

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



Pichia pastoris'te REKOMBİNANT İNSAN DORNAZ ALFA ÜRETİMİ

Ayça URAS

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEMMUZ 2023

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



Pichia pastoris'te REKOMBİNANT İNSAN DORNAZ ALFA ÜRETİMİ

Ayça URAS

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEMMUZ 2023

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Pichia pastoris'te REKOMBİNANT İNSAN DORNAZ ALFA ÜRETİMİ

Ayça URAS
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 03/07/2023 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet İNAN (Danışman)

Prof. Dr. Ömer ŞİMŞEK

Doç. Dr. Aysun ÖZÇELİK

ÖZET

Pichia pastoris'te REKOMBİNANT İNSAN DORNAZ ALFA ÜRETİMİ

Ayça URAS

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet İNAN

Temmuz 2023; 71 sayfa

Dornaz alfa (rhDNAseI), hücre dışı DNA'nın hidrolizini katalize eden doğada bulunan sayısız nükleazlardan birisidir. Birincil rolü nükleik asitleri parçalamak olan Dornaz alfa pankreas ve tükürük bezleri tarafından salgılanmaktadır. Dornaz alfa ilk olarak 1980'lerin sonunda insan pankreasından klonlanmıştır. DNA'yı seçici bir şekilde parçalayan rekombinant Dornaz alfa, kistik fibrozis (KF) hastalığı tedavisinde kullanılmakta olup viskoz mukusta bulunan DNA'yı hidrolize ederek akciğerlerdeki vizkozitenin azaltılması şeklinde etki mekanizmasını göstermektedir. Bu çalışmada, insan kaynaklı Dornaz alfa enzimi *Pichia pastoris* mayasında etanol ile indüklenebilen ve güçlü bir ekspresyon seviyesine sahip olan *ADH2SNT5* promotörü kontrolü altında rekombinant olarak üreten bir suş geliştirilmiştir. Oluşturulan suşun Dornaz alfa üretim potansiyelinin laboratuvar ölçeğinde araştırılması ve endüstriyel üretime uyarlanabilmesi için ölçek büyütme çalışmaları yapılmıştır. Ayrıca, *P. pastoris* ekspresyon sistemi kullanılarak Dornaz alfa enziminin ekspresyonu ilk kez bu çalışma kapsamında gerçekleştirilmiştir.

Çalışma kapsamında öncelikle, Dornaz alfa enzimini kodlayan gen bölgesi, sentetik *ADH2SNT5* promotörünü içeren vektöre klonlanarak pADH2SNT5αDornaz alfa ekspresyon vektörü elde edilmiştir. Hücre dışına sekresyon şeklinde gerçekleştirilen enzim üretiminde konak hücre olarak, PDI şaperon proteinini 4 kopya içeren *P. pastoris* MK115(PDI) kullanılmıştır. Farklı plazmid kopyası içeren klonlar farklı zeosin (100-1000 µg/mL) içeren plakalardan elde edilmiştir. Seçilen farklı kopya sayısında Dornaz alfa geni içeren klonlar ile üretim koşulları (28 °C sıcaklıkta ve pH 6.0, 225 rpm) BMEY besiyerinde erlenmayer ölçeğinde Dornaz alfa ekspresyonu yapılmıştır. Ekspresyon sonunda, üretim suşu olarak protein üretiminin en yüksek olduğu klon tek kopya gen içeren **pADH2SNT5αDornaz alfa (MK115 PDI) #10** seçilmiştir. Daha sonrasında üretim miktarının artırılabilmesi amacıyla erlenmayer koşullarında farklı sıcaklık ve pH (20-28 °C ve 3-7 pH aralığı) denemeleri yapılmıştır. Erlenmayer ölçeğinde gerçekleştirilen 96 saatlik üretim sonunda, tüm üretim şartlarından elde edilen süpernatant örnekleri ile Dornaz alfa enzim aktivite testi yapılmış ve en yüksek verim pH 7.0 ve üretim sıcaklığı 24 °C olarak elde edilmiştir. Çalışmanın son aşamasında ise oluşturulan klon ile, erlenmayer ölçeğinde belirlenen bazı parametreler (sıcaklık 24 °C ve pH 7.0) kullanılarak minimal (FM22) ve zengin (BMGY) besiyerinde fermentör ölçeğinde üretimler gerçekleştirilerek hızlı performans sıvı kromatografi (FPLC) yöntemi ile histidin etiketli enzimin saflaştırması yapılmıştır. Saflaştırma sonrası enzim aktivite değerleri, FM22 besiyerinde yapılan biyoreaktör üretimi sonucunda, 3525.42 U/ml (13559.32 U/mg) şeklinde bulunmuşken BMGY besiyerinde yapılan üretimde 3325.42 U/ml (15254.23 U/mg) olarak tespit edilmiştir.

Çalışmanın ana hedefi, ticari olarak satılan Dornaz alfa enzimine muadil bir ürün geliştirilebilme potansiyelinin araştırılmasıdır. Bu bağlamda, yapılan bu çalışma ve ileride yapılacak olan karakterizasyon çalışmaları ile, memeli ekspresyon sistemi yerine maya hücre platformu kullanılarak ticari ürüne eşdeğer veya daha yüksek verimde bir ürün elde edilme potansiyeli mevcuttur.

ANAHTAR KELİMELEER: Dornaz alfa, fermantasyon, kistik fibrozis (KF), *Pichia pastoris*, rekombinant Dornaz alfa üretimi, rhDNaseI, *ADH2SNT5* promotoru

JÜRİ: Prof. Dr. Mehmet İNAN

Prof. Dr. Ömer ŞİMŞEK

Doç. Dr. Aysun ÖZÇELİK



ABSTRACT

PRODUCTION OF RECOMBINANT HUMAN DORNASE ALFA IN *Pichia pastoris*

Ayça URAS

MSc Thesis in Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet İNAN

July 2023, 71 pages

Dornase alfa (rhDNaseI) is one of the numerous nucleases common substance in nature that catalyze the hydrolysis of extracellular DNA. Dornase alfa that primary role is to cleaves nucleic acids and secreted by the pancreas and salivary glands. Dornase alfa was first cloned from the human pancreas in the late 1980s. Recombinant Dornase alfa, which selectively cleaves DNA, is used in the treatment of cystic fibrosis (CF) disease and shows its mechanism of action in the form of reducing viscosity in the lungs by hydrolyzing DNA contained in viscous mucus. In this study, a strain was developed to produces the human Dornase alfa enzyme recombinantly under the control of the *ADH2SNT5* promoter which is ethanol-inducible and has a strong expression level in *Pichia pastoris* yeast. Dornase alfa production potential of the created-strain was studied at laboratory scale and was carried out scale-up studies to adapt it to industrial production. In addition, the expression of the Dornase alfa enzyme was carried out in the *P. pastoris* expression system for the first time in this study.

In the first part of the study, the gene region encoding the Dornase alfa enzyme was cloned to the expression vector containing the synthetic *ADH2SNT5* promoter region and *pADH2SNT5 α Dornase alfa* expression vector was obtained. All the production of Dornase alfa carried out as extracellular secretion in this study so *P. pastoris* MK115(PDI) containing 4 copies of the PDI chaperone protein was used as the host cell. Clones containing different plasmid copies were obtained from plate containing different zeocin (100-1000 μ g/mL). Dornase alfa expression was performed in BMEY medium as erlenmeyer scale with clones containing different copy numbers of Dornase alfa gene under standard production conditions (temperature of 28 °C and pH 6.0, 225 rpm). At the end of expression studies, ***pADH2SNT5 α Dornase alfa* (MK115 PDI) #10** containing the clone single-copy Dornase alfa gene was selected as the production strain with the highest protein production. Later, different temperature and pH (20-28 °C and 3-7 pH range) experiments were carried out in order to increase the production amount at erlenmeyer scale. End of 96 hours of the production at erlenmeyer scale, Dornase alfa enzyme activity tests were performed with the supernatant samples obtained from all the tested production conditions so production condition was determined pH 7.0 and the production temperature 24 °C according to the achieved highest Dornase alfa activity. In the last part of the study, some determined parameters (temperature 24 °C and pH 7.0) at the erlenmeyer scale were used to produce Dornase alfa in fermenter scale in minimal (FM22) and rich (BMGY) media by the created clone and the purification of histidine-labeled enzyme was performed by Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC). The enzyme activity values after purification were determined 3525.42 U/ml (13559.32

U/mg) as a result of bioreactor production in FM22 medium while it was determined as 3325.42 U/ml (15254.23 U/mg) as a result of bioreactor production in BMGY medium.

The main target of the study is to investigate potential of developing a product equivalent to the commercially available Dornase alfa enzyme. In this context with this study and future characterization studies, using the yeast cell platform instead of the mammalian expression system can create the potential for a higher yield product or equivalent to commercial product.

KEYWORDS: Dornase alfa, fermentation, cystic fibrosis (CF), *Pichia pastoris*, production of recombinant Dornase alfa, rhDNAseI, *ADH2SNT5* promoter

COMMITTEE: Prof. Dr. Mehmet İNAN

Prof. Dr. Ömer ŞİMŞEK

Doç. Dr. Aysun ÖZÇELİK

ÖNSÖZ

Günümüzde ileri teknolojilerin gelişmesiyle ‘modern biyoteknoloji’ çalışmaları hız kazanmıştır. Moleküler biyoloji; genetik ve mühendislikten yararlanarak rekombinant DNA teknolojisiyle hücreleri geliştirmek, doğal olarak var olmayan veya ihtiyacımız kadar üretilmeyen yeni ve az bulunan ürünleri elde etmek için kullanılan muazzam bir çalışma alanıdır. Dünyada ilk olarak Kasım 2019 tarihinde Çin'in Vuhan bölgesinde ortaya çıkan ve oradan tüm dünyaya yayılan Covid-19 pandemisi sürecinde kullanılan ilaçlar, geliştirilen aşılar PCR tanı testleri ve diğer gelişmeler modern biyoteknolojiye olan merakımı arttırdı. Karantina dönemi boyunca bu alanla ilgili araştırma ve okumak için bolca zamanım oldu. Moleküler genetik ve biyoteknoloji alanında çalışarak çağa ayak uydurmak istediğime karar verdim.

Kendimi bu alanda geliştirebilmek için donanımlı bir laboratuvarda çalışabilme imkânı sağlayan, bilgi ve tecrübelerini paylaşarak bana rehberlik eden ve kazandırdığı akademik öğrenimlerden dolayı danışman hocam sayın Prof. Dr. Mehmet İNAN’a saygılarımı ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarında destek vererek yönlendiren tez savunma juri üyeleri Sayın Prof. Dr. Ömer ŞİMŞEK’e teşekkür ederim ve ayrıca laboratuvar çalışmalarım boyunca anlayışı ve desteğini hiçbir zaman esirgmeden her zaman yardım ettiği için Sayın Doç. Dr. Aysun ÖZÇELİK hocama destekleyici ve yönlendirici katkılarından dolayı çok teşekkür ederim.

Yeri geldi bir abla gibi yeri geldi bir anne gibi her zaman yanımda olan ve bana yardım eden çalışma arkadaşım Dr. Fatma Ersöz’e laboratuvar çalışmalarım ve lisansüstü eğitimim boyunca verdiği desteklerden dolayı çok teşekkür ederim.

Çalışmamın transformasyon analizlerinde yardımcı olan Şeyda Güllü ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyon analizlerini gerçekleştiren Hakan Soytürk’e çok teşekkür ederim.

Benden hiçbir desteğini esirgemeyen aileme sağladığı imkanlar için sonsuz teşekkür ederim.

İlgisi, arkadaşlığı, zor zamanlarımda verdiği fikirler ile rehberim olman ve ne zaman ne için arasam destekleriyle bana güç veren canım arkadaşım Umut Yıldırım’a çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
AKADEMİK BEYAN	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	3
2.1. Dornaz Alfa.....	3
2.2. Tedavi Amaçlı Rekombinant Dornaz Alfa	5
2.2.1. Kistik fibrozis ve Dornaz alfa.....	5
2.2.2. Covid-19 ve Dornaz alfa.....	6
2.2.3. Atelektazisi ve Dornaz alfa.....	7
2.3. CHO Konakçı Organizmasında Rekombinant Dornaz Alfa Üretimi.....	8
2.4. Konakçı Mikroorganizma Seçimi: <i>Pichia pastoris</i>	11
3. MATERYAL VE METOT	15
3.1. Materyal	15
3.1.1. Gen kaynağı.....	15
3.1.2. Suşlar ve plazmitler	15
3.1.3. Besiyerleri, kimyasallar ve restriksiyon enzimleri	16
3.2. Metot	17
3.2.1. Liyofilize plazmid DNA'nın hazırlanması	17
3.2.2. Bakteri ve maya hücrelerinin transformasyona yetenekli hale getirilmesi...17	
3.2.2.1. <i>E. coli</i> hücrelerinin transformasyona yetenekli hale getirilmesi.....	17
3.2.2.2. <i>P. pastoris</i> hücrelerinin transformasyona yetenekli hale getirilmesi	18
3.2.3. Plazmid DNA'ların <i>E. coli</i> 'e transformasyonu	18
3.2.4. pADH2SNT5Dornaz alfa plazmidinin oluşturulması	18
3.2.5. Doğrulanmış pADH2SNT5Dornaz alfa plazmidinin lineer hale getirilmesi ve konakçı <i>P. pastoris</i> MK115(PDI) suşuna transformasyonu	20
3.2.6. Genomik DNA izolasyonu	20
3.2.7. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile gen kopya sayısının belirlenmesi	21

3.2.8. Erlenmayer ölçeğinde Dornaz alfa ekspresyonu	22
3.2.9. Erlenmayer ölçeğinde sıcaklık ve pH optimizasyonu	22
3.2.10. Enzim aktivitesinin belirlenmesi	22
3.2.11. Spesifik enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	23
3.2.12. Dornaz alfa enziminin saflaştırılması	23
3.2.12.1. Manuel yöntemle saflaştırma	23
3.2.12.2. Hızlı performans sıvı kromatografisi (FPLC) yöntemi ile saflaştırma	24
3.2.13. SDS-PAGE ve Western Blot analizleri	24
3.2.14. Toplam protein miktarının belirlenmesi	25
3.2.15. EndoH _f ile deglikozilasyon uygulanması	26
3.2.16. Biyoreaktörde Dornaz alfa ekspresyonu.....	26
4. BULGULAR	30
4.1. Liyofilize Olarak Temin Edilen/Gelen pPICZαDornaz alfa Plazmidinin <i>E. coli</i> Hücrelerine Transformasyonu ve Doğrulaması	30
4.2. Ekspresyon Plazmidinin Oluşturulması	31
4.3. pADH2SNT5Dornaz alfa Ekspresyon Vektörünün <i>E. coli</i> Hücrelerine Transformasyonu.....	32
4.4. Doğrulan Ekspresyon Vektörünün Yetenekli <i>P. pastoris</i> 'e Transformasyonu.....	34
4.5. Genomik DNA İzolasyonu.....	35
4.6. Gen Kopya Sayısının Belirlenmesi	36
4.7. Seçilen Transformantların Erlenmayer Ölçeğinde Dornaz Alfa Ekspresyonu	36
4.8. Erlenmayer Ölçeğinde Ekspresyonu Gerçekleşen Dornaz Alfa Enziminin Aktivite Analizi	37
4.9. SDS-PAGE ve Western Blot Analizleriyle Protein Üretiminin Tespit Edilmesi	38
4.10. Erlenmayer Ölçeğinde Yapılan Üretimlerde Dornaz Alfa Manuel Saflaştırılması ve Toplam Protein Miktarının Belirlenmesi	39
4.11. EndoH _f ile Deglikozilasyon Analizi.....	39
4.12. Sıcaklık ve pH Optimizasyonu Deneyleri	40
4.13. Fermentör Üretimleri	42
4.13.1. FM22 besiyeri fermentör ölçeğinde Dornaz alfa ekspresyonu.....	42
4.13.2. Tamponlu gliserol-kompleks besiyeri fermentör ölçeğinde Dornaz alfa ekspresyonu	47
4.13.3. Fermantasyon üretimleri sonucu elde edilen veriler.....	51

4.13.4. Saflaştırılmış örneklerde glikozilasyon bölgelerinin düşürölmesi	52
4.13.5. Saflaştırılmış örneklerde spesifik enzim aktivitesinin ölçümü.....	52
5. TARTIşMA	54
6. SONUÇLAR	59
7. KAYNAKLAR	62
8. EKLER.....	67
ÖZGEÇMİş	



AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Pichia pastoris*’te REKOMBİNANT İNSAN DORNAZ ALFA ÜRETİMİ” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

03/07/2023

Ayça URAS

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

kDa	: Kilo Dalton
μ	: Mikro (10^{-6})
n	: Nano (10^{-9})
ms	: Milisaniye
V	: Volt
mA	: Miliamper
M	: Molar
L	: Litre
g	: Gram
OD	: Optik yoğunluk
dk	: Dakika
$\times g$	: Santrifüj kuvveti
rpm	: Devir/dakika
.	: Ondalık yazım ayracı

Kısaltmalar

KF	: Kistik fibrozis
KFTR	: Kistik Fibrozis Trans Membran Regülatör
NETs	: Nötrofil hücre dışı tuzaklar
CHO	: Çin hamster yumurta hücreleri
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNaz	: Deoksiribonükleaz
RNaz	: Ribonükleaz
NICU	: Yenidoğan yoğun bakım ünitesi

DHFR	: Dihidrofolateredüktaz
SCP	: Tek hücre proteini
GRAS	: Genellikle güvenli kabul edilir
PDI	: Protein disülfid izomeraz
YPD	: Maya özütü peptonlu dekstroz
LB	: Luria-Bertani
bç	: Baz çifti
dsDNA	: Çift zincirli DNA
BYED	: Tamponlu glukoz-kompleks ortamı
BMGY	: Tamponlu gliserol-kompleks ortamı
BMEY	: Tamponlu etanol-kompleks ortamı
LiAc	: Lityum asetat
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
NFW	: Nükleaz ari su
gDNA	: Genomik DNA
BSA	: Sığır serum albümin
PES	: Polietersülfon
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PBS	: Fosfat tamponlu salin
PVDF	: Polivinilidin Florür
DTT	: Dithiothreitol
TGS	: Tris-Glisin-EDTA

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Dornaz alfa protein sekansı birincil aminoasit dizilimi (Disülfid bağlarını oluşturan sistein aminoasitleri pembe renkle gösterilmiştir. N-bağlı glikozilasyon bölgeleri sarı renkle vurgulanmıştır).....	4
Şekil 2.2. Magnezyum ve kalsiyum iyonu ile kompleks halinde bulunan insan Dornaz alfa yapısı Ca^{+2} iyon bölgeleri gri, Mg^{+2} iyon bölgesi yeşil, bölge III yapısı fosfat iyonu, bölge I 2-[Bis-(2-Hidroksi-Etil)-Amino]-2-Hidroksimetil-Propan-1,3-Diol ve bölge II ve IV yapıları N-Asetil-D-Glukozamin bölgeleri şematik olarak gösterilmiştir.	4
Şekil 3.1. pPICZaADornaz alfa plazmit haritası	15
Şekil 3.2. pADH2SNT5Dornaz alfa ekspresyon vektörü haritası	16
Şekil 3.3. Seçilen klonun fermentör ortamında üretime alınmasının şematik gösterimi.....	27
Şekil 4.1. <i>E.coli</i> NEB5 α hücrelerine transforme edilen pPICZ α Dornaz alfa plazmidinin agaroz jel doğrulaması	30
Şekil 4.2. Dornaz alfa geninin pADH2SNT5 plazmidine klonlanma basamakları	31
Şekil 4.3. Vektör ve insert parçalarının agaroz jelden kesilmesi.....	32
Şekil 4.4. Oluşturulan ekspresyon vektörünün yetenekli <i>E.coli</i> NEB5 α hücrelerine transformasyonu sonucu elde edilen petri plaka üzerindeki koloni görüntüsü	33
Şekil 4.5. <i>Bsp</i> 119I ve <i>Not</i> I restriksiyon enzimleriyle kesim reaksiyonu kurulan pADH2SNT5Dornaz alfa plazmidlerinin agaroz jel görüntüsü.....	33
Şekil 4.6. <i>Pvu</i> II restriksiyon enzimiyle lineer edilen pSNT5 α Dornaz alfa ekspresyon vektörünün agaroz jel görüntüsü.....	34
Şekil 4.7. Farklı zeosin konsantrasyonlu seçim ortamında gelişen transformant <i>P. pastoris</i> MK115(PDI) hücrelerinin plaka görüntüleri	34
Şekil 4.8. Zeosinli agar plakadan seçilen transformant hücrelerin YPD agar besiyerine teke düşürme çizimi sonucu oluşan kolonilerin plaka görüntüleri	35
Şekil 4.9. İzole edilen genomik DNA'ların agaroz jel kontrolü	35
Şekil 4.10. Engelli erlenmayerde Dornaz alfa enzimi ekspresyonunun gerçekleştiği çalkalamalı inkübatör	37
Şekil 4.11. Süpernatant örnekleriyle gerçekleştirilen enzim aktivitesinin agaroz jel doğrulaması	37

Şekil 4.12. (a) Erlanmayer ölçeğinde gerçekleşen üretimden alınan süpernatant örneklerindeki protein üretim veriminin poliakrilamid SDS-PGE jel görüntüsü; (b) Erlanmayer ölçeğinde gerçekleşen üretimden alınan süpernatant örneklerindeki protein üretim veriminin western blot görüntüsü.....	38
Şekil 4.13. (a) Deglikozile elüsyon örneğinin poliakrilamid jel üzerindeki görüntüsü; (b) Deglikozile elüat örneğinin membran üzerindeki görüntüsü	40
Şekil 4.14. Farklı besiyeri ortam pH'larında ekspresyonu gerçekleştiren Dornaz alfa örneklerinin Western blot membran görüntüsü.....	40
Şekil 4.15. Farklı ortam pH'larında 96. saat süpernatant örnekleriyle gerçekleştirilen enzim aktivitesinin agaroz jel doğrulaması.....	41
Şekil 4.16. (a) 20 °C ortam sıcaklığı süpernatant örneklerinin Western blot membran görüntüsü; (b) 24 °C ve 28 °C ortam sıcaklığında süpernatant örneklerinin Western blot membran görüntüsü	41
Şekil 4.17. Farklı ortam sıcaklıklarında pH 7.0'de gerçekleşen üretim süpernatant örnekleriyle gerçekleştirilen enzim aktivitesinin agaroz jel doğrulaması.....	42
Şekil 4.18. (a) Fermantasyon süpernatant örnekleriyle gerçekleştirilen enzim aktivitesinin agaroz jel görüntüsü; (b) Fermantasyon süpernatant örneklerinin Western Blot analiz sonucu.....	43
Şekil 4.19. FM22 besiyerinde gerçekleşen fermantasyona ait zamana bağlı alınan örneklerde yaş hücre ağırlığı, toplam protein miktarı ve hasat örneğindeki spesifik enzim aktivite sonuçları	44
Şekil 4.20. <i>P. pastoris</i> için genel tanımlı FM22 besiyerinde yapılan fermantasyona ait kontrol parametreleri grafiği	45
Şekil 4.21. FM22 besiyerinde eksprese edilen 6x His etiketli Dornaz alfa proteini saflaştırma prosesine ait pik görüntüsü.....	46
Şekil 4.22. FM22 besiyerinde tamamlanan fermantasyon süpernatant örneğinden saflaştırılan elüat ve ticari sığır DNaseI standardının seri dilüsyonlarından elde edilen enzim aktivitesinin agaroz jel görüntüsü.....	47
Şekil 4.23. (a) BMGY besiyerinde gerçekleşen fermantasyona ait süpernatant örnekleriyle gerçekleştirilen enzim aktivitesinin agaroz jel görüntüsü; (b) BMGY besiyerinde gerçekleşen fermantasyona ait süpernatant örneklerinin Western Blot analiz sonucu.....	48
Şekil 4.24. BMGY besiyerinde gerçekleşen fermantasyona ait zamana bağlı alınan örneklerde yaş hücre ağırlığı, toplam protein miktarı ve hasat örneğindeki spesifik enzim aktivite sonuçları	48
Şekil 4.25. BMGY besiyerinde yapılan fermantasyona ait kontrol parametreleri grafiği.....	49

Şekil 4.26. BMGY besiyerinde eksprese edilen 6x His etiketli Dornaz alfa proteini saflaştırma prosesine ait pik görüntüsü	50
Şekil 4.27. BMGY besiyerinde gerçekleşen fermantasyon süpernatant örneğinden saflaştırılan elüat ve ticari sığır DNaseI standardının seri dilüsyonlarından elde edilen enzim aktivitesinin agaroz jel görüntüsü.....	51
Şekil 4.28. Üretim klonu ile gerçekleşen fermantasyon hasat süpernatantının saflaştırma örneklerinden glikolizasyon bölgelerinin düşürülmesi.....	52



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyon karışımı	21
Çizelge 3.2. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyon koşulları	21
Çizelge 4.1. Transformasyon sonucu elde edilen klonların RT-PZR analizi ile belirlenen gen kopya sayıları	36
Çizelge 4.2. FM22 ve BMGY besiyerlerinde gerçekleşen fermentör ölçekli üretimlerde elde edilen veriler	51
Çizelge 4.3. Seçilen üretim suşu ile gerçekleşen fermantasyon süpernatantındaki saflaştırma elüsyon örnekleriyle yapılan spesifik enzim aktivitesi ölçümünde elde edilen zamana bağlı absorbans değişimi	53

1. GİRİŞ

Dornaz alfa (rhDNaseI), hücre dışı DNA'nın hidrolizini katalize eden doğada bulunan bir nükleazdır. Gastrointestinal sistemde birincil rolü nükleik asitleri parçalamak olan Dornaz alfa pankreas ve parotis bezi tarafından salgılanmakta olup ilk olarak 1980'lerin sonunda insan pankreasından klonlanmıştır. Enzim komisyonunca (EC) yapılan sınıflandırma kapsamında Dornaz alfa enzimi, 3. grup olan Hidrolazlar ailesinin 1. alt grubu olan Esterazlar sınıfında yer almaktadır. Esterazların kendi iç gruplandırılmasında da 21. sırada yer alan endodeoksiribonükleazlar grubunun 1. üyesi olan ve EC 3.1.21.1 koduyla bilinen Deoxyribonuclease I grubuna ait olan bir enzim olarak tanımlanmaktadır (Lazarus ve Wagener 2019).

DNA'yı seçici olarak parçalayan rekombinant Dornaz alfa enzimi, Kistik Fibrozis (KF) hastalarının tedavisinde kullanılmaktadır. Hastalarda akciğer mukozasında bulunan DNA'yı seçici bir şekilde hidrolize eder ve vizkoziteyi azaltarak hasta bireylerin akciğer ventilasyonunu iyileştirir böylece nefes alma verme kalitesinin artışıyla solunuma yardımcı olur. Rekombinant Dornaz alfa enzimi, günümüzde Pulmozyme ticari ismi satışı mevcuttur. İlacın ticari satışında 1 kutusunda 30 adet 2.5 mL'lik renksiz sulu çözelti içeren plastik ampül içermektedir. Her bir ampul 1 mg/mL Dornaz alfa enzimi, 0.15 mg/mL kalsiyum klorür dihidrat ve 22 mg/mL sodyum klorür içermekte ve bu karışımın nominal pH'sı 6.3 değerindedir. Ampuller koruyucu folyo poşetlerinde 2–8 °C aralığında buzdolabında saklanarak ve güçlü ışıktan korunarak depolanır ve satışa sunulur.

KF, otozomal resesif geçiş gösteren öldürücü genetik hastalıktır. Hastalığın oluşumu insan genomunun 7. kromozomunda yer alan kistik fibrozis trans membran regülatör (*KFTR*) geninde oluşan mutasyon sonucu görülür. Hastalığın dünya üzerinde görülme sıklığı 1/3000-1/7000 arasında olup bu oran ülkeden ülkeye değişmektedir. Türkiye'de hastalığın görülme sıklığı ile ilgili bir çalışma yapılmamış olmasına rağmen 1/5000 civarında olduğu düşünülmektedir. KF hastalığı 1 Ocak 2015 tarihinden itibaren Sağlık Bakanlığı tarafından yenidoğan tarama programı arasına alınmış ve yenidoğan bebeklerde hastalığın tespiti taranır hale getirilmiştir (Çakır 2016).

KF hastalarının tedavisinde kullanılan rekombinant Dornaz alfa akciğerlerdeki viskoziteyi azaltarak sekresyon ve mukusun ileri derecede dehidrate, koyu ve yapışkan hale gelen lümendeki DNA'yı parçalayarak sekresyonların temizlenmesini desteklemektedir. Ayrıca Dornaz alfa enziminin kistik olmayan fibröz erken doğmuş bebek atelektazisinde (Atelektazi; akciğerin bir bölümünün veya tamamının sönerek içindeki havayı kaybetmesi ve kapanması durumudur) akciğer fonksiyonunu iyileştirdiği gözlenmiş ve bu sebeple tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Bununla birlikte Dornaz alfa enziminin Covid-19 tedavisinde kullanıldığı çalışmalar incelendiğinde; hastalardaki bağışıklık hücrelerinin özellikle nötrofiller, akut fibrin birikimine ve alveolar boşluğa ekstrasvazasyona neden olan pulmoner kapillere sızdığı tespit edilmiştir. Bu aşırı nötrofil birikiminin, mukusu koyu ve viskoz yapan NETs'leri (nötrofil hücre dışı tuzaklar) oluşturduğu bildirilmiştir. Oldukça viskoz olan bu mukus, hastanın solunum fonksiyonunu düşürmektedir ve akciğerlerin ventilasyonunu bozmaktadır. Bu durumda Dornaz alfa'nın Covid-19 pozitif hastalarda tedavi amaçlı kullanılmasıyla NETs'lerin temizlenmesini ve hasta kişilerin akciğer ventilasyonunu iyileştirdiği gözlenmiştir (Karcıoğlu 2020; Okur vd. 2020).

KF hastalarının hayat boyu kullanmak zorunda oldukları Dornaz alfa enziminin kritik öneme sahip olduğu bilinmektedir. Günümüz dünyasında Dornaz alfa üretiminde konakçı organizma olarak memeli hücreleri, memeli hücreleri içerisinden genellikle Çin hamster yumurta hücreleri (CHO) kullanılmaktadır. Terapötik protein üretiminde sıklıkla kullanılan CHO konakçı hücreleri, ölçek büyütme çalışmalarına uygunluğu ve insan glikoprotein yapılarına benzer glikanlar sentezleyebildikleri için sanayi üretimlerinde tercih edilmektedir. Ancak, memeli hücre kültürünün gelişebildiği ve protein ekspresyonu için ihtiyaç duyduğu besiyeri karmaşık bir yapıya sahip olup kültür ortamı hücrenin çoğalmasını desteleyecek serum içermelidir. Serum kullanımının potansiyel kontaminasyon kaynağı ve hücre kültürü ortamına eklenen en pahalı katkı maddesi olması sebebiyle birçok dezavantajı vardır. Ayrıca yüksek derecede parti değişkenliğinden dolayı ve ürün geri kazanımında problemler oluşturması bakımından üretiminde tutarlılık sağlamak genellikle zordur (Zhu vd. 2017). Ayrıca memeli ekspresyon sisteminde yüksek verim elde etmek her zaman mümkün değildir. Memeli ekspresyon sistemleri kullanılarak elde edilecek verim genellikle 0.2 ile 18 mg/mL arasında değişmekle birlikte bakteri ve maya ekspresyon sistemlerinde verim 0.75 ile 700 mg/mL seviyelerine ulaşmaktadır (Fuenmayor vd. 2017).

Biyoterapötik pazarın devam eden genişlemesiyle, rekombinant olarak üretilen proteinlere olan talep giderek artmaktadır. Bu sebeple biyofarmasötik endüstrisi bu proteinleri büyük miktarlarda yüksek verimlilikle üretimini hedeflemektedir. Ticari olarak memeli hücrelerinde üretilen rekombinant Dornaz alfa enziminin memeli hücrelerine kıyasla daha ucuz ve kompleks ortam gerektirmeyen basit büyüme ortamında gelişebilen, yüksek maliyetli proseslere ve pahalı cihazlara ihtiyaç duyulmadan üretilerek artan talebe ayak uydurabilecek üretim arayışları devam etmektedir.

Literatüre bakıldığında rekombinant Dornaz alfa enzimi üretiminde genellikle memeli hücrelerinin kullanıldığı görülmüştür. Ancak memeli hücrelerine göre daha ucuz ve basit büyüme ortamında gelişebilen, moleküler genetik manipülasyonların kolay uygulanabildiği, yüksek seviyede hücre içi/dışı üretim yapabilen, fermentör sistemlerinde yüksek hücre yoğunluğuna ulaşabilen, yüksek maliyetli proseslere ihtiyaç duyulmadan üretim yapabilen maya sistemleri ön plana çıkmıştır. Bu kapsamda *P. pastoris* ekspresyon sistemi kullanılarak Dornaz alfa enziminin ekstraselüler olarak ekspresyonu ilk kez bu çalışma kapsamında gerçekleştirilmiş ve oluşturulan suşun endüstriyel olarak kullanılabilirliği fermentör ölçeğinde test edilerek araştırılmıştır.

Bu tez kapsamında, Karaoğlu vd. (2019) tarafından geliştirilen *P. pastoris* etanol metabolizmasında etanolün yıkımında görev alan *ADH2* geninin promotörü kullanılarak tasarlanan, etanol ile indüklenebilen sentetik *ADH2SNT5* promotörü kontrolünde enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. Oluşturulan klon ile erlenmayer ölçeğinde enzim üretiminin en yüksek olduğu sıcaklık ve pH değerleri tespit edilmiş ve bu şartlarda fermentör ölçeğinde üretimler yapılmıştır. Fermentör ölçekli üretim sonrasında enzim saflaştırılarak aktivite deneyleri gerçekleştirilmiştir. Ticari sığır DNaseI enzimi ile rölatif olarak kıyaslaması yapılmıştır.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Dornaz Alfa

Canlı hücrenin kalıtım materyali olan nükleik asitler, nükleotit birimlerinden oluşmuş polimerlerdir. Nükleik asitlerin enzimatik olarak parçalanması ilk olarak 1903 yılında açıklanmıştır. Nükleazlar yapısında bulundurdıkları şekere göre 1940'lı yıllarda ribonükleazlar ve deoksiribonükleaz'lar olarak iki gruba ayrılmıştır. Deoksiribonükleazların (DNaz) temel özelliği, biyolojik moleküllerde bulunan kararlı kimyasal bir bağ olan fosfodiester bağını hidrolize ederek parçalamasıdır. DNazlar, nükleik asitlerin metabolizmasında ve insan vücudundaki fizyolojik DNA konsantrasyonunun korunmasında önemli bir rol oynamakta olup, kandaki DNA konsantrasyonunun artması, DNA-protein komplekslerinin birikmesine, anti-DNA antikollarının indüklenmesine ve çeşitlenmesine ve dolayısıyla otoimmün hastalıkların gelişmesine neden olmaktadır (Baranovskij vd. 2003).

