



**METABOLİK MÜHENDİSLİK ve REAKSİYON MÜHENDİSLİĞİ PRENSİPLERİYLE İNSAN BÜYÜME HORMONU ÜRETİMİ İÇİN YENİ BİYOTEKNOLOJİK PROSES GELİŞTİRİLMESİ**

**Program Kodu: 1001**

**Proje No: 114R091**

Proje Yürütücüsü:

**Prof.Dr. Pınar ÇALIK**

**Bursiyer(ler):**

Aslan Massahi

Damla Hüccetoğulları

Duygu Yalçınkaya

Özge Ata

Özge Kalender

Yiğit Akgün

TEMMUZ 2018  
ANKARA



## Önsöz

**“Metabolik mühendislik ve reaksiyon mühendisliği prensipleriyle insan büyüme hormonu üretimi için yeni biyoteknolojik proses geliştirilmesi”** konulu araştırma projesi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, “Endüstriyel Biyoteknoloji ve Metabolik Mühendislik Laboratuvarında” yürütülmüştür. Araştırma grubumuzun rekombinant protein üretimi, ve metabolik mühendislik araştırma alanlarında oluşturduğu birikimi, insan büyüme hormonunu biyoteknolojik prosesle üretimi için TÜBİTAK 114R091 projesi desteği ile sürdürülmüştür.

Türkiye'nin Avrupa Birliğine, Bağımsız Devletler Topluluğuna, Orta Doğu Pazarlarına yakınlığı ve büyük nüfusu, ortaya çıkan ve yeni çıkacak taleplerin karşılanması için doğal kaynaklarımızın kullanılarak yeni ürünler üretilmesini ve bunun için özgün proseslerin geliştirilmesini, bu çerçevede biyoteknolojik proseslerle birim fiyatı yüksek ürünler üretimini öncelikli araştırma ve uygulama alanı yapmaktadır. Bilim-buluş-teknoloji güdümünde sanayileşmenin temel strateji olarak benimsendiği 10. Plan Döneminde tamamlanan 114R091 Projesi biyoteknolojik ürünler üretim alanında, protein üretim sektörünün oluşması için önemli bir araştırma projesidir. Ülkemizde üretimi olmayan, rekombinant insan büyüme hormonunun global pazardaki payının 2015-2019 yılları arasında yıllık %4.22 oranında büyümesi beklenmektedir. 2013 yılında %28'lik hacimsel pay oranı ile Nova Nordisk rhGH pazarına liderlik etmiştir. 2014 yılında Nova Nordisk, Norditropin satışı ile \$1.080 milyar pazarda satış payı elde etmiştir. Metilotrofik maya *Pichia pastoris*, yabancı proteinleri yüksek miktarlarda üretebilme özelliği ile, insan büyüme hormonunun rekombinant üretimi için güçlü bir alternatif oluşturmaktadır.

TÜBİTAK-114R091 projesi altı değerli lisans-üstü araştırmacının yetişmesi için olanak sağlamıştır. Proje kapsamında elde edilen bilgiler doğrultusunda literatüre önemli katkılar yapılmaktadır. Birincisi Journal of Theoretical Biology, ikincisi Biotechnology & Bioengineering, üçüncüsü Journal of Chemical Technology and Biotechnology'de, dördüncüsü Biochemical Engineering Journal dördüncü makalemiz yayınlanmıştır; beşinci araştırma makalemiz de hazırlık aşamasındadır.

Pınar Çalık

23 Temmuz 2018

## İçindekiler

Önsöz.....	i
Şekillerin Listesi .....	vi
Tabloların Listesi.....	ix
Simgeleme .....	xi
ÖZET .....	xii
ABSTRACT .....	xiii
1. GİRİŞ .....	1
1.1. Hata-eğilimli PCR.....	7
1.2. Spacer Bölgelerin Mutasyonu.....	7
1.3. Hibrit Promotör Mühendisliği .....	7
1.4. Transkripsiyon Faktörlerinin Bağlanma Bölgelerinin (TFBB) Modifiye Edilmesi .....	8
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	9
2.1. Biyoteknolojik Ürün ve Proses ile İlgili Temel Bilgiler.....	9
2.1.1. Hormonlar ve Biyokimyası.....	9
2.1.2. Hormonların Yapıları .....	9
2.2. Biyoteknolojik Proseslerde Üretimi Etkileyen Biyoproses Parametreleri .....	11
2.2.1. Model Protein: Yeşil Floresan Protein .....	12
2.2.2. Biyoreaktör İşletim Türü ve Hidrodinamiği.....	12
3. GEREÇ ve YÖNTEM .....	13
3.1. pGAPZαA::hGH Plazmidinin pPICZα-A ve PGAPZαA Kullanılarak Geliştirilmesi.....	13
3.1.1. pGAPZαA ve pPICZαA::hGH Plazmidlerinin İzolasyonu .....	14
3.1.2. pGAPZαA ve pPICZαA::hGH Plazmidlerinin Çift Kesilmesi.....	15
3.1.3. Çift Kesilen pGAPZαA ve pPICZαA::hGH'den Elde Edilen hGH'nin Ligasyonu .....	15
3.1.4. <i>E. coli</i> DH5α Hücrelerinin pGAPZαA::hGH ile Transformasyonu ve Baz Plazmidin Oluşturulması .....	16
3.1.5. <i>Pichia pastoris</i> X-33'ün pGAPZαA::hGH ile Transformasyonu .....	17
3.2. P <sub>GAP</sub> Kütüphanesinin Oluşturulması.....	19

3.2.1. $P_{GAP}$ Dizininin Analizi.....	19
3.2.2. Tasarlanan $P_{GAP}$ varyantları .....	22
3.2.3. Temel Plazmidin Oluşturulması.....	28
3.2.4. Bazal Plazmidin Oluşturulması.....	29
3.2.5. $P_{GAP}$ Varyantlarını Taşıyan pGAPPro#:: <i>egfp</i> Plazmidlerinin Oluşturulması ve <i>E. coli</i> Transformasyonu .....	30
3.2.6. Tasarlanan $P_{GAP}$ Varyantlarını Taşıyan <i>P. pastoris</i> Suşlarının Oluşturulması .....	34
3.2.7. Tek-Kopya <i>P. pastoris</i> Suşlarının Seçilmesi.....	35
3.3. Geliştirilen $P_{GAP}$ Kütüphanesinin Taranması .....	36
3.3.1. Tarama Koşulları.....	37
3.4. rhGH Üretimi için Promotör Varyantlarının Seçimi.....	38
3.4.1. pGAPPro#:: <i>hGH</i> Plazmidlerinin Oluşturulması ve <i>E. coli</i> Transformasyonu.....	39
3.4.2. pGAPZa:: <i>hGH</i> ve pGAPPro#:: <i>hGH</i> Plazmidlerinin <i>P. pastoris</i> 'e Transformasyonu.....	43
3.4.3. pGAPZaA:: <i>hGH</i> ve pGAPPro#:: <i>hGH</i> Taşıyan r- <i>P. pastoris</i> 'in rhGH Üretim Performansının Araştırılması .....	45
3.5. Yarı-kesikli Biyoreaktörde hGH Üretimi .....	47
3.6. Analizler .....	50
3.6.1. Hücre Değişimi .....	50
3.6.2. eGFP Üretimi .....	50
3.6.3. rhGH Üretimi.....	50
3.6.4. Organik Asit Değişimi .....	51
3.6.5. Proteaz Aktivitesi .....	52
3.6.6. Hücre-içi Tepkime Hızlarının Hesaplanması.....	52
4. BULGULAR.....	55
4.1. pGAPZaA:: <i>hGH</i> Plazmidinin pPICZa-A ve PGAPZaA Kullanılarak Geliştirilmesi.....	55
4.1.1. pGAPZaA ve pPICZaA:: <i>hGH</i> Plazmidlerinin İzolasyonu .....	56
4.1.2. pGAPZaA ve pPICZaA:: <i>hGH</i> Plazmidlerinin Çift Kesilmesi.....	57
4.1.3. Çift Kesilen pGAPZaA ve pPICZaA:: <i>hGH</i> den Elde Edilen hGH'nin Ligasyonu .....	59
4.1.4. <i>E. coli</i> DH5a Hücrelerinin pGAPZaA:: <i>hGH</i> ile Transformasyonu ve Baz Plazmidin Oluşturulması .....	59

4.1.5. <i>Pichia pastoris</i> X-33'ün pGAPZαA::hGH ile Transformasyonu.....	61
4.2. P <sub>GAP</sub> Kütüphanesinin Oluşturulması.....	64
4.2.1. P <sub>GAP</sub> Dizininin Analizi.....	64
4.2.2. Temel Plazmidin Oluşturulması.....	67
4.2.3. Bazal Plazmidin Oluşturulması.....	68
4.2.4. P <sub>GAP</sub> Varyantlarını Taşıyan pGAPPro#::egfp Plazmidlerinin Oluşturulması ve <i>E. coli</i> Transformasyonu .....	70
4.2.5. Tasarlanan P <sub>GAP</sub> Varyantlarını Taşıyan <i>P. pastoris</i> Suşlarının Oluşturulması.....	75
4.2.6. Tek-Kopya <i>P. pastoris</i> Suşlarının Seçilmesi.....	76
4.3. Geliştirilen P <sub>GAP</sub> Kütüphanesinin Taranması .....	77
4.3.1. Tasarlanan Varyantların Farklı Tarama Koşullarındaki Kuvvetleri .....	78
4.4. pGAPZαA::hGH Taşıyan r- <i>P. pastoris</i> 'in rhGH Üretim Performansının Araştırılması.....	82
4.5. P <sub>GAP</sub> Metabolik Akı Analizi (MFA) .....	83
4.6. pGAPPro#::hGH Taşıyan Klonların Geliştirilmesi .....	85
4.6.1. rhGH Üretimi İçin Promotör Varyantlarının Seçimi .....	85
4.6.2. pGAPPro#::hGH Plazmidlerinin Oluşturulması ve <i>E. coli</i> Transformasyonu.....	86
4.6.3. pGAPZαA::hGH ve pGAPPro#::hGH Plazmidlerinin <i>P. pastoris</i> 'e Transformasyonu.....	89
4.7. pGAPZαA::hGH ve pGAPPro#::hGH Taşıyan r- <i>P. pastoris</i> 'in rhGH Üretim Performansının Hava Filtreli Çalkalamalı Biyoreaktörlerde Araştırılması .....	90
4.7.1. pGAPZαA::hGH ve pGAPPro#::hGH Taşıyan r- <i>P. pastoris</i> 'in rhGH Üretim İçin Üretim Ortamı Koşullarının Belirlenmesi .....	90
4.7.2. pGAPZαA::hGH ve pGAPPro#::hGH Taşıyan r- <i>P. pastoris</i> 'in rhGH Üretim Kapasitesinin Araştırılması .....	90
4.8. Yarı-kesikli Biyoreaktörde P <sub>GAP</sub> ve Pro9 Promotörlerinin rhGH Üretim Kapasitesinin Araştırılması .....	91
4.8.1. Glikoz Tüketimi, Etanol Üretimi ve Hücre Çoğalması .....	92
4.8.2. rhGH Üretimi.....	93
4.8.3. Proteolitik Aktivite.....	95
4.8.4. Organik Asit Üretimi.....	95



4.9. $P_{GAP}$ Altında Oksijen Transfer Koşullarının Hücre Çoğalması ve rhGH Üretimi Üzerindeki Etkisi .....	97
4.10 Pro10 Altında rhGH Üretimi.....	98
4.11 Yarı-kesikli ve Hibrit Yarı-kesikli Biyoreaktör Operasyonlarının Kıyaslanması.....	100
4.11.1. Glikoz-beslemeli Yarı-kesikli ve Hibrit Yarı-kesikli Biyoreaktör Operasyonlarının Kıyaslanması.....	100
4.11.2. Melas-beslemeli Yarı-kesikli ve Hibrit Yarı-kesikli Biyoreaktör Operasyonlarının Kıyaslanması.....	104
5. SONUÇLAR.....	108
KAYNAKLAR.....	109
EK-1 Agaroz Jel Görüntülemelerinde Kullanılan DNA Markerları.....	119
EK-2 <i>P. pastoris</i> Hücre İçi Tepkimeleri.....	120

## Şekillerin Listesi

Şekil 3. 1. pGAPZαA'nın şematik gösterimi. ....	13
Şekil 3. 2. pPICZαA::hGH'nin sahip olduğu His-tag ve Faktör Xa kesme bölgeleri ile birlikte şematik gösterimi .....	14
Şekil 3. 3. pGAPZαA::hGH plazmidi ve transformasyon için kullanılan Nsil enzimi kesme bölgesi .....	18
Şekil 3. 4. $P_{GAP}$ vektörünün haritası ve $P_{GAP}$ dizini .....	20
Şekil 3. 5. Temel plazmid olan pPICZα-a::egfp kullanılarak pGAPPro#::egfp plazmidlerinin oluşturulmasının şematik gösterimi .....	30
Şekil 3. 6. Kısıtlı glikoz ortamı için kullanılan disklerin salınım profili (Kuhner, CH).....	38
Şekil 3. 7. rhGH'nin Kex2 ile kesilerek hücre dışına çıkarılması .....	39
Şekil 3. 8. Füzyon PCR yöntemiyle α-faktör-rhGH fragmentinin oluşturulması. ....	40
Şekil 3. 9. Bsp119I ve KpnI enzimleri ile kesilerek egfp geninin uzaklaştırılması ve yerine α-faktör taşıyan hGH geninin yerleştirilmesi .....	41
Şekil 3. 10. Kısıtlı glikoz ortamı için kullanılan disklerin salınım profili.....	46
Şekil 3. 11. <i>P. pastoris</i> hücre-içi tepkime ağı.....	54
Şekil 4. 1. pGAPZαA'nın şematik gösterimi. Enzim kesme bölgeleri de şekilde görülmektedir .....	55
Şekil 4. 2. pPICZαA::hGH'nin sahip olduğu His-tag ve Faktör Xa kesme bölgeleri ile birlikte şematik gösterimi .....	56
Şekil 4. 3. pGAPZαA'ya ait 2, pPICZαA::hGH'ye ait 4 farklı koloniden izole edilen plazmidlerin jel elektroforez görüntüsü. ....	57
Şekil 4. 4. EcoRI ile kesildikten sonra elde edilen pGAPZαA and pPICZαA::hGH plazmidlerin jel elektroforez görüntüsü. ....	57
Şekil 4. 5. Çift kesilen pGAPZαA ve pPICZαA::hGH plazmidlerinin jel elektroforez görüntüsü. ....	58
Şekil 4. 6. Çift kesilen ve saflaştırılan pGAPZαA and pPICZαA::hGH plazmidleri.....	58
Şekil 4. 7. İzole edilen pGAPZαA::hGH'lerin jel elektroforez görüntüsü.....	59
Şekil 4. 8. EcoRI ve XbaI ile çift kesilmiş plazmidlerin jel elektroforez görüntüsü. ....	60
Şekil 4. 9. Seçilen transformantlara ait plazmidlerin PCR sonucunun jel elektroforez görüntüsü..	61
Şekil 4. 10. pGAPZαA::hGH plazmidi ve transformasyon için kullanılan Nsil enzimi kesme bölgesi .....	62
Şekil 4. 11. pGAPZαA::hGH plazmidinin Nsil enzimi ile kesildikten sonraki jel elektroforez görüntüsü.....	63

Şekil 4. 12. pGAPZαA::hGH taşıyan olası <i>P. pastoris</i> transformantlardan izole edilen genomik DNA'ların jel elektroforez görüntüsü. ....	63
Şekil 4. 13. pGAPZαA::hGH taşıyan kolonilerden izole edilen genomik DNA'ların GAP-ileri ve AOX-geri primerleri kullanılarak yapılan PCR sonucunun jel elektroforez görüntüsü. ....	64
Şekil 4. 14. $P_{GAP}$ vektörünün haritası ve $P_{GAP}$ dizini .....	65
Şekil 4. 15. Farklı tuz derişimlerinin denendiği egfp amplifikasyonu için yapılan PCR .....	67
Şekil 4. 16. Transformasyon sonrası izole edilen plazmidler .....	68
Şekil 4. 17. Seçilen koloniye ait plazmidin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	69
Şekil 4. 18. Seçilen kolonilere ait plazmidlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü .....	70
Şekil 4. 19. Temel plazmid olan pPICZα-a::egfp kullanılarak pGAPPro#:egfp plazmidlerinin oluşturulmasının şematik gösterimi. ....	71
Şekil 4. 20. Farklı tuz derişimlerinin denendiği PCR sonuçlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü. ....	71
Şekil 4. 21. $P_{GAP}$ varyantlarının PCR'den sonraki agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	72
Şekil 4. 22. BglIII ve EcoRI ile kesilmiş pPICZα-A::egfp (4286 bp) plazmidin agaroz jel elektroforez görüntüsü. ....	73
Şekil 4. 23. a Transformasyondan sonra izole edilen pGAPPro#:egfp plazmidlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. ....	74
Şekil 4.23. b Transformasyondan sonra izole edilen pGAPPro#:egfp plazmidlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü .....	74
Şekil 4.23. c Transformasyondan sonra izole edilen pGAPPro#:egfp plazmidlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü .....	75
Şekil 4. 24. qPCR sonucunda elde edilen ham datanın görüntüsü .....	76
Şekil 4. 25. qPCR sonucunda elde edilen standart eğri.....	77
Şekil 4. 26. qPCR sonucunda elde edilen tipik bir erime noktası analizi. ....	77
Şekil 4. 27. Tasarlanan varyantların modifiye edilmemiş $P_{GAP}$ 'a göre ekspresyon kuvvetleri (%)..	79
Şekil 4. 28. Hücre ve rhGH derişimlerinin kalma süresi ile değişimi.....	82
Şekil 4. 29. Glikoz ve etanol derişimlerinin kalma süresi ile değişimi .....	82
Şekil 4. 30. Kalma süresiyle spesifik rhGH üretim hızının değişimi .....	83
Şekil 4. 31. G3P dallanma noktasındaki akı dağılımı .....	84
Şekil 4. 32. Piruvat dallanma noktasındaki akı dağılımı .....	85
Şekil 4. 33. rhGH'nin Kex2 ile kesilerek hücre dışına çıkarılması.....	86



Şekil 4. 34. (a) $\alpha$ -faktör ve rhGH'nin çoğaltıldığı 1. PCR sonucu (b) $\alpha$ -faktör ve rhGH'nin birleştirildiği 2. PCR sonucu.....	87
Şekil 4. 35. İkili kesme tepkimesinden sonra elde edilen saflaştırılmış plazmidler ve $\alpha$ -faktör-rhGH DNA fragmenti.....	88
Şekil 4. 36. Transformasyon sonucu elde edilen izole plazmidler..	89
Şekil 4. 37. BglIII ile kesilen transformasyondan sonra seçilmiş plazmidlerin agaroz jel görüntüsü..	89
Şekil 4. 38. Pro9 ve Pro10'un doğal $P_{GAP}$ 'a göre rhGH üretimi kapasiteleri .....	91
Şekil 4. 39. $P_{GAP}$ ve Pro9 suşlarına ait hücre, glikoz ve etanol derişim profilleri .....	93
Şekil 4. 40. $P_{GAP}$ ve Pro9 suşlarına ait rhGH üretim profilleri.....	94
Şekil 4. 41. $P_{GAP}$ ve Pro9 suşlarına ait asidik proteaz üretim profilleri .....	95
Şekil 4. 42. a $P_{GAP}$ suşu için biyoproses süresince elde edilen organik asit derişim profili .....	96
Şekil 4. 42. b Pro9 suşu için biyoproses süresince elde edilen organik asit derişim profili .....	96
Şekil 4. 43. <i>P. pastoris</i> 'in varyant GAP promotörü, Pro10, altında biyoproses süresince hücre derişimindeki değişimler .....	98
Şekil 4. 44. <i>P. pastoris</i> 'in varyant GAP promotörü, Pro10, altında biyoproses süresince rhGH derişimindeki değişimler .....	99
Şekil 4. 45. Oksijen tüketim hızının biyoproses süresince değişimi .....	99
Şekil 4. 46. Organik asit oluşum profili .....	100
Şekil 4. 47. Glikoz bazlı besleme stratejilerinde hücre derişiminin zamana bağlı değişimi. ....	103
Şekil 4. 48. Glikoz bazlı besleme stratejilerinde rhGH derişiminin zamana bağlı değişimi .....	104
Şekil 4. 49. Melas bazlı besleme stratejilerinde fruktoz derişiminin zamana bağlı değişimi.....	106
Şekil 4. 50. Melas bazlı besleme stratejilerinde hücre derişiminin zamana bağlı değişimi .....	106
Şekil 4. 51. Melas bazlı besleme stratejilerinde rhGH derişiminin zamana bağlı değişimi.....	107

## Tabloların Listesi

Tablo 1. 1. Rekombinant farmasötik proteinler ve kullanım alanları.....	2
Tablo 2. 1. Rekombinant hGH üreten kuruluşlar ve ilaç sanayindeki ürün adları .....	12
Tablo 3. 1. pPICZαA:hGH ve pGAPZαA taşıyan <i>E. coli</i> DH5α hücrelerinin çoğaltıldığı ortam bileşimi .....	14
Tablo 3. 2. pPICZαA::hGH ve pGAPZαA'nın lineerizasyon tepkime bileşimi .....	15
Tablo 3. 3. pPICZαA::hGH ve pGAPZαA'nın çift kesme tepkime bileşimi .....	15
Tablo 3. 4. Ligasyon tepkime karışımı .....	16
Tablo 3. 5. Tasarlanan primerler ve dizinleri.....	16
Tablo 3. 6. PCR tepkime bileşimi .....	17
Tablo 3. 7. PCR işletim koşulları .....	17
Tablo 3. 8. pGAPZαA::hGH'nin lineerizasyon tepkime bileşimi.....	18
Tablo 3. 9. PCR tepkime bileşimi .....	19
Tablo 3. 10. MatInspector tarafından bulunan putative transkripsiyon faktörleri .....	21
Tablo 3. 11. Glikolitik genlerin TF bağlanma bölgeleri açısından analizi .....	22
Tablo 3. 12. Tasarlanan promotör varyantları.....	27
Tablo 3. 13. $P_{GAP}$ varyantlarının çoğaltılması için kullanılacak primerler .....	28
Tablo 3. 14. PCR tepkime bileşimi .....	28
Tablo 3. 15. PCR işletim koşulları.....	29
Tablo 3. 16. Ligasyon tepkime karışımı .....	29
Tablo 3. 17. GAPPro# varyantları ve egfp için tasarlanmış primerler.....	31
Tablo 3. 18. GAPPro# varyantlarının çoğaltıldığı PCR tepkime içeriği.....	31
Tablo 3. 19. GAPPro# varyantlarının çoğaltıldığı PCR işletim koşulları .....	31
Tablo 3. 20. GAPPro# varyantlarının boyutları .....	32
Tablo 3. 21. İkili kesme koşulları .....	32
Tablo 3. 22. Ligasyon reaksiyon içeriği.....	33
Tablo 3. 23. Lineerizasyon tepkime içeriği.....	34
Tablo 3. 24. eGFP'nin kopya sayısının bulunması için tasarlanan qPCR primerleri.....	36
Tablo 3. 25. qPCR işletim koşulları.....	36
Tablo 3. 26. qPCR tepkime içeriği .....	36
Tablo 3. 27. Ön-kültür ortamı kompozisyonu.....	37

Tablo 3. 28. Üretim ortamı kompozisyonu .....	37
Tablo 3. 29. Promotör kütüphanesinin tarandığı koşullar.....	38
Tablo 3. 30. $\alpha$ -faktör-rhGH DNA fragmentinin oluşturulmasında kullanılan primerler.....	39
Tablo 3. 31. $\alpha$ -faktör ve rhGH genlerinin çoğaltılması için kullanılan PCR tepkime içeriği .....	40
Tablo 3. 32. $\alpha$ -faktör ve rhGH genlerinin çoğaltılması için kullanılan PCR işletim koşulları .....	41
Tablo 3. 33. İkili kesme koşulları .....	41
Tablo 3. 34. Ligasyon reaksiyon içeriği.....	42
Tablo 3. 35. İleri kontrol için gerçekleştirilen ikili kesme koşulları .....	43
Tablo 3. 36. Lineerizasyon tepkime içeriği.....	43
Tablo 3. 37. Rekombinant <i>P. pastoris</i> için ön-sıvı çoğalma ortamı .....	45
Tablo 3. 38. Rekombinant <i>P. pastoris</i> biyoreaktör üretim ortamı-1 .....	46
Tablo 3. 39. Rekombinant <i>P. pastoris</i> biyoreaktör üretim ortamı-2.....	46
Tablo 3. 40. Seçilen promotörlerin rhGH üretim kapasitesinin tarandığı koşullar .....	47
Tablo 3. 41. BMGY Kompozisyonu.....	49
Tablo 3. 42. BSM Kompozisyonu .....	49
Tablo 3. 43. Eser Tuz Çözeltisi (PTM1) Kompozisyonu.....	49
Tablo 3. 44. Coomassie Boyama Çözeltileri .....	51
Tablo 4. 1. MatInspector tarafından bulunan putative transkripsiyon faktörleri .....	65
Tablo 4. 2. Glikolitik genlerin TF bağlanma bölgeleri açısından analizi.....	66
Tablo 4. 3. Tasarlanan promotör varyantları.....	67
Tablo 4. 4. GAPPro# varyantlarının boyutları .....	71
Tablo 4. 5. Tasarlanan varyantların modifiye edilmemiş $P_{GAP}$ 'a göre ekspresyon kuvvetleri (%)...79	
Tablo 4. 6. rhGH üretimi için seçilen promotör varyantlarının özellikleri.....	85
Tablo 4. 7. a Özgül hızların biyoproses boyunca anlık değişimi.....	94
Tablo 4. 7. b En yüksek rhGH derişiminin elde edildiği saate ( $t_{max}$ ) kadar hesaplanan toplam özgül hız ve verimler .....	95
Tablo 4. 8. Biyoreaktör işletim koşulları .....	97
Tablo 4. 9. rhGH üretimi için tasarlanmış yarı-kesikli ve hibrit yarı-kesikli biyoreaktör operasyonlarının kısaltmaları ve açıklamaları .....	102

## Simgeleme

A	Aktivite, U dm <sup>-3</sup>
AOX	Alkol oksidaz
C	Ortamdaki derişim, g dm <sup>-3</sup>
GAP	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz
GI	Glikoz izomeraz
N	Karıştırma hızı, dk <sup>-1</sup>
OD	Optik yoğunluk
Q	Besleme giriş hızı, dm <sup>3</sup> st <sup>-1</sup>
r(t)	Tepkime hızı (akı) vektörü
t	Kalma süre, s veya st
T	Sıcaklık, °C
V	Hacim, dm <sup>3</sup>
V <sub>R</sub>	Biyodönüşüm ortam hacmi, dm <sup>3</sup>
Y <sub>X/S</sub>	Substrat başına hücre verimi, g hücre/g substrat
Z	Amaç fonksiyonu
α <sub>i</sub>	Stokiyometrik katsayı
λ	Dalga boyu, nm

## Alt- indisler

0	Başlangıç koşulu
d	Degradasyon
G	Gliserol
M	Methanol
t	Toplam
S	Sorbitol veya substrat
X	Hücre



## ÖZET

İnsan büyüme hormonu (hGH), 22 kDa molekül ağırlığında, 191 amino asitten oluşan, beynin ön lobundaki hipofiz bezi tarafından üretilen bir proteindir. Hipofiz bezlerindeki somatotropik hücreler tarafından doğal olarak sentezlenen, kanda bulunan hGH'nin, insan organizmasında eksik, bozuk (defective) üretiminin neden olduğu problemlerin düzeltilmesi için dışarıdan verilme ihtiyacı –*diğer hormonlar gibi*- bu farmasötik temel maddenin biyoteknolojik prosesle endüstriyel üretimini önemli yapmaktadır. Bu proje kapsamında, gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz başlatıcısının (promotör) ( $P_{GAP}$ ) üzerinde bulunan transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgelerini transkripsiyon mühendisliği ile modifiye ederek rekombinant protein (r-protein) üretimini artırmak hedeflenmiştir. *Pichia pastoris*'te en çok kullanılan başlatıcılardan biri olan  $P_{GAP}$ , olası transkripsiyon faktörlerinin (TF) bağlanma bölgeleri açısından analiz edilmiştir. Bulunan TF bağlanma bölgeleri silinerek ya da doğal konumlarında duplike edilerek  $P_{GAP}$  varyant kütüphanesi oluşturulmuştur. Aynı zamanda, seçilen TF'ler aşırı-ekspres edilerek ya da silinerek, bu faktörlerin r-protein üretimine etkisi araştırılmıştır. Geliştirilen  $P_{GAP}$  varyantları altında modifiye yeşil floresan proteini üretiminin ekspresyon seviyeleri, doğal  $P_{GAP}$ 'a kıyasla 0.35-3.10 kat arasında değişim göstermiştir. En yüksek ekspresyon seviyelerine ulaşan başlatıcı varyantları olan Pro9 (Gal4-benzeri TF bağlanma bölgesinin duplike edildiği) ve Pro10 (Rfx1 bağlanma bölgesinin silindiği) kontrolü altında ikinci model protein, rekombinant insan büyüme hormonu (rhGH), ekspres edilmiş; doğal  $P_{GAP}$ 'a kıyasla, sırasıyla, 2.4 ila 1.6 kat daha fazla rhGH üretilmiştir. Yarı-kesikli biyoreaktör işletim koşullarında, Pro9 kontrolü altında ve Gal4-benzeri TF'nin aşırı-ekspres edildiği suş ile rhGH üretiminde birim hücre başına 2.2 kat artış elde edilmiştir. Geliştirilen hibrit yarı-kesikli işletim ile en yüksek rhGH derişimi  $t = 8$  st'te,  $C_{rhGH} = 611$  mg  $dm^{-3}$  elde edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** İnsan büyüme hormonu, *Pichia pastoris*, promotör, ortam tasarımı, biyoreaktör işletim koşulları, oksijen aktarım karakteristikleri, metabolik yolizi analizi.



## ABSTRACT

Human growth hormone (hGH), an important human therapeutic protein, is synthesized and secreted by the anterior lobe of the pituitary gland during the entire life of the individual, and in higher quantities in the pre-adult period. *Pichia pastoris*, a methylotrophic yeast, is a strong alternative for hGH production, having the ability of producing foreign proteins at high levels. In this project, to enhance the expression strength of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter ( $P_{GAP}$ ) for improved recombinant protein (r-protein) production through modifying the transcription factors (TF) that regulate the functioning of  $P_{GAP}$  by transcriptional engineering.  $P_{GAP}$  was analyzed in terms of putative TF binding sites. A synthetic library was constructed with distinct regulatory properties through deletion and duplication of these putative transcription factor binding sites and selected TFs genes were overexpressed or deleted to understand their roles on r-protein production. Using enhanced green fluorescent protein as the first model protein, an expression strength in a range between 0.35- and 3.10-fold of the wild-type  $P_{GAP}$  was obtained in *P. pastoris*. Recombinant human growth hormone (rhGH) was produced under control of selected promoter variants, and 2.4- to 1.6-fold higher product titers were reached compared to wild-type  $P_{GAP}$ . The specific glucose consumption rate and ethanol production rates were increased by 1.7- and 8-fold in *P. pastoris* Gal4-like transcription factor overexpression mutants compared to wild-type *P. pastoris*, respectively. The hybrid fed-batch bioreactor-operation was developed for the production of recombinant human growth hormone (rhGH) in *Pichia pastoris* under GAP promoter. The highest rhGH production was attained as 611 mg dm<sup>-3</sup> at 8 h.

**Keywords:** Human growth hormone, *Pichia pastoris*, promoter, bioprocess, bioreactor operation condition, oxygen transfer characteristics, metabolic flux analysis.



## 1. GİRİŞ

Son çeyrek asırda önce moleküler genetik tekniklerin gelişimi ile, son 15 yılda ise genom analiz projelerinin oluşturduğu bilgi birikiminin sağlık sektörü-araştırma projelerinin organizasyonunda kullanılması sonucu önemli gelişmeler sağlanmıştır. Farmasötik ürünler arasında, terapötik biyomoleküller (antibiyotikler, hormonlar, enzimler, monoklonal antikorlar, aşılarda), hastalıkların tanımlanmasında kullanılan immunodiagnostik testler için gerekli proteinler ve DNA problemleri ile doğum öncesi kalıtsal hastalıkların tanısında kullanılan kitler önemlidir. Biyoteknolojik ürünlerin üretiminde ürün verimi ve seçiciliği, her ne kadar ortam bileşimi ve biyoreaktör işletim koşullarının geliştirilmesiyle artırılabilir de, mikroorganizmanın üretim kapasitesi ile sınırlıdır. Mikroorganizma, biyoreaktör içerisinde mikro-biyoreaktör olarak işlev yaparak hem çoğalmakta hem de hücre-içi tepkime sistemi üzerinden istenen biyomolekülü üretmektedir. Ancak canlı istenen biyomolekülü doğal olarak üretmiyorsa, bir metabolik mühendislik tasarımı yapılarak önce yabancı geni taşıyan rekombinant plazmid oluşturulmalı ve sonra söz konusu ürünü üretebilecek rekombinant mikroorganizma geliştirilmelidir. Doğal olarak insan metabolizmasında üretilen bir biyomolekül, terapötik kullanım için üretilmek istenirse, önce insan genomundan biyomolekülün üretiminden sorumlu gen izole edilir, sonra bu gen, taşıyıcı DNA molekülleri olan plazmidlere aktarılır. Uygun bir konak hücreye transfer edilip orada çoğaltılan rekombinant DNA, mikroorganizma içine transfer edildiğinde geni taşıyan rekombinant hücre elde edilmiş olunur. Tablo 1.1’de rekombinant DNA teknolojisiyle üretilen farmasötik proteinler örneklendirilmiştir.

Biyoteknolojik ürünlerin üretiminde -sırasıyla- ABD, Japonya, ve başta Almanya, Hollanda, Fransa, İngiltere, Danimarka, İsveç, İsviçre ve İtalya olmak üzere Avrupa ülkelerinin bir kısmı -üniversitelerde yapılan temel ve araştırma merkezlerinde yapılan uygulamalı araştırmalarla- buluşları zamanında endüstriye aktararak, 1990 yılında yaklaşık 10 milyar dolar değerinde ve 2007 yılında 48 milyar dolar değerinde bir ticaret büyüklüğü elde etmişlerdir. Günümüzde endüstriyel yeni kimyasal maddeler sektöründe Japonya, endüstriyel enzimler sektöründe ise AB dünya lideridir. Türkiye klasik fermentasyon ürünleri sektöründe maya üretimi ve ihracı ile Fransa’dan sonra dünya ikincisidir. Gelecek on yılda biyoteknolojik ürünlerin ve biyoteknolojinin sağlık ve endüstriyel yeni kimyasal maddeler sektörlerine etkisi, sırasıyla, çok büyük ve büyük olarak öngörülmektedir. 1981 yılından günümüze dek 239 terapötik protein onay almıştır ve bu sayısının önümüzdeki 5 yılda 400’e ulaşacağı düşünülmektedir. Terapötik proteinlerin üretimi 2012 yılında 59 milyar dolar ve 2017 yılında 141 milyar dolar değerinde iken, bu rakamın 2022 yılında 241 milyara ulaşması beklenmektedir.

**Tablo 1. 1.** Rekombinant farmasötik proteinler ve kullanım alanları

<b>Farmasötik Protein</b>	<b>Kullanım Alanı</b>
Alfa-1-antitripsin	Amfizem tedavisi
Adrenokortikotropik hormon	Romatizmal hastalıklar tedavisi
B-hücre çoğalma faktörleri	Bağışıklık düzensizlikleri tedavisi
Kalsitonin	Osteomalazi tedavisi
Koloni uyarıcı faktörler	Kan düzensizlikleri tedavisi
Koryonik gonadotropin	Anovülasyon tedavisi
Endorfinler ve enkefalinler	Analjezik ajan
Epidermal çoğalma faktörü	Yara tedavisinde hızlandırıcı
Eritropoietin	Anemi tedavisi
Faktör VIII	Koagülasyon faktörü;hemofili tedavisi
Faktör IX	Koagülasyon faktörü;hemofili tedavisi
Büyüme hormonu	Büyüme hızlandırıcı
Büyüme hormon salgılama faktörü	Büyüme hızlandırıcı
İnsülin	Diyabet tedavisi
İnterferonlar ( $\alpha, \beta, \gamma$ )	Antiviral, antitümör, antikanser ajan
İnterlökinler	Kanser terapi; bağışıklık düzensizlikleri tedavisi
Limfotoksin	Antitümör ajan
Makrofaj aktive edici faktör	Antitümör ajan
Sinir çoğalma faktörü	Onarım hızlandırıcı
Platelet kaynaklı büyüme faktörü	Aterosklerosis tedavisi
Relaksin	Doğum kolaylaştırıcı
Serum albümin	Plazma destekleyici
Somatomedin C	Büyüme hızlandırıcı
Doku plazminojen aktivatör	Trombolitik ajan
Tümör nekroz faktörü	Antitümör ajan
Urogastron	Antiülser ajan
Ürokinaz	Trombolitik ajan



Proteinler amino asitlerin peptit bağları ile bağlanması sonucu oluşan ve biyokimyasal tepkimeleri katalizleyen biyopolimerlerdir. İlaç piyasasındaki değeri bir milyar doların üzerinde olan insan büyüme hormonu (hGH), 22 kDa molekül ağırlığında, 191 aminoasitten oluşan, beyin ön lobundaki hipofiz bezi tarafından üretilen bir proteindir. Başta çocuklarda büyüme geriliği olmak üzere kemik kırıkları, yanık tedavisi, mide kanamaları ve yaraların iyileştirilmesinde ve birçok hastalığın tedavisinde etkili olan hGH'nin, moleküler genetik tekniklerle geliştirilen mikroorganizmalarca biyoteknolojik yöntemlerle üretimi için araştırmalar, genomu ilk analizlenen mikroorganizma olan *Escherichia coli* konak-hücre olarak kullanılarak başlamış ve hGH geni Goeddel vd. (1979) tarafından klonlanmıştır. *E. coli*'de lac promotörü kontrolünde eksprese edilen hGH geniyle 191 amino asitten oluşan doğal hGH ile aynı immünolojik özelliklere sahip protein üretilmiştir (Goeddel vd., 1979; Ikehara vd., 1984; Gray vd., 1985; Becker vd., 1986). Rekombinant hGH'nin (rhGH) hücre-dışı üretimi, biyoreaktör ürün karışımından ayırma işlemlerini çok kolaylaştıracağından ve üretim maliyetini düşüreceğinden, söz konusu protein hücre-dışı üretim potansiyeli olan ve genom analizi tamamlanmış *Bacillus subtilis* ve türleri ile de üretilmiştir (Franchi vd., 1991; Kajino vd., 1997; Özdamar vd., 2009). Ökaryot bir mikroorganizma olan *Pichia pastoris* ile hGH üretimi, *P. pastoris*'in yüksek hücre derişimlerine ulaşması ve yüksek hücre-dışı protein üretim kapasitesine sahip olması nedeniyle araştırılmıştır (Ecamilla-Trevino vd., 2000; Eurwilaichitr vd., 2002; Çalık vd., 2008).

*E. coli* ile gerçekleştirilen çalışmalarda hGH periplazmik, sitoplazmik ve hücre-dışı olarak üretilmiştir. Gray vd. (1985), Becker ve Hsiung (1986), Chang vd. (1987), Yamakawa vd. (1989) araştırmalarında sırasıyla hGH, OmpA, *STII*, hGH sinyal peptitlerini ve *trp*, *Lpp-lac*, *phoA*, *tac* promotörlerini (başlatıcı) kullanarak hGH'yi periplazmik olarak üretmişlerdir. Kato vd. (1987) ise gerçekleştirdikleri çalışmada *Bacillus penisilinaz* sinyal peptidini iki farklı promotör (*Ex-K* ve *Ex*) ile kullanarak *E. coli*'de hGH'nin sırasıyla hem hücre-dışı hem de periplazmik üretimini gerçekleştirmişlerdir. Goeddel vd. (1979), Ikehara vd. (1984), Shin vd. (1998) ve Tabandeh vd. (2004) hGH'yi periplazmik olarak üretmişlerdir. Literatürde *Bacillus* türleri ile yapılan ilk araştırmada Nakayama vd. (1988) geliştirdikleri phGH526 plazmidini *B. subtilis*'e transforme ederek, hGH'nin hücre-dışı üretimini gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada geliştirilen ilk plazmid, phGH324, transkripsiyon terminatörü içermediğinden nötral proteaz terminatörü taşıyan phGH526 plazmidi geliştirilmiş ve her iki plazmid *B. subtilis* MT500 konak-hücresine transforme edilerek hGH üretim potansiyelleri araştırılmıştır. phGH526 plazmidini taşıyan hücrelerde 40 mg dm<sup>-3</sup> hGH kültür ortamına salgılanırken, phGH324 taşıyanlarda bu oranın 10 kat azaldığı görülmüştür. Başlatıcıları ve sinyal peptitleri aynı olan bu iki plazmidin farklı üretim potansiyellerine sahip olmaları, nötral proteaz terminatörünün aktivitesinin önemini göstermiştir. Çalışmada oksijen aktarım koşulları belirtilmeden çözünmüş oksijen derişiminin hGH üretimi üzerindeki etkisi de incelenmiş ve çözünmüş

oksijen derişimi arttığıında, hGH üretiminde düşüş gözlenmiştir; yüksek hücre yoğunluğunun ise üretimi pozitif etkilediği görülmüştür. Üretilen hGH'nin, doğalıyla aynı yapıda ve biyolojik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Özdamar vd. (2009), biyolojik aktif yapıda terapötik protein olarak kullanımı için biyoteknolojik prosesle recombinant *B. subtilis*'te hücre-dışı ve doğala özdeş hGH üretimi için metabolik mühendislik tasarımı yapmış; *subC* sinyal dizini *pre(subC)*, *hGH* gen dizininin önüne entegre edilerek (*pre(subC)::hGH*) hibrit-gen sistemi oluşturulmuş, ve hGH doğru yapıda üretilmiştir. Tasarlanan glikoz temelli ortam kullanılarak mekanik karıştırmalı, pH, sıcaklık, çözünmüş oksijen ve karıştırma hızı kontrollü  $V_R = 1.0 \text{ dm}^3$  hacimli kesikli biyoreaktörlerde  $Q_o/V_R = 0.5 \text{ vvm}$ ,  $N = 800 \text{ min}^{-1}$  oksijen aktarım koşulunda en yüksek derişimde hGH  $t = 32 \text{ st}'te$ ,  $C_{hGH} = 0.07 \text{ kg m}^{-3}$  olarak elde edilmiştir. Ecamilla-Trevino vd. (2000) konak hücre olarak *P. pastoris*'i kullanarak biyolojik olarak aktif hGH'nin üretimini biyoreaktörde araştırmış, 48 saatlik metanol indüksiyonundan sonra  $49 \text{ mg dm}^{-3}$  rhGH üretmişlerdir. Eurwilaichitr vd. (2002) hGH üretimi için optimum koşulların %3 (h/h) metanol derişiminde 3 günlük indüksiyon olduğunu belirtmiş ve  $190 \text{ mg dm}^{-3}$  hGH üretmişlerdir. Çalık vd. (2008) *P. pastoris* ile rhGH sentezi ve saflaştırılmasını gerçekleştirmiş, MALDI-TOF spektrometre ile yapısal analiz çalışmalarını yapmışlardır. Orman vd. (2009) *P. pastoris* ile rhGH üretiminde gliserol, metanol ve kompleks ortamın hGH üretimine etkisini *Mut<sup>S</sup>* ve *Mut<sup>t</sup>* fenotiplerini kullanarak araştırmışlardır. TÜBİTAK 109R015 projesi kapsamında, Çalık vd. (2010-a) önceki çalışmasında (Çalık vd. 2008) rhGH üretimi için geliştirdiği *P. pastoris hGH-Mut<sup>t</sup>* ile rhGH üretimine hidrojen iyon ( $H^+$ ) derişiminin etkisini araştırmış ve en yüksek hücre derişimine ( $0.27 \text{ g dm}^{-3}$ ) ve rhGH üretimine ( $0.25 \text{ g dm}^{-3}$ ) ulaşmak için en uygun koşulun  $pH = 5.0$  olduğunu bildirmişlerdir. Çalık vd. (2010-b) *P. pastoris hGH-Mut<sup>t</sup>* ile rhGH üretimine, fermantasyon ve oksijen aktarım karakteristiklerinin etkisini araştırmışlardır. Prosese kesikli sorbitol ve öngörülen farklı spesifik çoğalma hızlarında üstel besleme stratejisiyle yarı-kesikli metanol beslemesi yapılmıştır. rhGH derişimi ve oksijen aktarım karakteristikleri göz önüne alınarak; biyoprosese öngörülen spesifik çoğalma hızının  $\mu_0 = 0.04 \text{ st}^{-1}$  olduğu üstel besleme stratejisiyle başlanılıp,  $t = 15 \text{ st}'te$   $\mu_0 = 0.03 \text{ st}^{-1}$ e düşürülerek iki-aşamalı işletim stratejisi geliştirilebileceği bildirilmiştir. Çalık vd. (2011) *P. pastoris* ile rhGH üretiminde, hücre-içi tepkime sistemine metanol besleme hızının etkisini araştırmak için öngörülen üç farklı ( $\mu_0 = 0.02, 0.03, 0.04 \text{ st}^{-1}$ ; MS-0.02, MS-0.03, MS-0.04) spesifik çoğalma hızında üstel-besleme stratejisi geliştirmişlerdir. Biyoproses, hücre- ve rhGH- derişim eğrileri göz önüne alınarak, dört periyota ayrılmıştır. Periyot I ( $t = 32-42 \text{ st}$ ) erken üstel çoğalma evresi, Periyot II ( $t = 42-48 \text{ st}$ ) spesifik hücre çoğalma hızının azaldığı üstel çoğalma evresi, Periyot III ( $t = 48-51 \text{ st}$ ) hücre ve rhGH sentezinin yavaşladığı evredir. En yüksek hücre sentezi akı değerlerine, Periyot I, II, III'te, sırasıyla, MS-0.02, MS-0.03, MS-0.04 işletimlerinde; en yüksek rhGH akı değerlerine ise Periyot I, II, III'te, sırasıyla MS-0.03, MS-0.02, MS-0.03 işletimlerinde

ulaşmıştır. Hücre-içi reaksiyon akılarına göre Periyot I'de MS-0.03 metanol besleme hızı ile başlanarak Periyot II'nin ortasında metanol besleme hızı MS-0.02'ye düşürülerek, rhGH üretiminin artırılabilceği bildirilmiştir. Çalık vd. (2013), yarı-kesikli biyoreaktör işletimi için sürekli besleme stratejileri tasarlamış; tasarladıkları stratejilerin rhGH üretimine etkisini araştırmışlardır. Prosesin  $t = 0-15$  st'i arasında biyoreaktörde sorbitol derişiminin  $50 \text{ g dm}^{-3}$  değerinde sabit tutulduğu ve metanol üzerinden ön-hesaplanmış spesifik çoğalma hızının  $\mu_0 = 0.03 \text{ st}^{-1}$  olduğu strateji ile  $C_{\text{rhGH}} = 640 \text{ mg dm}^{-3}$  üretilmiştir. Geliştirilen strateji ile,  $C_{\text{rhGH}} = 640 \text{ mg dm}^{-3}$  üretildiğinde, hücre derişimi  $C_X = 105.3 \text{ g dm}^{-3}$ 'e ulaşmış; çift substratlı üretim stratejisinde, toplam substrat temel alınarak hesaplanan en yüksek ürün ve hücre verimleri, sırasıyla,  $Y_{\text{CrhGH/S}} = 1.83 \text{ mg g}^{-1}$  ve  $Y_{X/S} = 0.21 \text{ g g}^{-1}$  olmuştur. Güneş vd. (2016), üretim ortamındaki metanol derişimini proses süresince  $5 \text{ g dm}^{-3}$ 'te tutarak  $1.2 \text{ g dm}^{-3}$  rhGH üretmişlerdir.

*P. pastoris*, literatürde ve endüstride çok çalışılan *S. cerevisiae*'ya göre günümüzde, avantajlı bir alternatif olarak gösterilen ve endüstride kullanımı hızla artmakta olan, metilotrof bir mayadır. En önemli avantajları, yabancı proteinleri çok yüksek derişimlerde üretebiliyor olması ve bilinen en güçlü promotörlerden AOX1 (alkol oksidaz I) promotörüne sahip olmasıdır (Cereghino ve Cregg, 1999). Literatürde *P. pastoris* mayası ile rhGH üretimi için biyoreaktör işletim parametrelerinin etkisinin belirlenmesi sonrası metabolik yolizi mühendisliği analizi ile hücre-içi tepkime hızlarının belirlendiği herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. hGH'nin maya tarafından sentezlenmesi, üretim maliyetlerini düşürüp, verimliliği artıracaktır. Bu kapsamda, *P. pastoris* ile hGH üretimi için substrat besleme stratejisinin ve pH'nin fermentasyon karakteristikleri üzerine etkisi, hGH, alkol oksidaz I, ve proteazların ekspresyon seviyelerinin derişimi, substrat besleme stratejisinin hücre-içi tepkime hızlarına etkisi, 109R015 projesinde araştırılmış; yapılan yayınlarla evrensel bilime ve uluslararası literatüre katkılar yapılmıştır (Çalık vd., 2010a, 2010b; Çalık vd., 2011).

Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) promotörü,  $P_{\text{GAP}}$ , *Pichia* ekspresyon sisteminde rekombinant protein (r-protein) üretimi için sıklıkla kullanılan en güçlü promotörlerden biridir (Çalık vd., 2015). 35.4 kDa molekül ağırlığına sahip ve 333 aminoasitten oluşan homotetramerik yapıdaki GAPDH proteini, glikolizis ile glukoneogenezis yolizindeki NAD-bağlayan önemli bir enzimdir (Waterham vd., 1997). Waterham vd. (1997) tarafından yapılan izolasyon ve karakterizasyon çalışmalarına göre,  $P_{\text{GAP}}$  konstitütif bir promotördür ancak ortamda özellikle glikoz ya da gliserol bulunduğunda ekspresyon seviyeleri kayda değer ölçüde yükselmektedir. Bu durum,  $P_{\text{GAP}}$ 'ın kullanılan karbon kaynağına bağlı bir promotör olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla,  $P_{\text{GAP}}$  kullanılarak yapılan r-protein üretiminde karbon kaynağının seçimi çok önemlidir. Çoğu durumda, en yüksek ekspresyon seviyelerine glikoz kullanılarak ulaşılırken, gliserol kullanılarak da yüksek ekspresyon seviyelerine ulaşılabilir (Çalık vd., 2015).

*P. pastoris* ekspresyon sistemlerinde kullanılan promotörler arasında,  $P_{GAP}$  özellikle  $P_{AOX1}$  kullanımı ile ilgili problemleri giderdiği için sıklıkla tercih edilmektedir. En fazla kullanılan promotörlerden biri olan  $P_{AOX1}$ , çok kuvvetli bir şekilde regüle edilen ve metanol varlığında indüklenen bir promotördür.  $P_{AOX1}$ -kontrolü altında gerçekleştirilen üretimlerde çok yüksek ekspresyon seviyelerine ulaşılabilir ve bu üretimlerin oturmuş bir fermentasyon protokolü bulunmaktadır. Ancak,  $P_{AOX1}$ -kontrolü altında gerçekleştirilen üretimlerin avantajları, promotörü indüklemek için sağlığa zararlı ve pahalı bir kimyasal olan metanol kullanılmasından ötürü tekrar düşünülmelidir. Bu sebeple,  $P_{GAP}$ , *P. pastoris* için toksik olmayan proteinlerin üretimi açısından umut vadeden bir alternatiftir.  $P_{GAP}$ -kontrolü altında gerçekleştirilen üretim sistemlerin en büyük avantajları arasında, r-protein üretiminin hücre çoğalmasıyla doğru orantılı olması, metanol kullanımı ile ilgili problemlerin elimine edilmesi, hücrelerin oksijen ihtiyaçlarının azaltılması ve üretim fazındaki karbon kaynağı değişimi aşaması olmamasından ötürü prosesin basitleştirilmesi olarak sayılabilir. (Vassileva vd., 2001; Kottmeier vd., 2012; Ferreira vd., 2012; Goodrick vd., 2001; Pepeliaev vd., 2011; Potvin vd., 2012; Qin vd., 2011a; Zhang vd., 2007). Ayrıca,  $P_{GAP}$  konstitütif bir promotör olduğu için, gen dozu ayarlanarak ve iyi tasarlanmış besleme stratejileri yardımıyla r-proteinlerin yüksek miktarda üretilmeleri sağlanmaktadır (Cos vd., 2006; Ferreira vd., 2012; Potvin vd., 2012; Wu vd., 2003a; Wu vd., 2003b; Zhang vd., 2009).

$P_{AOX1}$  ve  $P_{GAP}$  promotörleri karşılaştırıldığında, farklı araştırmacılar tarafından farklı sonuçlar rapor edildiği görülmektedir. Ancak, çoğu durumda,  $P_{AOX1}$ -kontrolü altında gerçekleştirilen üretimlerde daha yüksek ekspresyon seviyeleri bildirilmiştir (Cos vd., 2006; Çalık vd., 2015). Bununla birlikte, kontrol edilebilir ve güçlü bir promotörün ulaşabildiği ekspresyon seviyesi transkripsiyon faktörlerinin, RNA polimerazın ve diğer bileşenlerin bağlanabileceği spesifik DNA-bağlanma bölgeleri taşımasıyla doğrudan ilintilidir (Vogl and Glieder 2013). Dolayısıyla, promotör mühendisliği yardımıyla, farklı regülasyon özelliklerine sahip bir promotör kütüphanesi oluşturularak aynı konak hücrede daha yüksek ekspresyon seviyelerine ulaşmak mümkündür (Qin vd., 2011a; Qin vd., 2011b); böylece farklı sentetik promotörler tasarlanabilir. Ancak, bugüne kadar, literatürde  $P_{GAP}$  üzerinde bulunan ve transkripsiyonu etkileyen faktörlerin çalışıldığı sistematik bir çalışma bulunmamaktadır. Sadece Qin vd. (2011a) rastgele mutagenез yöntemi kullanarak farklı özelliklere sahip  $P_{GAP}$ 'lerden oluşan bir kütüphane kurmuş ve 19.6 kat daha fazla ekspresyon seviyesine ulaşmışlardır. Bunun dışında,  $P_{AOX1}$  üzerinde bulunan elementlerin silinmesi ya da tekrarlanmasıyla yapılan çalışmalar sayesinde, 1.6-10 kat daha fazla transkripsiyon seviyelerine ulaşabilen bir  $P_{AOX1}$  kütüphanesi kurulmuştur (Ruth vd., 2010; Hartner vd., 2008). Burada belirtilmesi gereken nokta, yapısı bu denli iyi bilinen bir promotör olan  $P_{AOX1}$ 'in ulaşabildiği ekspresyon seviyelerinde bile hala artış elde edilebiliyorsa,  $P_{GAP}$  gibi görece daha yeni olan bir promotör için,  $P_{GAP}$ 'in regülasyonunda etkili olan transkripsiyon faktörlerinin araştırılması gibi promotör

mühendisliği yöntemleriyle, daha yüksek ekspresyon seviyelerine ulaşabilme potansiyeli vardır denebilir. Böylelikle, kolaylıkla manipüle edilebilen bir sentetik promotör tasarlayarak, *P. pastoris* ya da diğer başka konak hücreler tarafından r-protein üretiminde kullanılacak bir promotör tasarımı yapılabilir (Vogl vd., 2014).

