

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

REKOMBİNANT İNSÜLİN HORMONUNUN *Pichia pastoris*'te ÜRETİMİ

Ayşe TORUN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

2016

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

REKOMBİNANT İNSÜLİN HORMONUNUN *Pichia pastoris*'te ÜRETİMİ

Ayşe TORUN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**Bu tez TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU
(TÜBİTAK) tarafından 114Z164 nolu proje ile desteklenmiştir.**

2016

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

REKOMBİNANT İNSÜLİN HORMONUNUN *Pichia pastoris*'te ÜRETİMİ

Ayşe TORUN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

Bu tez 23/08/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Muharrem CERTEL

Prof. Dr. Mehmet İNAN

Doç. Dr. Ömer ŞİMŞEK

ÖZET

REKOMBİNANT İNSÜLİN HORMONUNUN *Pichia pastoris*'te ÜRETİMİ

Ayşe TORUN

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Muharrem CERTEL

Ağustos 2016, 48 sayfa

İnsülin pankreasın beta hücrelerinden üretilen ve vücutta glukoz dengesini sağlayan önemli bir peptit hormondur. Pankreasın yeterli miktarda insülin üretememesi ya da hücrelerin üretilen insüline cevap verememesi sonucu kan glukoz düzeyinin yükselmesiyle diyabet adı verilen metabolik bir hastalık meydana gelir. Günümüzde bu hastalığın tedavisinde insülin hormonu kullanılmaktadır. İnsülin hormonu genetik mühendisliği teknikleri kullanılarak rekombinant olarak üretilen ilk proteindir. İlk olarak *Escherichia coli* (*E.coli*) ve *Saccharomyces cerevisia* (*S. cerevisiae*)'da üretilmeye başlanmış, ancak son zamanlarda *Pichia pastoris* adı verilen mayanın kullanıldığı çalışmaların sayısı artmıştır. Bu çalışmada metilotrofik bir maya olan *P. pastoris* 'te insan insülin hormonu öncülerini(IP) kodlayan genin indüklenabilir *AOX1* promotoru altında üretilmesi hedeflenmiştir. Oluşturulan klonlarla küçük ölçekte protein üretimi çalışmaları engelli erlenlerde 120 saat boyunca yapılmıştır. Engelli erlenlerde üretim çalışması esnasında belirli zaman aralıklarında alınan örneklerden elde edilen süpernatantlarda SDS-PAGE ve Western blot analizleri yapılarak protein üretimi doğrulanmaya çalışılmıştır. SDS-PAGE ve Western blot analizlerinden elde edilen sonuçlar proteinin engelli erlenlerde üretildiğini ancak üretilen proteinin hücre dışına salgılanmadığını göstermiştir. Fermentörde üretim yapıldığında ise üretilen proteinin hücre dışına salgılandığı yapılan analizlerle gösterilmiştir.

ANAHTAR KELİMELE: *AOX1* promotoru, insülin hormonu, *Pichia Pastoris*, rekombinant protein

JÜRİ: Prof. Dr. Muharrem CERTEL (Danışman)

Prof. Dr. Mehmet İNAN

Doç. Dr. Ömer ŞİMŞEK

ABSTRACT

RECOMBINANT INSULIN HORMONE PRODUCTION in *Pichia pastoris*

Ayşe TORUN

MSc Thesis in Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Muharrem CERTEL

August 2016, 48 pages

Insulin is a peptide hormone, produced by beta cells of the pancreas and regulates the glucose homeostasis in the body. Diabetes mellitus is a metabolic disease in which a person has high blood sugar, either because the pancreas does not produce enough insulin, or because cells do not respond to produced insulin. At the present time, insulin is used to treatment of this disease. Insulin hormone is first protein produced recombinantly by using genetic engineering techniques. Firstly, it was produced in *E. coli* and *Saccharomyces cerevisia*, but recently the number of studies that used *Pichia pastoris* in the production of recombinant insulin increase. This study was aimed that the production of human insulin hormone precursor (IP) under the inducible AOX1 promotor of metilotrophic yeast *P. pastoris*. The small scale protein production studies have been done with the clones in shake flasks for 120 hours. During the shake flask production study, the samples was taken at specific time intervals and obtained supernatants for SDS-PAGE and Western blot analysis to confirm protein production. The results of SDS-PAGE and Western blot analysis showed that the protein was produced in shake flask but was not secreted out of the cell. When the protein production was done in fermentor, the analysis showed that produced protein was secreted out of the cell.

KEYWORDS: AOX1 promoter, insulin hormone, *Pichia Pastoris*, recombinant protein production

COMMITTEE: Prof. Dr. Muharrem CERTEL (Supervisor)
Prof. Dr. Mehmet İNAN
Assoc. Prof. Dr. Ömer ŞİMŞEK

ÖNSÖZ

Rekombinant DNA teknolojisi çok uzun bir zamandır kullanılmaktadır. Gıda ve sağlık alanındaki sorunların giderek artması ile bu dala verilen önem artmaktadır. Hem zaman hem de maddi açıdan tasarruf sağlaması bu daldaki çalışmaları giderek çoğaltmaktadır.

Bu yüzden bu tezdeki araştırma sonuçlarının yapılacak benzeri çalışmalara ışık tutacağı ve ülkemiz biyoteknoloji endüstrisine önemli katkılar sağlayacağı ümit edilmektedir.

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde bana her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen ve bu konuda çalışma olanağı sağlayan danışmanım Prof. Dr. Muharrem CERTEL'e (Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi), biyoteknoloji dalı ile ilgili bilgi ve tecrübeleriyle bana yardımcı olan proje danışmanımız Prof. Dr. Mehmet İNAN'a (Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi), proje yürütücümüz Uzman Dr. Aysun ÖZÇELİK'e (Akdeniz Üniversitesi Gıda Güvenliği ve Tarımsal Araştırmalar Merkezi), projede beraber görev aldığımız Semiramis YILMAZ'a, laboratuvar çalışmalarında bana yardımcı olan Dr. Mert KARAOĞLAN'a, Dr. Fidan ERDEN KARAOĞLAN'a, Arş. Gör. Fatma ERSÖZ'e (Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi), Gürkan YILMAZ'a, Lena AZER'e, Erol BYTYQİ'e, Uzman İhsan Burak ÇAM' a (Akdeniz Üniversitesi Gıda Güvenliği ve Tarımsal Araştırmalar Merkezi) çok teşekkür ediyorum. Tez çalışmam boyunca en güzel anılarımı paylaştığım sevgili dostum Fadime DEMİREL'e ne kadar teşekkür etsem az kalır.

Projeye verdikleri destekten dolayı TÜBİTAK yetkililerine teşekkür ederim.

Son olarak maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan, bu noktalara gelmemde en büyük pay sahibi olan sevgili annem Safiye TORUN'a ve sevgili babam Ahmet TORUN'a çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI	4
2.1. İnsülin	4
2.2. İnsülin Üretimi	4
2.3. Rekombinant İnsülin Üretimi	5
2.3.1. <i>Escherichia coli</i>	6
2.3.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
2.3.3. <i>Pichia pastoris</i>	7
2.3.4. Transgenik Bitki ve Hayvanlar	9
2.4. İnsülinin Kimyasal Yapısı	9
2.5. Çalışmanın Temeli ve Kapsamı	10
3. MATERYAL ve METOT	13
3.1. Materyal	13
3.1.1. Kimyasallar ve restriksiyon enzimleri	13
3.1.2. Tampon ve stok çözeltileri	13
3.1.3. Mikroorganizmalar ve enzimler	13
3.1.4. Plazmidler	14
3.1.5. Besiyerleri, gelişim ortamları ve antibiyotikler	14
3.1.6. Primerler	15
3.2. Metot	15
3.2.1. Liyofilize gelen plazmid DNA'nın açılması	15
3.2.2. Mayadan genomik DNA izolasyonu	15
3.2.3. Plazmid izolasyonu	16
3.2.4. Agaroz jel elektroforezi	16
3.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	17
3.2.6. PZR ürünlerinin saflaştırılması	17
3.2.7. DNA'nın jelden geri alınması	18
3.2.8. DNA ve plazmid konsantrasyonlarının belirlenmesi	18
3.2.9. Hücre yoğunluğunun ölçülmesi	18
3.2.10. Kompetent <i>E. coli</i> ve <i>P. pastoris</i> hücrelerinin hazırlanması	18
3.2.11. DNA parçalarının plazmide ligasyonu	19
3.2.12. Kompetent <i>E. coli</i> ve <i>P. pastoris</i> hücrelerine transformasyon	19
3.2.13. Restriksiyon analizi	20
3.2.14. Engelli erlende insülin proteini üretilmesi	20
3.2.15. Rekombinant <i>P. pastoris</i> suşları kullanılarak fermentör koşullarında insülin proteini üretimi	21
3.2.16. SDS-PAGE analizi	23
3.2.17. Western blot analizi	23
3.2.18. His-Tag pürifikasyonu	24

3.2.19. Hücrelerin SDS-PAGE ve Western Blot analizi için kırılması	24
3.2.20. Toplam protein tayini	25
4. BULGULAR	26
4.1. İnsülin genine histidin etiketi eklenmesi ve insülin genini taşıyan ekspresyon vektörünün oluşturulması.....	26
4.2. pPICZalpha-IP-6XHIS Ekspresyon vektörünün <i>E. coli</i> 'ye Transformasyonu..	28
4.3. Ekspresyon vektörünün <i>Pichia pastoris</i> 'e transformasyonu	28
4.4. Engelli erlerde insülinin üretimi western blot analizi ile gösterilmesi	31
4.5. Fermentör üretimi SDS-PAGE ve Western blot sonuçları.....	34
4.6. Fermentör üretimi toplam protein tayini sonuçları.....	36
5. TARTIŞMA	37
6. SONUÇ	40
7. KAYNAKLAR	41
8. EKLER.....	46
Ek-1: pPICZ α IP-His #4 plazmidi sekans sonucu.....	46
Ek-2: Çalışmada kullanılan DNA ve protein standartları.....	47
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

μ	Mikro (10 ⁻⁶)
m	Mili
M	Molar
n	Nano (10 ⁻⁹)
OD	Optik yoğunluk
s	Saniye
kDa	Kilo dalton birimi
L	Litre
g	Gram

Kısaltmalar

AOX1	Alkol Oksidaz I
BMGY	Buffered Glycerol-Complex Medium
BMMY	Buffered Methanol-Complex Medium
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DTT	Dithiothreitol
FDA	ABD Gıda ve İlaç Dairesi, Food And Drug Administration
LB	Luria-Bertani Besiyeri
LiAc	Lityum Asetat
OD	Optical Density (Optik yoğunluk)
PAGE	Poliakrilamit Jel Elektroforezi
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TAE	Jel Elektroforez Tamponu, Tris Asetat EDTA
YNB	Maya Azot Bazı
YPD	Maya Pepton Dekstroz, Yeast Pepton Dextrose
HPLC	High-Pressure Liquid Chromatography
bç	Baz çifti
aa	Amino asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Farklı konakçı sistemlerinde üretilen biyofarmasötiklerin dağılımı	5
Şekil 2.2. İnsülin proteinin üç boyutlu yapısı	9
Şekil 2.3. İnsülin zinciri	10
Şekil 2.4. İnsülin geni DNA dizilimi	10
Şekil 2.5. pPICZ α A ekspresyon vektörünün şematik gösterimi	11
Şekil 2.6. pPICZ α -IP-6XHis ekspresyon vektörünün oluşturulması	12
Şekil 3.1. pPICZ α A ekspresyon vektörünün şematik gösterimi	14
Şekil 4.1. pUC 57-IP genine 6XHİS etiketi eklenmesi ve doğrulanması	26
Şekil 4.2. pPICZ α A plazmidinin <i>XhoI/NotI</i> enzimleri ile restriksiyon analizi kontrolü	27
Şekil 4.3. pPICZ α -IP-6XHİS ekspresyon vektörünün haritası.....	27
Şekil 4.4. pPICZ α -IP-6XHİS plazmidinin <i>HindIII</i> kesimi sonrası görüntüsü.....	28
Şekil 4.5. pPICZ α -IP-6XHİS 4 numaralı plazmidin <i>MssI</i> enzimi ile kesilerek doğrulanması	29
Şekil 4.6. pPICZ α -IP-6XHis klonlarının PZR kontrolü.....	29
Şekil 4.7. pPICZ α -IP-6XHİS 4 numaralı plazmidin <i>MssI</i> enzimi ile kesilerek doğrulanması	30
Şekil 4.8. pPICZ α -IP-6XHis klonlarının PZR kontrolü.....	31
Şekil 4.9. PDI 1 numaralı klonun engelli erlen üretimi sonucu Western blot görüntüsü.....	31
Şekil 4.10. pPICZ α -IP-6XHis klonunun engelli erlen üretimi sonunda elde edilen süpernatant örneklerinin western blot görüntüsü	32
Şekil 4.11. pPICZ α -IP-6XHis klonunun engelli erlen üretimi sonunda elde edilen pelet soluble örneklerinin western blot görüntüsü	33
Şekil 4.12. pPICZ α -IP-6XHis klonunun engelli erlen üretimi sonunda elde edilen pelet insoluble örneklerinin western blot görüntüsü	33
Şekil 4.13. PDI pPICZ α -IP-6XHis klonunun fermentör üretimi SDS-PAGE jel görüntüsü.....	34
Şekil 4.14. Fermentörde üretilen 120.saat örneklerinin His-tag purifikasyonu sonrasında yapılan SDS-PAGE jel görüntüsü.....	35

Şekil 4.15. PDI pPICZ α -IP-6XHis klonunun fermentör üretimi Western blot görüntüsü.....	35
Şekil 4.16. Toplam protein tayini için farklı konsantrasyonlardaki BSA standardının 660 nm absorbans değerleri ile çizilmiş standart grafiği	36



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Konakçı sistemlerin insan insülin hormon üretimi açısından karşılaştırılması	7
Çizelge 2.2. <i>Pichia pastoris</i> yapısal ve tetiklenebilir promotorları	8
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar	13
Çizelge 3.2. PZR’de kullanılacak olan primerler	15
Çizelge 3.3 PZR Döngü Parametresi Karışım Oranları	17
Çizelge 3.4. Fermentörde kullanılan tuz bileşimi	21
Çizelge 3.5. PTM1 tuzlarının bileşimi	21
Çizelge 3.6. Fermentör kesikli faz parametresi.....	22
Çizelge 3.7. Fermentör kesikli beslemeli faz parametresi	22
Çizelge 3.8. Fermentör metanol besleme parametresi	23
Çizelge 4.1. Toplam protein tayini sonuçları	36

1. GİRİŞ

İnsülin, pankreasın beta hücrelerinden üretilen ve vücutta glukoz dengesini sağlayan önemli bir peptit hormondur. Pankreasın yeterli miktarda insülin üretememesi ya da beta hücrelerinin üretilen insüline cevap verememesi sonucu kan glukoz düzeyinin yükselmesiyle diyabet adı verilen metabolik bir hastalık meydana gelir. Günümüzde bu hastalığın tedavisinde dışarıdan insülin hormonu kullanılmaktadır. İnsülin hormonu genetik mühendisliği teknikleri kullanılarak rekombinant olarak üretilen ilk proteindir (Ahmad 2004).

Endüstriyel anlamda çeşitli konukçu mikroorganizmalar kullanılarak üretilen rekombinant proteinlerin, özellikle gıda ve sağlık alanlarında kullanımı giderek artış göstermektedir. Zaman geçtikçe, sürekli artış gösteren rekombinant protein ihtiyacını karşılayabilmek için çeşitli heterolog ekspresyon sistemleri geliştirilmiştir. Bu sistemler arasında, mayalar, prokaryotik organizmalara göre, ökaryotik proteinlerin post-translasyonel modifikasyonlarını gerçekleştirebilmek gibi bazı avantajlar sunmaktadır (Cregg vd 1993).

Stanley Cohen ve Herbert Boyer'in öncü çalışmaları ile DNA klonlama tekniği icat edilmiş ve genetik mühendisliğinin doğuşu ile genler arasında farklı biyolojik türlerin aktarımı kolaylaştırılmıştır (Porro vd 2011).

İnsülin ve büyüme hormonu gibi terapötik uygulamalarla birçok rekombinant protein üretimi sağlanmıştır. İnsülin ve büyüme hormonu genleri 1978 ve 1979 yıllarında *E.coli*'ye klonlanmıştır. Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak üretilen ilk lisanslı ilaç olan insülin Genentech tarafından geliştirilmiş ve Eli Lilly tarafından 1982 yılında lisanslanıp ticarileştirilmiştir (Baeshen vd 2014).

Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından onaylanan biyofarmasötikler 2004'den 2013'e kadar çoğunlukla memeli hücreleri(%56), *E. Coli* (24%), *S.Cerevisiae* (13%), transgenik hayvan ve bitkiler (3%) ile böcek hücrelerinden (4%) elde edilmiştir. Günümüzde ise insülin üretiminde diabetik hastalık tedavisi için çoğunlukla *E. coli* ve *S. cerevisiae* kullanılmaktadır (Walsh 2005).

1920'lerin başından beri diyabetik hastaların tedavisinde kullanılan insülin, sığır ve domuz pankreasından saflaştırılmıştır. Genetik mühendisliği alanındaki gelişmelerle insülin üretimindeki terapötik uygulamalarda *E. coli* ve maya kullanılmasına FDA tarafından izin verilmiştir (Ahmad vd 2014).

Günümüzde rekombinant insan insülini üretimi için çoğunlukla kullanılan *E. coli* veya *Saccharomyces cerevisiae*'dir (Nilsson vd 1996). Büyük ölçekli insülin üretiminde çoğunlukla *Saccharomyces cerevisiae* kullanılmaktadır fakat alternatif olarak farklı maya suşları örneğin *Pichia pastoris* denenmektedir (Hollenberg ve Gellissen 1997, Porro vd 2005).

Prokaryotlar arasından *E.coli* yüksek verimi, basit kültür ortamı, kolay kullanımı ve maliyeti çok uygun olduğu için tercih edilmektedir fakat bunun yanında bazı dezavantajları vardır. Gen ekspresyonu için istenmeyen indükleyiciler, hücre içi

bulaşıklar, proteolitik sindirim, modifikasyon eksikliği bunlardan bazılarıdır (Sahdev vd 2008).

Rekombinant protein üretiminde *S. cerevisiae* günümüzde sıklıkla kullanılan bir konakçı olmasına rağmen son yıllarda *Pichia pastoris* (Gurramkonda vd 2010, Kjeldsen vd 1999, Pais vd 2003) , *Hansenula polymorpha* (Gellissen ve Melber 1996, Weydemann vd 1995) *Pichia methanolica* (Raymond vd 1998) gibi alternatif mayalar kullanılmaya başlanmış ve rekombinant heterolog protein üretiminde önemli bir yere sahip olmuşlardır. Geçtiğimiz on yıl içinde özellikle *P. pastoris* adı verilen metilotrofik maya heterolog protein üretiminde yaygın bir şekilde kullanılan ekspresyon sistemi haline gelmiştir. Bu sistemin yaygın hale gelmesindeki başlıca faktörler;

- Genetik modifikasyon için gereken tekniklerin kolaylığı ve mayanın gelişimi için gerekli olan ortam ve kültür koşullarının basitliği,
- Memeli hücreleriyle kıyaslandığında daha ucuz ve basit büyüme ortamına ihtiyaç duyması,
- Hücre içi ve hücre dışı olarak yüksek protein ekspresyon seviyelerine ulaşabilmesi,
- Metanol katabolizmasında ilk enzim olan Alkol Oksidaz I (*AOX1*) gen promotorunun kontrollü gen ekspresyonu için uygun olması,
- Entegre edilen hedef genin kararlı bir şekilde ekspresyonunun yapılması,
- Diğer mikrobiyal organizmalarla karşılaştırıldığında, fermentör sistemlerinde yüksek hücre yoğunluğuna ulaşabilmesi,
- Ekspresyon sistemine ticari olarak satılan kit şeklinde ulaşılabilir olması olarak sayılabilir (Cereghino ve Cregg 2000, Cregg vd 1993).

Pichia pastoris, rekombinant protein üretiminde sıklıkla kullanılan konakçı olarak geliştirilmiş metilotrofik bir mayadır. *P. pastoris*'te bugüne kadar çok sayıda farklı proteinin üretimi gerçekleştirilmiştir. Tek hücreli maya olan *P. pastoris*, bakteriler gibi ucuz üreme ortamlarında hızlı bir şekilde çoğalabilir. Bunun yanında ökaryotik olan *P. pastoris*, bakterilerin yapamadıkları ökaryotik proteinler için önemli olan polipeptid katlanması, disülfid bağı oluşumu ve glikozilasyon gibi post-tranlasyonel değişiklikleri yapabilirler (Hagenson, 1991). Bu da *Pichia* ekspresyon sistemini ökaryotik proteinlerin rekombinant üretimi için bakterilere göre daha avantajlı kılar. Heterolog protein üretiminde *P. pastoris* konakçı sistemleri, kolay genetik manipulasyon olanağı ile birlikte ölçeklendirilebilir hücre yoğunluklarına da ulaşılmasını sağlar. *S. cerevisiae* ile karşılaştırıldığında, *P. pastoris* sisteminde, daha iyi bir sekresyon verimi yanında daha yüksek miktarlarda doğru katlanmış ve glikozillenmiş rekombinant protein üretimi gerçekleştirilir (Cereghino ve Cregg 2000; Macauley-Patrick vd. 2005).

Bunun yanında, çok güçlü tetiklenebilir *AOX1* ve yapısal *GAP* gibi promotorlara sahip vektörlerin varlığı, rekombinant protein üretiminde konakçı-vektör dizaynı yaparken çok büyük esneklik ve kolaylıklar sağlamaktadır (Cregg vd 2000).

Bu çalışmada PZR işlemi ile, pUC57-IP kalıbındaki IP genine InsHIS (Not) ve InsXhoI primerleri kullanılarak histidin etiketi (6 adet histidin amino asidi) eklenmiştir.

pPICZ α vektörü ile IPhis fragmentinin ligasyonu yapılmıştır. pPICZ α -IP-6XHis ekspresyon vektörü oluşturulmuştur. Metilotrofik bir maya olan *P. pastoris* 'te dizayn edilmiş olan insülin hormonu vektörü pPICZ α -IP-6XHis vektörü ile *AOX1* promotörü altında üretilmiştir. Ayrıca genetik mühendisliği teknikleri kullanılarak geliştirilmiş bir maya suşunun endüstriyel olarak değerlendirilebilmesi için temel veriler elde edilmeye çalışılmıştır. Klonların, engelli erlenlerde protein ekspresyonu çalışmaları yapılmıştır. Engelli erlen sonucuna göre fermentör üretimi yapılmıştır. Yapılan üretim çalışması esnasında belirli zaman aralıklarında alınan örneklerden santrifüj yardımıyla süpernatantlar elde edilmiş ve bu örneklerde SDS-PAGE, western blot analizleriyle üretilen protein tayin edilmeye çalışılmıştır. İnsan insülin hormonuna dönüştürülebilmesi için gelecekteki çalışmalara ışık tutması amaçlanmıştır.



2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI

2.1. İnsülin

İnsülin, pankreasın beta hücreleri tarafından üretilen ve vücutta karbonhidrat kullanımını düzenleyen polipeptit yapılı bir hormondur (Shivanand ve Noopur 2010).

Diyabet (şeker hastalığı), popülasyon içinde teşhis edilmiş, bir o kadar da teşhis edilememiş olarak bulunan ve insanlar arasında en yaygın olarak görülen hastalıklardan birisidir. İnsülin hormonunun yokluğu, yetersizliği veya etkisizliği nedeniyle hiperglisemi (yüksek kan şekeri) ile birlikte özel komplikasyonlara yol açan bir hastalıktır. Tedavi edilmediği durumlarda bu hastalığın uzun süreli etkisi çeşitli organ hasarları ve yetmezlikleri ile sonuçlanmaktadır (Brownlee 2001).

Dünya sağlık örgütü her yıl yaklaşık 2.9 milyon ölümün diyabetle ilişkisi olduğunu tahmin etmektedir. İnsülin, diyabet hastalığının tedavisinde kullanılan ve kan şekerini düşürücü etkiye sahip bir hormondur. Elli bir amino asitten (aa) oluşan polipeptit yapısındaki bu hormon vücutta glukoz dengesini sağlamak için hayati bir öneme sahiptir (Ahmad 2004).

Normal bir insan vücudunda pankreas, beslenme sonucunda gıdaların enerjiye dönüşümünü sağlayabilmek için insülin üretimi gerçekleştirir. Bu durum bütün insanların insüline gereksinimi olduğunu bir göstergesidir. Diyabet hastalarında ise pankreas yeterli miktarda insülini üretemez ve insülini hücreler (karaciğer, yağ ve kas hücreler vb.) gereğince kullanamazlar. Bu durum sonucunda şeker hastalığı ortaya çıkmaktadır ve şeker ihtiyacını dışarıdan alarak karşılamaları gerekmektedir (Anonim 2016).

2.2. İnsülin Üretimi

Son yıllarda şeker hastalığının görülme sıklığının artması insüline olan ihtiyacı da arttırmıştır. 1920'li yılların başlarından itibaren diyabet, domuz ve sığır pankreasından elde edilen insülinle tedavi edilmekteydi. İnsülinle tedavi gören bir hasta için günlük ortalama doz yaklaşık olarak 40-60 U yani 1.4-2.1 mg arasındadır. Dünyanın endüstrileşmiş kısmında yılda 130.000 mega U insülin diyabet hastalarını tedavi etmek için kullanılmakta ve her yıl insüline olan ihtiyaç %3-4 oranında artış göstermektedir (Kjeldsen 2000).

Domuz ve sığır insülini aralarındaki farklılıklardan dolayı şeker hastalığının tedavisinde bu insülinlerin kullanımı sonrasında antikor gelişme olasılığı oldukça fazladır. Son 10 yıl içerisinde hayvanlardan elde edilen insülin biyolojik ve kimyasal reaksiyonlarla insan insülinine benzeyecek şekilde değişime uğratarak yarı sentetik olarak elde edilmeye başlanmıştır. Ancak moleküler biyoloji ve biyoteknoloji alanındaki gelişmelerle birlikte insan vücudunun ürettiği insülinin yapısı ile aynı olacak şekilde genetik mühendisliği teknikleriyle biyosentetik insan insülinleri bakteriler ve mayalar kullanılarak rekombinant DNA teknolojisi ile üretilmeye ve şeker hastaları tarafından yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Heinemann ve Richter 1993).

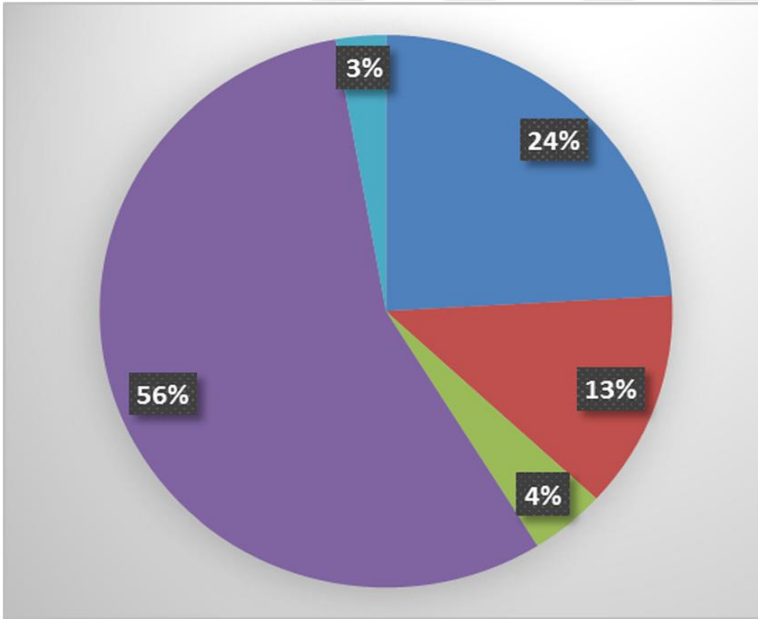
2.3. Rekombinant İnsülin Üretimi

İnsülin rekombinant olarak üretilen ilk üründür ve 1982 yılında insanlar üzerinde uygulanması Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (U.S.A Food and Drug Administration, FDA) tarafından onaylanmıştır (Ferrer-Miralles vd 2009, Walsh 2005).

İnsülin üretimi için kullanılan ilk konakçı sistemi iki farklı *E. coli* suşunda A ve B zincirlerinin ayrı ayrı üretilmesi ve taşıyıcı proteinlere kaynaştırılmasına dayanıyordu (Heinemann ve Richter 1993, Schmidt vd 1999). Son zamanlarda insan insülini rekombinant protein olarak farklı yollarla üretilabiliyor (Schmidt vd 1999).

Rekombinant biyofarmasotik üretiminde (Şekil 2.1) çoğunlukla memeli hayvan hücreleri kullanılmıştır. Fakat günümüzde ihtiyacın artması ile mayalar, bakteriler, transgenik bitki ve hayvanlarında kullanımının arttığı görülmektedir. İnsülin üretiminde de *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Pichia pastoris* genellikle kullanılan mikroorganizmalardandır (Baeshen vd 2014).

İlk olarak *Escherichia coli* (*E. Coli*) ve *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*)’da üretilmeye başlanmış, ancak son zamanlarda rekombinant insülin üretiminde *Pichia pastoris* adı verilen mayanın kullanıldığı çalışmaların sayısı artmıştır (Ahmad 2004).



Şekil 2.1. Farklı konakçı sistemlerinde üretilen biyofarmasötiklerin dağılımı Mavi renk: *E.coli*, Kırmızı renk: Mayalar, Yeşil renk: Böcek hücre hatları, Mor renk: Memeli hücre hatları, Mavi renk: Transgenik bitki ve hayvanlar (Baeshen vd 2014)

2.3.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli en fazla çalışılan mikroorganizmalardan birisidir. Genetik yapısı nedeniyle hızlı çoğalabilmesi ve maliyetinin düşük olması avantajlarından bazılarıdır (Ahmad 2004).

E. coli'nin sitoplazmasında çözünmeyen inklüzyon cisimcikleri şeklinde proinsülin üretilir, çözündürülerek ve yeniden katlanma işlemleriyle insan insülini elde edilir. Yapılan bu işlemin en büyük avantajı proinsülinin yüksek miktarlarda üretilmesidir, fakat saflaştırma işleminin spesifikliği ve peptit katlanması sırasında doğru disülfid bağı oluşumu kritik maliyet faktörleri olarak belirtilmektedir (Nilsson vd 1996, Sung vd 1986).

E. coli'de alternatif olarak proinsülin üretilir ve rekombinant proteini periplazmik boşluğa yönlendirecek uygun sinyal dizileri kullanarak salgılanır. Ancak hücre içi proinsülin üretim verimi ile kıyaslandığında doğru şekilde katlanmış proinsülin verimi bu metotta daha düşüktür (Chan vd 1981, Talmadge vd 1981).

2.3.2. *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisia en yaygın kullanılan mayadır. Genom dizisi belirlenen ilk ökaryotik canlı olarak uzun yıllardır kullanılmaktadır. Endüstriyel anlamda da en çok kullanılan mikroorganizmadır. Büyük ölçekli kültür ortamındaki geniş deneyimlerden dolayı *S. cerevisia* IP salgılanması için de ilk maya bazlı konakçı sistemi olarak kullanılmıştır (Kjeldsen vd 1997, Thim vd 1986). *S. cerevisiae*'da α -faktör lider dizisi kaynaştırılmış proinsülinin ekspresyonu kültür süpernatantında etkili bir proinsülin ya da insülin salgılanmasıyla sonuçlanmamıştır. Ancak, proinsülin benzeri molekül kodlayan cDNA ekspresyonu, α -faktör liderine küçük peptitler eklenerek tek zincirli proinsülin benzeri moleküllerin üretilmesiyle sonuçlanmıştır (Thim vd 1986).

S. cerevisiae, basit kültür koşullarında gelişebilmek, genetik tekniklerin gelişmiş ve kolay olması, endüstriyel üretim ve büyük ölçekte sahip olunan çok fazla deneyim, hem de tipik ökaryotik protein modifikasyonları gibi (translasyon sonrası glikozilasyon gibi) birçok önemli özelliğe sahiptir. Ayrıca metilotrofik maya olan *S. cerevisiae* ile üretilen proteinler toksin DNA ihtiva etmezler. Bu özellikleri ile, özellikle gıda ve ilaç endüstrisi için üretilen proteinler açısından çok önemlidir (Baeshen vd 2014).

Rekombinant protein üretiminde *S. cerevisiae* yaygın kullanılan bir konakçı sistemi olmasına rağmen son yıllarda *Pichia pastoris* (Kjeldsen vd 1999, Pais vd 2003, Wang vd 2001) , *Hansenula polymorpha* (Gellissen ve Melber 1996) , *Pichia methanolica* (Raymond vd 1998) gibi alternatif mayalar kullanılmaya başlanmış ve rekombinant heterolog protein üretiminde önemli bir yere sahip olmuşlardır. Geçtiğimiz on yıl içinde özellikle *P. pastoris* adı verilen metilotrofik maya heterolog protein üretiminde yaygın bir şekilde kullanılan ekspresyon sistemi haline gelmiştir.

İnsülin üretiminde konakçı olarak kullanılan *Pichia pastoris*, *S. cerevisiae* ve *E.coli* gibi mikroorganizmaların ekspresyon sonucu verimleri aşağıda belirtilmiştir (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Konakçı sistemlerin insan insülin hormon üretimi açısından karşılaştırılması (Baeshen vd 2014)

Kaynak	<i>E.coli</i>	<i>E.coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>P. pastoris</i>
Salgılama bölgesi	H.içi	H.dışı	H.dışı	H.dışı
Biyokütle hücre kuru ağırlığı (g / l)	80, kesikli beslemeli	1.2, shake flask	5, shake flask	59, biyoreaktör
Tipik spec. büyüme oranı (1 / h)	0.08– 0.12	-	< 0.33	<0.03
Tipik spec . üretim hızı (mg / gh)	14.2	3.4	0.21	0.375
Ürün konsantrasyonu (g / L)	4.34	0.009	0.075	3.075
	1.085	4.01	1.04	17
Verimlilik (mg / l h)				
Referans	(Shin vd 1997)	(Mergulh ao vd 2004)	(Kjeldsen 2000)	(Gurramko nda vd 2010)

2.3.3. *Pichia pastoris*

P. pastoris, enerji ve karbon kaynağı olarak metanolü kullanır. Tek hücreli bir mayadır ve bakteriler gibi ucuz üreme ortamlarında hızlı bir şekilde çoğalabilir. Bununla birlikte ökaryotik olduğu için, bakterilerin yapamadıkları ökaryotik proteinler için elzem olan protein katlanması, disülfid bağı oluşumu ve glikozilasyon gibi post-tranlasyonel değişiklikleri yapabilirler (Hagenson 1991). Bu da *Pichia* konakçı sistemini ökaryotik proteinlerin rekombinant üretimi için bakterilere göre daha avantajlı kılar. Heterolog protein üretiminde *P. pastoris* konakçı sistemleri, kolay genetik manipulasyon olanağı ile birlikte ölçeklendirilebilir hücre yoğunluklarına da ulaşılmasını sağlar. *S. cerevisiae* ile karşılaştırıldığında, *P. pastoris* sisteminde, daha iyi bir ekspresyon verimi yanında daha yüksek miktarlarda doğru katlanmış ve glikozillenmiş rekombinant protein üretimi gerçekleştirilir (Cereghino ve Cregg 2000, Macauley-Patrick vd 2005).

Bunun yanında, çok güçlü tetiklenebilir *AOX1* ve yapısal *GAP* gibi promotorlara sahip vektörlerin varlığı, rekombinant protein üretiminde konakçı-vektör dizaynı yaparken çok büyük esneklik ve kolaylıklar sağlamaktadır. *P. pastoris* sisteminde heterolog proteinlerin ekspresyonu, genellikle *AOX1* promotoru altında gerçekleştirilir. *AOX1* promotorunun çalışmalarda en sık kullanılan promotor olmasının sebepleri arasında, çok güçlü olması ve karbon kaynakları tarafından çok sıkı bir şekilde regüle edilmesine ek olarak *P. pastoris*'te karakterize edilen ilk promotor olmasıdır (Cereghino ve Cregg 2000). *AOX1* promotoru bu zamana kadar kullanılmış olan en güçlü ve en kolay kontrol edilebilen promotorlardan birisidir. Bu özellik sayesinde metilotrofik mayalar, metanol tarafından tetiklenen promotorların altında heterolog protein üretilmesinde çekici birer konukçu organizma haline gelmişlerdir (Cregg vd 2000).

Diğer özelliklerinin yanında yapısal ve tetiklenebilir maya promotorlarında göz önünde bulundurulmalıdır. *P. pastoris* için yapısal ve tetiklenebilir promotorlar Çizelge 2.2’de belirtilmiştir (Çelik ve Çalık 2012).

Çizelge 2.2. *Pichia pastoris* yapısal ve tetiklenebilir promotorları (Çelik ve Çalık 2012)

Promotor	Tür
AOX1	Tetiklenebilir (metanol)
AOX2	Tetiklenebilir (metanol)
FLD1	Tetiklenebilir (metanol, metilamin)
GAP	Yapısal
PEX8	Tetiklenebilir (metanol, oleat)
YPT1	Yapısal

P. pastoris ekspresyon sisteminin *S. cerevisiae* ve diğer benzer mayalara göre daha avantajlı olmasının da iki sebebi vardır.

A) *P. pastoris*, *S. cerevisiae*’nin tersine fermentatif bir maya olmadığı için glukozun nerdeyse tamamı substrat haline dönüşür. *S. cerevisiae* gibi glukoz, etanole ve diğer organik asitlere çevrilmez ve bu özellik de *P. pastoris*’in aerobik şartlarda yüksek hücre konsantrasyonuna çıkmasını sağlar.

B) *P. pastoris*’te gelişimi engellemeyen koşullarda her iki alkol oksidaz geni, *AOX1* ve *AOX2*, glukoz, etanol, gliserol, asetat gibi karbon kaynaklarında baskılanmakla birlikte, tek karbon kaynağı olarak metanol olan bir ortama transfer edildiklerinde daha yüksek miktarda indüksiyonları gerçekleşmektedir. *AOX1* promotorunu baskılamayan sorbitol, mannitol ve alanin gibi başka karbon kaynakları bulunmaktadır. Fakat ekspresyon için mutlaka metanole gereksinim duyulmaktadır (Inan vd 2006).

P. pastoris’in gelişmesi için metanolü karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. Metanolün katabolik yolla parçalanmasında rol alan alkol oksidaz enzimi, metanolde gelişme esnasında toplam hücre proteinin %30’unu oluşturacak seviyeye ulaşır (Cregg vd 1993). Bu kadar yüksek miktarda alkol oksidazın sentezlenmesinin sebebi ise, alkol oksidaz enziminin oksijene afinitesinin düşük olması ve bu dezavantajı ortadan kaldırmak için fazla miktarda alkol oksidaz enziminin üretilmesidir. Dolayısı ile *AOX1* promotorunun yüksek seviyede ekspresyon edilmesi, bu mayayı rekombinant protein üretimi için avantajlı hale getirmektedir. Metanol *AOX1* promotorunda indüksiyona neden olurken glukoz ya da etanol gibi diğer karbon kaynakları *AOX1* promotorunun represyonuna sebep olmaktadır (Cereghino ve Cregg 2000, Cregg vd 2000, Cregg vd 1989). Yani *AOX1* promotoru glukoz, etanol gibi genel karbon kaynaklarında aktif değildir bu özelliği de toksik proteinlerin üretimi için bir avantajdır (Inan ve Meagher 2001).

Yukarıda anlatılan bilgiler heterolog protein üretimi için *P. pastoris*'in ne kadar uygun bir ekspresyon sistemi olduğunu göstermektedir. Diyabet tedavisinde kullanılan insülin hormonunu üretmek için yine *P. pastoris* ekspresyon sistemi günümüzde sıkça kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda insülin öncüleri rekombinant olarak üretilip daha sonra aktif insülin formuna dönüştürülmektedir.

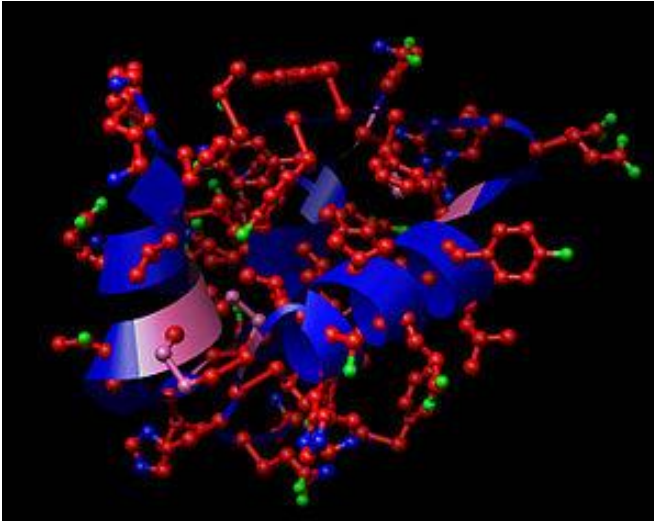
2.3.4. Transgenik Bitki ve Hayvanlar

Ökaryotlardan transgenik bitkiler posttranslasyonel yapıları nedeniyle insülin üretiminde kullanılmışlardır. Maliyetleri, yüksek oranda protein stabiliteyi, protein yapıları ve patojen risklerinin az olması kullanılma sebeplerinden bazılarıdır. Örneğin; *Arabidopsis thaliana*, tütün ve marul bunlardan birkaçıdır (Baeshen vd 2014).

2.4. İnsülinin Kimyasal Yapısı

Pankreastaki langerhans adacıklarının beta hücreleri tarafından üretilen insülin, 51 aminoasitten oluşan ve 5808 dalton molekül ağırlığına sahip bir hormondur. Vücuttaki karbonhidrat ve yağ metabolizmasından sorumludur. Molekül yapısı iki aminoasit zincirinden oluşmaktadır ve zincirler birbirlerine iki disülfür köprüsü ile bağlanmıştır. İnsülin pre-pro diye bilinen tek bir polipeptit olarak sentezlenmektedir. İnsülin, pankreasın beta hücrelerinden ilk olarak pre-proinsülin olarak üretilir 84 aa'ten oluşur ve daha sonra 33 aa'lık kısmın kimyasal yollarla uzaklaştırılır. Sinyal peptidi polipeptit içerisinde yayılarak aktif insüline dönüştürülür (Vajo vd 2001).

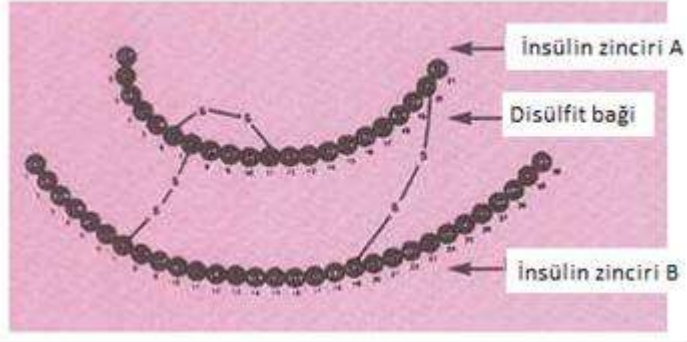
İnsülin hormonu küçük bir proteindir. 21 tanesi A zinciri ve 30 tanesinin de B zinciri üzerinde bulunan 51 amino asitten oluşan polipeptit yapıda proteindir. Bu iki zincir bir disülfid bağı (Şekil 2.2) ile bağlanır (Vajo vd 2001).



Şekil 2.2. İnsülin proteinin üç boyutlu yapısı

İnsülini kodlayan gen dizileri insan genomunun on birinci kromozomun kısa kolunun üzerinde bulunmuştur. Bu DNA, 63 ü A zincirinde ve 90 tanesi de B zincirinde olmak üzere 153 zincirden oluşur. Heliksel yapıdaki iki uzun DNA sarmalı, her biri bir şeker deoksiriboza, bir fosfat ve azot kökünden oluşan bir nükleotidler zincirinden inşa

edilir. Dört farklı azot bazı vardır; adenin, timin, sitozin ve guanindir. İnsülin gibi özel bir proteinin sentezi bu köklerin tekrar edildikleri bir zincir ile ortaya çıkmıştır (Shivanand ve Noopur 2010).



Şekil 2.3. İnsülin zinciri

İnsülin proteininin kimyasal yapısı türler arasında farklılık göstermektedir. Ayrıca domuz ve sığırdan elde edilen insülin ile insan vücudunun ürettiği insülin arasında yapısal farklılıklar vardır (Aytan 2011).

Sığır insülinin, 3 aminoasidi insan insülininden farklıdır. Hem A hem de B zincirinde farklılıklar gösterir. A zincirinde insan insülinindeki 8. ve 10. amino asitler ve B zincirindeki 30. amino asitler farklıdır. Domuz insülini, insan insülininden B zincirindeki 30. aminoasitin farklı olmasıyla ayrılır. İnsan insülinine en yakın olan domuz insülinidir (Heinemann ve Richter 1993).

2.5. Çalışmanın Temeli ve Kapsamı

İnsülin öncülerini kodlayan DNA fragmenti kimyasal yolla GenScript (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Üretilen proteinin moleküler ağırlığı 7.8 kDa'dır.

```
SEQ insulin sipariş: 212 bp;
Composition 57 A; 36 C; 50 G; 69 T; 0 OTHER
Percentage: 26.9% A; 17.0% C; 23.6% G; 32.5% T; 0.0%OTHER
Molecular Weight (kDa): ssDNA: 65.67 dsDNA: 130.68
COLOURS
sequence = 1
features = 0
ORIGIN
1      CTCGAGAAGA GAGAAGAAGC TGAAGCTGAA GCTGAACCAA AGTTTGTTAA CCAACATTTG
61      TGTGGTTCTC ATTTGGTTGA AGCTTTGTAC TTGGTTTGTG GTGAAAGAGG TTTCTTCTAC
121     ACTCCAAAGG CTGCTAAGGG TATTGTTGAA CAATGTTGTA CTTCTATTG TCTTTGTAC
181     CAATTCGAAA ACTACTGTAA CTAAGCGGCC GC
```

Şekil 2.4. İnsülin geni DNA dizilimi

LEKR**EEAEAEAPK** FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPK**AAK**GIVEQCCTSI**CS**LYQFENYCN
 LEKR**EEAEAEAPK** FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPK**AAK**GIVEQCCTSI**CS**LYQFENYCN**HHHHHH**
 EFFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPK**AAK**GIVEQCCTSI**CS**LYQFENYCN
 LEKRFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPK**AAK**GIVEQCCTSI**CS**LYQFENYCN
 spacer B chain (29 aa) linker A chain (21 aa) Histag

51 aa ~ 5.8 kDa human insulin

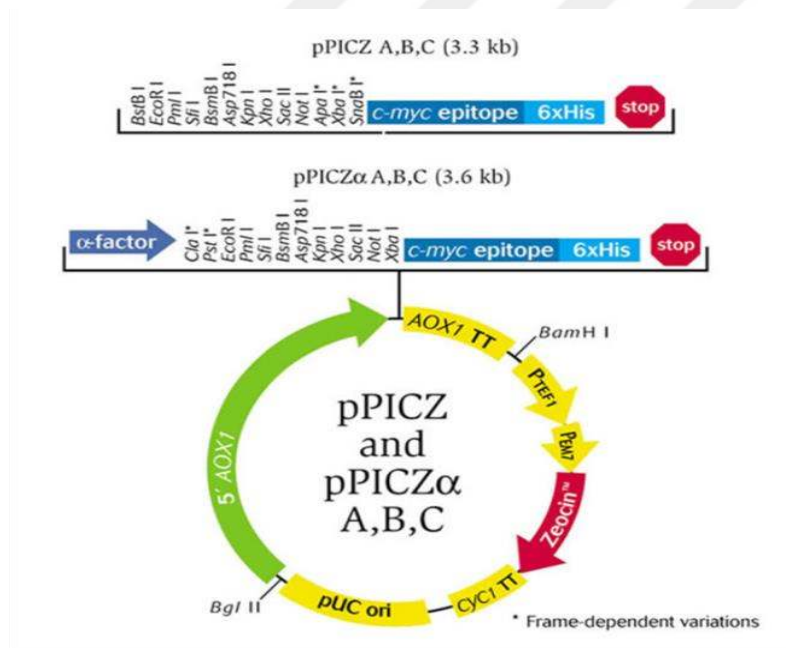
63 aa ~ 7 kDa

69 aa ~ 7.8 kDa

Bir genin vektöre klonlanması için vektörün kesim bölgeleri ve promotor bölgesi dikkate alınır. Vektör seçimi konakçı organizmaya göre belirlenir. Seçilen organizmaya uygun olan vektörler arasından yapılacak olan çalışmaya uygun olan vektör seçilir. *Pichia pastoris* mayası ile yapılacak bir çalışma için pPICZaA, pGAPZ ve pPBGP1 vektörleri uygun görülmüştür (Routledge vd 2016).

Bu tez kapsamında rekombinant insülin üretiminde *AOXI* promotörü altında pPICZaA vektörü kullanılmıştır. Salgılama sekansı olarak alfa sinyal sekansı kullanılmıştır.

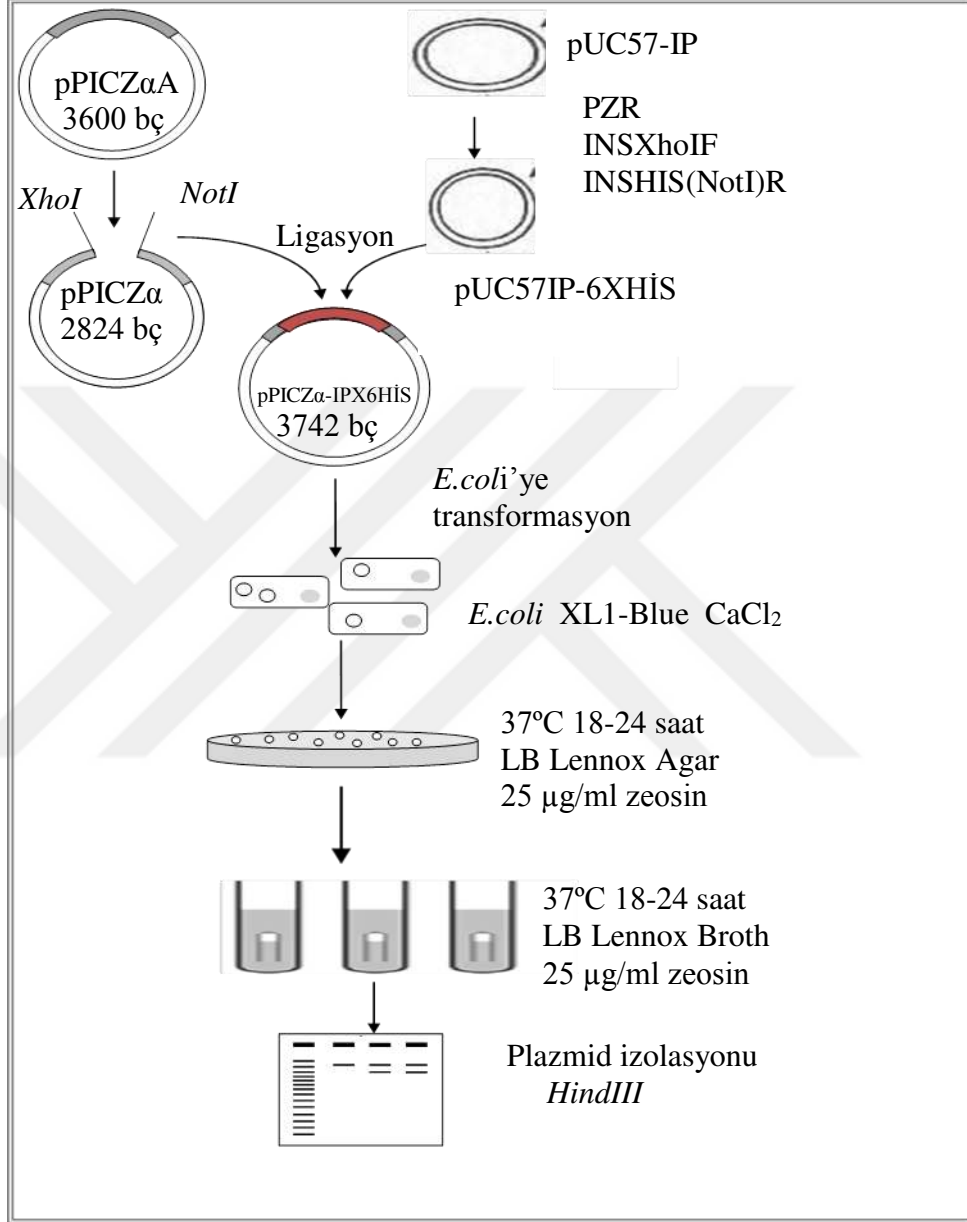
Klonlama işlemleri için klonlama vektörleri Fermentas(ABD) firmasından ve protein ekspresyonu için pPICZαA Invitrogen(CA, ABD) firmasından temin edilmiştir (Şekil 2.4). pUC57-IP parçası kullanılmıştır.



Şekil 2.5. pPICZαA ekspresyon vektörünün şematik gösterimi

PZR işlemi ile, pUC57-IP kalıbındaki IP genine InsHIS (Not) ve InsXhoI primerleri kullanılarak histidin etiketi (6 adet histidin amino asidi) eklenmiştir. pPICZα

vektörü ile IPHis parçasının ligasyonu yapılmıştır. pPICZ α -IP-6XHis ekspresyon vektörü oluşturulmuştur. Engelli erlen üretimi yapılmıştır. Gelecek çalışmalara öncülük etmesi için fermentör üretimi yapılarak standart insülin elde edilmeye çalışılmıştır.



Şekil 2.6. pPICZ α -IP-6XHis ekspresyon vektörünün oluşturulması

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasallar ve restriksiyon enzimleri

Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar moleküler biyoloji kalitesinde olup Sigma-Aldrich Co. (MO, ABD), Difco (Fransa), Merck (Almanya) markalarından temin edilmişlerdir. Restriksiyon enzimleri Thermo Fisher Scientific (MA, ABD) firmasından temin edilmiştir.

3.1.2. Tampon ve stok çözeltileri

Tüm tamponlar ve stok çözeltileri saf su ile hazırlanmış, 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak (Nüve, İngiltere) ya da 0,22 µm filtreden geçirilerek (Corning, MA, ABD) sterilize edilmiş, 4°C ya da oda sıcaklığında muhafaza edilmişlerdir.

3.1.3. Mikroorganizmalar ve enzimler

Çalışmamızda kullanılan *P. pastoris* X33 ve PDI, *E. coli* XL1-Blue suşları kullanılmıştır. Genotip özellikleri ile birlikte Çizelge 3.1'de verilmiştir.

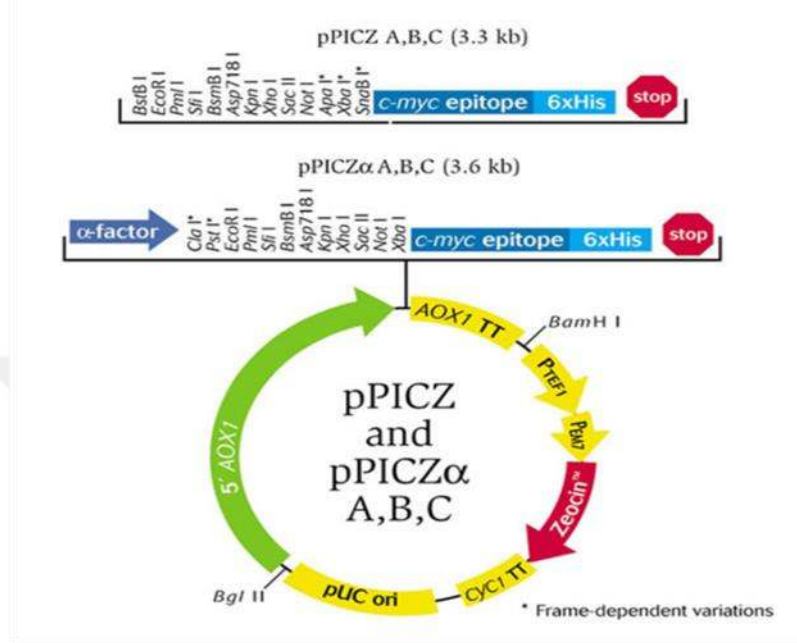
Tüm mikroorganizmalar %25 gliserol içeren uygun besiyeri içinde -80°C'de muhafaza edilmişlerdir. Çalışmada kullanılacak olan suşlar ana stoktan agar plakalara tek koloni düşecek şekilde çizim yapılarak uygun sıcaklık ve süre boyunca (*P. pastoris* 30°C'de 3 gün, *E. coli* 37°C'de 1 gün) inkübatörlerde bekletilerek geliştirilmiş ve +4°C'de muhafaza edilmişlerdir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar

Suş	Genotip	Kullanım yeri ve amacı	Kaynak
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1</i> <i>gyrA96 thi-1</i> <i>hsdR17 supE44</i> <i>relA1 lac [F'</i> <i>proAB lacIqZΔM15</i> <i>Tn10 (Tetr)]</i>	Plazmidlerin çoğaltılması ve saklanması	Stratagene, CA, ABD
<i>P. pastoris</i> X-33	yabanıl suş	Kontrol ve konukçu	Invitrogen, CA, ABD
<i>P. pastoris</i> PDI	yabanıl suş	Kontrol ve konukçu	Nebraska Üniversitesi

3.1.4. Plazmidler

İnsan insülin hormonunu sentezleyen insülin geni GenScript (ABD) firmasından pUC57-IP plazmidi içerisinde liyofilize şekilde temin edilmiştir. Protein ekspresyonu için, pPICZαA vektörü (Invitrogen CA, ABD) kullanılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. pPICZαA ekspresyon vektörünün şematik gösterimi

3.1.5. Besiyerleri, gelişim ortamları ve antibiyotikler

P. pastoris suşlarının geliştirilmesinde YPD (%1 maya özütü, %2 pepton, %2 glukoz), *E. coli* için LB Miller (10 g/L tryptone, 5 g/L yeast extract ve 10 g/L NaCl) ya da LB Lennox (10 g/L tryptone, 5 g/L yeast extract ve 5 g/L NaCl) ortamları kullanılmıştır.

Kullanılan sıvı ve katı besiyerlerine kullanılan plazmidin üzerindeki direnç genine göre uygun antibiyotik ilaveleri yapılmıştır. Zeosin (InvivoGen, CA, ABD) ve ampicilin (Roche, Almanya) antibiyotiklerinin stok solüsyonları 100 mg/ml konsantrasyonunda hazırlanmış ve 0.22 µm filtreden (Corning, MA, AB) geçirilerek sterilize edilmiş ve 1'er ml alikotlanarak -20°C'de saklanmışlardır. Antibiyotikli besiyeri hazırlamak için, otoklav ile sterilize edilen besiyerleri 55°C'ye soğutulduktan sonra, buz üzerinde çözdürülmüş olan antibiyotiklerden, *E.coli* suşları için 25 µg/ml zeosin veya 100-150 µg/ml ampicilin, *P. pastoris* suşları için ise 100 µg/ml zeosin olacak şekilde ilaveler yapılmıştır.

İnsülin ekspresyonunu gerçekleştirmek için rekombinant *P. pastoris* hücreleri Buffered Glycerol-Complex Medium (BMGY) (10 g/l maya ekstraktı, 20 g/l pepton, 13.4 g/l YNB, 4 × 10⁻⁵ g/l biotin, 10 g/l gliserol ve 0.1 M potasyum fosfat

tamponu, pH 7.0) ve Buffered Methanol-Complex Medium (BMMY) (10 g/l maya ekstraktı, 20 g/l pepton, 13.4 g/l YNB, 4×10^{-5} g/l biotin, %10 saf metanol ve 0.1 M sodyum sitrat tamponu, pH 7.0) ortamlarında geliştirilmiştir.

3.1.6. Primerler

İnsülin geninin sonuna altı tane histidinden oluşan bir etiket eklemek için Polimeraz zincir Reaksiyonunda (PZR) kullanılacak olan primerler Çizelge 3.2’de verilen primerler kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. PZR’de kullanılacak olan primerler

Primer	Sekans	Kaynak
INSHIS(NotI)R	5'-GCG GCC GCT TAA TGA TGA TGA TGA TGA TGG TTA CAG TAG TTT TCG AAT TGG-3'	MetaBion
INSXhoF	5'-GGG CTC GAG AAG AGA GAA GAA GC- 3'	MetaBion

3.2. Metot

Çalışmada kullanılan moleküler teknikler kit protokollerine göre gerçekleştirilmiştir. Analizlerde kullanılan diğer bir metot kaynağı “Molecular cloning a laboratory manual” dir. *E.coli* hücrelerinin yetenekli hale getirilmesinde kullanılmıştır (Sambrook ve Russel 2001). Gen ve protein taramalarında ise Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi Ağ Servisi (Bethesda, MD, ABD; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) yararlanılmıştır.

3.2.1. Liyofilize gelen plazmid DNA’nın açılması

Liyofilize gelen plazmid DNA GenScript (ABD), üretici firmanın talimatlarına uygun olarak kapağı kapalı şekilde -20°C’de muhafaza edilmiştir. Tüp 4°C, 6000xg’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. DNA’nın çözülmesi için 40 µl TE tamponu eklendikten sonra 1 dakika vortekslenmiştir.

3.2.2. Mayadan genomik DNA izolasyonu

P. pastoris suşlarından genomik DNA izolasyonu laboratuvarımızda kullanılan metoda göre yapılmıştır. YPD plakada geliştirilen tek kolonilerden YPD sıvı besiyerine ekim yapılmış ve 28-30°C çalkalamalı inkübatörde geceboyu gelişmeye bırakılmıştır. 2 ml santrifüj tüpüne alınan gelişmiş kültürden hücreler masaüstü Centrifuge 5424 (Eppendorf, Almanya) ile maximum g’de 1 dakika santrifüjlenip ve süpernatanı atılmıştır. Pelet kısmı 200 µl lysis buffer içerisinde çözülüp ve -80°C’de tamamen donana kadar inkübasyona bırakılmıştır (Lysis Buffer: %2 Triton X-100, %1 SDS, 0.1 M NaCl, 10 Mm Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8). Daha sonra 95°’de 2 dakika bekletilip ve sonra tekrar -80°C’ye tamamen donana kadar inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlem 2 kez tekrar edilmiştir. 30 saniye güçlü vorteks işlemi uygulanmıştır. 200 µl

kloroform eklenilmiş ve 2 dakika güçlü vorteks yapılmıştır. Daha sonra 20000xg'de 3 dakika santrifüj yapılmıştır. Steril 1.5 ml'lik eppendorf tüplere 400 µl soğuk %100 ethanol konmuştur ve bir önceki aşamada santrifüj sonu oluşan en üstteki faz tüplere konulmuştur. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra 20000xg'de 5 dakika santrifüj yapılmış ve süpernatanı dökülmüştür. Tüplerin üzerlerine 500 µl %70 soğuk ethanol eklenmiştir ve 20000xg'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Bundan sonra tüplerdeki ethanol dökülmüş ve kapakları açık şekilde Concentrator Plus (Eppendorf, Almanya) cihazında 60°C'de 5 dakika kurutulmuştur. Vakum altında kurutulan DNA peleti 20 µl TE buffer içinde çözülmüş, 1 µl RNase enzimi ilavesi ile 37°C'de 3-5 saat inkübe edilerek içerdiği RNA'ların parçalanması sağlanmıştır. Elde edilen genomik DNA +4°C'de saklanmıştır.

3.2.3. Plazmid izolasyonu

E. coli'den plazmid izolasyonu Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak kit protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Plazmidin taşıdığı direnç genine uygun antibiyotikli LB Miller ya da LB Lennox sıvı besiyerinde 37°C çalkalamalı inkübatörde 18 saat geliştirilen kültürlerden hasat edilen hücreler RNase A içeren Tris-Cl-EDTA tamponunda resüspanse edilmiştir. NaOH/SDS tamponunda hücreler parçalanmış, asidik potasyum asetat eklenmesi ile lizat nötrale edilmiştir. Lizatın santrifüjlenmesi ile denatüre olmuş proteinler, kromozomal DNA ve hücre artıkları çöktürülmüş, süpernatantta çözülmüş halde kalan plazmid DNA'nın miniprep kolonundan geçirilerek kolona tutunması sağlanmıştır. Etanol içeren yıkama çözeltisinin kolondan geçirilmesi ile tuzlar uzaklaştırılmış ve elüsyon tamponu (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) ile plazmid kolondan alınmıştır.

3.2.4. Agaroz jel elektroforezi

PZR ürünlerinin, genomik DNA'ların ve plazmidlerin doğrulaması agaroz jel elektroforezi ile yapılmıştır. Agaroz'un (SeaChem, Lonza, ME, ABD) 1 gr tartılarak 10 ml 1X TAE tamponunda (Tris/asetat/EDTA, 40 mM Tris asetat, 1 mM EDTA) mikrodalgada ısıtılarak çözündürülmesi ile hazırlanan jelle, 60°C'ye kadar soğutulduktan sonra 2 µl etidyum bromür çözeltisi (10 mg/ml, Invitrogen, CA, ABD) eklenmiştir. Henüz katılaşmadan jel kasetine dökülen ve tarakları yerleştirilen jel katılaştıktan sonra 6X yükleme boyası ile karıştırılan örnekler kuyucuklara yüklenmiş, 1X TAE tamponu içerisinde 120 V akımda 45 dakika yürütülmüştür. Jelde boyutlarına göre farklı hızda ilerleyen DNA parçaları böylelikle birbirlerinden ayrılmış ve DNA'ya bağlanan etidyum bromürün UV ışınları altında ışıma yapması sayesinde UV jel görüntüleme kutusunda (Vilber Lourmat EBox-VX2, Fransa) görüntülenmişlerdir.

DNA standardı olarak GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD) kullanılmıştır. DNA standardı, 6X jel yükleme boyası ve steril ultra saf su ile 1:10 seyreltilerek kullanıma hazır hale getirilmiş ve kuyucuklara 5 µl olarak yüklenmiştir.

3.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PZR, KOD Hot Start DNA Polymerase (EMD Biosciences, San Diego, CA, ABD; önceden Novagen) kullanılarak ve kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilmek istenen DNA parçasının büyüklüğüne ve kullanılan primerlerin çözülme sıcaklıklarına (T_m) göre uyarlama yapılarak uygulanan standart protokol aşağıdaki gibidir.

0.5 μ l PZR tüplerinde oda sıcaklığında ya da buz üzerinde aerosol filtreli pipet uçları ile hazırlanan 50 μ l reaksiyon karışımı için:

Çizelge 3.3 PZR Döngü Parametresi Karışım Oranları

Miktar	Malzeme	Son konsantrasyon
30 μ l	Steril ultra saf su	
5 μ l	10X KOD Buffer	1x
5 μ l	dNTP karışımı (10 mM)	0.2 mM herbiri
4 μ l	MgSO ₄ (25 mM)	2.0 mM
3 μ l	5' İleri primer (10 μ M)	0.3 μ M
3 μ l	3' Geri primer (10 μ M)	0.3 μ M
1 μ l	KOD DNA Polimeraz (1 U/ μ l)	0.02 U/ μ l
1 μ l	Kalıp (genomik DNA/plazmid)	10 ng genomik DNA/1 ng plazmid
50 μ l	Toplam	

Reaksiyonun gerçekleşeceği ısı döngü cihazında (Biometra Biomedizinische Analytik GmbH, Almanya) uygulanan programda polimeraz enziminin 2 dak boyunca 95°C'de tutularak aktive olmasını takiben aşağıdaki basamaklar uygulanmıştır:

Denatürasyon	95°C'de	20 s
Bağlanma	95°C'de	20 s
Uzama	70°C'de	15 s

Program 35 döngü boyunca tekrarlanmış ve 72°C'de 2 dakika süren son uzama basamağı ile bitirilmiştir. Reaksiyonun kontrolü, karışımın 5 μ l'sinin 1 μ l 6X jel yükleme boyası ile karıştırılarak 0.5 μ g/ml etidyum bromür içeren %1 agaroz jelde yürütülmesi ve UV jel görüntüleme kutusunda hedef parçanın görüntülenmesi ile yapılmıştır.

3.2.6. PZR ürünlerinin saflaştırılması

PZR sonucu elde edilen ürünün saflaştırılması MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, Almanya) ile yapılmıştır. Temel olarak, reaksiyon karışımında bulunan PZR

ürünü DNA parçası spin-kolondan geçirilirken yüksek tuz varlığında silika membrana tutunur, diğer PZR bileşenleri (primerler, tuzlar, enzimler, fazla nükleotitler vb.) yıkanır ve saf DNA kolondan Tris tamponu ya da su ile alınır.

PZR sonucu elde edilen ürüne 5 katı hacimde bağlama tamponu eklenmiştir. pH indikatörünün renk değiştirmesi durumunda 10 µl 3 M sodyum asetat (pH 5.0) eklemesi yapılan karışım spin kolona yüklenmiş ve santrifüjlenmiştir. Kolondan 750 µl yıkama tamponu santrifüj işlemi uygulanarak geçirilmiş, süzöntü atıldıktan sonra kolon boş olarak tekrar santrifüjlenerek yıkama tamponunda bulunan etanolün tamamen uzaklaştırılması sağlanmıştır. Kolon temiz bir santrifüj tüpüne aktarılmış, membranın ortasına 10 µl elüsyon tamponu (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) eklenmiş, 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra santrifüjlenerek DNA parçası kolondan alınmıştır. Santrifüj işlemleri 17900xg hızında 1 dakika süresince Centrifuge 5424 (Eppendorf, Almanya) cihazı ile oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

3.2.7. DNA'nın jelden geri alınması

Agaroz jelde yürütüldükten sonra jelden kesilerek alınan DNA parçalarının saflaştırılması MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen, Almanya) ile üretici talimatları doğrultusunda yapılmıştır. Jelin bağlama tamponunda çözündürülmesi ve spin kolona yüklenip santrifüjlenmesi ile silika membrana bağlanması sağlanmıştır. Daha sonra membrana 10 µl elüsyon tamponu (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) eklenmiş, 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra santrifüjlenerek DNA parçasının elüsyonu yapılmıştır. Santrifüj işlemleri 17900xg hızında 1 dakika süresince Centrifuge 5424 (Eppendorf, Almanya) cihazı ile oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

3.2.8. DNA ve plazmid konsantrasyonlarının belirlenmesi

Genomik DNA, plazmid DNA ve PZR ürünü DNA parçalarının konsantrasyonlarının ölçülmesi Qubit dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, CA, ABD) ile üretici talimatlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Protokolde belirtilen oranlarda toplam 200 µl içinde hazırlanan Qubit tamponu/boya/örnek karışımının okumaları ve konsantrasyon hesaplamaları Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, CA, ABD) cihazında yapılmıştır.

3.2.9. Hücre yoğunluğunun ölçülmesi

Sıvı besiyerinde geliştirilen kültürlerin hücre yoğunluklarının ölçülmesi spektrofotometrik olarak yapılmıştır. Kültürlerin uygun besiyeri ile seyreltikten sonra Libra S50 (Biochrom, İngiltere) spektrofotometre cihazında 600 nm dalgaboyunda absorbansı ölçülerek hücre yoğunlukları belirlenmiştir.

3.2.10. Kompetent *E. coli* ve *P. pastoris* hücrelerinin hazırlanması

Kompetent *E. coli* hücreleri CaCl₂ yöntemi ile hazırlanmıştır. LB Miller plakada tek koloni düşecek şekilde geliştirilen *E. coli* suşunun 3 ml LB Miller sıvı besiyerine tek koloniden ekimi yapılarak gece boyu 37°C 225 rpm'de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün gelişen kültürün optik yoğunluğu ölçülerek 50 ml LB Miller sıvı besiyerine başlangıç OD değeri 0.01 olacak şekilde ekilerek OD değeri

0.3 olana kadar (yaklaşık 3 saat) 37°C çalkalamalı inkübatörde geliştirilmiştir. Kültür beklenen OD değerine ulaştığında 3000xg'de 4°C'de 5 dakika süre ile santrifüjlenerek hücreler hasat edilmiştir. İşlemler bu aşamadan sonra buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen hücre peleti 5 ml 0.1 M CaCl₂ çözeltisi içinde süspanse edilmiş ve 30 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. Bir önceki şartlarda santrifüjlenerek tekrar hasat edilen hücre peleti 1.5 ml %15 gliserol içeren 0.1 M CaCl₂ çözeltisi içinde resüspanse edilmiş ve 1.5 ml'lik eppendorf tüplere 100 µl olacak şekilde alikotlanmıştır. -80°C'ye kaldırılmıştır.

Kompetent *P. pastoris* hücreleri Lityum Asetat Yöntemine (Wu ve Letchworth 2004) göre hazırlanmıştır. *P. pastoris* suşu, donmuş kültürden ya da +4°C'de saklanan agar plakasındaki tek kolonilerden test tüpü içerisinde 3 ml YPD besiyerine ekilmiş, 250 d/dak 28-30°C çalkalamalı inkübatörde geceboyu geliştirilmiştir. Ertesi gün, geceboyu gelişen kültürden başlangıç OD₆₀₀ değeri 0.1 olacak şekilde 250 ml hacimli engelli erlen içerisinde 80 ml YPD besiyerine ekim yapılmıştır. OD₆₀₀ değeri 1.2-1.5 olana kadar 250 d/dak 28-30°C çalkalamalı inkübatörde geliştirilen hücreler, +4°C'de 3000 g hızında 5 dakika süre ile santrifüjlenerek hasat edilmişlerdir. Hücre peleti, 8 ml lityum asetat karışımı (100 mM LiAc, 10 mM DTT, 0.6 M Sorbitol, 10 mM Tris-HCl pH 7.4) içinde süspanse edilmiş ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. 4°C'de 3000xg hızında 5 dakika santrifüjlenerek tekrar hasat edilen hücreler 1.5 ml buz soğukluğundaki 1 M sorbitol içinde süspanse edilmiş ve 2 ml hacimli santrifüj tüpüne aktarılmıştır. 4°C'de 3000xg hızında 5 dakika santrifüjlenerek hasat edilen hücreler 3 kez 1.5 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 süspanse edilmiş, 1.5 ml'lik eppendorf tüplere 80 µl olacak şekilde alikotlanmıştır. -80°C'de saklanmıştır.

3.2.11. DNA parçalarının plazmide ligasyonu

Küt ve yapışkan uçlu DNA parçalarının vektörlere ligasyon işlemleri Thermo Fisher Scientific T₄ DNA Ligase (Almanya) kiti kullanılarak, üretici talimatlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Ligasyon reaksiyonunda 1:3 vektör: insert oranı (molar: molar) kullanılmıştır.

Ligasyon işlemi için toplam 10 µl içerisinde 50 ng vektör DNA, 150 ng insert DNA karıştırılmış, 1X T₄ DNA ligasyon tamponu varlığında 5 U T₄ DNA ligaz eklenmiştir. Oda sıcaklığında (22°C) 15 dakika inkübasyon sonrası ligasyon karışımının 1/10'u ile yetenekli maya ya da bakteri hücrelerine transformasyon işlemine devam edilmiş, karışımın kalan miktarı -20°C'de saklanmıştır.

3.2.12. Kompetent *E. coli* ve *P. pastoris* hücrelerine transformasyon

Buz üzerinde çözdürülen 100 µl kompetent *E. coli* (XL1-Blue) hücrelerine 5 µl ligasyon karışımı eklenmiş ve 30 dakika buz üzerinde inkübe edilmiştir. Daha sonra 42°C'de 60 saniye süre ile ısı şokuna maruz bırakılan hücreler 5 dakika buz üzerinde bekletilerek soğutulmuş, 200 µl LB sıvı besiyeri eklenerek 37°C çalkalamalı inkübatörde 60 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Transfer edilen plazmide uygun antibiyotik içeren (100 µg/ml ampisilin ya da 25 µg/ml zeosin) LB plakalara ekimi

yapılan transformant hücreler 37°C’de geceboyu inkübasyona bırakılmışlardır. Inkübasyon sonrası plakalarda oluşan kolonilerin kontrolü plazmid izolasyonu, restriksiyon analizi yöntemleri ile yapılmıştır.

Yetenekli *P. pastoris* hücrelerine gen transferleri elektroporasyon yöntemi ile yapılmıştır. Buz üzerinde bekletilerek çözündürülen 80 µl yetenekli *P. pastoris* hücrelerine 3-5 µg lineer DNA eklenmiş, pipetlenerek karıştırılmış ve buz soğukluğundaki 2 mm elektroporasyon küvetine aktarılmıştır. Küvetler 5 dakika buz üzerinde bekletilerek elektroporasyon cihazında 5 ms süre ile 1500 V akıma tabi tutulmuştur. Hemen ardından çok soğuk 1 M sorbitol eklenmiş ve 1.5 ml’lik santrifüj tüpüne alınmıştır. 28-30°C’de 1-2 saat inkübe edilen hücreler uygun antibiyotik ve besiyeri içeren plakalara 50, 100, 500 µl olacak şekilde yayılmıştır. Plakalar, koloniler oluşana kadar 28-30°C inkübatörde 2-3 gün inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrası plakalarda oluşan kolonilerin kontrolü genomik DNA izolasyonu ve PZR analizleri aracılığı ile yapılmıştır.

3.2.13. Restriksiyon analizi

Plazmidlerin izolasyonları yapıldıktan sonra doğrulaması restriksiyon analizi ile gerçekleştirilmiştir. Öncelikle, plazmid ve ligasyonu yapılan genlerin haritalarına bakılarak bir tane genin içinden, bir tane de plazmidten olmak üzere 2 noktadan kesen enzim ya da enzimler belirlenmiştir. Plazmidlerin konsantrasyonları ölçüldükten sonra 1 µg plazmide 1 U enzim olacak şekilde, 10X enzim tamponu ve su eklenerek toplam 20 µl içinde reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. 37°C’de 30 dakika inkübasyondan sonra kesilmiş plazmidlerin değerlendirilmesi, kontrol olarak kesilmemiş plazmidle birlikte %1 agaroz jele yüklenerek agaroz jel elektroforezi ile yapılmıştır.

3.2.14. Engelli erlende insülin proteini üretilmesi

Plakalardan seçilen klonlar engelli erlen koşullarında geliştirilerek insülin ekspresyonu araştırılmıştır. İnsülin genini taşıyan ekspresyon vektörünün aktarıldığı *P. pastoris* hücreleri ile ekspresyon vektörünü taşımayan *P. pastoris* hücreleri (negatif kontrol) 3 ml’lik YPD sıvı besi yerlerine inoküle edilmiştir. YPD sıvı besi yerinde gelişen hücreler, besiyerinin son OD 0.1 olacak şekilde BMGY (sodium sitrat tamponu pH 7.0)’ye inoküle edilmiştir. 18-20 saat boyunca çalkalamalı inkübatörde, 28-30°C’de BMGY besiyerinde çoğalan hücreler yaklaşık 10 OD iken 4°C, 3000 g’de 5 dakika santrifüj edilerek hasat edilmiş ve supernatanlar atılmıştır. Aynı hacimde BMMY (sodium sitrat tamponu pH 7.0) eklenip, hücreler süspanse edildikten sonra protein ekspresyonu için 28°C’de 225 rpm’de çalkalamalı inkübatöre koyulmuştur. Protein ekspresyonu 72-120 saat boyunca sürdürülmüştür. Metiltrofik bir maya olan *P. pastoris*’in protein ekspresyonu için besiyerinin son konsantrasyonu %1 olacak şekilde 12 saatte bir saf metanol eklenmiştir. 24 saatte bir örnek alınmıştır ve analizlerde kullanmak üzere örnekler filtreden geçirilmiş ve hazırlanmıştır. 120 saat sonunda hücreler hasat edilmiş ve süpernatant devam edecek analizler için 4°C’ye kaldırılmıştır.

3.2.15. Rekombinant *P. pastoris* suşları kullanılarak fermentör koşullarında insülin proteini üretimi

pPICZ α -IP-6XHis plazmidini taşıyan *P. pastoris* suşu fermentör ortamında çoğaltılarak insülin öncülerinin üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, pPICZ α -IP-6XHis plazmidini içeren PDI suşu 0.1 OD olacak şekilde 100 mL BMGY besiyeri içeren engelli erlenlere ekilmiştir. Fermentör (5L hazneli, Sartorius B plus) ortamında inokulum olarak kullanılacak kültür, 8-10 OD oluncaya kadar çalkalamalı inkübatörde 250 rpm 30°C’de 12-16 saat geliştirilmiştir.

Fermentör ortamında insülin üretimi 2L hacimde gerçekleştirilmiş ve temel tuz besiyeri (Çizelge 3.3) kullanılmıştır. Besiyerinin içine 4.35 mL/ L PTM1 tuzu (Çizelge 3.4) eklenmiştir. Fermentasyonlar 800-1000 rpm karıştırma hızında, 30°C’de ve pH 5.0’de gerçekleştirilmiş, pH kontrolü %26’lık (w/v) amonyum hidroksit çözeltisi ile yapılmıştır.

Çizelge 3.4. Fermentörde kullanılan tuz bileşimi

Temel Tuz Besiyeri	
%85 H ₃ PO ₄	26.7 mL/L
CaSO ₄	0.93 g/L
K ₂ SO ₄	18.2 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	14.9 g/L
KOH	4.13 g
Gliserol	40 g/L
%5’lik köpük kırıcı	2 mL/L

Çizelge 3.5. PTM1 tuzlarının bileşimi

PTM1 tuzlarının bileşimi	
CuSO ₄ .5H ₂ O	2 g/L
ZnCl ₂	7 g/L
NaI	0.08 g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	22.0 g/L
MnSO ₄ .H ₂ O	3.0 g L
Biotin	0.2 g/L
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.2 g/L
Borik asit	0.02 g/L
CoCl ₂	0.5 g/L
H ₂ SO ₄	2 mL

Fermentasyonun ilk aşaması olan gliserol kesikli faz (batch) %4 gliserol içeren 2L temel tuz besiyerinde (Çizelge 3.3) gerçekleştirilmiştir ve yaklaşık 20 saat sürdürülmüştür. Ortamda gliserolün varlığı, çözünmüş oksijen düzeyi takip edilerek izlenmiştir. Gliserolün tükenmesi sonucu, çözünmüş oksijen miktarında ani artış gözlemlendiğinde kesikli faz sona erdirilmiştir. Bu aşamadan sonra fermentasyonun ikinci aşaması olan gliserol besleme fazı (fed-batch) başlatılmıştır. Bu fazda, 2 saat boyunca %40 gliserol kullanılarak 16.5 mL/L.sa olacak şekilde gliserol beslemesi yapılmıştır. Bu

sürenin sonunda, ortama *AOX1* promotoru için 2 mL/L metanol ilave edilmiş ve gliserol besleme hızı 0 mL/L.sa düzeyine 3 saatlik süre içinde lineer olarak düşürülmüştür. Ortamdaki karbon kaynaklarının tükenmesi ile çözünmüş oksijen miktarında ani artış gözlenmiş ve fermentasyonun 3. aşaması olan indüksiyon fazına geçilmiştir. Bu fazda 120 saat boyunca %100 metanol (9 mL/L PTM1 tuzu içeren) ile besleme yapılmıştır. İşlem boyunca; sıcaklık 30°C, pH değeri 5.5, karıştırma hızı 1000 rpm ve hava beslemesi 2.0 vvm olacak şekilde sabit tutulmuştur. Çözünmüş oksijen miktarı ise, gerektiğinde saf oksijen eklenerek, %20 olacak şekilde kontrol edilmiştir. Fermentasyon süresi boyunca insülin proteini varlığını tespit etmek için örnek alınmıştır. 120.saatte alınan örnekten HisPur Ni-NTA resin (Thermo Scientific) kullanılarak IP purifikasyonu yapılmıştır. Diğer saatlerde alınan örneklerin süpernatantları ve histag saflaştırılması yapılan 120.saat örneklerinin SDS-PAGE ve Western Blot analizleri yapılmıştır.

Çizelge 3.6. Fermentör kesikli faz parametresi

Kesikli faz				
Saat	Süre	Hız (rpm)	Akış(m.L/L.h)	DO(%)
9: 00	0	-	-	-
5: 00	20	800		33
6: 00	21	800		25.2
7: 00	22	850		25.5
7: 30	22.5	900		25.5
8: 00	23	950		23.3
8: 15	-	-		

Çizelge 3.7. Fermentör kesikli beslemeli faz parametresi

Kesikli beslemeli faz				
Saat	Süre	Hız (rpm)	Akış(m.L/L.h)	DO(%)
8: 00	0	1.1	16.5	22
10: 30	12	1.1	16.5	23
11: 00	30	0.9	13.5	17.1
11: 30	60	0.7	10.5	23
12: 00	90	0.6	9	21
12: 30	120	0.4	6	40
13: 00	150	0.2	3	27
13: 15	165	0.1	1.5	35
13: 30	180	0	0	30
14: 00				55

Çizelge 3.8. Fermentör metanol besleme parametresi

Metanol besleme fazı				
Saat	Süre	Hız (rpm)	Akış(m.L/L.h)	DO(%)
15: 00	0	0.1	3	85
01: 00	10	0.2	3	20
10: 30	19.5	0.3	4.5	20
23: 00	32	0.4	6	20
09: 00	42	0.5	7.5	20
10: 00	43	0.5	7.5	20
21: 00	54	0.6	9	9-10
23: 00	56	0.5	7.5	
09: 00	66	0.5	7.5	
11:00	68	0.5	9	
13: 20		0.6		
23: 00	80	0.5	7.5	
09: 00	90	0.6	9	
10:00	115	0.6		

3.2.16. SDS-PAGE analizi

SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE), OWL P8D8 (Thermo Scientific, IL, ABD) cihazında Gel Buffer (3M Tris-Cl, %0.3 SDS, pH 8.45) hazırlanarak uygulanmıştır. Protein üretimi için geliştirilen hücrelerden ayrılan süpernatantlar, toplam 100 µl olacak şekilde 2:1 oranında 2X SDS jel yükleme tamponu (200 mM Tris-Cl, pH 6.8, %8 SDS, %40 gliserol, 100 mM DTT) ile karıştırılarak 70 °C'de 10 dakika bekletilmiştir. 10'er µl'leri hazırlanan jellere yüklenmiştir. Elektroforez işlemi jelin, 1x Cathode Buffer (0.1 M Tris, 0.1 M Tricine, %0.1 SDS) ve 5x Anode Buffer (0.2 M Tris-Cl, pH 8.9) kullanılmıştır. 5x Anode Buffer 1x Anode Buffer'a seyreltilmiştir. Başlangıçta 100 V akımda 10 dakika, daha sonra 200 V akımda 30 dakika yürütülmesi ile tamamlanmıştır. Jel alındıktan sonra 15 dakika saf su ile yıkanmıştır. Daha sonra Boyama (%0.1 Coomassie Blue R250, %10 asetik asit, %20 metanol, %70 saf su) içeren solüsyonda 1 saat çalkalayıcıda çalkalanmıştır. Bu işlemden sonra jel Sabitleme (%10 asetik asit, %20 metanol, %70 saf su) solüsyonunda 1 saat yıkanmıştır, en sonunda saf su içerisine alınmış ve görüntülenmiştir. Protein standardı olarak SeeBlue Plus2 prestained protein ladder kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak daha önce laboratuvarımızda üretilen ve sonunda 6XHis etiketi olan Ksilanaz enzimi (29.8 kDa) kullanılmıştır.

3.2.17. Western blot analizi

Western blot analizi için örnekler SDS-PAGE analizinde olduğu şekilde hazırlanmış, 10'er µl'leri hazırlanan jellere yüklenmiştir. 1x Cathode Buffer (0.1 M Tris, 0.1 M Tricine, %0.1 SDS) ve 5x Anode Buffer (0.2 M Tris-Cl, pH 8.9) kullanılmıştır. 5x Anode Buffer 1x Anode Buffer'a seyreltilmiştir. Başlangıçta 100 V akımda 10 dakika, daha sonra 200 V akımda 30 dakika yürütüldükten sonra jel 1X TGM tamponu (0.192 M glisin, 25 mM tris bazı, %2 metanol) ile 15 dakika yıkanmıştır. Jelde ayrımlanan proteinler, jelden PVDF membrana (Millipore, MA, ABD) Owl HEP-

1 Electrobloetter (Thermo Scientific, IL, ABD) cihazı kullanılarak (20 V, 60 dakika) aktarılmıştır. Daha sonra membran protein aktarılan yüzü yukarıya bakacak şekilde kapaklı kutuya aktarılmış ve 1X PBS tamponu (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄) ile 2 kez 10'ar dakika yıkandıktan sonra kapatma tamponu I-Block (1X PBS+%0.5 g I-Block) içeren kapatma tamponunda 1 saat çalkalamaya bırakılmıştır. Histidin etiketli proteine ait bandı tespit edebilmek için birincil antikor olarak Purified Anti-His Tag (Cat:652502) 1:2500 seyreltilerek 1 saat çalkalayıcıda muamele edilmiştir. Daha sonra 3 sefer 5'er dakika I-Block solüsyonu ile ara yıkama yapılmıştır. İkincil antikor olarak ise Goat Anti-Mouse IgG (H+L), Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugate (USA) 1:2000 seyreltilerek 1 saat çalkalayıcıda muamele edilmiştir. Daha sonra 3 sefer 5'er dakika I-Block, 1 sefer 5 dakika 1X PBS ile yıkanmıştır. Antikorlarla hibridizasyonu tamamlanan membranın 2.5 ml enhancer luminol- 2.5 ml peroxide (SuperSignal^RWestPico Chemiluminescent Substrate) solüsyonu ile 5 dakika çalkalanmıştır. Membran şeffaf dosya içine alınmıştır ve peçete yardımıyla hava kalmayacak şekilde silinmiştir. X- Ray film kasedinde görüntülenmiştir. Protein standardı olarak SeeBlue Plus2 prestained protein ladder kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak daha önce laboratuvarımızda üretilen ve sonunda 6XHis etiketi olan Ksilanaz enzimi (29.8 kDa) kullanılmıştır.

3.2.18. His-Tag pürifikasyonu

Hücre içi insülin üreten *P. pastoris* klonları 3 ml YPD besiyerine ekilerek bir gece 28°C 225 rpm'de çalkalamalı inkübatörde geliştirilmiş ve inokulum olarak kullanılmıştır. İnokulumdan başlangıç OD'si 0.1 olacak şekilde BMGY besiyerine ekim yapılmış ve 28°C çalkalamalı inkübatörde 18-24 saat gelişmeye bırakılmıştır. Daha sonra BMMY mediasına aktarılmış ve protein üretimi 250 ml engelli erlenlerde 30 ml BMMY besiyerinde gerçekleşmiştir. Kültürden 120. saatte 50 ml falkon tüpüne 25 ml alınmış ve 3000xg hızında 4°C'de 5 dakika santrifüjlenmiş ve filtreden geçirilmiştir.

Saflaştırma işlemi HisPur Ni-NTA Resin protokolüne göre yapılmıştır. Falkonda bulunan süpernatana aynı miktarda equilibration buffer eklenilmiştir ve son pH, 1M Tris-HCl pH 9.5 ile 7'nin üzerine çıkarılmıştır. Rezine santrifüj işlemi yapıldıktan sonra falkon tüpündeki süpernatana ilave edilmiştir. 30 dakika rotater mixerde karıştırılmıştır. Dispozitör kolonundan geçirilmiş ve flow through olmuş hali elde edilmiştir. Yıkama işlemleri 2M imidozale, 1XPBS ve distile saf su içeren buffer ile, ve elüsyonları da yine aynı şekilde yapılmıştır.

3.2.19. Hücrelerin SDS-PAGE ve Western Blot analizi için kırılması

Hücre peletlerinden bir miktar (200 mg) tartılarak 2 ml'lik eppendorf tüplere konulmuştur. Üzerlerine 1 ml Hücre lizisi (%25 gliserol, 1.5Mm MgCl₂, 415mM NaCl, 0.5mM PMSF, 0.5mM DTT, 20mM HEPES, 0.2mM EDTA, saf su) buffer eklenmiştir. Vortekslelendikten sonra peletlerin parçalanması sağlanmıştır. Parçalanmış peletler Qiagen kırma tüpüne aktarılmıştır. Tüpün içerisine yarım kapak dolusu zirkonya boncuklardan konulmuştur. Doku parçalayıcı (Almanya) cihazında 4 sefer 1.5 dakika (her arada 2 dakika -20°C de bekletilerek) olmak üzere pelet kırma işlemi yapılmıştır. 4°C'de 20000xg'de 10 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. Daha sonra faz ayrımı sonucu

süpernatantlar 1.5 ml'lik eppendorf tüplere alınarak çözünen pelet fraksiyonu SDS-PAGE ve Western blot analizi için hazır hale getirilmiştir.

Çözünen pelet fraksiyonu sonucu süpernatant alındıktan sonra dipteki kısma 2X SDS jel yükleme tamponu (200 mM Tris-Cl, pH 6.8, %8 SDS, %40 gliserol, 100 mM DTT) eklenerek 70°C'de 10 dakika bekletildikten sonra süpernatant kısmı direk olarak SDS-PAGE ve Western blot analizi için kullanılmıştır.

3.2.20. Toplam protein tayini

AOX enzim aktivite tayini için maya hücreleri kırılarak elde edilen hücre özütünün içerdiği protein miktarı Pierce 660 nm Protein Assay (Thermo Scientific, IL, ABD) kiti kullanılarak tayin edilmiştir. Protein konsantrasyonu, örneklerle birlikte okutulan bir seri BSA standart çözeltilerinin (125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml, 1000 µg/ml, 1500 µg/ml, 2000 µg/ml) absorbans değerleri referans alınarak belirlenmiştir. Protein miktarları ölçülecek olan hücre özütleri, reaksiyon ayırıcı ile 1:15 oranında karıştırılmış, 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyondan sonra UV spektrofotometre cihazında (Biochrom Libra S50, İngiltere) 660 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Paralel olarak ölçülen standart serisinden elde edilen absorbans değerleri ile çizilen standart grafiğinden, bilinmeyen örneğin protein miktarı hesaplanmıştır.

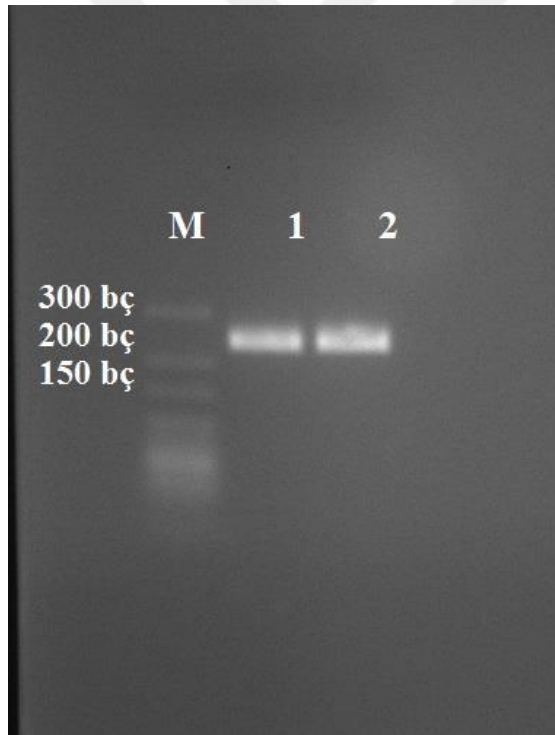
4. BULGULAR

4.1. İnsülin genine histidin etiketi eklenmesi ve insülin genini taşıyan ekspresyon vektörünün oluşturulması

İnsülin genini taşıyan pUC57-IP plazmidi GenScript (Almanya) tarafından kimyasal yolla elde edilerek liyofilize şekilde laboratuvarımıza getirilmiş ve üretici firmanın talimatlarına göre ön işlemleri yapılmıştır. 4°C’de 6000xg’de 1 dakika santrifüj işlemi yapılarak, konsantrasyonu 100 ng/μl olacak şekilde 40 μl buffer TE tamponu eklenmiştir.

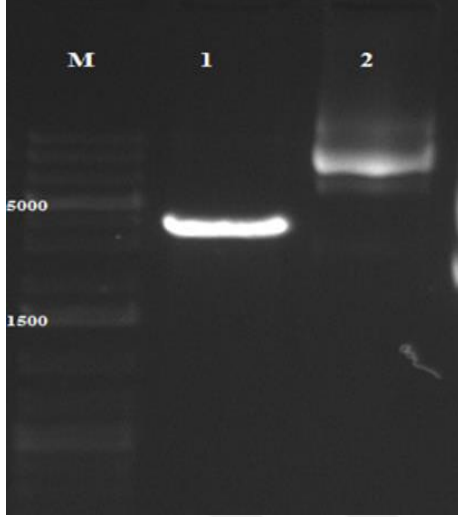
PZR ile IP genine altı adet histidin aminoasidinden oluşan bir etiket eklenmiştir. Bu etiket hem western blot analizinde anti-his antikor kullanılarak analiz yapılmasına hem de saflaştırma işleminde büyük kolaylık sağlamıştır.

PZR sonucunda elde edilen ürün agaroz jelde yürütülmüş beklenen baz çifti (250 bç) elde edilerek doğrulanmıştır (Şekil 4.1).



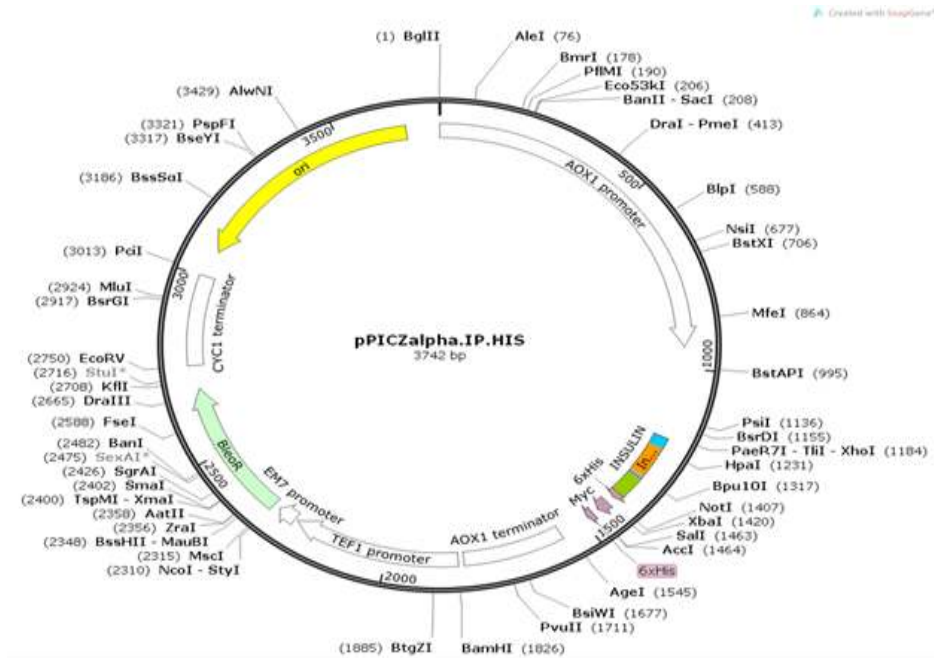
Şekil 4.1. pUC 57-IP genine 6XHİS etiketi eklenmesi ve doğrulanması M: GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD); 1: PZR sonrası elde edilen IPHİS geni; 2: PZR sonrası elde edilen IPHİS geni

Daha sonra pPICZ α A plazmidinin *XhoI/NotI* enzimleri ile restriksiyon analizi yapılmış, beklenen baz çifti (2824 bp) elde edilerek doğrulanmıştır (Şekil 4.2). PZR pürifikasyonları yapılmış ve konsantrasyonları ölçülmüştür.



Şekil 4.2. pPICZ α A plazmidinin *XhoI/NotI* enzimleri ile restriksiyon analizi kontrolü
M: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD); 1: *XhoI/NotI* ile kesilmiş pPICZ α A plazmidi; 2: pPICZ α A plazmidi

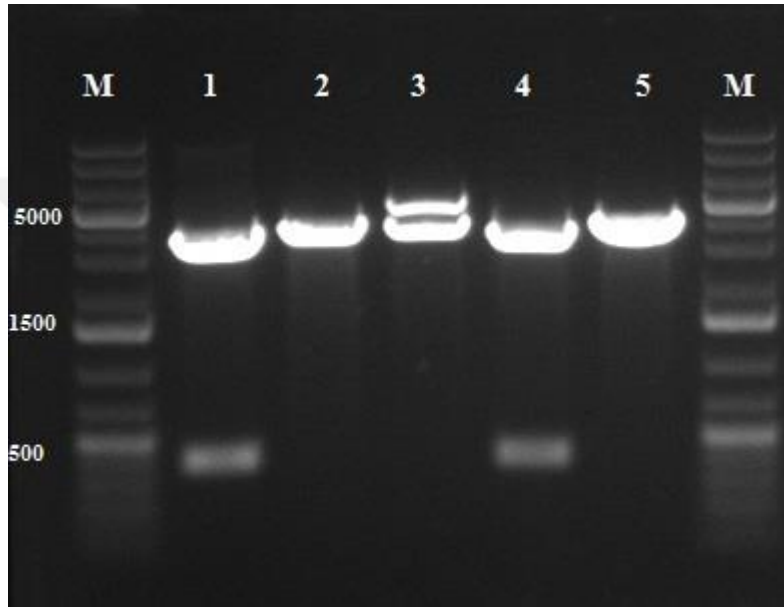
Bu çalışmanın ardından pPICZ α vektörüne IP-6XHIS fragmenti birleştirilmiştir. Bu şekilde pPICZ α -IP-6XHIS ekspresyon vektörü oluşturulmuştur (Şekil 4.3). Daha sonra *E. coli*'ye transformasyonu yapılmış ve doğrulanmıştır.



Şekil 4.3. pPICZalpha-IP-6XHIS ekspresyon vektörünün haritası

4.2. pPICZalpha-IP-6XHİS Ekspresyon vektörünün *E. coli*'ye Transformasyonu

Ligasyon işlemi sonunda kompetent *E. coli* XL1-Blue hücrelerine transformasyonu gerçekleştirilmiş, 50 µg/mL zeosin içeren LB Lennox agar plakalara ekim yapılmıştır. 37°C'de bir gece inkübasyon sonucunda plakalarda oluşan kolonilerden 5 tanesi plazmid izolasyon için seçilmiştir. 3 mL LB Lennox sıvı besiyerine ekilmiş ve 37°C'de gece boyu geliştirilmiştir. Ertesi gün kültürlerden plazmid izolasyonları yapılmış ve *HindIII* enzimi ile restriksiyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Oluşturulan ekspresyon vektörü için restriksiyon analizi sonrası beklenen bç uzunlukları pPICZα-IP-6XHis için 391 bç ve 3351 bç'dir (Şekil 4.4).

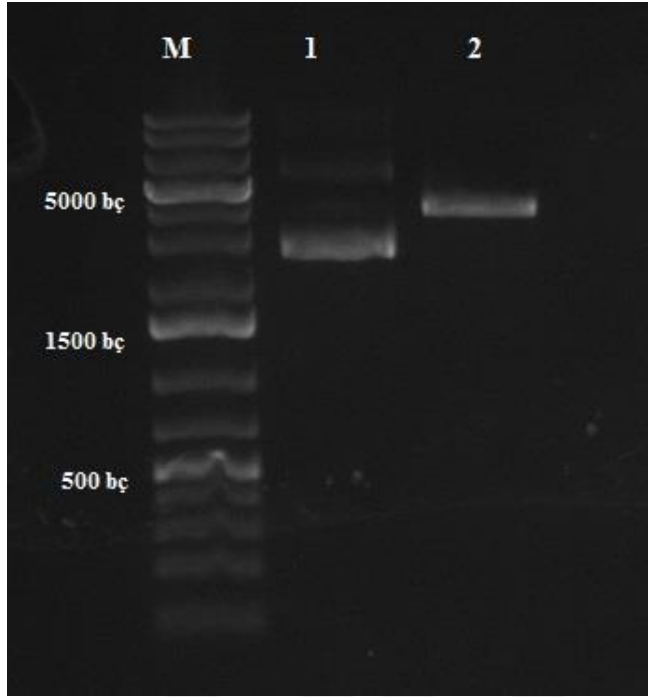


Şekil 4.4. pPICZalpha-IP-6XHİS plazmidinin *HindIII* kesimi sonrası görüntüsü M: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD); 1: pPICZα-IP-6XHis 1.klon; 2: pPICZα-IP-6XHis 2.klon; 3: pPICZα-IP-6XHis 3.klon; 4: pPICZα-IP-6XHis 4.klon; 5: pPICZα-IP-6XHis 5.klon

1 ve 4 numaralı hücrelerin içerdiği pPICZalpha-IP-6XHİS plazmidi doğru kesimi vermiştir. Bu nedenle seçilen bu klonların donmuş kültürleri hazırlanmıştır. Transformasyon işlemine 4 numaralı klon ile devam edilmiştir.

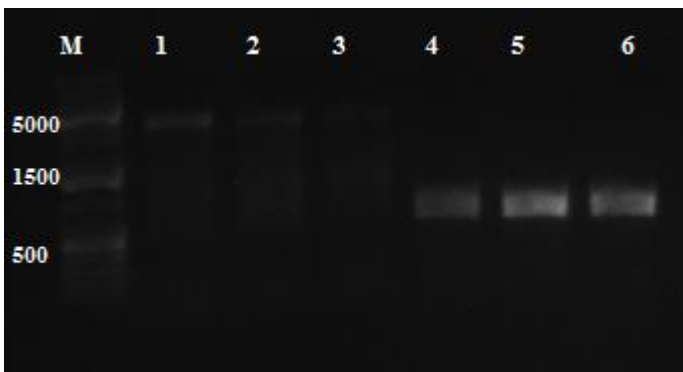
4.3. Ekspresyon vektörünün *Pichia pastoris*'e transformasyonu

Doğrulan 4 numaralı klonun 3-5 µg plazmit içerecek kadarı *MssI* enzimi ile lineer hale getirilerek (Şekil 4.5), PZR pürifikasyonu yapılmıştır ve yetenekli *Pichia pastoris* X-33 suşuna transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Transformant hücreler 100 µg/mL ve 500 µg/mL zeosin içeren YPD agar plakalara ekilmiştir. Plakalar 3 gün boyunca 30 °C'de gelişmeye bırakılmıştır.



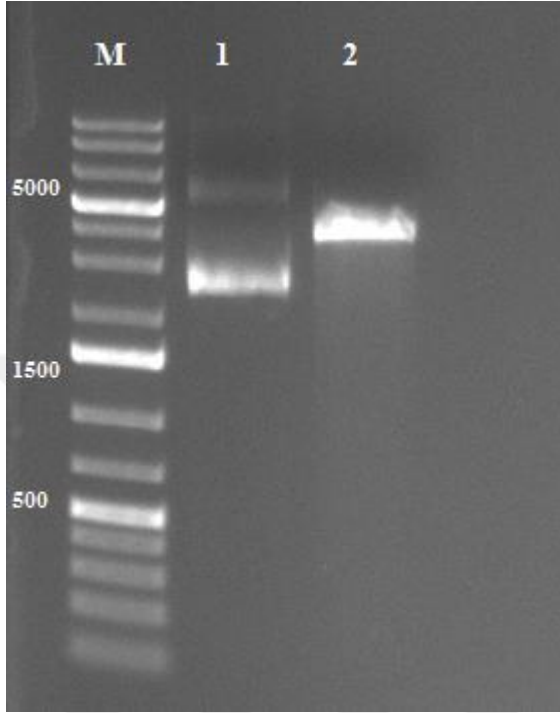
Şekil 4.5. pPICZalpha-IP-6XHis 4 numaralı plazmidin *MssI* enzimi ile kesilerek doğrulanması M: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD); 1: pPICZα-IP-6XHis vektörü; 2: pPICZα-IP-6XHis vektörünün *MssI* enzimi ile lineer hale gelmiş hali

100 µg/mL zeosin ve 500 µg/mL zeosin içeren plakalardan 3'er koloni olmak üzere toplamda 6 koloni seçilmiştir ve YPD sıvı besiyerinde inokulum olarak gece boyu geliştirilmiştir. Daha sonra klonların donmuş kültürü hazırlanmış ve genomik DNA izolasyonları yapılmıştır. PZR ile insülin geninin varlığı kontrol edilmiştir (Şekil 4.6). Beklenen fragment uzunlukları 2000 ve 800 bç'dir. 1,2 ve 3 numaralı klonlarda PZR çalışmamış olabilir. 4,5 ve 6 numaralı klonlar doğrulanmıştır. 5'AOXF(GACTGGTTCCAATTGACAAGC) ve 3'AOXR (GCAAATGGCATTCTGACATCC) primerleri kullanılmıştır.



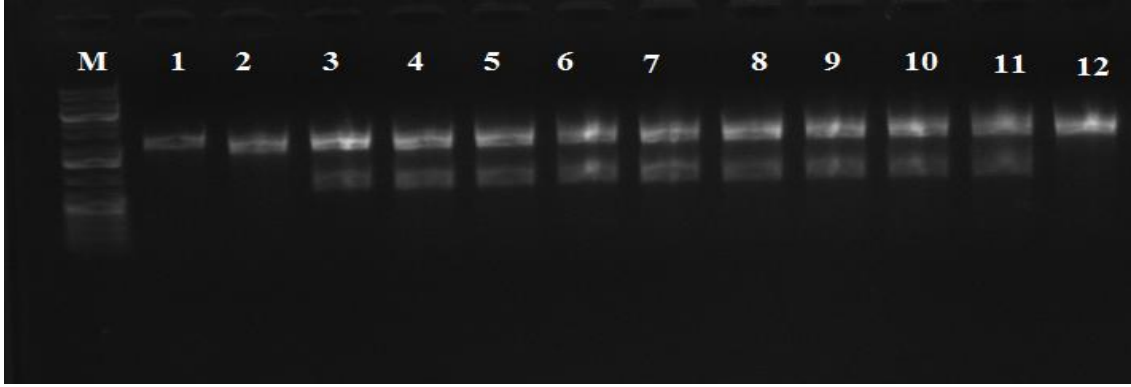
Şekil 4.6. pPICZα-IP-6XHis klonlarının PZR kontrolü M: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD); 1: pPICZα-IP-6XHis 1.klon; 2: pPICZα-IP-6XHis 2.klon; 3: pPICZα-IP-6XHis 3.klon; 4: pPICZα-IP-6XHis 4.klon; 5: pPICZα-IP-6XHis 5.klon; 6: pPICZα-IP-6XHis 6.klon

Aynı zamanda doğrulanan 4 numaralı klonun 3-5 µg kadarı *MssI* enzimi ile lineer hale getirilerek (Şekil 4.7), PZR pürifikasyonu yapılmıştır ve yetenekli *Pichia pastoris* PDI suşuna transformasyonu gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.7. pPICZalpha-IP-6XHİS 4 numaralı plazmidin *MssI* enzimi ile kesilerek doğrulanması M: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD); 1: pPICZα-IP-6XHis vektörü; 2: pPICZα-IP-6XHis vektörünün *MssI* enzimi ile lineer hale gelmiş hali

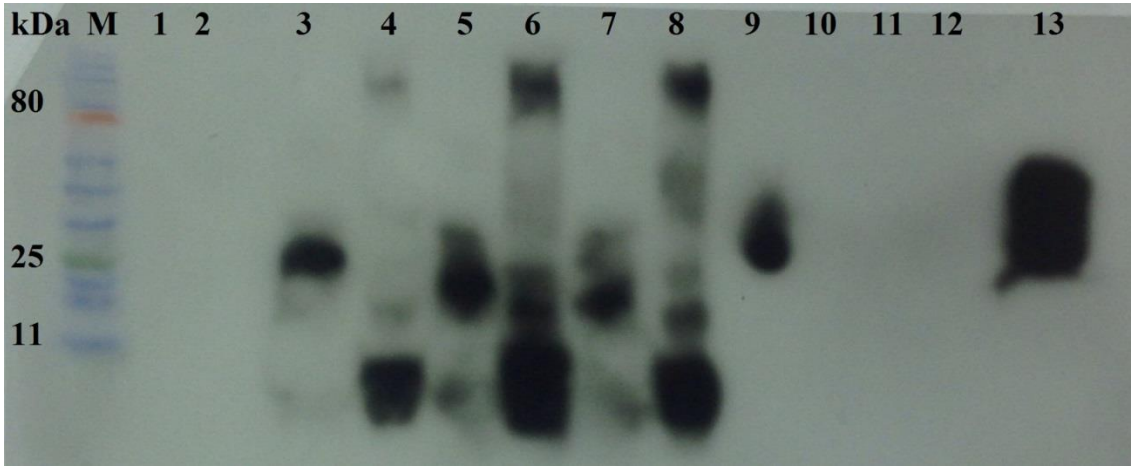
500 µg/mL zeosin içeren plakalarda koloni oluşmamıştır, 100 µg/mL zeosin içeren plakalardan 10 koloni seçilmiştir. YPD sıvı besiyerinde inokulum olarak gece boyu geliştirilmiştir. Daha sonra klonların donmuş kültürü hazırlanmış ve genomik DNA izolasyonları yapılmıştır. Genomik DNA izolasyonu sonucu genin girip girmediğini kontrol etmek için klonların PZR ile kontrolü yapılmıştır (Şekil 4.8). Beklenen fragment uzunlukları 2000 ve 800 bp'dir. 1-2-3-4-5-6-7-8-9 numaralı klonlar doğrulanmıştır. 5'AOXF(GACTGGTTCCAATTGACAAGC) ve 3'AOXR (GCAATGGCATTCTGACATCC) primerleri kullanılmıştır.



Şekil 4.8. pPICZ α -IP-6XHis klonlarının PZR kontrolü M: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD); 1: X-33 kontrol; 2: PDI kontrol; 3: pPICZ α -IP-6XHis 1.klon; 4: pPICZ α -IP-6XHis 2.klon; 5: pPICZ α -IP-6XHis 3.klon; 6: pPICZ α -IP-6XHis 4.klon; 7: pPICZ α -IP-6XHis 5.klon; 8: pPICZ α -IP-6XHis 6.klon, 9: pPICZ α -IP-6XHis 7.klon, 10: pPICZ α -IP-6XHis 8.klon, 11: pPICZ α -IP-6XHis 9.klon, 12: pPICZ α -IP-6XHis 10.klon

4.4. Engelli erlende insülinin üretimi western blot analizi ile gösterilmesi

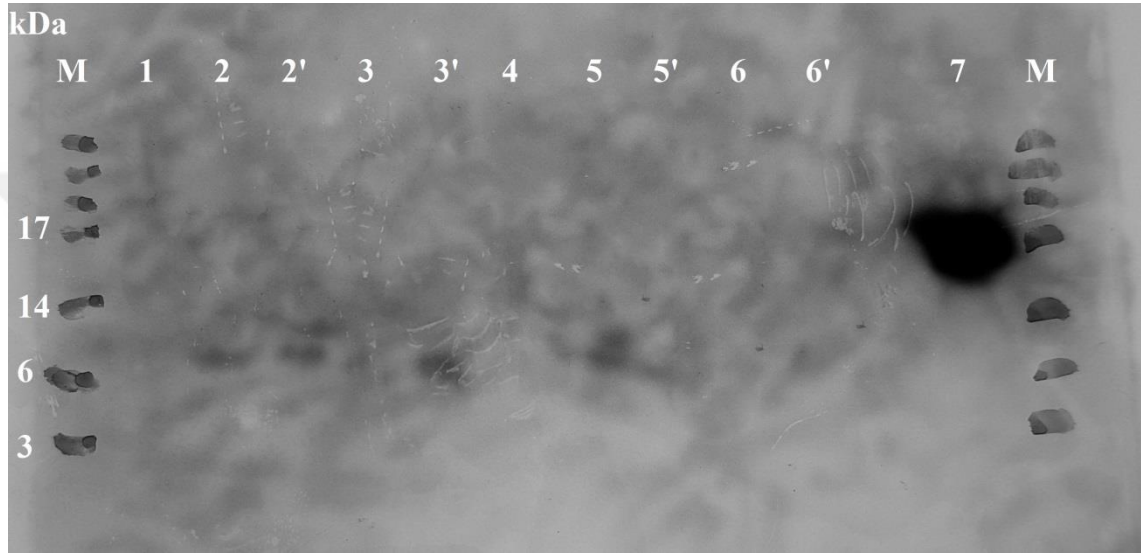
72 saat süren engelli erlen üretiminde 24, 48 ve 72. saatlerinde örnekler alınmıştır ve örneklerin peletleri kırılarak Westen blot analizi yapılmıştır. Üretimde PDI suşunun klonu kullanılmıştır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. PDI 1 numaralı klonun engelli erlen üretimi sonucu Western blot görüntüsü M: Color Prestained Protein Standard, Broad Range; 1: Negatif kontrol süpernatant (PDI) 72. saat ; 2: Negatif kontrol pelet soluble (PDI) 72. saat ; 3: 24. saat süpernatant; 4: 24. saat pelet soluble; 5: 48. saat süpernatant; 6: 48. saat pelet soluble; 7: 72. Saat süpernatant; 8: 72. saat pelet soluble; 9: pozitif kontrol ksilanaz; 10: pozitif kontrol humilin; 11: pozitif kontrol bovine insülin; 12: pozitif kontrol human insülin; 13: pozitif kontrol ksilanaz

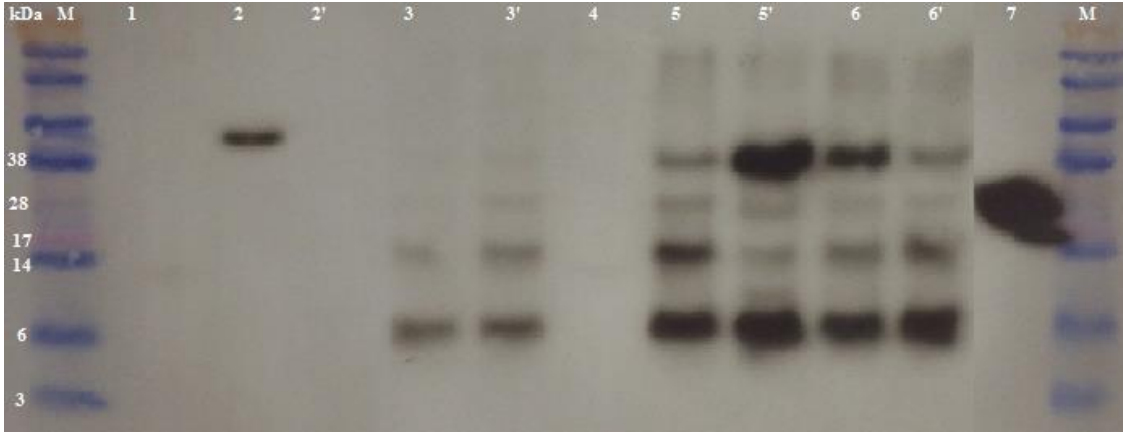
Western blot analizi sonucunda pPICZ α -IP-6XHis PDI 1 numaralı klonunda süpernatant ve pelet soluble kısmında insülin bandı tespit edilmiştir. Üretilen proteinin moleküler ağırlığı 7.8 kDa'dır. İnsülin proteinin moleküler yapısı nedeniyle süpernatant kısmında ortam koşullarından kaynaklanan dimer-trimer yapı oluşturduğu düşünülmüştür.

pPICZ α -IP-6XHis klonlarının 2 tane (PDI) ve 2 tane (X33) toplamda 4 farklı klon olmak üzere duplike (paralel) üretimi sonucu Western blot analizi yapılmıştır (Şekil. 4.10).

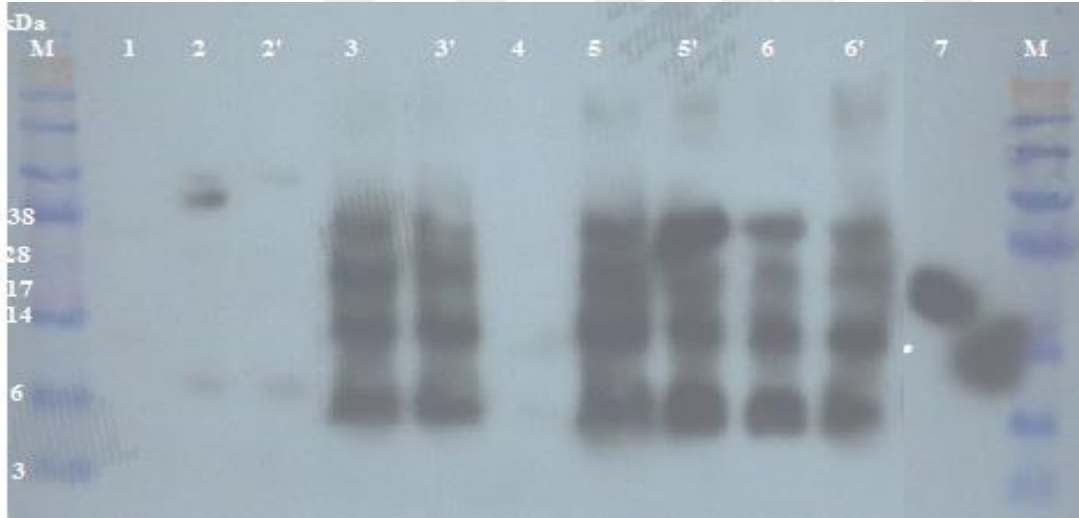


Şekil 4.10. pPICZ α -IP-6XHis klonunun engelli erlen üretimi sonunda elde edilen süpernatant örneklerinin western blot görüntüsü M: SeeBlue® Plus2 Pre-stained Protein Standard; 1: X33 negatif kontrol; 2: X33 pPICZ α -IP-6XHis 1.klon; 2': X33 pPICZ α -IP-6XHis 1.klon; 3: X33 pPICZ α -IP-6XHis 2.klon, 3': X33 pPICZ α -IP-6XHis 2.klon; 4:PDI negatif kontrol; 5: PDI pPICZ α -IP-6XHis 1.klon; 5': PDI pPICZ α -IP-6XHis 1.klon; 6: PDI pPICZ α -IP-6XHis 2.klon; 6': PDI pPICZ α -IP-6XHis 2.klon; 7: Pozitif kontrol ksilanaz; M: SeeBlue® Plus2 Pre-stained Protein Standard

Yapılan üretim sonucunda X33 1 numaralı klonun paralel üretiminde de bant görüldüğü, X33 2 numaralı klonda paralel üretiminde bant görülmendiği, PDI 1 numaralı klonun paralel üretiminde de bant görüldüğü, PDI 2 numaralı klonda bant oluşturmadığı, negatif kontrol X33 ve PDI suşunda bant gözlenmediği görülmüştür. Pozitif kontrol ksilanazın çalıştığı gözlenmiştir. 6-14 arasındaki bantların insülin olduğu tespit edilmiştir (bizim beklediğimiz 7.8 kDa).



Şekil 4.11. pPICZ α -IP-6XHis klonunun engelli erlen üretimi sonunda elde edilen pelet soluble örneklerinin western blot görüntüsü M: SeeBlue® Plus2 Pre-stained Protein Standard; 1: X33 negatif kontrol; 2: X33 pPICZ α -IP-6XHis 1.klon; 2': X33 pPICZ α -IP-6XHis 1.klon; 3: X33 pPICZ α -IP-6XHis 2.klon, 3': X33 pPICZ α -IP-6XHis 2.klon; 4:PDI negatif kontrol; 5: PDI pPICZ α -IP-6XHis 1.klon; 5': PDI pPICZ α -IP-6XHis 1.klon; 6: PDI pPICZ α -IP-6XHis 2.klon; 6': PDI pPICZ α -IP-6XHis 2.klon; 7: Pozitif kontrol ksilanaz; M: SeeBlue® Plus2 Pre-stained Protein Standard

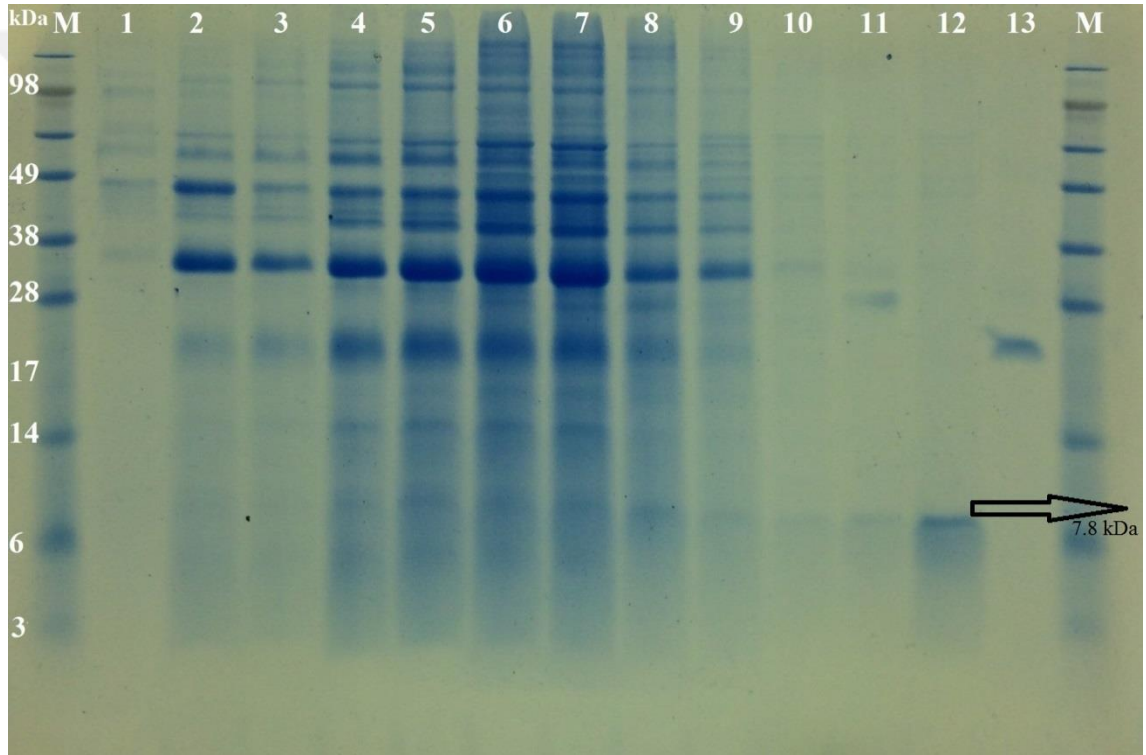


Şekil 4.12. pPICZ α -IP-6XHis klonunun engelli erlen üretimi sonunda elde edilen pelet insoluble örneklerinin western blot görüntüsü M: SeeBlue® Plus2 Pre-stained Protein Standard; 1: X33 negatif kontrol; 2: X33 pPICZ α -IP-6XHis 1.klon; 2': X33 pPICZ α -IP-6XHis 1.klon; 3: X33 pPICZ α -IP-6XHis 2.klon, 3': X33 pPICZ α -IP-6XHis 2.klon; 4:PDI negatif kontrol; 5: PDI pPICZ α -IP-6XHis 1.klon; 5': PDI pPICZ α -IP-6XHis 1.klon; 6: PDI pPICZ α -IP-6XHis 2.klon; 6': PDI pPICZ α -IP-6XHis 2.klon; 7: Pozitif kontrol ksilanaz; M: SeeBlue® Plus2 Pre-stained Protein Standard

Yapılan analizler sonucunda pelet soluble ve pelet insoluble örneklerinde X33 1 numaralı klonun net bant vermediği, negatif kontrol X33 ve PDI suşlarının bant vermediği, diğer klonların bant verdiği gözlenmiştir. Bu deney sonucunda insülin proteinin üretildiği fakat engelli erlen üretiminde hücre dışına çıkışında sorun olduğu gözlenmiştir. Literatürde yapılan bazı çalışmalarda fermentör üretimine geçilerek hücre dışına çıkışın olduğu görülmüştür (Gurramkonda vd 2010, Vanz vd 2014). Bu nedenle fermentör üretimine geçilmeye karar verilmiştir.

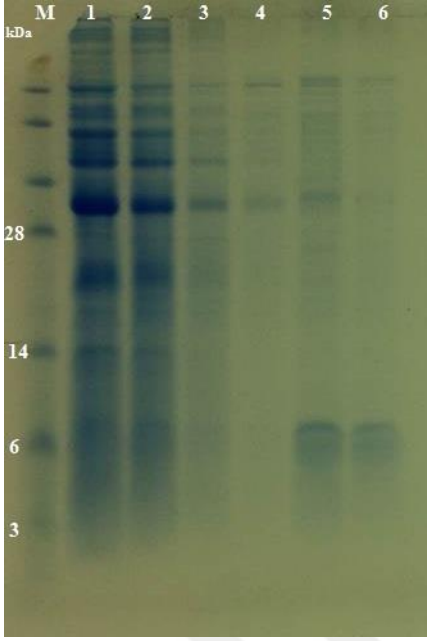
4.5. Fermentör üretimi SDS-PAGE ve Western blot sonuçları

Fermentör üretimi boyunca belirli saatlerde alınan örneklerin ve 120. saat örneklerine His-tag pürifikasyonu yapılarak elde edilen örneklerin SDS-PAGE ve western-blot analizleri yapılmıştır (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. PDI pPICZα-IP-6XHis klonunun fermentör üretimi SDS-PAGE jel görüntüsü M: SeeBlue® Plus2 Pre-stained Protein Standard; 1: 0.saat; 2: 42.saat; 3: 52.saat; 4: 68 saat; 5: 90.saat; 6: 115.saat; 7: 120.saat; 8: Flow through; 9: Yıkama 1; 10: Yıkama 2; 11: Elüsyon 1; 12: Elüsyon 2; 13: Pozitif kontrol ksilanaz; M: SeeBlue® Plus2 Pre-stained Protein Standard

Yapılan SDS-PAGE analizinde insülin bantlarının saat ilerledikçe koyulaştığını, His-tag pürifikasyonu sonucu insülin bandının daha net görüldüğü bulunmuştur. 6-14 arasındaki bantların insülin olduğu tespit edilmiştir (bizim beklediğimiz 7.8 kDa).



Şekil 4.14. Fermentörde üretilen 120.saat örneklerinin His-tag purifikasyonu sonrasında yapılan SDS-PAGE jel görüntüsü M: SeeBlue® Plus2 Pre-stained Protein Standard; 1: 120.saat süpernatant; 2: Flow through; 3: Yıkama 1; 4: Yıkama 2; 5: Elüsyon 1; 6: Elüsyon 2

6-14 kDa arasındaki bantların insülin bandı olduğu tespit edilmiştir.



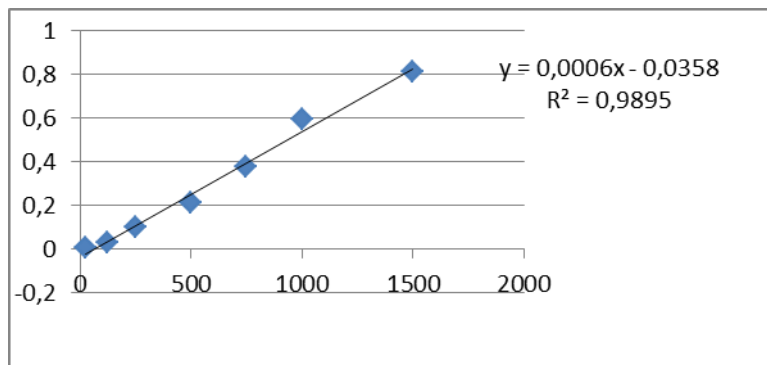
Şekil 4.15. PDI pPICZ α -IP-6XHis klonunun fermentör üretimi Western blot görüntüsü
1: 0.saat; 2: 42.saat; 3: 52saat; 4: 68.saat; 5: 90.saat; 6: 115.saat; 7: 120.saat,
8: Flow through; 9: Yıkama 1; 10: Yıkama 2; 11: Elüsyon 1; 12: Elüsyon 2;
13: Pozitif kontrol ksilanaz

SDS-PAGE analizinde zamanla artış gösteren ve 6-14 kDa seviyesine denk gelen bandın insülin olduğu tespit edilmiştir. Pozitif kontrol ksilanazın çalıştığı görülmüştür (bizim beklediğimiz 7.8 kDa).

4.6. Fermentör üretimi toplam protein tayini sonuçları

Çizelge 4.1. Toplam protein tayini sonuçları

BSA ug/ml	A660
Blank	
Saline	
25	0,005
125	0,033
250	0,101
500	0,211
750	0,378
1000	0,594
1500	0,813
2000	-
0	0,028
42	0,139
52	0,149
68	0,227
90	0,316
115	0,596
120	0,659
Elüsyon 1(E1)	0,32



Şekil 4.16. Toplam protein tayini için farklı konsantrasyonlardaki BSA standardının 660 nm absorbans değerleri ile çizilmiş standart grafiği

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada insan insülin geni *P. pastoris*’e aktararak hücre kültür süpernatantına insülin salgılanması amaçlanmış ve endüstriyel olarak insülin üreten bir suş elde edilmeye çalışılmıştır.

İnsülinin hücre dışı ekspresyonu için alfa sinyal sekansı kullanılmıştır ve üretim *AOX1* promotörü altında *P. pastoris* PDI ve X33 suşları ile gerçekleştirilmiştir. Protein disülfid izomeraz (PDI)’ın heterolog protein sekresyonunu artırıcı etkisinden dolayı yapılan çalışmalarda PDI şusuna aktarılan pPICZ α -IP-6XHis vektörü daha iyi sonuç vermiştir. Engelli erlen üretiminde pH 7’de (sodyum sitrat buffer) üretim gözlenmiştir. Yapılan Western blot ve SDS-PAGE analizlerinde üretilen insülinin 6-14 kDa arasında (7.8 kDa) bant verdiği görülmüştür.

Engelli erlende yapılan üretim çalışmaları sonucunda üretilen proteinin hücre içinde kaldığı görülmüş bunun üzerine ölçek büyütülerek 5 L’lik fermentörde PDI (pPICZ α -IP-6XHis) 1 numaralı klon ile 120 saat boyunca protein üretimi denemesi yapılmıştır. Fermentörden elde edilen örneklerle yapılan Western blot (Şekil 4.15) ve SDS-PAGE (Şekil 4.13) analizlerinde insülin proteininin üretildiği ve hücre dışına salgılandığı görülmüştür.

PDI suşunu fermentöre koyma nedenimiz; PDI (protein disülfid izomeraz) 57 kDa büyüklüğünde, endoplazmik retikulumda bulunan bir şaperon proteindir. İzomeraz aktivitesi sayesinde yanlış sıralanan disülfid çiftlerinin düzeltilmesinde görev alır. *P. pastoris* pPIC3.5K-PDI suşunda PDI proteinin aşırı üretilmesinin disülfid bağları içeren proteinlerin sekresyonunu iyileştirdiği gösterilmiştir. Endoplazmik retikulum proteinlerin disülfid sıralanmasının doğru yapılmasına yardımcı olan ve ‘folding assistant’ adı verilen bir takım proteinler içerir. Disülfid bağı oluşumu, proteinlerin endoplazmik retikulumda katlanmasında kritik bir rol oynar. İzomeraz aktivitesi sayesinde yanlış sıralanan disülfid çiftlerinin düzeltilmesinde görev alır. Chinese Hamster Ovary (CHO) hücrelerinde ve *E. coli* hücrelerinde aşırı üretici (over-expressing) PDI sayesinde rekombinant protein ekspresyonunda iyileşme görülmüştür. Yine endoplazmik retikulum proteini olan ve bir takım benzer özellikler gösteren başka şaperon proteinlerinin ise rekombinant protein ekspresyonuna herhangi bir iyileştirici etkide bulunmadığı da tespit edilmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada PDI’nın *P. pastoris*’te de aşırı üretici olduğu ve disülfid bağı içeren rekombinant proteinlerin sekresyonu için PDI’da bulunan tekrar katlama aktivitesinin önemi ispatlanmıştır (Inan vd 2006).

Endoplazmik retikulum (ER) çalışma kapasitesini aşan fizyolojik veya patolojik durumlarda katlanmamış ya da yanlış katlanmış protein birikimi meydana gelir ve bu durumu ER’da stres olarak isimlendirilmektedir. ER stresi oluşuktan sonra, hücrede homeostazı tekrar sağlamak ve stresten en az zararla kurtulmak için hücre katlanmamış protein cevabı (UPR, unfolded protein response) oluşturabilmektedir. UPR bir takım hücre içi sinyaller oluşturarak hücrenin doğru bir şekilde katlanmasını sağlamaktadır (Düzgün vd 2012).

P. pastoris'te IP üretimi için engelli erlen ve fermentör çalışmalarında UPR'nin etkisi araştırılmıştır. Maya hücresinde UPR'nin oluşması hücrenin besinsel durumu ile ilgili olmaktadır. Engelli erlen üretimi esnasında hücre kendini iyi bir şekilde geliştirebilmekte ancak IP üretimi düşük konsantrasyonlarda kalmaktadır. Kontrollü kesikli beslemeli fermentasyon koşullarında oluşan UPR miktarı engelli erlen koşullarındakine göre çok daha fazla oluşmaktadır. Dolayısıyla tanımlanmış gelişme koşulları altında UPR miktarının artmasıyla IP üretimi de artmaktadır (Vanz vd 2014).

İnsülin üretimi ile ilgili yapılan çalışmalarda IP, yüksek kopya numarasına sahip transformantlardan, başlıca tuz ve metanolden oluşan basit kültür ortamı kullanılarak yüksek yoğunluklu fermentasyonla 1.5 g/L ekspresyon seviyesinde elde edilmiştir (Wang vd 2001).

Yapılan diğer bir çalışmada *P.pastoris*'in Mut^s (methanol utilization slow) suşunda mini-proinsülin (MPI) üretmeye çalışmış ve MPI salgılanmasının indüksiyon fazı boyunca popülasyonun gelişimiyle olan ilgisini incelemişlerdir. Elde ettikleri MPI miktarı 1.5 g/L'yi geçememiştir (Pais vd 2003). Buna ek olarak MPI'in toplam miktarı ile toplam biyomas ilişkilendirildiğinde, ilgilenilen ürünün metanol fazında büyümeyle ilgisi olduğu görülmüştür.

Aynı ekibin yaptığı başka bir çalışmada sıcaklık, pH ve farklı nitrojen kaynaklarının yine aynı suşda MPI üretimine olan etkisine bakılmıştır. Kültivasyon pH'sı 5.1'den 6.3'e yükseltilmiş, sıcaklık 28°C'den 22°C'ye düşürülmüş ve periyodik olarak amonyum sülfat ve EDTA kültür ortamına eklenerek 160 saatlik gelişme sonrasında MPI salgılanması 0.3 g/L seviyesine ulaştığı görülmüştür (Pais-Chanfrau vd 2004).

P. pastoris'te IP üretimi için yine Ala-Ala-Lys bağlayıcı peptidi ve α -faktörü sinyal dizisi kullanılarak ekspresyon plazmidi pPIC9'da 16 litrelik fermentörde 3.6g/L IP üretilmiş ve üretilen IP aktif insüline dönüştürüldüğünde verimin %70 seviyesinde olduğu belirtilmiştir (Xie vd 2008).

Yine yapılan başka bir çalışmada ise α -faktör sinyal dizisi liderliğinde AAK bağlayıcı peptidi ve EEAEAEAEPK ara peptidi kullanılarak ekspresyon vektörü dizayn edilmiş ve daha sonrasında kesikli gliserol ve sabit miktarda metanolden oluşan yarı kesikli beslemeli iki fazlı kültürasyon işlemi uygulanmıştır. Bu yaklaşım IP üretimini 2 kat arttırmış ve saflaştırılan IP insan insülinine dönüştürüldükten sonra 1 litre sıvı kültürde yaklaşık 1.5 g ve %99 saflıkta rekombinant insan insülini elde edilmiştir (Gurramkonda vd 2010).

P. pastoris'te rekombinant insan insülini öncülerinin *AOX1* promotoru altında üretimiyle ilgili yapılan bir başka çalışmada ise fermentasyon sonrasında 200-400 mg/L IP elde edildiği rapor edilmiştir (Annibali 2006). Aynı grubun başka bir çalışmasında ise bir insülin analogu olan aspart insülin *P. Pastoris*'te *AOX1* promotoru altında üretilmiş ve sonuçta 400mg/L aspart insülin öncüsü elde edildiği ifade edilmiştir (Annibali vd 2011).

E.coli ile ilgili yapılan bir çalışmada XL1-Blue suşunda, pDsbA3-PI ekspresyon vektörü altında, 25°C’de 10 g/L glukoz içeren engelli erlen üretiminde proinsülin miktarı 0.009 g/L olarak ifade edildiği görülmüştür (Mergulhao vd 2004).

S. cerevisiae’da rekombinant insülin üretimi ile ilgili bir çalışmada *TPI* promotoru altında pAK721 ekspresyon vektörü kullanılarak engelli erlen üretiminde verimi 0.075 g/L olduğu söylenmiştir (Kjeldsen 2000).

P. pastoris *AOX1* promotoru altında 1.5 litre fermentörde pPIH-01 plazmidi ile 18.6 mg/L, pPIH-M4 plazmidi ile 120 mg/L, pPIH-M6Z 246 mg/L miniproinsülin verimi elde edildiği görülmüştür (Mansur vd 2005).

Yapılan diğer bir çalışmada domuz insülin geni *P. pastoris*’e transfer edilerek *AOX1* promotoru altında GS115 (*his4*) suşu kullanılarak fermantasyonu sonucu 181 mg/L olduğu görülmüştür (Zhu vd 2009).

6. SONUÇ

Bu tez kapsamında insülin genini taşıyan ekspresyon vektörü oluşturulmuş, *P. pastoris*'te *AOX1* promotoru altında hücre dışı ekspresyonu gerçekleştirilmiştir.

Konakçı olarak *P. pastoris*'in X-33 ve PDI suşları kullanılmıştır. Ekspresyon vektörü pPICZ α -IP-6XHis olarak adlandırılmıştır. Protein ekspresyonu sonrası alınan sonuçlara göre PDI suşunun üretim için daha verimli olduğuna karar verilmiştir. Yapılan SDS-PAGE ve Western blot analizlerinde insülin genine ait protein bandı 7.8 kDa büyüklüğünde beklenen büyüklükte tespit edilmiştir (Şekil 4.10).

Engelli erlen üretiminde hücre kolay bir şekilde gelişmekte fakat üretim sınırlı kalmaktadır. Fermentör koşullarının kontrol edilebilmesi ile UPR miktarı artmaktadır. Böylece engelli erlen üretiminde hücre dışında protein tespit edilmezken, fermentör çalışmalarında proteinin hücre dışına salgılandığı yapılan analizlerle doğrulanmıştır. Dolayısıyla bu suşun endüstriyel boyutta insülin üretimi için kullanılabilirliğini tespit etmek amacıyla fermentör şartlarının optimize edilerek maksimum üretimin yapılabileceği koşulların belirlenmesi gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

- AHMAD, B. 2004. Review: Pharmacology of insulin. *The British Journal of Diabetes & Vascular Disease*, 4 (1): 10-14.
- AHMAD, M., HIRZ, M., PICHLER, H. and SCHWAB, H. 2014. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 98 (12): 5301-5317.
- ANNIBALI, N. 2006. Expression of a human insulin precursor in *P. Pastoris*, United States Patent, Patent No: US 7,091,032 B2.
- ANNIBALI, N., GOIN, M., TREJO, G., CARRIZO, F., BARUQUE, D. and MORALES, A. 2011. Process for obtaining aspart insulin using a *pichia pastoris* yeast strain, United States Patent Application Publication, Pub No: US/2011/0117600S.
- ANONIM 2016. <http://www.dfgd.org.tr/index.php/s-k-sorulan-sorular/antioksidan-nedir-13>. [Son erişim tarihi: 28.06.2016].
- AYTAN, T. 2011. İnsülinin Biyoteknolojik Üretimi, Lisans Bitirme Tezi Erciyes Üniversitesi, Kayseri, 51 s.
- BAESHEN, N.A., BAESHEN, M.N., SHEIKH, A., BORA, R.S., AHMED, M.M., RAMADAN, H.A., SAINI, K.S. and REDWAN, E.M. 2014. Cell factories for insulin production. *Microb. Cell. Fact*, 13: 141.
- BROWNLEE, M. 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414 (6865): 813-820.
- CEREGHINO, J.L. and CREGG, J.M. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS. Microbiol. Rev.*, 24 (1): 45-66.
- CHAN, S.J., WEISS, J., KONRAD, M., WHITE, T., BAHL, C., YU, S.D., MARKS, D. and STEINER, D.F. 1981. Biosynthesis and periplasmic segregation of human proinsulin in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 78 (9): 5401-5405.
- CREGG, J.M., CEREGHINO, J.L., SHI, J. and HIGGINS, D.R. 2000. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol. Biotechnol.*, 16 (1): 23-52.
- CREGG, J.M., MADDEN, K.R., BARRINGER, K.J., THILL, G.P. and STILLMAN, C.A. 1989. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.*, 9 (3): 1316-1323.
- CREGG, J.M., VEDVICK, T.S. and RASCHKE, W.C. 1993. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology (N Y)*, 11 (8): 905-910.

- ÇELİK, E. and ÇALIK, P. 2012. Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnology Advances*, 30 (5): 1108-1118.
- DÜZGÜN, A., ALAÇAM, H. and OKUYUCU, A. 2012. Endoplazmik retikulum stresi ve katlanmamış protein cevabı. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 29: 95-100.
- FERRER-MIRALLES, N., DOMINGO-ESPIN, J., CORCHERO, J.L., VAZQUEZ, E. and VILLAVARDE, A. 2009. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microb. Cell. Fact.*, 8 17.
- GELLISSEN, G. and MELBER, K. 1996. Methylophilic yeast *hansenula polymorpha* as production organism for recombinant pharmaceuticals. *Arzneimittelforschung*, 46 (9): 943-948.
- GURRAMKONDA, C., POLEZ, S., SKOKO, N., ADNAN, A., GABEL, T., CHUGH, D., SWAMINATHAN, S., KHANNA, N., TISMINETZKY, S. and RINAS, U. 2010. Application of simple fed-batch technique to high-level secretory production of insulin precursor using *Pichia pastoris* with subsequent purification and conversion to human insulin. *Microb. Cell. Fact.*, 9 31.
- HAGENSON, M.J. 1991. Production of recombinant proteins in the methylophilic yeast *Pichia pastoris*. *Bioprocess. Technol.*, 12 193-212.
- HEINEMANN, L. and RICHTER, B. 1993. Clinical Pharmacology of Human Insulin. *Diabetes. Care.*, 16 (Supplement 3): 90-100.
- HOLLENBERG, C.P. and GELLISSEN, G. 1997. Production of recombinant proteins by methylophilic yeasts. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8 (5): 554-560.
- INAN, M., ARYASOMAYAJULA, D., SINHA, J. and MEAGHER, M.M. 2006. Enhancement of protein secretion in *Pichia pastoris* by overexpression of protein disulfide isomerase. *Biotechnol. Bioeng.*, 93 (4): 771-778.
- INAN, M. and MEAGHER, M.M. 2001. Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase (AOX1) promoter of *Pichia pastoris*. *J. Biosci. Bioeng.*, 92 (6): 585-589.
- KJELDSSEN, T. 2000. Yeast secretory expression of insulin precursors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54 (3): 277-286.
- KJELDSSEN, T., PETTERSSON, A.F. and HACH, M. 1999. Secretory expression and characterization of insulin in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 29 (Pt 1) 79-86.
- KJELDSSEN, T., PETTERSSON, A.F., HACH, M., DIERS, I., HAVELUND, S., HANSEN, P.H. and ANDERSEN, A.S. 1997. Synthetic leaders with potential BiP binding mediate high-yield secretion of correctly folded insulin precursors from *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein. Expr. Purif.*, 9 (3): 331-336.

- MACAULEY-PATRICK, S., FAZENDA, M.L., MCNEIL, B. and HARVEY, L.M. 2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 22 (4): 249-270.
- MANSUR, M., CABELLO, C., HERNANDEZ, L., PAIS, J., VARAS, L., VALDES, J., TERRERO, Y., HIDALGO, A., PLANA, L., BESADA, V., GARCIA, L., LAMAZARES, E., CASTELLANOS, L. and MARTINEZ, E. 2005. Multiple gene copy number enhances insulin precursor secretion in the yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Lett.*, 27 (5): 339-345.
- MERGULHAO, F.J., TAIPA, M.A., CABRAL, J.M. and MONTEIRO, G.A. 2004. Evaluation of bottlenecks in proinsulin secretion by *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.*, 109 (1-2): 31-43.
- NILSSON, J., JONASSON, P., SAMUELSSON, E., STAHL, S. and UHLEN, M. 1996. Integrated production of human insulin and its C-peptide. *J. Biotechnol.*, 48 (3): 241-250.
- PAIS-CHANFRAU, J.M., GARCIA, Y., LICOR, L., BESADA, V., CASTELLANOS-SERRA, L., CABELLO, C.I., HERNANDEZ, L., MANSUR, M., PLANA, L., HIDALGO, A., TAMBARA, Y., DEL, C.A.-P.M., DEL TORO, Y., VALDES, J. and MARTINEZ, E. 2004. Improving the expression of mini-proinsulin in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Lett.*, 26 (16): 1269-1272.
- PAIS, J.M., VARAS, L., VALDES, J., CABELLO, C., RODRIGUEZ, L. and MANSUR, M. 2003. Modeling of mini-proinsulin production in *Pichia pastoris* using the AOX promoter. *Biotechnol. Lett.*, 25 (3): 251-255.
- PORRO, D., GASSER, B., FOSSATI, T., MAURER, M., BRANDUARDI, P., SAUER, M. and MATTANOVICH, D. 2011. Production of recombinant proteins and metabolites in yeasts: when are these systems better than bacterial production systems? *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 89 (4): 939-948.
- PORRO, D., SAUER, M., BRANDUARDI, P. and MATTANOVICH, D. 2005. Recombinant protein production in yeasts. *Mol. Biotechnol.*, 31 (3): 245-259.
- RAYMOND, C.K., BUKOWSKI, T., HOLDERMAN, S.D., CHING, A.F., VANAJA, E. and STAMM, M.R. 1998. Development of the methylotrophic yeast *Pichia methanolica* for the expression of the 65 kilodalton isoform of human glutamate decarboxylase. *Yeast*, 14 (1): 11-23.
- ROUTLEDGE, S.J., MIKALIUNAITE, L., PATEL, A., CLARE, M., CARTWRIGHT, S.P., BAWA, Z., WILKS, M.D., LOW, F., HARDY, D., ROTHNIE, A.J. and BILL, R.M. 2016. The synthesis of recombinant membrane proteins in yeast for structural studies. *Methods*, 95 26-37.

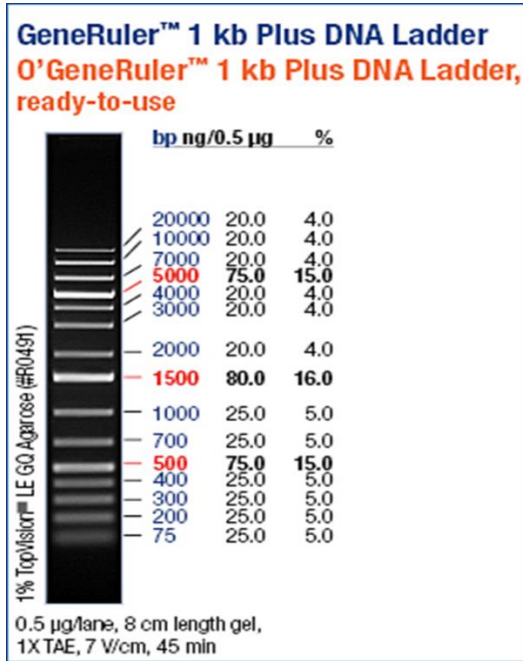
- SAHDEV, S., KHATTAR, S.K. and SAINI, K.S. 2008. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Mol. Cell. Biochem.*, 307 (1-2): 249-264.
- SAMBROOK, J. and RUSSEL, D. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor.
- SCHMIDT, M., BABU, K.R., KHANNA, N., MARTEN, S. and RINAS, U. 1999. Temperature-induced production of recombinant human insulin in high-cell density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.*, 68 (1): 71-83.
- SHIN, C.S., HONG, M.S., BAE, C.S. and LEE, J. 1997. Enhanced production of human mini-proinsulin in fed-batch cultures at high cell density of *Escherichia coli* BL21(DE3)[pET-3aT2M2]. *Biotechnol. Prog.*, 13 (3): 249-257.
- SHIVANAND, P. and NOOPUR, S. 2010. Recombinant DNA technology: Applications in the field of biotechnology and crime sciences. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 1 (1): 43-49.
- SUNG, W.L., YAO, F.L., ZAHAB, D.M. and NARANG, S.A. 1986. Short synthetic oligodeoxyribonucleotide leader sequences enhance accumulation of human proinsulin synthesized in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83 (3): 561-565.
- TALMADGE, K., BROSIUS, J. and GILBERT, W. 1981. An internal signal sequence directs secretion and processing of proinsulin in bacteria. *Nature.*, 294 (5837): 176-178.
- THIM, L., HANSEN, M.T., NORRIS, K., HOEGH, I., BOEL, E., FORSTROM, J., AMMERER, G. and FIIL, N.P. 1986. Secretion and processing of insulin precursors in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 83 (18): 6766-6770.
- VAJO, Z., FAWCETT, J. and DUCKWORTH, W.C. 2001. Recombinant DNA technology in the treatment of diabetes: insulin analogs. *Endocr. Rev.*, 22 (5): 706-717.
- VANZ, A.L., NIMTZ, M. and RINAS, U. 2014. Decrease of UPR- and ERAD-related proteins in *Pichia pastoris* during methanol-induced secretory insulin precursor production in controlled fed-batch cultures. *Microb. Cell. Fact.*, 13 (1): 23.
- WALSH, G. 2005. Therapeutic insulins and their large-scale manufacture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 67 (2): 151-159.
- WANG, Y., LIANG, Z.H., ZHANG, Y.S., YAO, S.Y., XU, Y.G., TANG, Y.H., ZHU, S.Q., CUI, D.F. and FENG, Y.M. 2001. Human insulin from a precursor overexpressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and a simple procedure for purifying the expression product. *Biotechnol. Bioeng.*, 73 (1): 74-79.

- WEYDEMANN, U., KEUP, P., PIONTEK, M., STRASSER, A.W., SCHWEDEN, J., GELLISSEN, G. and JANOWICZ, Z.A. 1995. High-level secretion of hirudin by *Hansenula polymorpha*--authentic processing of three different preprohirudins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 44 (3-4): 377-385.
- WU, S. and LETCHWORTH, G.J. 2004. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *Biotechniques*, 36 (1): 152-154.
- XIE, T., LIU, Q., XIE, F., LIU, H. and ZHANG, Y. 2008. Secretory Expression of Insulin Precursor in *Pichia pastoris* and Simple Procedure for Producing Recombinant Human Insulin. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 38 (3): 308-317.
- ZHU, T., GUO, M., TANG, Z., ZHANG, M., ZHUANG, Y., CHU, J. and ZHANG, S. 2009. Efficient generation of multi-copy strains for optimizing secretory expression of porcine insulin precursor in yeast *Pichia pastoris*. *J. Appl. Microbiol.*, 107 (3): 954-963.

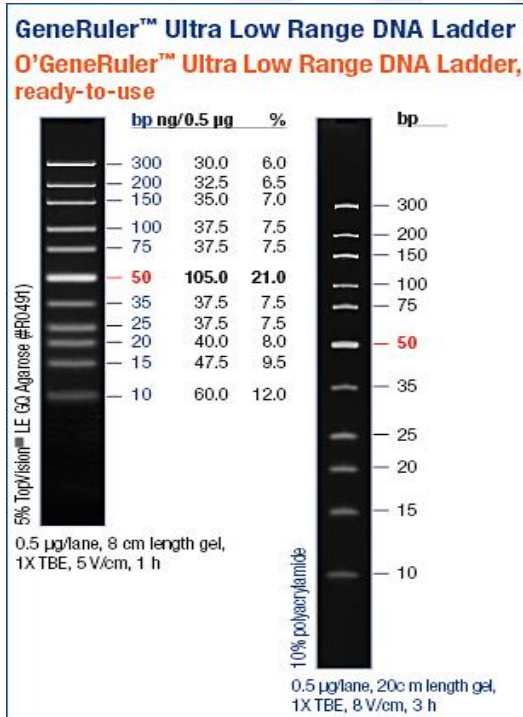
Ek-1: pPICZ α IP-His #4 plazmidi sekans sonucu



Ek-2: Çalışmada kullanılan DNA ve protein standartları

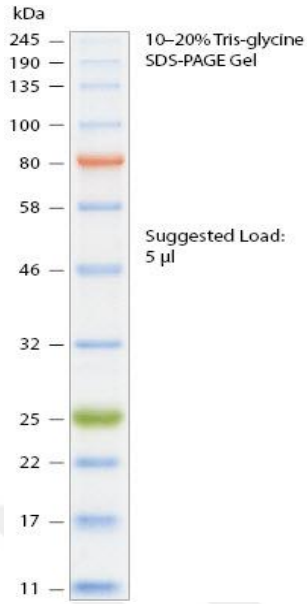


Agaroz jel elektroforezinde kullanılan DNA standardı: O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD)

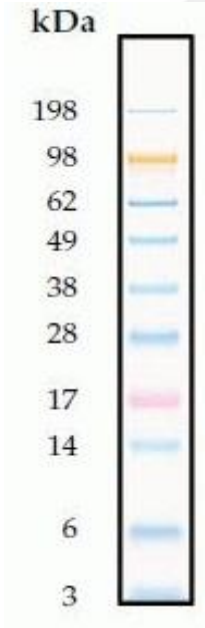


Agaroz jel elektroforezinde kullanılan DNA standardı: GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD)

Ek 2'nin devamı Çalışmada kullanılan DNA ve protein standartları



Western blot analizinde kullanılan protein standardı: Color Prestained Protein Standard, Broad Range (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD)



Western blot ve SDS-PAGE analizinde kullanılan protein standardı: SeeBlue® Plus2 Pre-stained Protein Standard (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD)

ÖZGEÇMİŞ



Ayşe TORUN, 1991 yılında Burdur Bucak'ta doğdu. Lise öğrenimini Bucak Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2010 yılında girdiği Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden 2014 yılında mezun oldu. Aynı yıl Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Yüksek lisans eğitimine başlayan Ayşe TORUN halen aynı kurumda eğitimini sürdürmektedir.