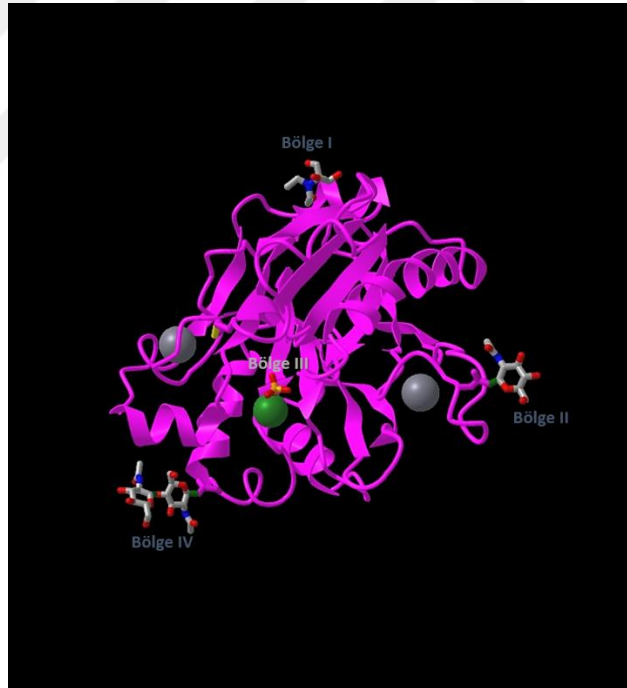
Dornaz alfa insan vücudunda hücre dışı DNA'nın hidrolizini katalize eden bir deoksiribonükleazdır ve enzim komisyonunca (EC) yapılan sınıflandırma kapsamında Dornaz alfa enzimi, EC 3.1.21.1 koduyla bilinen Deoxyribonuclease I grubuna ait olan bir enzim olarak tanımlanmaktadır. Birincil rolü nükleik asitleri sindirmek olan Dornaz alfa sindirim sistemi organları olan pankreas ve parotis bezleri tarafından salgılanır. Dornaz alfa 1980'lerin sonunda insan pankreasından klonlanmıştır (Lazarus ve Wagener 2019).

Rekombinant Dornaz alfa, 260 amino asitten oluşan bir glikoproteindir. Dornaz alfa, Cys¹⁰¹-Cys¹⁰⁴ ve Cys¹⁷³-Cys²⁰⁹ arasında dört sistein ve oksitlenebilen iki disülfid bağı içermektedir. Ayrıca Asn¹⁸ ve Asn¹⁰⁶ aminoasitlerinde iki potansiyel N-bağlı glikozilasyon bölgesi mevcut olup bu bölgelerden glikozillendiğinden dolayı poliakrilamid elektroforez jeli üzerinde 29.3 kDa olan moleküler kütesinden daha yüksek moleküler ağırlıkta olan 35 kDa'luk bir bant olarak tespit edilmektedir. Dornaz alfa asidik karakterde bir proteindir ve izoelektronik noktası (pI) değeri 4.18 olarak hesaplanmıştır. (Parsiegla vd. 2012; Lauková vd. 2020). Dornaz alfa'nın birincil amino asit dizilimi Şekil 2.1'de gösterilmiştir.

Dornaz alfa proteinin enzim aktivitesinin Ca ve Mg iyonlarına bağlı olduğu bilinmekte olup enzimin katalizi sırasında, Ca⁺² metal iyonları Asp²⁰¹ ve Asp¹⁰⁷'ye yakın katyon bağlanma bölgelerine ve Mg⁺² metal iyonu Asp¹⁶⁸ aktif bağlanma bölgesine bağlanarak enzim aktivitesinde görev almaktadır. (Parsiegla vd. 2012; Lazarus ve Wagener 2019). Aktif bağlanma bölgelerine bağlanmış Ca⁺² ve Mg⁺² metal iyonlarıyla kompleks halinde bulunan Dornaz alfa proteinin üç boyutlu şematik gösterimi Şekil 2.2'de gösterilmiştir.

LOCUS	4AWN_A	260 aa	linear	PRI 01-DEC-2020
DEFINITION	Chain A, DEOXYRIBONUCLEASE-1.			
ACCESSION	4AWN_A			
VERSION	4AWN_A			
SOURCE	Homo sapiens (human)			
ORGANISM	<u>Homo sapiens</u> Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.			
ORIGIN	1 lkiaafniqt fgetkmsnat lvsyivqils rydialvqev rdshltavgk lldnlnqdap 61 dtyhyvvsep lgrnsykery lfvyvdpqvs avdsyyyddg cepgndtfn repaivrffs 121 rftvrefai vplhaapgda vaeidalydv yldvqekwgl edvmlmgdfn agcsyvrpsq 181 wssirlwtsp tfqwlipdsa dttatptha ydrivvagml lrgavvpdsa lpfnfqaayg 241 lsdqlaqais dhypvevmlk			

Şekil 2.1. Dornaz alfa protein sekansı birincil aminoasit dizilimi (Disülfid bağlarını oluşturan sistein aminoasitleri pembe renkle gösterilmiştir. N-bağlı glikozilasyon bölgeleri sarı renkle vurgulanmıştır) (NCBI GenBank, www.ncbi.nlm.nih.gov)



Şekil 2.2. Magnezyum ve kalsiyum iyonu ile kompleks halinde bulunan insan Dornaz alfa yapısı Ca^{+2} iyon bölgeleri gri, Mg^{+2} iyon bölgesi yeşil, bölge III yapısı fosfat iyonu, bölge I 2-[Bis-(2-Hidroksi-Etil)-Amino]-2-Hidroksimetil-Propan-1,3-Diol ve bölge II ve IV yapıları N-Asetil-D-Glukozamin bölgeleri şematik olarak gösterilmiştir. (NCBI GenBank, www.ncbi.nlm.nih.gov)

2.2. Tedavi Amaçlı Rekombinant Dornaz Alfa

2.2.1. Kistik fibrozis ve Dornaz alfa

KF hastalığı ilk olarak 1938'de klinik bir sendrom olarak tanımlanmış ve kısa bir süre sonra otozomal resesif (hastalık geninin ortaya çıkması için her iki gen kopyasında da mutasyonun görülmesi) gösteren öldürücü bir hastalık olduğu yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır. KF hastalığı, genellikle vücut epitel hücrelerindeki Cl^- iyon konsantrasyonu artışına bağlı solunum yolu hastalığı şeklinde kendini göstermektedir. (Welsh ve Smith 1993). KF hastalarının ortalama yaşam süresi 30-33 yıl olup az sayıda hasta bireyler 40-50 yıl yaşam süresine kadar ömre sahip olabilmektedir. Çok nadir olmakla beraber hafif düzeyde kistik fibrozis hastalarının 50 yıldan daha fazla yaşayabildiği raporlanmıştır. (Tug ve Tug 2003).

KF hastalığı epidemiyolojisi incelendiğinde dünya genelinde hastalığın görülme sıklığı 1/3000-1/7000 arasında değişmektedir. Bu oran Avrupa ülkelerinde 1/2500; Avustralya'da yaklaşık 1/3000; Amerika Birleşik Devletleri'nde 1/4000; Türkiye genelinde henüz sıklığı tam olarak bilinmese de ortalama 1/5000 civarında olduğu düşünülmektedir. KF 1 Ocak 2015 tarihinden itibaren Sağlık Bakanlığı tarafından yenidoğan tarama programı arasına alınmış olup yenidoğan bebeklerde rutin olarak taranması zorunlu olan bir hastalıktır (Çakır 2016; Scotet vd. 2020).

KF hastalığının oluşumu insan genomunun 7. kromozomunun uzun kolunda yer alan 250 kb'lık bir gen olan kistik fibröz transmembran regülatör (*KFTR*) genindeki mutasyonlardan kaynaklanan otozomal resesif gösteren ölümcül bir hastalıktır (Coakley ve Boucher 2007). Akciğerler, üst solunum yolu, pankreas, karaciğer, safra kesesi, bağırsaklar, ter bezlerinin epitel hücre apikal zarında bulunan *KFTR* proteini hücrelerin içerisine ve dışarısına doğru klor iyonu (Cl^-) transportundan sorumludur (Hanssens vd. 2021). *KFTR* geninde hastalığa yol açabilecek iki binden fazla mutasyon tanımlanmış olup *KFTR* geninde en sık rastlanan mutasyon 10. ekzonda 3 bazlık delesyon sonucu oluşan $\Delta F508$ mutasyonunun tipidir. Bu mutasyon tipi fenilalanin amino asidini kodlayan 508. kodonun delesyonu sonucu gözlenmektedir (Hangül vd. 2019). Dünya çapında, $\Delta F508$ mutasyonu tüm KF'e yol açan mutasyonların yaklaşık üçte ikisinden (%66)'dan sorumlu olduğu bilinmektedir (Bobadilla vd. 2002).

KF hastalığında gözlenen mutasyonlar sonucu klor ve sodyum transportu etkilenmekte olup hastalarda hücrelerden dışarıya klor çıkışı durur ve hücre içine sodyum girişi artar. Böylece epitel hücrelerden salınan sekresyonlar koyu ve yapışkan kıvamlı bir hal alır. Koyu kıvamlı ve yapışkan sekresyon kronik hava yolu tıkanıklığına sebep olduğu için akciğerlerde gözlenen tutulum sonucu öksürük nöbetleri ve tekrarlayan akciğer enfeksiyonları gözlenmektedir. İleri düzey hastalıklarda pankreas yetmezliği ve atipik diyabet görülebilmektedir. KF hastalarının tedavisinde kullanılan Dornaz alfa akciğerlerdeki viskoziteyi azaltarak sekresyon ve mukusun ileri derecede dehidrate, koyu ve yapışkan hale gelen lümendeki DNA'yı parçalayarak sekresyonların temizlenmesini desteklemektedir (Çakır 2016).

Aile öyküsü ve KF hastalığı ile uyumlu tipik KF belirtileri gösteren hasta bireylerde, klorür geri absorbe edilemediği için terde klorür düzeyi yükselmekte ve bu nedenle klasik bir yöntem olan "Ter Testi" olarak ifade edilen terdeki klorür

konsantrasyonunun ölçümü, KF teşhisi için kesin yöntem olarak kabul edilmektedir. Sağlıklı bir insan terinde klor değeri ≤ 40 mmol/L'den düşük klor konsantrasyonunda seyrederek. Terdeki klor değeri ≥ 60 mEq/L ise KF hastalığı tanı riskini yükseltir ancak bu testin en az iki tekrar sonucu aynı yüksek değer tespit edilmesiyle kesin tanı konulabilmektedir. Bununla birlikte ara değer risk grubuna girer ve KF tanısını düşündürebilmektedir (Amaral 2014).

2.2.2. Covid-19 ve Dornaz alfa

WHO raporlarına göre 27 Aralık 2019'da Çin Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi ve Wuhan şehir sağlık yetkilileri tarafından Wuhan şehrinde nedeni bilinmeyen üç pnömoni salgını bildirilmiştir. 7 Ocak 2020'de Çin Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi tarafından hastaların alt solunum yolu örneklerinde yeni bir koronavirüs tespit edilerek bu yeni koronavirüs, daha sonra şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs-2 (SARS-CoV-2) olarak adlandırılmıştır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), 2019'da tanımlanan SARS-CoV-2'nin neden olduğu bu enfeksiyonu; CO ve VI heceleri İngilizce karşılığı Coronavirus olan koronavirüsten, "D" harfi ise İngilizce'de hastalık anlamına gelen "disease" kelimesinden, 19 ise vakaların görülmeye başlandığı yıl olan 2019'dan köken alınarak adlandırılmıştır. Akut solunum sendromu koronavirüs-2 pandemisi sonucu 10 Mayıs 2023 itibarıyla, COVID-19 salgınında dünya çapında 680 milyondan fazla vaka ve 6.8 milyondan fazla ölüm gözlenmiştir. Türkiye'de hastalık sonucunda 17 milyondan fazla vaka gözlenmiş ve 100 binden fazlası ölüm ile sonuçlanmıştır (Anonim 1).

Doğal bağışıklığın ilk savunma mekanizması olan nötrofiller bir tür fagosittir ve beyaz kan hücrelerinde bulunmaktadır. Beyaz kan hücrelerinin yapısında %40'ından %70'ine kadar bulunmaktadır. (Actor 2012). Nötrofillerin patojenlerle mücadelesinde hücre dışı tuzaklar (NETs) olarak tanımlanan ağısı yapılar oluşturduğu gözlenmiştir. Bu savunma mekanizması sonucu oluşan NETs granülleri, histonlardan oluşan lineer DNA elementleridir. Yoğun stoplazmik protein içeren ve kromatin yapısındaki NETs ise sadece DNaz ile yıkılabilmektedir (Yıldız 2016).

SARS-CoV-2 enfeksiyonunun erken bir göstergesi olarak kandaki NETs seviyesi yükselmektedir. Enfeksiyon sonucu vücutta uygun şekilde düzenlenemediğinde NETs ağ yapıları trombozu başlatma ve inflamasyonu yayma potansiyeline sahiptir (Zuo vd. 2020). Normal koşullarda asıl görevi vücudu savunma olan bu NETs ağları eğer çok fazla etkin olursa immün hiper aktivasyonuna neden olabilmektedir. Covid-19 patogeneğinde NETs ağları, pulmoner kapillere infiltre olur ve fibrin birikimine, alveolar boşluğa ekstrasvazyona neden olmakta ve bu aşırı NETs birikimi mukusu yoğun ve kıvamlı hale getirmektedir. Oldukça viskoz yapıya dönüşen mukus hasta solunum fonksiyonunu düşürerek ventilasyonu bozarmaktadır. Yapılan çalışmalarda Dornaz alfa'nın kistik fibröz tedavisinde olduğu gibi Covid-19 hastalarında da koyu ve yapışkan mukus salgısını çözmeye yardımcı olabileceği ön görülerek bununla ilgili bazı çalışmalar yapılmıştır (Okur vd. 2020).

Okur vd. (2020)'nin ön vaka çalışmalarına göre, KF hastalarında olduğu gibi Covid-19 hasta vakalarında da gözlenen viskoz mukus problemi rekombinant Dornaz alfa enzimi kullanılarak hastalık semptomları araştırılmıştır. İlk vaka 64 yaşında tip 2 diyabet hastalığı olan bir erkek, ikinci vaka 33 yaşında meme kanseri hastalığı olan bir kadın ve

üçüncü vaka 27 yaşında başka bir hastalığı olmayan bir kadın şeklinde ön Covid-19 vakaları incelenmiştir. Hastalara 8 günlük rekombinant Dornaz alfa ile tedavi uygulanarak Toraks Bilgisayarlı Tomografi (Toraks BT) ile göğüs bölgesinin detaylı görüntüsü ve solunum hızları değerlendirilmiştir. İlk vakanın tedaviye başlamadan önce solunum hızı %95 ve tedavi sonrası solunum hızı %97'e yükselmiş ve nefes darlığı, ciğerlere yeterince hava alamama hissi gibi diğer dispneik problemlerinde gerileme olduğu tespit edilmiştir. İkinci vakanın tedaviye başlamadan önce solunum hızı oksijen desteğiyle %99, tedavi sonrası solunum hızı oksijen desteği olmadan %97'e ve solunum hızı normal seviyesi olan 18 nefes/dk'ya ulaştığı gözlenmiştir. Üçüncü vakanın tedaviye başlamadan önce solunum hızı 4 L/dk oksijen desteğiyle %91 iken tedavi sonrası solunum hızı 1 L/dk oksijen desteği ile %99'a yükselmiş ve öksürük problemlerinde azalma olduğu bildirilmiştir. Dornaz alfa ile tedavi edilen hastaların klinik iyileşmesinin yanında ek olarak tedaviden 7 gün sonrasında viral yükleri değerlendirilmek üzere hastalardan nazofaringeal ve orofaringeal örnekleri toplanmış ve kantitatif RT-PCR analizi kullanılarak viral yüklerinde ciddi azalma olduğu tespit edilmiştir.

2.2.3. Atelektazisi ve Dornaz alfa

Atelektazi hastalığı, akciğerlerdeki hava yollarının fiziksel bir engel sebebi ile akciğer parankiminde oluşan hacim kaybı sonucu akciğerlere yeterli hava dolamaz ve solunum işlevinin yerine getirilemediği bir hastalık olarak bilinmektedir. KF'de olduğu gibi akciğer ventilasyonu bozulur ve hücre dışı DNA birikimi nedeniyle sekresyonlar oldukça viskoz hale gelmektedir. Rekombinant Dornaz alfa akciğerlerdeki ekstraselüler DNA'yı parçalayarak DNA'nın depolimerize olmasını sağlar böylece pürülan mukusun viskoelastisitesi ve yüzey gerilimini azaltarak tedavi uygulanmaktadır (Kuşkaya 2012; Crescimanno ve Marrone 2014).

Genellikle yenidoğan ve prematüre doğumlarda daha sık görülen atelektazisi tedavisinde prematüre bebeklerin boyutları küçük olması nedeniyle geleneksel tedavi olan bronkoskopik olarak çıkarılması her zaman mümkün olmayan bir tedavi yöntemidir. Dornaz alfa kullanılarak tedavi edilmiş sınırlı sayıda çalışma mevcut olup yenidoğan atelektazilerinde Dornaz alfa kullanımı yeni yaklaşımlardan bir tanesi olarak değerlendirilmektedir (Küpeli vd. 2003; Erdevi vd. 2008).

Fedekar vd. (2012) tarafından yenidoğan yoğun bakım ünitesi (NICU)'nde hasta bebekler üzerinde Dornaz alfa kullanılarak tedavi uygulama çalışması gerçekleştirmiş ve hasta yenidoğan bebeklere 3 gün boyunca günde 2 kez nebulize Dornaz alfa verilmiştir. Tedavi öncesi ve sonrası solunum hızı, fraksiyonel solunan oksijen, göğüs radyografisi görüntüsü ve tedaviye bağlı olarak advers reaksiyon olayları kaydedilerek değerlendirme yapılmıştır. Tedavi sonrası hastaların radyografik skorlarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düzelme gözlemlendiği ve dakikadaki nefes sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma kaydedildiği bildirilmiştir. Benzer şekilde, tedaviden sonra solunum hızı ve fraksiyonel solunan oksijende istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma kaydedildiği bildirilmiştir. Özetle, 22 hastanın 18'inde 3 günlük nebulize rekombinant Dornaz alfa tedavisi ardından atelektazide klinik ve radyolojik bir iyileşme kaydedilmiştir. Diğer 4 hastada atelektazi 1 kez ve 1 hastada 4 kez nüks ettiği gözlenmiş ve tekrarlayan atelektazili hastalara kombine endotrakeal ve nebulize tedaviler uygulanmış ve 4 hastada atelektazi düzeldiği bildirilmiştir. Üç hasta çeşitli nedenlerle hayata yenik düşmüş ve

mortalite oranı %13.6 olarak tespit edilmiştir. Hastaların hiçbirinde Dornaz alfa ile ilişkili yan etki gözlenmediği de bildirilmiştir.

2.3. CHO Konakçı Organizmasında Rekombinant Dornaz Alfa Üretimi

Rekombinant terapötik protein üretiminde Çin hamster yumurtalık (CHO) hücrelerinin kullanılması ilk kez 1987’de insan doku plazminojen aktivatörünün (tPA) üretimiyle gerçekleşmiştir. Bu gelişmeyle birlikte, CHO hücreleri özellikle kompleks glikoproteinlerin endüstriyel üretimi için, ana hücre hattı haline gelmiştir. 1987’den beri, en çok satan 10 biyolojik ilacın 7’si CHO hücreleri kullanılarak üretildiği bilinmektedir (Noh vd. 2013). Rekombinant Dornaz alfa üretimi Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından ilk kez 1993 yılında onaylanmış ve günümüz endüstrisinde rekombinant Dornaz alfa enzimi CHO hücrelerinde üretilmektedir (Hudayberdiyev ve Öner 1997).

Memeli hücreleri günümüzde biyofarmasötik ilaç üretiminde en sık kullanılan ekspresyon sistemini oluşturmaktadır. Memeli hücrelerinin popülaritesinin nedeni, rekombinant proteinlerin biyolojik aktivitesi için bir ön koşul olan translasyon sonrası modifikasyonları gerçekleştirme potansiyeli olarak düşünülmektedir. Memeli hücreleri tarafından gerçekleştirilen translasyon sonrası modifikasyonlar arasında proteolitik işleme, disülfid bağı oluşumu, glikosilasyon, γ -karboksilasyonu, β -hidroksilasyonu, O-sülfatlanması ve amidasyonu yer almaktadır (Berlec ve Štrukelj 2013). Bu modifikasyonlar, proteinin klinik etkinliğini modüle etmekte ve biyokimyasal karakterizasyonunu etkilemektedir. Memeli ekspresyon sisteminde üretilen proteinler; tam olarak katlanmamış, parçalarına ayrılmış veya birleştirilmemiş proteinlerin sekresyon yolağına ilerlemesinin seçici olarak engellendiği bir süreç aracılığıyla protein ekspresyonu düzenlenmektedir. Doğru katlanmış protein hücre yolağına ilerleyerek genellikle aktif protein olarak salgılanmaktadır. Memeli hücre ekspresyonunun bir diğer önemli özelliği, omurgalılar tarafından üretilen glikoproteinlere yakından benzeyen, sialil glikoformları taşıyan proteinleri eksprese edebilme yeteneği olarak bilinmektedir (Gray 1997).

Üretim verimi sadece konakçı organizma seçimine bağlı olmayıp aynı zamanda eksprese edilecek protein yapısına da bağlı olduğundan, farklı sistemler arasında üretim verimlerinin karşılaştırılması her zaman doğru olmamaktadır. Buna rağmen, genellikle bakteri ve maya ekspresyon sistemlerinde, yüksek konsantrasyonlarda üretim ve verim elde edilebilmektedir. Bakteri ve maya ekspresyon sistemlerinde verim 0.75 ile 700 mg/mL protein arasında değişebilmekte iken memeli ekspresyon sistemleri kullanılarak elde edilecek verim genellikle 0.2 ile 18 mg/mL arasında değişebilmektedir (Fuenmayor vd. 2017).

1957'den bu yana çok sayıda CHO türevli çeşitli CHO-K1, CHO-DXB11 ve CHO-DG44 gibi konakçı organizmalar geliştirilmiştir. CHO hücre hattının iki türevi, CHO-K1 ve CHO pro-3, günümüzde biyo işlemede en yaygın olarak kullanılan iki hücre hattıdır. (Kodati ve Darbha 2016; Zhu vd. 2017).

Memeli hücrelerinde heterolog genlerin ekspresyonu için genellikle BacMam teknolojisi gibi tekniklerle türetilen vektörler kullanılmaktadır. BacMam teknolojisi, memeli hücrelerinde genleri verimli bir şekilde iletebilmek ve gen ifadesinin

gerçekleştirilebilmesi amacıyla çift sarmallı DNA böcek virüslerini (baculovirüs) araçlar olarak kullanılmasıyla gerçekleşen biyo mühendislik teknolojisidir. CHO'da virüs kaynaklı kullanılan vektörler; Simian Virüsleri 40 (SV40), sitomegalovirüs (CMV), poliomavirüs, herpesvirüs ve papovirüs gibi virüs vektörleri şeklindedir. Bu vektörler; neomisin, higromisin veya puromisin gibi bazı antibiyotiklere direnç genleri içermektedir. Bununla birlikte en yaygın seçim markör sistemleri, DHFR aktivitesi olmayan CHO hücreleri veya NS0 hücrelerinde glutamin sentaz (GS) ile kombinasyon halinde dihidrofolat redüktaz (DHFR) genine dayanmaktadır. Seçilim, ortam bileşiminde uygun metabolitin (DHFR için hipoksantin ve timidin; GS için glutamin) olmamasıyla sağlanmaktadır. Seçici gen, rekombinant protein geni ile aynı plazmid üzerinde veya ayrı bir plazmid üzerinde mevcut olabilmektedir (Khan 2013; Kodati ve Darbha 2016).

Yabancı genin memeli hücrelerine transfeksiyonu için kullanılan farklı yöntemler mevcuttur. Gen transferinin sağlanabilmesi için kimyasal lipozomlar, kalsiyum fosfat, DEAE-dekstran, polibren, fiziksel elektroporasyon ve mikroyenjeksiyon yöntemleri kullanılarak DNA'nın hücrelere doğrudan transferi sağlanmaktadır. CHO ekspresyon sisteminde transfeksiyon genellikle elektroporasyon kullanılarak yapılmaktadır. Plazmid DNA endonükleazlar veya eksonükleazlar tarafından lineerleştirilir ve rekombinazların etkisiyle konakçı hücre genomuna transforme edilmektedir (Khan 2013).

Memeli hücrelerin optimum gelişme parametreleri incelendiğinde, çoğu memeli hücresi gibi CHO hücreleri de en iyi 37 °C'de gelişmektedir. CHO hücrelerinde, rekombinant protein üretimini artırmak için genellikle gelişme ortamı 37 °C'nin altındaki sıcaklıklarda ekspresyon yapılmaktadır. Kültür sıcaklığının düşürülmesiyle birlikte rekombinant CHO (rCHO) hücre hattının spesifik üretkenliği artsa da bazı rekombinant proteinlerin ekspresyonunda hücresel glikozilasyonda önemli bir modifikasyon olan sialilasyon (glikan zincirlerine sialik asit eklenmesi) seviyelerinde azalmalar gözlemlenmektedir. Dokuz karbonlu bir şeker olan sialik asit, stratejik olarak glikanların son konumunu düzenleyerek hücre ile matris arasında bir bağlantı molekülü olarak işlev gördüğünden dolayı CHO konakçı organizmalarında rekombinant terapötik protein ekspresyonunda sialilasyon da azalma istenmemektedir (Türker ve Bakar 2021). Buna örnek olarak, CHO konakçısında rekombinant insan EPO-Fc protein üretiminde kültür sıcaklığının 37 °C'den 30 °C'e düşürülmesi ile sialilasyon seviyesinde %40 azalmaya yol açtığı belirlenmiştir. CHO hücreleri gelişmek için nötr pH'a ihtiyaç duymakta ve pH indikatörlerin kültür ortamına direk ilavesi gerekmektedir. CHO hücrelerinin gelişim gösterebildiği ortamın CO₂ oranı istenen oran olan %5'e kadar değişen inkübatörlerde gerçekleştirilmektedir. Hazırlanan kültür ortamında oluşabilecek potansiyel kirleticilerle mücadele etmek için antibiyotikler (penisilin, streptomisin, kanamisin, neomisin veya gentamisin) tek tek veya kombinasyon halinde kullanılabilmeyle beraber antimikotik maddeler de kullanılabilir. Benzer şekilde, amfoterisin B (Fungizone) ve mikostatin (Nystatin) gibi fungusitler tek başına veya antibiyotik/antimikotik solüsyonlar olarak kullanılabilir (Phelan 2007; Ha Kwang vd. 2021). Bu şekilde farklı antibiyotik/antimikotik/fungusitlerin kullanımı ile potansiyel kontaminasyonlardan korunma gerçekleştirilmektedir.

Memeli hücre kültürünün gelişebildiği ve protein ekspresyonu için ihtiyaç duyduğu besiyeri karmaşıktır. Besiyeri ortamının memeli hücrelerinin hayatta kalabilmeleri ve çoğalabilmeleri için *in vivo* maruz kaldıkları besinleri ve büyüme faktörlerini sağlaması gerekmektedir. Kültür ortamı hücrenin çoğalmasını desteleyecek

serum (Serum bileşenleri; büyüme faktörleri, hormonlar, taşıma ve bağlayıcı proteinler, bağlanma faktörleri, proteaz inhibitörleri ve lipidler dahil olmak üzere gerekli bileşenler bütünüdür) içermelidir. Bununla birlikte, memeli hücre kültüründe serum kullanımının potansiyel bakteri bulaşması, mikoplazma ve viral kontaminasyon kaynağı, hücre kültürü ortamına eklenen en pahalı katkı maddesi olması gibi birçok dezavantajı bulunmaktadır. Ayrıca yüksek derecede parti değişkenliğine sahip olması ve ürün geri kazanımında problemler oluşturabilecek kadar yüksek konsantrasyonda protein içermesinden dolayı üretimde tutarlılığını sağlamak karşılaşılan diğer problemler olarak sayılabilmektedir (Zhu vd. 2017).

Rekombinant Dornaz alfa üretimine yönelik literatür bilgileri tarandığında çalışma azlığı görülmektedir. Rekombinant Dornaz alfa üretiminde memeli sistemi dışında farklı bir sistem kullanılarak protein üretimi gerçekleştirilmediği gözlenmiştir. Memeli hücrelerinde rekombinant Dornaz alfa üretimine yönelik literatür bilgileri tarandığında US 20170233704A1 no'lu patentte yapılan çalışma sonucuna göre; rekombinant Dornaz alfa kodlayan gen bölgesinin pE-mIRES-GS-puro vektörüne klonlaması yapılarak ekspresyon vektörü oluşturulmuş ve CHO-K1 konakçı organizmasında SV40 promotörü kontrolü altında eksprese edilmiştir. Mevcut çalışmada, gelişme ortamı sıcaklığı 35-37 °C aralığında ayarlanmış, üretim ortamına hava litresi başına 125 mL/dk, CO₂ litresi başına 37.5 mL/dk oranında sağlanmış ve gelişme ortamı 70 rpm hızında karıştırma sağlanmıştır. Bu şartlar altında; fermantasyonun 11. gününde 0,728 mg/mL ve 14. gün sonunda süpernatantta 0,778 mg/mL rekombinant Dornaz alfa üretimi gerçekleştirilmiştir. (Koshimura vd. 2017). Literatür çalışmalarının eksiliği sebebiyle farklı çalışmalar ile rekombinant Dornaz alfa üretimiyle ilgili verim sonuçlarına ulaşılamamıştır.

Literatür taraması sonucu elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, memeli ekspresyon sisteminde üretilen Dornaz alfa proteini veriminin oldukça düşük olduğu görülmektedir. Uzun fermantasyon süresi sonunda yaklaşık olarak 0,8 mg/mL protein ekspresyonu gerçekleştirilebilmiştir. Ayrıca fermantasyon süresinin uzunluğu ve fermantasyon boyunca gelişme ortamının yüksek sıcaklıklarda olması özellikle terapötik proteinlerin üretiminde verimin düşmesi, protein degradasyonu veya proteinlerin sıcaklık stresiyle kısmi inhibisyonunun gözlenebilme olasılığını arttırmaktadır ve böylece proteinin geri kazanımında problemler yaratabilmektedir. Biyofarmasötik endüstrisindeki artan talebin karşılanabilmesi için düşük maliyetli ve yüksek hacimli üretime imkan verebilen ve kısa sürede üretim yapılabilen sistemler geliştirilme arayışına gidilmiş olup memeli hücrelerine alternatif olarak, rekombinant Dornaz alfa enzimi üretiminde *P. pastoris* ekspresyon sistemi kullanılarak Dornaz alfa enziminin ekspresyonunun gerçekleştirilmesi memeli hücrelerine kıyasla ucuz ve basit büyüme ortamında gelişebilen, yüksek seviyede hücre içi veya hücre dışı üretim yapabilme kapasitesine sahip, fermentör sistemlerinde yüksek hücre yoğunluğuna ulaşabilen, entegre edilen hedef geni kolayca ekspresyonunu yapabilen, yüksek maliyet ve pahalı cihazlara ihtiyaç duyulmadan maya ekspresyon sistemlerinde ekstraselüler olarak ekspresyonu gerçekleştirilmesi endüstriyel uygulamalarda memeli hücrelerine kıyasla bir çok avantaj sağlamaktadır.

2.4. Konakçı Mikroorganizma Seçimi: *Pichia pastoris*

Pichia pastoris Philips Petrol Şirketi tarafından keşfedilmiş olup ilk endüstriyel uygulama alanı, hayvan yemine katkı maddesi tek hücre protein (SCP) üretiminde katkı maddesi olarak kullanılmış olan bir mayadır. Metanol içeren basit ortamlarda yüksek hücre yoğunluğunda gelişebilmesinden dolayı metanolü karbon kaynağı olarak tercih edebildiği için metilotrofik bir maya olarak da bilinmektedir. *P. pastoris*'in SCP üretiminde kullanımı 1960'ların sonlarında metandan (doğal gaz) metanol sentezi ucuz olduğu için ticari üretimlerde uygun bir seçenek olarak kabul edilmiştir. Ancak 1970'lerde gerçekleşen petrol krizi sonucu metan gazı fiyatları artmış ve SCP üretiminde *P. pastoris*'e olan ilgi maliyetin yükselmesinden dolayı azalmıştır. Daha sonrasında 1980 yıllarında La Jolla, California'da bulunan Salk Institute Biotechnology/Industrial Associates (SIBIA), Phillips Petroleum Company ile sözleşmeli olarak, protein üretimi için *P. pastoris* ekspresyon sistemini geliştirmiş olup günümüzde de *P. pastoris*, ekspresyon sistemi olarak kullanımı devam etmektedir (Batt 2014; Ünver 2022).

Rekombinant protein üretiminde *P. pastoris* ekspresyon sisteminin kullanılmasının bazı avantajları vardır: (i) memeli hücreleriyle kıyaslandığında daha ucuz kültür ortamlarında hızlı bir şekilde çoğalabilme; (ii) ökaryotik proteinlerin işlevini kazanabilmesi için gerekli olan polipeptid katlanmalarını, glikozilasyon, metilasyon, asilasyon ve disülfid bağı oluşumu gibi post-tranlasyonel değişiklikleri yapabilme; (iii) yüksek hücre yoğunluğuna ulaşabilme ve fermentasyon kolaylığı; (iv) ekspresyon vektörlerine uygulanan moleküler genetik manipülasyonların kolay uygulanabilmesi ve hedef genin kararlı bir şekilde ekspresyonunu gerçekleştirebilme yeteneği; (v) yüksek seviyede hem hücre içi hem de hücre dışı protein ekspresyonu yapabilmesi; (vi) maya hücrelerinin hasat edilmeden büyüme ortamından saflaştırılabilen salgılanmış proteinleri üretebilme yeteneği; (vii) ve son olarak *P. pastoris* ekspresyon sistemine ticari olarak satılan kit şeklinde ulaşılabilir olması *P. pastoris* ekspresyon sisteminin avantajlarıdır (Li vd. 2007; Weinacker vd. 2013; Türkanoglu Özçelik vd. 2018).