Bu bağlamda promotör mühendisliği, daha güçlü ya da kontrol edilebilir promotörlerin tasarımı için rasyonel yöntemler sunmaktadır ve genel olarak dört kategoride incelenebilir.

### 1.1. Hata-eğilimli PCR

Hata eğilimli PCR, rastgele mutasyonlar sonucu farklı promotörlerin elde edilmesini sağlamaktadır. Bu yaklaşımla özgün promotör varyantları elde edilebilir. Ancak, rastgele mutasyona dayandığı için, promotörün regülasyonu ile ilgili bilgi almak ya da rasyonel bir tasarım gerçekleştirmek mümkün değildir. Ancak, çok sayıda ve farklı ekspresyon seviyelerine sahip promotörler kısa sürede elde edilebilir (Alper ve Fischer, 2005; Nevoigt vd., 2006). *P. pastoris* ve  $P_{GAP}$  promotörü ile bu yöntemle yapılmış tek çalışma Qin vd. (2011) tarafından yapılmıştır ve özgün  $P_{GAP}$  promotörüne göre %8-218 arası ekspresyon seviyesine sahip  $P_{GAP}$  varyantları elde edilmiştir.

### 1.2. Spacer Bölgelerin Mutasyonu

Bu yöntem, promotör sekansındaki değişken bölgelerin mutasyonuna dayanmaktadır ve consensus bölgeye dokunmaz. Bu anlamıyla, hata eğilimli PCR yöntemine göre, özellikle bakteriyal promotörler için daha rasyonel bir yöntemdir. Bu yöntemle tasarlanan ve 2 Gcr1p, 2 Rap1p bağlanma bölgesi ve bir TATA kutusu içeren bir *S. cerevisiae* promotörü ile araştırmacılar 37 varyant içeren bir kütüphane oluşturmuşlar ve farklı ekspresyon seviyelerine ulaşabilen promotörler elde etmişlerdir (Jeppson vd., 2003).

### 1.3. Hibrit Promotör Mühendisliği

Hibrit promotör mühendisliği aktivatör bölgelerle ana bölgenin füzyon edilmesine dayanan bir yöntemdir ve özellikle *S. cerevisiae* promotörleri için kullanılmıştır (de Boer vd., 1983; Guarente vd., 1984; Guarente ve Hoar, 1984; Johnston vd., 1994). Bunun yanısıra, farklı aktivatör bağlanma bölgelerinin farklı sayılarda eklenmesi de promotörün kuvvetini artırabilir (Blazeck vd., 2012). Bu yöntemle, galaktoz ile indüklenen promotörlerin gücü neredeyse 50 kat artırılabilmiştir.

#### 1.4. Transkripsiyon Faktörlerinin Bağlanma Bölgelerinin (TFBB) Modifiye Edilmesi

Bu yöntem, kısaca, bir promotör üstündeki TFBB'lerin rasyonel ve sistematik bir biçimde tasarımına (silinmesi, eklenmesi, değiştirilmesi) dayanır. TFBB'ler ile ilgili bilginin gittikçe artmasıyla, bu bölgelerin doğrudan modifikasyonu ve farklı özelliklere sahip promotör varyantlarının oluşturulması mümkün kılınmaktadır. Bu yöntemin bir uygulaması Hartner vd. (2008) tarafından *P. pastoris*'te uygulanmış ve %6-160 arasında değişen ekspresyon seviyelerine sahip  $P_{AOX1}$  varyantları elde edilmiştir.

*P. pastoris*'te kullanılan promotörlerin regülasyonu ile ilgili bilgimiz kısıtlıdır. En yaygın kullanılan promotörlerden biri olan  $P_{AOX1}$  ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda 5 transkripsiyon faktörünün (Mit1, Mxr1, Trm1, Mig1-1 ve Mig1-2) regülasyonda görev aldığı gösterilmiştir (Lin-Cereghino vd., 2006; Wang vd., 2016b; Wang vd., 2017). Bunlara ek olarak *HXT1* ya da *GSS1* genlerinin silinmesinin de  $P_{AOX1}$ 'in glikoz içeren ortamda derepresyonuna sebep olduğu araştırılmıştır (Polupanov vd., 2012; Zhang vd., 2010). Ayrıca Wang vd. (2016a), *Nrg1*'in  $P_{AOX1}$ 'in glikoz ya da gliserol içeren ortamda baskılanmasında görev aldığını göstermişlerdir. Son olarak, Ata vd. (2017) transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgelerini silerek ya da ekleyerek bir kütüphane oluşturmuşlar ve 0.35-3.1 katlık ekspresyon seviyelerine bağlı  $P_{GAP}$  varyantları elde etmişlerdir.





## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

### 2.1. Biyoteknolojik Ürün ve Proses ile İlgili Temel Bilgiler

#### 2.1.1. Hormonlar ve Biyokimyası

Biyolojik sistemlerin katalizörleri olan hormonlar protein yapısındadırlar. Protein molekülleri, amino asitlerin birbirlerine kovalent bağlarla özgün bir dizin oluşturarak polimerleşmeleriyle oluşurlar. Bir  $\alpha$ -amino asit, karbon atomuna bağlı bir amino grubuna, bir karboksil grubuna, bir hidrojen atomuna ve amino asiti simgeleyen hidrofilik veya hidrofobik; asitik, nötral veya bazik; alifatik veya aromatik bir R grubuna sahiptir. R gruplarının etkisiyle özellikleri farklılaşan amino asitler değişik gruplamalarla sınıflandırılmaktadırlar. Enzimlerin ve proteinlerin yapısı ve fonksiyonları açısından R gruplarının polaritelerine dayanan sınıflandırma en önemlisidir. Buna göre amino asitler dört ana gruba ayrılırlar:

- a. Polar olmayan (nonpolar) veya hidrofobik R grubuna sahip amino asitler,
- b. Nötral (yüksüz) polar R grubuna sahip amino asitler,
- c. Pozitif yüklü (bazik) R grubuna sahip amino asitler,
- ç. Negatif yüklü (asitik) R grubuna sahip amino asitler.

#### 2.1.2. Hormonların Yapıları

Atomların, "protein yapısını" oluşturan üç boyutlu özel düzenlerine "protein konformasyonu" adı verilir. Bir protein, polipeptit zincirindeki peptit bağları ve peptit grupları arasındaki hidrojen bağları, hidrofobik bağlar, van der Waals kuvvetleri, disülfid bağları ve elektrostatik etkileşimler gibi kovalent olmayan etkileşimler ile üç boyutlu özel yapıya sahip olur. Bu protein yapısı, kovalent olarak bağlanmamış atomlar arasındaki zayıf molekül içi kuvvetlerle sağlanır (Lehninger vd., 1979). Protein yapısı genellikle polipeptit zincirinin -termodinamik açıdan Gibbs serbest enerjisinin en düşük değeri olarak- en kararlı olduğu durumda oluşur. Doğal yapılarına göre protein molekülleri üç boyutlu karakteristik yapıya sahiptir ve özgül yapılarına (konformasyon) göre de sınıflandırılır. Yapılarına göre proteinler ipliksi ve küresel olmak üzere iki gruba ayrılırlar. İpliksi proteinler, bir eksen boyunca paralel yerleşmiş uzun şerit şeklindeki polipeptit zincirlerinden oluşur. İpliksi proteinler, fiziksel olarak dayanıklı; suda veya tuzlu suda çözünmezler. İpliksi proteinler yüksek yapıları organizmaların özellikle bağlantı dokularında temel yapı elemanlarıdır. Elastik bağlantı dokularındaki elastin, tendon ve kemik dokusu üzerindeki kollagen; saçta, tırnakta, deride bulunan  $\alpha$ -keratin ipliksi proteinlere örneklerdir. Küresel proteinlerde ise polipeptit zincirleri küre şeklinde sıkı olarak sarılmışlardır. Küresel proteinlerin çoğu suda çözünür; hücre içinde genellikle hareketli veya

dinamik işleve sahiptirler. Enzimlerin hemen tümü, hormonların bir kısmı, antikorlar, serum albumin ve hemoglobin gibi taşıyım işlevi olan proteinler küresel proteinlerdir.

Proteinlerin yapısal özelliklerini açıklamak için özgün terimler kullanılır. Protein moleküllerinin birincil (primer) yapısını, polipeptit zincirin kovalent bağlarla amino asitlerden oluşan biyopolimerik omurgası yani amino asit dizini belirler. Protein moleküllerinin ikincil (sekonder) yapısı, oluşan polipeptit zincirinin düzenli, *tek-boyutta* kovalent olmayan etkileşimlerle sarılarak kıvrılmasıyla oluşur. Protein moleküllerinin üçüncül (tersiyer) yapısı, uzun polipeptit zincirinin -yine kovalent olmayan etkileşimlerle- *üç-boyutta*, birbiri üzerine kıvrılıp, katlanmasıyla meydana gelir; böylece küresel proteinlerin küresel yapısı ortaya çıkar. Protein moleküllerinin dördüncül (kuaterner) yapısı, iki veya daha fazla zincir içeren bir proteinin birbirinden ayrı polipeptit zincirlerinin etkileşimi içinde düzenini belirtir. Dördüncül yapı özellikle enzim görevindeki proteinlerinde önem taşımakta ve enzim aktivitesi üzerinde etkin olmaktadır (Lehninger vd., 1993).

Hormonlar, insan vücudunun düzenleyici biyomolekülleridir. Hormonlar iç salgı bezleri ve bazı organların hücrelerinde üretilen ve kan dolaşımıyla hedef hücrelere ulaşan, hücrelerdeki özgün metabolik olayları düzenleyen biyomoleküllerdir. İnsan büyüme hormonu (hGH), doğal olarak beynin ön-lobundaki hipofiz bezlerinden salgılanan, 191 amino asit içeren 22 kDa molekül ağırlığında küresel bir proteindir. hGH proteinini kodlayan gen “Kromozom 17” üzerinde bulunmaktadır. Terapötik protein hGH'nin yapısında 4 “sistein” ve 2 “disülfid bağı” bulunmaktadır. İzoelektrik noktası  $pI = 5.1$ 'dir. Gelişme çağında yüksek seviyede salgılanan hormonun vücuttaki derişimi yaş ilerledikçe azalmaktadır. Doğal hGH'nin en yoğun sentezlendiği periyot derin uykunun başlamasından hemen sonradır. Başta büyüme geriliği olmak üzere kemik kırıkları, yanık tedavisi, mide kanamaları, yaraların iyileştirilmesi, beslenme yetersizliğinden dolayı adelerin gelişmemesi, ve diğer sağlık sorunlarının tedavisinde hGH'nin terapötik kullanımı vardır. Çocuklarda az salgılanması durumunda büyüme gecikmesi (cücelik-dwarfism) görülmektedir. Kalp-damar hastalıkları, şişmanlık, saçların beyazlaması ve ciltte kırışıklıklar gibi yaşlanma belirtilerinin çoğu, yaşlanmayla birlikte hGH sentezindeki azalmayla ilgilidir. Fazla salgılanması durumunda ise, gençlerde dev hastalığı (gigantizm); yaşlılarda ise el ve ayak kemikleri, çene, alın büyümesi olarak ortaya çıkan akromegaliye sebep olmaktadır. hGH'nin biyolojik ve fizyolojik aktiviteleri ile protein, yağ ve karbonhidrat mekanizması üzerindeki etkileri nedeniyle terapötik protein olarak tedavide önemli bir yere sahiptir.

Rekombinant insan büyüme hormonu ilk kez 1985'te Genentech (ABD) tarafından *Protropin* ürün-adıyla N-ucunda metiyonin bulunan ve 192 amino asit içeren yapıda üretilmiştir. 1986'da Eli Lilly 191 amino asitten oluşan rekombinant hGH'yi *Humatrope* ürün adıyla üretmiş ve farklı bir kimyasal yapıya, sonuç olarak farklı etkilere sahip olduğu için FDA (ABD)



tarafından lisans verilmiştir. Rekombinant hGH (rhGH) üreticileri ve ürün adları Tablo 2.1.'de verilmiştir. İnsan proteinlerinin doğal, çözünebilir ve biyolojik olarak aktif yapıda üretilebilmesi için mikro-biyoreaktör olarak işlev yapan rekombinant mikroorganizmadan doğrudan biyoreaktör üretim ortamına salgılanması önemlidir. Farmasötik proteinlerin üretiminde, genom analiz projesiyle genetik yapısı daha önce aydınlatılmış olması nedeniyle *E. coli* en yaygın kullanılmış mikroorganizmadır. *E. coli*'de protein üretiminde karşılaşılan protein degradasyonu problemi sebebiyle alternatif mikroorganizmalar aranması gerekmektedir. *Pichia pastoris* ise, sentezlediği proteinleri hücre-dışına salgılama özellikleriyle, önemli bir alternatiftir.

## 2.2. Biyoteknolojik Proseslerde Üretimi Etkileyen Biyoproses Parametreleri

C kaynağı, N kaynağı, P kaynağı, inorganik tuzlar, vitaminler girdi olarak kullanılarak, mikrobiyal, bitki doku veya hayvan doku hücrelerinin, enzimlerin veya biyolojik sistemlerin kullanılmasıyla -biyokimyasal bir tepkime yolizyile- üretilen ürünlere *biyoteknolojik ürünler*; bu ürünlerin (antibiyotikler, farmasötik proteinler, amino asitler, organik asitler, enzimler) elde edildiği ve çeşitli ayırma işlemleri ile istenen niteliğe getirildiği proseslere de *biyoteknolojik prosesler* denir. Biyoteknolojik proseslerle üretim 20. yüzyılın ikinci yarısında özellikle son yirmi yılda -önem sırasına göre- farmasötik temel maddeler, biyokimyasal temel maddeler, enzimler, klasik fermentasyon ürünleri yanında hayvancılık-ormancılık-tarım sektörleri için biyoteknolojik ürünler, üretim sektörlerinin hızlı ve büyük gelişimini sağlamıştır. Düşük basınçta ve düşük sıcaklıklarda çalışılması ile işletme maliyetinin düşük olması, küçük ölçekte yüksek birim fiyatlı ürünlerin üretilebilmesi, iyi tasarlanmış mikro ve küçük ölçekli üretim sistemlerinde araştırma-geliştirme (Ar-Ge) desteği ile çok sayıda ürün üretilebilmesi kimya sanayinin biyoteknolojik ürünler üretim sektörlerine büyük önem kazandırmaktadır.

Biyoteknolojik proseslerde üretimi etkileyen biyoproses ve biyoreaktör parametreleri :

1. Mikroorganizma
2. Ortam tasarımı
3. Biyoreaktör işletim türü ve hidrodinamiği
4. Biyoreaktör işletim parametreleri
  - a) Oksijen aktarımı ve stratejisi
    - \* Havalandırma hızı, ( $Q_0/V$ )
    - \* Karıştırma hızı, (N)
  - b) Hidrojen iyonu derişimi (pH), ve sıcaklıktır.

### 2.2.1. Model Protein: Yeşil Floresan Protein

Floresan proteinlerin keşfi ile protein izleme, hedefleme ve canlı hücrelerin takibinde olduğu kadar bu proteinlerin model ya da reporter protein olarak kullanılmasının önü açılmıştır. En fazla kullanılan floresan proteinlerden biri olan yeşil floresan protein (YFP), ilk olarak *Aequorea victoria*'dan izole edilmiştir (Ormö and Cubitt, 1996). YFP, 238 aminoasitten oluşan ve 27 kDa ağırlığında olan bir proteindir. 395 nm'de eksitasyon piki verir, 509 nm'de ise emisyon pikini verir. YFP'nin bir çok varyantı başka araştırmacılar tarafından geliştirilmiştir. En büyük gelişme, Heim ve Tsien (1996) tarafından S65T nokta-mutasyonu ile gerçekleştirilmiş ve floresan miktarında ve stabilitede bir artış elde edilmiş ve eksitasyon piki 488 nm'ye kaymıştır. F64L mutasyonu ise geliştirilmiş (eYFP veya eGFP) YFP varyantının oluşturulmasını sağlamış ve bu proteinin memeli hücreleri tarafından kullanılmasını mümkün kılmıştır (Cormack vd., 1996). *P. pastoris*'te YFP bir çok farklı amaçlar (protein izleme, organel izleme, işaretleme ve promotör varyantlarının taranması gibi) için kullanılmıştır (Hartner vd., 2008; Qin vd., 2011; Ruth vd., 2010; Prielhofer vd., 2013; Heiss vd., 2015; Puxbaum vd., 2016; Rossanese vd., 1999; Sakai vd., 1998; Sjöblom vd., 2012).

### 2.2.2. Biyoreaktör İşletim Türü ve Hidrodinamiği

Biyoreaktör işletim türü;

- Kesikli veya yarı-kesikli işletim
- Sürekli işletim
- Periyodik pulse (fed batch) beslemeli işletim şeklinde sınıflandırılabilir.

Sıvı faza göre kesikli, oksijene göre yarıkesikli olan işletimler, küçük ve orta kapasiteli üretim proseslerinde kullanılırlar.

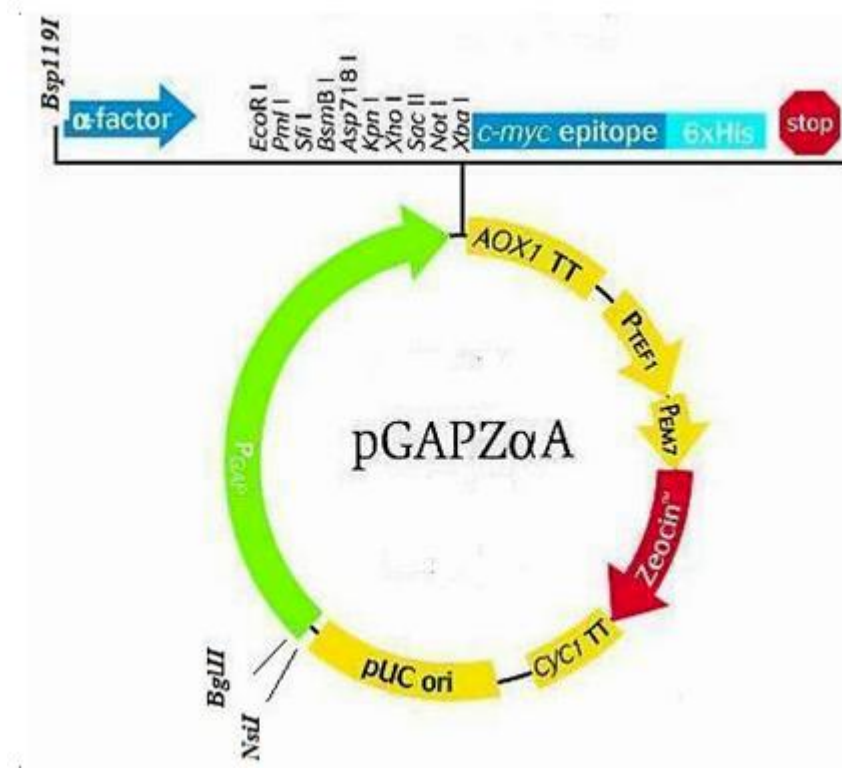
**Tablo 2. 1.** Rekombinant hGH üreten kuruluşlar ve ilaç sanayindeki ürün adları

Kuruluş	Ürün adı
Eli Lilly	Humatrope
Genentech	Nutropin & Protopin
Pharmacia & Upjohn Company	Genotropin
Novo Nordisk	Norditropin
Serono Laboratories	Saizen & Serostim

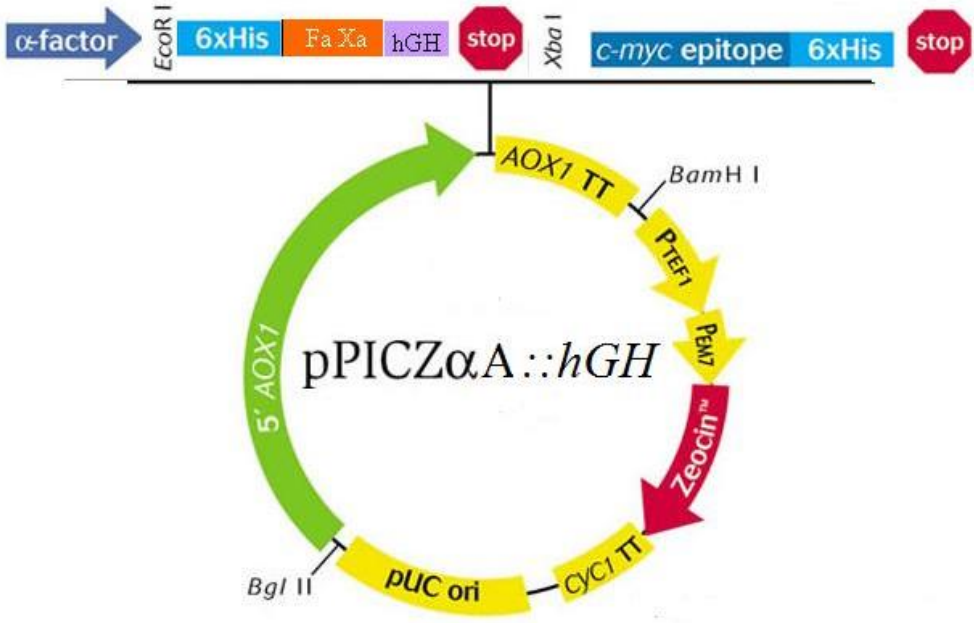
### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. pGAPZαA::hGH Plazmidinin pPICZα-A ve PGAPZαA Kullanılarak Geliştirilmesi

pGAPZαA (Invitrogen) ve pPICZαA::hGH (Çalık vd., 2008), çalışmanın bu kısmında kullanılan iki ana plazmidir ve Şekil 3.1. ve 3.2.'de gösterilmiştir. pPICZαA::hGH plazmidinde bulunan hGH'nin her iki ucunda plazmide klonlamak için gerekli olan restriksiyon enzim kesme bölgeleri, üretim sonrası rhGH'yi orijinal N-ucu ile saflaştırmak için gerekli olan dizinler bulunmaktadır. N-terminus'ta bulunan His-tag protein saflaştırılmasını kolaylaştırmakta ve Faktör Xa ile kesildikten sonra proteinin orijinal N-ucu ile hGH elde edilmesini sağlamaktadır. pGAPZαA'nın 3147 bp büyüklüğündedir. hGH geni pPICZαA::hGH'den (Çalık vd., 2008), *EcoRI* ve *XbaI* restriksiyon enzimleri ile kesilerek, saflaştırıldıktan sonra pGAPZαA'ya klonlanmıştır.



Şekil 3. 1. pGAPZαA'nın şematik gösterimi. Enzim kesme bölgeleri de şekilde görülmektedir



**Şekil 3. 2.** pPICZαA::hGH'nin sahip olduğu His-tag ve Faktör Xa kesme bölgeleri ile birlikte şematik gösterimi

### 3.1.1. pGAPZαA ve pPICZαA::hGH Plazmidlerinin İzolasyonu

-80°C'de saklanan pGAPZαA ve pPICZαA::hGH plazmidlerini taşıyan *E.coli* DH5α suşları ayrı ayrı seçici antibiyotik olarak Zeocin™ içeren LSLB katı ortamına aktarılmıştır (Tablo 3.1.). Çoğalan hücreler daha sonra LB sıvı ortamına aktarılmış ve 37°C'de 12-16 st inkübe edilmiştir. Plazmid izolasyonu alkali lizis yöntemiyle yapılmıştır. Plazmidler, sonuçları doğrulamak adına, *EcoRI* enzimi ile kesilmiştir. Kesme işlemi 37°C'de gerçekleştirilmiştir ve 65°C'de 20 dk ısı inaktivasyonu yapılarak reaksiyon sonlandırılmıştır (Tablo 3.2.).

**Tablo 3. 1.** pPICZαA::hGH ve pGAPZαA taşıyan *E. coli* DH5α hücrelerinin çoğaltıldığı ortam bileşimi

Bileşen	Derişim (g dm <sup>-3</sup> )
Tripton	10
Maya özütü	5
NaCl	5
Zeocin™	0.025

**Tablo 3. 2.** pPICZαA::hGH ve pGAPZαA'nın lineerizasyon tepkime bileşimi

Bileşen	Miktar
pPICZαA::hGH ve pGAPZαA	0.5-1 µg
10X <i>EcoRI</i> Tamponu	2 µl
<i>EcoRI</i> (10 U µl <sup>-1</sup> )	2 µl
H <sub>2</sub> O	20 µl (Toplam hacim olacak şekilde)

### 3.1.2. pGAPZαA ve pPICZαA::hGH Plazmidlerinin Çift Kesilmesi

Bir sonraki aşama, pGAPZαA ve pPICZαA::hGH plazmidlerinin *EcoRI* ve *XbaI* enzimleriyle çift kesilmesi ve hGH ve kullanılacak olan pGAPZαA plazmidinin hazır hale getirilmesidir (Tablo 3.3.). Kesme işlemi 37°C'de gerçekleştirilmiş ve 65°C'de 20 dk ısı inaktivasyonu yapılarak reaksiyon sonlandırılmıştır.

**Tablo 3. 3.** pPICZαA::hGH ve pGAPZαA'nın çift kesme tepkime bileşimi

Bileşen	Miktar
pPICZαA::hGH ya pGAPZαA	< 1 µg
10X Tango Tamponu	4 µl
<i>EcoRI</i> (10 U µl <sup>-1</sup> )	1 µl
<i>XbaI</i>	2 µl
H <sub>2</sub> O	20 µl (Toplam hacim olacak şekilde)

### 3.1.3. Çift Kesilen pGAPZαA ve pPICZαA::hGH'den Elde Edilen hGH'nin Ligasyonu

*EcoRI* ve *XbaI* ile çift kesilen ve birbiriyle uyumlu uçlara sahip olan DNA'lar T4 DNA ligaz enzimi kullanılarak üretici firma Thermo Scientific tarafından belirtilen protokole göre ligasyon tepkimesine sokulmuştur (Tablo 3.4.). Ligasyon reaksiyonu için kullanılan molar oran 3:1-5:1 (hGH/çift kesilmiş pGAPZαA) arasında değiştirilmiştir. Ligasyon karışımı, 16°C'de 14 st boyunca inkübe edilmiştir ve 65°C'de 10 dk ısı inaktivasyonu ile reaksiyon sonlandırılmıştır. Ligasyon sonucu elde edilen ürün olan pGAPZαA::hGH'nin 3696 bp olup, jel elektroforezde pPICZαA::hGH (4142 bp) ve pGAPZαA (3147 bp) arasında görüntülenmesi beklenmektedir.

**Tablo 3. 4.** Ligasyon tepkime karışımı

Bileşen	Miktar
<i>hGH</i> geni	30-50 ng
pGAPZ $\alpha$ A	100 ng
T4 DNA Ligaz (5 U $\mu$ l <sup>-1</sup> )	0.4 $\mu$ l (2 U)
10X T4 DNA Ligaz Tamponu	2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	20 $\mu$ l (Toplam hacim olacak şekilde)

### 3.1.4. *E. coli* DH5 $\alpha$ Hücrelerinin pGAPZ $\alpha$ A::*hGH* ile Transformasyonu ve Baz Plazmidin Oluşturulması

Ligasyondan sonra elde edilen pGAPZ $\alpha$ A::*hGH*, *E. coli* DH5 $\alpha$  hücreleri kullanılarak transformasyonda kullanılmıştır (Sambrook and Russell, 2001). 37°C'de 16-24 st sonra görülen kolonilerden 6 tanesi seçilmiş ve plazmid izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen plazmidlerin büyüklüğü jel elektroforezde kontrol edilmiştir. Daha ileri düzeyde kontrol için, seçilen 2 koloniye ait plazmidler GAP-ileri ve AOX-geri primerleri (Invitrogen) (Tablo 3.5.) kullanılarak PCR'de kalıp olarak kullanılmışlardır. Üretici tarafından belirtildiği üzere, pGAPZ $\alpha$ A dizinininde, bu iki primer arasında kalan DNA dizini 540 bp uzunluğundadır. *hGH*'nin plazmide aktarılmasıyla birlikte bu kısım yaklaşık 1080 bp olmalıdır. PCR karışımı ve koşulları Tablo 3.6. ve Tablo 3.7.'de verilmiştir.

**Tablo 3. 5.** Tasarlanan primerler ve dizinleri

İsim	Dizin
GAP İleri Primeri	5'- GTCCCTATTTCAATCAATTGAA-3'
AOX1 Geri Primeri	5'- GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'

**Tablo 3. 6.** PCR tepkime bileşimi

Bileşen	Miktar
10X PCR Tepkime Tamponu (Mg <sup>++</sup> siz)	5 µl
dNTP (2 mM)	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3 µl , 4 µl
İleri GAP Primer (5 µM)	2 µl
Geri AOX Primer (5 µM)	2 µl
Kalıp DNA (10pg-1 µg)	1 µl
Taq DNA polimeraz (5 U µl <sup>-1</sup> )	0.3 µl
H <sub>2</sub> O	50 µl (Toplam hacim olacak şekilde)

**Tablo 3. 7.** PCR işletim koşulları

Döngü sayısı	Sıcaklık	Zaman
1 döngü	94°C	3 dk
	94°C	1 dk
1 döngü	50°C	1 dk
	72°C	1 dk
	94°C	1 dk
29 döngü	55°C	1 dk
	72°C	1 dk
1 döngü	72°C	10 dk

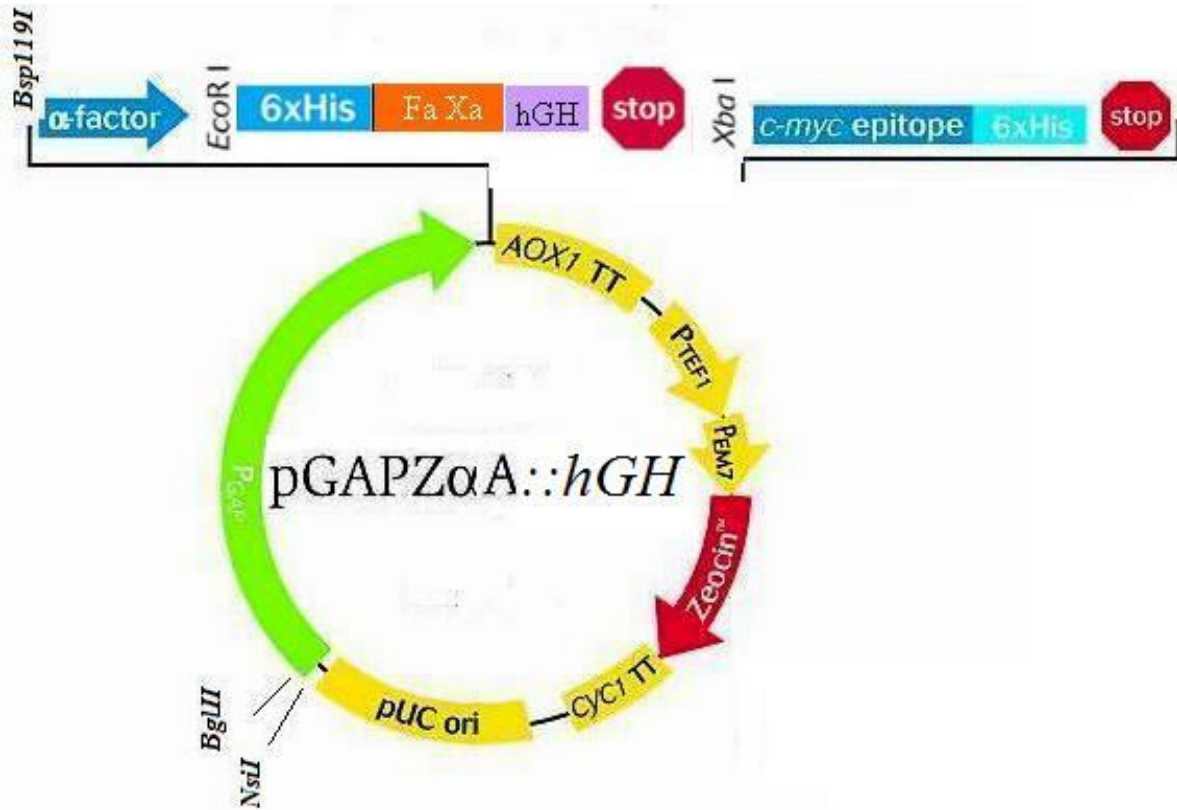
### 3.1.5. *Pichia pastoris* X-33'ün pGAPZαA::hGH ile Transformasyonu

*P. pastoris* X-33 hücreleri, *Nsi*I (Mph1103I) restriksiyon enzimi ile lineerize edilmiş pGAPZαA::hGH plazmidi kullanılarak transforme edilmiştir. *Nsi*I enziminin plazmidde bulunduğu nokta Şekil 3.3.'te görülebilir. Üretici firma tarafından belirtildiği üzere, transformasyon kesilmemiş plazmidle de gerçekleşebilir, ancak bu durumda plazmidin genome entegre olma olasılığı daha düşüktür (Invitrogen, 2010). Dolayısıyla, pGAPZαA::hGH plazmidi lineer hale getirilip kullanılmıştır. pGAPZαA::hGH plazmidi, bu plazmidi taşıyan ve daha önce raporda belirtildiği şekilde geliştirilen *E. coli* hücrelerinden

izole edilerek elde edilmiştir. Lineerizasyon tepkimesinin bileşenleri Tablo 3.8.'de verilmiştir. Tepkime 37°C'de 5 st inkübasyondan sonra 65°C'de 25 dakika inkübe ederek ısı inaktivasyonu ile durdurulmuştur. Tepkime sona erdikten sonra, karışım ThermoScientific PCR Saflaştırma Kiti ile kullanılarak saflaştırılmıştır. Bu işlemde, son aşamada pGAPZαA::hGH plazmidini, elüsyon tamponu kullanılarak değil, steril saf su içinde çözülmüştür. Lineerizasyon, jel elektroforezde kullanılarak kontrol edilmiştir.

**Tablo 3. 8.** pGAPZαA::hGH'nin lineerizasyon tepkime bileşimi

Bileşen	Miktar
pGAPZαA::hGH	180-200 µL (10-15 µg)
10X R Tamponu	25 µl
NsiI (10 U µl <sup>-1</sup> )	2 µl
H <sub>2</sub> O	250 µl (Toplam hacim olacak şekilde)



**Şekil 3. 3.** pGAPZαA::hGH plazmidini ve transformasyon için kullanılan NsiI enzimi kesme bölgesi

Lityum asetat yöntemi *Pichia* transformasyonu için uygun olmadığı için (Invitrogen, 2010), lityum klorid metodu transformasyon için seçilmiştir. Bu amaçla, *P. pastoris* X-33 hücreleri YPD ortamında OD<sub>600</sub> 0.8-1.0 aralığında olana dek çoğaltılmış ve daha sonra saf suyla



yıkanan hücreler, üretici firma (Invitrogen) tarafından belirlenen metoda göre transformasyon için kullanılmıştır. Transformasyon sonuçları, 60 st sonra kontrol edilmiş ve 18 koloni seçilmiştir. Seçilen koloniler Zeocin<sup>TM</sup> içeren YPD katı ortamına aktarılmış ve 24 st boyunca 30°C'de inkübe edilmişlerdir. Altı adet muhtemel pozitif koloni seçilmiş, genomik DNA'ları izole edilip (Burke vd., 2000) pGAPZαA::hGH plazmidi taşıyıp taşımadıkları AOX-geri ve GAP-ileri primerleri kullanılarak koşulları ve bileşenleri Tablo 3.7. ve Tablo 3.9.'da verilen PCR ile kontrol edilmiştir.

**Tablo 3. 9.** PCR tepkime bileşimi

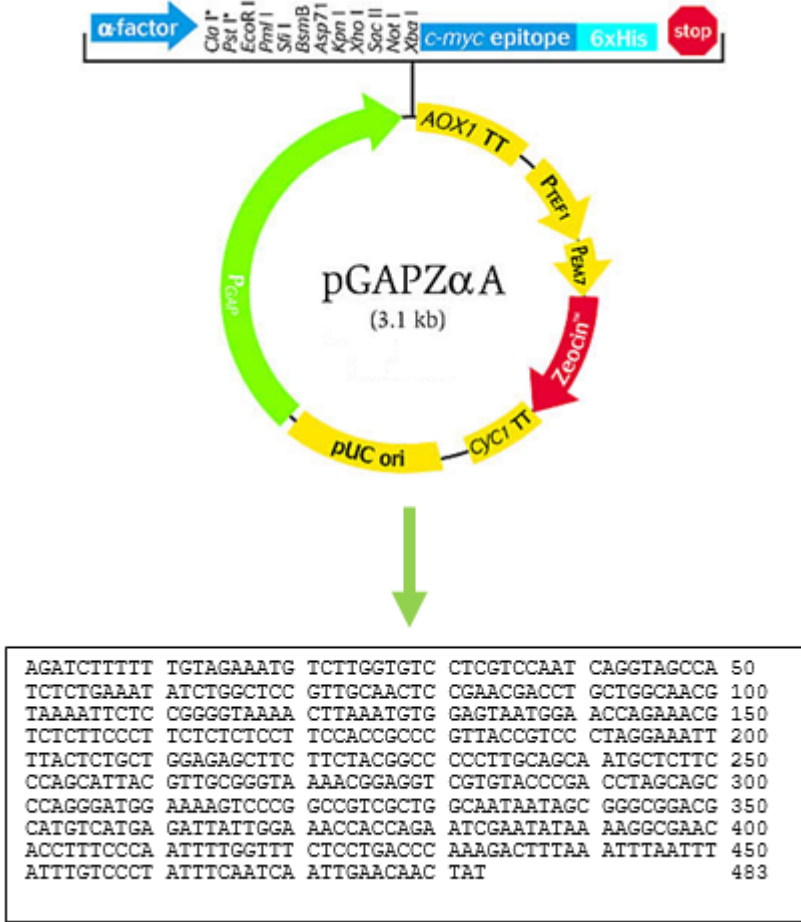
Bileşen	Miktar
10X PCR Tepkime Tamponu (Mg <sup>++</sup> siz)	5 µl
dNTP (2 mM)	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3 µl
İleri GAP Primer (5 µM)	2 µl
Geri AOX Primer (5 µM)	2 µl
Genomik DNA (10pg-1 µg)	1.3 µl
Taq DNA polimeraz (5 U µl <sup>-1</sup> )	0.3 µl
H <sub>2</sub> O	50 µl (Toplam hacim olacak şekilde)

## 3.2. P<sub>GAP</sub> Kütüphanesinin Oluşturulması

### 3.2.1. P<sub>GAP</sub> Dizininin Analizi

Kontrol edilebilen ve güçlü bir promotörün ulaşabildiği ekspresyon seviyesi transkripsiyon faktörlerinin, RNA polimerazın ve diğer bileşenlerin bağlanabileceği spesifik DNA-bağlanma bölgeleri taşımasıyla doğrudan ilintilidir (Vogl and Glieder 2013). Dolayısıyla, promotör mühendisliği yardımıyla, farklı regülasyon özelliklerine sahip bir promotör kütüphanesi oluşturularak aynı konak hücrede daha yüksek ekspresyon seviyelerine ulaşabilmek mümkündür (Qin vd., 2011a; Qin vd., 2011b); böylece farklı sentetik promotörler tasarlanabilir. Başka bir deyişle, P<sub>GAP</sub>'ın regülasyonunda etkili olan transkripsiyon faktörlerinin (TF) araştırılması gibi promotör mühendisliği yöntemleriyle, daha yüksek ekspresyon seviyelerine ulaşabilme potansiyeli vardır denebilir. Bu bağlamda, P<sub>GAP</sub> ile ulaşılan ekspresyon seviyelerini artırmak amacıyla, P<sub>GAP</sub> üzerinde bulunan putatif TF

bağlanma bölgeleri MatInspector (Cartharius vd., 2005) programı kullanılarak analiz edilmiştir. Bu yazılım, veritabanlarında bulunan TF bağlanma bölgelerini tarayarak, analiz edilen dizin üzerinde bulunan putatif TF bağlanma bölgelerini eşleşme skorlarıyla birlikte bir liste olarak sunmaktadır.  $P_{GAP}$  dizini, pGAPZ $\alpha$ -A (Invitrogen) ticari vektörünün haritasından yararlanılarak bulunmuştur (Şekil 3.4.).



**Şekil 3. 4.**  $P_{GAP}$  vektörünün haritası ve  $P_{GAP}$  dizini

MatInspector tarafından bulunan ve eşleşme puanı 0.8'den yüksek olan 41 putatif TF bağlanma bölgeleri fonksiyonlarına göre sınıflandırılmıştır (Tablo 3.10.).

**Tablo 3. 10.** MatInspector tarafından bulunan putative transkripsiyon faktörleri

TF'nin Fonksiyonu	Bulunan TF'ler
Karbon kullanımı ile ilgili olan glikolitik genler, oksijen tüketimi ile ilgili olarak glikoz ile baskılanan ya da aktive olan genler	Hap2/3/4/5p kompleksi, CSRE'ler, Pip2p, Mig1p, Mig2p
Stres yanıtı	Isı şoku transkripsiyon faktörleri
Genel TF'ler	Rap1p, Ssn6p, Tup1p, Rfx1p, rDNA bağlayıcı proteini, Reb1p, Fhl1p
Amino asit metabolizması	Leu3p, Put3, Cha4p
Gelişim ve çoğalma ile ilgili yolizleri	Tea1, Mcm1p

$P_{GAP}$ , glikoliz ve glukoneogenezis yolizlerindeki bulunan GAPDH enzimini kodladığından ve ekspresyon seviyesi kullanılan karbon kaynağına bağlı olduğundan,  $P_{GAP}$  varyantlarının tasarımı yapılırken glikolitik genlerin regülasyonunda ya da genel olarak represör ya da aktivatör görevi olan TF'ler, dikkate alınmıştır. Bunlara ek olarak, diğer glikolitik genlerin promotörleri de incelenmiştir. Bu genler, glikoz-6-fosfat izomeraz, fosfofruktokinaz, fruktoz 1,6-bifosfat aldolaz, fruktoz-1,6-bifosfataz, trioz-fosfat izomeraz, 3-fosfogliserat kinaz, fosfogliseratmutaz, enolaz, piruvat kinazdır. Bulunan TF'lerin ait oldukları ailelere göre glikoliz genlerinin promotörlerindeki varlıkları Tablo 3.11.'de gösterilmiştir. Tüm bunlar dışında,  $P_{GAP}$  tasarımı yapılırken seçilen TF'ler sayılarına ve eşleşme skorlarına göre seçilmiş ve tasarım bu şekilde yapılmıştır. Bunlardan represör etkisi olan putatif TF bağlanma bölgeleri silinirken, aktivatör etkisi olan putatif TF bağlanma bölgeleri dizindeki doğal pozisyonlarında tekrarlanmıştır. Bunlardan represör etkisi olan putatif TF bağlanma bölgeleri silinirken, aktivatör etkisi olan putatif TF bağlanma bölgeleri dizindeki doğal pozisyonlarında tekrarlanmıştır.

**Tablo 3. 11.** Glikolitik genlerin TF bağlanma bölgeleri açısından analizi

Buldukları Promotör Sayısı	Matriks Ailesi	Açıklama	Örnek TFs
7 ( $\approx$ %70)	YMCM	Maya hücre döngüsü ve metabolik regülatör	Mcm1p
8 ( $\approx$ %80)	RFXP	Regülatör faktör X proteini	Rfx1p
	TEAF	TEA/ATTS DNA bağlanma faktörleri	Tec1p
9 (%90)	HOMD	Homeo bölgesi içeren transkripsiyonel regülatörler	Pho2p, Yox1p
	YMIG	Maya GC-Box Protenleri	Mig1p(Mig1-2p), Mig2p (Mig1-1p)
	YSTR	Maya stress yanıt proteinleri	Msn2p
10 (%100)	BZIP	Fungal bazik lösin fermuar ailesi	Yap1p, Hac1p
	CSRE	Karbon kaynağı yanıt elementleri	Sip4p, Cat8p
	ICGG	Ters çevrilmiş CGG üçlü bölgeler	Tea1p
	MGCM	Monomerik Gal4-sınıfı motifler	Rgt1p, Yrr1p
	YGAL	Maya GAL4 faktörü	Gal4p (Att1p)
	YORE	Maya oleat yanıt elementleri	Oaf1p

Bu bağlamda, tasarlanan promotörler ve dizinleri aşağıda verilmiştir. Varyantlar ile ilgili özet bilgi Tablo 3.12.'de mevcuttur.

### 3.2.2. Tasarlanan P<sub>GAP</sub> varyantları

**P<sub>GAP</sub> Varyant 1 (MIG1-2 Silinmesi):** Mig1-2p bir çinko parmak proteindir ve Ssn6-Tup1 represör kompleksini devreye sokarak glikoz represyonuna sebep olur. Bu bağlamda, P<sub>GAP</sub> üzerinde bulunan Mig1-2p bağlanma bölgesi silinmiştir.

```

AGATCTTTTTTTGTAGAAATGTCTTGGTGTCCCTCGTCCAATCAGGTAGCCA      50
TCTCTGAAATATCTGGCTCCGTTGCAACTCCGAACGACCTGCTGGCAACG      100
TAAAATTCTC CGGGGTAA AACTTAAATGTGGAGTAATGGAACCAGAAACG      150
TCTCTTCCCTTCTCTCTCCTTCCACCGCCCGTTACCGTCCCTAGGAAATT      200
TACTCTGCTGGAGAGCTTCTTCTACGGCCCCCTTGCAGCAATGCTCTTC      250
CCAGCATTACGTTGCGGGTAAAACGGAGGTCGTGTACCCGACCTAGCAGC      300
CCAGGGATGGAAAAGTCCCGGCCGTCGCTGGCAATAATAGCGGGCGGACG      350
CATGTCATGAGATTATTGGAAACCACCAGAATCGAATATAAAAGGCGAAC      400
ACCTTTCCAATTTTGGTTTCTCCTGACCCAAAGACTTTAAATTTAATTT      450
ATTTGTCCCTATTTCAATCAATTGAACAACAT      483

```

**P<sub>GAP</sub> Varyant 2 (RGT1 Duplikasyonu):** P<sub>GAP</sub> Varyant 1'in bulunduğu bölge, MatInspector tarafından aynı zamanda glikoza duyarlı transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesi olarak da tespit edilmiştir. Glikoza duyarlı transkripsiyon faktörleri, glikolizde ve glikozun hücre-içine taşınımında aktivatör olarak görev alırlar. Dolayısıyla, bu bölge doğal pozisyonunda tekrarlanmıştır.

AGATCTTTTTGTAGAAATGTCTTGGTGTCTCGTCCAATCAGGTAGCCA	50
TCTCTGAAATATCTGGCTCCGTTGCAACTCCGAACGACCTGCTGGCAACG	100
<b>TAAAATTCTCCGGGGTAA</b> AACTTAAATGTGGAGTAATGGAACCAGAAACG	150
TCTCTTCCCTTCTCTCTCCTTCCACCGCCCGTTACCGTCCCTAGGAAATT	200
TACTCTGCTGGAGAGCTTCTTCTACGGCCCCCTTGCAGCAATGCTCTTC	250
CCAGCATTACGTTGCGGGTAAAACGGAGGTCGTGTACCCGACCTAGCAGC	300
CCAGGGATGGAAAAGTCCCGGCCGTCGCTGGCAATAATAGCGGGCGGACG	350
CATGTCATGAGATTATTGGAAACCACCAGAATCGAATATAAAAGGCGAAC	400
ACCTTTCCAATTTTGGTTTCTCCTGACCCAAAGACTTTAAATTTAATTT	450
ATTTGTCCCTATTTCAATCAATTGAACAACCTAT	483

**P<sub>GAP</sub> Varyant 3 (CSRE Duplikasyonu):** Karbon kaynağına duyarlı elementler (CSRE) glikoliz ve glukoneogenezis yollarındaki genlerin aktivasyonunda görev alırlar. Dolayısıyla, bu bölge doğal pozisyonunda tekrarlanmıştır.

AGATCTTTTTGTAGAAATGTCTTGGTGTCTCGTCCAATCAGGTAGCCA	50
TCTCTGAAATATCTGGCTCCGTTGCAACTCCGAACGACCTGCTGGCAACG	100
TAAAATTCTCCGGGGTAAAACCTTAAATGTGGAGTAATGGAACCAGAAACG	150
TCTCTTCCCTTCTCTCTCCTTCCACCGCCCGTTACCGTCCCTAGGAAATT	200
TACTCTGCTGGAGAGCTTCTTCTACGGCCCCCTTGCAGCAATGCTCTTC	250
CCAGCATTACGTTGCGGGTAAAACGGAGGTCGTGTACCCGACCTAGCAGC	300
CCAGGGATGGAAAAGTCCCGGCCGTCGCTGGCAATAATAGCGG <b>CCGGACG</b>	350
<b>CATGTC</b> ATGAGATTATTGGAAACCACCAGAATCGAATATAAAAGGCGAAC	400
ACCTTTCCAATTTTGGTTTCTCCTGACCCAAAGACTTTAAATTTAATTT	450
ATTTGTCCCTATTTCAATCAATTGAACAACCTAT	483

**P<sub>GAP</sub> Varyant 4 (RAP1 Duplikasyonu):** Rap1p maya hücrelerinde glikoliz yolizinde aktivatör olarak görev yapan bir transkripsiyon faktörüdür; dolayısıyla, bu bölge doğal pozisyonunda tekrarlanmıştır.

AGATCTTTTT **TGTAGAAATG TCTTGGTGTC CTCGTC** CAATCAGGTAGCCA 50  
TCTCTGAAAT ATCTGGCTCCGTTGCAACTCCGAACGACCTGCTGGCAACG 100  
TAAAATTCTCCGGGGTAAACTTAAATGTGGAGTAATGGAACCAGAAACG 150  
TCTCTTCCCTTCTCTCTCCTTCCACCGCCC GTTACCGTCCCTAGGAAATT 200  
TACTCTGCTGGAGAGCTTCTTCTACGGCCCCCTTGCAGCAATGCTCTTC 250  
CCAGCATTACGTTGCGGGTAAAACGGAGGTCGTGTACCCGACCTAGCAGC 300  
CCAGGGATGGAAAAGTCCCGGCCGTCGCTGGCAATAATAGCGGGCGGACG 350  
CATGTCATGAGATTATTGGAACCACCAGAATCGAATATAAAAGGCGAAC 400  
ACCTTTCCCAATTTTGGTTTCTCCTGACCCAAAGACTTTAAATTTAATTT 450  
ATTTGTCCCTATTTCAATCAATTGAACAAC TAT 483

**P<sub>GAP</sub> Varyant 5 (MIG1-1 ve MIG1-2 Silinmesi):** Mig1-1p bir çinko parmak proteindir ve Mig1-2p ile işbirliği yaparak benzer şekilde, glikoz ile indüklenen genlerin represyonunda görev alır. Dolayısıyla, P<sub>GAP</sub> Varyant 1'e benzer şekilde, MIG1-1 ve MIG1-2 bağlanma bölgelerini içeren bu bölge, represör etkisinin azaltılması amacıyla silinmiştir.

AGATCTTTTT TGTAGAAATG TCTTGGTGTC CTCGTCCAAT CAGGTAGCCA 50  
TCTCTGAAAT ATCTGGCTCC GTTGCAACTC CGAACGACCT GCTGGCAACG 100  
**TAAAATTCTC CGGGGTAAAA CTAAATGTG GAGTAAT** GGA ACCAGAAACG 150  
TCTCTTCCCT TCTCTCTCCT TCCACCGCCC GTTACCGTCC CTAGGAAATT 200  
TACTCTGCT GGAGAGCTTC TTCTACGGCC CCCTTGCAGCA ATGCTCTTC 250  
CCAGCATTAC GTTGCGGGTA AACGGAGGT CGTGTACCCGA CCTAGCAGC 300  
CCAGGGATGG AAAAGTCCCG GCCGTCGCTG GCAATAATAGC GGGCGGACG 350  
CATGTCATGA GATTATTGGA AACACCAGA ATCGAATATAA AAGGCGAAC 400  
ACCTTTCCCA ATTTTGGTTT CTCCTGACCC AAAGACTTTAA ATTTAATTT 450  
ATTTGTCCCT ATTTCAATCA ATTGAACAAC TAT 483

**P<sub>GAP</sub> Varyant 6 (MIG1-1 Silinmesi):** Mig1-1p bir çinko parmak proteindir ve Mig1-2p ile işbirliği yaparak benzer şekilde, glikoz ile indüklenen genlerin represyonunda görev alır. Dolayısıyla, represör etkisinin azaltılması amacıyla silinmiştir.

```
AGATCTTTTT TGTAGAAATG TCTTGGTGTC CTCGTCCAAT CAGGTAGCCA      50
TCTCTGAAAT ATCTGGCTCC GTTGCAACTC CGAACGACCT GCTGGCAACG      100
TAAAATTCTC CGGGGTAAA A CTTAAATGTG GAGTAATGGA ACCAGAAACG      150
TCTCTTCCCT TCTCTCTCCT TCCACCGCCC GTTACCGTCC CTAGGAAATT      200
TACTCTGCT GGAGAGCTTC TTCTACGGCC CCCTTGCAGCA ATGCTCTTC      250
CCAGCATTAC GTTGCGGGTA AAACGGAGGT CGTGTACCCGA CCTAGCAGC      300
CCAGGGATGG AAAAGTCCCG GCCGTCGCTG GCAATAATAGC GGGCGGACG      350
CATGTCATGA GATTATTGGA AACCACCAGA ATCGAATATAA AAGGCGAAC      400
ACCTTTCCCA ATTTTGGTTT CTCCTGACCC AAAGACTTTAA ATTTAATTT      450
ATTTGTCCCT ATTTCAATCA ATTGAACAAC TAT                             483
```

**P<sub>GAP</sub> Varyant 7 (CSRE Duplikasyonu):** Karbon kaynağına duyarlı elementler (CSRE) glikoliz ve glukoneogenezis yollarındaki genlerin aktivasyonunda görev alırlar. Dolayısıyla, bu bölge, P<sub>GAP</sub> Varyant 3'te yapıldığı gibi doğal pozisyonunda tekrarlanmıştır.

```
AGATCTTTTT TGTAGAAATG TCTTGGTGTC CTCGTCCAAT CAGGTAGCCA      50
TCTCTGAAAT ATCTGGCTCC GTTGCAACTC CGAACGACCT GCTGGCAACG      100
TAAAATTCTC CGGGGTAAA CTTAA ATGTG GAGTAATGGA ACCAGAAACG      150
TCTCTTCCCT TCTCTCTCCT TCCACCGCCC GTTACCGTCC CTAGGAAATT      200
TACTCTGCT GGAGAGCTTC TTCTACGGCC CCCTTGCAGCA ATGCTCTTC      250
CCAGCATTAC GTTGCGGGTA AAACGGAGGT CGTGTACCCGA CCTAGCAGC      300
CCAGGGATGG AAAAGTCCCG GCCGTCGCTG GCAATAATAGC GGGCGGACG      350
CATGTCATGA GATTATTGGA AACCACCAGA ATCGAATATAA AAGGCGAAC      400
ACCTTTCCCA ATTTTGGTTT CTCCTGACCC AAAGACTTTAA ATTTAATTT      450
ATTTGTCCCT ATTTCAATCA ATTGAACAAC TAT                             483
```

**P<sub>GAP</sub> Varyant 8 (CSRE Duplikasyonu):** Karbon kaynağına duyarlı elementler (CSRE) glikoliz ve glukoneogenesis yollarındaki genlerin aktivasyonunda görev alırlar. Dolayısıyla, bu bölge, P<sub>GAP</sub> Varyant 3 ve P<sub>GAP</sub> Varyant 7’de yapıldığı gibi doğal pozisyonunda tekrarlanmıştır.

AGATCTTTTT TGTAGAAATG TCTTGGTGTC CTCGTCCAAT CAGGTAGCCA 50  
TCTCTGAAAT ATCTGGCTCC GTTGCAACTC CGAACGACCT GCTGGCAACG 100  
TAAAATTCTC CGGGGTAAAA CTAAATGTG GAGTAATGGA ACCAGAAACG 150  
TCTCTCCCT TCTCTCCT TCCACCGCCC GTTACCGTCC CTAGGAAATT 200  
TACTCTGCT GGAGAGCTTC TTCTACGGCC CCCTTGCAGCA ATGCTCTTC 250  
CCAGCATTAC **GTTGCGGGTA AAACGG**AGGT CGTGTACCCGA CCTAGCAGC 300  
CCAGGGATGG AAAAGTCCCG GCCGTCGCTG GCAATAATAGC GGGCGGACG 350  
CATGTCATGA GATTATTGGA AACCACCAGA ATCGAATATAA AAGGCGAAC 400  
ACCTTTCCA ATTTTGGTTT CTCCTGACCC AAAGACTTTAA ATTTAATTT 450  
ATTTGTCCCT ATTTCAATCA ATTGAACAAC TAT 483

**P<sub>GAP</sub> Varyant 9 (GAL4 Duplikasyonu):** Bu bölge GAL ve diğer glikoliz genlerinin aktivasyonunda görev alan bir TF olan maya GAL4 DNA-bağlayan çinko kümesinden bir TF olarak tespit edilmiştir. Dolayısıyla, doğal pozisyonunda tekrarlanmıştır.

AGATCTTTTT TGTAGAAATG TCTTGGTGTC CTCGTCCAAT CAGGTAGCCA 50  
TCTCTGAAAT ATCTGGCTCC GTTGCAACTC CGAACGACCT GCTGGCAACG 100  
TAAAATTCTC CGGGGTAAAA CTAAATGTG GAGTAATGGA ACCAGAAACG 150  
TCTCTCCCT TCTCTCCT TCCACCGCCC GTTACCGTCC CTAGGAAATT 200  
TACTCTGCT GGAGAGCTTC TTCTACGGCC CCCTTGCAGCA ATGCTCTTC 250  
CCAGCATTAC GTTGCGGG**TA AAACGGAGGT CGTGTACCCGA CC**TAGCAGC 300  
CCAGGGATGG AAAAGTCCCG GCCGTCGCTG GCAATAATAGC GGGCGGACG 350  
CATGTCATGA GATTATTGGA AACCACCAGA ATCGAATATAA AAGGCGAAC 400  
ACCTTTCCA ATTTTGGTTT CTCCTGACCC AAAGACTTTAA ATTTAATTT 450  
ATTTGTCCCT ATTTCAATCA ATTGAACAAC TAT 483



**P<sub>GAP</sub> Varyant10 (RFX1 Silinmesi):** Düzenleyici Faktör X Proteini (Rfx1p), Ssn6p ve Tup1p gibi represörleri bir araya getirerek promotör ifadesinde azalmaya sebep olan bir TF'dir. Dolayısıyla, P<sub>GAP</sub> üzerinde 4 farklı noktada tespit edilen bağlanma bölgeleri, bu represör etkisini azaltabilmek için silinmiştir.

AGATCTTTTT TGTAGAAATG TCTTGGTGTC CTCGTCCAAT CAGGTAGCCA	50
TCTCTGAAAT ATCTG <b>GCTCC GTTGCAACTC CGAACGACCT GCTGGCAACG</b>	100
TAAAATTCTC CGGGGTAAAA CTTAAATGTG GAGTAATGGA ACCAGAAACG	150
TCTCTCCCT TCTCTCCT TCCACCGCCC GTTACCGTCC CTAGGAAATT	200
TTACTCTGCT GGAGAGCTTC TTCTACGGCC CCCTTGCAGCA ATGCTCTTC	250
CCAGCATTAC GTTGCGGGTA AAACGGAGGT CGTGTACCCGA CCTAGCAGC	300
CCAGGGATGG AAAAGTCCCG GCCGTCGCTG GCAATAATAGC GGGCGGACG	350
CATGTCATGA <b>GATTATTGGA AACCACCA</b> GA ATCGAATATAA AAGGCGAAC	400
ACCTTTCCCA ATTTTGGTTT CTCCTGACCC AAAGACTTTAA ATTTAATTT	450
ATTTGTCCCT ATTTCAATCA ATTGAACAAC TAT	483

**Tablo 3. 12.** Tasarlanan promotör varyantları. Silinen TF bağlanma bölgeleri *italik* olarak gösterilmiştir. Tekrarlanan TF bağlanma bölgeleri ***kalın italik*** olarak gösterilmiştir

Varyant	Olası TF	Bulunduğu Bölge (bp)
Pro1	<i>MIG1 (MIG1-2)</i>	-383 / -366
Pro5	<i>MIG1/MIG2 (MIG1-2/MIG1-1)</i>	-383 / -347
Pro6	<i>MIG2 (MIG1-1)</i>	-365 / -347
Pro2	<b><i>RGT1</i></b>	-383 / -366
Pro3	<b><i>CSRE</i></b>	-142 / -128
Pro7	<b><i>CSRE (SIP4)</i></b>	-358 / -344
Pro8	<b><i>CSRE</i></b>	-222 / -208
Pro4	<b><i>RAP1</i></b>	-469 / -448
Pro9	<b><i>GAL4</i></b>	-215 / -189
Pro10	<i>RFX1</i>	-418 / -384 ve -123 / -106

Tasarlanan P<sub>GAP</sub> varyantları kimyasal olarak sentezletilmiştir. Sentezlenen bu varyantların PCR ile çoğaltılması için primerler tasarlanmıştır (Tablo 3.13.). Tasarım yapılırken, P<sub>GAP</sub> dizininin 3' ve 5' uçları değiştirilmediği için aynı geri ve ileri primerler kullanılmıştır. Tasarlanan varyantların ifade gücü, yeşil floresan protein (YFP) kullanılarak belirlenmiştir.

YFP proteinine ait gen dizisi pEGFP-N2 vektörü kullanılarak elde edilecektir. Bu amaçla tasarlanan primerler Tablo 3.13.'te verilmiştir.

### 3.2.3. Temel Plazmidin Oluşurulması

Farklı  $P_{GAP}$  varyantlarını taşıyacak olan pGAPPro#::*egfp* plazmidlerinin oluşturulması için öncelikle temel plasmid olan pPICZ $\alpha$ -A::*egfp* için tasarım yapılmıştır. Bu amaçla, pEGFP-N2 vektörü kalıp olarak kullanılarak, bir önceki gelişim raporunda belirtilen primerler yardımıyla *egfp* geni çoğaltılmıştır. Kullanılan PCR koşulları ve içerikleri Tablo 3.14. ve 3.15.'te verilmiştir.

**Tablo 3. 13.**  $P_{GAP}$  varyantlarının çoğaltılması için kullanılacak primerler. Altı çizili bölgeler restriksiyon enzimlerinin bağlanma bölgeleridir

Primer Adı	Dizin (5'→3')	Restriksiyon Enzimi
GAPProV-İleri	CGAGATCTTTTTGTAGAAATGTCTTGGTGTCTC	<i>Bgl</i> I
GAPProV-Geri	GGAATTCGTTTCGAAATAGTTGTTCAATTGATTG	<i>Eco</i> RI, <i>Bsp</i> 119I
YFP-İleri	GGAATTCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG	<i>Eco</i> RI
YFP-Geri	CCGGTACCTCACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGA	<i>Kpn</i> I

**Tablo 3. 14.** PCR tepkime bileşimi

Bileşen	Miktar
10X PCR Tepkime Tamponu (Mg <sup>++</sup> 'siz)	5 $\mu$ l
dNTP (2 mM)	10 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4 $\mu$ l , 6 $\mu$ l, 8 $\mu$ l
İleri GAP Primer (5 $\mu$ M)	5 $\mu$ l
Geri AOX Primer (5 $\mu$ M)	5 $\mu$ l
Kalıp DNA (10pg-1 $\mu$ g)	1 $\mu$ l
<i>Taq</i> DNA polimeraz (5 U $\mu$ l <sup>-1</sup> )	0.5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	50 $\mu$ l (Toplam hacim olacak şekilde)

**Tablo 3. 15.** PCR işletim koşulları

Döngü sayısı	Sıcaklık	Zaman
1 döngü	94°C	2 dk
1 döngü	94°C	1 dk
	50°C	1 dk
	72°C	2 dk
29 döngü	94°C	1 dk
	55°C	1 dk
	72°C	2 dk
1 döngü	72°C	10 dk

Bu aşamadan sonra, çoğaltılan *egfp* gen dizini pPICZ $\alpha$ -A plazmidine uygun restriksiyon enzimleri kullanılarak klonlanmıştır. Bu amaçla, çoğaltılan *egfp* geni, ThermoScientific PCR Safılaştırma Kiti kullanılarak safılaştırıldıktan sonra, *EcoRI* and *KpnI* ile kesilmiştir. Aynı şekilde, pPICZ $\alpha$ -A plazmidini de aynı enzimlerle kesilip ligasyon tepkimesine sokulmuştur (Tablo 3.16.). Ligasyon tepkimesi 22°C'de 1 saat inkübe edilerek gerçekleştirilmiş ve 65°C'de 10 dk tutularak sonlandırılmıştır.

**Tablo 3. 16.** Ligasyon tepkime karışımı

Bileşen	Miktar
<i>egfp</i>	50 ng
pPICZ $\alpha$ A	200 ng
T4 DNA Ligaz (5 U $\mu$ l <sup>-1</sup> )	1 $\mu$ l (5 U)
10X T4 DNA Ligaz Tamponu	2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	20 $\mu$ l (Toplam hacim olacak şekilde)

Ligasyondan sonra elde edilen pPICZ $\alpha$ A::*egfp*, *E. coli* TOP10 hücreleri kullanılarak transformasyonda kullanılmıştır (Sambrook and Russell, 2001). 37°C'de 16-24 st sonra görülen kolonilerden 4 tanesi seçilmiş ve plazmid izolasyonu yapılmıştır. Seçilen plazmidlerden bir tanesi tekli ve çift kesilerek, ve kalıp olarak kullanılarak PCR ile kontrol edilmiştir. Daha sonra, dizin analizi ile *egfp* dizini daha ileri düzeyde kontrol edilmiştir .

### 3.2.4. Bazal Plazmidin Oluşturulması

Bazal plazmid, tasarlanan P<sub>GAP</sub> varyantlarının ifade seviyelerinin karşılaştırılacağı plazmid olarak tasarlanmıştır. Bu plazmid tasarlanırken, eGFP hücre-içi değil hücre-dışı üretilecek

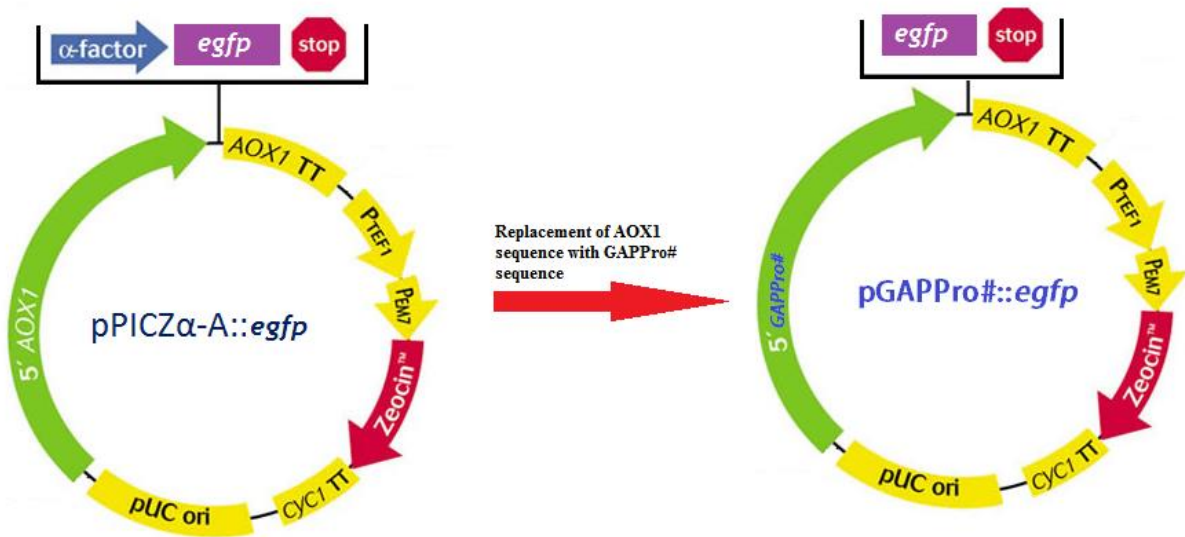
şekilde tasarlanmıştır. Bu şekilde protein salgılama prosesinin karmaşıklığı ortadan kaldırılması amaçlanmıştır ve sadece promotörün protein üretimi üzerindeki tekil etkisi görülmeye çalışılmıştır. Bu amaçla, pPICZ $\alpha$ -A::*egfp* ve pGAPZ $\alpha$ -A plazmidleri *Bgl*II and *Eco*RI enzimleriyle kesilerek, P<sub>AOX1</sub> promotör bölgesi P<sub>GAPWT</sub> ile ligasyon tepkimesine sokularak değiştirilmiştir. Ligasyon sonucu elde edilen ürün *E. coli* TOP10 hücrelerine transforme edilmiştir. Transformasyon sonucu elde edilen hücrelerden seçilen plazmidlerden 2 tanesi tekli ve çift kesme ve bu plazmidlerin kalıp olarak kullanılmasıyla PCR ile kontrol edilmiştir. Çıkarılan P<sub>AOX1</sub> dizini P<sub>GAPWT</sub>'den daha büyük olduğu için, doğru P<sub>GAPWT</sub>::*egfp* plazmidlerinin, pPICZ $\alpha$ -A::*egfp* plazmidinin önünde olması beklenmektedir.

### 3.2.5. P<sub>GAP</sub> Varyantlarını Taşıyan pGAPPro#::*egfp* Plazmidlerinin Oluşturulması ve *E. coli* Transformasyonu

#### 3.2.5.1. P<sub>GAP</sub> Varyantlarının Çoğaltılması

P<sub>GAP</sub> varyantları Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) ile çoğaltılmışlardır. Bu amaçla, uygun restriksiyon enzimleri seçilerek primerler tasarlanmıştır (Tablo 3.17.) ve bu şekilde çoğaltılan P<sub>GAP</sub> varyantının daha önce tasarlanan pPICZ $\alpha$ -a::*egfp* plazmidinde bulunan P<sub>AOX1</sub> ile değiştirilmesi sağlanmıştır (Şekil 3.5.). P<sub>GAP</sub> varyantlarında, 5' ve 3' uçları değiştirilmediği için her bir varyant aynı primerlerle çoğaltılmışlardır.

GAPPro# varyantlarının en yüksek verimde çoğaltılabilmesi için en uygun tuz derişimi belirlenmiştir ve PCR tepkime içeriği Tablo 3.18.'de verilmiştir. PCR işletim koşullar Tablo 3.19.'da verilmiştir. PCR tepkimesinden sonra örnekler %0.8 agaroz jelde 60 dakika boyunca 90 V'ta koşturulmuş ve görüntülenmiştir.



**Şekil 3. 5.** Temel plazmid olan pPICZ $\alpha$ -a::*egfp* kullanılarak pGAPPro#::*egfp* plazmidlerinin oluşturulmasının şematik gösterimi

**Tablo 3. 17.** GAPPro# varyantları ve *egfp* için tasarlanmış primerler. Altı çizili dizinler restriksiyon enzimlerini temsil etmektedirler

Primer Adı	Dizin (5' → 3')	Restriksiyon Enzimi
GAPPro-İleri	CGAGATCITTTTTGTAGAAATGTCTTGGTGCCTC	<i>Bgl</i> I
GAPPro-Geri	GGAATTCCGTTTCGAAATAGTTGTTCAATTGATTG	<i>Eco</i> RI
EGFP-İleri	GGAATTCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG	<i>Eco</i> RI
EGFP-Geri	CCGGTACCTCACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGA	<i>Kpn</i> I

**Tablo 3. 18.** GAPPro# varyantlarının çoğaltıldığı PCR tepkime içeriği

Bileşen	Miktar (µL)
<i>Pfu</i> DNA Polimeraz Tamponu (10X)	5
MgSO <sub>4</sub>	4 (2 mM) – 6 (3 mM) – 8 (4 mM)
dNTP Karışımı (2 mM)	10
GAPPro-İleri primeri	5
GAPPro-Geri Primeri	5
Kalıp DNA (pUC57::GAPPro#)	1
<i>Pfu</i> DNA Polimeraz	0.5
Su	50 µL'ye tamamlayacak şekilde

**Tablo 3. 19.** GAPPro# varyantlarının çoğaltıldığı PCR işletim koşulları

Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
1 döngü	94°C	2 dk
1 döngü	94°C	1 dk
	50°C	1 dk
	72°C	1.5 dk
29 döngü	94°C	1 dk
	55°C	1 dk
	72°C	1.5 dk
1 döngü	72°C	10 dk

Uygun tuz derişiminin belirlenmesi için, 2 mM, 3mM ve 4 mM derişimleri denenmiştir. Tüm GAPPro# varyantlarını temsilen, sadece GAPPro1 varyantı kalıp DNA olarak kullanılmıştır. PCR sonrası elde edilen örnekler, agaroz jel elektroforezde görüntülenmiştir.

Tüm GAPPro# varyantları Tablo 3.18. ve 3.19.'da verilen koşullara göre çoğaltılmışlardır. Tüm varyantların PCR sonucunda beklenen boyutları Tablo 3.20.'de verilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri Thermo Fisher Scientific PCR Saflaştırma Kiti ile saflaştırılmıştır.

### 3.2.5.2. Tasarlanan Plazmidlerin Oluşturulması ve *E. coli* TOP10 Transformasyonu

Saflaştırılmış GAPPro# varyantları ve izole edilmiş temel plazmid olan, i.e pPICZ $\alpha$ -A::*egfp* ikili kesilerek ligasyon için hazır hale getirilmiştir. Plazmidlerin ve PCR ürünlerinin kesim reaksiyonu 37°C'de 2 st boyunca gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon ısı inaktivasyonu ile 65°C'de 20 dk inkübasyon ile sonlandırılmıştır. İkili kesme koşulları Tablo 3.21.'de verilmiştir.

**Tablo 3. 20.** GAPPro# varyantlarının boyutları

PCR Ürünü	Beklenen boyut (bp)
GAPPro1	474
GAPPro2	510
GAPPro3	507
GAPPro4	515
GAPPro5	455
GAPPro6	473
GAPPro7	507
GAPPro8	507
GAPPro9	517
GAPPro10	444
GAPWT	483

**Tablo 3. 21.** İkili kesme koşulları

Bileşen	Miktar ( $\mu$ L)
10X Tango Tamponu	10
<i>Bgl</i> I (10 U/ $\mu$ L)	2.5
<i>Eco</i> RI (10 U/ $\mu$ L)	2.5
DNA (GAPPro# veya temel plazmid)	10-50 (~2.5 $\mu$ g)
Su	100 $\mu$ L'ye tamamlayacak şekilde

GAPPro# varyantlarının kesildikten sonraki görüntüsü, sadece bir kaç baz çifti kesildiği için farklı bir şekilde görüntülenememiştir. Ancak temel plazmidin tamamen kesildiği, 1 µL örneğin agaroz jel elektroforezde koşturulması ile görüntülenmiştir. Aynı miktarda GAPPro# varyantı ve temel plazmid kullanıldığı için, kesme işleminin aynı sürede tamamlandığı kabul edilmiştir. Örnekler ikili kesme tepkimesinden sonra Thermo Scientific Jel Elüsyon Kiti ile jelden alınarak saflaştırılmıştır. Örneklerin derişimi, 10 kat seyreltilmiş örneklerin jel elektroforez görüntüsü kullanılarak tespit edilmiş ve daha sonra ligasyon işlemi bu derişimler göz önüne alınarak yapılmıştır. Ligasyon 1:1 molar oranı kullanılarak yapılmıştır (Tablo 3.22.).

**Tablo 3. 22.** Ligasyon reaksiyon içeriği

Bileşen	Miktar (µL)
10X Ligaz Tamponu	2
Temel Plazmid	12 µL (~3.6 µg)
DNA (GAPPro#)	1.5 µL (~0.5 µg)
T4 DNA Ligaz	1
Su	20 µL'ye tamamlayacak şekilde

Ligasyon reaksiyonu 22°C'de 1 st inkübasyon ile gerçekleştirilmiş ve 65°C'de 10 dk bekletilerek sonlandırılmıştır. Elde edilen ligasyon karışımı *E. coli* TOP10 hücrelerinin transformasyonu için kullanılmıştır. Transformasyon CaCl<sub>2</sub> metodu ile bir kaç modifikasyon yapılarak gerçekleştirilmiştir (Sambrook ve Russell, 2001). 200 µL hücre yerine 50 µL kompetent hücre kullanılmış ve inkübasyon süresi 60 dakikaya uzatılmıştır. Transformasyondan sonra hücreler 25 µg cm<sup>-3</sup> Zeocin içeren LSLB katı ortamına aktarılmış ve 37°C'de 18-20 st inkübe edilmişlerdir. Seçilen koloniler yeni katı ortama aktarılmış ve plazmidleri Thermo Fisher Scientific Plazmid İzolasyon Kiti kullanılarak izole edilmiştir. Her bir olası pGAPPro#::*egfp* plazmidini için 6 koloni plazmid izolasyonu için seçilmiştir. İzole edilen plazmidler agaroz jel elektroforezde görüntülenmiştir. P<sub>AOX1</sub> dizini, yerine yerleştirilen GAPPro# dizinlerinden daha uzun olduğu için, doğru plazmidlerin pPICZα-A::*egfp* plazmidinin önünde görüntülenmesi beklenmiştir. Dolayısıyla, temel plazmidten daha hızlı koşan plazmidler doğru transformant olarak kabul edilmiş ve 2 tanesi seçilerek daha ileri kontrolleri yapılmıştır. Bu ileri kontroller, izole edilen plazmidin tekli ve ikili kesilmesini ve bu plazmidlerin PCR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.18.-3.19.). Bu plazmidlerin ileri kontrollerinin sonuçları agaroz jel elektroforez kullanılarak görüntülenmiştir. Her bir pGAPPro#::*egfp* plazmidini için bir adet koloni seçilmiş ve bu koloniye ait plazmid sekanslanarak doğrulanmıştır (ODTÜ Merkez Laboratuvarı).

### 3.2.6. Tasarlanan P<sub>GAP</sub> Varyantlarını Taşıyan *P. pastoris* Suşlarının Oluşturulması

#### 3.2.6.1. Plazmidlerin Hazırlanması

pGAPPro#::*egfp* plazmidleri kontrol edildikten sonra, plazmidin *P. pastoris* genomuna integrasyonunu kolaylaştırmak için lineer hale getirilmiştir. Lineerizasyon işlemi plazmidlerin uygun restriksiyon enzimi kullanılarak ve ortamdaki DNA miktarına göre 37°C'de 5-6 st inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir. Lineerizasyon tepkimesinin içeriği Tablo 3.23.'te verilmiştir.

**Tablo 3. 23.** Lineerizasyon tepkime içeriği

Bileşen	Amount (µL)
10X Tampon O	40
Plazmid (pGAPPro#:: <i>egfp</i> )	230-249 µL (~10-12 µg)
<i>Bgl</i> I	2.5
Su	400 µL'ye tamamlayacak şekilde

Lineer hale getirilmiş DNA ürünü, Thermo Fisher Scientific PCR Saflaştırma Kiti ile saflaştırılmış; ancak elüsyon aşaması elüsyon tampon ile değil, steril su kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılmış DNA'nın derişimi 20 µL'de 0.5-1 µg olacak şekilde ayarlanmıştır.

#### 3.2.6.2. *Pichia pastoris*'in Transfeksiyonu

*P. pastoris*'in transfeksiyonu elektroporasyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir (Invitrogen, 2010). Elektroporasyon için hücreler öncelikle 28°C'de 5 cm<sup>3</sup> YPD ortamında 170 rpm'de bir gece inkübe edilmiştir. Buradan elde edilen kültür, 200 cm<sup>3</sup> ortama taze YPD ortamına aktarılmıştır. Aktarılan hücrenin miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$V_{inoc}[\mu L] = \frac{OD_m * V_m}{e^{\mu * t}} * \frac{1000}{OD_{pre}}$$

OD<sub>m</sub>: Ana kültürdeki t süre geçtikten sonraki OD<sub>600</sub> miktarı (1.8-3.0 arası olmalı)

V<sub>m</sub>: Ana kültürün hacmi (cm<sup>3</sup>)

t: İnkübasyon süresi (15-20 st arası olmalı)

µ: 0.32 st<sup>-1</sup> (yabani suş için YPD'de 28°C'deki spesifik büyüme hızı)

OD<sub>pre</sub>: Pre-kültürün OD<sub>600</sub> miktarı



Yukarıdaki formül kullanılarak inokülasyon miktarı hesaplandıktan sonra hücreler arzu edilen OD<sub>600</sub>'e miktarına kadar çoğaltılmışlardır. Çoğaltılan hücreler daha sonra 1500 g x 4°C de 5 dk santrifüj edilmişlerdir. Hücreler 2 cm<sup>3</sup> 1 M HEPES (pH 8.0) ve 2.5 cm<sup>3</sup> 1 M DTT içeren 100 cm<sup>3</sup> önceden ısıtılmış YPD'ye aktarılmış ve 15 dakika boyunca 28°C'de 170 rpm'de inkübe edilmişlerdir. Daha sonra hücrelere 200 cm<sup>3</sup> soğuk distile su eklenmiş ve aynı şekilde santrifüj edilmişlerdir. Çöktürülen pellet 250 cm<sup>3</sup> steril 1 mM HEPES tamponunda yıkanmış ve tekrar santrifüj edilmişlerdir. Sonraki aşamada, pellet 50 cm<sup>3</sup> soğuk, steril 1 M sorbitol çözeltisinde resüspanse edilmiş ve tekrar santrifüj edilmişlerdir. Son olarak, çöktürülen hücreler 0.5 cm<sup>3</sup> steril soğuk 1 M sorbitolde resüspanse edilmiş ve 80 µl olarak eppendorflara dağıtılmışlardır. Transformasyona kadar -80°C'de saklanmışlardır.

Kompetent hale getirilen hücreler daha sonra elektroporasyon yöntemiyle transfekte edilmişlerdir (2000 V, 25 µF ve 200 Ω). Transfekte edilen hücreler, 25 µg cm<sup>-3</sup> Zeocin içeren YPD ortamında 30°C'de 48 st inkübe edilmiştir. Her bir varyant için 8 koloni seçilmiş ve bu koloniler promotör kuvveti açısından taranmışlardır.

### 3.2.7. Tek-Kopya *P. pastoris* Suşlarının Seçilmesi

Farklı GAPPro# varyantlarının doğru bir şekilde ifade seviyelerinin karşılaştırılabilmesi için üretilen genin kopya sayısının bilinmesi ve birbirine eşit olması gerekir. Bu amaçla Kantitatif PCR (qPCR) yapılmıştır. qPCR için seçilen metot Mutlak Kuantifikasyon'dur. Bu yöntemde kısaca, genomdaki kopya sayısının 1 olduğu bilinen referans bir genin qPCR sonucunda elde edilen kopya miktarı kullanılarak, hedef genin genomdaki kopya sayısı bulunabilmektedir. Bu amaçla genomda 1 adet kopya taşıdığı bilinen *ARG4* geni seçilmiştir. Hesaplama için aşağıdaki formül kullanılmıştır:

$$\text{Hedef genin kopya sayısı (eGFP)} = \frac{\text{Hedef genin kopya miktarı (eGFP)}}{\text{Referans genin kopya miktarı (ARG4)}}$$

Bu yöntemde hedef genin kopya sayısı, formülde 1-1.4 olarak arasında ise 1 olarak, 1.5-2 arasında ise 2 olarak kabul edilmektedir (Abad vd., 2011). qPCR için kullanılacak olan primerlerin tasarlanması esnasında, çoğaltılan ampikon uzunluğu, GC içeriği, primerin uzunluğu ve erime sıcaklığı gibi parametreler düşünülmelidir (Arya vd., 2005). Bu parametreler düşünülerek, uygun primerler PrimerBlast (NCBI) ile tasarlanmıştır (Tablo 3.24.).

**Tablo 3. 24.** eGFP'nin kopya sayısının bulunması için tasarlanan qPCR primerleri

Primer	Dizin (5'-3')	Erime Sıcaklığı (°C)	Çoğaltılan Amplikon Uzunluğu (bp)
egfp-qPCR-İleri	GGACGACGGCAACTACAAGA	59.4	185
egfp-qPCR-Geri	CCTTGATGCCGTTCTTCTGC	59.4	185
ARG4-İleri	TCCATTGACTCCCGTTTTGAG	57.9	84
ARG4-Geri	TCCTCCGGTGGCAGTTCTT	58.8	84

qPCR koşullarının belirlenmesinde Abad vd. (2011) makalesindeki parametrelerden yararlanılmıştır. Ön-denemeler sonucunda optimum primer derişimi olarak 200 nM ve optimum genomik DNA derişimi olarak 8 ng bulunmuştur. qPCR için işletim koşulları Tablo 3.25.'te ve tepkime içeriği Tablo 3.26.'da verilmiştir. Tüm deneylerde örnekler 3 tekrarlı olacak şekilde hazırlanmıştır.

**Tablo 3. 25.** qPCR işletim koşulları

Döngü sayısı	Sıcaklık	Süre
1 döngü	95°C	10 dk
30 döngü	95°C	15 sn
	60°C	1 dk
Erime noktası analizi	50-99°C	5 sn-1°C aralıklarla

**Tablo 3. 26.** qPCR tepkime içeriği

Bileşen	Stok Derişimi	Final Derişimi
SYBR Green Karışımı	2X	1X
İleri Primer	5 µM	200 nM
Geri Primer	5 µM	200 nM
DNA	4 ng/µL	8 ng (Toplam)
Su	--	20 µL olacak şekilde

### 3.3. Geliştirilen P<sub>GAP</sub> Kütüphanesinin Taranması

P<sub>GAP</sub>, glikolizde yer alan konstitütif bir promotör olması yanında, farklı karbon kaynakları varlığında farklı ekspresyon seviyelerine erişebilmektedir (Weinhandl vd., 2014, Waterham vd., 1997). Özellikle glikoz ve gliserol varlığında erişilen ekspresyon seviyesi artmaktadır. Dolayısıyla, tasarlanan sentetik P<sub>GAP</sub> promotör kütüphanesi farklı karbon kaynakları

varlığında denenmesine karar verilmiştir. Bu bağlamda, *P. pastoris* metanolü metabolize edebilen bir maya hücresi olduğu için, tasarlanan promotörlerin ekspresyon gücünün metabol indüklemesine yanıtı da araştırılmıştır. Bunun yanı sıra, glikoliz, hücrenin çoğalması ve  $P_{GAP}$  kontrolünde üretilen rekombinant proteinin miktarı birbirine bağlı olduğundan, farklı hızlarda hücre çoğalmasını sağlayacak kısıtlı miktarda glikoz içeren üretim ortamı da tarama koşullarına dahil edilmiştir.

### 3.3.1. Tarama Koşulları

Farklı promotör varyantları tarafından üretilen hücre-içi YFP proteininin miktarının belirlenmesi için 24-kuyulu petri kâğıtları kullanılmıştır. Her bir varyant temsilen rastgele 6-8 klon seçilmiştir. Klonlar önce 2 cm<sup>3</sup> YP (Tablo 3.27.) ve 25 µg cm<sup>-3</sup> Zeocin içeren ön-kültür ortamında 24-26 st boyunca 25°C'de 280 rpm'de inkübe edilmişlerdir. Ön-kültürden alınan hücreler daha sonra belli bir başlangıç OD<sub>600</sub> olacak şekilde farklı karbon kaynakları içeren üretim ortamına aktarılmıştır. Bu tarama koşulları aşırı glikoz, aşırı gliserol, kısıtlı glikoz ve metanol indüklemesidir. Üretim ortamının içeriği ve tarama koşulları sırasıyla Tablo 3.28. ve 3.29.'da verilmiştir. Tablo 3.28.'te verilen üretim ortamında karbon kaynağı bulunmamaktadır. Tasarlanan ortama göre karbon kaynağı, final derişimleri Tablo 3.28.'deki gibi olacak şekilde eklenmiştir. Kısıtlı glikoz için kullanılan 6 mm çapındaki glikoz disklerin glikoz salınım profile Şekil 3.6.'da verilmiştir.

**Tablo 3. 27.** Ön-kültür ortamı kompozisyonu

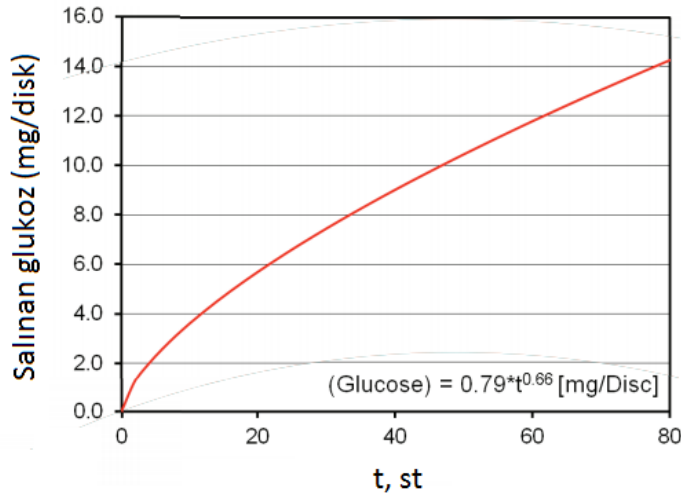
Bileşen	Derişim (g dm <sup>-3</sup> )
Maya özütü	20
Pepton	10

**Tablo 3. 28.** Üretim ortamı kompozisyonu

Bileşen	Derişim (g dm <sup>-3</sup> )
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.15
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0.49
KCl	0.8
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	0.0268
Sitrik asit monohidrat	22
PTM1	1.47 cm <sup>3</sup>
Biyotin	2 cm <sup>3</sup>

**Tablo 3. 29.** Promotör kütüphanesinin tarandığı koşullar

Üretim Koşulu	Karbon Kaynağı ve Derişimi	Başlangıç OD <sub>600</sub>
Glikoz	20 g dm <sup>-3</sup> glikoz	0.1
Gliserol	20 g dm <sup>-3</sup> gliserol	0.1
Kısıtlı Glikoz	1 adet 6 mm glikoz diski (Kuhner, CH)	1.0
Metanol	t = 0 st'te %0.5 metanol indüklemesi, t = 16 st'te %1 metanol indüklemesi	1.0



**Şekil 3. 6.** Kısıtlı glikoz ortamı için kullanılan disklerin salınım profili (Kuhner, CH)

Hücreler, 20 st boyunca 25°C'de 280 rpm'de inkübe edilmişler ve t = 20 st'te kültürlerden örnek alınmıştır. Alınan hücreler final OD<sub>600</sub> 0.4 olacak şekilde 1 M soğuk PBS içinde seyreltilip ve YFP ölçümü yapılmıştır. YFP ölçümü için flow sitometri kullanılmıştır. Flow sitometri için kullanılan metot Stadlmayr vd. (2010) adapte edilmiştir. Yabancı tip *P. pastoris* CBS7435 hücresinden gelen arka-plan sinyali, hücre popülasyonunun geometrik ortalamasından çıkarılmıştır. Relatif YFP ekspresyonu, modifiye edilmemiş P<sub>GAP</sub> kontrolünde üretilen YFP seviyesine göre hesaplanmıştır.

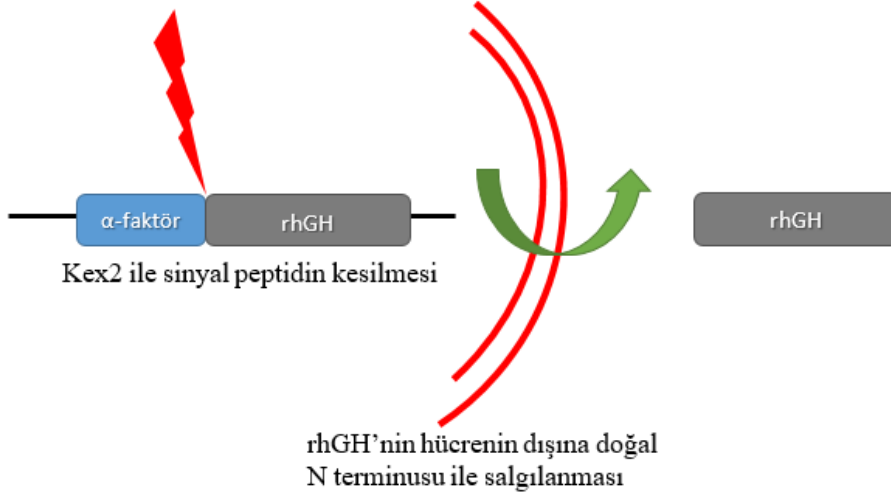
### 3.4. rhGH Üretimi için Promotör Varyantlarının Seçimi

Farklı üretim ortamlarında ekspresyon kuvvetleri taranan promotör varyantlarından en fazla yeşil floresan protein (YFP) üretim kapasitesine sahip olan iki promotör, Pro9 ve Pro10, rekombinant insan büyüme hormonu (rhGH) üretim kapasitesinin araştırılması için seçilmiştir.

### 3.4.1. pGAPPro#::hGH Plazmidlerinin Oluşturulması ve *E. coli* Transformasyonu

#### 3.4.1.1. $\alpha$ -faktör-rhGH DNA Fragmentinin Oluşturulması

Pro9 veya Pro10 kontrolü altında üretilecek olan  $\alpha$ -faktör-rhGH DNA fragmenti, ürün hücre dışına salgılandığında doğal N terminus içerecek şekilde tasarlanmıştır (Şekil 3.7.).

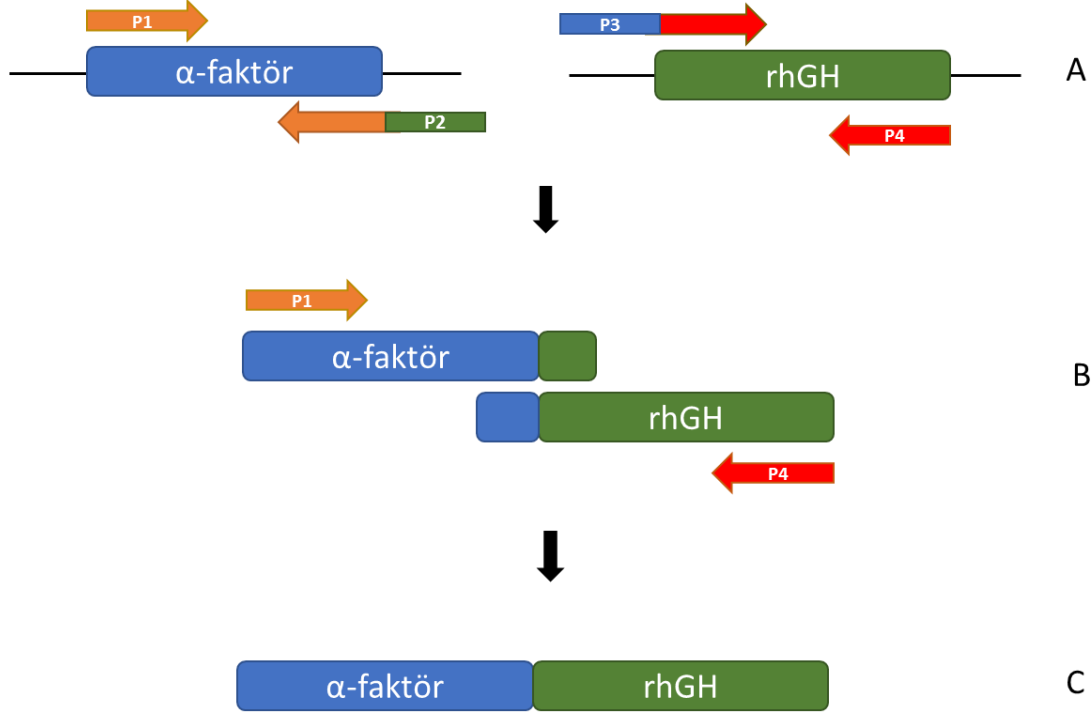


**Şekil 3. 7.** rhGH'nin Kex2 ile kesilerek hücre dışına çıkarılması

$\alpha$ -faktör-rhGH DNA fragmentinin oluşturulması için füzyon polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniği kullanılmıştır (Şekil 3.8.). Bu amaçla kullanılan primerler Tablo 3.30.'da verilmiştir. Bu yöntemde P2 ve P3 primerlerinin 5' uçlarında diğer DNA fragmenti ile üst üste gelen kısımlar bulunmaktadır. Bu şekilde ilk PCR sonucunda elde edilen fragmentler, diğer fragmente ait çakışan dizinler taşıyacak şekilde elde edilmiş olur. İkinci PCR yapılırken, ilk PCR'da elde edilen fragmentlerin ikisi de tepkime çözeltisine konularak kalıp şeklinde kullanılır ve P1-P4 primerleri vasıtasıyla çoğaltılır. Birinci ve ikinci PCR tepkime içerikleri ve işletim koşulları Tablo 3.31. ve Tablo 3.32.'de verilmiştir.

**Tablo 3. 30.**  $\alpha$ -faktör-rhGH DNA fragmentinin oluşturulmasında kullanılan primerler

Primerin Adı	Primerin Dizini (5'-3')	Hedefi
P1- $\alpha$ factor-F	CTTCGAAACGGAATTCATGAGATTTCCCTCAATTTTTACTGC	$\alpha$ -faktör
P2- $\alpha$ factor-R	GATAGTGGTATAGTTGGGAAAGCTTCAGCCTCTCTTTTCT	$\alpha$ -faktör
P3-hgh-F	CGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTTTCCCAACTATAACCACTATCTC	rhGH
P4-hgh-R	ATGGTACCCTAGAAGCCACAGCTGCCC	rhGH



**Şekil 3. 8.** Füzyon PCR yöntemiyle  $\alpha$ -faktör-rhGH fragmentinin oluşturulması. A: P1-P2 ve P3-P4 primerleri ile  $\alpha$ -faktör ve rhGH genlerinin ayrı ayrı çoğaltılması. B: A kısmında elde edilen DNA fragmentlerinin ikinci PCR ile birleştirilmesi. C: İkinci PCR sonunda elde edilen ürün

**Tablo 3. 31.**  $\alpha$ -faktör ve rhGH genlerinin çoğaltılması için kullanılan PCR tepkime içeriği

Bileşen	Miktar (uL) (1. PCR)	Miktar (uL) 2.PCR
q5 PCR Tamponu (5X)	4	4
dNTP (2 mM)	2	2
Kalıp (100-400 ng/uL)	1	0.5 uL $\alpha$ -faktör, 0.5 uL rhGH
q5 Polimeraz (2U/uL)	0.2	0.2
Su	20 uL'ye tamamlayacak şekilde	20 uL'ye tamamlayacak şekilde
İleri Primer (10 uM)	1	1
Geri Primer (10 uM)	1	1

**Tablo 3. 32.**  $\alpha$ -faktör ve rhGH genlerinin çoğaltılması için kullanılan PCR işletim koşulları

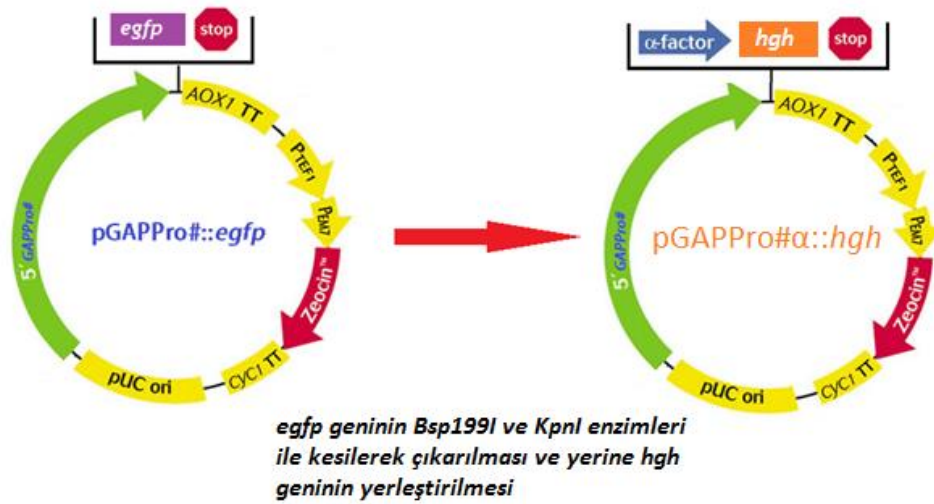
Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç denatürasyonu	98	1 dk	1
Denatürasyon	98	10 sn	
Bağlanma	70	30 sn	30
Uzama	72	30 sn	
Son uzama	72	2 dk	1

### 3.4.1.2. pGAPZ $\alpha$ ::hGH ve pGAPPro#::hGH Plazmidlerinin Oluşturulması

Farklı P<sub>GAP</sub> varyantlarını taşıyacak olan pGAPPro#::hGH plazmidlerinin oluşturulması için tasarlanan pGAPZ::egfp ve pGAPPro#::egfp plazmidleri kullanılmıştır (Şekil 3.9.). Bu amaçla öncelikle *Bsp119I* ve *KpnI* enzimleri kullanılarak *egfp* geninin uzaklaştırılmıştır. İkili kesme reaksiyonu 37°C'de 2 st süresince gerçekleştirilmiştir ve tepkime bileşimi Tablo 3.33.'te verilmiştir. Reaksiyon ısı inaktivasyonu ile 65°C'de 20 dk inkübasyon ile sonlandırılmıştır.

**Tablo 3. 33.** İkili kesme koşulları

Bileşen	Miktar ( $\mu$ L)
10X Tango Tamponu	5
<i>Bsp119I</i> (10 U/ $\mu$ L)	2
<i>KpnI</i> (10 U/ $\mu$ L)	2
DNA (Plazmid ya da $\alpha$ -faktör-rhGH DNA fragmenti)	10-50 (~2 $\mu$ g)
Su	50 $\mu$ L'ye tamamlayacak şekilde



**Şekil 3. 9.** *Bsp119I* ve *KpnI* enzimleri ile kesilerek *egfp* geninin uzaklaştırılması ve yerine  $\alpha$ -faktör taşıyan *hGH* geninin yerleştirilmesi

$\alpha$ -faktör-rhGH DNA fragmentinin kesildikten sonraki görüntüsü, sadece bir kaç baz çifti kesildiği için farklı bir şekilde görüntülenememiştir. Ancak plazmidlerin tamamen kesildiği, 1  $\mu$ L örneğin agaroz jel elektroforezde koşturulması ile görüntülenmiştir. Aynı miktarda plazmid ve DNA fragmenti kullanıldığı için, kesme işleminin aynı sürede tamamlandığı kabul edilmiştir. Örnekler ikili kesme tepkimesinden sonra Thermo Scientific Jel Elüsyon Kiti ile jelden alınarak saflaştırılmıştır. Örneklerin derişimi, 10 kat seyreltilmiş örneklerin jel elektroforez görüntüsü kullanılarak tespit edilmiş ve daha sonra ligasyon işlemi bu derişimler göz önüne alınarak yapılmıştır. Ligasyon 3:1 molar oranı kullanılarak yapılmıştır (Tablo 3.34.). Ligasyon reaksiyonu 22°C'de 1 st inkübasyon ile gerçekleştirilmiş ve 65°C'de 10 dk bekletilerek sonlandırılmıştır.

**Tablo 3. 34.** Ligasyon reaksiyon içeriği

Bileşen	Miktar ( $\mu$ L)
10X Ligaz Tamponu	2
Plazmid	5 (~100 ng)
$\alpha$ -faktör-rhGH DNA fragmenti	5 (~100 ng)
T4 DNA Ligaz	1
Su	20 $\mu$ L'ye tamamlayacak şekilde

#### 3.4.1.3. pGAPZ $\alpha$ ::hGH ve pGAPPro#::hGH Plazmidlerinin *E. coli*'ye Transformasyonu

Elde edilen ligasyon karışımı *E. coli* TOP10 hücrelerinin transformasyonu için kullanılmıştır. Transformasyon CaCl<sub>2</sub> metodu ile bir kaç modifikasyon yapılarak gerçekleştirilmiştir (Sambrook ve Russell, 2001). 200  $\mu$ L hücre yerine 50  $\mu$ L kompetent hücre kullanılmış ve inkübasyon süresi 60 dakikaya uzatılmıştır. Transformasyondan sonra hücreler 25  $\mu$ g cm<sup>-3</sup> Zeocin içeren LB katı ortamına aktarılmış ve 37°C'de 18-20 st inkübe edilmişlerdir. Seçilen koloniler yeni katı ortama aktarılmış ve plazmidleri Thermo Fisher Scientific Plazmid İzolasyon Kiti kullanılarak izole edilmiştir. Her bir olası pGAPPro#::hGH plazmidini için 6 koloni plazmid izolasyonu için seçilmiştir. İzole edilen plazmidler agaroz jel elektroforezde görüntülenmiştir.  $\alpha$ -faktör-rhGH DNA fragmenti, yerine yerleştirilen *egfp* gen dizininden 168 bp daha uzun olduğu için, doğru plazmidlerin negative kontrol plazmidini (pGAPPro#::*egfp*) plazmidinin arkasında görüntülenmesi beklenmiştir. Dolayısıyla, temel plazmidten daha yavaş koşan plazmidler doğru transformant olarak kabul edilmiş ve 3 tanesi seçilerek daha ileri kontrolleri yapılmıştır. Bu ileri kontroller, izole edilen plazmidin hem yerleştirilen  $\alpha$ -faktör-rhGH DNA fragmentini hem de plazmidini kesen *Bgl*I enzimi ile kesilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Kesme koşulları Tablo 3.35.'te verilmiştir. Bu plazmidlerin ileri kontrollerinin sonuçları agaroz jel elektroforez kullanılarak görüntülenmiştir. Beklendiği gibi,



*Bgl*I negative kontrol olan plazmidleri tek bir bölgeden kesitği için tek bant elde edilirken, olası pozitif pGAPPro# $\alpha$ ::*hGH* plazmidini iki noktadan keserek iki bant görülmesine sebep olmuştur. Her bir pGAPPro#:::*hGH* plazmidini için iki adet koloni seçilmiş ve bu koloniye ait plazmidler sekanslanarak doğrulanmıştır (ODTÜ Merkez Laboratuvarı). Doğru sekansa sahip olan plazmidleri taşıyan *E. coli* hücrelerinin gliserol stoğu yapılarak daha sonra deneylerde kullanılmak üzere -80°C'de saklanmıştır.

**Tablo 3. 35.** İleri kontrol için gerçekleştirilen ikili kesme koşulları

Bileşen	Miktar ( $\mu$ L)
Tampon O	5
<i>Bgl</i> I (10 U/ $\mu$ L)	2
Kontrol edilen plazmidler	5 (~1 $\mu$ g)
Su	20 $\mu$ L'ye tamamlayacak şekilde

### 3.4.2. pGAPZ $\alpha$ :::*hGH* ve pGAPPro#:::*hGH* Plazmidlerinin *P. pastoris*'e Transformasyonu

#### 3.4.2.1. Plazmidlerin Hazırlanması

pGAPPro#:::*hGH* plazmidleri kontrol edildikten sonra, plazmidin *P. pastoris* genomuna integrasyonunu kolaylaştırmak için lineer hale getirilmiştir. Lineerizasyon işlemi plazmidlerin uygun restriksiyon enzimi kullanılarak ve ortamdaki DNA miktarına göre 37°C'de 1-2 st inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir. Lineerizasyon tepkimesinin içeriği Tablo 3.36.'da verilmiştir.

**Tablo 3. 36.** Lineerizasyon tepkime içeriği

Bileşen	Miktar ( $\mu$ L)
10X Tampon <i>Bam</i> HI	40
Plazmid (pGAPPro#::: <i>hGH</i> )	~1 $\mu$ g
<i>Bam</i> HI	2.5
Su	50 $\mu$ L'ye tamamlayacak şekilde

Lineer hale getirilmiş DNA ürünü, Thermo Fisher Scientific PCR Saflaştırma Kiti ile saflaştırılmış; ancak elüsyon aşaması elüsyon tampon ile değil, steril su kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

### 3.4.2.2. *Pichia pastoris*'in Transformasyonu

*P. pastoris*'in transformasyonu LiCl yöntemi ile gerçekleştirilmiştir (Invitrogen, 2010). Bunun için hücreler öncelikle 28°C'de 5 cm<sup>3</sup> YPD ortamında 170 rpm'de bir gece inkübe edilmiştir. Buradan elde edilen kültür, 200 cm<sup>3</sup> ortama taze YPD ortamına aktarılmıştır. Aktarılan hücrenin miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$V_{inoc}[\mu L] = \frac{OD_m * V_m}{e^{\mu * t}} * \frac{1000}{OD_{pre}}$$

OD<sub>m</sub>: Ana kültürdeki t süre geçtikten sonraki OD<sub>600</sub> miktarı (1.8-3.0 arası olmalı)

V<sub>m</sub>: Ana kültürün hacmi (cm<sup>3</sup>)

t: İnkübasyon süresi (15-20 st arası olmalı)

μ: 0.32 st<sup>-1</sup> (yabani suş için YPD'de 28°C'deki spesifik çoğalma hızı)

OD<sub>pre</sub>: Ön-kültürün OD<sub>600</sub> miktarı

Yukarıdaki formül kullanılarak inokülasyon miktarı hesaplandıktan sonra hücreler arzu edilen 0.8-1.0 OD<sub>600</sub>'e kadar çoğaltılmışlardır. Çoğaltılan hücreler daha sonra 1500 g x 4°C de 10 dk santrifüj edilmişlerdir. Çöktürülen hücreler 25 cm<sup>3</sup> saf su ile yıkandıktan sonra yeniden santrifüj edilerek 1 cm<sup>3</sup> 100 mM LiCl'de resüspanse edilmiştir. Maksimum hızda 15 saniye boyunca çöktürülen hücreler 400 μL 100 mM LiCl'de resüspanse edilmiştir. Her bir transformasyon için 50 μL kompetent hücre kullanılmıştır. Ayrılan 50 μL kompetent hücre maksimum hızda 15 saniye boyunca çöktürüldükten sonra üzerine 240 μL %50 PEG (3350), 36 μL 1 M LiCl, 25 μL 2 mM tek iplikli salmon sperm DNA ve 50 μL hacimde olacak şekilde yaklaşık 0.5-1 μg DNA eklenmiştir. Çözününe kadar vortekslenen karışım önce 30°C'de 30 dakika boyunca inkübe edilmiş, daha sonra 42°C'de 25 dakika boyunca ısı şokuna maruz bırakılmıştır. Bu aşamadan sonra 6000-8000 rpm'de 15 saniye boyuca çöktürülen hücreler, 1 cm<sup>3</sup> taze YPD ortamında resüspanse edilerek 3-4 saat boyunca 30°C'de çalkalanarak inkübe edilmiştir. Transforme edilen hücreler, 25 μg cm<sup>-3</sup> Zeocin içeren YPD ortamında 30°C'de 48-60 st inkübe edilmiştir. Her bir varyant için 6-8 koloni seçilmiş ve bu koloniler rhGH üretim performansı açısından taranmışlardır.

