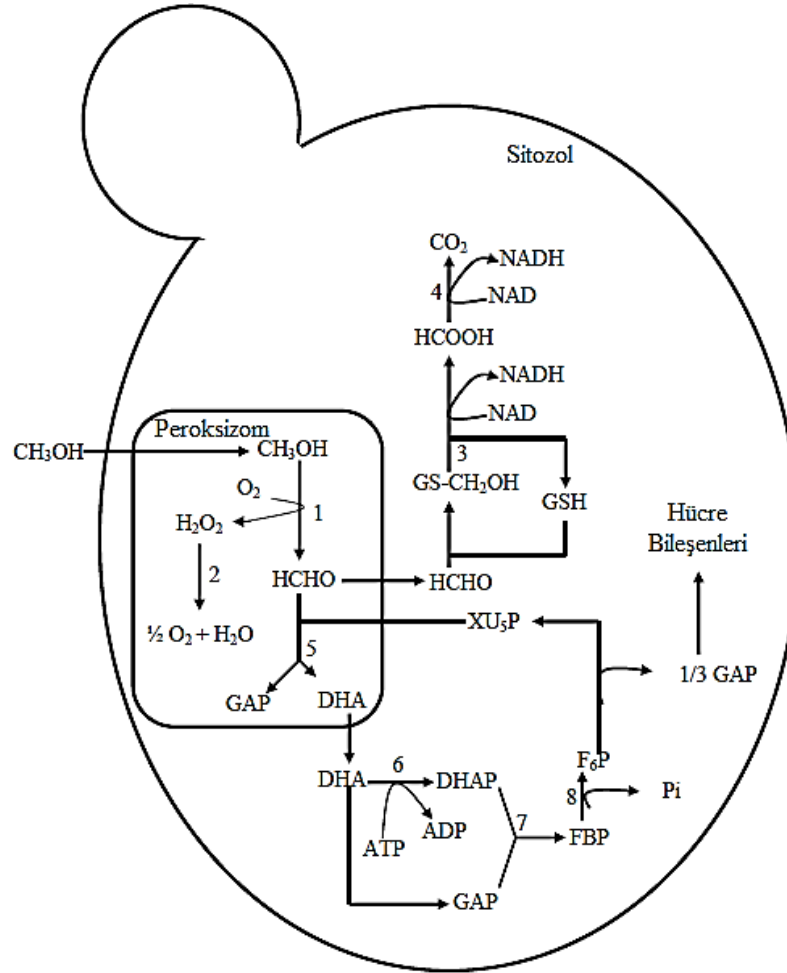
### ICL1 (izositrat liyaz) promotörü

*P. pastoris*'in ICL1 (izositrat liyaz) geni, AOX1 ve GAP promotörlerine alternatif promotördür (Menendez *et al.* 2003). Ancak *P. pastoris*'te heterolog protein üretimi için faydasını belirlemede sonraki çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle araştırmacıların büyük çoğunluğu metanolla indüklenen AOX1 promotörünü tercih etmektedir (Cereghino *et al.* 2001).

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

Metilotrofik mayalar, karbon ve enerji kaynağı olarak metanolü kullanma yeteneğindedir. Bugüne kadar tanımlanan metilotrofik tüm suşlar *Hansenula*, *Pichia*, *Candida* ve *Torulopsis* cinslerine aittir (Faber *et al.* 1995). Bu mikroorganizmalar, birkaç enzim içeren spesifik metanol kullanım metabolik yoluna sahiptir. Başlangıç reaksiyonları, özelleşmiş mikrobadilerde ve peroksizomlarda gerçekleşir. Peroksizomlar, alkol oksidaz ve katalaz gibi metanol metabolizmasında anahtar rol alan enzimleri barındırdığından büyüme esnasında önemli rol oynar. Asimilasyon ve disimilasyonun sonraki reaksiyonları ise sitozolde yer alır (Macauley-Patrick *et al.* 2005). Metanol metabolizmasının ilk basamağı metanolün alkol oksidaz enzimi tarafından moleküler oksijen kullanılarak formaldehit oksidasyonudur. Bu reaksiyonda formaldehitin yanı sıra hidrojen peroksit meydana gelir. Hidrojen peroksitin toksik etkisinden kaçınmak için metanol metabolizması, özelleşmiş bir organel olan peroksizomlarda yer alır. Bu organeller toksik yan ürünleri hücreden uzaklaştırır (Invitrogen 2010a). Metanol metabolizması tam olarak Cereghino and Cregg (2000), Jahic *et al.* (2003) ve Gellisen (2000) tarafından açıklanmıştır (Şekil 1.2). Alkoloksidaz, *Pichia* genomunda iki farklı lokustan (AOX1 ve AOX2) transkribe olur

(Ellis *et al.* 1985; Cregg *et al.* 1989). AOX1 ve AOX2'nin açık okuma bölgelerinde %92 benzerlik ve amino asit sekanslarında %97 homoloji olmasına rağmen hücredeki alkol oksidaz aktivitesinin büyük çoğunluğu AOX1 tarafından düzenlenir (Cregg *et al.* 1989; Koutz *et al.* 1989).



**Şekil 1.2.** *P. pastoris*'te metanolün metabolik yolu

(1; alkol oksidaz, 2; katalaz, 3; formaldehit dehidrogenaz, 4; format dehidrogenaz, 5; dihidroksiaseton sentaz, 6; dihidroksiaseton kinaz, 7; fruktoz 1,6- bisfosfat aldolaz, 8; fruktoz 1,6-bisfosfat. DHA; dihidroksiaseton, DHAP; dihidroksiaseton fosfat, FBP; fruktoz 1,6- bisfosfat, FGP; fruktoz 6-fosfat, GAP; gliseraldehit-3-fosfat, GSH; indirgenmiş glutatyon, Xu5P; ksiluloz 5-fosfat) (Sunga 2008)

*P. pastoris*'in konakçı suşlarının metanol kullanımıyla ilgili üç fenotipi bulunur. 'Mut<sup>+</sup>' veya metanol kullanımı pozitif fenotip; yabancıl tip gibi metanolde gelişir ve geniş ölçekli fermentasyonlarda fazla miktarda metanole ihtiyaç duyar (Cereghino and Cregg 2000). 'Mut<sup>s</sup>' veya metanol kullanımı yavaş fenotip; AOX1 geninde bozukluk vardır.

Metanol metabolizması için daha zayıf olan AOX2 geni kullanıldığından metanolü daha yavaş kullanan ve yavaş gelişen suştur. Bu fenotipe sahip suşların Hepatit B yüzey antijeninin üretiminde avantajlı olduğu bildirilmiştir (Cregg *et al.* 1987). ‘Mut’ fenotipi veya metanol kullanımı negatif fenotip; metanolde gelişemez. Bu suşun her iki AOX geni de silinmiştir. Belirli rekombinant ürünlerin üretimi için hücrelerin az gelişimi istendiğinden bu fenotipin kullanımı avantajlıdır (Cregg *et al.* 1987; Cregg and Madden 1988). Şimdilerde araştırmacıların çoğu ‘Mut<sup>+</sup>’ fenotipinin kullanımını tercih ederken (Yu and Zang 2002; Hohenblum *et al.* 2004; Slibinskas *et al.* 2004) bazı araştırmacılar, ‘Mut<sup>s</sup>’ fenotipini tercih etmektedir (Aoki *et al.* 2003; McKinney *et al.* 2004; Paramsvam *et al.* 2002; Peng *et al.* 2004; Yang *et al.* 2004).

#### 1.2.4. Post-translasyonel modifikasyonlar ve proteinlerin salgılanması

*P. pastoris* ekspresyon sistemi, yüksek yapılı ökaryotlardaki ilgili sinyal sekansın izlenmesi, katlanma, disülfit bağ oluşumu, lipid ilavesi ve O- ve N-glikozilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonları gerçekleştirmesiyle bakteriyal ekspresyon sistemlerinden daha avantajlıdır. Çizelge 1.2’de çeşitli konak hücrelerin gen ekspresyon yetenekleri verilmiştir.

**Çizelge 1.2.** Çeşitli konak hücrelerin gen ekspresyon yetenekleri (Greene 2004)

Konak hücre veya organizma	Proteolitik işlem	Fosforilasyon	Glikozilasyon	Amino asit modifikasyonu
Bakteri	Yok	Muhtemel	Yok	Yok
Maya/Fungi	Biraz	Biraz	Var	Biraz
Böcek	Biraz	Biraz	Orta derecede	Biraz
Bitkiler	Orta derecede	Biraz	Orta derecede	Biraz
Bitki Hücreleri	Orta derecede	Biraz	Orta derecede	Biraz
Hayvanlar	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Orta derecede
Hayvan Hücreleri	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Tam
Memeliler	Var	Var	Var	Tam

#### 1.2.4.a. Protein katlanması ve disülfid bağ oluşumu

Aktif proteinlerin üretimi için katlanma ve disülfid bağ oluşumu, heterolog protein üretiminde hız sınırlayıcı basamak olsa da önemli bir adımdır. (Hohenblum *et al.* 2004). Endoplazmik retikulumda (ER) disülfid bağ ve ikincil yapıların oluşumu, doğru protein katlanmasının iki ana basamağını oluşturur. Klausner (1989)'in çalışmasında rapor edildiği gibi sadece uygun şekilde katlanan proteinlerin golgi cisimciğine girişine izin verilmesinde protein katlanması ve post-translasyonel modifikasyonlar sıkı kontrol altındadır (Holst *et al.* 1996). Salgılanan bir protein yanlış katlanır veya yanlış bir biçimde işlenirse ER'de birikerek strese yol açar. Stres durumunu azaltmak için yanlış katlanan proteinler, ER ilişkili parçalanma ile ortadan kaldırılır (Wu and Kaufman 2006). Ancak stres durumu yoksa olgunlaşmamış proteinler stabilize edilir, stresi azaltmak ve heterolog protein salgılanmasını artırmak için katlanmaya yardımcı diğer proteinlerin ve protein disülfid izomerazın yanı sıra ER'de yer alan şaperonların yardımıyla agregasyon oluşumu önlenir (Idiris *et al.* 2010; Damasceno *et al.* 2011).

#### 1.2.4.b. Glikozilasyon

Maya hücrelerinde meydana gelen diğer bir post-translasyonel modifikasyon glikozilasyondur. Glikozilasyon protein katlanması, oligomer birleşmesi, yapısal stabilite, spesifik sinyal iletimi, tanınma ve salgılanma işlemlerinde önemli bir süreçtir (Wright and Morrison 1997). O- ve N- bağlı olmak üzere iki tip glikozilasyon vardır. *P. pastoris*, her ikisini de gerçekleştirebilme yeteneğine sahiptir. Ancak memeli hücrelerininkine göre bazı farklılıkları vardır. Örneğin, memeli hücreleri N-asetilgalaktozamin, galaktoz ve sialik asit gibi oligosakkaritleri ilave ederken *P. pastoris* hücreleri yalnızca mannoz rezidülerini ilave eder (Cereghino and Cregg 2000). Bu yüzden rekombinant *P. pastoris* tarafından üretilen glikoproteinlerin tedavi edici olarak kullanımında bazı immunojenik etkilerin olabileceği bildirilmiştir (De Pourcq *et al.* 2010). *P. pastoris*'te O-bağlı glikozilasyon modeli diğer maya suşlarıyla benzerdir ve O-oligosakkaritler genellikle rekombinant proteinlerin serin ve treonin amino asit rezidülerinin hidrosil gruplarına bağlanır (De Schutter *et al.* 2009).

N-bağlı glikozilasyonun metabolik yolu mayalarda ve yüksek yapılı ökaryotlarda korunmuştur. Bu olay, Asn-X-Ser/Thr tanıma bölgelerinde glikanlar ilave edilerek gerçekleştiren protein translasyonundan sonra ER lümeninde meydana gelir (Gemmill and Trimble 1999). Bu glikozilasyon tipinin aşamaları maya ve memeli hücrelerinde benzerdir. Ancak proteinin golgiye iletiminden sonra farklı aşamalar gözlenir. Maya hücrelerinde bu olay, fazlaca mannozillenmiş glikan yapılarıyla sonuçlanırken (Gerngross 2004) memeli hücrelerinde mannoz rezidülerinin uzaklaştırılması,  $\alpha$ -1-2-mannosidazın ilave edilmesine bağlıdır (Tulsiani *et al.* 1982).

*P. pastoris*'teki oligosakkarit zincirleri, *S. cerevisiae*'dekinden daha kısa olduğundan *S. cerevisiae*'deki hiperglikozilasyon sorunu ortadan kaldırılmış olur. Ancak *P. pastoris*'te tedavi edici glikoprotein üretiminde hipermannozilasyonun üstesinden gelmek için birçok deneme yapılmaktadır. Glikomhendislikteki ilerlemelerle birlikte *P. pastoris*'te insan tipi N-bağlı glikozilasyon metabolik yolu araştırılmaktadır.

### 1.2.5. Salęılama sinyalleri

Rekombinant protein üretiminde proteinin hücre içi ortamda eksprese edilebilirliği veya hücre dışına salgılanabilirliği önemli konulardan biridir. Protein zellikleri önemli olsa da istenen ürünün hücre kütlesinden saflaştırılmasının kolay ve bu işlemin ekonomik olması dolayısıyla ekstrasellüler üretim daha avantajlıdır (Daly and Hearn 2005).

Proteinin ortama salgılanması için bir sinyal sekansı gereklidir. Sinyal sekansları, salgılanma için ekstrasellüler protein yapısına bağlanan peptidlerdir. Bu amaçla alfa-eşleşme faktör ( $\alpha$ -mating;  $\alpha$ -MF) pre-pro lider sekansı, asit fosfataz sinyal sekansı (PHO) veya invertaz sinyal sekansı (SUC2) gibi farklı bir sinyal sekansı seçilebileceği gibi proteinin kendi sekansı da seçilebilir (Macauley-Patrick *et al.* 2005). *P. pastoris* ekspresyon sisteminde en yaygın olarak kullanılan sinyal sekansı *S. cerevisiae*  $\alpha$ -MF'dir. Bu sinyal sekansının bazı durumlarda heterolog proteinin kendi nc sekansından daha iyi olup ekstrasellüler rekombinant proteinin daha fazla miktarda üretimine öncülük ettiği (Sreeknisha *et al.* 1997; Daly and Hearn 2005) ve N-terminal

amino asitlerin sayısındaki çeşitliliğin, genellikle  $\alpha$ -faktör sinyali kullanılarak salgılanan heterolog proteinlerle sağlandığı bildirilmektedir (Brocca *et al.* 1998).

*S. cerevisiae*  $\alpha$ -MF, 19 amino asitten oluşan sinyal peptid öncü sekansını ve 60 hidrofilik amino asit asitlerinin öncü bölgelerini içerir (Julius *et al.* 1984). *P. pastoris*'te salgılama mekanizması üç aşamada gerçekleşir. İlk aşama; proteinin, öncü domainlerin sinyal peptidazla uzaklaştırıldığı endoplazmik retikulumda yeniden düzenlenmesidir. İkinci aşama, öncü proteinin dibazik endo-peptidaz (*kex2*) aktivitesi aracılığıyla uzaklaştırıldığı golgi cisimciğine gönderildiği aşamadır. Son aşama ise rekombinant proteinin salgı veziküllerine paketlenmesi ve ardından ekstrasellüler olarak ortama salgılandığı aşamadır (Daly and Hearn 2005).

### 1.3. Proteolitik Parçalanma

Proteolitik parçalanma, *P. pastoris* ekspresyon sisteminde rekombinant proteinlerin etkili bir şekilde salgılanması ve saflaştırılmasında protein veriminin azalmasına, biyolojik aktivite kaybına ve sonraki işlemlerde parçalanma ile ürün kontaminasyonuna yol açan önemli sorunlardan biridir (Jahic *et al.* 2003; Idiris *et al.* 2010). Bu durumun sıcaklık, pH değişikliği, besin yetersizliği, karbon kaynağı değişikliği ve kültür sıvısındaki yabancı kimyasallar gibi birçok nedeni vardır (Hilt and Wolf 1992).

*P. pastoris* ekspresyon sisteminde metanol metabolizmasının yüksek seviyede oksijen isteği, oksidatif stres nedeniyle gliserol metabolizmasındakinden daha yüksek miktarda proteazların oluşumuna yol açar (Sinha *et al.* 2005; Potvin *et al.* 2010). *P. pastoris* hücreleri, fermentasyon sırasında yüksek hücre yoğunluğuna ulaşabildiğinden hücre parçalanmasıyla birlikte *P. pastoris* kültürlerinin süpernatantında bulunan vakuolar proteazlar, protein parçalanmasında temel faktördür (Shen *et al.* 1998).

#### 1.4. pPICZ $\alpha$ A Ekspresyon Vektörü

Rekombinant DNA teknolojisinde DNA klonlama için yaygın olarak kullanılan, vektör olarak tasarlanan plazmitler, üç farklı bölgeye sahiptir. Bunlar; replikasyon orjini, seçimi sağlayan markır gen (ilaç direnç geni) ve eksojen DNA fragmentlerinin entegre edildiği bölgedir (Lodish *et al.* 2003). *P. pastoris* ekspresyon vektörlerinin çoğu 5'AOX1 promotör bölgesi ve AOX1 transkripsiyon terminasyon bölgesinden oluşan bir ekspresyon kasetine sahiptir (Koutz *et al.* 1989). Promotör ve terminatör bölgeler arasında yabancı sekansın yerleştirileceği bir bölge veya çoklu klonlama bölgesi yer alır (Cereghino and Cregg 2000). pPICZ $\alpha$ A vektörü, en güçlü ve en ayarlanabilir promotör olan AOX1 promotörünün kontrolü altında eksprese edilen heterolog geni, genoma entegre edebilme özelliğine sahip bir vektör olarak bilinir (Cereghino and Cregg 1999, 2000). Bu vektör, *P. pastoris*'te rekombinant proteinlerin eksprese edilmesi ve salgılanması için kullanılmaktadır. *E. coli*'de çoğaltılması ve stoklanması için kapalı olarak dizayn edilmiştir. Herhangi bir *Pichia* suşunda kullanılabilir ve ilgilenilen genin yüksek seviyede metanolla indüklenmesine olanak sağlar.

#### 1.5. Gen Mühendisliği Teknikleri

Rekombinant DNA teknolojisi, aynı organizmada doğal olarak bulunmayan iki nükleik asit sekansının birleşmesi yoluyla yeni DNA zincirlerinin üretimidir. Bu teknolojinin olabilirliği, 1970 yılında DNA'yı kesen restriksiyon endonükleaz enzimlerinin Werner Arber, Daniel Nathans ve Hamilton Smith tarafından keşfedilmesini takiben ilk olarak lisansüstü öğrencileri, A. Dale Kaiser ve Peter Lobban tarafından tahmin edilmiş ve 1978 yılında nobel ödülüne layık görülmüştür. O zamandan beri rekombinant DNA teknolojisi olarak da adlandırılan genetik mühendislik teknikleri, önemli proteinlerin yabancı konukçuda üretimi için güçlü bir araç olmuş, biyoteknoloji biliminde köklü bir değişime yol açmıştır (Boy 2011). Önem kazanan rekombinant proteinler ise bu tekniklerin gelişmesinde önemli rol oynamaktadır.

Spesifik DNA bölgelerinin çoğaltılması, DNA konsantrasyonunun tespiti, restriksiyon kesimi ve ligasyon reaksiyonu rekombinant DNA teknolojisinde kullanılan bazı temel basamaklar olup bu basamaklar aşağıda açıklanmıştır.

İstenen gen, restriksiyon bölgelerini içeren dizayn edilmiş uygun primerler kullanılarak PCR'da çoğaltıldıktan sonra gen ve plazmit spesifik restriksiyon enzimleri ile kesilir. Kesim ardından ligaz enzimi ile birleştirilir ve istenen geni içeren rekombinant plazmit, transformasyon veya genomik entegrasyon ile mikroorganizmalara transfer edilir. Transforme olan mikroorganizmalar, plazmitte direnç geni bulunan uygun antibiyotik içeren besi ortamına yayılır. Böylelikle besiyerinde sadece plazmiti taşıyan mikroorganizmalar gelişeceğinden klonlanmış mikroorganizmalar kolayca seçilir. Seçilen mikroorganizmaların plazmiti taşıyıp taşımadığı PCR yöntemi ile analiz edilir.

İlgilenilen genin klonlanacağı plazmit seçimi, rekombinant DNA teknolojisinde diğer önemli bir basamaktır. Plazmit, bakteri genomundan ayrı olan, kendini replike edebilen, ekstrakromozomal, halkasal DNA molekülüdür. Fonksiyonlarına göre sınıflandırılan plazmitlerin en iyi çalışılmış olanları, konjugasyonda rol alan F plazmiti, antibiyotik ve toksinlere karşı direnç geni taşıyan R plazmiti, diğer bakterileri öldürme yeteneğine sahip proteinleri kodlayan genleri içeren Col-plazmit ve rekombinant plazmitlerdir (Klug *et al* 2006). Yapay olarak tasarlanan plazmitlerin çoğu klonlama vektörü olarak kullanılır. Bazı plazmitler, konakçı genomuna entegre olma yeteneğindedir. Rekombinant DNA teknolojisinde yaygın olarak kullanılan plazmitler, DNA klonlama için replikasyon orijini, seçime izin veren markır gen (genellikle ilaç direnç geni kullanılır) ve eksojen DNA fragmentlerinin entegre edileceği alan olmak üzere üç temel bölgeye sahiptir (Lodish *et al.* 2003).

Ligasyon işleminde ilgilenilen DNA fragmentinin komplementer zincir ile bağlanmaya eğilimli yapışkan uçlu zincirleri restriksiyon enzimleri ile kesilir, aynı restriksiyon enzimleri ile kesilerek yabancı DNA'ya komplementer yapışkan uçlar oluşturulan vektör DNA ilave edilerek birleşecek zincirler arasındaki fosfodiester bağları ise DNA ligaz tarafından oluşturulur. Bu enzim, DNA'nın 3'-hidroksil grubu ile 5'-fosfat grubu



arasında kovalent bağ meydana getirir. Bu işlemden sonra rekombinant vektörü içeren karışım, konak hücreye transfer edilir. Çoğu durumda bu işlem transformasyonla gerçekleştirilir (Shuler and Kargi 2002). Transformasyonla doğrudan transfer için dört farklı yöntem vardır:

1. Doğal transformasyon; yabancı DNA bakteri tarafından alınır ve kromozomal DNA'sı ile birleştirilir.
2. Yapay transformasyon; hücreler 0°C'de CaCl<sub>2</sub> ile uygun duruma getirilerek (kompetent yapılarak) DNA transformasyonu sağlanır.
3. Protoplast transformasyonu; sert yapıdaki hücre duvarı enzimlerle hidroliz edilerek hücre, sitoplazmik membranla çevrili protoplast haline getirilir.
4. Elektroporasyon; hücre membranında geçici porlar oluşturmak üzere kısa süreli, yüksek voltajda elektrik sinyallerinin verilmesiyle gerçekleştirilir (Glazer and Nikaido 1995).

### **1.5.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile klonlama**

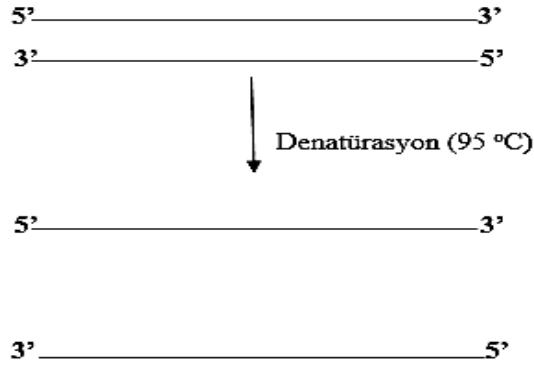
Polimeraz zincir reaksiyonu, *in vitro* ortamda DNA çift zincirini ayırıp oligonükleotid primerler ve DNA polimeraz ile inkübe ederek amplifiye etme tekniğidir. DNA'nın spesifik bölgesini bir milyar kez kadar çoğaltabilen bu teknik biyoteknolojide, adli tıpta ve genetik araştırmalarda önemli bir teknik olarak bilinmektedir.

PCR ile klonlama, DNA'nın restriksiyon enzimleriyle kesildiği ve ilgilenilen genin transformantların taranması ile arandığı geleneksel klonlama yöntemiyle karşılaştırıldığında nispeten etkili bir yöntemdir. PCR'da öncelikle ilgilenilen genin sekansı bilinir, *in vitro* da genin amplifikasyonunu başlatan 'primer' olarak adlandırılan komplementer oligonükleotidler sentezlenir. Ayrıca bölge spesifik mutasyonların oluşumunu ve açık okuma bölgelerinin (ORF; Open Reading Frame) C ve N terminaline restriksiyon kesim bölgelerinin ilave edilmesini sağlar (Lui 2010).

### 1.5.1.a. PCR'ın temel basamakları

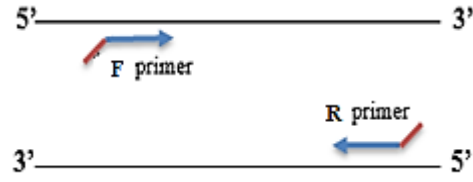
Bir PCR işlemi üç temel basamaktan oluşur, basamaklar 30-40 döngü şeklinde tekrarlanır. Döngüler, reaksiyon karışımı içeren test tüplerinde hızlı bir şekilde ısınıp soğuyan otomatik ısı döngüleyici (termal saykır) tarafından gerçekleştirilir.

Denatürasyon basamağı; Kalıp DNA ve primerlerin yüksek sıcaklıkta çift zincirli yapısının açıldığı basamaktır. 94-95°C sıcaklık çift zincirli DNA'nın açılması için yeterlidir. Tekrar eden döngülerde bu sıcaklık 45-60 sn olmalıdır. Ancak ön denatürasyon basamağı, uzun DNA zincirlerinde tam bir denatürasyon sağlamak için 5 dakikaya kadar uzatılabilir. Guanin ve sitozin (G+C) miktarı kalıp DNA'da veya hedef DNA sekansında %55'ten fazla ise daha yüksek sıcaklık gerektirebilir.



**Şekil 1.3.** Çift zincirli DNA'nın denatürasyonu

Bağlanma basamağı (annealing); Kalıp DNA'ya primerlerin bağlandığı basamaktır. Reaksiyon karışımı, primerlerin erime sıcaklığının 5°C altına kadar soğutulur ve primerler kalıp DNA'da kendilerine komplementer bölgelere bağlanır. Bu sıcaklığın çok yüksek olması durumunda primer bağlanması zayıf olurken çok düşük sıcaklıkta ise spesifik olmayan bağlanmalar meydana gelir. Bu yüzden, bağlanma sıcaklıklarının belirlenmesi önemlidir.



**Şekil 1.4.** Dizayn edilen primerlerin denatüre edilmiş DNA zincirlerine bağlanması

Uzama basamağı (ekstensiyon); polimeraz enzimi aracılığıyla oligonükleotid primerlerin uzayarak DNA'nın amplifiye edildiği basamaktır. Uzama sıcaklığı, genellikle 72°C'dir. Ancak bu basamağın gerçekleşme süresi, kullanılan polimeraz enziminin tipine bağlı olarak değişir. Taq (*Thermus aquaticus*) polimerazın kullanılması durumunda her 1000 bç'lik kalıp DNA'nın sentezi için 1 dk yeterliyken Pfu (*Pyrococcus furiosus*) polimeraz kullanıldığında bu süre iki katına çıkmaktadır.



**Şekil 1.5.** Yeni komplementer DNA zincirlerinin uzaması

Yeterli miktarda DNA ürünü elde etmek için genellikle 30 döngü idealdir. Daha yüksek döngü sayısında spesifik olmayan bağlanmalar meydana gelebilir. Üç basamağı da içeren döngüler sonucunda belli hedef bölgeyi içeren ve sayısı geometrik olarak artış gösteren çift zincirli DNA molekülü meydana gelir (Primrose *et al.* 2001).

### 1.5.1.b. Primer dizaynının temelleri

**Baz kompozisyonu;** dizayn edilecek primer içerisindeki bazlar, homojen bir dağılıma sahip olmalı, çoklu pürin ve primidin tekrarlarından kaçınılmalıdır. G+C içeriği %40-60 arasında olmalıdır ve düşük G+C içerikli primerler için primer uzunluğu, düşük erime sıcaklığını önlemek için yeterince uzun olmalıdır.

**Uzunluk;** Primerin kalıp DNA'ya komplementer bölgesi, optimum 18-25 bç olmalı ve aynı reaksiyondaki primer çiftlerinin uzunlukları arasındaki fark 3 bazı geçmemelidir.

**Kendine komplementer sekanslar;** ters tekrarlar içeren oligonükleotidler veya saç tokası yapısı oluşturan komplementer bölgeler, PCR'ın etkinliğini azaltan kendine bağlanmayı meydana getirir. Bu durumdan olabildiğince kaçınmak gerekir.

**Primer çiftleri arasındaki komplementer sekanslar;** primerler arasında komplementer bölgeler varsa primerlerin 3' uçları diğer primerlere bağlanma eğilimindedir. Kural olarak, bir primerde ard arda gelen maksimum üç nükleotid diğer primere komplementer olabilir.

**Erime sıcaklığı;** primer çiftlerinin erime sıcaklıkları arasındaki fark 5°C'den fazla olmamalıdır.

**Primerlerin 3' ucu;** mümkünse primerin 3' ucunda G veya C bazı olmalı, ancak saç tokası yapısının oluşmaması için NNGC veya NNCG varyasyonlarından kaçınılmalıdır.

**Primerlerin 5' ucundaki restriksiyon bölgesi;** restriksiyon bölge seçimi sınırsızdır, ancak bu bölge klonlanacak gen ve vektör DNA'da bulunmamalıdır. Primerlerin 5' uçlarını dizayn ederken kesim etkinliğini artırmak için fazladan baz ilave edilebilir. Eklenen baz sayısı ise restriksiyon bölgesine bağlı olarak değişiklik gösterir (Dallas *et al.* 1998; Boy 2011).

### 1.5.2. Restriksiyon kesim enzimleri

Restriksiyon kesim enzimleri, bakteriler tarafından yabancı DNA'lardan korunmak amacıyla üretilir. Bu enzimler, yabancı DNA'yı dış sarmal yapıdan keserken konukçu DNA'sını karakteristik metillenmiş bölgelerden dolayı kesmezler (Scragg 1988).

Restriksiyon enzimleri birkaç tip olmakla beraber, klonlama için en uygun olanları Tip II restriksiyon enzimleridir. Genellikle 4-8 bç'ye sahip olan bu enzimler, DNA'yı spesifik olarak tanıyıp kesme özelliğine sahiptir (Kirk and Othmer 1994). Örneğin, *EcoRI* olarak adlandırılan restriksiyon enzimi çift zincirli altı nükleotidlik GAATTC sekansını tanıyarak her bir zinciri G ve A rezidüleri arasından keser. DNA'nın bu bölgeden kesimi sonucu diğer DNA parçalarına komplementer olan, yapışkan uç olarak adlandırılan yapı meydana gelir. Bazı restriksiyon enzimleri ise her iki zinciri de küt uç oluşturacak şekilde keser.

### 1.5.3. Ligasyon reaksiyonu

DNA zincirlerini birarada tutmaya yarayan fosfodiester bağları, DNA ligaz tarafından kovalent bağla birleştirilir. T4 DNA ligaz, çift zincirli DNA'da yan yana duran nükleotidler arasında tek zincirli çentikleri birleştirir (Olivera *et al.* 1968; Gumpert and Lehman 1971). Bu enzim ATP'ye ihtiyaç duyar ve enzimdeki kofaktör ayrılınca AMP kompleksi meydana gelir. Bu kompleks, 5'fosfat ve 3'OH grubunu oluşturacak çentiğe bağlanır ve zincirde fosfodiester kovalent bağı meydana getirir. Yapışkan uçlar meydana getiren restriksiyon endonükleazlar tarafından uç kısım oluşturulduğunda birleşme yeri karşı zincirdekenden ayrı olarak birkaç baz çiftine sahip çentik içerir. Daha sonra DNA ligaz tam çift zincir oluşumu için bu çentikleri tamamlar. Bu reaksiyon *in vitro* ortamda gerçekleşir (Primrose and Twyman 2002).

#### **1.5.4. Transformasyon**

Ligasyon işleminden sonra istenen geni taşıyan vektör, alıcı veya konak hücreye gönderilir. Bu işlem çoğunlukla transformasyon ile gerçekleştirilir. Basit ve kısmen etkili olan *E. coli* hücrelerine transformasyon prosedüründe logaritmik fazda bekleyen hücrelerin buz üzerinde çözünmesi sağlandıktan sonra plazmit DNA, kompetent olan bu hücreler üzerine ilave edilerek buz üzerinde 30 dk inkübe edilir ve 42°C’de 30 sn ısı şoku uygulanır. Sıvı besiyerine alınan hücreler, 30-60 dk inkübasyondan sonra antibiyotik içeren seçici katı besiyerine yayılarak koloni gelişimi için inkübasyona bırakılır. pPICZ $\alpha$ A vektörü mavi-beyaz koloni seçimi özelliğine sahip olmadığından doğru transformant tespiti, koloni PCR ve plazmit izolasyonu ile gerçekleştirilir (Old and Primrose 1994; Shuler and Kargi 2002).