Protein ekspresyonunda konakçı organizma olarak *P. pastoris*'in kullanımıyla ilgili en önemli gelişme, GRAS (genellikle güvenli olarak kabul edilir) statüsü ve rekombinant protein üretiminde konakçı organizma olarak kullanımının Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmasıdır. Güncel veriler incelendiğinde, 300'den fazla biyoteknoloji ve farmasötik şirketi lisansını almış 5000'den fazla proteinin ekspresyonunda *P. pastoris* ekspresyon sistemini kullanmaktadır. *P. pastoris* ekspresyon sistemi kullanarak FDA tarafından onaylanan toplam 70 terapötik ve endüstriyel protein piyasada mevcut veya geliştirme aşamasındadır. *P. pastoris* konakçısında farklı kaynaklara ait birçok proteinin ekspresyonu gerçekleştirilmiş ve bunlara örnek olarak α -amilaz, invertaz, lipaz, katalaz, fitaz, insülin, serum albümini, insan epidermal büyüme faktörü ve Hepatit B virüsü yüzey antijeni proteinleri verilebilmektedir (Cregg vd. 2000; Spohner vd. 2015; Safder vd. 2018).

Rekombinant protein üretiminde verim ve üretilen protein kalitesi konakçı mikroorganizmanın fermentasyon mekanizmasına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Fermentasyonun yüksek verim, iyi kalitede son ürün ve optimum şartlarda yürütülebilmesi için rekombinant protein üretiminde kullanılan konakçı mikroorganizmanın metabolizması ve genetik karakteristiği iyi bilinmelidir. Yapılan çalışmalar incelendiğinde, özellikle karbon kaynağı kullanım mekanizmasında rol alan

genler, bu genlerin düzenlenmesi ve farklı karbon kaynaklarının mikroorganizmanın metabolizmasındaki etkileri rekombinant protein üretiminde en önemli parametrelerden birisi olmaktadır.

P. pastoris ekspresyon sisteminin bilinen en verimli ve sıkı şekilde düzenlenmiş promotorlarından biri olan AOX, metanol ile düzenlenmiş Alkol Oksidaz geninin promotoru ve heterolog gen ekspresyonunu düzenlemek için kullanılan promotordur. *P. pastoris* genomunda; alkol oksidaz aktivitesinin %85'ini düzenleyen AOX1 geni ve alkol oksidaz aktivitesinin %15'inden sorumlu AOX2 geni olmak üzere iki kopyası bulunmaktadır. *P. pastoris* ekspresyon sisteminde heterolog protein ekspresyonunu yönlendirmek için AOX1 promotorunun daha yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir. *P. pastoris*'in metanol kullanma yeteneklerine göre üç fenotipi (mut^+ , mut^s ve mut^-) mevcuttur. Çoğu konakçı suş metanol üzerinde gelişebildiği için mut^+ (metanol kullanımı pozitif) fenotipindedir. Bununla birlikte AOX geninde meydana gelen delesyonlar nedeniyle metanol kullanımı mut^s (metanol kullanımı yavaş) ve mut^- (metanol kullanımı negatif) konakçı suşlarında fermentasyonlar için büyük miktarlarda metanole ihtiyaç duymadıkları bilinmektedir. KM71 ($\Delta aox1$: : SARG4 his4 arg4), AOX1 geninin kısmen silindiği ve *S. cerevisiae* ARG4 geni ile değiştirildiği suşu mut^s fenotipinde özellik göstermektedir. Bir diğer suş olan MC100-3 ($\Delta aox1$: : SARG4 $\Delta aox2$: : Phis4 his4 arg4) her iki AOX geni üzerinde delesyonlar sonucu metanolde tamamen gelişemez ve mut^- fenotipinde gözlenmektedir. mut^- suş da dahil olmak üzere bu suşların tamamı AOX1 promotoru altında ekspresyonda yüksek seviyelerde indüklenme kabiliyetlerini korumaktadır (Cereghino ve Cregg 1999; İnan ve Meagher 2001a).

Rekombinant protein üretimi için genellikle kullanılan AOX1 promotorunun yüksek verimlilikte üretim yaptığı bilinmektedir ancak indüksiyonu için metanole ihtiyaç duyulması ve yüksek ölçekli üretimlerde kullanıldığında depolama problemlerinin olması yangın tehlikesine karşı gerekli önlemlerin alınması gibi sorunlardan dolayı bazı dezavantajları bulunmaktadır. Waterham vd. (1997)'nin yaptığı bir çalışmada gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAP) genini karakterize etmiş ve AOX1 promotoruna benzer güçlü bir ifade seviyesine ulaşabileceğini göstermiştir. GAP geni başlangıçta *S. cerevisiae* GAP homologunun bir probu ile koloni hibridizasyonu yoluyla genomik kütüphaneden izole edilmiş olup GAP gen bölgesi *P. pastoris* genomunda 2. kromozom üzerinde bulunmaktadır. GAP yapısal geninin promotoru ile yapılan üretimlerde glikoz ile besleme yapılabilmekte ve protein üretimi sağlanmaktadır. GAP promotoru kullanmanın avantajları indüksiyon için metanolün gerekli olmaması ve kültür ortamını bir karbon kaynağından diğer bir karbon kaynağına geçirmeye gerek duyulmaması olarak da sıralanabilir. Bu da suş büyümesini daha kolay hale getirmekte ve proseste kolaylıklar sağlamaktadır. Bununla birlikte, GAP promotoru yapısal olarak eksprese edildiğinden kullanımının dezavantajı olarak, maya için toksik olan proteinlerin üretiminde iyi bir seçim olmamaktadır (Waterham vd. 1997; Cereghino ve Cregg 1999; De Schutter vd. 2009; Vogl ve Glieder 2013).

Crabtree-negatif bir maya olan *P. pastoris*, yüksek glikoz konsantrasyonlu ortamlarda etanol üretimi gerçekleştirmez. Ancak İnan ve Meagher (2001b)'e göre *P. pastoris*'in aerobik koşullar altında yan ürün olarak az miktarda etanol ürettiği belirtilmiştir. Ortamda bulunan bir miktar etanolün; metanol tarafından indüklenen AOX1 promotorunu baskılayarak rekombinant protein üretimini etkilediği sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte ortamda bulunan bir miktar etanol AOX1 promotorunun tersine, GAP

promotorunu baskılamadığı hatta *GAP* promotoru kullanılarak yapılan rekombinant protein üretimlerinde hipoksik şartların oluşumu ile ekspresyon seviyesini bir miktar arttırabildiği belirtilmiştir (İnan ve Meagher 2001b; Yılmaz 2018).

AOX1 ve yapısal *GAP* promotorlarının bahsedilen dezavantajlarından dolayı rekombinant protein üretiminde alternatif bir promotor arayışı oluşmuştur. *P. pastoris*'ten türetilen halihazırda mevcut olan promotor indüksiyon sistemlerine alternatif olabilecek, tehlikesiz indüksiyon alternatiflerini kullanabilen yeni, güçlü indüklenebilir promotorlar araştırılmış ve *P. pastoris* için iki alkol dehidrogenaz (*ADH*) geni kontrolünde regülasyonundan sorumlu olan promotor bölgesi *ADH* promotoru olarak belirlenmiştir. Bu gen NCBI veri tabanında tarandığında, *S. cerevisiae ADH3* amino asit dizisine benzerliği sebebiyle *ADH3* geni olarak adlandırılmıştır. Karaoğlu vd. (2015) tarafından yapılan çalışmalar incelendiğinde, etanol metabolizmasından sorumlu olan bu genin fonksiyonu araştırılmış ve etanol metabolizması karakterize edilmiştir.

NCBI veri tabanında protein erişim no (XM_002491337) olan *ADH3* geni, *P. pastoris* etanol metabolizmasında rol oynadığı düşünülen *ADH3* geni GS115 suşunda inaktif edilerek, glukoz ve etanol içeren minimal besiyerinde üreme davranışları izlenmiş ve *P. pastoris* MK115 ($\Delta adh3$) olarak adlandırılan mutant suşun etanol içeren besiyerinde üremediği ancak glukoz içeren besiyerinde etanol ürettiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak, *ADH3* geni etanol tüketiminden sorumlu tek gen olduğu belirtilmiştir (Karaoğlu vd. 2019). (*Çalışmada araştırılan ADH3 olarak isimlendirilen bu promotor, literatürde sistematik karışıklığı önlemek için sonraki çalışmalarda ve bu tez kapsamında ADH2 olarak isimlendirilmiştir*)

Aynı araştırma grubu tarafından yapılan başka bir çalışmada, *ADH2* promotorunu, *AOX1* ve *GAP* promotorları ile karşılaştırmak amacıyla *Aspergillus niger* gen kaynaklı ksilanaz (*XylB*) enzimi *ADH2*, *AOX1* ve *GAP* promotorları kontrolünde rekombinant olarak üretilmiştir. Çalkalamalı erlenmayer deneylerinde *ADH2* kontrolü altında yapılan ekspresyonda, *AOX1* ekspresyonuna kıyasla iki kat daha düşük ksilanaz enzim aktivitesi elde edilmiş, *GAP* promotoru kontrolü altında yapılan ekspresyon ile *ADH2* promotoru kontrolü altında yapılan ekspresyon yaklaşık olarak aynı olduğu gösterilmiştir. Ancak erlenmayer koşulları kontrolsüz koşullar olduğundan, *ADH2*, *AOX1* ve *GAP* promotorları kontrolünde gerçekleşen fermentör ölçekli üretimlerde sırasıyla enzim aktivitesi 3725 U/mL, 2095 U/mL ve 580 U/mL olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte, fermentasyon süpernatant örneğinde ölçülen toplam protein sırasıyla 408 g/L, 287 g/L ve 392 g/L olarak belirlenmiştir. En yüksek protein üretimi ve ksilanaz enzim aktivitesi *ADH2* promotoru kontrolü altında gerçekleşen fermentasyon üretimlerinde gerçekleştiği belirlenmiştir. Böylece *ADH2* promoturunun, büyük ölçekli uygulamalar için rekombinant protein üretiminde kullanımının daha uygun olabileceği sonucuna varılmış ve *ADH2* promotorunun diğer güçlü promotorlara alternatif olabileceği gösterilmiştir (Karaoğlu vd. 2016; Türkanoglu Özçelik vd. 2019).

P. pastoris ekspresyon sisteminin daha etkin ve verimli şekilde kullanılmasına yönelik promotorlarda genetik modifikasyonlar yapılarak, mevcut promotorların kullanım amacına yönelik geliştirilmesi için çalışmalar devam etmektedir. Erden Karaoğlu (2016)'ın yaptığı çalışmaya göre *P. pastoris* etanol metabolizmasında etanol tüketiminden sorumlu olan *ADH2* geninin regülasyonundan sorumlu *ADH2* promotorunun %100 olarak aktivite gösterdiği en kısa DNA bölgesi belirlenerek pozitif

(aktivatör) ve negatif (represör) düzenleyici bölgelerinin tespitini gerçekleştirmiş ve sondan silme analizleri ile tam promotor aktivitesinin değişmeden korunduğu en kısa DNA bölgesi ADH900 bç promotor bölgesi olarak tanımlanmıştır. Doğal ADH2 promotorunun sondan silme analizleri ile belirlenen ADH900 bç promotor bölgesi üzerinde içten silme analizi gerçekleştirilmiş ve pozitif regülasyondan sorumlu bölgeler (UAS, Upstream Activator Site) ve negatif regülasyondan sorumlu bölgeler (URS, Upstream Repressor Site) belirlenmiştir.

Çalışmanın devamında ADH2 promotor gücünü arttırmak amacıyla promotorun aktivitesini arttıracak bölgelerin ilavesi ve aktiviteyi azaltacak bölgelerin silinmesiyle farklı kombinasyonlarla beş sentetik ADH2 promotoru oluşturulmuş ve rekombinant protein üretimlerini test etmek üzere tek kopya ksilenaz geni içeren klonları oluşturarak ksilenaz ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Aynı koşullarda gerçekleştirilen erlenmayer örneklerinde belirli aralıklarla örnekler alınarak fermentasyon süresince yaş hücre ağırlığı, toplam protein miktarı ve ksilenaz aktivitesi takip edilerek, sentetik promotorlarda ksilenaz üretiminin, ADH2SNT1, ADH2SNT2 ve ADH2SNT3'ün yaklaşık olarak aynı seviyelerde olduğu (doğal ADH2 promotoruna göre yaklaşık %170'i seviyesinde) ve ADH2SNT4 ve ADH2SNT5 ile yaklaşık %200 değerlerine ulaşıldığı belirlenmiştir (Erden Karaoğlu 2016).

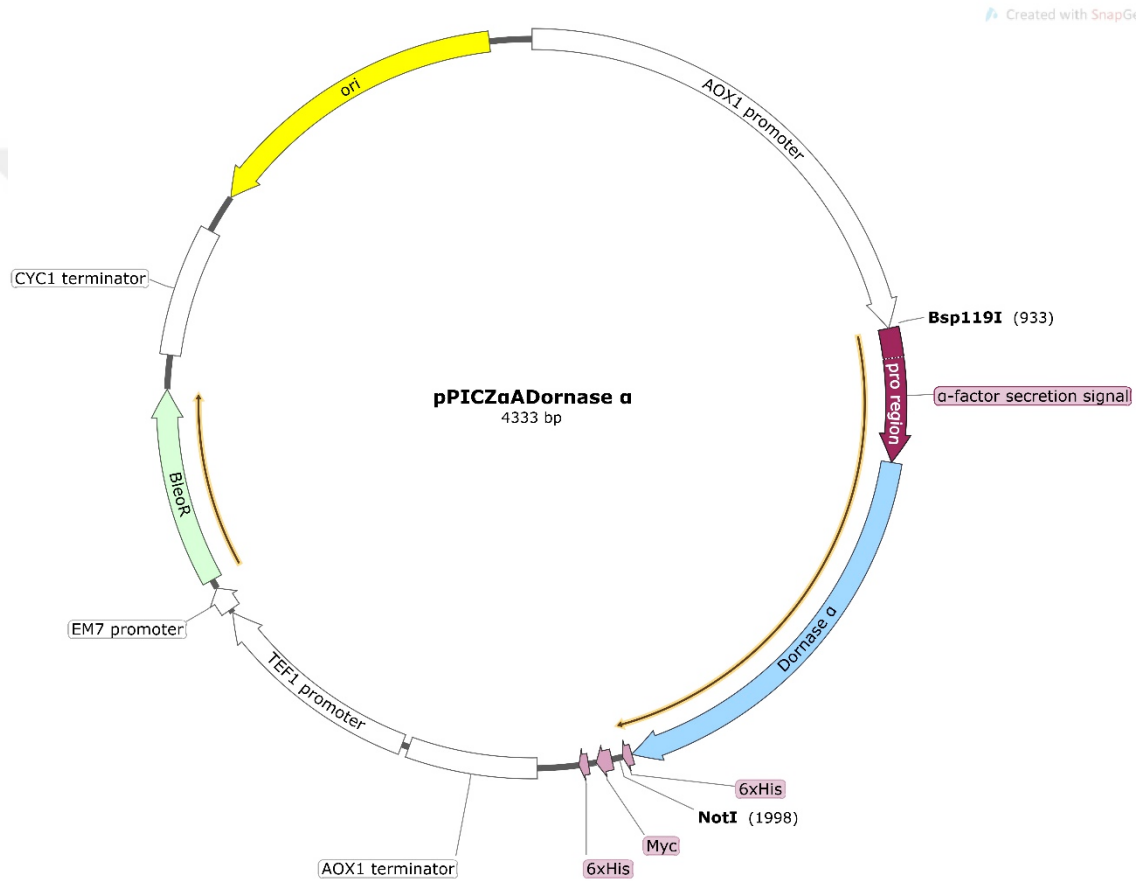
Bu sonuçlar ışığında ksilenaz genini tek kopya içeren klonlar birbirleri ile karşılaştırıldığı için tasarlanan sentetik promotorlar arasındaki bu üretim farklılığının promotör dizaynından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu sebeple tez çalışması kapsamında üretimi hedeflenen Dornaz alfa enziminin, *P. pastoris* 'te üretiminde etanol ile indüklenebilen ve güçlü bir ekspresyon seviyesi gösterdiği bilinen ADH2SNT5 promotoru kontrolünde üretime karar verilmiştir. Yine ekspresyon seviyesini arttırmak amacıyla Protein Disülfid İzomeraz (PDI) over ekspresyonu yapılmış olan 4 kopya PDI geni içeren *P. pastoris* MK115(PDI) suşu kullanılarak Dornaz alfa enziminin rekombinant üretimi ilk kez bu çalışma kapsamında yapılmıştır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Gen kaynağı

Kodon optimizasyonu yapılmış Dornaz alfa (rhDNaseI) geni, pPICZ α A vektörü üzerinde liyofilize olarak GenScript (USA) firmasından temin edilmiştir (NCBI gen erişim no: MH318617.1). Üretici firmanın talimatları doğrultusunda EB buffer içinde çözdürülen plazmit *E. coli* hücrelerine transformasyona hazır hale getirilmiştir. Şekil 3.1’de pPICZ α A-Dornaz alfa plazmit haritası verilmiştir.



Şekil 3.1. pPICZ α Dornaz alfa plazmit haritası

3.1.2. Suşlar ve plazmitler

Yapılan çalışmalarda plazmitlerin çoğaltılması ve saklanması amacıyla kimyasal transformasyona elverişli konakçı *E. coli* NEB5 α kullanılmıştır. Klonların oluşturulması amacıyla kullanılan maya hücreleri Karaoğlan vd. (2015)’in tarafından oluşturulan *P. pastoris* MK115 (Δ adh3) suşunun laboratuvar ekibimiz tarafından ekstra 4 kopya PDI (Protein Disülfid İzomeras) şaperon proteinini kodlayan gen eklenmiş ve Dornaz alfa üretim çalışmalarında konakçı organizma olarak kullanılmıştır. Tüm mikroorganizmalar gliserol içeren ortamda -80 °C’de muhafaza edilmişlerdir.

Çalışma kapsamında Erden Karaoğlu (2016) tarafından oluşturulan pADH2SNT5 ekspresyon vektörü kullanılmıştır. Şekil 3.2’de pADH2SNT5Dornaz alfa ekspresyon vektörü haritası verilmiştir.



Şekil 3.2. pADH2SNT5Dornaz alfa ekspresyon vektörü haritası

3.1.3. Besiyerleri, kimyasallar ve restriksiyon enzimleri

E. coli hücrelerinin gelişiminde LB Lenox (5 g/L yeast extract, 10 g/L Tryptone ve 5 g/L NaCl) kullanılmıştır. Kullanılan sıvı ve katı besiyerlerine plazmidin üzerindeki direnç genine uygun seçilimi sağlamak amacıyla uygun antibiyotik ilavesi yapılmıştır.

Zeosin antibiyotiğinin stok solüsyonları 100 mg/mL konsantrasyonlarda hazırlanmış ve steril 0.22 µm filtreden (Corning, AB) geçirilerek 1mL alikotlanmış ve kullanıma kadar -20 °C de muhafaza edilmiştir. Antibiyotikli besiyeri hazırlamak için besiyeri 121 °C de 15 dk steril edildikten sonra 50 °C’ye soğutulmuş, üzerine buz üzerinde çözdürülmüş olan zeosinden *E. coli* suşları besiyerine 25 µg/mL oranında ilave edilmiştir. *P. pastoris* suşlarının seçilimini sağlayabilmek için besiyerlerine 100 µg/mL, 500 µg/mL ve 1000 µg/mL oranlarda zeosin ilavesi yapılmıştır.

Çalışmalarda kullanılan *P. pastoris* suşlarının genel gelişiminde; YPD (%1 maya ekstraktı, %2 pepton, %2 glukoz), tamponlu gliserol-kompleks ortamı (BMGY) (10 g/L maya ekstraktı, 20 g/L pepton, 13.4 g/L YNB, 4×10^{-5} g/L biotin, %10 gliserol ve 0.1 M

fosfat tamponu, pH 6.0) kullanılmıştır. Dornaz alfa protein ekspresyonunu gerçekleştirmek için tamponlu etanol-kompleks ortamı (BMEY) (10 g/L maya ekstraktı, 20 g/L pepton, 13.4 g/L YNB, 4×10^{-5} g/L biotin, %10 etanol ve 0.1 M sodyum sitrat tamponu veya 0.1 M fosfat tamponu, pH 3-7) kullanılmıştır.

Çalışmada DNA'nın kesilmesi amacıyla restriksiyon enzimleri ve bunların tampon çözeltileri (FastDigest Restriction Enzymes-Thermo Fisher Scientific, ABD) Thermo Fisher Scientific firmasından temin edilmiş ve enzimler kullanılırken üretici firmanın talimatları uygulanmıştır.

Çalışmada kullanılan kimyasalların tümü moleküler biyoloji kalitesinde olup Sigma-Aldrich (ABD), Difco (Fransa) ve Merck (Almanya) markalarından temin edilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. Liyofilize plazmid DNA'nın hazırlanması

Liyofilize gelen plazmid DNA (GenScript, USA), üretici firmanın talimatlarına uygun olarak -20 °C depolama sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Tüp içerisinden DNA kaybı yaşamamak için 4°C, 6000 g'de 1 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Liyofilize DNA'nın üzerine 40 µl EB tamponu ilave edilerek pipetaj yardımıyla çözdürüldükten sonra kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.2.2. Bakteri ve maya hücrelerinin transformasyona yetenekli hale getirilmesi

3.2.2.1. *E. coli* hücrelerinin transformasyona yetenekli hale getirilmesi

E. coli hücreleri CaCl₂ yöntemi (Chang vd. 2017) kullanılarak transformasyona yetenekli hale getirilmiştir. Bu amaçla LB Miller agar içeren petri plakasında, *E. coli* NEB5α hücreleri teke düşecek şekilde geliştirilmiştir. Teke düşmüş olan kolonilerden öze yardımıyla sıyrarak alınmış ve 3 mL LB Miller sıvı besiyerine ekimi yapılmış ve gece boyu 37 °C çalkalamalı inkübatörde gelişmeye bırakılmıştır. Gelişen kültürün optik yoğunluğu ölçülmüş ve 500 mL çalışma hacimli erlenmayer içerisinde 150 mL LB Miller sıvı besiyerinde başlangıç OD_{600nm} değeri 0.01 olacak şekilde ekilmiş ve OD_{600nm} değeri 0.3-0.4 olana kadar 37 °C çalkalamalı inkübatörde geliştirilmiştir.

E. coli NEB5α hücreleri 0.3-0.4 OD_{600nm} değerine ulaştığında 3000×g'de +4 °C'de 10 dk santrifüjlenerek hücreler çöktürülmüştür. Bu aşamadan sonra tüm işlemler buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Hücre peleti buz soğukluğundaki 20 ml soğuk 0.1 M CaCl₂ çözeltisi içerisinde pipetaj yardımıyla resüspanse edilmiş ve 30 dk buz üzerinde inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyondan sonra tekrardan 3000×g'de +4 °C'de 10 dk santrifüjlenerek süspansiyon sıvısından ayrılan hücre peleti %15 gliserol içeren 5 ml 0.1 M CaCl₂ çözeltisi içerisinde tekrar resüspanse edilmiş ve ardından steril 1.5 ml'lik tüpler içerisine 100 µl'lik hacimler halinde paylaştırılmıştır. Hazırlanan yetenekli hücreler -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2.2. *P. pastoris* hücrelerinin transformasyona yetenekli hale getirilmesi

P. pastoris MK115(PDI) suşu Lityum Asetat (LiAc) yöntemine (Wu ve Letchworth 2004) göre transformasyon için yetenekli hale getirilmiştir. *P. pastoris* MK115(PDI) suşu, stok kültürden 3 mL YPD sıvı besiyerine ekilmiş, 225 rpm, 28 °C çalkalamalı inkübatörde gece boyu geliştirilmiştir. Ertesi gün gelişen hücreler başlangıç OD_{600nm} değeri 0.1 olacak şekilde 250 mL hacimli engelli erlenmayer içerisinde 80 mL YPD sıvı besiyerine ekimi yapılmıştır. OD_{600nm} değeri 2.0-2.5 olana kadar aynı şartlarda geliştirilmeye devam ettirilmiştir. OD_{600nm} değeri 2.0-2.5'e ulaştıktan sonra +4 °C'de 3000×g hızında 5 dakika süre ile santrifüjlenerek süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır.

Hücre pelleti, 10 ml lityum asetat karışımı (100 mM LiAc, 10 mM DTT, 0.6 M Sorbitol, 10 mM Tris-HCl pH 7.4) içinde pipetaj yardımıyla resüspanse edilmiş ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda 4 °C'de 3000×g hızında 5 dakika santrifüjlenerek alınan hücreler 2 mL buz soğukluğundaki 1 M sorbitol içinde resüspanse edilmiştir. Daha sonrasında +4 °C'de 3000×g hızında 5 dakika santrifüjlenerek alınan hücreler 3 kez 2 ml soğuk 1 M sorbitol ile yıkanmış, daha sonra son konsantrasyon 10¹⁰ hücre/ml olacak şekilde buz soğukluğundaki maya resüspansiyon tamponu (1 M sorbitol, %20 gliserol) içinde çözündürülmüş, 80 µl'lik hacimler halinde paylaştırılarak -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3. Plazmid DNA'ların *E. coli*'e transformasyonu

Buz üzerinde çözödürülen 100 µl yetenekli *E. coli* NEB5α hücrelerinin üzerine, 1 ng/µl'e seyreltilmiş olan pADH2SNT5Dornaz alfa plazmid DNA'sından 1 µl hacminde alınarak eklenmiştir. Otuz dakika buz üzerinde inkübe edildikten sonra 42 °C'de 120 saniye süre ile ısı şokuna uğratılan hücreler sonrasında tekrar 5 dakika buz üzerinde bekletilerek soğutulmuş, 200 µl LB Lenox sıvı besiyeri eklenerek 37 °C çalkalamalı inkübatörde 1 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyondan sonra transformasyon karışımı 25 µg/mL zeosin antibiyotiği içeren LB Lenox agar plakalara ekilerek 37 °C'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası plakalarda oluşan teke düşmüş kolonilerden seçim yapılmış ve 25 µg/mL zeosin antibiyotiği içeren sıvı LB Lenox besiyerine ekilerek tekrar 37 °C'de gece boyu geliştirilmiştir. Gelişen transformant hücrelerden ilk olarak gliserol stok hazırlanmış ve etiketlenerek -80 °C'de muhafaza edilmişlerdir.

3.2.4. pADH2SNT5Dornaz alfa plazmidinin oluşturulması

Çalışma kapsamında *ADH2SNT5* promotörü kontrolünde enzim üretimi gerçekleştirilmiş olup pADH2SNT5Dornaz alfa plazmidinin oluşturulmasında kullanılacak olan vektör ve insert parçalarının elde edilmesi amacıyla laboratuvarımızda -80 °C stokta mevcut bulunan pADH2SNT5αA ve pPICZαADornaz alfa plazmidlerini içeren *E. coli* NEB5α hücreleri, 25 µg/ml zeosin antibiyotiği içeren sıvı LB Lenox besiyerine ekimi yapılmış ve 37 °C'de gece boyu çalkalamalı inkübatörde geliştirilmiştir. Ardından gelişim besiyeri 20.000×g'de 5 dk santrifüjlenerek hücre pelleti ve süpernatant kısmı birbirinden ayrılmıştır. Hücre pelletlerinden plazmit izolasyonu ticari Bio Basic Plazmid Mini-Prep Kiti kullanılarak, protokol doğrultusunda belirtilen şekilde plazmit

izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen plazmitlerin DNA miktar ölçümlerinde Qubit™ dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen™) kullanılmıştır. Kit içerisinde bulunan standartlarla Qubit 4 Fluorometer (Invitrogen, ABD) cihazı kullanılarak cihaz kalibrasyonu yapılmış ve florometrik olarak plazmit DNA konsantrasyonları (ng/μl) olarak ölçülmüştür.

Vektör ve insert parçalarının doğrulanması amacıyla restriksiyon kesim analizleri ile doğrulama analizleri yapılmıştır. pADH2SNT5aA vektör plazmidi ve pPICZαADornaz alfa plazmidi klonlama (*Bsp*119I ve *Not*I) enzimleri ile 1 μg plazmide 1 U enzim olacak şekilde, 10X enzim tamponu ve nükleaz ari su (NFW) eklenerek toplam 10 μl içinde reaksiyon karışımı hazırlanmış ve 37 °C’de 1 saat inkübasyona bırakılarak plazmit üzerinden 2 farklı noktadan kesilmiştir. Kesilmiş plazmitler ve kontrol olarak kesilmemiş plazmitlerin değerlendirilmesi agaroz jel elektroforezi ile yapılmıştır.

Agaroz (SeaKem® LE Agarose, ABD), %1 olacak şekilde 1X TAE tamponu içerisinde (Tris-asetat-EDTA, 1 mM EDTA, 40 mM Tris ve 20 mM asetik asit) mikrodalgada ısıtılarak çözündürülmesi ile hazırlanan jelle, 55°C’ye kadar soğutulduktan sonra UV ışık altında yansıma alabilmek için %5 oranında SafeView™ (Applied Biological Materials, CA) ilave edilmiş ve jel kasetine dökülmüştür. Kaset üzerinde donan jel kuyucuklarına 10 μl kesim reaksiyon karışımı ve 10 μl kesim analizi uygulanmamış plazmit DNA ve 5 μl DNA markör standardı yüklenmiş ve 1X TAE tamponu içerisinde 90 V akımda 30 dakika koşturulmuştur. Jelde büyüklüklerine göre farklı hızda koşan DNA parçaları elektrik akımı etkisiyle birbirlerinden ayrılmış ve DNA parçaları ChemiDoc MP Görüntüleme Sistemi (Bio-Rad, ABD) ile görüntülenmiştir. Görüntüleme sonrasında SnapGene programında (GSL Biotech LLC, USA) belirlenen enzimlerin kesim bölgeleri beklenen fragment büyüklüklerine bakılarak kontrol edilmiştir. Doğrulanmış plazmid ile ligasyon analizine devam edilmiştir.

Ligasyonda kullanmak üzere yeterli miktarda insert ve vektör DNA’sı elde etmek için klonlama enzimleri ile yüksek hacimde kesim reaksiyonu kurulmuştur. 37 °C’deki inkübasyondan sonra ve agaroz jelle yürütülerek pSNT5aA vektör DNA ve pPICZαA plazmidinden düşürülen insert DNA (Dornaz alfa) belirlenen büyüklükteki parçaları jelden kesilmiş ve jel ekstraksiyonu MinElute® Gel Extraction Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak kit protokolleri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

Insert DNA parçasının vektöre ligasyon işlemi “Rapid DNA Dephosphate and Ligation Kit (Roche, Almanya)” ile üretici talimatlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Plazmit ve ligasyonu yapılmak istenen insert DNA’nın molar oranları 3:1 olacak şekilde ayarlanmıştır. Vektörün kendi üzerine kapanmasını önlemek amacıyla vektöre defosforilasyon işlemi için FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermo Scientific™) kiti kullanılarak kit protokolleri doğrultusunda defosforilasyon işlemi uygulanmıştır. Bu amaçla toplam 20 μl içerisinde 1 μg vektör, 10X alkalın fosfataz tamponu ve 1 U alkalın fosfataz karıştırılarak 37 °C’de 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Defosforile vektör reaksiyon karışımıyla ligasyon işlemine devam edilmiştir. Ligasyon işlemi için toplam 20 μl içerisinde 50 ng vektör DNA’sı için hesaplanan miktarlarda insert DNA karıştırılmış, 10X T4 DNA ligasyon tamponu varlığında 1 U T4 DNA ligaz (Thermo Scientific™) eklenerek. 25 °C sıcaklıkta 20 dk inkübasyon sonrası ligasyon karışımından 1 μl alınarak yetenekli *E. coli* NEB5α hücrelerine transforme edilmiştir.

3.2.5. Doğrulan pADH2SNT5Dornaz alfa plazmidinin lineer hale getirilmesi ve konakçı *P. pastoris* MK115(PDI) suşuna transformasyonu

pADH2SNT5Dornaz alfa plazmidinin yetenekli *P. pastoris* MK115(PDI) konakçısına transformasyonu amacıyla *ADH2SNT5* promotorunun içinden kesen *PvuII* enzimi ile kesim reaksiyonu kurulmuştur. Üretici talimatları doğrultusunda gerçekleştirilen 37 °C’de 1 saatlik kesim sonucunda lineer hale getirilmiş ve agaroz jelde doğrulama analizi yapılmış olan plazmid MinElute® PCR Purification Kiti (Qiagen, Almanya) kullanılarak saflaştırılmış ve DNA konsantrasyonu ölçülerek transformasyona hazır hale getirilmiştir.

Lineer plazmidlerin yetenekli *P. pastoris* MK115 (PDI) konakçı suşuna transformasyonu elektro transformasyon yöntemi ile yapılmıştır. Buz üzerinde bekletilerek çözdürülen 80 µl yetenekli *P. pastoris* MK115(PDI) konakçı suşu üzerine 10 µl lineer DNA (yaklaşık 3-5 µg) eklenmiş, pipetlenerek karıştırılmış ve buz soğukluğundaki 2 mm elektroporasyon küvetine (Electroporation Cuvettes-Thermo Scientific™) aktarılmıştır. Küvetler 5 dakika buz üzerinde inkübasyona bırakılmış ve sonrasında Eppendorf Eporator (Eppendorf Eporator 4309) elektroporasyon cihazında 5-6 ms süreyle 1600 V elektrik akımına tabi tutulmuştur. Hemen ardından buz soğukluğundaki 1 mL 1M sorbitol eklenmiş ve 1.5 mL’lik santrifüj tüpüne alınmıştır. 28 °C’de 2 saat inkübe edilen hücreler 100 µg/mL, 500 µg/mL ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarında zeosin içeren YPD agar plakalarına yayılmış ve 28 °C sıcaklıkta 3 gün inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.6. Genomik DNA izolasyonu

Transformasyon sonrası agar plakada gelişen klonlar 3 mL YPD sıvı besiyerine ekilmiş ve çalkalamalı inkübatörde (Innova 44R, New Brunswick Scientific, NJ, ABD) 28 °C 225 rpm’de gece boyu geliştirilmiştir. Genomik DNA izolasyonu amacıyla gece boyu 3 mL YPD’de geliştirilen OD_{600nm} değeri 6 ile 10 arasındaki hücreler, Centrifuge 5424 (Eppendorf, Almanya) cihazında 20.000xg’de 5 dk santrifüjlenmiş ve hücre peletleri ile devam edilmiştir. Süpernatantı uzaklaştırılmış hücre peletine 200 µl maya lizis tamponu (%2 triton X-100, %1 SDS, %0.1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA, pH 8,0) eklenerek maya hücre duvarının parçalanması sağlanmıştır. Hücreler en az 20 dakika süreyle -80 °C’de bekletildikten sonra ısı bloğunda 95 °C’de 2 dk bekletilerek ısı şok uygulanmış ve dondur çözme işlemi 3-5 kez tekrarlanmıştır. Dondur çözme tekrarlarının sonrasında 30 saniye en yüksek devirde vortekslenerek 200 µl kloroform eklenmiş ve tekrar 2 dk vortekslenmiştir.

Vorteksleme işleminden sonra 20.000xg’de 3 dk santrifüjlenerek faz ayrımı sağlanmıştır. Santrifüjden sonra 3 fazlı karışım elde edilmiş ve en üstteki şeffaf faz alınarak içerisinde 400 µl soğuk %100 etanol bulunan steril DNaz, RNaz ari tüplere alınmış ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonunda örnekler 20.000xg’de 5 dk santrifüjlenmiş ve pellet kısmı üzerine 500 µl soğuk %70 etanol eklenerek 20.000xg’de 2 dk daha santrifüj edilmiştir. Pellet alınarak Concentrator Plus (Eppendorf, Almanya) cihazında etanol tamamen uçana kadar 60°C’de vakum altında etanol uzaklaştırılmıştır. Daha sonrasında üzerine 20 µl EB buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) eklenerek çözdürülmüştür. İzole edilen gDNA’dan RNA’ların uzaklaştırılması için 1 µl RNaz A enzimi (Thermo Scientific™) ilavesi yapılarak 37 °C’ 1 saat inkübe edilmiş

ve RNA'ların parçalanması sağlanmıştır. Elde edilen genomik DNA'lar jelde kontrol edildikten sonra gerçek zamanlı PZR'da kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.7. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile gen kopya sayısının belirlenmesi

P. pastoris'ten izole edilen genomik DNA'lar NFW ile 5 ng'a seyreltilerek agaroz jelde kontrolü sağlanmıştır. Kullanılacak olan primerler stoklarından alınarak NFW ile 1:10 (son konsantrasyon 10 µM) seyreltilerek F: 5' CCACCCCTCCCAATCTC 3' ve R: 5' AGCTAGTAGCTGATGGAAGAAGG 3' primerleri için ayrı ayrı üçer kopya olarak SYBR Green qPCR master mix Çizelge 3.1'de verilen konsantrasyonlarda hazırlanmış olup RT-PZR tüplerine dağıtılmıştır. Master mix karışımı üzerine, uygun oranda seyreltilen kalıp DNA'lar eklenerek reaksiyon karışımı hazırlanmış ve Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD) cihazı ile analiz gerçekleştirilmiştir. Analizlerde çapraz bulaşma kontrolü olarak kalıp DNA'nın eklenmediği NTC (no template control) reaksiyonları da hazırlanmış ve sonuç değerlendirilmesinde NTC kontrol edilerek analiz tamamlanmıştır.

Çizelge 3.1. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyon karışımı

Bileşen	Hacim	Final konsantrasyonu
iTaq Universal SYBR® Green qPCR Master Mix	5 µl	1x
F primer	0.25 µl	250 nM
R primer	0.25 µl	250 nM
Template DNA	4.5 µl	≤ 50 ng
Toplam	10 µl	

Analiz sonunda gen kopya sayısının hesaplanabilmesi için 7500 Software v2.0.6 kullanılmıştır. Verilerin normalizasyonu, referans olarak internal standart (*GAP* geni) kullanılarak sağlandığı için sonuçlar; hesaplanan hedef gen kopyalarının, referans genine oranı olarak verilmiştir (Verilerin sonucuna bakıldığında; kalibratör suş 4 kopya olarak gösterilmiş olup, örneklerden bu değer çıkarılarak gen kopya sayısı bulunmuştur). Gerekli reaksiyon koşulları Çizelge 3.2'de gösterildiği gibi ayarlanmıştır.

Çizelge 3.2. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyon koşulları

Aşamalar	Koşullar		
Enzim aktivasyon	95 °C	300 s	1 döngü
Denatürasyon	95 °C	15 s	← 40-45 döngü
Uzama	60 °C	60 s	

3.2.8. Erlenmayer ölçeğinde Dornaz alfa ekspresyonu

P. pastoris MK115(PDI)'a transformasyon sonrası zeosinli plakalarda gelişen kolonilerin, teke düşürülmek amacıyla YPD agar besiyerine ekilmiş ve 3 gün 28 °C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. Teke düşen ve gerçek zamanlı PZR sonucu ekspresyon kasedini taşıdığı bilinen klonlar ve boş konak hücre *P. pastoris* MK115(PDI) 3 mL YPD sıvı besiyerine ekilerek 28 °C'de ve 225 rpm'de gece boyu geliştirilmiştir. Gelişen hücreler 250 ml engelli erlenlerde 30 ml BMGY (pH 6.0) besiyerine başlangıç, OD_{600nm} değeri 0.1 olacak şekilde inokülasyon yapılmış ve gece boyu 28 °C'de ve 225 rpm'de gelişmeye bırakılmıştır. BMGY besiyerinde sayısını arttıran hücreler 10-13 OD_{600nm}'ye ulaşınca +4 °C, 3000×g'de 15 dakika santrifuj edilerek hasat edilmiş, hücre peleti 30 ml BMEY (pH 3-7) içinde resüspanse edilmiş ve hücrelerin Dornaz alfa ekspresyonunu gerçekleştirebilmesi için aynı inkübasyon şartlarında ekspresyon 96 saat sürdürülmüştür. Ekspresyon boyunca her on iki saatte bir olacak şekilde etanol eklemesi yapılarak medyadaki etanol miktarının %1 olması sağlanmıştır. Hücre kültürlerinden 72. saatte 1'er mL örnek alınarak 96. saatte üretim sonlandırılmıştır. Hasat sonrası süpernatant örnekleri 0.45 PES filtre edilerek daha sonra gerçekleştirilecek olan aktivite analizlerinde, SDS-PAGE ve Western Blot analizlerinde kullanılmak üzere -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.9. Erlenmayer ölçeğinde sıcaklık ve pH optimizasyonu

Dornaz alfa enziminin ekspresyonunda protein üretim şartlarının optimizasyonu amacıyla farklı üretim sıcaklıkları ve farklı besiyeri pH değerlerinde ekspresyon yapılmıştır. Bu amaçla standart üretim yöntemi ve gerekli doğrulama analizlerinden sonra seçilen üretim klonu öncelikle standart BMGY (pH 6.0) besiyerinde 28 °C sıcaklıkta geliştirilmiştir. Daha sonrasında farklı pH (3, 4, 5, 6, 7) değerlerinde hazırlanmış BMEY besiyerine aktarılmış ve 20 °C, 24 °C ve 28 °C sıcaklıklara ayarlanarak çalkalamalı inkübatörde ekspresyonu yapılmıştır. Ekspresyon 96 saat sürdürülmüş olup yukarıda bahsedildiği şekilde her 12 saatte son konsantrasyonu %1 olacak şekilde etanol ilavesi yapılmıştır. Ekspresyon süresi sonunda hücreler 5000×g'de 15 dakika sürede santrifüj edilerek hasat edilmiş ve hücrelerinden ayrılan süpernatant filtre edilerek enzim aktivitesi, SDS-PAGE ve Western Blot analizlerinde kullanılmak üzere uygun şartlarda muhafaza edilmiştir.

3.2.10. Enzim aktivitesinin belirlenmesi

Enzim aktivitesinin belirlenebilmesi için standart olarak ticari sığır DNaseI (Thermo Scientific™) kullanılmış ve karşılaştırma yöntemi ile üretilen Dornaz alfa aktivitesi belirlenmiştir. Agaroz jel görüntüleri alınarak DNA'yı parçalama miktarına görsel olarak bakılarak yorumlanmıştır. Reaksiyon şartları standart olarak kabul edilen ticari sığır DNaseI (Thermo Scientific™) enzimi üretici firma talimatı baz alınarak belirlenmiştir. Enzim aktivitesinin belirlenmesi amacıyla 1 µg DNA için 1 µl üretilen Dornaz alfa enzimi kullanılmıştır. Bu amaçla; DNase free reaksiyon tüpü içerisine, 500 ng DNA örneği üzerine buz üzerinde çözdürülen süpernatant örneklerinden 0.5 µl konulmuştur. Tüp içerisine 1.5 µl 10X Reaction buffer (100 mM Tris-HCl (pH 7.5, 25 °C), 25 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂) ve 7.5 µl nükleaz ari su (NFW) eklenerek toplam 15 µL hacimde reaksiyon başlatılmıştır. Standart ticari sığır DNaseI enzimiyle kurulan reaksiyon ise şartları değiştirilmeden uygulanmıştır. Reaksiyon karışımları 37 °C

sıcaklığında 10 dk inkübasyona bırakılmış, inkübasyon sonunda örnekler, agaroz jel elektroforezinde görüntülenerek görsel olarak yorumlanmıştır. Fermentör üretimleri sonucu saflaştırılan örnekler 10, 25, 50, 100, 200, 400 kat dilüsyonlar uygulanarak aynı şartlarda enzim aktivitesi yapılmıştır.

3.2.11. Spesifik enzim aktivitesinin belirlenmesi

Dornaz alfa enziminin 1 ünitesi 37 °C’de 10 dakikada 1 µg DNA’ı parçalayan enzim miktarı olarak tanımlanır. Dornaz alfa’nın maksimum aktivitesini gösterebilmesi için reaksiyon ortamında Mg^{+2} veya Ca^{+2} bivalent metallerin bulunması aktivatör olarak görev yapmaktadır. Substrat çözeltisinin bileşimi 5 mM magnezyum sülfat, 0.1 M asetat tamponu (pH 5.0) şeklinde olup 1ml substrat çözeltisi içerisine 90 µg DNA ilave edilerek homojen karışımı sağlanmış ve reaksiyon öncesinde taze hazırlanmıştır. Substrat solüsyonundan 30 µl alınarak tüplere paylaştırılmış ve tüp içerisinde bulunan DNA miktarına göre, her 1 µg DNA için 2 µL enzim konularak BioDrop (BioChrom, UK) 260 nm’deki absorbansı ölçülmüştür.

Dornaz alfa enziminin spesifik aktivitesi “Production For Recombinant Human Dnase I; patent no: US 20170233704A1” patentinde tanımlanan ve Kunits (1949) tarafından yapılan çalışmalardan yararlanılarak tespit edilmiştir. Spesifik aktivite hesabının yapılabilmesi için ilk olarak faktör sabiti referans olarak ticari sığır DNaseI (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD) kullanılmasıyla tespit edilmiştir. Faktör sabiti hesaplanırken (3.1)’de verilen bağıntı kullanılarak hesaplama yapılmıştır. Bağıntı üzerindeki referans: ticari sığır DNaseI enziminin U/mg cinsinden ifadesini, ΔA_{260} : 260 nm dalga boyundaki absorbans değişimi, dk: dakikayı dilüsyon oranı ise enzimin dilüsyonunu ifade etmektedir.

$$\text{Faktör sabiti} = \frac{\text{Referans (U/mg)}}{\frac{\Delta A_{260}}{dk} \times \text{dilüsyon oranı}} \quad (3.1)$$

Faktör sabiti hesabı yapıldıktan sonra saflaştırma sonrası elüsyon örneklerindeki enzim aktivitesinin hesaplanabilmesi için absorbanstaki değişim verileri denklem 3.2’de belirtilen bağıntı kullanılarak hesaplama yapılmıştır.

$$\text{Spesifik Aktivite (Unit/mg)} = \frac{\Delta A_{260}}{dk} \times \text{dilüsyon oranı} \times \text{faktör sabiti} \quad (3.2)$$

3.2.12. Dornaz alfa enziminin saflaştırılması

3.2.12.1. Manuel yöntemle saflaştırma

Enzim aktivitesi sonucu protein ekspresyonunu gerçekleştirdiğini bildiğimiz süpernatant örneklerinden Dornaz alfa enzimini saflaştırabilmek amacıyla protein sekasında etiketlenen Histidin (6×His) aminoasidinden yararlanılarak HisPur™ Ni-NTA Resin (Thermo Fisher Scientific, ABD) yardımıyla saflaştırma yapılmıştır. Saflaştırmanın ilk aşamasında süpernatant miktarı kadar equilibration buffer (10mM imidazol, 0.3 M NaCl, 0.1 M Na-fosfat tamponu, pH 7.4) eklenerek karıştırılmış ve pH’sı ölçülerek 1M Tris-Cl (pH 9.5) ile pH 7.4’e ayarlanmıştır. Daha sonra etanolden

uzaklaştırılmış toplam hacim miktarına göre %1 oranında HisPur™ Ni-NTA Resin (Thermo Fisher Scientific, ABD) eklenmiş ve proteinin rezine bağlanabilmesi için Rotator Mixer RM-Multi 1 (Starlab, UK) cihazında 2 saat 10 rpm dönüş hızında karıştırılması sağlanmıştır. Süre sonunda buffer ve süpernatant karışımı, tek kullanımlık 5 ml polipropilen (Thermo Fisher Scientific, ABD) kolonlardan yavaşça geçirilerek histidin etiketli proteinlerin kolona tutunması sağlanmıştır. Spesifik olmayan bağlanmaların uzaklaştırılması amacıyla kolon 20 mM konsantrasyonda imidazol içeren 1ml yıkama solüsyonu ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra sırasıyla 200 mM 500 mM imidazol içeren tamponlar ile histidin etiketli proteinlerin kolondan elüsyonu sağlanmış ve hedef proteinin elüsyon tamponu içerisine salınarak saflaştırma işlemi tamamlanmıştır.

3.2.12.2. Hızlı performans sıvı kromatografisi (FPLC) yöntemi ile saflaştırma

Fermantasyon hasat süpernatant örneklerinden saf olarak elde edilmek istenen Dornaz alfa enziminin afinite kromatografisi esasına dayanan saf olmayan süpernatant karışımından elde edilmesi için ÄKTA avant™ 150 kromatografi sistemi (Cytiva, Almanya) kullanılmıştır. Saflaştırma prosesi için 6x His etiketli peptidi moleküler konformasyona göre ayırma işlemi için HisTrap™ HP (Cytiva, Almanya) kolonu kullanılmıştır. Prosesin ilk aşaması olan etanol içerisinde depolanan kolondan (20 mM sodyum fosfat, 300 mM NaCl, pH 7.4) bağlama tamponu geçirilerek etanol kolondan uzaklaştırılmış ve kolon şartlandırılmıştır. Kolon akış hızı 1 mL/dk olacak şekilde ayarlanmış ve tüm proses boyunca bu akış hızı kullanılmıştır. Filtre edilen süpernatant örneğinin pH kontrolü yapılmış ve pH 7.4'e ayarlanmıştır. Süpernatant örneği kolon içerisinde sabitlenmiş iki değerlikli (bivalent) nikel metal iyonu bulunan kolondan geçirilerek, nikelin polihistidin etiketine bağlanması sağlanmıştır. Bütün örnek kolondan geçirildikten sonra kolondan bağlama tamponu (20 mM sodyum fosfat, 300 mM NaCl, 5 mM imidazol, pH 7.4) geçirilerek etiketsiz proteinler kolona bağlanmadan sistemden atık olarak toplanmıştır.

Kolon içerisindeki nikel bağlanan etiketli proteinin kolondan elüsyon tamponu içerisine süzülmesini sağlamak için (20 mM sodyum fosfat, 300 mM NaCl, 200 mM imidazol, pH 7.4) elüsyon tamponu kolondan geçirilerek elüsyon örnekleri toplanmıştır. UNICORN™ 7 Cytiva programı üzerinden proteinin 280 nm'de geldiği pik'e göre elüsyon toplanmıştır. Elüsyon tamponu içerisinde bulunan imidazol 280 nm'de soğurulur dolayısıyla morötesi absorpsiyonuna dayanan protein ölçümlerinde hatalı sonuçlar verebilmektedir. Bununla birlikte üretilen proteinde depolamaya karşı kayıpların yaşanmaması için uygun tampon içerisinde depolanması amacıyla CaCl_2 'lü tamponuyla (0.001M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.15M NaCl, pH 6.3) tampon değişikliği yapılmış ve elüsyon örneğinde protein konsantrasyonu ölçülmüştür.

3.2.13. SDS-PAGE ve Western Blot analizleri

SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel Elektroforez) yüklü proteinleri elektrik akımı etkisi ile moleküler ağırlıklarına (kDA) göre ayıran analitik bir metot olup proteinlerin tanımlanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE), Mini-PROTEAN Tetra Dikey Elektroforez Hücresi (Bio-Rad, ABD) cihazında %5 poliakrilamid yükleme jeli ve %10 poliakrilamid ayırma jeli 1 mm hazırlanarak uygulanmıştır. Protein üretimi tespit edilecek olan süpernatant

örnekleri, toplam 30 µl olacak şekilde 1:3 oranında 4X SDS jel yükleme tamponu (200 mM Tris-Cl, pH 6.8, %8 SDS, % 0.4 Bromphenol Blue, %40 gliserol, 100 mM DTT) ile karıştırılarak 70 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakılmış ve proteinlerin denatürasyonu sağlanmıştır. Hazırlanan örnek-yükleme karışımından 20 µl alınarak jel kuyucuklarına yüklenmiştir. Protein örnekleri, elektroforez işlemi boyunca 1X TGS (0.025 M Tris base, 0.192 M Glisin, % 0.1 SDS, pH 8.3) tamponunda 120 V akımda 90 dakika koşturulmuştur. Elektroforez işleminden sonra jel, Coomassie brilliant blue içeren boyama tamponu (%10 Asetik asit, %50 Metanol, %0.1 coomassie blue staining) ile 2 saat orbital çalkalayıcı üzerinde boyanmış, boya içermeyen yıkama tamponu (%10 Asetik asit, %10 Metanol) ile proteine bağlanmayan fazla boyanın arınması için protein bantları görünür hale gelene kadar yıkanmıştır. Sonrasında akrilamid jel ChemiDoc MP görüntüleme sistemi ile görüntülenmiş, aynı jel içerisindeki bir kuyucuğa yüklenen protein standardı (Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad, ABD) yardımıyla hizalama yöntemi ile hedef proteinin doğrulanması yapılmıştır.

Western blot analizi için örnekler SDS-PAGE analiziyle aynı şekilde akrilamid jelde ayrılmış ve jel boyama işlemine tabi tutulmadan western blot analizine devam edilmiştir. Bu amaçla PVDF membran (Millipore, MA, ABD), kullanılmış ve Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, ABD) cihazında (350mA, 90 dakika) 1x TGM (192 mM glisin, 25 mM Tris baz, %10 metanol) buffer yardımıyla proteinlerin jelden membrana transferi sağlanmıştır. Transfer tamamlandığında membran protein aktarılan yüzü yukarıya bakacak şekilde ışık geçirmeyen tanka alınmış ve 1X PBS tamponu (%0.9 NaCl, 10mM Na- Fosfat buffer, pH 7.4) ile yıkandıktan sonra kapatma tamponu (100 mL 1x PBS, %1 kazein) içinde 1 saat süre ile orbital çalkalayıcının üzerinde inkübasyona bırakılmış ve proteinlerin bloklanması sağlanmıştır. Histidin etiketli proteinlerin tespiti için birincil antikör olarak 6xHis, His-Tag primary antibody (Proteintech, USA) kullanılmış ve kapatma tamponu içerisine 1:1000 oranında ilave edilerek membran yüzeyini kaplayacak şekilde dökülmüş ve çalkalayıcıda 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Süre sonunda membran 3 kez 5'er dakika olacak şekilde 1x PBST (%0.1 Tween 20, 100 mL 1x PBS) tamponuyla yıkanmıştır. Yıkamaların sonunda oda sıcaklığında 1 saat boyunca 1:10000 oranında ikincil antikör (IRD'ye conjugated secondary antibody anti-mouse IgG (H+L) HRP, Sigma Aldrich, USA) içeren kapatma tamponu içerisinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda membran tekrardan 3 kez 5'er dakika 1xPBST tamponuyla yıkanmış ve Tween 20'den arındırmak için 1 kez 5 dk 1xPBS ile son yıkama tamamlanmıştır. Antikörlerle bağlanması tamamlanan membran yüzeyi, uygun yansıma veren çözelti (100 mM Tris-Cl (pH 8.8), 1.25 mM luminol, 2mM 4-IPBA, 5.3 mM H₂O₂) ile kaplanmıştır. Membran yüzeyinin tamamen yansıma çözeltisi ile kaplanması sağlandıktan sonra seri bir şekilde ChemiDoc MP Görüntüleme Sistemi (Bio-Rad; ABD) ile kemilüminesans yansıma veren kanalda görüntü alınmıştır.

3.2.14. Toplam protein miktarının belirlenmesi

Süpernatant örneklerinde toplam protein miktarı, ticari Coomassie Plus (Bradford) Assay Kiti kullanılarak belirlenmiştir. Kit içerisinde bulunan protein standardı (sığır serum albumini (BSA)) kullanılarak standart kalibrasyon kurvesi oluşturulmuş ve standart grafiğinden elde edilen formül üzerindeki eğim kullanılarak toplam protein miktarı, µg/mL cinsinden hesaplanmıştır. Ölçüm için 1.5 mL Coomassie plus reagent çözeltisi içerisine 50 µl süpernatant örneği/BSA standardı eklenmiş, homojen karışımları sağlanmış ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda

süpernatant örneklerindeki protein miktarının yoğunluğuna göre bordo renkli Coomassie plus reagent renginin mavi renge dönüştüğü gözlenmiştir. 25-2000 µg/mL aralığındaki BSA standartları ve örneklerin spektrofotometrede 595 nm dalga boyundaki absorbansları ölçülmüştür.

3.2.15. EndoH_f ile deglikozilasyon uygulanması

Dornaz alfa protein sekansında Asn¹⁸ ve Asn¹⁰⁶ aminoasitlerinde iki potansiyel N-bağlı glikozilasyon bölgesi mevcuttur. Potansiyel glikozilasyonun tespiti ve glikozilasyonun protein moleküler ağırlığındaki değişimini tespit etmek, glikolize olmayan rekombinant proteinin molekül ağırlığını belirlemek için glikoproteinlerin denatürasyonu sonrası EndoH_f (New England Biolabs, UK) enzimi ile muamele edilmiştir. Reaksiyonun optimum şartlarda çalışabilmesi için süpernatant örneklerinde hesaplanan protein miktarına (µg/mL) göre belirlenen EndoH_f enzim miktarı belirlenmiştir. Miktarı bilinen protein örneği üzerine 10X glikoprotein denatürasyon tamponu (0.4 M DTT, %5 SDS) eklenmiş ve 95 °C'de 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 1 dk buz üzerine alınmış ve 10X Endo H_f reaksiyon tamponu (C₆H₅Na₃O₇, 25 °C'de pH 5,5) eklenmiştir ve üzerine hesaplanan miktarda EndoH_f (20mM Tris-HCl (25 °C'de pH 7.5), 50mM NaCl, 5mM EDTA, 500U/µl Endo H) enzimi eklenerek toplam hacim 40 µl olacak şekilde nükleaz ari su (NFW) ile tamamlanarak reaksiyon başlatılmıştır. 37 °C'de 5 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonunda SDS-PAGE analizi ile jelde süpernatant ve deglikozile örneğin protein markere göre verdiği bantlar incelenmiş ve jel görüntüsü alınmıştır.

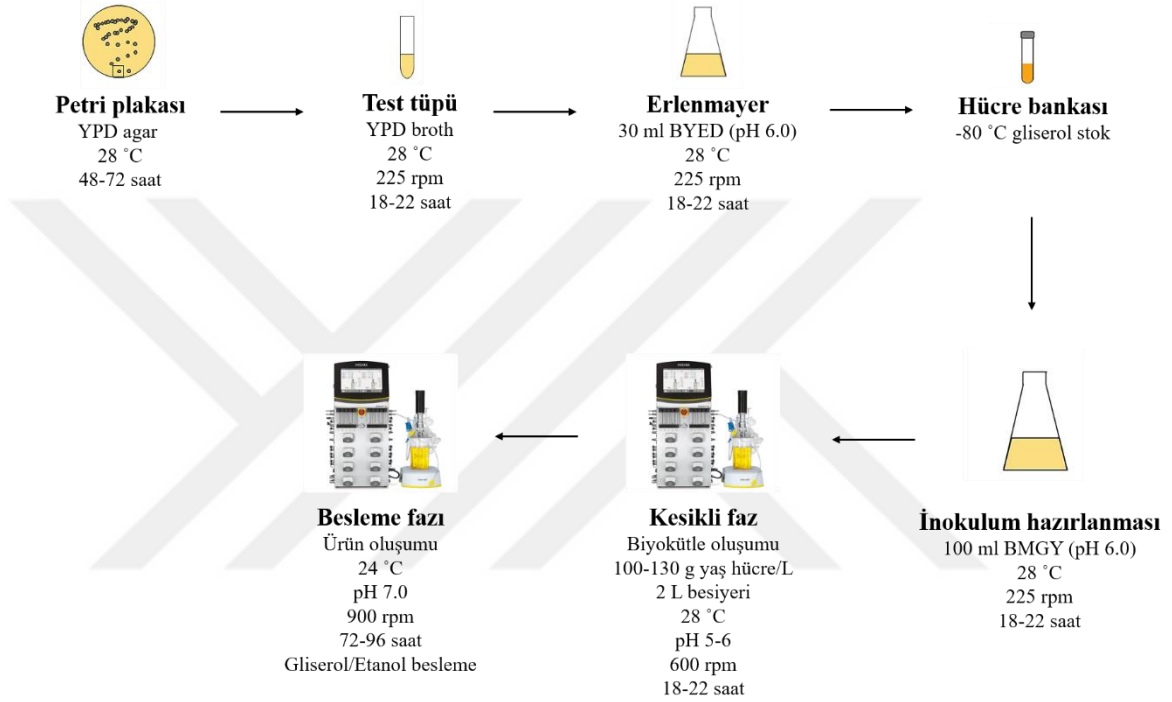
3.2.16. Biyoreaktörde Dornaz alfa ekspresyonu

Fermantasyon çalışmaları 5 L Biostat B (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Almanya) biyoreaktöründe kesikli faz ve indüksiyon fazı olmak üzere 2 aşamada gerçekleştirilmiştir. Biyoreaktör üretim parametreleri "Pichia Fermentation Process Guidelines (Invitrogen, USA)" protokolü referans alınarak belirlenmiştir. Fermantasyon koşullarının kontrolü amacıyla sıcaklık sensörü (kontrol aralığı 0-80 °C), çözünmüş oksijen (DO%) probu (Oxyferm FDA VP 120 Hamilton İsviçre (kontrol aralığı %0- 100)), pH & Redoks probu (Easyferm FDA VP 120 Hamilton İsviçre (kontrol aralığı 0- 14)), antifoam (köpük kontrol) probu (seramik kaplı paslanmaz çelik-elektrik iletken sensör) ve etanol probu (Raven Biotech Inc Kanada (kontrol aralığı % 0.1-1.0 etanol) kullanılmıştır (Yılmaz 2018).

Fermantasyon çalışmalarında FM22 besiyeri (42.2 g/L KH₂PO₄, 5 g/L (NH₄)₂SO₄, 0.79 g/L CaSO₄, 14.9 g/L K₂SO₄, 4.13 g/L MgSO₄·7H₂O, 40 g/L gliserol, pH 7.0) ve tamponlu gliserol-kompleks besiyeri (% 1 Maya ekstraktı, % 2 Soyton, % 1.34 YNB, % 4×10⁻⁵ Biotin, % 2 Gliserol, 100 mM potasyum fosfat tamponu pH 7.0) olmak üzere iki farklı gelişme ortamı kullanılarak temel besiyeri ve kompleks besiyerinde ekspresyon gerçekleştirilmiştir. Fermantasyonlar iki farklı besiyeri için aynı koşullarda gerçekleştirilmiştir. Fermantasyonda izlenen tek değişiklik protein üretiminin farklı üretim besiyerlerinde gerçekleştirilmesi olarak çalışılmıştır.

Çift cidarlı ve 5 L hacimli biyoreaktör haznesi içerisine 2 L besiyeri ilave edilmiş, gerekli bağlantıları (problar ve örnek alma-besleme hortumları) yapıldıktan sonra 121 °C'de 30 dk süre ile steril edilmiştir. Sterilizasyon sonrası oda sıcaklığına kadar

soğutulduktan sonra besiyeri ortamına aseptik şartlarda 1 mL/L oranında PTM4 (Pichia trace minerals 4) tuz solüsyonu ilavesi yapılmıştır. Daha sonrasında prob (DO ve pH) kalibrasyonları, pH ve sıcaklık ayarlaması gibi standart üretim ön hazırlıkları yapılmış ve reaktörler inokulum vermeye hazır hale getirilmiştir. Klonlama çalışmalarından ve doğrulama analizleri sonucunda seçilen klonun biyoreaktör üretiminde standardizasyonunun sağlanabilmesi için seçilen klonun birebir aynısı olan çok sayıda kopyasının oluşturulabilmesi amacıyla BYED besiyerinde geliştirilerek gliserol içeren ortamda hücre çalışma bankası hazırlanmıştır. Seçilen klonun fermentör ortamında üretime alınması Şekil 3.3'te şematize edilmiştir.



Şekil 3.3. Seçilen klonun fermentör ortamında üretime alınmasının şematik gösterimi

Hücre çalışma bankasının hazırlanabilmesi amacıyla YPD agar plakada teke düşürülerek geliştirilen koloniler 3 ml YPD sıvı besiyerine ekimi yapılmış ve çalkalamalı inkübatörde, 28 °C 225 rpm'de gece boyu geliştirilmiştir. Ertesi gün bu kültürden BYED (% 3 maya ekstraktı, % 2 glukoz, % 1.34 YNB, 100 mM potasyum fosfat tamponu pH 6.0, % 4×10^{-5} biotin) besiyerine başlangıç OD_{600nm} değeri 0.1 olacak şekilde ekim yapılmıştır. OD_{600nm} değeri 10-13 olana kadar çalkalamalı inkübatörde geliştirilmiştir. 30 ml BYED'de gelişen kültür üzerine 10 ml %80 gliserol eklenerek steril kriyojenik tüplere 1 ml olacak şekilde paylaştırılmış ve fermentör üretimine kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir. Fermentör üretimlerinde her seferinde hücre bankası stoklarından 1 vial çözdürülerek 500 mL hacimli engelli erlenmayer içerisindeki 100 ml BMGY (pH 6.0) besiyerine ekimi yapılarak çalkalamalı inkübatörde 28 °C'de OD_{600nm} değeri 13 olana kadar geliştirilmiştir. Gelişimi tamamlanan hücreler aseptik şartlarda 50 mL steril şırıngalara aktararak biyoreaktör haznesi içerisindeki 2 litre besiyeri ortamına inokulum olarak verilmiştir.

Fermantasyon ortamına kompresör yardımıyla gelen hava 1 lpm/L verilmiştir. Havalandırma yetersiz kaldığında saf oksijen kullanılarak çözünmüş oksijen seviyesinin kontrolü sağlanmıştır. Hava ve saf oksijen 0.22 µm por büyüklüğündeki PES filtreden geçirilerek steril şekilde üretim ortamına verilmiştir. Ortam pH değerinin kontrolü amacıyla %25'lik amonyak solüsyonu kullanılmış olup kontrol panelinden ayarlanan pH değerine göre sistem üzerinde bulunan dahili peristaltik pompa aracılığıyla ihtiyaç halinde baz solüsyonu beslemesi yapılarak pH ayarlanmıştır. Fermantasyonun ilerleyen zamanlarında oluşan köpüklenmeyi önlemek amacıyla antifoam sensöründen gelen sinyal doğrultusunda sisteme dahili bir peristaltik pompa yardımıyla %5 konsantrasyonundaki köpük kesici (Tito, Türkiye) ile köpüklenme kontrol edilmiştir. Kontrol panelinden ayarlanan sıcaklık değerinin sabit kalması için sisteme bağlı harici soğutucu tarafından biyoreaktör ceketine soğutma ajanlı sıvı akışı gerçekleştirilerek ortam sıcaklığı kontrol edilmiştir ve ortam sıcaklığı prob tarafından anlık olarak ölçülerek soğutmanın etkinliği kontrol edilmiştir. Fermantasyon besiyeri ortamının karıştırma işlemi ana gövde üzerindeki motora bağlı 2 adet 6 kanatlı impeller tarafından gerçekleştirilmiştir. Besleme solüsyonu, biyoreaktör kontrol sistemine bağlı peristaltik Watson Marlow 120 U harici pompa aracılığıyla besleme oranına uygun dönüş hızında üretim ortamına verilmiştir.

Fermantasyonun ilk aşamasında 100 ml BMGY da gelişen hücreler kültür fermentör ortamına inoküle edilmiştir. Kesikli fazda temel amaç hücre yoğunluğunun artırılması olup gelişim ortam koşulları FM22 için 28 °C ve pH 5, kompleks besiyeri için 28 °C ve pH 6 olarak ayarlanmıştır. Hücreler bu kesikli faz aşamasında gelişim ortamında bulunan gliserolü tüketene kadar geliştirilmiştir. Kesikli faz boyunca çözünmüş oksijen (% DO) değeri gözlemlenerek ortam gliserol varlığı kontrol edilmiştir. Kesikli fazın sonlarına doğru çözünmüş oksijen (DO) değerinde gerçekleşen ani artış (DO spike) gözlemlenmesi sonucu ortamda bulunan gliserolün tükendiği anlaşılmış ve besleme fazına geçilmiştir.

DO spike olan hücreler 20 dakika aç bırakılmış ve fermantasyonun protein üretim fazı olarak da bilinen ikinci aşaması olan besleme fazı başlatılmış olup bu fazda artan hızda besleme profili uygulanmıştır. Fermantasyon süresi boyunca ortamda bulunan etanol miktarının gözlemlenmesi amacıyla etanol sensörü kullanılmıştır. Böylece ortama verilen etanol miktarının hücreler tarafından kullanılıp kullanılmadığı ve ortamda birikip birikmediği kontrol edilmiştir. Ortam etanol miktarının kontrol edilerek hücreler için toksik seviyeye çıkmasını önlemek amacıyla besleme başlamadan hemen önce fermentör ortamına %1 olacak şekilde saf etanol pulse şeklinde verilmiş ve etanol sensör değeri sabitlenene kadar beklenilmiş ve mV cinsinden okunan en yüksek değeri kaydedilmiştir. Bu aşamada karıştırma hızı 900 rpm, hava beslemesi 2vvm değerinde ve çözünmüş oksijen seviyesi %20 seviyesinde tutulmuştur. Sıcaklık ve pH parametreleri erlenmayer çalışmalarında belirlenen optimum şartlara (24 °C ve pH 7.0) ayarlanmıştır. Besleme solüsyonunun içeriği %50 gliserol, %10 etanol ve %0.4 PTM4 tuzu şeklinde olup fermantasyon süresinin ilk iki saatinde 7.3 mL/L.sa hızda, iki saat sonunda fermantasyonun 60. saatine kadar lineer artan profil girilerek besleme hızı 31.2 mL/L.sa seviyesine ulaştırılmış ve daha sonra 96. saate kadar sabit 31.2 mL/L.sa hızında beslemeye devam edilmiştir.

Fermantasyon boyunca üretim ortamından düzenli aralıklarla örnekler alınmıştır. Alınan örneklerde yaş hücre ağırlığı (g yaş hücre/L) ölçülmüştür. Yaş hücre ağırlığının ölçülmesi amacıyla darası alınmış olan 3 adet 1.5 mL santrifüj tüplerine 1'er mL

fermantasyon örneği paylaştırılmış ve 10.000×g hızında 5 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonunda şiringa yardımıyla süpernatant kısımları toplanmış ve pelet ağırlığı hassas terazide tartılarak boş tüp ile pelet içeren tüp arasındaki fark alınmıştır. Hesaplamalar sonucunda g yaş hücre/L cinsinden yaş hücre ağırlığı belirlenmiştir.

şiringaya alınan süpernatant kısımları ise 0.45 µm por büyüklüğüne sahip PES filtrelerden geçirilerek filtre edilmiş, daha sonraki analizlerde kullanılmak üzere -80 °C’de muhafaza edilmiştir. Süpernatant örneklerinde toplam protein ölçümü, enzim aktivite analizi ve Western Blot analizleri yapılmıştır.

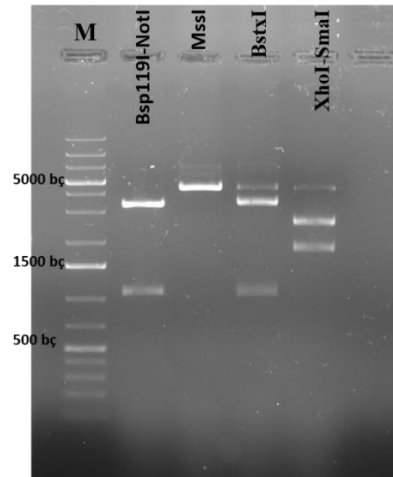


4. BULGULAR

4.1. Liyofilize Olarak Temin Edilen/Gelen pPICZαDornaz alfa Plazmidinin *E. coli* Hücrelerine Transformasyonu ve Doğrulaması

Liyoflize şekilde temin edilen, Dornaz alfa gen bölgesini içeren pPICZαA vektörünün çoğaltılmak üzere *E. coli* NEB5α hücrelerine transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Zeosinli LB Lenox agar plakalarda seçilimi sağlanmıştır. Antibiyotikli seçim ortamında beklendiği üzere, bünyesinde plazmit bulundurmayan boş konakçı hücreler *E. coli* NEB5α gelişmemiş ve pPICZαDornaz alfa plazmidini bünyesinde bulunduran *E. coli* NEB5α gelişmiştir.

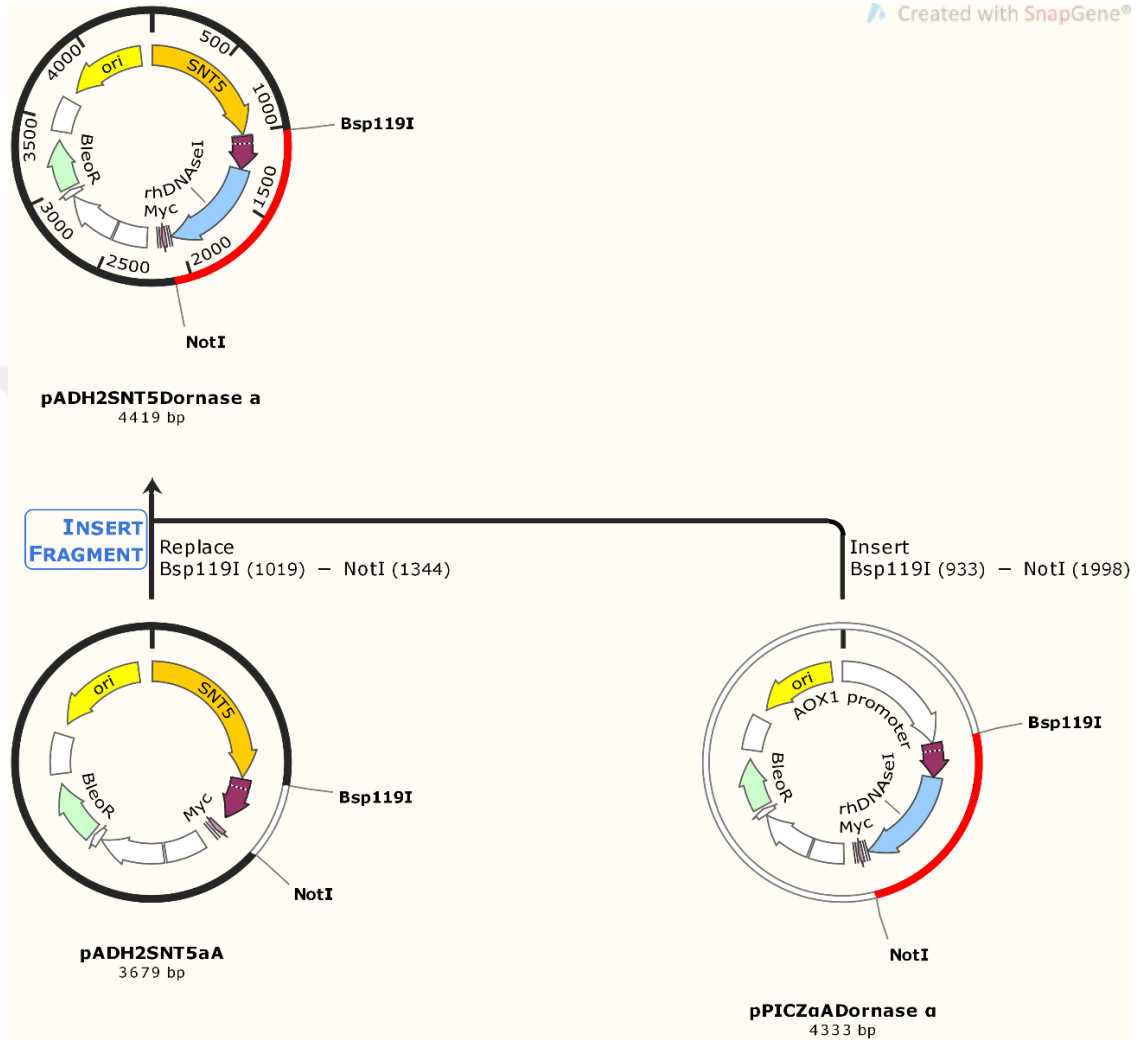
Zeosinli LB Lenox agarda gelişen kolonilerden 10 tane seçilerek aynı sırayla numaralandırılmış transformantlar LB Lenox sıvı besiyerinde geliştirilerek stok kültür hazırlanmış ve plazmid izolasyonları yapılarak kontrol edilmiştir. Seçilen pPICZαDornaz alfa #1 no'lu transformant hücreden plazmid izolasyonu yapılarak çoğaltılan plazmidi doğrulamak amacıyla *Bsp119I*-*NotI*, *MssI*, *BstXI* ve *XhoI*-*SmaI* restriksiyon enzimleriyle kontrol kesim reaksiyonu kurulmuştur. Kesim sonucu beklenen fragmentler *Bsp119I*-*NotI* enzim çifti ile kesildiğinde 3268 bp ve 1065 bp, *MssI* ile kesildiğinde 4333 bp, *BstXI* ile kesildiğinde 3305 bp ve 1028 bp, *XhoI*-*SmaI* çifti ile kesildiğinde 2524 bp ve 1809 bp şeklinde olup agaroz jelde kontrol edildiğinde beklenen fragmentlerin görülmesiyle pPICZαDornaz alfa #1 plazmidi doğrulanmıştır. Analiz kapsamında beklenen fragmentler harici bantlar görülmüş ve bunun nedeni olarak analizlerde kullan enzim miktarının yetersiz gelmesinden kaynaklanarak plazmitlerin kesilememiş bölgelerinin olduğu tespit edilmiştir. Çalışmanın devamında pADH2SNT5α vektörüne klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Şekil 4.1'de *E. coli* NEB5α hücrelerine transforme edilen pPICZαDornaz alfa #1 plazmidinin agaroz jelde doğrulanması görüntüsü verilmiştir.



Şekil 4.1. *E.coli* NEB5α hücrelerine transforme edilen pPICZαDornaz alfa plazmidinin agaroz jel doğrulanması M: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD), *Bsp119I*-*NotI* ile kesim sonucu beklenen fragmentler 3268 bp ve 1065 bp, *MssI* ile kesim sonucu beklenen fragment 4333 bp, *BstXI* ile kesim sonucu beklenen fragmentler 3305 bp ve 1028 bp, *XhoI* ve *SmaI* ile kesim sonucu beklenen fragmentler 2524 bp ve 1809 bp

4.2. Ekspresyon Plazmidinin Oluşturulması

SnapGene programı üzerinden Dornaz alfa gen bölgesinin, ekspresyon vektörü olan pADH2SNT5αA'ye klonlanması amacıyla, klonlama haritası oluşturularak klonlama stratejisi belirlenmiş ve klonlanma basamakları Şekil 4.2'de verilmiştir.

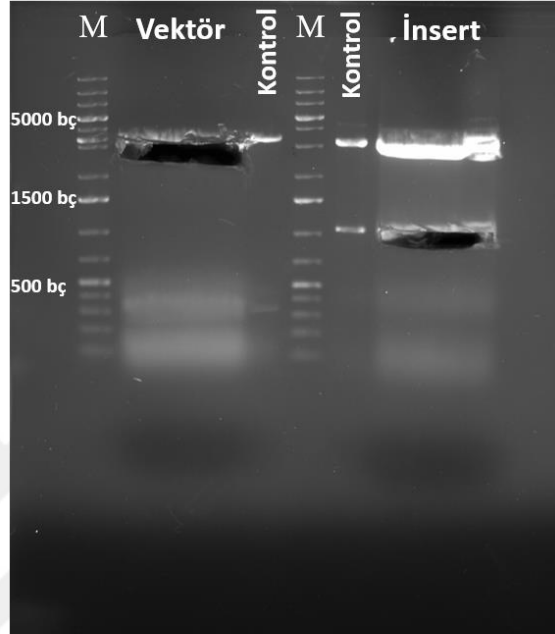


Şekil 4.2. Dornaz alfa geninin pADH2SNT5 plazmidine klonlanma basamakları

Laboratuvarımızda hazır stoğu bulunan *E. coli* NEB5α içerisindeki pADH2SNT5αA plazmidi zeosinli LB Lenox sıvı besiyerinde geliştirilerek plazmit izolasyonu yapılmıştır. Klonlamada kullanılacak olan vektör ve insert DNA'larının elde edilmesi için pPICZαADornaz alfa ve pADH2SNT5αA plazmidlerinin her ikisi de *Bsp119I* ve *NotI* ile kesilmiştir (Şekil 4.3). Kesim sonucunun kontrol edilebilmesi amacıyla 5 µl hacimde kesim reaksiyon karışımından alınarak agaroz jele kontrol olarak yüklenmiştir.

Kesim sonucu reaksiyon karışımı agaroz jele yüklenmiş ve agaroz jelde vektör DNA 3354 bp, insert DNA 1065 bp hizasında parça verdiği doğrulanmıştır. Beklenen parçaların jelden kesimi yapılmış ve jel pürifikasyonu yapılmıştır. Dornaz alfa geni

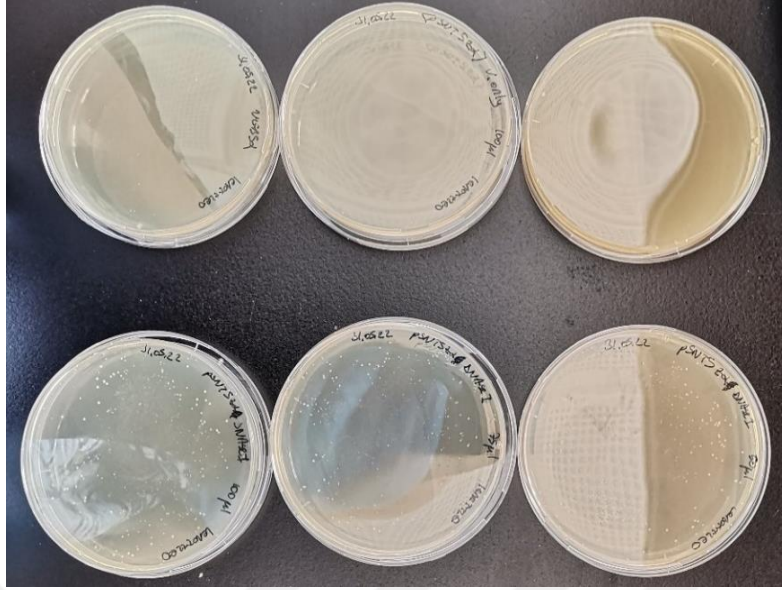
taşıyan ekspresyon vektörlerinin oluşturulması amacıyla 2 farklı noktadan kesilerek lineer hale getirilen pADH2SNT5 α A vektörünün kendi üzerine kapanmasını önlemek amacıyla defosforilasyon yapılmıştır. Defosforilasyondan sonra ligasyon protokolü izlenerek 1:3 insert:vektör oranı (molar:molar) kullanılarak ligasyon yapılmış ve pADH2SNT5Dornaz alfa ekspresyon vektörü oluşturulmuştur.



Şekil 4.3. Vektör ve insert parçalarının agaroz jelden kesilmesi M: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD), *Bsp*119I-*Not*I ile kesim sonucu beklenen vektör fragmenti 3354 bp ve insert fragmenti 1065 bp

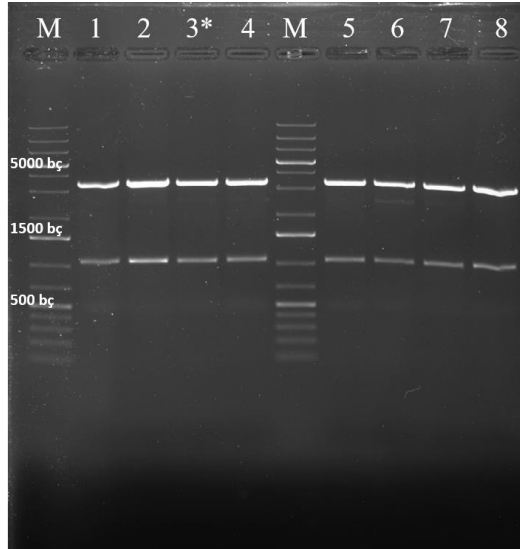
4.3. pADH2SNT5Dornaz alfa Ekspresyon Vektörünün *E. coli* Hücrelerine Transformasyonu

Oluşturulan ekspresyon vektörü *E. coli* hücrelerine transforme edilmiş ve transformant hücrelerin seçilimi zeosinli LB Lenox agar plakalarda gerçekleştirilmiştir. Beklendiği üzere, bünyesinde pADH2SNT5Dornaz alfa ekspresyon kasedini bulundurmayan boş konakçı *E. coli* NEB5 α hücreleri gelişmemiş ve pADH2SNT5Dornaz alfa plazmidini bünyesinde bulunduran *E. coli* NEB5 α hücreleri antibiyotikli seçim ortamında gelişmiştir. Şekil 4.4'te pADH2SNT5Dornaz alfa ekspresyon vektörünün yetenekli *E. coli* NEB5 α hücrelerine transformasyonu sonucu gelişen hücrelerin görüntüsü verilmiştir.



Şekil 4.4. Oluşturulan ekspresyon vektörünün yetenekli *E.coli* NEB5α hücrelerine transformasyonu sonucu elde edilen petri plaka üzerindeki koloni görüntüsü

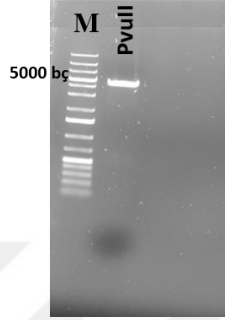
Zeosinli LB Lenox agarda gelişen kolonilerden 8 tane seçilmiş, aynı sırayla numaralandırılmış ve stok kültür hazırlanmıştır. Transformant hücrelerden plazmid izolasyonu yapılarak çoğaltılan plazmidleri doğrulamak amacıyla *Bsp119I*-*NotI* restriksiyon enzimleriyle kesim reaksiyonu kurulmuştur (Şekil 4.5). Restriksiyon kesimi sonucu 3354 bp ve 1065 bp fragmentleri beklenmekte olup agaroz jelde kontrol edilmiş ve plazmitlerin tamamı doğrulanmıştır. Doğrulan plazmitlerden konsantrasyonu en yüksek olan 3 numaralı plazmit ile analizlere devam edilmiştir.



Şekil 4.5. *Bsp119I* ve *NotI* restriksiyon enzimleriyle kesim reaksiyonu kurulan pADH2SNT5Dornaz alfa plazmidlerinin agaroz jel görüntüsü M: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD), 1-8 kuyucuklar: pADH2SNT5Dornaz alfa (NEB5α), *Analizlere devam edilen pADH2SNT5Dornaz alfa plazmidi

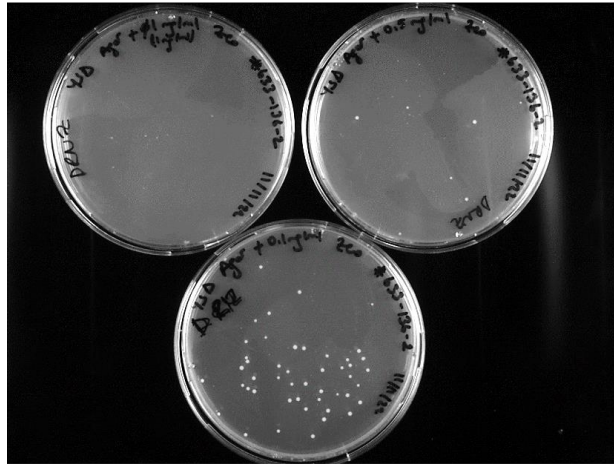
4.4. Doğrulan Ekspresyon Vektörünün Yetenekli *P. pastoris*'e Transformasyonu

Doğrulan pADH2SNT5 α Dornaz alfa #3 ekspresyon vektörü promotör bölgesi içerisinde kesen *PvuII* restriksiyon enzimi ile lineer hale getirilmiş ve %1'lik agaroz jel üzerinde beklenen lineer fragment 4419 bp doğrulandıktan sonra PCR pürifikasyonu ile saflaştırması yapılarak transformasyona hazır hale getirilmiştir. Şekil 4.6'da *PvuII* ile lineer edilen pADH2SNT5 α Dornaz alfa ekspresyon kasetinin agaroz jel görüntüsü verilmiştir.



Şekil 4.6. *PvuII* restriksiyon enzimiyle lineer edilen pSNT5 α Dornaz alfa ekspresyon vektörünün agaroz jel görüntüsü M: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD)

Lineer edilen pADH2SNT5Dornaz alfa ekspresyon vektörüne saflaştırılma işlemi yapıldıktan sonra yetenekli *P. pastoris* MK115(PDI) hücrelerine transformasyonu elektro transformasyon yöntemi ile yapılmıştır. Transformasyondan sonra hücreler farklı zeosin miktarı içeren (100 μ g/mL, 500 μ g/mL ve 1000 μ g/mL) YPD plakalara yayılarak, 3 gün boyunca 28 °C sıcaklıkta inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon sonucunda 1000 μ g/mL zeosin konsantrasyonlu plakada gelişim gözlenmemiş, 500 μ g/mL zeosin konsantrasyonlu plakada 12 koloni ve 100 μ g/mL zeosin konsantrasyonlu plakada ise 51 koloninin gelişimi gözlenmiştir. Şekil 4.7'de farklı zeosin konsantrasyonlu seçim ortamında gelişen transformant *P. pastoris* MK115(PDI) hücrelerinin gelişim plaka görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.7. Farklı zeosin konsantrasyonlu seçim ortamında gelişen transformant *P. pastoris* MK115(PDI) hücrelerinin plaka görüntüleri

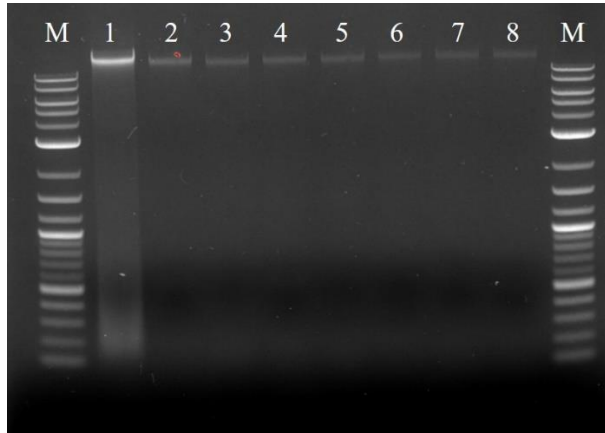
Yüksek zeosin konsantrasyonlu plakadan başlayarak gelişen koloniler seçilmiş ve teke düşürme çizimi yapılmıştır. Teke düşen koloniler daha sonrasında YPD sıvı besiyerine ekilmiş, 225 rpm karıştırma hızında 28 °C sıcaklıkta gece boyu gelişmeye bırakılmıştır. Gelişen transformant hücrelerden stok kültür hazırlanmıştır. Şekil 4.8’de zeosinli agar plakadan seçilen transformant hücreler öze yardımıyla alınarak YPD agar besiyerine teke düşürme çizimi sonucu oluşan kolonilerin plaka görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.8. Zeosinli agar plakadan seçilen transformant hücrelerin YPD agar besiyerine teke düşürme çizimi sonucu oluşan kolonilerin plaka görüntüleri

4.5. Genomik DNA İzolasyonu

YPD agarda geliştirilen transformantlardan 3 ml YPD sıvı besiyerine ekim yapılmış ve çalkalamalı inkübatörde gece boyu geliştirilmiştir. Gelişen transformant hücrelerden genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Konsantrasyonları ölçüldükten sonra agaroz jel üzerindeki her bir kuyucuğa 5 µl olacak şekilde DNA yüklenmiş ve %1 agaroz jelde koşturularak kontrol edilmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. İzole edilen genomik DNA’ların agaroz jel kontrolü M: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD), 1-8 arası sütunlar transformant hücrelerden izole edilen genomik DNA’lar

4.6. Gen Kopya Sayısının Belirlenmesi

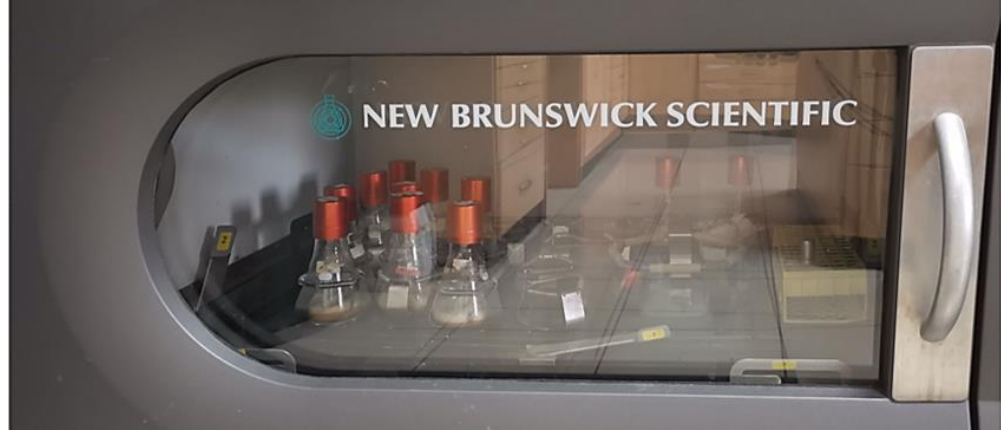
Rekombinant *P. pastoris* pADH2SNT5Dornaz alfa MK115(PDI) klonlarından izole edilen genomik DNA'lar gerçek zamanlı PZR analizi ile gen kopya sayıları belirlenmiştir. Gerçek zamanlı PZR analizi sonucunda taranan klonların gen kopya sayıları Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR Software programı üzerinde hesaplanan veriler hedef gene referans genine oranı şeklinde verilmiştir. Verilerin sonucuna göre; kalibratör suş 4 kopya olarak gösterilmiş olup, bu değer örneklerden çıkarılarak gen kopya sayısı bulunmuştur. Buna göre elde edilen klonların gen kopya sayıları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Transformasyon sonucu elde edilen klonların RT-PZR analizi ile belirlenen gen kopya sayıları

Transformasyon Sonucu Elde Edilen Klonlar	Kopya Sayısı
pADH2SNT5Dornaz alfa #1 (MK115PDI)	3 kopya
pADH2SNT5Dornaz alfa #2 (MK115PDI)	6 kopya
pADH2SNT5Dornaz alfa #3 (MK115PDI)	6 kopya
pADH2SNT5Dornaz alfa #4 (MK115PDI)	11 kopya
pADH2SNT5Dornaz alfa #5 (MK115PDI)	5 kopya
pADH2SNT5Dornaz alfa #6 (MK115PDI)	2 kopya
pADH2SNT5Dornaz alfa #7 (MK115PDI)	4 kopya
pADH2SNT5Dornaz alfa #8 (MK115PDI)	4 kopya
pADH2SNT5Dornaz alfa #9 (MK115PDI)	1 kopya
pADH2SNT5Dornaz alfa #10 (MK115PDI)	1 kopya

4.7. Seçilen Transformantların Erlenmayer Ölçeğinde Dornaz Alfa Ekspresyonu

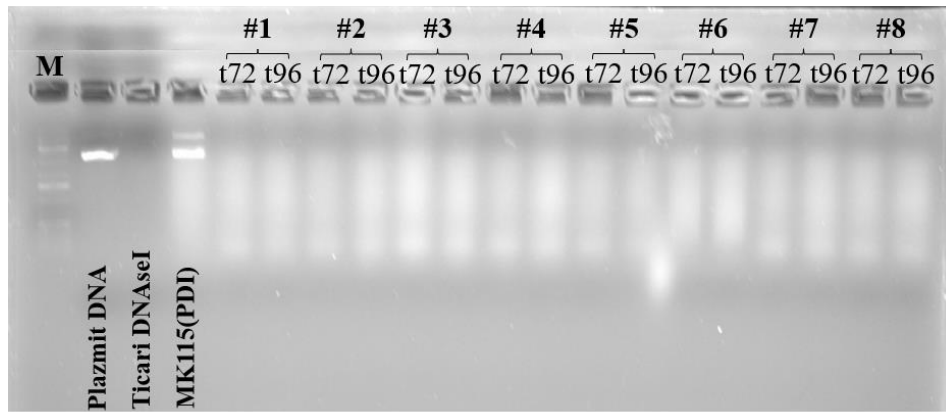
Erlenmayer ölçeğinde Dornaz alfa ekspresyonu için seçilen transformantlar YPD sıvı besiyerine ekilmiş ve 225 rpm, 28 °C'de gece boyu geliştirilmiştir. Gelişen hücrelerin BMGY (pH 6.0) besiyerine başlangıç OD₆₀₀'si 0.1 olacak şekilde ekimi gerçekleştirilmiş ve gece boyunca 28 °C ve 225 rpm'de inkübasyona bırakılarak hücrelerin gelişmesi sağlanmıştır. BMGY besiyerinde yaklaşık 13 OD olan hücreler BMEY (pH6.0) besiyerine geçirilmiş ve aynı sıcaklık ve karıştırma koşullarında 96 saat boyunca inkübasyona devam edilerek Dornaz alfa ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Dornaz alfa ekspresyonu *ADH2SNT5* promotörü kontrolünde gerçekleştiği için indükleme süresi boyunca örnekler on iki saatte bir toplam besiyeri miktarının %1'i olacak şekilde etanol eklemesi yapılmıştır. Ekspresyonun 72. ve 96. saatlerinde örnek alınarak enzim aktivitesi, SDS-PAGE ve Western blot analizleri yapılmıştır. Şekil 4.10'da engelli erlenmayerde Dornaz alfa enzim ekspresyonunun gerçekleştiği çalkalamalı inkübatör verilmiştir.



Şekil 4.10. Engelli erlenmayerde Dornaz alfa enzimi ekspresyonunun gerçekleştiği çalkalamalı inkübatör

4.8. Erlenmayer Ölçeğinde Ekspresyonu Gerçekleşen Dornaz Alfa Enziminin Aktivite Analizi

Enzim aktivitesinin belirlenmesi için reaksiyon tüpü içerisine konsantrasyonu bilinen 500 ng plazmid DNA'sının üzerine Dornaz alfa üretim süpernatant örnekleri eklenmiş ve DNA'nın parçalanma oranına görsel olarak bakılarak belirlenmiştir. Aktivitesinin karşılaştırılabilmesi için ticari sığır DNaseI enzimiyle üretici firma talimatına göre aynı şekilde reaksiyon kurulmuştur. Enzim aktivitesi belirlenirken agaroz jele sırasıyla 72. ve 96. saat süpernatant örnekleriyle gerçekleştirilen reaksiyon karışımı yüklenerek agaroz jel görüntüsü sonucu görsel yorumlama yapılmıştır (Şekil 4.11). Şekil 4.11'e bakıldığında *P. pastoris* MK115(PDI) konak hücrenin süpernatantının plazmid DNA'sını parçalamadığı görülmüşken tüm klonlarda hem 72 hem 96. saat süpernatant örneklerinde ortamdaki plazmid DNA'sının parçalandığı görülmüş dolayısıyla enzim üretiminin gerçekleştiği gözlemlenmiştir.

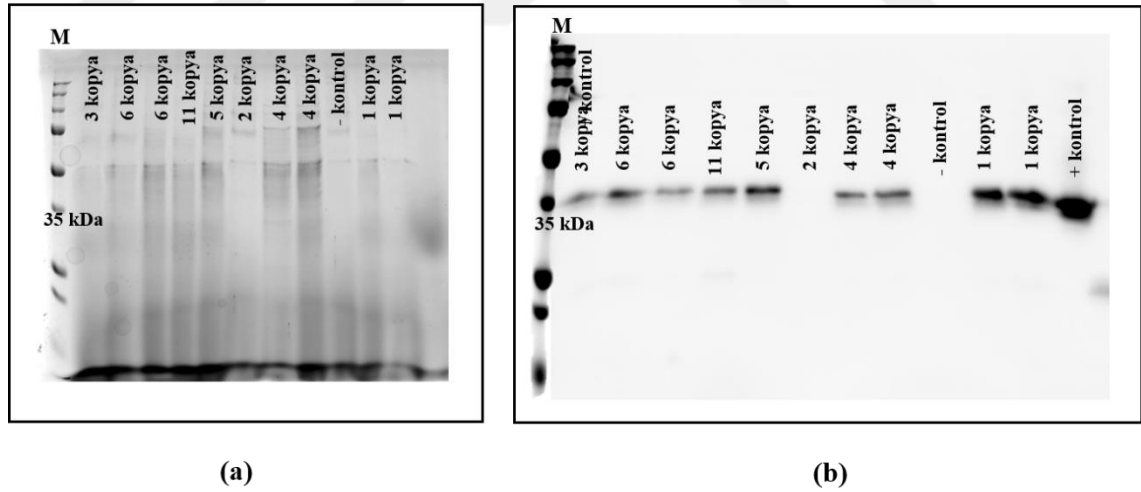


Şekil 4.11. Süpernatant örnekleriyle gerçekleştirilen enzim aktivitesinin agaroz jel doğrulaması M: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD)

4.9. SDS-PAGE ve Western Blot Analizleriyle Protein Üretiminin Tespit Edilmesi

Farklı gen kopya sayısında Dornaz alfa içerdiği bilinen transformant klonların erlenmayer ölçeğinde gerçekleştirilen Dornaz alfa ekspresyonunda 72. ve 96. saatlerinde alınan örnekler SDS-PAGE ve Western Blot analizleri yapılmıştır. Poliakrilamid jel elektroforezinde beklenen 29,3 kDa moleküler kütlede olan Dornaz alfa enzimine ait protein bandı marker'a göre hizalama yapılmış ve yaklaşık 30 kDa hizasında gözlenerek doğrulanmıştır.

Dornaz alfa, aminoasit profilinde iki bölgede potansiyel glikozile olduğundan dolayı PVDF membran üzerinde 29.3 kDa olan moleküler kütlede daha yüksek moleküler ağırlıkta olan bir bant olarak görülmüştür (Şekil 4.12-b). Erlenmayer ölçeğinde gerçekleştirilen üretim süpernatantlarında yapılan SDS-PAGE ve Western blot sonuçlarına göre gen kopya sayısı ile protein üretim miktarı arasında doğrusal bir orantı olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.12-a). Membran üzerindeki görüntüye bakıldığında (şekil 4.12-b) 9 numaralı kuyucukta boş konak hücre bulunmakta olup bant yansıması vermemesinden dolayı üretim olmadığı doğrulanmıştır. Seçilen klonlar arasında sadece 6 numaralı klonda protein üretimi gözlemlenmemişken, 10 ve 11 numaralı kuyucukta yansıma veren 1 kopya gen içeren klonların, yüksek kopya gen içeren klonlara göre bant yoğunlukları açısından değerlendirildiğinde daha yüksek miktarda protein üretimi gerçekleştirdiği tespit edilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde 1 kopya gen içeren pADH2SNT5Dornaz alfa #10 numaralı klon ile fermentör ölçeğinde üretim için aday klon olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.12. (a) Erlenmayer ölçeğinde gerçekleşen üretimden alınan süpernatant örneklerindeki protein üretim veriminin poliakrilamid SDS-PAGE jel görüntüsü; **(b)** Erlenmayer ölçeğinde gerçekleşen üretimden alınan süpernatant örneklerindeki protein üretim veriminin western blot görüntüsü M: Precision Plus Protein All Blue Prestained Protein Standardı (Bio-Rad, ABD)

4.10. Erlenmayer Ölçeğinde Yapılan Üretimlerde Dornaz Alfa Manuel Saflaştırılması ve Toplam Protein Miktarının Belirlenmesi

Erlenmayer ölçeğinde üretim miktarının az olması sebebiyle süpernatant örneklerinden Dornaz alfa'yı ayırabilmek için manuel yöntemle Histag saflaştırması yapılmıştır. Enzim aktivitesi sonuçlarına göre (Şekil 4.11) protein ekspresyonunu gerçekleştirdiğini bildiğimiz toplam 50 ml süpernatant örneğiyle saflaştırma işlemi yapılmıştır. Saflaştırma sonucu örnekler SDS-PAGE ve western blot ile analiz edilmiş, jel ve membran görüntüleri Şekil 4.13'te verilmiştir.

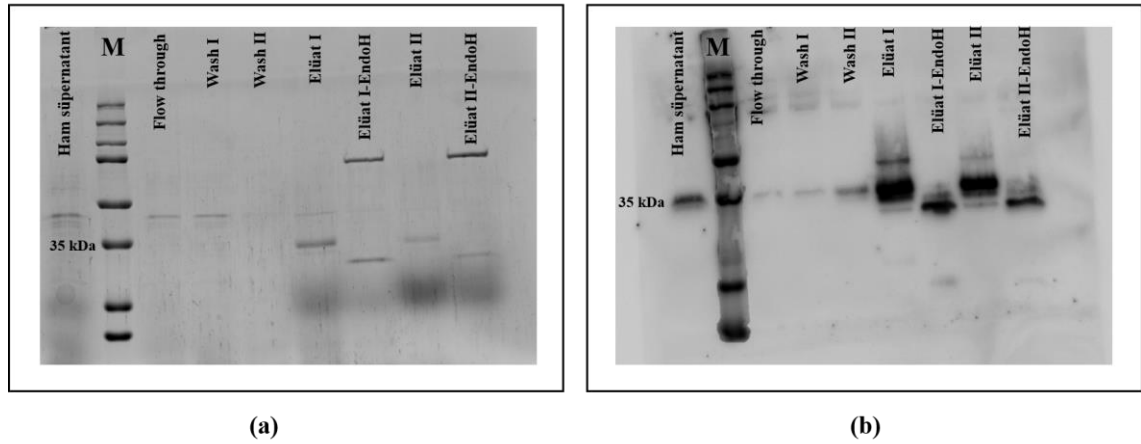
Saflaştırma sonrasında Şekil 4.13'e bakıldığında ham süpernatant örneğinin yüklendiği 1 numaralı kuyucukta Dornaz alfa protein bandı dışında başka bantların da varlığı görülmüştür. Oluşan bu diğer bantlardan Dornaz alfa'yı saflaştırmak amacıyla histag pürifikasyonu yapılmış ve aynı görüntü üzerinde flow through ve wash kuyucuklarına bakıldığında spesifik olmayan bağlanmaların uzaklaştırıldığı ve elüsyon kuyucuklarında Dornaz alfa enziminin geri kazanıldığı görülmüştür. Yine aynı şekilde western blot sonucuna bakıldığında flow through ve wash kuyucuklarında Dornaz alfa enziminin beklenen hızda yansıma verdiği görülmüş olup bu durum, saflaştırmada kayıp yaşandığını göstermektedir.

Histag saflaştırmasından sonra elde edilen elüsyon örneğinde toplam protein miktarı ticari Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit protokolüne uygun şekilde belirlenmiştir. Kit içerisinde bulunan protein standardı olarak sığır serum albümini (BSA) standardı ve süpernatant örnekleri 595 nm dalga boyunda absorbanları okunmuştur. Analiz sonunda standart okumalarıyla elde edilen eğri ve denklem Ek-3'te verilmiştir. Elde edilen formül üzerinde absorban değerleri girilerek örneğin toplam protein miktarı hesaplaması yapılmıştır. Manüel saflaştırma sonunda elde edilen elüsyon örneğinin absorban değeri eğri üzerinde yerine konularak toplam protein miktarı 159,9167 µg/mL olarak hesaplanmıştır.

4.11. EndoH_f ile Deglikozilasyon Analizi

Dornaz alfa geni üzerindeki 18 ve 106. aminositlerde (Asn¹⁸ ve Asn¹⁰⁶) gerçekleşen iki potansiyel N-bağlı glikozilasyon bölgesinin glikolize olmayan rekombinant proteinin molekül ağırlığının doğrulanabilmesi için protein denatüre edildikten sonra Endo H_f enzimi ile muamele edilmiştir. Endo H_f muamelesi sonucu örnekler SDS-PAGE ve Western Blot analizleri yapılarak glikozilasyonun tespiti gerçekleştirilmiştir.

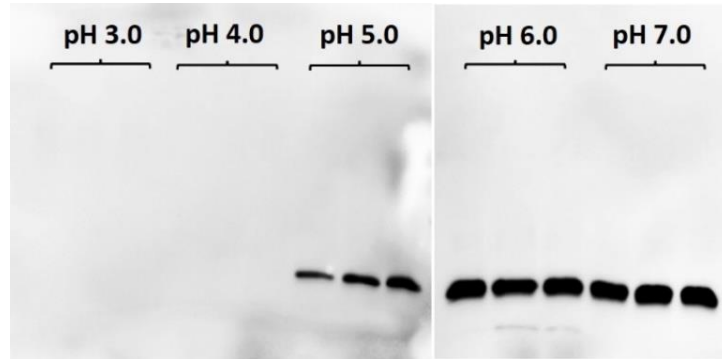
Beklenildiği gibi poliakrilamid elektroforez jeli ve membran üzerinde, ekspresyonu sırasında glikolize olan Dornaz alfa proteininin 29.3 kDa moleküler kütesinden daha yüksek moleküler ağırlıkta olan bir bant verdiği görülmüştür. Ancak, glikozilasyon bölgeleri Endo H_f ile uzaklaştırıldığı ve Dornaz alfa proteini, markör standardına göre 30 kDa moleküler ağırlık hizasında olan bir bant olarak görüldüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. (a) Deglikozile elüsyon örneğinin poliakrilamid jel üzerindeki görüntüsü; **(b)** Deglikozile elüat örneğinin membran üzerindeki görüntüsü M: Precision Plus Protein All Blue Prestained Protein Standardı (Bio-Rad, ABD)

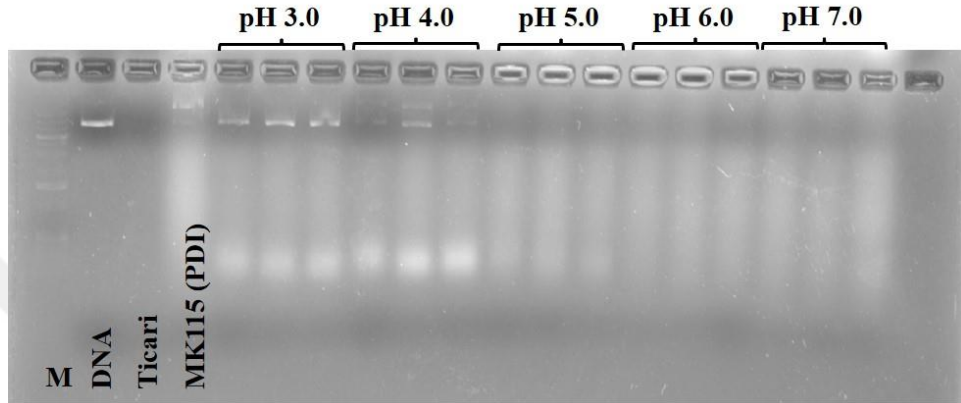
4.12. Sıcaklık ve pH Optimizasyonu Deneyleri

Standart *P. pastoris* protein ekspresyonu şartlarında (28 °C ve pH 6.0) gerçekleştirilen Dornaz alfa enziminin ekspresyonunun yüksek verimde gerçekleştiği şartları belirlemek amacıyla sıcaklık ve pH optimizasyonu yapılmıştır. Genomunda 1 kopya Dornaz alfa geni bulunduran ve enzim üretimini gerçekleştirdiğini bildiğimiz klon ile üçer paralel olacak şekilde 3, 4, 5, 6, 7 pH'larda hazırlanmış BMEY besiyerinde 28 °C üretim yapılarak optimum pH belirlenmiştir. Sonuçlar Western Blot analiziyle (Şekil 4.14) değerlendirildiğinde pH 3.0 ve pH 4.0 üretimlerinde Dornaz alfa ekspresyonu gerçekleşmediği görülmüştür. Dornaz alfa ekspresyonunun pH 5.0, pH 6.0 ve pH 7.0'de gerçekleştiği görülmüş olup bu değerler kendi içinde karşılaştırıldığında pH 5.0'te ekspresyon miktarının nispeten daha düşük, pH 6.0'da ise beklenen protein bandından daha aşağıda da yansıma vermesinden dolayı degradasyon olduğu görülmüştür. Dolayısıyla aynı klon kullanılarak farklı pH değerlerinde gerçekleştirilen Dornaz alfa ekspresyonunda en uygun besiyeri ortam pH değeri 7.0 olarak belirlenmiştir.



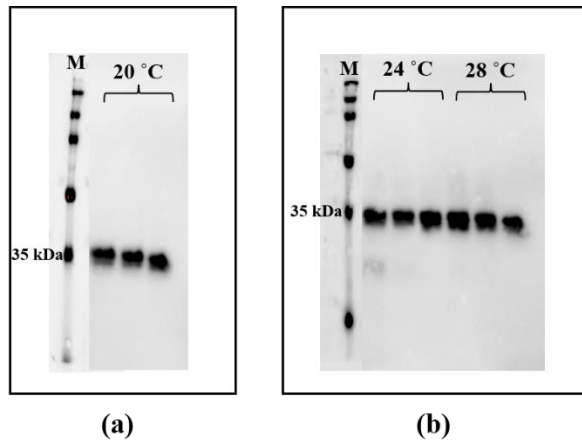
Şekil 4.14. Farklı besiyeri ortam pH'larında ekspresyonu gerçekleşen Dornaz alfa örneklerinin Western blot membran görüntüsü

Farklı ortam pH'larında ekspresyonu gerçekleşen Dornaz alfa enziminin üretim miktarlarına göre en uygun pH değeri 7.0 olarak bulunmuş ancak bununla birlikte enzim aktivitesinin olup olmadığı da tespit edilmiştir. Beklenildiği üzere enzim aktivitesinin de en yüksek olduğu ortam pH 7,0 olarak belirlenmiştir. Şekil 4.15'te 3, 4, 5, 6 ve 7 ortam pH'larında ekspresyonu gerçekleşen Dornaz alfa enziminin aktivite analiz sonucu agaroz jel görüntüsü verilmiş olup 3 ve 4 pH değerli besiyeri ortamında enzim üretimi görülmediği ortamda bulunan DNA'ların parçalanmamasından anlaşılmaktadır. Western blot (Şekil 4.14) ve enzim aktivitesi sonuçlarına (Şekil 4.15)'e göre enzimin üretim ortam pH değerinin 7 olmasına karar verilmiştir.



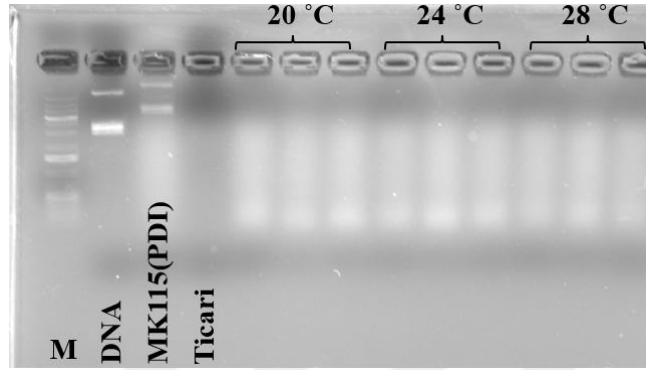
Şekil 4.15. Farklı ortam pH'larında 96. saat süpernatant örnekleriyle gerçekleştirilen enzim aktivitesinin agaroz jel doğrulaması M: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD)

Dornaz alfa enzim ekspresyonunun yüksek verimde gerçekleştiği optimum pH 7.0 olarak belirlendikten sonra üretim miktarına ortam sıcaklığının etkisini incelemek amacıyla üç farklı (20, 24 ve 28 °C) sıcaklıkta üçer paralelli olarak üretimler yapılmıştır. Ekspresyon sonucu süpernatant örnekleri ile Western Blot analizi yapılmıştır (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. (a) 20 °C ortam sıcaklığı süpernatant örneklerinin Western blot membran görüntüsü; **(b)** 24 °C ve 28 °C ortam sıcaklığında süpernatant örneklerinin Western blot membran görüntüsü M: Precision Plus Protein All Blue Prestained Protein Standardı (Bio-Rad, ABD)

Western Blot analizi sonucunda üretim ortamının 20 °C, 24°C ve 28°C sıcaklığında olduğu koşullarda gerçekleşen protein konsantrasyonu ve konsantrasyon değişimi karşılaştırılmasında tüm sıcaklıklarda üretimin gerçekleştiği görülmüştür. Bu sonuçla birlikte farklı sıcaklıklardaki süpernatant örnekleriyle enzim aktivitesi analizi gerçekleştirilerek agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Farklı ortam sıcaklıklarında pH 7.0’de gerçekleşen üretim süpernatant örnekleriyle gerçekleştirilen enzim aktivitesinin agaroz jel doğrulaması M: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD)

Üretim koşullarının, 20 °C, 24 °C, 28 °C ve pH 7.0’de gerçekleşen süpernatant örneklerine enzim aktivitesi analizi sonucu enzim aktivitesi bakımından da üretim sıcaklıklarının hepsinde enzim ekspresyonunun gerçekleştiği görülmüştür. Bu durumda ortalama sıcaklık olan 24 °C optimum sıcaklık olarak belirlenmiştir.

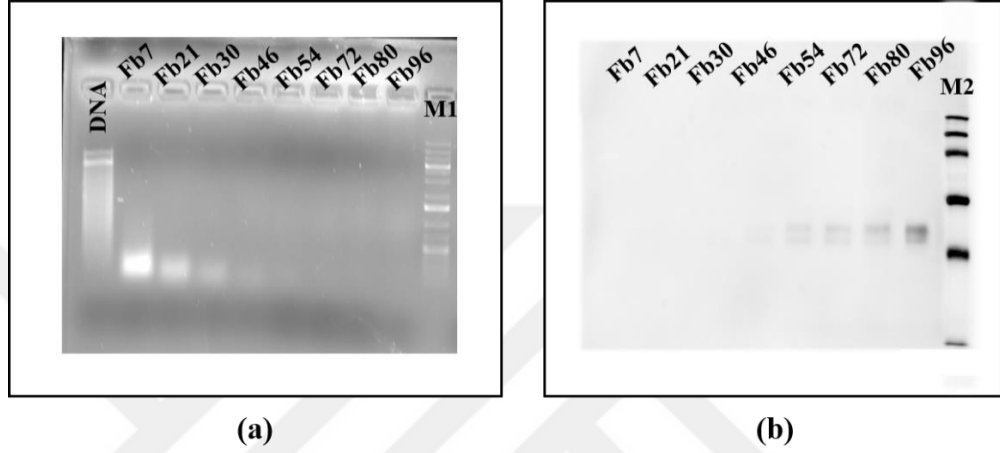
4.13. Fermentör Üretimleri

Çalışma kapsamında Dornaz alfa enziminin en yüksek verimde üretimi amaçlandığı için erlenmayer ölçeğinde ekspresyon çalışmaları sonucu optimum sıcaklık ve pH değerleri belirlenmiştir. Bu sıcaklık ve pH değerlerinde yapılan fermentör üretimlerinde üretimin artırılabilmesi amacıyla iki farklı besiyerinde üretim yapılmış ve üretim miktarları karşılaştırılmıştır. Bu amaçla genomunda tek kopya Dornaz alfa gen kasedi içeren pADH2SNT5Dornaz alfa #10 (MK115(PDI)) klonu kullanılarak 24 °C sıcaklıkta ve pH 7.0 değerinde enzim üretimi için FM22 ve BMGY (gliserol-kompleks) besiyerlerinde üretimler gerçekleştirilmiş ve sonuçları aşağıda verilmiştir.

4.13.1. FM22 besiyeri fermentör ölçeğinde Dornaz alfa ekspresyonu

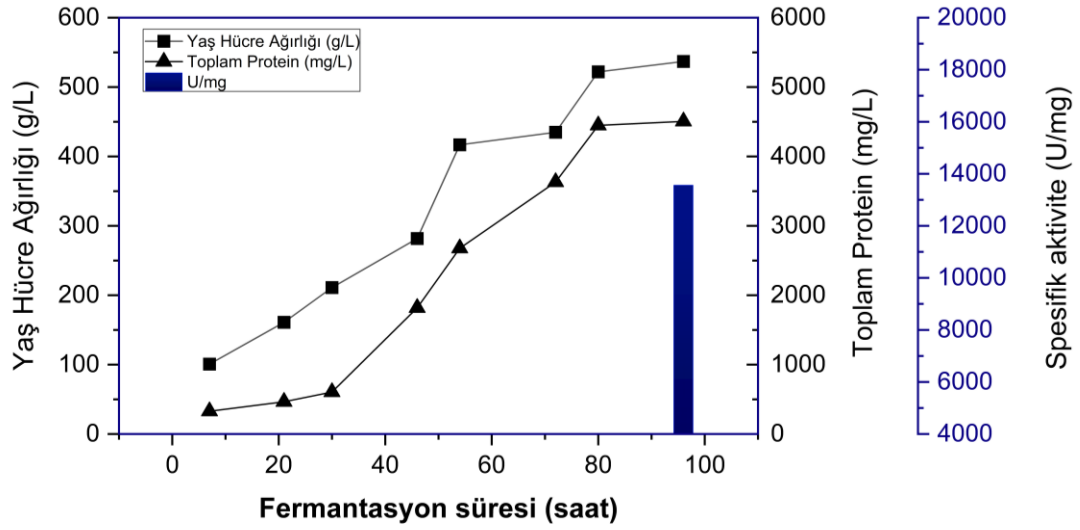
Fermentör çalışmalarında besiyeri olarak % 4 oranında gliserol içeren ve PTM4 tuzu ilave edilmiş *P. pastoris* için genel tanımlı FM22 ortamına, ortam koşulları hava 2 vvm, 28 °C ve pH 5.0’e ayarlanarak inokülasyon yapılmış ve kesikli faz başlatılmıştır. İnokulum öncesi çözünmüş oksijen seviyesi (ÇO) % 100 iken hücre yoğunluğunun artmasıyla ÇO lineer olarak azalmış ve ÇO set değeri % 20’e ayarlanarak DO probu ile kontrolü sağlanmıştır. Hücreler ortamdaki gliserolü tüketene kadar geliştiğinde ÇO seviyesinde ani bir artış gözlenmiş (ÇO spike) ve kesikli faz sonlandırılmıştır.

ÇO spike'tan sonra fermentasyonun ikinci aşaması olan besleme fazına geçilmiştir. Bu aşamada fermentasyon ortamı; hava 2 vvm, 24 °C, pH 7.0 ve karıştırma hızı 900 rpm olacak şekilde ayarlanmıştır. Fermentasyon boyunca 7, 21, 30, 46, 54, 72, 80 ve 96. saatlerde süpernatant örnekleri alınmıştır. Süpernatant örneklerine enzim aktivitesi ve Western-Blot analizi yapılarak sonuçlar görsel olarak yorumlanmıştır (Şekil 4.18-a,b). Enzim aktivitesi sonucu aktivitenin fermentasyon boyunca arttığı görsel olarak gözlenmiştir. Western blot analizi sonucuna bakıldığında beklenen bant yoğunluğunun artması ile fermentasyon süresi boyunca Dornaz alfa ekspresyonunda protein miktarında artış olduğu gözlenmiştir.



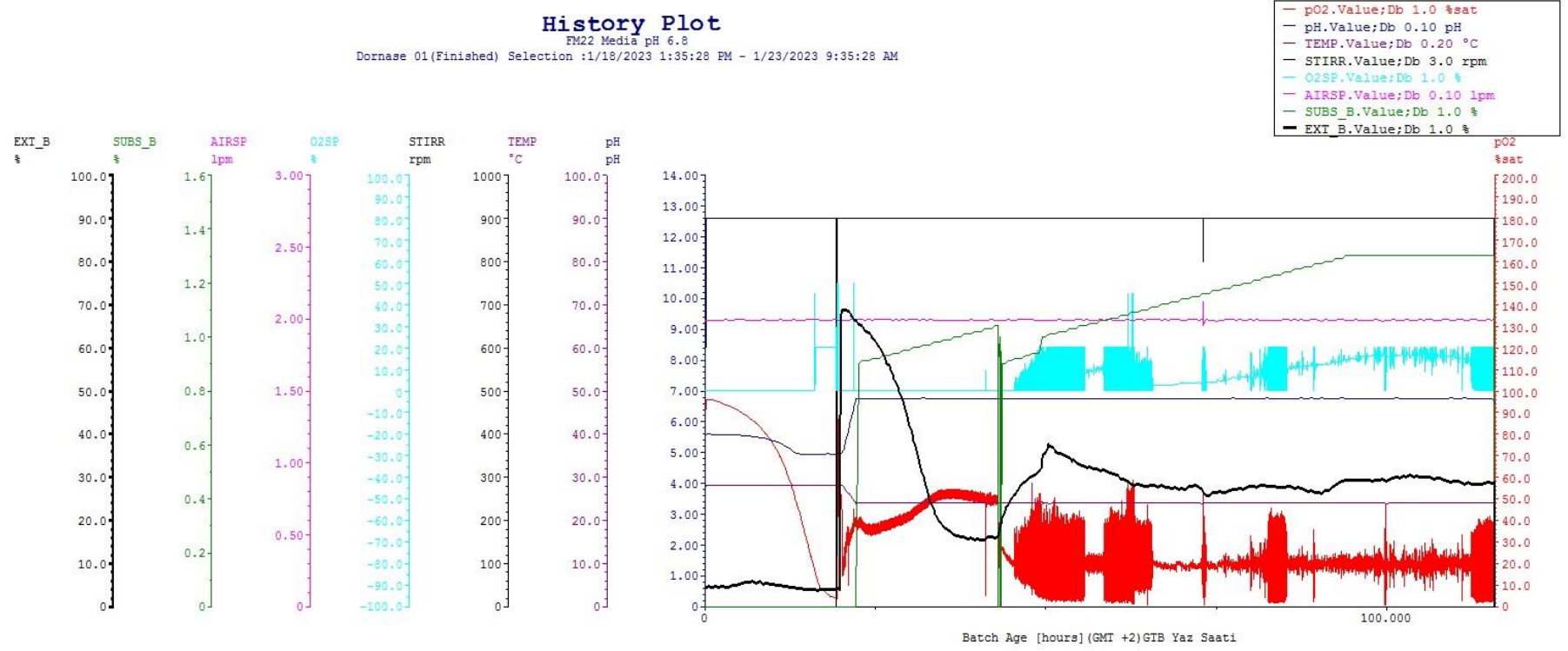
Şekil 4.18. (a) Fermentasyon süpernatant örnekleriyle gerçekleştirilen enzim aktivitesinin agaroz jel görüntüsü; **(b)** Fermentasyon süpernatant örneklerinin Western Blot analiz sonucu, M1: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, ABD), M2: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, ABD)

Doksan altı saat boyunca süren fermentasyonda günde 2 kez olacak şekilde alınan süpernatant örneklerinde yaş hücre ağırlığı, toplam protein miktarı ve hasat örneğinde spesifik enzim aktivitesi analizleri yapılmıştır (Şekil 4.19). Süpernatant örneklerinin toplam protein ölçümü ve absorban okumaları EK-4'te verilmiştir. Veriler analiz edildiğinde hücre ağırlığı 100.76 g/L değerinden 536.85 g/L değerine ulaşarak artış gözlemlenmiştir. Fermentasyon başlangıcında toplam protein 34.75 mg/L iken fermentasyon sonunda toplam protein 4505.83 mg/L'e kadar yükselmiştir. Hasat süpernatant örneğinde Dornaz alfa'nın spesifik aktivite ölçümü yapılmış ve hesaplamalar sonucu spesifik aktivitesi 13559.32 U/mg bulunmuştur. Fermentasyonlar sonucu elde edilen pellet ağırlıkları ve yaş hücre ağırlığı hesaplama sonuçları EK-5'te verilmiştir.



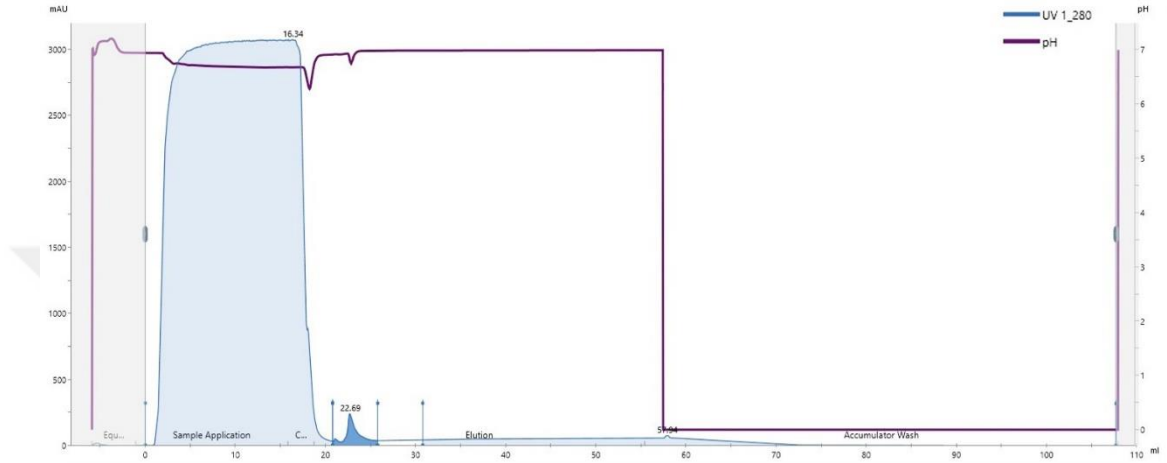
Şekil 4.19. FM22 besiyerinde gerçekleşen fermantasyona ait zamana bağlı alınan örneklerde yaş hücre ağırlığı, toplam protein miktarı ve hasat örneğindeki spesifik enzim aktivite sonuçları

Fermantasyon koşullarının kontrolü amacıyla etanol probu (Raven Biotech Inc Kanada (kontrol aralığı % 0.1-1.0 etanol), fermantasyon kontrol paneli tarafından izlenebilen beslenen substrat miktarı, CO₂ & O₂ çıkışı (BioPat Xgas Analyser (Sartorius Stedim, Almanya (kontrol aralığı %1-50 O₂ %0-10 CO₂)), çözünmüş oksijen (ÇO%) probu (Oxyferm FDA VP 120 Hamilton İsviçre (kontrol aralığı % 0- 100))), fermantasyon kontrol paneli tarafından izlenebilen karıştırma hızı (kontrol aralığı 0-900 rpm), sıcaklık sensörü (kontrol aralığı 0-80 °C), pH & Redoks probu (Easyferm FDA VP 120 Hamilton İsviçre (kontrol aralığı 0- 14)), Çözünmüş O₂ OxyFern FDA VP 120 (Hamilton, İsviçre kontrol aralığı (% 0-100)) tarafından FM22 besiyerinde tamamlanan fermentasyon boyunca takibi sağlanan parametrelerin sistem verilerini içeren grafiği Şekil 4.20’de verilmiştir.



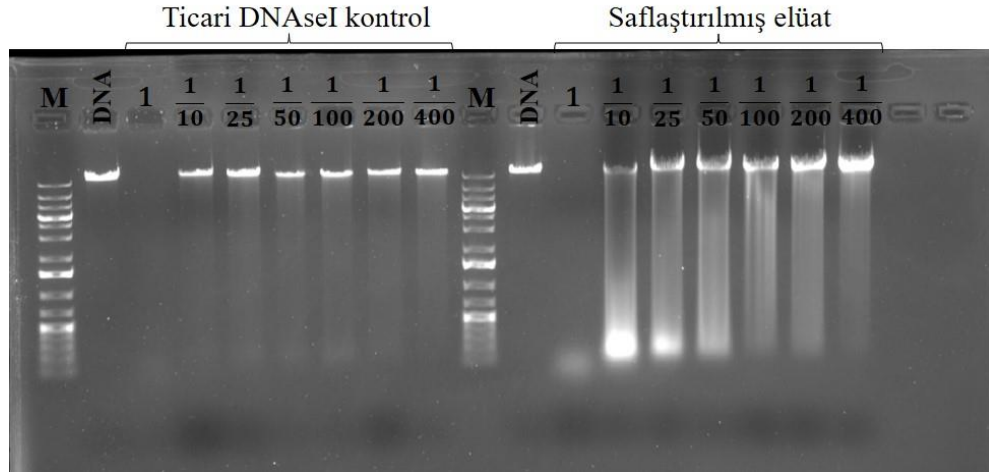
Şekil 4.20. *P. pastoris* için genel tanımlı FM22 besiyerinde yapılan fermentasyona ait kontrol parametreleri grafiği

Fermantasyonun 96. saat süpernatantı ÄKTA avant™ 150 (Cytiva, Almanya) cihazı kullanılarak FPLC kromatografi prensibine göre saflaştırılmıştır. Şekil 4.21’de FM22 besiyerinde yapılan fermantasyon süpernatantında 6x His etiketli Dornaz alfa proteinine ait saflaştırma prosesi pik görüntüsü verilmiştir. Toplam 15 mL süpernatant kullanılarak saflaştırılmaya başlanmış ve saflaştırma sonucu elüsyon sıvısındaki yüksek konsantrasyonlu imidazolün uzaklaştırılması amacıyla CaCl_2 ‘lü tamponu ile (0.001M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.15M NaCl, pH 6.3) tampon değişikliği yapılmış ve toplam 0.260 mg/mL konsantrasyonunda saf Dornaz alfa elde edilmiştir.



Şekil 4.21. FM22 besiyerinde eksprese edilen 6x His etiketli Dornaz alfa proteini saflaştırma prosesine ait pik görüntüsü

Standart olarak kullanılan ticari sığır DNaseI ve imidazolden arındırılmış elüsyon fazına 10, 25, 50, 100, 200 ve 400 kat oranlarında dilüsyonlar yapılarak enzim aktivite analizi yapılmış ve enzimin çalışabileceği en düşük konsantrasyon belirlenmiştir. Enzim aktivitesi agaroz jel üzerinde kontrol edilmiştir. Şekil 4.22 incelendiğinde elüsyon örneğinin ticari sığır DNaseI enzimi standart alınarak çalışabileceği maksimum dilüsyon oranının belirlenebilmesi için agaroz jel doğrulama analizi verilmiştir. Ticari sığır DNaseI standart enzimin 10-400 kat aralığındaki hiçbir dilüsyonunda enzim aktivitesi gözlemlenmemiştir. Saflaştırılmış elüsyon örneği 10 kat seyreltme sonucunda ortamdaki DNA’ı kısmen parçalayarak aktivite gösterirken, 25-400 kat aralığındaki dilüsyonlarda ise herhangi bir aktivite göstermemiştir.

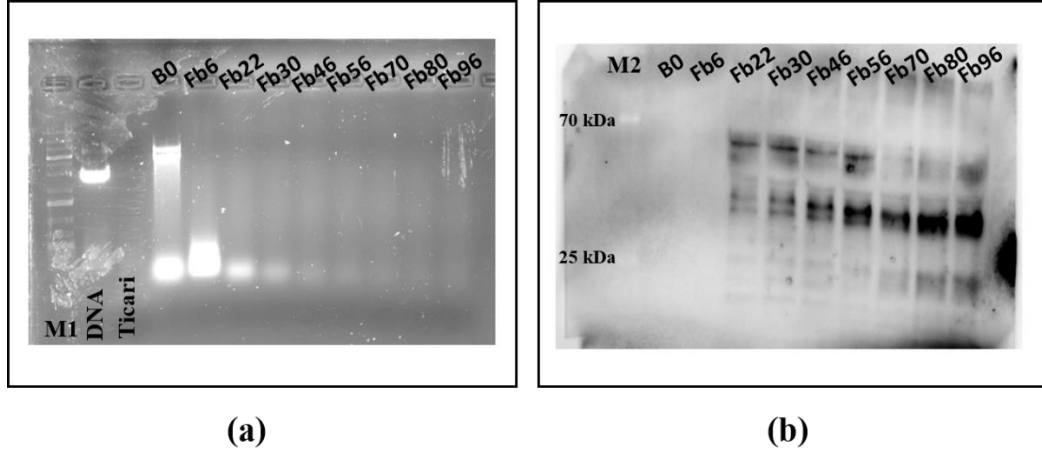


Şekil 4.22. FM22 besiyerinde tamamlanan fermentasyon süpernatant örneğinden saflaştırılan elüat ve ticari sığır DNaseI standardının seri dilüsyonlarından elde edilen enzim aktivitesinin agaroz jel görüntüsü M: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD)

4.13.2. Tamponlu gliserol-kompleks besiyeri fermentör ölçeğinde Dornaz alfa ekspresyonu

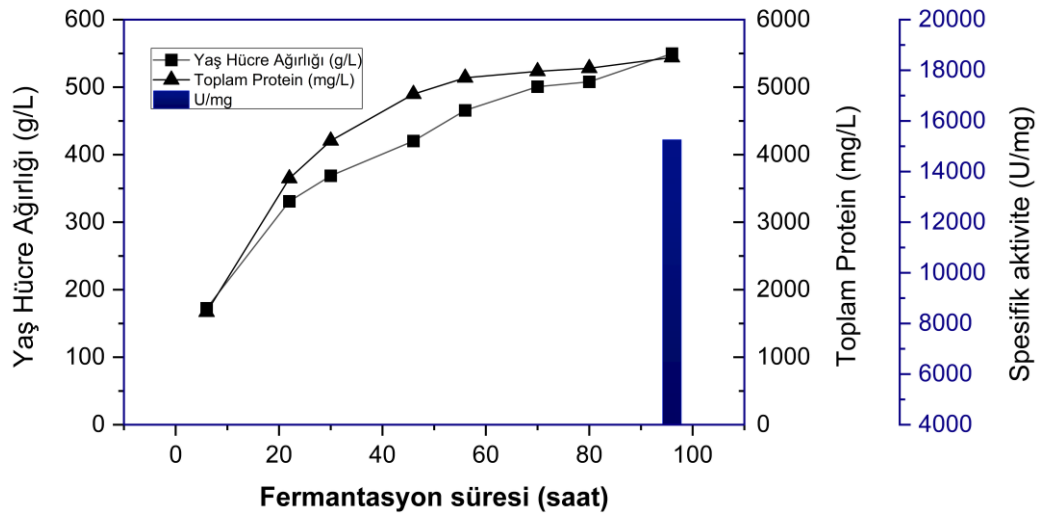
Dornaz alfa üretici pADH2SNT5Dornaz alfa #10 (MK115(PDI) klonunun fermentör üretiminin tamponlu gliserol-kompleks besiyerinde yapılması için besiyeri olarak % 2 gliserol içeren ve PTM4 tuzu ilave edilmiş BMGY besiyeri kullanılmış ve ortam koşulları hava 2 vvm, 28 °C ve pH 6.0'a ayarlanarak inokülasyon yapılmış ve kesikli faz başlatılmıştır. İnokulum öncesi çözünmüş oksijen seviyesi % 100 iken hücre yoğunluğunun artmasıyla ÇO lineer azalmış ve ÇO set değeri % 20'e ayarlanarak ÇO probu ile kontrolü sağlanmıştır. Hücreler ortamdaki gliserolü tüketene kadar geliştiğinde ÇO seviyesinde ani bir artış gözlenmiş ve kesikli faz sonlandırılmıştır.

ÇO spike'den sonra fermentasyonun ikinci aşaması olan besleme fazına geçilmiştir. Bu aşamada fermentasyon ortamı; hava 2 vvm, 24 °C, pH 7.0 ve karıştırma hızı 900 rpm olacak şekilde ayarlanmıştır. Fermentasyon boyunca 0, 6, 22, 30, 46, 56, 70, 80 ve 96. saatlerde süpernatant örnekleri alınmıştır. Süpernatant örneklerine enzim aktivitesi ve Western-Blot analizi yapılarak sonuçlar görsel olarak yorumlanmıştır (Şekil 4.23). Enzim aktivitesi sonucu DNA parçalanma oranı artan fermentasyon zamanı ile orantılı olarak artmış ve bunun sonucunda enzim aktivitesinin de arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.23-a). Fermentasyondan alınan süpernatant örneklerinde proteinin varlığı ve bant yoğunluğunun değerlendirilmesi için Western blot analizi yapılmıştır (Şekil 4.23-b). Western blot analizi sonucuna bakıldığında beklenen bant yoğunluğunun artması ile fermentasyon süresi boyunca Dornaz alfa ekspresyonunda protein miktarında artış olduğu gözlenmiştir.

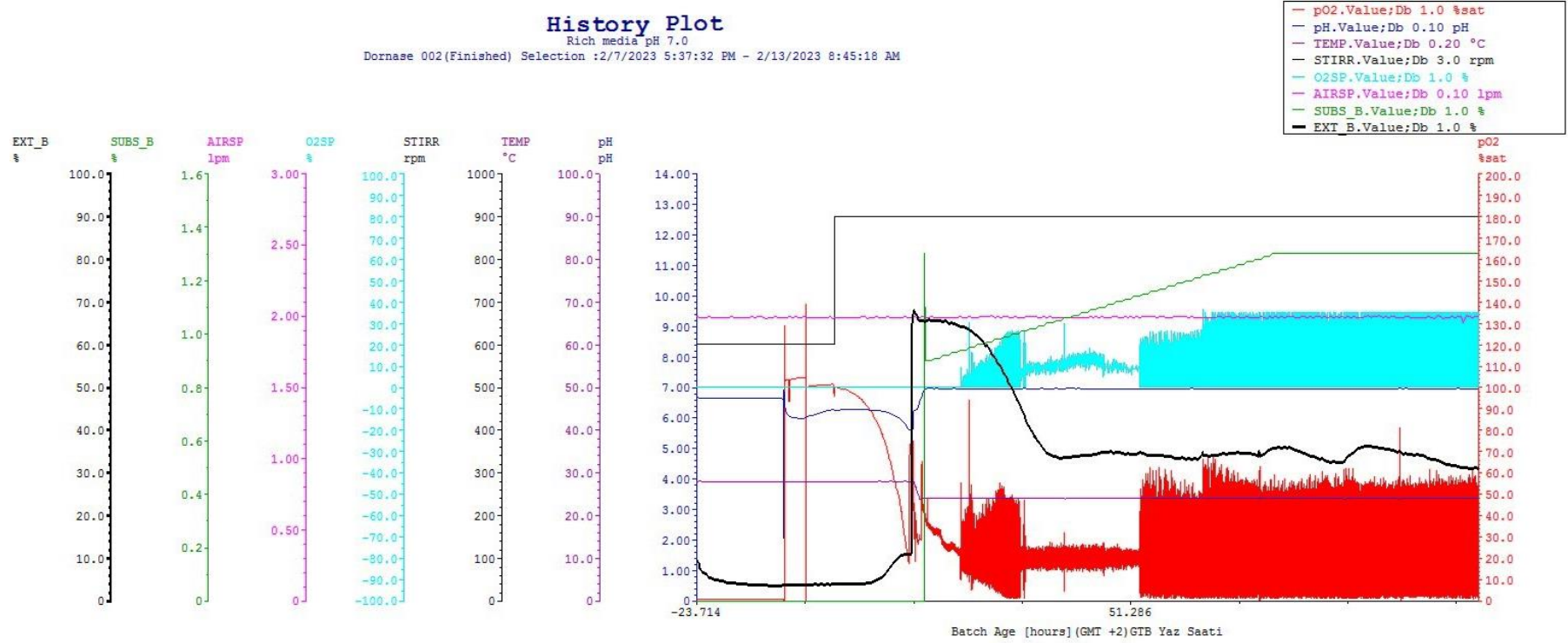


Şekil 4.23. (a) BMGY besiyerinde gerçekleşen fermentasyona ait süpernatant örnekleriyle gerçekleştirilen enzim aktivitesinin agaroz jel görüntüsü; **(b)** BMGY besiyerinde gerçekleşen fermentasyona ait süpernatant örneklerinin Western Blot analiz sonucu M1: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, ABD), M2: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, ABD)

Doksan altı saat boyunca süren fermentasyon üretimlerinde günde 2 kez olacak şekilde alınan süpernatant örneklerinde yaş hücre ağırlığı, toplam protein miktarı ve hasat örneğinde spesifik enzim aktivitesi analizleri yapılmıştır (Şekil 4.24). Süpernatant örneklerinin toplam protein ölçümü ve absorbans okumaları EK-4’te verilmiştir. Veriler analiz edildiğinde yaş hücre ağırlığı 88.05 g/L değerinden 549.70 g/L değerine ulaşarak artış gözlemlenmiştir. Fermentasyon sonunda toplam protein 5439.17 mg/L ‘e kadar yükselmiştir. Hasat süpernatant örneğinde Dornaz alfa’nın spesifik aktivite ölçümü yapılmış ve hesaplamalar sonucu spesifik aktivitesi 15254.23 U/mg bulunmuştur (Şekil 4. 24). BMGY besiyerinde tamamlanan fermentasyon boyunca takibi sağlanan parametrelerin sistem verilerini içeren grafiği Şekil 4.25’te verilmiştir.



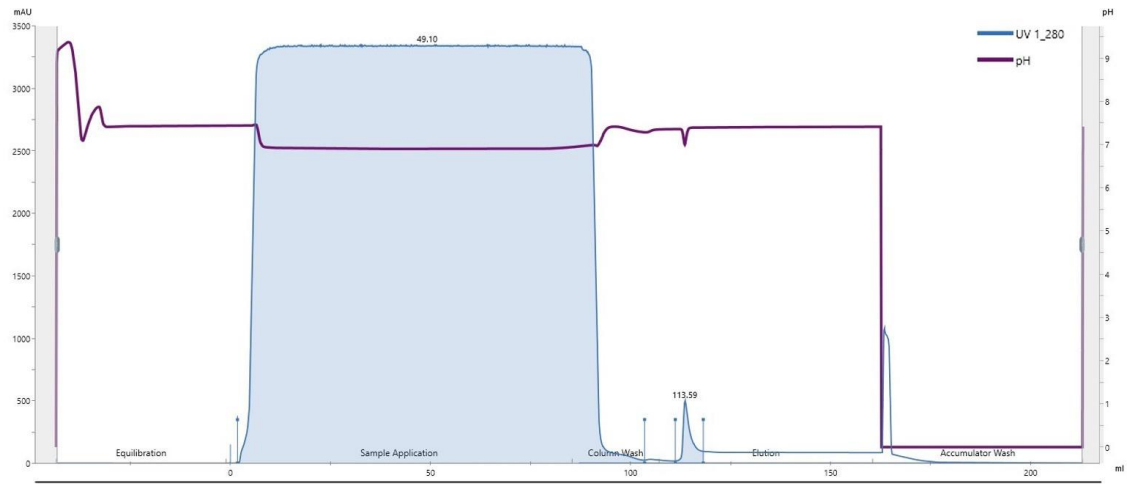
Şekil 4.24. BMGY besiyerinde gerçekleşen fermentasyona ait zamana bağlı alınan örneklerde yaş hücre ağırlığı, toplam protein miktarı ve hasat örneğindeki spesifik enzim aktivite sonuçları



Şekil 4.25. BMGY besiyerinde yapılan fermentasyona ait kontrol parametreleri grafiği

Fermantasyonun 96. saat süpernatantı ÄKTA avantTM 150 (Cytiva, Almanya) cihazı kullanılarak FPLC kromatografi prensibine göre saflaştırılmıştır. Şekil 4.26'da BMGY besiyerinde yapılan fermantasyon süpernatantında 6x His etiketli Dornaz alfa proteinine ait saflaştırma prosesi pik görüntüsü verilmiştir.

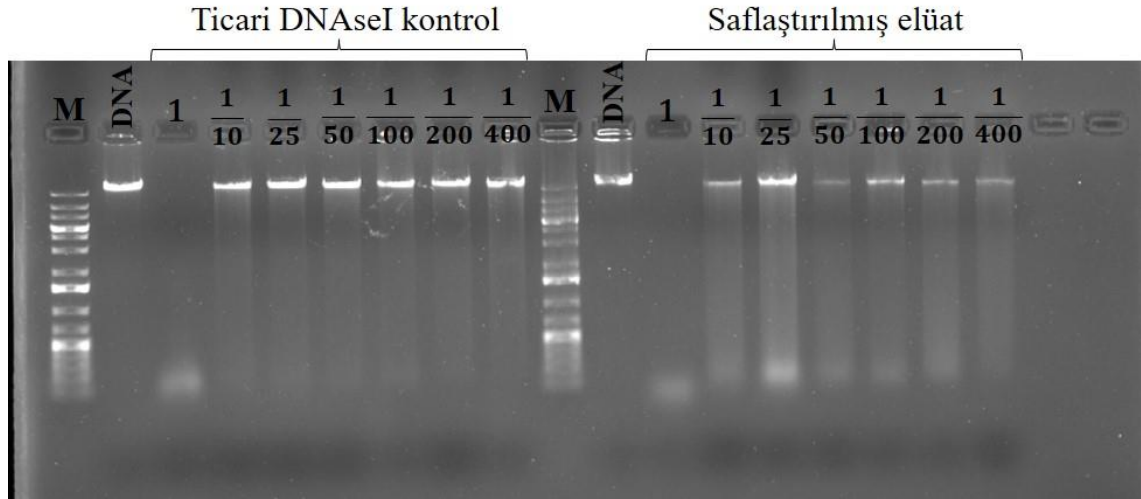
Toplam 35 ml süpernatant kullanılarak saflaştırılmaya başlanmış ve saflaştırma sonucu elüsyon sıvısındaki yüksek konsantrasyonlu imidazolün uzaklaştırılması amacıyla CaCl₂ 'lü tampon ile (0.001M CaCl₂•2H₂O, 0.15M NaCl, pH 6.3) tampon değişikliği yapılmış ve 0.218 mg/mL konsantrasyonunda saf Dornaz alfa elde edilmiştir.



Şekil 4.26. BMGY besiyerinde eksprese edilen 6x His etiketli Dornaz alfa proteini saflaştırma prosesine ait pik görüntüsü

Standart olarak kullanılan ticari sığır DNaseI ve imidazolden arındırılmış elüsyon fazına 10, 25, 50, 100, 200 ve 400 kat oranlarında dilüsyonlar yapılarak enzim aktivite analizi yapılmış ve enzimin çalışabileceği en düşük konsantrasyon belirlenmiştir. Enzim aktivitesi agaroz jel üzerinde kontrol edilmiştir.

Şekil 4.27 incelendiğinde elüsyon örneğinin ticari enzim standart alınarak çalışabileceği maksimum dilüsyon oranının belirlenebilmesi için agaroz jel kontrol analizi verilmiştir. Ticari sığır DNaseI standart enzimi 10 kat seyreltme sonunda enzim aktivitesi göstermezken, saflaştırılmış elüsyon örneği 10 kat seyreltme sonucunda ortamdaki DNA'ı tamamen parçalayamamış ancak az bir miktar DNA'ı parçalayarak enzim aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.27. BMGY besiyerinde gerçekleşen fermentasyon süpernatant örneğinden saflaştırılan elüat ve ticari sığır DNaseI standardının seri dilüsyonlarından elde edilen enzim aktivitesinin agaroz jel görüntüsü M: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD)

4.13.3. Fermentasyon üretimleri sonucu elde edilen veriler

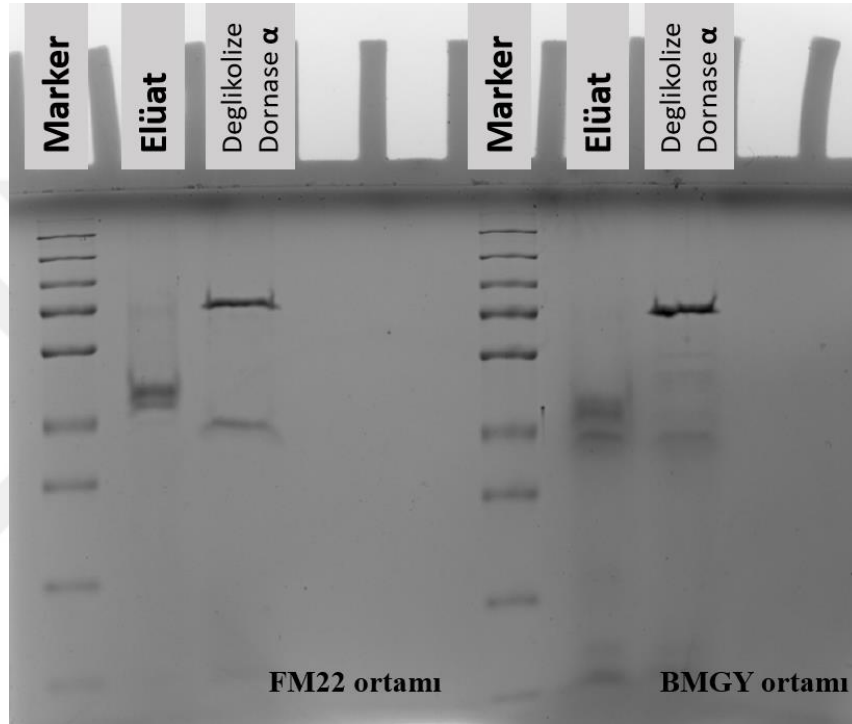
Çalışma kapsamında Dornaz alfa enziminin en yüksek verimde üretimi amaçlandığı için Dornaz alfa enziminin *P. pastoris* MK115(PDI) konakçı suşunda fermentör ölçekli iki farklı besiyerinde üretim yapılmış ve üretim sonucu elde edilen veriler karşılaştırılmıştır. Bu amaçla genomunda tek kopya Dornaz alfa gen kasedi içeren üretim klonu kullanılarak 24 °C sıcaklıkta ve pH 7.0 değerinde enzim üretimi için FM22 ve BMGY (gliserol-kompleks) besiyerlerinde üretimler gerçekleştirilmiş ve fermentör ölçekli üretimlerinde elde edilen veriler Çizelge 4.2’de özetlenmiştir.

Çizelge 4.2. FM22 ve BMGY besiyerlerinde gerçekleşen fermentör ölçekli üretimlerde elde edilen veriler

	FM22’de tamamlan fermentör verileri	BMGY’da tamamlan fermentör verileri
Yaş hücre ağırlığı (g/L)	536.85	549.70
Enzim aktivitesi (U/mL)	3225.42	3325.42
Spesifik aktivite (U/mg)	13559.32	15254.23
Saf Dornaz alfa proteini (mg/mL)	0.260	0.218

4.13.4. Saflaştırılmış örneklerde glikozilasyon bölgelerinin düşürülmesi

Dornaz alfa aminoasit sekansı üzerinde potansiyel N-bağlı glikozilasyon bölgelerinin uzaklaştırılması ve glikolize olmayan rekombinant proteinin molekül ağırlığını doğrulamak amacıyla saflaştırılan elüat örnekleri EndoH_f enzimi ile muamelesi sonrasında örneklere SDS-PAGE analizi yapılarak jel görüntüsü alınmıştır (Şekil 4.28). Ekspresyon sırasında glikolize olan bölümler analiz sonunda uzaklaştırılmış ve Dornaz alfa proteini, markör standardına göre 30 kDa moleküler ağırlık hizasında olan bir bant olarak görülmüştür. Analiz sonucunda protein ekspresyonu sırasında glikozilasyona uğradığı görülmüştür.



Şekil 4.28. Üretim klonu ile gerçekleşen fermantasyon hasat süpernatantının saflaştırma örneklerinden glikolizasyon bölgelerinin düşürülmesi M: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, ABD)

4.13.5. Saflaştırılmış örneklerde spesifik enzim aktivitesinin ölçümü

Spesifik enzim aktivitesi analizi metod kısmında bahsedildiği şekilde yapılmış olup substrat üzerine enzim eklendiği andan itibaren absorbansta beklendiği gibi azalma görülmüştür. Absorbanstaki azalma enzimin DNA'ı parçalayabileceği maksimum zamana kadar devam etmiştir. Reaksiyon zamanı kısa bir zaman dilimi içerisinde (ortalama 2 dk sonra) bittiği ve absorban değişimlerinin durduğu belirlenmiştir. Üretim suşu olarak 1 kopya gen içeren pADH2SNT5Dornaz alfa (MK115PDI) #10 klonu ile gerçekleşen fermantasyon süpernatant örnekleriyle yapılan spesifik enzim aktivitesi ölçümünde elde edilen zamana bağlı absorban değişimi Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. Seçilen üretim suşu ile gerçekleşen fermantasyon süpernatantındaki saflaştırma elüsyon örnekleriyle yapılan spesifik enzim aktivitesi ölçümünde elde edilen zamana bağlı absorbans değişimi

Absorbans* (260 nm)			
Süre (dk)	Ticari Sığır DNaseI (Thermo Scientific™)	FM22 besiyerinde tamamlanan fermantasyon saflaştırma örneği	BMGY besiyerinde tamamlanan fermantasyon saflaştırma örneği
0	0.218	0.218	0.218
0.5	0.159**	0.151	0.128
1.0	0.163	0.138**	0.121**
1.5	0.174	0.160	0.151
2.0	0.171	0.167	0.162

*2'şer paralel ölçüm alınarak ortalaması yazılmıştır.

** Reaksiyon tamamlanma noktası

Ticari sığır DNaseI enzimi 20000 U/mg aralığında bir spesifik aktivite değerine sahip olduğu bilinmektedir. Hesaplamalar sonucu pADH2SNT5Dornaz alfa (MK115PDI) #10 klonuyla FM22 besiyeri ortamında tamamlanan fermentör üretiminin hasat örneğinde 13559.32 U/mg spesifik aktivitede ve 3525.42 U/mL verimlilikte ya da oranında enzim aktivitesi bulunmuşken BMGY besiyeri ortamında tamamlanan fermentör üretiminin hasat örneğinde 15254.23 U/mg spesifik aktivitede 3325.42 U/mL verimlilikte ya da oranında enzim aktivitesi bulunmuştur.

5. TARTIŞMA

Tez kapsamında, insan kaynaklı Dornaz alfa enziminin *P. pastoris* mayasında, etanol ile indüklenabilen ve güçlü bir ekspresyon seviyesi gösteren *ADH2SNT5* promotoru kontrolü altında ekspresyonu yapılmıştır. Bu çalışma ile Dornaz alfa enziminin ilk defa bir maya ekspresyon platformunda rekombinant olarak üretimi yapılmıştır. Bu amaçla tez çalışması kapsamında oluşturulan suşun Dornaz alfa üretim potansiyelinin öncelikle erlenmayer ölçeğinde belirli üretim parametreleri test edilerek araştırılmış ve sonrasında endüstriyel üretime uyarlanabilmesi için fermentörde üretimi sağlanarak ölçek büyütme çalışmaları yapılmıştır. Ayrıca çalışma kapsamında enzimin FPLC yöntemi ile saflaştırılması da yapılarak endüstriyel üretim için kullanılma potansiyeli bulunan temel bazı üretim verileri elde edilmiştir.

Günümüz dünyasında sanayi ölçekli Dornaz alfa üretiminde konakçı organizma olarak memeli hücreleri, Çin hamster yumurta hücreleri (CHO) kullanılmaktadır. Ayrıca rekombinant Dornaz alfa enzimi üretiminde memeli ekspresyon sisteminin kullanıldığı görülmüştür (Parsiegla vd. 2012). Literatür araştırma sonucuna bakıldığında rekombinant Dornaz alfa enzimi üretiminde *P. pastoris* ekspresyon sistemi kullanılarak Dornaz alfa enziminin ekspresyonu ilk kez bu çalışma kapsamında denenmiştir.

Dornaz alfa enzimini kodlayan gen bölgesinin pADH2SNT5a vektörüne klonlanmasıyla pADH2SNT5Dornaz alfa ekspresyon vektörü oluşturulmuştur. Üretim veriminin artırılabilmesi amacıyla enzimin katlanması ve disülfid bağı oluşumunu katalize ederek proteinin biyolojik aktif formunun oluşumunu destekleyici ve hücre dışı sekresyonu artırıcı PDI şaperon proteini kullanılmıştır. Bu amaçla laboratuvar ekibimiz tarafından oluşturulan ve genomunda ekstra 4 kopya PDI geni içeren *P. pastoris* MK115(PDI) suşu konakçı organizma olarak kullanılmış ve bu suşa transformasyonlar yapılarak klonlar elde edilmiştir.

Rekombinant heterolog protein üretiminde gen kopya sayısı protein ekspresyonunda değerlendirilmesi gereken önemli parametrelerden bir tanesi olarak karşımıza çıkmaktadır. Romanos (1995)'e göre gen kopya sayısı, *P. pastoris* ekspresyon sistemi kullanılarak rekombinant proteinin ekspresyonunda sınırlayıcı bir adım olarak tanımlanmıştır. Ekspresyon kasetinin kopya sayısını artırmak, genellikle ifade edilen protein miktarını artırma etkisine sahiptir (Macauley-Patrick vd. 2005; Damasceno vd. 2012). Gen kopya sayısının üretime etkisi üzerine Vassileva vd. (2001) tarafından yapılan çalışmaya göre, *GAP* promotorunun kontrolü altında hepatit B yüzey antijenini (HbsAg) farklı gen kopya sayısında içeren *Pichia* hücrelerinin, dört kopya gen sayısı içeren hücrelere kadar çok kopyalı klonların, tek kopya içerenlere göre dört kat daha yüksek HbsAg verimine sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Hohenlum vd. (2003) tarafından insan tripsinojeni geni içeren *P. pastoris* X33 konakçısında yapılan çalışmaya göre, üretim *AOX1* veya *GAP* promotorları karşılaştırılarak gerçekleştirilmiş ve böylece 3 kopyaya kadar *GAP* promotoru kontrolünde gerçekleştirilen üretimlerde gen kopya sayısının her hangi bir etkisinin olmadığı görülmüşken *AOX1* promotoru kontrolünde yapılan ekspresyonda 2 kopya gen içeren klonlarda protein üretimi 2 kat artış gösterirken 3 kopya gen içeren klonlarda üretimin en düşük seviyede olduğu tespit edilmiştir. Hem *AOX1* hemde *GAP* promotoru kontrolü altında 3 kopya üzerindeki klonlarda hücre canlılığı azalmış ve hücresel proteinlerin kültür süpernatantına salınması sebebiyle veriler incelenememiş ve bu durumda *AOX1* ve *GAP* altında yapılan insan tripsinojen enziminin

artan gen kopya sayısı sebebiyle hücreye toksik etki oluşturduğu düşünülmektedir. Bu bağlamda gen kopya sayısının üretime etkisinin incelendiği çalışmalara bakıldığında sadece gen kopya sayısının bilinmesiyle üretim miktarının yorumlanamayacağı buna karşın konakçı organizma, protein farklılığı, promotor bölgesi ve üretim koşulları gibi birden fazla değişkenin olmasının sonuçları etkilediği görülmüştür. Çalışma sonucu literatür ile karşılaştırıldığında, 1-11 kopya gen içeren klonlar ile *P. pastoris* için standart üretim koşulu olan 28 °C sıcaklıkta ve pH 6.0'da BMEY besiyerinde shake flask ortamında ekspresyonu gerçekleştirilerek Western Blot analizi yapılmış ve analiz sonunda bant yoğunluğuna bakılarak protein üretiminin en yüksek olduğu klonun 1 kopya gen, en düşük üretime sahip klonun 6 kopya gen ve hiç üretim göstermeyen klonun 2 kopya gen içerdiği tespit edilmiştir. Bu sebeple fermentör üretimleri için, tek kopya gen içeren pADH2SNT5Dornaz alfa #10 klonu seçilmiştir.

Türkanoglu Özçelik vd. (2019) tarafından *P. pastoris*'te rekombinant bakteriyel transglutaminaz (pro-MTGase) üretim çalışmalarında, üç farklı sıcaklık 20 °C, 25 °C, 28 °C ve dört farklı üretim pH'larında 5, 6, 7, 7.5 olmak 40 saatlik shake flask üretimi sonucu en yüksek pro-MTGase üretimi 20 °C ve pH 7.5'te 9120 U/L elde edilmiştir. Araştırma grubu tarafından sonuçlar değerlendirilerek düşük sıcaklık ve yüksek pH ortamında *P. pastoris*'te rekombinant pro-MTGaz protein ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Tez kapsamında üretim suşunun belirlenmesinin ardından üretim verimliliğinin artırılabilmesi için erlenmayer koşullarında farklı sıcaklık ve pH değerlerinde üretimler yapılmış ve gerçekleştirilen 96 saatlik üretim sonunda enzim aktivite analizleri ve Western Blot analizi yapılmıştır. Enzim aktivitesi sonucu agaroz jel görüntüsü alınarak Dornaz alfa enziminin ortamdaki DNA'yı parçalayabilme miktarına bakılmış ve enzimin en yüksek aktivite gösterdiği ortam pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla pH 7.0 ve 24 °C olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuca paralel olacak şekilde Western Blot analizi sonucu da değerlendirilerek proteinin varlığı ve bant yoğunluğuna bakılarak en yüksek protein üretiminin pH 7.0 ve üretim sıcaklığının 24 °C olduğu gözlenmiştir. Tez kapsamında yapılan çalışma sonuçlarına göre literatürde, *P. pastoris*'te diğer protein ekspresyon çalışmalarında elde edilen sonuçlara benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Glikozilasyon, biyolojik temelli ilaçlarda yaygın olarak görülen, ilacın çözünürlük, serum yarı ömrü ve protein katlanması gibi klinik güvenlik ve etki profillerini etkilemekte ve etkisinin ilaç kalitesinde önemli rolü bulunmaktadır (Dotz vd. 2015). SDS-PAGE ve Western Blot analizlerinde rekombinant Dornaz alfa enzimi çoğul bantlar olarak gözlenmiş ve EndoH_f ile muamele sonunda Dornaz alfa enziminden glikoz üniteleri uzaklaştırılmış bandın yaklaşık 30 kDa boyutlarına tek bant şeklinde düştüğü saptanmıştır. Bu sonuç ile proteinin glikozilasyona uğradığı doğrulanmıştır. Çalışma kapsamında glikozilasyonun üretim verimine etkisi çalışılmamış olup ilerleyen zamanlarda bu çalışmaya devam niteliğinde yapılacak olan diğer çalışmalarda glikozilasyonun üretim verimine etkisinin çalışılması hedeflenmektedir.

Bivalent iyonlar, rhDNaseI aktivitesi için gerekli olup DNA, bivalent iyon mevcudiyetinde rastgele, tek iplikçiğe bölünmesi şeklinde hidrolize uğramaktadır. rhDNaseI enzim aktivitesine iyon etkisinin çalışıldığı bir çalışmada 0.1 mM Ca⁺² veya 2.5 mM Mg⁺² varlığında, rhDNaseI düşük spesifik aktiviteye sahip olmakta iken her iki metalin aynı reaksiyon ortamında belirtilen konsantrasyonlarda mevcut olduğunda rhDNaseI aktivitesi neredeyse 700 kat artmaktadır. Çalışması sonucunda Ca⁺² iyonu, Mg⁺² iyonlarının DNA substratının etkili bir şekilde tanınması için rhDNaseI yapısını

stabilize ettiği gözlemlenmişken, Zn^{+2} , Eu^{+3} , Sm^{+3} , Nd^{+3} , Cd^{+2} , Sn^{+2} , Fe^{+2} , Ni^{+2} , Cu^{+2} ve Mn^{+2} gibi diğer metal iyonlarının ise rhDNaseI aktivitesi üzerinde sinerjistik etkiler bulunamamıştır (Shire 1996). Metal iyonlarının etkisinin incelendiği Rosenecker vd. (2009) tarafından yapılan başka bir araştırmaya göre, 1 µg plazmit DNA'sı için 0.5 U rhDNaseI enzimi kullanılarak reaksiyon karışımı içerisinde 5 mM, 1.67 mM, 0.56mM, 0.19 mM ve 0.06 mM konsantrasyonlarında $CaCl_2$ ve $MgCl_2$ bivalent iyonlarının ilave edilmesinin enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. Reaksiyon karışımları 37 °C'de gece boyu inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonrasında %1 agaroz jel üzerinde DNA parçalama miktarlarına bakılmıştır. Çalışma sonucunda 5 mM, 1.67 mM ve 0.056 mM $MgCl_2$ ortamında bulunan DNA tamamen parçalanmış ancak ondan sora parçalanma yavaşlamaya başlamıştır. Bununla birlikte sadece $CaCl_2$ ortamında bulunan DNA, hiçbir konsantrasyonda tamamen parçalanamamış olmasına rağmen çalışılan konsantrasyonlar arasında enzimin çalıştığı en iyi konsantrasyon 0.19 mM $CaCl_2$ olarak belirlenmiştir. Ortamda bulunan iyonların, özellikle Ca ve Mg iyonlarının rhDNaseI aktivitesi üzerine etkisi yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Bu sebeple tez kapsamında süpernatant örneklerinde enzim aktivitesi tespiti için tampon çözelti içerisinde 2.5 mM $MgCl_2$ ile reaksiyonlar kurulmuştur. Farklı konsantrasyonlarda ve farklı iyonlar ile çalışmalar denenmemiş, standart deneme şartlarından elde edilen bu bilgiler sonraki çalışmalarda referans olarak kabul edilerek enzim aktivitesinin en yüksek verimle çalışabildiği reaksiyon ortamı araştırılabilir bir konu olarak değerlendirilmiştir.

Klonlama sonucunda oluşturulan pADH2SNT5Dornaz alfa #10 üretim suşu ile 5 L hacimli biyoreaktörde, 24 °C, normoksik koşullarda (ÇO %20), 900 rpm karıştırma hızında iki farklı besiyeri ortamı kullanılarak yapılmış ve FM22 besiyerinde üretim miktarının daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. İki farklı besiyerinde gerçekleştirilen üretimler karşılaştırıldığında FM22 besiyerinde gerçekleşen biyoreaktör üretimi sonucunda, yaş hücre ağırlığı 536.85 g/L ve toplam protein 4505.83 mg/L olarak hesaplanmıştır bunun yanında BMGY besiyerinde tamamlanan biyoreaktör üretimi sonucunda, yaş hücre ağırlığı 549.70 g/L ve toplam protein 5439.17 mg/L olarak hesaplanmıştır. Öncelikle FM22 de yapılan üretimlerde üretim verimini arttırabilmek adına daha sonra BMGY besiyerinde çalışılmış ve beklenen üzere üretilen toplam protein miktarı artmıştır. Toplam protein içerisinde Dornaz alfa enzimi üretiminde de zamana bağlı olarak artış gözlenmiş ve en yüksek aktivite agaroz jel görüntüleriyle 96. saatte görülmüştür. Bunun üzerine hasat örnekleri saflaştırılmış ve saflaştırma sonucunda FM22 besiyeri ortamında bitirilen fermentör saf ürününde protein konsantrasyonu 0.260 mg/mL olarak tespit edilmiştir. BMGY besiyeri ortamında bitirilen üretimin saflaştırma örneğinde protein konsantrasyonu 0.218 mg/mL olarak tespit edilmiştir. BMGY üretiminde toplam protein miktarının artmasının aksine Dornaz alfa konsantrasyonunda artış gözlenememiştir. Bu durumun BMGY besiyerinde üretim esnasında hücrenin kendi endojen proteinlerini üretimi ve hücre dışına salgılanmasının FM22'ye göre daha yüksek olmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Bu sebeple farklı media bileşenleri denenerek endojen protein salgısını azaltacak ortam optimize edilebileceği sonucu çıkarılmıştır.

Standart olarak ticari sığır DNaseI'e karşı, FM22 besiyeri ortamında tamamlanan fermentör üretimi sonucu imidazolü uzaklaştırılmış elüsyon karışımına 10-400 kat dilüsyon yapılarak enzim aktivitesi agaroz jel üzerinde görüntülenmiştir. Bu çalışma kapsamında yapılan tüm enzim aktivitesi çalışmalarında 1 µg DNA substrat üzerine 1 µl

enzim olacak şekilde çalışmalar gerçekleştirilmiş. Bu bilgiler doğrultusunda, ticari sığır DNaseI standart enzimi 10 kat seyreltme sonunda enzim aktivitesi göstermezken, saflaştırılmış elüsyon örneği 10 kat seyreltme sonucunda ortamdaki DNA'yı tamamen parçalayamasa da kısmen hidrolize ederek enzimatik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bununla birlikte, BMGY besiyerinde yapılan fermentör üretimi elüsyon örneğinde de aynı sonuç görülmüştür. *P. pastoris*'te eksprese olan Dornaz alfa enziminin fermentör üretim süpernatantlarının saflaştırma çalışmaları sonucunda enzim aktivitesinin ticari sığır DNaseI enzimine göre 10 kat daha fazla olduğu sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte tez kapsamında FM22 ve BMGY olmak üzere iki farklı besiyeri ortamında gerçekleşen fermentör ölçekli *P. pastoris*'te rekombinant Dornaz alfa ekspresyonunda farklı besiyeri bileşeninin protein aktivitesi üzerinde bir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır.

Literatür bilgileri tarandığında US 20170233704A1 no'lu patentte yapılan çalışmaya göre; rekombinant Dornaz alfa üretiminde konakçı organizma olarak CHO-K1 kullanılmış ve fermantasyonun 11. gününde 0,728 mg/mL ve 14. gün sonunda süpernatantta 0,778 mg/mL rekombinant Dornaz alfa üretimi gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde, uzun fermantasyon süresi sonunda yaklaşık olarak 0,8 mg/mL protein ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Tez kapsamında, Dornaz alfa enziminin *P. pastoris* ekspresyon sistemi kullanılarak yapılan üretim çalışmalarında 96 saat sonunda elde edilen saflaştırılmış protein konsantrasyonu en yüksek verimle 0.260 mg/mL olarak belirlenmiştir. Memeli hücrelerinde yapılan üretime göre yaklaşık 2.5 kat daha az ürün verimi elde edilebilmiştir. Konsantrasyon olarak daha düşük olmasına karşın fermantasyon süresinin kısalığı, memeli hücreleriyle kıyaslandığında daha ucuz kültür ortamlarında ekspresyonun sağlanabilmesi ve hasat sonunda fermantasyon süpernatantından proteinlerin daha kolay saflaştırılabilmesi gibi birçok avantajından dolayı sanayi ölçekli rekombinant Dornaz alfa üretiminde konakçı organizma olarak memeli hücrelerine alternatif olabileceği sonucuna varılmıştır. İlerleyen zamanlarda *Pichia* ekspresyon sistemi kullanılarak gerçekleştirilecek olan üretimlerde farklı promotorlar kullanımı, farklı konakçı hücrede üretimler, fermentör ve saflaştırma çalışmalarında yapılacak olan çalışmalar ile üretim verimliliğinin artırılabilmesi de ön görülmektedir.

Memeli hücrelerinde üretim üzerine aynı çalışma grubu tarafından US 20170233704A1 no'lu patent'e göre; fermantasyonun 14. gün sonunda saflaştırma yapılmış ve spesifik aktivite olarak 974 U/mg olarak hesaplanmıştır. Tez kapsamında yapılan saflaştırmalar sonunda ise elde edilen elüsyon örneklerinde FM22 besiyeri ortamında yapılan fermentör üretimi sonucunda saflaştırma elüat örneğinde 13559.32 U/mg spesifik aktivite ve BMGY besiyeri ortamında tamamlanan fermentör üretimi sonucunda saflaştırma elüat örneğinde 15254.23 U/mg spesifik aktivite tespit edilmiştir. Protein konsantrasyonu açısından verim düşük olmasına karşı spesifik aktivite olarak daha önceki çalışmalarla kıyaslandığında 15 kata kadar fazla enzim aktivitesi tespit edilmiştir. Bu sonuç ise *Pichia* sisteminde yapılan üretimin hem memeli üretimlerine hem de mevcut ticari ürüne iyi bir alternatif olabileceği sonucuna varılmıştır.

Bununla birlikte ticari olarak satılan Dornaz alfa 1 mg/mL konsantrasyonunda enzim içermekte ve 1000 U/mL enzim aktivitesine sahiptir. Tez kapsamında üretilen Dornaz alfa ise 3525.42 U/mL aktivite elde edilmiştir. Ticari Dornaz alfa ile karşılaştırıldığında aktivite olarak yaklaşık 3.5 kat fazla ancak protein konsantrasyonu

bakımından istenilen seviyeye erişilememiştir.

Son zamanlarda Walsh (2018, 2022) tarafından farklı yıllarda yapılan ve terapötik protein üretiminde kullanılan platformların incelendiği çalışmalara bakıldığında %79 olan memeli hücre platformunun kullanım oranının %72'e düştüğü görülmüştür. Bu azalış durumu, memeli sistemlerine bir alternatif arayışı olduğunun sonucu olarak düşünölebilir. Bu alışma kapsamında protein konsantrasyonu bakımından memeli üretimine göre 4 kata kadar az protein miktarı olmasına karşın; enzim aktivitesi bakımdan 3.5 kat fazla olması, hastalığın dozuna bağlı olarak az miktarda protein alımının yüksek aktiviteye neden olması Dornaz alfa üretiminde Pichia ekspresyon platformunun iyi bir seçenek olabileceğini göstermiştir. Ancak, ticari ürüne eşdeğer bir ürün çıktısının analizi için farklı çalışmalar yapılarak değerlendirilmesi gerekmektedir.



6. SONUÇLAR

Tez kapsamında, insan kaynaklı Dornaz alfa enziminin etanol ile indüklenene ve diğer bilinen *P. pastoris* promotorlarına göre daha güçlü bir ekspresyon seviyesi gösteren *ADH2SNT5* promotoru kontrolü altında rekombinant olarak üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla çalışma kapsamında oluşturulan suşun Dornaz alfa üretim potansiyelinin laboratuvar ölçeğinde araştırılması ve endüstriyel üretime uyarlanabilmesi için ölçek büyütme çalışmaları yapılmıştır. Sanayi ölçekli rekombinant Dornaz alfa üretimi memeli ekspresyon sistemlerinde gerçekleşmektedir. *P. pastoris* ekspresyon sistemi kullanılarak Dornaz alfa enziminin ekspresyonu ilk kez bu çalışma kapsamında denenmiştir.

- Dornaz alfa enzimini kodlayan gen bölgesinin **pADH2SNT5 α** vektörüne klonlanarak ekspresyon vektörü elde edilmiştir. Verimin artırılabilmesi ve çalışmanın temel amacı doğrultusunda yüksek miktarda enzim üretimine ulaşılabilmek amacıyla; enzimin doğru bir şekilde katlanarak 3 boyutlu yapısını kazanmasını ve disülfid bağı oluşumunu katalize ederek hücre dışı sekresyonu artırıcı etksi olduğu daha önceki çalışmalarda ispatlanmış PDI şaperonu kullanılmıştır. Bu amaçla 4 kopya PDI şaperon proteini içeren ***P. pastoris* MK115(PDI)** konakçı organizmasına transforme edilmiştir.
- Transformasyon sonucunda farklı kopya sayısında gen içeren klonlar ile *P. pastoris* için standart üretim koşulu olan 28 °C sıcaklıkta ve pH 6.0'da BMEY besiyerinde erlenmayer ölçeğinde Dornaz alfa ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Ekspresyon sonunda Western Blot analizi yapılarak bant yoğunluğunun değerlendirilmesi sonucunda yüksek kopya sayısı ile protein üretim miktarı arasında doğru orantılı bir ilişki olmadığı aksine 1 kopya Dornaz alfa içeren klonun en yüksek üretime sahip olduğu gözlenmiştir. Protein ekspresyonunun en yüksek olduğu klon tek kopya gen içeren **pADH2SNT5Dornaz alfa #10** üretim suşu olarak seçilmiştir.
- Aday klonlar ile standart üretim koşulları 28 °C, pH 6.0 ve 225 rpm çalkalamalı ortamda erlenmayer ölçeğinde üretim sonucu üretim verimliliğinin araştırılması amacıyla enzim aktivite analizi yapılmıştır. Enzim aktivitesi sonucu agaroz jel görüntüsü üzerinde DNA'yı parçaladığı görülerek *P. pastoris*'te rekombinant Dornaz alfa üretiminin gerçekleştiği doğrulanmıştır.
- Standart üretim koşullarında üretim sonucu seçilen pozitif klon ile üretim miktarını artırmak amacıyla erlenmayer koşullarında farklı sıcaklık (20-28 °C) ve pH (3-7)denemeleri yapılmıştır. 96 saatlik üretim sonunda Western Blot analizi ve enzim aktivite analizleri yapılarak enzim üretiminin en yüksek olduğu üretim ortamı **pH değeri 7.0 ve üretim sıcaklığı 24 °C** olarak belirlenmiştir.

- SDS-PAGE ve Western Blot analizlerinde rekombinant Dornaz alfa enzimi çoğul bantlar şeklinde gözlenmiş ve EndoH ile muamele sonunda Dornaz alfa enziminin glikoz üniteleri uzaklaştırılmış bantın yaklaşık 30 kDa boyutlarına tek bir bant şeklinde düştüğü saptanmıştır. Bu sonuç ile proteinin glikozilasyona uğradığı doğrulanmıştır.
- Oluşturulan pADH2SNT5Dornaz alfa #10 üretim suşu ile fermentör ölçekli üretimler yapılarak sanayi boyutunda üretime uyarlanabilirliği test edilmiştir. Bu amaçla FM22 besiyeri ve BMGY besiyeri olmak üzere iki farklı besiyeri ortamı kullanılarak fermentör üretimleri yapılmıştır. FM22 besiyerinde yapılan biyoreaktör üretimi sonucunda hasat örneğinde, yaş hücre ağırlığı 536.85 g/L ve toplam protein 4505.83 mg/L olarak hesaplanmışken BMGY besiyerinde yapılan biyoreaktör üretimi sonucunda hasat örneğinde, yaş hücre ağırlığı 549,70 g/L ve toplam protein 5439.17 mg/L olarak hesaplanmıştır.
- Fermantasyon hasat örnekleri saflaştırılmış ve saflaştırma sonucunda FM22 besiyeri ortamında bitirilen fermentör üretiminde Dornaz alfa protein konsantrasyonu **0.260 mg/mL** olarak tespit edilmişken, BMGY besiyeri ortamında bitirilen fermentör üretiminin hasat örneğinde Dornaz alfa protein konsantrasyonu **0.218 mg/mL** olarak tespit edilmiştir.
- *P. pastoris*'te eksprese edilen Dornaz alfa enziminin süpernatant karışımından saflaştırma çalışmaları sonucunda elüsyon örnekleri 10, 25, 50, 100, 200 ve 400 kat dilüsyon yapılarak enzim aktivitesi agaroz jel üzerinde görüntülenmiş ve standart olarak ticari sığır DNaseI ile karşılaştırılmıştır. Ticari sığır DNaseI standardı 10 kat seyreltme sonunda enzim aktivitesi göstermezken, FM22 ve BMGY olmak üzere farklı besiyeri ortamında tamamlanan fermentör üretimlerinin saflaştırılmış elüsyon örnekleri 10 kat seyreltme sonucunda ortamdaki DNA'yı kısmen parçalayarak enzimatik aktivite gösterdiği belirlenmiştir.
- Tez kapsamında FM22 ve BMGY olmak üzere iki farklı besiyeri ortamında gerçekleşen fermentör ölçekli *P. pastoris*'te rekombinant Dornaz alfa ekspresyonunda farklı besiyeri bileşeninin enzim aktivitesi ve protein miktarı üzerine bir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır.
- Fermentör ölçeğinde farklı iki üretim besiyerinde yapılan üretimlerde süpernatantların saflaştırılması sonunda elüsyon örneklerinde FM22 besiyeri ortamında tamamlanan fermentör üretiminin elüsyon örneğinde 13559.32 U/mg spesifik aktivite ve BMGY besiyeri ortamında tamamlanan fermentör üretiminin elüsyon örneğinde 15254.23 U/mg spesifik aktivite tespit edilmiştir.
- Elde edilen elüsyon örneklerinde FM22 besiyeri ortamında tamamlanan fermentör üretiminin elüsyon örneğinde **3525.42 U/mL** enzim aktivitesi ölçülmüşken, BMGY besiyeri ortamında tamamlanan fermentör

üretiminin elüsyon örneğinde **3325.42 U/mL** enzim aktivitesi tespit edilmiştir.

Çalışma kapsamında *P. pastoris*'te Dornaz alfa ekspresyonun ilk defa yapılmasına ilaveten şaperon proteinin aşırı ekspresyonun da yapılması çalışmanın bir diğer özgünlüğünü oluşturmaktadır. Yapılan tez çalışması kapsamında oluşturulan klon ile bazı üretim ve fermentör parametreleri test edilerek şartları belirlenmiştir. Ayrıca bu tez çalışması daha sonra yapılması planlanan saflaştırma, karakterizasyon, biyoaktivite ve formülasyon çalışmaları ile desteklenerek ilgili klonun sanayide kullanımı için bir ön hazırlık niteliğindedir. Geliştirilen bu klon, Türkiye'de 10762.09 TL maliyeti olan 1 kutu Pulmozyme ilacına muadil ya da biyobenzer bir ilaç üretebilme potansiyeline sahiptir.



7. KAYNAKLAR

- Actor, J.K. 2012. A Functional Overview of the Immune System and Immune Components. In: Buschman-Versteeg, L. (Ed), Elsevier Inc., Introductory Immunology, pp. 7-16.
- Amaral, M.D. 2014. Novel personalized therapies for cystic fibrosis: treating the basic defect in all patients. *Journal of Internal Medicine*, 277(2): 155-66.
- Anonim 1: <https://covid19.saglik.gov.tr/> [Son erişim tarihi: 10.05.2023]
- Baranovskii, A.G., Buneva, V.N., Nevinsky, G.A. 2003. Human Deoxyribonucleases. *Biochemistry (Moscow)*, 69(6): 587-601.
- Batt, C. 2014. *Pichia pastoris*. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 3: 42-46.
- Berlec, A. and Štrukelj, B. 2013. Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 40: 257-74.
- Bobadilla, J.L., Macek, M., Fine, J.P., Farrell, P.M. 2002. Cystic fibrosis: A Worldwide Analysis of CFTR Mutations - Correlation With Incidence Data and Application to Screening. *Human Mutation*, 19(6): 575-606.
- Cereghino, J.L. and Cregg, J.M. 1999. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24: 45-66.
- Chang, A.Y., Chau, WY., Landas, J.A, Yvonne, P. 2017. Preparation Of Calcium Competent *Escherichia coli* And Heat-Shock Transformation. *JEMI Methods*, 1:22-25.
- Cregg, J.M., Cereghino, J.L., Shi, J., Higgins, D.R. 2000. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, 16(1): 23-52.
- Crescimanno, G., and Marrone, O. 2014. Successful treatment of atelectasis with Dornase alpha in a patient with congenital muscular dystrophy. *Revista Portuguesa de Pneumologia (English Edition)*, 20(1): 42-45.
- Coakley, R.D. And Boucher, R.D. 2007. Pathophysiology: epithelial cell biology and ion channel function in the lung, sweat gland and pancreas. In Hodson, M. and Geddes, D. (Eds.). Edward Arnold Publishers Ltd, pp. 59-68.
- Çakır, E. 2016. Kistik Fibrozis Tanı Ve Tedavisinde Yenilikler. *Klinik Tıp Pediatri Dergisi*, 8(5):25-34.
- Damasceno, L.M., Huang, C., Batt, C.A. 2012. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 93:31-39.
- De Schutter, K., Lin, Y.C., Tiels, P., Van Hecke, A., Glinka, S., Weber-Lehmann, J., Rouzé, P., Van de Peer, Y., Callewaert, N. 2009. Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nature Biotechnology*, 27(6): 561-566.
- Dotz, V., Haselberg, R., Shubhakar, A., Kozak, R.P., Falck, D., Rombouts, Y., Reusch, D., Somsen, G.W., Fernandes, D.L., Wuhler, M. 2015. Trends in Analytical Chemistry, 73:1-9

- Erden Karaoğlu, F. 2016. *Pichia pastoris* Alkol Dehidrogenaz (*ADH3*) Promotoru Üzerine Çalışmalar. Doktora tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 19 s.
- Erdeve, Ö., Akın, O., Caner, İ., Hepyanar, V., Sarıcı, S.Ü. 2008. Erken Neonatal Atektazide Kurtarıcı rhDNase Tedavisi: Olgu Sunumu. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 61(2): 96-99.
- Fedakar, A., Aydoğdu, C., Fedakar, A., Uğurlucan, M., Bolu, S., Iskender, M. 2012. Safety of recombinant human deoxyribonuclease as a rescue treatment for persistent atelectasis in newborns. *Annals of Saudi Medicine*, 32(2): 131-136.
- Fuenmayor, J., Gòdia, F., Cervera, L. 2017. Production of virus-like particles for vaccines. *New Biotechnology*, 39: 174-80.
- Gray, D. 1997. Overview of Protein Expression Mammalian Cells. In: Coligan, J. E., Dunn B. M., Speicher, D. W., Wingfield, P. T. and Ploegh H. L. (Eds.). *Current Protocols in Protein Science*. John Wiley and Sons, Inc., pp. 5.9.11.
- Ha Kwang, T., Kim, D., Kim, C.L., Grav, L.M., Lee, G.M. 2021. Factors affecting the quality of therapeutic proteins in recombinant Chinese hamster ovary cell culture. *Biotechnology Advances*, 54:1-12.
- Hangül, M. vd. 2019. The incidence of cystic fibrosis in the central region of anatolia in Turkey between 2015 and 2016. *Balkan Medical Journal*, 36(3): 179-183.
- Hanssens, L.S., Duchateau, J., Casimir, G.J. 2021. CFTR Protein: Not Just a Chloride Channel? *Cells*, 10(11): 1-15.
- Hudayberdiyev, H. ve Öner, F. 1997. Rekombinant DNA Teknolojisi ile Üretilen Peptid-Protein İlaçlar. *FABAD J. Pharm. Sci*, 22: 27-38.
- Hohenblum, H., Gasser, B., Maurer, M., Borth, N., Mattanovich, D. 2003. Effects of Gene Dosage, Promoters, and Substrates on Unfolded Protein Stress of Recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*, 85(4): 367-374.
- Inan, M. and Meagher, M.M. 2001a. The Effect of Ethanol and Acetate on Protein Expression in *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92(4): 337-341.
- Inan, M. and Meagher, M.M. 2001b. Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase (AOX1). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92(6): 585-589.
- Karaoglan, M., Karaoglan Erden, F., Inan, M. 2016. Comparison of *ADH3* promoter with commonly used promoters for recombinant protein production in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 121: 112-117.
- Karaoglan, M., Karaoglan Erden, F., Inan, M. 2015. Functional analysis of alcohol dehydrogenase (*ADH*) genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*, 38 (3): 463-469.
- Karaoglan, M., Karaoglan Erden, F., Yılmaz S., Inan, M. 2019. Identification of major *ADH* genes in ethanol metabolism of *Pichia pastoris*. *Wiley Yeast*, 37: 227-36.
- Karcioğlu, Ö. 2020. rhDNase (Dornase alfa) and its role in the management of COVID-19. *Phnx Med J. March*, 2(2): 122-24.
- Khan, K.H. 2013. Gene expression in Mammalian Cells and its applications. *Advanced*

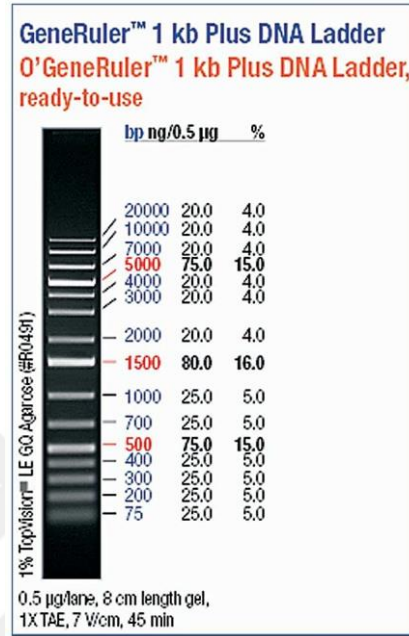
- Pharmaceutical Bulletin*, 3(2): 257-63.
- Kodati, B. and Darbhai S. 2016. Mammalian Expression System and Improvisation for High Production. *International Journal of Science and Research (IJSR)*, 5(6): 743-749.
- Koshimura, Y., Matev, M., Sonoda, H. 2017. Production For Recombinant Human DNase I. Patent Application Publication, US 2017/0233704.
- Kunitz, M. 1949. Crystalline Desoxyribonuclease. *The Journal of General Physiology*, 33(4):349-362.
- Kuşkaya, M. 2012. Otuz haftalık prematüre bir olguda gelişen rezistan atelektazide rhDNase kullanımı. *İzmir Dr. Behçet Uz Çocuk Hast. Dergisi*, 2(2): 122-126.
- Küpeli, S., Teksam, Ö., Dogru, D., Yurdakök, M. 2003. Use of recombinant human DNase in a premature infant with recurrent atelectasis. *Pediatrics International*, 45(5): 584-86.
- Lazarus, R.A. and Wagener, J.S. 2019. Recombinant Human Deoxyribonuclease I. In: Crommelin, D.J.A., Sindelar, R.D., Meibohm, B. (Eds.), *Pharmaceutical Biotechnology*. Springer, pp. 471-488.
- Lauková, L., Konečná, B., Janoviočvá, L., Vlková, B., Celec, P. 2020. Deoxyribonucleases and Their Applications in Biomedicine. *Biomolecules*, 10:1-20.
- Li, P., Anumanthan, A., Gao, X.G., Ilangovan, K., Suzara, V.V., Düzgüneş, N., Renugopalakrishnan, V. 2007. Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 142(2): 105-124.
- Macauley-Patrick, S., Fazenda, M.L., McNeil, B., Harvey, L.M. 2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 22: 249-270.
- Noh, S.M., Sathyamurthy, M., Lee, G.M. 2013. Development of recombinant Chinese hamster ovary cell lines for therapeutic protein production. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 2(4): 391-97.
- Okur, H.K. vd. 2020. Preliminary report of in vitro and in vivo effectiveness of dornase alfa on SARS-CoV-2 infection. *New Microbes and New Infections*, 37: 1-13.
- Parsiegla, G., Noguere, C., Santell, L., Lazarus, R.A., Bourne, Y. 2012. The Structure of Human DNase I Bound to Magnesium and Phosphate Ions Points to a Catalytic Mechanism Common to Members of the DNase I - like Superfamily. *Biochemistry including biophysical chemistry & molecular biology*, 51: 10250-10258.
- Phelan, M. 2007. Techniques for mammalian cell tissue culture. In: Coligan, J. E., Dunn B. M., Speicher, D. W., Wingfield, P. T., Ploegh H. L. (Eds.). *Current Protocols in Protein Science*. John Wiley and Sons, Inc., pp. A.3B.1.
- Romanos, M. 1995. Advances In The Use Of *Pichia pastoris* For High-Level Gene Expression. *Current Opinion in Biotechnology*, 6:527-533
- Rosenecker, J., Naundorf, S., Rudolph, C. 2009. Airway Surface Liquid Contains Endogenous DNase Activity Which Can Be Activated by Exogenous Magnesium. *European Journal of Medical Research*, 14: 304-308.
- Safder, I., Khan, S., Islam, I., Ali, M.K., Bibi, Z., Waqas, M. 2018. *Pichia pastoris*

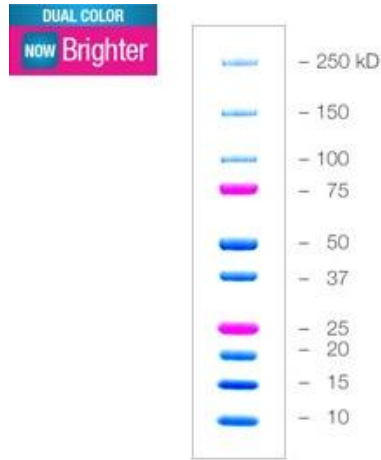
- expression system: a potential candidate to express protein in industrial and biopharmaceutical domains. *Biomedical Letters*, 4(1): 1-14.
- Scotet, V., Gutierrez, H., Farrell, P.M. 2020. Newborn Screening for CF across the Globe- Where Is It Worthwhile? *International Journal of Neonatal Screening*, 6(1): 1-18.
- Shire, S.J. 1996. Stability Characterization and Formulation Development of Recombinant Human Deoxyribonuclease I [Pulmozyme®, (Dornase Alpha)]. In: Pearlman, R. and Wang, Y.J. (Eds.), Formulation, Characterization, and Stability of Protein Drugs. Plenum Press. pp. 394-422.
- Spohner, S.C., Müller, H., Quitmann, H., Czermak, P. 2015. Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 202: 118-34.
- Tug, E. ve Tug, T. 2003. Kistik Fibrozis ve Moleküler-Genetik Yaklaşımlar. *Toraks Dergisi*, 4(2): 198-204.
- Türkanoglu Özçelik, A., Torun, A., Yılmaz, S., İnan, M. 2018. İnsan İnsülin Hormonu Öncülerinin *Pichia pastoris* AOX1 Promotoru Altında Klonlanması, Ekspresyonu ve Biyoreaktörde Üretimi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 22(3): 1190-96.
- Türkanoglu Özçelik, A., Yılmaz, S., İnan, M. 2019. *Pichia pastoris* Promoters. In: Gasser, B. and Mattanovich, D. (Eds). Recombinant Protein Production in Yeast. B. Springer Science, pp. 97-112.
- Türkanoglu Özçelik, A., Ersöz, F., İnan, M. 2019. Extracellular Production Of The Recombinant Bacterial Transglutaminase in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 159: 83-90
- Türker, N.P. ve Bakar, E. 2021. Kanser Metabolizmasında ve Metastazında Glikanların Önemi. *Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, (6)2:145-161.
- Ünver, Y. 2022. Biyofarmasötik Proteinlerin Üretiminde Kullanılan Mayalar. Gece Kitaplığı Yayınları, Ankara, 90 s.
- 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. and Glieder, A. 2013. Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production. *New Biotechnology*, 30(4): 385-404.
- Waterham, H.R., Digan, M.E., Koutz, P.J., Lair, S.V., Cregg, J.M. 1997. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene*, 186(1): 37-44.
- Weinacker, D., Rabert, C., Zepeda, A.B., Figueroa, C.A., Pessoa, A., Farías, J.G. 2013. Applications of Recombinant *Pichia pastoris* in the healthcare industry. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(4): 1043-48.
- Walsh, G. 2018. Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nature Biotechnology*, 28:1136–1145.
- Walsh, G. ve Walsh, E. 2022. Biopharmaceutical benchmarks 2022. *Nature Biotechnology*, 40(12):1722-1760.

- Welsh, M.J. and Smith, A. E. 1993. Molecular Mechanisms of CFTR Chloride Channel Dysfunction in Cystic Fibrosis. *Howard Hughes Medical Institute Departments of Internal Medicine and of Physiology and Biophysics University of Iowa College of Medicine*, 73: 1251-1254.
- Wu, S. and Letchworth, G.J. 2004. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *Biotechniques*, 36(1):152-4.
- Yıldız, K. 2016. Netosis : Nötrofilin Patojenle Savaşta Kullandığı Alternatif Savunma Yöntemi. *Türkiye Parazitol Dergisi*, 40: 158-62.
- Yılmaz, S. 2018. *Pichia Pastoris Gap Promotoru Altında Hücre Dışı Üretilen Rekombinant Proteinler İçin Yarı-Kesikli Proses Geliştirilmesi*. Doktora tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 29-33 s.
- Zhu, M.M., Mollet, M., Hubert, R.S., Kyung, Y.S., Zhang, G.G. 2017. Industrial Production of Therapeutic Proteins: Cell Lines, Cell Culture and Purification. *Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology*, 1639-1669.
- Zuo, Y. vd. 2020. Neutrophil extracellular traps in COVID-19. *JCI Insight*, 5(11): 1-11.

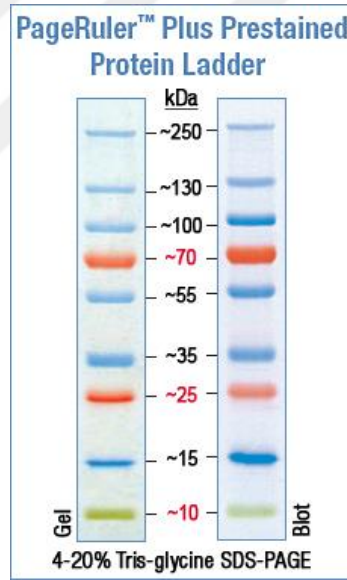
8. EKLER

EK-1: Çalışmalarda kullanılan DNA standardı (GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD))



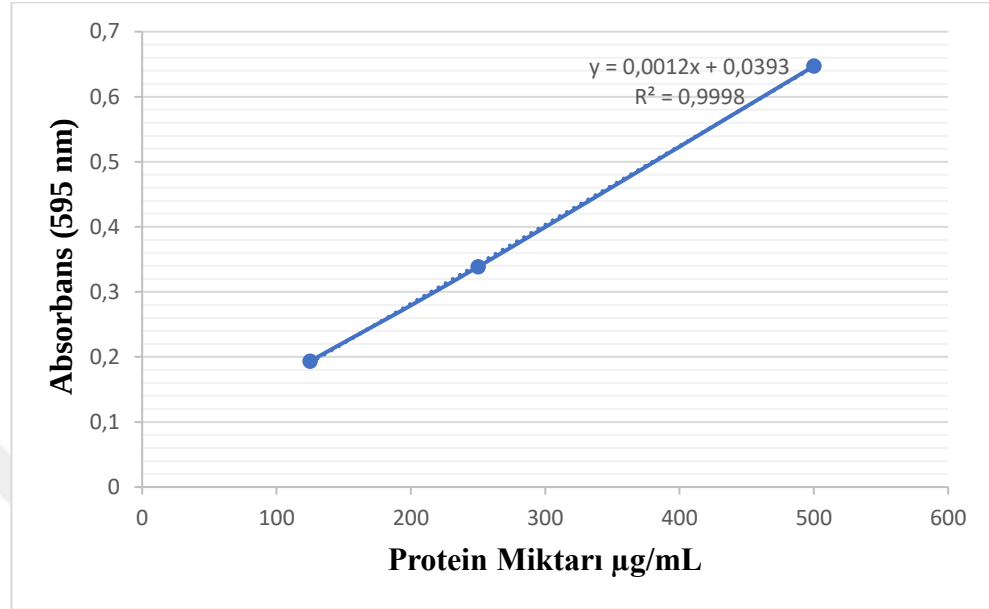
EK-2: Çalışmalarda kullanılan protein standartları

Precision Plus Protein All Blue Prestained Protein Standardı (Bio-Rad, ABD)



PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, ABD)

EK-3: Toplam protein miktarı hesaplamalarında kullanılan standart BSA spektrofotometre okumalarından elde edilen grafik ve denklem



EK-4: 1 kopya gen içeren pADH2SNT5Dornaz alfa #10 (MK115 PDI) klonuyla fermentör ölçekli üretimlerde elde edilen süpernatant örneklerinin toplam protein ölçümü ve absorbans okumaları

	Zaman	595 nm absorbans			Toplam protein	
		Okuma 1	Okuma 2	Ortalama	Dilüsyon oranı	mg/L
pADH2SNT5Dornaz alfa #10 (MK115PDI) FM22 Besiyeri pH 7.0 24 °C	Fb0	0.067	0.095	0.081	1	34.75
	Fb07	0.445	0.422	0.434	1	328.50
	Fb21	0.602	0.593	0.598	1	465.17
	Fb30	0.745	0.784	0.765	1	604.33
	Fb46	0.246	0.269	0.258	10	1818.33
	Fb54	0.364	0.357	0.361	10	2676.67
	Fb72	0.486	0.464	0.475	10	3630.83
	Fb80	0.573	0.573	0.573	10	4447.50
	Fb96	0.589	0.571	0.580	10	4505.83

	Zaman	595 nm absorbans			Toplam protein	
		Okuma 1	Okuma 2	Ortalama	Dilüsyon oranı	mg/L
pADH2SNT5Dornaz alfa #10 (MK115PDI) BMGY Besiyeri pH 7.0 24 °C	Fb0	0.393	0.378	0.386	1	288.50
	Fb06	0.246	0.233	0.240	10	1668.33
	Fb22	0.515	0.439	0.477	10	3647.50
	Fb30	0.546	0.542	0.544	10	4205.83
	Fb46	0.642	0.612	0.627	10	4897.50
	Fb56	0.686	0.626	0.656	10	5139.17
	Fb70	0.670	0.665	0.668	10	5235.00
	Fb80	0.672	0.674	0.673	10	5280.83
	Fb96	0.693	0.691	0.692	10	5439.17

EK-5: 1 kopya gen içeren pADH2SNT5Dornaz alfa #10 (MK115 PDI) klonuyla fermentör ölçekli üretimlerde elde edilen hücre pelet ağırlığı ve yaş hücre ağırlıkları

pADH2SNT5Dornaz alfa #10 (MK115PDI) FM22 Besiyeri pH 7.0 24 °C	Yaş Hücre ağırlığı (g/L)			
	Zaman	Pellet 1	Pellet 2	Ortalama
	Fb07	100,600	100,920	100,760
	Fb21	159,600	162,300	160,950
	Fb30	210,900	211,100	211,000
	Fb46	284,300	279,100	281,700
	Fb54	414,000	419,600	416,800
	Fb72	438,200	431,500	434,850
	Fb80	526,200	517,520	521,860
	Fb96	539,900	533,800	536,850

pADH2SNT5Dornaz alfa #10 (MK115PDI) BMGY Besiyeri pH 7.0 24 °C	Yaş Hücre ağırlığı (g/L)			
	Zaman	Pellet 1	Pellet 2	Ortalama
	Fb0	88,400	87,700	88,050
	Fb06	171,500	173,360	172,430
	Fb22	331,800	330,000	330,900
	Fb30	366,700	370,900	368,800
	Fb46	417,100	423,400	420,250
	Fb56	467,370	463,830	465,600
	Fb70	501,900	499,500	500,700
	Fb80	508,400	507,500	507,950
	Fb96	545,300	554,100	549,700

ÖZGEÇMİŞ

AYÇA URAS

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2021-2023	Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Antalya
Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2017-2021	Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya