



## HARRAN ÜNİVERSİTESİ MÜHENDİSLİK DERGİSİ

*HARRAN UNIVERSITY JOURNAL of ENGINEERING*

e-ISSN: 2528-8733 (ONLINE)

URL: <http://dergipark.gov.tr/humder>

---

### Pichia pastoris SMD1168 Suşu Kullanılarak Rekombinant Ekspanzin Üretimi

*Recombinant Expansin Production Using Pichia pastoris SMD1168 Strain*

**Yazar(lar) (Author(s)):** Asliye KARAASLAN<sup>1</sup>, Hasan VARDİN<sup>2</sup>, Mehmet KARAASLAN<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ORCID ID: 0000-0002-3834-0647

<sup>2</sup> ORCID ID: 0000-0001-6552-2713

<sup>3</sup> ORCID ID: 0000-0001-8097-9535

**Bu makaleye şu şekilde atıfta bulunabilirsiniz (To cite to this article):** Asliye KARAASLAN, Hasan VARDİN, Mehmet KARAASLAN, "Pichia pastoris SMD1168 Suşu Kullanılarak Rekombinant Ekspanzin Üretimi", *Harran Üniversitesi Mühendislik Dergisi*, 4(2): 101-111, (2019).

**Erişim linki (To link to this article):** <http://dergipark.gov.tr/humder/archive>



## *Pichia pastoris* SMD1168 Suşu Kullanılarak Rekombinant Ekspanzin Üretimi

Asliye KARAASLAN<sup>1</sup>, Hasan VARDİN<sup>2</sup>, Mehmet KARAASLAN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Harran Üniversitesi, Şanlıurfa Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Gıda Teknolojisi Bölümü, ŞANLIURFA

<sup>2</sup>Harran Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, ŞANLIURFA

### Öz

Bu çalışmanın amacı son yıllarda rekombinant protein üretiminde başarılı bir şekilde kullanılan metilotropik *Pichia pastoris* SMD1168 suşunu kullanarak domates bitkisinden izole edilen ekspanzin enziminin üretilmesidir. Bu amaçla domates (*Solanum lycopersicum*) genomundan toplam RNA izole edilmiş ve spesifik primerler vasıtasıyla çoğaltılarak pHO1 sinyal sekans bölgesine sahip pHIL-S1 vektörüne aktarılmıştır. PZR yöntemi ile 918 baz çiftlik LeExp1 geninin vektör içerisindeki varlığı tespit edilmiş ve hedef geni taşıyan pHIL-S1 vektörü çoğaltılarak *P. pastoris* SMD1168 suşuna elektroporasyon yolu ile transfer edilmiştir. Transgenik *P. pastoris* SMD1168 suşundan ekspresyon yolu ile ekspanzin proteini üretilmiş ve ekspresyon sonunda toplam protein konsantrasyonu ile kuru hücre ağırlığı ölçümleri yapılmıştır. SDS-PAGE analizi ile elde edilen proteinin ekspanzin olduğu doğrulanmıştır. Bu çalışmanın sonucunda *P. pastoris* SMD1168 suşu ve pHIL-S1 vektörü kullanılarak rekombinant ekspanzin proteini üretimi gerçekleştirilmiştir.

### Makale Bilgisi

Başvuru: 10/02/2019

Düzeltilme: 08/03/2019

Kabul: 03/04/2019

### Anahtar Kelimeler

*Pichia pastoris* SMD1168  
rekombinat ekspanzin  
pHIL-S1  
LeExp1

### Keywords

*Pichia pastoris* SMD1168  
rekombinat ekspanzin  
pHIL-S1  
LeExp1

### Recombinant Expansin Production Using *Pichia pastoris* SMD1168 Strain

### Abstract

The aim of this study was production of recombinant expansin protein isolated from tomatoes by using methylotrophic *Pichia pastoris* SMD1168 strain which have been using for recombinant protein production successfully in recent years. For this purpose total RNA was isolated from *Solanum lycopersicum* and LeExp1 gene cDNA was amplified cloned from tomato genome by using specific primers and transferred pHIL-S1 plasmid which have pHO1 signal sequence. The presence of 918 bases LeExp1 gene in the vector was determined by PCR method and the vector was amplified and transferred to *P. pastoris* SMD1168 strain by electroporation. Expansin protein was produced by expression of transgenic *P. pastoris* SMD1168 strain and dry cell weight and total protein concentration measurements were made at the end of expression. It was confirmed by SDS-PAGE analysis that the obtained protein from transgenic *P. pastoris* SMD1168 was expansin. As a result of this study, the production of recombinant expansin protein was performed using *P. pastoris* SMD1168 strain and pHIL-S1 vector.

## 1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

Rekombinant proteinler; biyofarmatik, ziraat, enzim endüstrisi, gibi önemli alanlarda; beslenme, tekstil, ilaç, gıda, kâğıt, 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 gerçekleştirilmiştir (insülin). Modern biyoteknoloji temelleri ilk olarak 1971'de atılmış ve bu tarihten 1-2 yıl sonra ise rekombinant DNA teknolojisi keşfedilmiştir. Rekombinant DNA teknolojisi ve moleküler genetik çalışmaları alanında son yıllarda artan gelişmeler sayesinde araştırmacılar farklı organizmalardan elde ettikleri DNA moleküllerini *in vitro* ortamda birleştirme imkânı elde etmiştir. Bu sayede bitki ve hayvan enzimleri mikrobiyal fermentasyon ile elde edilebilmektedir ayrıca enzim üretimi amacıyla kullanılan çeşitli mikroorganizma türleri mevcuttur. Günümüzde rekombinant DNA teknolojisi ve protein

mühendisliği sayesinde kullanıcıların veya kullanılan proseslerin ihtiyacına yönelik enzim üretimi yapılabilmektedir. 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].

Enzimlerin önemli bölümü yüksek maliyete rağmen 1970'lerde bitki ve hayvanlardan geleneksel olarak elde edilmekte iken 1980-1990'larda mikrobiyal enzimlerin kullanılmaya başlanması ile enzim endüstrisi gelişmeye başlamıştır [3]. Gıda ve yem sanayii endüstriyel enzimlerin en fazla kullanıldığı alanlardır. Mikroorganizmaların bitki ve hayvanlardan daha hızlı, daha ucuz çoğaltılması ve ayrıca mikroorganizmalarda istenen kalite ve miktarda enzim üretiminin yapılabilmesi mikrobiyal enzim üretim çalışmalarını arttırmıştır. Farklı türlere ait bakteri, maya ve küfler endüstriyel enzim üretiminde kullanılmaktadır.

Metilotropik bir maya olan *Pichia pastoris* uzun yıllardır rekombinant protein üretiminde kullanılan bir mikroorganizmadır. *P. pastoris* mayası sahip olduğu ökaryotik yapısı sayesinde doğada az miktarda bulunan veya endüstriyel öneme sahip proteinlerin üretiminde bir biyofabrika olarak kullanılabilir. *P. pastoris* mayası translasyon sonrası proteinlerde meydana gelen modifikasyonları doğru şekilde yapması, proteinlerin aktif formlarına uygun şekilde katlanmalarına olanak sağlaması, g/L düzeylerinde protein üretme yeteneğine sahip olması, başarılı transformasyonlarına olanak sağlayan metotların geliştirilmiş olması, hücre dışına çok az natif protein salgılaması ve dolayısıyla ekstraselüler proteinlerin üretim ve saflaştırılmasını kolaylaştırması nedenlerinden dolayı son yıllarda yaygın olarak heterolog protein üretiminde kullanılmaktadırlar. SMD1168 (*prb1 pep4*) suşu proteaz içermeyen *P. pastoris* suşu olup bazı heterolog proteinlerin üretiminde çok rahat olarak kullanılmaktadır.

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 karbonhidrat polimerlerini hücre duvarında lokalize olan enzimlerin daha kolay ulaşabileceği hale getirerek hücre duvarı modifikasyonlarında rol oynadığı hipotez olarak öne sürülmektedir [6]. Rose ve ark. [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 karbonhidratların 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.

Bu çalışma kapsamında domateste ekspanzin proteini üretiminden sorumlu LeExp1 geni pHIL-S1 vektörüne uygun enzimler vasıtasıyla klonlanmış ve hedef geni taşıyan pHIL-S1 vektörü elektroporasyon yöntemi ile *P. pastoris* SMD1168 suşuna transfer edilmiştir. Uygun ekspresyon koşulları sağlanarak transjenik *P. pastoris* suşundan ekspanzin proteini üretilmiştir.

## 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.

*P. pastoris* SMD1168 suşu, pHIL-S1 vektörü, RT-PCR analizi için kullanılan Superscript One step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase kiti, özgün primerler, besiyerleri Invitrogen (San Diego, CA) firmasından; Taq DNA polimeraz, DNA ligaz, DNA Restiriksiyon Endonükleaz enzimleri New England Biolabs (UK) firmasından temin edilmiştir. Araştırmada kullanılan kimyasal materyaller

analitik saflık düzeyinde olup Sigma Aldrich Co. (Taufkirchen, Germany) ve Merck (Darmstadt, Germany)'den temin edilmişlerdir.

## 2.2. Domates Bitkisinden Hedef Gen Bölgesi (LeExp1) İzolasyonu

Domates bitkisinden DNA izolasyonu yapılırken Muhammed ve ark. (1994) tarafından yayınlanan metot uygulanmıştır.

## 2.3. Ekspanzin Geninin Yarı Kantitatif Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) Vasıtasıyla Çoğaltılması

Yarı kantitatif RT-PZR reaksiyonu için SuperScript™ III One-Step RT-PCR system with Platinum® Taq DNA Polymerase kiti üretici firmanın talimatlarına uygun olarak kullanılmıştır (Invitrogen, Life technologies). Buna göre; 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 sn, 56°C'de 30 sn, 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 fotoğraflanmıştır.

## 2.4. LeExp1 geninin pHIL-S1 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 pHIL-S1 vektörü 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 pHIL-S1 vektörü elde edilmiştir. Elde edilen yeni vektör 'pHIL-S1-Exp1' şeklinde adlandırılmıştır.

## 2.5. pHIL-S1-Exp1 vektörünün çoğaltılması

pHIL-S1-Exp1 plazmidleri *P. pastoris* maya hücrelerine aktarılmadan önce çoğaltılmıştır. Bu amaçla hedef geni taşıyan plazmidler JM109 *Escherichia coli* (*E. coli*) hücrelerine transforme edilerek çoğaltılmıştır. Üretici firmanın el kitabına bağlı kalınarak Standart '*E. coli* JM109 Competent Cells Transformation' yöntemi vasıtasıyla *E. coli* hücreleri vektörlerle transforme edilmiştir.

## 2.6. pHIL-S1-Exp1 vektörünün kompetent *P. pastoris* SMD1168 hücrelerine elektroporasyonu

Hedef genleri taşıyan pHIL-S1-Exp1 vektörü 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 işlemi sonunda transgenik *P. pastoris* SMD1168 maya hücreleri elde edilmiştir.

## 2.7 Transgenik Mayaların PZR Reaksiyonu

Elektroporasyon işleminin doğru bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediği PZR yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Bu amaçla SMD1168 maya kolonilerinden DNA izolasyonu yapılmış ve bu DNA'ya bağlı olarak hedef genlerin maya genomundaki varlıkları tespit edilmiştir. PZR yöntemi sonucunda elde edilen veriler agaroz jel üzerinde değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol ve negatif kontrol örnekleri kullanılarak dizayn edilen PZR sonucunda elde edilen veriler elektroporasyon uygulanmış mayaların genomlarında hedef geni taşıdıklarını göstermiştir.

## 2.8 Transgenik Mayaların Antibiyotikli Besiyerinde Seçilimi

Rekombinant maya hücrelerinin antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi amacıyla mayalar farklı konsantrasyonlarda (0,5, 1, 2 ve 4 mg/ml) Geneticin G418 antibiyotiği içeren Yeast Peptone Dextrose (YPD) besiyerlerinde geliştirilmiştir.

## 2.9 Transgenik Maya Hücrelerinin Ekspresyonu

Başarılı transformasyon işlemi gerçekleştirilmiş maya hücrelerinden tek koloni alınarak ön zenginleştirme yapılmış ve hücreler ekspanzin proteinini üretmek üzere uygun ekspresyon ortamına transfer edilmiştir.

Ekspresyon işlemi Buffered Minimal Methanol (BMM) besiyerinde 30°C'de, 250 rpm'de, 96 saat süreyle gerçekleştirilmiştir.

### 2.10 Toplam Protein Konsantrasyonu

Toplam protein konsantrasyonunun ölçümü spektrofotometrik bir yöntem olan Bradford assay [11] prensibine göre yapılmıştır.

### 2.11 Kuru Hücre Ağırlığı Ölçümü

Ekspresyon süresi boyunca hücrelerin toplam kuru hücre ağırlıkları hesaplanmıştır. Bu amaçla, ekspresyonun 24, 48, 72 ve 96. saatlerinde fermentasyon ortamından örnek alınarak 10000xg'de 4°C'de 5 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda supernatant uzaklaştırılarak pelletler 105°C'de kurutulmuştur. Hücrelere ait toplam kuru ağırlık Wang ve ark.,'ın (2010) metoduna göre hesaplanmıştır [12].

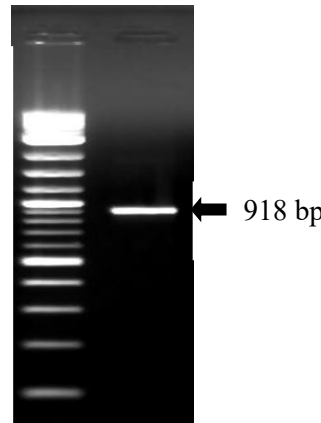
### 2.12 SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis) Analizi

Proteinler SDS-PAGE yöntemiyle Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) ayrıştırılmıştır [13].

## 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 3.1. LeExp1 Geninin PZR Vasıtasıyla Çoğaltılması

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 işlemine kullanılmak üzere Illustra™ GFX™ PCR Gel Band Purification Kit kullanılarak saflaştırılmıştır. Spesifik primer kullanımı, jel agarozu ayrıştırması sonucunda beklenen büyüklükte DNA parçacıklarının çoğaltılmış olması ve DNA dizi analizi sonucunda elde edilen sekans bilgilerine göre çoğaltılması planlanan gen bölgesi kesin olarak elde edilmiştir.



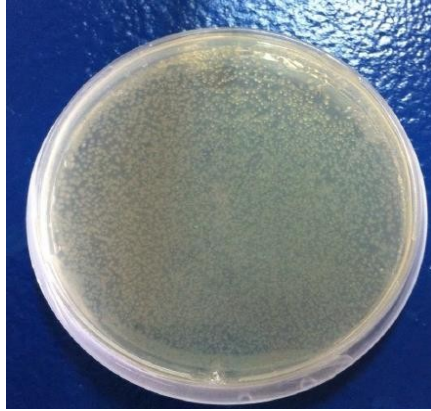
Şekil 1. DNA markörü (1. kuyucuk), LeExp1 (2. kuyucuk) genine ait cDNA'ların %1.2'lik agaroz jel görüntüsü.

### 3.2. LeExp1 geninin pHIL-S1 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* - *SmaI*) eklenmiştir. Hem klonlanacak olan DNA parçacıkları hem de üzerine klonlama yapılacak olan pHIL-S1 vektörü uygun restriksiyon enzimleriyle kesilerek DNA ligaz enzimleriyle hedef DNA parçacıklarının vektörlere yapıştırılması işlemi gerçekleştirilmiştir.

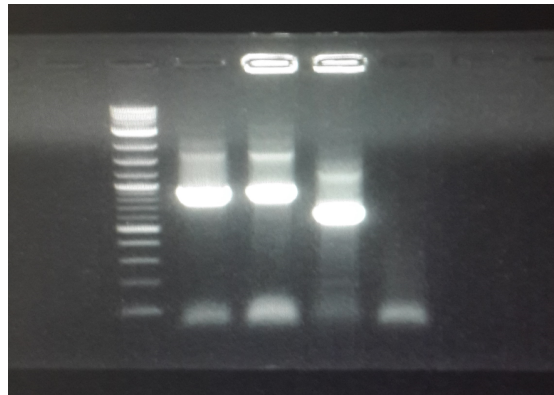
### 3.3. pHIL-S1 Plazmidinin *E.coli* Hücrelerinde Çoğaltılması

LeExp1 hedef genini içeren pHIL-S1-Exp1 vektörünün sub-cloning işlemi JM109 *E. coli* hücrelerinde gerçekleştirilmiştir. pHIL-S1-Exp1 vektörü JM 109 *E.coli* hücrelerine ısı-şoku yoluyla transfer edilmiştir. Isı şoku uygulaması kompetent JM109 *E.coli* hücrelerini üreten Promega firmasının ilgili maneline göre gerçekleştirilmiştir. pHIL-S1-Exp1 vektörü JM109 kompetent *E.coli* hücrelerine transforme edilmiştir. Transfer işleminden sonra 100 µl transforme edilmiş bakteri hücresi alınarak 100µg/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 içerdiği değerlendirilmiştir. Gelişim gösteren ve tek koloni oluşturan *E. coli* hücrelerinin örnek bir petri resmi Şekil 2'de gösterilmektedir.



**Şekil 2.** 100 µg/ml ampisilin içeren Luria Bertani katı besiyerinde geliştirilen pHIL-S1-Exp1 vektörünü içeren JM109 kompetent *E. coli* hücreleri

100 µg/ml ampisilin içeren LB agar'da gelişen *E. coli* hücrelerinin sahip oldukları antibiyotik dirençliliklerine bağlı olarak pHIL-S1 vektörünü 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 pHIL-S1 vektörünü ve bu vektöre bağlı olarak hücre içine aktarılan LeExp1 genini içerip içermediği ikinci bir adımda analiz edilmiştir. Bu amaçla *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 pHIL-S1-Exp1 vektörünün hedef gen bölgesini kesin olarak taşıdığı Şekil 3'te verilen agaroz jel görüntüsü ile doğrulanmıştır.



**Şekil 3.** *E. coli* hücre kültüründen izole edilen pHIL-S1 plazmidinin DNA kaynağı olarak kullanıldığı PZR analiz sonucu. Birinci kuyucuk DNA markörü, ikinci ve üçüncü kuyucuklar yaklaşık 900 bp'lik LeExp1 genini çoğaltacak şekilde tasarlanmış primer çiftinin kullanıldığı PZR ürünü; dördüncü kuyucuk yaklaşık 650 bp'lik LeExp1 gen parçasığını çoğaltacak şekilde tasarlanmış primer çiftinin kullanıldığı PZR ürünü; beşinci kuyucuk negatif kontrol.

### 3.4. pHIL-S1 plazmidinin *P. pastoris* SMD1168 suşuna transformasyonu

Hedef geni taşıyan pHIL-S1 vektörü hazırlanan kompetent maya hücrelerine aktarılmadan önce doğrusal hale getirilmiştir. LeExp1 genini taşıyan vektör *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 Minimal Dextrose (MD) 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 pHIL-S1 vektörünü taşıyan transgenik *P. pastoris* SMD1168 maya hücreleri gelişmeye başlamışlardır (Şekil 4). Elde edilen transgenik maya hücresi 'SMD1168-pHIL-S1-Exp1' şeklinde adlandırılmıştır.



Şekil 4. *pHIL-S1-Exp1* vektörü ile transforme edilmiş SMD1168 maya hücreleri (SMD1168-*pHIL-S1-Exp1*)

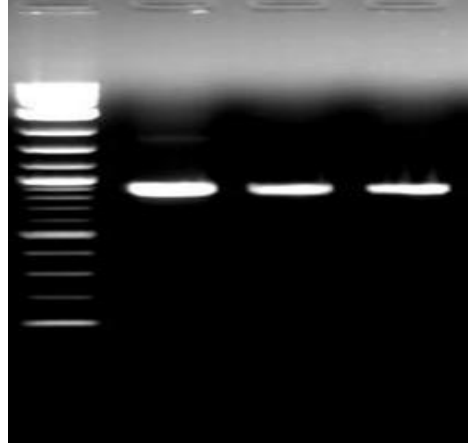
### 3.5 Transgenik Mayaların Histidinsiz Ortamda Gelişim Özelliklerinin Belirlenmesi

Normal koşullarda *P. pastoris* mayaları gelişebilmek için buldukları besiyeri ortamında histidin amino asidi bulunmasına ihtiyaç duyarlar ya da histidin bulunmadığı durumlarda metabolik olarak bu amino asidi üretebilme yeteneğinde olmaları gerekir ancak doğal *P. pastoris* mayaları histidin üretme yönünden negatiftirler. Yapılan dizayna göre *P. pastoris* SMD1168 maya hücrelerinin genomuna rekombine olma yeteneğinde bulunan pHIL-S1 vektörü yapısında hedef genin yanı sıra histidin üretimini katalizleyen *HIS4* genini ve antibiyotik dirençlilik genlerini bulundurmaktadır. Dolayısıyla ancak genomuna pHIL-S1-Exp1 vektörünün yerleştiği *P. pastoris* maya hücrelerinin histidin bulunmayan selektif besiyerinde koloni oluşturma yeteneğine sahip olabilecekleri önkabülünden yola çıkılarak ilk adımda vektör içeren mayaların seçimi bu prensibe göre yapılmıştır. İçerdiği vektör sayesinde histidin bulunmayan selektif besiyerinde gelişme yeteneğini gösteren maya hücreleri ise His<sup>+</sup> olarak adlandırılmıştır.

### 3.6 Transgenik Mayaların PZR Reaksiyonu

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 çözündürüldükten 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 çökeltip ardından etanol ile yıkanmıştır. Elde edilen DNA ekstraktları PZR analizlerinde DNA kaynağı olarak kullanılmış ve içerisinde hedef genlerin var olup olmadıkları araştırılmıştır. PZR analizinden elde edilen sonuçlar %1.2 agaroz jel üzerinde (Şekil 5) gösterilmektedir.



**Şekil 5.** Rekombinant *P. pastoris* SMD1168 maya hücrelerinden spesifik *LeExp1* primerleri kullanımıyla elde edilen reaksiyon ürünlerinin %1.2 agaroz jel üzerinde gösterimi. 1. kuyucuk DNA markörü, 2, 3, ve 4. kuyucuklar PZR ürünleri.

### 3.7 Transgenik Mayaların Antibiyotikli Besiyerinde Seçilimi

PZR sonucunda elde edilen veriler elektroporasyon uygulanmış mayaların genomlarında hedef genleri taşıdıklarını göstermiştir. Bu yöntem Histidin seleksiyonu sonrasında elektroporasyon işleminin doğruluğunu gösteren 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 kullanılmıştır.

### 3.8 Transgenik Maya Hücrelerinin Ekspresyonu

Başarılı transformasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve 4 mg/mL antibiyotik dirençliliğine sahip toplam 48 maya hücrelerinden ayrı ayrı tek koloni alınarak 250 mL'lik erlen içerisindeki 25 mL BMG (Buffered Minimal Glycerol) besiyerine aktarılmış ve OD<sub>600</sub> değeri 2-6'ya ulaşmaya kadar 30°C'de 250 rpm'de inkübe edilmiştir. Hücreler santrifüj vasıtasıyla toplanıp süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra rekombinant protein ekspresyonunun indüklenmesi için OD<sub>600</sub> değeri 1.0 olacak şekilde taze BMM (Buffered Minimal Methanol) besiyerinde süspansiyon edilmiştir. İndüksiyonun devamı için her 24 saatte konsantrasyonu %0.5 olacak şekilde ortama %100 saf metanol eklenmiştir. Ekspresyonun kontrolü için 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 ve 96. saatlerde maya kültüründen 1'er ml alınarak eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Oda sıcaklığında 14.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek süpernatant ve pellet birbirlerinden ayrıştırılmıştır ve daha sonra süpernatantlar yeni tüplere aktararak analizlerde kullanılmıştır.

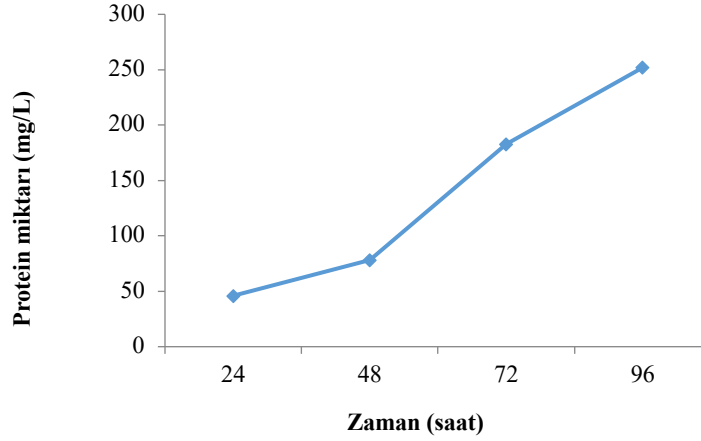
### 3.9 Toplam Protein Konsantrasyonu

Ekspresyon çalışmaları sonucunda yapılan Bradford analizlerine göre transgenik maya hücrelerinin 24., 48., 72. ve 96. saatler sonunda ürettiği maksimum protein miktarları birim hacimde çözünen toplam protein (mg/L) şeklinde tespit edilmiştir ve 48 hücreye ait ortalama değer Tablo 1'de gösterilmiş olup Şekil 6'da ise bu değerlerin zamana bağlı değişim grafiği verilmektedir.



**Tablo 1.** SMD1168-pHIL-S1-Exp1 transgenik maya hücrelerinden ekspresyon boyunca elde edilen ortalama rekombinant protein miktarları

Zaman (saat)	24	48	72	96
Üretilen rekombinant protein miktarı (mg/L)	46	78	183	252

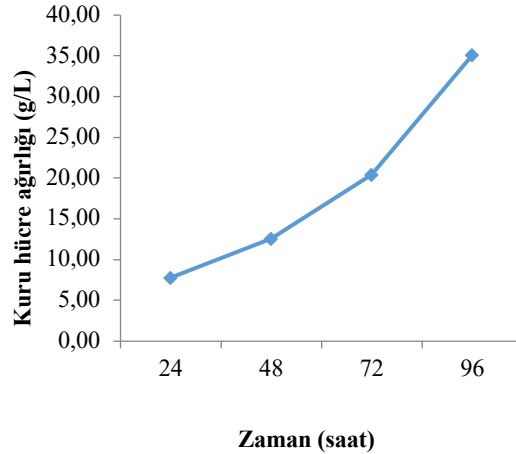
**Şekil 6.** SMD1168-pHIL-S1-Exp1 transgenik maya hücrelerinden ekspresyon boyunca elde edilen ortalama rekombinant protein miktarlarının zamana bağlı değişim grafiği

### 3.10 Kuru Hücre Ağırlığı

*P. pastoris* maya hücrelerinin 30°C'de maksimum hücre ağırlığına ulaştığı literatürdeki birçok kaynakta yer almıştır [14, 15, 16, 17, 18, 19]. Ayrıca *P. pastoris* SMD1168 konakçı hücrelerinin rekombinant protein üretimi optimizasyonu üzerine yapılan bir çalışmada hücrelerin 30°C'de optimum gelişim gösterdiği tespit edilmiştir [16]. Transgenik maya hücrelerinin 24., 48., 72. ve 96. saatler sonunda ulaşılmış olduğu kuru hücre ağırlıkları (g/L) düzeyinde tespit edilmiş ve 48 hücreye ait ortalama kuru hücre ağırlıkları Tablo 2'de gösterilmiş olup Şekil 7'de zamana bağlı değişim grafiği verilmektedir.

**Tablo 2.** SMD1168-pHIL-S1-Exp1 transgenik maya hücrelerinin ekspresyon boyunca ulaştığı ortalama kuru hücre ağırlıkları

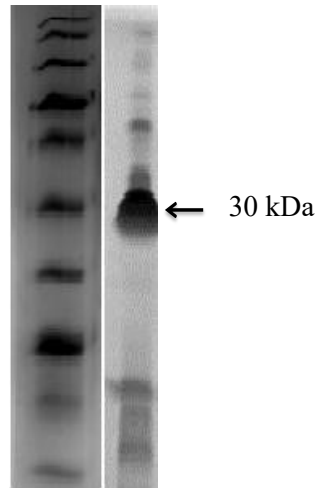
Zaman(saatt)	24	48	72	96
Kuru hücre ağırlığı (g/L)	7.8	12.6	20.4	35.1



**Şekil 7.** SMD1168-pHIL-S1-Exp1 transgenik maya hücrelerinin ekspresyon boyunca ulaştığı ortalama kuru hücre ağırlıklarının zamana bağlı değişim grafiği

### 3.11 SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis) Analizi

SMD1168-pHIL-S1-Exp1 transgenik maya hücrelerinden ekstraselüler rekombinant protein ekspresyonu boyunca örnek alınarak süpernatant ve pellet birbirinden ayrıştırılmıştır. Süpernatant içerisindeki proteinler saflaştırıldıktan sonra SDS-PAGE vasıtasıyla ayrıştırılmıştır. SMD1168-pHIL-S1-Exp1 transgenik maya hücrelerinin fermentasyon ortamlarından elde edilen süpernatantların SDS-PAGE sonuçları Şekil 8'de gösterildiği gibidir. Şekilde verildiği haliyle süpernatantın ayrıştırılması sonucunda ekspanzin proteinlerinin moleküler ağırlıklarına karşılık gelen protein bantları gözlenmiştir. Gözlenen bantların ekspanzin proteinlerinin boyutlarına uygun olması nedeniyle rekombinant maya hücrelerinin başarılı bir şekilde protein ekspresyonu yapabildikleri belirlenmiştir. *P. pastoris* mayaları çok az sayıda ekstraselüler protein üretmektedirler ve dolayısıyla bu mayaların fermentasyon ortamında ekstraselüler olarak üretilen rekombinant protein haricinde çok sayıda farklı protein bandı bulunması beklenmemektedir.



**Şekil 8.** SMD1168-pHIL-S1-Exp1 hücrelerinin fermentasyon ortamından alınan süpernatantın SDS-PAGE görüntüsü

## 4. SONUÇ

*P. pastoris* mayaları kullanılarak heterolog rekombinant protein üretimi başarılı bir şekilde yıllardır uygulanmaktadır. Rekombinant protein üretimi için önemli basamaklardan bir tanesi uygun konakçı suş ve vektörün belirlenmesidir. Bu çalışmada domates bitkisinden izole edilen ekspanzin proteinini üretmek amacıyla *P. pastoris* mayasının ticari olarak üretilen ve proteaz genleri inhibe edilmiş SMD1168 suşu ile pHIL-S1 vektör kombinasyonu kullanılmıştır. LeExp1 gen bölgesine sahip pHIL-S1 vektörünün maya

hücrelerine elektroporasyonu sonucunda elde edilen transgenik karakterdeki hücrelerden uygun ekspresyon koşulları altında doğada az miktarda bulunan ekspanzin proteininin rekombinant üretimi başarılı bir şekilde tamamlanmıştır. Ekspresyon süresi sonunda hücrelerden 252 mg/L düzeyinde rekombinant ekspanzin elde edilmiştir. Bundan sonraki benzer çalışmalarda farklı suş ve vektör dizaynları ile karşılaştırmalı rekombinant protein üretimleri gerçekleştirilebilir.

## 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]. Bradford Assay, 1976.
- [12]. Wang, Y., Liang, Z.H., Zhang, Y.S., Yao, S.Y., Xu, Y.G. Human insulin from a precursor overexpressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and a simple procedure for purifying the expression product. *Biotechnology Bioengineering*, 73: 74–9, 2010.
- [13]. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680–685, 1970.
- [14]. Jahic, M., Rotticci-Mulder, J. C. Modeling of growth and energy metabolism of *Pichia pastoris* producing a fusion protein. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 24(6):385-393, 2002.
- [15]. Byrne, B. *Pichia pastoris* as an expression host for membrane protein structural biology. *Current Opinion in Structural Biology*, 32: 9-17, 2015.
- [16]. Qiu, Z., Guo, Y., Bao, X., Hao, J., Sun, G., Peng, B., Bi, W. Expression of *Aspergillus niger* glucose oxidase in yeast *Pichia pastoris* SMD1168. *Protein Expression Purification*, 998-1005, 2016.
- [17]. Salamin, K., Sriranganadane, D., Léchenne, B., Jousson, O., Monod, M. Secretion of an endogenous subtilisin by *Pichia pastoris* strains GS115 and KM71. *Appl. Environ. Microbiology*, 76 (13): 4269–4276, 2010.
- [18]. Chen, X., Meng, K., Shi, P., Bai, Y., Luo, H., Huang, H., Yuan, T., Yang, P., Yao, B. High-level expression of a novel *Penicillium* endo- 1.3(4)-d-glucanase with high specific activity in *Pichia pastoris*. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, 39 (6): 869–876, 2012.
- [19]. Chahal, S., Wei, P., Moua, P., Park, S.P.J., Kwon, J., Patel, A., Vu, A.T., Catolico, J.A., Tsai, Y.F.T., Shaheen, N., Chu, T.T., Tam, V., Khan, Z., Joo, H.H., Xue, L., Cereghino, J.L., Tsai,

J.W., Cereghino, G.P.L. Structural Characterization Of The A-Mating Factor Prepro-Peptide For Secretion Of Recombinant Proteins İn *Pichia Pastoris*. Gene, 598: 50-62, 2017.