

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

***Pichia pastoris* MIG1 GENİNİN MOLEKÜLER VE FONKSİYONEL
KARAKTERİZASYONU**

Semiramis YILMAZ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

2012

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Pichia pastoris MIG1 GENİNİN MOLEKÜLER VE FONKSİYONEL
KARAKTERİZASYONU

Semiramis YILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**Bu tez TÜBİTAK Araştırma Destek Programları Başkanlığı (ARDEB) tarafından
1002-Hızlı Destek Programı Kapsamında 111T685 nolu proje ile desteklenmiştir.**

2012

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Pichia pastoris* MIG1 GENİNİN MOLEKÜLER VE FONKSİYONEL
KARAKTERİZASYONU**

Semiramis YILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu tez 27/12/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından (100) not takdir edilerek
Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Mehmet İnan (Danışman)

Yrd. Doç. Dr. Barçın KARAKAŞ

Yrd. Doç. Dr. Cengiz İKTEN

ÖZET

***Pichia pastoris* MIG1 GENİNİN MOLEKÜLER VE FONKSİYONEL KARAKTERİZASYONU**

Semiramis YILMAZ

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mehmet İNAN

Aralık 2012, 100 Sayfa

Pichia pastoris rekombinant protein üretiminde konukçu organizma olarak yaygın ve başarılı bir şekilde kullanılan metilotrofik bir mayadır. *Pichia* sisteminin artan popülerliğini sağlayan sebepler arasında, bir çok ökaryotik transkripsiyon sonrası modifikasyonları gerçekleştirebilmesi ve heterolog proteinleri hem hücre içi hem hücre dışı olarak çok yüksek miktarlarda üretebilme kapasitesine sahip olması sayılabilir. *P. pastoris* ekspresyon sisteminde, diğer sistemlerle karşılaştırıldığında çok yüksek verimliliklerde protein ekspresyonu gerçekleştiriliyor olmakla birlikte, sistemin verimliliğini arttırmak için çalışmalar yapılmaya devam edilmektedir.

P. pastoris ekspresyon sisteminde protein üretimi genellikle metanol metabolizmasındaki ilk enzimi kodlayan alkol oksidaz geninin (*AOX1*) promotörü kontrolünde gerçekleştirilir. Çok sıkı denetim altında tutulabilen *AOX1* promotörü, metanol tarafından tetiklenmekte (metanol indüksiyon), glukoz ve etanol tarafından baskılanmaktadır (katabolit represyon). *AOX1* promotörünün indüksiyon ve katabolit represyon mekanizmaları ile kontrol edildiği bilinmesine rağmen bu mekanizmada rol alan regülasyon proteinleri henüz bilinmemektedir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda yalnızca bir transkripsiyonal regülasyon proteininin (*Mxr1* proteini) metanol indüksiyonunda aktivatör olarak rol aldığı belirlenmiştir.

Bu çalışma kapsamında, *P. pastoris*'in katabolit represyon mekanizması çalışılmıştır. Bu amaçla, *S. cerevisiae* ve diğer mayalarda katabolit represyon

mekanizmasında kilit rol oynadığı ve represör olarak DNA'ya bağlandığı tespit edilen Mig1 proteinini kodlayan *MIG1* geninin, *P. pastoris*'te moleküler ve fonksiyonel karakterizasyonu yapılmıştır. *MIG1* ve homoloğu *MIG2* genlerinin inaktive edilmesi ile elde edilen tekli ($\Delta mig1$, $\Delta mig2$) ve çift mutant ($\Delta mig1\Delta mig2$) suşlarının represyon (glukoz), derepresyon (gliserol) ve indüksiyon (metanol) koşullarında geliştirilmesi, gelişim eğrilerinin çıkarılması ve alkol oksidaz enzimi aktivitelerinin karşılaştırılması şeklinde gerçekleştirilen fonksiyonel analiz sonucunda *MIG1* ve *MIG2* genlerinin *AOX1* geninin katabolit represyon mekanizmasında rollerinin olduğu ortaya çıkarılmıştır. *MIG1* ve *MIG2* genlerinin inaktivasyonu, hücrelerin gliserol ve glukozda gelişimlerinde herhangi bir fenotipik etkiye neden olmazken metanoldeki gelişimlerinde $\Delta mig1$ ve $\Delta mig1\Delta mig2$ suşlarının gelişim hızlarında ve ulaştıkları hücre yoğunluğunda az da olsa bir artış gözlenmiştir. *AOX* enzim aktivitesi sonuçlarında ise glukoz/metanol besiyerinde hiçbir suшта aktivite tespit edilmezken, gliserol/metanol besiyerinde $\Delta mig2$ ve $\Delta mig1\Delta mig2$ suşlarında sırasıyla ~%30 ve ~%50 oranlarında aktivite hesaplanmıştır. Elde edilen bu sonuçlarla *PpMig1* ve *PpMig2* proteinlerinin *AOX1* promotorunun negatif regülasyon mekanizmasında yer aldıkları ilk kez ortaya konmuştur.

ANAHTAR KELİMELER: *Pichia pastoris*, katabolit represyon, glukoz represyonu, Mig1, Mig2,

JÜRİ: Doç. Dr. Mehmet İNAN (Danışman)

Yrd. Doç. Dr. Barçın KARAKAŞ

Yrd. Doç. Dr. Cengiz İKTEN

ABSTRACT

MOLECULAR AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF *Pichia pastoris* *MIG1* GENE

Semiramis YILMAZ

M.Sc. Thesis in Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet INAN

December 2012, 100 Pages

The methylotrophic yeast *Pichia pastoris* is widely and successfully used as a host system to produce recombinant proteins for a variety of applications. The rising popularity of the system could be attributed to several characteristics, including the ability to perform many eukaryotic post-transcriptional modifications, and the capability of this yeast to produce heterologous proteins at high levels, either intra- or extracellularly. Being already the most productive expression system in protein expression within the other systems, *Pichia pastoris* is still being studied in order to enhance the efficiency of the system.

In the *P. pastoris* expression system, the expression of foreign genes is usually driven by the promoter of the alcohol oxidase gene I (*AOXI*) which encodes the first enzyme in the methanol utilization pathway. Under a very strict control, the *AOXI* promoter is highly induced by methanol (methanol induction) and repressed by glukoz and ethanol (catabolite repression). Although it is well known that the *AOXI* promoter is regulated strictly by induction and catabolite repression mechanisms, the proteins involved in these regulation mechanisms have not been identified yet. So far only one gene product, Mxr1p, has been showed to be involved in the positive regulation (methanol induction) of the *AOXI* promoter.

In the scope of this project, the mechanism of catabolite repression of *P. pastoris* has been studied. For this purpose, the molecular and functional characterization of the

MIG1 gene, which is determined to have the key role in catabolite repression mechanism for *S. cerevisiae* and other yeasts and encodes the protein Mig1 that is bound to DNA as repressor, were done. As a result of the functional analysis of single ($\Delta mig1$, $\Delta mig2$) and double mutant ($\Delta mig1\Delta mig2$) *P. pastoris* strains, which have been derived by inactivation of *MIG1* and homologous *MIG2* genes, by building up their growth curves under repression (glukoz), derepression (glycerol) and induction (methanol) conditions and comparing the alcohol oxidase enzyme activities, it has been revealed that the *MIG1* ve *MIG2* genes have a role in catabolite repression mechanism of *AOX1* gene. Although the inactivation of *MIG1* and *MIG2* genes has shown no phenotypic effect in growth of cells in glycerol and glukoz, a slight increase in growth speed of $\Delta mig1$ and $\Delta mig1\Delta mig2$ strains and cell density at methanol has been observed. Regarding to *AOX* enzyme activity results, no activity has been identified at glukoz/methanol media, whereas the activities were found on $\Delta mig2$ ve $\Delta mig1\Delta mig2$ strains at glycerol/methanol media at an approximate rate of 30% ve 50% respectively. Overall results suggested that the *PpMig1* and *PpMig2* proteins hold a place in negative regulation mechanism of *AOX1* promotor.

KEYWORDS: *Pichia pastoris*, catabolite repression, glukoz repression, Mig1, Mig2

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr. Mehmet İNAN (Supervisor)
Asst. Prof. Dr. Barçın KARAKAŞ
Asst. Prof. Dr. Cengiz İKTEN

ÖNSÖZ

Bu çalışmayı gerçekleştirirken düşlediğimin ötesinde imkanlarla donattığı (ve her an her dakika donatmaya devam ettiği) laboratuvarında çalışma olanağı bulduğum danışman hocam Sayın Doç. Dr. Mehmet İnan'a, her an laboratuvarında olup attığım her adıma takip ettiği, atmaya çekindiğim adımlar için cesaretlendirdiği, zamanında ve yerinde yaptığı önerilerle ve yardımlarla hiç tökezlemeden çalışmaya devam etmemi sağladığı için çok ama çok teşekkür ederim.

Değerli jüri üyelerim Sayın Yrd. Doç. Dr. Cengiz İkten ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Barçın Karakaş'a tezim için yaptıkları eleştiri ve katkılardan dolayı, ayrıca, çalışmakta olduğum AÜ Gıda Güvenliği ve Tarımsal Araştırmalar Merkezi Müdür Yardımcısı, hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Bülent Şık'a gösterdiği anlayış ve verdiği motivasyondan dolayı çok teşekkür ederim.

Çalışma arkadaşlarım Mert Karaoğlan ve Fidan Erden olmadan deneylerin altından tek başıma kalkabilmem mümkün olamazdı. Onlar sayesinde 17 ay boyunca çalıştığım laboratuvar, koşa koşa geldiğim, aydınlık, samimiyet, kahkaha ve gözyaşı dolu olarak hatırlayacağım sıcacık bir yer benim için. Her ikisine de binlerce kez teşekkür ederim.

Sevgili dostlarım Doç. Dr. F. Yeşim Ekinci Kadıpaşaoğlu ve Dr. A. Kamuran Kadıpaşaoğlu'na beni bu yola tekrar çıkardıkları için, Yrd. Doç. Dr. N. Altınay Perendeci'ye yoluma yön verdiği için ne kadar teşekkür etsem az.

Tekrar öğrencilik günlerime geri dönüp keyif alarak çalışmamı sağlayan sevgili annem Makbule Geredeli, sevgili babam Kasım Geredeli'ye, hayatımı her zaman kolaylaştıran ve güzelleştiren, varlığı yeter olan güzel kardeşim Y. İskender Geredeli'ye, desteklerini her zaman yanımda hissettiğim kardeşlerim Sakine, Pınar, Hatice ve Sena'ya...

Çocuklarından ayrı kalma pahasına, maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili fedakar eşim Abdurrahman Yılmaz'a (Apocum'a), sonsuz sabırla ve sevgiyle beni sıcacık sarıp sarmalayan iki güzel oğlum Sinan ve Civan'a ne duyduğum minneti kelimelere dökümem ne de teşekkür edebilmem mümkün.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI.....	4
2.1. Mayalarda Glukoz Algılama Mekanizmaları	4
2.1.1. <i>S. cerevisiae</i> 'de glukoz indüksiyon mekanizması	5
2.1.2. <i>S. cerevisiae</i> 'de katabolit represyon mekanizması.....	7
2.2. Metilotrofik Mayalarda Glukoz Algılama Mekanizmaları	13
2.2.1. Metilotrofik mayaların genel özellikleri ve kullanım alanları.....	13
2.2.2. Metilotrofik mayalarda metanol metabolizması.....	15
2.2.3. Metilotrofik mayalardaki <i>AOX</i> genleri ve promotor bölgeleri	18
2.2.4. <i>AOX</i> ekspresyonuna farklı karbon kaynaklarının etkisi	19
2.2.5. <i>AOX</i> regülasyonuna etki eden cis- ve trans-etkili faktörler.....	22
2.2.6. Heterolog konukçu organizmalarda <i>AOX</i> promotorları	31
2.3. Çalışmanın Temeli ve Kapsamı	32
3. MATERYAL VE METOD	35
3.1. Materyal.....	35
3.1.1 Kimyasallar ve restriksiyon enzimleri.....	35
3.1.2. Tampon ve stok çözeltileri	35
3.1.3. Mikroorganizmalar ve enzimler	35
3.1.4. Plazmidler.....	37
3.1.5. Besiyerleri, gelişim ortamları ve antibiyotikler.....	38
3.1.6. Primerler	38
3.2. Metod.....	39

3.2.1. Mayadan genomik DNA izolasyonu	39
3.2.2. Plazmid izolasyonu	39
3.2.3. Agaroz jel elektroforezi	40
3.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	40
3.2.5. PZR ürünlerinin saflaştırılması.....	41
3.2.6. DNA'nın jelden geri alınması	42
3.2.7. DNA ve plazmid konsantrasyonlarının belirlenmesi	42
3.2.8. Hücre yoğunluğunun ölçülmesi.....	43
3.2.9. <i>E. coli</i> ve <i>P. pastoris</i> hücrelerinin yetenekli hale getirilmesi.....	43
3.2.10. DNA parçalarının plazmide ligasyonu	44
3.2.11. Yetenekli <i>E. coli</i> ve <i>P. pastoris</i> hücrelerine transformasyon	45
3.2.12. Koloni PZR.....	45
3.2.13. Restriksiyon analizi	46
3.2.14. Southern blot analizi.....	46
3.2.15. SDS-PAGE ve Western blot analizleri.....	48
3.2.16. His-etiketli proteinlerin üretilmesi, saflaştırılması ve diyaliz edilmesi...	49
3.2.17. Jel geciktirme analizi	50
3.2.18. AOX enzim aktivitesi tayini	50
3.2.19. Toplam protein tayini	52
4. BULGULAR	53
4.1. <i>P. pastoris</i> <i>MIG1</i> Geninin Moleküler Karakterizasyonu	53
4.1.1. <i>PpMIG1</i> geninin izolasyonu ve klonlanması	54
4.1.2. <i>PpMIG1</i> geninin dizileme sonucu ve <i>in silico</i> moleküler analizi.....	55
4.2. <i>P. pastoris</i> <i>MIG1</i> Geninin Fonksiyonel Analizinin Yapılması	59
4.2.1. <i>P. pastoris</i> <i>MIG1</i> mutant suşun ($\Delta mig1$) elde edilmesi.....	61
4.2.2. <i>P. pastoris</i> <i>MIG1</i> ve <i>MIG2</i> mutant suşun ($\Delta mig1\Delta mig2$) elde edilmesi.....	63
4.2.3. <i>P. pastoris</i> suşlarında inaktive edilen genlerin Southern blot analizi ile doğrulanması	66
4.2.4. <i>P. pastoris</i> $\Delta mig1$, $\Delta mig2$ ve $\Delta mig1\Delta mig2$ suşlarının gelişim eğrilerinin çıkarılması.....	69

4.2.5. <i>P. pastoris</i> $\Delta mig1$, $\Delta mig2$ ve $\Delta mig1\Delta mig2$ suşlarında AOX enzim aktivitesi tayini	71
4.2.6. Mutant suşların hücre özütleri ile jel geciktirme analizi	73
4.3. <i>PpMig1</i> Proteinin Aşırı Üretiminin Gerçekleştirilmesi	75
4.3.1. <i>P. pastoris</i> Mig1 proteini üretim suşunun oluşturulması	75
4.3.2. Transformant kolonilerde Mig1 protein üretimlerinin taranması.....	78
4.3.3. Mig1 ve Mig2 proteinlerinin üretimi ve saflaştırılması	79
4.3.3. Saflaştırılmış Mig1 ve Mig2 proteinleri ile jel geciktirme analizi	81
5. TARTIŞMA	83
6. SONUÇ	88
7. KAYNAKLAR	89
8. EKLER.....	96
Ek 8.1. Çalışmada kullanılan primerler.....	96
Ek 8.2. Çalışmada Kullanılan DNA ve Protein Standartları	97
Ek 8.3. Toplam Protein Tayini Standart Grafiği	100
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

bç	Baz çifti
d	Devir
dak	Dakika
kbç	Kilo baz çifti
μ	Mikro (10^{-6})
m	Mili
M	Molar
n	Nano (10^{-9})
OD	Optik yoğunluk
s	Saniye
T_m	Çözülme sıcaklığı
U	Ünite

Kısaltmalar

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)
AOX	Alkol Oksidaz
DIG	Digoksjenin
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DTT	Dithiothreitol
EMSA	Jel Geciktirme Analizi, Electron Mobility Shift Assay
FDA	ABD Gıda ve İlaç Dairesi, Food And Drug Administration
GRAS	Genel Olarak Güvenli Kabul Edilen, Generally Regarded As Safe
LB	Luria-Bertani Besiyeri
LiAc	Lityum Asetat
MD	Minimal Glukoz Besiyeri
MG	Minimal Gliserol Besiyeri
MM	Minimal Metanol Besiyeri
MMH	Minimal Metanol ve Histidin Besiyeri
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektrofrez
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SSC	Tuzlu Sodyum Sitrat, Saline Sodium Citrate
TAE	Jel Elektrofrez Tamponu, Tris Asetat EDTA
TBE	Jel Geciktirme Analizi Tamponu, Tris Borat EDTA
YNB	Maya Azot Bazı
YPD	Maya Pepton Dekstroz, Yeast Pepton Dextrose

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Glukozun negatif etkide bulunduğu kontrol basamakları	4
Şekil 2.2.	Ana glukoz sinyal yollarının basitleştirilmiş gösterimi.....	6
Şekil 2.3.	Katabolit represyon mekanizmasında rol alan kilit öğeler.....	7
Şekil 2.4.	Hxk2'nin katabolit represyonda oynadığı rollerin basitleştirilmiş gösterimi.....	10
Şekil 2.5.	Metilotrofik mayalarda metanol metabolizması	17
Şekil 2.6.	<i>AOX1</i> promotoru A ve C parçalarının EMSA jel görüntüleri.....	24
Şekil 2.7.	<i>P. pastoris AOX1</i> promotorunda DNA bağlanma proteinlerinin bağlandığı ve regülasyon mekanizmasında rol aldığı tespit edilen bölgeler.....	25
Şekil 2.8.	<i>P. pastoris MIG1</i> geni nükleotid dizisi	33
Şekil 2.9.	<i>P. pastoris AOX1</i> promotoru gen dizisi	34
Şekil 3.1.	Gen klonlamada kullanılan pJET1.2 (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD) ve pDRIVE (Qiagen, Almanya) plazmidleri	37
Şekil 3.2.	<i>P. pastoris</i> 'te Mig1 proteinini hücre içi üretmekte kullanılan PGAPZB (Invitrogen, CA, ABD) vektörü	37
Şekil 4.1.	<i>P. pastoris MIG1</i> geninin izolasyonu, klonlanması ve dizilenmesi işlemlerinin şematik olarak gösterimi	53
Şekil 4.2.	<i>P. pastoris MIG1</i> geninin PZR sonucunun jelde görüntülenmesi.....	54
Şekil 4.3.	Transformant kolonilerden izole edilen pJETMIG1 plazmidlerinin <i>BamHI/HindIII</i> restriksiyon analizi.....	55
Şekil 4.4.	<i>P. pastoris</i> X-33 suşundan izole edilmiş <i>MIG1</i> geninin dizileme sonucu elde edilen nükleotid dizisi.....	56
Şekil 4.5.	<i>P. pastoris</i> X-33 suşundan izole edilen Mig1 proteininin aminoasit dizisi	57
Şekil 4.6.	<i>P. pastoris</i> Mig1 protein aminoasit dizisinin diğer mayaların Mig1 proteinleri ile çoklu hizalaması	58
Şekil 4.7.	<i>P. pastoris MIG1</i> geninin inaktive edilmesinin şematik gösterimi.....	59
Şekil 4.8.	<i>P. pastoris MIG1</i> geninin inaktive edilmesinin şematik gösterimi (Şekil 4.7'nin devamı)	60

Şekil 4.9. <i>MIG1</i> geninin <i>ADE1</i> geni ile inaktive edilmesinin şematik gösterimi	61
Şekil 4.10. pDRIVE <i>mig1::ADE1</i> nakavt plazmidini oluştururken elde edilen jel görüntüleri	62
Şekil 4.11. Transformant MK201 genomik DNA'larından nakavt parça <i>mig1::ADE1</i> varlığının PZR ile kontrol edilmesi	63
Şekil 4.12. PZR ile çoğaltılan <i>mig1::ADE1</i> parçasının jel görüntüsü.....	64
Şekil 4.13. <i>mig1::ADE1</i> parçasının JC304 Δ <i>mig2</i> suşuna transformasyon sonucunun PZR ile taranması	65
Şekil 4.14. <i>MIG1</i> ve <i>MIG2</i> problemlerinin etiketlenme verimliliklerinin ölçülmesi.....	66
Şekil 4.15. Southern blot analizi için <i>KpnI</i> ve <i>BglII</i> enzimleri ile kesilen <i>P. pastoris</i> konukçu ve mutant suşları genomik DNA'larının jel görüntüsü	67
Şekil 4.16. <i>P. pastoris</i> Δ <i>mig1</i> , Δ <i>mig2</i> ve Δ <i>mig1</i> Δ <i>mig2</i> suşların Southern blot analizi sonucu elde edilen X-Ray film görüntüsü.....	68
Şekil 4.17. Mutant suşların doğrulamasının yapıldığı PZR reaksiyon sonucunun jel görüntüsü.....	69
Şekil 4.18. <i>P. pastoris</i> X33, Δ <i>mig1</i> , Δ <i>mig2</i> ve Δ <i>mig1</i> Δ <i>mig2</i> suşlarının %1 metanol içeren besiyerindeki (MM) gelişim eğrileri	70
Şekil 4.19. <i>P. pastoris</i> X33, Δ <i>mig1</i> , Δ <i>mig2</i> ve Δ <i>mig1</i> Δ <i>mig2</i> suşlarının %2 glukoz içeren besiyerindeki (MD) gelişim eğrileri	70
Şekil 4.20. <i>P. pastoris</i> X33, Δ <i>mig1</i> , Δ <i>mig2</i> ve Δ <i>mig1</i> Δ <i>mig2</i> suşlarının %2 gliserol içeren besiyerindeki (MG) gelişim eğrileri	71
Şekil 4.21. Mutant suşların MM, MDM ve MGM besiyerlerinde gelişen hücrelerin AOX enzim aktivitesi tayini sonuçları	73
Şekil 4.22. MGM besiyerinde gelişen hücrelerin özütleri ile gerçekleştirilen jel geciktirme deneyi	74
Şekil 4.23. MM besiyerinde gelişen hücrelerin özütleri ile gerçekleştirilen jel geciktirme deneyi	74
Şekil 4.24. <i>P. pastoris</i> Mig1 üretim suşunun oluşturulma basamaklarının şematik olarak gösterimi.....	75
Şekil 4.25. <i>EcoRI/NotI</i> enzimleri ile kesilen PGAPZB vektörü ve <i>MIG1</i> parçalarının jel görüntüsü.....	76

Şekil 4.26. Transformant XL1-Blue hücrelerinde pGAPZMIG1 ekspresyon vektörünün varlığının kontrolü için gerçekleştirilen koloni PZR sonucunun jel görüntüsü.....	77
Şekil 4.27. pGAPZMIG1 ekspresyon plazmidinin BamHI ile restriksiyon analizinin jel görüntüsü.....	78
Şekil 4.28. P. pastoris (pGAPZMIG1) hücre-içi Mig1 proteini üretim suşlarından elde edilen süpernatantların Western blot analizi sonucunda elde edilen membran görüntüsü.....	79
Şekil 4.29. Saflaştırılmış Mig1 ve Mig2 proteinlerinin SDS-PAGE jel görüntüsü	80
Şekil 4.30. Saflaştırılmış Mig1 ve Mig2 proteinlerinin Western blot analizi sonucunun membran görüntüsü	80
Şekil 4.31. Saflaştırılmış Mig1 ve Mig2 proteinleri ile gerçekleştirilen jel geciktirme analizi jel görüntüsü	82

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Metilotrofik mayalarda AOX proteinini kodlayan genler ve promotorları	19
Çizelge 2.2. Metilotrofik mayaların AOX genleri üzerinde karbon kaynaklarının represyon ve derepresyon etkileri	20
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar	36
Çizelge 4.1. AOX enzim aktivitesi sonuçları (U/μg).....	72
Çizelge 4.2. AOX enzim aktivitesi sonuçları (%).....	72

1. GİRİŞ

Mikroorganizmaların, doğal hallerinde üretmedikleri peptit ve proteinleri üretir hale gelmeleri 1970'lerin ortalarında gelişmeye başlayan rekombinant DNA teknolojileri ile birlikte mümkün hale gelmiştir. Endüstriyel olarak çeşitli konukçu organizmalar kullanılarak üretilen rekombinant proteinlerin, özellikle gıda ve sağlık sektörlerinde kullanımı giderek artış göstermektedir. Yıllar içerisinde, sürekli artış gösteren rekombinant protein ihtiyacını karşılayabilmek için çok 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).

Pichia pastoris, rekombinant protein üretiminde kullanılmak üzere ekspresyon platformu olarak geliştirilmiş metilotrofik bir mayadır. *P. pastoris*'te bugüne kadar çok sayıda farklı proteinin üretimi gerçekleştirilmiştir. *Pichia* ekspresyon sisteminin endüstriyel rekombinant protein üretiminde giderek artan popülerliğini sağlayan özellikler şu şekilde sıralanabilir: (1) Genetik modifikasyon için gereken tekniklerin kolaylığı ve mayanın gelişimi için gerekli olan ortam ve kültür koşullarının basitliği; (2) hücre içi ve hücre dışı olarak yüksek protein ekspresyon seviyelerine ulaşabilmesi; (3) translasyon sonrası ökaryotik protein modifikasyonlarını (glikozilasyon, disülfid bağlarının oluşması gibi) gerçekleştirebilme yetisi; (4) ticari ekspresyon kitlerinin var olması (Lin-Cereghino ve Cregg 2000).

P. pastoris sisteminde heterolog proteinlerin ekspresyonu, genellikle alkol oksidaz I geninin (*AOX1*) promotörü kontrolünde gerçekleştirilir. *AOX1*, metanol metabolizmasındaki ilk enzim olan alkol oksidazı kodlayan genidir. *AOX1* promotörünün araştırmalarda ve uygulamada en fazla kullanılan promotör olmasının sebebi, *P. pastoris*'te karakterize edilen ilk promotör olması ve ticari kit olarak (Invitrogen, CA, ABD) piyasaya sürülmesinin yanında çok güçlü olması ve karbon kaynakları tarafından çok sıkı bir şekilde regüle edilmesidir. *AOX* ekspresyonu, farklı karbon kaynaklarına tepki olarak gelişen represyon, derepresyon ve indüksiyon mekanizmaları ile regüle edilir. *AOX1* promotörü metanol tarafından çok kuvvetli bir

şekilde tetiklenmekte ve fakat glukoz, gliserol, asetat, etanol gibi diğer karbon kaynakları tarafından baskılanmaktadır. Sorbitol, mannitol, trehaloz ve alaninde ise *AOXI* promotörü baskılanmamakta fakat indüksiyon için metanole gereksinim duyulmaktadır (İnan ve Meagher 2001b).

AOXI promotörünün indüksiyonunun derecesi, karbon kaynağı olarak metanolün varlığına bağlıdır. Metanol esas olarak, gıda ürünleri ve katkılarının üretiminde kullanılmaya pek uygun olmayan petrokimyasal kaynaklardan elde edilir. Büyük ölçekli fermentasyon endüstrisinde metanol kullanımı ve depolanması, toksik ve yanıcı olduğundan tehlike arz etmektedir. Ayrıca, metanolde biyokütle üretimi için gerekli olan oksijen miktarı, karbon kaynağı glukoz olduğunda gerekli olan miktardan 3-4 kat daha fazladır. Oksijenin fazla miktarda kullanımı ısı üretimini arttırmakta ve biyoreaktörün sıcaklığını yükseltmektedir (Zhang vd 2010). Yüksek oksijen temini ve soğutma ihtiyacı üretim maliyetini arttırmakta ve ölçek büyütmede zorluklara neden olmaktadır.

P. pastoris'te yapısal ve tetiklenebilir başka promotörler de bulunmasına rağmen (*AOX2*, *DAS*, *GAP*, *ICL1*, *FLD1*, *PEX8*, *TEF1*, *PGK1*, *YPT1* gibi) çoğu çalışmada ve uygulamada bazı avantajlarından dolayı *AOXI* promotörü kullanılmaktadır. Örneğin, *FLD1*, *AOXI* promotörüne iyi bir alternatif olarak görünse de indüksiyon için başka bir toksik ve yanıcı madde olan metilamin ya da formaldehite ihtiyaç duymaktadır. Diğer promotörler ise düşük ekspresyon düzeylerinden dolayı *AOXI* promotörü kadar yaygın kullanılamamaktadırlar. *P. pastoris* ekspresyon sistemini kullanan çoğu araştırmacının temel amacı maksimum miktarda rekombinant protein eldesi olduğundan, yüksek promotör fonksiyonu istenen bir özelliktir. Örneğin, *YPT1* promotörü altında üretilen α -glucuronidaz ekspresyon seviyesi, glukozda gelişen *GAP* promotörü altında üretilen miktardan 10 kat az iken metanolde gelişen *AOXI* promotörü altında elde edilen miktardan 80 kat daha az bulunmuştur (Sears vd 1998). Diğer taraftan, *GAP*, *TEF1*, *PGK1* ve *YPT1* promotörleri yapısal olduklarından, kontrol ettikleri genlerin transkripsiyonlarını tetikleyici ihtiyacı olmadan sürekli bir şekilde gerçekleştirirler. Yapısal promotör kullanılırken genin ekspresyona başladığı an kontrol edilemez. Bu

yüzden, konukçu organizmaya toksik etkisi olan rekombinant bir proteinin üretiminin yapısal bir promotör altında gerçekleştirilmesi beklenemez.

AOX1 promotörünün yaygın olarak kullanılıyor olmasına rağmen metanol indüksiyonu ve glukoz represyonunun moleküler mekanizması hakkında çok az şey bilinmektedir. İndüksiyon ve represyon mekanizmalarının açığa çıkarılması ile, metanole ihtiyaç duyulmadan, ya da glukoz gibi daha ekonomik karbon kaynaklarının represyona neden olmadan kullanılabilirdiği daha verimli suşların geliştirilmesi mümkün olabilecektir.

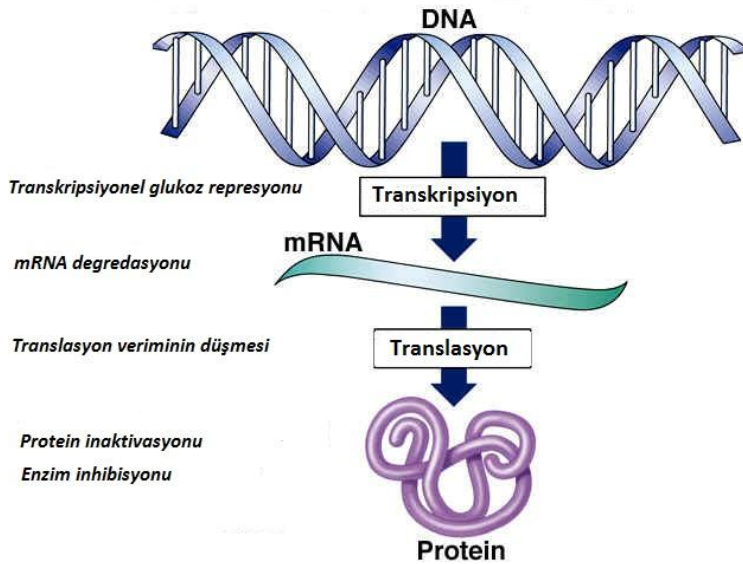
Glukoz indüksiyon ve represyon mekanizmaları en ayrıntılı olarak çalışılan ve en fazla bilgi sahibi olunan organizma *Saccharomyces cerevisiae* mayasıdır. Bir çok geribildirim döngüleri ve farklı yollar arasında etkileşim ve iletişimin olduğu bu karmaşık proses üzerine yapılan çalışmalar, elde edilen bulgular üzerinden yeni deneysel sistemlerin kurgulanıp uygulandığı, biyoinformatik araçların kullanıldığı farklı boyutlar kazanarak devam etmektedir (Westergaard vd 2007, Christensen vd 2009). *S. cerevisiae*'de açığa çıkarılan bilgiler, glukoz sinyal mekanizmalarının diğer organizmalarda da araştırılması için yol gösterici olmaktadır. Bu çalışmada da *S. cerevisiae* katabolit represyonundan yola çıkarak belirlenen, mekanizmanın başrol oyuncusu olan Mig1 proteininin *P. pastoris* mayasında ilk kez moleküler ve fonksiyonel analizi yapılarak *AOX1* geninin katabolit represyonundaki rolü araştırılmıştır.

Kuramsal Bilgiler ve Kaynak Taramaları bölümünde iki ana başlık altında öncelikle *S. cerevisiae*'de ortaya koyulan katabolit represyon ve glukoz indüksiyon mekanizmalarında rol alan temel öğelerin tanımları ve aralarındaki etkileşimlerin açıklamaları yapılarak genel bir model çizilmiş, ikinci başlıkta ise *P. pastoris* mayasının dahil olduğu metilotrofik mayaların kullanım alanlarından, sahip oldukları özgün metanol metabolizmalarından, metabolizmadaki ilk enzimi kodlayan alkol oksidaz geninin (*AOX*) ekspresyonuna farklı karbon kaynaklarının etkisinden söz edilmiş, *AOX* promotörünün negatif ve pozitif regülasyonunda rol oynayan öğelerin ortaya çıkarılmasına yönelik yapılan çalışmalara yer verilmiştir.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

2.1. Mayalarda Glukoz Algılama Mekanizmaları

Doğadaki en yaygın monosakkarit olan glukoz, mikroorganizmaların en favori yakıtıdır. Ökaryotik hücrelerin çoğu, mayalar ve insanlar dahil, çevrelerindeki karbon kaynaklarının varlığını, niteliğini ve miktarını algılayabilirler. Hücreler, glukozdan farklı bir çok karbon kaynağını kullanabilseler de, ancak, ortamda bulunan tüm glukozun bittiğinden emin olduktan sonra diğer kaynaklara yönelirler (Johnston 1999). Olayın bu şekilde gerçekleşebilmesi için genlerin transkripsiyonundan, mRNA'nın kararlılığına, genlerin ifadesinden proteinlerin kararlılığına kadar tüm işleyişin her bir basamağında etkili olan çok sayıda mekanizma bulunmaktadır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Glukozun negatif etkide bulunduğu kontrol basamakları (Klein vd 1998)

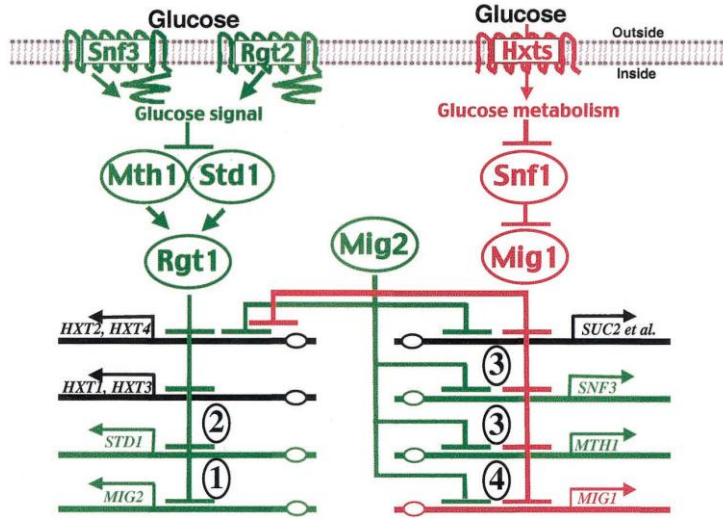
Ortamda bulunan glukoz, öncelikle hücre tarafından algılanır. Hücreye iç ve dış uyarılardan ulaşan bilgi, anında bir çok fiziko-kimyasal sinyal dizisine çevrilir (Johnston 1999). Sinyal dizileri ve düzenleyici faktörler, hücrenin çevresel uyarılara karşı vereceği tepkiyi belirler. Diğer bir deyişle glukoz, temel olarak gen ifadelerini negatif ya da pozitif yönde düzenleyerek kendi kullanımını teşvik eder. Glukozun, gen ifadesi üzerinde sahip olduğu iki ana etki olan represyon ve indüksiyon, aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

- (1) Hücrelerin gelişme ortamında bulunan glukoz, bir çok genin çok hızlı ve dramatik bir şekilde baskılanmasına sebep olur. Baskılanan genler, galaktoz, sukroz, maltoz gibi alternatif karbon kaynaklarının kullanımını sağlayan proteinleri ifade eden genler başta olmak üzere, solunum, mitokondriyal aktiviteler ve glikoneojenez ile ilgili genler olarak sıralanabilir (Klein vd 1998). **Glukoz represyonu ya da katabolit represyon** olarak adlandırılan bu mekanizma, temel olarak transkripsiyon faktörü Mig1 tarafından yönlendirilmektedir.
- (2) Glukoz, aynı zamanda kendi metabolizması için gerekli olan glikolitik enzimler ve glukoz taşıyıcılar gibi proteinlerin genlerinin ifadelerini artırır. **Glukoz indüksiyonu** olarak adlandırılan bu mekanizma, membran reseptörleri Snf3, Rgt2 ve transkripsiyon faktörü Rgt1 tarafından yönlendirilmektedir (Johnston 1999).

Katabolit represyon, besin öğelerinin algılanmasındaki rolü ve farklı karbon kaynaklarının kullanılmasındaki endüstriyel etkisi nedeniyle sinyal ve regülasyon mekanizmalarının çalışılmasında model sistem olmuştur. Glukoz, direkt olarak DNA bağlanma proteinlerine etki etmez. Etki edeceği genlerin promotoruna proteinler tarafından iletilmek üzere bir dizi sinyaller üretir. Katabolit represyon mekanizmasını çözmek için glukoz tarafından üretilen sinyaller, bu sinyallere karşılık veren proteinler ve regüle edilen genin promotoruna bağlanan proteinlere varana kadar zincirdeki her bir öğenin fonksiyonunun açığa çıkarılması gerekir (Gancedo 1998).

2.1.1. *S. cerevisiae*'de glukoz indüksiyon mekanizması

S. cerevisiae'de açıklığa kavuşturulan glukoz indüksiyon ve represyon mekanizmalarının anahtar elemanları Şekil 2.2'de özet bir şekilde gösterilmektedir.



Şekil 2.2. Ana glukoz sinyal yollarının basitleştirilmiş gösterimi. Glukoz indüksiyon yolu yeşil, glukoz represyon yolu ise kırmızı olarak, iki sinyal yolunun nihai hedefleri olan genler siyah olarak gösterilmiştir. Ok işareti ile biten çizgiler aktivasyonu, çizgi ile kesilen çizgiler ise inhibisyonu göstermektedir. Daire ile işaretlenmiş olan sayılar iki yolun birbirlerini regüle ettikleri kontrol mekanizmalarına işaret etmektedir (Kaniak vd 2004).

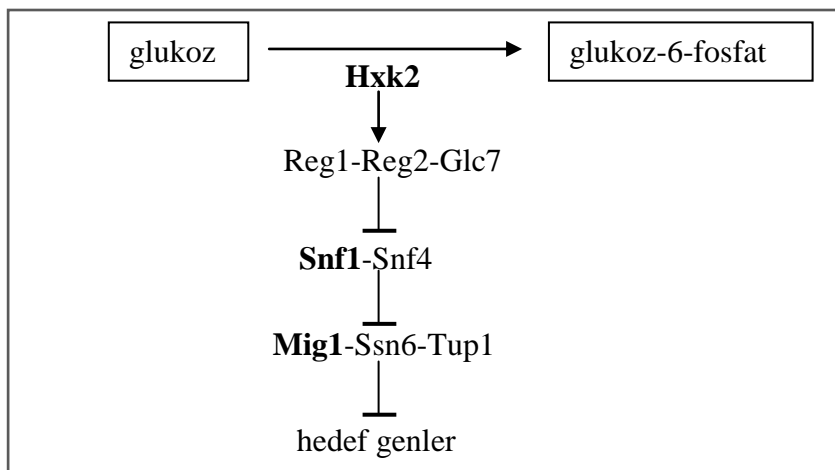
Glukoz, hücre zarında bulunan iki glukoz sensörü (Snf3 ve Rgt2) tarafından algılanır ve glukozu hücre dışından içeriye taşıyacak olan proteinlerin genlerinin (*HXT1*, *HXT2*, *HXT3*, *HXT4* vb.) ekspresyonunun tetiklenmesini sağlayan hücre içi sinyaller üretilir. Bu yolun son hedefi Rgt1 proteindir. Rgt1, glukozun yokluğunda *HXT* genlerine bağlanan ve bu genlerin ifadelerini baskılayan bir transkripsiyon faktörüdür. Mth1 ve Std1 proteinleri, Rgt1'in *HXT* genlerini baskılaması için gereklidir. Glukoz sinyali, Mth1 ve Std1 proteinlerinin degradasyonuna neden olarak Rgt1-aracılı represyonu ortadan kaldırır (Şekil 2.2).

Bugüne kadar Rgt1-aracılı glukoz indüksiyon yolunun yalnızca glukoz taşıyıcılarını kodlayan 6 *HXT* genini etkilediği bulunabilmiştir. Bununla birlikte, Mig1-aracılı glukoz represyon yolunun birçok genin ekspresyonunu etkilediği bilinmektedir. Glukoz indüksiyon ve represyon yollarının etkilediği gen profilinin çıkarılmasına yönelik yapılan çalışmalarda bu iki yolun birbirleri ile sıkı bir bağlantı halinde oldukları ve birbirlerini farklı yollarla regüle ettikleri ortaya çıkarılmıştır (Kaniak vd 2004) (Şekil 2.2).

2.1.2. *S. cerevisiae*'de katabolit represyon mekanizması

Katabolit represyon sonucu baskılanan genler üç grup altında toplanabilir. İlk grup, diğer karbon kaynaklarının (galaktoz, maltoz, etanol gibi) hücre içine alınması ve metabolizması için gerekli olan genlerdir. Ortamda bu genleri tetikleyen karbon kaynakları bulunsa dahi (galaktozun *GAL* genlerini tetiklemesi gibi) katabolit represyon, diğer kaynaklardan gelen indüksiyon mekanizmalarına baskın gelir. İkinci grupta toplanan genler, hücrelerin fermantatif gelişim için ihtiyaç duyduğu oksidatif fosforilasyon ve Krebs döngüsü için gerekli olan genlerdir. Üçüncü grup ise kısır bir döngüye girilmesini önlemek amacıyla baskılanan glikoneojenez yolağında yer alan genlerdir (Westholm vd 2008).

Katabolit represyon yolu da indüksiyon yolu gibi ilk olarak glukozun hücre zarında algılanması ile başlar. Hücre zarında Rgt2/Snf3 reseptörlerine bağlanan glukoz bir sinyal dizisi başlatır (Şekil 2.2). Glukoz taşıyıcı genlerin (*HXTs*) ifade edilmesini takiben represör proteinin baskılanacak olan genin promotörüne fiziksel olarak bağlanması şeklinde gelişen olaylar zinciri sonucunda genin transkripsiyonu engellenmiş olur (Jonston ve Kim 2005). Katabolit represyon yolunun kilit bileşenleri, heksokinaz PII (*Hxk2*), protein kinaz Snf1 ve DNA-bağlanma proteini Mig1 represörüdür (Şekil 2.3) (Klein vd 1998).



Şekil 2.3. Katabolit represyon mekanizmasında rol alan kilit öğeler (Klein vd 1998).

2.1.2.1. DNA bağlanma proteini represör Mig1p

Katabolit represyon mekanizmasının en önemli ögesi Mig1 proteindir. İlk kez *GAL* genlerinin promotor bölgesine bağlanarak transkripsiyonu inhibe eden proteinlerin taranması sırasında izole edilmiştir (Nehlin ve Ronne 1990). Daha sonra yapılan araştırmalarda birçok farklı promotorun transkripsiyonunda represör olarak rol aldığı gösterilmiştir. Bu genlerden başlıcaları arasında *SUC*, *GAL* ve *MAL* gen aileleri sayılabilir (Hu vd 1995).

Mig1, genlerin transkripsiyonlarını doğrudan ve dolaylı olmak üzere iki şekilde baskılayabilir: genin promotoruna bağlanarak ya da genin transkripsiyonel aktivatörlerinin genlerinin promotor bölgelerine bağlanarak. Buna örnek olarak *GAL* genleri verilebilir, Mig1 tarafından hem direk olarak, hem de aktivatörleri *GAL4* geninin represyonu yolu ile dolaylı olarak baskılanırlar (Westholm vd 2008).

Mig1 proteininin DNA'ya bağlanması, proteinin ilk 90 aminoasitlik bölgesinde yer alan iki çinko parmak motifinden, promotorun 6 bçlik -GCGGGG- sekansına bağlanması şeklinde olmaktadır. Bu GC bağlanma bölgesi, bağlanma için gerekli olduğu tespit edilen AT-zengin başka bir bölgenin hemen altında yer almaktadır. Bu gereklilik sıra dışı olsa da AT-zengin bölgenin uygun DNA konformasyonunu sağladığı düşünülmektedir (Needham ve Trumbly 2006).

Mig1 proteininin yol açtığı represyon oranı promotora göre farklılık gösterir ve genlerin tamamen baskılanmış durumda kalmalarını sağlamak için işbirliği yaptığı başka proteinler de vardır (Zhou ve Winston 2001).

2.1.2.2. Cyc8(Ssn6)-Tup1 protein kompleksi: Mig1 işbirlikçileri

Mig1 proteininin represyona neden olabilmesi için Cyc8(Ssn6)-Tup1 proteinleri ile kompleks oluşturması gerektiği bilinmektedir (DeRisi vd 1997). Cyc8-Tup1 kompleksinin DNA-bağlanma bölgesi bulunmamakta fakat Mig1 gibi dizi-spesifik DNA bağlanma proteinleri ile işbirliği yaparak represyona neden olmaktadırlar

(Tzamarias ve Struhl 1995). Cyc8, Mig1 proteinine, C ucundaki 24 amino asitlik bağlanma bölgesinden etki eder ve bu bölge represyonun gerçekleşebilmesi için gereklidir (Ostling ve Ronne 1998). Bu bulgulardan geliştirilen basit modele göre Cyc8 ve Tup1, Mig1 ile etkileşerek bağlanacakları promotora yönelirler ve değişik mekanizmalarla transkripsiyonu inhibe ederler.

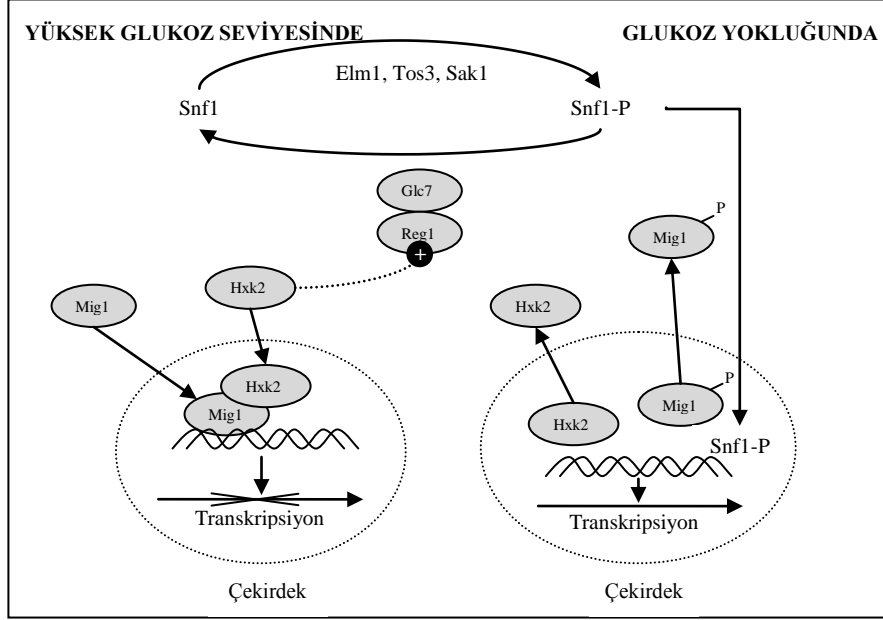
2.1.2.3. Protein kinaz Snf1: Mig1 regülatörü

Mig1, bütün ökaryotlarda bulunan Snf1 protein kinaz tarafından negatif yönde regüle edilir. Bu kinazın hücrenin enerji dengesinin sağlanmasında genel bir fonksiyonu vardır. Düşük enerji koşullarında aktifleştirilir ve enerji üreten prosesleri aktifleştirerek, enerji harcayan prosesleri ise inhibe ederek enerji seviyesini dengelemeye çalışır. Mayalarda, ortamda glukozun bulunması yüksek enerji koşulları şeklinde algılanabilir çünkü glukozun varlığı Snf1'in inhibisyonuna neden olur. Ortamda glukozun bitmesi durumunda ise (düşük enerji koşulları demektir) başka protein kinazlar (Elm1, Tos3 ve Sak1) tarafından fosforlanarak aktifleştirilen Snf1, Mig1'i fosforlar. Fosforlanan Mig1 çekirdekte dışarı taşınır, co-represörleri Cyc8-Tup1 ile kompleks oluşturamaz, ve glukoz tarafından baskılanan genlerin promotorlarına bağlanamaz (Westholm vd 2008). Glukoz represyonunun ortadan kalkması için Mig1'in fosforlanması mutlaka gereklidir ve fosforilasyon noktalarının mutasyonu Mig1 proteinini yapısal represör haline getirir (DeVit ve Johnston 1999).

2.1.2.4. Hezokinaz Hxk2: Mig1 destekçisi

Mig1'in Snf1 tarafından fosforlanması Ser311 noktasından gerçekleşir ki bu nokta ayrıca Hxk2 (hezokinaz 2) ile etkileşimde kritik olan bir noktadır (Ahuatzi vd 2007). Hxk2, glukoz metabolizmasında ilk katalitik basamak olan glukozun fosforlanmasını gerçekleştiren 3 enzimden (iki hezokinaz, bir glukokinaz) biridir. Hücreler glukozda ürerken bu üç enzim içinde en fazla üretilen Hxk2'dir. Yani glukozun hücre içi metabolizmasının başlamasından Hxk2 sorumludur (Herrero vd 1995).

Şekil 2.4’de Hxk2’nin katabolit represyonda oynadığı roller basitleştirilmiş bir çizimle gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Hxk2’nin katabolit represyonda oynadığı rollerin basitleştirilmiş gösterimi (Gancedo ve Flores 2008)

Hxk2 ortamda bulunan glukozu algılar ve bir sinyal dizisi başlatır. Yüksek glukoz konsantrasyonlarında bir miktar Hxk2 çekirdeğe girer ve Mig1 represör proteinine bağlanır. Böylelikle Hxk2, Mig1 proteininin ortamda bulunan henüz aktif olan Snf1 proteinlerini tarafından fosforlanmasına hemen engel olarak Mig1’in represyon görevini gerçekleştirmesini sağlar (Ahuatzi vd 2004). Diğer taraftan, glukoz varlığında Hxk2 tarafından üretilen sinyal Snf1’in defosforilasyonuna (Glc7-Reg1 protein fosfatazlar tarafından) yani inaktif duruma geçmesine neden olur (Kaniak vd 2004). Bununla birlikte, Hxk2, Reg1 ile ayrıca etkileşir ve bu etkileşim Glc7 fosfatazının Snf1’i inaktif formda (fosforlanmamış şekilde) tutmasını sağlar (Şekil 2.4). Hxk2 mutant hücrelerde, yüksek glukoz konsantrasyonlarında bile Snf1’in aktif halde olduğu gösterilmiştir (Cera vd 2002). Ayrıca uzun zamandan beri $\Delta h x k 2$ hücrelerde bazı genlerden (invertazı kodalayan *SUC2*, galaktoz metabolizması için gerekli olan enzimleri kodlayan *GAL* genleri gibi) katabolit represyonun kalktığı bilinmektedir (Entian 1980).

Mig1 ve Hxk2 arasındaki etkileşim ve işbirliğini kısaca tekrar özetlemek gerekirse, Hxk2 yüksek glukoz konsantrasyonunda hem Mig1 proteinine bağlanarak hem de Snf1'in inaktif formuna gelmesi ve o halde tutulmasını sağlayarak, Mig1'in çekirdekte kalmasına ve represyon görevini yerine getirmesine yardımcı olur. Ortamda glukozun bulunmaması durumunda ise Snf1, 3 kinazdan (Elm1, Tos3 ve Sak1) biri tarafından fosforlanır; fosforlanmış Snf1 aktif hale gelir ve çekirdeğe girerek Mig1p'i fosforlar, böylelikle Mig1'in sitoplazmaya taşınmasını sağlar (Şekil 2.4). Snf1, Hxk2 ile hem yüksek hem de düşük glukoz konsantrasyonlarında etkileşirken, Mig1 ile yalnızca düşük glukoz konsantrasyonlarında etkileşir (Gancedo ve Flores 2008).

Yüksek glukozda sodyum stresi altında gelişen hücrelerde Snf1'in aktif olduğu fakat Mig1'i fosforlamadığının tespit edildiği araştırmadan yola çıkarak, Hxk2 ve Mig1 arasındaki etkileşimin, Mig1 proteininin dolayısı ile represyon mekanizmasının farklı sinyal yollarından etkilenmesini önlemek açısından da önemli olduğu sonucuna varılmıştır (McCartney ve Schmidt 2001).

2.1.2.5. Msn5: Mig1'in taşıyıcısı

Mig1 proteininin çekirdekte sitoplazmaya taşınmasını β -importin ailesinden bir protein olan Msn5 sağlar. Bu ailedeki taşıyıcılar proteinlerin hem dışarıdan çekirdek içine, hem de çekirdek içinden dışına taşınmasını sağlarlar (Ohno 1998).

Mig1'in çekirdeksel lokalizasyonu glukoz tarafından regüle edilir: glukozun varlığında çekirdekte, glukozun yokluğunda ise sitoplazmada bulunur (DeVit vd 1997). Ortamda glukozun bulunmadığı durumda Snf1 tarafından fosforlanan Mig1, Msn5 tarafından tanınır ve çekirdekte sitoplazmaya taşınır. $\Delta msn5$ suşlarında Mig1, beklendiği üzere glukoz konsantrasyonundan bağımsız olarak her zaman ve yalnızca çekirdekte bulunur. Bununla birlikte $\Delta msn5$ suşlarında Mig1'in, ortamdaki glukozun uzaklaştırılması ile çekirdek dışına taşınamamasına rağmen *GALI* ekspresyonunu baskılamaya devam etmediği, gen ekspresyonunun normal olarak gerçekleştiği tespit edilerek (DeVit ve Johnston 1999) Mig1'in çekirdekte bulunmasının represyonun

devam etmesi için yeterli olmadığı gösterilmiştir. Bu durum, fosforilasyon olayının Mig1'in çekirdeğin dışına taşınmasını sağlamanın dışında, Msn5'den bağımsız başka mekanizmalar ile de Mig1'in fonksiyonununun regülasyonunda rol aldığı açıkça gösterilmiştir.

2.1.2.6. Mig1 ve dublörü Mig2'nin regülasyon mekanizmaları

Mig1 ile aynı bağlanma bölgesine sahip olan Mig2 proteini de bazı genlerin glukoz tarafından baskılanmasında görev alarak Mig1 ile işbirliği içinde çalışır (Kaniak vd 2004). Mig2'nin represyon mekanizmasındaki rolü Mig1'e göre daha küçük görünmektedir. Glukoz tarafından baskılanan genlerin bazıları hem Mig1 hem Mig2 tarafından baskılanırken, bazıları yalnızca Mig1 tarafından baskılanır. Şimdiye kadar yalnızca Mig2 tarafından baskılanan bir gen ortaya çıkarılmış değildir (Kaniak vd 2004).

Katabolit represyonun iki ana represörü Mig1 ve Mig2'nin regülasyonları farklı şekilde gerçekleşmektedir. Mig1'in çekirdeksel lokasyonu glukoz tarafından kontrol edilirken Mig2'nin lokasyonu glukozdan bağımsızdır. Mig2'nin her koşulda çekirdekte bulunduğu ve Mig1 regülatörü olan Snf1 tarafından regüle edilmediği gösterilmiştir (Lutfiyya vd 1998). Kaniak vd'nin (2004) yaptıkları çalışma sonucunda ise *MIG2* ekspresyonunun Rgt2/Snf3-Rgt1 sinyal yolu (glukoz indüksiyonu) ile glukoz tarafından tetiklendiği ortaya çıkarılmıştır (Kaniak vd 2004) (Bknz. Şekil 2.2).

Esasen fosforlanarak protein inhibisyonu şeklinde gerçekleşen Mig1'in negatif regülasyonu, *MIG1* geni promotoruna Mig1 ve Mig2 proteinlerinin bağlanması ile transkripsiyon basamağında da gerçekleşmektedir. İki glukoz sinyal yolu arasında gerçekleşen bu çapraz etkileşimler sonucu meydana gelen geribildirimde represörün sentezi, kendisinin aktif olduğu durumda azalmaktadır. Bu durumun represyon etkisinin aşırıya kaçmasını önlemek ve ortamda glukozun tükenmesini takiben çok çabuk bir şekilde represyondan kurtulabilmek gibi etkileri olabileceği bildirilmiştir (Kaniak vd 2004).

Yapılan onca çalışmadan çıkarılan sonuçlar birlikte düşünüldüğünde, Mig1, promotor DNA ve diğer proteinler arasındaki etkileşimin daha önce düşünüldüğünden ve şimdiye kadar ortaya çıkarıldığından çok daha karmaşık olduğu anlaşılmaktadır (Papamichos-Chronakis 2004). Mig1'in birkaç proteinle kompleks oluşturup promotara bağlanarak represyonu sağladığı şeklinde çizilen basit modelin olayın karmaşıklığını açıklamaya yeterli olmadığı görülmektedir. Her yeni araştırma sonucu elde edilen bulgular glukoz represyon modelinin gelişmesi ve değişmesine, bu kompleks sistem ve içerdiği önemli proteinler üzerine yapılan araştırmaların farklı araçlar kullanılarak devam etmesine neden olmaktadır.

2.2. Metilotrofik Mayalarda Glukoz Algılama Mekanizmaları

2.2.1. Metilotrofik mayaların genel özellikleri ve kullanım alanları

Rekombinant protein üretiminde ilk kullanılmaya başlayan maya, binlerce yıldır bira ve ekmek yapımında kullanılan *S. cerevisiae*'dir. Hatta, çok uzun zaman boyunca yaygın olarak kullanılmasından dolayı "maya" denilince akla yalnızca *S. cerevisiae* gelmekteydi. Fakat endüstriyel biyoteknolojideki araştırmaların hız kazanması ile 1970'lerden başlayarak farklı ve üstün özelliklere sahip yeni mayalar keşfedilmeye başlanmıştır (Romanos vd 1992). Yeni keşfedilen mayalar arasında sınırlı sayıda bulunan, karbon ve enerji kaynağı olarak yalnızca metanolü kullanma yetisine sahip olan mayalar karakterize edilmiş ve önce tek hücre proteini olarak daha sonra ise rekombinant protein üretiminde kullanılmaya başlanmışlardır. Metilotrofik olarak adlandırılan bu mayalar 4 cinse aittirler: *Pichia*, *Hansenula*, *Candida* ve *Torulopsis*. En öne çıkan türleri ise *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha* (*Pichia angusta*), *Candida boidinii* ve *Pichia methanolica* olarak sayılabilir (Lin-Cereghino ve Cregg 2000).

Metilotrofik mayaların kullanılmaları, daha çok tek karbon kaynağı olarak metanolü kullanabilme yeteneklerine ya da metanol metabolizmasının kendine özgü regülasyon özelliklerine dayanmaktadır. Metilotrofik mayaların kullanıldıkları alan 3 temel başlık altında toplanabilir:

- (1) Metanol metabolizmasındaki ilk reaksiyonlar peroksizom adı verilen organellerde gerçekleşir. Hücreler tek karbon kaynağı olarak metanol içeren besiyerine geçirildiklerinde peroksizom oluşumu kuvvetli bir şekilde tetiklenir. Bu nedenle metilotrofik organizmalar peroksizom oluşumu ve fonksiyonu çalışmalarında model organizma olarak kullanılmaktadırlar (Veenhuis ve Klei 2002).
- (2) Biyosensör uygulamalarında, özellikle alkol tespitinde, tanıma elementi olarak ya da biyodönüşümler için geliştirilen metilotrofik mayalar ve enzimler bulunmaktadır (Gonchar vd 2002).
- (3) Metilotrofik mayalar esas olarak rekombinant protein üretiminde kullanılmaktadırlar. Bu konu ile ilgili yapılmış olan geniş kapsamlı derlemelerde de (Macauley-Patrick vd 2005, Dijk vd 2000) belirtildiği gibi metilotrofik mayalarda metanol kullanım yolunda bulunan enzimlerin genlerinin promotor bölgeleri, özellikle alkol oksidaz geninin promotor bölgesi, şimdiye kadar yüzlerce farklı proteinin üretilmesinde kullanılmıştır.

Metilotrofik mayalar, *S. cerevisiae* gibi, hem mikroorganizmaların avantajlarını taşırlar (örn. basit kültür koşullarında gelişebilmek, genetik tekniklerin oturmuş ve kolay olması, endüstriyel üretim ve ölçek büyütmede sahip olunan çok fazla deneyim) hem de tipik ökaryotik protein modifikasyonlarını (translasyon sonrası glikozilasyon gibi) gerçekleştirebilirler. Ayrıca metilotrofik mayaların ürettikleri proteinler, endotoksin, onkojenik ve viral DNA ihtiva etmezler. Bu özellikleri, özellikle gıda ve ilaç endüstrisi için üretilen proteinler açısından çok önemlidir. Örneğin, *P. pastoris*'in kendisi GRAS (generally recognized as safe, güvenli olarak kabul edilebilir) statüsünde olmamasına rağmen *P. pastoris*'te üretilen enzim preparatları Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi'nin (FDA) GRAS listesinde yer almaktadır (Anonim 2006).

Metilotrofik mayaların endüstriyel rekombinant protein üretiminde giderek artan popülerliğini sağlayan bazı ilginç özellikleri bulunmaktadır. *S. cerevisiae*'nin tersine bu mayalar *Crabtree* negatif mayalar grubundadırlar. Yani tam aerobik koşullar altında

etanol üretimi çok düşük seviyelerde gerçekleşir. Bu özellikleri bioreaktör kültürlerinde çok yüksek hücre yoğunluklarına kadar gelişebilmelerini ve böylelikle yüksek protein ekspresyon seviyelerine ulaşabilmelerini sağlar. Ayrıca, *S. cerevisiae*'de proteinlerin, hatta düşük molekül ağırlıklı peptitlerin periplazmik boşluklara takılması, hücre dışı protein üretimi için özellikle *P. pastoris* ve *H. polymorpha* mayalarının tercih edilmelerine neden olmaktadır. Metilotrofik mayaların yüksek sekresyon kapasiteleri, yüksek hücre yoğunluklu fermentasyon teknikleri ile birleşince litrede birkaç gram seviyelerinde protein üretimi gerçekleştirmek mümkün olabilmektedir (Hartner ve Glieder 2006).

Metilotrofik mayalarda hiper-mannozilasyon, *S. cerevisiae* ile karşılaştırıldığında daha az gerçekleşmektedir. Ayrıca, terapötik proteinlerin üretiminde kullanılmak üzere glikozilasyon prosesini insan hücresi gibi gerçekleştirebilen organizmalar elde etmek için için özellikle *P. pastoris*'te mühendislik çalışmaları yapılmaktadır (Wildt ve Gerngross 2005). Bu çalışmalar, şimdiye kadar *E. coli*, *S. cerevisiae* ve memeli hücre kültürlerinin hakim olduğu biyofarmasötik proteinlerin üretiminde metilotrofik mayaların kullanımı için yeni bir kapı açmıştır.

Tüm bu özelliklere ek olarak, metilotrofik mayaların genomlarının dizi analizlerinin yapılması da araştırmalarda ve endüstriyel uygulamalarda kullanımlarını kolaylaştırmakta ve yaygınlaştırmaktadır. Örneğin, şimdiye kadar üç farklı *P. pastoris* suşunun (DSMZ 70382, GS115 ve CBS7475) genomu üç akademik araştırma laboratuvarı tarafından dizilenmiştir (De Schutter vd 2009, Mattanovich vd 2009, Küberl vd 2011).

2.2.2. Metilotrofik mayalarda metanol metabolizması

Metilotrofik mayaların rekombinant protein üretiminde başarılı bir şekilde kullanılmaları başlıca, metanol kullanım yolağındaki bazı genlerin çok sıkı ve kuvvetli regüle edilen promotörlere sahip olmalarından kaynaklanmaktadır. Özellikle *P. pastoris*'in yolağındaki ilk enzim olan alkol oksidazı kodlayan *AOX1* geninin

promotoru rekombinant protein üretiminde en yaygın olarak kullanılan promotordur (Gellissen 2000).

Metilotrofik mayalar, regülasyonu transkripsiyon seviyesinde gerçekleşen özgün bir metanol metabolizmasına sahiptir. Bu organizmaların, metanolde gelişebilmeleri için peroksizom olarak adlandırılan ve içinde metanol metabolizmasının anahtar enzimlerini barındıran özel organellere ihtiyaçları vardır. Bu organellerin hücre içindeki oluşumları metanol tarafından tetiklenir. Metanolde gelişen hücrelerde peroksizomlar, sitoplazmanın %80'ini kaplayacak kadar çoğalırlar (Hartner ve Glieder 2006).

Metanol metabolizmasının ilk basamağında metanol, alkol oksidaz (AOX, EC 1.1.3.13) tarafından formaldehit ve hidrojen peroksida (H_2O_2) okside olur. AOX, 8 aynı altbirimden oluşan yüksek molekül ağırlıklı bir proteindir. Elektron alıcı olarak oksijeni kullanır fakat oksijene afinitesi çok düşüktür. Hücre bu durumun üstesinden gelmek için çok büyük miktarlarda AOX sentezlemek durumunda kalır (toplam çözünür proteinin %30'u kadar).

Metanolün oksidasyonu sonucu ortaya çıkan toksik H_2O_2 , katalaz (CAT, EC 1.11.1.6) tarafından su ve oksijene parçalanır. Formaldehit ise hem özümleme hem de katabolizma yollarına giren kilit bir ara üründür. Özümleme yolağında, formaldehitin bir miktarı sitoplazmaya girer, indirgenmiş glutatyon ile kompleks oluşturur ve iki dehidrogenaz reaksiyonu sonucunda karbondioksite okside olur. Reaksiyonun ilk basamağında formaldehit dehidrogenaz format oluşumunu katalizler, ikinci basamakta format dehidrogenaz, formatı karbondioksite çevirir. Metilotrofik mayalar ayrıca formaldehiti direk metanole indirgeyen NADH-bağımlı formaldehit redüktaz enzimine de sahiptirler. Formaldehit redüktazın, alkol oksidaz ile birlikte hücrenin formaldehit ve NADH miktarını düzenleyici bir döngü oluşturduğu düşünülmektedir. Formaldehitin katabolik yolağında ise, peroksizomda kalmış olan formaldehit xyluloz-5-fosfat (Xu_5P) ile reaksiyona girer. Dihidroksi aseton sentaz (DAS, 2.2.1.3) tarafından katalizlenen bu reaksiyonda 2 tane 3 karbonlu bileşik oluşur: dihidroksiaseton (DHA) ve gliseraldehit-3-fosfat (GAP). Bu bileşikler sitoplazmaya geçerek metabolize olmaya devam ederler (Şekil 2.5).

2.2.3. Metilotrofik mayalardaki AOX genleri ve promotor bölgeleri

Metanol metabolizmasının ilk basamağını gerçekleştiren AOX enzimi ve AOX geninin regülasyon mekanizması metilotrofik mayalarda en çok çalışılan konulardır. Bunun için başlıca iki neden sıralanabilir:

- (1) AOX ekspresyonunu kontrol eden promotor (örn. *AOX1* promotoru) şimdiye kadar karşılaşılmış olan en kuvvetli ve en sıkı kontrol edilebilen promotorlardan biridir. Bu özellik sayesinde metilotrofik mayalar, metanol tarafından tetiklenen promotorların altında heterolog protein üretiminde çekici birer konukçu organizma haline gelmişlerdir (Cregg vd 2000). Metanol-tetiklemeli promotorların karbon kaynakları tarafından çok sıkı bir şekilde kontrol ediliyor olması konukçu organizmaya toksik olabilen proteinlerin üretimini mümkün hale getirmektedir. İki safhada gerçekleştirilen protein üretiminin gelişim evresinde hücre sayısı çok büyük yoğunluklara ulaştırılır; tetikleme evresinde ise proteinin üretimi gerçekleştirilir.
- (2) AOX enziminin kendisi alkol sensörlerindeki ana bileşen olarak kullanılmakta olup endüstriyel öneme sahiptir. AOX enziminin birincil alkollere afinitesi çok yüksek olması (μM seviyelerinde), aktif formunda iken yüksek stabiliteye sahip olması, bulunması ve elde edilmesi kolay bir enzim olması (metanolde gelişen hücrelerin toplam hücre proteinlerinin %30'unu AOX oluşturmaktadır) kullanılma nedenleri arasında sayılabilir.

Metilotrofik mayalarda bugüne kadar izole edilen AOX proteinini kodlayan genler Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Metilotrofik mayalarda AOX proteinini kodlayan genler ve promotorları (Ozimek vd 2005)

Organizma	Gen/Promotor adı	Genbank No.
<i>Pichia pastoris</i>	<i>AOX1</i>	U96967
	<i>AOX2</i>	U96968
<i>Pichia methanolica</i>	<i>AUG1 (MOD1)</i>	AF141329
	<i>AUG2 (MOD2)</i>	AF141330
<i>Hansenula polymorpha (Pichia angusta)</i>	<i>MOX</i>	X02425
<i>Pichia pinus</i>	<i>AOX1</i>	AY425620
<i>Candida boidinii</i>	<i>AOD1</i>	M81702

Metilotrofik mayalar arasında AOX geni için farklı isimler kullanılmaktadır. Ayrıca, her birinde AOX enzimini kodlayan gen sayısı da farklılık göstermektedir. *C. boidinii* ve *H. polymorpha*'da alkol oksidazı birer gen kodlarken (sırasıyla *AOD1* ve *MOX*), *P. pastoris* ve *P. methanolica*'da ikişer gen kodlamaktadır (sırasıyla *AOX1* ve *AOX2*, *MOD1* ve *MOD2*) (Çizelge 2.1). *P. pastoris* *AOX2* geninin rolünün ne olduğu tam olarak bilinmemekle beraber *P. methanolica*'da ikinci bir alkol oksidaz geninin yüksek metanol konsantrasyonlarında avantaj sağladığı düşünülmektedir (Nakagawa vd 2002).

P. pastoris sisteminde heterolog proteinlerin ekspresyonu, çoğunlukla *AOX1* promotoru kontrolünde gerçekleştirilir. *AOX1* promotorunun araştırmalarda ve uygulamada en fazla 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 olması ve ticari kit olarak (Invitrogen, CA, ABD) piyasaya sürülmesi de gösterilebilir.

2.2.4. AOX ekspresyonuna farklı karbon kaynaklarının etkisi

Genel olarak, metilotrofik mayalarda, AOX başta olmak üzere metanol metabolizmasında yer alan anahtar enzimler, hücrelerin metanolde geliştiği ortamda

üretirler. Glukozda gelişen hücrelerde ise hemen hemen hiç bulunmazlar. Yani, metanol tarafından tetiklenen genler (metanol indüksiyonu) glukoz tarafından tamamen baskılanmaktadır (katabolit represyon). Hücreler glukozdan, fermente edilemeyen bir karbon kaynağına geçirildiklerinde ya da ortamda glukoz tükendiğinde ise bu genlerin ekspresyonu üzerindeki represyon kalkar (derepresyon), ortama metanol eklenmesi ile birlikte ise transkripsiyon seviyeleri tekrar en yüksek seviyelerine çıkar.

Metilotrofik mayalardaki tüm AOX genleri farklı karbon kaynaklarına göre gelişen represyon, derepresyon ve indüksiyon mekanizmaları ile regüle edilseler de regülasyon mekanizmaları birbirlerinden farklılık göstermektedir (Sasano vd 2008). Çizelge 2.2’de metilotrofik mayalardaki AOX ekspresyonu üzerinde farklı karbon kaynaklarının etkisi liste olarak verilmiştir.

Çizelge 2.2. Metilotrofik mayaların AOX genleri üzerinde karbon kaynaklarının represyon ve derepresyon etkileri (Hartner ve Glieder, 2006).

Organizma		Glukoz	Gliserol	Metanol	Gliserol+Metanol
		Etanol			
<i>P. pastoris</i>	<i>AOX1</i>	Represyon	Represyon	İndüksiyon	Represyon
	<i>AOX2</i>	Represyon	Represyon	İndüksiyon	Represyon
<i>P. methanolica</i>	<i>MOD1</i>	Represyon	Derepresyon (~%60-70)*	İndüksiyon	İndüksiyon (~%100)
	<i>MOD2</i>	Represyon	Aktivite yok	İndüksiyon	İndüksiyon (~%100)
<i>H. polymorpha</i>	<i>MOX</i>	Represyon	Derepresyon (~%60-70)*	İndüksiyon	İndüksiyon (~%100)
<i>C. boidinii</i>	<i>AOD1</i>	Represyon	Derepresyon (~%3-30)*		İndüksiyon (~%90)

* Derepresyon seviyeleri, metanol indüksiyon seviyeleri %100 kabul edilerek hesaplanmıştır.

H. polymorpha ve *C. boidinii* AOX genlerinin regülasyonları benzer şekilde gerçekleşir: *HpMOX* ve *CbAOD1* promotorları glukoz ya da etanolün tek karbon kaynağı olduğu durumda tamamen baskılanırken, gliserolde dereprese olur ve metanol

ile birlikte (ortamda glukoz yoksa) kuvvetli bir şekilde tetiklenir. Fakat, gliseroldeki derepresyon seviyeleri iki maya arasında farklıdır. *C. boidinii*'de *AOD1* promotorunun gliseroldeki derepresyon seviyesi, metanoldeki tetiklenmiş seviyesi ile karşılaştırıldığında yalnızca ~%20 iken aynı koşullar altında *H. polymorpha* *MOX* aktivitesi ~%80'lere çıkmaktadır (Çizelge 2.2) (Yurimoto vd 2000). *MOX* ve *AOD* ekspresyonları ortamda glukoz ve metanol birlikte bulunduğu baskılanırken, gliserol ve metanolün varlığındaki alkol oksidaz aktiviteleri neredeyse ortamda yalnızca metanol bulunduğu durumdaki aktivitesine kadar ulaşmaktadır. Başka karbon kaynakları da (örn. ksiloz, riboz ve sorbitol) *H. polymorpha*'da *MOX* ekspresyonunda derepresyona neden olur. Fakat bu karbon kaynaklarındaki ekspresyon seviyeleri gliseroldekinden daha düşüktür (ksilozda ~%50, ribozda ~%25, sorbitolde ~%10) (Hartner ve Glieder 2006).

P. pastoris'te ise gelişimi sınırlamayan koşullarda her iki alkol oksidaz geni, *AOX1* ve *AOX2*, glukoz, etanol, gliserol, asetat gibi karbon kaynaklarında baskılanmakla birlikte (Cregg vd 1989), tek karbon kaynağı olarak metanol olan bir ortama transfer edildiklerinde 1000 kata kadar indüksiyonları gerçekleştirmektedir (İnan ve Meagher 2001a). *AOX1* promotorunu baskılamayan sorbitol, mannitol, trehaloz ve alanin gibi başka karbon kaynakları bulunmaktadır. Fakat ekspresyon için mutlaka metanole gereksinim duyulmaktadır (İnan ve Meagher 2001b).

P. pastoris *AOX1*'in tersine, *P. methanolica* *MOD1*'i, *H. polymorpha*'daki *MOX* gibi gliserol tarafından baskılanmamaktadır. Promotor bölgeleri olarak *MOD1* ve *MOD2* genlerinin 5' uçlarından ~1.5-1.6 kb'lık bölgelerin izole edilip raportör enzim olarak asit fosfataz enzimi kullanılarak yapılan deneylerde elde edilen sonuçlar daha önce yapılan *MOD* izozim aktivite ölçümünün sonuçları ile paralellik göstermiştir: her iki gen de glukozun varlığında baskılanırken, *MOD1* gliserolde ifade edilmektedir. Metanol, düşük konsantrasyon seviyelerinde daha çok *MOD1*'i tetiklerken yüksek konsantrasyonlarda her iki genin ifadesini de kuvvetli bir şekilde tetikler. *MOD2*'nin regülasyon şekli *P. pastoris*'in *AOX1* promotorununkine benzer. Glukoz tarafından baskılanmakta ve ifadesi için metanole gereksinim duyulmaktadır. Fakat *PpAOX1*'den farklı olarak, gliserol içeren ortamda ifade edilmezken ortama metanol eklenmesi ile

represyon ortadan kalkmakta ve %100 indüksiyon gerçekleşmektedir (Nakagawa vd 2002).

AOX ekspresyonunun seviyesi hücrelerin geliştiği kültür koşullarına çok sıkı bir şekilde bağlıdır. Bir tane *AOX* geni bulunan *H. polymorpha*'da glukoz-sınırlı koşullar altında iken (örn. glukoz içeren kesikli kültürlerde durgun fazın ilk safhalarında ya da karbonu sınırlanmış kemostatlarda) çok düşük miktarlarda AO seviyeleri gözlenebilmektedir. AO protein seviyeleri hücreler dihidroksiaseton ya da gliserolde geliştiğinde artmakta ve metanoldeki seviyesinin %80'ine kadar çıkmaktadır (Roggenkamp vd 1984). Çok yüksek AO seviyeleri için ise genin metanol tarafından tetiklenmesi gerekmektedir. Metanol tetiklemesi sonucu AO protein seviyesi toplam hücre proteininin %30'una kadar çıkmaktadır. Bu şartlar altındaki hücreler peroksizomla doludur (Ozimek vd 2005). İlginç bir şekilde, AO ekspresyonunun maksimum seviyeye tetiklenmesi glukoz ve metanol ile beslenen karbon-limitli karışık substrat kemostat kültürlerinde de gerçekleşmektedir. Tek karbon kaynağı kemostat kültürleri ile karşılaştırıldığında her iki karbon kaynağı da biyokütle üretiminde artışa yol açacak şekilde tamamen kullanılmaktadır. Metilotrofik mayalarda yapılan kemostat çalışmalarında elde edilen veriler, genel bir metanol regülasyon mekanizmasının söz konusu olmadığını, metanol yolağındaki her bir genin değişen çevre koşullarına göre (örn. dilüsyon oranı, karbon kaynağı kompozisyonu) farklı davrandığından duruma göre özel regülasyon mekanizmalarının bulunduğunu göstermektedir (Hartner ve Glieder 2006).

2.2.5. *AOX* regülasyonuna etki eden cis- ve trans-etkili faktörler

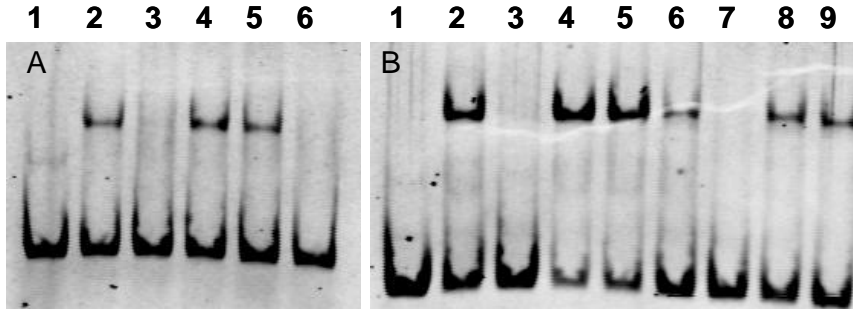
AOX ekspresyonunun represyon, derepresyon ve indüksiyon şartlarındaki regülasyon mekanizmalarının ortaya çıkarılması için yapılan çalışmalar, genelde *S. cerevisiae*'da ortaya konan modellerden yola çıkarak belirlenen, mekanizmada rol aldığı düşünülen genlerin fonksiyonel analizlerinin yapılması yolu ile gerçekleştirilmiş, tüm gelişme faktörlerinin kontrol edilebildiği kemostat çalışmaları ile desteklenerek bugüne kadar birçok genel bilgi ve hipotez elde edilmiştir. Promotor sekanslarının silinmesi yolu ile yapılan moleküler çalışmalar ile birlikte promotorun regülasyon mekanizmalarında önemli olan bölgeleri (cis-etkili parçalar) ve bu bölgelere bağlanan

proteinler (trans-etkili faktörler) tespit edilmeye başlanmış, proteinlerin bazıları tanımlanmış ve böylelikle regülasyon mekanizmalarında gerçekleşen olaylar zinciri daha ayrıntılı bir şekilde ortaya çıkmaya başlamıştır.

AOX promotorunun regülasyon mekanizmasına yönelik çalışmalar genelde metanol indüksiyon (pozitif regülasyon) mekanizmasına odaklanmış durumdadır. Metilotrofik mayaların alkol oksidaz genlerinin katabolit represyonu (negatif regülasyon) mekanizması daha çok *H. polymorpha* ve *C. boidinii*'de çalışılmış olup *P. pastoris*'te çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu bölümde, metilotrofik mayalarda gerçekleştirilen, *AOX* promotorlarının indüksiyon, derepresyon ve katabolit represyon mekanizması ile ilgili yapılmış çalışmalara yer verilecektir.

2.2.5.1. *P. pastoris*

PpAOX1 promotorunun indüksiyon ve represyonundaki önemli rol oynayan bölgelerinin belirlenmesi İnan'ın (2000) çalışması ile başlamıştır. İnan, ardışık silme analizlerini kullanarak, *AOX1* geninin 1120 bç'lik 5' üst bölgesini 6 parçaya bölmüş ve A, B, C, D, E ve F olarak adlandırmıştır. Haberci olarak *Escherichia coli lacZ* genini kullanarak yaptığı silme analizi deneylerinde her bir parçanın promotor aktivitesine önemli etkileri olduğunu göstermiştir. Metanolde ve metanol+etanolde gelişen hücre özütleri ile yapılan jel geciktirme (EMSA) çalışmaları A (-960/-688) ve C (-539/-399) parçalarına DNA bağlanma proteinlerinin bağlandığını göstermiştir. Bu iki parçanın aynı protein için rekabet etmediği ve bağlanan proteinlerin ayrı proteinler olduğu da ispatlanmıştır (Şekil 2.6). Ayrıca E parçasının, düşürüldüğünde promotor aktivitesinin %80'i kaybedildiğinden, olası bir pozitif regülatör bölgesi (UAS) içerdiği, D parçasının ise düşürülmesi ile promotor aktivitesinde %30 artış gözlemlendiğinden negatif regülatör bölgesi (URS) taşıdığı öne sürülmüştür (İnan 2000).

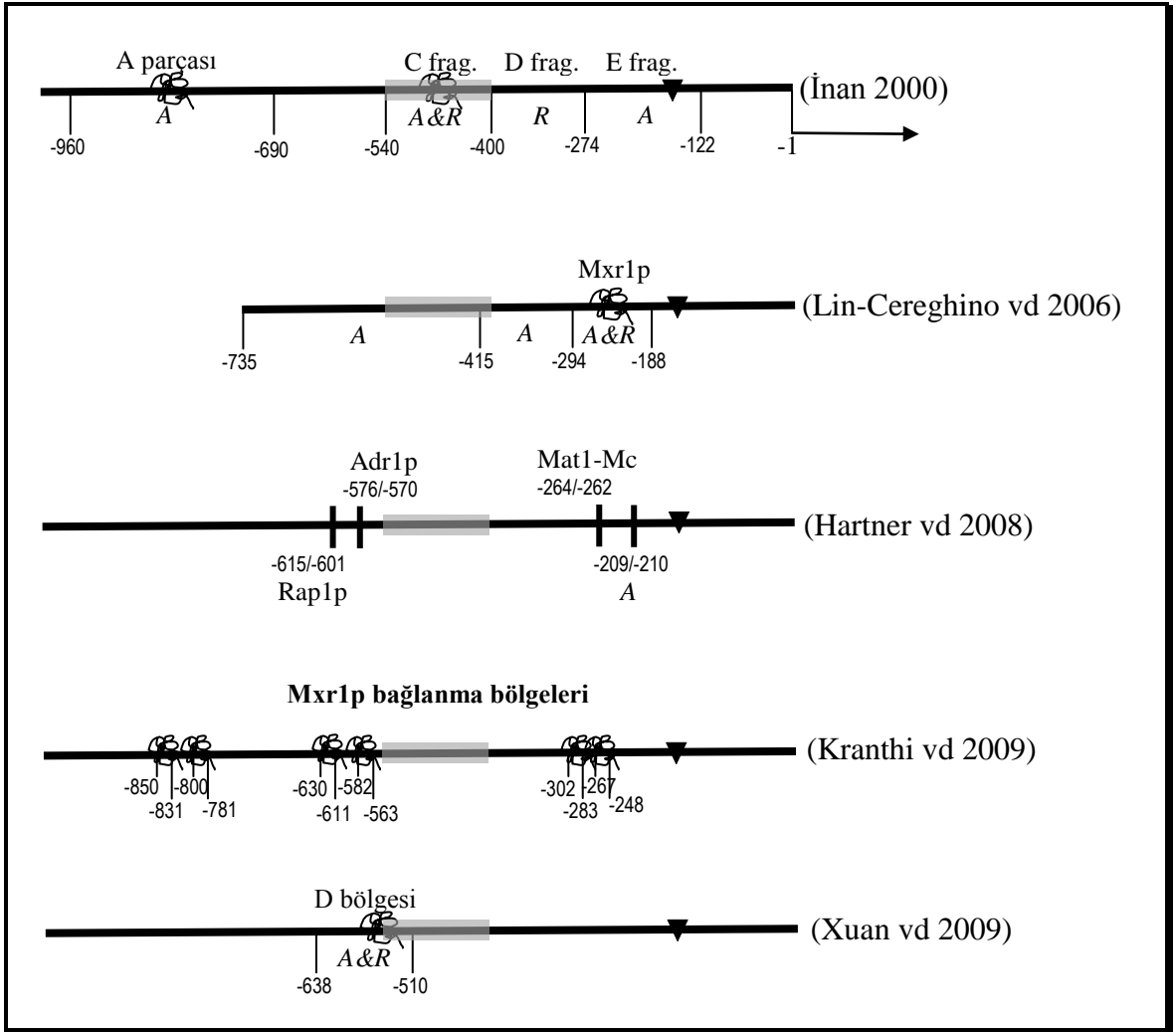


Şekil 2.6. *AOX1* promotoru A ve C parçalarının EMSA jel görüntüleri.

- (A) A parçasının EMSA deneyi. (1) Etiketlenmiş A parçası probu, (2-5) MM'de gelişen hücrelerden toplam protein eklenmiş; (6) MME'de gelişen hücrelerden toplam protein eklenmiş, (3) 30 kat fazla etiketsiz A parçası eklenmiş, (4) 30 kat fazla C parçası eklenmiş, (5) 30 kat fazla *L. monocytogenesis* DNA'sı eklenmiş.
- (B) C parçasının EMSA deneyi. (1) C parçası probu; (2-5) MM'de gelişen hücrelerden 6 µg toplam protein eklenmiş; (7-9) MME'de gelişen hücrelerden toplam protein eklenmiş, (3 ve 7) 30 kat fazla spesifik rekabetçi (C parçası) eklenmiş, (4 ve 6) 30 kat fazla spesifik olmayan rekabetçi (A parçası) eklenmiş, (5 ve 9) 30 kat fazla spesifik olmayan *L. monocytogenes* DNA'sı eklenmiş (İnan 2000).

Şekil 2.6'de görüldüğü üzere, A parçasına yalnızca metanolde gelişen hücre özütünden protein bağlanırken; C parçası, hem metanolde gelişen, hem de metanol/etanol karışımında gelişen hücre özütleri ile kompleks oluşturmuştur. Bu verilerden yola çıkarak A parçasına bağlanan proteininin aktivatör, C parçasına bağlanan proteinin ise hem metanol hem de etanolde gelişen hücrelerde bulunmasından dolayı, yapısal bir regülatör protein olduğu sonucu çıkarılabilir. C parçasının düşürülmesi sonucunda, haberci enzim aktivitesinde %10 artış gözlenmesi ve metanolde gelişirken bağlanan protein miktarının, metanol/etanolde geliştiğinde bağlanan protein miktarından daha fazla olmasından yola çıkarak C parçasına bağlanan proteinin etanol represyonunda rol aldığı yorumu yapılmıştır (İnan 2000).

PpAOX1 promotorunda şimdiye kadar tespit edilen cis-etkili parçalar ve trans-etkili faktörler Şekil 2.7'de özetlendiği gibidir.



Şekil 2.7. *P. pastoris* AOX1 promotorunda DNA bağlanma proteinlerinin bağlandığı ve regülasyon mekanizmasında rol aldığı tespit edilen bölgeler. AOX1 geninin ATG başlangıç kodunu -1 kabul edilerek numaralandırılmıştır. ▼ :TATA kutusu (-161/-154), ☞ : Protein, A: Aktivasyonda rol aldığı tespit edilen bölge, R: Represyonda rol aldığı tespit edilen bölge. Bu çalışmada *PpMig1*'in bağlanıp bağlanmadığına bakılan bölge her bir promotor çizgisinin üzerinde gri bölge şeklinde gösterilmiştir.

Hartner vd (2008), AOX1 promotorunu *in silico* analizini yaparak olası transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerini tespit etmişler ve bu bölgelerde yaptıkları silme ve mutasyon deneyleri sonucunda promotor aktivitesinin >%50 azalmasına neden olan bölgeleri belirlemişlerdir (Şekil 2.7). Bunlar arasında en çarpıcı olan değişiklik, -209/-210 pozisyonundaki nükleotitleri sildikleri (ya da mutasyona uğrattıkları) zaman promotor aktivitesinin, yabancı promotor aktitesine göre %6-30

seviyelerine düşmesidir. Bu bölgelerde yapılan değişikliklerle aktiviteleri yabancı promotora göre %6-%160 arasında değişen promotor kütüphanesi oluşturmuşlardır. Kütüphaneyi represyon, derepresyon ve indüksiyon koşullarında karakterize etmişler ve farklı cis-etkili bölgelerin varlığını *in silico* gözlemlemişlerdir. Fakat bu cis-etkili bölgelere bağlanan trans-etkili proteinler deneysel olarak tespit edilmemiştir. *AOX1* regülasyonunun moleküler temelini tam olarak karakterize edilebilmesi için, mekanizmada rol aldığı düşünülen unsurların biyolojik fonksiyonlarının anlaşılması, bunun için de yeni çalışmalar yapılması gerektiğini belirtmişlerdir (Hartner vd 2008).

Xuan vd. (2009) *AOX1* promotorunun cis-etkili bölgelerini tanımlamak için yaptıkları çalışmada *AOX1* promotorunu belirli bölgelere ayırmışlar ve her bir bölgeyi silerek yaptıkları analizde D bölgesinin (-638/-510) silinmesi ile promotorun transkripsiyon aktivitesini önemli ölçüde kaybettiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca indüksiyon (metanol) ve represyon (glukoz+metanol) koşullarında gelişen hücre özütlerinin D bölgesi ile protein-DNA kompleksi oluşturduğunu gözlemlemişlerdir. D bölgesinin, transkripsiyon düzenleyici proteinlerin bağlanma sekanslarını içerdiği ve hem aktivasyon hem de represyonda rol aldığı sonucuna ulaşmışlardır (Xuan vd 2009). Bu bulgu İnan'ın (2000) aynı bölgelere karşılık gelen C parçası ile elde ettiği sonuç ile paralellik göstermektedir.

Bugüne kadar *AOX1* promotoruna bağlandığı tespit edilen iki farklı proteinden (İnan 2000) yalnızca bir tanesi karakterize edilebilmiştir. Metanol indüksiyon mekanizmasında rol oynadığı tespit edilen bu protein, metanol ekspresyon regülatörü (*Mxr1p*) olarak adlandırılmıştır. *AOX1* promotorunda belli bölgeler silinerek gerçekleştirilen çalışmada silinen her bölgenin metanol indüksiyonunda rol aldığı ve *Mxr1*'in bağlandığının tespit edildiği -415 ve -172 arasındaki 243 bç'lik bölgesinde ise hem aktivasyon hem de represyon bölgelerinin yer aldığı gösterilmiştir (Lin-Cereghino vd 2006).

Kranthi vd (2009, 2010) *Mxr1* proteininin, *AOX1* promotoru ile birlikte metanol metabolizmasında rol alan diğer genlerden, dihidroksiaseton sentaz (*DHAS*) ve peroksin8 (*PEX8*) promotorlarına bağlanma özelliğini çalışmışlar ve *Mxr1p*'nin

metanol tarafından tetiklenen bu promotorlara 5'-CYCCNY-3' ortak motifinden birden fazla yere bağlandığını göstermişlerdir (Kranthi vd 2009) (Şekil 2.7).

MXR1 geninin silinmesi/inaktivasyonu ile oluşturulan Δ *mrx1* suşlarda metanol metabolizmasındaki genlerin ve diğer peroksizomal genlerin transkripsiyonlarının tamamen durduğu ya da önemli oranda düşüş yaşandığı gösterilmiştir. Bu durum, Δ *mrx1* suşlarda, tek karbon kaynağı olarak metanol ya da oleat bulunan ortamlarda gelişememe, glukoz, gliserol ve etanolde ise gelişim hızlarının düşmesi gibi fenotipik etkilerle sonuçlanmıştır. Ayrıca Δ *mrx1* suşlarda AOX1 promotörü altında protein ekspresyonu gerçekleştirilemediği β -laktamase'in haberci enzim olarak kullanıldığı Western blot analizleri ile gösterilmiştir (Lin-Cereghino vd 2006). Mxr1'in N-ucunda yer alan DNA-bağlanma bölgesi çinko-parmak motifinin, *S. cerevisiae*'daki Adr1p'nin (alkol dehidrogenaz II regülatörü, fermente edilemeyen karbon kaynaklarının metabolizmalarında rol alan ve glukoz tarafından baskılanan genlerin ekspresyonunu regüle eden transkripsiyon faktörü) DNA-bağlanma bölgesi ile homoloji gösterdiği tespit edilmiştir (Lin-Cereghino vd 2006). Yalnızca glukozun varlığında ekspresyonu gerçekleşen Adr1p'nin tersine, Mxr1p çok düşük seviyelerde yapısal olarak üretilir. Regülasyonunun ise hücre içinde bulunduğu yerin değişmesi şeklinde post-translasyonel olarak gerçekleştiği düşünülmektedir: Mxr1p'nin hücreler glukozda gelişirken sitoplazmada bulunduğu, metanol ya da oleata geçirildiklerinde ise çekirdeğe geçiş yaptıkları gösterilmiştir. Bununla birlikte, Mxr1p hücreler gliserol ya da etanolde gelişirken de çekirdekte lokalize olmakta fakat AOX1 promotörünün bu karbon kaynakları tarafından baskılanması devam etmektedir. Bu nedenle MXR1 geninin regülasyonunun yalnızca Mxr1p'nin lokalizasyonu yolu ile yapılmadığı öne sürülmüştür (Lin-Cereghino vd 2006).

P. pastoris'te katabolit represyon mekanizmasını araştırmak için Zhang vd (2010) tarafından yapılan çalışmada, iki heksoz transporter homologunun tanımlanması ve karakterizasyonu yapılmış, *AOX1* geninin ekspresyon seviyesinin glukoz tarafından baskılanmadığı, aksine tetiklendiği heksokinaz mutant suşlar elde edilmiştir (Zhang vd 2010). Bu çalışma, *P. pastoris* katabolit represyon mekanizmasının aydınlatılması için atılmış olan ilk adımdır.

2.2.5.2. *H. polymorpha*

H. polymorpha *MOX* geni yaklaşık 1.5 kb büyüklüğünde bir promotor bölgesine sahiptir. Şimdiye kadar bu promotor bölgesinde 3 cis-etkili bölge tanımlanabilmiştir: iki aktivasyon sekansı (UAS1 ve UAS2) ve bir represyon sekansı (URS1). Bu sekanslara 3 farklı regülatör proteininin (*MOX* bağlanma faktörleri: MBF1, MBF2 ve MBF3) bağlandığı tespit edilmiş (Godecke vd 1994) fakat proteinlerin ayrıntılı analizi henüz yapılmamıştır.

H. polymorpha'da, katabolit represyon koşullarında (glukoz varlığında) *HpMOX* promotor sekansının nükleozom yapılarının içinde yer aldığı, böylelikle transkripsiyonun başlaması için gerekli olan faktörlerin promotora bağlanamadığı ve transkripsiyonu başlatamadıkları bildirilmiştir. Önerilen modele göre, derepresyon ve indüksiyon koşullarında (örn. gliserol veya metanolün varlığında) *MOX* sentezi başlamadan hemen önce kromatin yeniden şekillenir ve genler transkripsiyon faktörlerinin ulaşabileceği şekilde açığa çıkarlar. Özimek vd (2004) kromatinin yeniden şekillenmesinde rol aldığı bilinen *S. cerevisiae* SWI/SNF kompleksinin homologlarını *H. polymorpha*'da izole edip inaktive etmişlerdir. *H. polymorpha* $\Delta snf2$ ve $\Delta swi1$ suşları metanolde artık gelişemezken, glukoz ve sukrozdaki gelişim oranlarında da düşüş yaşamışlardır. Bu mutant suşlarda *MOX* promotörü altında gerçekleştirilen haberci enzim β -laktamazın ekspresyonunda da büyük oranda düşüş gerçekleşmiştir ($\Delta snf2$ suşunda 200 kattan fazla, $\Delta swi1$ suşunda ise 50 kattan fazla azalış). SWI/SNF kompleksinin olmadığı koşullarda *MOX* geninin ifadesinde yaşanan dramatik düşüşün metanolde gelişmemesinin nedeni olabileceği düşünülmüştür (Özimek vd 2004). Tüm bu verilerle, SWI/SNF kompleksinin *MOX* geninin derepresyonunda kromatin yapısının yeniden şekillenmesini sağlayarak rol oynadığına ilişkin sağlam kanıtlar elde edilmiştir.

S. cerevisiae'de *ADH2* geninde derepresyon sırasında kromatin yeniden şekillenir. Bu değişikliğin transkripsiyon faktörlerinin genin TATA kutusuna erişimlerini sağladığı ve transkripsiyonu başlattıkları düşünülmektedir. Adr1p'nin kromatinin kararlılığının bozulmasını sağlayarak yeniden şekillenmesinde rol aldığı düşünülmektedir (Mauro vd 2000).

H. polymorpha'da *MOX* katabolit represyonunun regülasyon mekanizmasında rol alan bileşenleri tespit etmeye yönelik çalışmalarda bir heksoz transporter, bir hekzokinaz ve bir glukokinaz tanımlanmıştır. Bu genler inaktive edilerek yapılan çalışmalarda hücrelerde represyon koşulları altında (glukoz içeren kültürlerde) AOX proteininin üretildiği gösterilmiştir. Heksoz fosforilasyon aktivitesinin *H. polymorpha* represyon sinyalizasyonu için gerekli olduğunun gösterildiği çalışmada, hekzokinaz mutant suşlar fruktoz represyonuna tepki göstermezken, hekzokinaz ve glukokinaz çift mutant suşta glukoz represyonu ortadan kalkmıştır (Kramarenko vd 2000). Bu proteinlerin karakterizasyonları ayrıca yapılmıştır (Laht vd 2002, Karp vd 2003).

Stasyk vd (2007) *H. polymorpha*'da Mig1'in iki homologunu (*HpMig1* ve *HpMig2*) karakterize etmişlerdir. AOX protein sentezi $\Delta mig1$ ve $\Delta mig1\Delta mig2$ suşlarında çalışılmış ve sonuçlar, Mig1 ve Mig2 proteinlerinin AOX geninin glukoz tarafından baskılanmasını kısmen etkilediği şeklinde yorumlanmıştır. Glukoz ya da glukoz+metanol besiyerinde geliştirilen *Hp\Delta mig1* suşlarında AOX proteininin varlığı Western blot analizi ile gösterilmiştir (Stasyk vd 2007). Başka çalışmalarda da glukozun varlığında AOX üreten diğer *H. polymorpha* mutantlar rapor edilmiş fakat ilgili genlerin tanımlaması henüz yapılmamıştır (Ozimek vd 2005).

S. cerevisiae'da glukoz represyonunun iki ana oyuncusu olan Snf1 ve Tup1 proteinlerini kodlayan genlerin *H. polymorpha*'daki homologları izole edilip inaktive edilmiştir (Gancedo 1998). Bu proteinlerin hücrede ifade edilmemesi *S. cerevisiae*'nin gelişiminde önemli değişikliklere neden olduğu halde, karbon kaynağı olarak glukoz ve metanolde geliştirildiklerinde *H. polymorpha*'da belirgin bir fenotipik etki gözlenmemiştir. Bununla birlikte $\Delta tup1$ suşun aksine, $\Delta snf1$ suşunda metanol tetiklemeli koşullar altında *MOX* ve *DAS* genlerinin transkripsiyonlarının düştüğü tespit edilmiştir. İlginç olan bu iki genin mRNA seviyeleri belirgin oranlarda düştüğü halde $\Delta snf1$ suşun gelişiminin yabancıl suştan ayırt edilememesi olmuştur. Bu durumdan *MOX* ve *DAS* transkripsiyonlarındaki düşüşün gelişimde herhangi bir olumsuz etkiye, yavaşlamaya neden olmadığı sonucu çıkarılmıştır (Hartner ve Glieder 2006).

2.2.5.3 *C. boidinii*

C. boidinii'de metanol ile indüklenen genlerin ekspresyonunda rol alan iki pozitif transkripsiyonal regülatör karakterize edilmiştir: (1) Trm1, metanole özgü gen aktivasyonundaki anahtar regülatör; (2) Trm2, derepresyondan sorumlu regülatör. Genlerin tek tek ve birlikte nakavt edilmeleri ile oluşturulan *C. boidinii* suşları ile yapılan analizler sonucunda bu iki proteinin metanol tarafından tetiklenen gen ekspresyonunu ne şekilde düzenlediği konusunda bazı sonuçlara ulaşılmıştır. Ortamda glukoz tükendiğinde ya da metanol besiyerine aktarıldıklarında Trm2'nin (*S. cerevisiae* Atr1 homologu) glukoz represyonunu ortadan kaldırdığı ve akabinde Trm1'in geni aktive ettiği tespit edilmiştir (Sasano vd 2008, 2010).

Glukoz represyonunda rol alan regülatörlerin tespit edilmesine yönelik devam eden çalışmalarında aynı çalışma grubu, *C. boidinii*'de Mig1 proteinini kodlayan genin tanımlanması ve moleküler karakterizasyonunu yapmış, $\Delta mig1$ suşunda metanol tarafından tetiklenen *AOD1* geninin ekspresyonunu transkripsiyon seviyesinde analiz etmişlerdir (Zhai vd 2012). *Cbmig1* Δ suşunda, glukozun varlığında *AOD1* promotor aktivitesi tespit edilememiştir. Yalnızca bu sonuçtan yola çıkılarak *CbMig1* proteininin glukoz represyonunda elzem bir rolü olmadığı düşünülebilir. Fakat, metanol-tetiklemeli genler transkripsiyonları için aktivatör proteinlere (Trm1 ve Trm2 gibi) gereksinim duyarlar (Sasano vd 2008, 2010). Ortamda glukoz bulunduğu sürece metanol-tetiklemeli genlerin transkripsiyonları için gerekli olan aktivatörler fonksiyonlarını yerine getiremezler. Glukozda gelişen hücrelerde Trm1 ve Trm2 proteinlerinin metanol-tetiklemeli promotorlara bağlanmadıkları, Trm2'nin glukozda gelişen hücrelerde çekirdekte değil sitoplazmada konumlandığı gösterilmiştir. Ortamda glukozun bitmesi ya da hücrelerin metanole geçirilmesi ile birlikte *AOD1* promotorunun *Cb* $\Delta mig1$ suşunda yabanıl suşa göre çok daha hızlı bir şekilde aktive olması, *CbMig1*'in metanol indüksiyonunun ilk aşamalarında negatif regülatör olarak etki gösterdiği ve böylelikle *CbMig1*'in yokluğunda transkripsiyonel aktivatörlerin metanol-tetiklemeli genlerin DNA bağlanma bölgelerine daha hızlı bir şekilde ulaştıkları şeklinde yorumlanmıştır (Zhai vd 2012). Aynı çalışmada *HpMIG2* genine homoloji gösteren gen tespit edilmiş, olası *CbMIG2* geni nakavt edilerek yapılan çalışmalar sonucunda farklı karbon

kaynaklarında ne gelişimde ne de *AOD1* promotor aktivitesinde herhangi bir etki tespit edilememiştir. *CbMig2p*'nin fonksiyonunun aydınlatılabilmesi için başka çalışmalar yapılması gerektiği ileri sürülmüştür.

S. cerevisiae'de yüksek glukoz konsantrasyonlarında *ScMig1* çekirdekte bulunur ve glukozun olmadığı durumda *ScMsn5* taşıyıcı proteini, fosforlanmış *Mig1* proteini çekirdekten sitoplazmaya çıkarır (Klein vd 1998). *C. boidinii*'de de *Mig1* proteininin, hücreler glukozdan fermente-edilemeyen karbon kaynaklarına geçirildiklerinde (metanol, gliserol, etanol ve oleat) sitoplazmaya geçtiği, *CbΔmsn5* suşlarında ise çekirdekte kalmaya devam ettikleri gözlenmiştir. Bununla birlikte *CbMig1* çekirdekte olduğu halde *AOD1* geninin ekspresyonunun normal olarak gerçekleştiği tespit edilmiştir (Zhai vd 2012). Bu sonuçlar *CbMig1*'in fermente-edilemeyen karbon kaynaklarında gelişirken fosforlandığı, *S. cerevisiae*'de olduğu gibi fosforlanmış *CbMig1*'in, çekirdekte kalsa bile (*CbΔmsn5* suşlarında olduğu gibi) represör olarak faaliyet gösteremediği şeklinde açıklanmıştır. Metanol-tetiklemeli promotorlar altında heterolog protein üretimi gerçekleştirilirken, promotorun metanole hızlı cevap vermesi arzu edilen bir özelliktir. *CbAmig1* suşunda, hücreler glukoz ortamından metanol besiyerine geçirildiklerinde *AOD1* promotoru yabancı-suşa göre daha hızlı bir şekilde ekspresyona başladığından, bu suşun protein üretiminde kullanılmasının induksiyon süresini kısaltabileceği öne sürülmüştür (Zhai vd 2012).

2.2.6. Heterolog konukçu organizmalarda AOX promotorları

P. pastoris AOX1 ve *H. polymorpha MOX* promotorları *S. cerevisiae*'ye aktarılmış ve haberci enzim β -galaktosidaz ekspresyonuna bakılmıştır. Ayrıntılarda ortaya çıkan birkaç istisna dışında bu promotorların *S. cerevisiae*'deki regülasyon profilleri konukçu organizmaninkine benzer şekilde gerçekleşmiştir: glukoz gen ekspresyonu baskılanmış, karbon kaynağı tükendiğinde hafifçe derepresyon meydana gelmiş, *P. pastoris* promotorunda bile gliserol ekspresyonu tetiklemiştir (Hartner ve Glieder 2006).

Daha önceki bölümlerde belirtildiği gibi, *AOX1* ve *MOX* genlerinin regülasyon şekilleri birbirinden farklıdır: gliserolde derepresyon sonucu *MOX* geni ifade edilirken, *AOX1* geni baskılanmaya devam etmektedir. *AOX1* promotorunun *H. polymorpha* aktarılarak gerçekleştirilecek çalışmalarda bu promotorun heterolog konukçuda gliserol tarafından baskılanmadığı ortaya koyulmuştur (Rodriguez vd 1996, Raschke vd 1996). *H. polymorpha*'ya aktarılan heterolog *AOX1* promotoru, homolog *MOX* promotoru gibi regüle edilmektedir. *AOX1* promotorunun heterolog konukçularda çalışılması ile gliserol tarafından baskılanmasının organizmaya özgü bir özellik olduğu anlaşılmıştır (Hartner ve Glieder 2006).

2.3. Çalışmanın Temeli ve Kapsamı

P. pastoris'te, glukoz varlığında baskılanan *AOX1* geninin baskılanma mekanizmasında, *S. cerevisiae* ve diğer mayalarda çalışılan Mig1-aracılı yolun ne kadar geçerli olduğunun bir ön tespiti için yapılan *in silico* analizde elde edilen bilgiler aşağıdaki gibidir:

(1) *P. pastoris* GS115 suşunda *MIG1* (ve *MIG2*) genlerinin varlığı *in silico* gösterilmiştir (De Schutter vd., 2009) (Şekil 2.4).

(2) *AOX1* promotorunun analizi sonucu olası Mig1-bağlanma bölgesinin (G/C)(C/T)GG(G/A)G (Nehlin ve Ronne 1990) C parçasında (-539/-399) yer aldığı tespit edilmiştir (Şekil 2.5). Bu tespit ve İnan'ın (2000) doktora çalışmasında elde ettiği *AOX1* promotoruna 2 farklı proteinin bağlanıyor olduğu, bugüne kadar bu 2 proteinin yalnızca birinin karakterize edilmiş olması ve C parçasına bağlanan ve represyonda rol aldığı düşünülen bir proteinin varlığı, *PpMig1* proteininin *P. pastoris* katabolit represyon mekanizmasında görev aldığı ve *AOX1* promotoruna bağlanıyor olabileceği ihtimalini kuvvetlendirmiştir.

Bu çalışma kapsamında *PpMig1* proteininin, *P. pastoris* katabolit represyonunda oynadığı rol araştırılmıştır. Çalışma 3 aşamada gerçekleştirilmiştir:

- (1) İlk olarak *P. pastoris* *MIG1* geni izole edilmiş ve moleküler karakterizasyonu yapılmıştır.
- (2) *MIG1* ve homologu *MIG2* genleri tek tek ve birlikte inaktive edilerek tekli ve çiftli mutant suşlar elde edilmiş ve represyon, derepresyon ve indüksiyon koşullarında gelişim eğrileri çıkarılarak ve AOX enzim aktivitesi analizleri yapılarak mutant suşların fonksiyonel analizleri yapılmıştır.
- (3) Son olarak ise *PpMig1*'in *P. pastoris*'te aşırı üretimi gerçekleştirilerek saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış *Mig1* ve nakavat suş hücre özütlerinin *AOX1* promotörü C parçasına bağlanma özelliklerine bakılmıştır.

```

LOCUS       XM_002490613 1365 bp  mRNA  linear  PLN 22-JUL-2009
DEFINITION  Pichia pastoris GS115 Regulatory protein MIG1 (PAS_chr1-4_0526)
ACCESSION  XM_002490613
SOURCE      Pichia pastoris GS115
ORIGIN
1 atgactactg ctcccccaac gaagcccaat gataggccct accagtgcc  catgtgcgac
61 aaggccttcc accggttga acatcaaaca agacacatta gaacacacac aggggaaaaa
121 cctcaccctt gcacgttccc tggatgcccc aagaagtttt ccagggtctga tgaattgacc
181 agacacttga ggatacacac aaacccaact gtgagaaaag gcagaaagaa gaagcgggaag
241 gacgaagaac aagctgtgga gttgccacct cagaataacg aggtacatct cgttcccatg
301 ggaacgatac aaatgggaca accaatatac acgcaggcgg ttccctgttta ttgggttcca
361 tctggtgctg caaacggcga acaaggccag tatttgatgc ctccgctttt ttccttaaca
421 ccaagacagg tgatggcagg gacttctcaa accagtttga atgggtgtaga tgctcaaaaa
481 cagcagcagc agcagcagca gcagcaaaaa caacaacaac aacaacaaca acaaccacag
541 caacaaccac agcaacaacc gccactgcaa ccacaaccac ttcaaccaca accacaggcc
601 cagcaacaat ttggatttgc tcaagatcaa agaaacctgg caccngctaa tcagcaacag
661 cacagattct cccaccatt ttctgcatct tcaaggacct attcagccaa ttcatgtttt
721 tctctcaact caaatggatc cacgccttca ggtcatatc aacagttgaa ctctttatct
781 cttttacaca gaatcactcc aatcaggact ccaagcagta atagcctggt gacaaaaatc
841 aataaccagt cgatgacatc aatagtcacg ttgagcgacc aacaacagga ttttgtttcc
901 agaaaaaagt caagacccaa ctcaccaaca gttccaaact ctccaacaat ttcaaacttg
961 gtctgccccg ctgatacgcc tttaactact ccggtgcaat cgctacact gaagcccgca
1021 atgcccagca acgtacaact tccaccaata agatcactgt taaatttggga agaacttccc
1081 tcggaacatc tgcagcaacc agccaatgct tctactgaca ataaagtgaa gacaatgttg
1141 aacaaatctt cgtccaacgt cactttgagt aaatcgtttt cttcacaaga cattcgtctg
1201 gggaccaaga gaaagtctga taccaacctc tctgcattag attctaccaa tgctattcgc
1261 aagcctgccc tatcaccggt ggctcctctg tcagtctcat cagatcgatt taccaagaga
1321 aagaacaact tcacgatagg caatatcatg aactcggact cttga

```

Şekil 2.8. *P. pastoris* *MIG1* geni nükleotid dizisi (NCBI GenBank, www.ncbi.nlm.nih.gov)

```

SEQ AOX1pgenome: 940 bp;
Composition 271 A; 229 C; 171 G; 269 T; 0 OTHER
Percentage: 28.8% A; 24.4% C; 18.2% G; 28.6% T; 0.0%OTHER
Molecular Weight (kDa): ssDNA: 289.04 dsDNA: 579.44
ORIGIN
1      AGATCTAACA TCCAAAGACG AAAGGTTGAA TGAAACCTTT TTGCCATCCG ACATCCACAG
61     GTCCATTCTC ACACATAAGT GCCAAACGCA ACAGGAGGGG ATACACTAGC AGCAGACCGT
121    TGCAAACGCA GGACCTCCAC TCCTCTTCTC CTCAACACCC ACTTTTGCCA TCGAAAAACC
181    AGCCAGTTA TTGGGCTTGA TTGGAGCTCG CTCATTCCAA TTCCTTCTAT TAGGCTACTA
241    ACACCATGAC TTTATTAGCC TGTCTATCCT GGCCCCCTG GCGAGGTTCA TGTTTGTTTA
301    TTTCCGAATG CAACAAGCTC CGCATTACAC CCGAACATCA CTCCAGATGA GGGCTTTCTG
361    AGTGTGGGGT CAAATAGTTT CATGTTCCCC AAATGGCCCA AAATGACAG TTAAACGCT
421    GTCTTGGAAC CTAATATGAC AAAAGCGTGA TCTCATCCAA GATGAACTAA GTTTGTTTCG
481    TTGAAATGCT AACGGCCAGT TGGTCAAAAA GAACTTCCA AAAGTCGGCA TACCGTTTGT
541    CTTGTTTGGT ATTGATTGAC GAATGCTCAA AAATAATCTC ATTAATGCTT AGCGCAGTCT
601    CTCTATCGCT TCTGAACCCC GGTGCACCTG TGCCGAAACG CAAATGGGGA AACACCCGCT
661    TTTTGGATGA TTATGCATTG TCTCCACATT GTATGCTTCC AAGATTCTGG TGGGAATACT
721    GCTGATAGCC TAACGTTTCA TATCAAAATT TAACTGTTCT AACCCCTACT TGACAGCAAT
781    ATATAAACAG AAGGAAGCTG CCCTGTCTTA AACCTTTTTT TTTATCATCA TTATTAGCTT
841    ACTTTCATAA TTGCGACTGG TTCCAATTGA CAAGCTTTTG ATTTAACGA CTTTAAACGA
901    CAACTTGAGA AGATCAAAAA ACAACTAATT ATTCGAAACG

```

Şekil 2.9. *P. pastoris* AOX1 promotörü gen dizisi (İnan 2000). C parçası gri arkaplanla, Mig1 proteininin olası bağlanma yeri altı çizili ve koyu olarak belirtilmiştir.

3. MATERYAL VE METOD

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 (Tuttnauer, Hollanda) 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* ve *E. coli* suşları 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

<i>P. pastoris</i> suşları	Genotipi	Kullanım yeri	Kaynak
X-33	yabani suş	Kontrol ve konukçu	Invitrogen, CA, ABD
MK115	<i>his4 adh3::HIS4</i>	Protein ekspresyonu için konukçu	Başka bir çalışma
X33	(pGAPZMIG2)	Mig2 proteininin ekspresyonu	Başka bir çalışma
MK115	(pGAPZMIG1)	Mig1 proteininin ekspresyonu	Bu çalışma
MK201	<i>ade1 his4::HIS4</i>	Mutant suş yapımı	Başka bir çalışma
MK111	<i>his4 ade1::ADE1</i>	Mutant suş yapımı	Başka bir çalışma
JC304	<i>his4 ade1</i>	Mutant suş yapımı	(Lin-Cereghino 2007)
JC304 Δ <i>mig2</i>	<i>ade1 mig2::HIS4</i>	Mutant suş yapımı	Başka bir çalışma
MK111 Δ <i>mig2</i>	<i>mig2::HIS4</i>	Fonksiyonel analiz	Başka bir çalışma
MK201 Δ <i>mig1</i>	<i>mig1::ADE1</i>	Fonksiyonel analiz	Bu çalışma
JC304 Δ <i>mig1</i> Δ <i>mig2</i>	<i>mig1::ADE1</i> <i>mig2::HIS4</i>	Fonksiyonel analiz	Bu çalışma
<i>E. coli</i> suşları			
XL1-Blue	<i>recA1 endA1</i> <i>gyrA96 thi-1</i> <i>hsdR17 supE44</i> <i>relA1 lac [F'</i> <i>proAB</i> <i>lacIqZ ΔM15</i> <i>Tn10 (Tetr)]</i>	Plazmidlerin çoğaltılması ve saklanması	Stratagene, CA, ABD

3.1.5. Besiyerleri, gelişim ortamları ve antibiyotikler

P. pastoris suşlarının genel gelişiminde YPD (%1 maya özütü, %2 pepton, %2 glukoz); *P. pastoris MIG1* mutant suşun seleksiyonunda MD (%1,34 YNB, 4×10^{-5} biotin, %2 glukoz) ve MDH (MD, 2×10^{-3} histidin) besiyerleri; *P. pastoris* üretim suşlarında gerçekleştirilen Mig1 proteininin aşırı üretiminde BYED (%3 maya özütü, %2 glukoz, 100 mM potassium fosfat, %1.34 YNB, 4×10^{-5} biotin) besiyeri; *P. pastoris MIG1* ve *MIG2* tekli ve çiftli mutant suşların fonksiyonel analizinde ise MM (%1.34 YNB, 4×10^{-5} biotin, %0.5 metanol), MMD (%1.34 YNB, 4×10^{-5} biotin, %2 glukoz, %1 metanol) ve MMG (%1.34 YNB, 4×10^{-5} biotin, %2 gliserol, %1 metanol) besiyerleri kullanılmıştır. *E. coli* suşların geliştirilmesinde LB Miller (%0.5 maya özütü, %1 pepton ve %1 NaCl) ya da LB Lennox (%0.5 maya özütü, %1 pepton ve %0.5 NaCl) besiyerleri kullanılmıştır.

Kullanılan sıvı ve katı besiyerlerine kullanılan plazmidin üzerindeki direnç genine göre uygun antibiyotik ilaveleri yapılmıştır. Zeosin (InvivoGen, CA, ABD) ve ampisilin (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 ampisilin, *P. pastoris* suşları için ise 100 µg/ml zeosin olacak şekilde ilaveler yapılmıştır.

3.1.6. Primerler

MIG1 geninin izolasyonunda ve dizilemesinde, *AOX1* geninin C parçasının elde edilmesinde kullanılan primerler Ek 8.1'de verilmiştir. Primerler, NCBI GenBank XM_002490613 erişim numaralı *P. pastoris* GS115 *MIG1* dizisi baz alınarak DNAMAN 7.0 (Lynnon Corporation) programı ile tasarlanmıştır.

3.2. Metod

Çalışmada kullanılan moleküler teknikler, Sambrook ve Russel (2001)'a ve kit protokollerine göre gerçekleştirilmiştir. Gen ve protein taramalarında Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi Ağ Servisi (Bethesda, MD, ABD; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) kullanılmıştır.

3.2.1. Mayadan genomik DNA izolasyonu

P. pastoris suşlarından genomik DNA izolasyonu için MasterPure Yeast DNA Purification Kit (Epicentre Biotechnologies, WI, ABD) kullanılmıştır. İşlemler üretici talimatlarına göre gerçekleştirilmiştir. YPD plakada geliştirilen tek kolonilerden YPD sıvı besiyerine ekim yapılmış ve 30°C çalkalamalı inkübatörde geceboyu gelişmeye bırakılmıştır. 2 ml santrifüj tüpüne alınan gelişmiş kültürden hücreler masaüstü Santrifüj 2418 (Eppendorf, Almanya) ile 5 dak 5000xg'de santrifüjlenerek çöktürülmüş, 300 µl hücre kırma çözeltisi içerisinde resüspanse edilerek buz üzerinde 5 dakika bekletilmiştir. 150 µl protein çöktürme çözeltisi eklenerek 10 s karıştırılmış ve 10 dakika 18000xg'de santrifüjlenerek bütün protein ve hücre kalıntıları çöktürülmüştür. Nükleik asitleri içeren süpernatant 1.5 ml'lik yeni santrifüj tüpüne alınmış ve 500 µl izopropanol eklenmiş ve 5-10 kez tersyüz edilerek karıştırılmıştır. 15000xg'de +4°C'de 10 dakika Allegra 25R (Beckman Coulter, CA, ABD) soğutmalı santrifüj ile santrifüjlenerek nükleik asitler çöktürülmüş ve elde edilen DNA peleti %70 etanol ile yıkanmıştır. Son yıkama ve çöktürmeyi takiben Concentrator Plus (Eppendorf, Almanya) cihazında vakum altında kurutulan DNA peleti 30 µl TE tamponu içinde çözülmüş, 0.5 µl RNase (10 µg/µl) enzimi ilavesi ile 37°C'de 1 saat inkübe edilerek içerdiği RNA'ların parçalanması sağlanmıştır. Elde edilen genomik DNA +4°C'de saklanmıştır.

3.2.2. 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 nötralize 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.

3.2.3. 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 jele, 60°C'ye kadar soğutulduktan sonra 2 µl etidyum bromür çözeltisi (10 mg/ml, Invitrogen, CA, ABD) eklenmiştir. Henüz katılaşımdan jel kasetine dökülen ve tarakları yerleştirilen jel katılaştıktan sonra 6X yükleme boyası ile karıştırılan örnekler kuyucuklara yüklenmiş, 1X TAE tamponu içerisinde 120 V akımda 60 dakika yürütülmüştür. Jelde boyutlarına göre farklı hızda ilerleyen DNA parçaları böylelikle birbirlerinden ayrılmış ve DNA'ya bağlanan etidyum bromürün UV ışınları altında ışımaya 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 (Bkz. Ek 8.2). 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.

3.2.4. 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 çözümlenme sıcaklıklarına (T_m °C) göre uyarlama yapılarak uygulanan standart protokol aşağıdaki gibidir.

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

<u>Miktar</u>	<u>Malzeme</u>	<u>Son konsantrasyon</u>
30 µl	Steril ultra saf su	
5 µl	10X KOD Buffer	1x
5 µl	dNTP karışımı (10 mM)	0.2 mM herbiri
4 µl	MgSO ₄ (25 mM)	2.0 mM
3 µl	5' İleri primer (10 µM)	0.3 µM
3 µl	3' Geri primer (10 µM)	0.3 µM
1 µl	KOD DNA Polimeraz (1 U/µl)	0.02 U/µl
1 µl	Kalıp (genomik DNA/plazmid)	10 ng genomik DNA/1 ng plazmid
50 µl	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	T_m -5°C'de	30 s
Uzama	70°C'de	20 s/1 kb

Program 35 döngü boyunca tekrarlanmış ve 72°C'de 10 dk süren son uzama basamağı ile bitirilmiştir. Reaksiyonun kontrolü, karışımın 5 µl'sinin 1 µl 6X jel yükleme boyası ile karıştırılarak 0.5 µg/ml etidyum bromür içeren %1 agaroz jelde yürütülmesi ve UV jel görüntüleme kutusunda hedef parçanın görüntülenmesi ile yapılmıştır

3.2.5. 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 değiştirilmesi 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, 1 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.

3.2.6. 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 çözdürülmesi 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.

3.2.7. 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.

3.2.8. 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.

3.2.9. *E. coli* ve *P. pastoris* hücrelerinin yetenekli hale getirilmesi

E. coli hücreleri CaCl₂ yöntemi ile yetenekli hale getirilmiştir. LB Miller plakada tek koloni düşecek şekilde geliştirilen *E. coli* suşunun 3 ml LB Miller sıvı besiyerine tek koloniden ekimi yapılarak geceboyu 37°C 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 100 µl'lik sıvı bölüntüler halinde -80°C'ye kaldırılmıştır.

P. pastoris hücreleri Lityum Asetat Yöntemine (Wu ve Letchworth 2004) göre yetenekli hale getirilmişlerdir. Yetenekli yapılmak istenen *P. pastoris* suşu, donmuş kültürden ya da +4°C'de saklanan agar plakasındaki tek kolonilerden test tüpü içerisinde 2 ml YPD besiyerine ekilmiş, 250 d/dak 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 1.3-1.5 olana kadar 250 d/dak 30 °C çalkalamalı inkübatörde

geliştirilen hücreler, +4°C'de 3000 g hızında 5 dakika süre ile santrifüjlenerak 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 süspansiyon edilmiş ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. 4°C'de 3000xg hızında 5 dakika santrifüjlenerak tekrar hasat edilen hücreler 1.5 ml buz soğukluğundaki 1 M sorbitol içinde süspansiyon edilmiş ve 2 ml hacimli santrifüj tüpüne aktarılmıştır. 4°C'de 3000xg devirde 5 dakika santrifüjlenerak hasat edilen hücreler 3 kez 1.5 ml soğuk 1 M sorbitol ile yıkanmış, daha sonra son konsantrasyon 10^{10} hücre/ml olacak şekilde buz soğukluğundaki maya resüspanسیون tamponu (1 M sorbitol, %20 gliserol) içinde süspansiyon edilmiş, 80 µl'lik sıvı bölüntüler halinde -80°C'de saklanmıştır.

3.2.10. DNA parçalarının plazmide ligasyonu

Küt ve yapışkan uçlu DNA parçalarının vektörlere ligasyon işlemleri Rapid DNA DephosandLigation Kit (Roche, Almanya) kiti kullanılarak, üretici talimatlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Ligasyon reaksiyonunda 1:3 vektör:insert oranı (molar:molar) kullanılmıştır. Küt uçlu insertün ligasyonu öncesinde vektöre defosforilasyon işlemi uygulanmıştır.

Defosforilasyon işlemi için toplam 20 µl içerisinde 1 µg'a kadar vektör, 1X alkalın fosfataz tamponu varlığında 1 U alkalın fosfataz ile karıştırılarak 37°C'de 10 dakika inkübasyona bırakılmış, takiben 75°C'de 2 dakika süre ile tutularak fosfataz inaktivasyonu gerçekleştirilmiştir. Karışımın bir kısmı ile ligasyon işlemine devam edilirken, kalan kısmı -20°C'de saklanmıştır.

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) 5 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.

3.2.11. Yetenekli *E. coli* ve *P. pastoris* hücrelerine transformasyon

Buz üzerinde çözdürülen 100 µl yetenekli *E. coli* (XL1-Blue) hücrelerine 2 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. İnkübasyon sonrası plakalarda oluşan kolonilerin kontrolü koloni PZR ya da plazmid izolasyonu/restriksiyon analizi yöntemleri ile yapılmıştır.

Yetenekli *P. pastoris* hücrelerine gen transferleri elektroporasyon yöntemi ile yapılmıştır. Buz üzerinde bekletilerek çözdürülen 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. 30°C’de 1-2 saat inkübe edilen hücreler uygun antibiyotik ve besiyeri içeren plakalara 50, 100, 200 µl olacak şekilde yayılmıştır. Plakalar, koloniler oluşana kadar 30°C inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası plakalarda oluşan kolonilerin kontrolü genomik DNA izolasyonu/PZR ve Southern blot analizleri aracılığı ile yapılmıştır.

3.2.12. Koloni PZR

Transformant *E. coli* hücrelerinin istenen plazmidi taşıyıp taşımadığının kontrolü ilk olarak koloni PZR ile yapılmıştır. Transformasyon sonucunda geceboyu 37°C inkübasyondan sonra plakada oluşan koloniler, 200 µl PZR tüpleri içinde 75 µl uygun antibiyotikli LB besiyerine ekilmiş ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildikten sonra PZR reaksiyon karışımında kalıp olarak kullanılmışlardır. Pozitif kontrol olarak aktarılan plazmidin kendisi, negatif kontrol olarak ise transformant olmayan *E. coli*

kolonisi kullanılmış, PZR reaksiyon sonucu %1 agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir. Aktarılan plazmidi taşıdığı doğrulanan kolonilerden 3 tanesi tekrar uygun antibiyotikli besiyerine ekimleri yapılmış ve 37°C çalkalamalı inkübatörde 18 saat inkübe edilerek plazmidlerin izolasyonları gerçekleştirilmiştir.

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. Southern blot analizi

P. pastoris mutant suşların kontrolü için yapılan Southern blot analizi İnan'a (2007) göre gerçekleştirilmiştir.

Southern blot analizinde prob olarak kullanılacak olan parça uygun primer çiftleri ve kalıp kullanılarak PZR ile çoğaltılmıştır. PZR sonucu agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiş ve parçaların PZR pürifikasyonları yapılmıştır. DNA parçalarının konsantrasyonları ölçüldükten sonra DIG High Prime DNA Labelling and Detection Starter Kit II (Roche, Almanya) ile kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirilen işlemlerle digoxigenin (DIG) ile etiketlemeleri yapılmıştır.

Analizi yapılacak olan *P. pastoris* suşları, tek koloniden 3 ml YPD besiyerine ekilerek geceboyu 30°C çalkalamalı inkübatörde geliştirilmiştir. Genomik DNA izolasyonları yapılarak 1 µg'ları 30 µl reaksiyon karışımı içinde uygun enzimler ile kesilmeye bırakılmıştır. 37°C'de geceboyu sürdürülen kesim işleminden sonra elde

edilen DNA parçaları 0.25 µg/ml etidyum bromür içeren %0.8 agaroz jelde 100 V akımda 2 saat boyunca yürütülerek ayrımlanmıştır. Jelde ayrımlanan DNA parçaları 45 dakika denatürasyon çözeltisi (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) içinde, 30 dakika nötralizasyon çözeltisi (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris·Cl (pH 7.2), 1 mM EDTA) içinde çalkalamalı tabla üzerinde yıkanmıştır. DNA standardı olarak GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD) ve DNA Molecular Weight Marker II DIG-labeled (Roche, Almanya) kullanılmıştır (Bkz. Ek 8.2).

Jel ile aynı boyutta kesilen pozitif yüklü membran (Roche, Almanya) saf su ile ıslatıldıktan sonra 10X SSC tamponu (3 M NaCl, 0.3 M sodyum sitrat, 1 mM EDTA) içinde bekletilmiştir. Yıkama işlemleri tamamlanan jel, emdirim düzeneğine alt tarafı yukarıya gelecek şekilde yerleştirilmiş, üzerine membran yerleştirilmiş ve filtre kağıdı ve kağıt havlularla düzenek tamamlamıştır. 1X SSC tamponu ile gerçekleştirilen emdirim işlemi ile DNA'ların jelden membrana aktarılması yaklaşık 4 saatte gerçekleştirilmiştir. Düzenekten alınan membran kısa süreliğine kağıt havlu üzerinde kurutulmuş ve UV çapraz bağlayıcı (CL-1000 UV Crosslinker, UVP, CA, ABD) içinde 3 kez 120 mJ UV ışığına maruz bırakılarak DNA'ların membrana sabitlenmesi sağlanmıştır.

Hibridizatör tüpüne alınan membranın hibridizasyon solüsyonu ile (DIG HighPrime DNA Labeling and Detection Starter Kit, Roche, Almanya) 41°C'de 30 dakika ön hibridizasyonu gerçekleştirildikten sonra DIG-etiketli prob eklenmiş hibridizasyon solüsyonu içinde 41°C'de geceboyu hibridizasyona bırakılmıştır. Ertesi gün yıkama solüsyonu I (2X SSC + %0.1 SDS) ve yıkama solüsyonu II (0.5X SSC + %0.1 SDS) ile yıkamaları gerçekleştirilen membran, kapatma tamponu (DIG blocking solution) içinde 1 saat bekletilmiştir. Maleik asit yıkama tamponu (0.1 M Maleik Asit, 0.15 M NaCl, %0.3 Tween20, pH 7,5) ile 2 kez 5'er dakika yıkanan membran anti-DIG antikor içeren kapatma tamponunda 1 saat çalkalamalı tabla üzerinde bekletilmiştir. Tekrar maleik asit yıkama tamponu ile 4 kez 5'er dakika yıkaması yapılan membran, 5 dakika da dedeksiyon tamponu (0.1 M Tris (pH 9.5), 0.1 M NaCl) ile yıkanmıştır. Şeffaf yaprak dosyanın arasına alınan membranın üzerine 4-5 damla CSPDR çözeltisi (alkali fosfataz substratı) damlatılmış ve şeffaf dosyanın üzerinde bir peçete ile dairesel

hareketler yapılarak çözeltinin membranın tüm yüzeyine yayılması sağlanmıştır. Dosyanın içinde hava boşlukları çıkartılmış ve membran 37°C'de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonraki işlemler karanlık odada gerçekleştirilmiştir. Membran X-ışını film kaseti içerisinde üzerine X-ışını filmi yerleştirilerek 30-40 dakika bekletilmiştir. Kasetten alınan film Kodak film geliştirme çözeltileri ile yıkanarak geliştirilmiştir.

3.2.15. SDS-PAGE ve Western blot analizleri

SDS-Poliakrilamid Jel Elektforezi (SDS-PAGE), OWL P8D8 (Thermo Scientific, IL, ABD) cihazında gradient jel (%5 polyakrilamid yükleme jeli ve %10 poliakrilamid ayırma jeli, 0.8 mm) hazırlanarak uygulanmıştır. Protein üretimi için geliştirilen hücrelerden ayrılan süpernatantlar, toplam 50 µl olacak şekilde 3:1 oranında 4X SDS jel yükleme tamponu (200 mM Tris-Cl, pH 6.8, %8 SDS, %0.4 Bromphenol Blue, %40 gliserol, 100 mM DTT) ile karıştırılarak 70 °C'de 10 dakika bekletilmiştir. 25'er µl'eri hazırlanan jellere yüklenmiştir. Elektforez işlemi, jelin, 1X TGS (0.025 M Tris base, 0.192 M Glycine, %0.1 SDS, pH 8.3) tamponunda 150 V akımda 60 dakika yürütülmesi ile tamamlanmıştır. Daha sonra jel, IRDye Blue Protein Stain (Li-Cor, NE, ABD) ile 1 saat orbital çalkalayıcı üzerinde boyanmış, saf su ile 15 dakika yıkandıktan sonra Odyssey görüntüleme sistemi (Li-Cor, NE; ABD) ile görüntülenmiştir. Protein standardı olarak PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD) kullanılmıştır (Bkz. Ek 8.2).

Western blot analizi için örnekler SDS-PAGE analizinde olduğu şekilde hazırlanmış, 10'ar µl olacak şekilde hazır jelle (Precise Protein Jels, %8-16, Thermo Scientific, IL; ABD) yüklenmişlerdir. Jel, 1X Tris-HEPES SDS tamponunda (0.1 M Tris, 0.1 M HEPES, 3 mM SDS), 100 V akımda 45 dakika yürütüldükten sonra 1X TGM tamponu (0.192 M glisin, 25 mM tris bazı, %2 metanol) ile yıkanmıştır. Jelde ayrımlanan proteinler, jelden PVDF membrana (Millipore, MA, ABD) Owl HEP-1 Electroblotter (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 (0.2X PBS+%0.1 Casein) içinde geceboyu orbital çalkalayıcının üzerinde bırakılmıştır. Histidin etiketli proteine ait bandı tespit edebilmek için birincil antikor olarak Penta-His Antibody (Qiagen, Almanya) 1:2000 seyreltilerek, ikincil antikor olarak ise Goat Anti-Mouse IRDye 800 CW (Li-Cor, NE, ABD) 1:20000 seyreltilerek kullanılmıştır. Antikorlarla hibridizasyonu tamamlanan membran Odyssey görüntüleme sistemi (Li-Cor, NE; ABD) ile görüntülenmiştir. Protein standardı olarak Odyssey Protein Molecular Weight Marker (Li-Cor, NE, ABD) kullanılmıştır (Bkz. Ek 8.2).

3.2.16. His-etiketli proteinlerin üretilmesi, saflaştırılması ve diyaliz edilmesi

P. pastoris hücre-içi üretim klonları 3 ml YPD besiyerine tek koloniden ekilerek geceboyu 30°C çalkalamalı inkübatörde geliştirilmiş ve inokulum olarak kullanılmıştır. Protein üretimi 125 ml engelli erlenlerde 25 ml BYED besiyerinde gerçekleştirilmiştir. Inokulumdan başlangıç OD'si 0.1 olacak şekilde BYED besiyerine ekim yapılmış ve 30°C çalkalamalı inkübatörde 24 saat gelişmeye bırakılmıştır. Kültürden 24. saatte 50 ml falcon tüpe alınmış ve 3000xg hızında 4°C'de 5 dakika santrifüjlenerek hasat edilen hücreler proteaz inhibitör eklemesi yapılmış LE tamponu (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8.0) içinde süspansiyon edilerek 2 ml'lik tüplere aktarılmışlardır. Cam boncuk (0.5 mm çapında, Zirconia/SILICA, Biospec Products, Kanada) eklemesi yapılarak Tissue Lyser II (Qiagen, Almanya) cihazında 5 kez 1'er dakikalık 30 frekansındaki çalkalamalarla kırılan hücreler daha sonra 12000xg'de 4°C'de 15 dakika santrifüjlenmiş ve elde edilen süpernatantlar (hücre özütü) ile saflaştırma işlemlerine devam edilmiştir.

Histidin etiketli proteinin saflaştırılması için Ni-Charged MagBeads (GenScript, NJ, ABD) kullanılmış ve işlemler ürün protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Hücreler kırıldıktan sonra elde edilen hücre özütüne manyetik boncuklardan eklenmiş ve etiketli proteinlerin boncuklara bağlanmasını sağlamak için 30 dakika oda sıcaklığında karıştırılarak inkübasyona bırakılmıştır. Manyetik boncuklara bağlanan proteinler, yıkama tamponu (LE tamponu içinde 10 mM imidazol) ile birkaç yıkama yapıldıktan sonra elüsyon tamponu (LE tamponu içinde 250 mM imidazol) ile boncuklardan geri alınmıştır. Tüm bu işlemler sırasında toplanan yıkama ve elüsyon

fraksiyonları SDS-PAGE ve western blot analizleri ile kontrol edilmiştir. Analizler sonucunda ilgili proteini taşıdığı doğrulanan fraksiyon, diyaliz kaseti ile (Slide-A-Lyzer 3.5 K Dialysis Cassette G2, Thermo Scientific, IL, ABD) %5 gliserol içeren 1X PBS tamponu (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄) içinde 2 saat diyaliz edilmiştir. Elde edilen saf protein jel geciktirme analizlerinde kullanılmıştır.

3.2.17. Jel geciktirme analizi

Jel geciktirme analizi, DNA molekülünün bir protein molekülüne bağlandığında denatüre-etmeyen poliakrilamid jeldeki hareketinin gecikmesi esasına dayanır. Toplam 20 µl olarak hazırlanan bağlanma reaksiyon karışımı, 20 mM Tris-Cl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 2 µg poly (dI-dC)-poly (dI-dC), %0.05 Nonidet 40, %10 gliserol, 1 ng IR-etiketli prob, 4 µg toplam protein içerecek şekilde hazırlanmıştır. Bağlanmanın o parçaya spesifik olduğunu göstermek için her bir reaksiyon için probun 300 kat fazlası etiketsiz C parçası eklenerek yeni reaksiyonlar hazırlanmış ve jelde her bir hücre özütü (probu reaksiyon ve ilaveten etiketsiz prob eklemesi yapılmış reaksiyon olacak şekilde) yanyana yapılmıştır. Oda sıcaklığında 20 dakika inkübasyondan sonra, 4X yükleme boyası eklenerek %6 denature-etmeyen poliakrilamid jele (Novex, CA, ABD) yüklenmişlerdir. Elektroforez işlemi 100 V akımda 90 dakika 0.5X TBE tamponunda (45 mM Tris base, 45 mM Boric asit, 1 mM EDTA pH 8.3) gerçekleştirilmiştir. Plakaların arasından alınıp saf su ile durulanan jel Odyssey görüntüleme sisteminde (Li-Cor, NE, ABD) görüntülenmiştir.

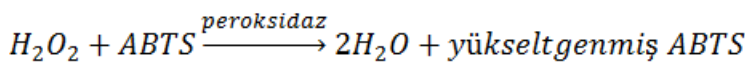
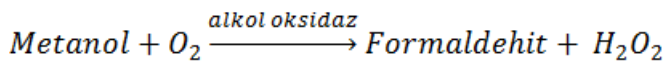
IR-etiketli prob, *AOX1* promotor bölgesi C parçasının C1F/C7RIR primer çifti ile PZR'de çoğaltılması, %2 agaroz jelde kontrolü yapıldıktan sonra PZR saflaştırması yapılarak hazırlanmıştır. Etiketsiz prob ise aynı işlemler C1F/C7R primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.18. AOX enzim aktivitesi tayini

AOX, hücre içi bir enzim olduğu için aktivitesinin ölçülebilmesi için hücrelerin kırılıp, içindeki tüm proteinlerin denatürasyonuna neden olmayacak bir yöntemle

alınması gerekir. Bu amaçla, 40 ml MG, MM ve MD besiyerlerinde 28°C 250 d/dak çalkalamalı inkübatörde geliştirilen kültürlerden her bir suşun logaritmik fazının orta noktasına gelen zamanında 10 ml örnek alınmıştır. 10000xg 4°C’de 5 dakika santrifüj ile toplanan hücre peleti 2 kez 1 M sorbitol ile yıkanmıştır. 2 ml tüplere 200 mg yaş hücre peleti tartılarak alınmış ve üzerlerine 1 ml hücre kırma tamponu (0.2 mM EDTA, 20 mM HEPES, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 0.42 M NaCl, 1.5 mM MgCl₂, %5 gliserol) eklenerek hücreler resüspanse edilmiş ve -80’e kaldırılmıştır. Örneklerin tamamı alındıktan sonra -80’den çıkarılan hücreler cam boncuk (0.5 mm çapında, Zirconia/SILICA, Biospec Products, Kanada) eklemesi yapılarak Tissue Lyser II (Qiagen, Almanya) cihazında 5 kez 1’er dakikalık 30 frekansındaki çalkalamalarla kırılmıştır. Tüpler, sıcaklığın yükselmemesi için aralarda 1’er dakika buz üzerinde bekletilmiştir. 12000xg’de 4°C’de 15 dakika santrifüjlenen tüplerden alınan süpernatantlar yapılacak analize kadar ve analiz süresince buz üzerinde bekletilmişlerdir.

AOX enzim aktivitesi, Sigma’nın kalite kontrol testi kullanılarak spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir (Enzymatic assay of alcohol oxidase (EC 1.1.3.13), Sigma). Testin esasını, metanolün alkol oksidaz tarafından formaldehite indirgenirken hidrojen peroksit oluşturması ve bu hidrojen peroksitin peroksidaz tarafından suya indirgenirken ABTS’nin elektron verici olarak okside olması, yükseltgenmiş ABTS’nin solüsyonun renginde ve dolayısı ile absorbansında değişikliğe neden olması oluşturur.



Yükseltgenmiş ABTS solüsyona parlak mavi-yeşil bir renk verir ve maksimum absorbans dalga boyu 414 nm’dir. AOX aktivitesi, UV-spektrofotometre ile 405 nm dalga boyunda absorbansta meydana gelen değişiklik gözlenerek tespit edilmiştir. Tüm kinetik çalışmalar 25°C’de, 96 mM potasyum fosfat, 2 mM ABTS, 0.00001% (w/w) hidrojen peroksit, 2.5 U peroksidaz, %0.033 (v/v) metanol içeren reaksiyon karışımı ile gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımının hazırlanması şu şekilde

gerçekleştirilmiştir: bir tüpte 2.8 ml ABTS solüsyonu (2 mM) ve 0.1 ml peroksidaz enzim solüsyonu (250 ünite/ml) karıştırılmış, oda sıcaklığında bir süre bekletilmiş ve küvetlere alınarak 405 nm’de absorbansı sabitlenene kadar gözlenmiştir. Daha sonra 0.1 ml örnek, 0.01 ml hidrojen peroksit solüsyonu eklenmiş ve tekrar absorbans sabitlenene kadar beklenmiştir. Son olarak 0.10 ml %1’lik metanol solüsyonu eklenerek reaksiyon başlatılmış ve absorbanstaki değişiklik 5 dakika boyunca 60 saniyelik aralıklarla kaydedilmiştir. Bir ünite enzim, 25 °C sıcaklıkta ve pH 7.5’da , 1.0 µmol metanolü 1 dakikada formaldehite okside eden enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

Formül 3.1 kullanılarak absorbansta meydana gelen değişiklik enzim ünitesine çevrilmiştir.

$$\frac{\text{ünite}}{\text{ml enzim}} = \frac{(\Delta A_{405\text{nm}}/\text{min}(\text{örnek}) - \Delta A_{405\text{nm}}/\text{min}(\text{kör})) \times (3.02) \times (\text{SF})}{(36.8)(0.1)} \quad 3.1$$

3.02 = Testteki toplam reaksiyon hacmi (ml)

SF = Seyreltme Faktörü

36.8 = ABTS’nin 405 nm’deki milimolar sönümlenme katsayısı

0.1 = Kullanılan örnek hacmi

min = Dakika

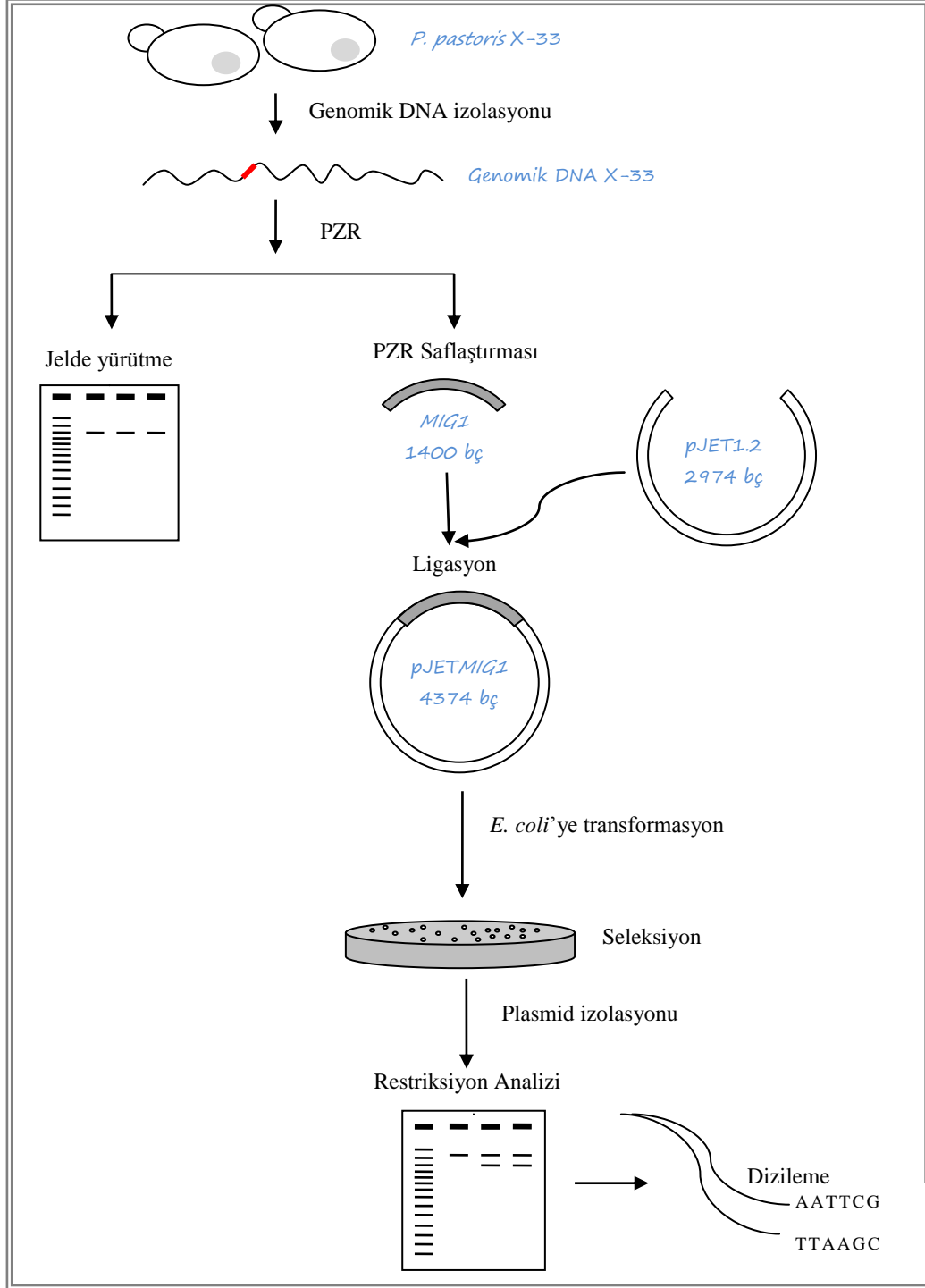
3.2.19. Toplam protein tayini

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 ayıracağı 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. Deneyler sırasında elde edilen standart grafiklerinden biri Ek 8.3’de örnek olarak verilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. *P. pastoris* *MIG1* Geninin Moleküler Karakterizasyonu

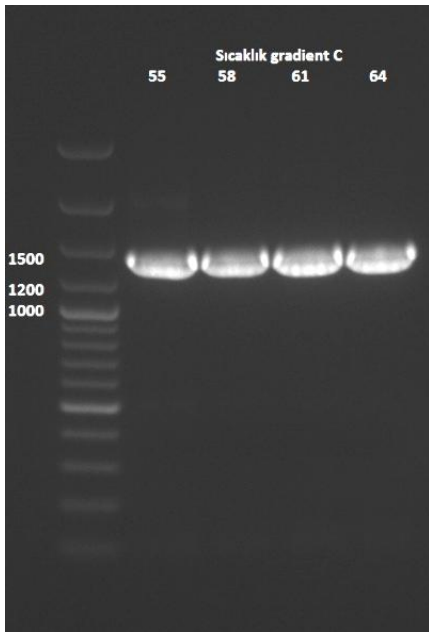
PpMIG1 geninin klonlanma basamakları Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. *P. pastoris* *MIG1* geninin izolasyonu, klonlanması ve dizilenmesi işlemlerinin şematik olarak gösterimi

4.1.1. *PpMIG1* geninin izolasyonu ve klonlanması

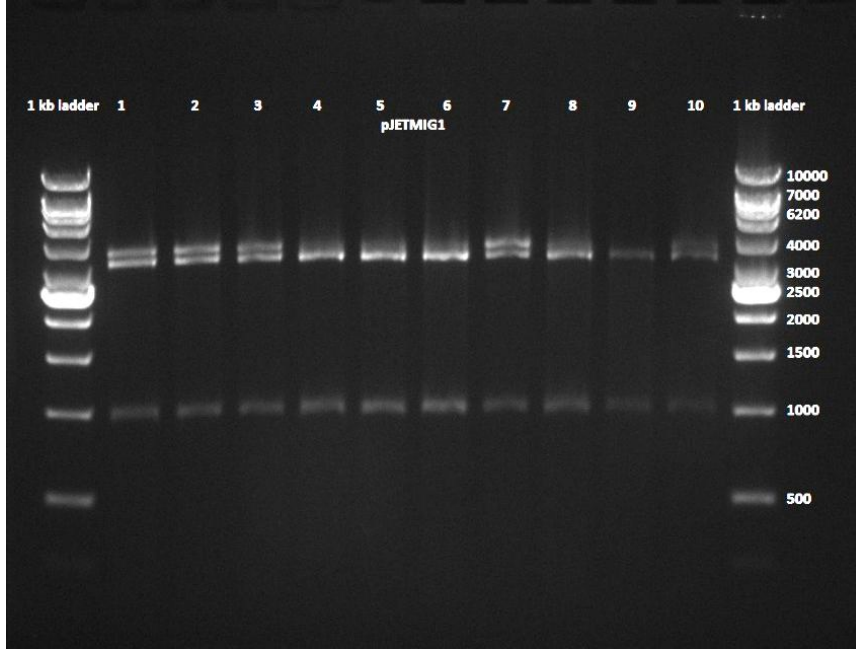
PpMIG1 geninin (1400 bp) izolasyonu için YPD sıvı besiyerinde geliştirilen *P. pastoris* X-33 suşunun genomik DNA'sı izole edilmiş ve Mig1FATG/Mig1RSTP primerleri ile gerçekleştirilen PZR'nda kalıp olarak kullanılmıştır. Bağlanma sıcaklığı 55-65°C arası gradient olarak gerçekleştirilen PZR ürünlerinin 5'er µl'sinin %1 agaroz jelde yürütülmesi ile 1400 bç uzunluğunda beklenen parçanın elde edildiği görülmüştür (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. *P. pastoris* *MIG1* geninin PZR sonucunun jelde görüntülenmesi. 1. sütun: O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD); 2-5. sütunlar: 55-65°C arası farklı sıcaklıklarda oluşan *MIG1* parçaları (1400 bç)

Elde edilen *MIG1* parçasının PZR saflaştırması yapılmış pJET1.2 plazmidine ligasyonu gerçekleştirilmiştir. Oluşturulan yeni plazmid pJETMIG1 (4375 bç) olarak adlandırılmıştır. pJETMIG1 plazmidi yetenekli *E. coli* XL1-Blue hücrelerine transfer edilmiş, 100 µg/ml ampisilin içeren LB Miller plakalarında transformant kolonilerin seçilimi gerçekleştirilmiştir. 37°C'de bir gece inkübasyon sonucunda plakalarda gelişen kolonilerden 10 tanesi seçilerek 100 µg/ml ampisilin içeren 3 ml LB Miller sıvı besiyerine ekilerek 37°C'de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün kültürlerden

plazmid izolasyonları yapılmış ve restriksiyon analizi ile kontrolleri yapılmıştır. Restriksiyon analizi, plazmidlerin, *MIG1* geninin içinden kesen *Bam*HI ve plazmidi sadece bir noktadan kesen *Hind*III enzimleri ile kesilmesi ve oluşan parçaların %1 agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmesi ile yapılmıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Transformant kolonilerden izole edilen pJETMIG1 plazmidlerinin *Bam*HI/*Hind*III restriksiyon analizi

Kesim sonucunun jelde yürütülmesi ile, *MIG1* geninin pJET1.2 plazmidine ligasyonunun doğru gerçekleştiği ve seçilen kolonilerin hepsinde pJETMIG1 plazmidinin varlığı beklenen 3372 bç ve 1003 bç parçalarının görüntülenmesi ile doğrulanmıştır (Şekil 4.3).

4.1.2. *PpMIG1* geninin dizileme sonucu ve *in silico* moleküler analizi

Elde edilen plazmidlerden seçilen 3 tanesi, konsantrasyonları 30 ng/μl olacak şekilde ayarlanarak Ek 8.1’de verilen *MIG1* dizileme primerleri ile birlikte dizilemeye gönderilmiştir. Dizileme, REFGEN Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Ltd. Şti.’nde (Ankara) gerçekleştirilmiştir.

Dizilemeden gelen nükleotid sonuçları DNAMAN 7.0 (Lynnon Corporation, Kanada) programında analiz edilerek Şekil 4.4’de verilen DNA dizisi elde edilmiştir. DNA dizisine tekabül eden aminoasit dizisi de Şekil 4.5’te verilmiştir. İzole ettiğimiz *MIG1* genininin sekansının, NCBI Gen Bankasına kayıtlı NC_012963 numaralı GS115 suşunun *MIG1* geni sekansı ile %100 aynı olduğu tespit edilmiştir.

```

SEQ MIG1-SequenceAssembly: 1404 bp;
Composition 452 A; 399 C; 252 G; 298 T; 3 OTHER
Percentage: 32.2% A; 28.4% C; 17.9% G; 21.2% T; 0.2%OTHER
Molecular Weight (kDa): ssDNA: 431.21 dsDNA: 865.52
COLOURS
sequence = 1
features = 0
ORIGIN
1      ACTCGAGAAG AGAATGACTA CTGCTCCSCC AACGAAGCCC AATGATAGGC CCTACCAGTG
61     CCCCATGTGC GACAAGGCCT TCCACCGGTT GGAACATCAA ACAAGACACA TTAGAACACA
121    CACAGGGGAA AAACCTCACC CTTGCACGTT CCCTGGATGC CCAAAGAAGT TTTCCAGGTC
181    TGATGAATTG ACCAGACACT TGAGGATACA CACAAACCCA ACTGTGAGAA AGGGCAGAAA
241    GAAGAAGCGG AAGGACGAAG AACAAGCTGT GGAGTTGCCA CCTCAGAATR ACGAGGTACA
301    TCTCGTTCCC RTGGGGAACG ATCAAATGGG ACAACCAATA TACACGCAGG CGGTTCCTGT
361    TTATTGGGTT CCATCTGGTG CTGCAAACGG CGAACAAGGC CAGTATTTGA TGCCCTCCGCT
421    TTTTTCCTTA CAACCAAGAC AGGTGATGGC AGGGACTTCT CAAACCAGTT TGAATGGTGT
481    AGATGCTCAA CAACAGCAGC AGCAGCAGCA GCAGCAGCAA CAACAACAAC AACAACAACA
541    ACAACAACCA CAGCAACAAC CACAGCAACA ACCGCCACTG CAACCACAAC CACTTCAACC
601    ACAACCACAG GCCCAGCAAC AATTTGGATT TGCTCAAGAT CAAAGAAACC TGGCACCCGC
661    TAATCAGCAA CAGCACAGAT TCTCCCCACC ATTTTCTGCA TCTTCAAGGA CCCATTGAGC
721    CAATTCATTG TTTTCTCTCA ACTCAAATGG ATCCACGCCT TCAGGGTCAT ATCAACAGTT
781    GAACTCTTTA TCTCTTTTAC ACAGAAATCAC TCCAATCAGC ACTCCAAGCA GTAATAGCCT
841    GTTGACAAAA TCTAATAACC AGTCGATGAC ATCAATAGTC ACGTTGAGCG ACCAACAAACA
901    GGATTTTGTG TCCAGAAAAA AGTCAAGACC CAACTCACCA ACAGTTCCAA ACTCTCCAAC
961    AATTTCAAAC TTGGTCTCGC CCGCTGATAC GCCTTTAACT ACTCCGTTGC AATCGCCTAC
1021   ACTGAAGCCC GCAATGCCCA GCAACGTACA ACTTCCACCA ATAAGATCAC TGTTAAATTT
1081   GGAAGAACTT CCCTCGGAAC CATTGCAGCA ACCAGCCAAT GTCTCTACTG ACAATAAAGT
1141   GAAGACAATG TTGAACAAAT CTTTCGTCAA CGTCACTTTG AGTAAATCGT TTTCTTCACA
1201   AGACATTCTG CTGGGGACCA AGAGAAAATC TGATACCAAC CTCTCTGCAT TAGATTCTAC
1261   CAATGCTATT CGCAAGCCTG CCCTATCACC GTTGGCTCCT CTGTGAGTCT CATCAGATCG
1321   ATTTACCAAG AGAAAGAACA ACTTCACGAT AGGCAATATC ATGAACTCGG ACTCTCATCA
1381   TCATCATCAT CATGCGG CCGC

```

Şekil 4.4. *P. pastoris* X-33 suşundan izole edilmiş *MIG1* geninin dizileme sonucu elde edilen nükleotid dizisi. Primer dizayn edilirken eklenen *XhoI* (2) ve *NotI* (1398) enzimleri kesim bölgeleri altı çizili olarak, 6xHistidin etiket bölgesi gölgelendirilerek gösterilmiştir.

P. pastoris Mig1 protein aminoasit dizisinin diğer metilotrofik mayalarda (*C. boidinii* ve *H. polymorpha*) karakterize edilmiş olan Mig1 proteinleri ile karşılaştırılması sonucunda elde edilen bulgular şu şekildedir:

- (1) *PpMig1* proteini 454 aminoasitten oluşmaktadır. Karşılaştırma yaptığımız diğer Mig1 protenlerinden daha kısadır (ScMig1p 504 aa, HpMig1 480 aa, CbMig1p 868 aa).
- (2) Mayalar arasında, daha önce başka araştırmacıların belirttiği gibi, N-ucu ZnF (çinko parmak motifi) DNA-bağlanma bölgeleri yüksek oranda korunduğu gözlenmiştir (Ostling vd, 1996; Carmona ve Barrado, 2002) (Şekil 4.6). N-terminal DNA bağlanma bölgelerinin arasındaki özdeşlik %83.88 olarak belirlenmiştir.
- (3) Proteinlerin tamamı karşılaştırıldığında ise *PpMig1* proteini diğer mayaların Mig1 proteinleri ile beklenildiği gibi sınırlı homoloji göstermiştir. *PpMig1* proteininin, şekilde yer alan organizmaların Mig1 proteinleri ile özdeşliklerini şu şekilde sıralayabiliriz: ScMig1 ile %34.5; HpMig1 ile %33.5, CbMig1 ile %37.5 ve HpMig2 ile %47.5.

```

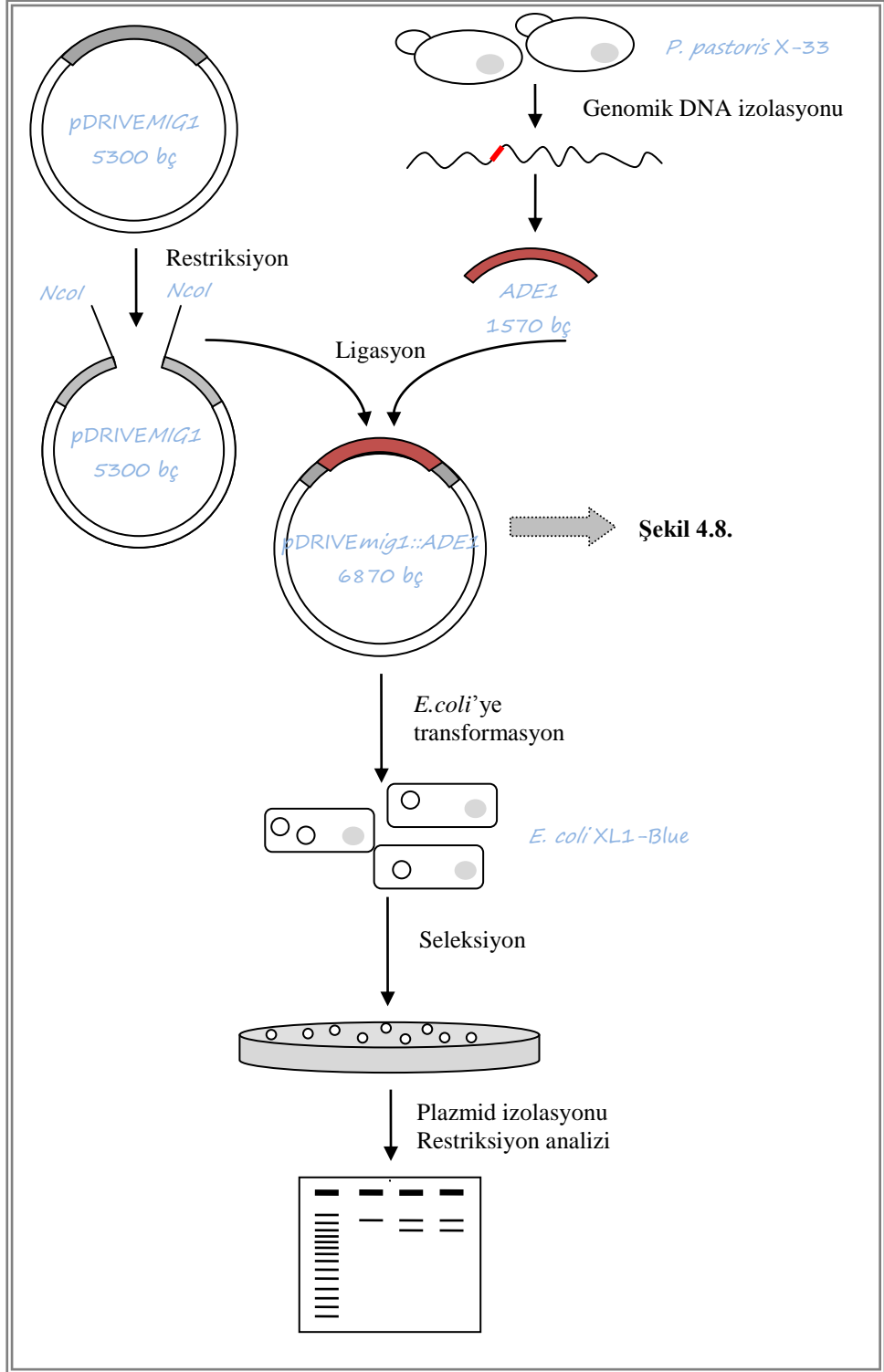
Translation of MIG1-SequenceAssembly(1-1404)
Universal code
Total amino acid number: 466, MW=51650
Max ORF starts at AA pos 1(may be DNA pos 2) for 464 AA(1392 bases),
MW=51508
ORIGIN
1      LEKRMTTAPP TKPNDRPYQC PMCDKAFHRL EHQTRHIRTH
41     TGEKPHPCTF PGCPKKFSRS DELTRHLRIH TNPTVRKGRK
81     KKRKDEEQAV ELPPQNXEVH LVPXGNDQMG QFIYTQAVPV
121    YWVPSGAANG EQGQYLMPPPL FSLQPRQVMA GTSQTSLNGV
161    DAQQQQQQQQ QQQQQQQQQQ QQPQQQPQQQ PPLQPQPLQP
201    QPQAQQQFGF AQDQRNLAPA NQQQHRFSPP FSASSRTHSA
241    NSLFSLNSNG STPSGSYQQL NSLSLLHRIT PIRTPSSNSL
281    LTKSNNQSMT SIVTLSDQQQ DFVSRKKSSR NSPTVPNSPT
321    ISNLVSPADT PLTTPLQSPT LKPAMPSNVQ LPPIRSLLNL
361    EELPSEPLQQ PANVSTDNKV KTMLNKSSSN VTLSKSFSSQ
401    DIRLGTKRKS DTNLSALDST NAIRKPALSP LAPLSVSSDR
441    FTKRKNNFTI GNIMNSDSHH HHHH*

```

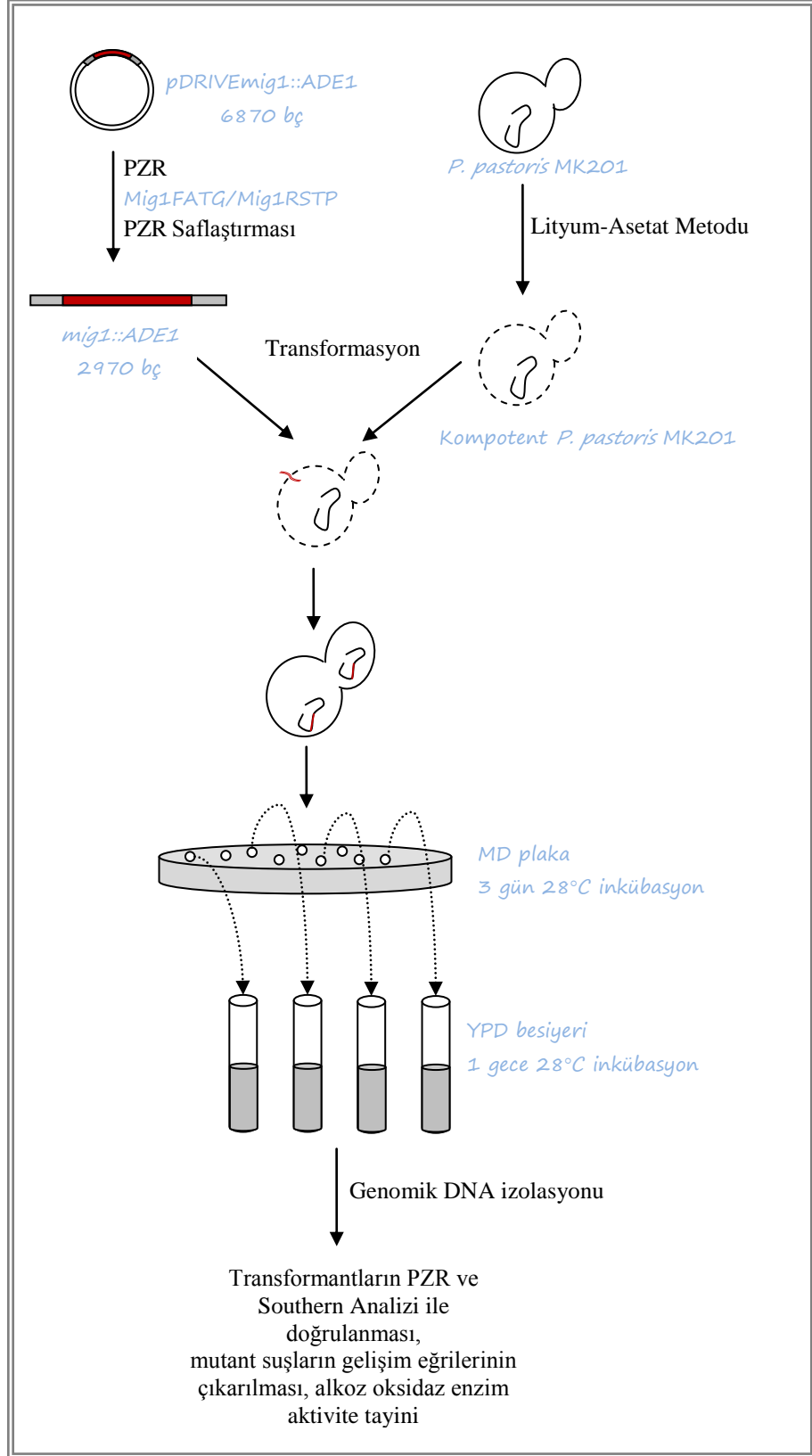
Şekil 4.5. *P. pastoris* X-33 suşundan izole edilen Mig1 proteininin aminoasit dizisi. Dizinin başında, α sekresyon faktörüne ait dizi koyu renkle, dizinin sonunda histidin etiketine ait dizi italik ve altı çizili olarak gösterilmiştir.

4.2. *P. pastoris* MIG1 Geninin Fonksiyonel Analizinin Yapılması

PpMIG1 geninin inaktive edilmesi Şekil 4.7’de şematik olarak gösterilmiştir.



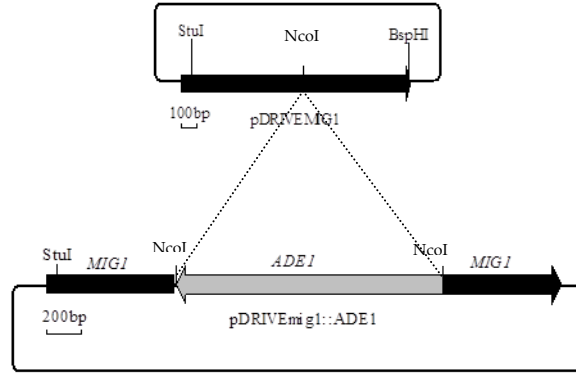
Şekil 4.7. *P. pastoris* MIG1 geninin inaktive edilmesinin şematik gösterimi



Şekil 4.8. *P. pastoris* *MIG1* geninin inaktive edilmesinin şematik gösterimi (Şekil 4.7'nin devamı)

4.2.1. *P. pastoris* *MIG1* mutant suşun ($\Delta mig1$) elde edilmesi

PpMIG1 geni, adenini kodlayan *ADE1* geni ile inaktif hale getirilmiştir (Dux ve Inan, 2006) (Şekil 4.9).

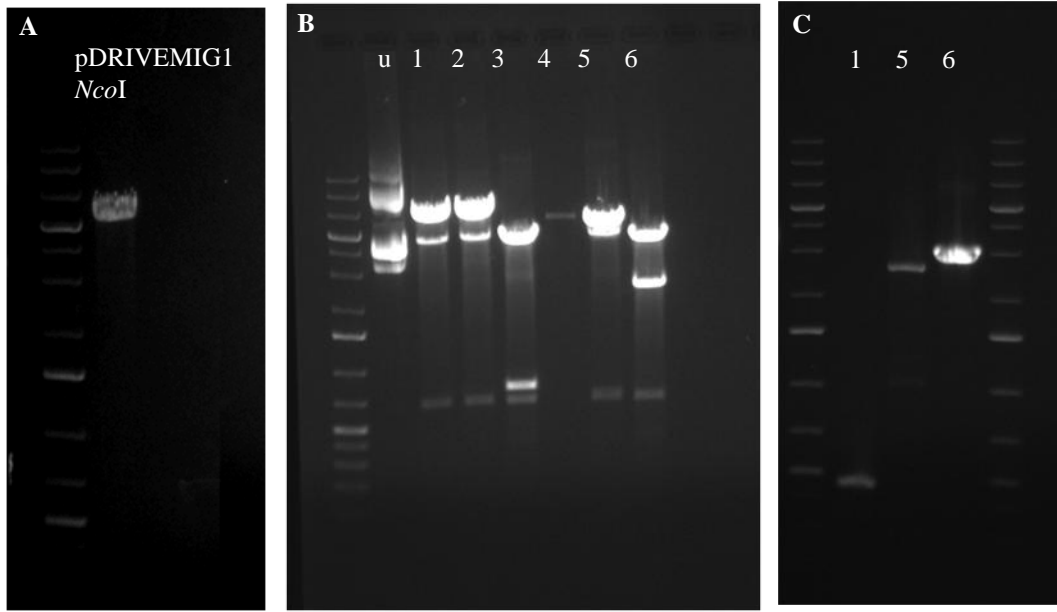


Şekil 4.9. *MIG1* geninin *ADE1* geni ile inaktive edilmesinin şematik gösterimi

ADE1 geni, *P. pastoris* genomik DNA'sından *ADE1Bsp1407IF* ve *ADE1BgIIIR* primerleri kullanılarak (1500 bç) PZR ile çoğaltılmıştır. PZR ürününün %1 agaroz jelde yürütülerek kontrolü yapıldıktan sonra saflaştırması yapılmıştır.

Bu arada, pDRIVE klonlama vektörüne klonlanan *MIG1* geni, *NcoI* enzimi ile ortadan kesilmiş, kesim ürünleri %1 agaroz jelde yürütülerek doğrulanmıştır (Şekil 4.10.A). Lineer hale geldiği doğrulanan pDRIVEMIG1 (5300 bç) plazmidinin PZR saflaştırması yapılmış, uçları kütleştirilmiş ve aynı şekilde uçları kütleştirilmiş *ADE1* parçası ile ligasyonları gerçekleştirilmiştir. Ligasyon karışımının yetenekli XL1-Blue hücrelerine transformasyonu yapılmış, 100 µg/ml ampisilin içeren LB Miller plakalarına ekimleri yapılarak 37°C'de geceboyu inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi sabah oluşan kolonilerden 6 tanesi seçilerek plazmid izolasyonu için ampisilinli LB Miller sıvı besiyerine ekim yapılmış, 37°C çalkalamalı inkübatörde 18 saat inkübasyona bırakılmışlardır. Daha sonra seçilen kolonilerden elde edilen kültürlerden plazmid izolasyonları yapılmış, elde edilen plazmidleri doğrulamak için *BamHI* ile restriksiyon analizi gerçekleştirilmiştir. Restriksiyon sonucunun %1 agaroz jelde görüntülenmesi ile

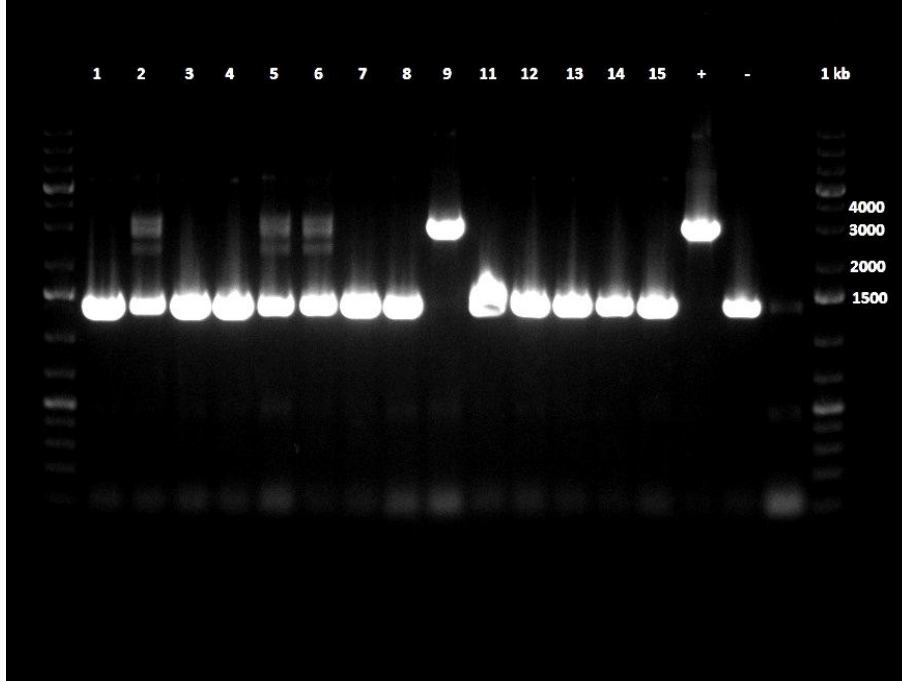
oluşan parçalara bakılarak (Şekil 4.10B) doğru olması muhtemel 3 koloni seçilmiş ve *mig1::ADE1* (3000 bç) nakavt parçanın PZR ile elde edilmesi için kalıp olarak kullanılmıştır. Mig1FATG/Mig1RSTP primer çifti kullanılarak PZR sonucunun jelde görüntülenmesi ile seçilen plazmidlerden yalnızca 6 numaralı plazmitten doğru parçanın (3000 bç) çoğaldığı gözlenmiş ve bu plazmid pDRIVEmig1::ADE1 olarak isimlendirilmiştir (Şekil 4.10.C).



Şekil 4.10. pDRIVEmig1::ADE1 nakavt plazmidini oluşturulurken elde edilen jel görüntüleri (A) pDRIVEMIG1 plazmidinin *NcoI* ile lineer hale getirilmesi, (B) pDRIVEmig1::ADE1 nakavt plazmidlerin *BamHI* ile restriksiyon analizi, u: uncut, 1-6: plazmid izolasyonu yapılan koloni numaraları (C) *mig1::ADE1* nakavt parçanın 3 farklı plazmidin kalıp olarak kullanıldığı PZR sonucunda elde edildiği jel görüntüsü, 1,5,6: plazmidlerin koloni numaraları

pDRIVEmig1::ADE1 nakavt plazmidinden PZR ile elde edilen *mig1::ADE1* nakavt parçanın saflaştırması yapıldıktan sonra, yaklaşık 1 µg kadarı yetenekli *P. pastoris* MK201 suşuna transform edilmiştir. Transformantlar MD plakalara ekilmiş, 30 °C'de 3 gün inkübasyona bırakılmışlardır. Üçüncü günün sonunda MD plakalarda gelişen tek kolonilerden 14 tanesi seçilerek YPD sıvı besiyerine ekim yapılmış, 30°C çalkalamalı inkübatörde bir gece inkübe edilmiş ve ertesi gün DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Konsantrasyonları 10 ng/µl olarak ayarlanan genomik DNA'lar

MIG1 geninin inaktif olup olmadığının kontrolü için yapılan PZR'de kalıp olarak kullanılmıştır. Mig1FATG/Mig1STP primer çifti ile yapılan PZR sonucunun %1'lik agaroz jelde yürütülmesi ile, beklenen 3000 bp uzunluğundaki parçanın yalnızca 9 nolu koloniden elde edilen genomik DNA'dan elde edildiği gösterilmiştir (Şekil 4.11).



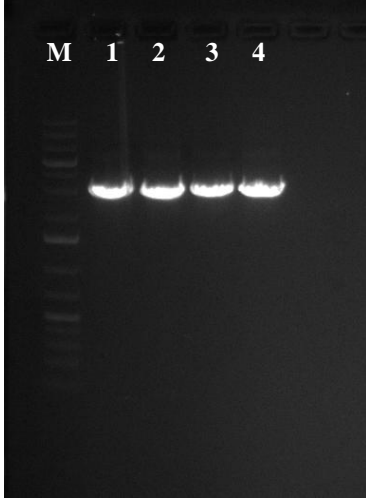
Şekil 4.11. Transformant MK201 genomik DNA'larından nakavt parça *mig1::ADE1* varlığının PZR ile kontrol edilmesi. 1-15: MD plakalardan seçilen transformant koloniler; +: Pozitif kontrol pDRIVE*mig1::ADE1* plazmid; -: negatif kontrol MK201 genomik DNA'sı

PZR sonucunda 9 nolu MK201 suşunun *mig1* mutant ($\Delta mig1$) olduğu gösterilmiş, Southern blot analizi ile doğrulamasının yapılması için YPD plakaya tek koloni düşecek şekilde çizimi yapılmış ve 30 °C'de inkübasyona bırakılmıştır.

4.2.2. *P. pastoris* *MIG1* ve *MIG2* mutant suşun ($\Delta mig1\Delta mig2$) elde edilmesi

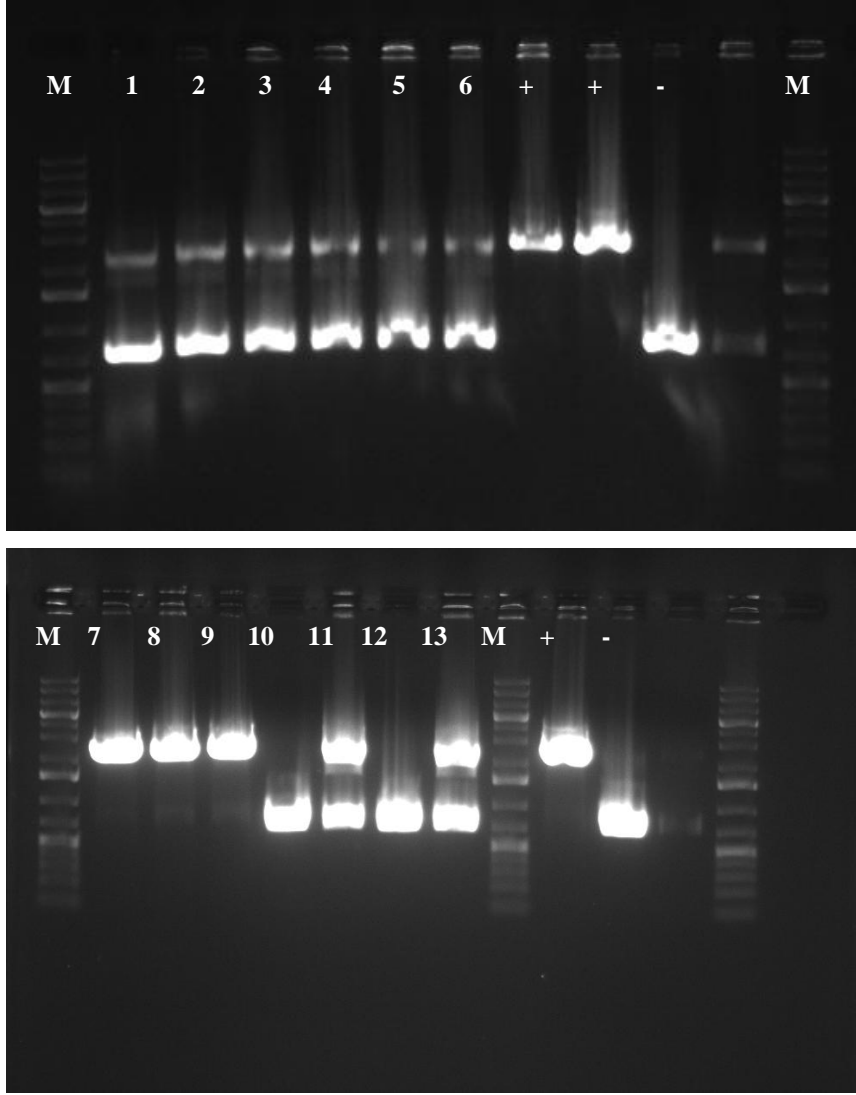
P. pastoris $\Delta mig1\Delta mig2$ suşunu elde etmek için, *MIG2* geni histidinol dehydrogenase (*HIS4*) geni ile inaktif edilmiş olan JC304 $\Delta mig2$ suşu yetenekli hale getirilmiş ve *mig1::ADE1* parçasının transformasyonu yapılarak MD plakalarda transformant kolonilerin seçimi gerçekleştirilmiştir.

Öncelikle *mig1::ADE1* parçası (~3000 bç), pDRIVE*mig1::ADE1* plazmidi kalıp olarak kullanılarak Mig1FATG/Mig1RSTP primer çifti ile PZR ile çoğaltılmıştır. PZR ürününün agaroz jel elektroforezi ile kontrolü yapılmıştır (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. PZR ile çoğaltılan *mig1::ADE1* parçasının jel görüntüsü. M: 1 kb DNA standardı; 1-4: reaksiyon tüpü numaraları

Jelde görüntülenerek doğrulaması yapılan *mig1::ADE1* parçasının PZR saflaştırmasından sonra yetenekli JC304 Δ *mig2* suşuna transformasyonu yapılmış ve MD plakalara ekilerek 30°C’de 3 gün inkübasyona bırakılmışlardır. Üç gün sonunda plakalarda oluşan toplam 13 koloniden 3’er ml YPD besiyerine ekilmiş ve kültürler 30°C’de geceboyu çalkalamalı inkübasyona bırakılmışlardır. Ertesi gün gelişen kültürlerden genomik DNA izolasyonları yapılmış ve transformasyon sonucu nakavt parçanın hedeflenen bölgeye girip girmediğinin kontrolü PZR ile gerçekleştirilmiştir. Mig1F235/Mig1R969 primer çifti ile gerçekleştirilen PZR sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir (Şekil 4.13).

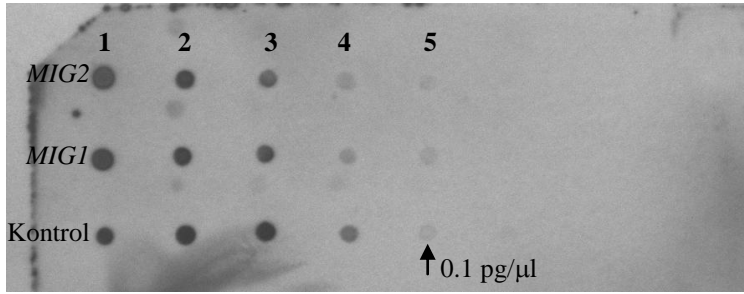


Şekil 4.13. *mig1::ADE1* parçasının *JC304Δmig2* suşuna transformasyon sonucunun PZR ile taranması. 1-13: transformant koloniler, +: pDRIVEMIG1::ADE1 plazmidi, -: *JC304* genomik DNA'sı, M: 1 kb DNA standardı

PZR sonucunun jelde görüntülenmesi ile transformasyon sonucu 3 suşta (7, 8 ve 9 numaralı koloniler) nakavt parçanın genomda *MIG1* geninin olduğu bölgeye girdiği anlaşılmıştır. Elde edilen bu suşlardan *JC304Δmig1Δmig2* olarak adlandırılmıştır. Çalışmaya *MK201Δmig1*, *MK111Δmig2* ve *JC304Δmig1Δmig2* suşlarında nakavt edilen genlerin Southern blot analizi ile doğrulanma işlemleri ile devam edilmiştir.

4.2.3. *P. pastoris* suşlarında inaktive edilen genlerin Southern blot analizi ile doğrulanması

PZR yolu ile *MIG1* ve *MIG2* genlerinin inaktif olduğu doğrulanan suşların bir de Southern blot analizi ile doğrulanması yapılmıştır. Analizde *MIG1* ve *MIG2* problemleri hazırlanırken bu genlerin ilk 500 bp'lik parçaları kullanılmıştır. *MIG2* probe pJET*MIG2* plazmid kalıp olarak kullanılarak Mig2FATG/Mig2470R primer çifti ile, *MIG1* probe ise pJET*MIG1* plazmid kalıp olarak kullanılarak Mig1FATG/Mig1R453 primer çifti ile PZR yapılarak çoğaltılmış ve agaroz jel elektroforezi ile kontrolleri yapılmıştır. PZR saflaştırması yapılan parçaların DIG etiketlemeleri yapılmış ve etiketlenme verimlilikleri ölçülmüştür (Şekil 4.14).

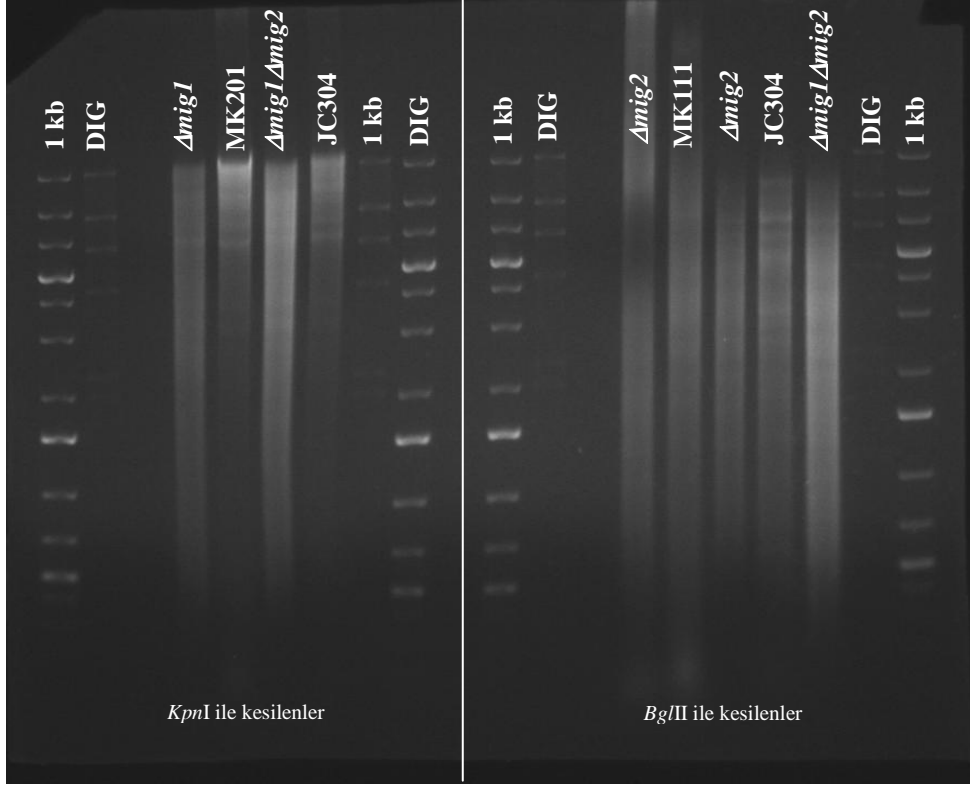


Şekil 4.14. *MIG1* ve *MIG2* problemlerinin etiketlenme verimliliklerinin ölçülmesi. 1-5: Farklı dilüsyonlar

Probe verimli bir şekilde etiketlenmesinin göstergesi olan dilüsyon serisinden 0.1 pg/µl konsantrasyonuna tekabül eden dilüsyonun (Şekil 4.14'de gösterilen 5. nokta) filmde görünür olmasından hareketle, problemlerin etiketlenme verimliliklerinin iyi olduğu anlaşılmıştır.

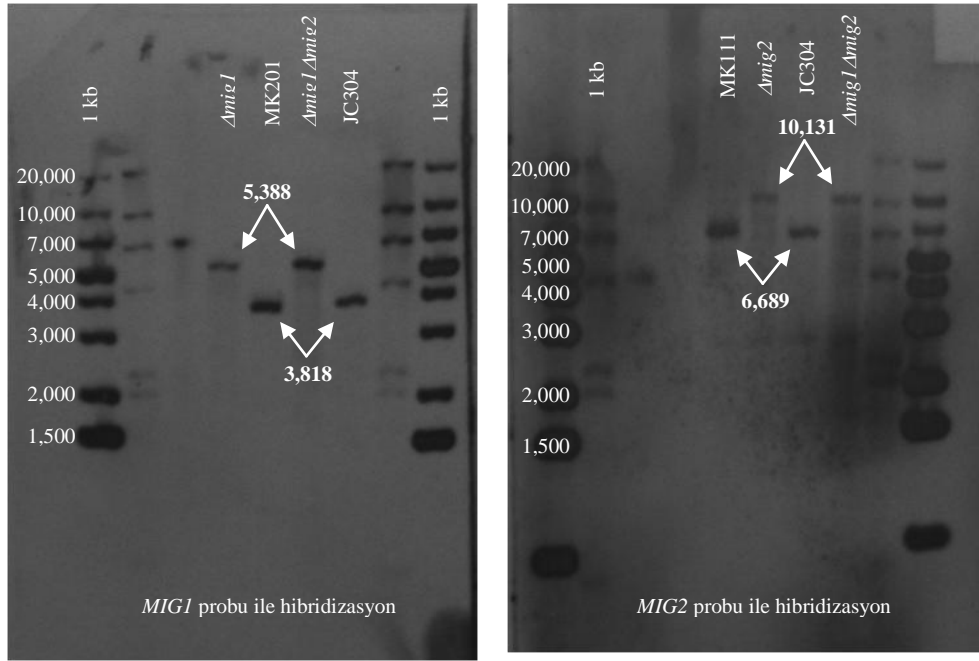
Southern blot analizleri yapılacak olan *P. pastoris* X33, MK201Δ*mig1*, MK111Δ*mig2* ve JC304Δ*mig1*Δ*mig2* suşları tek koloniden YPD sıvı besiyerine ekilerek geceboyu 30°C çalkalamalı inkübatörde geliştirilmiş ve genomik DNA izolasyonları yapılmıştır. *MIG1* probe ile hibridize olarak *MIG1* geninin nakavt olduğu doğrulanacak olan MK201Δ*mig1* ve JC304Δ*mig1*Δ*mig2* suşlarının genomik DNA'ları *KpnI* enzimi ile 37°C'de geceboyu kesime bırakılmışlardır. Aynı şekilde, *MIG2* probe ile hibridize olarak *MIG2* geninin nakavt olduğu doğrulanacak olan MK111Δ*mig2*, JC304Δ*mig2* ve

JC304 Δ *mig1* Δ *mig2* suşlarının genomik DNA'ları ise *Bgl*III enzimi ile 37°C'de geceboyu kesime bırakılmıştır. Kontrol olarak ise MK111, MK201 ve JC304 suşlarının genomik DNA'ları kesilmiştir. Enzimle kesimleri tamamlanan DNA'lar, %0.8 agaroz jele yüklenerek yürütülmüş ve UV ışığı altında görüntülenmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Southern blot analizi için *Kpn*I ve *Bgl*III enzimleri ile kesilen *P. pastoris* konukçu ve mutant suşları genomik DNA'larının jel görüntüsü

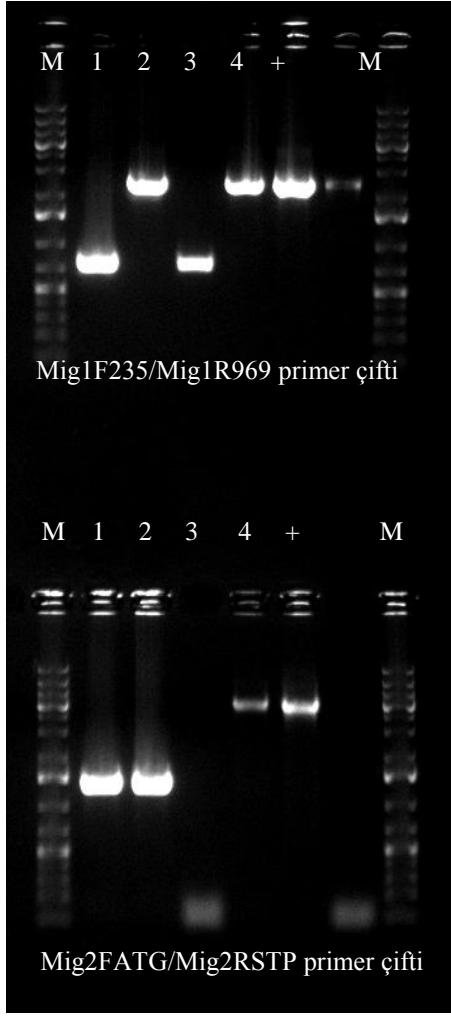
Jelde ayrılan genomik DNA'lar pozitif yüklü membrana aktarılmıştır. *Kpn*I enzimi ile kesilen DNA'ların bulunduğu membran *MIG1* probu ile *Bgl*III enzimi ile kesilen DNA'ların bulunduğu membran *MIG2* probu ile hibridize edilmiştir. Daha sonra geliştirilen filmler sonucu elde edilen görüntü Şekil 4.16'da verilmiştir.



Şekil 4.16. *P. pastoris* $\Delta mig1$, $\Delta mig2$ ve $\Delta mig1 \Delta mig2$ suşların Southern blot analizi sonucu elde edilen X-Ray film görüntüsü.

Southern blot analizi sonucunda elde edilen film görüntüsünde *MIG1* geni inaktive edilen suşlarda *MIG1* probunun bağlandığı parçalar ~5,300 bç (hesaplanan 5,388) uzunluğunda, *MIG1* geni normal olan konukçu suşlarda ise ~3,800 bç (hesaplanan 3,818) uzunluğunda olduğu tespit edilmiştir. *MIG2* geni inaktif olan suşlarda *MIG2* probunun bağlandığı parçalar ~10,000 bç (hesaplanan 10,131) uzunluğunda, *MIG2* geni normal olan suşlarda ise ~6800 bç (hesaplanan 6889) uzunluğunda tespit edilmiştir. Analiz sonucunda hesaplanan veriler elde edildiğinden, MK201 $\Delta mig1$, MK111 $\Delta mig2$ ve JC304 $\Delta mig1 \Delta mig2$ suşlarında *MIG1* ve *MIG2* genlerinin inaktif olduğunun doğrulaması yapılmış olup, diğer analizlere bu suşlar ile devam edilmiştir.

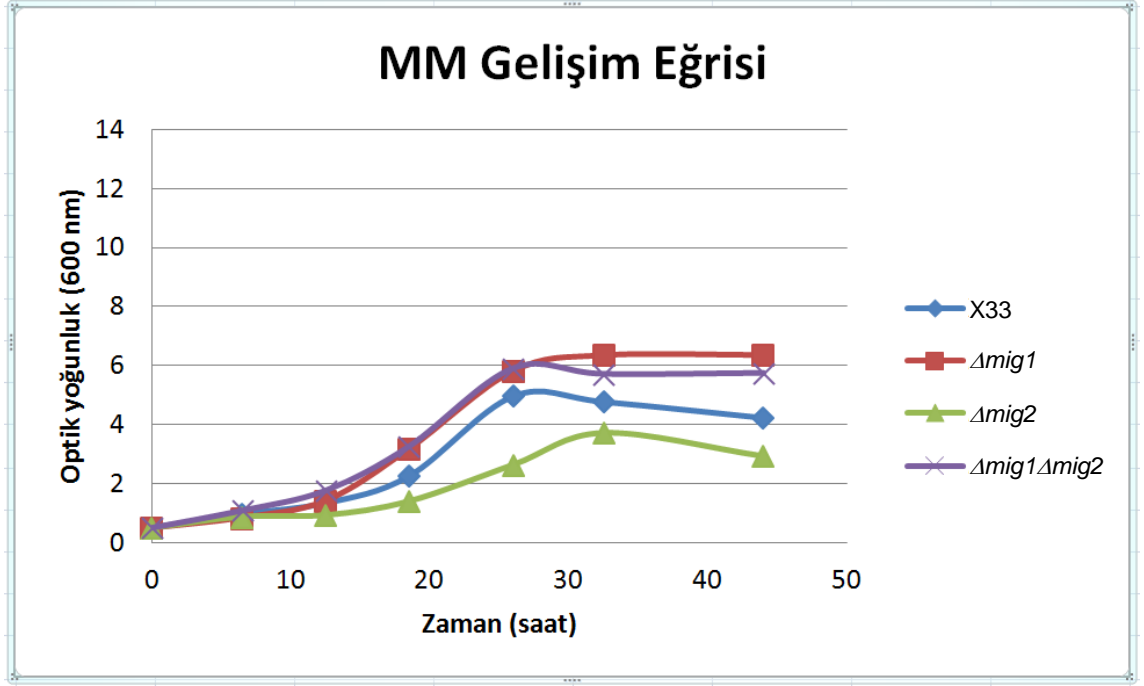
Mutant suşların her biri YPD agar plakaya tek koloni düşürecek şekilde çizilmiş ve 30°C'de 3 gün inkübasyona bırakılarak geliştirilmişler ve +4°C'ye kaldırılmışlardır. Fonksiyonel analizlerde inokulum, plakadan seçilen tek koloniden hazırlanmıştır. Belirli aralıklarla inokulumlardan genomik DNA izole edilerek mutant suşların *MIG1* ve *MIG2* genlerinin kontrolleri PZR yolu ile yapılmıştır. Şekil 4.17'de mutant suşların doğrulandığı PZR reaksiyonlarından birinin jel görüntüsü verilmiştir.



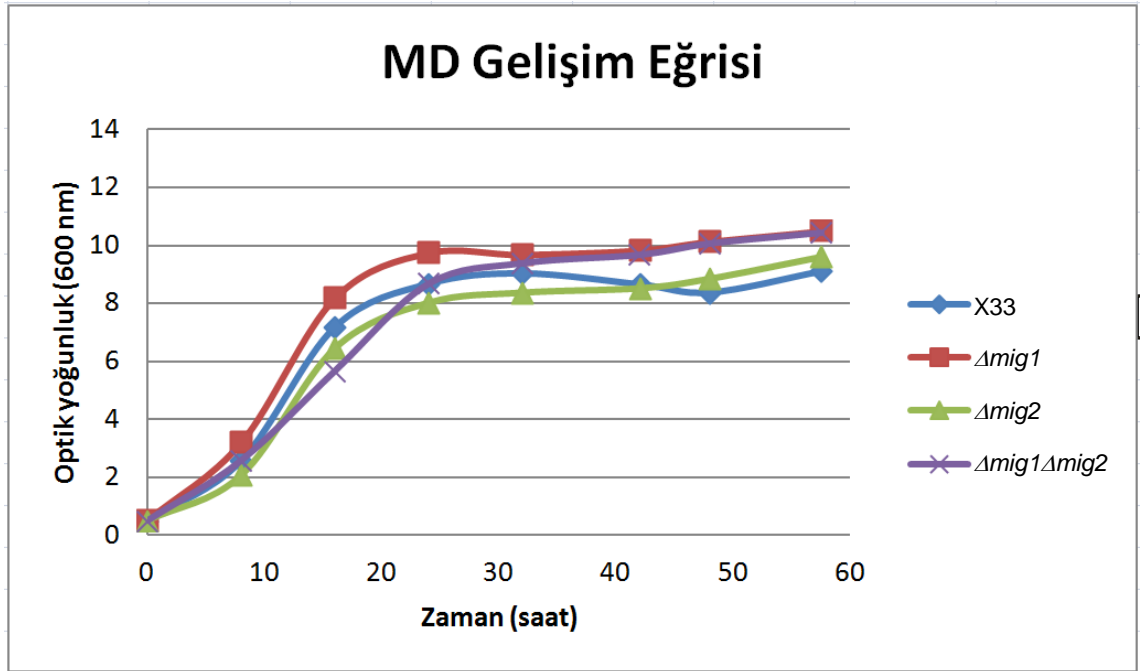
Şekil 4.17. Mutant suşların doğrulamasının yapıldığı PZR reaksiyon sonucunun jel görüntüsü. 1: X33, 2: $\Delta mig1$, 3: $\Delta mig2$; 4: $\Delta mig1\Delta mig2$; +: pozitif kontrol olarak nakavt plazmidler (pDRIVEmig1::ADE1, pJETmig2::HIS4), M: 1 kb DNA standardı

4.2.4. *P. pastoris* $\Delta mig1$, $\Delta mig2$ ve $\Delta mig1\Delta mig2$ suşlarının gelişim eğrilerinin çıkarılması

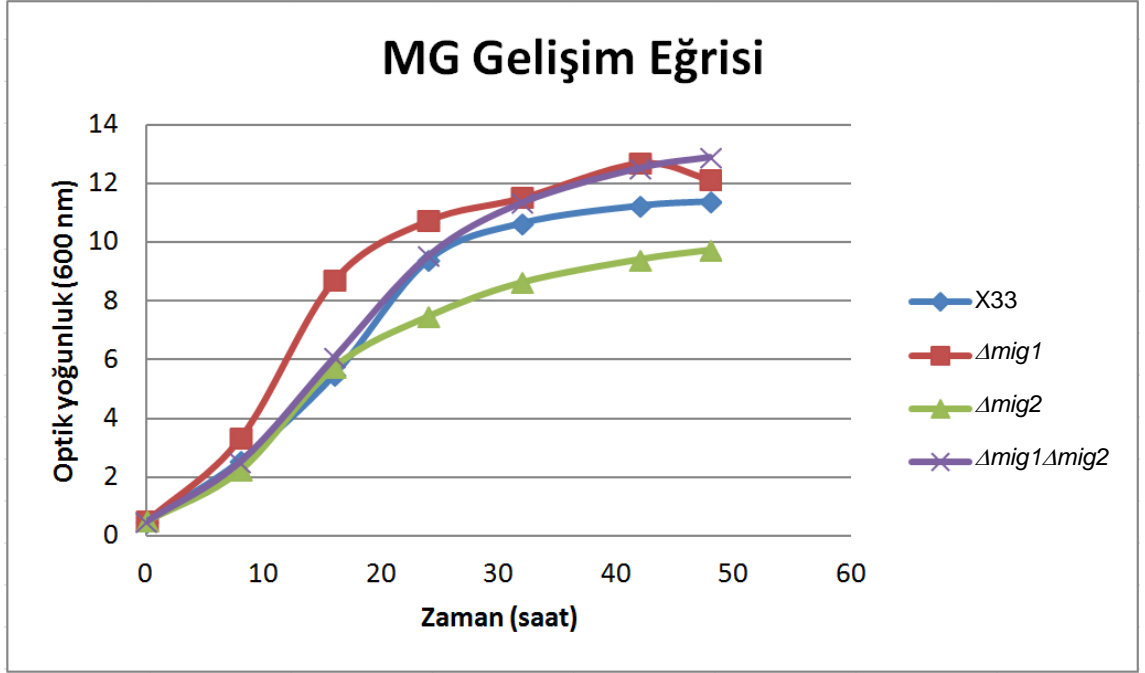
MIG1 ve *MIG2* genlerinin inaktive edilmesinin hücrenin gelişiminde değişikliğe yol açıp açmadığının anlaşılabilmesi için ilgili suşların metanol, glukoz ve gliserol içeren besiyerlerinde gelişim eğrileri çıkarılmıştır (Şekil 4.18, Şekil 4.19 ve Şekil 4.20). Kontrol suşu olarak X-33 kullanılmıştır.



Şekil 4.18. *P. pastoris* X33, $\Delta mig1$, $\Delta mig2$ ve $\Delta mig1\Delta mig2$ suşlarının %1 metanol içeren besiyerindeki (MM) gelişim eğrileri



Şekil 4.19. *P. pastoris* X33, $\Delta mig1$, $\Delta mig2$ ve $\Delta mig1\Delta mig2$ suşlarının %2 glukoz içeren besiyerindeki (MD) gelişim eğrileri



Şekil 4.20. *P. pastoris* X33, $\Delta mig1$, $\Delta mig2$ ve $\Delta mig1\Delta mig2$ suşlarının %2 gliserol içeren besiyerindeki (MG) gelişim eğrileri

Metanol besiyerinde gelişen hücreler ~ 6 (OD_{600}) hücre yoğunluğuna ulaşırlarken (Şekil 4.18), glukozdaki yoğunlukları 10 (Şekil 4.19), gliseroldeki ise 12'yi bulmuştur (Şekil 4.20). Mutant suşlarla yabancı suş (X33) üç karbon kaynağında da benzer gelişim eğrileri çizmişler fakat çok belirgin olmasa da $\Delta mig1\Delta mig2$ ve $\Delta mig1$ suşları yabancı suştan daha yüksek hücre yoğunluklarına ulaşırken, $\Delta mig2$ yabancı suştan daha düşük hücre yoğunluklarında kalmıştır.

4.2.5. *P. pastoris* $\Delta mig1$, $\Delta mig2$ ve $\Delta mig1\Delta mig2$ suşlarında AOX enzim aktivitesi tayini

Hücreler glukoz ve gliserolde gelişirken meydana gelen *AOX1* geninin represyonunda Mig1 ve Mig2 proteinlerinin oynadıkları rolün anlaşılması için, glukoz ve gliserolde gelişen hücrelerde *AOX1* geninin ifade edilip edilmediğine AOX enzim aktivitesi analizi ile bakılmıştır. Bu amaçla, *MIG1* ve *MIG2* genleri inaktif olan mutant suşlar ($\Delta mig1$, $\Delta mig2$ ve $\Delta mig1\Delta mig2$) metanol, glukoz ve gliserol besiyerlerinde geliştirilip logaritmik fazlarının ortalarında iken (15. saatte) hasat edilmişlerdir.

Hücrelerin kırılması ve çöktürülmesi ile elde edilen hücre özütlerinde AOX enzim aktivitesi tayini yapılmıştır. Kontrol olarak X33 suşu kullanılmıştır. Analizler 3 paralelli olarak gerçekleştirilmiş, elde edilen sonuçların ortalaması alınmış ve standart sapmaları hesaplanmıştır. Elde edilen enzim aktivite değerleri (U/ml) hücre özütlerinin toplam protein miktarına bölünerek 1 µg proteindeki enzim aktivitesi hesaplanmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.1’de verilmiştir. Enzim aktivite değeri % aktivite değerine, X33 suşunun MM besiyerindeki aktivite değeri %100 olarak kabul edilerek çevrilmiş, Çizelge 4.2’de tablo olarak, Şekil 4.21’de ise grafik olarak gösterilmiştir.

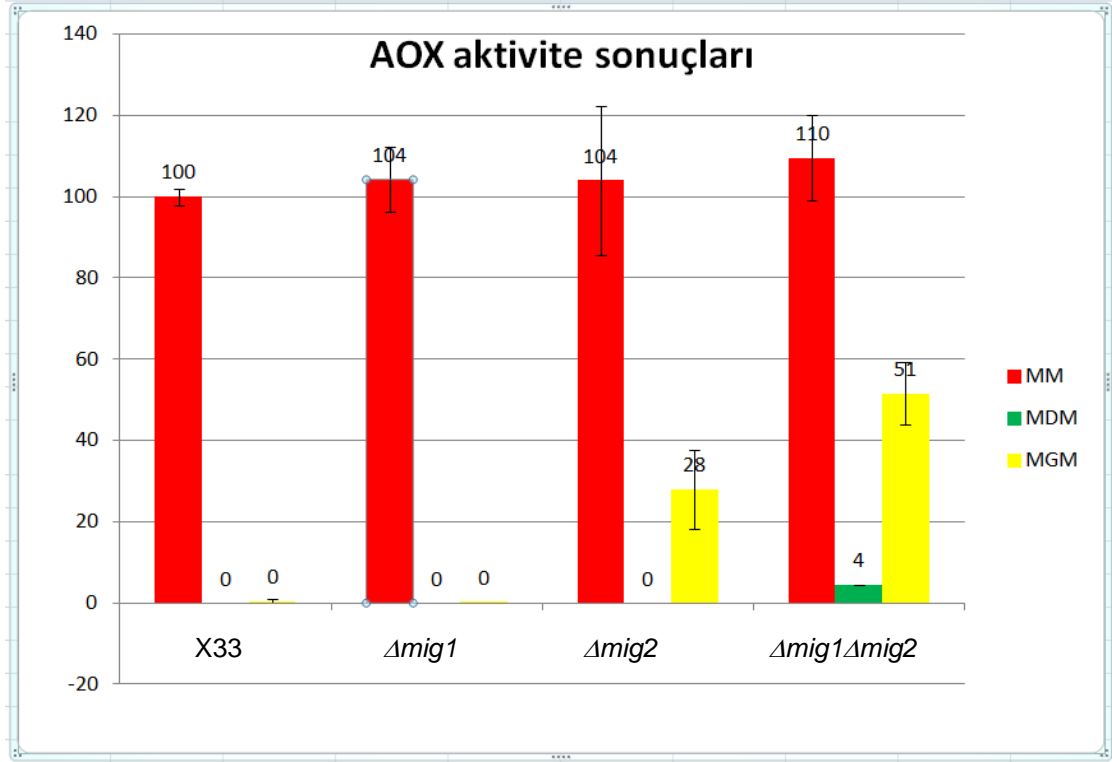
Çizelge 4.1. AOX enzim aktivitesi tayini sonuçları (U/µg)

U/µg	MM	MDM	MGM
X33	0,0030±0,0001	0,0000±0,0000	0,0000±0,0000
<i>Δmig1</i>	0,0031±0,0002	0,0000±0,0000	0,0000±0,0000
<i>Δmig2</i>	0,0031±0,0005	0,0000±0,0000	0,0008±0,0003
<i>Δmig1Δmig2</i>	0,0027±0,0003	0,0001±0,0000	0,0016±0,0002

Çizelge 4.2. AOX enzim aktivitesi tayini sonuçları (%)

%	MM	MDM	MGM
X33	100±2	0±0,0	0±0
<i>Δmig1</i>	104±8	0±0,0	0±0
<i>Δmig2</i>	104±18	0±0,0	28±10
<i>Δmig1Δmig2</i>	110±10	4±0,1	51±8

AOX enzim aktivitesi tayini sonucunda, metanol ve glukoz+metanolde gelişen suşlar arasında kayda değer bir farklılık gözlenmezken yalnızca gliserol+metanol besiyerinde gelişen hücrelerin enzim aktivitesinde önemli farklılıklar tespit edilmiştir. Glukoz+metanolde gelişen suşların hiçbirinde AOX enzim aktivitesi ortaya çıkmamıştır. Metanolde gelişen farklı suşlarda ise birbirlerine yakın enzim aktivite değerleri elde edilmiştir. Hücreler, gliserol+metanolde geliştirildiğinde beklendiği üzere X33’de herhangi bir aktivite tespit edilmezken, *Δmig2* hücrelerinde %28±10, *Δmig1Δmig2* hücrelerinde ise %51±8 aktivite değerleri elde edilmiştir (Şekil 4.21).

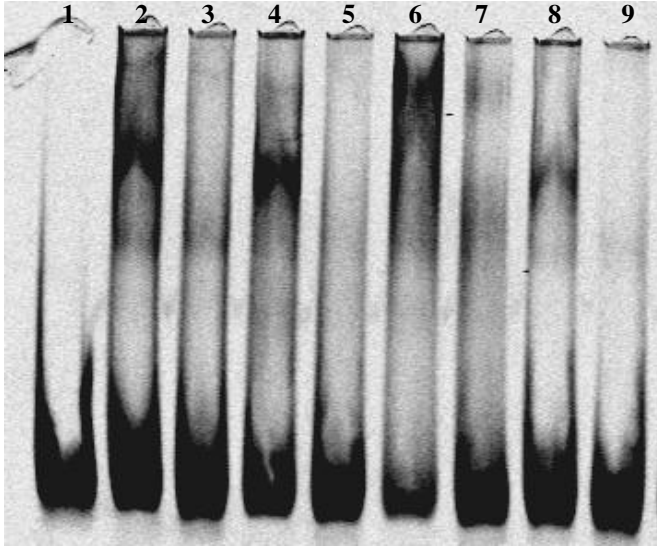


Şekil 4.21. Mutant suşların MM, MDM ve MGM besiyerlerinde gelişen hücrelerin AOX enzim aktivitesi tayini sonuçları

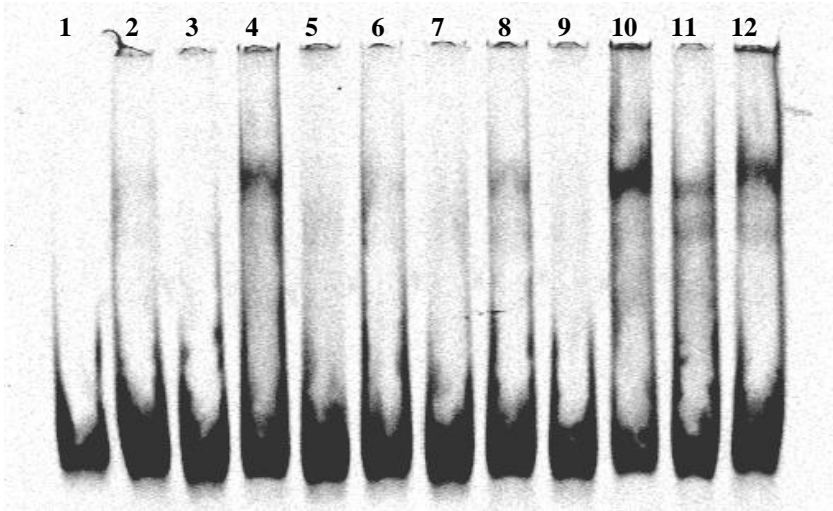
4.2.6. Mutant suşların hücre özütleri ile jel geciktirme analizi

Şekil 4.22’de gliserol+metanolde geliştirilen X33 ve $\Delta mig1$, $\Delta mig2$ ve $\Delta mig1\Delta mig2$ suşlarının hücre özütleri ile gerçekleştirilen jel geciktirme analizi jel görüntüsü yer almaktadır. Prob olarak *AOX1* promotorunun C parçası kullanılmıştır. Suşların hepsinde (2, 4, 6 ve 8 numaralı kuyucuklar daki bantlardan) C parçası ile bağlantı yapan protein ya da proteinlerin varlığı tespit edilmiştir. C parçası ile bağlantı yapan bu protein ya da proteinlerin bağlantılarının spesifik olduğu her bir reaksiyon kuyucuğunun yanındaki kuyulara (3, 5, 7 ve 9 numaralı kuyucuklar) probdan 300 kat daha fazla etiketsiz C parçası eklenince bağlantının kaybolması ile anlaşılmıştır.

Metanol ve glukoz+metanolde gelişen X33 ve $\Delta mig1$, $\Delta mig2$ ve $\Delta mig1\Delta mig2$ suşlarının hücre özütleri ile gerçekleştirilen jel geciktirme analizi sonucunda C parçası ile bağlantı yapan proteinin tüm hücre özütlerinde mevcut olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.23).



Şekil 4.22. MGM besiyerinde gelişen hücrelerin özütleri ile gerçekleştirilen jel geciktirme deneyi. 1 (yalnızca prob), 2 (X33 hücre özütü), 3 (2+etiketsiz prob), 4 ($\Delta mig1$ hücre özütü), 5 (4+etiketsiz prob), 6 ($\Delta mig2$ hücre özütü), 7 (6+etiketsiz prob), 8 ($\Delta mig1 \Delta mig2$ hücre özütü), 9 (8+etiketsiz DNA)

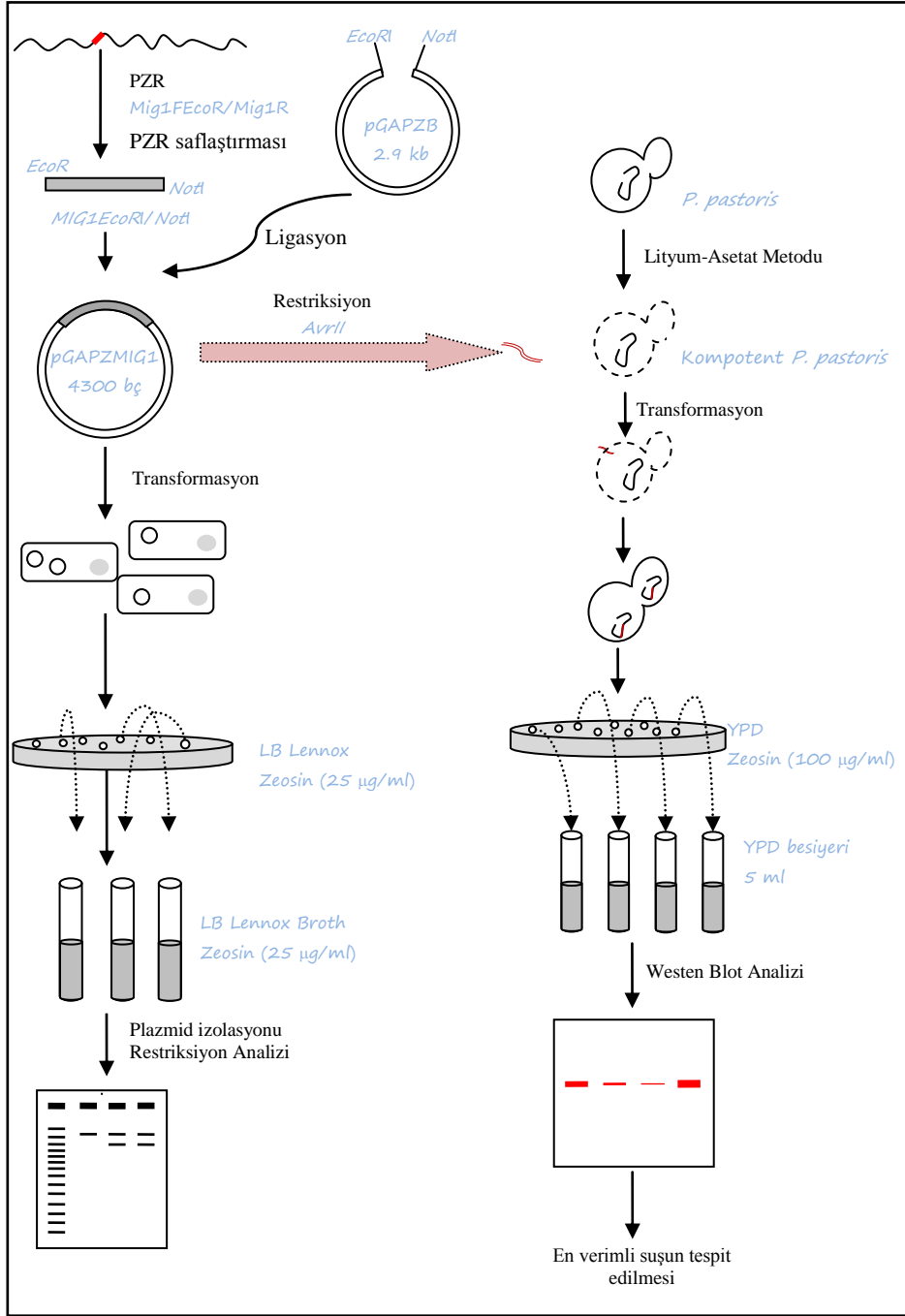


Şekil 4.23. MM besiyerinde gelişen hücrelerin özütleri ile gerçekleştirilen jel geciktirme deneyi. 1 (yalnızca prob), 2 (X33 hücre özütü), 3 (2+etiketsiz prob), 4 ($\Delta mig1$ hücre özütü), 5 (4+etiketsiz prob), 6 ($\Delta mig2$ hücre özütü), 7 (6+etiketsiz prob), 8 ($\Delta mig1 \Delta mig2$ hücre özütü), 9 (8+etiketsiz DNA), 10 (MDM'de gelişen $\Delta mig1$ hücre özütü), 11 (MDM'de gelişen $\Delta mig2$ hücre özütü), 12 (MDM'de gelişen $\Delta mig1 \Delta mig2$ hücre özütü)

4.3. *PpMig1* Proteinin Aşırı Üretimini Gerçekleştirilmesi

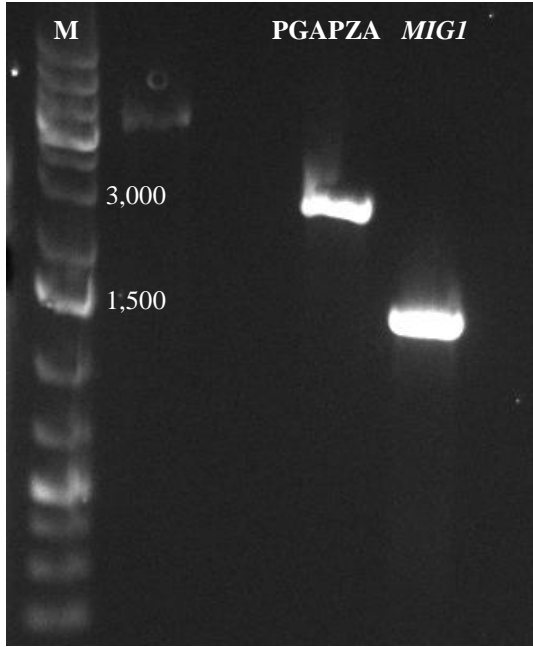
4.3.1. *P. pastoris* Mig1 proteini üretim suşunun oluşturulması

PpMig1 proteininin üretiminin gerçekleştirileceği *P. pastoris* üretim suşunun oluşturulması şematik olarak Şekil 4.24’de gösterilmiştir.



Şekil 4.24. *P. pastoris* Mig1 üretim suşunun oluşturulma basamaklarının şematik olarak gösterimi

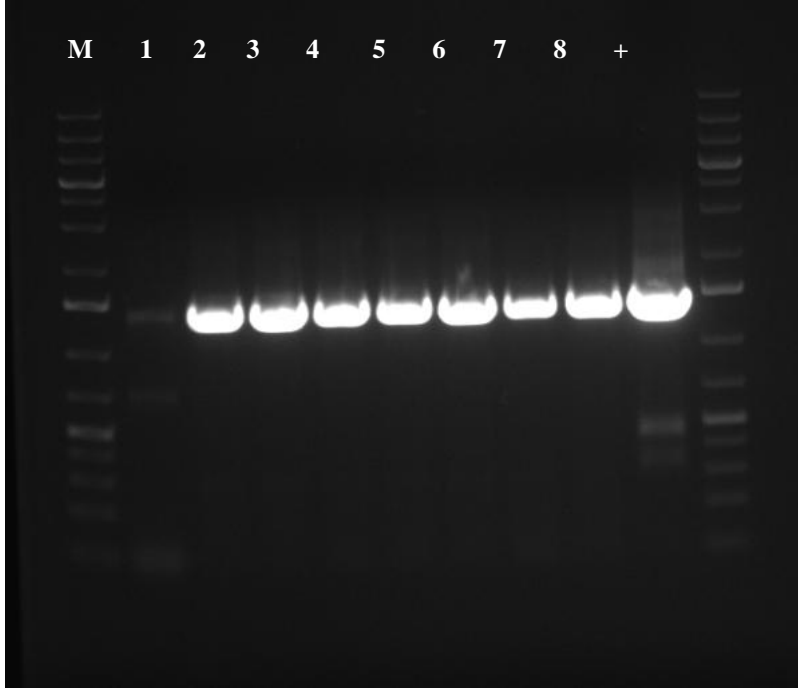
Mig1 proteininin DNA bağlanma özelliklerini araştırmak üzere mayanın kendisi konukçu olarak kullanılarak proteinin aşırı üretimi gerçekleştirilmiştir. Mig1 üretim süşunun elde edilmesi Şekil 4.24’de şematik olarak gösterilmiştir. Öncelikle, yapısal GAP promotörü altında hücre içi üretiminin gerçekleşeceği ekspresyon kaseti pGAPZMIG1 (4,300 bç) oluşturulmuştur. Bunun için, *P. pastoris* X33 genomik DNA’sından Mig1FEcoR/Mig1RNot primer çifti ile PZR gerçekleştirilmiş, elde edilen EcoRI ve NotI kesim bölgelerine sahip olan parçanın PZR saflaştırması yapılmıştır. Daha sonra MIG1 parçası (1,400 bç) ve PGAPZA (2,900 bç) vektörü EcoRI/NotI enzimleri ile kesilerek agaroz jel elektroforezi ile kontrolleri yapılmıştır (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. *EcoRI/NotI* enzimleri ile kesilen PGAPZB vektörü ve *MIG1* parçalarının jel görüntüsü. M: 1 kb DNA standardı

EcoRI ve *NotI* enzimleri ile kesim sonucu oluşan PGAPZA ve *MIG1* parçalarının tamamı jele yüklenmiş, jelden kesilerek alınmış, jel pürifikasyonları yapıldıktan sonra ligasyonları gerçekleştirilmiştir. Ligasyon karışımı yetenekli *E. coli* XL1-Blue hücrelerine aktarılmış, transformant kolonilerin seçilimi zeosin (25 µg/ml) içeren LB Lennox plakalarda yapılmıştır. Geceboyu 37°C’de inkübasyona bırakılan plakalarda gelişen kolonilerden 8 tanesi seçilerek koloni PZR ile hücrelerin pGAPZMIG1 ekspresyon vektörünü taşıyıp taşımadığı kontrol edilmiştir.

GAPF/3'AOX primer çifti ile gerçekleştirilen PZR sonucunun jelde görüntülenmesi ile seçilen 8 koloniden 7'sinin vektörü taşıdığı tespit edilmiştir (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. Transformant XL1-Blue hücrelerinde pGAPZMIG1 ekspresyon vektörünün varlığının kontrolü için gerçekleştirilen koloni PZR sonucunun jel görüntüsü. 1-8: Zeosinli plakada gelişen transformant koloniler, +: pGAPZMIG1, M: 1 kb DNA standardı

Ekspresyon vektörünün varlığının tespit edildiği kolonilerden 6 tanesi, plazmid kontrollerinin yapılması için zeosin içeren LB Lennox sıvı besiyerine inoküle edilip geceboyu 37°C 250 d/dak çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmışlardır. Ertesi gün gelişen kültürlerden plazmid izolasyonu yapılmış ve *Bam*HI ile restriksiyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Restriksiyon sonucunun jelde görüntülenmesi ile (Şekil 4.27), 3,200 bç ve 1100 bç uzunluğundaki parçaları vererek pGAPZMIG1 olduğu doğrulanan plazmitlerden biri seçilerek işlemlere devam edilmiştir.

pGAPZMIG1 plazmidini *Avr*II enzimi ile lineer hale getirilerek 1 µg kadarı yetenekli *P. pastoris* MK115 hücrelerine elektroporasyon yöntemi ile transform edilmiştir. 100 µg/ml zeosin içeren YPD plakalara ekilen transformant hücreler 30°C'de 2-3 gün inkübasyon sonucunda koloniler oluşturmuş, bu kolonilerden seçilen 7 koloni

Mig1 protein ekspresyonunu gerçekleştirmek üzere seçilip, tek koloni oluşturacak şekilde YPD plakalara ekilmiş ve 30 °C’de 3 gün inkübasyona bırakılmışlardır.

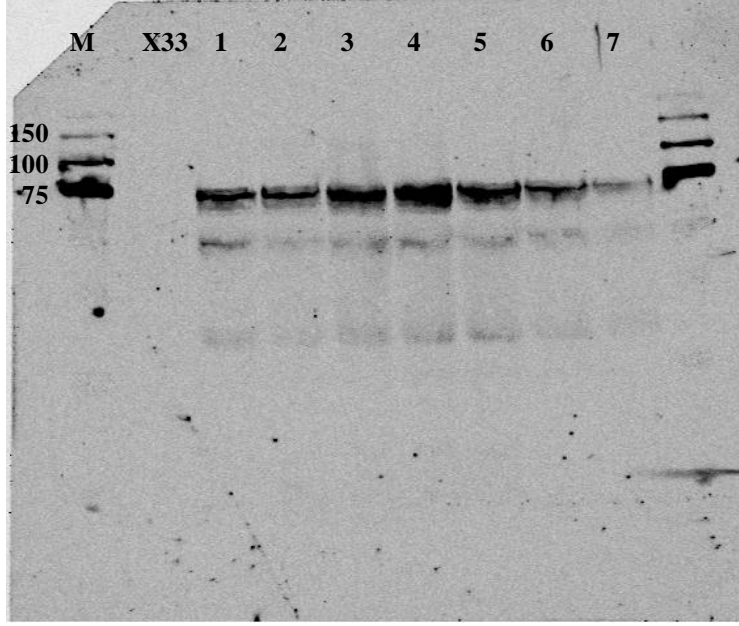


Şekil 4.27. pGAPZMIG1 ekspresyon plazmidinin *Bam*HI ile restriksiyon analizinin jel görüntüsü. 1-6: farklı transformant kolonilerden izole edilen plazmitler

4.3.2. Transformant kolonilerde Mig1 protein üretimlerinin taranması

Seçilen 7 adet *P. pastoris* (pGAPZMIG1) Mig1 hücre-içi ekspresyon suşu, Mig1 proteinini üretip üretmediklerinin kontrol edilmesi amacı ile 3 ml YPD besiyerine ekilerek 30°C’de 250 d/dak çalkalamalı inkübatörde geceboyu inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler, 24 saat geliştirilen kültürlerden 4°C 3000xg’de 5 dakika santrifüjlenerek hasat edilmiştir. Hücre lizis solüsyonu eklenerek kırılan hücrelerden hücre özütü elde edilmiştir. Hücre özütlerinde Mig1 proteininin varlığının kontrolü için Western blot analizi yapılmıştır (Şekil 4.28).

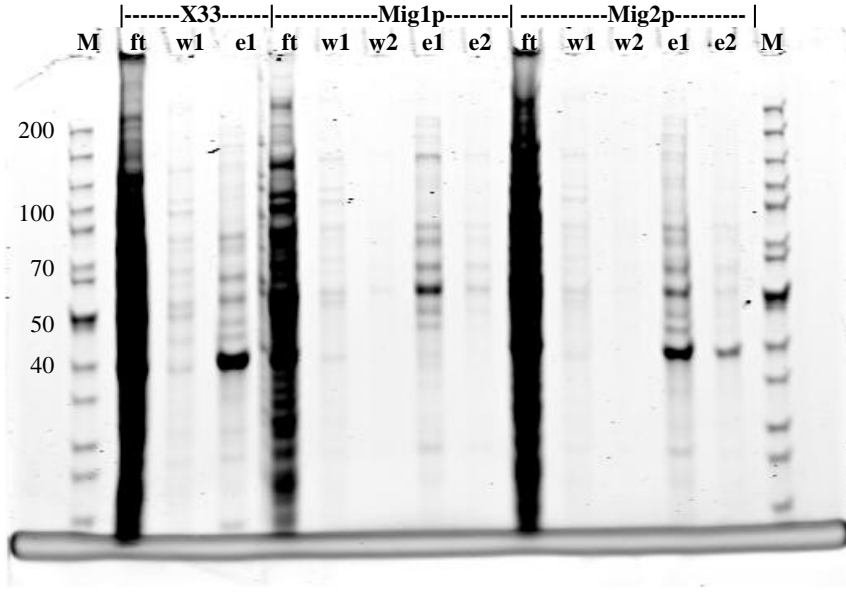
Western blot analizi sonucunda elde edilen membran görüntüsü ile hücre-içi üretim suşu olarak 7 klonun hepsinin Mig1p’ni ürettiği doğrulanmıştır. Büyüklüğünün 50-75 kDa aralığında çıkması beklenen protein bandı 75 kDa çizgisinde çıkmıştır. Klonlardan iki tanesinden donmuş kültür hazırlanmış (4 ve 5 nolu klon), 4 nolu klon ile protein üretimi ve saflaştırma işlemlerine devam edilmiştir.



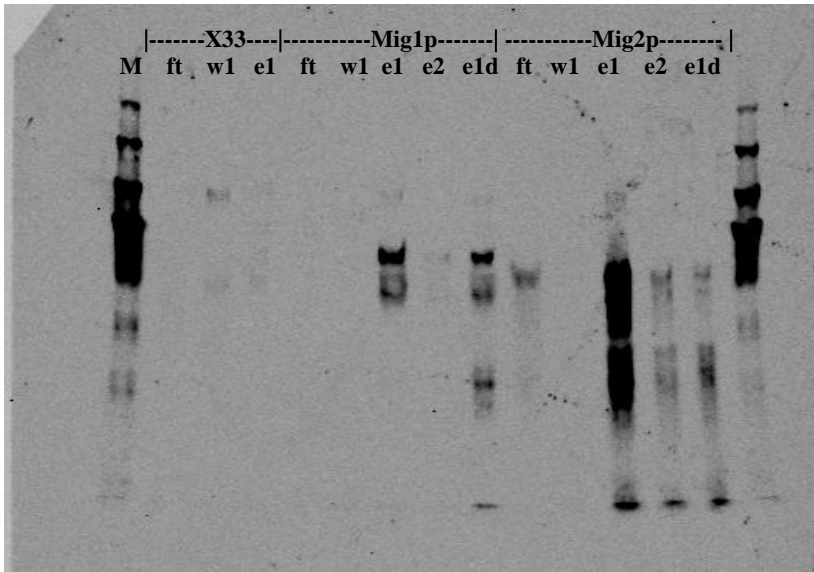
Şekil 4.28. *P. pastoris* (pGAPZMIG1) hücre-içi Mig1 proteini üretim suşlarından elde edilen hücre özütlerinin Western blot analizi sonucunda elde edilen membran görüntüsü. 1-7: *P. pastoris* (pGAPZMIG1) farklı transformant suşlar. X-33: Negatif kontrol *P. pastoris* X-33 suşu. M: Odyssey Protein Molecular Weight Marker, kDa.

4.3.3. Mig1 ve Mig2 proteinlerinin üretimi ve saflaştırılması

Mig1p, Mig2p üretim suşlarından [MK115 (pGAPZMIG1) X33(pGAPZMIG2)] ve kontrol olarak X33 suşundan 3 ml YPD besiyerine inokulum başlatılmış, ertesi gün 125 ml engelli erlenlerde 25 ml BYED besiyerine başlangıç OD (600 nm) değeri 0.1 olacak şekilde ekim yapılmıştır. Protein ekspresyonu 30°C çalkalamalı inkübatörde 24 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin hasat edilip kırılması ile elde edilen hücre özütlerinden proteinler saflaştırılmıştır. Saflaştırma sırasında yapılan yıkama ve elüsyon işlemlerinde elde edilen fraksiyonlar ile SDS-PAGE ve Western blot analizleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.29). Aynı anda yüklenen ve yürütülen 2 jelden biri boyanarak SDS-PAGE görüntüsü elde edilmiş, diğer jel ile Western blot analizine devam edilmiştir.



Şekil 4.29. Saflaştırılmış Mig1 ve Mig2 proteinlerinin SDS-PAGE jel görüntüsü. ft: hücre özütünün ilk süzütüsü, w1 ve w2: birinci ve ikinci yıkama fraksiyonları, e1 ve e2: birinci ve ikinci elüsyon fraksiyonları



Şekil 4.30. Saflaştırılmış Mig1 ve Mig2 proteinlerinin Western blot analizi sonucunun membran görüntüsü. ft: hücre özütünün ilk süzütüsü, w1: birinci yıkama fraksiyonu, e1 ve e2: birinci ve ikinci elüsyon fraksiyonları, e1d: bir önceki protein saflaştırmasından diyaliz edilmiş e1 fraksiyonu.

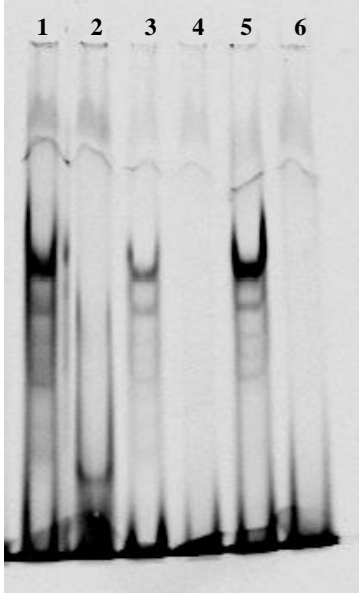
Western blot analizi membran görüntüsünden (Şekil 4.30) Mig1 ve Mig2 proteinlerinin birinci elüsyon fraksiyonunda yoğun bir şekilde elde edildiğini göstermiştir. Daha önce aynı şekilde gerçekleştirilen (1 hafta önce) Mig1 ve Mig2 proteinlerinin saflaştırması, SDS-PAGE ve Western blot analizleri ile kontrolü, birinci

elüsyon fraksiyonlarının diyaliz edilip 4°C'ye kaldırılan örneklerin de bu analizde kontrolü yapılmıştır. Şekil 4.30'da e1d kolonlarına bakıldığında, Mig1 ve Mig2 proteinlerinin +4°C'de beklerken bozunmaya başladığı açıkça görülmektedir.

SDS-PAGE jel görüntüsüne bakıldığında (Şekil 4.29) proteinlerin çok saf bir şekilde elde edilemediği görülmektedir. Kontrol suşu olarak geliştirilen X33 hücrelerinde histidin etiketli protein ekspresyonu gerçekleşmemesine rağmen, hücre özütünün saflaştırması sonucunda birinci elüsyonda 10'dan fazla protein bandı tespit edilmiştir. Bunların arasında yaklaşık 40 kDA boyutuna denk gelen proteinin yoğunluğu hem X33 suşunda hem de X33'ün konukçu olduğu Mig2 üretim suşunda çok dikkat çekicidir. Ortamda, üretilmesi hedeflenen proteinden bile daha fazla bulunan ve saflaştırma yapılırken bertaraf edilemeyen bu proteinin alkol dehidrogenaz (ADH) olduğu daha önce de bildirilmiştir. Ancak, ADH proteini üretmeyen bir suşun konukçu olarak kullanılması ile bu kirliliğin önlenebileceği düşüncesi ile laboratuvarımızda başka bir proje kapsamında geliştirilen *ADH* geni inaktive edilmiş olan suş (MK115) Mig1 proteininin üretimi için konukçu olarak kullanılmıştır. Jelde (Şekil 4.29) Mig1 proteininin bulunduğu e1 fraksiyonuna bakıldığında ADH proteininin artık bulunmadığı ve fakat başka birçok proteinin varlığı ile kirliliğin devam ettiği görülmektedir.

4.3.3. Saflaştırılmış Mig1 ve Mig2 proteinleri ile jel geciktirme analizi

Mig1 ve Mig2 proteinlerinin pürifikasyondan sonra çok saf bir şekilde elde edilememesinden dolayı, kirlilik yapan proteinlerin etkisini bertaraf etmek amacı ile kontrol olarak X33 suşunda da diğer iki üretim suşuna yapılan tüm işlemler aynen uygulanmıştır (protein ekspresyon süreci, pürifikasyon, diyaliz). Her üç suştan elde edilen protein fraksiyonları ile jel geciktirme analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucu elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.27'de verilmiştir.



Şekil 4.31. Saflaştırılmış hücre özütleri ile gerçekleştirilen jel geciktirme analizi gel görüntüsü. 1 (saflaştırılmış X33 hücre özütü), 2 (1+etiketsiz C parçası), 3 (saflaştırılmış Mig1p), 4 (3+etiketsiz C parçası), 5 (saflaştırılmış Mig2p), 6 (5+etiketsiz C parçası)

Her üç protein fraksiyonu ile gerçekleştirilen reaksiyonda C parçasına protein bağlanması gerçekleşmiştir (Şekil 4.31). Bağlanmanın, negatif sonuç vermesi beklenen X33 suşunun saflaştırılmış hücre özütü ile de gerçekleşmesi, Mig1 ve Mig2 proteinlerinden kaynaklanıp kaynaklanmadığının tespitini zorlaştırmıştır.

5. TARTIŞMA

Bu çalışma, *P. pastoris* GS115 gen bankasında yapılan taramada “regülatör protein Mig1” olarak tanımlanan fakat henüz karakterizasyonu yapılmamış olan *PpMIG1* geninin glukoz represyon mekanizmasındaki rolünün araştırılması amacıyla gerçekleştirilmiştir. *P. pastoris* X33 suşundan izole edilen ve dizilemesi yapılan *MIG1* geni 1368 bp uzunluğunda olup kodladığı Mig1 proteini 454 amino asitten oluşmaktadır. Karakterizasyonunun yapıldığı diğer metilotrofik mayaların (*H. polymorpha*, *C. boidinii*) ve *S. cerevisiae*'nin Mig1 proteinleri ile karşılaştırıldığında N-uçlarında bulunan iki adet çinko parmak motife (ZnF1 ve ZnF2) tekabül eden bölgenin mayalar arasında yüksek oranda korunduğu gözlenmiştir (Şekil 4.6). DNA bağlanma bölgesi olarak bilinen C₂H₂ motifine (2 sistein ve 2 histidin) sahip bu bölgenin karşılaştırma yapılan mayalar arasındaki özdeşlik oranı %83.88 olarak tespit edilmiştir. Proteinlerin tamamının homolojisine bakıldığında ise korunmuş bölge dışındaki bölgelerin sınırlı homoloji gösterdikleri belirlenmiştir.

Mig1 ve homologu olan Mig2 proteinlerinin fizyolojik rolünün araştırılması amacı ile *MIG1* geninin *ADE1* ile, *MIG2* geninin ise *HIS4* ile inaktive edilmesi ile mutant suşlar oluşturulmuştur. Farklı karbon kaynaklarında (metanol, glukoz ve gliserol) gelişim grafikleri çıkarılan $\Delta mig1$, $\Delta mig2$ ve $\Delta mig1\Delta mig2$ mutant suşların yabanıl suş X33 ile karşılaştırması yapılmıştır. Farklı karbon kaynaklarında geliştirilen mutant suşlar ve yabanıl suşun gelişim eğrilerine bakıldığında suşlar arasında belirgin bir fizyolojik farkın olmadığı gözlenmiştir. Mutant suşların her üç karbon kaynağında yabanıl suşa benzer gelişim profili sergilemelerine karşın, çok belirgin bir şekilde olmasa da $\Delta mig1\Delta mig2$ ve $\Delta mig1$ suşları X33'den daha fazla hücre yoğunluğuna, $\Delta mig2$ suşu ise daha geriden gelip daha az hücre yoğunluğuna ulaşmıştır. Bu veriden, *MIG2* geninin inaktive edilmesinin, metanol, glukoz ve gliserolde hücre gelişimini düşük oranlarda da olsa negatif yönde etkilerken, *MIG1* geninin inaktive edilmesinin hücre gelişimine pozitif yönde etki ettiği tespitleri yapılabilir.

S. cerevisiae'de, Mig1 ve Mig2 proteinlerinin, birçok genle birlikte *MIG1* geninin katabolit represyonuna da neden olduğu tespit edilmiştir (Kaniak vd 2004).

Mig1 ve Mig2 proteinlerinin aktif oldukları şartlarda *MIG1* geninin ekspresyonunu baskılayarak gerçekleştirdikleri glukoz represyon yolundaki bu geribildirim döngüsünün genler üzerindeki Mig1-aracılı represyonu hafiflettiği, represyonun aşırıya kaçmasını engellediği ve glukozun ortamda bitmesi ile birlikte çok hızlı bir şekilde represyonun ortadan kalkmasını sağladığı yorumları yapılabilir. *Δmig2* suşunun gelişiminin özellikle metanolde gelişirken yabanıl suş, *Δmig1* ve *Δmig1Δmig2* suşlarından geride kalması, Mig2 proteininin yokluğunda *MIG1* üzerindeki baskının bir miktar kalktığı ve *AOX1* geninin daha fazla baskılanması ile sonuçlandığı çıkarımları yapılabilir. *Δmig1Δmig2* ve *Δmig1* suşlarının daha iyi gelişim göstermeleri ise, %100 indüksiyon koşulunda bile (tek karbon kaynağı olarak metanolün bulunduğu besiyerinde) Mig1 proteininin *AOX1* geni üzerinde bulunabilecek olası artık-represyonunun ortadan kalkmış olabileceği ve bu sebeple *Δmig1* mutant hücrelerin daha iyi gelişim sergiledikleri şeklinde yorumlanabilir. *S. cerevisiae*'daki Mig1 proteininin represyon koşullarında kendini kodlayan geni Mig2 proteini ile birlikte baskılayarak represör fonksiyonunu kontrol altında tuttuğu şeklinde çizilen bu modelin *P. pastoris*'te ne kadar geçerli olduğunun anlaşılması için farklı analiz ve çalışmaların yapılması gerekmektedir.

MIG1 ve *MIG2* genlerinin inaktive edilmesinin metanol tetiklemeli *AOX1* geninin transkripsiyonel regülasyonuna etkisinin ne olduğunun anlaşılabilmesi için *Δmig1*, *Δmig2* ve *Δmig1Δmig2* ve X33 suşlarında represyon (glukoz), derepresyon (gliserol) ve indüksiyon (metanol) koşullarında *AOX1* geninin ekspresyon seviyesine *AOX* enzim aktivitesi tayini ile bakılmıştır. Metilotrofik mayaların hepsinde *AOX* genleri glukoz tarafından kuvvetli bir şekilde baskılanmakta, metanol tarafından da kuvvetli bir şekilde tetiklenmektedir. Gliserolde ise durum herbir metilotrofik mayada farklıdır: Gliserol, *P. pastoris* dışındaki mayalarda, %3-70 arasında değişen oranlarda *AOX* geninin derepresyonuna, *P. pastoris*'te ise represyona neden olmaktadır (Hartner ve Glieder, 2006). Nitekim, çalışmamızdaki mutant suş ve X33 hücreleri yalnızca glukoz ve yalnızca gliserol içeren besiyerinde gelişirken hiçbir suшта *AOX* enzim aktivitesi tayin edilememiştir (sonuçlar verilmemiştir). *PpAOX1* geninin ekspresyonu için metanole gereksinim duymasından dolayı glukoz ve gliserol ortamlarına metanol eklemesi yapılarak enzim aktivite deneyleri tekrarlanmıştır.

Gelişim süreçlerinde logaritmik fazlarının ortasında bulunan hücrelerde yapılan AOX enzim aktivitesi tayini sonucunda, metanol ve glukoz+metanolde gelişen X33, *Δmig1*, *Δmig2* ve *Δmig1Δmig2* hücreleri arasında herhangi bir farklılık gözlenmezken yalnızca gliserol+metanol besiyerinde gelişen hücrelerin enzim aktivitesinde suşlar arasında kayda değer farklılıklar tespit edilmiştir. Glukoz+metanolde gelişen suşların hiçbirinde AOX enzim aktivitesi ortaya çıkmamıştır. Metanolde gelişen farklı suşlarda ise birbirlerine yakın enzim aktivite değerleri elde edilmiştir. Metanolde gelişen X33 suşunda hesaplanan AOX aktivitesi %100 kabul edilerek diğer aktivite değerleri yüzdeye çevrildiğinde, gliserol+metanolde gelişen hücrelerde beklendiği üzere X33'de herhangi bir aktivite tespit edilmezken, *Δmig2* hücrelerinde %28±10, *Δmig1Δmig2* hücrelerinde ise %51±8 aktivite değerleri elde edilmiştir (Şekil 4.21). Bu verilerden Mig1 ve Mig2 proteinlerinin *AOX1* geninin negatif regülasyonunda rollerinin olduğu sonucu çıkarılabilir.

Glukozda gelişen *Δmig1*, *Δmig2* ve *Δmig1Δmig2* suşlarında herhangi bir AOX aktivitesinin tespit edilmemiş olması, yalnızca bu sonuçtan yola çıkılarak Mig1 ve Mig2 proteinlerinin *AOX1* geninin glukozdaki katabolit represyonunda önemli bir fonksiyona sahip olmadıkları kanısına varmamıza sebep olabilir. Fakat, metanol tarafından tetiklenen genlerin transkripsiyonları için aktivatörlere ihtiyaçları vardır: HpTrm1p, HpTrm2p (Sasano vd 2008, 2010) ve PpMxr1p (Kranthi vd 2009) gibi. Metanol tetiklemeli genlerin transkripsiyonları için ihtiyaç duyulan transkripsiyonel aktivatörler, ortamda glukoz varken aktivatör fonksiyonlarını yerine getiremezler. Örneğin *H. polymorpha*'da hücreler glukozda gelişirken Trm1p ve Trm2p aktivatörleri metanol-tetiklemeli promotorlara bağlanamazlar, çünkü hücre içindeki lokasyonları glukoz tarafından regüle edilir: glukozun varlığında Trm2p çekirdekte değil sitoplazmada bulunur (Sasano vd 2008, 2009).

P. pastoris'te *AOX1* geninin ekspresyonu için gerekli olduğu tespit edilen transkripsiyonel aktivatör Mxr1p düşük seviyelerde yapısal olarak üretilen bir DNA bağlanma proteindir. Regülasyonunun hücre içinde bulunduğu yerin değişmesi şeklinde translasyon sonrası gerçekleştiği düşünülmekle beraber karbon kaynağına bağlı inhibisyonu ve metanol tarafından tetiklenen aktivasyonunun moleküler mekanizması

hakkında henüz yeterli bilgi elde edilmemiştir. Yapılan bir çalışmada, Mxr1 proteininin hücreler glukozda gelişirken sitoplazmada bulunduğu, metanol ya da oleata geçirildiklerinde ise çekirdeğe geçiş yaptıkları gösterilmiştir (Lin-Cereghino vd 2006). Gliserol ya da etanolde ise Mxr1p çekirdekte lokalize olur fakat *AOX1* promotorunun bu karbon kaynakları tarafından baskılanması yine de devam etmektedir. Bu nedenle Mxr1p'nin fonksiyonunun yalnızca hücre içinde yer değiştirmesi şeklinde regüle edilmediği, karbon kaynağına göre tepki veren başka faktörler ve proteinlerin de regülasyon mekanizması içinde yer aldığı öne sürülmüştür (Lin-Cereghino vd 2006).

Glukozda gelişen *MIG1* ve *MIG2* mutant hücrelerde AOX enzim aktivitesinin tespit edilememiş olması sonucundan yola çıkarak, Mig1 ve Mig2 proteinlerinin *AOX1* promotor bölgesine bağlanmamasının, represyonun ortadan kalkması ve *AOX1* transkripsiyonunun başlamasına yol açmak için yeterli olmadığı, bununla birlikte aktivatör proteinler gibi başka faktörlerin de devreye girmesinin gerekli olduğu yorumu yapılabilir. Glukozda gelişirken regülasyonu sitoplazmada kalacak şekilde yapılan Mxr1p'nin çekirdeğe giremediği ve bu yüzden *AOX1* geninin ekspresyonunu başlatamadığı varsayımında bulunulabilir. Bu varsayımın geçerli olup olmadığının anlaşılabilmesi için daha fazla çalışmanın yapılması gerekir.

Gliserol+metanolde gelişen $\Delta mig2$ ve $\Delta mig1\Delta mig2$ hücrelerde tespit edilen AOX enzim aktivitesi ise gliseroldeki aktivatör ve represör proteinlerin birbirlerine göre konumlarının glukozdakinden daha farklı olmasından kaynaklanmış olabilir. Aktivatör Mxr1 proteininin gliserolde, glukozdan farklı olarak çekirdekte yer alıyor olmasının, tespit edilen kısmi enzim aktivitesine yol açan faktörlerden biri olduğu savunulabilir. Tam indüksiyonun gerçekleşmemesinin nedeni olarak ise Mxr1 proteininin çekirdekte yer almasına rağmen karbon kaynağı tarafından regüle edilen olaylarla aktivitesinin kontrol altında tutuluyor olması ve ayrıca represör proteinlerle promotorda aynı bölgeye bağlanmak için rekabet içinde olması gösterilebilir.

AOX1 promotoruna Mig1 ya da Mig2 proteininin bağlanıp bağlanmadığının tespit edilebilmesi için gerçekleştirilen jel geciktirme analizlerinde, metanol, gliserol+metanol, glukoz+metanol besiyerlerinde geliştirilen X33, $\Delta mig1$, $\Delta mig2$ ve

Δmig1Δmig2 mutant suşlarının hücre özütleri ile C parçasının reaksiyonu sonucunda her bir suşun her üç karbon kaynağında gelişirken de C parçasına bağlanan proteine ya da proteinleri sahip oldukları ortaya çıkmıştır (Şekil 4.22, Şekil 4.23). C parçasına bağlanan proteinin Mig1 ve Mig2 olabileceği savı ile mutant suşların hücre özütleri kullanılarak gerçekleştirilen jel geciktirme analizinde, *Δmig1Δmig2* suşunda bile bağlantının kaybolmaması, bağlanan proteinlerin Mig1 ya da Mig2 olup olmadıkları konusunda yorum yapılmasını zorlaştırmıştır.

Yine aynı amaçla fakat bu kez *P. pastoris*'te aşırı üretimleri gerçekleştirilip saflaştırılan Mig1 ve Mig2 proteinleri ile yapılan jel geciktirme analizlerinde ise yine yorum yapmayı zorlaştıran bir sonuç elde edilmiştir (Şekil 4.31). Kontrol suşu X33'den pürifikasyon sonrası elde edilen protein fraksiyonu ile C parçasının bağlantı gerçekleştirilmesinden dolayı, Mig1 ve Mig2 proteinleri ile gerçekleşen bağlantıların Mig1 ve Mig2 proteinlerinden kaynaklandığı iddia edilememiştir. Bu nedenlerle, jel geciktirme analizlerinden fonksiyonel analiz sonuçlarına katkıda bulunacak herhangi bir sonuç elde edilememiştir. Protein saflaştırması ve jel geciktirme analizlerinin daha iyi optimize edilmesi ile gerçekleştirilecek yeni analizlerden elde edilecek olan sonuçlar kuşkusuz ki konunun açığa kavuşturulmasını sağlayacaktır.

6. SONUÇ

Pichia ekspresyon sisteminde en yaygın olarak kullanılan promotörün (*AOX1* promotörü) regülasyon mekanizmasının moleküler seviyede ortaya çıkarılması ve anlaşılmasının, protein üretim işlemlerinin optimizasyonuna çok önemli faydaları olacaktır. Her duruma uyan, genel ve en iyi tek bir promotörün varlığından söz etmek mümkün değildir. Protein üretiminde, promotörün regülasyon mekanizması, üretilen (hedef) protein ve üretim süreci bir bütün olarak değerlendirilmelidir. Örneğin, kuvvetli bir promotör non-toksik proteinlerin üretimi için idealken, biyolojik aktivitelerinden dolayı konukçu hücreye zararlı etkileri olan proteinlerin (proteazlar ya da toksinler gibi) üretiminde promotörün daha zayıf versiyonların kullanılması gerekebilir. Bu nedenle promotörlerin regülasyon mekanizmalarının transkripsiyonal seviyede anlaşılması, üretim optimizasyonu açısından çok büyük önem taşımaktadır.

P. pastoris AOX1 geninin katabolit represyon mekanizmasında Mig1 ve Mig2 proteinlerinin rollerinin araştırılmasına yönelik olarak yapılmış olan bu çalışmada, *MIG1* ve *MIG2* genlerinin inaktive edilmesinin hücrelerin farklı karbon kaynaklarında gelişiminde çarpıcı bir değişikliğe neden olmadığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, *MIG1* ve *MIG2* mutant suşlar glukoz ve gliserolde geliştirildiklerinde, glukozda gelişen hücrelerde *AOX1* promotörünün üzerindeki represyon devam ederken, gliserolde gelişen hücrelerde $\Delta mig2$ ve $\Delta mig1\Delta mig2$ suşlarında sırasıyla ~%30 ve ~%50 alkol oksidaz aktivitesi tespit edilerek represyonun bir miktar ortadan kalktığı gösterilmiştir. Elde edilen sonuçların yorumlanması ile *PpAOX1* promotörünün katabolit represyon mekanizmasında başlıca Mig2 olmak üzere her iki proteinin de (Mig1 ve Mig2) rollerinin olduğunun açıkça gösterildiği sonucuna varılmıştır. Gliserol ve glukoz karbon kaynaklarının *PpAOX1* promotörünü baskılama mekanizmalarında farklı faktörlerin rol oynadığının da ortaya çıkarılmış olması göze çarpan sonuçlar arasındadır. Çok fazla faktörün rol oynadığı *PpAOX1* geninin represyon mekanizmasının daha fazla aydınlatılabilmesi için daha ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

- AHUATZI, D., HERRERO, P., CERA, T.D. and MORENO, F. 2004. The glukoz regulated nuclear localization of hexokinase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* is Mig1-dependent. *J. Biol. Chem.* 279, 14440-14446.
- AHUATZI, D., RIERA, A., PELAEZ, R., HERRERO, P. and MORENO, F. 2007. Hxk2 regulates the phosphorylation state of Mig1 and therefore its nucleocytoplasmic distribution. *J. Biol. Chem.* 282, 4485-4493.
- ALAMAE, T., PARN, P., VIIGAND, K. and KARP, H. 2003. Regulation of the *Hansenula polymorpha* maltase gene promoter in *H. polymorpha* and *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 4(2),165-173.
- ANONİM. 2006. Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000204. (<http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASListings/ucm153734.htm>).
- CERA, T.D., HERRERO, P., MORENO-HERRERO, F., CHAVES, R.S. and MORENO, F. 2002. Mediator factor Med8p interacts with the hexokinase 2: implication in the glukoz signalling pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* 319, 703-714.
- CHRISTENSEN, T., OLIVEIRA, A. and NIELSEN, J. 2009. Reconstruction and logical modeling of glukoz repression signaling pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Systems Biology*, 3:7.
- CREGG, J., CEREGHINO, J., SHI, J. and HIGGINS, D. 2000. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology* 16, 23-52.
- CREGG, J., VEDVICK, T. and RASCHKE, W. 1993. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology* 11, 905-1000.
- CREGG, J., MADDEN, K., BARRINGER, K., THILL, G. and STILLMAN, C. 1989. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Cell Biol.* 9, 1316-1323.
- DE SCHUTTER, K., LIN, Y., TIELS, P., HECKE, A.V., GLINKA, S. and WEBER-LEHMANN, J. 2009. Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nat Biotechnol.* 27, 561–566.
- DERISI, J., IYER, V. and BROWN, P. 1997. Exploring the metabolic and genetic expression on a genomic scale. *Science* 278, 680-686.
- DEVIT, M., WADDLE, J. and JOHNSTON, M. 1997. Regulated nuclear translocation of the Mig1 glukoz repressor. *Mol. Biol. Cell* 8, 1603-1618.

- DEVIT, M. and JOHNSTON, M. 1999. The nuclear exportin Msn5 is required for nuclear export of the Mig1 glukoz repressor of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Biology* 9, 1231-1241.
- DIJK, R.V., FABER, K., KIEL, J., VEENHUIS, M. and KLEI, I.V. 2000. The methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*: a versatile cell factory. *Enzyme Microb Technology* 26, 793-800.
- ENTIAN, K.D. 1980. Genetic and biochemical evidence for hexokinase PII as a key enzyme involved in carbon catabolite repression in yeast. *Mol. Gen. Genet.* 178, 633-637.
- GANCEDO, J. 1998. Yeast Carbon Catabolite Repression. *Microbiol Mol Biol Rv* 62, 334-361.
- GANCEDO, C. and FLORES, C.L. 2008. Moonlighting Proteins in Yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 197-210.
- GELLISSEN, G. 2000. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl Microbial Biotechnol* 54, 741-750.
- GODECKE, S., ECKART, M., JANOWICZ, Z. and HOLLENBERG, C. 1994. Identification of sequences responsible for transcriptional regulation of the strongly expressed methanol oxidase-encoding gene in *Hansenula polymorpha*. *Gene* 139, 35-42.
- GONCHAR, M., MAIDAN, M., KORPAN, Y., SIBIRNY, V., KOTYLAK, Z. and SIBIRNY, A. 2002. Metabolically engineered methylotrophic yeast cells and enzymes as sensor biorecognition elements. *FEMS Yeast Res* 2, 307-314.
- HARTNER, F. and GLIEDER, A. 2006. Regulation of methanol utilization pathway genes in yeasts. *Microb Cell Fact* 5, 39.
- HARTNER, F., RUTH, C., LANGENEGGER, D., JOHNSON, S., HYKA, P., LINCEREGHINO, G. et al. 2008. Promoter library designed for fine-tuned gene expression in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acid Research* 36, 76-91.
- HERRERO, P., GALINDEZ, J., RUIZ, N., MARTINEZ-CAMPA, C. and MORENO, F. 1995) Transcriptional regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* *HXK1*, *HXK2* and *GLK1* genes. *Yeast* 11, 137-144.
- HILT, W. and WOLF, D. 1992. Stress-induced proteolysis in yeast. *Mol. Microbiol.* 6, 2437-2442.
- HU, Z., NEHLIN, J. O., RONNE, H. and MICHELS, C. A. 1995. *MIG1*-dependent and *MIG1*-independent glukoz regulation of *MAL* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 28, 258-266.

- İNAN, M. 2000. Studies on the Alcohol Oxidase (*AOX1*) Promoter of *Pichia pastoris*. Ph.D. Thesis, University of Nebraska, 98 p.
- İNAN, M. and MEAGHER, M. 2001a. The effect of ethanol and acetate on protein expression in *Pichia pastoris*. *J Biosci Bioeng* , 92, 337-341.
- İNAN, M. and MEAGHER, M. 2001b. Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase (*AOX1*) promoter of *Pichia pastoris*. *J Biosci Bioeng* , 92, 585-589.
- JOHNSTON, M. 1999. Feasting, fasting and fermenting. Glukoz sensing in yeast and other cells. *Trends Genet*, 29-33.
- JONSTON, M. and KIM, J. 2005. Glukoz as a hormone: receptor-mediated glukoz sensing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Soc Trans*, 33(1), 247-252
- KANIAK, A., XUE, Z., MACOOL, D., KİM, J. and JOHNSTON, M. 2004. Regulatory Network Connecting Two Glukoz Signal Transduction Pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eucaryotic Cell*, 221-231.
- KARP, H., JARVISTE, A., KRIEGEL, T. and ALAMAE, T. 2003. Cloning and biochemical characterization of hexokinase from the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Curr. Genet*. 44, 268-276.
- KLEIN, C.J., OLSSON, L. and NIELSEN, J. 1998. Glukoz control in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of *MIG1* in metabolic functions. *Microbiology*, 13-24.
- KRAMARENKO, T., KARP, H., JARVISTE, A. and ALAMAE, T. 2000. Sugar repression in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* studied by using hexokinase-negative, glucokinase-negative and double kinase-negative mutants. *Folia Microbiol (Praha)*, 45, 521-529.
- KRANTHI, B., KUMAR, N.R., RAO, D. and RANGARAJAN, P. 2009. Identification of key DNA elements involved in promoter recognition by Mxr1p, a master regulator of methanol utilization pathway in *Pichia pastoris*. *Biochim Biophys Acta*, 1789, 460-468.
- KRANTHI, B., KUMAR, H.V. and RANGARAJAN, P. 2010. Identification of Mxr1p-binding sites in the promoters of genes encoding dihydroxyacetone synthase and peroxin 8 of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Yeast*, 27, 705-711.
- KÜBERL, A., SCHNEIDER, J., THALLINGER, G., ANDERL, I., WIBBERG, D., HAJEK, T. et al. 2011. High-quality genome sequence of *Pichia pastoris* CBS7435. *J.Biotechnol.*, 154(4), 312-320.
- LAHT, S., KARP, H., KOTKA, P., JARVISTE, A. and ALAMAE, T. 2002. Cloning and characterization of glucokinase from a methylotrophic yeast *Hansenula*

polymorpha: different effects on glukoz repression in *H. polymorpha* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 296, 195-203.

LIN-CEREGHINO, J. and LIN-CEREGHINO, G.P. 2007. Vectors and strains for expression. In: J.M. Cregg (Editor), *Methods in Molecular Biology*, vol. 389: *Pichia Protocols*, 2. Edition, Humana Press Inc., pp. 11-21, Totowa, NJ.

LIN-CEREGHINO, G., GODFREY, L., CRUZ, B.D., JOHNSON, S., KHUONGSATHIENE, S., TOLSTORUKOV, I. et al. 2006. Mxr1p, a key regulator of the methanol utilization pathway and peroxisomal genes in *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol*, 26, 883-897.

LIN-CEREGHINO, J. and CREGG, J. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 45-66.

LUTFIYYA, L., IYER, V., DERISI, J., DEVIT, M., BROWN, P. and JOHNSTON, M. 1998. Characterization of three related glukoz repressors and genes they regulate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 150, 1377-1391.

MACAULEY-PATRICK, S., FAZENDA, M. and MCNEIL, L.H. 2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 22, 249-270.

MATTANOVICH, D., GRAF, A., STADLMANN, J., DRAGOSITS, M., REDL, A., MAURER, M. et al. 2009. Genome, secretome and glukoz transport highlight unique features of the protein production host *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories*, 8, 29.

MAURO, E.D., KENDREW, S. and CASERTA, M. 2000. Two distinct nucleosome alterations characterize chromatin remodelling at the *Saccharomyces cerevisiae* *ADH2* promoter. *J Biol Chem*, 275, 7612-7618.

MCCARTNEY, R.R. and SCHMIDT, M.C. 2001. Regulation of Snf1 kinase. Activation requires phosphorylation of threonine 210 by an upstream kinase as well as a distinct step mediated by the Snf4 subunit. *J. Biol. Chem.*, 276, 36460-36466.

NAKAGAWA, T., MIZUMURA, T., MUKAIYAMA, H., MIYAJI, T., YURIMOTO, H. and KATO, N. 2002. Physiological role of the second alcohol oxidase gene *MOD2* in the methylotrophic growth of *Pichia methanolica*. *Yeast*, 19, 1067-1073.

NEEDHAM, P.G. and TRUMBLY, R.J. 2006. In vitro characterization of the Mig1 repressor from *Saccharomyces cerevisiae* reveals evidence for monomeric and higher molecular weight forms. *Yeast*, 1151-1166.

- NEHLIN, J.O. and RONNE, H. 1990. Yeast MIG1 repressor is related to the mammalian early growth response and Wilm's tumour finger proteins. *EMBO J*, 9, 2891-2898.
- OSTLING, J. and RONNE, H. 1998. Negative control of the Mig1p repressor by Snf1p-dependent phosphorylation in the absence of glukoz. *Eur. J. Biochem.*, 252, 162-168.
- OZIMEK, P., LAHTCHEV, K., KIEL, J., VEENHUIS, M. and KLEI, I.V. 2004. *Hansenula polymorpha* Swi1p ve Snf2p are essential for methanol utilization. *FEMS Yeast Res.*, 4, 673-682.
- OZIMEK, P., VEENHUIS, M. and KLEI, I.V. 2005. Alcohol oxidase: A complex peroxisomal, oligomeric flavoprotein. *FEMS Yeast Research*, 5, 975-983.
- PAPAMICHOS-CHRONAKIS, M., GLIGORIS, T. and TZAMARIAS, D. 2004. The Snf1 kinase controls glukoz repression in yeast by modulating interactions between the Mig1 repressor and the Cyc8-Tup1 co-repressor. *EMBO Rep.*, 5(4), 368-372.
- PARUA, P.K., RYAN, P.M., TRANG, K. and YOUNG, E.T. 2012. *Pichia pastoris* 14-3-3 regulates transcriptional activity of the methanol inducible transcription factor Mxr1 by direct interaction. *Molecular Microbiology*, 85(2), 282-298.
- RASCHKE, W.C., NEIDITCH, B.R., HENDRICKS, M. and CREGG, J.M. 1996. Inducible expression of heteroloous protein in *Hansenula polymorpha* using the alcohol oxidase I promoter of *Pichia pastoris*. *Gene*, 177, 163-167.
- RODRIGUEZ, L., NARCIANDI, R.E., ROCA, H., CREMATA, J., MONTESINOS, R., RODRIGUEZ, E., GRILLO, J.M., MUZIO, V., HERRERA, L.S. and DELGADO, J.M. 1996. Invertase secretion in *Hansenula polymorpha* under the *AOX1* promoter from *Pichia pastoris*. *Yeast* 1996, 12, 815-822.
- ROGGENKAMP, R., Z. JANOWICZ, B.S. and HOLLENBERG, C. 1984. Biosynthesis and regulation of the peroxisomal methanol oxidase from the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Mol. Gen. Genet.*, 194, 489-493.
- ROMANOS, M., SCORER, C. and CLARE, J. 1992. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*, 8, 423-488.
- SAMBROOK, J. and RUSSELL, D.W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold 639 Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SASANO, Y., YURIMOTO, H., YANAKA, M. and SAKAI, Y. 2008. Trm1p, a Zn(II)₂Cys₆-type transcription factor, is a master regulator of methanol specific

- gene activation in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *Eukaryot Cell*, 7, 527-536.
- SASANO, Y., YURIMOTO, H., KURIYAMA, M. and SAKAI, Y. 2010. Trm2p-dependent derepression is essential for methanol-specific gene activation in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *FEMS Yeast Res*, 10, 535-544.
- SEARS, I., O'CONNOR, J., ROSSANESE, O. and GLICK, B. 1998. A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris*. *Yeast*, 14, 783-790.
- STASYK, O., STASYK, O., KOMDUUR, J., VEENHUIS, M., CREGG, J. and SIBIRNY, A. 2004. A hexose transporter homologue controls glukoz repression in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *J. Biol. Chem.*, 279, 8116-8125.
- STASYK, O., ZUTPHEN, T., KANG, H., STASYK, O., VEENHUIS, M. and SIBIRNY, A. 2007. The role of *Hansenula polymorpha* *MIG1* homologues in catabolite repression and pexophagy. *FEMS Yeast Research*, 7, 1103-1113.
- TZAMARIAS, D. and STRUHL, K. 1995. Distinct TPR motifs of Cyc8 are involved in recruiting the Cyc8-Tup1 corepressor complex to differentially regulated promoters. *Genes Dev.*, 9, 821-831.
- VEENHUIS, M. and KLEI, I.V. 2002. Peroxisomes: surprisingly versatile organelles. *Biochim Biophys Acta*, 1555, 44-47.
- WESTERGAARD, S., OLIVEIRA, A., BRO, C., OLSSON, L. and NIELSEN, J. 2007. A systems biology approach to study glukoz repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 96, 134-145.
- WESTHOLM, J., NORDBERG, N., MUREN, E., AMEUR, A., KOMOROWSKI, J. and RONNE, H. 2008. Combinatorial control of gene expression by the three yeast repressors Mig1, Mig2 and Mig3. *BMC Genomics*, 9, 601-616.
- WILDT, S. and GERNGROSS, T.U. (2005). The humanization of N-glycosylation pathways in yeast. *Nat Rev Microbiol*, 3, 119-128.
- XUAN, Y., ZHOU, X., ZHANG, W., ZHANG, X., SONG, Z. and ZHANG, Y. 2009. An upstream activation sequence controls the expression of *AOX1* gene in *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Res*, 9, 1271-1282.
- YURIMOTO, H., KOMEDA, T. and LIM, C. 2000. Regulation and valuation of five methanol-inducible promoters in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *Biochim Biophys Acta*, 1493, 56-63.

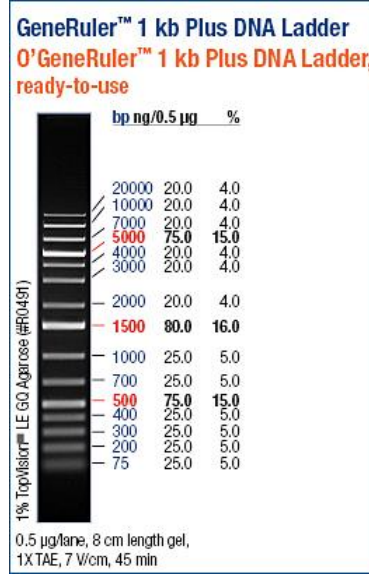
- ZHAI, Z., YURIMOTO, H., and SAKAI Y. 2012. Molecular characterization of *Candida boidinii* *MIG1* and its role in the regulation of methanol-inducible gene expression. *Yeast*, 293-301.
- ZHANG, P., ZHANG, W., ZHOU, X., BAI, P., CREGG, J. and ZHANG, Y. 2010. Catabolite repression of Aox in *Pichia pastoris* is dependent on hexose transporter *PpHxt1* and pexophagy. *Applied and Environmental Microbiology*, 6108-6118.

8. EKLER

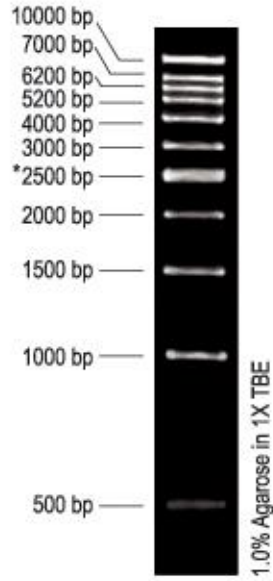
Ek 8.1. Çalışmada kullanılan primerler

Primer adı	Hedef gen/Amaç	Sekans
Mig1FATG	<i>MIG1</i> amplifikasyonu	5' -ATGACTACTGCTCCACCAACG-3'
Mig1RSTP	<i>MIG1</i> amplifikasyonu	5' -TCAAGAGTCCGAGTTCATGATATTG-3'
Mig1FXhoI	Mig1p ekspresyonu	5' -ACTCGAGAAGAGAATGACTACTGCTCCACC AACG-3'
Mig1RNotI	Mig1p ekspresyonu	5' -GCGGCCGCTTAATGATGATGATGATGATGAG AGTCCGAGTTCATGATATTG-3'
Mig1FEcoRI	Mig1p ekspresyonu	5' -AAGAATTCATGACTACTGCTCCACCAACG- 3'
Mig1F235	<i>MIG1</i> dizileme	5' -CGGAAGGACGAAGAACAAGC-3'
Mig1R235	<i>MIG1</i> dizileme	5' -GCTTGTCTTTCGTCTTCCG-3'
Mig1F543	<i>MIG1</i> dizileme	5' -ACAACCACAGCAACAACCG-3'
Mig1R453	<i>MIG1</i> dizileme	5' -GGTTTGAGAAGTCCCTGCCA-3'
Mig1F969	<i>MIG1</i> dizileme	5' -ATTTCAAACCTGGTCTCGCCC-3'
Mig1R969	<i>MIG1</i> dizileme	5' -GGGCGAGACCAAGTTTGAAT-3'
ADE1FBsp1407I	<i>ADE1</i> izolasyonu	5' -TGTACAGGGTGCTATCGTTTTGTGC-3'
ADE1RBgII	<i>ADE1</i> izolasyonu	5' -AGATCTCTTTTCTGACGAACCAC-3'
Mig2FATG	<i>MIG2</i> nakavt kontrolü Prob yapımı	5' -ATGACCACTGCCTATCCCAAC-3'
Mig2470R	Prob yapımı	5' -GGGAAAGAGGAAGCGTCATC-3'
Mig2R1043	<i>MIG2</i> nakavt kontrolü	5' -TGCTGTGCCAAGTTAGATGT-3'
Mig2RSTP	<i>MIG2</i> nakavt kontrolü	5' -TCATTTCTTTTCTTGATTTTCCAGAG-3'
GAPF	Koloni PZR	5' -GTCCCTATTTCAATCAATTGAA-3'
3'AOX	Koloni PZR	5' -GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'
C1F	C parçası prob yapımı	5' -TCCGAATGCAACAAGCTC-3'
C7R	C parçası etiketsiz prob yapımı	5' -CCAAGACAGCGTTTAAACTG-3'
C7RIR	C parçası IR etiketli prob yapımı	5' -CCAAGACAGCGTTTAAACTG-3'

Ek 8.2. Çalışmada Kullanılan DNA ve Protein Standartları

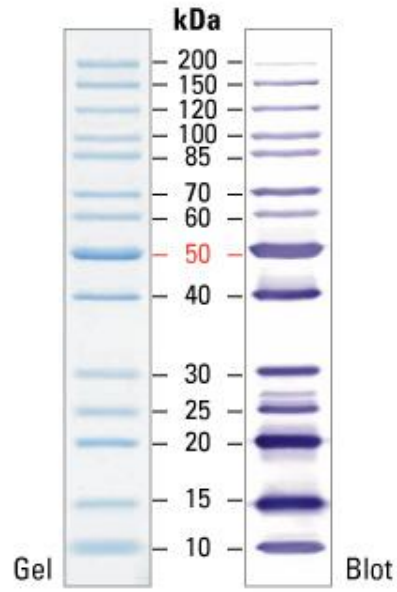


Agaroz jel elektroforezinde kullanılan DNA standardı: O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD)



Agaroz jel elektroforezinde kullanılan DNA standardı: 1 kb DNA ladder (Vivantis, CA, ABD)

Ek 8.2'nin Devamı. Çalışmada Kullanılan DNA ve Protein Standartları

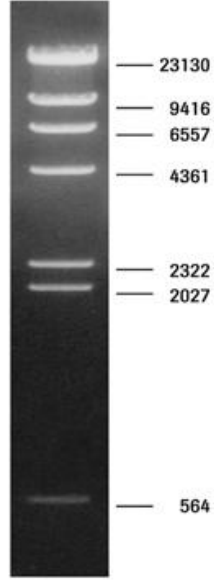


SDS-PAGE analizinde kullanılan protein standardı: PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD)



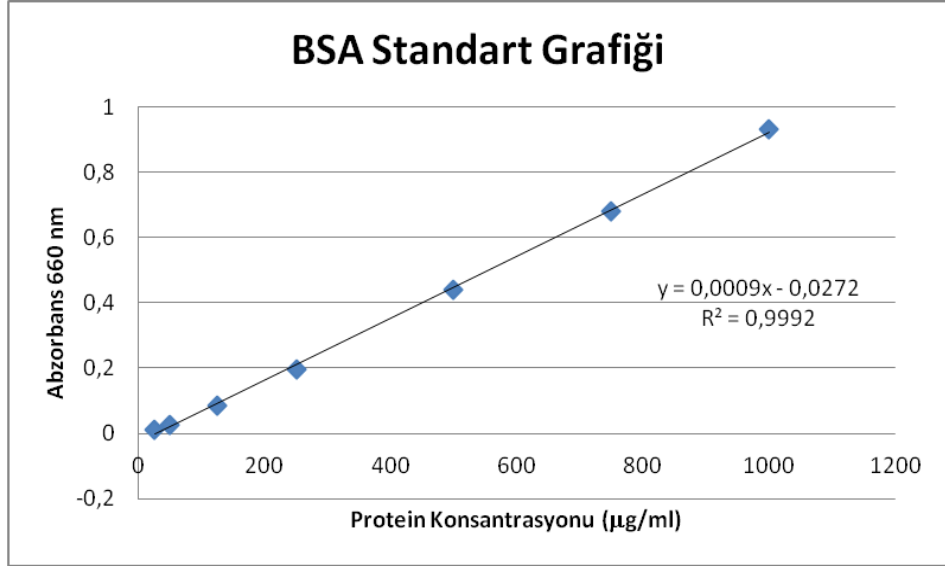
Western blot analizinde kullanılan protein standardı: Odyssey Protein Molecular Weight Marker (Li-Cor, NE, ABD)

Ek 8.2'nin Devamı. Çalışmada Kullanılan DNA ve Protein Standartları



Southern blot analizinde kullanılan DNA standardı: DNA Molecular Weight Marker II DIG-labeled (Roche, Almanya)

Ek 8.3. Toplam Protein Tayini Standart Grafiği



Toplam protein tayini için farklı konsantrasyonlardaki BSA standardının 660 nm abzorbans değerleri ile çizilmiş standart grafiği

ÖZGEÇMİŞ

Semiramis YILMAZ 1975 yılında Ankara'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Düzce'de, lise öğrenimini Aksaray'da tamamladı. Lisans derecesini 1997 yılında Orta Doğu Teknik Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden aldı. 2010 yılında Yeditepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda başladığı yüksek lisansına Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda devam etti. Evli ve 2 çocuk annesidir.