#### **1.6. Rekombinant Protein Üretiminde Biyoproses Parametreleri**

Mikroorganizmalar, bitki ve hayvan hücre kültürleri veya onlardan elde edilen materyaller (enzim, organel vs.) aracılığıyla bazı ham maddelerin (biyolojik olan veya olmayan) bazı ürünlere dönüşümünü içeren herhangi bir süreç ‘biyoproses’ olarak tanımlanır. Ekonomik açıdan asıl hedef, endüstriyel ürünlerin üretimini ve ürün miktarının artırılmasını optimize etmektir. Bu amaçla mikroorganizma seçimi, besiyeri bileşimi, sıcaklık, pH ve oksijen transfer oranı gibi biyoreaktör çalışma parametreleri optimizasyon için önemli kriterler olarak görülmektedir (Moses and Cape 1991).

##### **1.6.1. Mikroorganizma seçimi**

Biyoproseslerde endüstriyel proteinlerin üretiminde konukçu mikroorganizma seçimi, bu sürecin başarılı olması için önemlidir. Potansiyel bir konukçu, yeterli miktarda ürün verebilmeli, proteini fazla miktarda salgılayabilmeli, endüstriyel fermentasyonlar için uygun olmalı, ucuz besiyerinde hızlı üreyip fazla hücre kütlesi üretebilmeli, güvenilir olmalı ve zararlı madde veya istenmeyen ürünleri üretmemelidir (Kirk and Othmer 1994).

Yabancı gen ekspresyon sistemleri olarak en yaygın kullanılan mikroorganizmalar, *Escherichia coli* ve *Bacillus subtilis*'tir. Ancak bu mikroorganizmalar, çoğu ökaryot-spesifik post-translasyonel modifikasyonları daha az oranda gerçekleştirmektedir (Daly and Hearn 2005). Ökaryotik yabancı proteinleri yüksek seviyede üretmelerine rağmen bu mikroorganizmaların ökaryotik post-translasyonel modifikasyon sistemlerinin olmayışı, çözünmez ve inaktif proteinlerle sonuçlanmakta ve bu yüzden araştırmacıların son zamanlarda ökaryotik protein üretimi için *P. pastoris* gibi ökaryotik hücrelere ilgileri artmaktadır (Cregg 1999).

### **1.6.2. *P. pastoris*'te rekombinant protein üretimi ve biyomas üzerine biyoproses parametrelerinin etkisi**

Hücreler, istenen ürünü intrasellüler biyokimyasal reaksiyon yoluyla ürettiğinden mikro-biyoreaktör olarak kabul edilir. Bu yüzden biyoreaktördeki besiyerine salgılanan proteinin konsantrasyonu, hücre popülasyonu ve yoğunluğu ile ilgilidir. Oksijen transferi, pH ve sıcaklık gibi ana parametreler, aerobik biyoproseslerde ürün oluşumu üzerinde önemli etkiye sahiptir. Bu parametreler, metabolik yolları etkiler, metabolik akışı değiştirir ve endüstriyel üretimde optimum şartları gerektirir (Çalık *et al.* 1999).

Moleküler seviyede heterolog protein ekspresyonu, vektör sistemi, promotör seçimi ve post-translasyonel prosesleri içeren çoğu parametreden etkilenir (Niebauer and Robinson 2005). *P. pastoris* ekspresyon sisteminin temel prensipleri Invitrogen firması (USA) tarafından belirlenmiş olsa da her sistemin kendi optimizasyon proseslerine ihtiyaç duyulur. Bu yüzden bu parametrelerin dikkate alınması ve protein üretimiyle birlikte verimini etkilediğinden derinlemesine incelenmesi gerekir (Orman 2007).

#### **1.6.2.a. Sıcaklık**

Sıcaklık, fermentasyon prosesi boyunca sürekli optimum değerde tutulması istenen önemli parametrelerden biridir. Etkili olduğu hücre prosesleri çok farklı ve kompleks olabilir. Genelde yüksek sıcaklık, onarımı için fazladan enerjiye ihtiyaç duyulan protein

denatürasyonu ile sonuçlanırken düşük sıcaklık, reaksiyon verimini azaltır (Nielsen *et al.* 2003). Yüksek sıcaklıkta rekombinant proteinin zayıf stabilitesinden, katlanma sorunlarından ve uzun indüksiyon sonucu ölü hücrelerden açığa çıkan proteazlardan dolayı, daha düşük kültürasyon sıcaklığının rekombinant protein verimi üzerinde olumlu etkisinin olduğu görülmektedir (Macauley-Patrick *et al.* 2005). *P. pastoris*'in en iyi 30°C'de gelişme göstermesine (Cos *et al.* 2006) rağmen bazı çalışmalarda AOX aktivitesi ve ürün verimi üzerine daha düşük sıcaklığın etkili olduğu bildirilmiştir (Sarramegna *et al.* 2002; Jahic *et al.* 2003). Yapılan bir çalışmada sıcaklığın 30°C'den 20°C'ye düşürülmesiyle domuz  $\alpha$ -interferon üretiminin 100 kat artış gösterdiği bildirilmiştir (Jin *et al.* 2010). Başka bir çalışmada ise 30°C'de ölü hücrelerin total hücre miktarına oranının 22°C'dekinden 5 kat daha fazla olduğu görülmüştür. Bu durum da ölü hücrelerden fazla miktarda proteaz salınımının yüksek oranda rekombinant protein parçalanmasına yol açtığını göstermiştir (Wang *et al.* 2009).

### 1.6.2.b. pH

Hidrojen iyon konsantrasyonu, enzim aktivitesini, iletim mekanizmalarını, mikrobiyal üreme oranı gibi diğer hücre içi ve hücre dışı olayları etkileyen parametrelerden biridir. Organizmalar, farklı optimal pH'larda gelişme gösterir. *P. pastoris* 3-7 arasında geniş bir pH aralığında gelişebilir. Rekombinant proteinlerin farklı pH değerlerinde stabil olabilmesi ve pH değerinin ayarlanarak rekombinant protein parçalanmasının azaltılabilmesi dolayısıyla yapılan çalışmalarda rekombinant protein üretiminde farklı pH değerlerinin optimal olduğu bildirilmiştir (Clare *et al.* 1991; Brierley *et al.* 1994). Yapılan çalışmalar, her proteinin farklı pH değerinde stabil olması nedeniyle farklı rekombinant proteinler için farklı pH değerlerinin optimum olabileceğini göstermiştir. Bu yüzden her ürün için rekombinant protein veriminin maksimum olduğu yaygın bir pH değeri yoktur ve bu değer, her ürün için ayrı ayrı test edilmelidir. Örneğin, optimum pH'nın, fare epidermal büyüme faktörü (EGF) ve insan serum albumin üretimi için 6, insülin benzeri büyüme faktörü-I (IGF-I) ve sitokin gelişim engelleyici peptidin üretimi için 3 olduğu bildirilmiştir (Clare *et al.* 1991; Brierley 1994; Kobayashi *et al.* 2000).



### 1.6.2.c. Oksijen

*P. pastoris* ekspresyon sisteminin popüler olmasının nedenlerinden biri, gelişim esnasında fermentasyondan ziyade oksijenli solunumu tercih etmesidir (Cereghino *et al.* 2002). *Pichia*, metanolde geliştiğinde metanol metabolizması süresince oksijene ihtiyaç duyduğundan zorunlu aerobik mikroorganizmadır. Bu yüzden etanol ve asetik asit gibi ürünler üretmez. Moleküler oksijen, sadece solunum için kullanılmaz, metanolün formaldehite oksidasyonu için de kullanılır. AOX enzimi tarafından katalizlenen bu reaksiyon sonucunda hidrojen peroksit oluşur. Böylece hücrede metanol oksidasyonu esnasında iki potansiyel toksik metabolit meydana gelmiş olur. Hücreler oksijen kısıtlanmasına maruz kaldığında formaldehitin hücre içinde biriktiği ve zararlı etkiye neden olduğu düşünülmektedir (Sibirny *et al.* 1990; Couderc and Baratti 1998).

Oksijen, aerobik fermentasyon süreçlerinde metabolik yolu etkileyerek ve metabolik akışı değiştirerek ürün oluşumu üzerine farklı etkiler gösterir (Çalık *et al.* 1998, 1999; 2000). Fermentasyon besiyerindeki hücrelerin oksijen isteğini mikroorganizmaya ait metabolik yolun özelliği, karbon kaynakları ve kullanılan diğer besinler de etkilemektedir. Çalışmalarda genellikle metanol indüklemesi esnasında oksijen seviyesi %20-30'un üzerinde tutulur (Jahic *et al.* 2006). Yapılan bir çalışmada oksijen sınırlı kültürler ile metanole doymuş ve metanol miktarı sınırlı iki farklı kültürasyon tekniği karşılaştırılmış ve rekombinant protein kalitesinin ve veriminin metanole doymuş olanda daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Trentmann *et al.* 2004).

### 1.6.2.d. Besiyeri dizaynı

Tüm canlı hücreler, üremeleri ve gelişmeleri için belirli besinlere ihtiyaç duyar. Bu besinler, membran geçişleri, enzim aktivitesi ve biyosentetik proseslerde gerekli enerji üretimi için ihtiyaç duyulan elementlerin yanı sıra hücre materyal ve yapıları oluşturan kimyasal elementleri de içermelidir (Scragg 1988). Ürün oluşumu ve hücre gelişimi, besin alınımı sonucu gerçekleştiğinden biyoproses işlemlerinin gelişmesinde fermentasyon besiyerinin seçimi anahtar rol oynar. Bu yüzden bir fermentasyon

besiyeri, karbon, azot ve enerji kaynaklarını, hücre gelişimi için gerekli olan tüm temel mineralleri ve istenen proteinin yüksek seviyede verimini ve hızlı gelişmeyi sağlayacak üreme faktörlerini içermeli, uygun kalitede ve kolay bulunabilir olmalı ve istenen ürünün hücre kütesinden ayrılarak saflaştırılması sırasında en az soruna neden olmalıdır (Nielsen and Villadsen 1994).

Üretim besiyerlerinin kimyasal içeriği ve miktarı bilinen, tanımlı besiyeri ve kimyasal içeriği bilinmeyen, doğal bileşikleri içeren kompleks besiyeri olmak üzere iki ana tipi vardır. Kompleks besiyerinde zengin içeriğinden dolayı yüksek hücre yoğunluğu ve protein verimi elde edilebilirken, tanımlı besiyerinde fermentasyon ortamı daha rahat kontrol edilebilir ve ürün daha kolay ve ucuz bir şekilde elde edilebilir (Shuler and Kargi 2002). Beslenme rejiminin optimize edilmesi rekombinant proteinin yüksek seviyede üretilmesi için gereklidir. Bu yüzden biyomasın yanı sıra rekombinant protein miktarını etkileyen karbon ve azot kaynaklarının miktarı ve iz element solüsyonu, dikkate alınması gereken önemli parametrelerden birkaçıdır. Karbon kaynakları, rekombinant protein üretimi ve hücre gelişimi üzerinde önemli rol oynar. En yaygın kullanılan karbon kaynakları metanol, gliserol, sorbitol, glukoz, mannitol ve trehalozdur (Brierley *et al.* 1990; Sreekrishna *et al.* 1997; Thrope *et al.* 1999; Inan and Meagher 2001). Metanol, sadece rekombinant protein ekspresyonu için indükleyici olarak kullanılmaz, ayrıca tek karbon kaynağı olarak da kullanılır. Ancak hücre gelişimi, belirli konsantrasyonlar üzerindeki metanol tarafından inhibe edilir (Zhang *et al.* 2000). Bu yüzden genellikle kesikli beslemeli işlem kullanılır.

### **1.7. Proteinlerin Sodyum Dodesil Sülfat Poli Akrilamid Jel Elektrofrezisi**

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektrofrezisi (SDS-PAGE), proteinlerin moleküler büyüklüğünü analiz etmek için kullanılan bir yöntemdir. Proteinlerin elektroforetik ayrımı, yaygın olarak poliakrilamid jelde gerçekleştirilir. Bu jel, akrilamid ve çapraz bağlayıcı N,N'-metilen-bis-akrilamidin serbest radikal polimerizasyonu ile hazırlanır. Kimyasal polimerizasyon, bir başlatıcı-katalizör sistemi (amonyum persülfat-TEMED) tarafından kontrol edilir. Protein karışımı jele yüklendiğinde elektrik akımı

uygulanır, jel içerisinde küçük proteinler, büyük proteinlerden daha hızlı göç eder. Jel, cam plaklar arasına dökülerek polimerleşmesi beklenir. Porların çapı, poliakrilamid konsantrasyonuna bağlı olarak değişkenlik gösterir. Jelde proteinin yürüme hızı, por çapından ve elektriksel alan gücünden etkilenir. Bu parametrelerin uygun şekilde ayarlanmasıyla farklı boyutlara sahip proteinler ayrılabilir. Protein karışımlarını ayırtmada kullanılan en güçlü yöntem, elektroforez esnasında ve öncesinde proteinlerin iyonik deterjan olan SDS ile muamele edilmesidir. SDS, multimerik proteinleri alt ünitelerine ayırarak denatüre eder, polipeptidlere bağlanarak oluşturduğu kompleks, polipeptidlerin negatif yüklü kalmalarını sağlar (Lodish *et al.* 2003).

### 1.8. Western Blotlama

Protein blotlama metodu olan western blot ile; örneklerden elde edilen protein homojenatındaki proteinler, SDS-PAGE jel elektroforezi ile molekül ağırlığıyla orantılı olarak, artı kutba (anot) doğru göç ederek ayrılır. Ayrılan proteinler, destek membrana transfer edilir. Bu yöntem, otoradyografi, ultraviyole ışığı ya da peroksidaz reaksiyon ürünü ile membrandaki proteinlerin molekül ağırlığını ve göreceli miktarını belirlemek için kullanılır. SDS-PAGE jel elektroforezi takip eden aşağıdaki 4 basamak ile tamamlanır.

- a) SDS-PAGE jel elektroforezi ile molekül ağırlıklarına göre jel üzerinde fragmentlere ayrılmış proteinlerin, nitroselüloz veya poliviniliden diflorid (PVDF) membrana transfer edildiği **blotlama** basamağı,
- b) Blotlama işlemi sonrasında spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için membranda protein bağlanmayan bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplandığı **bloklama** basamağı,
- c) Spesifik **antikorlarla inkübasyon** basamağı,
- d) Membrandaki proteinlerin molekül ağırlığının ve göreceli miktarının belirlenmesi için kemilüminesans, floresans, kolorimetrik veya radyoaktif olarak **görüntülenme** basamağı (Budak 2009).

Yapılan kapsamlı literatür araştırması sonucu insan PON1 enziminin *P. pastoris* ekspresyon sisteminde ekstrasellüler olarak üretimi ile ilgili bir çalışmanın rapor edilmediği tespit edilmiştir. Bu yüzden bu çalışma, insan PON1 enziminin ilk defa *P. pastoris* mayasında eksprese edildiği özgün bir çalışma niteliğindedir.

Bu çalışmada sırayla; insan PON1 geninin *E.coli*'de klonlanması, elde edilen rekombinant vektörün *P. pastoris*'te ekspresyonu, üretim sonucu elde edilen rekombinant enzimin saflaştırılması ve saf olarak elde edilen enzimin karakterize edilmesi amaçlanmıştır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Yapılan araştırmalarda çeşitli rekombinant ürünlerin *Pichia pastoris* tarafından gerçekteşirilen üretimi, rekombinant ürünü elde etmede kullanılan suşlar, vektörler ve farklı yöntemler, ayrıca elde edilen rekombinant ürün üretimi üzerine etki eden faktörler özet halinde aşağıda belirtilmiştir.

Uehara *et al.* (2000), metilotrofik maya olan *P. pastoris*'te fare  $\alpha$ -amilaz geninin ekspresyonunu çalışmıştır. pPIC9 vektörü, 38 Mut<sup>+</sup> klonun HIS4 lokusundan, 15 Mut<sup>s</sup> klonun da AOX1 lokusundan *SalI* veya *BglI* enzimleriyle kesilerek  $\alpha$ -amilaz geni vektörün çoklu klonlama bölgesine yerleştirilmiş ve *Pichia* kromozomuna entegre olduğu gösterilen 11 transformanta Southern Blot yapılmış, ikinci tarama 53 transformant arasından üç günlük çalkalamalı kültürde en yüksek aktivite gösteren G2 transformantı ile gerçekteşirilmiştir. Bu ekspresyon seviyesi, aynı fare  $\alpha$ -amilaz genini eksprese eden rekombinant *Saccharomyces cerevisiae* ile karşılaştırıldığında spesifik enzim aktivitesinin *S. cerevisiae*'den elde edilen enziminkinden 8 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir.

Büyüksungur (2006) yaptığı çalışmada, *Pseudomonas fluorescens* biovarI mikroorganizmasına ait tiamin difosfat bağımlı enzimin C-C bağlarının yapımı ve yıkımında görevli olan benzaldehit liyaz (BAL) enziminin ekstrasellüler üretimi amacıyla enzime ait genin *P. pastoris* mayasında ekspresyonunu gerçekteşirmiştir. *E. coli*'de klonlama sonucu elde edilen rekombinant pPICZ $\alpha$ A::*bal* plazmiti, maya hücrelerine aktarılıp kromozomuna entegre edilen rekombinant enzim, AOX promotörünün kontrolü altında üretilmiş ve *S. cerevisiae*  $\alpha$ -faktör sinyal dizisi ile hücre dışına aktarılmiştir. Rekombinant transformant, 72 saat boyunca her 24 saatte bir metanol ile indüklenerek geliştirilmiş, yapılan SDS-PAGE analizleri sonucu rekombinant enzimin monomer yapısının 59 kDa büyüklüğünde olduğunu, FPLC (Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi) analizi ile de üretim ortamında enzimin tetramer formunun monomer formundan çok daha az miktarda bulunduğunu bildirmiştir.

Zhu *et al.* (2006) yaptıkları çalışmada insan paraoksonaz 1 Q genini (hPON1Q) pVL1392 Bakulovirüs transfer vektörüne klonlamış, ve ipek böceği larvasında (*Bombyx mori*) genin ekspresyonunu gerçekleştirmiştir. Rekombinant proteinin SDS-PAGE ve western blot analizi sonucu yaklaşık 40 ve 43 kDa moleküler kütleye sahip iki bant gözlemlenmiş, hemolenfteki ekspresyon seviyesinin, BmN hücrelerinininkinden 50 kat daha yüksek seviyede olduğunu tespit etmiştir. İki kromatografi basamağı (DEAE-Sepharose ve HiTrap Chelating HP) ile saflaştırma işleminden sonra rekombinant ürünün %90 oranında saflaştığını ve enzimatik özelliklerinin insan serum PON1 enzimine benzer olduğunu bildirmiştir.

Abdelmoula-Souissi *et al.* (2007) yaptıkları çalışmada, hücre döngüsünün düzenlenmesine, DNA tamirine ve apoptosise katılan, çoğu hedef geni düzenleyen, genomun koruyucusu olarak görev yapan ve tümör baskılamada anahtar bir protein olan insan tümör supresörü P53'ün metanolle uyarılabilen AOX1 promotörü kullanılarak *P. pastoris* tarafından ekspresyonunu bildirmiş, rekombinant P53'ü intrasellüler formda üretmiştir. İntrasellüler P53, 'Mut<sup>+</sup>' (X33) suşunun yanısıra 'Mut<sup>s</sup>' (KM71) suşunda da başarıyla üretilmiştir. Bununla birlikte fazla sayıdaki P53 kopyası, Mut<sup>+</sup> suşuna entegre olmasına rağmen salgılanan formu 'Mut<sup>s</sup>' suşunda gözlenmiştir. Ayrıca Mut<sup>s</sup> fenotipinin üretildiği besiyerinin pH'sı 7 olduğunda rP53 üretiminin pH 6'dakinden daha fazla olduğu bildirilmiştir.

Orman (2007) yaptığı çalışmada, biyoproses işletim parametrelerinin *P. pastoris* ile insan büyüme hormonu üretimi üzerine etkisini sistematik olarak incelemiştir. Bu kapsamda, rekombinant insan büyüme hormonunun (rhGH) hücre dışına salgılanması ve üretim ortamından saflaştırılması için metabolik mühendislik tasarımı yapılmış, insan büyüme hormonun kromatografik yöntemlerle ayrılmasını sağlayan 6xHis dizinini ve saflaştırılmış hormonun bu amino asitlerden ayrılmasını sağlayan Faktör Xa proteaz enziminin tanıdığı amino asit dizinini kodlayan DNA, hGH hormonunun genine PCR yöntemi ile entegre edilmiş ve oluşturulan pPICZαA::hGH rekombinant plazmiti, *P. pastoris* kromozomunun AOX1 bölgesine entegre edilerek, metanol indüksiyonu ile hGH sentezi gerçekleştirilmiştir. Dot-blot analiz yöntemi ile klonlanmış olan

mikroorganizmalar arasında en uygun farklı iki fenotip olan ‘Mut<sup>+</sup>’ ve ‘Mut<sup>s</sup>’ seçilmiştir. ‘Mut<sup>+</sup>’ ve ‘Mut<sup>s</sup>’ ile tanımlı ve kompleks ortamlarda metanol derişiminin rhGH üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. Kompleks ortamda (BMMY ortamı), hacimce %2 metanol derişiminde optimum rhGH saptanmıştır. Bu koşullarda, ‘Mut<sup>+</sup>’ fenotip, 0,052 g/l, ‘Mut<sup>s</sup>’ ise 0,16 g/l rhGH üretmiştir. Tanımlı ortamda, sadece metanol karbon kaynağı olarak kullanıldığında, ‘Mut<sup>s</sup>’ fenotipi metanolü tam olarak kullanamadığından yeterli hücre derişimine ulaşamayıp rhGH üretimi gerçekleşmemiştir. ‘Mut<sup>+</sup>’ fenotipi metanolü etkin olarak kullanabildiğinden %3'lük metanol derişimde 0,032 g/l rhGH üretilebilmiştir. Gliserol ve metanol birlikte kullanıldığında, bu iki fenotip için en çok rhGH üretimi farklı metanol derişimlerinde bulunmuştur. Tasarlanan üretim ortamı kullanılarak (%3 metanol içeren tanımlı ortam) biyoreaktör işletim parametrelerinden oksijen aktarımı, fermentasyon ve oksijen aktarım karakteristikleri pilot ölçek biyoreaktörde incelenmiştir. İnsan büyüme hormonu üretiminde oksijen aktarımının etkileri, hava giriş hızı  $Q_0/VR=0.5$  vvm; karıştırma hızları  $N=250, 500, 625, 750$  dk<sup>-1</sup> koşullarında incelenmiştir. İnsan büyüme hormonunun, hücre, amino asit, organik asit konsantrasyonlarının kalma süresi ile değışimi; dinamik yöntem kullanılarak, biyoprosesin büyüme evresi süresince oksijen tüketim hızı ve sıvı faz kütle aktarım katsayısı; verim ve yaşam katsayıları belirlenmiştir. İncelenen koşullar arasında en yüksek hGH derişimi 0,023 g/l olarak 5,37 g/l hücre konsantrasyonunda  $Q_0/VR=0,5$  vvm ve  $N=500$  dk<sup>-1</sup> koşullarında elde edilmiştir.

Kaymak (2008), belli substratlara karşı spesifik ve endüstride kullanılabilir olduğu düşünölen bitki lipazlarından *Arabidopsis thaliana* lipazlarının taranması amacıyla bir çalışma yapmıştır. Çalışmada *A. thaliana*'nın bilinen lipazlara benzer sekanstaki genleri, *P. pastoris* ekspresyon vektörlerine klonlanmış, sekansı doğrulanmış klonlar *P. pastoris*'e aktarılıp küçük miktarlarda eksprese edilmiştir. Küçük miktarlarda, 4-metilumbelliferil substratları kullanılarak rekombinant lipazlar, floresan test ile taranmıştır. 27 transformantta *Arabidopsis* lipaz aktiviteleri çalışılmış ve 7 tanesinin daha ilerideki çalışmalar da kullanılmasına karar verilmiştir. Bu klonların *P. pastoris*'te yüksek miktarda üretilmeye hazır durumda oldukları, böylece yüksek miktarlarda

üretilebilir ve sonuç olarak endüstriyel uygulamalarda kullanılabilir *A. thaliana* lipazlarının bulunabileceği bildirilmiştir.

Bayraktar (2009), yaptığı çalışmada *P. pastoris* ile biyoreaktör işletim parametrelerinden pH'nın, rekombinant insan büyüme hormonu (rhGH) üretimi üzerine etkisini düzenleyici genlerin ifade düzeyleri ile birlikte araştırmıştır. İlk olarak, iki farklı metanol kullanım fenotipi, *P. pastoris* 'Mut<sup>+</sup>' ve 'Mut<sup>S</sup>' arasından konak mikroorganizma, gliserol/metanol veya sorbitol/metanol içeren ortamlar kullanılarak seçilmiş, incelenen koşullarda, en yüksek rhGH üretimi, 120 g/l ve ifade düzeyi,  $9,84 \times 10^9$  kopya kuru hücre ağırlığı/mg, 30 g/l sorbitol ve %1 metanol içeren ortamda, *P. pastoris* hGH-Mut<sup>+</sup> suşu kullanılarak elde edilmiştir. Sonraki aşamada, pH'nın rhGH üretimine ve protein stabilitesine etkisi laboratuvar ölçekli biyoreaktörlerde incelenmiştir. Rekombinant insan büyüme hormonunun pH 5'te daha stabil olduğu gözlenmiştir. Üretim süresince, ortamın pH değerinin düştüğü görülmüştür. Üretim sırasında pH'ı kontrol altında tutabilmek için pH optimizasyon çalışmaları yarı kesikli biyoreaktörlerde gerçekleştirilmiş, rhGH konsantrasyonuna ek olarak, hücre içi AOX aktivitesi, ekstrasellüler proteaz konsantrasyonu; hGH, AOX, *pep4*, *prb1* ve *prc1* genlerinin ifade düzeyleri incelenmiştir. En yüksek hücre konsantrasyonu, pH 6 koşulunda 24 saatte 53 g/l olarak elde edilmiş fakat bu koşulda hGH derişimi 24 mg/l seviyesinde kalmıştır. En yüksek hGH derişimi, 271 g/l olarak 42 g/l hücre konsantrasyonunda sorbitol içeren ortamda pH 5'te 24 saatte elde edilmiştir. İncelenen bu şartlarda, toplam substrat üzerinden ürün ve hücre verimi 2,08 mg/g ve 0,15 g/g olarak bulunmuştur. Buna ek olarak, incelenen ortam şartlarında, en yüksek hGH ve alkol oksidaz ifade seviyesi, pH 5'te elde edilmiştir. Ayrıca pH 5 değerinde sabit tutularak, üç farklı proteazın ifade düzeylerinin azalması sağlanmıştır.

Açık (2009) yaptığı çalışmada, değişik karbon kaynaklarının ve beslenme stratejilerinin *P. pastoris* ile rekombinant insan büyüme hormonu (rhGH) üretimi üzerine etkilerini, hücre çoğalmasını, rekombinant protein üretimini ve hGH ve alkol oksidaz (AOX) genlerinin ifade düzeylerini belirleyerek araştırmıştır. Bu kapsamda, öncelikle yüksek seviyede insan büyüme hormonu üretimi için kullanılacak suş, *P. pastoris*-hGH'nin iki



farklı metanol kullanım fenotipi olan *P. pastoris*-hGH ‘Mut<sup>+</sup>’ ve *P. pastoris*-hGH ‘Mut<sup>s</sup>’ arasından seçilmiş, bu seçim sırasında, iki suş da gliserol/metanol ya da sorbitol/metanol olmak üzere iki farklı karbon kaynağı içeren üretim ortamlarında karşılaştırılmış ve 30 g/l sorbitol ve %1 metanol içeren ortamda *P. pastoris*-hGH ‘Mut<sup>+</sup>’nın  $9,84 \times 10^9$  kopya/mg kuru hücre ağırlığına sahip yüksek hGH gen ifade düzeyine ve 120 mg/l rhGH üretim seviyesine sahip olduğu bildirilmiştir. Sonraki aşamada, sorbitol, mannitol, fruktoz, laktoz, sükroz, sitrik asit, laktik asit ve asetik asitin karbon kaynağı olarak etkisi *P. pastoris*-hGH ‘Mut<sup>+</sup>’ kullanılarak laboratuvar ölçekli biyoreaktörlerde incelenmiştir. Bunlardan sorbitol ve sükroz yarı-kesikli biyoreaktörde indüklenme fazının başında, yarı-kesikli metanol besleme programı ile birlikte kesikli olarak eklenmiştir. Sükrozun rhGH üretimini inhibe etmemesine karşın hücre çoğalmasını sorbitol kadar desteklemediği bulunmuştur. Daha sonra sorbitol/metanol karışık beslemesini geliştirmek için üç farklı besleme stratejisi uygulanmıştır. Bu stratejiler: a) 0. saatte tek kesikli sorbitol eklemesi, b) 0. ve 9. saatte iki kesikli sorbitol eklemesi, c) AOX’u tetiklemek amacıyla 24. saatte ani metanol eklemesi olarak uygulanmıştır. Bu üç farklı besleme stratejisi sorbitolsüz ortamda yapılan üretim ile karşılaştırılmış, bu farklı stratejiler için substrat tüketimi, hücre çoğalması, rekombinant protein üretimi ve hGH ve AOX genlerinin ifade düzeyleri incelenmiş, en yüksek hücre derişimi olan 55 g/l’ye üçüncü strateji ile ulaşılırken en yüksek rekombinant protein derişimi (301 g/l) iki kez sorbitol eklenerek uygulanan ikinci strateji ile elde edilmiştir. Bu en yüksek üretim koşulunda toplam substrat üzerinden elde edilen en yüksek hücre ve ürün verimleri sırasıyla 0,17 g/g ve 1,71 mg/g olarak bulunmuştur. Ayrıca en yüksek hGH ve AOX ifade düzeylerine de bu strateji ile ulaşılmıştır.

Selamoğlu (2009) yaptığı çalışmada, Hepatit B yüzey antijeninin (rHBsAj) *P. pastoris*’te yüksek miktarda ekspresyonunu gerçekleştirmiştir. Bu amaçla HBV M geni tek kopya olarak alkol oksidaz (AOX1) promotörünün altına yerleştirilerek pPICZA vektörüne klonlanmış, rHBsAj protein sentezi hücre içinde metanolla indüklenmiştir. Yüksek hücre konsantrasyonlu fermentasyon çalışmalarının ardından, rHBsAj kromatografik teknikler kullanılarak saflaştırılmıştır. Rekombinant HBsAj proteini ile bağışıklanan farelerde oluşan immun yanıt, ticari Hepatit B yüzey antijen kiti

kullanılarak gösterilmiştir. Üretilen rekombinant antijenin istenilen konformasyonda olduğu AFM (Atomik Kuvvet Mikroskobu) ile doğrulanmıştır.

Fei *et al.* (2009), *P. pastoris*'te glutatyon üretimi için glutatyon sentezinde gerekli olan ve gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAP) promotörü tarafından düzenlenen, *S. cerevisiae*'de kodlanan gsh1 ve gsh2 genlerini taşıyan ekspresyon vektörünü *P. pastoris* GS115 suşuna transfer etmiş, çalkalamalı kültürde 217 mg/l glutatyon üretimi gözlemiştir. Çalışmada kesikli-beslemeli kültürde rekombinant suşun öncü amino asitleri glutatyona dönüştürmede yüksek aktivite gösterdiği bildirilmiş, üç amino asitin (15 mmol/l glutamik asit, sistein ve glisin) birlikte ilave edildiği fermentasyon ortamından 50 saat sonra elde edilen glutatyon ve biyomas miktarının sırasıyla 4,15 g/l ve 98,15 g/l olduğu tespit edilmiştir.

De Schutter *et al.* (2009), rekombinant protein üretiminde sıkça kullanılan, metanol asimilasyonu ve peroksizomal biyogenez çalışmaları için model organizma olan metilotrofik *P. pastoris*'in genom sekansını belirlemiştir. Şu an mevcut olan *P. pastoris* suşlarının insan tipi N-glikozilasyon yapma yeteneğine sahip olduğunu ve bu sayede bu suşların biyofarmasötik üretim için kullanımlarının arttığını bildirmiştir. *P. pastoris* GS115 suşunun 5,313 protein kodlayan gene ve 9,43 Mbç'lik genomik sekansa sahip olduğunu belirlemiştir.

Çalık (2010), yaptığı çalışmada *Trichoderma reesei* endoglukanaz I enziminin *P. pastoris*'te üretimini göstermiştir. Heterolog endoglukanaz I üreten *Pichia* hücreleri farklı stratejiler uygulanarak fermentörde üretilmiştir. EG I üretiminde sıcaklık ve metanol konsantrasyonunun etkileri anlaşılmaya çalışılmış, özellikle, promotör indüksiyonu metanol gerektirdiğinden, fermentör içerisindeki metanol miktarının etkisi incelenmiştir. Kesikli ve kesikli beslemeli fermentasyonlar ile örneklerin analizleri yapılarak kesikli beslemeli fermentasyonlarda, hücrelerin protein üretimi sırasında büyümelerine yardımcı olmak amacıyla metanole ek substrat olarak sorbitol kullanılmıştır. Protein konsantrasyonları, EG I'in aktivite analizleri, SDS-PAGE ve büyüme hızı sonuçları karşılaştırılarak bu rekombinant enzimin *P. pastoris*'te yüksek

üretimi optimize edilmeye çalışılmış, EG I'in *P. pastoris*'te üretilmesi için en iyi koşulların düşük metanol seviyesi ve düşük sıcaklık olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçların özellikle deterjan ve kağıt endüstrisinde kullanılabilir olduğu bildirilmiştir.

Boy (2011), yaptığı çalışmada glukozil bağlarını parçalayan, yüksek sıcaklığa dayanıklı, sıra dışı özellikleri ile nişasta hidrolizi işlemini geliştirebilecek potansiyele sahip olan ve doğal arkeal konağında çok az miktarda üretilen *Pyrococcus furiosus*'a ait  $\alpha$ -amilaz (PFA) enziminin *P. pastoris* ile ekstrasellüler üretimini amaçlamıştır. PFA enzimini kodlayan gen, tasarlanan ileri ve geri primerle çoğaltıldıktan sonra pPICZ $\alpha$ A plazmitine klonlanmış, *P. pastoris* X-33 suşu, pPICZ $\alpha$ A:PFA plazmiti ile transfekte edildikten sonra üretim ortamında rekombinant PFA (rPFA) enzim aktivitesinin varlığı saptanmış ve rekombinant enzimin biyokimyasal karakterizasyonu yapılmıştır. rPFA'nın optimum 95°C sıcaklık ve pH 4.5-6.5 aralığında metal iyonlarına ihtiyaç duymadan çalıştığı, ancak divalent metal iyonları varlığında enzimin inhibe olduğu bildirilmiştir. *S. cerevisiae*  $\alpha$ -faktör salgı sinyalinin enzimin amino ucuna eklenmesine rağmen hücre-dışı enzim aktivitesinin düşük, hücre içi enzim aktivitesinin ise yüksek olduğu bulunmuştur. Enzim üretimi ve hücre çoğalması üzerine pH etkisi, erlenmayer deneyleri ile incelenmiş, pH'sı 6 olan tampon çözeltide 4800 U/l  $\alpha$ -amilaz aktivitesi ve 7,30 g/l yaş hücre derişimi tespit edilmiş, daha yüksek miktarda rPFA üretmek amacıyla pH 4 ve pH 5 ayarlı, pH kontrollü işletim koşullarında, 1 litre çalışma hacminde iki farklı biyoreaktör deneyi tasarlanmıştır. En yüksek  $\alpha$ -amilaz aktivitesi pH 4'te, üretim fazının 27. saatinde, yaş hücre derişimi 209 g/l iken 73,400 U/l olarak belirlenmiştir. Bu çalışmanın aynı zamanda PFA enziminin ökaryotik bir hücrede üretildiği ilk çalışma olduğu bildirilmiştir.

Fan *et al.* (2011), çeşitli boyaarı güçlü renksizleştirme yeteneği olan ve yüksek miktarda lakkaz enzimi üreten yerel beyaz kök fungusu, *Trametes* sp. 48424'ten lakkaz genini (lac48424-1) klonlamış ve karakterize etmiştir. Genin 1563 bç'lik cDNA'sının 21 amino asitlik sinyal peptidinden önce gelen 499 aminoasidi içeren olgun lakkaz proteinini kodladığını ve lac48424-1'in protein sekansının bilinen diğer fungal lakkazlar

ile yüksek benzerlik gösterdiğini bildirmiştir. Çalışmada aktif lakkaz kodlayan lac48424-1 geninin işlevselliği *P. pastoris* mayasında gen ekspresyonu ile başarılı bir şekilde doğrulanmıştır. Ayrıca transformant maya hücreleri tarafından üretilen rekombinant lakkaz enziminin çeşitli boyaları renksizleştirebildiği bildirilmiştir.

Li *et al.* (2011), multipotent hematopoietik hücrelerin canlılığını devam ettirmesi, çoğalması ve farklılaşması için gerekli büyüme faktörü olan insan interlekin-3 (IL-3) genini pPICZαA vektörüne klonlamış, N terminalinde alfa faktör sinyal sekansı, C terminalinde 6xHis ve C-myc kuyruğu içeren füzyon protein üretmiştir. Dört gün metanol indüksiyonunun ardından yüksek seviyede rekombinant IL-3 üretimi gerçekleştirilmiştir. Rekombinant ürün, DEAE-sefaroze (diethylaminoethanol) anyon değişim kromatografisi ardından Ni<sup>2+</sup>-NTA afinite kromatografisi ile %95'in üzerindeki saflıkla yaklaşık 21 mg/l elde edilmiştir. Saflaştırılan ürünün moleküler kütesinin kütle spektrometrisi ve MALDI-TOF-TOF ile analizi sonucu N-bağlı glikozilasyon nedeniyle 18995,694 Da and 22317,469 Da olarak iki farklı şekilde bulunduğunu bildirilmiştir. Rekombinant proteinin biyolojik aktivitesi ba/f3 hücrelerinin çoğalmasını destekleme ve ERK sinyal verici metabolik yolu aktive etme yeteneği ile doğrulanmıştır. Sonuçların, deneysel prosedürün *P. pastoris*'ten fazla miktarda rekombinant insan IL-3 proteini üretilbileceğini gösterdiği bildirilmiştir.

Zhao *et al.* (2011), *Yarrowia lipolytica* CLIB122 mayasının genomunda 18 tane muhtemel lipaz geni belirleyip bu genlere ait ürünleri, *E. coli*'de eksprese etmiş ve paranitrofenol palmitatı hidroliz edebildiklerini belirlemiştir. Çalışmada enzim özelliklerini karakterize etmek için, 365 amino asitten oluşan proteini kodlayan 1098 baz çiftine sahip gen, *P. pastoris*'te eksprese edilmiş, üretilen rekombinant enzim, pH 7'de ve 35°C'de p-NP-dekanoata karşı yüksek aktivite göstermiştir. Ayrıca bu yeni enzimin diğer *Yarrowia* enzimleriyle karşılaştırıldığında daha düşük optimum sıcaklık ve pH'ya sahip olduğu ve Ca<sup>2+</sup> ile aktive olurken, PMSF, Hg<sup>2+</sup> ve Ni<sup>2+</sup> ile inhibe olduğu bildirilmiştir.

Wang *et al.* (2012), *Yarrowia lipolytica* lipazı, LIP2 (YILIP2)'yi kodlayan geni pGAPZ $\alpha$ A ekspresyon vektörüne klonlamış ve ekspresyon için *P. pastoris* X-33'e transfer etmiştir. Yüksek miktarda ürün veren klonlar elde edilmiş, bu klonlar enzim aktivitesinin tespit edilmesi için, çalkalamalı ve fermentör kültürlerde üretilmiştir. Sonuçlar, glukozun YILIP2 üretiminde optimum karbon kaynağı olduğunu, flask kültürde pH 7 ve 28°C şartlarda 48 saat sonunda rekombinant YILIP2'nin maksimum hidrolitik aktivitesinin 1,315 U/ml'ye ulaştığını göstermiştir. Kesikli-beslemeli fermentasyon, 3 ve 10 l'lik biyoreaktörlerde hücre yoğunluğunu ve YILIP2 miktarını artırmak için üreme besiyerine sürekli glukoz ilave edilerek gerçekleştirilmiş, 3 l'lik biyoreaktörde YILIP2'nin maksimum hidrolitik aktivitesinin ve hücre yoğunluğunun sırasıyla 10,300 U/ml ve 116 g (kuru hücre ağırlığı)/l'ye, 10 l'lik biyoreaktörde ise bu değerlerin sırasıyla 13,500 U/ml ve 120 g/l'ye ulaştığı, süpernatanttaki toplam protein miktarının ise 80 saatlik kültürde 3,3 g/l olduğu bildirilmiştir. Sonuç olarak yüksek hücre yoğunluğu ile YILIP2'nin ekspresyonu için *P. pastoris*'in GAP promotör içeren ekspresyon sisteminin etkili olduğu görülmüş ve bu promotörün, endüstriyel lipazların geniş ölçekli üretiminde kullanılan geleneksel AOX1 promotör ekspresyon sistemine alternatif olabileceği bildirilmiştir.

Chen *et al.* (2012), *Aspergillus fumigates*'in kitosanaz üretimi ile ilgili genini, bir maya ekspresyon vektörü olan pHBM905A'ya klonlanmış ve *P. pastoris* GS115'e aktarmıştır. Endokitinaz enziminin verimi, 14 lt'lik bir fermentörde 3mg/ml ve aktivitesi ise yaklaşık 25 U/l olarak belirlenmiştir. Enzimin aktivitesinin 10 M üre varlığında %70 sabit kaldığı ve 3 gramının 200 kg kitosanı 24 saat içinde oligosakkarite dönüştürdüğü bildirilmiştir.

Peng *et al.* (2012), antimikrobiyal özelliğe sahip scygonadin peptidini kodlayan gen bölgesini *P. pastoris* 'te eksprese etmeye çalışmıştır. Bunun için bu peptidile ilgili 306 bç'lik cDNA'yı, pPIC9K vektörüyle *P. pastoris*'te eksprese etmiştir. Bu işlem için optimal koşulların, %0,5 metanol, 48 saatlik süre ve pH 6 olduğunu belirlemiştir. İmmobilize metal afinite kromatografisini kullanarak bu peptidi %97 verimle

saflaştırmıştır. Rekombinant scygonadinin bazı virus ve bakterilere karşı antimikrobiyal etki gösterdiğini belirlemiştir.

Ata (2012), metabolik mühendislik yaklaşımıyla aktif termostabil glukoz izomeraz (GI) enzimi üretebilen *P. pastoris* suşunun geliştirilmesini amaçladığı çalışmasında araştırma programını iki ana alt programda yürütmüştür. İlk kısımda, *Thermus thermophilus*'a ait *xyIA* geni çoğaltılmış ve pPICZαA ekspresyon vektörüne yerleştirilip elde edilen pPICZαA::*xyIA* vektörü, daha sonra *P. pastoris* genomunda bulunan AOX1 lokusuna entegre edilerek *xyIA* geninin metanolla indüklenen alkol oksidaz promotör vasıtasıyla ekspresyonu sağlanmıştır. Elde edilen rekombinant *P. pastoris* suşları arasından spesifik enzim aktivite analizi ve SDS-PAGE yöntemiyle belirlenen, enzimi en iyi üreten suş seçilerek bu suş, eP20 olarak adlandırılmıştır. Daha sonra, farklı tuz ve sorbitol konsantrasyonlarının hücre çoğalması ve rekombinant GI aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Farklı konsantrasyon değerlerinde tuz içeren üretim ortamlarının kullanıldığı deney sonucunda 30 g/l sorbitol, 4,35 g/l amonyum sülfat, 0,1 M potasyum fosfat tamponu (pH 6), 14,9 g/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1,17 g/l CaSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1 ml/l kloramfenikol ve 4,35 ml/l PTM1 içeren ortamda maksimum hücre konsantrasyonu 6,3 g/l ve maksimum rekombinant GI aktivitesi 3,21 U/l olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte, başlangıç sorbitol konsantrasyonunun hücre çoğalması ve rekombinant GI aktivitesi üzerine etkisinin araştırıldığı deneyde, maksimum hücre konsantrasyonu ve rekombinant GI aktivitesi 50 g/l sorbitol içeren ortamda sırasıyla 7,32 g/l ve 3,6 U/l olarak elde edilmiştir. Çalışmanın ikinci alt programında, 1 l'lik çalışma hacmine sahip pilot ölçek biyoreaktör deneyi gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda, fermentasyon süresince hücre çoğalması, rekombinant GI aktivitesi, AOX aktivitesi, toplam proteaz aktivitesi ve ortamda bulunan organik asit derişimi analiz edilmiştir. Ayrıca, spesifik büyüme hızı, verimler ve spesifik tüketim hızları da hesaplanmış ve sonuçta pH ve oksijenin kontrol edildiği biyoreaktör üretim koşullarının rekombinant GI aktivitesi üzerinde önemli bir artışa sebep olduğu gösterilmiştir. Deney sonucunda, rekombinant GI aktivitesinde 56,1 kat bir artış gözlenmiş ve 12. saatte 202,8 U/l aktivite değeri elde edilmiştir. Bununla birlikte maksimum hücre konsantrasyonu 85,2 g/l olarak 36. saatte

elde edilmiş, bu çalışmayla birlikte, aktif termostabil rekombinant GI enziminin ekstrasellüler olarak ilk kez bir maya hücresinde üretildiği bildirilmiştir.

Kang *et al.* (2012), kitosanaz enzimini üreten *Bacillus subtilis* HD145CCTCCAB 2010353 bakterisini topraktan izole ederek bu enzimi kodlayan geni klonlamış, sekans analizi ile doğruladıktan sonra bu enzimi çözülebilir ve aktif formda *P. pastoris*'te eksprese etmiştir. Ekspresyon seviyesinin 800 mg/l kadar yüksek seviyeye ve enzim aktivitesinin yaklaşık 9000 U/mg'a ulaştığını, optimum pH ve sıcaklığın sırasıyla 5,5 ve 50°C olduğunu bildirmiştir. Ayrıca rekombinant proteinin kısmen glikozillendiğini ve yarı ömrünün 50°C'de 26 saat, 60°C'de ise 23 dakika olduğunu belirlemiştir. Ayrıca enzim aktivitesinin, kitosanın deasetilasyon derecesinin artmasıyla birlikte artış gösterdiğini bildirmiştir.

Li *et al.* (2012), kemikli balıkların metabolizmasında, üreme ve gelişimlerinde anahtar role sahip IGF-1 (insülin benzeri büyüme faktörü) rekombinant proteininin hem teorik araştırmalarda hem de akuakültür uygulamalarında yararlı bir araç olduğunu bildirmiştir. Ancak *E. coli* ekspresyon sistemi kullanılarak üretilen balık IGF-1 proteininin kalitesinde bir eksiklik görüldüğünü ve bu iş için maya ekspresyon sisteminin denendiğini belirtmiştir. Çalışmada IGF-1 proteinini üreten maya ekspresyon sistemini kullanmak için sinyal peptidaz ve E domaini içeren olgun turuncu benekli orfoz balığı IGF-1 peptidini kodlayan cDNA klonlanmış, metanolla indüklenen *P. pastoris* kültür sıvısına salgılanan rIGF-1'in, SDS-PAGE ve western blotlama ile gösterilen moleküler kütesinin 8,7 kDa olduğu tespit edilmiştir. Üretimin 24 saatlik indükleme ile arttığı ve optimum pH'nın 5 olduğu bildirilmiş, rekombinant protein, amonyum sülfat çöktürmesinin ardından Ni<sup>+2</sup> afinite kromatografisi ile saflaştırılmış, 420 ml kültür süpernatantından 17,9 mg protein elde edilmiş ve saflık oranı 92,4 olarak belirlenmiştir. Sonrasında rIGF-1'in MFC-7 ve GP hücre hattının çoğalmasını uyarma yeteneğinde olduğu doğrulanmış ve sonuç olarak *P. pastoris* ekspresyon sisteminin hem araştırma hem de akuakültür uygulamalarında fonksiyonel rIGF-1 üretimi için kullanılabileceği bildirilmiştir.

Jiang *et al.* (2012) tarafından peynir yapımında sütün koagülasyonuna neden olan K-kazeinin çözünmez formu olan para-K-kazeinin oluşması için kazeinin Phe105–Met106 peptid bağına spesifik olarak kıran kimosin, rekombinant olarak elde edilmeye çalışılmıştır. Çalışmada güvenilir ve etkili, alternatif bir süt koagülantı elde etmek için sığira ait prokimosin B seçilerek *P. pastoris*'te ekspresyonu sağlanmıştır. Rekombinant kimosin, salgılanan formda eksprese edilmiş ve süt-koagülasyon aktivitesi göstermiştir. Amonyum sülfat çöktürmesinin ardından iyon değişim kromatografisi yapılmış ve %24,2 oranında yaklaşık 36 kDa moleküler kütleyle sahip saf enzim elde edilmiştir. Proteolizis ölçümü enzimin kazeini spesifik olarak hidroliz ettiğini göstermiş, ayrıca enzimin 25-50°C'de stabil olduğunu ve 37°C'de pH 4'te optimum aktiviteye sahip olduğunu bildirmiştir.  $Mn^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$ ,  $Mg^{+2}$  ve  $Na^{+}$  gibi katyonların rekombinant kimosin aktivitesini artırdığı,  $K^{+}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$  ve daha az miktardaki  $Cu^{+2}$ 'nin inhibe ettiğini bildirmiştir. Sonuçlar, rekombinant sığır kimosininin bir süt koagülantı olduğunu ve peynir üretiminde güvenilir ve etkili enzim olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Yu and Tang (2012), kitin degradasyonu ile biyoaktif kitooligosakkaritlerin yapımında önemli uygulamaya sahip olan *Trichoderma* sp. endokitinaz enziminin aktivitesini artırmak amacıyla *P. pastoris* GS115'te eksprese etmiştir. Elde edilen rekombinant suş %0,5'lik metanol indüksiyonu ile kültür sıvısına enzimin salgılanmasını gerçekleştirmiş, 72 saatlik inkübasyon sonrası enzim aktivitesinin 89,3 U/ml'ye, konsantrasyonunun ise 365 mg/l'ye ulaştığı, kitini parçalayan optimal toz kitin konsantrasyonunun %4, pH'nın 7 ve sıcaklığın 30°C olduğu bildirilmiştir. Sonuçlar rekombinant endokitinazın iyi bir kitin parçalama yeteneğine sahip olduğunu ve gelecekte biyoaktif kitooligosakkarit yapımında kullanılabileceğini göstermiştir.

Seok *et al.* (2012), agarozu  $\alpha$ -1,3 bağından hidroliz eden *Thalassomonas* JAMB A33'ün  $\alpha$ -agarazı kodlayan AgaA genini (2,3 kb) indüklenebilir ekspresyon vektörlerine klonlamış, Pvt-AgaA (ADH1 promotör) ve pYInu-AgaA (GAL10 promotör) plazmitlerini *S. cerevisiae* SEY2102 ve FY833 suşlarına, pPIC9-AgaA plazmitini ise *P. pastoris* GS115 suşuna transfer etmiştir. SEY2102/pYInu-AgaA transformantında rekombinant  $\alpha$ -agaraz aktivitesinin 0,3 U/ml'den 1,6 U/ml'ye ulaştığını ve çalışmada



kullanılan *P. pastoris* ekspresyon sisteminin rekombinant  $\alpha$ -agaraz üretimi için uygun olmadığını ayrıca endüstriyel kullanım için mayada rekombinant  $\alpha$ -agaraz üretiminin gerçekleştirildiği ilk çalışma olduğunu bildirmiştir.

Eom *et al.* (2013), *Candida antarctica* lipaz B (CalB) genini PCR ile çoğaltıp, pPICZ $\alpha$ A plazmitine klonladıktan sonra *P. pastoris* mayasında eksprese etmiştir. Yaklaşık 34 kDa ağırlığındaki CalB, rekombinant *P. pastoris* X-33 tarafından başarılı bir şekilde salgılanmıştır. 140 saatlik çalkalamalı kültürde kuru hücre ağırlığı ve ekstrasellüler lipaz aktivitesinin sırasıyla 5,4 g/l ve 57,9 U/l olduğu belirlenmiştir. 110 saatlik kesikli-beslemeli kültürde ise kuru hücre ağırlığı ve lipaz aktivitesinin sırasıyla 135,7 g/l ve 11,900 U/l'ye yükseldiği tespit edilmiştir. *P. pastoris*'ten elde edilen CalB'nin özellikleri, *Aspergillus oryzae*'den elde edilen ticari enzimle karşılaştırıldığında kinetik çalışmalar ve spesifik aktivitenin, sıcaklık ve pH stabilitesinin, glikozilasyon varlığının, makropor reçinede immobilizasyon derecesinin, oleik asit ve n-butanol arasındaki esterifikasyon reaksiyon ürünlerinin birbirleriyle benzer olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, *P. pastoris* tabanlı ekspresyon sisteminin endüstriyel açıdan ümit verici olduğunun başarılı bir şekilde kanıtlandığı bildirilmiştir.

Zou *et al.* (2013), *Penicillium purpurogenum*'a ait  $\beta$ -glukuronidaz enziminin *E. coli* ve *P. pastoris*'te karşılaştırmalı ekspresyonunu gerçekleştirerek enzimi saflaştırıp karakterize etmiştir. Farklı rekombinant ekspresyon sistemlerinde post-translasyonel modifikasyonların rekombinant enzimin katalitik özellikleri üzerine etkisini araştırmak için *Penicillium purpurogenum* Li3'e ait  $\beta$ -glukuronidaz (PGUS) genini klonlayıp *E. coli* BL21 ve *P. pastoris* GS115'te eksprese etmiştir. Rekombinant *E. coli*'nin bu enzimi ana suşundan 15 kat, *P. pastoris*'in ise 6,9 kat daha yüksek seviyede ürettiğini, rekombinant *E. coli* (PGUS-E) ve *P. pastoris* (PGUS-P)'ten elde edilen enzimin afinite, iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak sırasıyla 35,9 ve 47,4 kat saflaştırıldığını *E. coli*'den elde edilen, glikozillenmemiş PGUS-E proteininin moleküler kütesinin yaklaşık 72,43 kDa ve *P. pastoris*'ten elde edilen, glikozillenmiş PGUS-P proteininin moleküler kütesinin ise yaklaşık 78,83 kDa olduğunu bildirmiştir. Her iki rekombinant enzimin benzer optimum pH'ya sahip olmasına rağmen

glikozillenmiş PGUS-P'nin, glikozillenmemiş PGUS-E ile karşılaştırıldığında önemli seviyede daha yüksek sıcaklık stabilitesine ve metal iyonlarına karşı daha az duyarlılığa sahip olduğu, ayrıca daha düşük  $K_M$  değerine ve  $k_{cat}/K_M$ 'nin daha yüksek olduğunu belirlemiştir. Sonuçların  $\beta$ -glukuronidaz enziminin katalitik özelliği üzerinde *P.pastoris* ekspresyon sistemindeki post-translasyonel modifikasyonların anahtar rolü olduğunu ve prokaryotik ekspresyon sisteminden daha yüksek potansiyel stabilitesi ile endüstriyel enzimlerin fonksiyonel iyileştirilmesinde önemli bir araç olarak kullanılabileceğini gösterdiğini bildirmiştir.

### **3. MATERYAL ve YÖNTEM**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Kimyasallar**

Çalışmada kullanılan besiyeri, moleküler markırlar, kitler ve tüm kimyasallar, Invitrogen Ltd., Sigma Ltd., Fermentas, Difco Lab., Fluka Ltd. ve Merck Ltd. firmalarından temin edildi.

##### **3.1.2. Kullanılan mikroorganizmalar**

Çalışmada Invitrogen firmasından temin edilen *Pichia pastoris* X-33 mayası ve *E. coli* TOP10 bakterisi kullanıldı.

##### **3.1.3. İnsan karaciğer cDNA kütüphanesi**

Invitrogen firmasından temin edilen insan karaciğer cDNA kütüphanesi, PON1 genine ait sekansın PCR ile çoğaltılması için kullanıldı.

##### **3.1.4. Gene spesifik primerler**

PON1 genine ait restriksiyon kesim enzimleri tanıma sekanslarını içeren ileri ve geri primerler, <http://www.appliedbiosystems.com> ( $T_m$  calculator) adresinden uygun  $T_m$  sıcaklıkları hesaplanarak dizayn edildi.

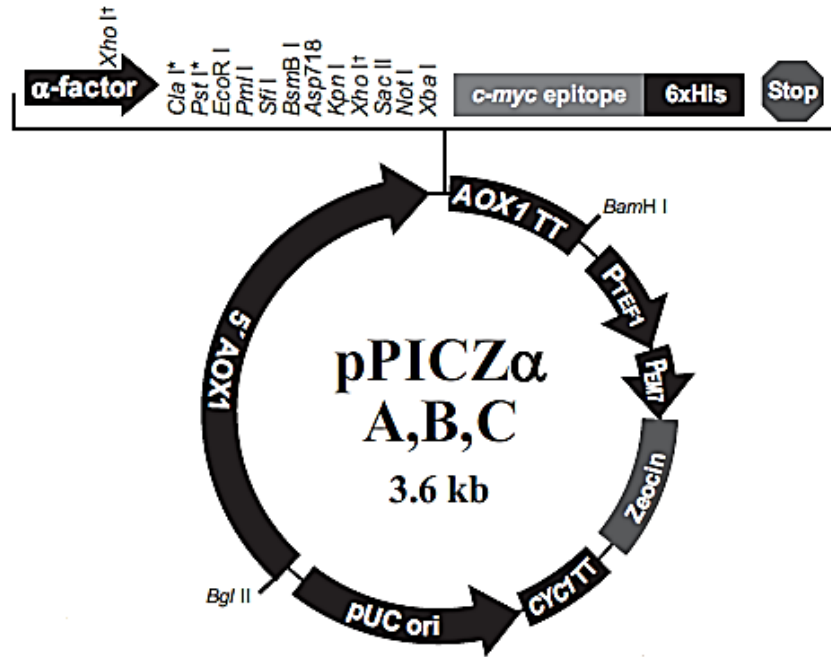
**Çizelge 3.1.** PON1 genini çoğaltmak için dizayn edilen primerler

Primer Adı	Sekansı	T <sub>m</sub> (°C)	%GC	Uzunluk (bç)
<i>EcoRI</i> -PON1 ileri primer	GAG <u>AATTC</u> ATGGCGAAGCTGA	61.20	48	21
<i>XbaI</i> -PON1 geri primer	GCGT <u>CTAGA</u> GAGCTCACAGTAAAGAG	60.19	44	26

\*Altı çizili kısımlar restriksiyon enzim tanıma bölgesini gösterir.

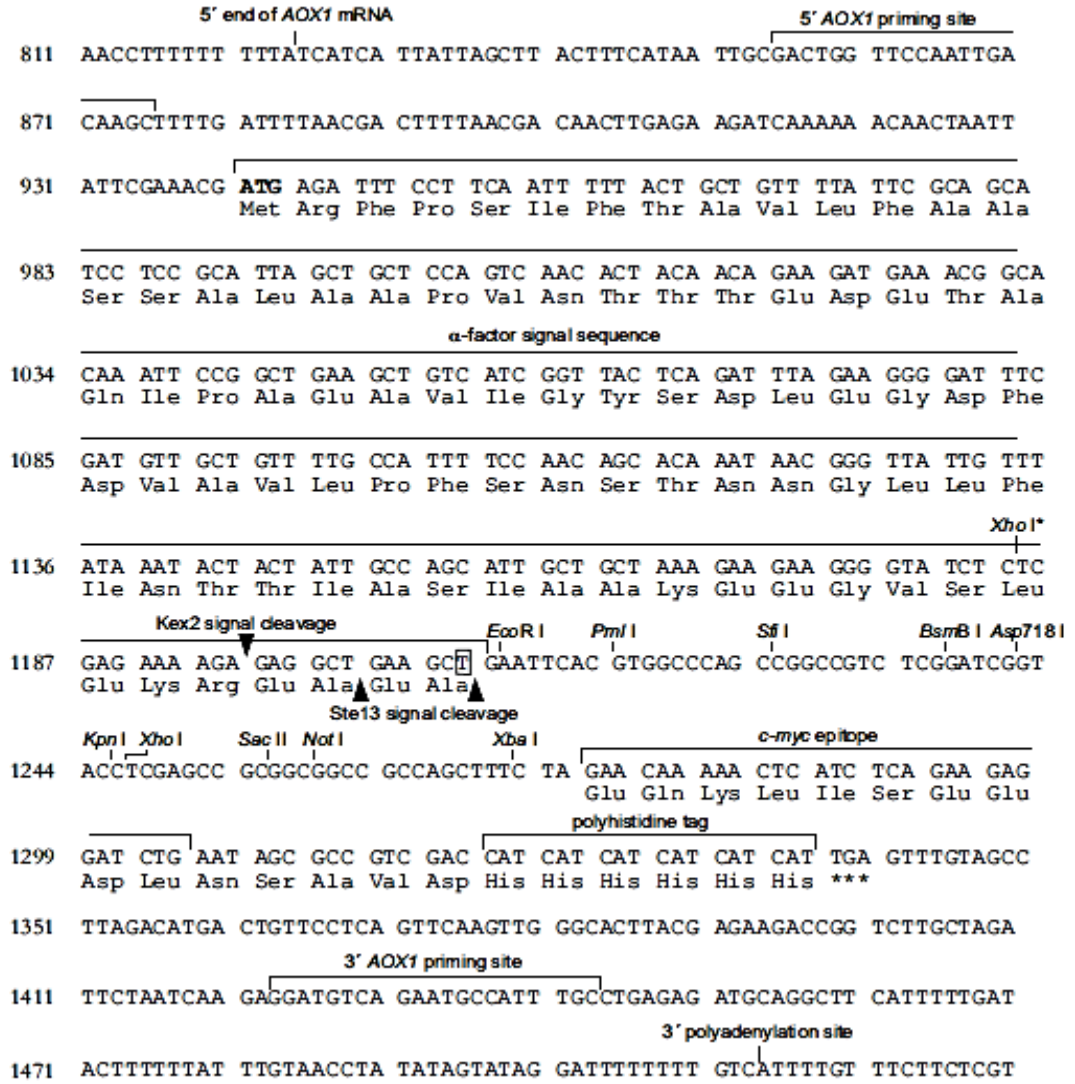
### 3.1.5. pPICZ $\alpha$ A vektörü

Çalışmada kullanılan pPICZ $\alpha$ A vektörü, Invitrogen firmasından temin edildi. Vektörün şekli ve gen haritası Şekil 3.1 ve Şekil 3.2’de verildi.

**Şekil 3.1.** pPICZ $\alpha$  A,B,C vektörü

pPICZ $\alpha$  vektörlerinin yalnızca çoklu klonlama bölgeleri farklılık gösterirken aşağıda belirtilen diğer bölgeleri ortaktır (*Pst* I, B tipi ve *Cla* I, C tipi vektörde bulunur).

- AOX1 promotörünü içeren 5' fragment; rekombinant gen ekspresyonunu düzenler, metanolle indüklenir.
- $\alpha$  sekresyon sinyal faktörü; üreme ortamına rekombinant proteinin sekresyonunu sağlar.
- Zeosin antibiyotiğine direnç geni; hem *E. coli* hem de *Pichia*'da transformant seçimi sağlar.
- PUC orjini; *E.coli*'de yüksek kopya replikasyonu sağlar.
- Çoklu klonlama bölgesi; on iki restriksiyon enziminin tanıma sekansını içerir.
- AOX1 terminatör bölgesi; etkili transkripsiyon terminasyonu sağlar.
- C-myc epitop ve polihistidin (6xHis) kuyruğu içeren C-terminal peptid; rekombinant proteinin kolay saflaştırılması için kullanılır (Invitrogen 2010b).



**Şekil 3.2.** pPICZαA plazmitine ait çoklu klonlama bölgesinin nükleotid sekansı (Invitrogen 2010b)

### 3.1.6. Kesim enzimleri (Restriksiyon Endonükleazlar)

www.restrictionmapper.org adresinden vektöre yerleştirilecek geni kesmediği belirlenen *EcoRI*, *XbaI* ve *PmeI* kesim enzimleri, Fermentas firmasından temin edildi (**EK 6**). Kullanılan kesim enzimleri, bu enzimlerin tanıma sekansları ve kesim noktaları Çizelge 3.2'de verildi.

**Çizelge 3.2.** Kesim enzimlerinin tanıma sekansları ve kesim noktaları

<b>Enzim</b>	<b>Hedef bölge</b>
<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'

### 3.1.7. Vektöre ait primerler

Rekombinant vektörü PCR'da çoğaltarak kontrol analizi yapmak için aşağıdaki sekansa sahip primerler kullanıldı.

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

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

### 3.1.8. Kullanılan besiyerler

Rekombinant vektör, *E. coli* TOP10 hücrelerine transforme edildikten sonra rekombinant hücrelerin seçimi ve çoğaltılması için zeosin antibiyotiği içeren LSLB agar ve sıvı besiyeri (**EK 1**), *E. coli* hücrelerinden saflaştırılan rekombinant vektörün *P. pastoris*'e transformasyonunun ardından hücrelerin gelişmesi için zeosin antibiyotiği içeren YPD agar ve sıvı besiyeri (**EK 1**) ve PON1 enziminin ekspresyonu için BMGY (ön kültür) ve BMMY (üretim) besiyeri (**EK 1**) kullanıldı (Invitrogen 2010a).

### 3.1.9. Tampon ve stok solüsyonlar

Çalışmada kullanılan tampon ve stok solüsyonların içeriği ve hazırlanışı **EK 2**'de verildi.

### 3.2. Yöntem

#### 3.2.1. PON1 genine ait sekansın çoğaltılması

NCBI'da (National Center for Biotechnology Information) tespit edilen 'insan paraoksonaz1' (NM\_000446.5) transkriptine ait sekansın (**EK 3**) amplifikasyonu için dizayn edilen ileri ve geri primerler ile Çizelge 3.3 ve 3.4'teki uygun gradient PCR protokolü uygulanarak PON1 genine ait sekans çoğaltıldı.

**Çizelge 3.3.** cDNA'nın PCR ile amplifikasyonu

PCR reaksiyon karışım içeriği	Miktar
cDNA (1/10)	3 µl
dNTP mix (10 mM)	0,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1µl
<i>Eco</i> RI-PON1 İ primer (10 pmol/µl)	1 µl
<i>Xba</i> I-PON1 G primer (10 pmol/µl)	1 µl
10xPCR buffer	2 µl
ddH <sub>2</sub> O	6 µl
Taq DNA polimeraz	0,6 µl
Toplam	15,1 µl

**Çizelge 3.4.** PCR şartları

Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)
1	94	4
35	94	1
	59-63,2	1
	72	1:30
1	72	5
	4	∞



### **3.2.2. Rekombinant vektörün elde edilmesi**

PON1 enziminin üretimi ile ilgili gen bölgesi, dizayn edilen ileri ve geri primerler ile PCR’da çoğaltıldıktan sonra uygun restriksiyon enzimi ile kesilip genin aktarılacağı vektör (pPICZαA) de aynı enzimle kesildikten sonra ligasyon yapıldı. Bu işlem sonucunda rekombinant vektör elde edildi.

#### **3.2.2.a. PCR ürününün agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi**

Bu aşamada %1’lik agaroz jel hazırlandı. Bunun için hazırlanan miktara göre %1 oranında tartılan agaroz, gerekli miktarda 1xTAE içerisine alındı. Mikrodalga fırında eritilen bu karışım, 35-40°C’ye kadar soğutulduktan sonra son konsantrasyon 0,5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromür eklenip jel katılaşmaya bırakıldı. Jelin katılaşmasını takiben yükleme boyası ile karıştırılan PCR ürünleri kuyucuklara yüklenip 60-70 V’de markırla birlikte 45-60 dk yürütüldü. Yürüme işlemi tamamlandığında bantlar, UV ışık altında gözlemlendi (Sambrook 2001).

#### **3.2.2.b. PCR ürününün jelden ekstraksiyonu**

PCR ile amplifiye edilen PON1 geni, restriksiyon enzimleri ile kesim öncesinde jelden ekstraksiyonla saflaştırıldı. Bu işlem için Sigma firmasından temin edilen ‘Gen Elute™ Jel Ekstraksiyon Kiti’ kullanıldı. Tüm santifüj basamakları 12000-16000 g’de gerçekleştirildi. Agaroz jelde yürütülen ve UV ışık altında görülen bantlar bant kesme aparatı ile jelden kesildi. Alınan bantların ağırlığı tespit edilerek her 100 mg jel için 300 µl ‘jel çözme solüsyonu’ ilave edilip karışım, her 2-3 dk’da bir vortekslenerek 55°C’de 10 dk inkübe edildi. Kolon, 2 ml’lik ependorf tüpüne yerleştirilerek üzerine 500 µl ‘kolon hazırlama solüsyonu’ eklendi. 1 dk santrifüjlendikten sonra sıvı kısım uzaklaştırıldı. 1 jel hacmi kadar saf izopropanol eklenerek homojen hale gelinceye kadar karıştırıldı. Karışım, hazırlanan kolona aktarılıp 1 dk santrifüj edildikten sonra sıvı kısım uzaklaştırıldı. Üzerine 700 µl ‘yıkama solüsyonu’ eklenerek 1 dk santrifüj edildi. Sıvı kısım uzaklaştırılıp kolon tekrar yerleştirilerek ekleme yapılmadan 1 dk

santrifüjlendi. Kolon yeni bir tüpe alınarak üzerine 50 µl 'elüsyon tamponu' eklenip 1 dk santrifüj edildikten sonra saf olarak elde edilen PCR ürünü kesim için kullanıldı.

### 3.2.2.c. PCR ürününün restriksiyon enzimleri ile kesimi

Kesim enzimlerinin tanıma sekanslarını içeren PON1 genine ait PCR ürünü jelden ekstraksiyonla saflaştırıldıktan sonra *EcoRI* ve *XbaI* enzimleri ile kesildi.

**Çizelge 3.5.** PCR ürünü kesim reaksiyonu 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
Toplam	29 µl

Çizelge 3.5'teki gibi hazırlanan karışım, 37°C'de 30 dk inkübe edildi. 80°C'de 5 dk gerçekleştirilen enzim inaktivasyonunun ardından tüpe 1µl *XbaI* enzimi ilave edildi. Karışım 37°C'de 30 dk inkübe edilip, 65°C'de 20 dk inaktivasyon gerçekleştirildi. Reaksiyondan sonra kesilen genin fenol/kloroform ile ekstraksiyonu gerçekleştirildi.

### 3.2.2.d. Kesilen ürünün fenol/kloroform ekstraksiyonu

Her iki enzim ile kesilen DNA solüsyonu, steril saf su ile 100 µl'ye tamamlandı. Üzerine yarım hacim fenol/kloroform/izoamil alkol (25/24/1) ilave edilerek 20 sn vortekslendi. 14500 rpm'de oda sıcaklığında 10 dk santrifüj edildi. Üst faz, temiz bir tüpe alınıp alınan fazın 1/10 hacmi kadar 3 M sodyum asetat ve 2,5 hacim saf etanol ilave edilerek vortekslendi. 14500 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırılarak pelet, 10-20 µl TE tamponunda çözüldü (Kaymak 2008).

### 3.2.2.e. Vektör DNA'nın kesimi

PCR ürününün kesimi ve saflaştırılmasının ardından vektör DNA da aynı enzimlerle kesilerek 5' ucundaki fosfat gruplarını uzaklaştırmak için CIAP enzimi ile muamele edildi.

**Çizelge 3.6.** Vektör DNA'nın kesim reaksiyonu karışım içeriği

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

Çizelge 3.6'daki gibi hazırlanan karışım, 37°C'de 30 dk inkübe edildi. Daha sonra 80°C'de 5 dk enzim inaktivasyonu gerçekleştirildi. Tüpe 1µl *Xba*I ilave edildikten sonra 37°C'de 30 dk inkübe edilip 65°C'de 20 dk inaktivasyon gerçekleştirildi. Ardından 1µl CIAP ilave edilerek 37°C'de 5 dk inkübe edildi. Bu reaksiyon sonucu lineer hale getirilen plazmit, jelde yürütülerek kesilip kesilmediği teyit edildi.

### 3.2.2.f. Vektör DNA'nın jelden ekstraksiyonu

Kesim reaksiyonu sonrası jele yüklenip yürütülen örnek, 3.2.2.b'deki gibi jelden ekstrakte edilerek hem CIAP uzaklaştırılmış hem de kesilen vektör DNA saflaştırılmış oldu.

### 3.2.3. Ligasyon reaksiyonu

Vektöre yerleştirilecek gen ve vektör DNA, restriksiyon enzimleriyle kesildikten sonra reaksiyon karışımına gen /vektör DNA oranı 3/1 olacak şekilde aşağıdaki eşitliğe göre

hesaplanarak ilave edildi (Büyüksungur 2006).

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

**Çizelge 3.7.** Vektör DNA ve vektöre yerleştirilecek genin ligasyon reaksiyonu karışım içeriği

Reaksiyon karışım içeriği	Miktar
Saf su	19,5 µl
5x ligasyon tamponu	8 µl
Vektör DNA	2 µl (72 ng)
Vektöre yerleştirilecek DNA	8 µl (66 ng)
T4 DNA ligaz	2,5 µl
Toplam	40 µl

Çizelge 3.7'deki gibi hazırlanan ligasyon reaksiyonu 16°C'de 16 saat inkübe edilerek gerçekleştirildi.

#### 3.2.4. Rekombinant vektörün kompetent *E. coli* TOP10 hücrelerine transformasyonu

Elde edilen ligasyon ürününün bakteri hücrelerine transformasyonu için -86°C'den alınan kompetent hücre tüpü buz üzerinde çözülüp üzerine 1-5 µl DNA (10 pg-100 ng) ilave edilerek yavaşça karıştırıldı. Tüp, buz üzerinde 30 dk inkübe edildikten sonra ısı şoku için hücreler çalkalamadan 42°C'de 30 sn bekletildi. Süre sonunda 42°C'den alınarak buz üzerinde 2 dk bekletildi. Tüpe steril ortamda önceden ısıtılmış S.O.C besiyerinden 250 µl ilave edilip kapağı sıkıca kapatılarak çalkalayıcı inkübatörde 37°C'de 225 rpm'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Önceden ısıtılmış LSLB-zeosin seçim plaklarına transformasyon karışımından 20-200 µl yayılarak 37°C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı (Invitrogen 2010a).

### 3.2.5. PON1 genine ve vektör DNA'ya ait primerler kullanılarak ilgili sekansların koloni PCR ile amplifikasyonu

İnkübasyon sonrası gelişen kolonilerden 34 koloni seçilip vektöre yerleştirilen PON1 genine ve vektör DNA'ya ait primerlerin kullanıldığı Çizelge 3.8 ve 3.9'daki PCR protokolü uygulanarak koloni PCR yapıldı. PCR reaksiyonu kurmak için koloniden çok küçük miktar mikropipet ucu ile alınarak pipet ucu, PCR reaksiyon karışımı üzerine yerleştirilip etrafında sabitçe çevrildikten sonra PCR reaksiyonu başlatıldı (Kaymak 2008).

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

PCR reaksiyon karışım içeriği	Miktar
dNTP mix (10 mM)	0,8 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1 µl
İleri primer (10 pmol/µl)	1 µl
Geri 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.** PCR reaksiyon şartları

Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)
1	94	4
35	94	1
	61/59	1
	72	1:30
1	72	5
	4	∞

Agaroz jel elektroforezinde PON1 genine ait, bant görülen kolonilerden 9., 16., 17., 23., 24., 25., 27., 28. ve 30. kolonilerle gene ve vektöre ait primerler kullanılarak ikinci bir koloni PCR yapıldı.

### **3.2.6. Muhtemel rekombinant kolonilerden plazmit DNA izolasyonu**

Bu işlem için ‘Invitrogen-PureLink-Hi-Pure plazmit DNA saflaştırma kiti’ kullanıldı. Transforme edilmiş *E. coli* hücreleri LSLB-zeosin besiyerinde 1 gece geliştirildi ve bakteri hücreleri 600 nm de optik dansite 2,0 (OD<sub>600</sub>) olduğunda yüksek kopya sayılı plazmitler için bir mikrosantrifüj tüpüne 1 gecelik kültürden 1-3 ml alınıp 4000 g’de 5-10 dk santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Pelete 0,4 ml RNase içeren ‘resüspanسیون tamponu’ ilave edilerek hücreler, homojen oluncaya kadar süspanse edildi. Üzerine 0,4 ml ‘lisis tamponu’ ilave edilen lizat karışımı, yavaşça ters çevrilerek tamamen homojen oluncaya kadar karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi. 0,4 ml ‘presipitasyon tamponu’ ilave edilip tüpler ters çevrilerek tamamen homojen oluncaya kadar karıştırıldı. Lizat, 12000 g’de oda sıcaklığında 10 dk santrifüjlendi. Elde edilen süpernatant, dengelenen kolona yüklenip kolondaki solüsyonun yerçekimi ile akıp kuruması beklendi. Kolon, iki kez 2,5 ml ‘yıkama tamponu’ ile yıkanıp her yıkamadan sonra kolondaki solüsyonun yerçekimi ile akıp kuruması beklendikten sonra alttaki sıvı uzaklaştırıldı. Kolonun altına steril bir elüsyon tüpü yerleştirildi. 0,9 ml ‘elüsyon tamponu’ eklenerek solüsyonun yerçekimi ile akıp kuruması beklendikten sonra kolon atıldı. Elüsyon tüpüne 0,63 ml izopropanol ilave edilerek iyice karıştırıldıktan sonra 12000 g’de 4°C’de 30 dk santrifüj edilip süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. DNA peleti 1 ml %70’lik etanol ile süspanse edilip 12000 g’de 4°C’de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. 10 dk süreyle havada kurutulan DNA peleti, 50 µl ‘TE tamponu’nda süspanse edildi. Saflaştırılan DNA kullanılmak üzere +4°C’de saklandı.

### 3.2.6.a. Kolonilerden izole edilen muhtemel rekombinant plazmitlerin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi

9., 16., 25., 27., 28. ve 30. kolonilere ait izole edilen plazmit solüsyonlarından 5'er µl jele yüklenerek 60 V'de 45-60 dk yürütüldü.

### 3.2.6.b. Vektöre ait primerler kullanılarak izole edilen plazmit sekansının PCR ile amplifikasyonu

İzole edilen 9., 16., 25., 27., 28. ve 30. koloni plazmitlerinin vektör ileri ve vektör geri primerleri (Vİ/VG) ile Çizelge 3.10 ve 3.11'de belirtildiği şekilde PCR protokolü uygulandı.

**Çizelge 3.10.** Muhtemel rekombinant plazmit ile yapılan PCR reaksiyonu karışım içeriği

PCR reaksiyon karışım içeriği	Miktar
dNTP mix (10 mM)	0,8 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1 µl
Plazmit DNA	3 µl
Vektör İ primer (10 pmol/µl)	1 µl
Vektör G primer (10 pmol/µl)	1 µl
10xPCR buffer	2 µl
ddH <sub>2</sub> O	5,6 µl
Taq DNA polimeraz	0,6 µl
Toplam	15 µl

**Çizelge 3.11.** PCR reaksiyon şartları

Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)
1	94	4
35	94	1
	59	1
	72	1:30
1	72	5
	4	∞

**3.2.6.c. Muhtemel rekombinant plazmitin *EcoRI* ve *XbaI* ile kesilmesi**

30. koloniden izole edilen muhtemel rekombinant plazmitin miktarı belirlendikten sonra *EcoRI* ve *XbaI* enzimleriyle kesim reaksiyonu gerçekleştirildi.

**Çizelge 3.12.** Muhtemel rekombinant plazmit kesim reaksiyonu karışım içeriği

Reaksiyon karışım içeriği	Miktar
dH <sub>2</sub> O	15 µl
10xFast Digest Green Buffer	2 µl
Vektör DNA	1 µl
<i>EcoRI</i>	1 µl
Toplam	19 µl

Çizelge 3.12'deki gibi hazırlanan karışım, 37°C'de 30 dk inkübe edildikten sonra 80°C'de 5 dk enzim inaktivasyonu gerçekleştirildi. 1µl *XbaI* ilave edilen karışımın 37°C'de 30 dk inkübasyonundan sonra 65°C'de 20 dk inaktivasyon gerçekleştirildi. Reaksiyon sonrası örnek, jele yüklenerek vektör DNA'ya ve vektöre yerleştirilecek gene ait bantlar gözlemlendi.



### 3.3. Gliserolde stoklama

Doğru transformant tespit edildikten sonra rekombinant plazmiti taşıyan hücrelerin çoğaltılarak gliserolde stoklanması için koloniden alınan bakteri 25 µg/ml zeosin içeren LSLB plağa ekilerek 37°C’de 1 gece inkübasyona bırakıldı. Gelişen kolonilerden biri alınarak 10 ml, LSLB-zeosin sıvı besiyerine inoküle edildi. OD<sub>600</sub> değeri 0,5-0,7 oluncaya kadar hücrelerin büyümesi sağlandı. 0,85 ml kültür sıvısı, 0,15 ml steril gliserol ile karıştırılarak hızlıca sıvı azotta dondurulduktan sonra -86°C’de stoklandı.

### 3.4. *E. coli* hücrelerinden saflaştırılan rekombinant vektörün sekans analizi

Plazmitlere klonlanan genlerin sekans analizinde dizayn edilen primerler kullanılarak klonlamanın doğruluğunu kontrol etmek için gliserolde stoklanan rekombinant plazmiti taşıyan hücreler, LSLB-zeosin sıvı besiyerinde çoğaltılıp 3.2.6’daki gibi rekombinant plazmit izole edilerek elde edilen hibrid genin nükleotid sekans analizi IONTEK firması (İstanbul) laboratuvarlarında DNA sekans analiz cihazı ile yapıldı.

### 3.5. *E. coli* hücrelerinden saflaştırılan rekombinant vektörün lineer hale getirilmesi

Saflaştırılan rekombinant plazmitin maya genomuna entegre olabilmesi için AOX promotör bölgesinden *PmeI* enzimi ile lineer hale getirildi. Bu işlem için Çizelge 3.13’teki gibi hazırlanan karışım, 37°C’de 30 dk inkübasyona bırakıldı. 65°C’de 10 dk inaktivasyon yapıldı. 1 µl CIAP ilave edilerek 50°C’de 5 dk inkübe edildi. Rekombinant vektörün kesilip kesilmediğini anlamak için tüplerdeki karışımdan 2’şer µl agaroz jele yüklenerek yürütüldü.

**Çizelge 3.13.** Rekombinant plazmit kesim reaksiyonu karışım içeriği

<b>Reaksiyon karışım içeriği</b>	<b>Miktar</b>
Steril Su	15 µl
10xFast Digest Buffer	2 µl
Plazmit	2 µl
<i>PmeI</i>	1 µl
Toplam	20 µl

### 3.5.1. Kesilen rekombinant vektörün fenol/kloroform ile ekstraksiyonu

Kesilen DNA solüsyonu steril saf su ile 300 µl'ye tamamlandı. Üzerine yarım hacim fenol/kloroform/izoamil alkol (25/24/1) ilave edilerek 20 sn vortekslendi. 14500 rpm'de oda sıcaklığında 10 dk santrifüj edildikten sonra üst faz temiz bir tüpe alındı. Alınan fazın 1/10 hacmi kadar 3 M sodyum asetat ve 2,5 hacim saf etanol eklenerek vortekslendi. 14500 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırılarak pelet havada kurutulduktan sonra 50 µl steril saf suda çözüldü (Kaymak 2008).

### 3.5.2. Lineer rekombinant vektörün *P. pastoris*'e transformasyonu ve seleksiyonu

Transformasyon işlemi, üretici firmanın tarifine göre LiCl metodu kullanılarak gerçekleştirildi (Invitrogen 2010a). Bu amaçla *PmeI* enzimi ile kesilip fenol/kloroform ile ekstrakte edilen rekombinant vektörün kompetent yapılan maya hücrelerine transformasyon işlemi gerçekleştirildi.

#### 3.5.2.a. Kompetent *P. pastoris* hücrelerinin hazırlanması

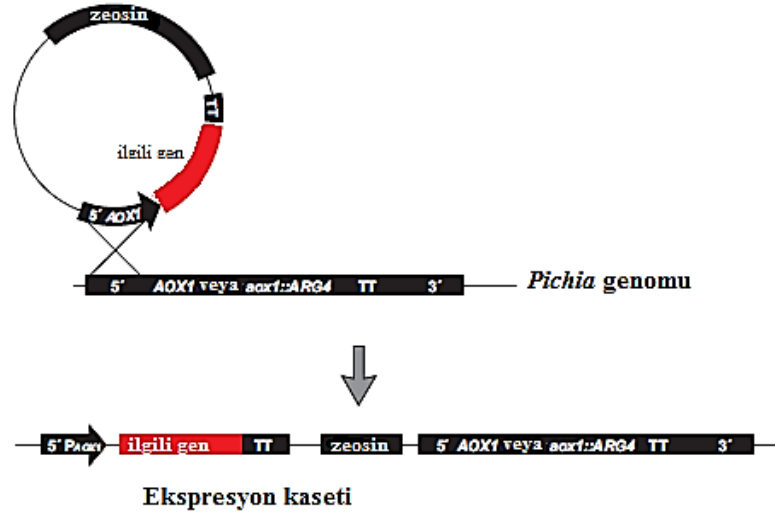
*P. pastoris* X-33'ün YPD agarda 30°C'de 60 saat inkübasyonunun ardından kültürden tek koloni alınarak YPD sıvı besiyerine inoküle edilen hücrelerin OD<sub>600</sub> değeri 0.8-1'e ulaştığında kültür sıvısı, 4°C'de, 1500 g'de 4dk santrifüjlendi. Süpernatantı uzaklaştırılan pelet, steril saf su ile yıkanıp tekrar 1500 g'de 6 dk santrifüj edildi. Elde edilen pelet, 1 ml 100 mM LiCl solüsyonu ile yeniden süspanse edilerek 1,5 ml'lik

mikrosantrifüj tüpüne transfer edildi. 15 sn maksimum hızda santrifüj edildikten sonra LiCl pipetle uzaklaştırılıp hücreler yeniden 400 µl, 100 mM LiCl ile süspanse edildi. Her bir transformasyonda kullanılmak üzere hücre süspansiyonu, ependorf tüplerde 50 µl'lik alikuotlar halinde hazırlandı.

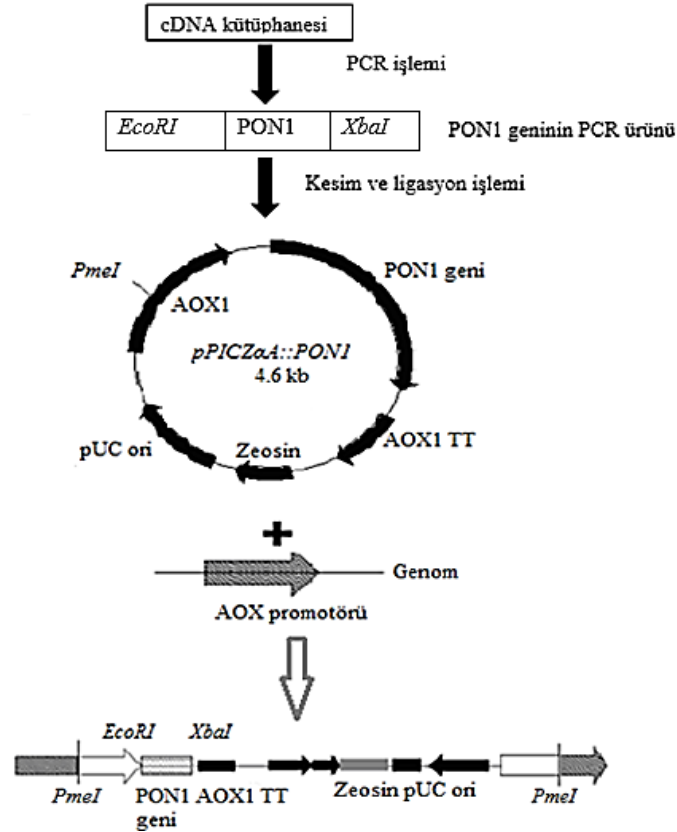
### **3.5.2.b. Transformasyon**

Transformasyon işlemi, kompetent hücreler hazırlandıktan sonra derhal yapıldı. Bu işlem için; 25 µl som balığı sperm DNA'sı (2 mg/ml) 5 dk kaynatılıp hızlı bir şekilde buz üzerinde soğutuldu. Kompetent yapılan alikuot halindeki hücre peleti 4000 g'de 2 dk santrifüjlenerek LiCl pipetle uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin üzerine sırasıyla 240 µl %50 PEG, 36 µl 1 M LiCl, 25 µl som balığı sperm DNA'sı, 50 µl steril saf su içinde lineer plazmit DNA (5-10 µg) ilave edildi. Karışım, hücre peleti tamamen çözülünceye kadar hızlıca vortekslenip 30°C'de 30 dk çalkalamadan inkübe edildikten sonra 42°C'ye ayarlı su banyosuna alınarak 20-25 dk bekletildi. 4000 g'de santrifüjlenerek süpernatant uzaklaştırıldı. Hücreler, antibiyotik içermeyen 1 ml YPD ile süspanse edilip 30°C'de çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyondan 1 saat ve 4 saat sonra uygun konsantrasyonda zeosin (400 µg/ml) içeren YPD plaklarına 25-100 µl süspansiyon yayılıp plaklar 30°C'de 2-3 gün inkübe edildi.

Transformasyonu takiben rekombinant vektörün maya genomunun 5' AOX1 bölgesine basit krossing-over olayı ile gerçekleşen entegrasyonu Şekil 3.3 ve 3.4'te verildi.



**Şekil 3.3.** Transformasyon sonrası *Pichia* genomunda gerçekleşen basit crossing-over olayı (Invitrogen 2010a)



**Şekil 3.4.** pPICZαA::PON1'in *P. pastoris* genomuna entegrasyonunun şematik gösterimi

(Genomun her iki ucundaki AOX promotörüne homolog bölgeye sahip rekombinant plazmit, *PmeI* enzimi ile AOX promotör bölgesinden kesilerek lineer hale getirilir. Plazmitin genomu entegrasyonundan sonra genomda AOX promotörünün iki fonksiyonel kopyası bulunur)

### 3.6. Doğru transformant seçimi için koloni PCR ile kontrol analizi

İnkübasyon sonrası YPD-zeosin agarda gelişen kolonilerden 6 tanesi seçilip PON1 genine ve vektör DNA'ya ait ileri ve geri primerler kullanılarak PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Bu işlem için test edilecek maya kolonilerinden çok küçük miktar mikropipet ucu ile alınıp, pipet ucu PCR tüplerine yerleştirildi ve tüpler mikrodalga fırının maksimum sıcaklığında 3 dk ısıtıldıktan sonra her bir tüpe Çizelge 3.14'te verilen PCR karışımı ilave edilerek Çizelge 3.15'te belirtildiği gibi PCR reaksiyonu başlatıldı (Kaymak 2008).

**Çizelge 3.14.** Koloni PCR reaksiyon karışım içeriği

PCR reaksiyon karışım içeriği	Miktar
dNTP mix (10 mM)	0,8 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1µl
<i>Eco</i> RI-PON1/Vektör İ primer (10 pmol/µl)	1 µl
<i>Xba</i> I-PON1/Vektör G 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 3.15.** PCR reaksiyon şartları

Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)
1	94	4
	94	1
35	61/59	1
	72	1:30
	72	5
1	4	∞

### 3.7. Rekombinant *P. pastoris*'in gliserolde stoklanması

Doğruluğu tespit edilen tek koloniler, YPD agardan toplanarak bir gece YPD sıvı besiyerinde geliştirildikten sonra santrifüj edilerek toplanan hücreler %15 gliserol içeren YPD besiyerinde yeniden süspanse edilerek sıvı azotta hızlıca dondurulup -86°C'de stoklandı.

### 3.8. Rekombinant PON1 enziminin üretimi

Doğru *P. pastoris* transformantları seçildikten sonra PON1 enziminin üretimi için YPD agarda 48-72 saat geliştirilen rekombinant hücreler, ön yetiştirme için BMGY besiyerinde 30°C'de 225 rpm'de 18 saat inkübe edildikten sonra oda sıcaklığında, 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek BMMY üreme besiyeri ile süspanse edilip, 50 ml besiyeri içeren 500 ml hacimli bölmeli erlenmayerlerde 30°C'de 280 rpm'de 120 saat inkübe edildi. Her 24 saatte bir besiyerine gen indüksiyonu için %0,5 saf metanol ilave edildi. Her 24 saatlik inkübasyon sonrası alınan örnekler, 4°C'de, 3000 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek elde edilen süpernatantlarda aktivite ölçümü ve protein analizi yapıldı.

#### 3.8.1. Rekombinant protein analizi

İnkübasyon sonucu elde edilen kültürden alınan örneklerden santrifüj sonrası elde edilen süpernatantın 50 µl'si SDS-PAGE jel yükleme tamponu (**EK 2**) ile karıştırıldı. 5 dk kaynatıldıktan sonra 10-20 µl örnek jelle yüklenip yürütme sonucu protein bantları gümüş boyama yapılarak gözlendi.

##### 3.8.1.a. SDS-PAGE analizi ve gümüş boyama

Elektroforez plakaları önce su sonra alkol ile iyice yıkandı. İki cam plaka birbiri üzerine konup jel hazırlama aparatına yerleştirilerek sıkıştırıldı. Ayırma jeli hazırlandıktan sonra plakalar arasına pipetle dökülerek jel yüzeyinin düzgün olması için izopropanol ile ince

bir tabaka oluşturuldu. Polimerleşme gerçekleştikten sonra üzerindeki izopropanol dökülüp yağma jeli üst yüzeye kadar ilave edilerek tarak dikkatlice yerleştirildi. Polimerleşmenin ardından tarak çıkarılarak plakalar elektroforez tankına yerleştirilip yürütme tamponu ilave edildi. Hazırlanan numunelerden kuyulara 10-20 µl yüklenerek önce 60 V'de 30 dk daha sonra 120 V'de 90 dk oda sıcaklığında yürütüldü (Laemmli 1970). Süre sonunda cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Çıkarılan jel, 'tespit solüsyonu'na alınarak 30 dk yavaşça çalkalandı. Süre sonunda 'redüksiyon solüsyonu'na alınıp 30 dk çalkalandıktan sonra saf su içerisine alınarak 5 dk çalkalandı ve bu işlem 3 kez tekrarlandıktan sonra 'boyama solüsyonu'na alınarak 20 dk çalkalanmaya bırakıldı. Boyamadan sonra saf su ile yıkanan jel, 'yıkama-1 solüsyonu'na alınıp standart protein bantları görününceye kadar yavaşça elle çalkalandı. Daha sonra 'yıkama-2 solüsyonu'na alınarak zemin rengi açılıncaya kadar bekletildi. Saf su içerisine alınan jel görüntülendi (Kullanılan solüsyonlar **EK 2**'de verildi).

### **3.8.2. Western blot tekniğinin uygulanması**

#### **3.8.2.a. Protein örneklerini TCA (Trikloroasetik asit) ile çöktürme**

Western Blot analizi yapılırken öncelikle jele yüklenecek örneklerin protein konsantrasyonunu artırmak için TCA çöktürmesi yapıldı. Bu işlem için; 1 hacim TCA çözeltisi (**EK 2**) 4 hacim örnek üzerine ilave edilerek elde edilen karışım, 4°C'de 10 dk inkübe edildikten sonra 13000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Pelet üzerine 200 µl soğuk aseton ilave edilerek yıkama yapıldı. 13000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Asetonla yıkama işlemi tekrarlandıktan sonra pelet, 95°C'ye ayarlanan ısı bloğunda kurutuldu. Kuruyan pelet, yükleme tamponunda çözülerek jele yüklendi (Bensadoun and Weinstein. 1976).

#### **3.8.2.b. SDS jelinin hazırlanması ve yüklenmesi**

SDS-PAGE jeli 3.8.1.a'da anlatıldığı gibi hazırlanarak kuyulara yüklenen örnekler elektroforezde yürütüldü.

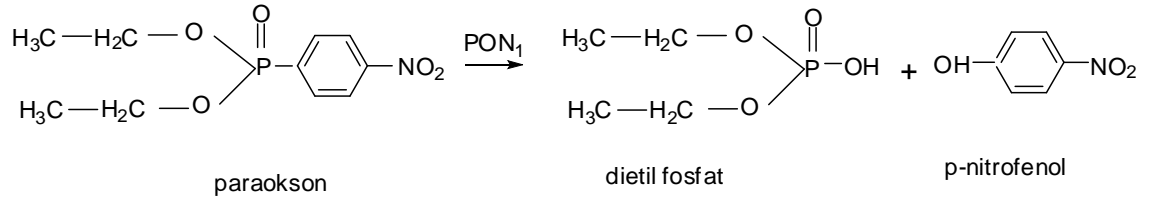
### 3.8.2.c. Blotlama

TCA çöktürmesi yapıp SDS-PAGE jelinde yürütülen rekombinant protein için uygun Anti-His (C-term)-HRP antikorunu (Invitrogen<sup>TM</sup>) ile western blot analizi yapıldı. Bu işlem için; SDS- PAGE jel elektroforezinde yürütülen jel, musluk suyunda yıkandıktan sonra '1x transfer tamponu'nda 5 dk bekletildi. Membranlar kullanılmadan önce metanol ile 5 dk muamele edildikten sonra 1x transfer tamponu ile 5 dk muamele edildi. Semidry Blotlama cihazına sıra ile 4-5 parça blot kağıdı, nitroselüloz membran, jel ve 4-5 parça blot kağıdı konulup cihaz kapatıldı. 1 watt elektriksel alana konularak 75 dk blotlama işlemi yapıldı. Süre sonunda membran alınıp, bantların geçtiği yüze gelecek şekilde 10 ml 'bloklama tamponu'nda 1 saat oda sıcaklığında çevrilerek inkübe edildi. İnkübasyonun ardından membran, 20 ml 'PBST' (Phosphate-Buffered Saline + Tween 20) ile 2 kez 5 dk yavaşça çevrilerek yıkandı. 5 ml bloklama tamponuna 1 µl Anti-His (C-term)-HRP antikorunu ilave edildi. 1 gece +4°C'de yavaş çalkalama ile inkübe edildi. Süre sonunda membran 20 ml PBST ile yavaşça çalkalanarak 2 kez 5 dk yıkandı. Femto ve Pico substratları (ECL reagent) kullanılarak antikorun kimyasal sinyal oluşturması sağlanarak görüntülendi. Ayrıca nitroselüloz membran Coomassie Brilliant Blue ile boyanarak da görüntülenmesi sağlandı (Budak 2009).

### 3.8.3. Kültür sıvısında enzim aktivite tayini

Enzimin paraoksonaz aktivitesi, 25°C'de 1 mM CaCl<sub>2</sub> içeren 50 mM glisin/NaOH tamponu (pH 10,5) içerisinde paraoksonun substrat olarak kullanılmasıyla (2 mM) belirlendi (**EK 2**). Aktivite ölçümü, paraokson ile PON1'in reaksiyonu sonucu oluşan paranitrofenol'ün 412 nm'de absorbans vermesi esasına dayanır ve paranitrofenol'ün molar ekstinksiyon katsayısı ( $\epsilon=18,290 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , pH 10,5) aktivitenin hesaplanması için kullanılır. Paraoksonazın enzim ünitesi, 1 dakikada hidroliz olan paraokson'un mikromol sayısıdır (Renault *et al.* 2006).





**Şekil 3.5.** Paraoksonun paraoksonaz tarafından hidrolizi

Enzim aktivite ölçümünde kullanılan çözelti miktarları Çizelge 3.16'da verildi. PON1 enzimi için aktivite hesabı aşağıdaki denkleme göre yapıldı.

$$\text{EÜ/ml} = \frac{\Delta\text{OD}}{18,290} \times \frac{V_T}{V_E} \times 1000$$

Bu formülde yer alan simgeler aşağıda açıklanmıştır;

EÜ/ml: 1 ml'deki enzim ünitesi

ΔOD: Bir dakikadaki absorbans değişimi

18,290: p-nitrofenolun pH 10,5'teki molar ekstinksiyon katsayısı

V<sub>T</sub>: Ölçümün yapıldığı toplam küvet hacmi

V<sub>E</sub>: Ölçümün yapıldığı küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi

**Çizelge 3.16.** Enzim aktivite ölçümünde kullanılan çözelti miktarları

Stok çözelti	Kontrol küveti (µl)	Numune küveti (µl)
50 mM glisin-NaOH (pH 10,5)	500	500
Saf su	120	120
2 mM paraokson çözeltisi	330	330
Numune (kültür sıvısı)	-	50
Steril besiyeri	50	-

### **3.8.4. Doğal şartlar altında kolondan rekombinant protein saflaştırma**

#### **3.8.4.a. Probond™ kolonun hazırlanması**

Rekombinant proteinin doğal şartlar altında saflaştırılması için öncelikle kolon materyali hazırlandı. Bu işlem için; 10 ml'lik saflaştırma kolonuna 2 ml Probond™ nikel şelatlayıcı reçine dökülerek kolona yerleşimi sağlandıktan sonra üstte kalan sıvı dikkatlice uzaklaştırıldı. 6 ml steril saf su ilave edilip reçine ters çevrilerek ve kolona hafifçe vurularak yeniden süspansedildi. Reçinenin yer çekimi ile kolona yerleşimi sağlandıktan sonra üstte kalan sıvı dikkatlice uzaklaştırıldı. Doğal şartlar altında saflaştırma için 6 ml 'doğal bağlanma tamponu' (**EK 2**) ilave edildi. Reçine ters çevrilerek ve kolona hafifçe vurularak yeniden süspansedildi. Reçinenin yer çekimi ile kolona yerleşimi sağlandıktan sonra üstte kalan sıvı dikkatlice uzaklaştırıldı. Son işlem tekrarlandı.

#### **3.8.4.b. Fermentasyon sıvısının kolona yüklenmesi**

İnkübasyondan sonra fermentasyon sıvısı 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek elde edilen süpernatant 'amicon filtre' (Milipore) ile konsantre edildikten sonra numune, hazırlanan saflaştırma kolonuna yüklendi. Reçineyi yüklenen solüsyon içerisinde süspansedilme halde tutmak için yavaşça çalkalama ile 30-60 dk bağlanması sağlandı. Reçinenin yer çekimi ile kolona yerleşimi sağlandıktan sonra üstte kalan sıvı dikkatlice uzaklaştırıldı. 8 ml 'doğal yıkama tamponu' (**EK 2**) ile yıkama yapıldı. Reçinenin yer çekimi ile kolona yerleşimi sağlandıktan sonra üstte kalan sıvı dikkatlice uzaklaştırıldı. Yıkama işlemi 3-4 kez tekrarlandı. Dik pozisyonda kelepçe ile bağlanan kolonun alt uçtaki kapağı çıkarılarak 8-12 ml 'doğal elüsyon tamponu' (**EK 2**) ile protein elüe edildi.

### 3.8.4.c. Diyaliz

Kolondan saflaştırma sonucu elde edilen numune, diyaliz torbasına yerleştirilerek iki saat süreyle diyaliz tamponuna (50 mM sodyum fosfat, pH 8) karşı iki defa diyaliz edildi. Buz banyosunda gerçekleştirilen bu işlemin ardından elüsyon örneği, SDS-PAGE ile analiz edildi.

### 3.8.5. Bradford metodu ile protein miktarının belirlenmesi

Bu yöntem, proteine coomassie brilliant blue G-250'nin bağlanması esasına dayanır. Oluşan kompleks, 595 nm'de maksimum absorbanans gösterir. Hassasiyeti 1-100 µg arasında olan bu yöntemle (Bradford 1976) protein miktarı tayini için, 1 ml'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl alınıp tüm tüplerin hacmi saf su ile 0,1 ml'ye tamamlandı ve 4,9 ml renklendirme reaktifi tüplere ilave edilerek karıştırıldı. 10 dk sonra 595 nm'de 3 ml'lik küvetlerde köre karşı absorbanans değerleri okundu. Her bir ölçüm üç kez tekrarlandı. Kör olarak 0,1 ml saf su ve 4,9 ml renklendirme reaktifinden oluşan karışım kullanılarak absorbanans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri ile standart grafik çizildi (**EK 5**). Protein tayini yapılacak numuneler için aynı yöntem uygulanıp standart grafik kullanılarak miktar tayini yapıldı.

## 3.9. Saflaştırılan Rekombinant PON1 Enzimiyle İlgili Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları

### 3.9.1. SDS-PAGE analizi ile enzimin molekül kütlesinin tayini

Laemmli (1970), metoduna göre molekül kütlesi tayini şu şekilde yapıldı; 170-10 kDa aralığında molekül kütlesine sahip standart proteinler (**EK 4**) kullanılarak yapılan elektroforez işleminden sonra standart proteinlerin  $R_f$  değerleri hesaplanarak  $\log_{MK}-R_f$  standart grafiği (**EK 5**) çizildi. Daha sonra rekombinant PON1 enzimi için  $R_f$  değeri

hesaplandı ve standart grafikte yerine konularak PON1 enziminin  $\text{Log}_{\text{MK}}$ 'sı belirlendi.

Bu değerin antilogaritması alınarak numunenin molekül kütlesi hesaplandı.

Proteinlerin  $R_f$  değerleri;

$$R_f = \frac{X_e}{X_{\text{boya}}}$$

formülü kullanılarak belirlendi.

$X_e$ : Proteinin yürüme mesafesi,  $X_{\text{boya}}$ : Boyanın yürüme mesafesi

### **3.9.2. Saflaştırılan rekombinant PON1 enzim aktivitesi için optimum pH'nın bulunmasına yönelik çalışmalar**

Probond<sup>TM</sup> kolonundan saflaştırılan rekombinant PON1 enziminin optimum pH'sının belirlenmesi amacıyla pH'sı 5,5; 6,5; 7,5 ve 8,0 olan sodyum fosfat 7,5; 8,0; 8,5 ve 9,0 olan tris/HCl tamponu ve pH'sı 9,0; 9,5; 10,0 ve 10,5 olan glisin/NaOH tamponu hazırlandı. Enzimin substratı olan paraokson çözeltisi ile her bir tamponda ayrı ayrı enzim aktivitesi belirlendi.

### **3.9.3. Saflaştırılan rekombinant PON1 enzim aktivitesi için optimum tampon konsantrasyonunun bulunmasına yönelik çalışmalar**

Probond<sup>TM</sup> kolonundan saflaştırılan rekombinant PON1 enziminin optimum pH'sı belirlendikten sonra farklı glisin/NaOH tampon konsantrasyonlarının (20 mM, 40 mM, 50 mM, 80 mM, 100 mM, 150 mM ve 250 mM) enzim aktivitesi üzerine etkileri belirlendi.

#### **3.9.4. Saflaştırılan rekombinant PON1 enzim aktivitesi için optimum sıcaklığın bulunmasına yönelik alışmalar**

Probond™ kolonundan saflaştırılan rekombinant PON1 enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi amacıyla aktivite ölçümünde kullanılan solüsyonlar ve küvet içeriği 4°C, 10°C, 15°C, 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C ve 90°C’de 5 dk bekletildikten sonra ölçüm yapılarak enzim aktiviteleri belirlendi.

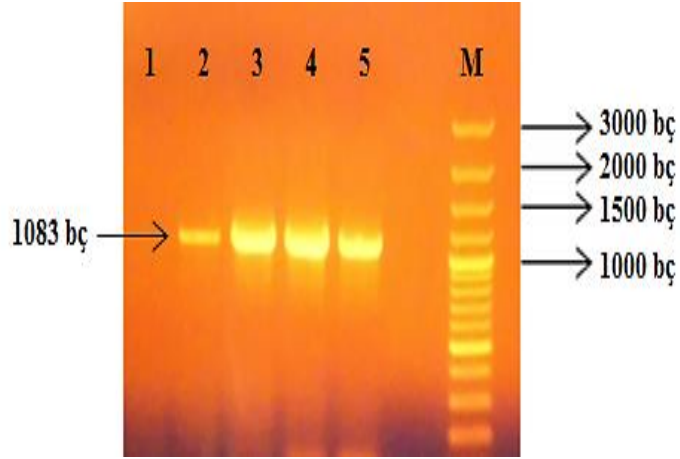
#### **3.9.5. Saflaştırılan rekombinant PON1 enzim aktivitesi için $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerinin bulunmasına yönelik alışmalar**

Paraokson substratı için rekombinant PON1 enziminin  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin belirlenmesi için en az beş farklı paraokson konsantrasyonu kullanılarak optimum şartlarda aktivite ölçümü yapıldı. Daha sonra Lineweaver-Burk grafiği çizilerek, bu grafikten  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplandı (Lineweaver and Burk 1934).

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. PON1 Genine Ait Sekansın Çoğaltılması

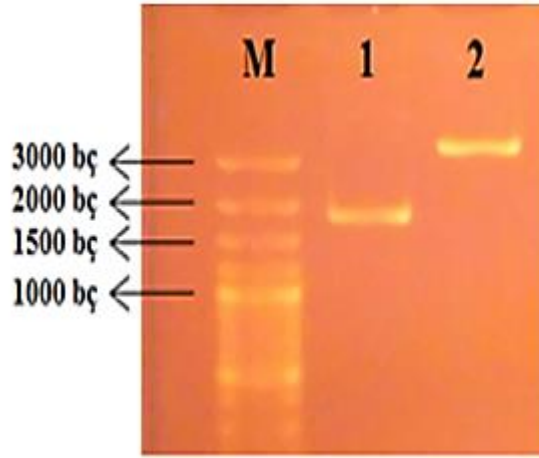
Çizelge 3.1'deki gibi dizayn edilen, PON1 genine spesifik ileri ve geri primerler kullanılarak gerçekleştirilen gradient PCR işlemi sonucuna göre primerlerin bağlandığı en iyi sıcaklık, 61°C olarak belirlendi (Şekil 4.1).



**Şekil 4.1.** PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M; Markır, 1:59°C, 2:60°C, 3:61°C, 4:62,2°C ve 5:63,2°C)

### 4.2. Rekombinant Vektörün Elde Edilmesi

PON1 enziminin üretiminden sorumlu gen bölgesi dizayn edilen primerler ile PCR'da çoğaltıldı. Elde edilen PCR ürünü ve vektör DNA (pPICZαA) aynı restriksiyon enzimleri ile kesildi.



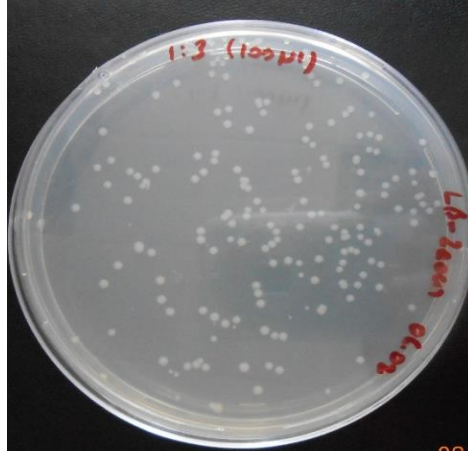
**Şekil 4.2.** Vektör DNA'nın agaroz jel elektroforez görüntüsü  
(M: Markır, 1: kesilmemiş vektör DNA, 2: kesilmiş vektör DNA)

Gen/vektör DNA oranı 3/1 olacak şekilde aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı ve 3.2.3'teki reaksiyon karışımına ilave edildi. Elde edilen karışım 16°C'de 16 saat inkübe edilerek ligasyon ürünü oluşturuldu. Bu işlem sonucunda rekombinant vektör elde edildi.

$$72 \text{ ng vektör DNA} \times \frac{1076 \text{ bç (PON1 geni)}}{3525 \text{ bç (vektör DNA)}} \times \frac{3}{1} = 66 \text{ ng PON1 geni}$$

### 4.3. Rekombinant Vektörün Kompetent *E. Coli* TOP10 Hücrelerine Transformasyonu

Ligasyon reaksiyonu sonucu elde edilen rekombinant vektör kompetent *E. coli* TOP10 hücrelerine transforme edildi. İnkübasyon sonrasında LSLB-zeosin agar besiyerinde gelişen koloniler gözlemlendi (Şekil 4.3).



**Şekil 4.3.** İnkübasyon sonrası gelişen transforme edilmiş *E. coli* TOP10 kolonileri

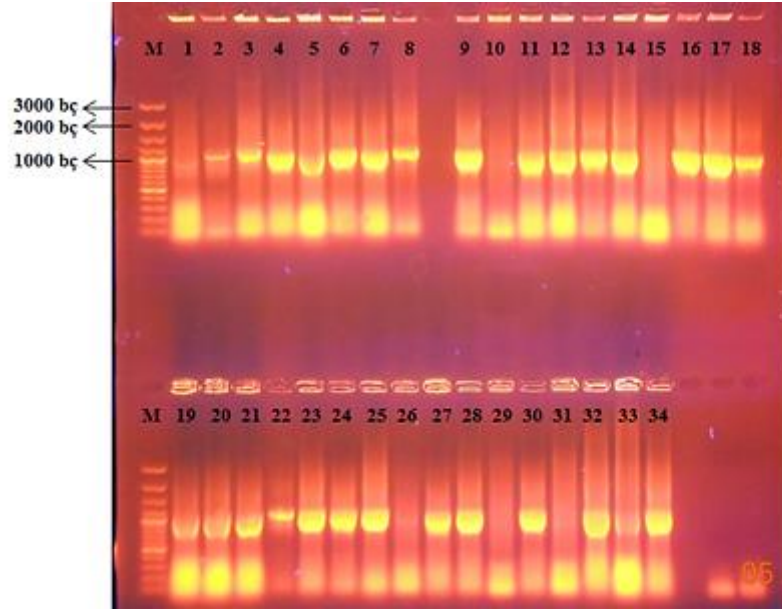
#### **4.4. Doğru Transformant Seçimi İçin Transformantlardan Kontrol Analizi**

Doğru *E.coli* transformantını belirlemek için çeşitli yöntemlerle kontrol analizi yapılarak seçilen doğru transformant, gliserol içeren kültür ortamıyla birlikte -86°C’de stoklandı.

##### **4.4.1. PON1 genine ve vektöre ait primerler kullanılarak sekansın koloni PCR ile amplifikasyonu**

İnkübasyon sonrası gelişen kolonilerde rastgele seçim yapılarak Çizelge 3.8’deki karışım içeriği ile PCR reaksiyonu başlatıldı. Çizelge 3.9’daki protokole göre gerçekleştirilen reaksiyon sonrası tüplerdeki örnekler agaroz jelde yürütüldü (Şekil 4.4).



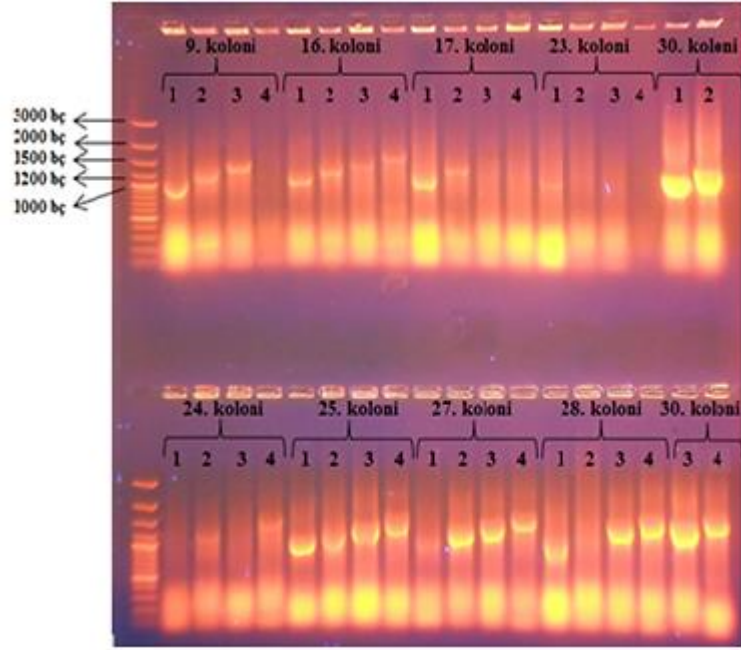


**Şekil 4.4.** Koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü

Şekil 4.4'teki sonuca göre seçilen koloniler ile yapılan koloni PCR'da kullanılan primerler ve amplifikasyon sonrası meydana gelecek bantların tahmin edilen uzunlukları;

<u>Primerler</u>	<u>Tahmin edilen uzunluk</u>
1. Gİ/GG (gen ileri/ gen geri)	1076 bç
2. Gİ/VG (gen ileri / vektör geri)	1216 bç
3. GG/Vİ (gen geri /vektör ileri)	1328 bç
4. Vİ/VG (vektör ileri / vektör geri)	1599 bç

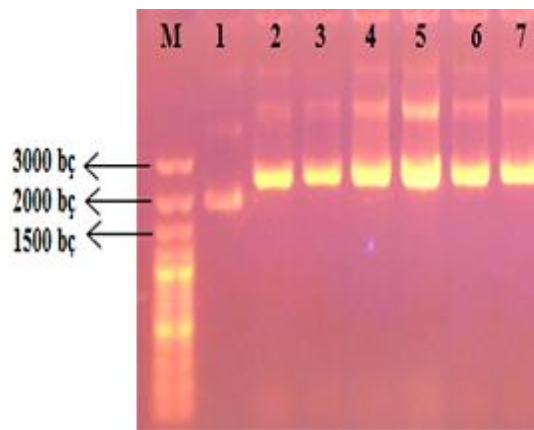
Agaroz jel elektroforezinde PON1 genine ait bant görülen kolonilerden 9., 16., 17., 23., 24., 25., 27., 28. ve 30. kolonilerin uygun primerler ile yapılan koloni PCR sonucu Şekil 4.5'te verildi.



**Şekil 4.5.** Koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü

#### 4.4.2. Muhtemel rekombinant kolonilerden plazmit saflaştırma

9., 16., 25., 27., 28. ve 30. koloniden saflaştırılan plazmitlerin agaroz jel elektroforez sonuçları Şekil 4.6'da verildi.

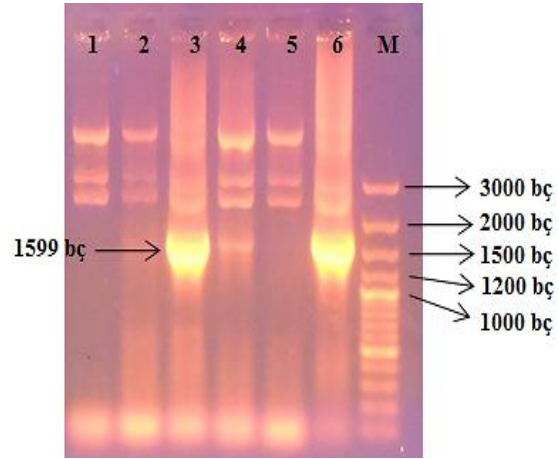


**Şekil 4.6.** Muhtemel rekombinant plazmitlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü

(M: Markır, 1: PON1 genini içermeyen plazmit (pPICZαA), 2: 9.koloni, 3: 16. koloni, 4: 25. koloni, 5: 27. koloni, 6: 28. koloni, 7: 30. koloni muhtemel rekombinant plazmitleri )

#### 4.4.3. Vektöre ait primerler kullanılarak saflaştırılan plazmit sekansının PCR ile amplifikasyonu

İzole edilen 9., 16., 25., 27., 28. ve 30. koloni plazmitlerinin VI/VG ile yapılan PCR sonucu Şekil 4.7’de verildi.

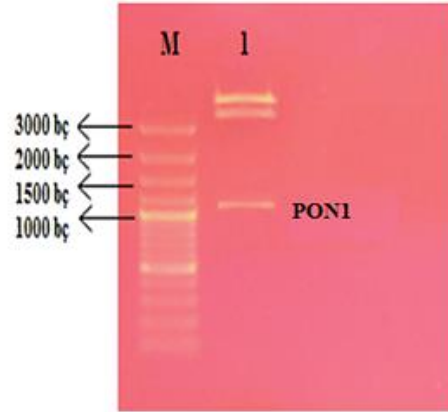


**Şekil 4.7.** Muhtemel rekombinant plazmit primerleri ile PCR sonucu agaroz jel elektroforezi görüntüsü

(M: Markır, 1: 9. koloni, 2: 16. koloni, 3: 25. koloni, 4: 27. koloni, 5: 28. koloni, 6: 30. koloni)

#### 4.4.4. Muhtemel rekombinant plazmitin *EcoRI* ve *XbaI* enzimleri ile kesimi

Muhtemel rekombinant plazmitin restriksiyon enzimleriyle kesimi sonucu elde edilen agaroz jel elektroforezi görüntüsü Şekil 4.8’de verildi.



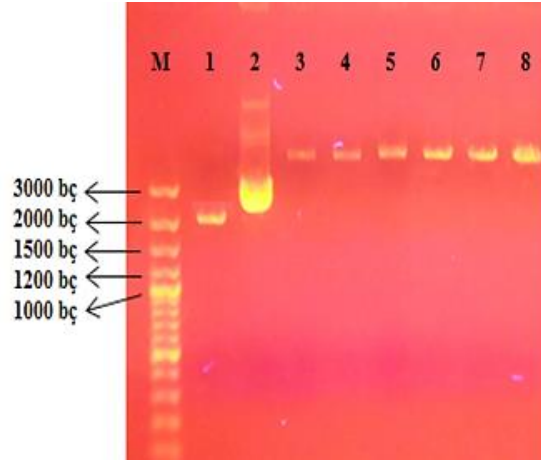
**Şekil 4.8.** Restriksiyon kesimi sonucu yürütülen muhtemel rekombinant plazmitin agaroz jel elektroforezi görüntüsü  
(M: Markır, 1: Kesilmiş rekombinant plazmit)

#### 4.5. *E. coli* Hücrelerinden Saflaştırılan Rekombinant Vektörün Sekans Analizi

Gliserolde stoklanan, rekombinant bakteri hücreleri çoğaltılıp plazmit izole edilerek sekans analizi için IONTEK firmasına (İstanbul) gönderildi. Elde edilen analiz sonucu blastlandığında insan PON1 enziminin sekansı ile %99 benzerlik gösterdi (**EK 3**).

#### 4.6. *E. coli* Hücrelerinden İzole Edilen Rekombinant Vektörün Lineer Hale Getirilmesi

Saflaştırılan rekombinant plazmit, AOX promotör bölgesinden *PmeI* enzimi ile kesilerek lineer hale getirildi. Kesilen vektör, agaroz jel elektroforezinde yürütülerek teyit edildi (Şekil 4.9).

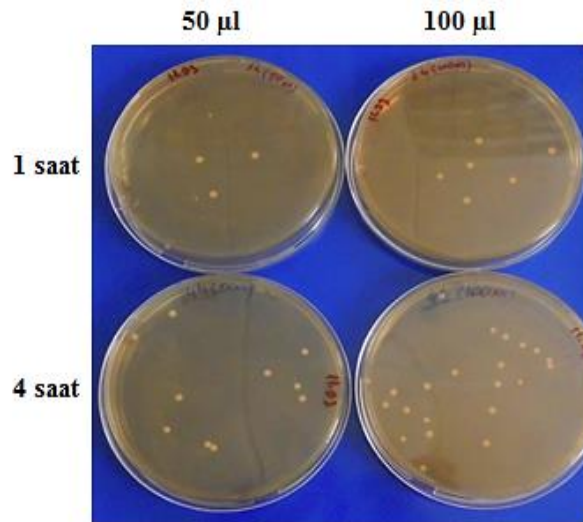


**Şekil 4.9.** *PmeI* enzimi ile kesilmiş rekombinant vektörün agaroz jel elektroforez görüntüsü

(M: Markır, 1: pPICZαA, 2: Rekombinant vektör (pPICZαA::PON1), 3-8: kesilmiş rekombinant vektör)

#### 4.6.1. Linear rekombinant vektörün *P. pastoris*'e transformasyonu ve seleksiyonu

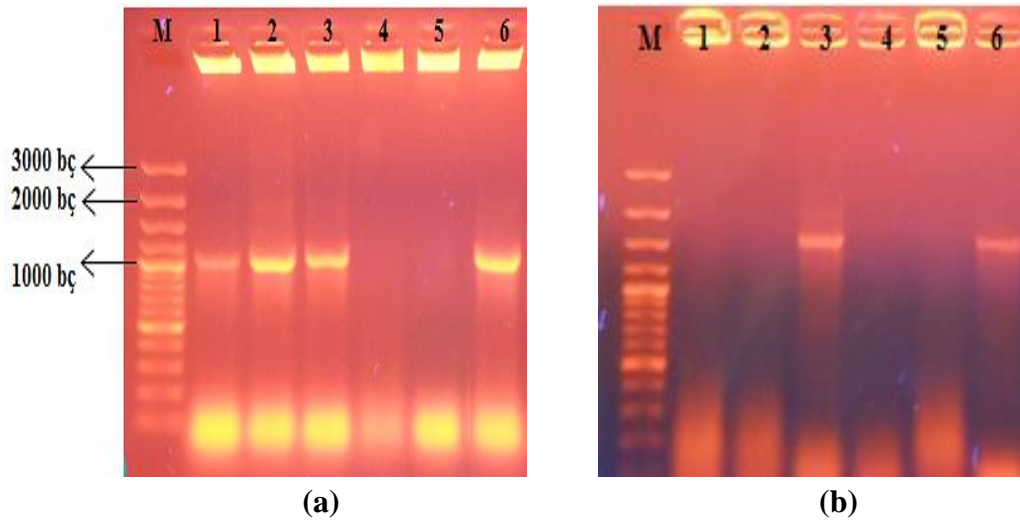
*PmeI* enzimi ile kesildikten sonra fenol/kloroform ile ekstrakte edilen rekombinant vektörün kompetent yapılan maya hücrelerine transformasyonu gerçekleştirildi. 1 saat ve 4 saat'lik transforme hücrelerden 50 ve 100 µl zeosin içeren YPD agar plaklarına yayılarak 60 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası gelişen koloniler gözlemlendi (Şekil 4.10).



**Şekil 4.10.** İnkübasyon sonrası gelişen *P. pastoris* kolonileri

#### 4.6.2. Doğru transformant seçimi için koloni PCR ile kontrol analizi

Gene ve vektöre ait primerler kullanılarak Çizelge 3.14'teki karışım içeriği ile PCR reaksiyonu başlatıldı. Çizelge 3.15'teki protokole göre gerçekleştirilen reaksiyon sonrası tüplerdeki örnekler agaroz jelde yürütüldü (Şekil 4.11). Doğruluğu tespit edilen koloniler, gliserol içeren kültür ortamıyla birlikte  $-86^{\circ}\text{C}$ 'de stoklandı.



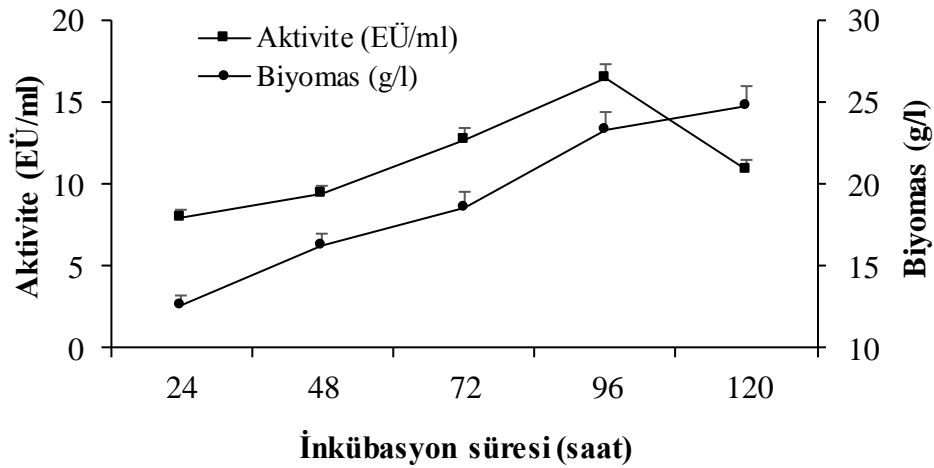
**Şekil 4.11.** Koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü  
(a) gene ait primerlerle yapılan PCR (b) vektöre ait primerlerle yapılan PCR

#### 4.6.3. Rekombinant PON1 enziminin üretimi

Altı muhtemel rekombinant koloni arasından yalnızca iki tanesinin (3. ve 6. koloni) hem gene hem de vektöre ait primerlerle yapılan PCR reaksiyon sonucunun pozitif olması dolayısıyla bu kolonilerin rekombinant enzim üretim kapasiteleri, 48 ve 72 saatlik inkübasyonları sonucu SDS-PAGE ve aktivite ölçüm sonuçlarına bakılarak karşılaştırıldı.

#### 4.6.3.a. Aktivite ölçümü

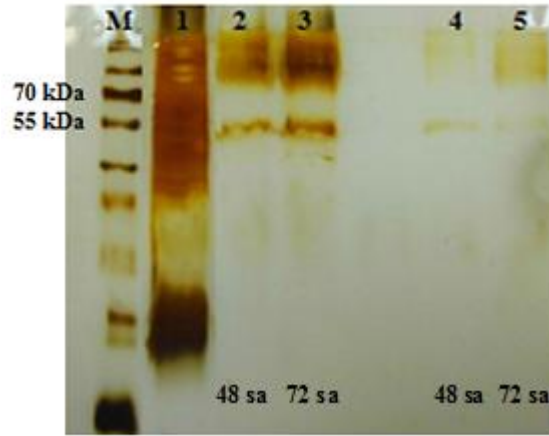
72 saatlik kültür sıvısında enzim aktivitesi ölçüm sonuçlarına göre 6. koloninin (10,12 EÜ/ml) 3. koloniye (7,23 EÜ/ml) nazaran daha yüksek aktiviteye sahip enzim ürettiği belirlendi. Bu yüzden 6. koloni ile devam eden bundan sonraki çalışmalarda besiyeri ortamına proteaz inhibitörü olarak kazamino asit ve karbon kaynağı olarak da sorbitol (30 g/l) ilave edildi. 30°C, 280 rpm'de 120 saate kadar gerçekleştirilen inkübasyon ile elde edilen kültür sıvısından 24 saatte bir örnek alınarak yapılan aktivite ölçüm sonucuna göre, 96 saat sonunda en yüksek enzim aktivitesinin 16,49 EÜ/ml, kuru hücre ağırlığının ise 23,3 g/l olduğu belirlendi (Şekil 4.12).



**Şekil 4.12.** İnkübasyon sürelerine göre rekombinant PON1 enziminin aktivitesi ve hücre biyoması

#### 4.6.3.b. SDS-PAGE analizi

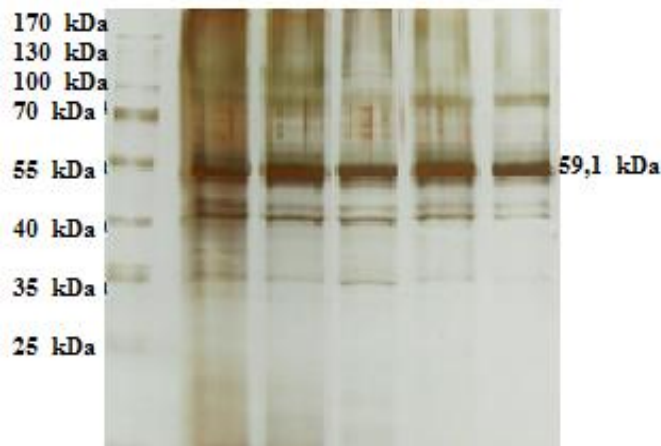
3. ve 6. koloni ile gerçekleştirilen 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonucu yapılan SDS-PAGE analizine göre 6. koloniye ait bantların daha belirgin olduğu gözlemlendi (Şekil 4.13).



**Şekil 4.13.** En iyi üretimi gerçekleştirecek koloni seçimi için yapılan 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrası SDS-PAGE sonucu

(M: Markır, 1: Kontrol (boş vektör içeren *P. pastoris*), 2,3: 6. Koloni, 4,5: 3. Koloni)

Kazamino asit ve sorbitol içeren BMMY üretim besiyerinde 6. koloni ile gerçekleştirilen inkübasyon sonucu elde edilen maya kültüründen her 24 saatte bir alınan örnekler ile SDS-PAGE analizi yapıldı. Elektroforez fotoğrafı kullanılarak standart proteinlerin Rf değerleri hesaplanıp  $\log_{MK}$ -Rf standart grafikleri çizildi. Daha sonra enzimin Rf değerleri de hesaplanarak rekombinant PON1 enziminin molekül kütlesinin 59,1 kDa olduğu belirlendi (Şekil 4.14).



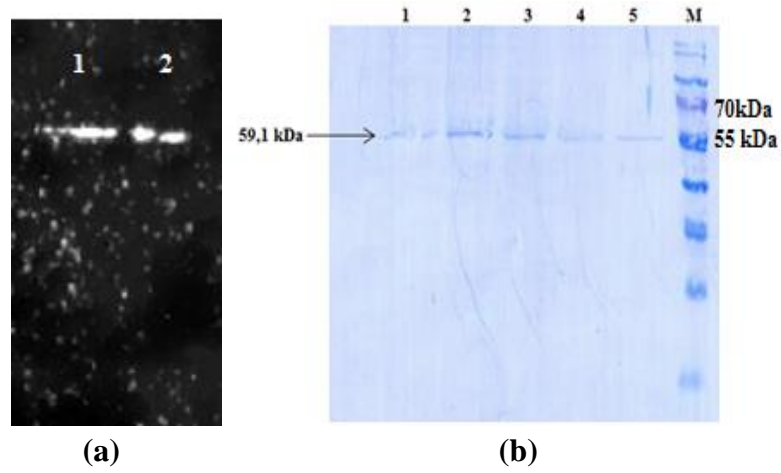
**Şekil 4.14.** *P. pastoris* 'e ait ekstrasellüler rekombinant proteinin SDS-PAGE analizi

(M: Markır, 1:24 sa, 2:48 sa, 3:72 sa, 4:96 sa, 5:120 sa'lık kültür)



#### 4.6.3.c. Western blotlama

Rekombinant enzim üretiminin gerçekleştirildiği maya kültüründe 6xHis içeren rekombinant PON1 enziminin varlığını tespit etmek için western blot analizi yapıldı. Elde edilen sonuçlar gümüş boyama sonuçlarını desteklemiş oldu (Şekil 4.15).

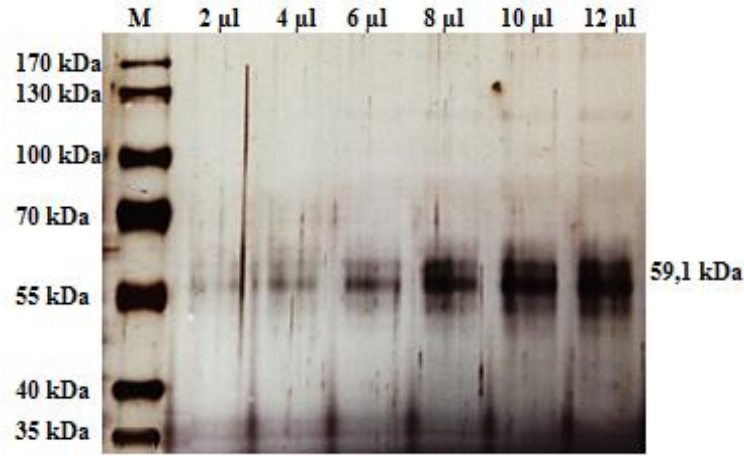


**Şekil 4.15.** *P.pastoris* 'e ait ekstrasellüler rekombinant proteinin western blot analizi (a) kemilüminesans görüntüleme (1:96 sa, 2:72sa'lık kültür) (b) Coomassie brilliant blue boyama (M: Markır, 1:120 sa, 2:96 sa, 3:72 sa, 4:48 sa, 5:24 sa'lık kültür)

### 4.7. Saflaştırılan Rekombinant PON1 Enzimi ile Yapılan Karakterizasyon Çalışmalarının Sonucu

#### 4.7.1. Saflaştırma ile elde edilen elüsyonun SDS-PAGE analiz sonucu

Santrifüj edilen kültür sıvısı, filtre (Amicon®) ile en az 10 kat konsantre edildiği ve aynı zamanda tuzların uzaklaştırıldığı ultrafiltrasyon işlemi sonrasında elde edilen solüsyon Probond™ kolonuna yüklenerek rekombinant enzim saflaştırıldı. Elde edilen elüsyon, diyaliz işleminin ardından farklı miktarlarda jele yüklenerek gümüş boyama yapıldı (Şekil 4.16).



**Şekil 4.16.** Saflaştırma sonucu farklı miktardaki örneklerle SDS-PAGE analizi

#### 4.7.2. Saflaştırılan rekombinant enzimin aktivite tayini

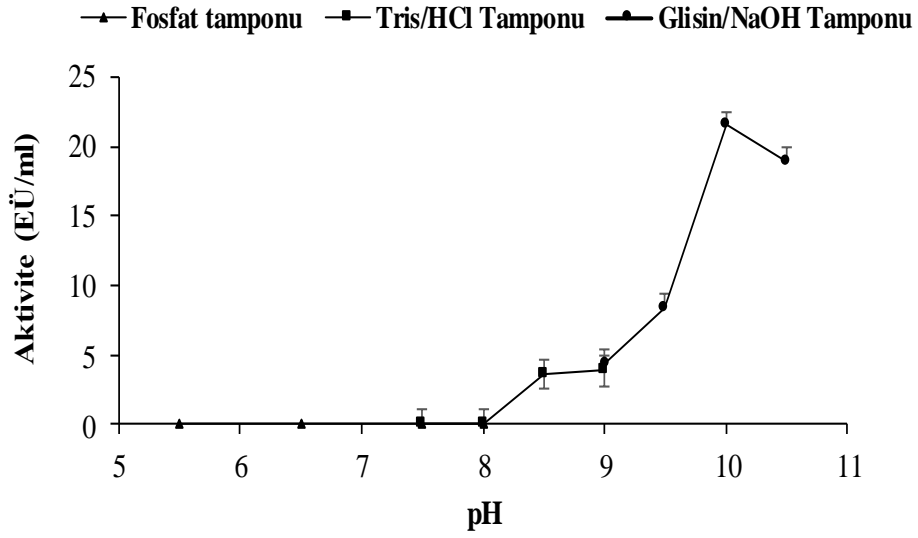
Çizelge 3.16'daki çözeltiler kullanılarak ölçülen enzim aktivitesi, 18,9 EÜ/ml olarak belirlendi.

#### 4.7.3. Saflaştırma ile elde edilen elüsyonun protein miktarının belirlenmesi

Saflaştırma işlemi sonucu elde edilen elüsyon sıvısında toplam protein miktarı, Bradford metodu ile belirlendi. Elde edilen standart grafik kullanılarak elüsyondaki toplam protein miktarının 10,1 mg/ml olduğu tespit edildi.

#### 4.7.4. Saflaştırılan rekombinant PON1 enzimi için optimum pH'nın bulunmasına yönelik sonuçlar

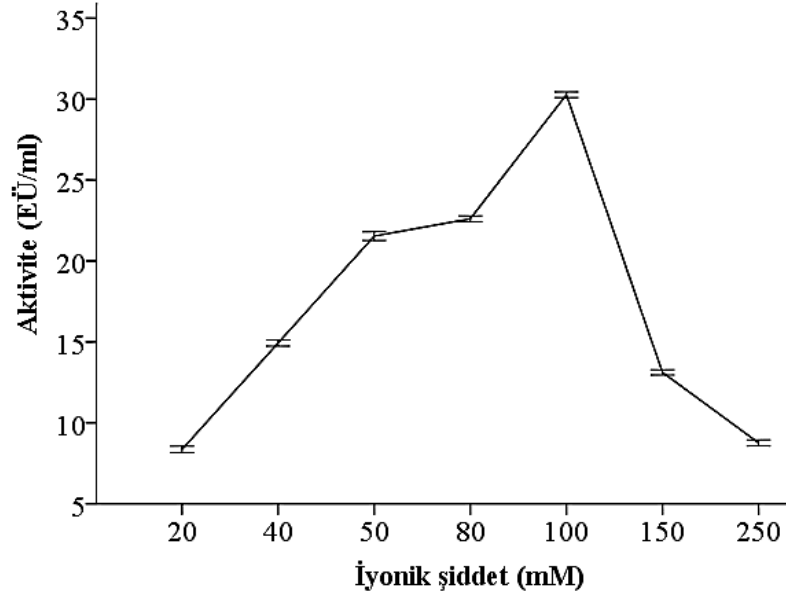
50 mM potasyum fosfat (pH 5,5-8,0), tris/HCl (pH 7,5-9,0) ve glisin/NaOH (pH 9,0-10,5) tamponları kullanılarak rekombinant PON1 enziminin optimum pH değerinin tespiti için yapılan aktivite ölçüm sonuçlarına göre potasyum fosfat tamponu ile denenen tüm pH aralıklarında aktivite gözlenmezken tris/HCl tamponu ile sadece pH 8,5 ve 9,0'da gözlendi. Glisin/NaOH tamponu ile denenen tüm pH aralıklarında aktivite gözlenmiş olup en iyi aktivite değerine (21,5 EÜ/ml) pH 10'da ulaşıldı (Şekil 4.17).



**Şekil 4.17.** 50 mM potasyum fosfat, tris/HCl ve glisin/NaOH tamponları kullanılarak rekombinant PON1 enzimi için yapılan optimum pH çalışma sonucuna yönelik pH-Aktivite grafiği

#### 4.7.5. Saflaştırılan rekombinant PON1 enzim aktivitesi için optimum tampon konsantrasyonunun bulunmasına yönelik sonuçlar

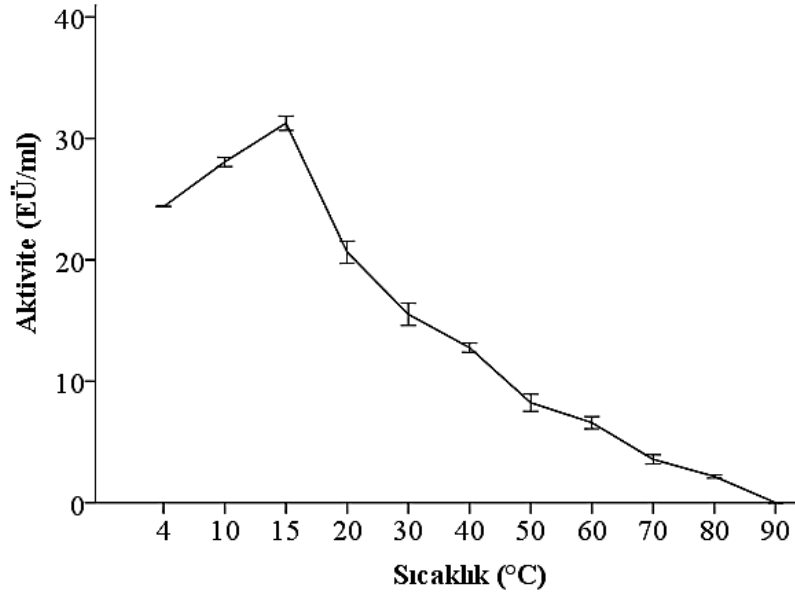
Glisin/NaOH tamponunun farklı konsantrasyonları (20-250 mM) kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçlarına göre rekombinant PON1 enziminin optimum aktivite gösterdiği değer (30,29 EÜ/ml) 100 mM olarak belirlendi (Şekil 4.18).



**Şekil 4.18.** Rekombinant PON1 enzimi için yapılan glisin/NaOH tamponu optimum konsantrasyon çalışması sonucuna yönelik iyonik şiddet-aktivite grafiği

#### **4.7.6. Saflaştırılan rekombinant PON1 enzim aktivitesi için optimum sıcaklığın bulunmasına yönelik sonuçlar**

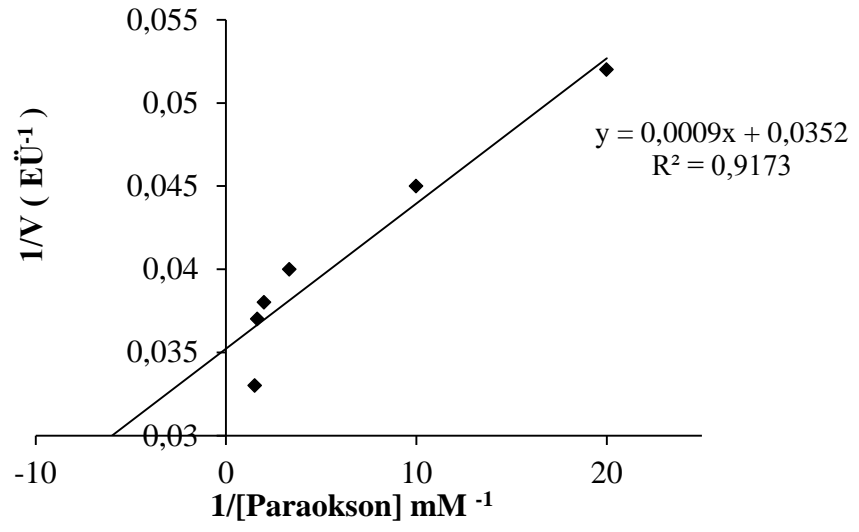
100 mM glisin/NaOH tamponu kullanılarak farklı sıcaklık değerlerinde (4-90°C) gerçekleştirilen aktivite ölçüm sonuçlarına göre rekombinant PON1 enziminin optimum aktivite gösterdiği değer (31,27 EÜ/ml) 15°C olarak belirlendi (Şekil 4.19).



**Şekil 4.19.** Rekombinant PON1 enzimi için 100 mM glisin/NaOH tamponu kullanılarak yapılan optimum sıcaklık çalışma sonucuna yönelik sıcaklık-aktivite grafiği

#### 4.7.7. Paraokson substratı için $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerinin belirlenmesine yönelik sonuçlar

Paraokson substratı için rekombinant PON1 enziminin  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin belirlenmesi için en az 5 farklı paraokson konsantrasyonu kullanılarak optimum şartlarda aktivite ölçümü yapıldı. Yapılan ölçümler sonucu elde edilen değerler kullanılarak  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplandı. Sonuçta  $K_M$  değeri, 0,025 mM ve  $V_{max}$  değeri ise 28,4 EÜ/ml olarak bulundu (Şekil 4.20).



**Şekil 4.20.** Paraokson substratı için  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin belirlenmesine yönelik grafik

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Glikoprotein yapıda ve kalsiyum bağımlı bir esterhidrolaz olan paraoksonaz1 (PON), hem arilesteraz hem de paraoksonaz aktivitesine sahip bir enzimdir. Tarımda çok kullanılan bir organofosforlu insektisit olan paratyonun (dietil-p-nitrofenil fosforotiyoat) her yıl tarımla uğraşan birçok insanın akut zehirlenmesine neden olduğu bilinmektedir. Paratyon, *in vivo* oksidatif desülfirasyon yolu ile oldukça toksik oksijen analogu (okson) olan paraoksona aktive olur (Costa *et al.* 1990). Paraokson, başta sinir uyarılarının iletiminde önemli rol oynayan asetilkolin esteraz olmak üzere diğer bazı enzimlerin inhibisyonuna neden olur. Ancak organizmalar, bu etkilerin birçoğuna karşı savunma sistemleri ile donatılmıştır. Bunlardan biri de PON1 enzimidir. Kardiyovasküler sistem sağlığı ve organofosforlu bileşiklerin toksisitesiyle ilişkili memeli serum proteini olan PON1'in fonksiyonu tam olarak bilinmese de paratyon, diazinon ve klorpirifoz gibi çok sayıda toksik insektisitinin okson metabolitlerini ve soman, sarin ve tabun gibi organofosfat sinir ajanlarını hidrolizleyebilmektedir (Dragonov and La Du 2004). Toksik organik molekülleri hidroliz etmesi, PON1'in tanımlanan ilk fizyolojik fonksiyonudur. Ancak bu bileşikler doğada bulunmadıklarından PON1'in organofosfatlı bileşikleri hidroliz etmesinin tamamen tesadüf olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle PON1'in fizyolojik fonksiyonu ve doğal substratı henüz tam olarak bilinmemektedir. PON1'in ayrıca bakteriyel laktonların hidrolizini gerçekleştirmesiyle doğal immüniteye katkı sağlayabileceği bildirilmiş ve organofosforlu toksinlerin profilaktik veya tedavi edici radikal temizleyicisi olarak önerilmiştir (Lenz *et al.* 2007; Stevens *et al.* 2008; Estin *et al.* 2010). PON1 enzimi toksikoloji, kardiyoloji ve biyokimyada önemli olmasına rağmen karaciğer PON1 enziminin biyokimyasal özellikleri hakkında çok az bilgi mevcuttur. Bu enzimin ksenobiyotiklerin metabolizmasında ve detoksifikasyonda görev aldığı bilinmektedir (Koncuk 2011).

Biyoteknoloji, biyoloji ve mühendislik bilimlerine dayalı, hızla gelişmekte olan alanlardan biridir. Bu interdisipliner alan, sağlık hizmetleri, çevre, tahıl üretimi ve tarım gibi geniş bir endüstriyel uygulama alanına sahip olup, endüstriyel öneme sahip

ürünlerin üretimini artırmaya ve optimize etmeye yönelik uygulamaları içerir. Bu bağlamda biyomoleküllerin kaynağından başka bir organizmada üretimi, istenen ürünün üretiminden sorumlu hedef genin klonlanmasıyla gerçekleştirilen rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak mümkün olmaktadır (Nielsen *et al.* 2003). Rekombinant DNA, farklı kaynaklardan elde edilen genetik materyallerin genetik mühendisliği metotları ile bir araya getirilmesi sonucu meydana gelen, biyolojik organizmalarda doğal olarak bulunmayan DNA molekülüdür. Bu molekülün elde edilmesi için genetik moleküllerin kesilmesi ve birleştirilmesi işlemlerini kapsayan teknoloji rekombinant DNA teknolojisi, elde edilen rekombinant DNA'nın ekspresyonuyla üretilen protein ise rekombinant protein olarak adlandırılmaktadır (Karaoğlan 2012). Ticari öneme sahip protein molekülleri, geleneksel yöntemlerle üretiminden ve genetik mutasyonlarla hücre metabolizmasını değiştiren metotların keşfedilmesinden önce bilinmekteydi. Geleneksel yöntemleri kullanarak 5 mg somatostatin, 500 bin koyun beyninden izole edilmiş ve 160 m<sup>3</sup> insan üresinden çok az miktarda epidermal büyüme faktörü elde edilmiştir. 1970'li yılların ortalarında gelişmeye başlayan rekombinant DNA teknolojileri ile birlikte doğal olarak üretilmeyen peptit veya proteinlerin mikroorganizmalar kullanılarak üretilmesi, birkaç litre bakteri kültüründen aynı miktarda ürün eldesi mümkün olmuştur (Old and Primrose 1994).

İnsan insülini, 1982 yılında ilk defa ticari olarak üretilen rekombinant proteindir. Ardından insan büyüme hormonu (human growth hormone) 'humatrope' marka adıyla üretilmiş olup o zamandan beri genetik rekombinasyonla çok sayıda proteinin ticari olarak üretimi mümkün olmuştur. Bu şekilde çeşitli konukçu organizmalar kullanılarak üretilen endüstriyel rekombinant proteinlerin, özellikle gıda, tarım ve sağlık sektörlerinde kullanımı giderek artış göstermektedir. Son yıllarda, özellikle endüstri ve tıp alanlarında rekombinant protein üretimi oldukça önem kazanmıştır. Rekombinant organizmaların büyük çoğunluğu ticari öneme sahip, fonksiyonel ve aktif formdaki rekombinant tedavi edici proteinlerin üretiminde kullanılmaktadır. Yıllardan beri sürekli artış gösteren rekombinant protein ihtiyacını karşılayabilmek için çok çeşitli heterolog ekspresyon sistemleri geliştirilmiştir. Bu sistemler arasında mayalara ait ekspresyon sisteminin prokaryotik mikroorganizmalara ait ekspresyon sistemine göre ökaryotik



proteinlerin post-translasyonel modifikasyonlarını gerçekleştirebilmek gibi bazı avantajlara sahip olduğu bilinmektedir (Cregg 2007; Karaoğlan 2012).

*Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* ve *Yarrowia lipolytica* heterolog protein üretiminde yaygın olarak kullanılan mayalardır. *P. pastoris* gibi metilotrofik mayalar eksprese edilen proteinin daha az hipermannozilasyonu dolayısıyla *S. cerevisiae*'nin alternatifi olarak kabul edilir (Gür 2010). Geçtiğimiz on yıl içinde genetikçiler, kaynak organizmadan farklı organizmalara gen transferi için DNA'yı manipüle etmeyi başarmıştır. Bilim adamlarının büyük çoğunluğu, bu rekombinant organizmaları ticari öneme sahip protein üretiminde kullanmıştır. Çalışmaların çoğu ise bu proteinlerin fonksiyonel ve verimli bir şekilde üretim yollarını bulmaya yoğunlaşmıştır. *P. pastoris* mayası, endüstriyel üretim ve temel laboratuvar araştırmaları için proteinlerin miligramdan grama kadar ekspresyonunda kullanılan yararlı bir sistemdir. Fermentasyon miktarı isteğe göre artırılabilir, protein üretimi ve aktivitesi üzerinde etkili pH, oksijen miktarı, karbon kaynağı çeşidi gibi parametreler kontrol edilebilir (Higgins and Cregg 1998). Salgılanan yerel proteinlerin nispeten düşük seviyede olması, aynı ortama salgılanan rekombinant proteinlerin kolayca saflaştırılmasını sağlar (Cregg *et al.* 1993). Bu yüzden güçlü ve ekonomik genetik teknikler, heterolog protein üretiminde *P. pastoris* ekspresyon sistemini seçim için uygun hale getirmektedir. Bu ekspresyon sistemi ile ilgili son gelişmeler, sadece ekspresyon seviyesinin başarılı olabilmesi üzerinde değil, çeşitli heterolog proteinlerin biyoaktivitesi üzerinde de etkili olmaktadır. Rekombinant protein üretimi için genetik olarak tasarlanan bu sistemde sıklıkla regüle edilen ve metanolla indüklenen güçlü promotör olan alkol oksidaz (AOX), ilgilenilen genin ekspresyonu için kullanılır. Bu özelliği sayesinde, metanol varlığında diğer mikroorganizmalara oranla daha kolay bir şekilde genetiksel olarak manipüle edilmektedir. Normal hücre gelişimi, glukoz, gliserol veya diğer karbon kaynaklarını içeren ortamda gerçekleştiğinde promotör baskılanırken, tek karbon kaynağı olarak metanol kullanıldığında AOX1 geni metanol ile indüklenir (Cereghino *et al.* 2002).

*P. pastoris*, özellikle endüstriyel alanda rekombinant protein üretimi için mükemmel özelliklere sahip konukçu organizmalardan biridir (Daly and Hearn 2005; Jungo *et al.* 2007). Özellikle aşağıda belirtilen üç nedenden dolayı bu maya yabancı protein ekspresyonu için uygun görülmektedir (Cregg *et al.* 1993).

- Moleküler genetik seviyede kolay bir şekilde manipüle edilebilir.
- Proteini yüksek seviyede intrasellüler veya ekstrasellüler olarak eksprese edebilir.
- Çoğu yüksek yapılı ökaryotik protein modifikasyonunu gerçekleştirebilir (glikozilasyon, disülfid bağ oluşumu ve proteolitik işleme gibi).

Bugüne kadar 600'ün üzerinde rekombinant proteinin üretimi gerçekleştirilen bu mikroorganizma ile anjiyo ödeme karşı üretilen rekombinant bir protein olan KALBITOR<sup>®</sup> (ecallantide)'un FDA (US Food and Drug Administration; ABD Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından onaylanması, endüstriyel olarak uygun bir mikroorganizma olması bakımından *P. pastoris* için en önemli konulardan biri olmuştur (Walsh 2010). Buna ilaveten, *P. pastoris* GRAS statüsünde olmamasına rağmen, bu mikroorganizmada üretilen bir enzim preparatının GRAS statüsünde olduğu da FDA tarafından kabul edilmiştir (Anonymous 2006). Bu maya, sahip olduğu yabancı proteini intrasellüler veya ekstrasellüler olarak yüksek seviyede üretme, glikozilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonları gerçekleştirme, doğru disülfid bağ oluşturma, biyoreaktörde yüksek hücre yoğunluğunda gelişme yeteneğine ve gen ekspresyonunu kontrol eden promotöre (AOX1) sahip olma gibi avantajlarından dolayı birçok rekombinant proteinin üretiminde kullanılan popüler bir mikroorganizmadır (Cereghino and Cregg 1999; 2000). Memeli hücreleri ile karşılaştırıldığında, *Pichia* için kompleks besiyeri ve kompleks kültür şartları gerekmediği, genetiksel manipülasyonunun nispeten kolay olduğu ve ökaryotik protein sentezi metabolik yoluna sahip olduğu bilinmektedir. Bu maya, minimal besiyeri kullanılması durumunda yüksek hücre yoğunluğunda gelişebilir. Entegre edilen vektörler, sürekli ve geniş ölçekli fermentasyon işlemlerinde bile rekombinant ürünlerin genetik stabilitesine yardımcı olur (Romanos 1995). Ayrıca bu mikroorganizmanın rekombinant protein üretiminde sorun teşkil edebilecek

endotoksin üretimi veya viral kontaminasyona maruz kalma gibi durumları yoktur (Jahic *et al.* 2003).

Bu mikroorganizmaya ait ekspresyon sistemi, biyoteknoloji, ilaç endüstrisi ve akademik araştırmacılar tarafından rekombinant protein üretimi için ihtiyaç duyulan bir sistemdir (Karaoğlan 2012). Maya ekspresyon sistemi, rekombinant olarak eksprese edilen proteinlerin salgılanması esnasında istenen proteinin hücre içerisindeki yabancı toksik proteinlerden korunması, hücreyi parçalamaya gerek kalmadan kolay bir şekilde saflaştırılması ve fermentasyon teknolojisi kullanılarak doğal proteinin yüksek seviyede elde edilmesi gibi bazı avantajlar sunar (Sharma *et al.* 2009).

Heterolog protein elde etmede bakterilerin kullanılması en kolay ve hızlı yöntem olmasına rağmen bu mikroorganizmalar, post-translasyonel işleme eksikliği nedeniyle çoğu ökaryotik protein üretimi için yetersizdir. Heterolog protein üretimi yalnızca protein sentezini değil, yeni sentezlenen proteinlerin endoplazmik retikuluma (ER) translokasyonunu, ER ve golgide post-translasyonel glikozilasyonunu, proteolitik parçalanmaya, yanlış katlanmaya veya aşırı ekspresyona bağlı stres cevabı gibi durumları da içermektedir. Bunun yanı sıra rekombinant proteinlerin doğru şekilde ekspresyonu, fonksiyonel protein üretimi için uygun olan konukçu organizmaya bağlı bir durumdur. Ökaryotik mayalar, ökaryotik organizmaya ait proteinlerin doğal ve biyolojik olarak aktif formda üretimi için ideal konukçulardır. (Freigassner *et al.* 2009; Idiris *et al.* 2010).

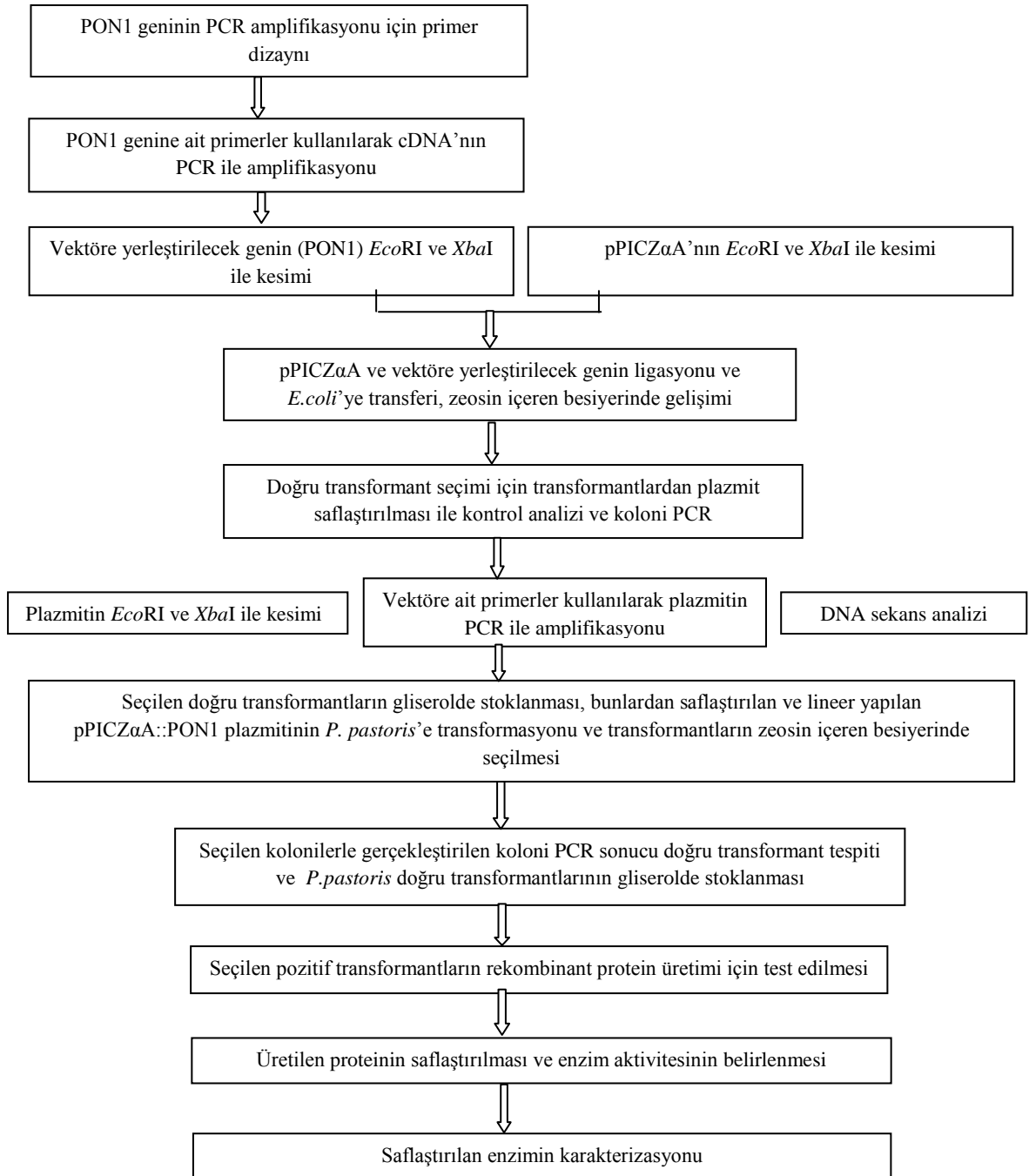
Konukçu organizmada protein üretimi yerine, ilgilenilen genin klonlanması ve heterolog ekspresyonu alternatif teknoloji olarak bilinmektedir. Son zamanlarda heterolog protein ürünleri endüstriyel uygulamaların yaklaşık üçte birini oluşturmaktadır. Heterolog PON1 ekspresyonunun insan kanından saflaştırılmasına nazaran çeşitli avantajlara sahip olduğu söylenebilir. Bunlardan ilki, kandaki diğer proteinler dışında yalnızca sekansı bilinen heterolog proteinin elde edilmesi, ikincisi rekombinant proteinin yüksek verimle elde edilebilir olması, üçüncüsü ise proteinin kültür ortamına salgılanabilmesi durumunda saflaştırılma işleminin daha kolay şekilde

gerçekleştirilmesidir (Ranieri *et al.* 2009; Rodgers *et al.* 2010). Bu bağlamda son zamanlarda yapılan çalışmalarda rekombinant mikroorganizmaların kullanımı giderek önem kazanmaktadır. Özellikle insan dokusu veya kanından saflaştırılması zor olan veya az miktarda saflaştırılabilen enzimlerin fazla miktarda elde edilebilmesinde rekombinant ürün üretiminin önemi daha da artmaktadır. Bu çalışmada oksidatif strese karşı önemli bir antioksidan olarak görev yapan, kanser ve kardiyovasküler hastalıklar başta olmak üzere birçok hastalığın patogeneziyle ilişkilendirilen (Uysal vd, 2011) PON 1 enziminin ekstrasellüler rekombinant üretimi gerçekleştirildi.

Bu çalışmada *Pichia pastoris* X-33 suşu, PON1 geninin ekspresyonu için konukçu organizma olarak seçildi. İlgili geni taşıyan ekspresyon vektörünün konukçuya transformasyonunun ardından konukçu genomuna entegrasyonu sağlandı. Doğru transformant seçiminde kolaylık sağlayan zeosin antibiyotik direnç genini, AOX1 promotörünü ve rekombinant ürünün ekstrasellüler üretimini mümkün kılan *Saccharomyces cerevisiae*'ye ait pre-pro lider sekansını ( $\alpha$ -mating factor;  $\alpha$ -MF) taşıyan pPICZ $\alpha$ A vektörü ile *P. pastoris* ekspresyon sistemi, amacımıza uygun olarak etkili bir şekilde kullanılabilirdi. Bu sistem, yüksek hücre yoğunluğunda yetişebilmesinden dolayı yeterli miktarda protein ekspresyonu için kolay ve hızlı bir yöntem olarak bilinmektedir. Bazı proteinler, 10 g/l'ye kadar yüksek verimde eksprese edilebilir (Cregg *et al.* 2000). *E. coli* ekspresyon sistemi, kolay ve hızlı bir sistem olmasına rağmen disülfit bağ oluşumu, glikozilasyon ve uygun katlanma için gerekli proteolitik işleme gibi post-translasyonel modifikasyonlara ihtiyaç duyulan ökaryotik proteinlerin fonksiyonel ekspresyonu için uygun değildir. *Pichia* ekspresyon sistemi, hem prokaryotik hem de ökaryotik ekspresyon sistemlerinin avantajlarına sahiptir. Prokaryotik sistemler gibi minimal besiyerinde yüksek miktarda üreyebilirken ökaryotik sistemler gibi post-translasyonel modifikasyonları gerçekleştirebilir. Ayrıca *P. pastoris* ekspresyonunda herhangi bir toksik protein ekstrasellüler besiyerine salgılanmadığından bu durum farmasötik kullanım için büyük bir avantaj olarak görülmektedir (Kaymak 2008). Diğer yandan *P. pastoris* ekspresyon sistemi, daha yüksek miktarda protein üretimi sağlaması dolayısıyla *S. cerevisiae* ekspresyon sistemine tercih edilmektedir. Çalışmamızda  $\alpha$ -MF sinyal sekansını taşıyan vektöre PON1 geninin yerleştirilmesi ile bu sinyal sekansının

kodlanan muhtemel PON1 enziminin ekstrasellüler ekspresyonuna öncülük ettiği görüldü. Bu nedenle protein saflaştırılması için hücreyi parçalamaya gerek duyulmadan elde edilen kültür süpernatantı, SDS-PAGE, western blot ve enzim aktivitesi ölçüm analizlerinde kullanıldı.

Bu çalışma, PON1 geninin pPICZ $\alpha$ A vektörüne klonlanması, elde edilen rekombinant vektörün *P. pastoris*'te ekstrasellüler ekspresyonu, eksprese edilen enzimin saflaştırılması ve saflaştırılan enzimin karakterizasyonu olmak üzere dört basamakta gerçekleştirildi. Bu işlemler için hazırlanan çalışma planı Şekil 5.1'de verildi.



**Şekil 5.1.** Ekstrasellüler PON1 enzimini üreten rekombinant *P. pastoris* hücrelerinin gelişimi için araştırma planı

Çalışmada ilk olarak, insan karaciğer cDNA'sının kalıp DNA olarak kullanıldığı, dizayn edilen primerler ile gerçekleştirilen gradient PCR işleminde beş farklı primer bağlanma sıcaklığı denendi. Elde edilen PCR ürünleri, agaroz jel elektroforezi sonrasında UV altında gözlemlendi (Şekil 4.1) ve sonraki işlemlerde primerlerin en iyi bağlanma sıcaklığının 61°C olduğu tespit edilen PCR şartları kullanıldı. Proteinin doğal N-terminali ile salgılanması için seçilen kesim enzimlerinin tanıma sekanslarını içerecek şekilde PCR'da çoğaltılan PON1 geni, agaroz jelde yürütüldükten sonra jelden ekstrakte edilerek Çizelge 3.5'te belirtilen uygun reaksiyon şartlarında *EcoRI* ve *XbaI* enzimleri ile kesilip fenol/kloroform ekstraksiyonu yapılarak ligasyon işlemi için hazır hale getirildi. Diğer yandan vektör DNA da aynı enzimlerle kesilerek CIAP ile muamele edilmesinin ardından agaroz jelde yürütüldü. Vektör DNA'nın kapalı formu, lineer formundan daha hızlı yürüdüğünden UV altında görüntülenen jelde vektör DNA'nın kesilerek lineer hale geldiği teyit edilmiş oldu (Şekil 4.2). Ardından jelden ekstrakte edilerek ligasyon işlemi için hazır hale getirildi. Gerçekleştirilen ligasyon işleminden sonra elde edilen muhtemel rekombinant ürün, kompetent *E. coli* TOP10 hücrelerine transforme edildi. Oluşturulan transformantlardan zeosin antibiyotiğine dirençli olan kolonilerin LSLB-zeosin agar besiyerinde gelişimi gözlemlendi (Şekil 4.3). Seçilen muhtemel rekombinant koloniler ile gerçekleştirilen PCR işlemleri, bu işlemler sonucu elde edilen pozitif kolonilerden saflaştırılan muhtemel rekombinant plazmitlerin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi ve vektör DNA'ya ait primerlerle gerçekleştirilen PCR reaksiyonu, muhtemel rekombinant plazmit kullanılarak gerçekleştirilen restriksiyon kesim işlemi ve sekans analizi sonucu rekombinant olduğu doğrulanan plazmit, bakteriden saflaştırılıp AOX promotör bölgesinden kesilerek lineer hale getirildikten sonra maya hücrelerine transfer edildi. Zeosin antibiyotiğine dirençli kolonilerin YPD agar besiyerinde seçimi sağlandıktan sonra (Şekil 4.10) koloni PCR ile doğrulanan iki rekombinant maya kolonisi (3. ve 6. koloni) kullanılarak rekombinant protein üretimi aşamasına geçildi.

Heterolog protein verimi, konak suşun fizyolojisi, üreme şartları ve kültürasyon işlem parametreleri gibi gen ekspresyonu ve salgılanmasını etkileyen faktörlere bağlı olduğu gibi yabancı proteinin stabilitesi ve proteaz hassasiyeti gibi karakteristik özelliklerine de

bağlıdır (Sreekrishna *et al.* 1997; Cos *et al.* 2005). Ekstrasellüler üretim besiyerindeki ürün konsantrasyonu, çoğu örnekte kültürdeki hücre konsantrasyonu ile orantılı olduğundan hücre büyümesi, özellikle biyoreaktörlerde salgılanan ürün üretimi için önemlidir (Cereghino and Cregg 2000). Fermentör kültürlerde kullanılan yalnızca gliserol veya metanol, biotin, tuz ve iz elementleri içeren mineral besiyerinin *P. pastoris* için ekonomik ve iyi tanımlanmış olması dolayısıyla elde edilen protein seviyesi daha yüksek olmaktadır. Daha önemlisi pH, aerasyon, karbon kaynağı ve besleme hızı gibi parametreler yalnızca fermentörde kontrol edilebildiğinden yüksek seviyede hücre yoğunluğuna ulaşmak da mümkün olmaktadır (Macauley-Patrick *et al.* 2005; Büyüksungur 2006). Buna rağmen, çalkalamalı erlenmayer kültürlerde üretim hacminin, oksijen transferinin, substrat ilavesinin ve bu faktörleri izlemenin sınırlı olması nedeniyle heterolog proteinleri yüksek miktarda üretmek zor olmakla birlikte oksijen transferi bölmeli erlenmayerlerde artırılabilir (Guarna *et al.* 1997; Villatte *et al.* 2001). Bu yüzden bölmeli erlenmayerler kullanılarak gerçekleştirilen rekombinant protein üretiminde öncelikle seçilen kolonilerin üretim kapasitelerinin karşılaştırılması için BMGY ön kültür besiyerine aşılardan iki farklı rekombinant koloninin 18 saatlik inkübasyonu ile geliştirilen hücreler, hazırlanan BMMY üretim besiyerlerinde 72 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Elde edilen kültürlerden 48. ve 72. saatlerde alınan örneklerin enzim aktiviteleri ölçülerek SDS-PAGE analizi yapıldı. Şekil 4.13'de görüldüğü gibi sadece 6. koloniye ait süpernatantta PON1 enzimine ait bant görülürken negatif kontrolde bant görülmedi. 3. kolonide ise neredeyse görülebilir miktarda üretim gerçekleşmedi. Bu sonucun nedeni, hücrede sentezlenen ve PON1 enzimini hidroliz eden mayaya ait çeşitli proteazların varlığı olarak tahmin edilmektedir (Ata 2012). SDS-PAGE analizinin ardından 72. saat sonunda enzim aktivitesi 6. kolonide 10,12 EÜ/ml olarak gözlenirken 3. kolonide 7,23 EÜ/ml, biyomasları ise sırasıyla 9,0 ve 9,8 g/l olarak gözlemlendi. Bu yüzden 3. kolonide yüksek hücre konsantrasyonu dolayısıyla fazla miktarda proteaz üretiminin rekombinant enzimin hızlı degradasyonuna neden olduğu söylenebilir. Sonuç olarak çalışmanın sonraki aşamalarında 6. koloni, rekombinant enzim üretimi için tercih edildi.



*P. pastoris*'te yabancı protein üretimi için genellikle uygulanan yöntem, öncelikle suşların istenen proteinin ekspresyonunu inhibe eden, karbon kaynağı olarak gliserol içeren tanımlı besiyerinde geliştirilmesi, daha sonra kültüre ekspresyonu indüklemek için metanol veya metanol ve gliserol karışımının ilave edilmesidir (Cereghino *et al.* 2002). Fermentasyon sıvısına ilave edilen metanol ve gliserol miktarı önemlidir. Çünkü farklı karbon kaynakları, istenen proteinin ekspresyonunu inhibe edebilen farklı yan ürünlerle sonuçlanan metabolizmayı belirler. Örneğin *P. pastoris*, gliserol içeren kesikli beslemeli kültür ve karışık beslemeli kültürde yan ürün olarak az miktarda etanol üretir (Inan and Meagher 2001). Özellikle kesikli-beslemeli sistemde metanol konsantrasyonunun sabit tutulması önemli sorunlardan biridir. Metanolün alkol oksidaz enzimi tarafından oksidasyonu sonucu hücre içinde toksik olan formaldehit ve hidrojen peroksitin hızlı birikimi nedeniyle aşırı metanol konsantrasyonu istenmeyen bir durum olduğundan kontrol edilmesi gerekir. Metanol konsantrasyonu, on-line metanol sensörü, çözünmüş oksijen seviyesi veya sürekli besleme ile kontrol edilebilir (Zhang *et al.* 2000). Diğer yandan düşük miktarı ise transkripsiyonu başlatmak için yeterli olmayabilir (Macauley-Patrick *et al.* 2005). Çalışmada Invitrogen tarafından tavsiye edilen miktarda ilave edilen metanolün (%0,5) rekombinant protein üretimi için transkripsiyonu başlatmada yeterli olduğu görüldü.

Yapılan bazı çalışmalarda uygun amonyum iyonlarının, vitaminlerin ve iz elementlerin ilave edilmesiyle rekombinant protein veriminde artış görülmüştür (Boze *et al.* 2001; Xie *et al.* 2005). Maya ekstraktı, kazamino asit, L-arjinin ve EDTA gibi diğer azot kaynakları, üretim seviyesini artırmak için kullanılır. Ayrıca proteaz sorunu için rakip substrat olan amino asitçe zengin bu bileşenler, proteaz indüksiyonunu baskılayarak ürün parçalanmasını azaltır (Macauley-Patrick *et al.* 2005; Daly and Hearn 2005). *Pichia* ile fermentasyonda kullanılan karbon kaynaklarından gliserol ve sorbitol gibi substratlar, hücre gelişiminde kullanılırken metanol ve metilamin gibi substratlar çeşitli proteinlerin ekspresyonunda kullanılmaktadır (Çalık 2010). Çalık *et al.* (2010) metanolün yanısıra sorbitolün kullanılması durumunda mikroorganizma için lag fazın (ortama alışma fazının) yalnızca metanolün kullanıldığı durumdan daha kısa olduğunu rapor etmiştir. Ayrıca Jungo *et al.* (2007), Çelik *et al.* (2009) ve Çalık *et al.* (2010)

tarafından rapor edildiği gibi kesikli kültürde sorbitolün ilave edilmesinden sonra indüksiyon fazının başlangıcında kullanılmaya başlandığından hücrede metanol ve sorbitol kullanımı eş zamanlı gerçekleşir. Ancak Orman (2007), sorbitol yerine gliserolün kullanılması durumunda gliserolün tamamı hücreler tarafından tüketildiğinde metanol kullanım oranının arttığını, bu durumda gliserolün AOX1 promotörünün güçlü bir represörü olduğunu, aşırı gliserolün metanolün etkisiz bir şekilde kullanımı ile sonuçlanan AOX1 ekspresyonunu sınırladığını ve bu durumun daha düşük rekombinant ürün üretimi ile sonuçlandığını bildirmiştir. Thrope *et al.* (1999) ise gliserol-metanol ve sorbitol-metanol besleme stratejilerini karşılaştırmış, her iki stratejiye ait ürün miktarının oldukça benzer olduğunu görmüş ve gliserolün promotörü baskılayıcı etkisinden dolayı sorbitol-metanol besin stratejisinin tercih edilebileceğini bildirmiştir. Bu bağlamda çalışmanın bu basamağında çalkalamalı kültürde hücrelerin rekombinant protein üretimi sırasında büyümelerine yardımcı olmak amacıyla da metanole ek substrat olarak sorbitol kullanıldı.

Fermentasyon sırasında yüksek hücre yoğunluğuna ulaşan maya hücrelerinin parçalanması sonucu kültür sıvısına salgılanan proteazlar, rekombinant proteinin parçalanmasında temel faktördür. Bu problemin üstesinden gelmek için şimdiye kadar çoğu araştırmacı tarafından kültür şartlarının kontrolü, besiyeri içeriğinin değiştirilmesi, proteaz inhibitörleri, pepton, kazamino asit ve spesifik amino asitlerin ilave edilmesi gibi çok sayıda deneme yapılmıştır (Enfors 1992; Gonzalez-Lopez *et al.* 2002). Li *et al.* (2000), yaptığı çalışmada inkübasyon sıcaklığını 30°C'den 23°C'ye indirerek *P. pastoris* ile ürettiği antifriz proteinlerin miktarının 5,3 mg/l'den 18 mg/l'ye ulaştığını, aynı şekilde Dragosits *et al.* (2009), 3H6 Fab fragmentinin 20°C'deki spesifik üretiminin 30°C'dekinden 3 kat daha fazla olduğunu bildirmiştir. Sıcaklıkta olduğu gibi hücre büyümesi ve rekombinant protein üretimi için pH'da önemli bir parametredir. Besiyeri pH'sının 5,0'dan 4,0'a düşürülmesi sonucu *P. pastoris*'te CBM (cellulose-binding module)-CALB (cellulose 6A and lipase B) ekspresyonunun %40'dan 90'a ulaştığı bildirilmiştir (Jahic *et al.* 2003). Potvin *et al.* (2010) ise proteolitik parçalanmayı önlemede istenen ürün haricinde proteazlar için yarışmalı enzimatik substrat kullanılabileceğini göstermiştir. Ancak bu denemelerin çoğu sınırlı etki gösterdiğinden

genetik manipölasyonlarla oluşturulan, proteaz üretmeyen suşlara ihtiyaç duyulmuştur. Bu amaçla *P. pastoris* SMD1163 (*his4 pep4 prb1*), SMD1165 (*his4 prb1*), ve SMD1168 (*his4 pep4*) suşları heterolog protein üretiminde etkili bir şekilde kullanılmaktadır (White *et al.* 1995; Brierley 1998). Ancak üretim besiyerinde yavaş gelişen ve transformasyon işlemi zorlukla gerçekleştirilebilen bu suşların kullanımını sadece yetersiz veya tatmin edici olmayan sonuçlara neden olan proteolitik parçalanmayı azaltmak için tavsiye edilir (Invitrogen 2010a).

Yapılan bu çalışmalara ait sonuçlar göz önünde bulundurularak nötral pH'da optimum aktivite gösteren proteazlara spesifik olarak duyarlı olan ve fermentasyon ortamına salgılanan rekombinant proteinin proteolitik parçalanmasından dolayı pH'sı 6 olan besiyerine %1 oranında kazamino asit ilave edildi ve böylelikle rekombinant *P. pastoris* tarafından üretilen ekstrasellüler proteazların inhibisyonu mümkün oldu. Aynı şekilde, Clare *et al.* (1991) yaptığı çalışmada %1 kazamino asit ilavesi ile proteazları inhibe ederek *P. pastoris* tarafından üretilen rekombinant fare epidermal büyüme faktörünün miktarında artış gözlemiş, diğer yandan Brierley *et al.* (1994) ortam pH'sını 3 veya daha altına ayarlandığında düşük pH değerine dirençli olan *Pichia*'nın iyi üreme gösterdiğini ve çoğu nötral pH proteazlarının inaktif olduğunu bildirmiştir. Bu bağlamda çalışmada kazamino asit ilavesinin yanısıra pH'sı 3'e ayarlanmış üretim besiyerinde gerçekleştirilen inkübasyon sonucu rekombinant hücrelerde iyi bir gelişim gözlenirken enzim aktivitesi gözlenemedi. Bu durum, düşük pH ortamında rekombinant PON1 enziminin aktivitesinin kaybolduğunu düşündürmektedir. Bu düşünceye paralel olarak pH 6'ya ayarlanmış tamponlu besi ortamında üretilerek inkübasyon süresi sonunda kültür ortamından saflaştırılan rekombinant enzimin karakterizasyonu çalışmalarında enzim aktivitesinin en iyi olduğu pH değerinin 10 olduğu belirlendiğinden bu düşüncenin doğruluğu teyit edilmiş oldu.

Seçilen 6. koloni ile rekombinant enzim üretimi için BMMY üretim besiyerine 30 g/l sorbitolün yanı sıra proteaz inhibitörü olan %1 kazamino asit ilave edildi ve her 24 saatte %0,5'lik metanol indüksiyonu ile 120 saat boyunca 24 saatte bir aktivite ölçümü gerçekleştirildi. En iyi enzim aktivitesine (16,49 EÜ/ml) 96. saatte ulaşıldı. Bu saatten

sonraki ölçümde enzim aktivitesinde meydana gelen düşüşün, enzimin hidrolize maruz kalma süresinin artması ve artan biyomas miktarına bağlı olarak salgılanan proteaz miktarının artması nedeniyle enzimin proteolizisinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu durum, indüksiyon süresinin uzunluğunun proteolizisi etkilediğini göstermekte ve enzim degradasyonu olarak bilinen PON1 enziminin hidrolize maruz kalma süresinin artması anlamına gelmektedir. Benzer şekilde Ata (2012), yaptığı çalışmada glukoz izomeraz enziminin *P. pastoris* ile ekstrasellüler üretimi sırasında kültür ortamındaki sorbitolün tükenmesini takiben proteaz aktivitesinin artarken rekombinant enzim aktivitesinin azaldığını ve sonuç olarak ekstrasellüler üretimde proteolitik aktivitenin maya ekspresyon sisteminde rekombinant enzim aktivitesinin daha yüksek seviyeye ulaşmasını önleyen sınırlayıcı bir basamak olduğunu bildirmiştir.

Glikozilasyon, *P. pastoris* tarafından gerçekleştirilen en yaygın post-translasyonel modifikasyonlardan biridir (Eckart and Bussineau 1996). Çoğu memeli doğal proteinlerinin glikozillendiği düşünüldüğünden rekombinant proteinlerin, biyolojik aktivitelerini sağlayacak şekilde doğru glikozilasyon modeline sahip olması gerektiği bilinmektedir. Ayrıca glikozillenen gen ürünleri, genellikle *S. cerevisiae*'de eksprese edilenden daha kısa glikozil zincirlerine sahip olduğundan *P. pastoris*, rekombinant protein üretiminde daha ilgi çekici mikroorganizma olarak bilinir. *Pichia*, diğer maya ve funguslarda olduğu gibi salgılanan proteinlerin serin ve treonin amino asitlerinin hidroksil gruplarına O-oligosakkaritleri ilave eder. Bunlar sadece mannoz rezidülerinden oluşur. Oysa memeliler gibi yüksek yapılı ökaryotlar, bu oligosakkaritlerde çok çeşitli şeker kompozisyonuna sahiptir. Bir protein, yerel konukçusunda doğal olarak glikozillensin veya glikozillenmesin heterolog proteinlerin *Pichia*'da glikozillenmesi mümkündür. Ancak aynı serin ve treonin rezidülerinden glikozillenmeyebilir (Cereghino and Cregg 2000). *P. pastoris* veya diğer funguslar tarafından salgılanan yabancı yüksek yapılı ökaryotik proteinler sorunlu olabilir. Memelilerde O-bağlı oligosakkaritler, N-asetilgalaktozamin, galaktoz ve sialik asit gibi şekerlerden oluşur. Ancak *P. pastoris*'in de dahil olduğu düşük yapılı ökaryotlar, O-oligosakkaritlere mannoz (Man) rezidüleri ekler. Her bir zincirdeki Man rezidülerinin sayısı, bağlanma çeşidi, *P. pastoris*'te O-glikozilasyonun sıklığı ve özgülüğü henüz

belirlenmemiştir. Ancak yerel konağında O-glikozilasyona uğramayan bir proteinin, glikozilasyona uğramayacağı da söylenemez. İnsanlarda glikozilasyona uğramayan IGF-1 proteinine *P. pastoris* tarafından O-bağlı mannoz ilave edilmiştir. Ayrıca O-glikozilasyonda *P. pastoris* tarafından tercih edilen Ser (serin) ve Thr (treonin) rezidülerinin yerel konakçıdaakinin aynısı olacağı da söylenemez. *P. pastoris* tarafından salgılanan diğer yabancı proteinler, hiperglikozillenmiş durumda SDS-PAGE ve western blotlama sonucu görülebilen fazla karbonhidrat taşırlar. *S. cerevisiae*'nin aksine, *P. pastoris* oligosakkaritlere  $\alpha$ -1,3-terminal mannoz ilave etme yeteneğine sahip değildir. Bu durum gözardı edilirse *P. pastoris* dış zincir oligosakkaritlerine ilişkin çok az bilgi vardır. Ayrıca dış zincirlerin neden *P. pastoris* tarafından salgılanan bazı proteinlere ilave edildiği veya zincir ilavesinin nasıl önlenebileceği bilinmemektedir. Mayalar tarafından proteinlere N-bağlı yüksek mannoz oligosakkaritlerinin ilavesi salgılanan yabancı proteinlerin eczacılık endüstrisinde kullanımında önemli sorunlara neden olur. Bu proteinler, memeliler için aşırı antijenik olup karaciğer tarafından kandan hızlı bir şekilde uzaklaştırılır. Son zamanlarda Belçika ve Amerika'daki bir çalışma grubu, insan proteinleri ile aynı mannoz motiflere sahip protein üreten *P. pastoris* konak suşları elde etmiştir. Sonraki çalışmalarında ise tamamen insan proteininin özelliklerine sahip rekombinant protein üreten suşlar geliştirmeleri ümit edilmektedir (Cregg 2001).

PON1 üzerinde ikisi (Asn 227 ve Asn 270)  $\beta$ -kırmalı tabakaların merkezinde, diğer ikisi ise yüzeye bakan bölgede (Asn 253 ve Asn 324) olmak üzere 4 tane potansiyel N-glikozillenme bölgesi yer almaktadır. PON1, memeli hücrelerinde eksprese edildikten sonra bu noktalardan glikozillenir (Dragonov and La Du 2004). PON ailesinin hidrolitik aktivitesi için glikozilasyonu önemli değildir (Josse 1999; Ahoroni 2004). Ancak enzimin yapısında bulunan bu karbonhidrat molekülleri spesifik olmayan hücre membranlarına bağlanmada veya kararlılığı ve çözünürlüğü artırmada etkili olabilir (Jonas 2000; Sinan 2005). Çalışmada heterolog proteinlerde glikozilasyonu gerçekleştirme yeteneğine sahip rekombinant *P. pastoris* ile 120 saatlik inkübasyon süresince elde edilen kültür ortamından örnekler alınarak enzimin elektroforez sistemindeki analizi, enzimin indirgeyici ajanı olan SDS ve ısı uygulaması ile denatüre

edilmesinin ardından poliakrilamid jel aracılığıyla gerçekleştirildi. Elektroforez uygulamasından sonra jelde ayrılan proteinler, gümüş boyama yöntemi ile görünür hale getirildi. Sonrasında ise western blot analizi yapıldı. Şekil 4.14'te görüldüğü gibi farklı zaman aralıklarında alınan ve jelde yürütülen örneklere ait protein bantları, gümüş boyama yöntemi yardımıyla görünür hale getirilip bunlardan belirgin olan ve indüklendiği tahmin edilen bantların rekombinant PON1 enzimine ait olduğu düşünüldü. Bu düşüncenin doğruluğu, rekombinant proteine spesifik antikor kullanılarak gerçekleştirilen western blot analiziyle de teyit edilmiş oldu (Şekil 4.15). Rf değerinin hesaplanması sonucunda rekombinant proteinin 59,1 kDa olduğu belirlendi. Yaklaşık 45 kDa moleküler kütleyle sahip olduğu bilinen insan PON1 enziminin rekombinant *P. pastoris*'te ekspresyonu sonucu 59,1 kDa moleküler kütleyle sahip olması, proteinin maya tarafından translasyon sonrası glikozilasyona uğratıldığını düşündürmektedir. Rekombinant ürün üretimi ile ilgili yapılan diğer çalışmalarda da *P. pastoris*'te eksprese edilen ürünlerin gerçek moleküler kütlelerinin üzerinde olması, maya tarafından gerçekleştirilen glikozilasyon olayı ile açıklanmıştır. Örneğin, Çalık (2010) yaptığı çalışmada 50 kDa moleküler kütleyle sahip *Trichoderma reesei* endoglukanaz I enziminin *P. pastoris*'te ekstrasellüler üretimi sonucu 70 ve 100 kDa civarında olup ancak oldukça yüksek aktiviteye sahip olduğunu ve Soyaslan (2010), 34-38,5 kDa moleküler kütleyle sahip insan eritropoietininin *P. pastoris*'te ekstrasellüler üretimi sonucu 43-55 kDa aralığında moleküler kütleyle sahip olduğunu bildirmiştir.

Son olarak, yeniden aynı şartlarda üretim ile elde edilen rekombinant enzim için karakterizasyon çalışmaları yapıldı. Polihistidin uzaması içeren (2,5 kDa) rekombinant proteini saflaştırma işleminin ilk basamağı, kültür ortamından elde edilen süpernatantın ultrafiltrasyon ile 10 kat konsantre edilmesi ve aynı zamanda tuzların uzaklaştırılması ile gerçekleştirildi. Ultrafiltrasyon ve takip eden diğer işlemler sırasında mikrobiyal ve proteolitik parçalanmayı önlemek amacıyla protein içeren solüsyonun sıcaklığı, 2-8°C'de tutuldu. Bu işlem sonucu elde edilen konsantre ürün, saflaştırma işlemi için hazırlanan histidine spesifik Probond™ kolonuna yüklenerek rekombinant protein, elüsyon tamponunda saf olarak elde edildi. Elde edilen bu elüsyon ile gerçekleştirilen diyaliz işleminin ardından SDS-PAGE ile jelde ayrılan proteinler, gümüş boyama

yöntemi ile görünür hale getirildi. Şekil 4.16'da görüldüğü gibi saf olarak elde edilen rekombinant protein, farklı konsantrasyonlarda jelle yüklenerek giderek artan yoğunlukta bantlar gözlemlendi.

Aynı zamanda gerçekleştirilen enzim aktivite ölçüm sonucuna göre, saflaştırılan enzimin spesifik aktivitesinin 1,87 EÜ/mg olduğu belirlendi. Sonraki adımlarda enzim aktivitesini artırmaya yönelik optimizasyon çalışmaları (optimum pH, optimum iyonik şiddet, optimum sıcaklık) gerçekleştirildi.

Enzim aktivitesinin en yüksek olduğu optimum pH'yı belirlemek için üç farklı tampon (potasyum fosfat, tris/HCl ve glisin/NaOH) kullanıldı. Yapılan aktivite ölçüm çalışmaları sonucu en iyi aktivite değerine (21,5 EÜ/ml) 50 mM glisin/NaOH tamponu ile pH 10'da ulaşıldı. pH 8,5'in altında ise aktivite gözlenmedi. Enzim aktivitesinin en yüksek olduğu optimum iyonik şiddeti belirlemek için pH'sı 10 olan glisin/NaOH tamponunun farklı konsantrasyonlarında çalışıldı. 30,29 EÜ/ml enzim aktivitesi ile optimum tampon konsantrasyonu, 100 mM olarak belirlendi. Enzimin en iyi aktivite gösterdiği optimum sıcaklığı belirlemek için 0-90°C aralığında çalışıldı. 31,27 EÜ/ml ile enzim aktivitesinin en yüksek olduğu sıcaklık değeri, 15°C olarak belirlendi. Saflaştırılan rekombinant PON1 enziminin kinetik sabitleri ( $K_M$  ve  $V_{max}$ ) paraokson substratı kullanılarak belirlendi. Çalışmada, 15°C'de 1 mM  $Ca^{+2}$  içeren 100 mM glisin/NaOH tamponunda (pH 10) 2 mM paraokson substratı için  $K_M$  0,025 mM ve  $V_{max}$  28,4 EÜ/ml olarak belirlendi.

Literatürde PON1 enziminin paraokson sustratı için farklı  $K_M$  değerleri bildirilmiştir. Gan *et al.* (1991) serumdan saflaştırdıkları PON1 için 25°C'de 50 mM tris/HCl tamponunda (pH 7,45) paraokson substratı ile  $K_M$  değerini 0,5 mM, Li *et al.* (2000) serumdan saflaştırdıkları PON1 için 37°C'de 2 mM  $Ca^{+2}$  içeren 0,1 M tris/HCl tamponunda (pH 8,5) paraokson substratı ile  $K_M$  değerini 0,81 mM ve Rodrigo *et al.* (2001) serumdan saflaştırdıkları PON1 için 25 °C'de 0,1 M tris/HCl 2 mM  $Ca^{+2}$  tamponunda (pH 8) paraokson substratı ile  $K_M$  değerini 1,38 mM olarak saptamışlardır. Paraokson için bildirilen afinite ( $K_M$ ) değerlerindeki bu farklılıklar, enzim ekstraktının

saflık derecesinden, kullanılan tampon pH'sından, ölçüm ortamının sıcaklığından, kullanılan substratın saflık derecesinden ve substrat konsantrasyonundan kaynaklanabilir. Ayrıca paraokson hidrofobik karakterli substrat olup metanol, etanol, izopropil alkol, aseton gibi organik çözücülerde çözülebilir. Ancak bu organik çözücülerin PON1'i inhibe ettiği bilinmektedir. Bu nedenle ölçüm ortamındaki bu çözücülerin konsantrasyonu %5'in altında tutulduğunda inhibisyon minimum düzeyde olmaktadır. Dolayısıyla,  $K_M$  ve  $V_{max}$  için bildirilen farklı değerlerin bir başka nedeni de kullanılan organik çözücü ve aktivite ortamındaki konsantrasyonu olabilir (Koncuk 2011).

### **Sonuç ve Öneriler**

- Bu tez kapsamında insan rekombinant PON1 enziminin *P. pastoris*'te ekstrasellüler üretimi başarıyla gerçekleştirilebilmiştir.
- Rekombinant enzim, ekstrasellüler özelliğe sahip olduğundan hücre içeriğini parçalamaya gerek duyulmadan saflaştırılabilmektedir. Bu durum iş gücünün azaltılması açısından önem arz etmektedir.
- Rekombinant enzim üretiminin gerçekleştirildiği, yukarıda önemi belirtilen tüm parametrelerin optimizasyonu ile daha fazla verim alınabileceği ve rekombinant maya hücrelerinin immobilizasyonu ile de optimize edilen kültür şartlarında enzim üretiminin gerçekleştirilebileceği düşünülmektedir.
- Daha fazla kültür hacmi kullanılarak büyük ölçekli fermentör üretimiyle daha fazla miktarda aktiviteye sahip saf enzim elde edilebileceği ve glikozillenmiş rekombinant enzimin fazla glikozil zincirlerinin bertaraf edilerek western blot, immunohistokimya, ELISA ve SDS-PAGE gibi çeşitli uygulama alanlarında kullanılabileceği tahmin edilmektedir.



**KAYNAKLAR**

- Abdelmoula-Souissi S., Rekik, L., Gargouri, A. and Mokdad-Gargouri, R., 2007. High-level expression of human tumour suppressor P53 in the methylotrophic yeast: *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 54, 283-288.
- Ahoroni, A.E.A., 2004. Directed Evolution of Mammalian Paraoxonases PON1 and PON3 for Bacterial Expression and Catalytic Specialization. *Proceedings of the National Academic of Sciences*, 101, 482-487.
- Aldridge, WN., 1953a. Serum esterases. I. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochemistry Journal*, 53 (1), 110-117.
- Aldridge, WN., 1953b. Serum esterases. II. An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. *Biochemistry Journal*, 53 (1), 117-24.
- Anonymous, 2006. Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000204. (<http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASListings/ucm153734.htm>)
- Açık, E., 2009. Effects Of Carbon Sources And Feeding Strategies On Human Growth Hormone Production By Metabolically Engineered *Pichia pastoris*. Master thesis, Middle East Technical University, The Graduate School of Natural and Applied Sciences, Ankara.
- Aoki, H., Ahsan, M.N. and Watabe, S., 2003. Heterologous expression in *Pichia pastoris* and single-step purification of a cysteine proteinase from northern shrimp. 2003. *Protein Expression and Purification*, 31(2), 213–221.
- Ata, Ö., 2012. Metabolical Engineering of *Pichia pastoris* For Extracellular Thermostable Glucose Isomerase Production. Master Thesis, Middle East Technical University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Ankara.
- Bayrak, T., 2009. Tavşan Karaciğer Paraoksonaz 1 Enziminin Saflaştırılarak Kinetik Özellikleri, Endojen Substratları ve Antioksidan Özelliklerinin Araştırılması. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Bayraktar, E., 2009. Effects Of pH On Human Growth Hormone Production By *Pichia pastoris* Considering The Expression Levels Of Regulatory Genes. Master thesis, Middle East Technical University, The Graduate School of Natural and Applied Sciences, Ankara.
- Bensadoun and Weinstein. 1976. Assays of proteins in the presence of interfering materials. *Analytical Biochemistry*, 70, 241-250.
- Boy, E., 2011. Recombinant *Pyrococcus furiosus* Extracellular Alpha-Amylase Expression in *Pichia pastoris*. Master Thesis, Middle East Technical University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Ankara.
- Boze, H., Laborde, C. and Chemardin, P., 2001. High-level secretory production of recombinant porcine follicle-stimulating hormone by *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry*, 36, 907-913.

- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248.
- Brierley, R.A., Bussineau, C., Kosson, R., Melton, A. and Siegel, R.S., 1990. Fermentation development of recombinant *Pichia pastoris* expressing the heterologous gene: bovine lysozyme. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 589, 350-362.
- Brierley, R. A., Davis, G. R., and Holtz, G. C., 1994. Production of Insulin-Like Growth Factor-1 in Methylo-trophic Yeast Cells. United States Patent 5, 324, 639.
- Brierley, R.A., 1998. Secretion of recombinant human insulin-like growth factor (IGF-I) *Methods in Molecular Biology*, 103, 149-177.
- Brocca, S., Schmidt-Dannert, C., Lotti, M., Alberghina, L. and Schmid, R.D., 1998. Design, total synthesis, and functional overexpression of the *Candida rugosa* lip1 gene coding for a major industrial lipase. *Protein Science*, 7, 1415-1422.
- Budak, H., 2009. Memeli Sirkadian Sisteminde Tip60 Geninin Karakterizasyonu. Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Büyüksungur, A., 2006. Cloning and Expression of Benzaldehyde Lyase Gene From *Pseudomonas fluorescens* Biovar I in *Pichia pastoris*. Master thesis, Middle East Technical University, The Graduate School of Natural and Applied Sciences, Ankara.
- Cereghino, G.P.L. and Cregg, J.M., 1999. Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 10, 422-427.
- 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. and Sunga, A.J., 2001. New selectable marker/auxotrophic host strain combinations for molecular genetic manipulation of *Pichia pastoris*. *Gene*, 263, (1-2), 159-169.
- 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.
- Chen, X., Zhai, C., Kang, L., Li, C., Yan, H., Zhou, Y., Yu, X. and Ma, L., 2012. High-level expression and characterization of a highly thermostable chitosanase from *Aspergillus fumigates* in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Letters*, 34:689-694.
- 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.
- Cos, O., Serrano, A., Montesinos, J.L., Ferrer, P., Cregg, J.M. and Valero, F., 2005. Combined effect of the methanol utilization (Mut) phenotype and gene dosage on recombinant protein production in *Pichia pastoris* fed-batch cultures. *Journal of Biotechnology*, 116, 321-335.
- Cos, O., Ramon, R., Montesinos, J.L. and Valero, F. 2006. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review. *Microbial Cell Factories*, 5, 17.
- Costa, L.G., Mcdonalds, B.E., Murphy, S.D., Omenn, G.S., Motulsky, A.G. and Furlong, C.E., 1990. Serum paraoxonase and Its Influence on Paraoxon and

- Chlorpyrifosoxon Toxicity in Rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*;103:66-76.
- Couderc, R. and Baratti, J., 1998. Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*: purification and properties of alcohol oxidase. *Agricultural and Biological Chemistry*, 44, 2279–2289.
- Cregg J.M., Tschopp J.F. and Stillman C., 1987. High-level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in *Pichia pastoris*. *Biotechnology*, 5, 479-485.
- Cregg J.M. and Madden K.R. 1988. Development of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, as a host system for the production of foreign proteins. *Developments in Industrial Microbiology*, 29, 23-42.
- Cregg, J.M., Madden, K.R., Barringer, K.J., Thill, G.P. and Stillman, C.A. 1989. Functional characterization of the two alcohol oxidase. *Molecular and Cellular Biology*, 9 (3), 1316-1323.
- Cregg, J.M., Vedvick, T.S. and Raschke W.C., 1993. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology*, 11, 905-909.
- Cregg, J.M., 1999. Gene expression systems, Ed: J.M. Fernandez and J.P. Hoeffler, Academic Press, San Diego, California.
- Cregg, J.M., 2001. Regulation of gene expression by methanol in the yeast *Pichia pastoris*. PhD thesis. Oregon Graduate Institute, United States.
- Cregg, J.M., 2007. Introduction: distinctions between *Pichia pastoris* and other expression systems. *Methods of Molecular Biology*, 389, 1-10.
- Çalık, P., Çalık, G., and Özdamar, T.H., 1998. Oxygen transfer effects in serine alkaline protease fermentation by *Bacillus licheniformis*: Use of citric acid as the carbon source. *Enzyme and Microbial Technology*, 23, 451-461.
- Çalık, P., Çalık, G., Takaç, S. and Özdamar, T.H., 1999. Metabolic flux analysis for serine alkaline protease fermentation by *Bacillus licheniformis* in a defined medium: effects of the oxygen transfer rate. *Biotechnology and Bioengineering*, (64), 151-167.
- Çalık P., Çalık G. and Özdamar T.H., 2000. Oxygen-Transfer Strategy and Its Regulation Effects in Serine Alkaline Protease Production by *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 69, 301-311.
- 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.
- Çalık A., 2010. Optimization of the Production of *Trichoderma reesei* Endoglucanase I in *Pichia pastoris*. Master Thesis, Sabancı University, Engineering and Natural Sciences, Istanbul.
- Çelik, E., Çalık, P. and Oliver, S.G., 2009. Fed-batch methanol feeding strategy for recombinant protein production by *Pichia pastoris* in the presence of co-substrate sorbitol. *Yeast*, 26, 474-484.
- Çelik, E. and Çalık, P., 2012. Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnology Advances*, 30, 1108-1118.
- Dallas-Yang, Q., Jiang G., and Francis, M.S., 1998. Digestion of Terminal Restriction Endonuclease Recognition Sites on PCR. *Biotechniques*, 582-584.

- 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.
- Damasceno, L.M., Huang, C.J., and Batt, C.A., 2011. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93 (1), 31-39.
- Deakin, S., Leviev, I., Gomaraschi, M., Calabresi, L., Franceschini, G. and James, R.W., 2002. Enzymatically active paraoxonase-1 is located at the external membrane of producing cells and released by a high affinity, saturable, desorption mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 4301-4308.
- De Pourcq, K., De Schutter, K. and Callewaert, N., 2010. Engineering of glycosylation in yeast and other fungi: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87 (5), 1617-1631.
- De Schutter, K., Lin, Y.C., Tiels, P., Van Hecke, A., Glinka, S., Weber-Lehmann, J., Rouze, P., Van de Peer, Y. and Callewaert, N., 2009. Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nature Biotechnology*, 27 (6), 561-569.
- Dragonov, D.I. and La Du, N.B., 2004. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 369, 78-88.
- Dragosits, M., Stadlmann, J., Albiol, J., Baumann, K., Maurer, M., Gasser, B., Sauer, M., Altmann, F., Ferrer, P. and Mattanovich, D., 2009. The effect of temperature on the proteome of recombinant *Pichia pastoris*. *Journal of Proteome Resources*, 8 (3), 1380-1392.
- Durrington, P.N., Mackness B. and Mackness M.I., 2001. Paraoxonase and Atherosclerosis. *Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology*, 21(4), 473-480.
- Eckart, M.A and Bussineau C.M., 1996. Quality and authenticity of heterologous proteins synthesized in yeast. *Current Opinion Biotechnology*, 7, 525-530.
- Egli, T., Van Dijken, J.P., Veenhuis, M., Harder, W. and Fiechter, A., 1980. Methanol metabolism in yeasts: regulation of the synthesis of catabolic enzymes. *Archives of Microbiology*, 124, 115-121.
- Ellis, S.B., Paul, F.B., Patricia, J.K., Ann, F.W., Michael, M.H. and Thomas, R.G., 1985. Isolation of Alcohol Oxidase and Two Other Methanol Regulatable Genes from the Yeast *Pichia pastoris*. *Molecular and Cellular Biology*, 1111-1121.
- Enfors, S., 1992. Control of proteolysis in fermentation of recombinant proteins. *Trends in Biotechnology*, 10, 310-315.
- Eom, G.T., Lee, S.H., Song, B.K., Chung, K-W., Kim, Y-W. and Song, J.K., 2013. High-level extracellular production and characterization of *Candida antarctica* lipase B in *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 116 (2), 165-170.
- Estin, M.L. Stoltz, D.A. and Zabner, J., 2010. Paraoxonase 1, quorum sensing and *P. aeruginosa* infection: a novel model. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 660, 183-193.
- 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.
- Fan, F., Zhuo, R., Sun, S., Wan, X., Jiang, M., Zhang, X. and Yang, Y., 2011. Cloning and functional analysis of a new laccase gene from *Trametes* sp. 48424 which

- had the high yield of laccase and strong ability for decolorizing different dyes *Bioresource Technology*, 102, 3126-3137.
- Fei, L., Wang, Y. and Chen, S., 2009. Improved glutathione production by gene expression in *Pichia pastoris*. *Bioprocess Biosystem Engineering*, 32, 729-735.
- Freigassner, M., Pichler, H., and Glieder, A., 2009. Tuning microbial hosts for membrane protein production. *Microbial Cell Factories*, 8, 69-91.
- Gan, K.N., Smolen, A., Eckerson, H.W. and La Du, B.N., 1991. Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. *Drug Metabolism and Disposition*, 19, 100-106.
- Glazer, A.N. and Nikaido, H., 1995. *Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Biotechnology*, W.H. Freeman and Company, USA
- Gellissen, G., 2000. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54, 741-750.
- Gemmill, T.R. and Trimble R.B., 1999. Overview of N-linked and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. *BBA-General Subjects*, 1426 (2), 227-237.
- Gerngross, T.U., 2004. Advances in the production of human therapeutic proteins in yeast and filamentous fungi. *Nature Biotechnology*, 22 (11),1409-1414.
- Gonzalez-Lopez, 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.
- Greene, J., 2004. Host Cell Compatibility in Protein Expression. In *Recombinant Gene Expression*, Ed: P. Balbas and A. Lorence, 10. New Jersey, Humana Press.
- Guarna M.M., Lesnicki, G.J. and Tan, B.M., 1997. On-line monitoring and control of methanol concentration in shake-flask cultures of *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*, 56 (3), 279-286.
- Gumport, R.I. and Lehman I.R., 1971. Structure of the DNA Ligase-Adenylate Intermediate: Lysine ( $\epsilon$ -amino)-Linked Adenosine Monophosphoramidate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68 (10), 2559-2563.
- Gür Kurt, G., 2010. Cloning Of The Laccase cDNAs From *Pycnoporus sanguineus* Mucl 38531, Expression in *Pichia pastoris* and Characterization Of Recombinant Laccases. PhD Thesis, Istanbul Technical University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Istanbul.
- Harel, M., Aharoni, A., Gaidukov, L., Brumshtein, B., Khersonsky, O., Meged, R., Dvir, H., Ravelli, R.B.G., McCarthy, A., Toker, L., Silman, I, Sussman, J.L. and Tawfik, D.S., 2004. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and antiatherosclerotic enzymes. *Nature Structural & Molecular Biology*; 11, 412-419.
- Higgins, D.R. and Cregg, J.M., 1998. Introduction to *Pichia pastoris*. *Pichia protocols*, Ed:D.R. Higgins, J.M. Cregg, Humana Press, Totowa, N.J, 1-15.
- Hilt, W. and Wolf, D.H., 1992. Stress-induced proteolysis in yeast. *Molecular Microbiology*, 6, 2437-2442.
- Hohenblum, H., Gasser, B., Maurer, M., Borth, N. and Mattanovich, D., 2004. Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*, 85 (4), 367-375.

- Holst, B., Bruun, A.W., Kiellandbrandt, M.C. and Winther, J.R., 1996. Competition between folding and glycosylation in the endoplasmic reticulum. *EMBO Journal* 15, 3538-3546.
- Idiris, A., Tohda, H., Kumagai, H. and Takegawa, K., 2010. Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86, 403-407.
- Inan, M. and Meagher, 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).
- Jahic, M., Wallberg, F., Bollok, M., Garcia, P. and Enfors, S.O., 2003. Temperature limited fed-batch technique for control of proteolysis in *Pichia pastoris* bioreactor cultures. *Microbial Cell Factory*, 2, 6.
- Jahic, M.A., Gustavsson, A.K., Jansen, M. and Enfors, S.O., 2006. Process technology for production and recovery of heterologous proteins with *Pichia pastoris*. *Biotechnology Progress*, 22, 1465-1473.
- Jawad, Z. and Paoli, M., 2002. Noval Sequences Propel Familiar Folds. *Structure*, 10, 447-454.
- Jiang, X.P., Yin, M.L., Chen, P. and Yang, Q., 2012. Constitutive expression, purification and characterization of bovine prochymosin in *Pichia pastoris* GS115. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 2087-2093.
- Jin, H., Liu G., Ye, X., Duan, Z., Li, Z. and Shi, Z., 2010. Enhanced porcine interferon- $\alpha$  production by recombinant *Pichia pastoris* with a combinational control strategy of low induction temperature and high dissolved oxygen concentration. *Biochemical Engineering Journal*, 52 (1), 91-98
- Jonas, A., 2000. Lecithin cholestrol Acyltransferase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1529, 245-256.
- Josse, D.E.A., 1999. Identification of Residues Essential For Human Paraoxonases (PON1) Arylesterase/Organophosphatase Activities. *Biochemistry*, 38, 2816-2825.
- Josse, D.E.A, 2002. Oligometric States of The Detergent-Solubilized Human Serum Paraoxonase (PON1). *Journal of Biological Chemistry*, 277, 386-397.
- Julius, E.W., Brake, A., Blair, L., Kunisawa, R. and Thorner, J., 1984. Isolation of the putative structural gene for the Lysine-Arginine-cleaving endopeptidase required for processing of the yeast prepro-alpha-factor. *Cell*, 37, 1075-1090.
- Jungo, C., Schenk, M., Pasquier, I.W., Arison, M. and Van 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*. *Journal of Biotechnology*, 131, 57-66.
- Kang, L., Chen, X., Fu, L. and Ma, L. 2012, kitosanaz Recombinant expression of chitosanase from *Bacillus subtilis* HD145 in *Pichia pastoris*. *Carbohydrate Research*, 352, 37-43.

- Karaoğlan, M., 2012. *Pichia pastoris* Alkol Oksidaz (AOX1 ve AOX2) Genlerinin İnaktif Edilmesi ve Elde Edilen Suşun Rekombinant Protein Üretiminde Kullanılması. Yüksek Lisans tezi, Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya.
- Kaymak, E., 2008. *Arabidopsis Thaliana* Lipases: Cloning and Expression in *Pichia pastoris*. Master thesis, Sabancı University, The Graduate School Of Engineering and Natural Sciences, Istanbul.
- Kirk, R.E. and Othmer, D.F., 1994. Encyclopedia of Chemical Technology, 4<sup>th</sup> Ed., the Interscience Encyclopedia Inc., New York.
- Klug, W.S., Cummings, M.R. and Spencer, C.A., 2006. Concepts of genetics, Eight Edition, Pearson Prentice Hall, New Jersey.
- Klausner, R.D., 1989. Architectural editing: determining the fate of newly synthesized membrane proteins. *New Biology*, 1, 3-8.
- Kobayashi, K., Shinobu, K., Tomoshi, O., Toyoo, O., Masao, O. and Kenji, T., 2000. Addition of oleic acid increases expression of recombinant human serum albumin by the AOX2 promoter in *Pichia pastoris*. *Microbial physiology and biotechnology*, 479-484.
- Koncuk, B., 2011. Koyun Karaciğer Mikrozoamlarından PON1 Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu Ve Bazı Radyonüklid İlaçların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Koutz, P., Geneva, R.D., Cathy, S., Kevin, B. Cregg, J. and Thill, G., 1989. Structural Comparison of the *Pichia pastoris* Alcohol Oxidase Genes. *Yeast*, 167-177.
- Krainer, F.W., Dietzsch, C., Hajek, T., Herwig, C., Spadiut, O. and Glieder, A., 2012. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains with an engineered methanol utilization pathway. *Microbial Cell Factories*, 11, 22.
- Kuo, C.L. and La Du, B.N., 1998. Calcium binding by human and rabbit serum paraoxonases. *Drug Metabolism Disposition*, 26, 653-660.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259), 680-685.
- Lee, J.D. and Komagata, K. 1980. Taxonomic study of methanol assimilating yeasts. *Journal of General and Applied Microbiology* 33:358-365.
- Lenz, D.E., Yeung, D., Smith, J.R., Sweeney, R. E., Lumley, L.A. and Cerasoli, D. M., 2007. Stoichiometric and catalytic scavengers as protection against nerve agent toxicity: a mini review. *Toxicology*, 233, 1-3, 31-39.
- Lenz, D.E., Yeung D.T. and Cerasoli, D.M., 2010. Human paraoxonase I: A potential bioscavenger of organophosphorous nerve agents. *The Paraoxonases: Their Role in Disease Development*, 1-20.
- Li, W.F., Costa, L.G., Richter, J.R., Hagen, T. and Shih, D.N., 2000. Catalytic efficiency determines the in-vivo efficacy of PON1 for detoxifying organophosphorous compounds. *Pharmacogenetics*, 10, 767-779.
- Li, H., Li, N., Gao, X., 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, Y., Wu, S., Ouyang J., Mao, L., Li, W. and Lin, H., 2012. Expression of insulin-like growth factor-1 of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) in yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 84, 80-85.

- Liang, H., 2003. Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress and diseases. *Journal of Molecular Medicine*, 81, 766-779.
- Lineweaver, H. and Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of American Chemical Society*, 57, 685.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D. and Darnell, J., 2003. *Molecular Cell Biology*, 5<sup>th</sup> Ed., W.H. Freeman Co., New York.
- Lourdes, R., Bharti, M., Durrington, P.N., Hernandez, A. and Mackness, M.I., 2001. Hydrolysis of platelet-activating factor by human serum paraoxonase. *Biochemistry Journal*, 354, 1-7.
- Lu, H., Chu, P., Sun, M. and Qin, J., 2006. High-level expression of recombinant human paraoxonase 1 Q in silkworm larvae (*Bombyx mori*). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72, 103-108.
- Lui, X., 2010. GMO and Protein Engineering, Part 2, in *Enzymes in Food Technology*. Ed: R.J. Whitehurst and M.V. Oort, 18-43. West Sussex, Blackwell Publishing Ltd.,
- Macauley-Patrick, S., Fazenda, M.L., McNeil, B. and Harvey, L.M., 2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 22, 249-270.
- Mackness, M.I., Mackness, B., Durrington, P.N., Connelly, P.W. and Hegele, R.A., 1996. Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Current Opinion in Lipidology*, 7, 69-76.
- Mazur, A., 1946. An enzyme in animal tissues capable of hydrolyzing the phosphorus fluorine bond of alkyl fluorophosphates. *Journal of Biological Chemistry*, 164, 271-89.
- McKinney, J., Knappskog, P.M. and Pereira, J., 2004. Expression and purification of human tryptophan hydroxylase from *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 33, 185-194.
- Menendez, J., Valdes, I. and Cabrera, N., 2003. The ICL1 gene of *Pichia pastoris*, transcriptional regulation and use of its promoter. *Yeast*, 20, 1097-1108.
- Menendez, J., Hernandez, L., Banguela, A and Pais, J., 2004. Functional production and secretion of the *Gluconoacetobacter diazotrophicus* fructose-releasing exo-levanase (LsdB) in *Pichia pastoris*. *Enzyme Microbial Technology*, 34 (5), 446-452.
- Mochizuki, S, Hamato, N, Hirose, M, 2001. Expression and characterization of recombinant human antithrombin III in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 23, 55-65.
- Moses, V. and Cape, R.E., 1991. *Biotechnology: The Science and the Business*, Harwood Academic Publishers, Switzerland.
- Niebauer, R.T. and Robinson, A.S., 2005. *Saccharomyces cerevisiae* protein expression from protein production to protein engineering. *Protein Expression Technologies*, 253-296.
- Nielsen, J. and Villadsen, J., 1994. *Bioreaction Engineering Principles*, 2<sup>nd</sup> ed., Plenum Press, New York.
- Nielsen, J., Villadsen, J. and Liden, G., 2003. *Bioreaction Engineering Principles*. 2<sup>nd</sup> ed. Kluwer Academic Publishers.
- Ogata, K., Nishikawa, H., Ohsugi, M., 1969. A yeast capable of utilizing methanol. *Agricultural and Biological Chemistry*, 33, 1519-1520.



- Old, R.W. and Primrose, S.B., 1994. Gene Manipulation, Part. 1 in Principles of Gene Manipulation, ed: R.W. Old and S.B.Primrose, 5. Blackwell Science.
- Olivera, B.M., Hall, Z.W. and Lehman, I.R., 1968. Enzymatic joining of polynucleotides, V.A DNA-adenylate intermediate in the polynucleotide-joining reaction. Proceedings of the National Academy of Sciences, 61, 237-244.
- Orman, M.A., 2007. Extracellular Recombinant Human Growth Hormone Production By *Pichia pastoris*. Master thesis, The Middle East Technical University, The Graduate School Of Natural And Applied Sciences, Ankara.
- Paramsivam, M., Saravanan, K. and Uma, K., 2002. Expression, purification and characterization of equine lactoferrin in *Pichia pastoris*. Protein Expression and Purification, 26, 28-34.
- Peng, L., Zhong, X. and Ou, J., 2004. High-level secretory production of recombinant bovine enterokinase light chain by *Pichia pastoris*. Journal of Biotechnology, 108, 185–192.
- Peng, H., Liu, H.P., Chen, B., Hao, H. and Wang, K.J., 2012. Optimized production of scygonadin in *Pichia pastoris* and analysis of its antimicrobial and antiviral activities. Protein expression and purification, 82, 37-44.
- Primrose, S.B., Twyman, R.M. and Old, R.W., 2001. Principles of gene manipulation, 6th edition. Blackwell Publishing, USA.
- Primrose, S.B. and Twyman, R.M., 2002. Principles of Gene Manipulation, 6th edition. Blackwell Publishing USA.
- Potvin, G., Ahmad, A. and Zhang, Z., 2010. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. Biochemical Engineering Journal, 64, 91-105.
- Ranieri, D., Colao, M.C., Ruzzi, M., Romagnoli, G., and Bianchi, M.M., 2009. Optimization of recombinant fungal laccase production with strains of the yeast *Kluyveromyces lactis* from the pyruvate decarboxylase promoter. FEMS Yeast Resources, 9, 892-902.
- Renault, F., Chabri`ere, E., Andrieu, J., Dublet, B., Massona, P., Rochua, D. Tandem. 2006. purification of two HDL-associated partner proteins in human plasma, paraoxonase (PON1) and phosphate binding protein (HPBP) using hydroxyapatite chromatography. Journal of Chromatography B, 836 15–21.
- Rodgers, C.J., Blanford, C.F., Giddens, S.R., Skamnioti, P., Armstrong, F.A. and Gurr, S.J., 2010. Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes?. Trends in Biotechnology, 28 (2), 63-72.
- Rodrigo, L., Mackness, B., Durlington, P.N., Hernandez, A. and Mackness, M.I., 2001. Hydrolysis of platelet-activating factor by human serum paraoxonase. Biochemical Journal, 354, 1-7.
- Romanos M., 1995. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. Current Opinion in Biotechnology, 6, 527–533.
- Rousselot, D.B., Therond, P., Beaudoux, J.L., Peynet, J., Legrand, A. and Delatre, J., 1999. High density lipoproteins and the oxidative hypothesis of atherosclerosis. Clinical Chemistry Laboratory Medicine, 37, 939-949.
- Sambrook J. and Russell D.W., 2001. Agarose Gel Electrophoresis, in Molecular Cloning, 3<sup>rd</sup> ed., Ed: J. Sambrook and D.W. Russell. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.

- Sarramegna, J., Demange, P., Milon, A. and Talmont, F., 2002. Optimizing functional versus total expression of the human m-opioid receptor in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 24, 212-220.
- Scragg, A.H., 1988. *Biotechnology for Engineers: Biological Systems in Technological Processes*, Ellis Horwood Ltd., England.
- Selamoğlu, H., 2009. High-Level Expression Of Hepatitis B Surface Antigen in *Pichia pastoris*, Its Purification and Immunological Characterization. Master thesis, Middle East Technical University, The Graduate School Of Natural and Applied Sciences, Ankara.
- Seok, J-H., Kim, H-S., Hatada, Y., Nam, S-W. and Kim, Y-H., 2012. Construction of an expression system for the secretory production of recombinant  $\alpha$ -agarase in yeast. *Biotechnology Letters*, 34, 1041-1049.
- Sharma, R., Katoch, M., Srivastava, P. S. and Qazi, G.N., 2009. Approaches for refining heterologous protein production in filamentous fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 2083-2094.
- Shen, S., Sulter, G., Jeffries, T.W. and Cregg, J.M., 1998. A strong nitrogen source regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 216, 93-102.
- Shuler, M.L. and Kargi, F., 2002. *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*, 2<sup>nd</sup> ed., Prentice Hall Inc., USA.
- Sibirny, A.A., Ubiyovk, V.M., Gonchar, M.V., Titorenko, V.I., Voronovsky, A.Y., Kapultsevich, Y.G. and Bliznik, K.M., 1990. Reaction of direct formaldehyde oxidation to CO<sub>2</sub> are not-essential for energy supply of yeast methylotrophic growth. *Archives of Microbiology*, 154, 566-575.
- Sinan, S., 2005. İnsan serum paraoksonaz (PON1) enziminin yeni bir yöntemle saflaştırılması ve bazı antibiyotiklerin enzim üzerindeki etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.
- Sinha, J., Plantz, B.A., Inan, M. and Meagher, M.M., 2005. Causes of proteolytic degradation of secreted recombinant proteins produced in methylotrophic yeasts *Pichia pastoris*: Case with recombinant ovine interferon-t. *Biotechnology and Bioengineering* 89 (1), 102-112.
- Slibinskas, R., Samuel, D., Gedvilaite, A., Staniulis, J. and Sasnauskas, K., 2004. Synthesis of the measles virus nucleoprotein in yeast *Pichia pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*, 107, 115-124.
- Soetart, W. and Vandamme, J., 2010. *Industrial biotechnology sustainable growth and economic success*. Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, Weinheim.
- 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.
- Sreekrishna, K., Brankamp, R.G., Kroop, K.E., Blankenship, D.T., Tsay, J.T., Smith, P.L., Wierschke, J.D., Subramaniam, A. and Birkenberger L.A., 1997. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 190, 87-97.
- Sreeknisha, K., Thill, G., Brierley, R.A. and Barr, K.A., 1998. Expression of human serum albumin in *Pichia pastoris*. United States Patent (5, 707, 828).
- Stevens, R.C., Suzuki, S.M., Cole, T.B., Park, S.S., Richter, R.J. and Furlong, C.E. 2008. Engineered recombinant human paraoxonase 1 (rHuPON1) purified from

- Escherichia coli* protects against organophosphate poisoning. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105 (35), 12780-12784.
- Sunga, A.J.J., 2008. Novel Methods for Generating Strains with Increased Copy Number in the Yeast *Pichia pastoris*. PhD Thesis, The Oregon Health & Science University, The Department of Science & Engineering, ABD.
- Thrope, E.D., Marc, C., d'Anjou and Andrew, J.D., 1999. Sorbitol as a nonrepressing carbon source for fed-batch fermentation of recombinant *Pichia pastoris*. Biotechnology Letters, 669-672.
- Trentmann, O., Khatri, N.K. and Hoffmann, F., 2004. Reduced oxygen supply increases process stability and product yield with recombinant *Pichia pastoris*. Biotechnology Progress, 20 (6), 1766-1775.
- Tulsiani, D.R., Hubbard, S.C., Robbins, P.W. and Touster, O., 1982. Alpha-D-mannosidases of rat liver Golgi membranes. Mannosidase II the GlcNacMan5-cleaving enzyme in glycoprotein biosynthesis and mannosidases IA and IB are the enzymes converting Man9 precursors to Man5 intermediates. Journal of Biological Chemistry, 257, 3660-3668.
- Uehara, H., Choi, D.B., Park, E.Y. and Okabe, M. 2000. Expression of Mouse  $\alpha$ -Amylase Gene in Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 5, 7-12.
- Uysal, S., Akyol, S., Hasgöl, R., Armutcu, F. and Yiğitoğlu M.R., 2011. Çok Yönlü Bir Enzim: Paraoksonaz. Yeni Tıp Dergisi, 28 (3), 136-141.
- Van Himbergen, T.M., Van Tits, L.J.H., Roest, M. and Stalenhoef, A.F.H., 2006. The story of PON1: how an organophosphate hydrolyzing enzyme is becoming a player in cardiovascular medicine. Netherlands Journal of Medicine, 64 (2), 34-38.
- Villatte, F., Hussein, A.S., Bachmann, T.T. and Schmid, R.D., 2001. Expression level of heterologous proteins in *Pichia pastoris* is influenced by flask design. Applied Microbiology and Biotechnology, 55, 463-465.
- Walsh, G., 2010. Biopharmaceutical benchmarks, Nature Biotechnology, 28, 917-924.
- White CE, Kempf NM, Komives EA. 1994. Expression of highly disulfide-bonded proteins in *Pichia pastoris*. Structure, 2 (11), 1003-1005.
- Wang, Y., Wang, Z., Xu, Q., Du, G., Hua, Z., Liu, L., Li J. and Chen, J., 2009. Lowering induction temperature for enhanced production of polygalacturonate lyase in recombinant *Pichia pastoris*. Process Biochemistry, 44, 949-954.
- Wang, X., Sun, Y., Shen, X., Ke, F., Zhao, H., Liu, Y., Xu, L. and Yan, Y., 2012. Intracellular expression of Vitreoscilla hemoglobin improves production of *Yarrowia lipolytica* lipase LIP2 in a recombinant *Pichia pastoris*. Enzyme and Microbial Technology, 50, 22-28.
- White, C.E., Kempf, N.M. and Komives, E.A., 1994. Expression of highly disulfide-bonded proteins in *Pichia pastoris*. Structure, 2 (11), 1003-1005.
- White, C.E., Hunter, M.J., Meininger, D.P., White, L.R. and Komives, E.A., 1995. Large-scale expression, purification and characterization of small fragments of thrombospondin: the roles of the sixth domain and methionine 388. Protein Engineering, 8 (11), 1177-1187.
- Wright, A. and Morrison S.L., 1997. Effect of glycosylation on antibody function: implications for genetic engineering. Trends in Biotechnology, 15 (1), 26-32.

- Wu, J. and Kaufman, R.J., 2006. From acute ER stress to physiological roles of the unfolded protein response. *Cell Death Differentiation*, 13, 374-384.
- Xie, J.L., Zhou, Q.W., Pen, D., Gan, R.B. and Qin, Y., 2005. Use of different carbon sources in cultivation of recombinant *Pichia pastoris* for angiostatin production. *Enzyme Microbiology and Technology*, 36, 210-216.
- Yang, G., Zhou, H., Lu, Y., Lin, Y. and Zhou, S., 2004. Comparing expression of different forms of human DNA topoisomerase I in *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology*, 34(2), 139-146.
- Yu, J., Li, D.Y. and Zhang, Y.J. 2002. High expression of *Trigonopsis variabilis* D-amino acid oxidase in *Pichia pastoris*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 18 (4-6), 291-297.
- Yu, P. and Tang, Y., 2012. Construction of the highly secreted endochitinase *Pichia pastoris* strain and the optimization of chitin-degrading conditions. *Carbohydrate Polymers*, 89, 41-45.
- Zhang, W., Inan, M. and Meagher, M.M., 2000. Fermentation strategies for recombinant protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 5, 275-287.
- Zhao, H., Zheng, L., Wang, X., Liu, Y., Xu, L. and Yan, Y., 2011. Cloning, expression and characterization of a new lipase from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Letters*, 12, 2445-52.
- Zhu, J., Ze, Y., Zhang, C., Zang, Y., Lu, H., Chu, P., Sun, M. and Qin, J., 2006. High-level expression of recombinant human paraoxonase 1 Q in silkworm larvae (*Bombyx mori*). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72, 103-108.
- Zou, S., Guo, S., Kaleema, I. and Lia, C., 2013. Purification, characterization and comparison of *Penicillium purpurogenum*  $\beta$ -glucuronidases expressed in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 88, 1913-1919.

## ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Erzurum'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Erzurum'da tamamladı. 2004 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2008 yılında birincilikle mezun oldu. 2008 yılında başladığı yüksek lisans öğrenimini 2010 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda tamamlayarak aynı yıl, aynı birimde doktora eğitimine başladı. 2010 yılından beri Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.