### 3.4.3. pGAPZαA::hGH ve pGAPPro#::hGH Taşıyan r-*P. pastoris*'in rhGH Üretim Performansının Araştırılması

$P_{GAP}$ , glikolizde yer alan konstitütif bir promotör olması yanında, farklı karbon kaynakları varlığında farklı ekspresyon seviyelerine erişebilmektedir (Weinhandl vd., 2014, Waterham vd., 1997). Özellikle glikoz varlığında erişilen ekspresyon seviyesi artmaktadır. Dolayısıyla rhGH üretim kapasitesinin araştırılması için karbon kaynağı olarak glikoz kullanılmasına karar verilmiştir. Ayrıca, standart olarak kullanılan glikoz temelli bir besleme stratejisinde glikoz genellikle kısıtlı koşullarda beslendiği için kısıtlı glikoz koşullarının da tarama sürecine eklenmesi uygun görülmüştür.

#### 3.4.3.1. pGAPZαA::hGH ve pGAPPro#::hGH Taşıyan r-*P. pastoris*'in rhGH Üretim İçin Üretim Ortamı Koşullarının Belirlenmesi

Seçilen promotör varyantlarının rhGH üretim kapasitesinin araştırılması için iki farklı üretim ortamı denenmiştir. Farklı promotör varyantları tarafından üretilen hücre-dışı rhGH proteininin miktarının belirlenmesi için 24-kuyulu petriyeler kullanılmıştır. Her bir varyant temsilen rastgele 6-8 klon seçilmiştir. Klonlar önce 2 cm<sup>3</sup> YP (Tablo 3.37.) ve 25 µg cm<sup>-3</sup> Zeocin içeren ön-kültür ortamında 24-26 st boyunca 25°C'de 280 rpm'de inkübe edilmişlerdir. Ön-kültürden alınan hücreler daha sonra belli bir başlangıç OD<sub>600</sub>'ü olacak şekilde farklı üretim ortamlarına aktarılmıştır. Aktarılan üretim ortamlarının bileşenleri Tablo 3.38. ve 3.39.'da verilmiştir. Kısıtlı glikoz için kullanılan 12 mm çapındaki glikoz disklerin glikoz salınım profili Şekil 3.10.'da verilmiştir. Üretim koşulları Tablo 3.40.'ta gösterilmiştir. Üretim koşullarının belirlenmesi için yapılan deneylerde, karşılaştırma amaçlı, sadece pGAPWT::α-hGH plazmidini taşıyan r-*P. pastoris* suşu kullanılmıştır.

**Tablo 3. 37.** Rekombinant *P. pastoris* için ön-sıvı çoğalma ortamı

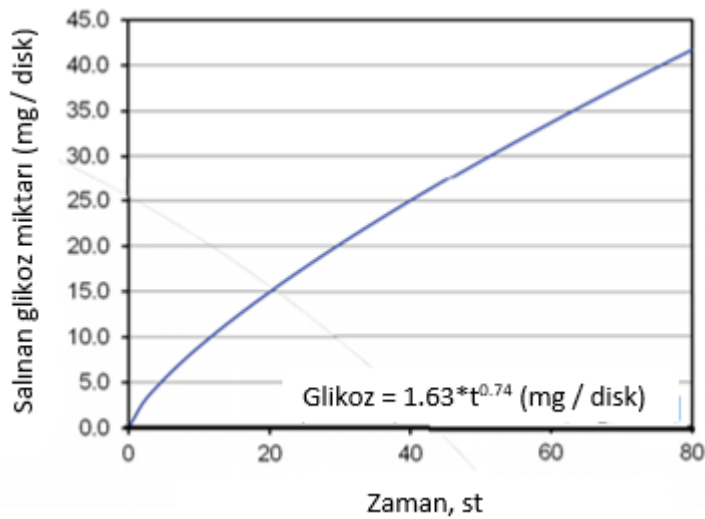
Bileşen	Derişim (g dm <sup>-3</sup> )
Maya özütü	20
Pepton	10

**Tablo 3. 38.** Rekombinant *P. pastoris* biyoreaktör üretim ortamı-1

Bileşen	Derişim (g dm <sup>-3</sup> )
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.15
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0.49
KCl	0.8
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	0.0268
Sitrik asit monohidrat	22
PTM1	1.47 cm <sup>3</sup>
Biyotin	2 cm <sup>3</sup>

**Tablo 3. 39.** Rekombinant *P. pastoris* biyoreaktör üretim ortamı-2

Bileşen	Derişim (g dm <sup>-3</sup> )
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6.3
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0.49
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.8
KCl	2.64
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	0.0535
Sitrik asit monohidrat	22
PTM1	1.47 cm <sup>3</sup>
Biyotin	2 cm <sup>3</sup>
NH <sub>4</sub> OH (%25)	20 cm <sup>3</sup>



**Şekil 3. 10.** Kısıtlı glikoz ortamı için kullanılan disklerin salınım profili

**Tablo 3. 40.** Seçilen promotörlerin rhGH üretim kapasitesinin tarandığı koşullar

Üretim Koşulu	Üretim Ortamı	Karbon Kaynağı ve Derişimi	Başlangıç OD <sub>600</sub>
Glikoz	1	20 g dm <sup>-3</sup> glikoz	2
Kısıtlı Glikoz	1	1 adet 12 mm glikoz diski (Kuhner, CH), günde iki kez 50 µL glikoz (Stok derişimi 200 g dm <sup>-3</sup> ) enjeksiyonu	7.5
Glikoz	2	20 g dm <sup>-3</sup> glikoz	2
Kısıtlı Glikoz	2	1 adet 12 mm glikoz diski (Kuhner, CH), günde iki kez 50 µL glikoz (Stok derişimi 200 g dm <sup>-3</sup> ) enjeksiyonu	7.5

Hücreler, 48 st boyunca 25°C'de 280 rpm'de inkübe edilmişler ve t = 48 st'te kültürlerden örnek alınmıştır. Alınan hücreler 1500 g'de 5 dakika boyunca santrifüje dildikten sonra süpernatantları rhGH üretimini hesaplamak için kullanılmış, pellet ise yaş hücre ağırlık ölçümü için kullanılmıştır. Elde edilen süpernatantlarda bulunan rhGH miktarı SDS-PAGE ile belirlenmiştir. rhGH derişimi, Coomassie Brilliant Blue (PageBlue Protein Staining Solution, ThermoFisher) ile boyanan jellerin ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) ile analizi yapılarak belirlenmiştir. Relatif rhGH üretimi, modifiye edilmemiş P<sub>GAP</sub> kontrolünde üretilen rhGH seviyesine göre hesaplanmıştır. Klon başına üretilen rhGH miktarı, birim hücre (g dm<sup>-3</sup>) derişimine bölünerek hesaplanmıştır.

### 3.5. Yarı-kesikli Biyoreaktörde hGH Üretimi

Rekombinant hGH üretimi 7 dm<sup>3</sup> (Sartorius BIOSTAT® C-plus, Germany) hacimli, 1.6 dm<sup>3</sup> minimum çalışma kapasiteli, sıcaklık, pH, köpük, karıştırma hızı, besleme hızı ve oksijen aktarım koşullarının kontrol edildiği biyoreaktörlerde gerçekleştirilmiştir. Biyoreaktör sisteminde soğutucu, elektrikli ısıtıcı, sterilizasyon ve sıcaklığın sabit tutulması amacıyla kullanılan ceket bulunmaktadır. Biyoreaktörde karıştırma altı bıçaklı bir karıştırıcı, dört baffle ve havanın homojen karışmasını sağlayan sparger aracılığıyla sağlanmıştır. Reaktörde bulunan PID kontrol ünitesi sayesinde hava giriş hızı, karıştırma hızı ve sürekli besleme hızı kontrol edilmiştir. Sisteme hava kompresör (Larfon Top Silent 1.5, Italy) yardımıyla beslenmiştir. Oksijen derişimini sabit tutmak için gaz akış hızını, karıştırma hızını veya beslenen saf oksijen miktarını kontrol eden bir kaskat sistemi kullanılmıştır. Substrat çözeltileri steril koşullar altında peristaltik pompalar aracılığıyla sisteme beslenmiştir.

Yarı-kesikli biyoreaktör üretimi P<sub>GAP</sub> ve Pro9 suşlarının hGH üretim kapasitelerinin araştırılması için 2 kademeli olarak tasarlanmıştır: i) kesikli faz, ii) yarı kesikli faz. İlk fazda, karbon kaynağı olarak, hücrelerin OD<sub>600</sub> = 80-85 (C<sub>x</sub> ~20 g dm<sup>-3</sup>, t<sub>T</sub> = 21 st) ulaşmasını

sağlayacak kadar gliserol kullanılmıştır. İkinci fazda ise, karbon kaynağı glikoz ile değiştirilmiş ve önceden belirlenmiş eksponensiyal besleme hızına göre besleme yapılmıştır:

$$Q_0 = \frac{\mu V_0 C_{X_0}}{Y_{X/S} C_G^0} e^{\mu t}$$

Burada  $Q_0$  volümetrik hız ( $\text{dm}^3 / \text{st}$ ),  $\mu_0$  önceden belirlenmiş özgül çoğalma hızı ( $\text{st}^{-1}$ ),  $V_0$  başlangıç hacmi ( $\text{dm}^3$ ),  $C_{X_0}$  ( $\text{g dm}^{-3}$ ) başlangıç hücre derişimi,  $Y_{X/S}$  ( $\text{g/g}$ ) substrat üzerindeki hücre verimi,  $C_G^0$  besleme çözeltisindeki glikoz derişimidir ( $\text{g dm}^{-3}$ ). İkinci fazdaki parametreler şu şekildedir:  $\mu_0 = 0.1 \text{ st}^{-1}$ ,  $V_0 = 1.9 \text{ dm}^3$ ,  $C_{X_0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$ ,  $Y_{X/S} = 0.48 \text{ g/g}$ ,  $C_G^0 = 500 \text{ g dm}^{-3}$ .

Üretim süresince sıcaklık  $30^\circ\text{C}$ 'de, pH 5.0'te (%25 amonyum çözeltisi kullanılarak) tutulmuştur. Kesikli fazda, çözülmüş oksijen derişimi %20'ye ayarlanmış ve  $N = 600 \text{ rpm}$  ve  $Q_0/V = 1 \text{ vvm}$  ile başlayarak giderek artan volümetrik hızlarla kontrol edilmiştir.  $t = 21 \text{ st}$ 'ten sonra, yarı-kesikli faza geçilmiş ve  $t = 0 \text{ st}$  olarak alınmıştır. Yarı-kesikli fazda, çözülmüş oksijen derişimi Güneş ve Çalık (2016) makalesinde araştırıldığı üzere  $\text{DO} = \%15$  olarak tutulmuştur. Sisteme beslenen hava, gerektiğinde en fazla  $Q_0/V = 2 \text{ vvm}$  olacak şekilde oksijen ile zenginleştirilmiştir. Fazla köpük %10 anti-köpük çözeltisi (Y-30 Solution, Sigma) eklenerek uzaklaştırılmıştır.

Gliserol stoktan alınan hücreler -eğer gerekiyorsa-  $25 \mu\text{g cm}^{-3}$  Zeocin içeren YPD'ye aktarıldıktan sonra 2 gün  $30^\circ\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir. Buradan alınan hücreler BMGY (Tablo 3.41.) içeren ortama başlangıç  $\text{OD}_{600} \sim 0.2$  olacak şekilde aktarılmış ve  $30^\circ\text{C}$ 'de  $200 \text{ rpm}$ 'de 15-18 st boyunca inkübe edilmiştir. Hücreler steril distile suyla iki kez yıkandıktan sonra, çöktürülen hücreler ( $2000 \text{ g}$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 2-3 dk) homojen bir fazda biyoreaktöre aktarılabilmesi için YP ortamına transfer edilmiştir. Burada 6 st boyunca  $200 \text{ rpm}$ 'de  $30^\circ\text{C}$ 'de inkübe edilmiş ve son aşamada biyoreaktör ortamı olan BSM'ye (Tablo 3.42.-43.) başlangıç  $\text{OD}_{600} = 2$  olacak şekilde aktarılmıştır.

**Tablo 3. 41.** BMGY Kompozisyonu

<b>Bileşen</b>	<b>Derişim (g dm<sup>-3</sup>)</b>
Maya Özüü	10
Pepton	20
Potasyum fosfat tampon çözeltisi (pH=6.0)	0.1 M
Maya Nitrojen Baz (YNB) (amino asitsiz)	13.4
Amonyum Sülfat	10
Biyotin	4 x 10 <sup>-5</sup>
Gliserol	10
Kloramfenikol	0.034

**Tablo 3. 42.** BSM Kompozisyonu

<b>Bileşen</b>	<b>Derişim (g dm<sup>-3</sup>)</b>
%85 H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	26.7 cm <sup>3</sup>
CaSO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1.17
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	14.9
KOH	4.13
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	18.2
Gliserol	40
Köpük önleyici (%10)	1
PTM1	4.35 cm <sup>3</sup>
Kloramfenikol	0.034

**Tablo 3. 43.** Eser Tuz Çözeltisi (PTM1) Kompozisyonu

<b>Bileşen</b>	<b>Derişim (g dm<sup>-3</sup>)</b>
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	6
Nal	0.08
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	3
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.2
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.02
ZnCl <sub>2</sub>	20
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	65
CoCl <sub>2</sub>	0.5
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5
Biyotin	0.2

### 3.6. Analizler

#### 3.6.1. Hücre Derişimi

Kuru ve yaş hücre derişimleri  $OD_{600}$ 'de yapılan ölçümleri kullanılarak hazırlanan kalibrasyon eğrisi yardımıyla hesaplanmıştır. Kuru hücre ağırlığı için, logaritmik fazda örnek alınan hücreler distile suyla yıkanmış, ve ağırlığı daha önceden tartılmış beherlerde  $100^{\circ}\text{C}$ 'de 24 st inkübe edilmiştir. Yaş hücre ağırlığı içinse, hücreler santrifüj edildikten sonra daha önceden tartılmış falkon tüplerinde tartılmışlardır.

#### 3.6.2. eGFP Üretimi

eGFP üretiminin ölçümü için flow sitometre (Gallios™, Beckman Coulter) kullanılmıştır (Stadlmayr vd., 2010). Yabani tip *P. pastoris* CBS7435'ten gelen arkaplan floresan sinyali tüm popülasyonun geometrik ortalamasından çıkarılmış ve eGFP ekspresyon seviyesi modifiye edilmemiş  $P_{GAP}$  altında üretilen eGFP sinyaline göre relative olarak hesaplanmıştır. Her ölçüm için, toplam 10000 hücre göz önüne alınmıştır. eGFP ölçümünde suşlar arası farklılık Student's t-testi ile istatistik olarak hesaplanmıştır.

#### 3.6.3. rhGH Üretimi

rhGH derişimi SDS-PAGE ve Coomassie R250 kullanılarak hesaplanmıştır. Kullanılan çözelti derişimleri Tablo 3.44.'te verilmiştir. rhGH derişiminin belirlenmesi için 13 uL süpernatant 5 uL boya ile (4X) karıştırılmış ve indirgeyici madde olarak 2 uL DTT eklenmiştir. Daha sonra örnekler  $95^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dakika boyunca inkübe edilmiş ve buz üstünde 5 dakika bekletilmiştir. Örnekler ve protein marker poliakrilamit jele yüklenerek 200 V'ta yaklaşık 40-50 dakika boyunca koşturulmuştur. Jelin fikse etme solüsyonunda 1 saat inkübasyonundan sonra, boyamaya geçilmiş ve 1 saat boyunca boyama çözeltisinde inkübe edilmiştir. Son olarak, jel, destain çözeltisi 1'e alınarak arkaplan rengi açılana kadar inkübe edilmiştir. Görüntüleme yapılacak olan jel, destain çözeltisi 2'ye alınarak, üretilen rhGH derişimi ImageJ (Schneider vd., 2012) ile hesaplanmış ve modifiye edilmemiş  $P_{GAP}$  promotörü altında üretilen rhGH'ye relatif olarak hesaplanmıştır. Mutlak derişimin hesaplanması gerektiği durumlarda derişimi bilinen rhGH çözeltisi standard olarak koşturulmuştur. rhGH ölçümünde suşlar arası farklılık Student's t-testi ile istatistik olarak hesaplanmıştır.



**Tablo 3. 44.** Coomassie Boyama Çözeltileri

<b>Fiksasyon Çözeltisi (500 cm<sup>3</sup>)</b>	
%25 glutaraldehid	4 cm <sup>3</sup>
Etanol	150 cm <sup>3</sup>
Sodyum asetat trihidrat	13.61
Distile Su	500 cm <sup>3</sup> 'e kadar
<b>Boya Çözeltisi (1 dm<sup>3</sup>)</b>	
Coomassie Blue R250	1
Asetik Asit	50 cm <sup>3</sup>
Metanol	300 cm <sup>3</sup>
Distile Su	650 cm <sup>3</sup>
<b>Yıkama Çözeltisi 1 (1 dm<sup>3</sup>)</b>	
Metanol	300 cm <sup>3</sup>
Asetik Asit	50 cm <sup>3</sup>
Distile Su	650 cm <sup>3</sup>
<b>Yıkama Çözeltisi 2 (1 dm<sup>3</sup>)</b>	
Metanol	50 cm <sup>3</sup>
Asetik Asit	70 cm <sup>3</sup>
Distile Su	880 cm <sup>3</sup>

#### 3.6.4. Organik Asit Derişimi

rhGH üretiminde üretim ortamına mikroorganizma tarafından salgılanan organik asitlerin derişimlerinin belirlenmesinde yüksek basınç sıvı kromatografisi (Waters, Alliance 2695, Organik Asit Analiz Sistemi) kullanılmıştır. Organik asit derişimleri, derişimleri bilen standart organik asit analizleriyle elde edilen standart kromatogramlar yardımı ile hesaplanmıştır. Organik asitlerin analiz koşulları aşağıdadır (İleri, 2006):

Kolon	: Capital Optimal ODS, 5 µm
Kolon boyutları	: 4.6 mm x 250 mm
Sistem	: Ters faz kromatografi
Hareketli faz akış hızı	: 0.8 cm <sup>3</sup> /dk
Kolon sıcaklığı	: 30°C

Dedektör, dalga boyu ve duyarlılık	: Waters 2487 Dual absorbans dedektör, 254 nm
Enjeksiyon hacmi	: 5 µl
Analiz süresi	: 15 dk
Hareketli faz bileşimi	: % 3.6 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (a/h), % 96.4 Deiyonize su

### 3.6.5. Proteaz Aktivitesi

Asidik proteaz aktivitesi için biyoreaktör örneklerinden alınan süpernatantlar kullanılmıştır. 300 uL örnek 700 uL %0.5 kazein içeren 0.05 M sodium asetat tamponu ile seyreltildikten sonra 30°C'de 20 dakika inkübe edilmiştir. Reaksiyon 2 cm<sup>3</sup> %10 trikloroasetik asit çözeltisinin eklenmesiyle sonlandırılmış ve örnekler 20 dakika boyunca buzda bekletilmiştir. 10500 g'de 10 dakika boyunca 4°C'de santifüj edilen hücreler, oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildikten sonra, 275 nm'de absorbansları okunmuştur. 1 U proteaz aktivitesi aşağıda formüle göre hesaplanmıştır (Çalık, 1998):

$$A_{\text{proteaz}} \left( \frac{U}{\text{cm}^3} \right) = \text{Absorbans} \times 15.625 \times \text{Seyreltme faktörü}$$

### 3.6.6. Hücre-içi Tepkime Hızlarının Hesaplanması

Karbon bileşiklerinin *P. pastoris*'te biyokimyasal yolizi üzerindeki akışını tanımlamak için hücre-içi tepkimeler ve biyokimyası araştırılmış; metabolik yolizlerinin kesişme ve dallanma noktalarındaki bileşikler dikkate alınarak (Çalık vd, 1999; Çalık ve Özdamar, 1999) biyokimyasal tepkime sistemi belirlenmiştir (Çalık vd., 2011). Toplam 102 metabolit içeren 147 reaksiyondan oluşan tepkime ağı EK-2'de verilmiştir. Hücre-içi reaksiyon akıları, her bir metabolit için yazılan stokiyometri temelli 102 adet kütle korunum denkleminin GAMS 2.25 (General Algebraic Modelling System, GAMS Development Corp, Washington DC) optimizasyon programıyla çözülmesi sonucu bulunmuştur. Çözüm için hücre-içi rhGH akısı minimize edilmiştir.

Tepkime ağındaki metabolik bileşiğin birikim hızı, bileşiği üreten tüm tepkimeler ile bileşiği tüketen tepkimelerin cebirsel toplamına eşitlenerek metabolik yolizindeki bileşik sayısına (m = 105) eşit sayıda kütle korunum temelli stokiyometrik denklemlerden oluşan matematik model kurulmuştur. Bu şekilde kurulan denklem sistemi matris notasyonu ile;

$$\mathbf{A} * \mathbf{r}(t) = \mathbf{c}(t) \quad (3.1)$$

Vektör diferansiyel denkleminle tanımlanır. Burada; **A**, metabolik tepkime sisteminin  $m \times n$  stokiyometrik katsayılar matrisi;  $\mathbf{r}(t)$ ,  $n \times 1$  tepkime hız (akı) vektörü; ve  $\mathbf{c}(t)$  ise metabolik bileşikler için  $m \times 1$  birikim hız vektörüdür.

$$\mathbf{c}(t) = \mathbf{c}_1(t) + \mathbf{c}_2(t) \quad (3.2)$$

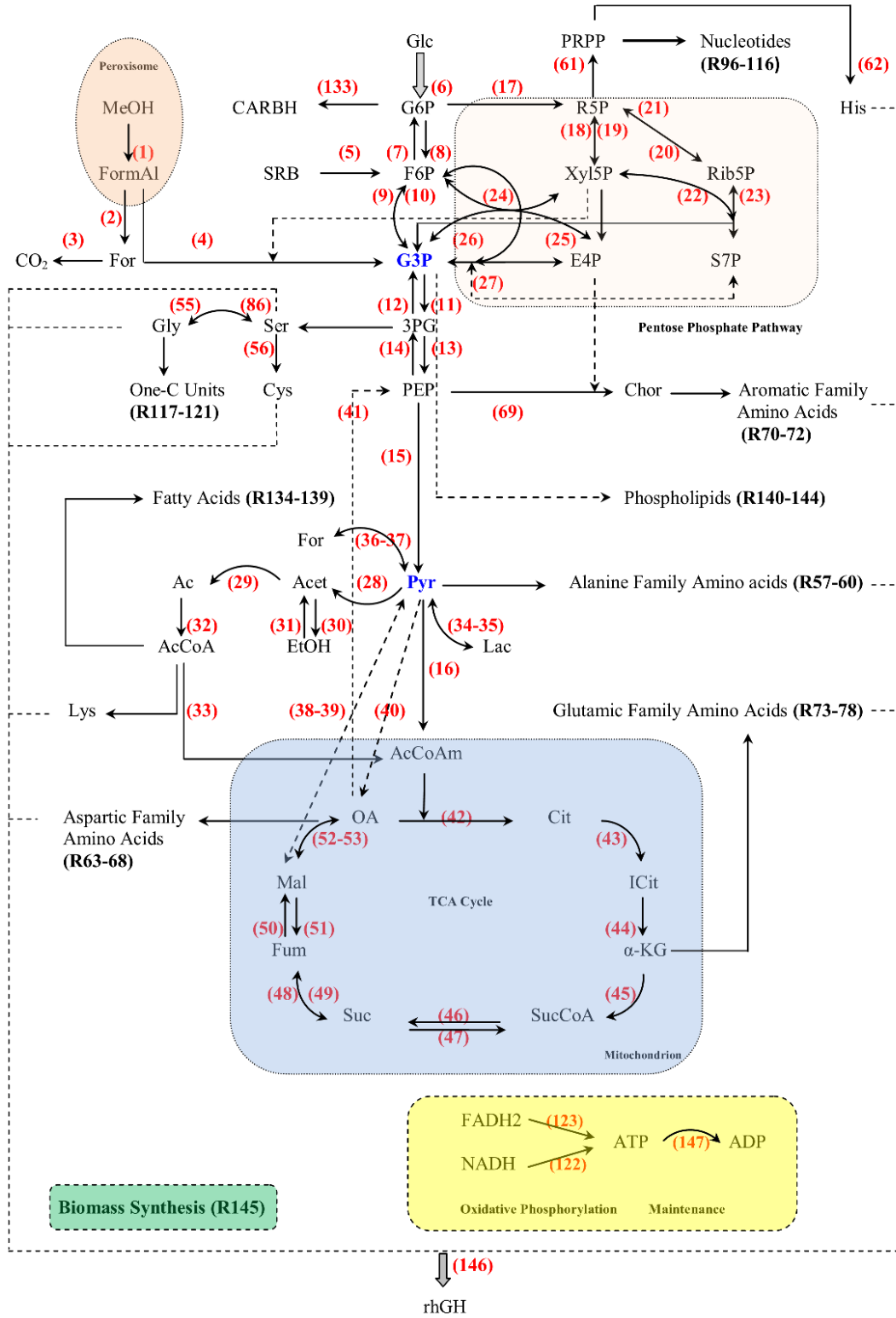
$\mathbf{c}_1(t)$  ve  $\mathbf{c}_2(t)$  sırasıyla hücre-dışı ve hücre-içi metabolit birikim vektörleridir. Hücre-dışı metabolitlerin birikim ve tüketim hızı, kalma süresi ile derişim değışimi eğrilerinden iki derişim arasındaki eğimden bulunmuştur. MYM analizinin yapıldığı evrede, hücre içinde yaklaşık yatışkin koşul varsayımı yapılmış ve böylece  $\mathbf{c}_2(t)=0$  olduğundan, denklem-3.2 denklem-3.3'e indirgenmiştir:

$$\mathbf{c}(t) = \mathbf{c}_1(t) \quad (3.3)$$

Lineer bir optimizasyon programıyla, amaç fonksiyonu Z;

$$Z = \sum \alpha_i r_i \quad (3.4)$$

i-bileşigi için  $\alpha_i$  stokiyometrik katsayıları ile  $r_i$  hızlarının çarpımının lineer toplamı olarak tanımlanan denklem-3.4, hücre içinde rhGH üretim hızı (R146) ile rhGH'nin hücre dışına aktarım hızının ( $dC_{rhGH}/dt/C_x$ ) farkı olarak tanımlanan Z fonksiyonu minimize edilerek denklem sistemi çözülmüştür.

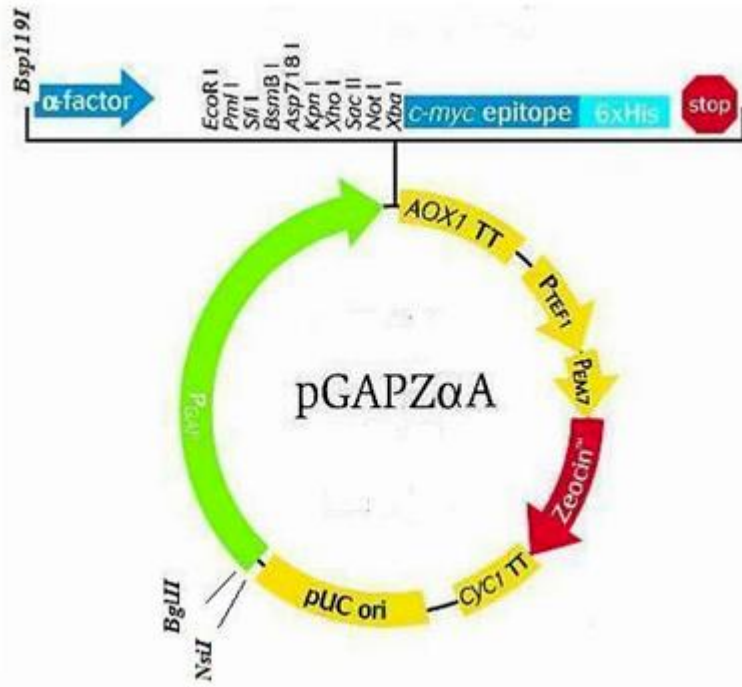


Şekil 3. 11. *P. pastoris* hücre-içi tepkime ağı

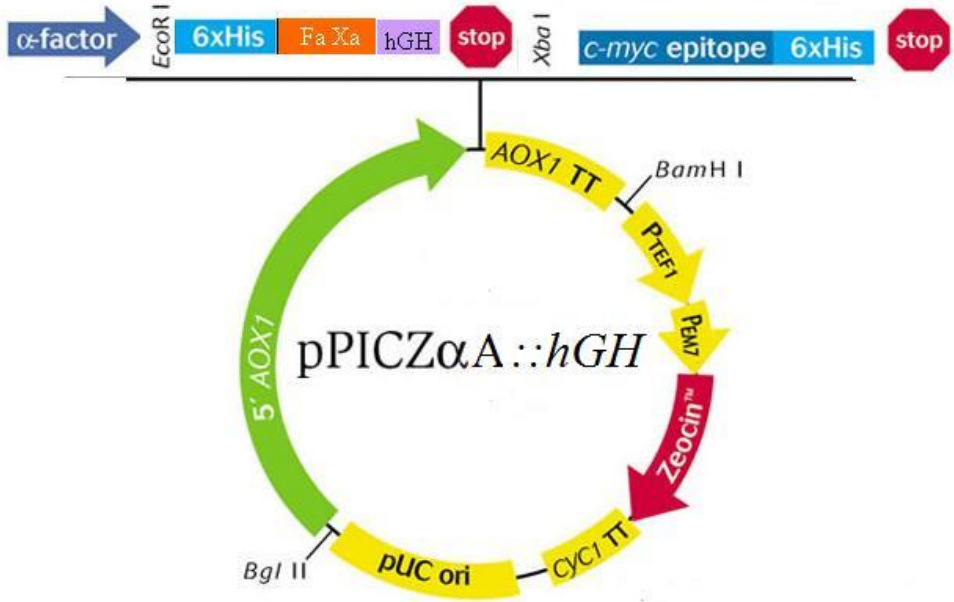
## 4. BULGULAR

### 4.1. pGAPZαA::hGH Plazmidinin pPICZα-A ve PGAPZαA Kullanılarak Geliştirilmesi

pGAPZαA (Invitrogen) ve pPICZαA::hGH (Çalık vd., 2008), çalışmanın bu kısmında kullanılan iki ana plazmidir ve Şekil 4.1. ve 4.2.'de gösterilmiştir. pPICZαA::hGH plazmidinde bulunan hGH'nin her iki ucunda plazmide klonlamak için gerekli olan restriksiyon enzim kesme bölgeleri ve üretim sonrası rhGH'yi orijinal N-ucu ile saflaştırmak için gerekli olan dizinler bulunmaktadır. N-terminus'ta bulunan His-tag protein saflaştırılmasını kolaylaştırmakta ve Faktör Xa ile kesildikten sonra proteinin orijinal N-ucu ile hGH elde edilmesini sağlamaktadır. pGAPZαA'nın 3147 bp büyüklüğündedir. hGH geni pPICZαA::hGH'den (Çalık vd., 2008), *EcoRI* ve *XbaI* restriksiyon enzimleri ile kesilerek, saflaştırıldıktan sonra pGAPZαA'ya klonlanmıştır.



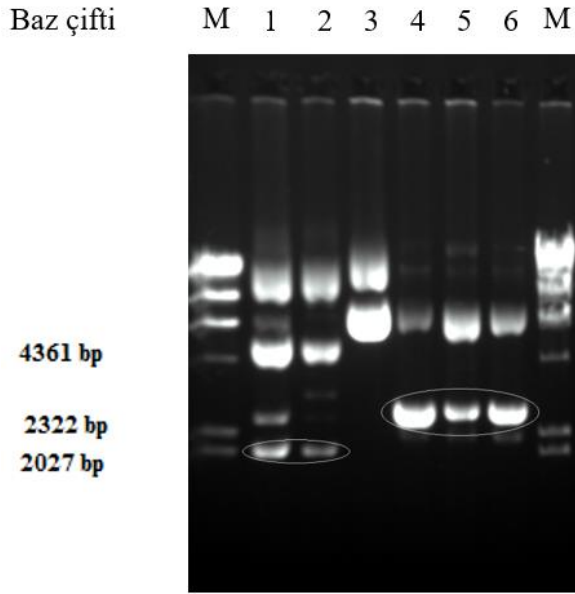
Şekil 4. 1. pGAPZαA'nın şematik gösterimi. Enzim kesme bölgeleri de şekilde görülmektedir



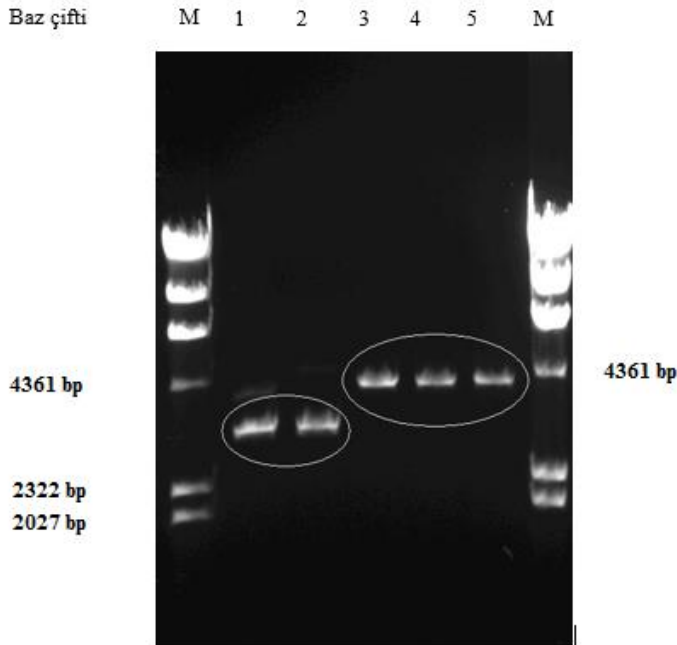
**Şekil 4. 2.** pPICZαA::hGH'nin sahip olduğu His-tag ve Faktör Xa kesme bölgeleri ile birlikte şematik gösterimi

#### 4.1.1. pGAPZαA ve pPICZαA::hGH Plazmidlerinin İzolasyonu

-80°C'de saklanan pGAPZαA ve pPICZαA::hGH plazmidlerini taşıyan *E. coli* DH5α suşları ayrı ayrı seçici antibiyotik olarak Zeocin™ içeren LSLB katı ortamına aktarıldıktan sonra çoğalan hücreler daha sonra LB sıvı ortamına aktarılmış ve 37°C'de 12 - 16 st inkübe edilmiştir. Plazmid izolasyonu alkali lizis yöntemiyle yapılmıştır (Şekil 4.3.). Plazmidler, sonuçları doğrulamak adına, *EcoRI* enzimi ile kesilmiştir. Kesme işlemi 37°C'de gerçekleştirilmiştir ve 65°C'de 20 dk ısı inaktivasyonu yapılarak reaksiyon sonlandırılmıştır. Kesme işleminin sonuçları Şekil 4.4.'te görülmektedir.



**Şekil 4. 3.** pGAPZαA'ya ait 2, pPICZαA::hGH'ye ait 4 farklı koloniden izole edilen plazmidlerin jel elektroforez görüntüsü. M: DNA marker λDNA/HindIII, 1. ve 2. kuyu: pGAPZαA plazmidleri, 3., 4., 5., 6., kuyu: pPICZαA::hGH plazmidleri



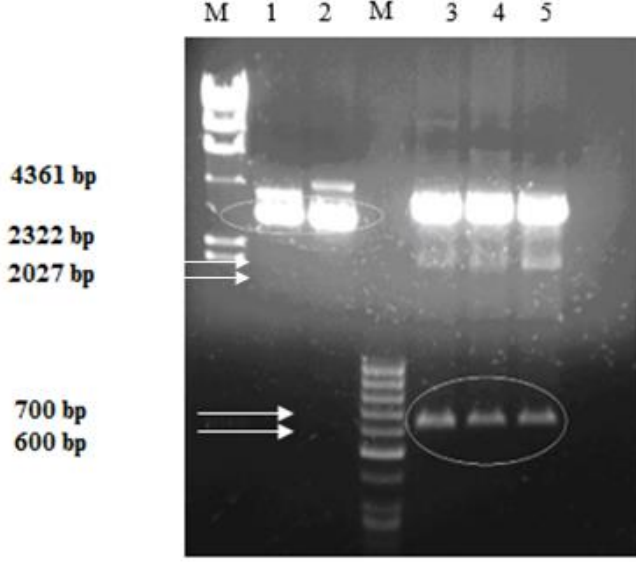
**Şekil 4. 4.** *EcoRI* ile kesildikten sonra elde edilen pGAPZαA and pPICZαA::hGH plazmidlerin jel elektroforez görüntüsü. M: DNA marker λDNA/HindIII, 1. ve 2. kuyu: Lineer pGAPZαA plazmidleri, 3., 4., 5. kuyu: lineer pPICZαA::hGH plazmidleri

#### 4.1.2. pGAPZαA ve pPICZαA::hGH Plazmidlerinin Çift Kesilmesi

Bir sonraki aşama, pGAPZαA ve pPICZαA::hGH plazmidlerinin *EcoRI* ve *XbaI* enzimleriyle çift kesilmesi ile hGH ve kullanılacak olan pGAPZαA plazmidinin hazır hale getirilmesidir.

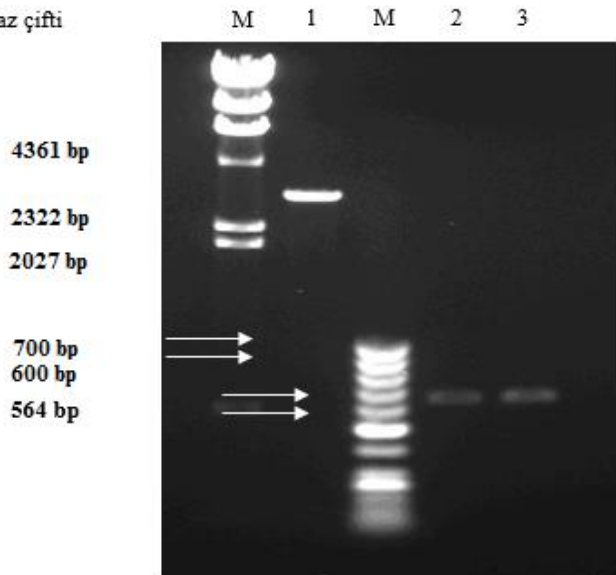
Kesme işlemi 37°C'de gerçekleştirilmiş ve 65°C'de 20 dk ısı inaktivasyonu yapılarak reaksiyon sonlandırılmıştır. Çift kesme sonucu elde edilen plazmidlere ait jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.5.'te gösterilmiştir. Şekil 4.6.'da daire içine alınarak gösterilen bantlar jelden alınmış, saflaştırılmış ve jel elektroforezde görüntülenmiştir.

Baz çifti



**Şekil 4. 5.** Çift kesilen pGAPZαA ve pPICZαA::hGH plazmidlerinin jel elektroforez görüntüsü. M: DNA marker λDNA/HindIII ve 50-bp DNA marker, 1. ve 2. kuyu: Çift kesilen pGAPZαA, 3., 4., 5. kuyu: Çift kesilen pPICZαA::hGH.

Baz çifti



**Şekil 4. 6.** Çift kesilen ve saflaştırılan pGAPZαA and pPICZαA::hGH plazmidleri. M: DNA marker λDNA/HindIII ve 50-bp DNA marker, 1. kuyu: saf, çift kesilmiş pGAPZαA, 2. ve 3. kuyu: çift kesilmiş pPICZαA::hGH plazmidinden elde edilen saflaştırılmış hGH.

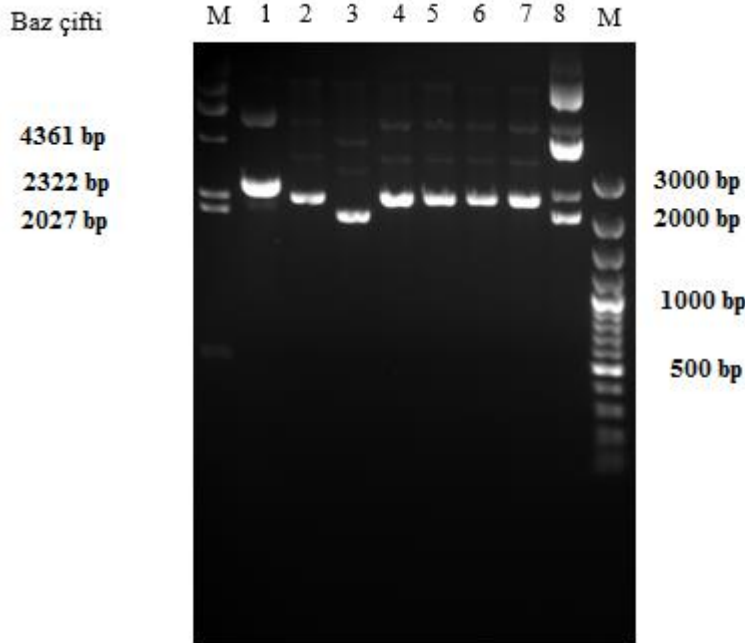


#### 4.1.3. Çift Kesilen pGAPZαA ve pPICZαA::hGH'den Elde Edilen hGH'nin Ligasyonu

*EcoRI* ve *XbaI* ile çift kesilen ve birbiriyle uyumlu uçlara sahip olan DNA'lar, T4 DNA ligaz enzimi kullanılarak üretici firma Thermo Scientific tarafından belirtilen protokole göre ligasyon tepkimesine sokulmuştur. Ligasyon reaksiyonu için kullanılan molar oran 3:1-5:1 (hGH/çift kesilmiş pGAPZαA) arasında değiştirilmiştir. Ligasyon karışımı, 16°C'de 14 st boyunca inkübe edilmiştir ve 65°C'de 10 dk ısı inaktivasyonu ile reaksiyon sonlandırılmıştır. Ligasyon sonucu elde edilen ürün olan pGAPZαA::hGH'nin 3696 bp olup, jel elektroforezde pPICZαA::hGH (4142 bp) ve pGAPZαA (3147 bp) arasında görüntülenmesi beklenmektedir.

#### 4.1.4. *E. coli* DH5α Hücrelerinin pGAPZαA::hGH ile Transformasyonu ve Baz Plazmidin Oluşturulması

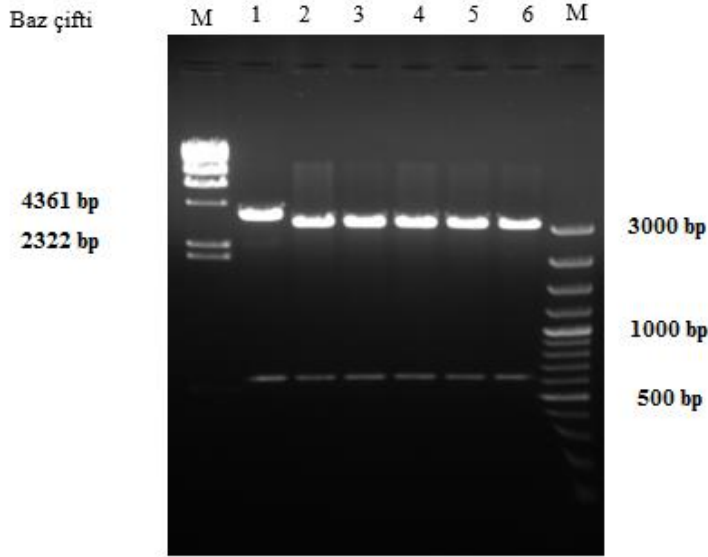
Ligasyondan sonra elde edilen pGAPZαA::hGH, *E. coli* DH5α hücreleri kullanılarak transformasyonda kullanılmıştır (Sambrook and Russell, 2001). 37°C'de 16 - 24 st sonra görülen kolonilerden 6 tanesi seçilmiş ve plazmid izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen plazmidlerin büyüklüğü jel elektroforezde kontrol edilmiştir (Şekil 4.7.).



**Şekil 4. 7.** İzole edilen pGAPZαA::hGH'lerin jel elektroforez görüntüsü. M: DNA marker λDNA/HindIII ve DNA marker 100-bp, 1. kuyu: pPICZαA::hGH, 2., 3., 4., 5., 6., 7. kuyular: Seçilen kolonilerden izole edilen pGAPZαA::hGH plazmidleri, 8. kuyu: pGAPZαA

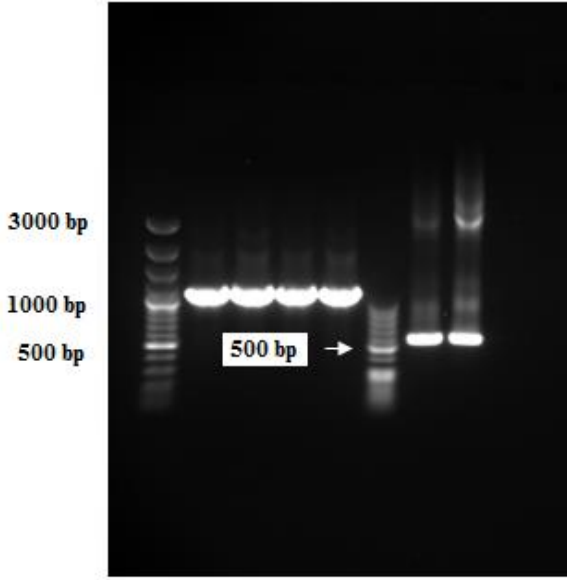
Şekil 4.7.'de de görüldüğü üzere 5 tane olası pozitif transformant elde edilmiştir. Bu 5 transformanttan elde edilen plazmidler, *EcoRI* ve *XbaI* ile çift kesilmiş ve ileri kontrolleri de yapılmıştır (Şekil 4.8.). Şekil 4.8.'de kesilen hGH de görülmektedir.

Daha ileri düzeyde kontrol için, seçilen 2 koloniye ait plazmidler *GAP*-ileri ve *AOX*-geri primerleri (Invitrogen) kullanılarak PCR'de kalıp olarak kullanılmışlardır. Üretici tarafından belirtildiği üzere, pGAPZ $\alpha$ A dizinininde, bu iki primer arasında kalan DNA dizini 540 bp uzunluğundadır. hGH'nin plazmide aktarılmasıyla birlikte bu kısım yaklaşık 1080 bp olmalıdır. PCR sonuçlarının jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.9.'da verilmiştir. PCR yapılırken, optimum koşulların bulunabilmesi için 2 farklı MgCl<sub>2</sub> (1.5 mM – 2 mM) derişimi denenmiştir. Seçilen bu iki koloniye ait plazmidler sekans analiziyle de kontrol edilmiş; *hGH* geninin doğru olarak klonlandığı ispatlanmıştır.



**Şekil 4. 8.** *EcoRI* ve *XbaI* ile çift kesilmiş plazmidlerin jel elektroforez görüntüsü. M: DNA marker  $\lambda$ DNA/HindIII ve DNA marker 100-bp, 1. kuyu: *EcoRI* ve *XbaI* ile çift kesilmiş pPICZ $\alpha$ A::*hGH*; 2., 3., 4., 5., 6. kuyu: Olası pozitif transformantlardan elde edilen, *EcoRI* ve *XbaI* ile çift kesilmiş pGAPZ $\alpha$ ::*hGH* plazmidleri

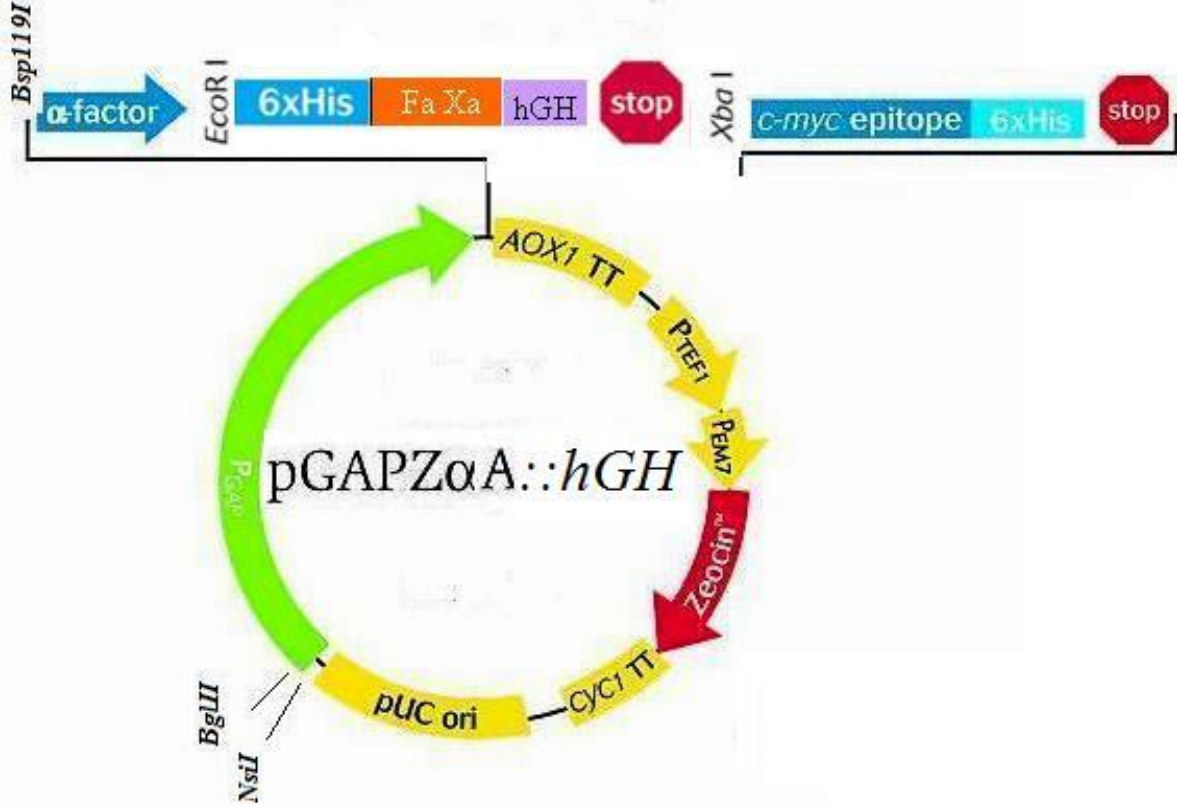
Baz çifti M 1 2 3 4 M 5 6



**Şekil 4. 9.** Seçilen transformantlara ait plazmidlerin PCR sonucunun jel elektroforez görüntüsü. M: DNA marker 100-bp ve DNA marker 50-bp, 1., 2., 3., 4. kuyu: Seçilen pGAPZαA::hGH plazmidlerinin kalıp olarak kullanıldığı PCR ürünleri (her koloni için 1.5 ve 2 mM tuz derişimi denenmiştir); 5. ve 6. kuyu: pozitif kontrol olarak kullanılan pGAPZαA plazmidi (sırasıyla 1.5 mM ve 2 mM MgCl<sub>2</sub> derişimi)

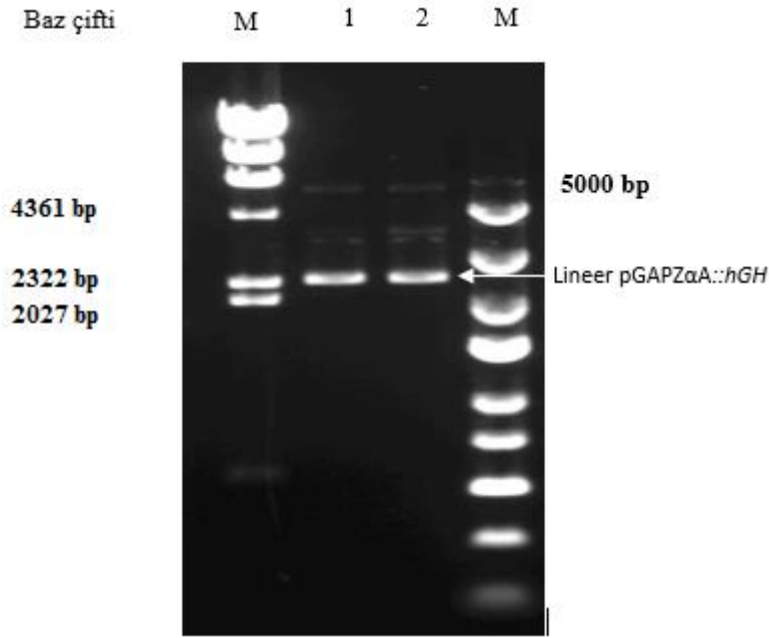
#### 4.1.5. *Pichia pastoris* X-33'ün pGAPZαA::hGH ile Transformasyonu

*P. pastoris* X-33 hücreleri, *Nsi*I (*Mph*1103I) restriksiyon enzimi ile lineerize edilmiş ve pGAPZαA::hGH plazmidi kullanılarak transforme edilmiştir. *Nsi*I enziminin plazmidde bulunduğu nokta Şekil 4.10.'da görülebilir. Üretici firma tarafından belirtildiği üzere, transformasyon kesilmemiş plazmidle de gerçekleşebilir, ancak bu durumda plazmidin genome entegre olma olasılığı daha düşüktür (Invitrogen, 2010). Dolayısıyla, pGAPZαA::hGH plazmidi lineer hale getirilip kullanılmıştır. pGAPZαA::hGH plazmidi, bu plazmidi taşıyan ve daha önce raporda belirtildiği şekilde geliştirilen *E. coli* hücrelerinden izole edilerek elde edilmiştir. Lineerizasyon tepkimesi 37°C'de 5 st inkübasyondan sonra 65°C'de 25 dakika inkübe ederek ısı inaktivasyonu ile durdurulmuştur. Tepkime sona erdikten sonra, karışım ThermoScientific PCR Saflaştırma Kiti ile kullanılarak saflaştırılmıştır. Bu işlemde, son aşamada pGAPZαA::hGH plazmidi, elüsyon tamponu kullanılarak değil, steril saf su içinde çözülmüştür. Lineerizasyon, jel elektroforezde kullanılarak kontrol edilmiştir (Şekil 4.11.).

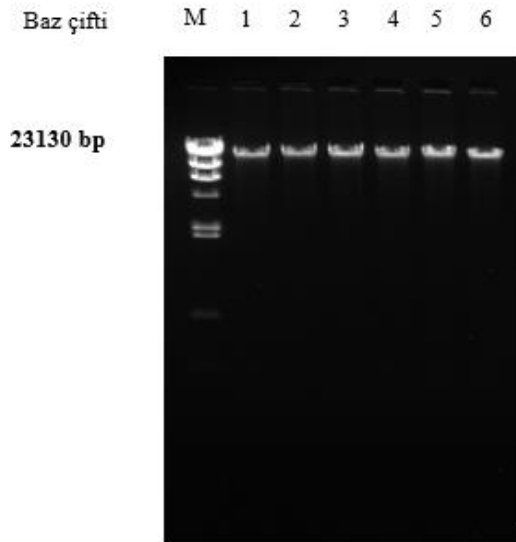


**Şekil 4. 10.** pGAPZαA::hGH plazmidi ve transformasyon için kullanılan *NsiI* enzimi kesme bölgesi

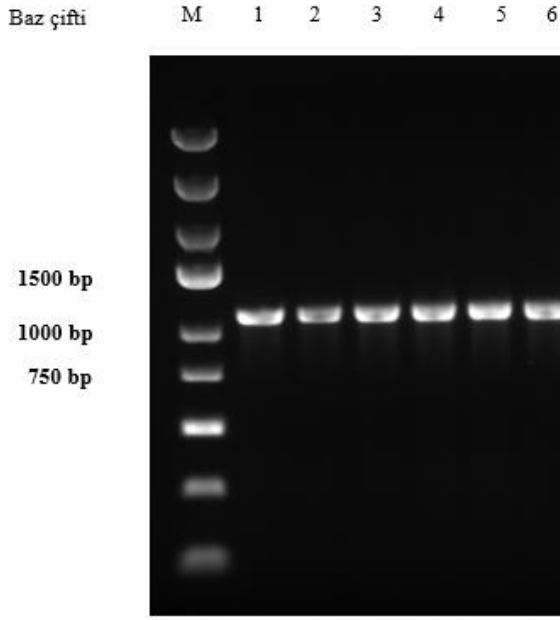
Lityum asetat yöntemi *Pichia* transformasyonu için uygun olmadığı için (Invitrogen, 2010), lityum klorid metodu transformasyon için seçilmiştir. Transformasyon sonuçları, 60 st sonra kontrol edilmiş ve 18 koloni seçilmiştir. Seçilen koloniler Zeocin™ içeren YPD katı ortamına aktarılmış ve 24 st boyunca 30°C'de inkübe edilmişlerdir. Altı adet muhtemel pozitif koloni seçilmiş, genomik DNA'ları izole edilip (Burke vd., 2000) pGAPZαA::hGH plazmidi taşıyıp taşımadıkları AOX-geri ve GAP-ileri primerleri kullanılarak koşulları ve bileşenleri PCR ile kontrol edilmiştir. İzole edilen genomik DNA'ların görüntüsü Şekil 4.12.'de gösterilmiştir. Gerçekleştirilen PCR deneyinin sonucunun görüntüsü Şekil 4.13.'te verilmiştir. Kontrol edilen kolonilerin stokları sonraki deneylerde kullanılmak üzere hazırlanmıştır.



**Şekil 4. 11.** pGAPZαA::hGH plazmidinin *NsiI* enzimi ile kesildikten sonraki jel elektroforez görüntüsü. M: DNA marker λDNA/HindIII ve DNA marker GeneRuler Express, 1. kuyu: sirküler pGAPZαA::hGH, 2. kuyu: saflaştırılmış, lineerize edilmiş pGAPZαA::hGH



**Şekil 4. 12.** pGAPZαA::hGH taşıyan olası *P. pastoris* transformantlardan izole edilen genomik DNA'ların jel elektroforez görüntüsü. M: λ-DNA Hind III marker. 1., 2., 3., 4., 5., 6. kuyu: İzole edilen genomik DNA'lar

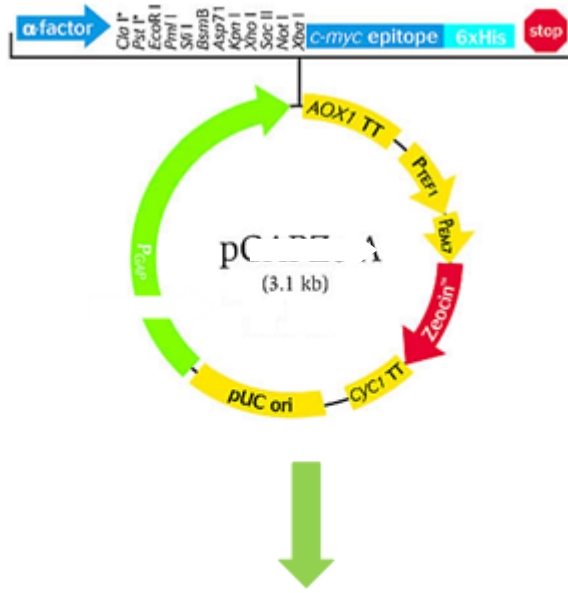


**Şekil 4. 13.** pGAPZαA::*hGH* taşıyan kolonilerden izole edilen genomik DNA'ların *GAP*-ileri ve *AOX*-geri primerleri kullanılarak yapılan PCR sonucunun jel elektroforez görüntüsü. M: DNA marker GeneRuler express, 1., 2., 3., 4., 5., 6. kuyu: İzole edilen ve kalıp olarak kullanılan genomik DNA'ların PCR sonucu. Beklenen DNA boyutu 1080 bp'dir.

## 4.2. P<sub>GAP</sub> Kütüphanesinin Oluşturulması

### 4.2.1. P<sub>GAP</sub> Dizininin Analizi

Kontrol edilebilen ve güçlü bir promotörün ulaşabildiği ekspresyon seviyesi transkripsiyon faktörlerinin, RNA polimerazın ve diğer bileşenlerin bağlanabileceği spesifik DNA-bağlanma bölgeleri taşımasıyla doğrudan ilintilidir (Vogl and Glieder 2013). Dolayısıyla, promotör mühendisliği yardımıyla, farklı regülasyon özelliklerine sahip bir promotör kütüphanesi oluşturularak aynı konak hücrede daha yüksek ekspresyon seviyelerine ulaşabilmek mümkündür (Qin vd., 2011a; Qin vd., 2011b); böylece farklı sentetik promotörler tasarlanabilir. Başka bir deyişle, P<sub>GAP</sub>'ın regülasyonunda etkili olan transkripsiyon faktörlerinin (TF) araştırılması gibi promotör mühendisliği yöntemleriyle, daha yüksek ekspresyon seviyelerine ulaşabilme potansiyeli vardır denebilir. Bu bağlamda, P<sub>GAP</sub> ile ulaşılan ekspresyon seviyelerini artırmak amacıyla, P<sub>GAP</sub> üzerinde bulunan putatif TF bağlanma bölgeleri MatInspector (Cartharius vd., 2005) programı kullanılarak analiz edilmiştir. Bu yazılım, veritabanlarında bulunan TF bağlanma bölgelerini tarayarak, analiz edilen dizin üzerinde bulunan putatif TF bağlanma bölgelerini eşleşme skorlarıyla birlikte bir liste olarak sunmaktadır. P<sub>GAP</sub> dizini, pGAPZα-A (Invitrogen) ticari vektörünün haritasından yararlanılarak bulunmuştur (Şekil 4.14.).



```

AGATCTTTT TGTAGAAATG TCTTGGTGTG CTCGTCCAAT CAGGTAGCCA 50
TCTCTGAAAT ATCTGGCTCC GTTGCAACTC CGAACGACCT GCTGGCAACG 100
TAAAATTCTC CGGGGTAAAA CTAAATGTG GAGTAATGGA ACCAGAAACG 150
TCTCTCCCT TCTCTCTCTC TCCACCGCCC GTTACCGTCC CTAGGAATTT 200
TTRACTGTGCT GGAGAGCTTC TICTACGGCC CCCTTGCAACA ATGCTCTTC 250
CCAGCATTAC GTTGGGGGTA AACCGGAGGT CGTGTACCCGA CCTAGCAGC 300
CCAGGGATGG AAAAGTCCC GCGTCCGCTG GCAATAATAGC GGGCGGACG 350
CATGTCATGA GATTATTGGA AACCACCAGA ATCGAATATAA AAGGCGAAC 400
ACCTTTCCA ATTTGGTTT CTCCTGACCC AAAGACTTTAA ATTTAATTT 450
ATTTGTCCTT ATTTCAATCA ATTGAACAAC TAT 483

```

**Şekil 4. 14.**  $P_{GAP}$  vektörünün haritası ve  $P_{GAP}$  dizini

MatInspector tarafından bulunan ve eşleşme puanı 0.8'den yüksek olan 41 putatif TF bağlanma bölgeleri fonksiyonlarına göre sınıflandırılmıştır (Tablo 4.1.).

**Tablo 4. 1.** MatInspector tarafından bulunan putative transkripsiyon faktörleri

TF'nin Fonksiyonu	Bulunan TF'ler
Karbon kullanımı ile ilgili olan glikolitik genler, oksijen tüketimi ile ilgili olarak glikoz ile baskılanan ya da aktive olan genler	Hap2/3/4/5p kompleksi, CSRE'ler, Pip2p, Mig1p, Mig2p
Stres yanıtı	Isı şoku transkripsiyon faktörleri
Genel TF'ler	Rap1p, Ssn6p, Tup1p, Rfx1p, rDNA bağlayıcı proteini, Reb1p, Fhl1p
Amino asit metabolizması	Leu3p, Put3, Cha4p
Gelişim ve çoğalma ile ilgili yolizleri	Tea1, Mcm1p

$P_{GAP}$ , glikoliz ve glukoneogenezis yolizlerinde bulunan GAPDH enzimini kodladığından ve ekspresyon seviyesi kullanılan karbon kaynağına bağlı olduğundan,  $P_{GAP}$  varyantlarının

tasarımı yapılırken glikolitik genlerin regülasyonunda ya da genel olarak represör ya da aktivatör görevi olan TF'ler, dikkate alınmıştır. Bunlara ek olarak, diğer gliolitik genlerin promotörleri de incelenmiştir. Bu genler, glikoz-6-fosfat izomeraz, fosfofruktokinaz, fruktoz 1,6-bifosfat aldolaz, fruktoz-1,6-bifosfat, trioz-fosfat izomeraz, 3-fosfogliserat kinaz, fosfogliseratmutaz, enolaz, piruvat kinazdır. Bulunan TF'lerin ait oldukları ailelere göre glikoliz genlerinin promotörlerindeki varlıkları Tablo 4.2.'de gösterilmiştir. Tüm bunlar dışında,  $P_{GAP}$  tasarımı yapılırken TF'ler sayılarına ve eşleşme skorlarına göre seçilmiş ve tasarım bu şekilde yapılmıştır. Bunlardan represör etkisi olan putatif TF bağlanma bölgeleri silinirken, aktivatör etkisi olan putatif TF bağlanma bölgeleri dizindeki doğal pozisyonlarında tekrarlanmıştır.

**Tablo 4. 2.** Glikolitik genlerin TF bağlanma bölgeleri açısından analizi

Buldukları Promotör Sayısı	Matriks Ailesi	Açıklama	Örnek TFs
7 ( $\approx$ %70)	YMCM	Maya hücre döngüsü ve metabolik regülatör	Mcm1p
8 ( $\approx$ %80)	RFXP	Regülatör faktör X proteini	Rfx1p
	TEAF	TEA/ATTS DNA bağlanma faktörleri	Tec1p
9 (%90)	HOMD	Homeo bölgesi içeren transkripsiyonel regülatörler	Pho2p, Yox1p
	YMIG	Maya GC-Box Proteinleri	Mig1p(Mig1-2p), Mig2p (Mig1-1p)
	YSTR	Maya stress yanıt proteinleri	Msn2p
10 (%100)	BZIP	Fungal bazik lösin fermuar ailesi	Yap1p, Hac1p
	CSRE	Karbon kaynağı yanıt elementleri	Sip4p, Cat8p
	ICGG	Ters çevrilmiş CGG üçlü bölgeler	Tea1p
	MGCM	Monomerik Gal4-sınıfı motifler	Rgt1p, Yrr1p
	YGAL	Maya GAL4 faktörü	Gal4p (Att1p)
	YORE	Maya oleat yanıt elementleri	Oaf1p

Bu bağlamda, tasarlanan promotörler ve dizinleri aşağıda verilmiştir. Varyantlar ile ilgili özet bilgi Tablo 4.3.'te mevcuttur.

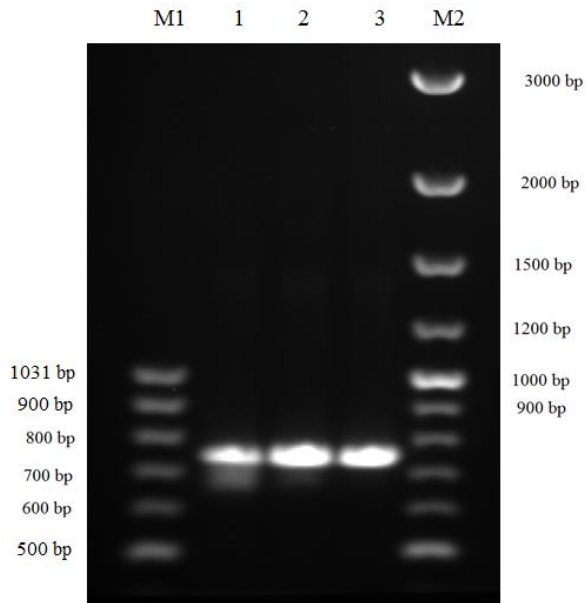


**Tablo 4. 3.** Tasarlanan promotör varyantları Silinen TF bağlanma bölgeleri *italik* olarak gösterilmiştir. Tekrarlanan TF bağlanma bölgeleri ***kalın italik*** olarak gösterilmiştir.

Varyant	Olası TF	Bulunduğu Bölge (bp)
Pro1	<i>MIG1 (MIG1-2)</i>	-383 to -366
Pro5	<i>MIG1/MIG2</i> <i>(MIG1-2/MIG1-1)</i>	-383 to -347
Pro6	<i>MIG2 (MIG1-1)</i>	-365 to -347
Pro2	<b><i>RGT1</i></b>	-383 to -366
Pro3	<b><i>CSRE</i></b>	-142 to -128
Pro7	<b><i>CSRE (SIP4)</i></b>	-358 to -344
Pro8	<b><i>CSRE</i></b>	-222to -208
Pro4	<b><i>RAP1</i></b>	-469 to -448
Pro9	<b><i>GAL4</i></b>	-215 / -189
Pro10	<b><i>RFX1</i></b>	-418 /-384 ve -123 / -106

#### 4.2.2. Temel Plazmidin Oluşurulması

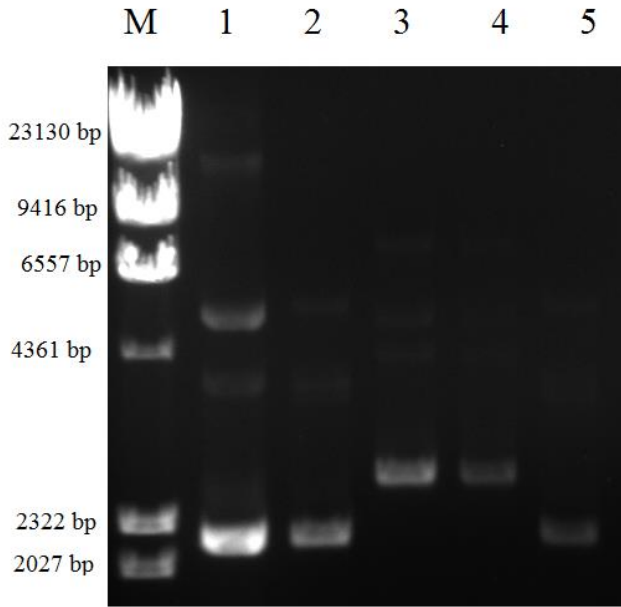
Farklı  $P_{GAP}$  varyantlarını taşıyacak olan pGAPPro#::*egfp* plazmidlerinin oluşturulması için öncelikle temel plasmid olan pPICZ $\alpha$ -A::*egfp* için tasarım yapılmıştır. Bu amaçla, pEGFP-N2 vektörü kalıp olarak kullanılarak, *egfp* geni çoğaltılmıştır. Yapılan PCR sonucunda 720 bp'lik bir DNA bandı görülmesi beklenmiştir (Şekil 4.15.).



**Şekil 4. 15.** Farklı tuz derişimlerinin denendiği *egfp* amplifikasyonu için yapılan PCR. M1-M2: Marker, 1: 2mM MgCl<sub>2</sub>, 3: 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 4: 4mM MgCl<sub>2</sub>

Farklı tuz derişimleri denendikten sonra, en uygun tuz derişiminin 3 mM olduğu saptanmıştır. Bu aşamadan sonra, çoğaltılan *egfp* gen dizini pPICZ $\alpha$ -A plazmidine uygun restriksiyon enzimleri kullanılarak klonlanmıştır. Bu amaçla, çoğaltılan *egfp* geni, ThermoScientific PCR Safılaştırma Kiti kullanılarak safılaştırıldıktan sonra, *EcoRI* and *KpnI* ile kesilmiştir ve pPICZ $\alpha$ -A plazmidi ile ligasyon tepkimesine sokulmuştur. Ligasyon tepkimesi 22°C'de 1 saat inkübe edilerek gerçekleştirilmiş ve 65°C'de 10 dk tutularak sonlandırılmıştır.

Ligasyondan sonra elde edilen pPICZ $\alpha$ A::*egfp*, *E. coli* TOP10 hücreleri kullanılarak transformasyonda kullanılmıştır (Sambrook and Russell, 2001). 37°C'de 16-24 st sonra görülen kolonilerden 4 tanesi seçilmiş ve plazmid izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen plazmidlerin büyüklüğü jel elektroforezde kontrol edilmiştir (Şekil 4.16.).



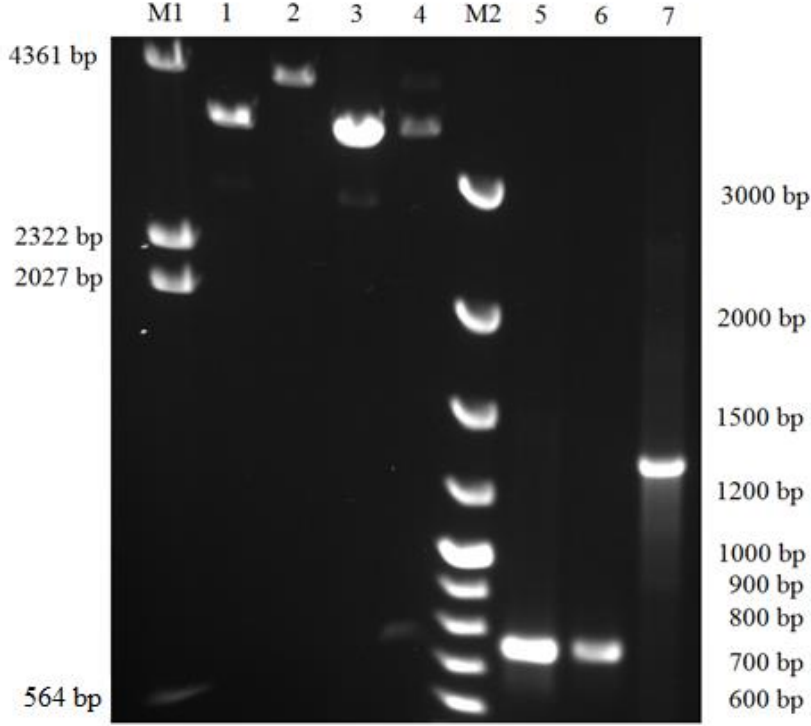
**Şekil 4. 16.** Transformasyon sonrası izole edilen plazmidler. M: Marker, 1: Boş pPICZ $\alpha$ -A (3593 bp), 2-5: İzole edilen olası pPICZ $\alpha$ -A::*egfp* (4286 bp)

Seçilen plazmidlerden bir tanesi (Şekil 4.16.-Kuyu 3) tekli ve çift kesilerek, ve kalıp olarak kullanılarak PCR ile kontrol edilmiştir (Şekil 4.17.). Daha sonra, dizin analizi ile *egfp* dizini daha ileri düzeyde kontrol edilmiştir.

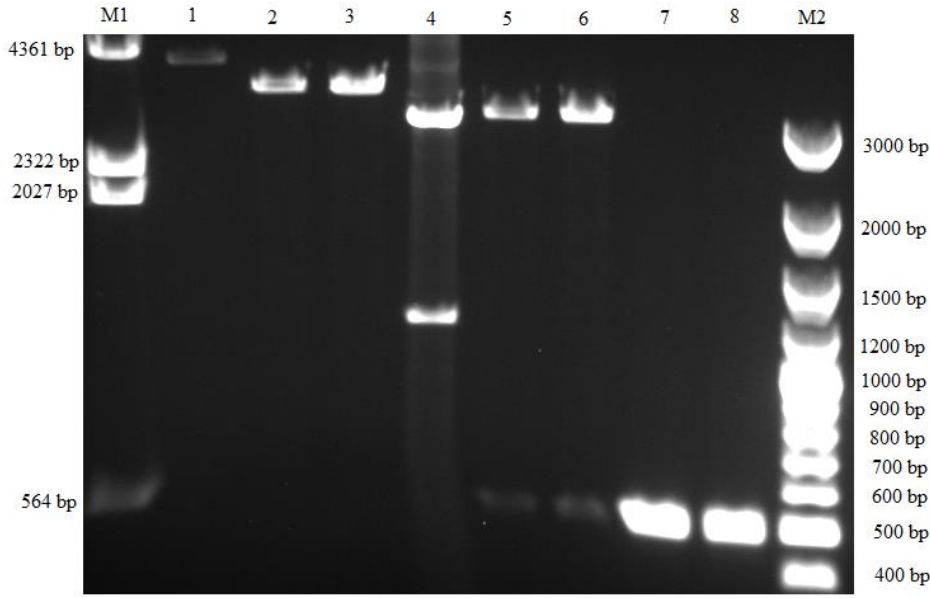
#### 4.2.3. Bazal Plazmidin Oluşturulması

Bazal plazmid, tasarlanan  $P_{GAP}$  varyantlarının ifade seviyelerinin karşılaştırılacağı plazmid olarak tasarlanmıştır. Bu plazmid tasarlanırken, eGFP hücre-içi değil hücre-dışı üretilecek şekilde tasarlanmıştır. Bu şekilde protein salgılama prosesinin karmaşıklığının ortadan kaldırılması amaçlanmıştır ve sadece promotörün protein üretimi üzerindeki tekil etkisi görülmeye çalışılmıştır. Bu amaçla, pPICZ $\alpha$ -A::*egfp* ve pGAPZ $\alpha$ -A plazmidleri *BglII* and *EcoRI* enzimleriyle kesilerek,  $P_{AOX1}$  promotör bölgesi  $P_{GAPWT}$  ile ligasyon tepkimesine

sokularak değiştirilmiştir. Ligasyon sonucu elde edilen ürün *E. coli* TOP10 hücrelerine transforme edilmiştir. Transformasyon sonucu elde edilen hücrelerden seçilen plazmidlerden 2 tanesi tekli ve çift kesme ve bu plazmidlerin kalıp olarak kullanılmasıyla PCR ile kontrol edilmiştir (Şekil 4.18.). Çıkarılan  $P_{AOX1}$  dizini  $P_{GAPWT}$ 'den daha büyük olduğu için, doğru  $P_{GAPWT}::egfp$  plazmidlerinin,  $pPICZ\alpha-A::egfp$  plazmidinin önünde olması beklenmektedir.



**Şekil 4. 17.** Seçilen koloniye ait plazmidin agaroz jel elektroforez görüntüsü. M1: Lambda DNA/HindIII Marker, 1: *EcoRI* ile kesilmiş pPICZ $\alpha$ -A (3593 bp), 2: *EcoRI* ile kesilmiş pPICZ $\alpha$ -A::*egfp* (4286 bp), 3: *EcoRI/KpnI* ile kesilmiş pPICZ $\alpha$ -A, 4: *EcoRI/KpnI* ile kesilmiş pPICZ $\alpha$ -A::*egfp*, M2: 100 bp DNA Ladder 5: eGFP için pozitif kontrol (720 bp), 6: EGFP-İleri ve EGFP-Geri primerleri kullanılarak pPICZ $\alpha$ -A::*egfp*'nin kalıp olarak kullanıldığı PCR ürünü (720 bp), 7: AOX-İleri ve AOX-Geri primerleri kullanılarak pPICZ $\alpha$ -A::*egfp*'nin kalıp olarak kullanıldığı PCR ürünü (1308 bp)



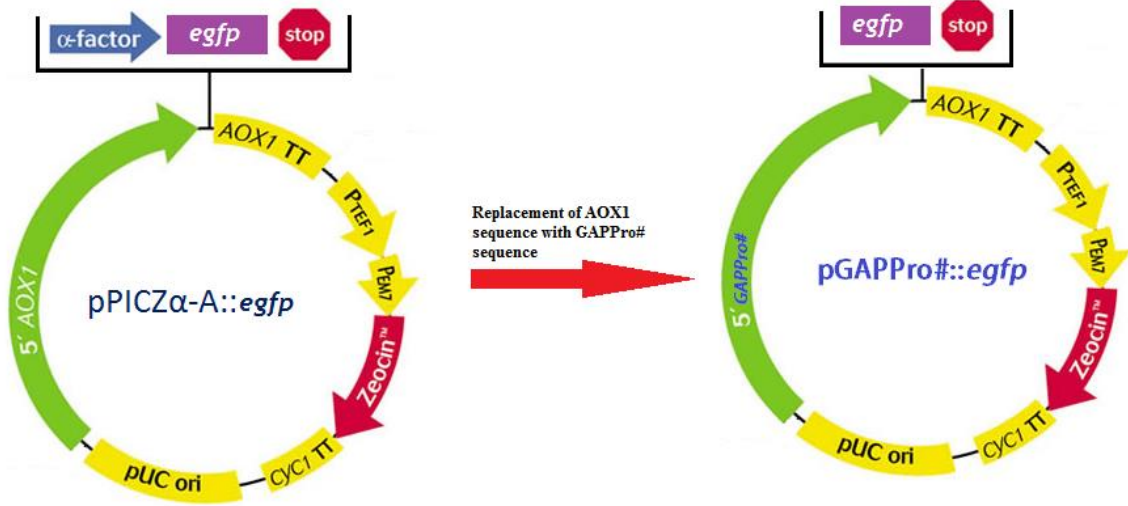
**Şekil 4. 18.** Seçilen kolonilere ait plazmidlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü. M1: Lambda DNA/HindIII Marker, 1: *EcoRI* ile kesilmiş pPICZ $\alpha$ -A::*egfp* (4286 bp), 2-3: *EcoRI* ile kesilmiş pGAPWT-A::*egfp* (3571 bp) plazmidleri, 3: *BglIII/EcoRI* ile kesilmiş pPICZ $\alpha$ -A::*egfp*, 5-6: *BglIII/EcoRI* ile kesilmiş pGAPWT-A::*egfp*, 7-8: GAPPro-İleri ve GAPPro-Geri primerleri kullanılarak pGAPWT-A::*egfp*'nin kalıp olarak kullanıldığı PCR ürünü (1308 bp), M2: 100 bp DNA Ladder

#### 4.2.4. P<sub>GAP</sub> Varyantlarını Taşıyan pGAPPro#::*egfp* Plazmidlerinin Oluşturulması ve *E. coli* Transformasyonu

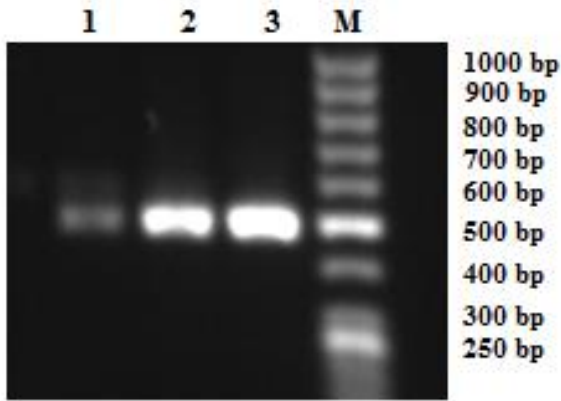
##### 4.2.4.1. P<sub>GAP</sub> Varyantlarının Çoğaltılması

P<sub>GAP</sub> varyantları Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) ile çoğaltılmışlardır. Bu amaçla, uygun restriksiyon enzimleri seçilerek primerler tasarlanmıştır ve bu şekilde çoğaltılan P<sub>GAP</sub> varyantının daha önce tasarlanan pPICZ $\alpha$ -a::*egfp* plazmidinde bulunan P<sub>AOX1</sub> ile değiştirilmesi sağlanmıştır (Şekil 4.19.). P<sub>GAP</sub> varyantlarında, 5' ve 3' uçları değiştirilmediği için her bir varyant aynı primerlerle çoğaltılmıştır.

GAPPro# varyantlarının en yüksek verimde çoğaltılabilmesi amacıyla en uygun tuz derişiminin belirlenmesi için 2 mM, 3mM ve 4 mM derişimleri denenmiştir. Tüm GAPPro# varyantlarını temsilen, sadece GAPPro1 varyantı kalıp DNA olarak kullanılmıştır. PCR sonrası elde edilen örnekler, agaroz jel elektroforezde görüntülenmiş ve en uygun tuz derişimi olan 4 mM MgSO<sub>4</sub> derişimi seçilmiştir (Şekil 4.20.). Tüm varyantların PCR sonucunda beklenen boyutları Tablo 4.4.'de verilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri Thermo Fisher Scientific PCR Safılaştırma Kiti ile safılaştırılmıştır. Safılaştırıldıktan sonra örnekler 10 kat seyreltilmiş ve agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.21.-Tablo 4.4.).



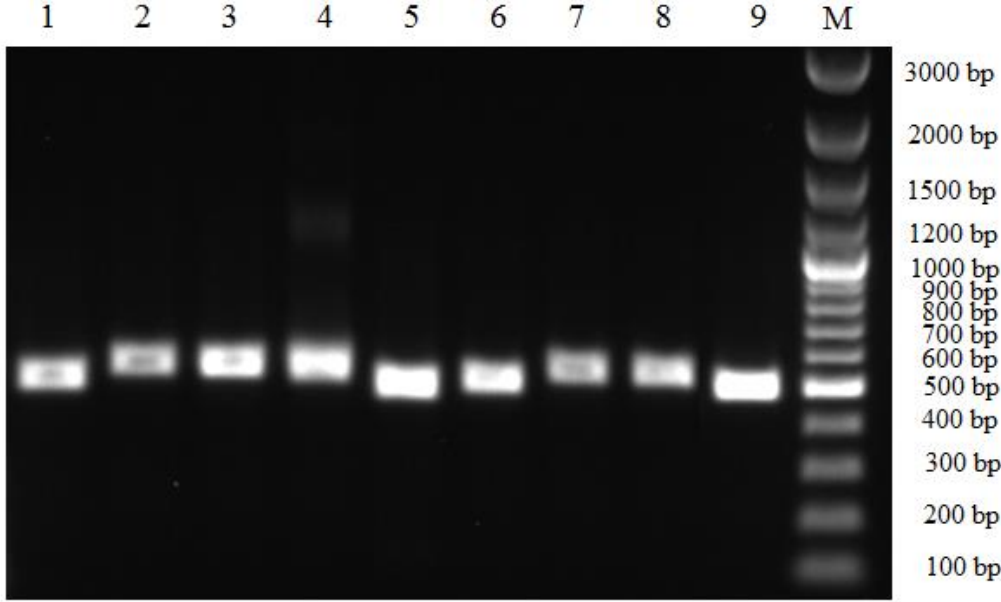
**Şekil 4. 19.** Temel plazmid olan pPICZα-a::egfp kullanılarak pGAPPro#::egfp plazmidlerinin oluşturulmasının şematik gösterimi.



**Şekil 4. 20.** Farklı tuz derişimlerinin denendiği PCR sonuçlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü. 1: 2mM, 2: 3 mM, 3: 4 mM, M: GeneRuler 50 bp DNA Ladder

**Tablo 4. 4.** GAPPro# varyantlarının boyutları

PCR Ürünü	Beklenen boyut (bp)
GAPPro1	474
GAPPro2	510
GAPPro3	507
GAPPro4	515
GAPPro5	455
GAPPro6	473
GAPPro7	507
GAPPro8	507
GAPWT	483

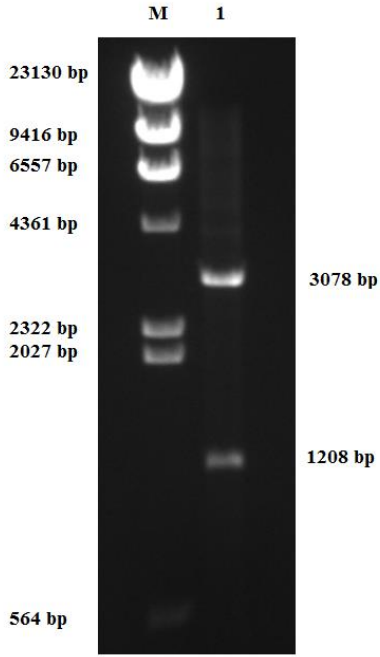


**Şekil 4. 21.**  $P_{GAP}$  varyantlarının PCR'den sonraki agaroz jel elektroforez görüntüsü. GAPProV-İleri ve GAPProV-Geri primerleri kullanılmıştır. 1:  $P_{GAPPro1}$ , 2:  $P_{GAPPro2}$ , 3:  $P_{GAPPro3}$ , 4:  $P_{GAPPro4}$ , 5:  $P_{GAPPro5}$ , 6:  $P_{GAPPro6}$ , 7:  $P_{GAPPro7}$ , 8:  $P_{GAPPro8}$ , 9:  $P_{GAPwt}$ , M: GeneRuler 100 bp DNA Ladder. Bantların boyutları Tablo 4.4.'de verilmiştir

#### 4.2.4.2. Tasarlanan Plazmidlerin Oluşturulması ve *E. coli* TOP10 Transformasyonu

Saflaştırılmış GAPPro# varyantları ve izole edilmiş temel plazmid olan, i.e pPICZ $\alpha$ -A::*egfp* ikili kesilerek ligasyon için hazır hale getirilmiştir. Plazmidlerin ve PCR ürünlerinin kesim reaksiyonu 37°C'de 2 st boyunca gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon ısı inaktivasyonu ile 65°C'de 20 dk inkübasyon ile sonlandırılmıştır.

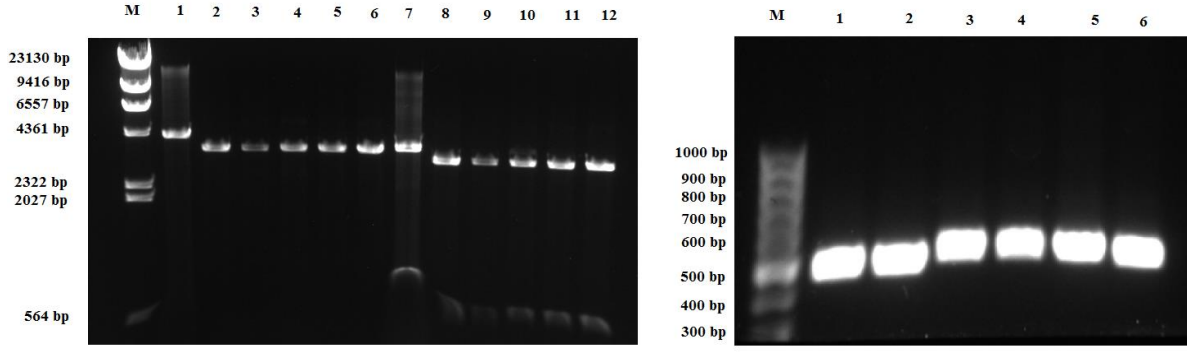
GAPPro# varyantlarının kesildikten sonraki görüntüsü, sadece bir kaç baz çifti kesildiği için farklı bir şekilde görüntülenememiştir. Ancak temel plazmidin tamamen kesildiği, 1  $\mu$ L örneğin agaroz jel elektroforezde koşturulması ile görüntülenmiştir (Şekil 4.22.). Aynı miktarda GAPPro# varyantı ve temel plazmid kullanıldığı için, kesme işleminin aynı sürede tamamlandığı kabul edilmiştir. Örnekler ikili kesme tepkimesinden sonra Thermo Scientific Jel Elüsyon Kiti ile jelden alınarak saflaştırılmıştır. Örneklerin derişimi, 10 kat seyreltilmiş örneklerin jel elektroforez görüntüsü kullanılarak tespit edilmiş ve daha sonra ligasyon işlemi bu derişimler göz önüne alınarak yapılmıştır. Ligasyon 1:1 molar oranı kullanılarak yapılmıştır.



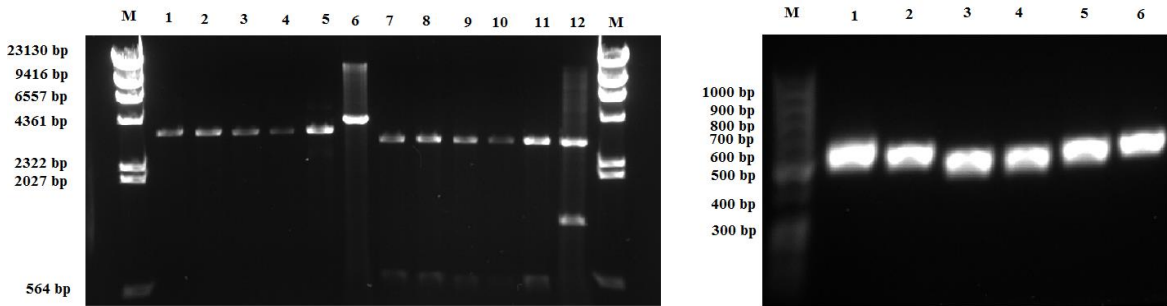
**Şekil 4. 22.** *Bgl*I ve *Eco*RI ile kesilmiş pPICZ $\alpha$ -A::*egfp* (4286 bp) plazmidin agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: Lambda DNA/HindIII DNA Marker, 1: *Bgl*I/*Eco*RI ile kesilmiş pPICZ $\alpha$ -A::*egfp*. Yukardaki bant plazmidin P<sub>AOX1</sub> ve  $\alpha$ -faktor kesildikten sonra kalan kısmıdır (3078 bp), aşağıdaki bant P<sub>AOX1</sub> +  $\alpha$ -faktör dizinidir (1208 bp).

Ligasyon reaksiyonu 22°C'de 1 st inkübasyon ile gerçekleştirilmiş ve 65°C'de 10 dk bekletilerek sonlandırılmıştır. Elde edilen ligasyon karışımı *E. coli* TOP10 hücrelerinin CaCl<sub>2</sub> yöntemi ile transformasyonu için kullanılmıştır (Sambrook ve Russell, 2001). Seçilen koloniler yeni katı ortama aktarılmış ve plazmidleri Thermo Fisher Scientific Plazmid İzolasyon Kiti kullanılarak izole edilmiştir. Her bir olası pGAPPro#::*egfp* plazmidi için 6 koloni plazmid izolasyonu için seçilmiştir. İzole edilen plazmidler agaroz jel elektroforezde görüntülenmiştir. P<sub>AOX1</sub> dizini, yerine yerleştirilen GAPPro# dizinlerinden daha uzun olduğu için, doğru plazmidlerin pPICZ $\alpha$ -A::*egfp* plazmidinin önünde görüntülenmesi beklenmiştir. Dolayısıyla, temel plazmidten daha hızlı koşan plazmidler doğru transformant olarak kabul edilmiş ve 2 tanesi seçilerek daha ileri kontrolleri yapılmıştır. Bu ileri kontroller, izole edilen plazmidin tekli ve ikili kesilmesini ve bu plazmidlerin PCR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Bu plazmidlerin ileri kontrollerinin sonuçları agaroz jel elektroforez kullanılarak görüntülenmiştir (Şekil 4.23.a-c). Her bir pGAPPro#::*egfp* plazmidi için bir adet koloni seçilmiş ve bu koloniye ait plazmid sekanslanarak doğrulanmıştır (ODTÜ Merkez Laboratuvarı). Bu plazmidlerin ileri kontrollerinin sonuçları agaroz jel elektroforez kullanılarak görüntülenmiştir (Şekil 4.23.a-c). Her bir pGAPPro#::*egfp* plazmidi için bir adet koloni seçilmiş ve bu koloniye ait plazmid sekanslanarak doğrulanmıştır (ODTÜ Merkez Laboratuvarı).



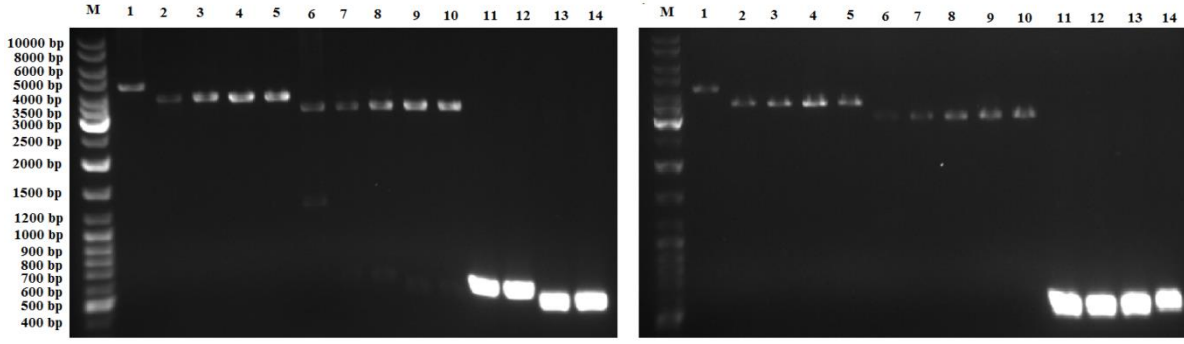


**Şekil 4.23. a** Transformasyondan sonra izole edilen pGAPPro#::*egfp* plazmidlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. **(Sol)** M: Lambda DNA/HindIII DNA Marker, 1: *EcoRI* ile kesilmiş pPICZα-A::*egfp* (4286 bp), 2-3: *EcoRI* ile kesilmiş pGAPPro1::*egfp* (3553 bp), 4: *EcoRI* ile kesilmiş pGAPPro2::*egfp* (3589 bp), 5-6: *EcoRI* ile kesilmiş pGAPPro3::*egfp* (3586), 7: *EcoRI/BglII* ile kesilmiş pPICZα-A::*egfp* (3078 bp), 8-9: *EcoRI/BglII* ile kesilmiş pGAPPro1::*egfp* (3078 bp), 10: *EcoRI/BglII* ile kesilmiş pGAPPro2::*egfp* (3078 bp), 11-12: *EcoRI/BglII* ile kesilmiş pGAPPro3::*egfp* (3078 bp) **(Sağ)** M: GeneRuler 50 bp DNA Ladder, 1-2: pGAPPro1::*egfp* (474 bp) için PCR sonucu 3: pGAPPro2::*egfp* için PCR sonucu (510 bp), 4-5: pGAPPro3::*egfp* için PCR sonucu (507 bp), 6: pGAPWT::*egfp* için PCR sonucu (483 bp). PCR GAPProV-İleri ve GAPProV-Geri primerleri kullanılarak Tablo 3.18.-3.19.'daki koşullar kullanılarak yapılmıştır



**Şekil 4.23 b** Transformasyondan sonra izole edilen pGAPPro#::*egfp* plazmidlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. **(Sol)** M: Lambda DNA/HindIII DNA Marker, 1-2: *EcoRI* ile kesilmiş pGAPPro4::*egfp* (3594 bp), 3-4: *EcoRI* ile kesilmiş pGAPPro5::*egfp* (3534 bp), 5: *EcoRI* ile kesilmiş pGAPPro6::*egfp* (3552 bp), 6: *EcoRI* ile kesilmiş pPICZα-A::*egfp* (4286 bp), 7-8: *EcoRI/BglII* ile kesilmiş pGAPPro4::*egfp* (3078 bp), 9-10: *EcoRI/BglII* ile kesilmiş pGAPPro5::*egfp* (3078 bp), 11: *EcoRI/BglII* ile kesilmiş pGAPPro6::*egfp* (3078 bp), 12: *EcoRI/BglII* ile kesilmiş pPICZα-A::*egfp* (3078 bp) **(Sağ)** M: GeneRuler 50 bp DNA Ladder, 1-2: pGAPPro4::*egfp* için PCR sonucu (515 bp) 3-4: pGAPPro5::*egfp* için PCR sonucu (455 bp), 5: pGAPPro6::*egfp* için PCR sonucu (473 bp), 6: pGAPWT::*egfp* için PCR sonucu (483 bp). PCR GAPProV-İleri ve GAPProV-Geri primerleri kullanılarak Tablo 3.18.-3.19.'daki koşullar kullanılarak yapılmıştır





**Şekil 4.23 c** Transformasyondan sonra izole edilen pGAPPro#::*egfp* plazmidlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. **(Sol)** M: Gene Ruler DNA Ladder Mix, 1: *EcoRI* ile kesilmiş pPICZα-A::*egfp* (4286 bp), 2-3: *EcoRI* ile kesilmiş pGAPPro7::*egfp* (3586 bp), 4-5: *EcoRI* ile kesilmiş pGAPPro10::*egfp* (3523 bp), 6: *EcoRI/BglIII* ile kesilmiş pPICZα-A::*egfp* (3078 bp), 7-8: *EcoRI/BglIII* ile kesilmiş pGAPPro7::*egfp* (3078 bp), 9-10: *EcoRI/BglIII* ile kesilmiş pGAPPro10::*egfp* (3078 bp), 11-12: pGAPPro7::*egfp* için PCR sonucu (507 bp), 13-14: pGAPPro10::*egfp* (444 bp) için PCR sonucu. **(Sağ)** M: Gene Ruler DNA Ladder Mix, 1: *EcoRI* ile kesilmiş pPICZα-A::*egfp* (4286 bp), 2-4: *EcoRI* ile kesilmiş pGAPPro8::*egfp* (3586 bp), 5: *EcoRI* ile kesilmiş pGAPPro9::*egfp* (3596 bp) 6: *EcoRI/BglIII* ile kesilmiş pPICZα-A::*egfp* (3078 bp), 7-9: *EcoRI/BglIII* ile kesilmiş pGAPPro8::*egfp* (3078 bp), 10: *EcoRI/BglIII* ile kesilmiş pGAPPro9::*egfp* (3078 bp), 11-13: pGAPPro8::*egfp* için PCR sonucu (507 bp), 14: pGAPPro9::*egfp* için PCR sonucu (517 bp). PCR GAPProV-İleri ve GAPProV-Geri primerleri kullanılarak Tablo 3.18.-3.19.'daki koşullar kullanılarak yapılmıştır

#### 4.2.5. Tasarlanan P<sub>GAP</sub> Varyantlarını Taşıyan *P. pastoris* Suşlarının Oluşturulması

##### 4.2.5.1. Plazmidlerin Hazırlanması

pGAPPro#::*egfp* plazmidleri kontrol edildikten sonra, plazmidin *P. pastoris* genomuna integrasyonunu kolaylaştırmak için lineer hale getirilmiştir. Lineerizasyon işlemi plazmidlere uygun restriksiyon enzimi kullanılarak ve ortamdaki DNA miktarına göre 37°C'de 5 - 6 st inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir. Lineer hale getirilmiş DNA ürünü, Thermo Fisher Scientific PCR Safılaştırma Kiti ile safılaştırılmış; ancak elüsyon aşaması elüsyon tamponu ile değil, steril su kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Safılaştırılmış DNA'nın derişimi 20 µL'de 0.5-1 µg olacak şekilde ayarlanmıştır.

##### 4.2.5.2. *Pichia pastoris*'in Transfeksiyonu

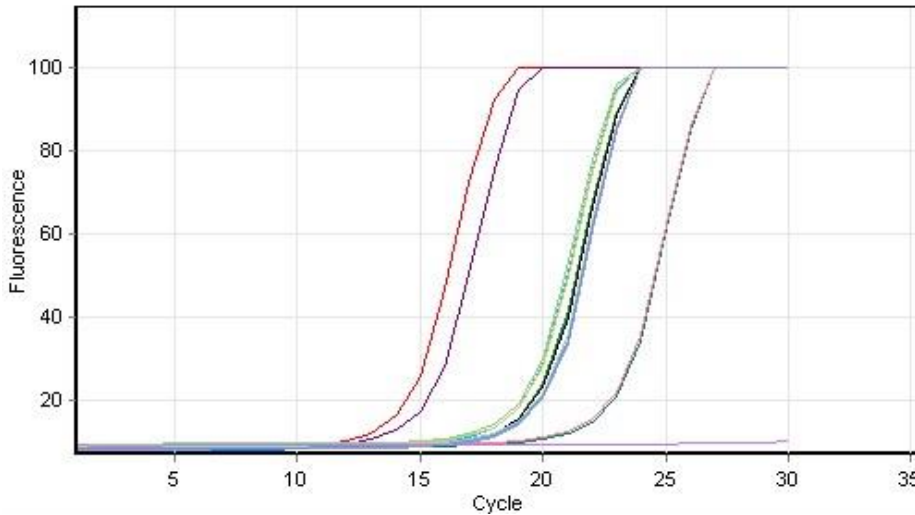
*P. pastoris*'in transfeksiyonu elektroporasyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir (Invitrogen, 2010). Transfekte edilen hücreler, 25 µg cm<sup>-3</sup> Zeocin içeren YPD ortamında 30°C'de 48 st inkübe edilmiştir. Her bir varyant için 8 koloni seçilmiş ve bu koloniler promotör kuvveti açısından taranmışlardır.

#### 4.2.6. Tek-Kopya *P. pastoris* Suşlarının Seçilmesi

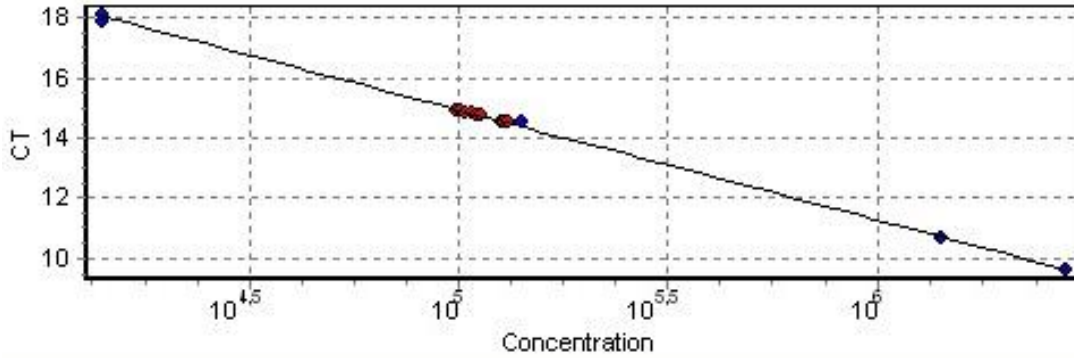
Farklı GAPPro# varyantlarının doğru bir şekilde ifade seviyelerinin karşılaştırılabilmesi için üretilen genin kopya sayısının bilinmesi ve birbirine eşit olması gerekir. Bu amaçla Kantitatif PCR (qPCR) yapılmıştır. qPCR için seçilen metot Mutlak Kuantifikasyon'dur. Bu yöntemde kısaca, genomdaki kopya sayısının 1 olduğu bilinen referans bir genin qPCR sonucunda elde edilen kopya miktarı kullanılarak, hedef genin genomdaki kopya sayısı bulunabilmektedir. Bu amaçla genomda 1 adet kopya taşıdığı bilinen *ARG4* geni seçilmiştir. Hesaplama için aşağıdaki formül kullanılmıştır:

$$\text{Hedef genin kopya sayısı (eGFP)} = \frac{\text{Hedef genin kopya miktarı (eGFP)}}{\text{Referans genin kopya miktarı (ARG4)}}$$

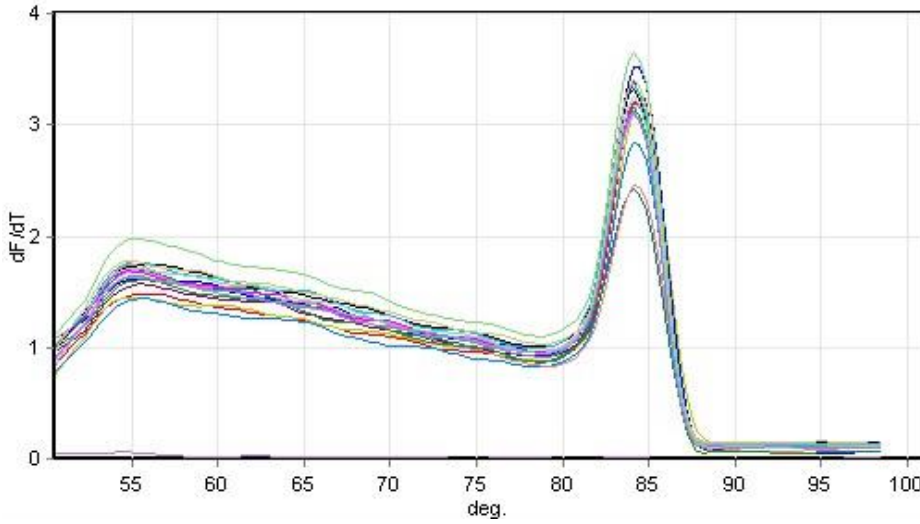
Bu yöntemde hedef genin kopya sayısı, formülde 1-1.4 olarak arasında ise 1 olarak, 1.5-2 arasında ise 2 olarak kabul edilmektedir (Abad vd., 2011). Tipik bir qPCR datasının temsili grafiği Şekil 4.24.'te verilmiştir. Tipik bir erime noktası analizi görüntüsü Şekil 4.25.'te, qPCR sonucunda elde edilen tipik bir standart eğri ise Şekil 4.26.'da verilmiştir. qPCR analizi Qiagen Corbett Rotor Gene Q cihazı ve Rotor Gene 6000 Software ile yapılmıştır. Kopya sayısının belirlenmesi için SYBR Green Mix (Roche) kullanılmıştır. Sonuç olarak kopya sayısı 1.0 olan en az 6 koloni, tek kopya koloni olarak seçilmiştir.



Şekil 4. 24. qPCR sonucunda elde edilen ham datanın görüntüsü



**Şekil 4. 25.** qPCR sonucunda elde edilen standart eğri. Mavi noktalar standart oluşturmak için kullanılan ve kopya miktarı bilinen örnekleri, kırmızı noktalar ise kopya miktarı bilinmeyen ve kopya sayısının belirlenmesi istenilen örnekleri göstermektedir



**Şekil 4. 26.** qPCR sonucunda elde edilen tipik bir erime noktası analizi. Tüm deneyler için negatif kontroller hazırlanmış ve erime noktası analizi sayesinde herhangi bir kontaminasyon ya da spesifik-olmayan ürün oluşup oluşmadığı kontrol edilmiştir

### 4.3. Geliştirilen $P_{GAP}$ Kütüphanesinin Taranması

$P_{GAP}$ , glikolizde yer alan konstitütif bir promotör olması yanında, farklı karbon kaynakları varlığında farklı ekspresyon seviyelerine erişebilmektedir (Weinhandl vd., 2014; Waterham vd., 1997). Özellikle glikoz ve gliserol varlığında, erişilen ekspresyon seviyesi artmaktadır. Dolayısıyla, tasarlanan sentetik  $P_{GAP}$  promotör kütüphanesinin farklı karbon kaynakları varlığında denenmesine karar verilmiştir. Bu bağlamda, *P. pastoris* metanolü metabolize edebilen bir maya hücresi olduğu için, tasarlanan promotörlerin ekspresyon gücünün metabol indüklemesine yanıtı da araştırılmıştır. Bunun yanı sıra, glikoliz, hücrenin çoğalması ve  $P_{GAP}$  kontrolünde üretilen rekombinant proteinin miktarı birbirine bağlı olduğundan, farklı hızlarda hücre çoğalmasını sağlayacak kısıtlı miktarda glikoz içeren üretim ortamı da tarama koşullarına dahil edilmiştir.

#### 4.3.1. Tasarlanan Varyantların Farklı Tarama Koşullarındaki Kuvvetleri

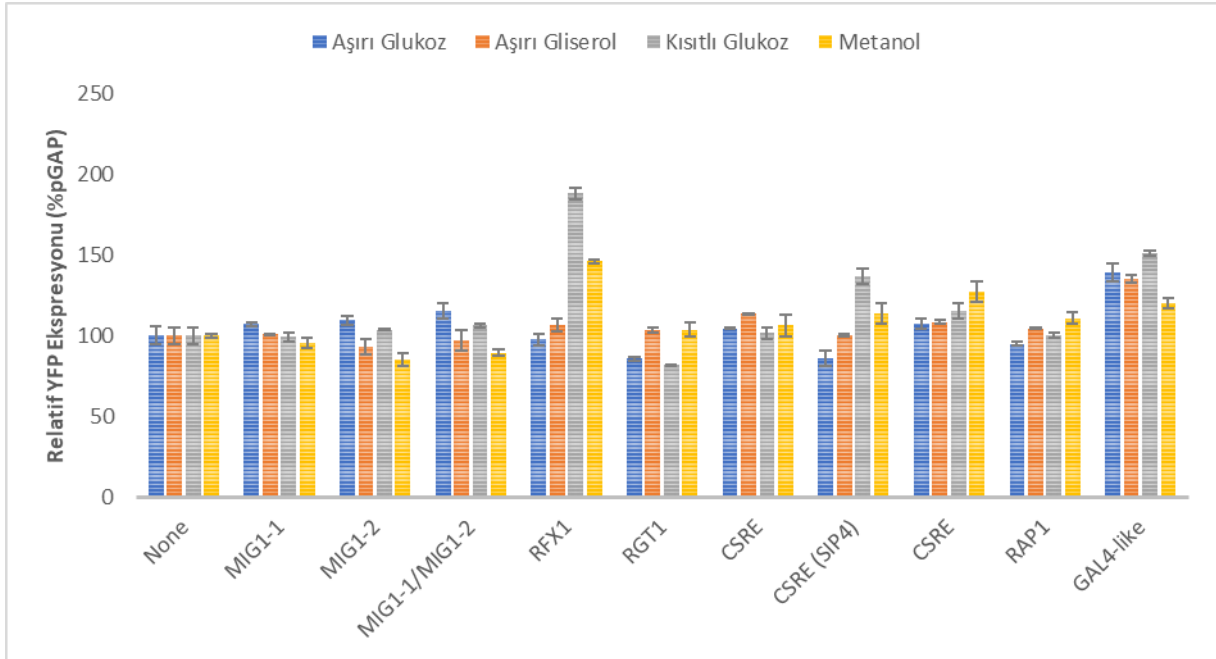
Farklı promotör varyantları tarafından üretilen hücre-içi YFP proteininin miktarının belirlenmesi için 24-kuyulu petri kâğıtları kullanılmıştır. Tasarlanan  $P_{GAP}$  varyantlarının farklı üretim koşullarındaki ekspresyon seviyeleri Tablo 4.5. ve Şekil 4.27.'de verilmiştir. Bu amaçla aşırı glikoz, aşırı gliserol, kısıtlı glikoz ve metanol indüklemesi kullanılmıştır. Farklı klonlardan gelecek varyasyonu ortadan kaldırmak için rastgele 6-8 klon seçilmiştir ve ekspresyon seviyesi (floresan) ve standart sapmalar bu klonların ortalamalarına göre hesaplanmıştır. Ayrıca, analiz sonucu yorumlanırken sadece monovaryant dağılıma sahip olan klonlar dikkate alınmıştır. Her bir tarama iki kez gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.5. ve Şekil 4.27.'de görülebileceği üzere, promotör varyantları farklı üretim ortamlarında beklenildiği gibi farklı tepkiler vermişlerdir. Daha yüksek spesifik çoğalma hızlarını ( $\mu$ ) sağlayan üretim ortamlarında (aşırı glikoz ve gliserol) modifiye edilmemiş  $P_{GAP}$ 'a göre daha fazla ekspresyon seviyesine ulaşılan promotörler olduğu gibi, bu koşullarda farklı bir yanıt vermeyen, ancak düşük spesifik çoğalma hızlarını ( $\mu$ ) sağlayan üretim ortamlarında (kısıtlı glikoz ve metanol) daha yüksek ekspresyon seviyelerine ulaşabilen promotörler mevcuttur. Farklı TF'ler farklı koşullarda  $P_{GAP}$  regülasyonunu düzenlediği için, bu sonuç beklenmektedir. Ayrıca, Prielhofer vd. (2015) makalesinde, farklı karbon kaynaklarının metabolizma üzerinde farklı etkileri olduğu açık bir şekilde belirtilmiştir. Buna ek olarak, aşırı glikoz ve gliserol ortamlarında elde edilen profillerin, kısıtlı glikoz ve metanol koşullarında elde edilen profillere göre birbirlerine benzer olduğu söylenebilir.

Aşırı glikoz ve gliserol koşullarında 10 kat daha az hücreyle üretime başlanmasına rağmen, yaklaşık 1.5 kat daha fazla hücreye ulaşılmıştır; bu sebeple bu üretim ortamlarında daha yüksek spesifik çoğalma hızına ulaşıldığı söylenebilir. Rebnegger vd. (2014), çalışmalarında, farklı büyüme hızlarının metabolizmaya etkisini araştırmışlar ve sonuçta, farklı TF'lerin hücrelerin spesifik çoğalma hızlarına göre üretimlerinin azaldığını ya da arttığını bulmuşlardır. Tüm bunlar göz önüne alındığında,  $P_{GAP}$ 'ın transkripsiyonel regülasyonunun farklı üretim ve tarama koşullarında farklı olacağı sonucuna ulaşabiliriz. Tablo 4.5. ve Şekil 4.27.'de verilen bulgular da bunu desteklemektedir.

**Tablo 4. 5.** Tasarlanan varyantların modifiye edilmemiş  $P_{GAP}$ 'a göre ekspresyon kuvvetleri (%)

Promotör Varyantı	Modifikasyon	Aşırı Glukoz	Aşırı Gliserol	Kısıtlı Glukoz	Metanol
WT	None	100±5.6	100±5.2	100±4.9	100±1.3
Pro6	<i>MIG1-1</i>	107±1.2	101±0.3	99±2.9	95±3.2
Pro1	<i>MIG1-2</i>	109±0.7	93±0.6	104±0.5	85±7.0
Pro5	<i>MIG1-1/MIG1-2</i>	115±1.3	97±1.8	106±1.5	89±4.2
Pro10	<i>RFX1</i>	98±5.5	107±2.3	188±3.4	146±3.2
Pro2	<i>RGT1</i>	86±3.0	103±4.9	82±0.1	104±3.7
Pro3	<i>CSRE</i>	105±4.8	114±6.6	101±3.9	106±1.7
Pro7	<i>CSRE (SIP4)</i>	86±4.7	100±0.5	137±4.7	114±6.2
Pro8	<i>CSRE</i>	108±3.2	109±1.0	115±4.7	127±6.5
Pro4	<i>RAP1</i>	95±3.7	105±4.0	100±1.4	111±1.2
Pro9	<i>GAL4</i>	139±1.3	135±0.2	151±1.7	120±3.6



**Şekil 4. 27.** Tasarlanan varyantların modifiye edilmemiş  $P_{GAP}$ 'a göre ekspresyon kuvvetleri (%)

*MIG* genlerinin ve kodladığı TF'lerin glukoz represyonunda *S. cerevisiae*'da önemli olduğu bilinmektedir (Gancedo, 1998). Dolayısıyla, bu TF'lerin bağlanma bölgelerinin silinmesinin (Pro1, Pro5, Pro6) etkisini en çok gösterdiği koşul aşırı glukoz varlığındadır. Bunun yanında, Pro1 (*MIG1-2*) ve Pro6 (*MIG1-1*) diğer üretim koşullarında farklı tepkiler vermişlerdir. Ayrıca, ikili silmenin gerçekleştiği (Pro 5-*MIG1-1/MIG1-2*) varyantın regülasyon profili Pro1'e

Pro6'dan daha çok benzemektedir. Gerçekten de, *MIG1-1* ve *MIG1-2* ters yönde regüle edilmekte ve *MIG1-2*'nin transkript miktarı *MIG1-1*'den daha fazladır (Prielhofer vd., 2015). Bu sonuçlara bakarak, *MIG1-2*'nin  $P_{GAP}$  üzerinde, *MIG1-1*'e göre daha önemli bir rolü olduğu söylenebilir. Ayrıca, *MIG1-1* ve *MIG1-2*'nin ayrı ayrı silinmesinin  $P_{GAP}$  üzerindeki etkisi, ikili silindikleri yarattıkları etkiden daha fazladır ve aşırı glikoz varlığında, YFP'nin üretimi %15 artmıştır.

Pro1 ve Pro6, aşırı gliserol varlığında farklı tepkiler vermişlerdir. Pro1'de elde edilen YFP ekspresyon seviyesi  $P_{GAP}$ 'a göre %7 daha azken, Pro6'da neredeyse değişmemiştir. Bu sonuçlara bakarak, gliserol gibi fermente edilmeyen bir karbon kaynağı varlığında, Mig1-1p ve Mig1-2p'nin farklı davrandığı söylenebilir. Ancak, yine fermente edilmeyen başka bir karbon kaynağı olan metanol varlığında ise, Pro1 ve Pro6, benzer bir profil göstermiştir. Ancak, *P. pastoris* metilotrofik bir maya hücresi olduğu için, metanol ve gliserolün ikisi de fermente edilmeyen karbon kaynakları olduğu halde, metabolizmaları farklı regüle edilmektedir (Prielhofer vd., 2015). Dolayısıyla, metanol ve gliserol varlığında farklı sonuçlar elde etmek beklenen bir durumdur.

*RGT1*(Pro2) ve *MIG1-2*(Pro1) MatInspector analizi sonucunda aynı yere bağlanıyor olduğu tahmin edilmiştir. *RGT1*, heksoz transport genlerinin regülasyonunda görev almaktadır ve yüksek glikoz derişimlerinde aktivatör olarak görev yapar ve *HXT1* genlerinin *S. cerevisiae*'da üretimini, dolayısıyla glikoz transport hızını artırır. Dolayısıyla, aşırı glikoz koşulunda, Pro2'nin daha  $P_{GAP}$ 'a göre daha fazla YFP üretimi sağlamasını bekleyebiliriz. Ancak, sonuçlar aksini göstermektedir ve aşırı glikoz koşullarında elde edilen ekspresyon seviyesi  $P_{GAP}$ 'ın %86'sıdır. Dolayısıyla bu bölgenin  $P_{GAP}$  üzerinde Rgt1p için bağlanma bölgesi olmayacağı sonucunu çıkarabileceğimiz gibi, Mig1-2p ve Rgt1p arasında  $P_{GAP}$ 'a bağlanmak için bir rekabet olduğunu ve denenen koşullarda Mig1-2p'nin daha iyi bağlandığını da söyleyebiliriz.

CSRE'ler (Carbon Source Responsive Elements) genellikle glukoneogenezisten sorumlu genlerin yapısında bulunan bağlanma bölgeleridir (Schüller, 2003). Bu bölgelere bağlanan önemli TF'ler arasında *CAT8-1*, *CAT8-2* ve *SIP4* bulunmaktadır ve bu TF'ler glikoz yokluğunda *S. cerevisiae*'da glukoneogenezis genlerini aktive ederler (Roth vd., 2004). Her ne kadar  $P_{GAP}$  glukoneogeneziste yer alan bir geni kodlamasa da pentoz fosfat yolizi gibi bir nodda yer aldığı ve karbon-kaynağı-bağımlı bir promotör olarak tanımlandığı için, MatInspector tarafından bulunan 3 farklı CSRE potansiyel promotör mühendisliği hedefi olarak dikkate alındığında bu bölgelerin tekrarlanmasıyla üç farklı varyant tasarlanmıştır (Pro3,7,8). Şekil 4.27.'de görüldüğü üzere, her üç varyant da farklı üretim koşullarında farklı profiller sergilemişlerdir. Dolayısıyla, bu bölgelere bağlanan farklı TF'ler olduğunu ve  $P_{GAP}$ 'ın regülasyonunda farklı şekillerde görev aldıklarını söyleyebiliriz. Ama, genel olarak, her üç varyantta da en yüksek ekspresyon seviyelerine glikoz olmadığında ya da kısıtlı olduğunda



ulaşmıştır (Tablo 4.5.). Bu üç varyant içinde, Pro3 en düşük kuvvete sahip olan promotör olmuştur ve Pro7 ve 8'e göre düşük veya yüksek hızla çoğalma koşullarında daha farklı bir profil sergilemiştir. Ancak, CAT8-2'nin çoğalma ile negatif olarak ilişkisi olduğu gösterildiğinden (Rebnegger vd., 2014) ve bu TF kısıtlı glikoz ve metanol varlığında daha fazla üretildiğinden, metanol ve kısıtlı glikoz gibi düşük hızla çoğalan hücrelerin bulunduğu koşullarda, Pro7 ve 8'de gözlemlendiği gibi,  $P_{GAP}$ 'tan daha yüksek ekspresyon seviyelerine ulaşılması beklenen bir sonuçtur. Dolayısıyla bu sonuçlar,  $P_{GAP}$ 'ta -142/-128 bp arasında bulunan (Pro3) CSRE bölgesinin ya başka bir TF tarafından kontrol edildiğini ya da  $P_{GAP}$  regülasyonu açısından fonksiyonel olmadığını göstermiştir. Sonuç olarak, CSRE'lerin  $P_{GAP}$  regülasyonunda önemli bir rol oynadığı açıktır, ancak hangi TF'lerin görev aldığı konusunda yorum yapmak için bilgimiz henüz yetersizdir.

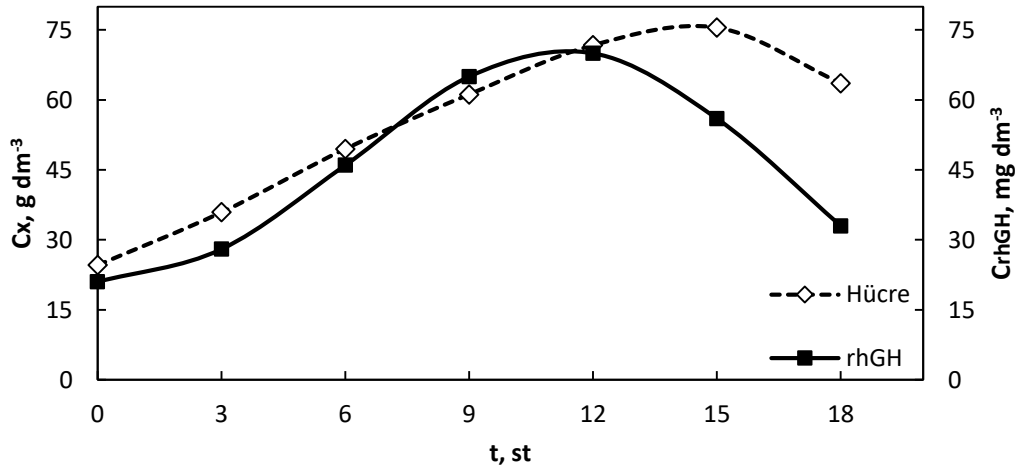
Regülatör faktör X (*RFX1*) *S. cerevisiae*'da genel bir represör olarak görev yapar. MatInspector analizi sonucunda  $P_{GAP}$  üzerinde 4 farklı Rfx1p bağlanma bölgesi bulunmuş ve bunların tümü silinmiştir (Pro10). Pro10, aşırı glikoz ve gliserol koşullarında hiç bir değişiklik göstermezken, kısıtlı glikoz ve metanol varlığında,  $P_{GAP}$ 'tan %88 ve %49 daha fazla YFP üretimi gerçekleştirmişlerdir. Bu sonuç, Rfx1p'nin özellikle düşük spesifik çoğalma hızlarının mevcut olduğu koşullarda  $P_{GAP}$  regülasyonunda görev aldığını göstermektedir. Gerçekten de, *RFX1* düşük büyüme hızlarında daha fazla üretilirken, yüksek büyüme hızlarının olduğu koşullarda daha az üretilmektedir (Rebnegger vd., 2014). Dolayısıyla, aşırı glikoz ya da gliserol gibi büyüme hızlarının daha yüksek olduğu koşullarda Rfx1p'nin transkript miktarı daha az olduğu için  $P_{GAP}$  regülasyonunda etkisi gözlenemezken, kısıtlı glikoz ya da metanol gibi hücre çoğalmasının daha yavaş olduğu koşullarda Rfx1p transkript miktarı daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, Rfx1p'nin, hücre düşük hızlarda çoğalırken,  $P_{GAP}$  tarafından daha düşük ekspresyon seviyelerine ulaşmasında rol oynayan TF'lerden biri olduğu söylenebilir ve bu TF'nin bağlanma bölgesi silinerek kısıtlı glikoz koşullarında yaklaşık 2 kat daha fazla YFP üretimi sağlanabilmiştir.

Gal4p, *S. cerevisiae*'da galaktoz kullanımından sorumlu genlerin aktivasyonunda görevli bir TF'dir. Ancak *P. pastoris* galaktoz kullanamaz, dolayısıyla Gal4p'nin metabolizmada farklı bir görevi olduğu düşünülebilir. Dolayısıyla, bu TF, proje kapsamında hedef olarak belirlenen TF'lerden biri olmuştur ve Gal4p'nin bağlanma bölgesi tekrarlanarak Pro9 oluşturulmuştur. Tablo 4.5. ve Şekil 4.27.'de görülebileceği üzere, Pro9, hangi üretim koşulu kullanılırsa kullanılsın her zaman  $P_{GAP}$ 'tan daha yüksek ekspresyon seviyelerine ulaşmıştır. En yüksek üretim seviyesine ise kısıtlı glikoz koşullarında ulaşılmış ve  $P_{GAP}$ 'tan 1.5 kat daha fazla YFP üretimi belirlenmiştir. Sonuç olarak, Gal4p'nin  $P_{GAP}$  regülasyonunda görev alan genel bir aktivatör olduğunu söyleyebiliriz ancak mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir.

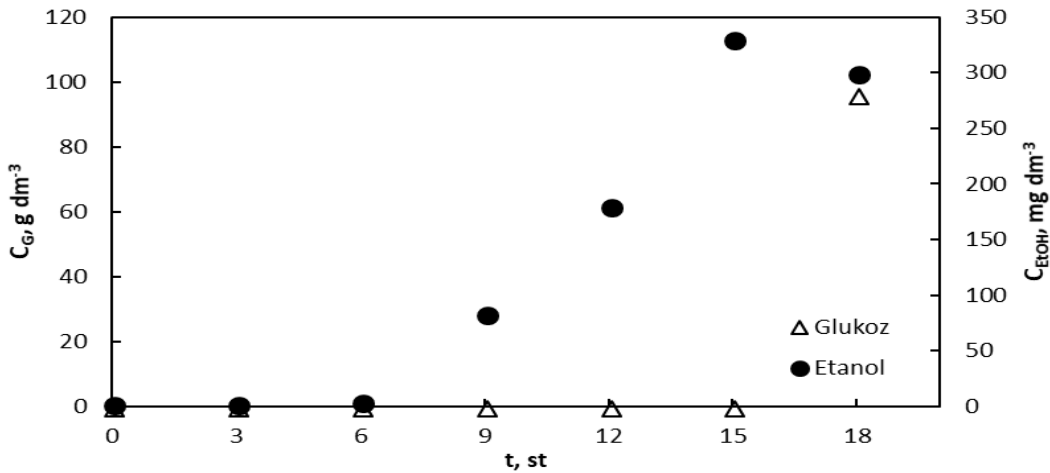
#### 4.4. pGAPZαA::hGH Taşıyan r-*P. pastoris*'in rhGH Üretim Performansının Araştırılması

pGAPZαA::hGH taşıyan *P. pastoris* suşu ile pilot ölçek rhGH üretiminde, hücre ve rhGH derişiminin kalma süresi ile değişimi Şekil 4. 28.'de verilmiştir. Şekillerde üretim fazı, glikoz yarı-kesikli beslenmeye başlama fazı (Faz II), anlatımda kolaylık sağlaması için  $t = 0$  st olarak gösterilmiştir. En yüksek hücre derişimi  $t = 15$  st'te  $C_x = 75 \text{ g dm}^{-3}$  olarak bulunmuştur. rhGH derişimi  $t = 12$  st'te  $70 \text{ mg dm}^{-3}$  olarak elde edilmiştir.

Bu suş ile yapılan fermentasyon süresince ortamdaki glikoz ve etanol derişimleri ölçülmüş, analiz sonuçları Şekil 4. 29.'da sunulmuştur.  $t = 15$  st'e kadar ortamdaki glikozun tamamının tüketildiği,  $t = 15$  st'ten sonra ise hücre derişiminin düşmesi ile glikoz konsantrasyonunda yükselme gözlemlenmiştir. Bununla birlikte maksimum glikoz derişimi  $t = 18$  st'te  $C_G = 96 \text{ g dm}^{-3}$  olarak bulunmuştur.  $t = 0 - 6$  st'leri arasında ortamda etanol bulunmadığı,  $t = 6$  st'ten sonra ise etanol derişiminin artmaya başladığı ve  $t = 15$  st'te en yüksek değeri olan  $0.33 \text{ g dm}^{-3}$ e ulaştığı belirlenmiştir.



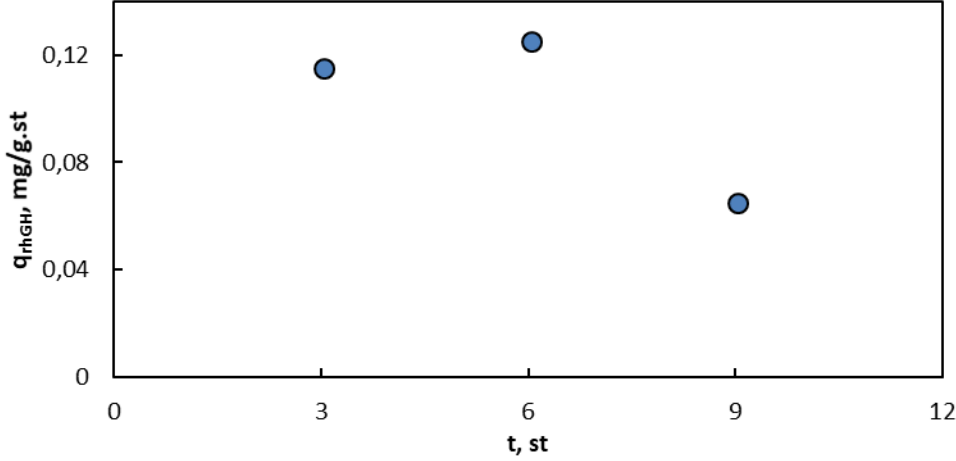
Şekil 4. 28. Hücre ve rhGH derişimlerinin kalma süresi ile değişimi



Şekil 4. 29. Glikoz ve etanol derişimlerinin kalma süresi ile değişimi



Spesifik rhGH üretim hızı ( $q_{rhGH}$ ) Şekil 4. 30'da verilmiştir.  $t = 6$  st'e kadar  $q_{rhGH}$  artmış ve maksimum değer olan  $0.126 \text{ mg/g.st}$ 'e ulaşmıştır. Proses sonuna kadar ise  $q_{rhGH}$  değeri düşmüştür.



**Şekil 4. 30.** Kalma süresiyle spesifik rhGH üretim hızının değişimi

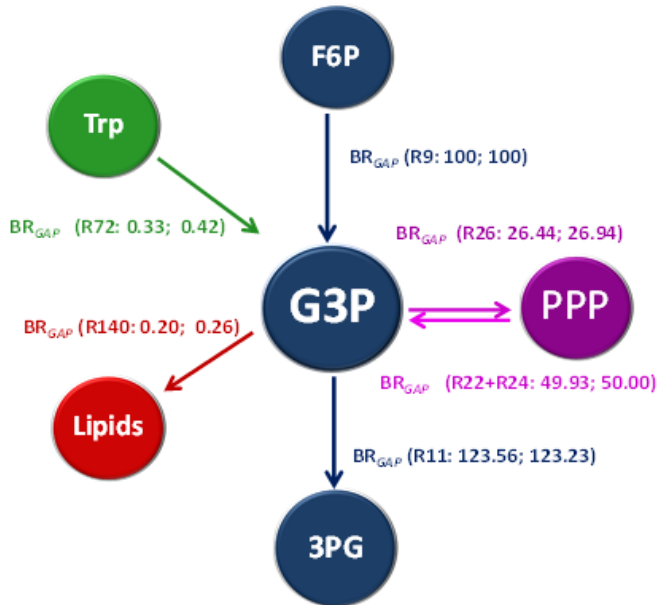
#### 4.5. $P_{GAP}$ Metabolik Akı Analizi (MFA)

**Yeni (novel) piruvat- dallanma noktası promotörleri r-protein üretimi yönünde karbon akışını indükler:**

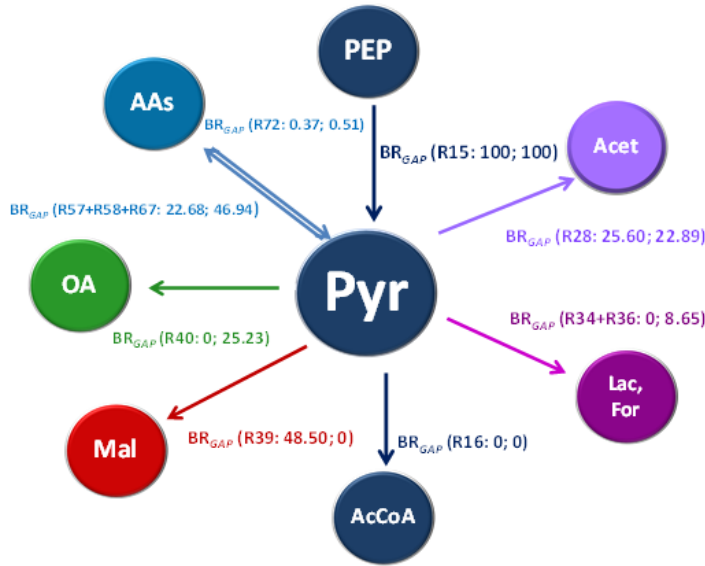
$P_{GAP}$  altında çalışan r- *P. pastoris* için hücre içi akı dağılımları glikoz yarı-kesikli besleme evresi (GFB) iki aşamaya bölünerek tasarlandı ve oluşturuldu. Fermantasyonun GFB evresinin ilk kısmı olan birinci aşama ( $0 < t < 3$  st) rhGH sentezinin başladığı süredir. rhGH üretimin arttığı ve en yüksek derişimine ulaştığı süre ise ikinci aşamadır ( $3 \text{ st} < t < t_{\max, hGH}$ ). Birinci aşamanın  $t = 3$  st için ve ikinci aşamanın  $t_{\max}$  zamanından 2 - 3 st öncesi için gerçek akılar ve göreceli akılar ve bunların değişimlerini ifade etmek için glikoz tüketimine göre metabolik akılar ( $\text{mmol gDCW}^{-1} \text{ st}^{-1}$ ) ve normalize edilmiş akılar (NF) hesaplandı. En yüksek r-protein derişiminin elde edildiği zaman  $t_{\max}$  saatidir ve bu saatten sonra fermantasyon durdurulmuştur. İkinci aşama için  $t=6$  st için  $P_{GAP}$  kontrolünde r-*P. pastoris* fermantasyonlarının metabolik akı analizleri yapılmıştır. GFB'nin ikinci aşamasında glikoz tüketim akıları  $P_{GAP}$  biyoreaktörü ( $BR_{GAP}$ ) için  $1.19 \text{ gDCW} / \text{st}$  olarak elde edilmiştir. Birinci ve ikinci aşamadaki glikoliz izyolu içinde gliseraldehit 3-fosfat (G3P) dallanma noktası çevresinde normalize edilmiş hücre içi reaksiyon akıları R9 akısına göre hesaplanmıştır (Şekil 4.31). Bununla birlikte, normalize akılar piruvat dallanma noktası çevresinde R15 akısına (Şekil 4.32.) göre elde edilmiştir. Glikoliz izyolundaki karbon akışı G3P ve PEP'ten piruvata doğru iki aşamada da tersinemez bir şekilde gerçekleşmiştir.

$BR_{GAP}$  için yapılan metabolik akı analizi pentoz fosfat izyolunun büyük ölçüde aktif olduğunu ve glikoz katabolizmasının önemli bir bölümünün pentoz fosfat izyoluna gittiğini göstermektedir. TCA döngüsüne giden karbon akışının kısıtlı olduğunu gösteren, glikoliz izyolundan dallanan reaksiyonların akıları ve anaplerotik (yerine koyma reaksiyonlarının) reaksiyonların akıları da yüksek bulunmuştur. Bundan dolayı, *P. pastoris* aerobik fermantasyonlarında yüksek anaplerotik tepkime akıları ve düşük TCA döngüsü akıları *P. pastoris* fenotipinde crabtree negatiften crabtree pozitif bir düzenleyici anahtar (regulatory switch) bulunabilirliğini, araştırmaya grubumuzunda çalışıldığı üzere, belirtmektedir.

G3P'den başlayarak glikoliz izyolunun ikinci (pay-off) fazında akılar yüksektir. TCA döngüsü *P. pastoris*'te sorunsuz bir şekilde çalışmadığı için, piruvat kinaz tarafından katalizlenen R15 reaksiyonu sitrat tarafından inhibe edilmemiştir. Bununla birlikte, piruvat karboksilaz tarafından katalizlenen R28 tepkimesi PEP tarafından inhibisyona uğramamıştır. Pyr'tan AcCoA'ya glikoliz izyolunda R16 reaksiyon akısı GFB'nin her iki aşamasında da sıfır bulunmuştur. Bundan başka, AcCoA oluşumu ile ilgili reaksiyon R36 sadece GFB evresinin ikinci aşamasında aktiftir. R16 reaksiyon akısı olmamasına rağmen sürekli glikoz beslemesinden dolayı karbon molekül akışı glikoneojenez izyoluna yönlenmemiştir. R16 tepkimesinin etkisizleşmesi Pyr'tan AcCoA üreten reaksiyonun inhibe edildiğini göstermektedir.  $BR_{GAP}$  fermantasyonunda R29 tepkimesi ile piruvat, asetat sentezlenmesi için kullanılmıştır.



Şekil 4. 31. G3P dallanma noktasındaki akı dağılımı



Şekil 4. 32. Piruvat dallanma noktasındaki akı dağılımı

#### 4.6. pGAPPro#::hGH Taşıyan Klonların Geliştirilmesi

##### 4.6.1. rhGH Üretimi İçin Promotör Varyantlarının Seçimi

Bir önceki bölümde tartışıldığı üzere, farklı üretim ortamlarında ekspresyon kuvvetleri taranan promotör varyantlarından en fazla yeşil floresan protein (YFP) üretim kapasitesine sahip olan iki promotör, Pro9 ve Pro10, rekombinant insan büyüme hormonu (rhGH) üretim kapasitesinin araştırılması için seçilmiştir.

Tablo 4.6.'da görüldüğü üzere, Pro10 varyantının ekspresyon seviyesi ortamda aşırı glikoz varken (%2),  $P_{GAP}$ 'la yaklaşık aynı değerdedir. Ancak kısıtlı glikoz içeren üretim ortamı kullanıldığında, ekspresyon seviyesi neredeyse 2 kat daha fazladır. Standart bir üretim prosesinde glikozun kısıtlı bir şekilde beslendiği göz önüne alınarak, Pro10 da Pro9 ile birlikte rhGH üretim kapasitesinin araştırılması için seçilmiştir.

Tablo 4. 6. rhGH üretimi için seçilen promotör varyantlarının özellikleri

Varyant	TFBB motifi <sup>1</sup>	$P_{GAP}$ 'ta bulunduğu bölge	Bağlanan olası TF <sup>2</sup>	Yapılan değişiklik	$P_{GAP}$ 'a göre ekspresyon seviyesi (%)	göre
Pro9	ggTCGGgtaca cgacctccgttta	-215 to - 189	<i>GAL4</i>	Tekrarlanma	Aşırı 139% Kısıtlı %150	Glikoz:
Pro10	gctccgttGCAActc tcggagttGCAAcgg acctgctgGCAAcgt gattattgGAAAcCa	-418'den 384'e -123'den - 106'ya	<i>RFX1</i>	Silinme	Aşırı 101% Kısıtlı %190	Glikoz:

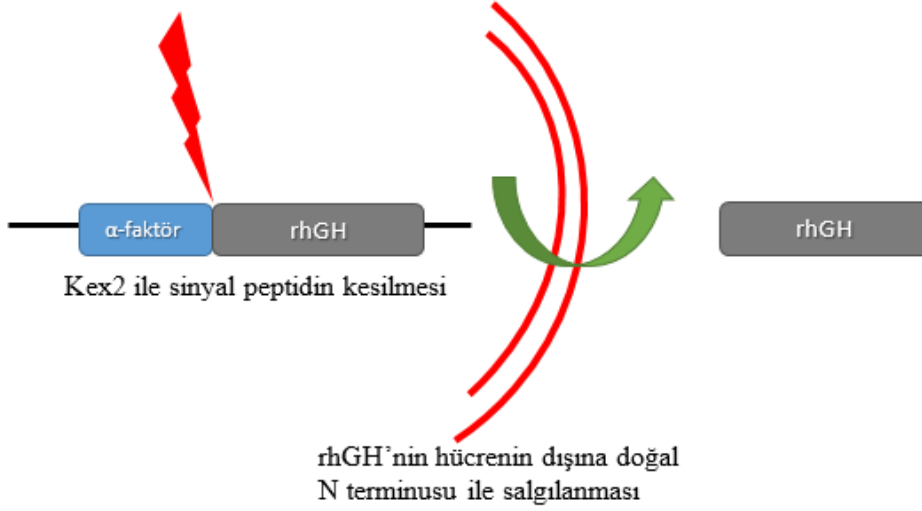
<sup>1</sup> TFBB: Transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesi

<sup>2</sup> TF: Transkripsiyon faktörü

## 4.6.2. pGAPPro#::*hGH* Plazmidlerinin Oluşturulması ve *E. coli* Transformasyonu

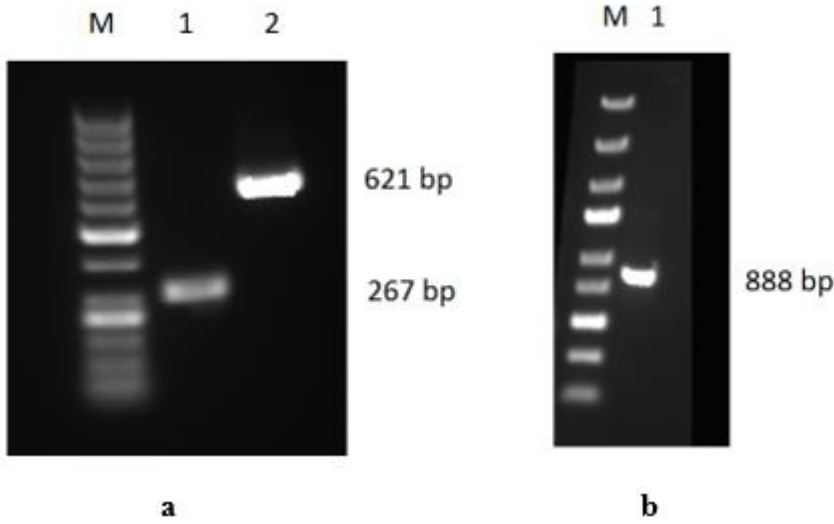
### 4.6.2.1. $\alpha$ -faktör-rhGH DNA Fragmentinin Oluşturulması

Pro9 veya Pro10 kontrolü altında üretilecek olan  $\alpha$ -faktör-rhGH DNA fragmenti, ürün hücre dışına salgılandığında doğal N terminus içerecek şekilde tasarlanmıştır (Şekil 4.33.).



**Şekil 4. 33.** rhGH'nin Kex2 ile kesilerek hücre dışına çıkarılması

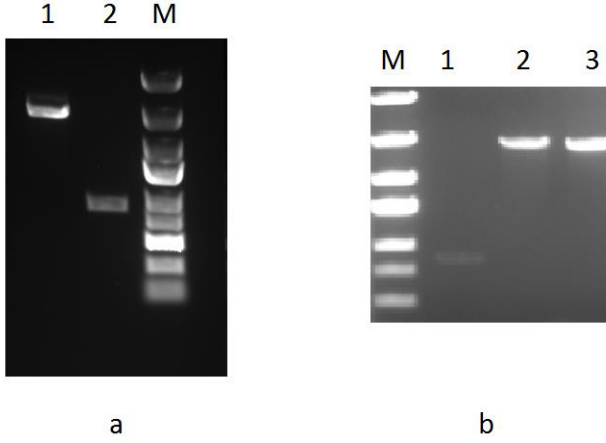
Füzyon PCR yöntemiye çoğaltılan *hGH* geninin agaroz jel görüntüsü Şekil 4.34.a'da gösterilmiştir. Bu PCR sonucunda elde edilen ürünler saflaştırılarak ikinci PCR'de kalıp olarak kullanılmıştır. En son ürün olan  $\alpha$ -faktör-rhGH DNA fragmentinin PCR ile amplifikasyon sonucu Şekil 4.34.b'de verilmiştir. Elde edilen  $\alpha$ -faktör-rhGH DNA fragmenti saflaştırılarak pGAPZ $\alpha$ ::*hGH* ve pGAPPro#::*hGH* plazmidlerinin oluşturulmasında kullanılmıştır.



**Şekil 4. 34. (a)**  $\alpha$ -faktör ve rhGH'nin çoğaltıldığı 1. PCR sonucu. M: 50 bp DNA Ladder, Gene Ruler; 1:  $\alpha$ -faktör, 2: rhGH **(b)**  $\alpha$ -faktör ve rhGH'nin birleştirildiği 2. PCR sonucu. M: GeneRuler Express DNA Ladder, 1:  $\alpha$ -faktör-rhGH DNA fragmenti.

#### 4.6.2.2. pGAPZa::*hGH* ve pGAPPro#::*hGH* Plazmidlerinin Oluşturulması

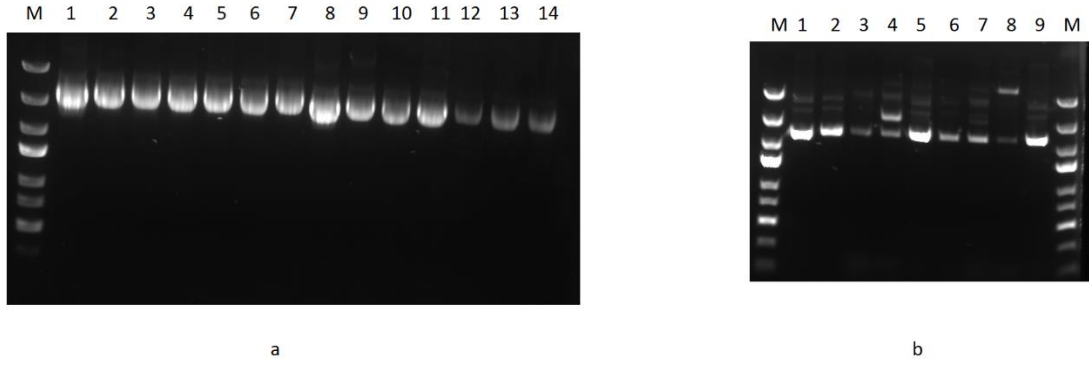
Farklı  $P_{GAP}$  varyantlarını taşıyacak olan pGAPPro#::*hGH* plazmidlerinin oluşturulması için daha önceki gelişim raporlarında tasarlanan pGAPZ::*egfp* ve pGAPPro#::*egfp* plazmidleri kullanılmıştır (Şekil 4.35.). Bu amaçla öncelikle *Bsp119I* ve *KpnI* enzimleri kullanılarak *egfp* geni uzaklaştırılmıştır. İkili kesme reaksiyonu 37°C'de 2 st süresince gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon, ısı inaktivasyonu ile 65°C'de 20 dk inkübasyon ile sonlandırılmıştır.  $\alpha$ -faktör-rhGH DNA fragmentinin kesildikten sonraki görüntüsü, sadece bir kaç baz çifti kesildiği için farklı bir şekilde görüntülenememiştir. Ancak plazmidlerin tamamen kesildiği, 1  $\mu$ L örneğin agaroz jel elektroforezde koşturulması ile görüntülenmiştir (Şekil 4.35.). Aynı miktarda plazmid ve DNA fragmenti kullanıldığı için, kesme işleminin aynı sürede tamamlandığı kabul edilmiştir. Örnekler ikili kesme tepkimesinden sonra Thermo Scientific Jel Elüsyon Kiti ile jelden alınarak saflaştırılmıştır. Örneklerin derişimi, 10 kat seyreltilmiş örneklerin jel elektroforez görüntüsü kullanılarak tespit edilmiş ve daha sonra ligasyon işlemi bu derişimler göz önüne alınarak yapılmıştır. Ligasyon 3:1 molar oranı kullanılarak yapılmıştır. Ligasyon reaksiyonu 22°C'de 1 st inkübasyon ile gerçekleştirilmiş ve 65°C'de 10 dk bekletilerek sonlandırılmıştır.



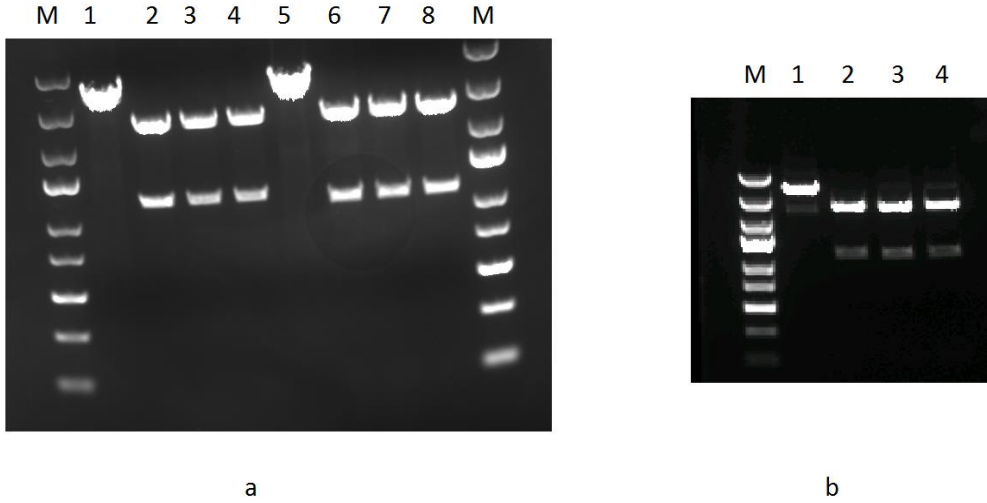
**Şekil 4. 35.** İkili kesme tepkimesinden sonra elde edilen saflaştırılmış plazmidler ve  $\alpha$ -faktör-rhGH DNA fragmenti. **(a)** 1: *Bsp119I* ve *KpnI* ile kesilmiş pGAPWT::*egfp* plazmidi, 2: *Bsp119I* ve *KpnI* ile kesilmiş  $\alpha$ -faktör-rhGH DNA fragmenti, M: GeneRuler Express DNA Ladder **(b)** M: Gene Ruler Express DNA Ladder, 1: *Bsp119I* ve *KpnI* ile kesilmiş  $\alpha$ -faktör-rhGH DNA fragmenti, 2: *Bsp119I* ve *KpnI* ile kesilmiş GAPPro9::*egfp* plazmidi, 3: *Bsp119I* ve *KpnI* ile kesilmiş GAPPro10::*egfp* plazmidi.

#### 4.6.2.3. pGAPZ $\alpha$ ::*hGH* ve pGAPPro#::*hGH* Plazmidlerinin *E. coli*'ye Transformasyonu

Elde edilen ligasyon karışımı, *E. coli* TOP10 hücrelerinin CaCl<sub>2</sub> yöntemiyle transformasyonu için kullanılmıştır (Sambrook ve Russell, 2001). Seçilen koloniler yeni katı ortama aktarılmış ve plazmidleri Thermo Fisher Scientific Plazmid İzolasyon Kiti kullanılarak izole edilmiştir. Her bir olası pGAPPro#::*hGH* plazmidi için 6 koloni, plazmid izolasyonu için seçilmiştir. İzole edilen plazmidler agaroz jel elektroforezde görüntülenmiştir (Şekil 4.36.).  $\alpha$ -faktör-rhGH DNA fragmenti, yerine yerleştirilen *egfp* gen dizininden 168 bp daha uzun olduğu için, doğru plazmidlerin negatif kontrol plazmidi (pGAPPro#::*egfp*) temel plazmidin arkasında görüntülenmesi beklenmiştir. Dolayısıyla, temel plazmidten daha yavaş koşan plazmidler doğru transformant olarak kabul edilmiş ve 3 tanesi seçilerek daha ileri kontroller yapılmıştır. Bu ileri kontroller, izole edilen plazmidler içerisinde  $\alpha$ -faktör-rhGH DNA fragmentinin varlığını hem PCR kontrolü ile hem de plazmidin *BglII* restriksiyon enzimi ile kesilmesi sonucu kanıtlamıştır. Bu plazmidlerin ileri kontrollerinin sonuçları agaroz jel elektroforez kullanılarak görüntülenmiştir (Şekil 4.37.). Beklendiği gibi, *BglII* negatif kontrol olan plazmidleri tek bir bölgeden kesmiş ve tek bir bant elde edilmiştir, olası pozitif pGAPPro# $\alpha$ ::*hGH* plazmidini ise iki noktadan keserek iki bant görülmesine sebep olmuştur. Her bir pGAPPro#::*hGH* plazmidi için iki adet koloni seçilmiş ve bu kolonilere ait plazmidler sekanslanarak doğrulanmıştır (ODTÜ Merkez Laboratuvarı). Doğru sekansa sahip olan plazmidleri taşıyan *E. coli* hücrelerinin gliserol stoğu yapılarak daha sonra deneylerde kullanılmak üzere -80°C'de saklanmıştır.



**Şekil 4. 36.** Transformasyon sonucu elde edilen izole plazmidler. **(a)** M: GeneRuler Express DNA Ladder, 1: GAPPro9::*egfp* (negatif kontrol), 2-7: Olası pozitif GAPPro9:: $\alpha$ -*hGH* plazmidleri, 8: GAPPro10::*egfp* (negatif kontrol), 9-14: Olası pozitif GAPPro10:: $\alpha$ -*hGH* plazmidleri. **(b)** M: GeneRuler Express DNA Ladder, 1: GAPWT::*egfp* (negatif kontrol), 2-9: Olası pozitif GAPWT:: $\alpha$ -*hGH* plazmidleri.



**Şekil 4. 37.** *Bgl*II ile kesilen transformasyondan sonra seçilmiş plazmidlerin agaroz jel görüntüsü. **(a)** M: GeneRuler Express DNA Ladder, 1: GAPPro9::*egfp* (negatif kontrol), 2-4: Olası pozitif GAPPro9:: $\alpha$ -*hGH* plazmidleri, 5: GAPPro10::*egfp* (negatif kontrol), 6-8: Olası pozitif GAPPro10:: $\alpha$ -*hGH* plazmidleri. **(b)** M: GeneRuler Express DNA Ladder, 1: GAPWT::*egfp* (negatif kontrol), 2-4: Olası pozitif GAPWT:: $\alpha$ -*hGH* plazmidleri.

#### 4.6.3. pGAPZ $\alpha$ ::*hGH* ve pGAPPro::*hGH* Plazmidlerinin *P. pastoris*'e Transformasyonu

pGAPPro::*hGH* plazmidleri kontrol edildikten sonra, plazmidin *P. pastoris* genomuna entegrasyonunu kolaylaştırmak için lineer hale getirilmiştir. Lineer hale getirilmiş DNA ürünü, Thermo Fisher Scientific PCR Saflaştırma Kiti ile saflaştırılmış; ancak elüsyon aşaması elüsyon tampon ile değil, steril su kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *P. pastoris*'in

transformasyonu elektroporasyon yöntemi ile yapılmıştır (Invitrogen, 2010). Seçilen kolonilerin rhGH üretim kapasitesinin araştırılması için gliserol stokları hazırlanmış ve -80°C'de saklanmışlardır.

#### **4.7. pGAPZαA::hGH ve pGAPPro#::hGH Taşıyan r-P. pastoris'in rhGH Üretim Performansının Hava Filtreli Çalkalamalı Biyorektörlerde Araştırılması**

P<sub>GAP</sub>, glikolizde yer alan konstitütif bir promotör olması yanında, farklı karbon kaynakları varlığında farklı ekspresyon seviyelerine erişebilmektedir (Weinhandl vd., 2014; Waterham vd., 1997). Özellikle glikoz varlığında ekspresyon seviyesi artmaktadır. Dolayısıyla rhGH üretim kapasitesinin araştırılması için karbon kaynağı olarak glikoz kullanılmasına karar verilmiştir. Bunun yanı sıra, daha önceki bölümde tartışıldığı üzere, seçilen promotör varyantları en yüksek ekspresyon seviyesine kısıtlı glikoz koşullarında ulaşmıştır. Ayrıca, standart olarak kullanılan glikoz temelli bir besleme stratejisinde glikoz genellikle kısıtlı koşullarda beslendiği için kısıtlı glikoz koşullarının da tarama sürecine eklenmesi uygun görülmüştür.

##### **4.7.1. pGAPZαA::hGH ve pGAPPro#::hGH Taşıyan r-P. pastoris'in rhGH Üretim İçin Üretim Ortamı Koşullarının Belirlenmesi**

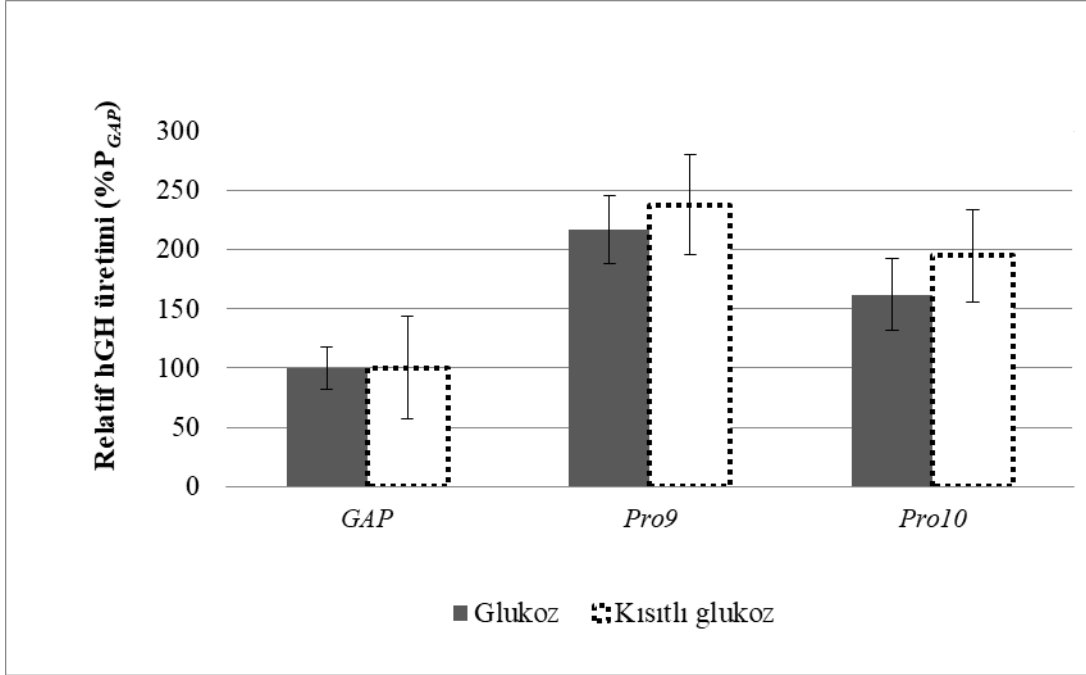
Seçilen promotör varyantlarının rhGH üretim kapasitesinin araştırılması için iki farklı üretim ortamı denenmiştir. Farklı promotör varyantları tarafından üretilen hücre-dışı rhGH protein miktarının belirlenmesi için 24-kuyulu petripler kullanılmıştır. Her bir varyantı temsilen rastgele 6-8 klon seçilmiştir. Üretim koşullarının belirlenmesi için yapılan deneylerde, karşılaştırma amaçlı, sadece pGAPWT::α-hGH plazmidini taşıyan r-P. pastoris suşu kullanılmıştır.

Farklı klonlar ile elde edilen biyokütle ölçümlerinde anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Ancak, üretim ortamı 1'de üretim ortamı 2'ye göre yaklaşık %20 daha az biyokütle elde edilmiştir. Üretim ortamı 2'de daha yüksek biyokütle elde edilmiştir ve buna bağlı olarak, daha fazla rhGH üretimi sağlandığı için sonraki deneylerde kullanılmak üzere üretim ortamı 2 seçilmiştir.

##### **4.7.2. pGAPZαA::hGH ve pGAPPro#::hGH Taşıyan r-P. pastoris'in rhGH Üretim Kapasitesinin Araştırılması**

Pro9 ve Pro10 kullanılarak yapılan rhGH üretim kapasiteleri değerlendirilmiştir. Üretim sonunda %2 başlangıç glikoz derişimi içeren ortamda hücreler yaklaşık 60 g dm<sup>-3</sup> derişime ulaşırken, kısıtlı glikoz ortamında yaklaşık 100 g dm<sup>-3</sup> derişime ulaşmıştır. Ne suşlar ne de klonlar arası elde edilen final biyokütle miktarında bir fark gözlenmemiştir. Pro9 ve Pro10'un doğal P<sub>GAP</sub>'a göre rhGH üretimini gösteren veriler Şekil 4. 38.'de verilmiştir.





**Şekil 4. 38.** Pro9 ve Pro10'un doğal P<sub>GAP</sub>'a göre rhGH üretimi kapasiteleri

Şekil 4.38.'de görüldüğü üzere, hem Pro9 hem de Pro10, rhGH üretim kapasitesi açısından doğal promotör olan P<sub>GAP</sub>'a göre daha güçlü bir ekspresyon seviyesine ulaşmıştır. Aşırı glikoz içeren ortamda Pro9 P<sub>GAP</sub>'a göre 2.2- katlık bir artış sağlarken, Pro10 1.6 katlık bir artış sağlayabilmiştir. Ancak, her iki promotör için de, kısıtlı glikoz içeren üretim ortamının, ulaştıkları rhGH üretimi açısından daha uygun koşullar sağladığı görülmektedir. Kısıtlı glikoz içeren ortamda, Pro9 ve Pro 10, doğal promotör olan P<sub>GAP</sub>'a göre, sırasıyla 2.4 ve 2 kat daha fazla rhGH üretimi gerçekleştirebilmişlerdir. Standart bir glikoz tabanlı üretim prosesinde, glikozun kısıtlı olarak kullanıldığını göz önüne alırsak, tasarlanan promotörlerin endüstriyel üretim açısından umut vadecici olduğu çıkarımı yapılabilir. Tasarlanan varyantlardan Pro9, her iki koşulda da hem Pro10'dan hem de doğal promotör P<sub>GAP</sub>'tan daha fazla rhGH üretim kapasitesine sahip olması sebebiyle, P<sub>GAP</sub> ile birlikte projenin sonraki aşamalarında laboratuvar ölçekli biyoreaktör deneylerinde kullanılmak üzere seçilmiştir.

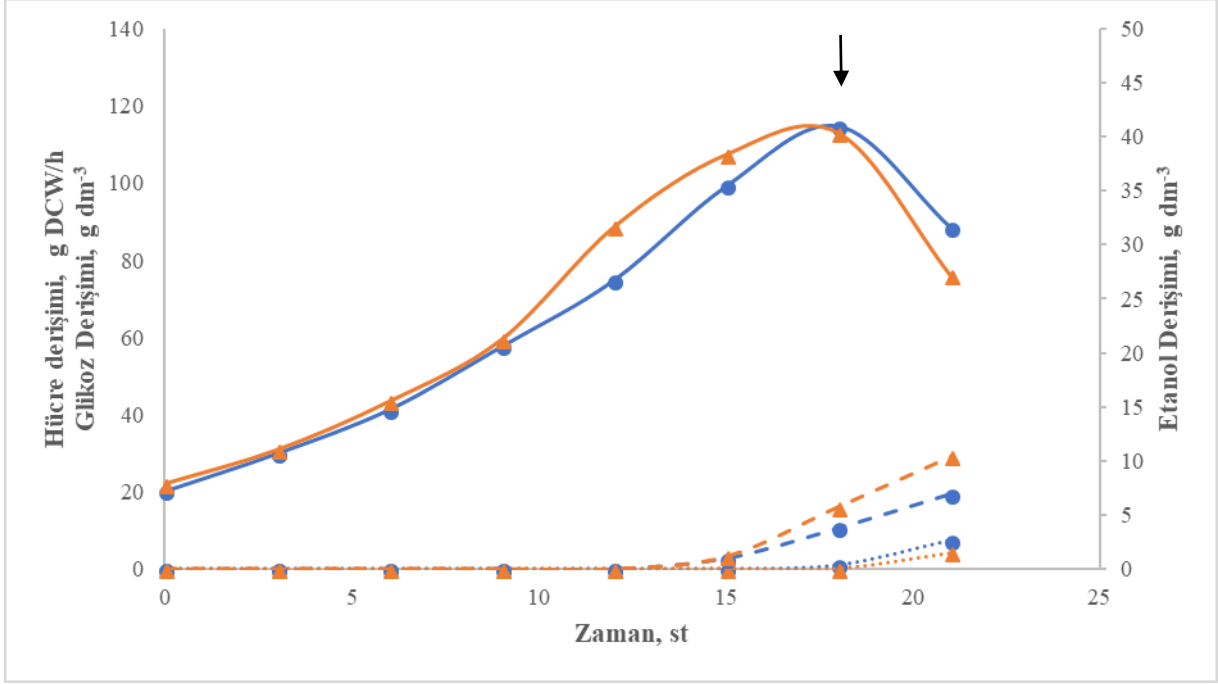
#### 4.8. Yarı-kesikli Biyoreaktörde P<sub>GAP</sub> ve Pro9 Promotörlerinin rhGH Üretim Kapasitesinin Araştırılması

Yarı-kesikli biyoreaktör üretim prosesi P<sub>GAP</sub> ve Pro9 suşlarının hGH üretim kapasitelerinin araştırılması için 2 kademeli olarak tasarlanmıştır: i) kesikli faz, ii) yarı kesikli faz. İlk fazda, karbon kaynağı olarak, hücrelerin OD<sub>600</sub> = 80-85 (C<sub>x</sub> ~20 g dm<sup>-3</sup>, t<sub>T</sub> = 21 st) ulaşmasını sağlayacak kadar gliserol kullanılmıştır. İkinci fazda ise, karbon kaynağı glikoz ile değiştirilmiş ve önceden belirlenmiş eksponansiyel besleme hızına göre  $\mu_0 = 0.1 \text{ st}^{-1}$  olacak şekilde besleme profili oluşturulmuştur.

Üretim süresince sıcaklık 30°C'de, pH 5.0'te (%25 amonyum çözeltisi kullanılarak) tutulmuştur. Kesikli fazda, çözünmüş oksijen derişimi %20'ye ayarlanmış ve  $N = 600$  rpm ve  $Q_0/V = 1$  vvm ile başlayarak giderek artan volümetrik hızlarla kontrol edilmiştir.  $t = 21$  st'ten sonra, yarı-kesikli faza geçilmiş ve  $t = 0$  st olarak alınmıştır. Yarı-kesikli fazda, çözünmüş oksijen derişimi Güneş ve Çalık (2016) makalesinde araştırıldığı üzere  $DO = \%15$  olarak tutulmuştur. Sisteme beslenen hava, gerektiğinde en fazla  $Q_0/V = 2$  vvm olacak şekilde oksijen ile zenginleştirilmiştir. Aşırı köpüklenme %10 anti-köpük çözeltisi (Y-30 Solution, Sigma) ortama eklenerek engellenmiştir.

#### 4.8.1. Glikoz Tüketimi, Etanol Üretimi ve Hücre Çoğalması

Glikoz ve hücre derişimi profilleri Şekil 4.39.'de verilmiştir. Şekilden görüldüğü üzere,  $t = 15$  st'ten itibaren biyoreaktördeki glikoz derişimi artmaya başlaması, bu saate kadar beslenen glikozun hücreler tarafından tamamen tüketildiğini göstermektedir. Biyoreaktör üretimleri boyunca hesaplanan spesifik glikoz tüketim hızları Tablo 4.7.a'da verilmiştir.  $P_{GAP}$  ve Pro9 suşları için spesifik glikoz tüketim hızları sırasıyla 0.17-0.19 ve 0.15-0.18 g glikoz/ $g_{DCW}$  st olarak hesaplanmıştır. En yüksek rhGH derişimine ulaşıldığı  $t_{max}$ 'ta, spesifik glikoz tüketim hızları sabit kalmasına rağmen, hücre derişimi azalmaya başlamıştır. Hücre derişiminin artmasıyla, hücreler agregat oluşturarak biyoprosesin oksijen- ya da glikoz-transferi açısından kısıtlı hale gelmesine yol açabilirler; bu da hücre lizisini indükleyebilir, hücre derişimi azalır ve glikoz birikmeye başlar. En yüksek hücre derişimi  $P_{GAP}$  ve Pro9 suşları için  $t = 15$  st'te sırasıyla  $C_X = 114$  g  $dm^{-3}$  ve  $113$  g  $dm^{-3}$  olarak elde edilmiştir.  $t = 18$  st'ten sonra ise etanol üretimi başlamış ve  $t = 21$  st'te sırasıyla 7.3 ve 4.2 g  $dm^{-3}$ 'e ulaşmıştır.

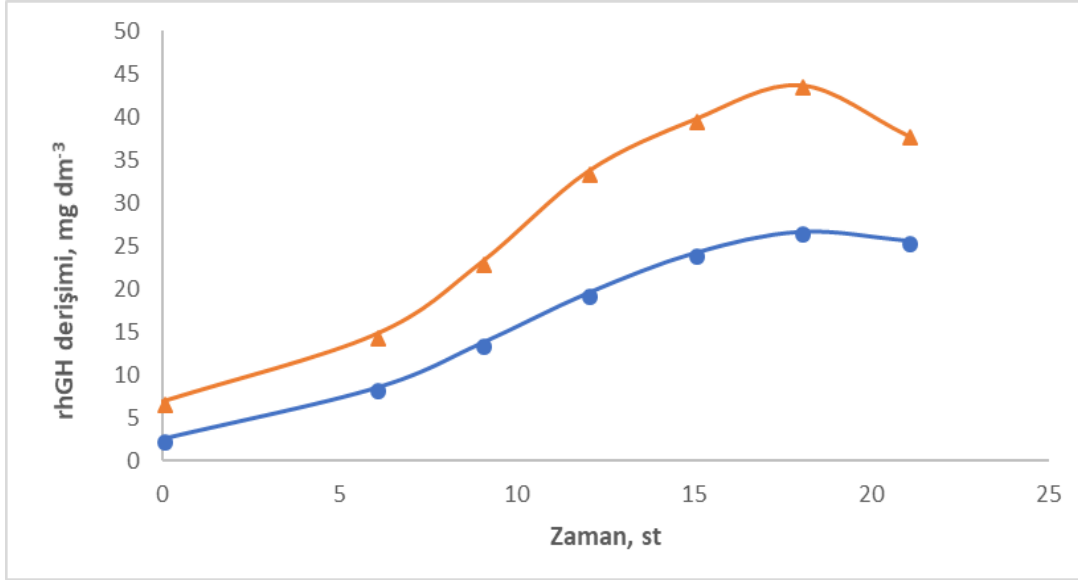


**Şekil 4.39.**  $P_{GAP}$  ve Pro9 suşlarına ait hücre, glikoz ve etanol derişim profilleri.  $t = 0$  st, yarı-kesikli fazın başladığı zamanı bildirmektedir. Mavi (●):  $P_{GAP}$  suşu, Turuncu (▲): Pro9 suşu. Düz çizgi: Hücre derişimi, noktalı çizgi: glikoz derişimi, kesikli çizgi: etanol derişimi. Ok, en yüksek rhGH derişiminin elde edildiği saati göstermektedir

Sonuç olarak, Şekil 4.39. ve Tablo 4.7.a, iki farklı suşun belirlenen üretim koşullarında farklı üretim kapasitelerini açıkça göstermiştir. Ayrıca, bu iki suşun, rhGH üretim kapasiteleri farklı olsa da, glikoz tüketim, hücre oluşumu ve etanol üretim profilleri benzer olduğu gözlenmiştir.

#### 4.8.2. rhGH Üretimi

En yüksek rhGH derişimi  $P_{GAP}$  ve Pro9 ile  $t = 18$  st'te sırasıyla  $27 \text{ mg dm}^{-3}$  ve  $44 \text{ mg dm}^{-3}$  olarak elde edilmiştir (Şekil 4.40.). Özgül hızlar ve verimler her iki suş için Tablo 4.7.b'de verilmiştir. Spesifik rhGH üretim hızları,  $P_{GAP}$  suşu için neredeyse sabit kalmış ve  $t = 18$  st'e kadar  $0.03-0.02 \text{ mg rhGH/ g}_{DCW}$  aralığında elde edilmiştir. Pro9 için de benzer bir profil elde edilmiş, ve özgül rhGH üretim hızları  $t = 18$  st'e kadar  $0.03-0.05 \text{ mg rhGH/g}_{DCW}$  arasında değişmiştir.



**Şekil 4. 40.** P<sub>GAP</sub> ve Pro9 suşlarına ait rhGH üretim profilleri. t = 0 st, yarı-kesikli fazın başladığı zamanı bildirmektedir. Mavi (●): P<sub>GAP</sub> suşu, Turuncu (▲): Pro9 suşu.

**Tablo 4. 7. a** Özgül hızların biyoproses boyunca anlık değişimi. En yüksek rhGH derişiminin elde edildiği saat **kalın** olarak verilmiştir

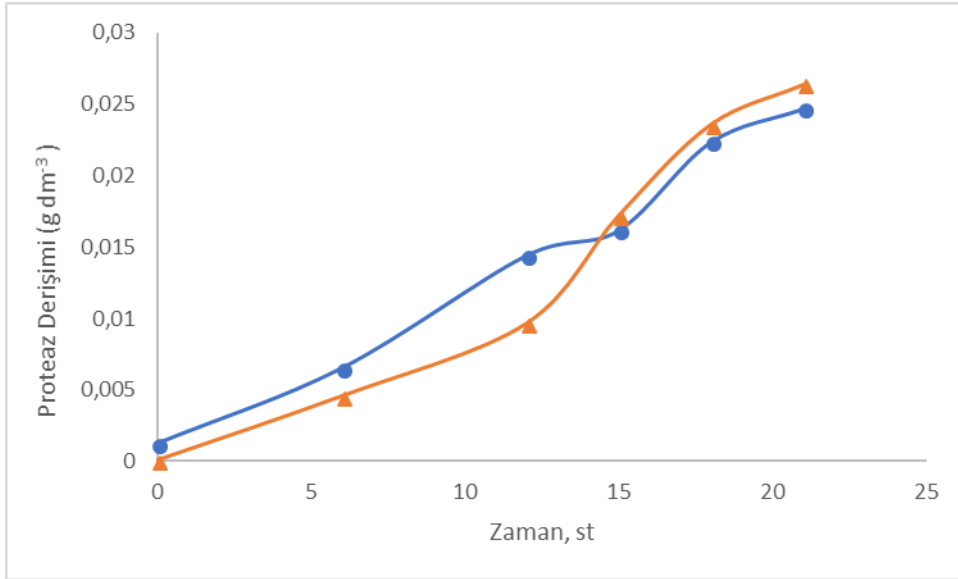
Suş	t, st	$\mu$ , st <sup>-1</sup>	$q_G$ , g /g <sub>DCW</sub> st	$q_P$ , mg g <sub>DCW</sub> st	rhGH/ g <sub>DCW</sub> /g	$Y_{X/S}$ , g <sub>DCW</sub> /g	$Y_{P/S}$ , mg rhGH/g	$Y_{P/X}$ , mg rhGH/g <sub>DCW</sub>
P <sub>GAP</sub>	3	0.11	0.19	0.03	0.57	0.15	0.27	
	6	0.11	0.18	0.03	0.55	0.17	0.31	
	9	0.11	0.17	0.03	0.56	0.20	0.36	
	12	0.11	0.17	0.03	0.53	0.19	0.35	
	15	0.10	0.17	0.02	0.50	0.14	0.29	
	<b>18</b>	<b>0.07</b>	<b>0.18</b>	<b>0.02</b>	<b>0.25</b>	<b>0.09</b>	<b>0.37</b>	
Pro9	3	0.10	0.18	0.04	0.52	0.20	0.40	
	6	0.10	0.17	0.04	0.55	0.23	0.42	
	9	0.10	0.17	0.05	0.54	0.33	0.61	
	12	0.08	0.15	0.05	0.49	0.34	0.70	
	15	0.08	0.15	0.03	0.38	0.20	0.53	
	<b>18</b>	<b>0.04</b>	<b>0.18</b>	<b>0.03</b>	<b>0.09</b>	<b>0.15</b>	<b>1.67</b>	

**Tablo 4. 7. b** En yüksek rhGH derişiminin elde edildiği saate ( $t_{max}$ ) kadar hesaplanan toplam özgül hız ve verimler

Strain	$t_{max}$ , st	$\mu$ , $st^{-1}$	$q_G$ , $g/g_{DCW}$ st	$q_P$ , $mg$ rhGH/ $g_{DCW}$ st	$Y_{X/S}$ , $g_{DCW}/g$	$Y_{P/S}$ , $mg$ rhGH/g	$Y_{P/X}$ , $mg$ rhGH/ $g_{DCW}$
<b>P<sub>GAP</sub></b>	18	0.06	0.18	0.02	0.49	0.12	0.46
<b>Pro9</b>	18	0.07	0.17	0.03	0.40	0.18	0.75

#### 4.8.3. Proteolitik Aktivite

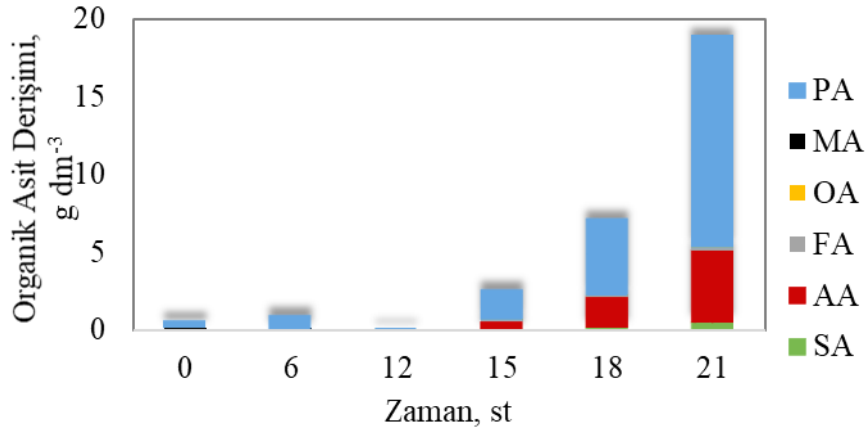
Her iki suşun da ürettiği asidik proteaz miktarı ölçülmüş ve Şekil 4.41.'de verilmiştir. Her iki suş için de, proteolitik aktivite biyoproses boyunca artmıştır. Elde edilen proteaz miktarları P<sub>GAP</sub> ve Pro9 suşu için benzerdir.



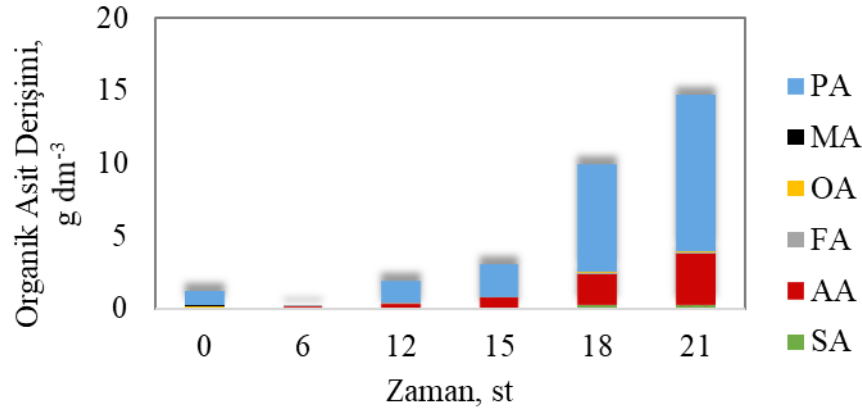
**Şekil 4. 41.** P<sub>GAP</sub> ve Pro9 suşlarına ait asidik proteaz üretim profilleri. t = 0 st, yarı-kesikli fazın başladığı zamanı bildirilmektedir. Mavi (●): P<sub>GAP</sub> suşu, Turuncu (▲): Pro9 suşu.

#### 4.8.4. Organik Asit Üretimi

Suşların biyoproses boyunca ürettiği organik asitlerin profilleri, hücre-içi metabolik izyolu hakkında daha fazla bilgi edinmek için araştırılmıştır. Bu amaçla, suşlara ait süksinik asit, fumarik asit, malik asit, okzalik asit, asetik asit ve pirüvik asit derişimleri biyoproses boyunca ölçülmüş ve Şekil 4.42. a-b'de verilmiştir.



**Şekil 4. 42. a**  $P_{GAP}$  suşu için biyoproses süresince elde edilen organik asit derişim profili.  $t = 0$  st, yarı-kesikli fazın başladığı zamanı bildirmektedir. PA: Pirüvik asit, MA: Malik asit, OA: Okzalik asit, FA: Fumarik asit, AA: Asetik asit, SA: Süksinik asit



**Şekil 4. 42. b** Pro9 suşu için biyoproses süresince elde edilen organik asit derişim profili.  $t = 0$  st, yarı-kesikli fazın başladığı zamanı bildirmektedir. PA: Pirüvik asit, MA: Malik asit, OA: Okzalik asit, FA: Fumarik asit, AA: Asetik asit, SA: Süksinik asit

Şekil 4.42. a-b, en fazla üretilen organik asitlerin pirüvik ve asetik asit olduğunu göstermektedir. Analiz,  $t_{max}$ 'a kadar, üretilen toplam organik asitlerin %18'i asetik asit, %79'unun ise pirüvik asit olduğunu ortaya koymuştur. TCA döngüsünde üretilen süksinik asit, malik asit, okzalik asit ve fumarik asit ortamda tespit edilse de, derişimlerinin  $0.5 \text{ g dm}^{-3}$ 'ün altında kalması, bu organik asitlerin verimli bir şekilde üretilip tüketildiğini ve birikmediğini göstermiştir. Sonuçlar ayrıca, bu organik asitlerin, rhGH üretiminin azalmasıyla  $t_{max}$ 'tan sonra arttığını ortaya koymuştur.

#### 4.9. $P_{GAP}$ Altında Oksijen Transfer Koşullarının Hücre Çoğalması ve rhGH Üretimi Üzerindeki Etkisi

*P. pastoris*'te,  $P_{GAP}$  altında rhGH üretimine düşük- ile orta- oksijen aktarım koşulları arasında oksijen aktarımının hücre çoğalması ve rhGH üzerindeki etkileri incelenmiştir. Reaktör işletim koşulları Tablo 4. 8.'de verilmiştir. Biyoreaktör işletimi kesikli- ve kesiksiz-üretim fazlarından oluşmaktadır. Kesikli-üretim fazı hücrelerin ön-kültür aşamasından sonra yüksek derişime ulaşmalarını sağlamak için uygulanmıştır. Tüm biyoreaktör deneylerinde kesikli-üretimden kesiksiz-üretimge geçiş  $C_x = 21.5 \text{ g dm}^{-3}$  derişiminde yapılmıştır.

**Tablo 4. 8.** Biyoreaktör işletim koşulları

<b>Kesikli-üretim Fazı</b>				
	N (rpm)	pH	Sıcaklık (°C)	$C_{DO}$ (%)
<b>Biyoreaktör 1 (BR1)</b>	600	5.5	30	20
<b>Biyoreaktör 2 (BR2)</b>	600	5.5	30	20
<b>Biyoreaktör 3 (BR3)</b>	600	5.5	30	20
<b>Kesiksiz-üretim Fazı*</b>				
	N (rpm)	pH	Sıcaklık (°C)	$C_{DO}$ (%)
<b>Biyoreaktör 1 (BR1)</b>	700	5.5	30	1
<b>Biyoreaktör 2 (BR2)</b>	700	5.5	30	5
<b>Biyoreaktör 3 (BR3)</b>	700	5.5	30	15

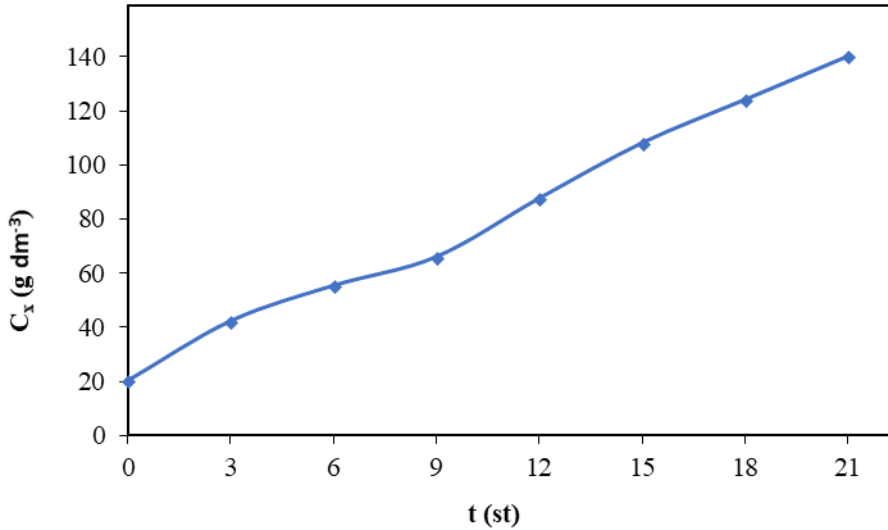
\* Tüm biyoreaktör deneylerinde  $t = 0$  st'te  $C_x = 21.5 \text{ g dm}^{-3}$

Oksijen aktarım koşullarının etkisi çözünen sabit-oksijen derişimlerinde ( $C_{DO}$ ):  $C_{DO} = \%1$ ,  $\%5$ , ve  $\%15$ 'te, üç oksijen aktarım koşulunda araştırılmıştır. En yüksek hücre ve rhGH derişimleri,  $C_{DO} = \%15$  oksijen aktarım koşulu için elde edilmiştir. Hücre derişimi,  $C_{DO} = \%5$  ve  $C_{DO} = \%1$  oksijen aktarım koşullarından 1.7 ve 3.4 kat daha yüksekken, rhGH derişimleri  $C_{DO} = \%5$  ve  $C_{DO} = \%1$  koşullarından 2.04 ve 2.64 kat daha yüksek bulunmuştur. En yüksek hücre ve rhGH derişimlerine ulaşılan  $C_{DO} = \%15$ 'te,  $t = 15$  st'e kadar etanol birikimi ölçülmemiştir.  $t = 15$  st'ten sonra en yüksek etanol derişimi  $C_{EtOH} = 9.8 \text{ g dm}^{-3}$ ,  $t = 18$  st, olarak ölçülmüştür (Akgün, 2018). Bu sonuçlar ışığında  $C_{DO} = \%15$  koşulu en iyi olarak belirlenmiştir. Bu yüzden Pro10 biyoreaktör prosesi için çözünen sabit-oksijen derişimi  $C_{DO} = \%15$  olarak karar verilmiştir.

#### 4.10. Pro10 Altında rhGH Üretimi

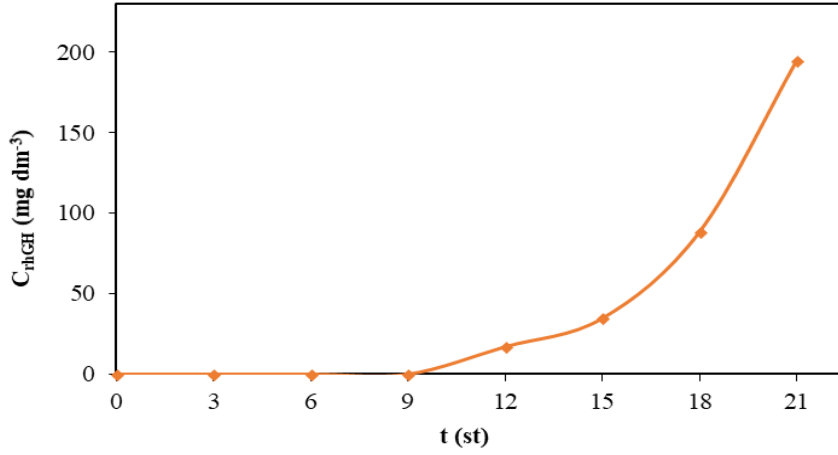
Tasarlanan varyantların farklı tarama koşullarındaki kuvvetleri incelendiğinde Pro10, aşırı glikoz ve gliserol koşullarında hiç bir değişiklik göstermezken, kısıtlı glikoz ve metanol varlığında,  $P_{GAP}$ 'tan daha fazla YFP üretimi gerçekleştirmiştir. Bu sonuç, Rfx1p'nin özellikle düşük spesifik çoğalma hızlarının mevcut olduğu koşullarda  $P_{GAP}$  regülasyonunda görev aldığını göstermektedir. Dolayısıyla, aşırı glikoz ya da gliserol gibi büyüme hızlarının daha yüksek olduğu koşullarda Rfx1p'nin transkript miktarı daha az olduğu için  $P_{GAP}$  regülasyonunda etkisi gözlenemezken, kısıtlı glikoz ya da metanol gibi hücre çoğalmasının daha yavaş olduğu koşullarda Rfx1p transkript miktarı daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, Rfx1p'nin, hücre düşük hızlarda çoğalırken,  $P_{GAP}$  tarafından daha düşük ekspresyon seviyelerine ulaşmasında rol oynayan TF'lerden biri olduğu söylenebilir ve bu TF'nin bağlanma bölgesi silinerek kısıtlı glikoz koşullarında yaklaşık 2 kat daha fazla YFP üretimi sağlanabilmiştir.

Bu bilgiler ışığında Pro10'un hücre çoğalması ve rhGH üretiminin zamana bağlı olarak değişimlerini anlamak için biyoreaktör çalışması yapılmıştır. Reaktör işletim koşulları kesikli ve yarı-kesikli iki fazdan oluşmaktadır. Yarı-kesikli fazda işletim koşulları;  $C_{DO} = \%15$ , pH = 5 ve karıştırma hızı 900 rpm olarak belirlenmiştir.  $t = 0$  st'te  $C_x = 20.2 \text{ g dm}^{-3}$  olup hücre derişimi  $t = 21$  st'te  $C_x = 140 \text{ g dm}^{-3}$ 'e ulaşmıştır. Ek olarak, rhGH üretimi  $t = 9$  st'te başlamış olup  $t = 21$  st'te  $194.3 \text{ mg dm}^{-3}$ 'e ulaşmıştır.



**Şekil 4. 43.** *P. pastoris*'in varyant GAP promotörü, Pro10, altında biyoproses süresince hücre derişimindeki değişimler



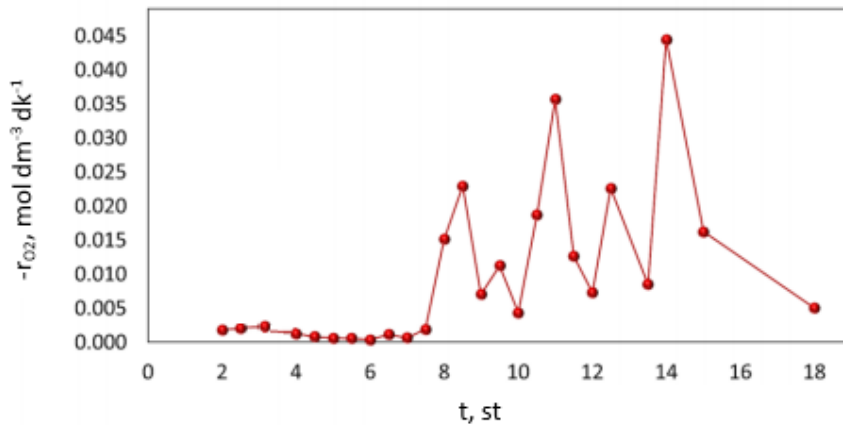


**Şekil 4. 44.** *P. pastoris*'in varyant GAP promotörü, Pro10, altında biyoproses süresince rhGH derişimindeki değişimler

Biyoproses süresince,  $P_{GAP}$  ve Pro10 altında hücre ve rhGH derişimlerinde olan değişimler karşılaştırıldıklarında,  $P_{GAP}$  altında  $C_{DO} = \%15$  koşulu için  $C_x = 114 \text{ g dm}^{-3}$  ve  $C_{rhGH} = 27 \text{ mg dm}^{-3}$  değerlerine ulaşılmıştır ve bu sonuçlar ışığında Pro10,  $P_{GAP}$ 'tan hücre derişimi için 1.23 kat, rhGH üretimi için ise 7.2 kat bir üretime ulaşılmıştır.

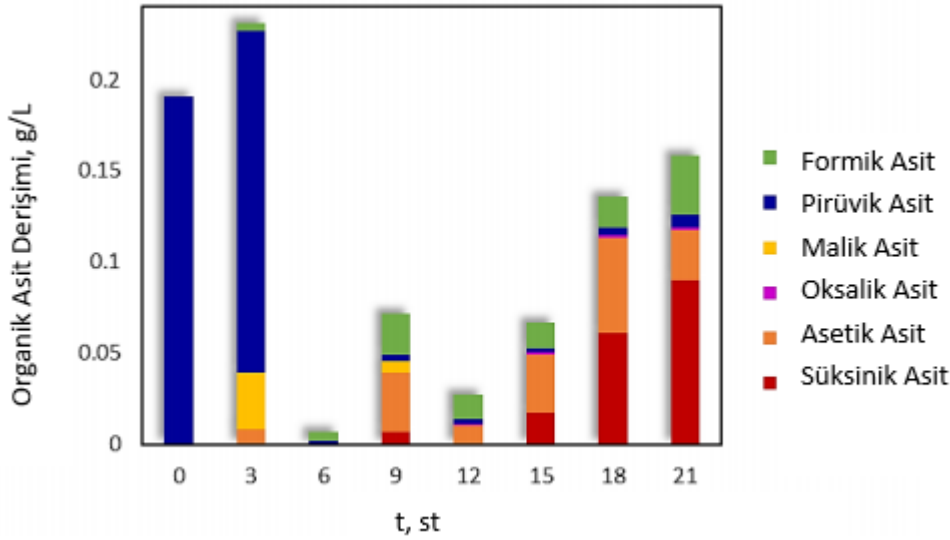
Elde edilen sonuçlar doğrultusunda Pro10,  $P_{GAP}$ 'a karşı hem hücre derişimi hem de rhGH derişimi açısından daha yüksek değerlere ulaşmıştır. Bu sonuçlar da, Rfx1p'nin düşük spesifik çoğalma hızlarında  $P_{GAP}$  regülasyonunda görev aldığını ve Rfx1p'nin, hücre düşük hızlarda çoğalırken,  $P_{GAP}$  tarafından daha düşük ekspresyon seviyelerine ulaşmasında rol oynayan TF'lerden biri olduğunu kanıtlamaktadır.

Pro10 biyoprosesi boyunca oksijen tüketim hızı reaktöre giren ve çıkan oksijen miktarları üzerinden hesaplanmıştır. Oksijen tüketim hızında salınımlar gözlemlenmiş olup (Şekil 4.45.), bunun sebebinin aralıklı substrat beslemesinden kaynaklı olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca, oksijen tüketim hızı, artan hücre derişimi ile artış göstermiştir.



**Şekil 4. 45.** Oksijen tüketim hızının biyoproses süresince değişimi

*P. pastoris*'in varyant GAP promotörü, Pro10, biyoprosesi için HPLC ile üretim ortamındaki organik asit derişimleri ölçülmüştür.  $t = 3$  st'e kadar pirüvik asit birikiminin olduğu ve  $t = 6$  st'ten itibaren kayda değer pirüvik asit birikimi gözlenmemiştir (Şekil 4.46.).  $t = 15$  st'ten sonra süksinik asitte birikme gözlenmiştir. Bu aşamada sitrik asit döngüsü düşünülüğünde alfa-ketoglutarattan süksinata geçişte bir dar boğaz oluştuğu gözlenmiştir.  $t = 9$  st'ten itibaren ortamda kayda değer bir asetik asit derişimi ölçülmüştür.  $t = 9$  st'ten sonra fermentatif izyolunun aktif olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 4. 46. Organik asit oluşum profili

#### 4.11. Yarı-kesikli ve Hibrit Yarı-kesikli Biyoreaktör Operasyonlarının Kıyaslanması

Hibrit yarı-kesikli işletim, yüksek hücre derişiminin hedeflendiği fermantasyon prosesleri için kesikli ve yarı-kesikli işletimin bir araya getirildiği bir uygulamadır. İşlem, yarı-kesikli olarak başlayıp kesikli olarak devam eden sürecin bir döngü halinde tekrarlandığı, böylece substrat tüketiminin kontrol altında tutulmasıyla hücre-içi reaksiyon ağının optimum reaksiyon yolizine yönlendirildiği, ve üretim ile verimin arttırıldığı yenilikçi bir tasarımıdır. Bu metot, *P. pastoris*'te GAP promotörü kontrolü altında rhGH üretimi için iki farklı karbon kaynağı, *i*) glikoz ve *ii*) eşit mol değerinde glikoz ve fruktoz içeren ön işlemden geçirilmiş hidrolize şeker pancarı melası, kullanılarak test edilmiştir (Çizelge 4.9).

##### 4.11.1. Glikoz-beslemeli Yarı-kesikli ve Hibrit Yarı-kesikli Biyoreaktör Operasyonlarının Kıyaslanması

Glikoz beslemeli yarı-kesikli ve hibrit yarı-kesikli işletimlerde rekombinant *P. pastoris* hücre derişiminin zamanla değışimi Şekil 4.47.'de verilmiştir. Daha yüksek hücre konsantrasyonlarının elde edildiği hibrit yarı-kesikli işletim stratejilerinden,  $\mu = 0.10 \text{ st}^{-1}$  özgül çoğalma hızı ile

tasarlanmış GH2'de en yüksek,  $\mu = 0.125 \text{ st}^{-1}$  özgül çoğalma hızı ile tasarlanmış GH3'te en düşük hücre konsantrasyonuna ulaşılmıştır. Yarı-kesikli ve hibrit yarı-kesikli işletimler için hücre konsantrasyonu profilleri, hibrit yarı-kesikli işletimlerde 7-10 st arasında görülen hafif karakteristik dönme noktası dışında  $t = 9 \text{ st}$ 'e kadar neredeyse aynı iken sonrasında giderek farklılaşmıştır. Hibrit yarı-kesikli işletimlerin hücre derişim eğrileri karakteristik dönüm noktaları üzerinden bir maksimum değere doğru eksponansiyel olarak artmış ve en yüksek hücre derişimine GH2'de  $t = 13.5 \text{ st}$ 'te  $136 \text{ g dm}^{-3}$  olarak ulaşılmıştır. Öte yandan  $\mu = 0.10 \text{ st}^{-1}$  özgül çoğalma hızı ile tasarlanmış GF1 ve  $\mu = 0.15 \text{ st}^{-1}$  özgül çoğalma hızı ile tasarlanmış GF2'de, hücreler stasyoner faza daha hızlı girmişlerdir (sırasıyla  $t = 12 \text{ st}$  ve  $t = 9 \text{ st}$ ).

Kıyaslama için, iki yarı-kesikli işletim dışında, en yüksek r-protein üretiminin olduğu  $\mu = \mu_{\text{opt}}$  değeri üst limitinin ve maksimum r-protein konsantrasyonuna karşılık gelen  $t_{\text{max}}$  değerinin belirlenmesi için, önceden belirlenmiş  $\mu = \mu_{\text{min}} + \Delta\mu$  değerleriyle dizayn edilen hibrit yarı-kesikli biyoreaktör operasyonlarında rhGH konsantrasyonunun zamana göre değişimi analiz edilmiştir (Şekil 4.48.). Hibrit yarı-kesikli işletim GH2'de ulaşılan en yüksek rhGH konsantrasyonu  $t = 8 \text{ st}$ 'te  $611 \text{ mg dm}^{-3}$  iken, GH3'de fermantasyon hacmindeki artışa bağlı olarak  $t = 10 \text{ st}$ 'te neredeyse aynı düzeyde üretim sağlanmıştır. Üretimin GH3'ten yüksek olduğu hibrit yarı-kesikli biyoreaktör operasyonu GH2'de optimum dizayn parametreleri  $\mu = \mu_{\text{opt}} = 0.10 \text{ st}^{-1}$  ve  $t = t_{\text{max}} = 8 \text{ st}$  olarak belirlenmiştir. GH2'ye kıyasla,  $\mu = 0.10 \text{ st}^{-1}$  değeri ile dizayn edilmiş, maksimum üretim miktarının  $t = 8 \text{ st}$ 'te  $380 \text{ mg dm}^{-3}$  olarak bulunduğu yarı-kesikli işletim GF1 sonuçlarına göre önceden belirlenmiş  $\mu$  değeri sürekli besleme akış dizaynında proses zamanını etkileyen belirleyici bir faktördür.

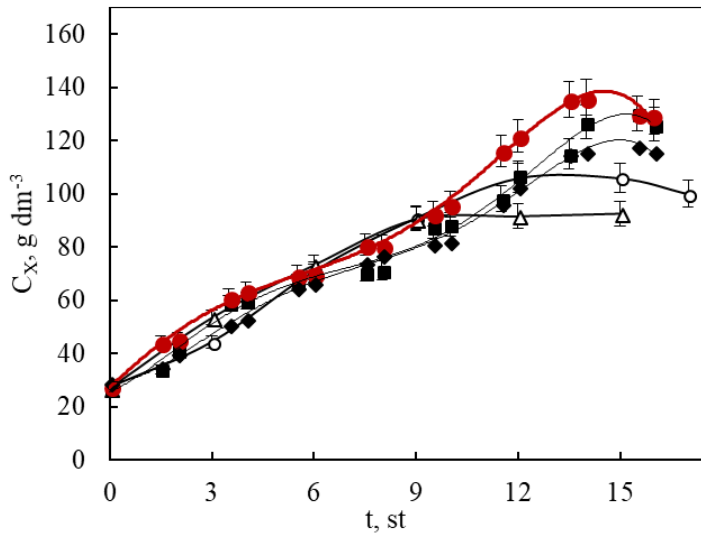
**Tablo 4. 9.** rhGH üretimi için tasarlanmış yarı-kesikli ve hibrit yarı-kesikli biyoreaktör operasyonlarının kısaltmaları ve açıklamaları

Kısaltma	Strateji
GF1	$\mu=0.10 \text{ st}^{-1}$ özgül çoğalma hızı kullanılarak hesaplanan eksponansiyel besleme debisi ile glikoz beslemeli yarı-kesikli işletim
GF2	$\mu=0.15 \text{ st}^{-1}$ özgül çoğalma hızı kullanılarak hesaplanan eksponansiyel besleme debisi ile glikoz beslemeli yarı-kesikli işletim
GH1	$\mu=0.07 \text{ st}^{-1}$ özgül çoğalma hızı kullanılarak hesaplanan eksponansiyel besleme debisi ile $\Delta t_{FB}=1.5 \text{ st}$ glikoz beslemeli yarı-kesikli işletimin $\Delta t_B=0.5 \text{ st}$ kesikli işletim ile değiştiği hibrit yarı-kesikli işletim
GH2	$\mu=0.10 \text{ st}^{-1}$ özgül çoğalma hızı kullanılarak hesaplanan eksponansiyel besleme debisi ile $\Delta t_{FB}=1.5 \text{ st}$ glikoz beslemeli yarı-kesikli işletimin $\Delta t_B=0.5 \text{ st}$ kesikli işletim ile değiştiği hibrit yarı-kesikli işletim
GH3	$\mu=0.125 \text{ st}^{-1}$ özgül çoğalma hızı kullanılarak hesaplanan eksponansiyel besleme debisi ile $\Delta t_{FB}=1.5 \text{ st}$ glikoz beslemeli yarı-kesikli işletimin $\Delta t_B=0.5 \text{ st}$ kesikli işletim ile değiştiği hibrit yarı-kesikli işletim
MF1	$\mu=0.07 \text{ st}^{-1}$ özgül çoğalma hızı kullanılarak hesaplanan eksponansiyel besleme debisi ile hidrolize melas beslemeli yarı-kesikli işletim
MF2	$\mu=0.10 \text{ st}^{-1}$ özgül çoğalma hızı kullanılarak hesaplanan eksponansiyel besleme debisi ile hidrolize melas beslemeli yarı-kesikli işletim
MH1	$\mu=0.07 \text{ st}^{-1}$ özgül çoğalma hızı kullanılarak hesaplanan eksponansiyel besleme debisi ile $\Delta t_{FB}=1.5 \text{ st}$ melas beslemeli yarı-kesikli işletimin $\Delta t_B=0.5 \text{ st}$ kesikli işletim ile değiştiği hibrit yarı-kesikli işletim
MH2	$\mu=0.10 \text{ st}^{-1}$ özgül çoğalma hızı kullanılarak hesaplanan eksponansiyel besleme debisi ile $\Delta t_{FB}=1.5 \text{ st}$ melas beslemeli yarı-kesikli işletimin $\Delta t_B=0.5 \text{ st}$ kesikli işletim ile değiştiği hibrit yarı-kesikli işletim
MH3	$\mu=0.15 \text{ st}^{-1}$ özgül çoğalma hızı kullanılarak hesaplanan eksponansiyel besleme debisi ile $\Delta t_{FB}=1.5 \text{ st}$ melas beslemeli yarı-kesikli işletimin $\Delta t_B=0.5 \text{ st}$ kesikli işletim ile değiştiği hibrit yarı-kesikli işletim

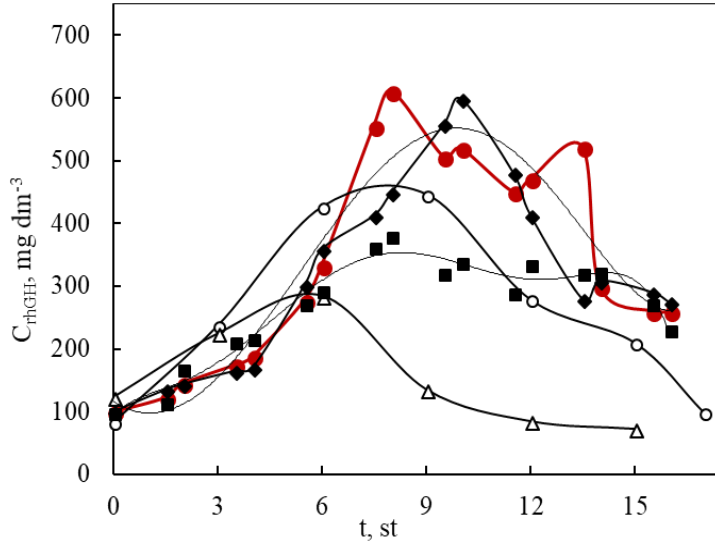
Ek olarak, substrat alımının hibrit yarı-kesikli biyoreaktör sistemi ile kontrol edilmesi, hücre-içi yol izi düzenlemeleri üzerinde oluşturduğu etki sonucu, karbon moleküllerinin hücre-içi reaksiyon alanında optimuma-yakın ya da optimum hücre-içi reaksiyon hızlarını elde edecek şekilde akmasını sağlamaktadır.  $\mu = \mu_{\min} = 0.07 \text{ st}^{-1}$  ile dizayn edilen GH1,  $t = 8 \text{ st}$ 'te maksimuma ulaşan ama  $\mu = 0.15 \text{ st}^{-1}$  ile dizayn edilen GF2'den daha iyi bir performans gösteren GF1'e göre daha az üretim sağlamıştır. Deneysel olarak belirlenen dizayn parametresi  $t_{\max}$  hibrit yarı-kesikli biyoreaktör ve yarı-kesikli biyoreaktör operasyon dizaynı için özgün bir değerdir ve bu değer sonrasında r-protein, yan ürün proteaz tarafından

hidrolize edilir. Proteaz sentezi ve salgılanması üretim fazında başlar ve zamanla artar. Fermantasyonun sonlandığı  $t_{max}$ 'dan sonra, yarı-kesikli GF1 ve GF2'de, ve hibrit yarı-kesikli GH2 ve GH3'de proteaz salgısının artması rhGH'nin proteolitik parçalanma hızının salgılanma hızından yüksek olduğunu gösterir. En düşük rhGH parçalanması, en düşük proteaz salgısının olduğu GH1'de ölçülmüştür.

Hibrit yarı-kesikli operasyonlarda, yarı-kesikli işletimden kesikli işleme geçişte  $C_G \rightarrow 0$  olduğundan  $\Delta t_B$  periyodu boyunca glikoz alımı yoktur. Stratejinin hücre içi reaksiyon ağı yoluyla karbon molekülleri akışı üzerindeki etkilerini kantitatif olarak belirlemek için, metabolik akı analizi yürütülebilir. Kalitatif olarak,  $\Delta t_{FB}$  boyunca geçerli yarı-kesikli işletimde, sürekli beslemesi sağlanan glikozun prekürsör metabolitlere dönüştürüldüğü ve ATP'deki yüksek enerjili fosfat bağlarında veya NADPH / NADP<sup>+</sup> ve NADH / NAD<sup>+</sup>'nin indirgenmiş hallerinde tutulan Gibbs serbest enerjisine dönüştürüldüğü sitoplazmaya yüksek bir alım hızıyla aktarılır. Ardından, hücrenin ana yapısını oluşturan makromoleküllerin oluşumu, yapı taşlarının sentezini ve ardından polimerizasyonunu gerektirir. Bu noktada hücre, ribozomlardaki protein sentezini dolayısıyla da enerji harcamasını kontrol eder. Kesikli işleme geçildiğinde, glikoz alımı durur; hücre çoğalma hızı  $r_x$  kısa süreli  $\Delta t_B$  periyodu boyunca azalır ve substratın tamamen tükendiği durumda  $r_x \rightarrow 0$  ulaşır. Karbon moleküllerin akışı makromoleküllerin ve r-proteinin sentezine yönlendirilirken, substratın ve ürünün enzim katalizörülüğünde gerçekleşen reaksiyonlar üzerinde açığa çıkardığı inhibisyonlar belli bir dereceye kadar kaldırılır ve hücrenin fenotipi glikoz alım hızının kontrolü ile kontrol edilebilir.



**Şekil 4. 47.** Glikoz bazlı besleme stratejilerinde hücre derişiminin zamana bağıli değişimi: GF1 (○), GF2 (Δ), GH1 (■), GH2 (●), GH3 (◆).



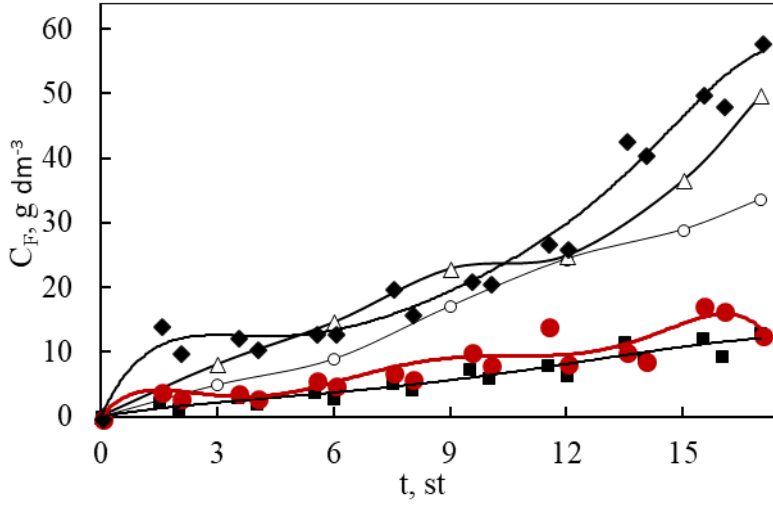
**Şekil 4. 48.** Glikoz bazlı besleme stratejilerinde rhGH derişiminin zamana bağılı değişimi: GF1 (○), GF2 (Δ), GH1 (■), GH2 (•), GH3 (◆).

#### 4.11.2. Melas-beslemeli Yarı-kesikli ve Hibrit Yarı-kesikli Biyoreaktör Operasyonlarının Kıyaslanması

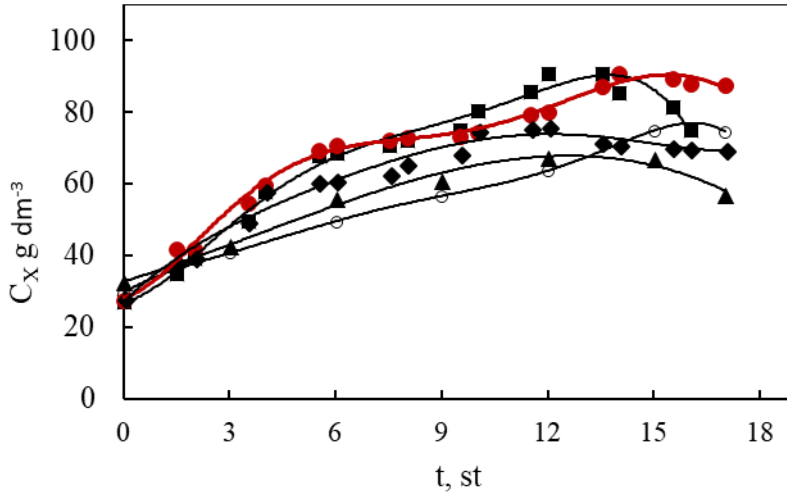
Fruktoz ve rekombinant *P. pastoris* hücre konsantrasyonlarının melas-beslemeli yarı-kesikli ve hibrit yarı-kesikli işletimlerde zamanla değişimi, sırasıyla Şekil 4.49. ve 4.50.'de verilmiştir. Fruktoz ile rekabet halinde iken seçici olarak tüketildiğinden, MH1 hariç hiçbir yarı-kesikli ya da hibrit yarı-kesikli işletimde  $t = 4$  st'e kadar ortamda glikoz saptanmamış, MH2 ve MH3'te de glikoz derişimi limitli koşullarda kalmaya devam etmiştir. MH1'de, hibrit yarı-kesikli işletim boyunca ortamda glikoz saptanmamışken; MH2'de  $t = 10$  st'e kadar  $C_G < 0.06$  g dm<sup>-3</sup> olan glikoz derişimi hafif bir şekilde artarak  $t_{max} = 13.5$  st'te  $C_G = 0.26$  g dm<sup>-3</sup>'e ulaşmıştır. En yüksek özgül çoğalma hızı ile tasarlanan ( $\mu = 0.15$  st<sup>-1</sup>) MH3'te de, glikoz konsantrasyonu çok düşük düzeylerde kalmaya devam etmiştir ( $t = 12$  st'e kadar  $C_G < 0.2$  g dm<sup>-3</sup>). Fruktoz birikimi, sırası ile  $\mu = 0.10$  st<sup>-1</sup> ile tasarlanan yarı-kesikli işletim MF2'de ve  $\mu = 0.07$  st<sup>-1</sup> ile tasarlanan yarı-kesikli işletim MF1'de, en yüksek özgül çoğalma ile tasarlanan MH3 haricindeki diğer tüm hibrit yarı-kesikli işletimlerde olduğundan daha yüksektir. MH1 ve MH2'nin  $C_F(t)$  eğrileri, çok benzer ve fruktoz tüketiminin glikoz sınırlaması nedeniyle arttığı yarı-kesikli işletimden kesikli işleme geçiş periyodlarındaki değerler açısından da yakındır. MH1 ve MH2 başta olmak üzere, hibrit yarı-kesikli işletimle, yarı-kesikli işleme kıyasla daha yüksek hücre derişimine ulaşılmıştır. MH2'deki hücre çoğalması  $t = 6$  st'e kadar en yüksek hızla olmak üzere  $t = 14$  st'e kadar devam etmiştir. MH1'deki çoğalma  $t = 7$  st'e kadar MH2'den biraz daha düşük olmasına rağmen, MH1'deki  $C_X(t)$   $t = 14$  st'e kadar neredeyse sabit ve MH2'dekinden daha yüksek bir hız ile devam etmiş ve  $C_X = 90$  g dm<sup>-3</sup> değerine ulaşmıştır.

Kıyaslama için, iki yarı-kesikli işletim sistemi dışında, en yüksek r-protein üretiminin olduğu  $\mu = \mu_{opt}$  değeri üst limitinin ve maksimum r-protein konsantrasyonuna karşılık gelen  $t_{max}$  değerinin belirlenmesi için, önceden belirlenmiş  $\mu = \mu_{min} + \Delta\mu$  değerleriyle dizayn edilen hibrit yarı-kesikli biyoreaktör operasyonlarında rhGH konsantrasyonunun zamana göre değişimi analiz edilmiştir (Şekil 4.51.). En yüksek rhGH konsantrasyonuna  $t = 13.5$  st'te  $625 \text{ mg dm}^{-3}$  olarak  $\mu = 0.10 \text{ st}^{-1}$  değeri ile dizayn edilen MH2'de ulaşılmıştır. Hibrit yarı-kesikli işletim MH2'de en yüksek verimliliğe ulaşılan optimum dizayn parametreleri  $\mu = \mu_{opt} = 0.10 \text{ st}^{-1}$  ve  $t = t_{max} = 13.5 \text{ st}$  olarak belirlenmiştir. Melas kullanımına dayalı geliştirilen stratejilerden bir diğeri de  $\mu = 0.07 \text{ st}^{-1}$  ile dizayn edilmiş,  $t = 17 \text{ st}$ 'te elde edilen  $650 \text{ mg dm}^{-3}$  üretim miktarıyla yarı-kesikli MF1 operasyonudur. Söz konusu işletim, verimlilik daha düşük olsa da dikkate değer bulunmuştur. Üretim alanında en düşük  $\mu$  ile dizayn edilmiş MF1 stratejisinde, iki ayrı karbon kaynağı ve çeşitli amino asitler ile organik asitleri yapısında barındıran kompleks bileşen melasın sürekli beslemesi operasyon süresini uzatmıştır. Buna karşılık,  $\mu$ 'deki artış ( $\mu = 0.07 \text{ st}^{-1}$ 'ten  $\mu = 0.10 \text{ st}^{-1}$ 'e) MF2'de  $t = 14 \text{ st}$ 'e kadar MF1'dekinden daha yüksek miktarda üretim olmasını sağlamıştır. Fermantasyonun sonlandığı  $t_{max}$ 'dan sonra, yarı-kesikli işletim MF2, ve hibrit yarı-kesikli işletim MH1, MH2 ve MH3'te proteaz salgısının artması rhGH'nin proteolitik parçalanma hızının salgılanma hızından yüksek olduğunu gösterir. En düşük rhGH konsantrasyonu, en yüksek proteaz salgısının olduğu MH3'te ölçülmüştür.

Sonuç olarak, en başarılı biyoreaktör operasyonları, (i)  $\mu = 0.10 \text{ st}^{-1}$  özgül çoğalma hızı kullanılarak hesaplanan eksponansiyel besleme debisi ile  $\Delta t_{FB} = 1.5 \text{ st}$  glikoz beslemeli yarı-kesikli işletimin  $\Delta t_B = 0.5 \text{ st}$  kesikli işletim ile devam ettiği hibrit yarı-kesikli işletim GH2, ve  $\mu = 0.10 \text{ st}^{-1}$  özgül çoğalma hızı kullanılarak hesaplanan eksponansiyel besleme debisi ile  $\Delta t_{FB} = 1.5 \text{ st}$  melas beslemeli yarı-kesikli işletimin  $\Delta t_B = 0.5 \text{ st}$  kesikli işletim ile devam ettiği hibrit yarı-kesikli işletim MH2 olarak belirlenmiştir. GH2'de en yüksek rhGH üretimi  $t = 8 \text{ st}$ 'te  $611 \text{ mg dm}^{-3}$  iken; MH2'de  $t = 13.5 \text{ st}$ 'te  $625 \text{ mg dm}^{-3}$  olarak ölçülmüştür. GH2'de, rhGH üretimi, proses süresi yarıya düşerken 1.37 kat artmıştır. Oysa, amino asit ve organik asit gibi diğer substratlarla zenginleştirilmiş iki karbon kaynağı içeren kompleks bileşen melas beslemesinin sağlandığı MH2'de daha düşük verimlilik değeri ve açığa çıkan daha masraflı ve karışık alt akım işlemleri gerekliliğine rağmen daha yüksek rhGH üretimine ulaşılmıştır. Tüm bu bilgiler ışığında, tek karbon kaynağı ile hibrit yarı-kesikli işletim güçlü bir tasarım metodudur. Fakat melas ile yürütülen hibrit yarı-kesikli işletimlerde kesikli işletim basamağında ortamda biriken ikinci karbon kaynağının tüketimi devam etmekte ve sonuç olarak birden fazla karbon kaynağı, özellikle kesikli işletim periyotlarında hücre çoğalmasını teşvik ederek proses süresi  $t_{max}$ 'ı arttırmaktadır. Bu kapsamda, kompleks besin ortamı kullanımına dayanan fermantasyonlarda hibrit yarı-kesikli işletiminin cazibesi bir noktaya kadar gölgelenmektedir.

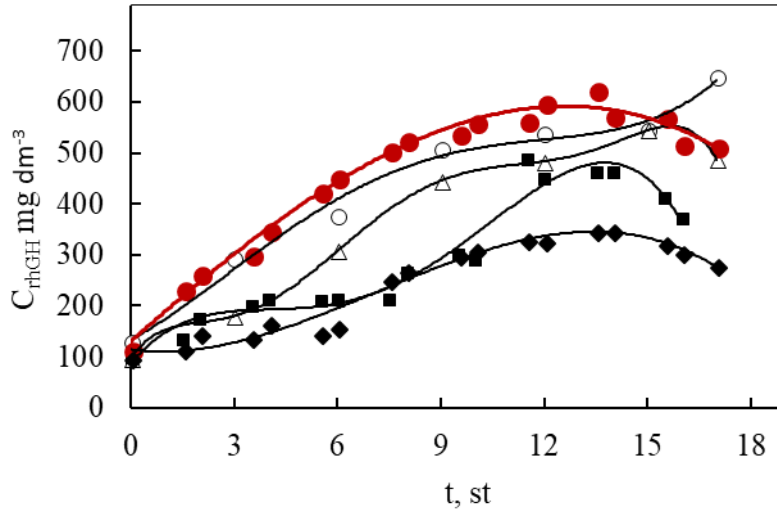


**Şekil 4. 49.** Melas bazlı besleme stratejilerinde fruktoz derişiminin zamana bağılı değişimi: MF1 (○), MF2 (Δ), MH1 (■), MH2 (●), MH3 (◆).



**Şekil 4. 50.** Melas bazlı besleme stratejilerinde hücre derişiminin zamana bağılı değişimi: MF1 (○), MF2 (Δ), MH1 (■), MH2 (●), MH3 (◆).





**Şekil 4. 51.** Melas bazlı besleme stratejilerinde rhGH derişiminin zamana bağlı değişimi: MF1 (○), MF2 (Δ), MH1 (■), MH2 (●), MH3 (◆).

## 5. SONUÇLAR

Sonuç olarak, bu verilerle birlikte, promotör mühendisliği yöntemlerinin rekombinant protein üretimini artırmak için rasyonel bir başlangıç noktası olduğu ortaya konulmuştur. Yapılan promotör analizinden sonra, promotörün kuvveti ve regülasyonu üzerinde etkisi olabilecek transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgeleri tespit edilmiş ve bu bölgeler, faktörlerin etkilerine göre silinmiş ya da artırılmıştır. Böylelikle, 10 farklı varyanttan oluşan bir promotör kütüphanesi oluşturulmuş ve bu promotörlerde, YFP proteini reporter gen olarak kullanılarak farklı üretim koşullarında taranmıştır. Yapılan deneyler, promotör varyantlarının farklı koşullarda regülasyonlarının farklı olduğunu ortaya koymuştur ve modifiye edilmemiş  $P_{GAP}$ 'e göre %86-188 arasında daha yüksek YFP üretimi elde edilmiştir. Bu yöntemin, nihai amaç olan rekombinant protein üretimini artırma üzerindeki etkisini görmek için rhGH geni seçilmiş ve iki promotör varyantı (Pro9-Pro10) altında ekpres edilmiştir. Bunun sonucunda protein üretiminin kısıtlı glikoz ortamında sırasıyla 2.4 ve 2 katlık bir artışa ulaştığı saptanmıştır. Bu sonuçlar göz önüne alınarak, Pro9 laboratuvar ölçekli biyoreaktörde rhGH üretimi yapılması amacıyla seçilmiş ve  $P_{GAP}$  altında yapılan rhGH üretimi ile karşılaştırılmıştır. Biyoreaktör üretimleri de, daha önce yapılan deney sonuçlarını desteklemiş ve Pro9 ile 1.6 kat daha fazla rhGH üretimi gerçekleştirilmiştir. Hücre derişimi, glikoz tüketimi, etanol üretimi ve organik asit profilleri gözönüne alındığında iki suş arasında rhGH üretim kapasitesi dışında bir fark gözlenmemiştir.



## KAYNAKLAR

- Abad, S., Nahalka, J., Winkler, M., Bergler, G., Speight, R., Glieder, A., Nidetzky B. 2011. "High-level expression of *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase in *Pichia pastoris*", *Biotechnology Letters*, 33, 557-563.
- Akgün, Y. 2018. "Therapeutic protein production and its separation by zeolitic imidazolate framework – 8 adsorbent", (Master Thesis), Middle East Technical University.
- Alper, H., Fischer, C., Nevoigt, E., Stephanopoulos, G. 2005. "Tuning genetic control through promoter engineering", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (36), 12678-12683.
- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., Patel, H. R. H. 2005. "Basic principles of real-time quantitative PCR", *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 5 (2), 209-219.
- Ata, Ö., Prielhofer, R., Gasser, B., Mattanovich, D., Çalık, P. 2017. "Transcriptional engineering of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter for improved heterologous protein production in *Pichia pastoris*", *Biotechnology and Bioengineering*, 114, 2319-2327.
- Becker, G. W., Hsiung, H. M. 1986. "Expression, secretion and folding of human growth hormone in *Escherichia coli*: purification and characterization", *FEBS Letters*, 204 (1), 145-150.
- Blazeck, J., Garg, R., Reed, B., Alper, H. S. 2012. "Controlling promoter strength and regulation in *Saccharomyces cerevisiae* using synthetic hybrid promoters", *Biotechnology and Bioengineering*, 109, 2884-2895.
- De Boer, H. A., Comstock, L. J., Vasser, M. 1983. "The *tac* promoter: a functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promoters", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80 (1), 21-25.
- Burke, D., Dawson, D., Stearns, T. 2000. *Methods in yeast genetics*, Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Cartharius, K., Frech, K., Grote, K., Klocke, B., Haltmeier, M., Klingenhoff, A., Frisch, M., Bayerlein, M., Werner, T. 2005. "MatInspector and beyond: Promoter analysis based on transcription factor binding sites", *Bioinformatics*, 21, 2933-2942.

Cereghino, G. P. L., Cregg, J. M. 1999. "Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis", *Current Opinion in Biotechnology*, 10 (5), 422-427.

Chang, C. N., Key, M., Bochner, B., Heyneker, H., Gray, G. 1987. "High-level secretion of human growth hormone by *Escherichia coli*", *Gene*, 55 (2), 189-196.

Cormack, B. P., Valdivia, R. H., Falkow, S. 1996. "FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP)", *Gene*, 173, 33-38.

Cos, O., Ramón, R., Montesinos, J. L., 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 (1), 17.

Çalık, G., Kocabaş, P., Afşar, H., Çalık, P., Özdamar, T. H. 2016. "Parametric continuous feed stream design to fine-tune fed-batch bioreactor performance: recombinant human growth hormone production in *Bacillus subtilis*", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 91, 2740-2750.

Çalık, P., Ata, Ö., Güneş, H., Massahi, A., Boy, E., Keskin, A., Öztürk, S., Zerze, G. H., Özdamar, T. H. 2015. "Recombinant protein production in *Pichia pastoris* under glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter: From carbon source metabolism to bioreactor operation parameters", *Biochemical Engineering Journal*, 95, 20-36.

Çalık, P., Bayraktar, E., İnankur, B., Soyaslan, E. Ş., Şahin, M., Taşpınar, H., Açık E., Yılmaz, R., Özdamar, T. H. 2010a. "Influence of pH on recombinant human growth hormone production by *Pichia pastoris*", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85 (12), 1628-1635.

Çalık, P., Çalık, G., 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 (7-8), 451-461.

Çalık, P., Çalık, G., Takaç, S., 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 (2), 151-167.

Çalık, P., Hoxha, B., Çalık, G., Özdamar, T. H. 2018. "Hybrid fed-batch bioreactor operation design: control of substrate uptake enhances recombinant protein production in high-cell-density fermentations", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, doi:10.1002/jctb.5696.

Çalık, P., İnankur, B., Soyaslan, E. Ş., Şahin, M., Taşpınar, H., Açık, E., Bayraktar, E. 2010b. "Fermentation and oxygen transfer characteristics in recombinant human growth hormone production by *Pichia pastoris* in sorbitol batch and methanol fed-batch operation", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85 (2), 226-233.

Çalık, P., Orman, M. A., Çelik, E., Halloran, M., Çalık, G., Özdamar, T. H. 2008. "Expression system for synthesis and purification of recombinant human growth hormone in *Pichia pastoris* and structural analysis by MALDI-ToF mass spectrometry", *Biotechnology Progress*, 24 (1), 221-226.

Çalık, P., Özdamar, T. H. 1999. "Mass flux balance-based model and metabolic pathway engineering analysis for serine alkaline protease synthesis by *Bacillus licheniformis*", *Enzyme and Microbial Technology*, 24 (10), 621-635.

Çalık, P., Şahin, M., Taşpınar, H., Soyaslan, E. Ş., İnankur, B. 2011. "Dynamic flux balance analysis for pharmaceutical protein production by *Pichia pastoris*: Human growth hormone", *Enzyme and Microbial Technology*, 48 (3), 209-216.

Ecamilla-Trevino, L. L., Viader-Salvadó, J. M., Barrera-Saldaña, H. A., Guerrero-Olazarán, M. 2000. "Biosynthesis and secretion of recombinant human growth hormone in *Pichia pastoris*", *Biotechnology Letters*, 22 (2), 109-114.

Eurwilaichitr, L., Roytrakul, S., Suprasongsin, C., Manitchotpisit, P., Panyim, S. 2002. "Glutamic acid and alanine spacer is not necessary for removal of MF $\alpha$ -1 signal sequence fused to the human growth hormone produced from *Pichia pastoris*", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18 (6), 493-498.

Ferreira, A. R., Ataíde, F., Von Stosch, M., Dias, J. M. L., Clemente, J. J., Cunha, A. E., Oliveira, R. 2012. "Application of adaptive DO-stat feeding control to *Pichia pastoris* X33 cultures expressing a single chain antibody fragment (scFv)", *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35(9), 1603-1614.

Franchi, E., Maisano, F., Testori, S. A., Galli, G., Toma, S., Parente, L., de Ferra, F., Grandi, G. 1991. "A new human growth hormone production process using a recombinant *Bacillus subtilis* strain", *Journal of Biotechnology*, 18 (1-2), 41-54.

Gancedo, J. M. 1998. "Yeast carbon catabolite repression", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62 (2), 334-361.

- Goeddel, D. V., Heyneker, H. L., Hozumi, T., Arentzen, R., Itakura, K., Yansura, D. G., Ross, M. J., Miozzari, G., Crea, R., Seeburg, P. H. 1979. "Direct expression in *Escherichia coli* of a DNA sequence coding for human growth hormone", *Nature*, 281 (5732), 544.
- Goodrick, J. C., Xu, M., Finnegan, R., Schilling, B. M., Schiavi, S., Hoppe, H., Wan, N. C., Corp, G., Square, O. K. 2001. "High-level expression and stabilization of recombinant human chitinase produced in a continuous constitutive *Pichia pastoris* expression system", *Biotechnology and Bioengineering*, 74 (6), 492-497.
- Gray, G. L., Baldridge, J. S., McKeown, K. S., Heyneker, H. L., Chang, C. N. 1985. "Periplasmic production of correctly processed human growth hormone in *Escherichia coli*: natural and bacterial signal sequences are interchangeable", *Gene*, 39 (2), 247-254.
- Guarente, L., Hoar, E. 1984. "Upstream activation sites of the *CYC1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* are active when inverted but not when placed downstream of the "TATA box"", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 8, 7860-7864.
- Guarente, L., Lalonde, B., Gifford, P., Alani, E. 1984. "Distinctly regulated tandem upstream activation sites mediate catabolite repression of the *CYC1* gene of *S. cerevisiae*", *Cell*, 36 503-511.
- Güneş, H., Çalık, P. 2016. "Oxygen transfer as a tool for fine-tuning recombinant protein production by *Pichia pastoris* under glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter", *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39 (7), 1061-1072.
- Hartner, F. S., Ruth, C., Langenegger, D., Johnson, S. N., Hyka, P., Lin-Cereghino, G. P., Lin-Cereghino, J., Kovar, K., Cregg, J. M., Glieder, A. 2008. "Promoter library designed for fine-tuned gene expression in *Pichia pastoris*", *Nucleic Acids Research*, 36, e76.
- Heim, R., Tsien, R. Y. 1996. "Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer", *Current Biology*, 6, 178-182.
- Heiss, S., Puxbaum, V., Gruber, C., Altmann, F., Mattanovich, D., Gasser, B. 2015. "Multistep processing of the secretion leader of the extracellular protein Epx1 in *Pichia pastoris* and implications for protein localization", *Microbiology*, 161, 1356-1368.
- Hsiung, H. M., Mayne, N. G., Becker, G. W. 1986. "High-level expression, efficient secretion and folding of human growth hormone in *Escherichia coli*", *Nature Biotechnology*, 4 (11), 991.



Ikehara, M., Ohtsuka, E., Tokunaga, T., Taniyama, Y., Iwai, S., Kitano, K., Miyamoto, S., Ohgi, T., Sakuragawa, Y., Fujiyama, K. 1984. "Synthesis of a gene for human growth hormone and its expression in *Escherichia coli*", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 81 (19), 5956-5960.

Invitrogen 2010, EasySelect™ Pichia Expression Kit For Expression of Recombinant Proteins Using pPICZ and PPICZα in *Pichia pastoris*

Invitrogen user manual 2010, "pGAPZA,B,C and pGAPZαA,B,C Pichia expression vectors for constitutive expression and purification of recombinant proteins".

İleri, N., Çalık, P. 2006. "Effects of pH strategy on endo-and exo-metabolome profiles and sodium potassium hydrogen ports of β-lactamase-producing *Bacillus licheniformis*", Biotechnology Progress, 22 (2), 411-419.

Jeppsson, M., Johansson, B., Jensen, P. R., Hahn-Hägerdal, B., Gorwa-Grauslund, M. F. 2003. "The level of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity strongly influences xylose fermentation and inhibitor sensitivity in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains", Yeast, 20,1263-1272.

Johnston, M., Flick, J. S., Pexton, T. 1994. "Multiple mechanisms provide rapid and stringent glucose repression of *GAL* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*", Molecular and Cellular Biology, 14, 3834-3841.

Kajino, T., Saito, Y., Asami, O., Yamada, Y., Hirai, M., Udata, S. 1997. "Extracellular production of an intact and biologically active human growth hormone by the *Bacillus brevis* system", Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 19 (4), 227-231.

Kato, C., Kobayashi, T., Kudo, T., Furusato, T., Murakami, Y., Tanaka, T., Baba, H., Oishi, T., Ohtsuka, E., Ikehara, M., Kato, H., Moriyama, S., Horikoshi, K., Yanagida, T. 1987. "Construction of an excretion vector and extracellular production of human growth hormone from *Escherichia coli*", Gene, 54 (2), 197-202.

Kottmeier, K., Günther, T.J., Weber, J., Kurtz, S., Ostermann, K., Rödel, G., Bley, T. 2012. "Constitutive expression of hydrophobin HFB1 from *Trichoderma reesei* in *Pichia pastoris* and its pre-purification by foam separation during cultivation", Engineering in Life Sciences 12, 162-170.

Lehninger, A. L. 1979. Biochemistry: the molecular basis of cell structure and function (2<sup>nd</sup> Edition). New York: Worth Publishers.

Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M. 1993. Principles of biochemistry (Vol.2, 241-242). New York: Worth Publishers,.

Lin-Cereghino GP, Godfrey L, de la Cruz BJ, Johnson S, Khuongsathiene S, Tolstorukov I, Yan M, Lin-Cereghino J, Veenhuis M, Subramani S, Cregg JM. 2006. "Mxr1p, a key regulator of the methanol utilization pathway and peroxisomal genes in *Pichia pastoris*", Molecular and Cellular Biology, 26, 883-97.

Massahi, A., Çalık, P. 2016. "Endogenous signal peptides in recombinant protein production by *Pichia pastoris*: From in-silico analysis to fermentation", Journal of Theoretical Biology, 408, 22-33.

Massahi, A., Çalık, P. 2018. "Naturally occurring novel promoters around pyruvate branch-point for recombinant protein production in *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*): Pyruvate decarboxylase- and pyruvate kinase- promoters", Biochemical Engineering Journal, 138, 110-120.

Nakayama, A., Ando, K., Kawamura, K., Mita, I., Fukazawa, K., Hori, M., Honjo, Y, Furutani, Y. 1988. "Efficient secretion of the authentic mature human growth hormone by *Bacillus subtilis*", Journal of Biotechnology, 8 (2), 123-134.

Nevoigt, E., Kohnke, J., Fischer, C. R., Alper, H., Stahl, U., Stephanopoulos, G. 2006. "Engineering of promoter replacement cassettes for fine-tuning of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*", Applied Environment Microbiology, 72, 5266-5273.

Orman, M. A., Çalık, P., Özdamar, T. H. 2009. "The influence of carbon sources on recombinant-human-growth-hormone production by *Pichia pastoris* is dependent on phenotype: a comparison of Muts and Mut+ strains", Biotechnology and Applied Biochemistry, 52 (3), 245-255.

Ormö, M., Cubitt, A. B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R. Y., Remington, S. J. 1996. "Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein", Science, 273 (5280), 1392-1395.

Özdamar, T. H., Şentürk, B., Yılmaz, Ö. D., Çalık, G., Çelik, E., Çalık, P. 2009. "Expression system for recombinant human growth hormone production from *Bacillus subtilis*", Biotechnology Progress, 25 (1), 75-84.

Pepeliaev, S., Krahulec, J., Černý, Z., Jílková, J., Tlustá, M., Dostálová, J. 2011. "High level expression of human enteropeptidase light chain in *Pichia pastoris*", Journal of Biotechnology, 156, 67-75.



- Polupanov, A. S., Nazarko, V. Y., Sibirny, A. A. 2012. "Gss1 protein of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* is involved in glucose sensing, pexophagy and catabolite repression" *The International Journal of Biochemistry Cell Biology*, 44 (11), 1906-1918.
- Potvin, G., Ahmad, A., Zhang, Z. 2012. "Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review". *Biochemical Engineering Journal* 64, 91-105.
- Prielhofer, R., Cartwright, S. P., Graf, A. B., Valli, M., Bill, R. M., Mattanovich, D., Gasser, B. 2015. "*Pichia pastoris* regulates its gene-specific response to different carbon sources at the transcriptional, rather than the translational level", *BMC Genomics* 16, 167.
- Prielhofer, R., Maurer, M., Klein, J., Wenger, J., Kiziak, C., Gasser, B., Mattanovich, D. 2013. "Induction without methanol: novel regulated promoters enable high-level expression in *Pichia pastoris*", *Microbial Cell Factory* 12, 5.
- Puxbaum, V., Gasser B., Mattanovich, D. 2016. "The bud tip is the cellular hot spot of protein secretion in yeasts", *Applied Microbiology and Biotechnology* 100, 8159-8168.
- Qin, X., Qian, J., Xiao, C., Zhuang, Y., Zhang, S., Chu, J. 2011a. "Reliable high-throughput approach for screening of engineered constitutive promoters in the yeast *Pichia pastoris*", *Letter Applied Microbiology*, 52, 634-41.
- Qin, X., Qian, J., Yao, G., Zhuang, Y., Zhang, S., Chu, J. 2011b. "GAP promoter library for fine-tuning of gene expression in *Pichia pastoris*", *Applied Environment Microbiology* 77, 3600-3608.
- Rebnegger, C., Graf, A. B., Valli, M., Steiger, M. G., Gasser, B., Maurer, M., Mattanovich, D. 2014. "In *Pichia pastoris*, growth rate regulates protein synthesis and secretion, mating and stress response", *Biotechnology Journal*, 9, 511-525.
- Rossanese, O. W., Soderholm, J., Bevis, B. J., Sears, I. B., O'connor, J., Williamson, E. K., Glick, B. S. 1999. "Golgi structure correlates with transitional endoplasmic reticulum organization in *Pichia pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae*", *The Journal of Cell Biology*, 145 (1), 69-81
- Roth, S., Kumme, J., Schüller, H. J. 2004. "Transcriptional activators Cat8 and Sip4 discriminate between sequence variants of the carbon source-responsive promoter element in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*", *Current Genetics*, 45, 121-128.
- Ruth, C., Zuellig, T., Mellitzer, A., Weis, R., Looser, V., Kovar, K., Glieder, A. 2010. "Variable production windows for porcine trypsinogen employing synthetic inducible promoter variants in *Pichia pastoris*", *System and Synthetic Biology*, 4, 181-191.

- Sakai, Y., Koller, A., Rangell, L. K., Keller, G. A., Subramani, S. 1998. "Peroxisome degradation by microautophagy in *Pichia pastoris*: identification of specific steps and morphological intermediates", *The Journal of Cell Biology*, 141 (3), 625-636.
- Sambrook, J., Russell, D.W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual* (3rd Edition). New York: Cold Spring Harbor Library Press.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., Eliceiri, K. W. 2012. "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis", *Nature Methods*, 9 (7), 671.
- Schüller, H. J. 2003. "Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*", *Current Genetics*, 43, 139-160.
- Shin, N. K., Kim, D. Y., Shin, C. S., Hong, M. S., Lee, J., Shin, H. C. 1998. "High-level production of human growth hormone in *Escherichia coli* by a simple recombinant process", *Journal of biotechnology*, 62 (2), 143-151.
- Sjöblom, M., Lindberg, L., Holgersson, J., Rova, U. 2012. "Secretion and expression dynamics of a GFP-tagged mucin-type fusion protein in high cell density *Pichia pastoris* bioreactor cultivations", *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 03, 238-248.
- Stadlmayr, G., Benakovitsch, K., Gasser, B., Mattanovich, D., Sauer, M. 2010. "Genome-scale analysis of library sorting (GALibSo): Isolation of secretion enhancing factors for recombinant protein production in *Pichia pastoris*", *Biotechnology and Bioengineering* 105, 543-555.
- Tabandeh, F., Shojaosadati, S. A., Zomorodipour, A., Khodabandeh, M., Sanati, M. H., & Yakhchali, B. 2004. "Heat-induced production of human growth hormone by high cell density cultivation of recombinant *Escherichia coli*", *Biotechnology letters*, 26 (3), 245-250.
- Vassileva, A., Chugh, D. A., Swaminathan, S., Khanna, N. 2001. "Expression of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* using the GAP promoter", *Journal of Biotechnology*, 88, 21–35.
- Vogl, T., Glieder, A. 2013. "Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production", *New Biotechnology*, 30, 385-404.
- Vogl, T., Ruth, C., Pitzer, J., Kickenweiz, T., Glieder, A. 2014. "Synthetic core promoters for *Pichia pastoris*", *ACS Synthetic Biology*, 3, 188-191.
- Wang, J., Wang, X., Shi, L., Qi, F., Zhang, P., Zhang, Y., Zhou, X., Song, Z., Cai, M. 2017. "Methanol-Independent Protein Expression by *AOX1* Promoter with trans-Acting Elements

Engineering and Glucose-Glycerol-Shift Induction in *Pichia pastoris*”, Scientific Reports, 7, 41850.

Wang, X., Cai, M., Shi, L., Wang, Q., Zhu, J., Wang, J., Zhou, M., Zhou, X., Zhang, Y. 2016a. “PpNrg1 is a transcriptional repressor for glucose and glycerol repression of AOX1 promoter in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*”, Biotechnology Letters, 38, 291-298.

Wang, X., Wang, Q., Wang, J., Bai, P., Shi, L., Shen, W., Zhou, M., Xiangshan, Z., Zhang, Y., Cai, M. 2016b. “Mit1 Transcription Factor Mediates Methanol Signaling and Regulates the Alcohol Oxidase 1 ( AOX1 ) Promoter in *Pichia*”, Journal of Biological Chemistry 291, 6245-6261.

Waterham, H. R., Digan, M. E., Koutz, P. J., Lair, S. V., Cregg, JM. 1997. “Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter”, Gene 186, 37-44.

Weinhandl, K., Winkler, M., Glieder, A., Camattari, A. 2014. “Carbon source dependent promoters in yeasts”, Microbial Cell Factories 13, 5.

Wu, J. M., Lin, J. C., Chieng, L. L., Lee, C. K., Hsu, T. A. 2003a. “Combined use of GAP and AOX1 promoter to enhance the expression of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in *Pichia pastoris*”, Enzyme and Microbial Technology, 33, 453-459.

Wu, J. M., Chieng, L. L., Hsu, T. A., Lee, C. K. 2003b. “Sequential expression of recombinant proteins and their separate recovery from a *Pichia pastoris* cultivation”, Biochemical Engineering Journal, 16, 9-16.

Yamakawa, M., Sugisaki, K., Morimoto, M., Tanaka, M., Yamamoto, M., Ichikawa, T., Nakashima, K. 1989. “Effects of gene dosage on the expression of human growth hormone cDNA in *Escherichia coli*”, Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression, 1009 (2), 156-160.

Zhang, A. L., Zhang, T. Y., Luo, J. X., Chen, S. C., Guan, W. J., Fu, C. Y., Li, H. L. 2007. “Constitutive expression of human angiostatin in *Pichia pastoris* by high-density cell culture”, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 34 (2), 117-122.

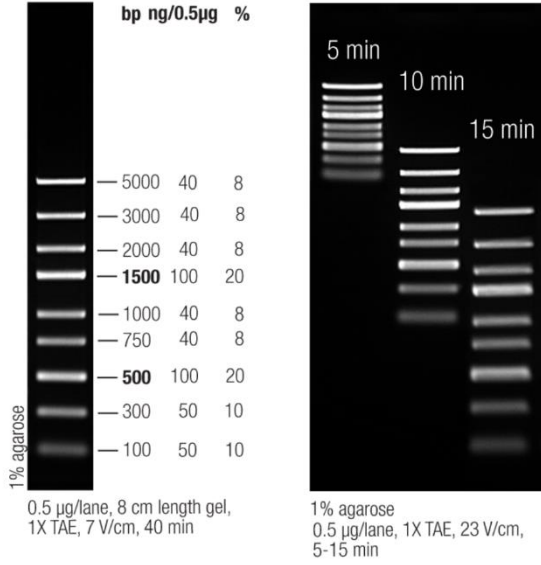
Zhang, A. L., Luo, J. X., Zhang, T. Y., Pan, Y. W., Tan, Y. H., Fu, C. Y., Tu, F. 2009. “Recent advances on the GAP promoter derived expression system of *Pichia pastoris*”, Molecular Biology Reports, 36, 1611–9.



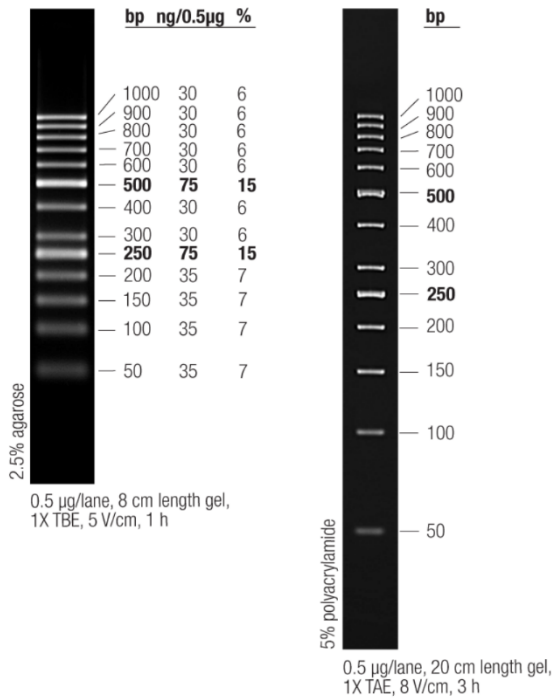
Zhang, P., Zhang, W., Zhou, X., Bai, P., Cregg, J. M., & Zhang, Y. 2010. "Catabolite repression of Aox in *Pichia pastoris* is dependent on hexose transporter PpHxt1 and pexophagy", Applied and environmental microbiology, 76 (18), 6108-6118.

## EK-1 Agaroz Jel Görüntülemelerinde Kullanılan DNA Markerları

### GeneRuler Express DNA Ladder, ready-to-use



### GeneRuler 50 bp DNA Ladder, ready-to-use



## EK-2 *P. pastoris* Hücre İçi Tepkimeleri

### MeOH Metabolizması

1. MeOH  $\rightarrow$  FormAl
2. FormAl  $\rightarrow$  For + NADH
3. For  $\rightarrow$  NADH + CO<sub>2</sub>
4. Xyl5P + FormAl + ATP  $\rightarrow$  ADP + 2 G3P

### Sorbitol Metabolizması

5. Sorb + ATP  $\rightarrow$  ADP + F6P + NADH

### Glikoliz ve Glukoneogenezis Yolizi

6. Glc + ATP  $\rightarrow$  G6P + ADP
7. F6P  $\rightarrow$  G6P
8. G6P  $\rightarrow$  F6P
9. F6P + ATP  $\rightarrow$  2 G3P + ADP
10. 2 G3P  $\rightarrow$  F6P + Pi
11. G3P + ADP + Pi  $\rightarrow$  3PG + ATP + NADH
12. 3PG + ATP + NADH  $\rightarrow$  G3P + ADP + Pi
13. 3PG  $\rightarrow$  PEP
14. PEP  $\rightarrow$  3PG
15. PEP + ADP  $\rightarrow$  Pyr + ATP
16. Pyr  $\rightarrow$  AcCoA<sub>m</sub> + CO<sub>2</sub> + NADH<sub>m</sub>

### Pentoz Fosfat Yolizi

17. G6P  $\rightarrow$  R5P + 2 NADPH + CO<sub>2</sub>
18. R5P  $\rightarrow$  Xyl5P
19. Xyl5P  $\rightarrow$  R5P
20. R5P  $\rightarrow$  Rib5P
21. Rib5P  $\rightarrow$  R5P
22. Xyl5P + Rib5P  $\rightarrow$  S7P + G3P
23. S7P + G3P  $\rightarrow$  Xyl5P + Rib5P
24. Xyl5P + E4P  $\rightarrow$  F6P + G3P
25. F6P + G3P  $\rightarrow$  Xyl5P + E4P
26. G3P + S7P  $\rightarrow$  F6P + E4P
27. F6P + E4P  $\rightarrow$  G3P + S7P

### **Glikoliz Yolizinden Dallanmalar**

28. Pyr → Acet + CO<sub>2</sub>
29. Acet → Ac + NADPH
30. Acet + NADH → EtOH
31. EtOH → Acet + NADH
32. Ac + 2 ATP → AcCoA + 2 ADP + 2Pi
33. AcCoA → AcCoAm
34. Pyr + NADH → Lac
35. Lac → NADH + Pyr
36. Pyr → For + AcCoA
37. For + AcCoA → Pyr

### **Anaplerotik Reaksiyonlar**

38. Mal → Pyr + CO<sub>2</sub> + NADPH
39. Pyr + CO<sub>2</sub> + NADPH → Mal
40. Pyr + CO<sub>2</sub> + ATP → OA + ADP
41. OA + ATP → PEP + ADP + CO<sub>2</sub>

### **Trikarboksilik Asit Döngüsü**

42. AcCoAm + OA → Cit
43. Cit → ICit
44. ICit → αKG + CO<sub>2</sub> + NADH<sub>m</sub>
45. αKG → SucCoA + CO<sub>2</sub> + NADH<sub>m</sub>
46. SucCoA + Pi + ADP → Suc + ATP
47. Suc + ATP → SucCoA + ADP + Pi
48. Suc → Fum + FADH<sub>2</sub>
49. Fum + FADH<sub>2</sub> → Suc
50. Fum → Mal
51. Mal → Fum
52. Mal → OA + NADH<sub>m</sub>
53. NADH<sub>m</sub> + OA → Mal

### **Serin Grubu Amino Asitlerin Sentezi**

54. 3PG + Glu → Ser + αKG + NADH + Pi
55. Ser + THF → Gly + MetTHF
56. Ser + AcCoA + H<sub>2</sub>S → Cys

### Alanin Grubu Amino Asitlerin Sentezi

57.  $\text{Pyr} + \text{Glu} \rightarrow \text{Ala} + \alpha\text{KG}$   
58.  $2 \text{Pyr} + \text{NADPH} \rightarrow \text{Kval} + \text{CO}_2$   
59.  $\text{Kval} + \text{Glu} \rightarrow \text{Val} + \alpha\text{KG}$   
60.  $\text{Kval} + \text{AcCoA}_m + \text{Glu} \rightarrow \text{Leu} + \alpha\text{KG} + \text{NADH} + \text{CO}_2$

### Histidin Sentezi

61.  $\text{R5P} + \text{ATP} \rightarrow \text{PRPP} + \text{AMP}$   
62.  $\text{PRPP} + \text{ATP} + \text{Gln} \rightarrow \text{His} + \text{PRAIC} + \alpha\text{KG} + 2 \text{PPi} + 2 \text{NADH} + \text{Pi}$

### Aspartik Grubu Amino Asitlerin Sentezi

63.  $\text{OA} + \text{Glu} \rightarrow \text{Asp} + \alpha\text{KG}$   
64.  $\text{Asp} + \text{Gln} + \text{ATP} \rightarrow \text{Asn} + \text{Glu} + \text{AMP} + \text{PPi}$   
65.  $\text{Asp} + \text{ATP} + 2 \text{NADPH} \rightarrow \text{Hser} + \text{ADP} + \text{Pi}$   
66.  $\text{HSer} + \text{ATP} \rightarrow \text{Thr} + \text{ADP} + \text{Pi}$   
67.  $\text{Thr} + \text{NADPH} + \text{Glu} + \text{Pyr} \rightarrow \text{Ile} + \alpha\text{KG} + \text{NH}_4 + \text{CO}_2$   
68.  $\text{AcCoA} + \text{HSer} + \text{H}_2\text{S} + \text{MTHF} \rightarrow \text{Met} + \text{THF}$

### Aromatik Grubu Amino Asitlerin Sentezi

69.  $2 \text{PEP} + \text{E4P} + \text{ATP} + \text{NADPH} \rightarrow \text{Chor} + \text{ADP} + 4 \text{Pi}$   
70.  $\text{Chor} + \text{Glu} \rightarrow \text{Phe} + \alpha\text{KG} + \text{CO}_2$   
71.  $\text{Chor} + \text{Glu} \rightarrow \text{Tyr} + \alpha\text{KG} + \text{NADH} + \text{CO}_2$   
72.  $\text{Chor} + \text{Gln} + \text{PRPP} + \text{Ser} \rightarrow \text{Trp} + \text{Glu} + \text{Pyr} + \text{G3P} + \text{CO}_2 + \text{PPi}$

### Glutamik Grubu Amino Asitlerin Sentezi

73.  $\alpha\text{KG} + \text{NH}_4 + \text{NADPH} \rightarrow \text{Glu}$   
74.  $\text{Glu} + \text{ATP} + \text{NH}_4 \rightarrow \text{Gln} + \text{ADP} + \text{Pi}$   
75.  $\text{Glu} + \text{ATP} + 2 \text{NADPH} \rightarrow \text{Pro} + \text{ADP} + \text{Pi}$   
76.  $\text{Gln} + \text{CO}_2 + 2 \text{ATP} \rightarrow \text{CaP} + \text{Glu} + 2 \text{ADP} + \text{Pi}$   
77.  $2 \text{Glu} + \text{AcCoA}_m + 4 \text{ATP} + \text{NADPH} + \text{CaP} + \text{Asp} \rightarrow \text{Arg} + \alpha\text{KG} + 4 \text{ADP} + \text{Fum} + 5 \text{Pi}$   
78.  $2 \text{Glu} + \text{AcCoA} + 3 \text{ATP} + 2 \text{NADPH} \rightarrow \text{Lys} + \alpha\text{KG} + \text{CO}_2 + 2 \text{NADH}$



### Amino Asit Katabolizması

79. Ala +  $\alpha$ KG  $\rightarrow$  Pyr + Glu
80. Arg +  $\alpha$ KG + NADPH  $\rightarrow$  Glu + 2 NH<sub>4</sub> + CO<sub>2</sub>
81. Asn  $\rightarrow$  Asp + NH<sub>4</sub>
82. Asp +  $\alpha$ KG + NADH  $\rightarrow$  Glu + Mal
83. Cys  $\rightarrow$  Pyr + NH<sub>4</sub> + H<sub>2</sub>S
84. Gln  $\rightarrow$  Glu + NH<sub>4</sub>
85. Glu  $\rightarrow$  NH<sub>4</sub> + NADH +  $\alpha$ KG
86. Gly + MetTHF  $\rightarrow$  Ser + THF
87. His + THF  $\rightarrow$  Glu + F10THF + NH<sub>4</sub>
88. Ile +  $\alpha$ KG  $\rightarrow$  Glu + FADH<sub>2</sub> + 2 NADH + CO<sub>2</sub> + AcCoA + SucCoA
89. Leu +  $\alpha$ KG + ATP  $\rightarrow$  Glu + FADH<sub>2</sub> + NADH + 2 AcCoA + ADP + Pi
90. Phe + NADH  $\rightarrow$  Tyr
91. Pro  $\rightarrow$  Glu + NADH + FADH<sub>2</sub>
92. Ser  $\rightarrow$  Pyr + NH<sub>4</sub>
93. Thr  $\rightarrow$  Gly + NADH + AcCoA
94. Trp + NADPH  $\rightarrow$  2 AcCoA + Ala + CO<sub>2</sub> + NH<sub>4</sub> + For + 2NADH + FADH<sub>2</sub>
95. Tyr +  $\alpha$ KG  $\rightarrow$  Glu + Fum + 2 AcCoA + CO<sub>2</sub>
96. Val +  $\alpha$ KG + ATP  $\rightarrow$  Glu + FADH<sub>2</sub> + 3 NADH + CO<sub>2</sub> + SucCoA
97. Lys + AcCoA + 2  $\alpha$ KG  $\rightarrow$  2 Glu + NADH + CO<sub>2</sub>

### Nükleotidlerin Sentezi

98. PRPP + 2 Gln + Asp + CO<sub>2</sub> + Gly + 4 ATP + F10THF  $\rightarrow$  2 Glu + PPi + 4ADP + 4 Pi + THF + PRAIC + Fum
99. PRAIC + F10THF  $\rightarrow$  IMP + THF
100. IMP + Gln + ATP  $\rightarrow$  NADH + GMP + Glu + AMP + PPi
101. GMP + ATP  $\rightarrow$  GDP + ADP
102. ATP + GDP  $\rightarrow$  ADP + GTP
103. GTP + ADP  $\rightarrow$  ATP + GDP
104. NADPH + ATP  $\rightarrow$  dATP
105. NADPH + GDP + ATP  $\rightarrow$  dGTP + ADP
106. IMP + GTP + Asp  $\rightarrow$  GDP + Pi + Fum + AMP
107. AMP + ATP  $\rightarrow$  2 ADP
108. PRPP + Asp + CaP  $\rightarrow$  UMP + NADH + PPi + Pi + CO<sub>2</sub>
109. UMP + ATP  $\rightarrow$  UDP + ADP
110. UDP + ATP  $\rightarrow$  ADP + UTP

111.  $UTP + NH_4 + ATP \rightarrow CTP + ADP + Pi$   
112.  $CTP + ADP \rightarrow CDP + ATP$   
113.  $CDP + ATP \rightarrow CTP + ADP$   
114.  $CDP + ADP \rightarrow CMP + ATP$   
115.  $ATP + NADPH + CDP \rightarrow dCTP + ADP$   
116.  $UDP + MetTHF + 3 ATP + NADPH \rightarrow dTTP + DHF + 3 ADP + Ppi + Pi$

### **Tek-Karbonlu Öğelerin Sentezi ve Ara-dönüşümü**

117.  $DHF + NADPH \rightarrow THF$   
118.  $Gly + THF \rightarrow MetTHF + NH_4 + NADH + CO_2$   
119.  $MetTHF + NADH \rightarrow MTHF$   
120.  $MetTHF \rightarrow MeTHF + NADPH$   
121.  $MeTHF \rightarrow F10THF$

### **Oksidatif Fosforilasyon ( $P/O = 2$ )**

122.  $NADH_m + 2 ADP + 2 Pi \rightarrow 2 ATP$   
123.  $FADH_2 + ADP + Pi \rightarrow ATP$

### **Taşınım Tepkimeleri**

124.  $CO_2 \rightarrow exp$   
125.  $imp \rightarrow CO_2$   
126.  $imp \rightarrow NH_4$   
127.  $NH_4 \rightarrow exp$   
128.  $2ATP + 4 NADPH \rightarrow AMP + ADP + H_2S + Ppi + Pi$   
129.  $Ppi \rightarrow 2Pi$   
130.  $imp \rightarrow Pi$   
131.  $Pi \rightarrow exp$   
132.  $NADH \rightarrow NADH_m$

### **Karbonhidrat Sentezi**

133.  $ATP + G6P \rightarrow ADP + 6 CARBH + 2 Pi$

### Lipidlerin Sentezi

134.  $\text{AcCoA} + \text{ATP} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{ADP} + \text{MaCoA} + \text{Pi}$   
135.  $\text{AcCoA} + 7 \text{ MaCoA} + 14 \text{ NADPH} \rightarrow 7 \text{ CO}_2 + \text{PLM}$   
136.  $\text{NADPH} + \text{PLM} + \text{ATP} \rightarrow \text{PLLM}$   
137.  $\text{AcCoA} + 8 \text{ MaCoA} + 16 \text{ NADPH} \rightarrow 8 \text{ CO}_2 + \text{STE}$   
138.  $\text{NADPH} + \text{STE} + \text{ATP} \rightarrow \text{OLE}$   
139.  $1.7 \text{ OLE} + 4.4 \text{ PLLM} + 1.4 \text{ PLM} + \text{STE} \rightarrow 8.5 \text{ FA}$   
140.  $2 \text{ FA} + \text{G3P} \rightarrow \text{PA}$   
141.  $\text{CTP} + \text{PA} + \text{Ser} \rightarrow 2 \text{ Pi} + \text{CMP} + \text{PS}$   
142.  $\text{PS} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{PE}$   
143.  $\text{PE} + 3\text{ATP} + 3 \text{ Met} \rightarrow \text{PC} + 3 \text{ AcCoA} + 3 \text{ H}_2\text{S} + 3 \text{ HSer} + 9 \text{ Pi}$   
144.  $\text{PA} + \text{CTP} + \text{G6P} \rightarrow \text{CMP} + \text{PINS}$

### Biyokütle Sentezi

145.  $0.459 \text{ Ala} + 0.161 \text{ Arg} + 0.102 \text{ Asn} + 0.297 \text{ Asp} + 0.007 \text{ Cys} + 0.105 \text{ Gln} + 0.302 \text{ Glu} + 0.290 \text{ Gly} + 0.066 \text{ His} + 0.193 \text{ Ile} + 0.296 \text{ Leu} + 0.286 \text{ Lys} + 0.051 \text{ Met} + 0.134 \text{ Phe} + 0.165 \text{ Pro} + 0.185 \text{ Ser} + 0.191 \text{ Thr} + 0.028 \text{ Trp} + 0.102 \text{ Tyr} + 0.265 \text{ Val} + 0.051 \text{ AMP} + 0.051 \text{ GMP} + 0.067 \text{ UMP} + 0.05 \text{ CMP} + 0.0024 \text{ dATP} + 0.0016 \text{ dGTP} + 0.0016 \text{ dTTP} + 0.0024 \text{ dCTP} + 0.0101 \text{ OLE} + 0.0081 \text{ PLM} + 0.0263 \text{ PLLM} + 0.0061 \text{ STE} + 0.0006 \text{ PA} + 0.005 \text{ PINS} + 0.002 \text{ PS} + 0.005 \text{ PE} + 0.006 \text{ PC} + 2.5 \text{ CARBH} + 23.917 \text{ ATP} \rightarrow \text{Biyokütle} + 23.917 \text{ ADP} + 23.946 \text{ Pi}$

### İnsan Büyüme Hormonu Sentezi

146.  $7 \text{ Ala} + 11 \text{ Arg} + 9 \text{ Asn} + 11 \text{ Asp} + 4 \text{ Cys} + 13 \text{ Gln} + 14 \text{ Glu} + 8 \text{ Gly} + 3 \text{ His} + 8 \text{ Ile} + 26 \text{ Leu} + 9 \text{ Lys} + 3 \text{ Met} + 13 \text{ Phe} + 8 \text{ Pro} + 18 \text{ Ser} + 10 \text{ Thr} + 1 \text{ Trp} + 8 \text{ Tyr} + 7 \text{ Val} + 1168 \text{ ATP} \rightarrow \text{rhGH} + 1168 \text{ ADP} + 1168 \text{ Pi}$

### Maintenance Enerji

147.  $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{Pi}$

## Kısaltmalar

Ac	Asetat
AcCoA	Asetil koenzim A
ADP	Adenozin 5'-difosfat
Ala	L-Alanin
AMP	Adenozin 5'-monofosfat
Arg	L-Arginin
Asn	L-Asparagin
Asp	L-Aspartat
ATP	Adenozin 5'-trifosfat
CaP	Karbomil-fosfat
CDP	Sitidin 5'-difosfat
Cit	Sitrat
Citr	Sitrulin
Chor	Korisimat
CMP	Sitidin 5'-monofosfat
CMPKDO	CMP-3-deoksi-D-manno-oktulosonik asit
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
CTP	Sitidin 5'-trifosfat
Cys	L-Sistein
dATP	2'-Deoksi-ATP
dCTP	2'-Deoksi-CTP
dGTP	2'-Deoksi-GTP
dTTP	2'-Deoksi-TTP
DHF	7.8-Dihidrofolat
E4P	Eritiroz 4-fosfat
F10THF	N <sup>10</sup> -Formil-THF
F6P	Fruktoz 6-fosfat
FA	Yağ asitleri
FADH	Flavin adenin dinükleotit (indirgenmiş)
Fum	Fumarat
G6P	Glikoz 6-fosfat
GDP	Guanozine 5'-difosfat
Glc	Glikoz
Gln	L-Glutamin
Glu	L-Glutamat

Gly	L-Glisin
GMP	Guanozin 5'-monofosfat
GTP	Guanozin 5'-trifosfat
H <sub>2</sub> S	Hidrojen sulfid
His	L-Histidin
Hser	Homoserin
ICit	İzositrat
Ile	L-Izolözin
IMP	İndosinmonofosfat
αKG	α-ketoglutarat
Kval	Ketovalin
Lac	Laktat
Leu	L-Lözin
Lys	L-Lizin
Mal	Malat
MeOH	Metanol
Met	L-Metiyonin
MeTHF	N <sup>5</sup> - N <sup>10</sup> -metenil-THF
MetTHF	N <sup>5</sup> - N <sup>10</sup> -metilen-THF
MTHF	N <sup>5</sup> - metil-THF
NADH	Nikotinamid-adenindinükleotid (indirgenmiş)
NADPH	Nikotinamid-adenindinükleotid fosfat (indirgenmiş)
OA	Okzaloasetat
PEP	Fosfofenolpürivat
Phe	L-Fenilalanin
Pi	İnorganik ortofosfat
PPi	İnorganik pirofosfat
PRAIC	5'-Fosforiboz-4-karboksiamid-5-aminoimidazol
Pro	L-Prolin
PRPP	5-Fosfat-D-ribozilpirofosfat
Pyr	Pürivat
R5P	Ribüloz 5-fosfat
Rib5P	Riboz 5-fosfat
S7P	Sedoheptuloz-7-fosfat
Ser	L-Serin
Sorb	Sorbitol



Suc	Süksinat
SucCoA	Süksinat koenzim A
Xyl5P	Ksiloz 5-fosfat
TCA	Trikarboksilik asit döngüsü
THF	Tetrahidrofolat
Thr	L-Treonin
Trp	L-Triptophan
Tyr	L-Tirozin
UDP	Uridin 5'-difosfat
UMP	Uridin 5'-monofosfat
UTP	Uridin 5'-trifosfat
Val	L-Valine

**TÜBİTAK**  
**PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. PINAR ÇALIK
Proje No:	114R091
Proje Başlığı:	Metabolik Mühendislik ve Reaksiyon Mühendisliği Prensipleriyle İnsan Büyüme Hormonu Üretimi İçin Yeni Biyoteknolojik Proses Geliştirilmesi
Proje Türü:	1001 - Araştırma
Proje Süresi:	36
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	ORTA DOĞU TEKNİK Ü. MÜHENDİSLİK F. KİMYA MÜHENDİSLİĞİ B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/05/2015 - 01/05/2018
Onaylanan Bütçe:	585000.0
Harcanan Bütçe:	545299.83
Öz:	<p>İnsan büyüme hormonu (hGH), 22 kDa molekül ağırlığında, 191 amino asitten oluşan, beyin ön lobundaki hipofiz bezi tarafından üretilen bir proteindir. Hipofiz bezlerindeki somatotropik hücreler tarafından doğal olarak sentezlenen, kanda bulunan hGH'nin, insan organizmasında eksik, bozuk (defective) üretiminin neden olduğu problemlerin düzeltilmesi için dışarıdan verilme ihtiyacı diğer hormonlar gibi- bu farmasötik temel maddenin biyoteknolojik prosesle endüstriyel üretimini önemli yapmaktadır. Bu proje kapsamında, gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz başlatıcısının (promotör) (PGAP) üzerinde bulunan transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgelerini transkripsiyon mühendisliği ile modifiye ederek rekombinant protein (r-protein) üretimini artırmak hedeflenmiştir. Pichia pastoris'te en çok kullanılan başlatıcılardan biri olan PGAP, olası transkripsiyon faktörlerinin (TF) bağlanma bölgeleri açısından analiz edilmiştir. Bulunan TF bağlanma bölgeleri silinerek ya da doğal konumlarında duplike edilerek PGAP varyant kütüphanesi oluşturulmuştur. Aynı zamanda, seçilen TF'ler aşırı-ekspres edilerek ya da silinerek, bu faktörlerin r-protein üretimine etkisi araştırılmıştır. Geliştirilen PGAP varyantları altında modifiye yeşil floresan proteini üretiminin ekspresyon seviyeleri, doğal PGAP'a kıyasla 0.35-3.10 kat arasında değişim göstermiştir. En yüksek ekspresyon seviyelerine ulaşan başlatıcı varyantları olan Pro9 (Gal4-benzeri TF bağlanma bölgesinin duplike edildiği) ve Pro10 (Rfx1 bağlanma bölgesinin silindiği) kontrolü altında ikinci model protein, rekombinant insan büyüme hormonu (rhGH), ekspres edilmiş; doğal PGAP'a kıyasla, sırasıyla, 2.4 ila 1.6 kat daha fazla rhGH üretilmiştir. Yarı-kesikli biyoreaktör işletim koşullarında, Pro9 kontrolü altında ve Gal4-benzeri TF'nin aşırı-ekspres edildiği suş ile rhGH üretiminde birim hücre başına 2.2 kat artış elde edilmiştir. Geliştirilen hibrit yarı-kesikli işletim ile en yüksek rhGH derişimi t = 8 st'te, CrhGH = 611 mg dm-3 elde edilmiştir.</p>
Anahtar Kelimeler:	İnsan büyüme hormonu, Pichia pastoris, promotör, ortam tasarımı, biyoreaktör işletim koşulları
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır