

## ***Solanum lycopersicum* Ekspanzin (LeExp1) Geni İçeren Rekombinant *Pichia pastoris* Protein Ekspresyon Vektörünün Dizaynı ve Oluşturulması**

Asliye Karaaslan<sup>1</sup>, Mehmet Karaaslan<sup>2</sup>, Hasan Vardin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Harran Üniversitesi, Şanlıurfa Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Şanlıurfa

<sup>2</sup>Harran Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Şanlıurfa

e-posta: asliyegumus@gmail.com, mk385@cornell.edu, hvardin@harran.edu.tr

Geliş Tarihi: 24.03.2017

Kabul Tarihi: 05.04.2017

### **Özet**

Bu çalışmanın amacı rekombinant ekspanzin proteini üretim amacıyla kullanılacak olan LeExp1-pPIC9K vektörünün dizayn edilmesi ve oluşturulmasıdır. Bu amaçla domates (*Solanum lycopersicum*) genomundan toplam RNA izole edilmiş ve spesifik primerler vasıtasıyla RT-PZR yöntemiyle LeExp1 genine ait olan komplementer DNA (cDNA) sentezlenmiş ve çoğaltılmıştır. LeExp1 genine ait cDNA pPIC9K vektörüne aktarılmadan önce EcoRI ve NotI restriksiyon enzimleriyle kesilmiş ve yine bu enzimlerle kesilmiş olan pPIC9K vektörüne DNA ligaz enzimi kullanılarak eklenmiştir. Klonlama işlemi sonrasında hedef geni içeren vektör JM109 kompetent *E. coli* hücrelerine ısı şoku uygulamasıyla transforme edilmiş ve antibiyotikli besiyerinde seçim gerçekleştirilmiştir. Antibiyotik pozitif olan tek kolonilerin hedef geni taşıyıp taşımadıkları koloni PZR yöntemiyle doğrulanmış ve *E. coli* hücrelerinden plazmid DNA'ler ekstrakte edilmiştir. PZR sonuçlarına göre 918 baz çiftlik LeExp1 geninin vektör içerisindeki varlığı tespit edilmiş ve dizi analizleriyle doğru nükleik asit sekansına sahip olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda moleküler analizler kullanılarak rekombinant ekspanzin proteinin üretilebilmesi için gerekli olan vektörün doğru bir şekilde oluşturulduğu ortaya konulmuştur.

**Anahtar kelimeler;** Ekspanzin; *Pichia pastoris*; rekombinant protein; pPIC9K

## **Design and Construction of *Pichia pastoris* Recombinant Expression Vector Harboring *Solanum lycopersicum* Expansin Gene (LeExp1)**

### **Abstract**

The aim of this study was design and construction of LeExp1-pPIC9K vector for recombinant expression of tomato expansin protein. For this purpose total RNA was isolated from *Solanum lycopersicum* and LeExp1 gene cDNA was amplified cloned from tomato genome by using specific primers via PCR. LeExp1 cDNA and pPIC9K vectors were digested with EcoRI - NotI and target gene was ligated to the vector by using DNA ligase enzyme. After cloning the transgene the LeExp1-pPIC9K vector was transferred to competent JM109 *E. coli* cells via heat shock transformation method and selected on antibiotic containing media. Antibiotic resistant single colonies were picked and presence of the target gene was verified using colony PCR. The vectors harboring LeExp1 gene was extracted from competent *E. coli* cells via plasmid DNA extraction method. According to the PCR results, presence of 918 bp transgene in the vector verified and the amplified DNA fragment was sequenced to make sure the fidelity of the construct. Based on the findings obtained in this study; it was determined that the vector required for recombinant expansin expression was successfully designed and constructed.

**Keywords;** Expansin; *Pichia pastoris*; recombinant protein; pPIC9K

### **1.Giriş**

Rekombinant proteinler; enzim endüstrisi, ziraat, biyofarmatik gibi önemli alanlarda; ilaç, gıda, beslenme, deterjan, tekstil, deri, kâğıt, polimer, plastik vb. birçok ürünün üretiminde büyük katkılar sağlamaktadır [1]. İlk protein aşısı 1796'da Jenner tarafından; ilk farmasötik protein üretimi ise 1922'de Banting ve Best tarafından gerçekleştiril-

miştir (insülin). Modern biyoteknoloji temelleri ilk olarak 1971'de atılmış ve bu tarihten 1-2 yıl sonra ise rekombinant DNA teknolojisi keşfedilmiştir. Enzim endüstrisi 1980-1990'larda mikrobiyal enzimlerin kullanılması ile gelişmeye başlamıştır. Yüksek maliyet ve düşük verime rağmen 1970'lerde enzimlerin önemli bölümü bitki ve hayvanlardan geleneksel olarak elde edilmekte idi. Mikroorganizmaların bitki ve hayvanlardan daha

hızlı, daha ucuz çoğaltılması ve ayrıca mikroorganizmalarda istenen kalite ve miktarda enzim üretiminin yapılabilmesi mikrobiyal enzim üretim çalışmalarını arttırmıştır. Dolayısıyla 2000'li yıllarda endüstriyel enzimlerin toplam pazarı iki milyar dolara ulaşmıştır ve bu rakam 2010'da ise yaklaşık olarak iki buçuk milyar dolar olarak tespit edilmiştir [1]. Proteaz grubu enzimler bu pazarın %57'sini oluşturmaktadır. Geriye kalan kısımda ise amilaz, glukoamilaz, ksiloz izomeraz, laktaz, lipaz, selüloz, pullulanaz ve ksilanaz yer almaktadır. Gıda ve yem sanayii endüstriyel enzimlerin en fazla kullanıldığı alanlardır. Endüstriyel enzimlerin yarısından fazlası maya ve küflerden; %30'u bakterilerden; %8'i hayvanlardan ve %4'ü bitkilerden elde edilmektedir. Yüksek miktarlarda protein elde etmek için uzun yıllar boyunca uygun mikroorganizma araştırılmış ve mutasyondan faydalanılmıştır [2].

Rekombinant DNA teknolojisi sağlamış olduğu şu yararlar ile enzim endüstrisinde önemli ölçüde rahatlık sağlamıştır. 1) Bitki ve hayvan enzimleri mikrobiyal fermentasyon ile elde edilebilmektedir. Ör; kimozen. 2) Enzim üretimi amacıyla kullanılan çeşitli mikroorganizma türleri mevcuttur. Ör; *Aspergillus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*. 3) Etkili sinyal sekans bölgelerinin, güçlü promoterlerin kullanımı ve çoklu sayıda kopyalama ile enzim üretilebilirliği arttırılabilmektedir. 4) Patojenik veya toksin üreten organizmalardan elde edilen yararlı enzimler güvenli konakçılarda üretilebilmektedir. 5) Protein mühendisliği enzimlerin stabilitesini, aktivitesini ve spesifikliğini arttırmak amacıyla çalışmaktadır [2]. Hodgson [3]'a göre 1990'larda birçok enzim rekombinant olarak üretilmekte idi ve 1993'de endüstriyel enzimlerin yarısından fazlası rekombinant üretilen enzimlerden oluşmaktaydı. Günümüzde rekombinant DNA teknolojisi ve protein mühendisliği sayesinde kullanıcıların veya kullanılan proseslerin ihtiyacına yönelik 'kişiyeye özel' enzim üretimi yapılabilir. 2000'li yıllarda endüstriyel enzimlerin toplam pazarı iki milyar dolara ulaşmıştır ve bu rakam 2010'da ise yaklaşık olarak iki buçuk milyar dolar olarak tespit edilmiştir [1]. Proteaz grubu enzimler bu pazarın %57'sini oluşturmaktadır. Geriye kalan kısımda ise amilaz, glukoamilaz, ksiloz izomeraz, laktaz, lipaz, selüloz, pullulanaz ve ksilanaz yer almaktadır. Gıda ve yem sanayii endüstriyel enzimlerin en fazla kullanıldığı alanlardır. Endüstriyel enzimlerin yarısından fazlası maya ve küflerden; %30'u bakterilerden; %8'i hayvanlardan ve %4'ü bitkilerden elde edilmektedir. Yüksek miktarlarda protein elde etmek için uzun yıllar boyunca uygun mikroorganizma araştırılmış ve mutasyondan faydalanılmıştır [2].

Ekspanzinler hücre duvarına lokalize olmuş, küçük boyutlu ve yaklaşık molekül ağırlığı 25 – 30 kDa arasında olan proteinlerdir [4, 5]. Literatürde bulunan bilgilere göre ekspanzin proteinleri selüloz mikrofibrilleri arasındaki hidrojen bağlarını

parçalayarak veya karbohidrat polimerlerini hücre duvarında lokalize olan enzimlerin daha kolay ulaşabileceği hale getirerek hücre duvarı modifikasyonlarında rol oynadığı hipotez olarak öne sürülmektedir [6]. Rose vd. [7] yaptıkları çalışmada domateslerde meyve ve olgunlaşmaya özgü LeExp1 geninin eksprese olduğunu göstermiştir. Bu genin meyvenin yumuşamaya başladığı ve dolayısıyla hücre duvarı parçalanma ve modifikasyon aşamalarında maksimum seviyeye çıktığı durumlarda spesifik olarak ifade edilmesi ekspanzin proteinleri ile hücre duvarı bileşenlerinin parçalanması arasında pozitif anlamda bir korelasyon olduğuna işaret etmektedir. Bu verileri destekleyecek şekilde ekspanzin proteinlerinin transjenik yöntemlerle yüksek miktarda eksprese edildiği meyvelerin kontrol örneklerine göre daha yumuşak olduğu ve hatta yumuşama reaksiyonlarının olgunlaşma periyodundan önce harekete geçtiği tespit edilmiştir [8]. Ekspanzin transkriptlerinin benzer şekilde klimakterik olmayan üzüm, çilek gibi meyvelerde bulunduğu belirlenmiş ve bu tür meyvelerde de yumuşama ve dolayısıyla karbohidratların parçalanma reaksiyonlarına katıldıkları fikrine işaret etmiştir [9, 10]. Dolayısıyla ekspanzin proteinlerinin hücre duvarını parçalama yetenekleri göz önüne alındığında son yıllarda bu proteinler üzerinde yapılan çalışmalar yoğun olarak devam etmiştir.

Rekombinant protein üretiminin ilk adımı üretilmek istenen enzimi kodlayan DNA bölgesini elde etmek ve çoğaltmaktır. Hedef geni konakçı hücreye taşıyacak uygun bir vektörün belirlenmesi ve bu vektörün ekspresyonu hedeflenen transgeni doğru oryantasyonda ve dizilimde içerecek şekilde dizayn edilmesi başarılı bir rekombinant protein üretimi için elzemdir. Bu çalışmanın amacı gıda, tekstil ve kimya endüstrisinde kullanılma potansiyeli bulunan rekombinant ekspanzin proteininin üretilmesine olanak sağlayacak olan maya transformasyon vektörünün oluşturulması ve moleküler analizler vasıtasıyla vektörün hedef geni taşıdığına tespit edilmesidir.

## 2. Materyal – Metod

### 2.1 Materyal

Bu çalışmada Ekspanzin gen kaynağı olarak domates bitkisi kullanılmıştır. Domates (*Solanum*

*lycopersicum cv. Ailsa craig*) bitki materyalleri steril koşullar altında doku kültürü ortamında geliştirilerek DNA ve RNA kaynağı olarak kullanılmışlardır. Araştırmada kullanılan kimyasal materyaller, özgün primerler Sigma Aldrich Co. (Taufkirchen, Germany) ve Merck (Darmstadt, Germany) 'den temin edilmişlerdir. kullanılan tüm kimyasal materyaller analitik saflık düzeyindedirler. *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) mayaları, ekspresyon vektörleri, besiyerleri Invitrogen (San Diego, CA) firmasından temin edilmişlerdir. Taq DNA polimeraz, DNA ligaz, DNA Restriksiyon Endonükleaz enzimleri New England Biolabs (UK) firmasından temin edilmiştir. RT-PCR analizi için kullanılan Superscript One step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase kiti Invitrogen (San Diego, CA) firmasından sağlanmıştır.

## 2.2. Domates Bitkisinden Toplam RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için kullanılan çözeltiler DEPC (dietilenpirokarbonat) ile muamele edilmiş saf su ile hazırlanmıştır. Meyve dokularından RNA izolasyonu için Lopez-Gomez ve Gomez-Lim [11] tarafından yayınlanan metot uygulanmıştır.

## 2.3. LeExp1 Geninin RT-PZR Vasıtasıyla Çoğaltılması

Hazırlanan RT-PZR reaksiyonları cDNA sentezi için 55°C'de 30 dakika boyunca bekletilmiş ve PZR amplifikasyonundan önce 94°C'de 2 dakika bekletilerek ters transkriptaz enzimi denatüre edilmiştir. PZR profili olarak 94°C'de 3 dakika, 34 döngü boyunca 94°C'de 15 s, 56°C'de 30 s, 68°C'de 1 dakika ve devamında tek bir döngü olarak 68°C'de 5 dakika olarak belirlenmiştir. PZR ürünleri %1,2 agaroz jel üzerinde ayrıştırılmıştır ve fotoğrafları çekilmiştir.

## 2.4. LeExp1 geninin pPIC9K vektörüne klonlanması

PZR reaksiyonu esnasında dizayn edilen primerler vasıtasıyla LeExp1 geninin cDNA'larının her iki uç bölgesine uygun DNA restriksiyon enzim tanıma bölgeleri (EcorI - NotI) eklenmiştir. Hem klonlanacak olan DNA parçacıkları hem de üzerine klonlama yapılacak olan pPIC9K vektörleri uygun restriksiyon enzimleriyle kesilerek DNA ligaz enzimleriyle hedef DNA parçacıklarının vektörlere yapıştırılması işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem sonucunda domateslerden izole edilen LeExp1

genini taşıyan ve rekombinant Ekspanzin proteinini üretebilir hale getirilmiş pPIC9K vektörleri elde edilmiştir.

## 2.5. LeExp1 genini taşıyan pPIC9K vektörlerinin çoğaltılması

*P. pastoris* mayalarına aktarmak amacıyla hedef genleri taşıyan pPIC9K plazmidlerinin JM109 *Escherichia coli* (*E. coli*) hücrelerine transforme edilerek vektörlerin çoğaltılması işlemi yapılmıştır. Üretici firmanın el kitabına bağlı kalınarak Standart *E. coli* JM109 Competent Cells Transformation yöntemi vasıtasıyla *E. coli* hücreleri vektörlerle transforme edilmiştir.

## 2.6. pPIC9K vektörlerinin kompetent *P. pastoris* hücrelerine elektroporasyonu, doğrulanması ve seçilimi

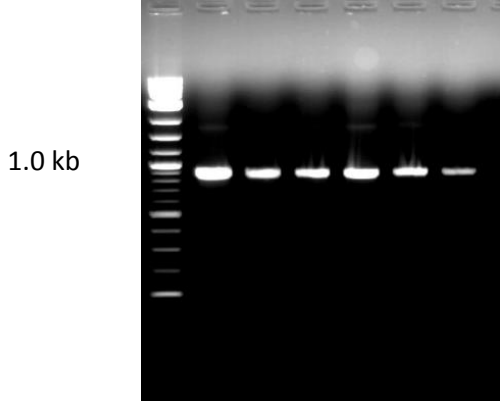
Hedef genleri taşıyan pPIC9K vektörleri hazırlanan kompetent maya hücrelerine aktarılmadan önce doğrusal hale getirilmiştir. Elektroporasyon cihazı üretici firmanın tavsiyelerine uygun olarak *Saccharomyces cerevisiae*'ye göre ayarlanarak elektroporasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Elektroporasyon işleminin doğru bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediği rekombinant maya hücrelerinden izole edilen DNA'ların PZR yöntemi kullanılarak çoğaltılması yoluyla doğrulanmıştır. Rekombinant maya hücrelerinin antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi amacıyla mayalar farklı konsantrasyonlarda (0,5, 1, 2 ve 4 mg/ml) Geneticin G418 antibiyotiği içeren YPD (Yeast Peptone Dextrose) besiyerlerinde geliştirilmiştir.

## 3. Bulgular ve Tartışma

### 3.1. LeExp1 Geninin PZR Vasıtasıyla Çoğaltılması

Rekombinant Ekspanzin proteinlerini kodlayan LeExp1 genlerini izole edebilmek için kullanılan nükleik asitler domates bitkilerinden izole edilmiştir. Bu amaçla domates bitkisinin genomundan LeExp1 genini kodlayan DNA ve RNA ekstraksiyonları yapılmıştır. İzole edilen nükleik asitlerin moleküler çalışmalarda kullanılabilir nitelikte olup olmadıkları jel elektroforezi ile teyit edilmiştir. LeExp1 genine ait cDNA'ların %1.2'lik agaroz jel görüntüsü Şekil 1'de verilmiştir. Genler klonlama işleminde kullanılmak üzere Illustra™ GFX™ PCR Gel Band Purification Kit kullanılarak saflaştırılmıştır. Spesifik primer kullanımı, jel agarozu ayrıştırması sonucunda beklenen

büyükte DNA parçacıklarının çoğaltılmış olması ve DNA dizi analizi sonucunda elde edilen sekans bilgilerine göre çoğaltılması planlanan gen bölgesi kesin olarak elde edilmiştir.



**Şekil 1.** DNA markörü (1. kuyucuk), LeExp1 (2.- 7. kuyucuk) genine ait cDNA'ların %1.2'lik agaroz jel görüntüsü.

### 3.2. LeExp1 geninin pPIC9K vektörüne klonlanması

PZR reaksiyonu ve bölgesel yönlendirilmiş mutasyonlara uygun dizayn edilen primerler vasıtasıyla ilgili genin (LeExp1) cDNA'sının her iki uç bölgesine uygun DNA restriksiyon enzim tanıma bölgeleri (EcoRI - NotI) eklenmiştir. Hem klonlanacak olan DNA parçacıkları hem de üzerine klonlama yapılacak olan pPIC9K vektörleri uygun restriksiyon enzimleriyle kesilerek DNA ligaz enzimleriyle hedef DNA parçacıklarının vektörlere yapıştırılması işlemi gerçekleştirilmiştir.

### 3.3. pPIC9K vektörlerinin *E. coli* hücrelerinde çoğaltılması

Hedef gen bölgesini taşıyan pPIC9K vektörlerini *P. pastoris* mayalarına aktarmak amacıyla plazmidler JM109 *E. coli* hücrelerine transforme edilerek çoğaltılmıştır. Üretici firmanın maneline bağlı kalınarak Standart *E. coli* JM109 Competent Cells Transformation yöntemi vasıtasıyla *E. coli* hücreleri vektörlerle transforme edilmiştir. Bu amaçla ilk olarak steril polipropilen tüpler buz üzerinde 5 dakika bekletilerek soğutulmuşlardır. Kompetent *E. coli* JM109 hücreleri -80°C'den çıkarılıp buz üzerinde çözündürülerek kullanıma hazır hale getirilmişlerdir. Kompetent hücreler çözündükten sonra 100 µl alınarak steril soğutulmuş polipropilen tüplere aktarılıp üzerlerine hedef genleri taşıyan 1 µl pPIC9K vektörü eklenmiştir. Polipropilen tüpler

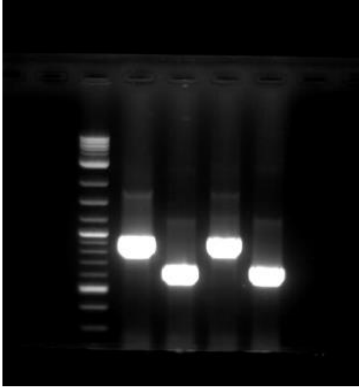
hafifçe karıştırılarak buz üzerinde 10 dakika inkübe edildikten hemen sonra 42°C'lik su banyosuna alınarak 50 saniye sabit tutularak inkübe edilmişlerdir. Hemen ardından vakit kaybetmeden buz üzerine alınarak 2 dakika süresince bekletilmişlerdir. Bu esnada meydana gelen ani ısı değişikliği ile açılıp kapanan bakteri hücre membranı porlarından vektörlerin hücre içerisine geçiş yapmaları sağlanmıştır. Bakteri hücrelerinin üzerine 900 µl SOC sıvı besiyeri eklenerek çalkalamalı inkübatörde 37°C'de 225 rpm'de 60 dakika süreyle bekletilmişlerdir. İnkübasyondan sonra 100 µl transforme edilmiş bakteri hücresi alınarak 100 µg/ml ampisilin içeren LB agar katı besiyerine ekim yapılmıştır ve bir gece 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonucunda ampisilinli ortamda gelişen hücrelerin vektör içerdikleri değerlendirilmiştir. Örnek bir petri resmi Şekil 2'de gösterilmektedir.



**Şekil 2.** 100 µg/ml ampisilin içeren LB agar'da gelişen transforme edilmiş *E. coli* hücreleri.

100 µg/ml ampisilin içeren LB agar'da gelişen *E. coli* hücrelerinin sahip oldukları antibiyotik dirençliliklerine bağlı olarak pPIC9K vektörlerini içerdikleri değerlendirilmiştir. Ancak sadece antibiyotikli ortamda gelişmiş olmaları yani vektörün sağladığı antibiyotik dirençliliği vektör içeren *E. coli* hücrelerinin seçiminde yeterli görülmemiştir ve bu nedenle PZR yöntemi de kullanılarak hücrelerin ikinci bir doğrulama metoduyla pPIC9K vektörünü ve vektöre bağlı olarak hücre içine aktarılan LeExp1 gen bölgesini içerip içermedikleri ikinci bir adımda analiz edilmiştir. Bu amaçla öncelikle vektörü içerdiği

düşünülen antibiyotik dirençli JM109 bakteri hücre kolonileri seçilerek antibiyotik içeren (100 µg/ml) 5 ml sıvı LB besiyerine aktarılmış ve bir gece boyunca 37°C'de bekletilerek bakteri gelişimi ve aynı zamanda bakterilerin içerisinde vektörlerin çoğaltılması işlemi yapılmıştır. *E. coli* bakteri hücre kültüründen 'Plasmid DNA Preparation from *E. coli* by the Alkaline Lysis Procedure' yöntemine göre plazmid DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Plazmid DNA izolasyonu işlemi sonucunda elde edilen plazmid DNA'lar PZR yönteminde DNA kaynağı olarak kullanılmıştır. PZR yöntemiyle transformasyon işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştiği ve pPIC9K vektörlerinin hedef genleri kesin olarak taşıdığı doğrulanmıştır. Hedef genleri taşıyan vektörlerle transforme edilmiş *E. coli* hücrelerinden izole edilen plazmidler kullanılarak yapılan PZR çalışması sonuçlarının agaroz jel üzerindeki görüntüsü Şekil 3'de örnek olarak verilmiştir. Dolayısıyla antibiyotik dirençliliği sonrasındaki seçimde elde edilen *E. coli* hücre kültürlerinin içerisindeki plazmidlerin hedef geni taşıdığı bu şekilde tayin edilmiştir.



**Şekil 3.** *E. coli* hücre kültüründen izole edilen pPIC9K plazmidlerinin DNA kaynağı olarak kullanıldığı PZR analiz sonucu. Birinci kuyucuk DNA markörü, ikinci ve dördüncü kuyucuklar yaklaşık 900 bp'lik LeExp1 genini çoğaltacak şekilde tasarlanmış primerler çiftlerinin kullanıldığı PZR ürünü; üçüncü ve beşinci kuyucuklar yaklaşık 650 bp'lik LeExp1 gen parçacığını çoğaltacak şekilde tasarlanmış primer çiftlerinin kullanıldığı PZR ürünü.

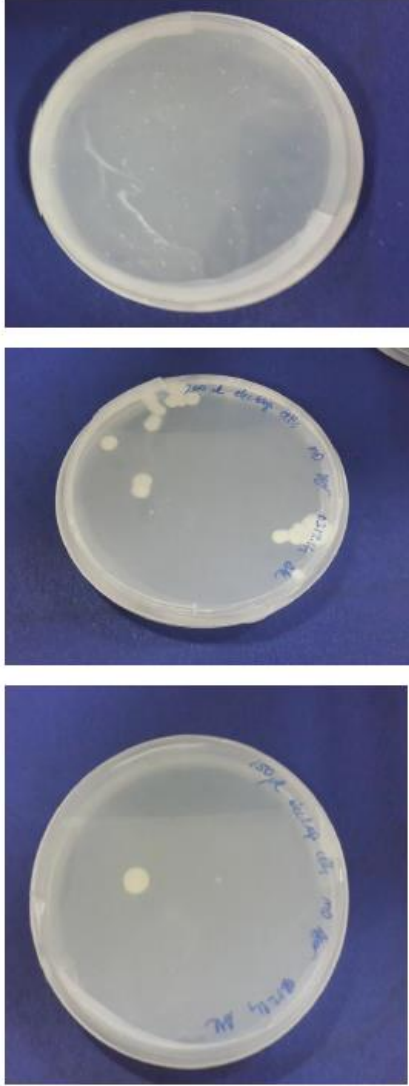
### 3.3. pPIC9K plazmidlerinin *Pichia pastoris* mayalarına transformasyonu

Hedef geni taşıyan pPIC9K vektörleri hazırlanan kompetent maya hücrelerine aktarılmadan önce doğrusal hale getirilmiştir. LeExp1 genini taşıyan

vektörler SacI enzimi ile 37°C'de gece boyunca inkübe edilerek doğrusal hale getirilmiş ve elektroporasyon yöntemiyle mayalara aktarılmışlardır. Elektroporasyon işlemi için doğrusal hale getirilen vektörlerden 10 µl alınarak 80 µl kompetent maya hücre kültürü üzerine aktarılmıştır. Karışım daha önceden soğutulmuş 0.2 cm'lik steril elektroporasyon küvetine transfer edilmiş ve buz üzerinde 5 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Bu esnada elektroporasyon cihazı üretici firmanın tavsiyelerine uygun olarak *Saccharomyces cerevisiae*'ye göre ayarlanmıştır. Buz üzerindeki inkübasyon sonunda küvet cihaza yerleştirilmiş ve elektroporasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Elektroporasyon işlemi tamamlanınca elektropore olmuş hücreler üzerine soğutulmuş 1 ml 1 M sorbitol ilave edilmiş ve hücreler steril mikrosantrifüj eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Hücre kültürlerinden 200 – 250 µl alınarak yayma yöntemiyle MD (Minimal Dextrose) katı besiyerine ekim yapılmıştır ve koloni oluşumu gözlenene kadar 30°C'de inkübe edilmiştir. 3-5 gün süren 30°C'deki inkübasyon sonucunda hedef geni taşıyan pPIC9K vektörlerini taşıyan transgenik *P. pastoris* mayaları gelişmeye başlamışlardır (Şekil 4).

Elektroporasyon sonrası başarılı bir şekilde maya genomuna rekombinasyon olayının gerçekleşip gerçekleşmediği ilk seviyede mayaların histidin bulunmayan ortamda gelişebilme yeteneklerine bağlı olarak tayin edilmiştir. İçerdiği vektör sayesinde Histidin bulunmayan selektif besiyerinde gelişme yeteneğini gösteren maya hücreleri His<sup>+</sup> olarak adlandırılmışlardır ve His<sup>+</sup> kolonilerden DNA izolasyonu yapılarak bu DNA'lara bağlı olarak hedef genlerin maya genomundaki varlıkları PZR yöntemiyle araştırılmıştır. DNA izolasyonunda mayalardan DNA ekstraksiyonu yapılmasına olanak sağlayan genel DNA saflaştırma yöntemi uygulanmıştır. Buna göre öncelikle 6-10 adet His<sup>+</sup> rekombinant maya kolonileri seçilerek MD sıvı besiyerine aşılanmış ve OD<sub>600</sub> değeri 5-10 aralığına ulaşana kadar 30°C'de inkübe edilmiştir. Santrifüjle çöktürülen maya peleti sırasıyla su ve SCED tampon çözeltisinde çözüldürüldükten sonra Zimolaz enzimi vasıtasıyla hücre duvarları parçalanarak DNA moleküllerinin çıkışı sağlanmıştır. Daha sonra SDS ve Potasyum Asetat çözeltileri ile muamele edilerek hücre ve organel membranları parçalanarak DNA

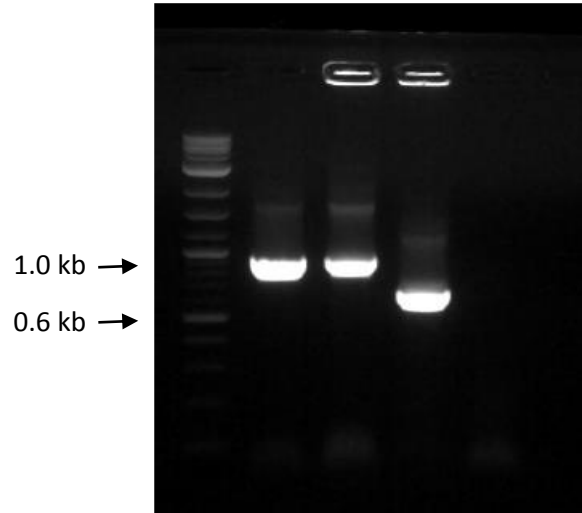
molekülleri çözelti içerisinde dağıtılarak fenol-kloroform-izoamil alkol karışımı ile ekstrakte edilip amonyum asetat vasıtasıyla çökeltilip ardından etanol ile yıkanmıştır.



**Şekil 4.** Histidin içermeyen selektif MD besiyerinde gelişen His<sup>+</sup> *P. pastoris* mayaları.

Elde edilen DNA ekstraktları PZR analizlerinde DNA kaynağı olarak kullanılmış ve içerisinde hedef genlerin var olup olmadıkları araştırılmıştır. PZR analizinde DNA kaynağı olarak rekombinant maya hücrelerinden izole edilen DNA, elektroporasyon öncesinde mayalara aktarılmak üzere doğrusal hale getirilen vektör (pozitif kontrol), rekombinant maya hücrelerinden izole edilen DNA, elektroporasyon işlemi uygulanmayan ebeveyn hücrelerden izole edilen DNA (negatif kontrol) kullanılmıştır. PZR reaksiyonu dört farklı tüp içerisinde spesifik primerler kullanılarak yürütülmüştür. İlk reaksiyon- da *P. pastoris* mayalarının transformasyonu

amacıyla hazırlanmış ve yapısında klonlanmış hedef genleri barındıran vektör (pozitif kontrol) DNA kaynağı olarak kullanılmış ve spesifik primer çifti kullanılmıştır. İkinci reaksiyonda elektroporasyon yöntemiyle dönüştürülen mayalardan izole edilen DNA nükleik asit kaynağı olarak kullanılmış ve spesifik primer çifti kullanılmıştır. Üçüncü reaksiyonda ikinci reaksiyonda kullanılan DNA kaynağı aynı şekilde değerlendirilmiş ancak primer olarak daha kısa bir bölgeyi hedef alan oligo çifti kullanılmıştır. Dördüncü reaksiyonda ise transforme edilmemiş parent mayalardan izole edilen DNA nükleik asit kaynağı olarak kullanılmış (negatif kontrol) ve spesifik primer çifti kullanılmıştır. PZR analizinden elde edilen sonuçlar %1.2 agaroz jel üzerinde (Şekil 5) gösterilmektedir. Elde edilen sonuçtan da görülebileceği üzere kontrol örneklerinden öngörüldüğü şekilde pozitif ve negatif sonuçların bulunması, ikinci kuyucukta beklenen büyüklükte bant elde edilmesi ve beşinci kuyucukta ise beklenildiği şekilde PZR sonucunda herhangi bir bant oluşmamış olması reaksiyonun sağlıklı ve kontrollü bir şekilde yürütülmüş olduğunu göstermektedir.



**Şekil 5.** Rekombinant *P. pastoris* mayasından spesifik LeExp1 primerleri kullanımıyla elde edilen reaksiyon ürünlerinin %1.2 agaroz jel üzerinde gösterimi. 1. kuyucuk DNA markör, 2, 3, ve 4. kuyucuklar PZR ürünleri.

PZR sonucunda elde edilen veriler elektroporasyon uygulanmış mayaların genomlarında hedef genleri taşıdıklarını göstermiştir. Bu yöntem Histidin seleksiyonu sonrasında elektroporasyon işleminin başarısını doğrulayan ikinci bir kontrol basamağı

olarak değerlendirilmiştir. Üçüncü ve nihai seleksiyon yöntemi olarak ise rekombinant mayaların Geneticin 418 antibiyotiği içeren besiyerlerinde geliştirilmesi yolu kullanılmıştır. PZR reaksiyonuyla LeExp1 genini içerdiği belirlenen mayalar sırasıyla 0,5, 1, 2 ve 4 mg/ml konsantrasyonuna kadar konsantrasyonlarda antibiyotik içeren Yeast Peptone Dextrose (YPD) besiyerlerinde geliştirilmiş ve antibiyotik dirençliliği gösteren mayalar ekspresyon çalışmalarında kullanılmak üzere stab kültürler halinde beklemeye alınmışlardır.

#### 4. Sonuç

*P. pastoris* mayaları kullanılarak heterolog rekombinant protein üretimi başarılı bir şekilde yıllardır uygulanmaktadır. Rekombinant proteinlerin *P. pastoris*'te üretilebilmeleri için gerekli olan önemli basamaklardan birincisi uygun vektörün dizayn edilmesi ve oluşturulmasıdır. Bu amaçla uygun vektörün ve bu vektörü taşıyacak olan konakçı hücrenin amaca yönelik olarak seçilimi gerekmektedir. Bu çalışma kapsamında rekombinant LeExp1-pPIC9K vektörü inşa edilmiştir. Bu vektör AOX1 promotörü ve üretilen rekombinant proteinin hücre dışına salgılanmasını sağlayan  $\alpha$ -mating faktörü içermektedir. *Pichia* hücreleri fermentasyon ortamında yüksek hücre konsantrasyonlarına kolaylıkla çoğalabilmeleri ve fermentasyon ortamına başarılı bir şekilde adapte olabilmeleri gelmektedir. Ayrıca *Pichia* mayaları rekombinant proteinler hücre dışına salgılayabilmekte ve bu durumda hedef proteinlerin saflaştırılmasını kolaylaştıran bir olgu olarak değerlendirilmektedir. Ökaryotik yapılarından dolayı bu mayalar proteinlerin doğru şekilde katlanmalarını sağlayan protein ifadesi sonrası modifikasyonlara olanak sağlaması ve çözünür-aktif formda proteinleri üretebilmeleri bir diğer pozitif özellikleridir. Bu özelliklerinden dolayı *Pichia* mayaları günümüzde yaygın olarak heterolog protein üretiminde kullanılmaktadır. Dolayısıyla *P. pastoris* mayalarında ekspansin proteinlerinin ifade edilmesi bu proteinlerin rekombinant olarak üretilebilmelerini sağlayacak olan önemli bir hedeftir. Bu hedefe ulaşabilmek için gerekli olan uygun vektörün dizayn ve inşa edilmesi bu çalışma kapsamında başarılı ve üretilen rekombinant

vektör ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere elde edilmiştir.

#### Teşekkür

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından 113O392 nolu proje kapsamında desteklenmiştir. Araştırmacılar TÜBİTAK'a sağladığı destekten dolayı teşekkürlerini sunarlar.

#### Kaynaklar

- [1]. Demain, A.L., Vaishnav, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms, *Biotechnology Advances*, 27, 297-306, 2009.
- [2]. Falch, E.A. Industrial enzymes — Developments in production and application, *Biotechnology Advances*, 9, 643-658, 1991.
- [3]. Hodgson, J. The changing bulk biocatalyst market. *Biotechnology*, 12, 289-290, 1994.
- [4]. McQueen-Mason, S.J., Durachko, D.M., Cosgrove, D.J. Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *Plant Cell* 4, 1425-1433, 1992.
- [5]. Cosgrove, D.J., Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature*, 407, 321-326, 2000.
- [6]. Cosgrove, D.J. Cell wall loosening by expansins. *Plant Physiology*, 118, 333-339, 1998.
- [7]. Rose, J.K.C., Lee, H.H., Bennett, A.B. Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening regulated. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:5955-5960, 1997.
- [8]. Brummell, D.A., Harpster MH, Civello PM, Palys JM, Bennett, AB, Dunsmuir P. Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening. *Plant Cell*, 11, 2203-2216, 1999.
- [9]. Harrison, P.E., McQueen-Mason, S.J., Manning, K. Expression of six expansin genes in relation to extension activity in developing strawberry fruit. *J Exp Bot* 52, 1437-1446, 2001.
- [10]. Gao, Z., Maurousset, L., Lemoine, R., Yoo, S-D., van Nocker, S., Loescher, W. Cloning, expression, and characterization of sorbitol transporters from developing sour cherry fruit and leaf sink tissues. *Plant Physiol* 131, 1566-1575, 2003.
- [11]. Lopez-Gomez, R., Gomez-Lim, M.A. A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. *Hortiscience* 27:440-442, 1992.