

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ZEYTİN BETA GLUKOZİDAZ GENİ'NİN *Pichia pastoris*'TE EKSPRESYONU

GÖZDE ZEYTUN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI**

**DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. ŞENAY VURAL KORKUT**

İSTANBUL, 2016

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ZEYTİN BETA GLUKOZİDAZ GENİ'NİN *Pichia pastoris*'TE EKSPRESYONU

Gözde ZEYTUN tarafından hazırlanan tez çalışması 18.03.2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT
Yıldız Teknik Üniversitesi

Eş Danışmanı

Arş. Gör. Dr. Günseli KURT GÜR
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Yrd. Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT
Yıldız Teknik Üniversitesi

Arş. Gör. Dr. Günseli KURT GÜR
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Ayten YAZGAN KARATAŞ
İstanbul Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Semra HASANÇEBİ
Trakya Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Emel ORDU
Yıldız Teknik Üniversitesi

Bu alışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' nün 2012-01-07-KAP01 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Çalışmam boyunca üzerimden bilgisini ve manevi desteğini eksik etmeyen değerli danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT'a,

Tüm yol göstericiliği, desteği ve en çok da bana olan inancı için değerli eş danışmanım Sayın Arş. Gör. Dr. Günseli KURT GÜR'e,

Gerek laboratuvar çalışmam, gerekse teorik birçok bilgi için desteklerini aldığım Sayın Arş. Gör. Dr. Esra YÜCA hocama ve değerli arkadaşım Arş. Gör. Munise YURTSEVER'e,

Arkadaşlıkları, destekleri ve tüm yardımları için, Özlem TURAN'a, Gözde YELKENÇİ'ye, Arş. Gör. Mine KUÇAK'a, Arş. Gör. Burcu TUNCER'e, Uzman Pınar ÇAĞLAR'a, ve Arş. Gör. Hasan DEMİRCİ'ye,

Tüm yardımları, hissettirdiği dostluğu, teorik ve manevi desteği için proje arkadaşım Serpil DEMİR'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Sevgileri, maddi ve manevi tüm destekleri, en önemlisi de bana olan inançları için değerli annem Rasime ZEYTUN, babam Mehmet ZEYTUN ve ağabeyim İlkey ZEYTUN'a özellikle teşekkür ediyorum.

MART, 2016

Gözde ZEYTUN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	viii
KISALTMA LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÇİZELGE LİSTESİ	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xv
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.1.1 Beta Glukozidazların Sınıflandırılmaları.....	2
1.1.2 Beta Glukozidazların Görevleri	4
1.1.2.1 Beta Glukozidazların Memelilerdeki Görevleri	4
1.1.2.2 Beta Glukozidazların Böceklerdeki Görevleri.....	5
1.1.2.3 Beta Glukozidazların Bitkilerdeki Görevleri	5
1.1.3 Zeytin Beta Glukozidazı	7
1.1.4 Oleuropein	7
1.1.5 <i>Pichia pastoris</i>	9
1.1.5.1 <i>Pichia pastoris</i> 'in Avantajları	9
1.1.5.2 <i>Pichia pastoris</i> 'te metanol metabolizması.....	9
1.1.5.3 <i>Pichia pastoris</i> Ekspresyon Sistemi	11
1.1.5.4 Ekspresyon Vektörü pPICZ	12
1.1.5.5 <i>Pichia pastoris</i> 'te Eksprese Edilmiş Beta Glukozidazlar	14
1.2 Tezin Amacı.....	15
1.3 Hipotez.....	15
BÖLÜM 2	
MATERYAL METOD	16

2.1	Tamponlar ve Çözeltiler	16
2.2	Besiyerleri	18
2.3	Kullanılan antibiyotikler	19
2.4	Kullanılan Substratlar	19
2.5	Cihazlar	19
2.6	Enzimler	20
2.7	Kitler	20
2.8	Oligonükleotitler	20
2.9	Markerlar	21
2.10	Beta glukozidaz cDNA'sının çoğaltılması	21
2.10.1	PCR Reaksiyonun Kurulması	21
2.10.2	PCR ürünün Agaroz Jelde Görüntülenmesi	22
2.10.3	DNA'nın Agaroz Jelden Pürifikasyonu	22
2.11	Pürifiye Edilmiş Ürünün ve Ekspresyon Vektörü pPicZB'nin <i>XhoI</i> / <i>EcoRI</i> Kesimi	22
2.11.1	Pürifiye Kesim Ürünlerinin Agaroz Jelde Kontrolü ve Kütlesinin Hesaplanması	23
2.12	Ekspresyon Vektörü pPicZB'ye Beta Glukozidaz cDNA'sının Ligasyonu	23
2.13	Ekspresyon Vektörünün <i>E.coli</i> JM109 Hücrelerine Transformasyonu	24
2.14	Plazmid İzolasyonu	24
2.15	Plazmid İçerisinde İnsert Varlığının Kontrolü	24
2.16	<i>Sac I</i> Enzim Kesimiyle Vektörün Doğrusal Hale Getirilmesi	25
2.17	Kimyasal Kompetent X-33 Hücrelerinin Hazırlanması	25
2.18	<i>Pichia pastoris</i> X-33 Hücrelerine Kimyasal Yolla Transformasyon	26
2.18.1	Transformantların Seçimi	27
2.19	Maya Hücrelerinden Genomik DNA İzolasyonu	27
2.20	Genomik DNA'dan Beta Glukozidaz Entegrasyonunun Kontrolü	28
2.20.1	AOX1 Primerli Reaksiyonun Kurulması	28
2.20.2	AOX1 Primerli ve Gene Özgü P5 Primerli Reaksiyonun Kurulması	28
2.21	Zeytin Beta Glukozidaz cDNA'sının <i>Pichia pastoris</i> 'te Ekspresyonu	29
2.21.1	Uygun Besiyerlerine Kolonilerin Aşılması ve Ekspresyonun İndüklenmesi	29
2.21.2	Hücre Pelletinin Parçalanması	29
2.22	Ekspresyon Sonrasında Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	29
2.22.1	pNPG Substratı ile Enzim Assay Kurulması	29
2.22.2	Bradford Yöntemi ile Protein Miktarı Tayini	31
2.22.3	MUG Aktivite Tayin Yönteminin Kurulması	31
2.22.4	Afinite Kromatografisi ile Saflaştırma	31
2.22.5	SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile Protein Örneklerinin Analizi ..	33

BÖLÜM 3

SONUÇLAR	34
3.1 Beta Glukozidaz cDNA'sının Çoğaltılması ile İlgili Sonuçlar	34
3.1.1 DNA'nın Agaroz Jelden Pürifikasyonu	34
3.2 Zeytin beta glukozidaz cDNA'sı ve ve Ekspresyon Vektörünün Restriksiyon Enzimleriyle Kesimi	35

3.2.1	Pürifiye Edilmiş Kesim Ürünlerinin Agaroz Jelde Kontrolü ve Konsantrasyonunun Hesaplanması	36
3.3	Ekspresyon Vektörü pPicZB'ye Zeytin Beta Glukozidaz cDNA'sının Ligasyonu	37
3.4	Vektörün <i>E.coli</i> JM109 Hücrelerine Transformasyonu ve Pozitif Kolonilerin Analizi	37
3.5	Rekombinant Vektörün Doğrusal Hale Getirilmesi	38
3.6	<i>Pichia pastoris</i> X-33 Hücrelerine Kimyasal Yolla Transformasyon	39
3.7	Maya Hücrelerinde Zeytin Beta Glukozidaz Geni'nin Entegrasyonun Kontrolü	40
3.8	Zeytin Beta Glukozidaz Enzimine Ait Ekspresyon Sonuçları	41
3.8.1	Hücrelerin Büyüme Hızına İlişkin Grafik	41
3.8.2	Bradford Ölçümü Sonuçları	42
3.8.3	pNPG Yapay Substratı ile Kurulan Enzim Assay Sonuçları	44
3.8.4	MUG Yapay Substratı ile Kurulan Spot Assay Sonuçları	47
3.8.5	SDS-PAGE Sonuçları	47
BÖLÜM 4		
TARTIŞMA VE ÖNERİLER		51
KAYNAKLAR.....		54
EK-A		
DİZİN ANALİZİ SONUÇLARI		61
A-1 pGEM-T EASY VEKTÖRÜNE KLONLANMIŞ KALIP OLARAK KULLANILAN ZEYTİN BETA GLUKOZİDAZ DNA'SININ DİZİN ANALİZİ SONUÇLARI		
A-1.1 T7 İLERİ PRİMER KULLANILARAK YAPILAN DİZİLEME SONUCU		61
A-1.2 SP6 GERİ PRİMER KULLANILARAK YAPILAN DİZİLEME SONUCU		62
A-2 İNSERT İÇEREN REKOMBİNANT VEKTÖRE AİT DİZİN ANALİZİ SONUÇLARI... 62		
A-2.1 5' AOX1 PRİMERİ İLE YAPILAN DİZİLEME SONUCU		62
A-2.2 3' AOX1 PRİMERİ İLE YAPILAN DİZİLEME SONUCU		63
ÖZGEÇMİŞ.....		64

SİMGE LİSTESİ

bp	Baz Çifti
g	Gram
µl	Mikrolitre
kb	Kilobaz
L	Litre
ml	Mililitre
mg	Miligram
mM	Milimolar
M	Molar
pH	Power of hydrogen 'Hidrojenin gücü'
U	Ünite
UV	Ultraviyole
β	Beta
°C	Santrigrat derece

KISALTMA LİSTESİ

AOX	Alkol Oksidaz
APS	Amonyum Persülfat
CBB	Coomassie Brilliant Blue
cDNA	Komplementer DNA
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksiribo Nükleozit Trifosfat
DTT	Dithioothreitol
EDTA	Etilen Di Amin Tetra Asetik Asit
IMAC	İmmobilize Edilmiş Metal Affinite Kromatografisi
LiOAc	Lityum Asetat
LS-LB	Düşük Tuzlu Luria Broth
MUG	4-Metilumbelliferil β -D-glucopiranosid
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pNPG	4-Nitrofenil β -D-glucopiranosid
RPM	Devir/ Dakika
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TEMED	Tetrametiletildiamin

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1.1 Farklı GH Ailelerinde Beta Glukozidaz Yapıları [5]	3
Şekil 1.2 Yaban Tip ve Knock out Farede Sperm Morfolojileri [14]	4
Şekil 1.3 Oleuropeinin Kimyasal Formülü [36]	7
Şekil 1.4 Oleuropeinin Beta Glukozidaz ile Hidrolizi [42]	8
Şekil 1.5 Metanol Kullanım Yolağı [59].....	10
Şekil 1.6 <i>Pichia pastoris</i> Genomuna Gen İnseriyonu(A) ve Yer Değiştirmesi (B) [60]	11
Şekil 1.7 <i>Pichia pastori</i> ste Heterolog Ekspresyon [62].....	12
Şekil 1.8 Ekspresyon Vektörü pPICZ'nin VektörününTasarımı [10].....	13
Şekil 2.1 pPICZB Vektörünün Çoklu Klonlama Bölgesi	23
Şekil 2.2 <i>Pichia pastoris</i> 'te Rekombinasyon ve İntegrasyon [10].....	27
Şekil 2.3 Beta glukozidazın pNPG ile reaksiyonu.....	30
Şekil 3.1 PCR ürününün jel görüntüsü	34
Şekil 3.2 Jelden elüe edilmişbeta glukozidaz cDNA'sı	35
Şekil 3.3 Beta Glukozidaz cDNA'sının <i>Xho I/EcoR I</i> Kesim Görüntüsü	36
Şekil 3.4 pPicZB vektörünün <i>XhoI/EcoRI</i> enzimleriyle kesimi	36
Şekil 3.5 Jelden elde edilenkesim ürünlerinin agaroz jel elektroforezi	37
Şekil 3.6 Rekombinant Plazmidde Zeytin Beta Glukozidaz cDNA'sının Entegrasyon Kontrolü	38
Şekil 3.7 P2P5 plazmidi <i>Sac I</i> kesim	39
Şekil 3.8 <i>Pichia pastoris</i> 'e Aktarılmış Rekombinant Koloni	39
Şekil 3.9 Genin Mayada Entegrasyonunu Gösteren PCR Sonuçları	40
Şekil 3.10 MM Besiyerinde 600nm'deki Büyüme Eğrisi.....	41
Şekil 3.11 BMMY Besiyerinde 600nm'deki Büyüme Hızı Grafiğı.....	42
Şekil 3.12 Bradford Yöntemi ile BSA standartları kullanılarak belirlenen Protein Standartı Grafiğı	42
Şekil 3.13 MM Besiyerinde pNPG Substratına Karşı Aktivite Sonuçları (U/ml)	45
Şekil 3.14 MM Besiyerinde pNPG Yapay Substratına Karşı Spesifik Aktivite	45
Şekil 3.15 BMMY Besiyerinde pNPG Substratına Karşı Aktivite Sonuçları (U/ml)	46
Şekil 3.16 BMMY Besiyerinde pNPG Yapay Substratına Karşı Spesifik Aktivite (U/mg)	46
Şekil 3.17 BMMY ve MM Besiyerine Ait Ham Ekstrelerin MUG Spot Testine Ait UV Görüntüsü	47
Şekil 3.18 MM Besiyerinde Ham Ekstrelerin SDS-PAGE Görüntüsü	48
Şekil 3.19 BMMY Besiyerinde Ham Ekstrelerin SDS-PAGE Görüntüsü	48

Şekil 3.20	MM ve BMMY Besiyerlerindeki Ham Ekstratların Afinite Kolon ile Saflaştırma Görüntüsü	49
Şekil 3.21	MM Besiyeri 72 Saat Örneğinin Afinite Kolon ile Doğal ve Denatüre Koşullardaki Saflaştırma Görüntüsü	50

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 1.1 pPICZB Vektörünün Özellikleri	13
Çizelge 1.2 <i>Pichia pastoris</i> 'te Ekspresyonu Yapılmış Beta Glukozidazlar	14
Çizelge 2.1 Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	16
Çizelge 2.2 Kullanılan Besiyerleri.....	18
Çizelge 2.3 Kullanılan Substratlar	19
Çizelge 2.4 Kullanılan Cihazlar	19
Çizelge 2.5 Kullanılan Enzimler	20
Çizelge 2.6 Kullanılan Kitler	20
Çizelge 2.7 Oligonükleotitler	20
Çizelge 2.8 Moleküler Markerlar	21
Çizelge 2.9 pNPG Aktivite Assay	30
Çizelge 2.10 SDS-PAGE Jelleri İçerikleri.....	33
Çizelge 3.1 BMMY Besiyerindeki Örneklerle İlişkin Protein Miktarları	43
Çizelge 3.2 MM Besiyerindeki Örneklerle İlişkin Protein Miktarları	43

ZEYTİN BETA GLUKOZİDAZ GENİ'NİN *Pichia pastoris*'TE EKSPRESYONU

Gözde ZEYTUN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT

Eş Danışman: Arş. Gör. Dr. Günseli KURT GÜR

Beta glukozidazlar (EC.3.2.1.21) glikozidler ve oligosakkaritlerin beta glukozidik bağlarının hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Bitkiler, hayvanlar, bakteriler ve mantarlarda bulunurlar. Hayvanlarda glikolipidlerin ve egzojen glikozidlerin yıkımı, mikroorganizmalarda biyokütle dönüşümü, bitkilerde koku salınımı, lignifikasyon, hücre duvarı oligosakkaritlerinin katabolizmasında önemli rol oynarlar. Beta glukozidazların zeytinde tat ve renk oluşumunda görevli olduğu düşünülmektedir. Çeşitli rekombinant proteinlerin üretiminde kullanılan bir organizma olan *Pichia pastoris*, beta glukozidaz ekspresyonu çalışmalarında da sıklıkla kullanılmaktadır. Ökaryotik protein üretiminde gerekli olan post translasyonel modifikasyon, protein katlanması ve protein işlenmesini sağlayan *Pichia pastoris*, yüksek düzeyde protein üretiminin yanı sıra diğer ökaryotik ekspresyon sistemlerine göre daha ucuz, daha kolay ve hızlı üretilebilme avantajına sahiptir. Bu çalışmada; enzimin büyük miktarda üretimi için *Pichia pastoris*'te, zeytin (*Olea europaea* L. Gemlik kùltivarı) beta

glukozidaz geninin heterolog ekspresyonu amaçlanmıştır. Tam boyda beta glukozidaz cDNA'sı, alkol oksidaz (AOX1) promotörü kontrolü altında maya mekik vektörü pPICZB içine klonlanmıştır. Oluşturulan rekombinant DNA, *Pichia pastoris*'in yabani tip X-33 suşuna kimyasal transformasyon ile aktarılmış ve transformantlar YPDS/Zeo içeren besiyerlerinde seçilmiştir. Zeytin beta glukozidaz geninin *P. pastoris* genomuna entegrasyonu hem ilgili gene özgü hem de AOX primerleri ile kurulan PCR sonucunda doğrulanmıştır. Kùltürler 30°C ve 250 rpm'de farklı besiyerlerinde büyütölmüş ve her gün %1 metanol ilavesi yapılarak heterolog beta glukozidaz ekspresyonu indüklenmiştir. Dört gün boyunca toplanan örneklerdeki rekombinant beta glukozidaz ekspresyonu, yapay substratlarla enzim aktivitesinin belirlenmesi ile analiz edilmiştir. Gelecek çalışmalarda üretilen rekombinant enzimin saflaştırılması ve biyokimyasal karakterizasyonu amaçlanmaktadır.

Anahtar Kelimeler: beta glukozidaz, heterolog ekspresyon, *Pichia pastoris*, zeytin

EXPRESSION OF OLIVE BETA GLUCOSIDASE *Pichia pastoris*

Gözde ZEYTUN

Department of Molecular Biology and Genetics

MSc. Thesis

Adviser: Assist. Prof. Dr. Şenay VURAL KORKUT

Co-Adviser: Dr. Günseli KURT GÜR

Beta glucosidases (EC.3.2.1.21) are enzymes which catalyze the hydrolysis of glucosidic linkages of glycosides and oligosaccharides. Beta glucosidases are found in plants, animals, bacteria and fungi. These enzymes have important roles in the catabolism of glycolipids and exogenous glycosids in animals, biomass conversion in microorganisms, scent release, lignification and catabolism of cell wall oligosaccharides in plants. Beta glucosidases are considered to be involved in the formation the taste of olives. Methylophilic yeast *Pichia pastoris* is an organism that is used for recombinant production of various proteins. It is also frequently used for heterologous expressin of beta-glucosidases. It has many advantages as being an eukaryotic expression system in that it allows posttranslational modifications including proteolytic processing, folding, disulfide bond formation and glycosylation. *Pichia pastoris* system is easier, less expensive, faster to use and gives higher expression levels of recombinant proteins

compared to other eukaryotic expression systems. In this study it is aimed to make heterologous expression of beta glucosidase in *Pichia pastoris* for the large scale production of enzyme. Beta glucosidase cDNA was cloned into yeast shuttle expression vector, pPICZB, under the control of alcohol oxidase (AOX) promoter and *Pichia pastoris* strain X-33 was chemically transformed with recombinant DNA. Transformants were selected on YPDS/Zeo plate. Entegration of gene was screened by PCR with gene specific primers and AOX primers. Cell cultures were incubated at 30°C for four days. Heterologous expression of beta glucosidase was induced by addition of 1% methanol every day. At the end of fourth day samples were collected and analyzed.

Keywords; beta glucosidase, heterologous expression, olive, *Pichia pastoris*

1.1 Literatür Özeti

Karbohidrat metabolizmasında rol oynayan enzimlerin çeşitliliği, karbohidrat stereokimyasında yer alan moleküllerin çeşitliliği ile paraleldir [1]. Hidrolazlar sınıfında bulunan glikozil hidrolazlar (EC 3.2.1) karbohidrat metabolizmasının anahtar enzimleridir ve üç ana alemde de bulunurlar (Arkebakteri, Eubakteri ve Ökaryot). Glukozil hidrolazlar, glikozidazlar ve transglikozidazları içerirler [1], [2].

Glikozil Hidrolaz (GH) Aile1 enzimleri G-O-X ya da G-S-X tipindeki substratları hidroliz etmektedirler. Burada G, β -bağlı glukozil, galaktozil, mannozil, fukozil, 6-fosfoglukozil ya da 6-fosfogalaktozil rezidüsünü (bakiyesini), X ise diğer glikozil bakiyesini ya da aglikonu temsil etmektedir. [3].

Henrissat'ın glikozil hidrolazlar için geliştirdiği sınıflandırma sistemi, amino asit dizi benzerlikleri ve yapısal benzerlikleri temel almaktadır [1], [4]. Bu sistemde, genel bir amino asit dizisi benzerliği ile iyi korunmuş dizi motiflerine sahip enzimler, aynı aile içinde gruplandırılır. Sıklıkla güncellenen Karbohidrat Aktif Enzimler Veritabanı (Carbohydrate Active Enzymes Database, CAZY) web sitesinde 115 glikozil hidrolaz ailesi listelenmiştir [4]. Glikozil hidrolazlar, glikozidik bağların hidrolizi ve/veya transglikozilasyonundan sorumludur [4]. Glikozil hidrolazlar ailesinin bir üyesi de beta glukozidazlardır.

Beta glukozidazlar (β -glukozidaz) tam adı ile β -D glukopiranosid glukohidrolazlar, E.C.3.2.1.21 Enzim Komisyonu Numarası'na sahiptirler [5]. Beta glukozidazlar, oligosakkaritler ya da polisakkaritlerden, terminal, indirgeyici olmayan 1,4 bağlı-beta-

glukoz bakiyelerini açığa çıkaran beta-D-glukoza hidrolizler [6]. Arkeaların, Öbakteriler ve Ökaryotların tüm domainlerinde, evrensel olarak bulunurlar ve çeşitli fonksiyonlara sahiptirler [5].

Beta glukozidazlar, selülozik biyokütle degradasyonu, hayvanlarda glikolipitlerin ve egzogen glikozidlerin yıkımı, mikroorganizmalarda biyokütle dönüşümü, bitkilerde koku salınımı, lignifikasyon, siyanogenezis, sekonder metabolitlerin modifikasyonu gibi çeşitli biyolojik süreçlerde önemli roller oynarlar [5], [7]. Bu enzimlerin diğer isimleri gentiobiaz ve sellobiazdır [8]. Tüm beta glukozidazlar, 55 ve 65 kDa'luk alt birimlere, asidik pH'a (pH 5-6) ve substrat olarak beta glukozide (glukozid ve daha az ölçüde fukozid ve galaktozid) mutlak gereksinim duymaktadırlar [5].

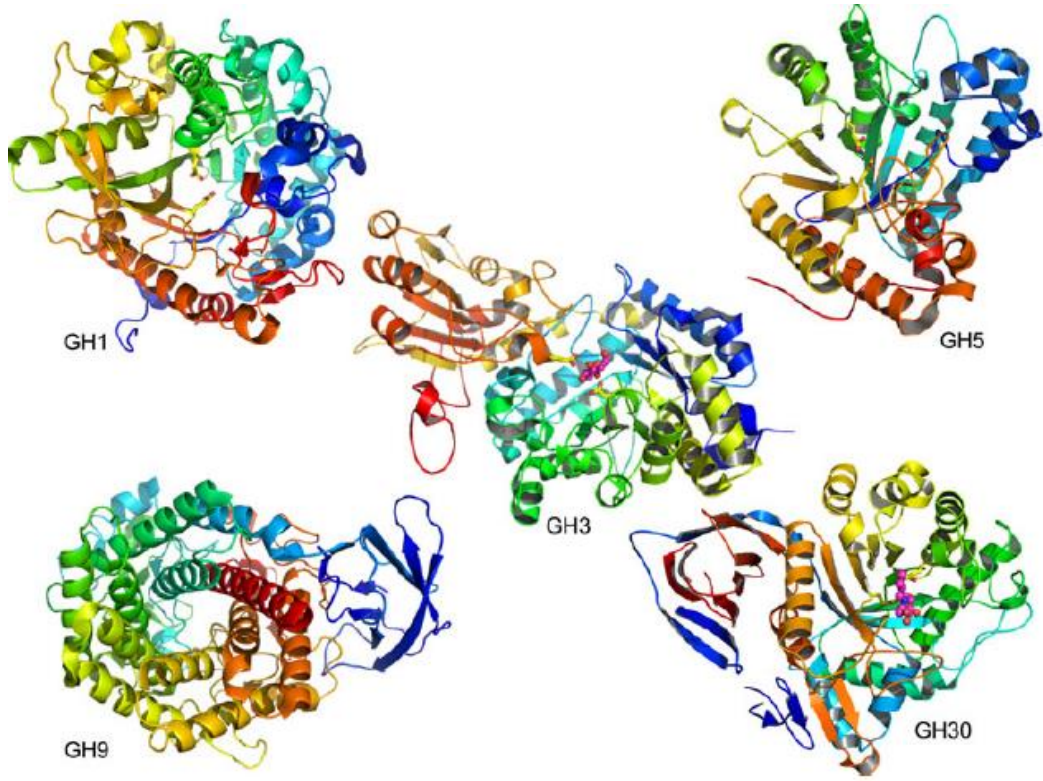
1.1.1 Beta Glukozidazların Sınıflandırılmaları

Beta glukozidazlar literatürde amino asit dizilimlerine dayalı olarak beş glikozil hidrolaz ailesi olarak sınıflandırılırlar. Bu aileler, GH1, GH3, GH5, GH9 ve GH30'dur [1], [4], [9].

GH1, GH5 ve GH30 (β/α)₈ fiçi yapısına sahip proteinlerden oluşan GH Clan A içerisine girmektedir. Bunun aksi olarak GH9 enzimleri (α/α)₆ fiçi yapılarına sahiptir. Ayrıca GH3 enzimlerinin aktif bölgesi iki domaine sahiptir [5].

Bu enzimlerin dördü tutucu reaksiyon mekanizması ile rol oynarken, sadece GH9 enzimleri ters çevirici mekanizma ile rol oynar [5]. GH1, GH5 ve GH30 katalitik nükleofili/bazı Glutamik asit iken GH3 ve GH9'un Aspartik asittir [10]. Ayrıca bütün ailelerin katalitik protein donörleri de Glutamik asittir [10].

In silico protein yapı analizleriyle zeytin beta glukozidazının GH1 ailesininden olduğunu gösterilmiştir [11]. Şekil 1.1'de farklı glikozil hidrolaz ailelerine ilişkin beta glukozidaz yapıları gösterilmektedir.



Şekil 1.1 Farklı GH Ailelerinde Beta Glukozidaz Yapıları* [5]

*Şekil 1.1’de yer alan yapılar: GH1 (*Zea mays* ZmGlu1), GH3 (*Hordeum vulgare* Ekzo I β -glukan glukohidroz), GH5 (*Candida albicans* Ekzo- β -(1,3)-glukonaz), GH30 (*Homo sapiens* Asit β -glukozidaz/ glukoserebrozidaz GBA1) ve GH9 (*Vibrio parahaemolyticus*’a ait varsayılan ekzoglukanaz) ailelerinden beta glukozidaz ya da ilgili enzimleri içerir. N-terminlerinden ve C- terminlerine maviden kırmızıya bir spektrumda renklendirilmiştir. Katalitik nükleofil ve asit-baz bakiyeleri okla gösterilmiştir.

Beta glukozidazlar substrat özgünlüklerine göre ise üç alt sınıfa ayrılırlar [8]:

Sınıf 1; glikozil beta glikozidaz ve aril beta glikozidaz aktivitesi olan enzimleri içerir; bu enzimler sellobioz, laktoz, beta-p-nitrofenilglukosit, beta-p-nitrofenilgalaktosit, beta-p-nitrofenilfruktosit ve diğer benzer substratları hidrolizleme yeteneğindedir [8].

Sınıf 2; sadece glikozil beta glukozidaz aktivitesine sahip olanları içerir; bu nedenle yalnızca sellobioz ve laktoz gibi substratları hidrolize edebilirler [8].

Sınıf 3; yalnızca aril (ya da alkil) beta glukozidaz aktivitesi olan enzimleri içerir; bu enzimler beta-p-nitrofenilglukosite ve benzer substratlara karşı önemli etkinliğe sahiptirler [12]. Ağırlıklı olarak küf, mantar ve bakteride üretilen bu enzimler doğada oldukça geniş yayılım gösterirler [13].

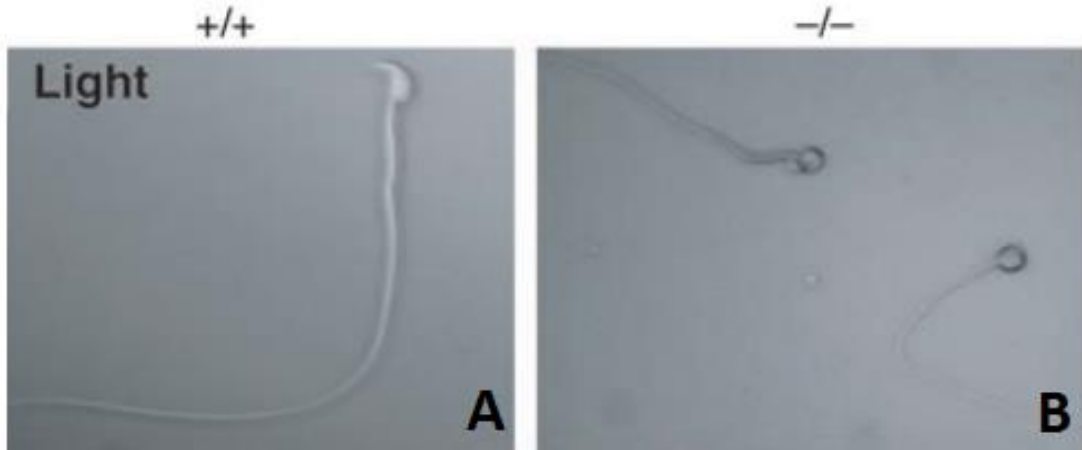
1.1.2 Beta Glukozidazların Görevleri

Beta glukozidazlar çeşitli canlı gruplarında birçok biyolojik süreçlerde rol oynarlar.

1.1.2.1 Beta Glukozidazların Memelilerdeki Görevleri

Memeliler, GH1 ailesinden laktaz-phloridzin hidrolaz ve sitoplazmik beta glukozidaz ayrıca GH30 ailesinden insan asit beta glukozidazı (GBA1) ve safra asidi beta glukozidazı (GBA2) olmak üzere birçok beta glukozidaz içerir [5]. Bu enzimlerin glikolipitler ve besinsel glukozidlerin metabolizmasında rol oynadığı düşünülür [5]. Ek olarak, GH1 ailesinden bir grup proteinin sinyal fonksiyonu da gösterdiği düşünülmektedir [5].

Memeliler ile ilgili olarak farede yapılmış bir çalışmada, fare safra kesesi beta glukozidazı elimine edildiğinde, safra asidi metabolizmasında küçük etkiler görülmüştür. Ancak testiste bulunan Sertoli hücrelerinde glukoseramidlerin birikimi olmuş, bu da yuvarlak başlı sperm oluşturarak üreme verimliliğini düşürmüştür [14]. Gen ile transfekte edilen hücreler, floresan glukoseramidlerin hidrolazını artıran bir yetenek göstermişlerdir [14]. Şekil 1.2’de beta glukozidaz defekti bulunan fare spermi ve yaban tip spermin ışık mikroskobu görüntüleri yer almaktadır.



Şekil 1.2 Yaban Tip ve Knock out Farede Sperm Morfolojileri* [14]

*A; Normal hilal şeklinde başa sahip yabanıl tip sperminin ışık mikroskobu ile 400X büyütülmüş görüntüsü B; Yuvarlak başa sahip knock out fare sperminin ışık mikroskobu ile 400X büyütülmüş görüntüsü

İnsanlarda çoğunlukla glukoserebrosidaz (β -D-glukosil-N-asilsfingosin glukohidrolaz) olarak bilinen bir beta glukozidaz ya da insan asit beta glukozidaz, lizozomlarda

glukoseramidlerin degradasyonunu katalizler [5]. Enzimin eksikliği kalıtsal bir hastalık olan Gaucher hastalığına neden olmaktadır. Bu hastalığın üç formundan birini üreten retikülaendotelyal hücrelerin lizozomları içerisinde, glikosfingolipid glukozilseramid birikir ve bu birikme sonucu Gaucher hastalığı ortaya çıkar [5]. Bu insan beta glukozidazını kodlayan genin moleküler biyolojisi ve enzimin fizikokimyasal yapısı çalışılmış ve iyi anlaşılmıştır. İnsan asit beta glukozidazı özellikle Gaucher hastalığının tedavisi için, terapötik ve diagnostik prosedürlerin gelişiminde potansiyele sahiptir.

1.1.2.2 Beta Glukozidazların Böceklerdeki Görevleri

Bitkilerle beslenen böcek larvasından, GH1'den sindirim beta glukozidazı izole edilmiş [15], [16] izole edilen bu larval beta glukozidazların, glukooligasakkaritler ve sellobioz, gentiobioz, amigdalın gibi bitki glikozitlerini, onların sindirim fonksiyonu doğrultusunda hidrolize edebildiği gösterilmiştir [15].

1.1.2.3 Beta Glukozidazların Bitkilerdeki Görevleri

Bitkilerde beta glukozidazlar bir dizi biyolojik fonksiyonda rol oynarlar. Bunlar; savunma, simbiyosis, hücre duvarı katabolizması ve lignifikasyon, sinyalleşme ve bitki sekonder metabolizması fonksiyonlarıdır. Birçok beta glukozidaz geninin biyotik ve abiyotik stres tarafından indüklendiği veya bu streslere başarılı bir yanıt oluşturduğu gösterilmiştir [3], [17]. Bu enzimlerin rolleri onların substrat spesifikliği, doku ve hücre içi lokalizasyonları ile hangi koşullar altında fizyolojik substratlarıyla temasta olduğu belirlenerek kabul edilmiştir [5].

Savunma: Bitkilerin siyanit ve hidroksamik asitler (4-hidroksi-1, 4-benzoakazin-3-one) gibi toksik komponentleri salabilen glikozitleri içerdiği bilinmektedir [18], [19], [20].

Genellikle savunma glikozitleri, toksik bileşenleri salmak adına hidrolizleyen beta glukozidazlardan, farklı bir hücre veya hücresel bölümde depolanırlar. Savunma bileşenleri vakuolde depolanma eğilimindedir, onlara karşılık gelen beta glukozidazlar genellikle apoplastta ya da plastidedir. Beta glukozidazlar ve tioglukozidazların ikisinin de bu rolleri oynadığı bulunmuştur. Bitkilerle beslenen uzman böcekler, bu enzimleri

glikozit bombası olarak görev alması için adapte etmişlerdir ve kendi savunmalarında kullanmışlardır [21].

Hücre Duvarı Metabolizması: Bitkilerin hücre duvarı, doğada karbohidratların en büyük deposudur, bundan dolayı beta glukozidazların hücre duvarı gelişiminde önemli rolleri oynaması şaşırtıcı değildir. Beta glukozidazlar aslında hücre duvarı aşamasında hem oligosakkaritlerin degradasyonunda hem de sekonder hücre duvarlarına lignifikasyona izin vermek için glikozitlerden monolignolların salınımında rol oynarlar [5].

Hücre duvarı türevli oligasakkaritleri hidrolizleyen birçok beta glukozidaz, öncelikli olarak tek çenekli bitkilerde çalışılmış ve yıllar içinde tanımlanmıştır. Örnek olarak; arpa tohumu çimlenmesindeki bir beta glukozidaz β -1,3- ve β -1,4-bağlı oligosakkaritlere karşı aktivite göstermiştir [22], [23], [24]. Son zamanlarda, bu enzimin arpa endosperm hücre duvarlarında bulunan manooligosakkaritleri daha fazla tercih ettiği gösterilmiştir [25]. Sekonder hücre duvarlarının lignifikasyonunun, sinamil alkol beta glukozidazlar gibi, monolignol glikozitlerinden beta glukozil bakiyelerinin çıkarılmasıyla, monolignollerin aktivasyonunu içerdiği düşünülmüştür [26].

Fitohormon Aktivasyonu: Bitkilerde birçok fitohormon glikozitleri bulunmuştur. Mısır beta glukozidazının hem *in vitro* olarak sitokinin beta glukozidlerini hidrolize ve aktive ettiği hem de *in vivo* olarak ekzojen substratının infüzyonunu yaptığı gösterilirken [27], kısmen saflaştırılmış pirinç beta glukozidazının gibberellin glikozidlerini hidrolize ettiği gösterilmiştir [28]. Absisik asit (ABA) glukozil esteri (ABA-GE) köklerden yapraklara taşındığı ve serbest ABA daha fazla miktarda olmasına rağmen ekstrasellüler beta glukozidazlar tarafından yapraklarda hidrolize edildiği gösterilmiştir [29]. Özel bir Arabidopsis ER beta glukozidazının (AtBGLU18, AtBG1) kuraklık stresine bağlı olarak ABA-GE'yi hidrolize etmek için aktive olduğu gösterilmiştir. Bu enzimde meydana gelen bir gen mutasyonu erken çimlenme ve hatalı stoma kapanmasına neden olmaktadır.

Yukarıda sayılanların dışında bitki beta glukozidazları başka mekanizmalarda da görev alabilir. Örneğin; glikozit depo formlarından uçucu maddelerin salınımında önemli rol oynadıkları görülür. Bu bitkiler ile beslenen otçul parazitik canlılar için çiçek kokusu gibi cezpediciler içerir [30].

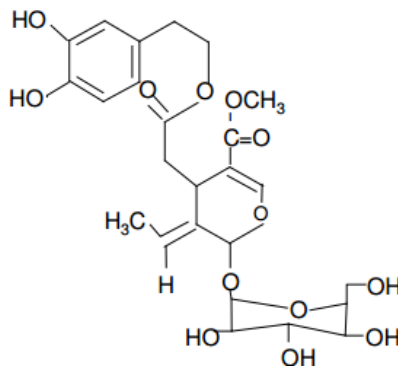
1.1.3 Zeytin Beta Glukozidazı

46 kromozoma sahip diploid bir bitki olan zeytin, 1.45 Gb genom büyüklüğüne sahiptir. Genom dizisi henüz yayınlanmamış olan zeytinin, beta glukozidazı ile ilgili az bilgi mevcuttur. Sadece NCBI (National Center for Biotechnology Information) GeneBank'ta bir cDNA dizisi (Accession no. AY083162.1) zeytin beta glukozidazına atfedilir. Beta glukozidazın sofralık zeytin meyvesi ile zeytin yağında oleuropeinin acı tadının giderilmesinden sorumlu olduğu tespit edilmiştir [31].

Zeytinde bulunan oleuropein, dimetil oleuropein ve verbaskosit ve luteolin-7-glukozid gibi fenolik bileşikler sağlık alanında etkin bir role sahiptir. Beta glukozidazlar bu fenolik glukozidlerin hidrolizini katalizler [32].

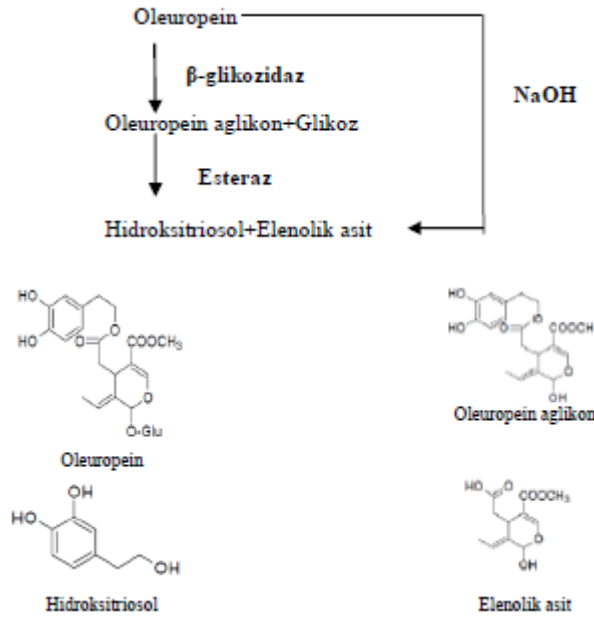
1.1.4 Oleuropein

Bitkiler gibi hareketsiz organizmalar biyotik ve abiyotik stresi tolere etmek için kimyasal savunmada genel bir strateji olarak; sekonder metabolitleri geniş çeşitlilikte üretirler. Farklı bitkiler çeşitli sekonder metabolitler içermesine rağmen, zeytin (*Olea europaea* L.) Oleaceae'ye ait oleosit olarak bilinen alışılmadık sekoiridoitlerden birini içerir [11]. Zeytinde en önemli sekoiridoit olan oleuropein, bir elenolik asit esteri ile 3,4-dihidroksifeniletanol (hidroksitirosol) ve onun direkt öncüsü ligstrosittir [33], [34]. İlk olarak Bourquelot ve Vintilesco tarafından bulunan oleuropein, yapı olarak 1960 yılında tanımlanmıştır [35].



Şekil 1.3 Oleuropeinin Kimyasal Formülü [36]

Oleuropein, zeytin meyvesinin ilk dönemlerinde fazla miktarda bulunan, olgunlaşma sürecinde metabolize olup miktarı azalan ve meyveye acılık veren bir maddedir [37], [38], [39], [40]. Zeytinin toplanmasından hemen sonra tüketilememe nedeni olan oleuropein glukoziti suda çözünabilir. Enzimatik olarak beta glukozidaz aktivitesi ile glüköz ve oleuropein aglikona parçalanır ve esterase enziminin aktivitesi ile hidroksitriosol ve elenolik asit ortaya çıkar [41].



Şekil 1.4 Oleuropeinin Beta Glukozidaz ile Hidrolizi [42]

Sekoiridoitler farmasötikal aktivitelerde geniş bir etkinlik aralığına sahiptirler. Zeytine ait bu ürünlerin yapılarındaki oleuropeinin, antioksidan, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, antiaterojenik, antiviral aktiviteler dahil olmak üzere çok sayıda farmakolojik özelliğe sahip olduğu birçok araştırmacı tarafından ortaya konmuştur [40], [43], [44], [45], [46], [47], [48], [49]. Yapılan çalışmalarda, yüksek miktarda oleuropein içeren zeytin yapraklarından çıkarılan fenolik fraksiyonun lipoprotein oksidasyonunu engellediği ve bundan dolayı besinsel takviye olarak önemli rol oynadığı gösterilmektedir [50], [51]. Ek olarak hidroksitriosolün doğal olarak elde edilen güçlü bir antioksidan olduğu, elenolik asitinse güçlü antiviral etki gösterdiği bilinmektedir [45], [52], [53], [54].

1.1.5 *Pichia pastoris*

Pichia pastoris, *Komagataella pastoris* olarak sınıflandırılmış, özellikle heterolog protein üretimi için biyoteknolojide önemi olan metilotrofik bir mayadır [55]. *E.coli*, *B.subtilis*, *S.cerevisiae*, *H.polymorpha* ve *Aspergillus* ile *Trichoderma* türleri ile birlikte proteinlerin endüstriyel platformda üretiminde kullanılır.

Metilotrofik maya *Pichia pastoris*'in tek hücre proteini üretimi için ilk uygulaması, 1970'lerin başında meydana gelmiştir. Bu amaç için, Philips Petroleum Company tarafından ucuz bir ortam ve yüksek hücre yoğunluklu bir fermentasyon işlemi geliştirilmiştir [56]. 1980'lerde Salk Institute Biotechnology/Industrial Associates, Inc.'deki araştırmacılar, alkol oksidazı kodlayan *AOX1* genini ve *AOX1* promotorunu izole etmişlerdir ayrıca *Pichia pastoris*'in moleküler genetik manipülasyonu için vektörler, suşlar ve metodlar geliştirmişlerdir. *Pichia pastoris* konakçı suşları, ilgili protein için kodlama yapan, genleri eksprese olan ve kolaylıkla elde edilebilen uygun vektörler ile birleştirilmiştir [56].

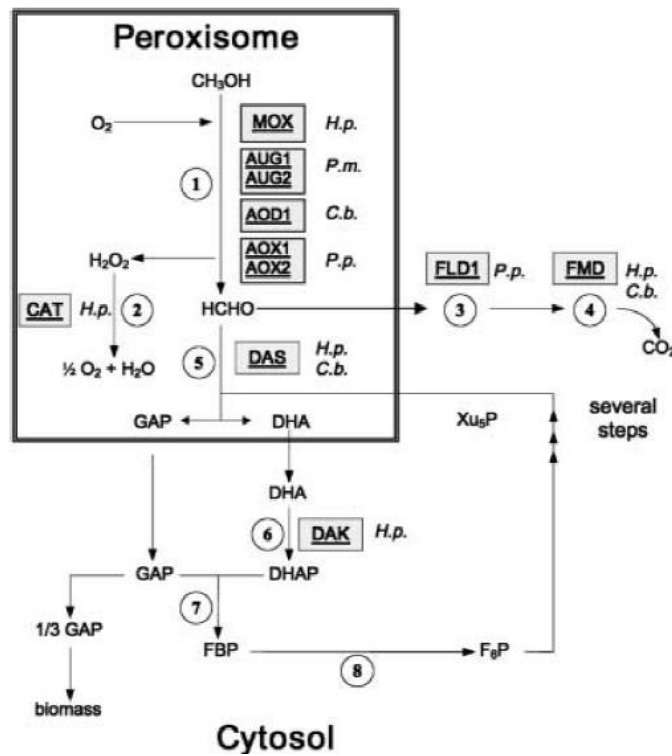
1.1.5.1 *Pichia pastoris*'in Avantajları

- ✓Basit mineral tuz besiyerinde ve biyoreaktörlerin kontrollü ortamlarında, *Pichia pastoris* yüksek hücre yoğunluğu ile büyüme gösterir.
- ✓Etkili ve sıkı olarak düzenlenmiş promotoru (*AOX1*), büyüme ve üretimin seçilimi ile istenilen kontrol için imkan verir.
- ✓Ayrıca, *Pichia pastoris* sadece birkaç endojen protein salgılamak, rekombinant proteinin salgılanması çok verimlidir.
- ✓Basit tuz besiyerinden rekombinant proteinin ayrılması oldukça kolaydır. Bu sebeple, *Pichia pastoris* üretim için ideal olan, oldukça etkili rekombinant protein oluşumu ve saflaştırılmasını sunar [56].

1.1.5.2 *Pichia pastoris*'te metanol metabolizması

Metilotrofik mayalar tek karbon ve enerji kaynağı olarak metanol kullanma yeteneğindedir. Bugüne kadar tespit edilen metilotrofik suşlar sadece dört cinse aittir: *Hansenula*, *Pichia*, *Candida* ve *Torulopsis* [57]. Hepsisi, birkaç özgün enzimi içeren

spesifik bir metanol kullanım yolağını paylaşırlar. Şekil 1.5’de metanol kullanımına ait enzimler ve yolak anlatılmaktadır. Başlangıç reaksiyonları özelleşmiş mikrobadiler ve peroksizomlarda gerçekleşir, takip eden sonraki metabolik adımlar ise sitoplazmada gerçekleşir [58]. Peroksizomlar, metanol metabolizması için üç anahtar enzim olan; alkol oksidaz, katalaz ve dihidroksiaseton sentazı barındırarak, büyüme sırasında zorunlu bir rol oynarlar [58]. Metanol özümsemesi ve katabolizmasının daha sonraki reaksiyonları sitosolde gerçekleşir[58].



Şekil 1.5 Metanol Kullanım Yolağı* [59]

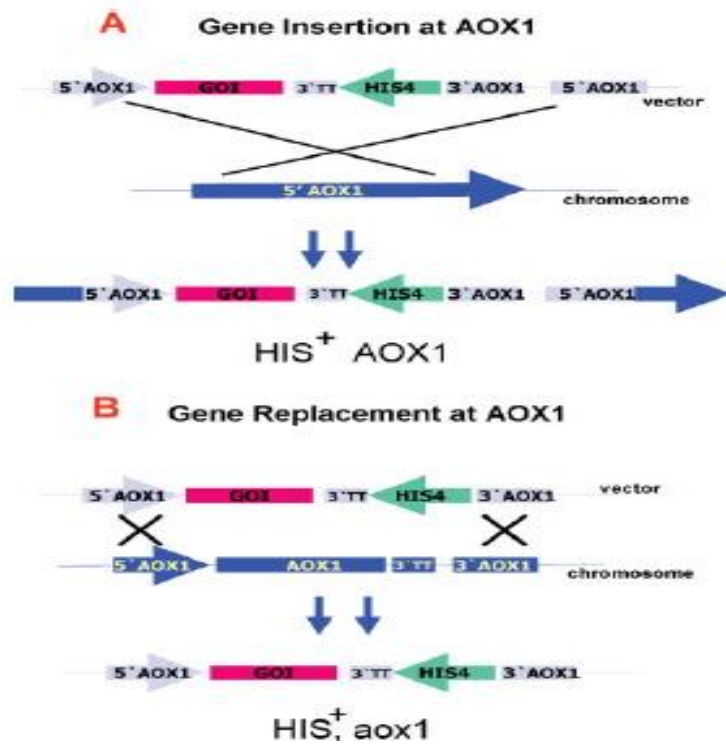
*1. Metanol alkol oksidaz tarafından okside olur ve formaldehit ile hidrojen peroksit oluşur. 2. Toksik hidrojen peroksit katalaz tarafından su ve oksijene ayrıştırılır. 3,4. Katabolik yolizinde formaldehit formaldehit dehidrogenaz (FDL) ve format dehidrogenaz (FMD) ile katalize edilmiş karbondioksit sıradaki iki dehidrogenaz reaksiyonu ile oksitlenir. 5. Asimilasyon için formaldehit, ksiluloz-5-fosfat (Xu_5P)₃ ile dihidroksiaseton sentazın hareketi ile reaksiyona girerek, bileşikleri gliseraldehit (GAP) ve dihidroksiaseton (DHA) oluşturur. 6. DHA, dihidroksaseton kinaz (DAK) ile dihidroksiaseton fosafta (DHAP) fosforile olur. 7. GAP ve DHAP bir aldolaz reaksiyonunda fruktoz1-6bifasfat (FBP) üretir. 8. Son adımda früktoz 6-fosfat ve son olarak ksiluloz-5-fosfat oluşur. Metanol kullanım yolağı genleri dört metilotroftan izole edilmiştir.

1.1.5.3 *Pichia pastoris* Ekspresyon Sistemi

Lineer vektör *Pichia pastoris* genomuna homolog rekombinasyon yoluyla entegre edilir ve kararlı transformantlar oluşturulur [56].

Pichia pastoris'te yabancı bir genin ekspresyonu temelde üç adım içerir [58]:

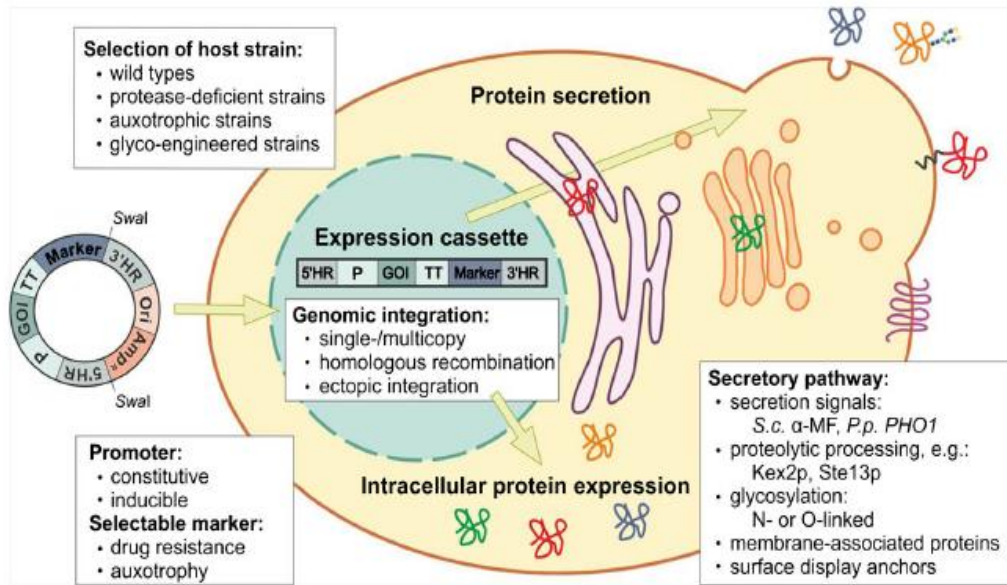
- 1) Ekspresyon vektörü içerisinde genin insersiyonu,
- 2) *Pichia pastoris* konakçısının içerisine ekspresyon vektörünün girişi,
- 3) Yabancı genin ekspresyonu için potansiyel suşların incelenmesi.



Şekil 1.6 *Pichia pastoris* Genomuna Gen İnsersiyonu (A) ve Yer Değiştirmesi (B) [60]

Pichia pastoris ile heterolog genlerin ekspresyonu AOX1 promotoru tarafından etkili ve sıkı bir şekilde düzenlenmektedir. Bu promotor, glukoz, gliserol ve diğer pek çok karbon kaynağı üzerinde büyüyen hücrelerde oldukça baskılanır fakat metanol tarafından güçlü bir şekilde indüklenir [56]. Bu sıkı düzenlenme *Pichia pastoris*'in, gliserolde büyüyen daha sonra metanol ile indüklenen hücre kültürlerinde kullanılmaktadır. Yetiştirme süreleri, üretimin endüstriyel seviyelerine göre şekillendirilebilir [56]. AOX promotorları en yaygın kullanılan promotor olsa da *Pichia*

Pastoris'te yabancı protein üretimi için DAS (Dihidroksiaseton sentaz), FLD 1 (Formaldehit dehidrogenaz) gibi başka promotor seçenekleri de mevcuttur [61].

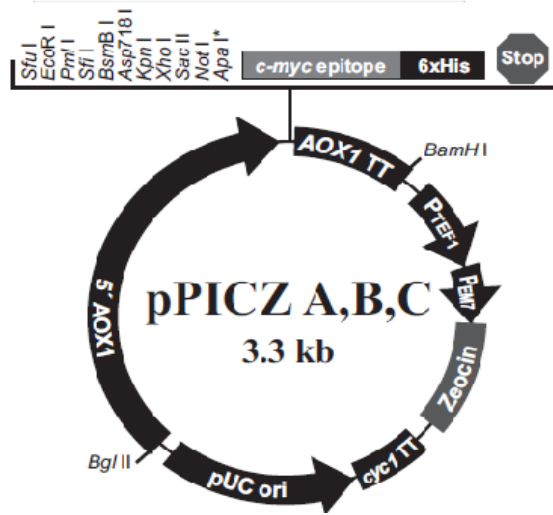


Şekil 1.7 *Pichia pastoris* Heterolog Ekspresyon* [62]

*Ekspresyon plazmidini barındıran ilgili gen(ler) (GOI), transformasyon öncesinde lineer hale getirilir. Seçilebilir markerlar ve replikasyon orijini (Ori), *E.coli* içindeki plazmidin çoğalması için gereklidir. İlgilenilen proteinin ekspresyon seviyesi kromozomal entegrasyon lokusuna ve genin kopya sayısına bağlıdır. Uygun sinyal sekansları rekombinant protein için intraselüler ya da ekstraselüler ekspresyona rehberlik eder.

1.1.5.4 Ekspresyon Vektörü pPICZ

pPICZ'ler, intraselüler ekspresyon için tasarlanan *Pichia pastoris* vektörleridir. Şekil 1.8'de vektöre ait harita verilmiştir. C-terminaldeki polihistidin bölgesiyle birlikte klonlayabilmek için ekspresyon vektörü üç okuma çerçevesine sahiptir. Ayrıca seçilimi sağlayan Zeocin direnç genini taşımaktadır.



Şekil 1.8 Ekspresyon Vektörü pPICZ'nin VektörününTasarımı [10]

Çizelge 1.1 pPICZB Vektörünün Özellikleri

5'AOX1	942 bp uzunluğa sahip promotor sekansıdır. Metanolle uyarılarak yüksek düzeyde ekspresyon sağlar. Plazmidin AOX1 lokusuna entegre olmasını hedefler.
MCS	On adet tekli restriksiyon bölgesi içerir ve hedeflenen genin ekspresyon vektörüne eklenmesini sağlar.
C-terminal myc epitope kuyruğu	(Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu-Asn) Füzyon proteinin anti-myc antikoruyla deteksiyonunu sağlar.
C-terminal polihistidin kuyruğu	Rekombinant füzyon proteinin metal-şelatlayan resinle saflaştırılmasını sağlar. Ayrıca Anti-His(C-term) Antibadi ve Anti-His (C-term)-HRP Antibadi için hedef epitoptur.
AOX1 Transkripsiyon Terminasyon (TT)	AOX1 geninin doğal transkripsiyon sonlanma sinyalidir (yaklaşık olarak 260 bp). mRNA stabilitesinin artırılması için 3' mRNA işlenmesini sağlar.
TEF1 promotoru:	Zeosin direncini oluşturan <i>Sh ble</i> geninin ekspresyonunu sağlar.
EM7(Sentetik prokaryotik promotor)	Zeosin direncini veren <i>Sh ble</i> geninin E. coli de ekspresyonunu sağlayan konstitütif promotordur.
Sh ble geni	E. coli de seçim için zeocin direnç genidir. (<i>Streptoalloteichus hindustanus ble</i> geni)
CYC1 TT	Sh ble geni için etkin 3' mRNA işlenmesini sağlar.

Çizelge 1.1 pPICZB Vektörünün Özellikleri (devamı)

pUC orijini	Plazmitin <i>E. coli</i> de kalmasını ve replikasyonunu sağlar.
Sac I, Pme I, BstX I	<i>Pichia</i> genomuna etkin integrasyon için vektörün AOX1 lokusunda linearizasyonunu sağlayan tekli reksriksiyon bölgeleridir.

1.1.5.5 *Pichia pastoris*'te Eksprese Edilmiş Beta Glukozidazlar

Çizelge 1.2' de ekspresyonu *Pichia pastoris*'te yapılmış farklı kaynaklara ait bazı beta glukozidazlar listelenmiştir. Himeno ve arkadaşları tarafından 2013 yılında yapılan bir çalışmada, tüberonik asit β -D-glukosidleri hidrolizeyebilen, *Oryza sativa*'ya ait iki adet beta glukozidazı, *Pichia pastoris*'in X-33 suşunda ekstraselüler olarak eksprese etmişlerdir. Rekombinant enzimin spesifik aktivitesi (182 U/mg), doğal enzimin spesifik aktivitesine (171 U/mg) göre daha yüksek görülmüştür. Ayrıca *E.coli*'de üretilmiş rekombinant enzimin spesifik aktivitesinin, doğal enzimin spesifik aktivitesine kıyasla üç kat daha düşük olduğu tespit edilmiştir [63]. Bu sonuç *Pichia pastoris*'teki rekombinant enzim üretiminin avantajlı olduğunu göstermektedir.

Çizelge 1.2 *Pichia pastoris*'te Ekspresyonu Yapılmış Beta Glukozidazlar

Organizmanın Tipi	Kaynak Organizma	Molekül Ağırlığı (kDa)	Ekspresyon Suşu	Ekspresyon Besiyeri Ve Koşulları	Optimal Sıcaklık (°C) ve pH	GH Ailesi	Ref .
Maya	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	120	X-33 KM71	BMMY 28°C / %0.5 Metanol	50°C pH 5	-	[64]
Mantar	<i>Piromyces sp.</i>	75.8	KM71	MMY %0.5 Metanol	39°C pH 6	GH1	[65]
	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	-	KM71	YPM 30°C	70°C pH 5	GH3	[66]
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	91.47	X-33	YPM	60°C pH 6	GH3	[67]

Çizelge 1.2 *Pichia pastoris*'te Ekspresyonu Yapılmış Beta Glukozidazlar (devamı)

Organizmanın Tipi	Kaynak Organizma	Molekül Ağırlığı (kDa)	Ekspresyon Suşu	Ekspresyon Besiyeri Ve Koşulları	Optimal Sıcaklık (°C) ve pH	GH Ailesi	Ref .
Hayvan	Human liver	53	GS115	BMMY 30°C	50°C pH 6.5	GH1	[68]
	<i>Nasutitermes takasagoensis</i>	169.5	KM71	-	65°C pH 5.5	GH1	[69]
Bitki	<i>Dalbergia cochinchinensis</i>	66	GS115	BMMY	-	GH1	[70]
	<i>Oryza sativa</i>	40 ve 26'lık iki peptid	X-33	BMMY 20 ve 30°C %0.5 Metanol	60°C pH 3.4	-	[63]

1.2 Tezin Amacı

Bu çalışmanın amacı; Zeytin (*Olea europaea* L. Gemlik kùltürü) beta glukozidaz geninin *Pichia pastoris*'te heterolog ekspresyonunu gerçekleştirmektir. Tez çalışması tamamlandıktan sonra enzimin saflaştırılması ve biyokimyasal karakterizasyonu ile ilgili çalışmalar devam edecektir.

1.3 Hipotez

Laboratuvarımızda klonlanan, tam uzunluktaki zeytin beta glukozidaz genine ait cDNA uygun primerler kullanılarak PCR yöntemi ile çoğaltılacaktır. Rekombinant ekspresyon vektörü, *Pichia pastoris* X-33 suşuna klonlanacak ve uygun besiyerlerinde beta glukozidaz proteini elde edilecektir. Daha sonra da enzimin yapay substratlarına yönelik tayin yöntemleri uygulanacaktır.

BÖLÜM 2

MATERYAL METOD

2.1 Tamponlar ve Çözeltiler

Çizelge 2.1 Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

TBE çözeltisi (10 X)	108 g Tris base, 55 g Boric acid, 40 ml 0.5M EDTA (pH 8.0), 1L distile suya tamamlandı.
Maya Hücresi Parçalama Tamponu	50 mM Sodyum Fosfat Tamponu pH 7.5, %10 Gliserol, 500 mM NaCl son hacim 500 ml olacak şekilde distile su ile tamamlandı. Parçalama işlemine başlamadan hemen önce gerekli miktar parçalama tamponuna son konsantrasyon 1 mM olacak şekilde PMSF ve her 6 ml için, 1 ml EDTA içermeyen Proteaz İnhibitör kokteyli birleştirildi.
7 X Proteaz İnhibitör Kokteyli	1 adet tablet 1.5 ml suda çözdürüldü. (cOmplete Mini EDTA-Free Protease Inhibitor Coctail ROCHE)
10 X YNB (%13 Yeast Nitrogen Base with Ammonium Sulfate without amino acids)	134 g YNB 1 L su içerisinde çözdürüldü. Filtre sterilizasyonu yapıldı.
10 X D (%20 Dextrose)	200 g Dextrose 1 L distile suya tamamlandı.

Çizelge 2.1 Kullanılan Tampon ve Çözeltiler (devamı)

10 X M (%5 Metanol)	5 ml Metanole 95 ml distile su eklendi.
10 X GY (%10 Gliserol)	100 ml Gliserole 900 ml distile su eklendi.
500 X B (Biotin)	2 mg Biotin 10 ml distile suda çözdürüldü.
200mM Lityum Asetat Tamponu	41 mg LioAC dihidrat 20 mg SDS ile 2 ml distile suda çözdürüldü.
Etanol	%96-100, %70
Sodyum Asetat Çözeltisi 0.1 M	0.802 g Sodyum Asetat 100 ml distile suda çözdürüldü.
Asetik Asit Çözeltisi 0.1 M	0,575 ml %100 Asetik asit 100 ml distile suya tamamlandı.
Sodyum Asetat Tamponu 0.1 M pH 4.1	35.7 ml 0.1M asetik asit çözeltisi, 64.3 ml 0.1M sodyum asetat çözeltisi ile karıştırıldı. Son pH asetik asit ile ayarlandı.
Tris-Glycine Running Buffer (pH 8.3)	1.5 g Tris-Base, 7.2 g Glisin 500 ml olacak şekilde distile su ile tamamlandı. pH 8.3'e ayarlandı.
20 mM pNPG	0.006 g pNPG 10 ml Sodyum Asetat Tamponunda çözdürüldü.
5 mM MUG	1.7 mg MUG, 1 ml Sodyum Asetat Buffer pH 5.5 içerisinde çözdürüldü.
%0.8 Agar Plate	800 mg agar, 100 ml su içerisinde eritildi. Ve plakelere alınarak polimerleşmesi sağlandı.
Tris	1.5 M pH 8.8 ve 1 M pH 6.8 hazırlandı.
%10 Amonyum Persülfat	20 mg APS, 200 µl distile suda çözdürüldü.
%10 SDS	10 g SDS, 100 ml distile suda çözdürüldü.

Çizelge 2.1 Kullanılan Tampon ve Çözeltiler (devamı)

SDS-PAGE Boyama Solüsyonu	62.5 mg CBB, 100 ml Metanol, 17.5 ml Asetik asit birleştirilip, son hacmi 250 ml olacak şekilde distile su ile tamamlandı.
SDS-PAGE Boyayı Yıkama Solüsyonu	100 ml Metanol, 50 ml Asetik asit, 350 ml distile su ile birleştirildi.
Denatüre Koşullarda Bağlanma Tamponu	8 M üre, 10 mM imidazol, 0.1 M sodyum fosfat monobazik, 0.01 M Tris birleştirilip pH 8.0'e ayarlandı.
Denatüre Koşullarda Yıkama Tamponu	8 M üre, 50 mM imidazol, 0.1 M sodyum fosfat monobazik, 0.01 M Tris birleştirilip pH 6.3'e ayarlandı.
Denatüre Koşullarda Elüsyon Tamponu	8 M üre, 250 mM imidazol, 0.1 M sodyum fosfat monobazik, 0.01 M Tris birleştirilip pH 4.5'e ayarlandı.

2.2 Besiyerleri

Çizelge 2.2 Kullanılan Besiyerleri

Düşük Tuz İçerikli Luria Broth (LS-LB)	10 g Tripton, 5 g Maya ekstratı, 5 g Sodyum Klorür, 15 g Agar 1L distile suya tamamlandı. 121°C'de 20 dakika otoklavlandı.
SOB (pH 7.0) (Super Optimal Broth)	%2 Tripton, %0.5 Maya Ekstraktı, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ içeriği hazırlandıktan sonra 121°C'de 20 dakika otoklavlandı.
SOC (Glukoz İlaveli Super Optimal Broth)	49 ml SOB'ye, 1 ml steril 1 M Glukoz solüsyonu eklendi.
YPDS (Yeast Extract Pepton Dextrose Medium)	%1 Maya ekstratı, %2 Pepton, %2 Dekstroz, 1 M Sorbitol, %2 Agar içeriği ile hazırlanan besiyeri 121°C'de 20 dakika otoklavlandı.

Çizelge 2.2 Kullanılan Besiyerleri (devamı)

YPD (YEPD) (Yeast Extract Pepton Dextrose Medium)	%1 Maya ekstratı, %2 Pepton, %2 Dekstroz, %2 Agar içeriği ile hazırlanan besiyeri 121°C'de 20 dakika otoklavlandı.
BMGY Besiyeri (Buffered Glycerol-complex Medium)	%1.34 YNB, %1 Gliserol, %4 x 10 ⁻⁵ Biotin, %1 Maya ekstratı, %2 Pepton, 100 mM Potasyum Fosfat pH 6.0 steril şartlar altında birleştirildi.
MM Besiyeri (Minimal Methanol Medium)	%1.34 YNB, %0.5 Metanol, %4 x 10 ⁻⁵ Biotin steril şartlar altında birleştirildi.
BMMY Besiyeri (Buffered Methanol-complex Medium)	%1.34 YNB, %1 Metanol, %4 x 10 ⁻⁵ Biotin, %1 Maya ekstratı, %2 Pepton, 100 mM Potasyum Fosfat pH 6.0 steril şartlar altında birleştirildi.

2.3 Kullanılan antibiyotikler

Zeocin (İnvitrogen); D1 fleomisinin bir formülasyonu olan Zeocin, Streptomyces verticillatus üretilen bir glikopeptittir. DNA'ya bağlanıp-kesme yoluyla hücre ölümlerine neden olur. Memeli, böcek, maya, bakteri ve bitki hücre kültürlerinin seçilimi için kullanılır.

2.4 Kullanılan Substratlar

Çizelge 2.3 Kullanılan Substratlar

pNPG	4-Nitrofenil-beta-D-glukopranosid (C ₁₂ H ₁₅ NO ₈)
MUG	4-Metilumbelliferil β-D- glukopranosid (C ₁₆ H ₁₈ O ₈)

2.5 Cihazlar

Çizelge 2.4 Kullanılan Cihazlar

Thermal Cycler	Eppendorf Mastercycler
Isı Bloğu	INOVA
Santrifüj	Hettich Universal 32R

Çizelge 2.4 Kullanılan Cihazlar (devamı)

Etüv	WTB binder
Spektrofotometre	SHIMADZU UV-1800
Çalkalamalı İnkübatör	JSR

2.6 Enzimler

Çizelge 2.5 Kullanılan Enzimler

Taq polimerazlar	Roche Expand High Fidelity PCR Enzimi, Thermo Phusion High Fidelity DNA Polimeraz
Ligazlar	Roche T4 DNA Ligaz
Restriksiyon Enzimleri	<i>Xho</i> I (Thermo), <i>EcoR</i> I (Thermo), <i>Sac</i> I (Thermo)

2.7 Kitler

Çizelge 2.6 Kullanılan Kitler

PCR Kiti	Roche Expand High Fidelity PCR System
Jel Ekstraksiyon Kiti	QIAGEN MinElute Jel Ekstraksiyon Kiti ve QIAGEN QIAquick Jel Ekstraksiyon Kiti
Ligasyon Kiti	Roche T4 DNA Ligaz Sistemi
Plazmid İzolasyon Kiti	Roche High Pure Plazmid İzolasyon Kiti
Ekspresyon Kiti	İnvitrogen EasySelect <i>Pichia</i> Ekspresyon Kiti
Saflaştırma Kiti	Zymoresearch His-Spin Protein Miniprep Kit

2.8 Oligonükleotitler

Çizelge 2.7 Oligonükleotitler

P2 İleri Primer	5'-CCGGAATTCAGCATGGATATCCAAAGCAACGT-3'
P5 Geri Primer	5'-AACCTCGAGGGTGCTGCCTCTAAGCCTTTTACGA-3'

Çizelge 2.7 Oligonükleotitler (devamı)

5'AOX1 Primer	5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'
3'AOX1 Primer	5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'

2.9 Markerlar

Çizelge 2.8 Moleküler Markerlar

Biotech Rabbit 100 bp DNA Ladder	%1.5'lik TAE agaroz jelde 3000 bp ile 100 bp arasında toplam on iki banta sahiptir.
Mass Ruler Low Range DNA Ladder	%1.7'lik agaroz jelde 1031 bp ile 80 bp arasında toplam on bir banta sahiptir.
Lambda DNA/EcoR I+ Hind III Marker	%1'lik agaroz jelde 21226 bp ile 564 bp arasında toplam on iki banta sahiptir.
Biorad Protein Precision Standard	10 ile 250 kD arasında toplam on banta sahiptir.

2.10 Beta glukozidaz cDNA'sının çoğaltılması

Beta glukozidaz cDNA'sının çoğaltılmasına ilişkin adımlar aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir.

2.10.1 PCR Reaksiyonun Kurulması

1 µl kalıp cDNA, 1.5 µl dNTPs (10 mM), 0.5 µl (10 mM) ileri primer (P2), 0.5 µl (10 mM) geri primer (P5), 5 µl 10 X Roche Expand High Fidelity buffer (15 mM MgCl₂) , 0.5 µl Roche Expand High Fidelity enzim (3.5 U/µl) ve 41 µl H₂O eklenerek reaksiyon kurulmuştur.

Kalıp olarak kullanılan DNA, laboratuvarımızda önceki çalışmalarda, *Olea europaea* L. Gemlik kùltivarından elde edilmiş beta glukozidaz cDNA'sını kalıp olarak kullanarak, Dr. Esra YÜCA tarafından pGEM-T Easy vektörüne klonlanmış DNA'dır. Kalıp olarak kullanılan plazmidin dizin analizi sonuçları **EK A-1'de** verilmiştir.

94°C'de 2 dakika başlangıç denatürasyonundan sonra, 94°C'de 15 saniye denatürasyon, 55°C'de 30 saniye primer bağlanması, 72°C'de 1 dakika uzama aşamaları 30 döngü

olacak şekilde tekrarlanmıştır. 72°C’de 7 dakika son uzatma yapılarak program sonlandırılmıştır. Örnekler buz üzerine alınıp incelenmek üzere -20°C’ye kaldırılmıştır.

2.10.2 PCR ürünün Agaroz Jelde Görüntülenmesi

0.75 g Agaroz ile 75 ml 1 X TBE şişe içerisine alınmış ve mikrodalgada ısıtılarak eritilmiştir. Yaklaşık 60°C’ye kadar soğutulmuş ve 3 µl etidyum bromür eklenmiştir. Karıştırıldıktan sonra jel tepsisine dökülmüş ve polimerleşmesi beklenmiştir. Polimerleşen jel, tepsi ile birlikte elektroforez tankına alınmıştır. Üzerine gerekli miktarda 1 X TBE eklenmiştir. Örnekler uygun miktarlarda yükleme tamponu eklenmiş ve kuyulara yüklenmiştir. 70 V’da 1 saat 15 dakika yürütülmüştür. UV ışık altında görüntülenmiştir.

2.10.3 DNA’nın Agaroz Jelden Pürifikasyonu

Jelde ilgili bölgeden bistüri ile kesilen bantlar QIAGEN MinElute Jel Ekstraksiyon Kit’te anlatılan protokole göre pürifiye edilmiştir. Son aşamada elüsyon tamponu yerine 55°C’de ısıtılmış, 15 µl DNase RNase içermeyen H₂O kullanılmıştır.

2.11 Pürifiye Edilmiş Ürünün ve Ekspresyon Vektörü pPicZB’nin *Xho*I/ *Eco*RI Kesimi

1 µl *Xho* I enzimi (10 U/ µl Thermo) , 1 µl *Eco*R I enzimi (10 U/ µl, Thermo), 10 µl 10 X Tango buffer, 18 µl pürifiye beta glukozidaz DNA’sı ile kurulan reaksiyon toplam 50 µl olacak şekilde DNase, RNase içermeyen H₂O ile tamamlanmıştır.

Kesim 37°C’de 2 saat 30 dakikada ısı bloğunda gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonucunda tüpler -20°C’ye kaldırılmıştır.

1 µl *Xho* I enzimi, 1 µl *Eco*R I enzimi, 5 µl 10 X Tango buffer, 10 µl pPicZB plazmidi ile kurulan reaksiyon toplam 25 µl olacak şekilde DNase, RNase içermeyen H₂O ile tamamlanmıştır. Kesim 37°C’de 2 saat 30 dakikada ısı bloğunda gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonucunda tüpler -20°C’ye kaldırılmıştır.

```

      5' end of AOX1 mRNA                                5' AOX1 priming site
811  AACCTTTTTT TTTATCATCA TTATTAGCTT ACTTTCATAA TTGCGACTGG TTCCAATTGA

871  CAAGCTTTTG ATTTTAACGA CTTTAAACGA CAACTTGAGA AGATCAAAAA ACAACTAATT

      Sfu I      EcoR I      Pml I      Sfi I      BsmB I Asp718 I Kpn I Xho I
931  ATTCGAAACG AGGAATTCAC GTGGCCCAGC CGGCCGTCTC GGATCGGTAC CTCGAGCCGC

      Sac II Not I      Xba I      myc epitope
991  GGCGGCCGCC AGCTT TCTA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG
      Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

      Polyhistidine tag
1040 AAT AGC GCC GTC GAC CAT CAT CAT CAT CAT CAT TGA GTTTGTAGCC TTAGACATGA
      Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His ***

1096 CTGTTCTCTCA GTTCAAGTTG GGCACCTACG AGAAGACCGG TCTTGCTAGA TTCTAATCAA

      3' AOX1 priming site
1156 GAGGATGTCA GAATGCCATT TGCCTGAGAG ATGCAGGCTT CATTTTTGAT ACTTTTTTAT

      3' polyadenylation site
1216 TTGTAACCTA TATAGTATAG GATTTTTTTT GTCATTTTGT TTC

```

Şekil 2.1 pPICZB Vektörünün Çoklu Klonlama Bölgesi

Reaksiyon sonucunda elde edilen kesim ürünleri %1'lik agaroz jele yüklenmiştir. 70 V'da 1 saat 15 dakika yürütülmüştür. UV ışık altında görüntülenme yapılmıştır.

İlgili bölge jelden kesilmiş ve QIAGEN MinElute Jel Ekstraksiyon Kit'te anlatılan protokole göre pürifiye edilmiştir. Son aşamada elüsyon tamponu yerine 12 µl H₂O kullanılmıştır.

2.11.1 Pürifiye Kesim Ürünlerinin Agaroz Jelde Kontrolü ve Kütlesinin Hesaplanması

%1'lik agaroz jele pürifikasyon ürünleri yüklenmiştir. 70 V'da 1 saat 15 dakika yürütülmüştür. UV ışık altında görüntülenme yapılmıştır. Daha sonra kullanılan marker ile yaklaşık kütle tayini yapılmıştır. Ligasyonda kullanılacak miktar hesaplanmıştır.

2.12 Ekspresyon Vektörü pPicZB'ye Beta Glukozidaz cDNA'sının Ligasyonu

Ligasyon reaksiyonunda Vektör DNA: cDNA oranı 1:7 olarak belirlenmiştir. Roche T4 DNA Ligaz Sistemi kullanılmıştır. 1 µl pPicZB vektör, 7 µl cDNA, 1 µl T4 DNA ligaz (5 U/µl) , 1 µl 10 X Tampon ile toplam 10 µl olacak şekilde reaksiyon kurulmuştur. +4°C'de bir gece boyunca bekletilmiştir.

2.13 Ekspresyon Vektörünün *E.coli* JM109 Hücrelerine Transformasyonu

75 µl *E.coli* JM109 hücresi, 5 µl vektöre bağlanmış DNA ile birleştirilmiştir. 30 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra 45 saniye 42°C'ye alınmıştır. Daha sonra 1 dakika buza tekrar alınmıştır. 920 µl SOC ekledikten sonra 37°C 220 rpm hızda 1 saat boyunca büyütülmüştür.

Büyüme işlemi sonlandırıldıktan sonra hücreler, 2320 xg'de 3 dakika santrifüjlenerek çöktürülmüştür. Üst fazdan 500 µl SOC uzaklaştırıldıktan sonra katı ve sıvı faz karıştırılmıştır. 25 µg/ml Zeocin içeren düşük tuz içerikli Luria Broth (LS-LB) besiyerine ekim yapılmıştır. 16 saat boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir.

Zeocin direncine sahip vektöre transforme olan koloniler besi ortamında büyüme gösterirken, transforme olamamış koloniler besiyerinde büyüme gösterememiştir.

2.14 Plazmid İzolasyonu

Büyüme gösteren kolonilerden biri seçilerek 25 µg/ml zeocin içeren 3 ml sıvı LS-LB'de 37°C'de 220 rpm hızda 16 saat büyütülmüştür. Sıvı kültür 6000 rpm'de çöktürülmüş ve hücrelerden Roche High Pure Plazmid İzolasyon Kit'indeki protokole göre plazmid izolasyonu yapılmıştır. Son aşamada elüsyon tamponu yerine DNase, RNase içermeyen 50 µl H₂O kullanılmıştır.

2.15 Plazmid İçerisinde İnsert Varlığının Kontrolü

Plazmid izolasyonu ile elde edilmiş plazmidin içerisinde, zeytin beta glukozidaz cDNA'sının varlığını kontrol etmek adına *Xho* I/*EcoR* I kesimi uygulanmıştır. Kesim reaksiyonu sonucunda jel görüntüsünde beta glukozidaz cDNA'sı büyüklüğünde bant görülmesi halinde, plazmidin insert içerdiği tespit edilebilecektir.

6 µl JM109 hücrelerine aktarılmış plazmid, 1 µl *Xho* I, 1 µl *EcoR* I, 4 µl 5 X Tango buffer, 8 µl H₂O mikrosantrifüj tüpünde birleştirilmiş ve ısı bloğunda 37°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra buz üzerine alınıp -20°C'ye kaldırılmıştır.

%1'lik agaroz jel hazırlanıp kesim reaksiyonları yükleme tamponları ile kuyulara yüklenmiştir. 70 V'da 1 saat 15 dakika yürütüldükten sonra UV görüntüleme cihazı ile görüntülenmiştir.

2.16 Sac I Enzim Kesimiyle Vektörün Doğrusal Hale Getirilmesi

İçerisinde insert barındıran vektörü *Pichia pastoris* X-33 suşuna transformasyonunu sağlamak için, öncelikle Sac I enzimi ile doğrusal hale gelmesi sağlanmıştır.

5 µl 10 X Tango buffer, 1 µl Sac I (10 U/ µl, Thermo), 40 µl vektör (insert içeren veya pPicZB), 4 µl H₂O mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır. Isı bloğunda 37°C'de 2 saat inkübe edilmiş ve tamamlanan reaksiyon -20°C'ye alınmıştır.

%1'lik agaroz jel hazırlanıp kesim reaksiyonları uygun miktarlarda yükleme tamponları ile kuyulara yüklenmiştir. 70 V'da 1 saat 15 dakika yürütüldükten sonra UV görüntüleme cihazı ile görüntülenmiştir.

Jelde görüntülenen kesim reaksiyonuna ait bantlar bistüri yardımı ile jelden kesilmiştir. İki adet kurulan Sac I kesim reaksiyonları daha konsantre bir elüsyon elde etmek adına, jel ekstraksiyonu aşamasında tek kolondan geçirilmiştir. Mikrosantrifüj tüplerine alınarak QIAGEN QIAquick Jel Ekstraksiyon kitinde yer alan protokole göre pürifiye edilmiştir. Son aşamada elüsyonlar 12 µl H₂O ile yapılmıştır.

2.17 Kimyasal Kompetent X-33 Hücrelerinin Hazırlanması

X-33 hücresi YPD katı besiyerine çizgi ekim ile ekilmiş ve 2 gün boyunca 30°C'de büyütülmüştür. Büyüyen tek kolonilerden biri seçilmiş sıvı 10 ml YPD besiyerine inoküle edilmiştir. 30°C'de 280 rpm hızda gece boyunca büyütülmüştür. Hücre kültürü 600 nm'deki hücre yoğunluğu 0.1 olacak şekilde 10 ml YPD besiyerine dilüe edilmiştir. Daha sonra 30°C'de 280 rpm hızda 4-6 saat hücre yoğunluğu 600nm'de 1 olacak şekilde büyütülmüştür.

Oda sıcaklığında 500 x g'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı atılmış ve İnvitrogen EasySelect *Pichia* Expression Kitinde gelen Solüsyon 1'den 10 ml eklenmiştir. Hücre pelleti eklenen Solüsyon 1 içerisinde homojen hale getirilmiştir. İnkübe etmeksizin oda sıcaklığında 500 x g'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı atılarak, 1 ml Solüsyon 1 içerisinde hücre pelleti homojen hale getirilmiştir. Oluşan kompetent hücreler 200 µl'lik hacimlerde mikrosantrifüj tüplerine paylaştırılmış ve -80°C'ye kaldırılmıştır.

2.18 *Pichia pastoris* X-33 Hücresine Kimyasal Yolla Transformasyon

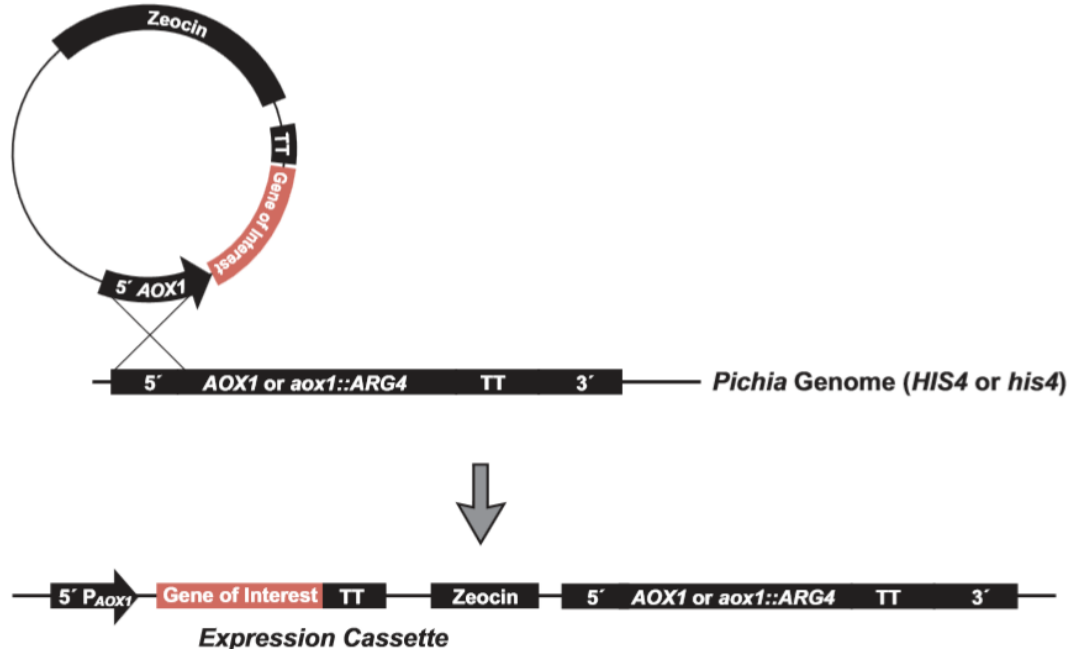
Doğrusal hale getirilmiş beta glukozidaz içeren ve içermeyen pPicZB vektörü X-33 suşuna kimyasal transformasyon yoluyla aktarılmıştır. İzlenilen prosedür şöyledir; 5 µl Sac I (10 U/ul) ile doğrusal hale getirilmiş insert içeren ve içermeyen vektörlerden alınmış ve 50 µl kompetent X-33 hücresi ile birleştirilmiştir.

İnvitrogen EasySelect *Pichia* Expression Kitinde gelen Solüsyon 2'den 1 ml eklenmiştir. DNA/hücre kültürü karışımı vorteks yardımı ile karıştırılmıştır. 30°C'de ısı bloğunda transformasyon reaksiyonu inkübe edilmiştir. Her 15 dakikada bir reaksiyon tüpü vorteks yardımı ile karıştırılmıştır. 1 saat inkübasyonun ardından hücrelere ısı bloğunda 10 dakika boyunca 42°C'de ısı şoku verilmiştir.

Şokun ardından hücreler iki mikrosantrifüj tüpüne bölünmüştür. Her bir tüpe 1 ml YPD besiyeri eklenmiştir. 30°C'de 1 saat boyunca hücreler inkübe edilmiştir.

Hücre kültürü 3.000 x g'de 5 dakika süre ile santrifüj edilmiş ve üst fazdaki süpernatant atılmıştır. Her bir tüpe 500 µl Solüsyon 3 eklenip, tek bir tüp içerisine birleştirilmiştir. Hücre kültürü 3.000 x g'de 5 dakika süre ile santrifüj edilmiş ve üst fazdaki süpernatant atılmıştır.

Hücre pelleti 150 µl Solüsyon 3 ile homojen hale getirilmiştir. Transformasyon steril cam üçgen ile 100 µg/ ml Zeocin içeren YPDS besiyerine yayılmıştır. 3-10 gün süre ile 30°C'de kolonilerin oluşumu için beklenmiştir.



Şekil 2.2 *Pichia pastoris*'te Rekombinasyon ve İntegrasyon [10]

2.18.1 Transformantların Seçimi

Zeocin direncine sahip transforme olmuş kolonilerin YPDS/Zeocin besiyerinde büyüme göstermesi beklenmiştir. Transforme olmamış hücrelerde zeocin direnci geni taşıyan pPiCZB vektörü olmadığı için seçici besiyerinde üreme olmayacaktır.

2.19 Maya Hücresinden Genomik DNA İzolasyonu

P2P5 ve X-33 tek kolonilerinden steril tip ile alınmış ve 100 µl 200mM LiOAc %1 SDS solüsyonu içerisine süspanse edilmiştir. 70°C'de ısı bloğunda 5 dakika inkübe edilmiş ve 300 µl %96-100 etanol eklenerek otuz saniye vortekslenmiştir.

15.000 x g'de 3 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Hücre pelleti %70 etanol ile yıkanmıştır. 15.000 x g'de 3 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Hücre pelleti %100 etanol ile yıkanmıştır. Daha sonra 100 µl H₂O içerisinde pellet homojen hale getirilmiştir. 15.000 x g'de 1 dakika santrifüjlenerek üst faz PCR'da kullanılmak üzere ayrılmıştır [71].

2.20 Genomik DNA'dan Beta Glukozidaz Entegrasyonunun Kontrolü

Maya hücrelerinden çıkartılan genomik DNA'ların içerisinde zeytin beta glukozidaz cDNA'sının varlığını kontrol etmek için *Pichia pastoris*'e ait AOX primerleri ve klonlanan beta glukozidaz genine özel tasarlanmış P2/P5 primerleriyle PCR kurulmuştur.

2.20.1 AOX1 Primerli Reaksiyonun Kurulması

1 µl 10 mM dNTP, 1 µl 10 mM 5' AOX1 primer, 1 µl 10 mM 3' AOX1 primer, 5 µl 10 X Reaksiyon tamponu (Thermo), 5 µl genomik DNA, 0,5 µl Phusion High Fidelity Enzim (Thermo) ve 31,5 µl H₂O toplam reaksiyon 50 µl olmak üzere mikrosantrifüj tüpünde birleştirilmiştir.

98°C'de 30 saniye ilk denatürasyon, 98°C'de 10 saniye denatürasyon 54°C'de 30 saniye primer bağlanması, 72°C'de 30 saniye zincirin uzama aşamaları 30 döngü tekrarlanmıştır. 72°C'de 10 dakika son uzama yapıldıktan sonra reaksiyon durdurulmuştur. Buz üzerine alınıp -20°C'ye kaldırılmıştır.

%1,5'lik agaroz jel hazırlanmış ve örnekler uygun miktarlarda yükleme tamponu ile kuyulara yüklenmiştir. 70 V'da 1 saat 15 dakika boyunca yürütülmüştür ve UV ışık altında görüntülenmiştir.

2.20.2 AOX1 Primerli ve Gene Özgü P5 Primerli Reaksiyonun Kurulması

1 µl 10 mM dNTP, 1 µl 10 mM 5' AOX1 primer, 1 µl 10 mM P5 primer, 5 µl 10X Reaksiyon tamponu (Thermo), 5 µl genomik DNA, 0,5 µl Phusion High Fidelity Enzim (Thermo) ve 31,5 µl H₂O toplam reaksiyon 50 µl olmak üzere mikrosantrifüj tüpünde birleştirilmiştir.

98°C'de 30 saniye ilk denatürasyon, 98°C'de 10 saniye denatürasyon 54°C'de 30 saniye primer bağlanması, 72°C'de 30 saniye zincirin uzama aşamaları 30 döngü tekrarlanmıştır. 72°C'de 10 dakika son uzama yapıldıktan sonra reaksiyon durdurulmuştur. Buz üzerine alınıp -20°C'ye kaldırılmıştır.

%1,5'lik agaroz jel hazırlanmış ve örnekler uygun miktarlarda yükleme tamponu ile kuyulara yüklenmiştir. 70 V'da 1 saat 15 dakika boyunca yürütülmüştür ve UV ışık altında görüntülenmiştir.

2.21 Zeytin Beta Glukozidaz cDNA'sının *Pichia pastoris*'te Ekspresyonu

Rekombinant *Pichia pastoris* kolonisi ve X-33 kolonisine ait ekspresyon adımları aşağıda belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

2.21.1 Uygun Besiyerlerine Kolonilerin Aşılması ve Ekspresyonun İndüklenmesi

Zeytin Beta glukozidaz cDNA'sını taşıyan P2P5 kolonisi ve insert içermeyen *P. pastoris* X-33 kolonisi 50 ml'lik BMGY besiyerlerine aşılanmıştır. Kültürler 30°C ve 250 rpm'de bir gece boyunca inkübe edilmiş ve kolonilerin büyümesi sağlanmıştır.

Büyütülen önkültür, OD 600 nm'de ölçülen absorbansı 1 olacak şekilde 50 ml MM ve BMMY içeren ekspresyon besiyerlerine aşılanmıştır. Ekspresyonun indüklenmesi amacıyla her 24 saatte bir % 1 metanol ilavesi yapılmıştır. Her 24 saatte bir kültürlerden 1.5 ml örnek alınmış ve 96. Saat sonunda ekspresyon durdurulmuştur.

2.21.2 Hücre Pelletinin Parçalanması

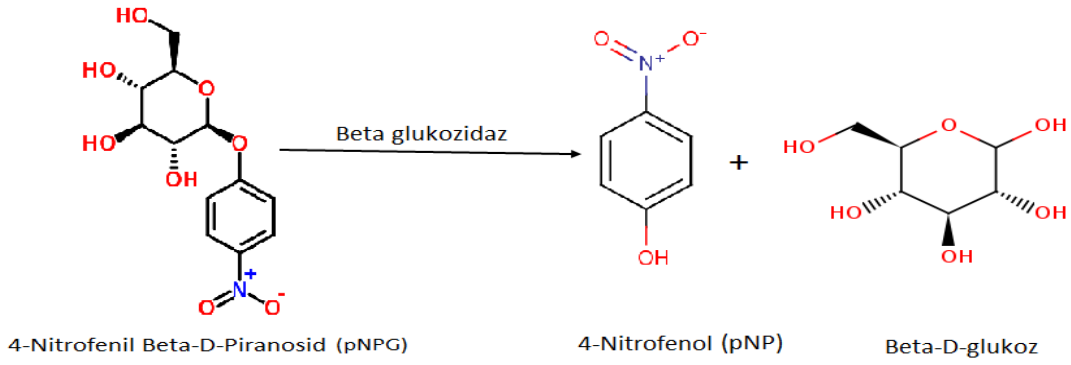
Ekspresyon kültürlerinden alınan örnekler, 16.000 x g'de 3 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant kısmı atılarak geriye kalan hücre pelletine her 1 ml kültür için 100 µl parçalama tamponu eklenmiştir. Eş hacimde asitle yıkanmış 0.5 mm boyutunda cam boncuk eklenmiştir. 1 dakika vorteksleme ve 1 dakika buzda bekletme aşamalarını içeren 8 döngü tamamlandıktan sonra hücre lizatı santrifüjde maksimum hızda +4°C'de 10 dakika çevrilmiştir. Süpernatant incelenmek üzere temiz mikrosantrifüj tüplerine alınmıştır.

2.22 Ekspresyon Sonrasında Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Ekspresyon aşaması sonrasında enzimin yapay substratları ile aktiviteleri Bölüm 2.22.1 ve 2.22.3'teki gibi belirlenmiştir. Ayrıca Bradford yöntemi ile protein miktarları belirlenmiştir.

2.22.1 pNPG Substratı ile Enzim Assay Kurulması

Şekil 2.3'de beta glukozidaz ile pNPG substratının meydana getirdiği reaksiyon şematize edilmiştir.



Şekil 2.3 Beta glukozidazın pNPG ile reaksiyonu

Çizelge 2.9 pNPG Aktivite Assay

ENZİM REAKSİYONU	KÖR
22.5 µl 20 mM pNPG + 45 µl 0.1 M Sodyum Asetat Buffer pH 4.1	
32.5 µl Enzim	_____
30 Dakika 42°C’de İnkübasyon	
100 µl Soğuk 1 M Na ₂ CO ₃ ile Reaksiyonu Sonlandırma	

Reaksiyonlar hem X-33 hem de P2P5 örnekleri için Çizelge 2.9’daki gibi kurulmuştur. pNPG’nin beta glukozidaz ile reaksiyonundan ortaya çıkan ürün olan pNP’nin (paranitrofenol) 405 nm’de verdiği absorbanslar ölçülmüştür.

Daha sonra Bradford Yöntemi ile protein miktarları tayin edilmiş ve aşağıda yer alan formüllere göre aktivite (U/ml) ve spesifik aktivite (U/mg) hesaplanmıştır.

U: Optimal şartlarda, 1 dakikada 1 mikromol (µmol) substratı ürüne dönüştüren enzim miktarıdır.

$$\text{Aktivite (U/ml)} = \frac{\Delta OD \times V_t \times d_f}{18.1 \times 1.0 \times t \times V_0}$$

$$\text{Spesifik aktivite (U/mg)} = (\text{U/ml}) \times 1/C$$

[**V_t**: Toplam hacim (0.2 ml), **V₀**: Örnek hacmi (32.5 µl), **1.0**: Işık yolu uzunluğu (cm), **t**: Reaksiyon süresi (30 dk), **d_f**: Seyreltme katsayısı **C**: Enzim yoğunluğu (mg/ml), **18.1**: p-nitrofenol için verilen şartlarda milimolar ekstinksiyon katsayısıdır.]

2.22.2 Bradford Yöntemi ile Protein Miktarı Tayini

Quick Start™ Bradford Protein Assay - Bio-Rad kitinin Standartassay 2 mg/ml BSA protokolü kullanılarak deney yapılmıştır. 2 mg/ml stok BSA çözeltisinden dH₂O ile 500, 400, 300, 200, 100, 50, 25, 0 µg/ml yoğunlukta protein çözeltileri hazırlanmıştır.

Standart çözeltilerden alınan 20 µl örneğe 1 ml Bradford çözeltisi eklenerek 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası sulandırma yapılmaksızın 595 nm deki absorbanslar ölçülmüştür. Her bir yoğunluk için iki defa ölçüm alınıp ortalamalar hesaplanmıştır.

Protein örnekleri için uygun miktarlarda dilüsyonlar hazırlanmıştır, BMMY besiyerinde büyüyen hücrelere ait proteinler için dilüsyon faktörü 20 iken, MM besiyerindeki proteinler için 10'dur. Örneklerin 20 µl'sine 1 ml Bradford çözeltisi eklenerek 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonrası sulandırma yapılmaksızın 595 nm deki absorbanslar ölçülmüştür. Elde edilen değerler standart grafiğinde oluşturulmuş denklemde yerine yerleştirilerek proteinlerin miktarları tayin edilmiştir.

2.22.3 MUG Aktivite Tayin Yönteminin Kurulması

BMMY ve MM besiyerindeki 24, 48, 72 ve 96. Saatteki ham protein ekstratlara son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde, 5 mM MUG stok çözeltisinden eklenmiştir. Karışımların eş protein yoğunluklarına göre miktarları hesaplanıp, %0.8 agar içeren ortama aktarılmıştır. 5 dakika inkübasyonun sonucunda UV altında görüntülenme sağlanmıştır.

2.22.4 Afinite Kromatografisi ile Saflaştırma

Moleküler tanımaya dayalı bir yöntem olan afinite kromatografisi, proteinlerin fiziksel veya kimyasal özelliklerinin yerine biyolojik fonksiyonlarına göre ayrılmalarını sağlayan bir yöntemdir [72] [73]. Afinite kromatografisi, hedef biyomolekülün, çözünmeyen bir destek materyali (matriks) üzerine immobilize edilen ve hedef molekülü tamamlayıcı bağlanma uçları içeren ligandlar tarafından spesifik ve geri dönüşümlü olarak adsorbe edilmesine dayalı bir yöntemdir [74].

Ligand ile hedef molekül arasındaki biyolojik etkileşimler, elektrostatik veya hidrofobik interaksiyonlar, van der Waals ve/veya hidrojen bağları ile gerçekleşebilmektedir. Hedef molekülün ortamdan elüsyonu ya yarışmacı bir ligandın kullanılması ya da ortamın (mobil faz) pH, iyonik kuvvet veya polaritesinde değişimler yapılması ile sağlanmaktadır [74].

Hedeflediğimiz heterolog protein saflaştırma protokolü de bir çeşit afinite kromatografisine (IMAC) dayanmaktadır. Zeytin beta glukozidaz geni PCR ile çoğaltılırken, sonlandırma kodonu kaldırılmış böylelikle 6X Histidin kuyruğunun sentezlenmesi sağlanmıştır.

Uyguladığımız protein saflaştırma aşaması Nikel iyonlarına polihistidin kuyruğunun bağlanma afinitesine dayanır. Uygun pH ve imidazol konsantrasyonunda resine bağlanan histidin kuyruğu ile proteinin saflaştırılması sağlanacaktır.

Zymo Research His-Spin Protein Miniprep kitinde yer alan protokole sadık kalınarak saflaştırma işlemi yapılmıştır. Vortekslenerek süspanse edilen 250 µl His- Afinite Jeli Zymo-Spin Kolona aktarılmış ve. 13.000 x g'de 5-10 sn santrifüjlenmiştir.

150 µl ham ekstrakt 150 µl Bağlanma Tamponu ile birleştirilerek resine aktarılmış ve iki dakika boyunca bağlanma sağlandıktan sonra resine bağlanmayan proteinlerin kolondan ayrılması amacıyla 13.000 x g'de 5-10 sn santrifüjleme yapılmıştır. Santrifüj sonunda resinden akan sıvı 'Altta Kalan Sıvı' olarak adlandırılmış ve temiz örnek tüpüne alınmıştır.

Kolona 250 µl Yıkama Tamponu eklenerek 13.000 x g'de 5-10 sn santrifüjleme yapılmış ve zayıf bağlanan proteinlerin kolondan uzaklaştırılması sağlanmıştır. Yıkama işleminin bir kez daha tekrarlanmasının ardından açığa çıkan sıvılar 'Yıkama 1' ve 'Yıkama 2' olarak kodlanmış ve temiz santrifüj tüplerine alınmıştır.

Kolona iki defa 100 µl Elüsyon Tamponu eklenmiş ve 13.000 x g'de 5-10 sn santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrasında tüpün alt kısmında kalan sıvılar 'Elüsyon 1' ve 'Elüsyon 2' olarak kodlanmış ve temiz santrifüj tüplerine alınmıştır. Saflaştırılan protein SDS-PAGE uygulanarak görüntülenmiştir.

Aynı zamanda denatüre koşullarda saflaştırma da denenmiştir. Bu amaçla Zymo Research His-Spin Protein Miniprep kitinde yer alan denatüre koşullarda saflaştırma protokolü uygulanmış ve üre içeren solüsyonlar kullanılmıştır.

2.22.5 SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile Protein Örneklerinin Analizi

% 12, % 15 ayırma jelleri ve % 5 yükleme jeli Çizelge 2.11'deki gibi hazırlanmış 1 mm'lik cam plakaların arasına dökülmüştür [75]. Örnekler 4x yükleme tamponu ile birleştirilip dört dakika boyunca kaynatılarak denatüre edilmiştir. Örnekler yükleme jelinden çıkana kadar 80 V'da, sonrasında da boya ayırma jelinden çıkana kadar 160 V'da yürütülmüştür.

Yürütme sonrasında jel, cam plakalar arasından ayrılmış ve birkaç kez distile su ile yıkanmıştır. Daha sonra boyama solüsyonu içerisinde 30 dakika çalkalanarak boyanmıştır.

Boyama işlemi ardından jel boya çıkarma solüsyonuna alınmış ve jel rengi açılana kadar çalkalama yapılarak proteine bağlanmayan boyanın uzaklaştırılması sağlanmıştır. Bu süre zarfında yıkama solüsyonu birkaç defa değiştirilmiştir. Jel rengi tamamen açılınca, yıkama solüsyonu boşaltılarak saf su içerisine alınmıştır.

Çizelge 2.10 SDS-PAGE Jelleri İçerikleri

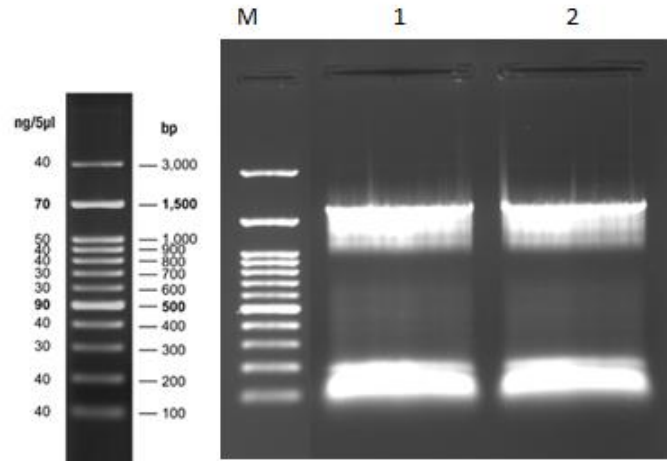
	%12'lik Ayırma Jeli	%15'lik Ayırma Jeli	%5'lik Yükleme Jeli
H₂O	3.2 ml	2.2 ml	3.6 ml
Tris-HCl	1.5 M pH 8.8 2.6 ml	1.5 M pH 8.8 2.6 ml	0.5 M pH 6.8 0.625 ml
%10 SDS	100 µl	100 µl	50 µl
%30 Akrilamid	4 ml	5 ml	0.67 ml
%10 APS	100 µl	100 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl	5 µl
TOPLAM	10 ml	10 ml	5 ml

BÖLÜM 3

SONUÇLAR

3.1 Beta Glukozidaz cDNA'sının Çoğaltılması ile İlgili Sonuçlar

2.10.1'de anlatılan koşullarda kurulan PCR reaksiyonu %1'lik agaroz jelde boyut ve kalite açısından kontrol edilmiştir. Yaklaşık 1.700 bp boyutunda DNA bantları elde edilmiştir.

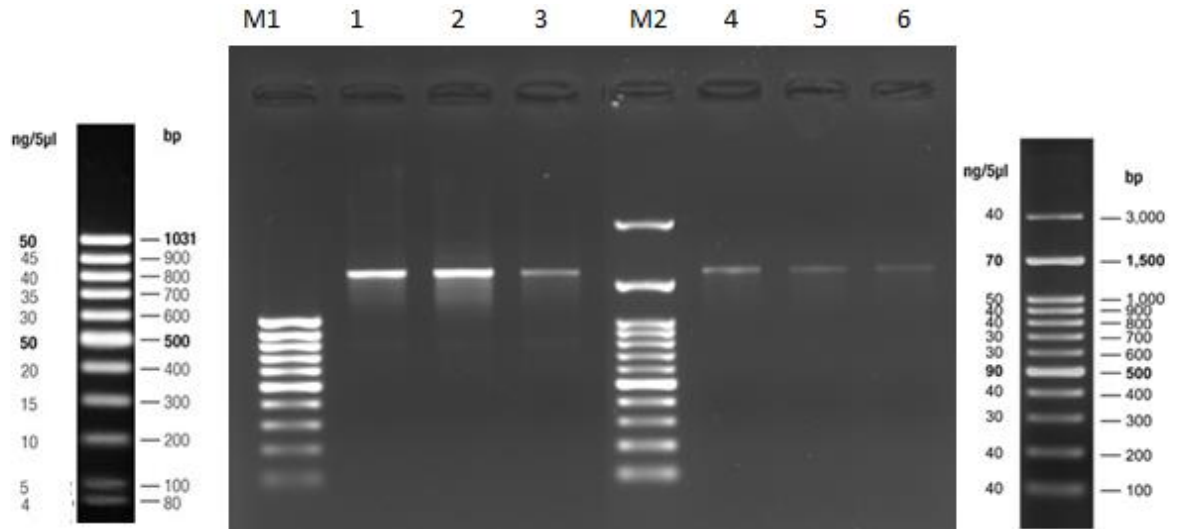


Şekil 3.1 PCR ürününün jel görüntüsü*

*M: Biotech Rabbit 100 bp DNA Ladder, 1,2: PCR Reaksiyonu

3.1.1 DNA'nın Agaroz Jelden Pürifikasyonu

2.10.3'de anlatıldığı gibi jelden pürifiye edilen zeytin beta glukozidaz cDNA'sı, pürifikasyonun kontrolü ve konsantrasyonun hesaplanması için %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür.



Şekil 3.2 Jelden elüe edilmiş beta glukozidaz cDNA'sı*

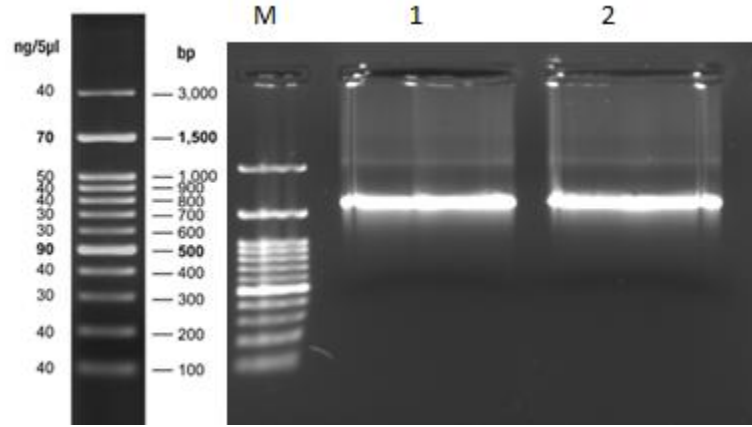
*M1: Fermentas Mass Ruler Low Range DNA Ladder 1,2,3: PCR pürifikasyonu birinci elüsyonlar M2: Biotech Rabbit 100 bp DNA Ladder, 4,5,6: PCR Pürifikasyonu ikinci elüsyonlar

1. ve 2. kuyuda yer alan örneklerin (1700 bp boyutundaki) yaklaşık konsantrasyonu 50 ng/µl'dir. 3. ve 4. Kuyudaki örneklerin ise konsantrasyonu yaklaşık 20 ng/µl olarak hesaplanmıştır.

3.2 Zeytin beta glukozidaz cDNA'sı ve ve Ekspresyon Vektörünün Restriksiyon Enzimleriyle Kesimi

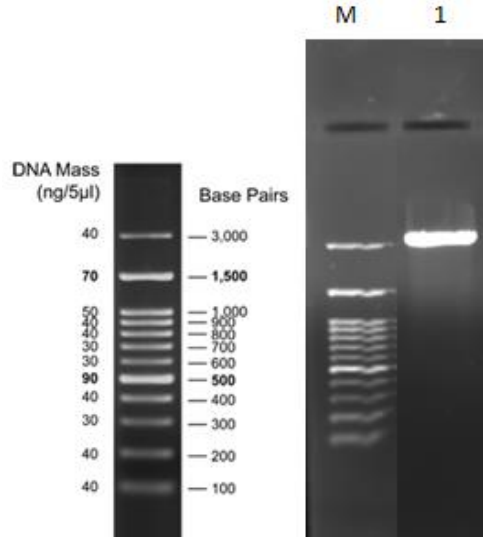
2.11.1'deki bölümde geçen koşullarda *XhoI/EcoRI* restriksiyon enzimleriyle kurulmuş kesim reaksiyonları %1'lik agaroz jelde görüntülenmiştir.

Jel elektroforezi sonucunda zeytine ait Beta glukozidaz cDNA'sı, Şekil 3.3'de görüldüğü üzere yaklaşık 1.700 bp'ye sahip bir bant olarak görüntülenmiştir.



Şekil 3.3 Beta Glukozidaz cDNA'sının *Xho* I/*EcoR* I Kesim Görüntüsü*

*M: Biotech Rabbit 100 bp DNA Ladder, 1,2: P2 ve P5 primerleri ile kurulan PCR sonucunda çoğaltılan β -glukozidaz cDNA'sının *Xho*I/*EcoR* I enzimleri ile kesimi
Çift restriksiyon enzimi ile kesilmiş pPicZB plazmidi ise 3000 bp'den büyük oldukça parlak bir bant olarak gözlenmiştir (Şekil 3.4).



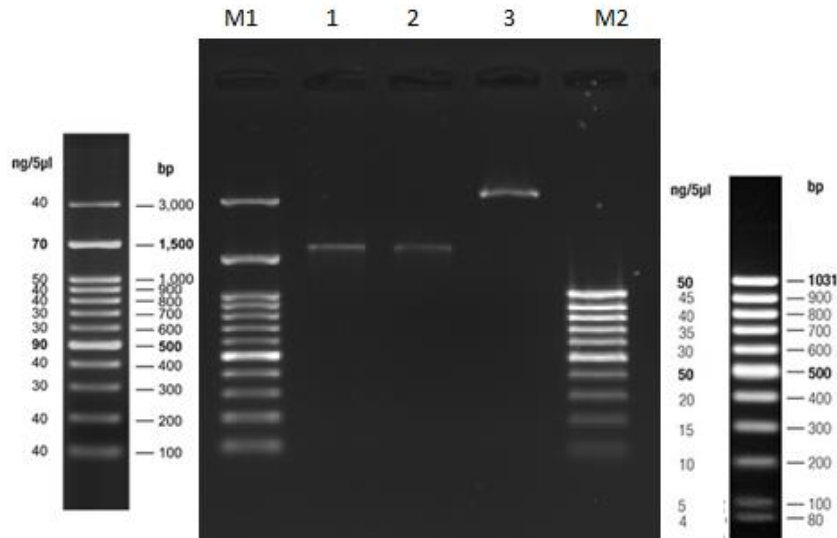
Şekil 3.4 pPicZB vektörünün *Xho*I/*EcoR*I enzimleriyle kesimi*

*M: Biotech Rabbit 100 bp DNA Ladder, 1: *Xho* I/*EcoR* I enzimleri ile kesilen pPicZB plazmidi

3.2.1 Pürifiye Edilmiş Kesim Ürünlerinin Agaroz Jelde Kontrolü ve Konsantrasyonunun Hesaplanması

QIAGEN MinElute Jel Ekstraksiyon Kiti ile 2.11.1 bölümde anlatıldığı gibi saflaştırılan Kesim ürünleri % 1'lik agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 3.5). "Mass Ruler Low Range

DNA Ladder" ile yapılan değerlendirmeye göre; PCR ürünün yaklaşık 40 ng/l, boş vektörün ise yaklaşık 50 ng/l yoğunluğa sahip olduğu anlaşılmıştır.



şekil 3.5 Jelden elde edilen kesim ürünlerinin agaroz jel elektroforezi*

*M1: Biotech Rabbit 100 bp DNA Ladder, 1,2: Jelden geri kazanılan *Xho* I/*Eco*R I enzimleriyle kesilmiş Beta glukozidaz cDNA 3: Jelden geri kazanılan *Xho* I/*Eco*R I enzimleriyle kesilmiş pPicZB plazmidi M2: Fermentas Mass Ruler Low Range DNA Ladder

3.3 Ekspresyon Vektörü pPicZB'ye Zeytin Beta Glukozidaz cDNA'sının Ligasyonu

2.12'de anlatıldığı gibi Roche T4 DNA Ligaz Kiti kullanılarak zeytin beta glukozidaz cDNA'sı maya ekspresyon vektörü pPicZB ile birleştirilmiştir.

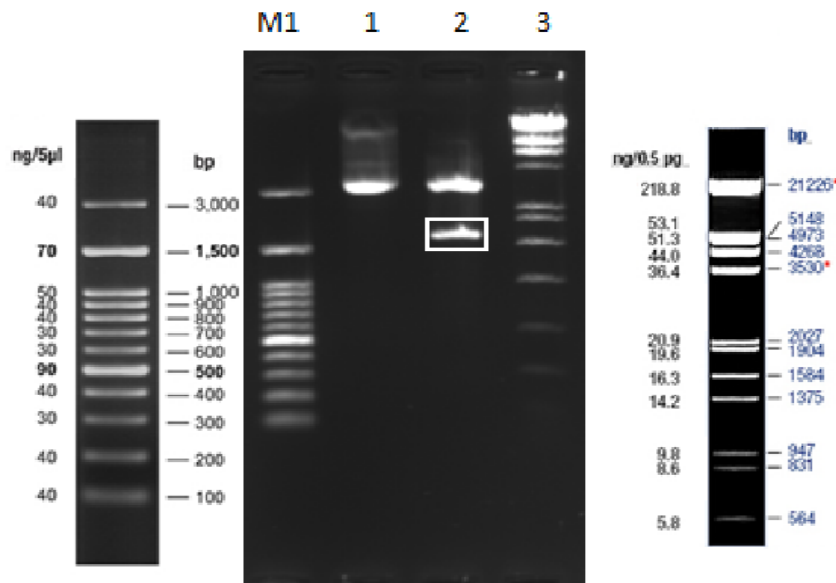
3.4 Vektörün *E.coli* JM109 Hücresine Transformasyonu ve Pozitif Kolonilerin Analizi

Ligasyon sonrasında oluşturulan rekombinant Bölüm 2.13'de anlatıldığı gibi transformasyon adımları izlenmiştir. pPicZB vektörüne ait seçici Zeocin'li LS-LB besi ortamında 16 saat boyunca 37°C'de büyütülmüştür. Büyümenin ardından 8 tane koloni elde edilmiştir.

Zeocin içeren sıvı LS-LB besiyerinde gece boyunca büyütülen kolonilerden bölüm 2.14'de anlatıldığı gibi Roche High Pure Plasmid Isolation Kit'i ile plazmid izolasyonu yapılmıştır. Zeytin beta glukozidaz geninin, vektörün içerisinde var olduğunu göstermek adına çift restriksiyon enzimi ile kesim uygulanmıştır.

%1'lik agaroz jelde görüntülenen kesim reaksiyonu sonucunda; karşılaştırmalı olarak *XhoI/EcoRI* kesimi uygulanmamış rekombinant plazmid (P2P5 Plazmidi) ve *XhoI/EcoRI* kesimi uygulanmış rekombinant plazmid (P2P5 Plazmidi) arasındaki boyut farkı görülmektedir (Şekil 3.6). Kesim uygulanmamış insert içeren plazmidin yaklaşık 5000 bp boyutunda olması beklenirken, jelde halkasal formda yaklaşık olarak 3000 bp olarak görülmektedir. Kesim uygulanmış plazmid için ise, serbest kalan yaklaşık 1700 bp'lik beta glukozidaz cDNA'sı ve plazmidin doğrusal formdaki hali 3000 bp'den biraz yukarıda görülmektedir. Zeytin beta glukozidazına ait cDNA Şekil 3.6'da kutucuk içerisinde alınarak gösterilmiştir.

Aynı zamanda insert içeren vektöre ilişkin dizin analizi sonuçları **EK A-2'**de verilmiştir.



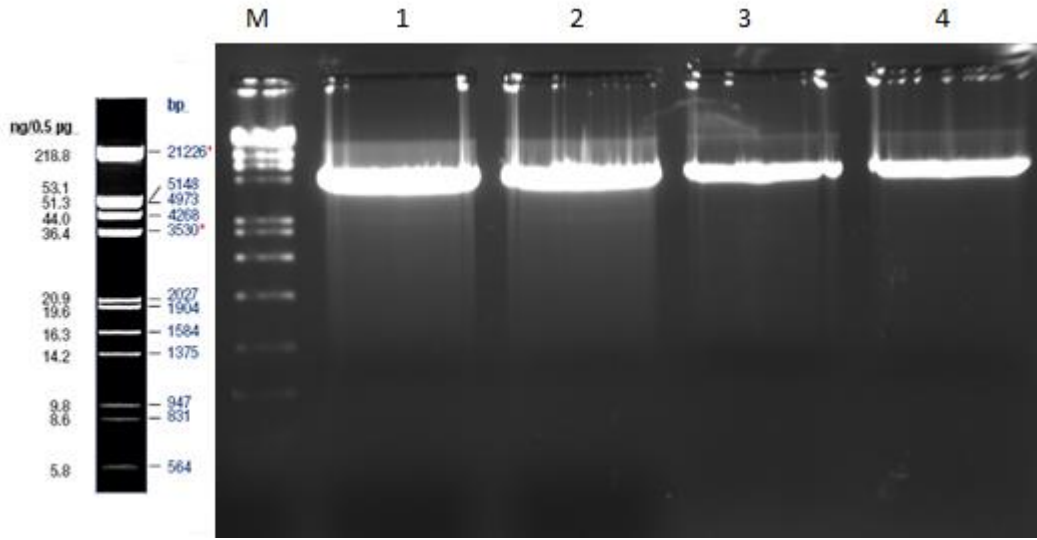
Şekil 3.6 Rekombinant Plazmidde Zeytin Beta Glukozidaz cDNA'sının Entegrasyon Kontrolü*

*M1: Biotech Rabbit 100 bp DNA Ladder, 1: Kesim Uygulanmamış P2P5 Plazmidi 2: Kesim Uygulanmış P2P5 Plazmidi M2: Lambda DNA/*EcoRI*+*Hind III* Marker

3.5 Rekombinant Vektörün Doğrusal Hale Getirilmesi

Rekombinant ekspresyon vektörünün *Pichia pastoris* X-33 genomuna tekli krossing-over mekanizmasıyla entegrasyonunu sağlamak amacıyla vektör tek bölgeden *Sac I* enzimiyle kesilmiş ve plazmid transformasyona hazırlanmıştır. Kesim koşulları bölüm 2.16'de anlatıldığı gibidir.

%1'lik agaroz jel ile yapılan elektroforez sonucundakesim reaksiyonu uygulanan plazmidlerin doğrusal hale getirildikleri anlaşılmıştır (Şekil 3.7).

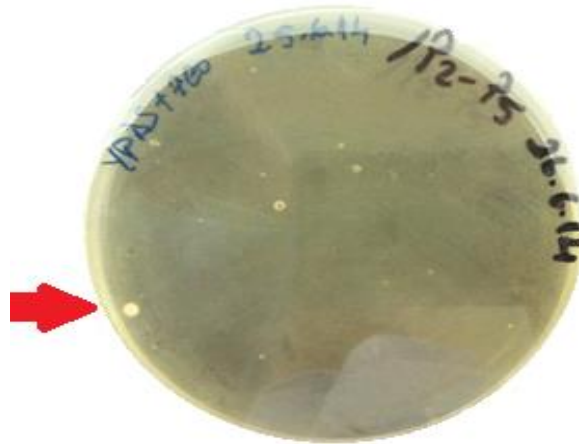


Şekil 3.7 P2P5 plazmidi Sac I kesimi*

*M:Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker 1,2: 1 Numaralı P2P5 Plazmidi Sac I Kesimi 3,4: 2 Numaralı P2P5 Plazmidi Sac I Kesimi

3.6 *Pichia pastoris* X-33 Hücrelerine Kimyasal Yolla Transformasyon

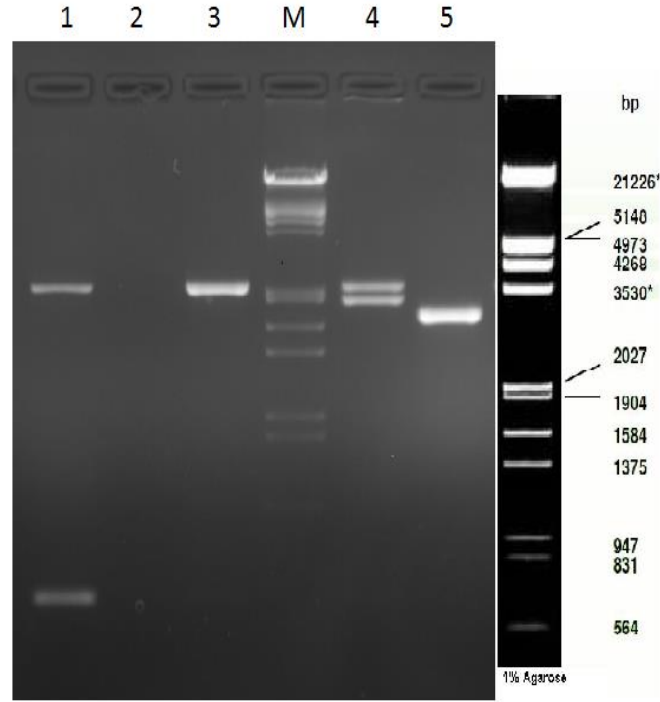
5 µl plazmidlerden kullanarak bölüm 2.18'de anlatıldığı gibi kurulan transformasyonlar zeocin içeren YPDS besiyerine ekilmiş ve koloni oluşumu için 30 °C'de 3-10 süre ile büyümeye bırakılmıştır. Geçen süre sonunda P2P5 plazmidine sahip hücreye ait petride yalnızca bir adet koloni oluşumu gözlenmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8 *Pichia pastoris*'e Aktarılmış Rekombinant Koloni

3.7 Maya Hücrelerinde Zeytin Beta Glukozidaz Geni'nin Entegrasyonun Kontrolü

Lityum Asetat protokülü maya hücrelerinden genomik DNA çıkarılmıştır. *Pichia pastoris* AOX bölgesine özel tasarlanan AOX 1 primerleri ve beta glukozidaz genine özel tasarlanmış P5 primer ile PCR kurulmuştur. PCR ürünleri %1.5'lik agaroz jelde görüntülenmiştir.



Şekil 3.9 Genin Mayada Entegrasyonunu Gösteren PCR Sonuçları*

*1: pPicZB 5'AOX1/3'AOX1 PCR'ı 2: X-33 5'AOX1/P5 PCR'ı 3: X-33 5'AOX1/3'AOX1 PCR'ı
M: *EcoR* I / *Hind* III A Marker 4: P2P5 5'AOX1/3'AOX1 PCR'ı 5: P2P5 5'AOX1/P5 PCR'ı

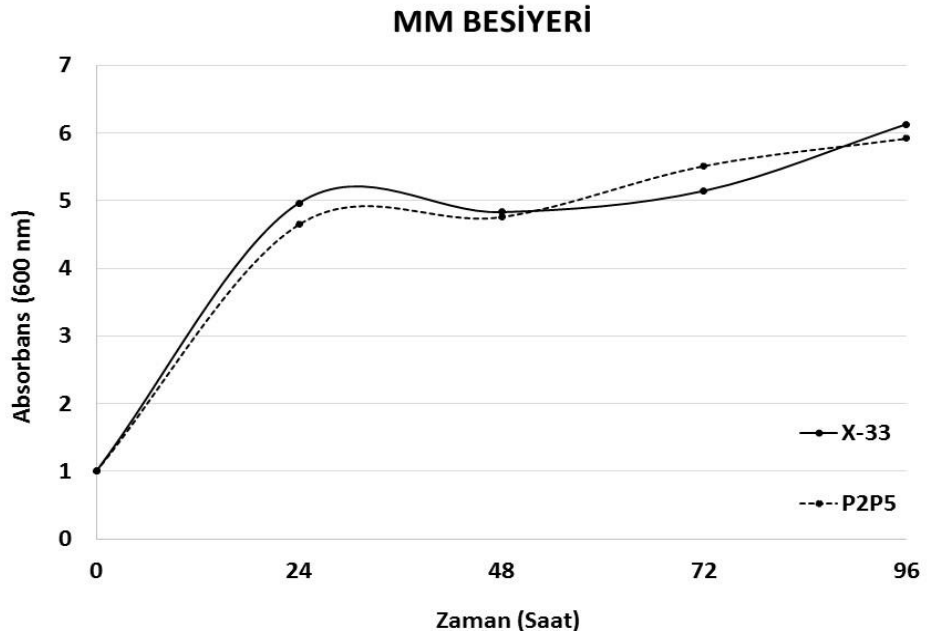
Jel sonucuna göre; birinci kuyuda pPicZB vektörüne ait AOX1 geni (~ 2.2 kb) ve vektörün 323 baz çiftlik bir bantı görülmektedir. İkinci kuyu, X-33 hücresi ile kontrol olarak kurulmuş PCR'dır ve gene özgü reverse primer ile bant oluşumu görülmemektedir. Üçüncü kuyuda görülen bant, X-33 suşunun AOX1 genidir (~ 2.2 kb). Dördüncü kuyuda yer alan ilk bant (~ 2.2 kb) AOX1 geni, hemen altındaki bant ise zeytin beta glukozidaz genine vektörden gelen 323 baz çifti eklenmiş şeklidir (~ 1.700 bp + 323bp). Beşinci kuyuda görülmekte olan bant ise (~ 1.700 bp) zeytin beta glukozidaz genidir. Elde edilen sonuçlara dayanarak, zeytin beta glukozidaz geninin *Pichia pastoris* genomuna entegre olduğu anlaşılmıştır.

3.8 Zeytin Beta Glukozidaz Enzimine Ait Ekspresyon Sonuçları

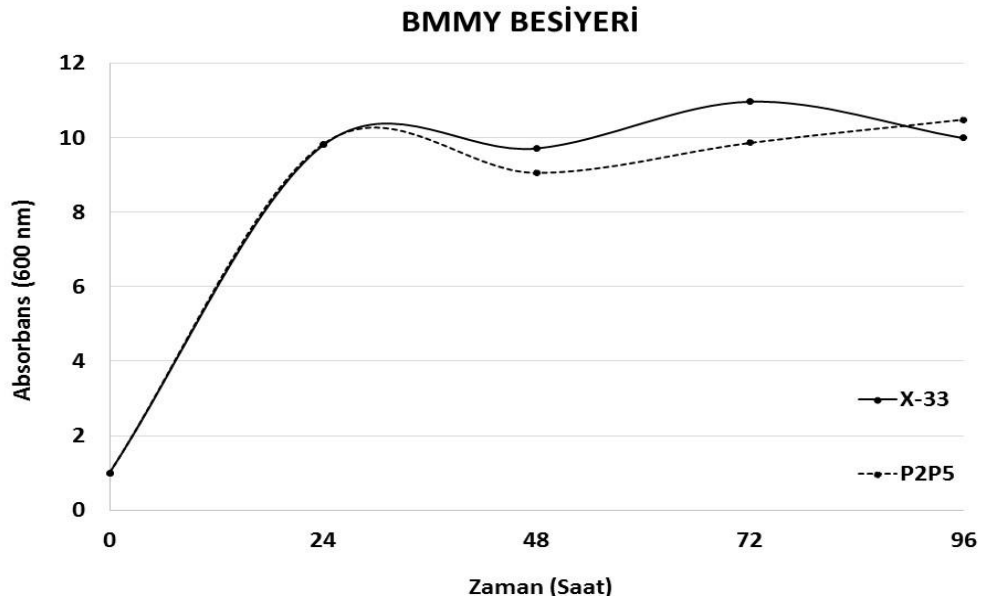
Rekombinant enzimin ve X-33 intraselüler beta glukozidazına ait ekspresyon sonuçları aşağıda gösterildiği gibidir.

3.8.1 Hücrelerin Büyüme Hızına İlişkin Grafik

BMMY ve MM besiyerlerinde büyüyen hücrelerin 600 nm'deki absorbanslarına ilişkin grafik Şekil 3.10 ve 3.11'deki gibidir.



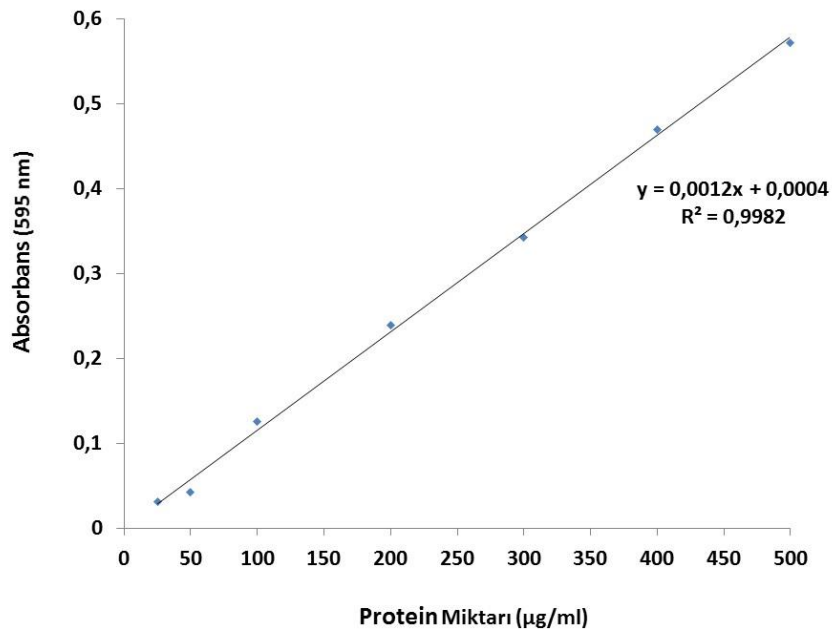
Şekil 3.10 MM Besiyerinde 600nm'deki Büyüme Eğrisi



Şekil 3.11 BMMY Besiyerinde 600nm'deki Büyüme Hızı Grafiği

3.8.2 Bradford Ölçümü Sonuçları

Örneklerin Hazırlanan protein standartlarına ait Şekil 3.12'da verildiği gibidir.



Şekil 3.12 Bradford Yöntemi ile BSA standartları kullanılarak belirlenen Protein Standartı Grafiği

Standart çözeltilerin protein miktarları referans olarak alınmış ve 595 nm'de ölçülen absorbanslar doğrultusunda protein miktarları tayin edilmiştir. Absorbans değerleri

standart grafiğinde elde edilen denkleme uyarlanmıştır ve net protein miktarı hesaplanmıştır. Hesaplanan değerler Çizelge 3.1 ve 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.11 BMMY Besiyerindeki Örneklerle İlişkin Protein Miktarları

Örnekler	X-33				P2P5			
Saatler	24	48	72	96	24	48	72	96
Absorbans Ortalamaları 595 nm	0,335	0,268	0,232	0,353	0,323	0,219	0,257	0,393
Standart Eğri Denklemin e Göre Protein Miktarı (µg/ml)	278,83	223	193	293,83	268,83	182,16	213,83	327,16
Dilüsyon Faktörü	20				20			
Dilüsyon Faktörü İle Çarpımı	5576,6	4460	3860	5876,6	5376,6	3643,33	4276,6	6543,3
Net Protein Miktarı (mg/ml)	5,576	4,460	3,860	5,876	5,376	3,643	4,276	6,543

Çizelge 3.12 MM Besiyerindeki Örneklerle İlişkin Protein Miktarları

Örnekler	X-33				P2P5			
Saatler	24	48	72	96	24	48	72	96
Absorbans Ortalamaları 595 nm	0,341	0,301	0,329	0,383	0,324	0,296	0,409	0,231

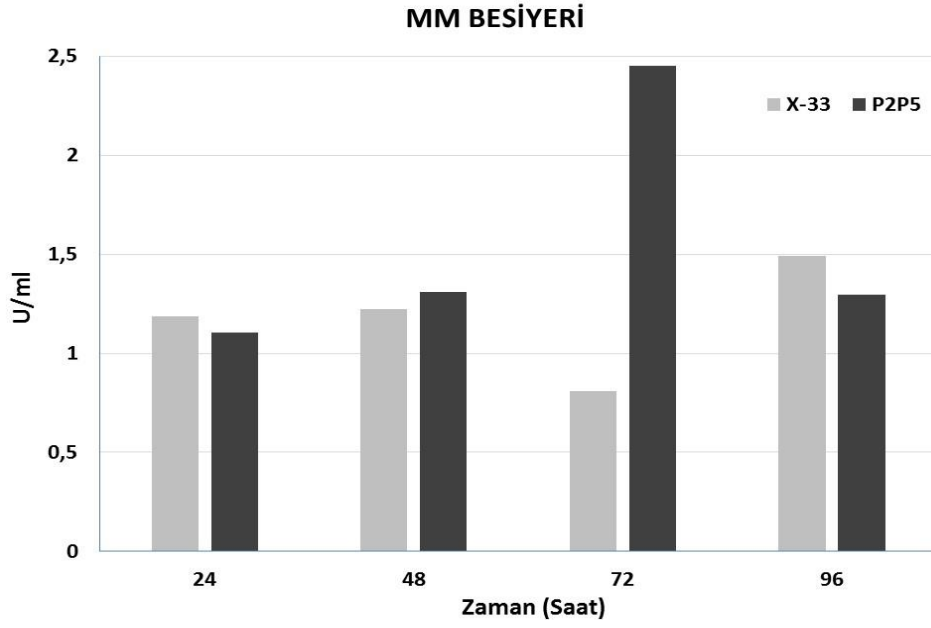
Çizelge 3.2 MM Besiyerindeki Örneklerle İlişkin Protein Miktarları (devamı)

Örnekler	X-33				P2P5			
Saatler	24	48	72	96	24	48	72	96
Standart Eğri Denklemine Göre Protein Miktarı (µg/ml)	284,11	250,5	273,83	318,83	270,22	246,611	408,416	192,16
Dilüsyon Faktörü	10				10			
Dilüsyon Faktörü İle Çarpımı	2841,1	2505	2738,3	3188,3	2702,2	2466,11	4084,16	1921,6
Net Protein Miktarı (mg/ml)	2,841	2,505	2,738	3,188	2,702	2,466	4,084	1,921

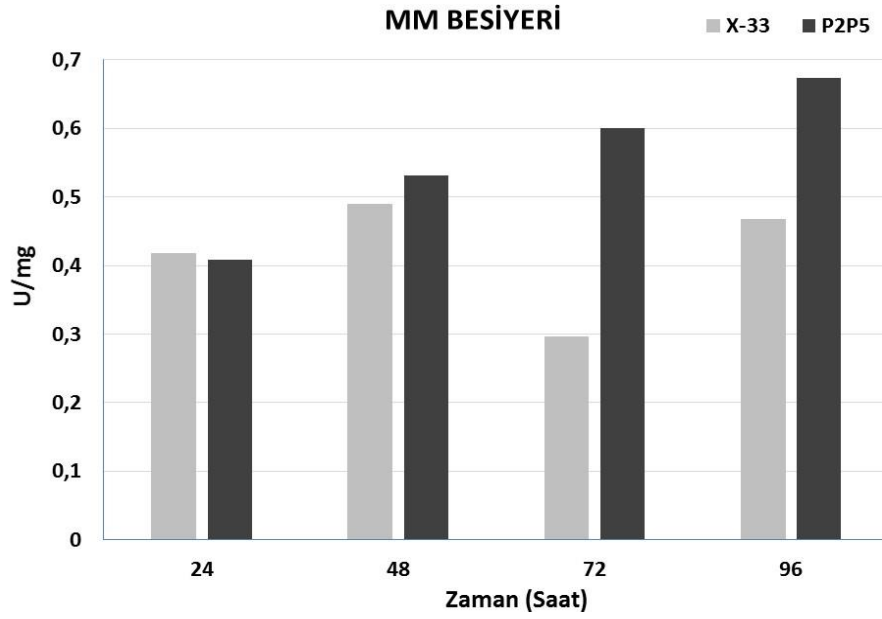
3.8.3 pNPG Yapay Substratı ile Kurulan Enzim Assay Sonuçları

Rekombinant zeytin beta glukozidazının pNPG substratı ile verdiği reaksiyon sonucunda elde edilen aktivite sonuçları Şekil 3.13 ve Şekil 3.15'deki gibidir.

Ayrıca enzim aktivitesinin total protein miktarına oranlanması ile belirlenen spesifik aktivite değerleri de Şekil 3.14 ve 3.16 de belirtilmektedir.



Şekil 3.13 MM Besiyerinde pNPG Substratına Karşı Aktivite Sonuçları (U/ml)

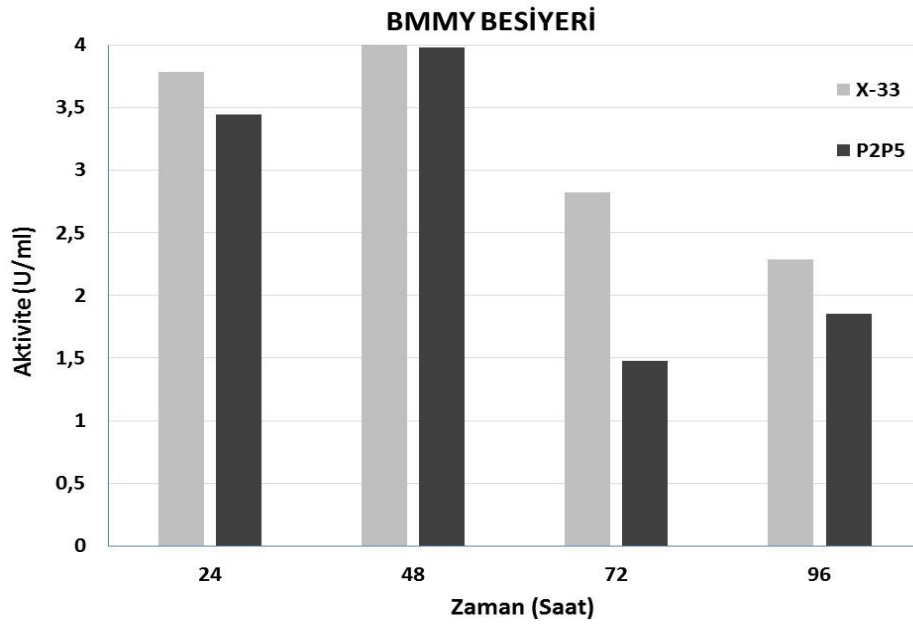


Şekil 3.14 MM Besiyerinde pNPG Yapay Substratına Karşı Spesifik Aktivite

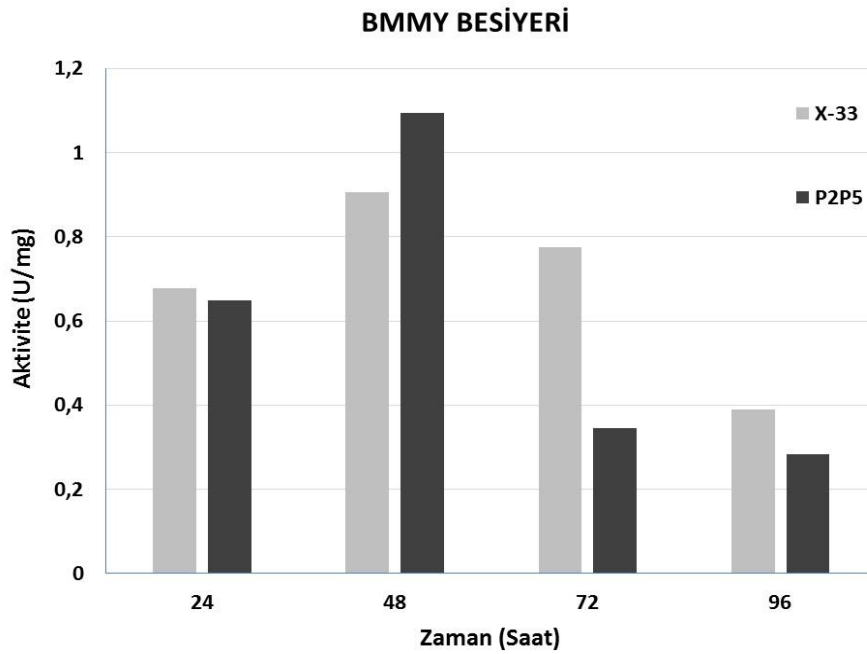
Minimal metanol besiyerinde; 24, 48, 96. Saatlerde X-33 ile neredeyse aynı seyirde aktivite gösteren P2P5 kültürü, 72. Saatte U/ml olarak X-33'ün yaklaşık 3 katı kadar aktivite göstermiştir.

Spesifik aktivite bakımından P2P5 kültürünün, 24, 48, 72 ve 96. Saatlerde X-33 kültürüne göre giderek artış gösteren bir grafik izlediği ve zeytin beta glukozidazını

üreten P2P5 kültürünün spesifik aktivitesinin, X-33 kültürünün beta glukozidaz aktivitesine kıyasla 72. Saatte 2.02 kat fazla olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.15 BMMY Besiyerinde pNPG Substratına Karşı Aktivite Sonuçları (U/ml)



Şekil 3.16 BMMY Besiyerinde pNPG Yapay Substratına Karşı Spesifik Aktivite (U/mg)

Bu sonuçlara göre; BMMY besiyerinde eksprese edilen kültürlerinin aktivitelerinde 24, 72 ve 96. Saatlerde X-33'ün P2P5'e oranla pNPG substratına karşı daha fazla aktivite gösterdiği, 48. Saatte ise aktivitelerin neredeyse eşit olduğu görülmektedir.

Öte yandan, aktivitelerin total protein miktarına oranlanması ile belirlenen spesifik aktivitede BMMY besiyerinde 48. Saate P2P5'in X-33'e kıyasla 1.2 kat fazla aktivite gösterdiği görülmüştür.

3.8.4 MUG Yapay Substratı ile Kurulan Spot Assay Sonuçları



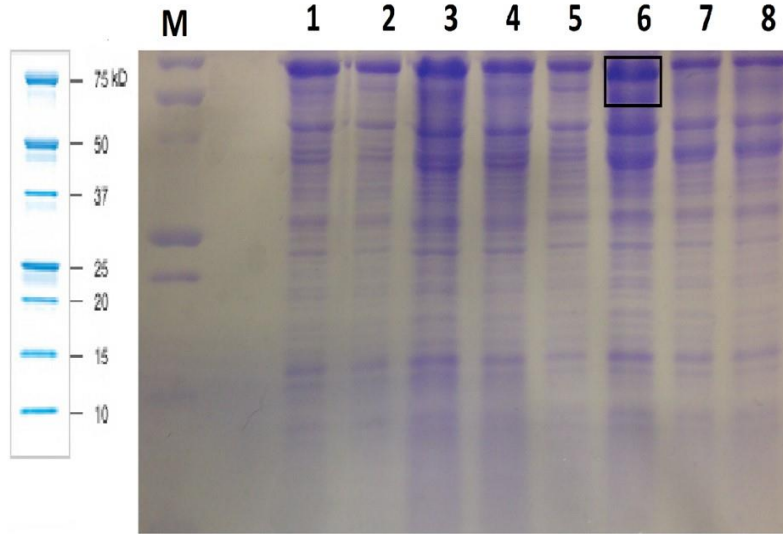
Şekil 3.17 BMMY ve MM Besiyerine Ait Ham Ekstrelerin MUG Spot Testine Ait UV Görüntüsü*

*1: MM X-33 24. Saat 2: MM P2P5 24. Saat 3: MM X-33 48. Saat 4: MM P2P5 48. Saat 5: MM X-33 72. Saat 6: MM P2P5 72. Saat 7: MM X-33 96. Saat 8: MM P2P5 96. Saat 9: BMMY X-33 24. Saat 10: BMMY P2P5 24. Saat 11: BMMY X-33 48. Saat 12: BMMY P2P5 48. Saat, 13: BMMY X-33 72. Saat 14: BMMY P2P5 72. Saat 15: BMMY X-33 96. Saat 16: BMMY P2P5 96. Saat

MUG substratının zeytin beta glukozidazıyla hidrolizini gösterebilmek amacıyla eşit miktarda protein örneği substrat ile karıştırılmış ve agar üzerine noktalar halinde uygulanmıştır. Oda sıcaklığında inkübasyonun ardından UV altında yapılan görüntüleme sonucunda MM besiyerindeki örnekler için 72. Saat P2P5 örneği (6. spot) maksimum ışımayı yaparken, BMMY besiyerinde en fazla ışımayı 48. Saat P2P5 örneği (12. spot) göstermiştir. Elde edilen bulgular pNPG ile ölçülen enzim aktivitesi sonuçlarıyla da korelasyon göstermektedir.

3.8.5 SDS-PAGE Sonuçları

SDS-PAGE jelinde yürütülen örneklerin boyama sonrası görüntüleri aşağıdaki gibidir.

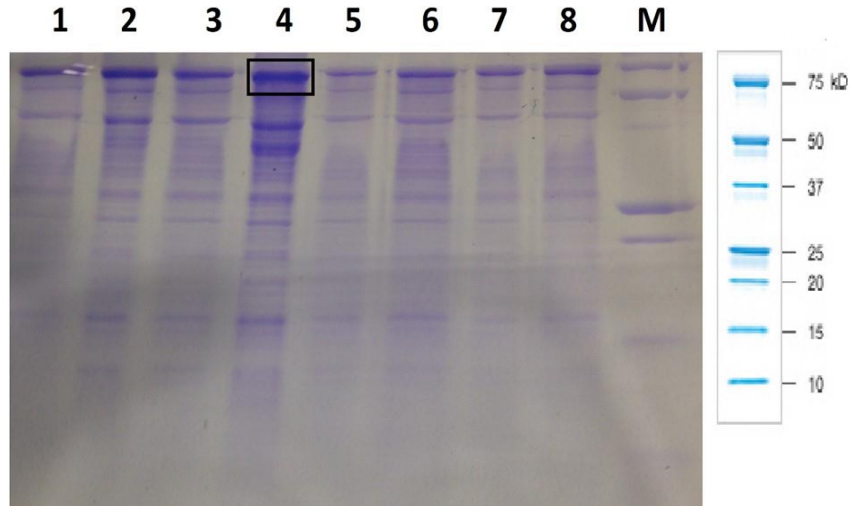


Şekil 3.18 MM Besiyeinde Ham Ekstrelerin SDS-PAGE Görüntüsü*

*M: Biorad Protein Precision Marker, 1: X-33 24. Saat 2: P2P5 24. Saat 3: X-33 48. Saat 4: P2P5 48. Saat

5: X-33 72. Saat 6: P2P5 72. Saat 7: X-33 96. Saat 8: P2P5 96. Saat

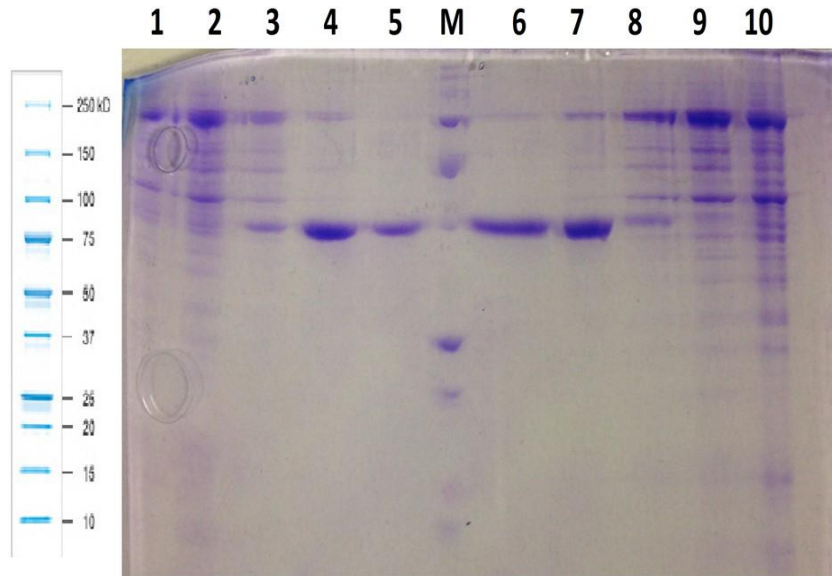
MM besiyerindeki ham ekstratların 24, 48, 72 ve 96. Saatlerde alınan örnekleri Şekil 3.18'deki gibi %15'lik SDS-PAGE jelinde görüntülenmiştir. Aktivitesinde de belirgin fark gözlenen 72. Saat P2P5 örneğine ait bant kutucuk içerisinde alınmıştır. Bu bant markerin 75 kDa'luk bantından daha aşağıda bir bant olarak gözlenmiştir.



Şekil 3.19 BMMY Besiyeinde Ham Ekstrelerin SDS-PAGE Görüntüsü*

*M; Biorad Protein Precision Marker, 1: X-33 24. Saat 2: P2P5 24. Saat 3: X-33 48. Saat 4: P2P5 48. Saat 5: X-33 72. Saat 6: P2P5 72. Saat 7: X-33 96. Saat 8: P2P5 96. Saat

BMMY besiyerindeki ham ekstratların da 24, 48, 72 ve 96. Saatlerde alınan örnekleri Şekil 3.19'daki gibi %15'lik SDS-PAGE jelinde görüntülenmiştir. Şekil 3.18'deki görüntüye benzer şekilde en yüksek aktiviteye sahip 48. Saat P2P5 örneği markerın 75 kDa'luk bantından aynı zamanda hizasındaki diğer bantlardan da daha aşağıda bir bant olarak görülmektedir. Bahsi geçen bant kutucuk içerisinde belirtilmiştir.



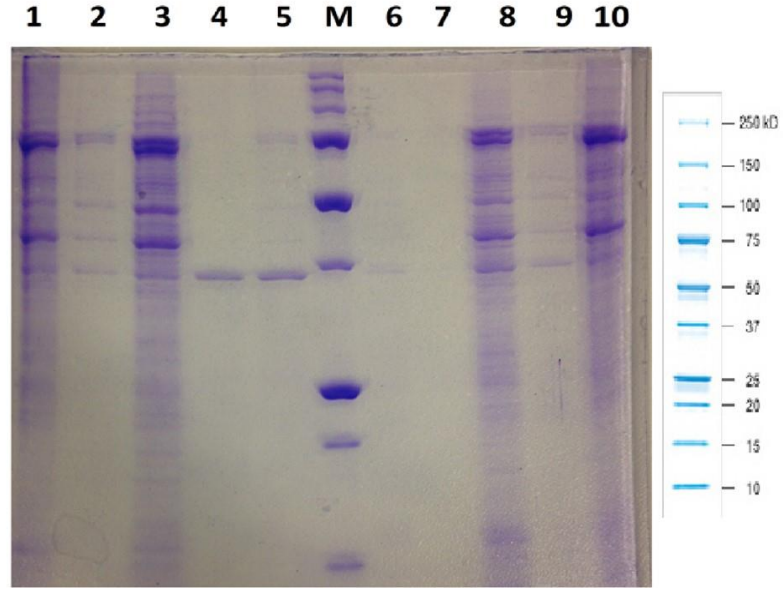
Şekil 3.20 MM ve BMMY Besiyerlerindeki Ham Ekstratların Afinite Kolon ile Saflaştırma Görüntüsü*

*M: Biorad Protein Precision Marker, 1: Altta kalan sıvı, 2: Yıkama 1, 3: Yıkama 2, 4:Elüsyon 1, 5:Elüsyon 2, 6: Elüsyon 2, 7: Elüsyon 1, 8: Yıkama 2, 9: Yıkama 1, 10:Altta kalan sıvı (1.-5. kuyular MM Besiyerine, 6.-10. kuyular BMMY Besiyerine aittir)

IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography) yöntemi ile saflaştırılması yapılan MM besiyeri 72. Saat P2P5 örneği (1-5. Kuyular) ve BMMY 48. Saat P2P5 örneğinin (6-10) %12'lik SDS-PAGE jeline ait görüntü Şekil 3.20'de gösterilmiştir.

Elüsyon kuyularında görülmekte olan yaklaşık 37 kDa'luk oldukça yoğun bantlar, bir çalışmada *Pichia pastoris*'in kendi mitokondriyal alkol dehidrogenaz enzimine atfedilmiştir [76] .

X-33'e ait proteinlerden yapılan kontrolede gözlendiği üzere, elüsyonlarda üstlerde görülen bantların da *Pichia pastoris*'ten gelen kontaminantlar olduğu görülmüştür. Rekombinant proteine ait bantlar gözlemlenememiştir.



Şekil 3.21 MM Besiyeri 72 Saat Örneğinin Afinite Kolon ile Doğal ve Denatüre Koşullardaki Saflaştırma Görüntüsü*

*1: Altta kalan sıvı, 2:Yıkama 1, 3: Yıkama 2, 4: Elüsyon 1, 5: Elüsyon 2, M: Biorad Protein Precision Marker, 6: Elüsyon 2, 7: Elüsyon 1, 8: Yıkama 2, 9: Yıkama 1, 10: Altta kalan sıvı (1-5. Kuyular Doğal Koşullardaki 6-10. Kuyular ise Denatüre Koşullardaki Saflaştırmaya Aittir.)

Doğal ve denatüre koşullarda yapılan IMAC saflaştırma deneyi sonuçları Şekil 3.21’de verilmiştir. Protein örnekleri %12’lik SDS-poliakrilamid jelde analiz edilmiştir.

Her iki saflaştırmada da resine *Pichia pastoris*’e ait proteinler bağlanmış ve rekombinant proteinin saflaştırılması sağlanamamıştır.

BÖLÜM 4

TARTIŞMA VE ÖNERİLER

E.C. 3.2.1.21 Enzim Komisyon Numarasına sahip β -D Glukopiranosid Glukohidrolazlar evrensel olarak, yaşayan organizmaların tüm domainlerinde bulunmaktadır. Selülozik biyokütle degradasyonu, hayvanlarda glikolipitlerin ve egzojen glikozidlerin yıkımı, mikroorganizmalarda biyokütle dönüşümü, bitkilerde koku salınımı, lignifikasyon, sekonder metabolitlerin modifikasyonu gibi çeşitli biyolojik süreçlerde rol oynamaktadırlar.

Endüstriyel olarak da önemli bir enzim olan beta glukozidazlar, zeytinin olgunlaşma sürecinde acı tadının giderilmesinden sorumludur. Ayrıca çeşitli şarap, meyve suyu gibi ürünlerin de aromatik bileşiklerinin arttırılmasından sorumludur.

Zeytine özgü fenolik bir bileşik olan Oleuropein antioksidan, antimikrobiyal, antienflamatuar, antiviral ve antikarsinojenik etkileri ile farmakolojik olarak öneme sahip bir maddedir. Beta glukozidaz aktivitesi ile hidrolizlenerek, esteraz enzimi varlığında antioksidan etkiye sahip hidroksitriosol ve antiviral etkiye sahip elenoik asit oluşturmaktadır.

Araştırma laboratuvarımızda önceki çalışmalarda zeytin yaprağından beta glukozidaz geni kodlayan mRNA elde edilmiştir. Daha sonra tam uzunlukta beta glukozidaz geni klonlanmıştır.

Bu çalışmada zeytine ait beta glukozidaz geni heterolog ekspresyon sistemi *Pichia pastoris*'e klonlanmış ve farklı besiyerlerinde intraselüler olarak ekspresyonları sağlanmıştır.

Elde edilen sonuçlar řu şekildedir:

1. İntraselüler olarak beta glukozidaz ürettiği bilinen *Pichia pastoris* mayasında, histidin kuyruğu taşıyan zeytin beta glukozidazını heterolog olarak üretmeyi amaçlayan bu çalışmada, intraselüler *Pichia pastoris* beta glukosidazının aktivitesi ile rekombinant zeytin beta glukozidaz aktivitesini ayırd edebilmek amacıyla X-33 suşunun ekspresyonu eş zamanlı olarak izlenmiş ve sonuçlar karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Yapay substratlar ile rekombinant proteine ait yapılan testlerde, farklı besiyerlerinde farklı zaman aralıklarında ekspresyon seviyelerinin değişim gösterdiği görölmüştür. MM besiyerinde üretimi yapılan zeytin beta glukozidaz enzim aktivitesi, X-33 suşundaki intraselüler beta glukozidaz enziminin aktivite düzeyi ile karşılaştırıldığında hem total aktivite (U/ml) hem de spesifik aktivite (U/mg) olarak daha yüksek olduğu görölmüştür. Öte yandan MM besiyerinde 72. Saatte en yüksek aktivite görölürken, BMMY besiyerinde ise zeytin beta glukozidaz aktivitesinin 48. saatte daha fazla olduğu belirlenmiştir. Ekspresyon süresi göz önüne alındığında BMMY besiyeri daha avantajlı görönse de, MM besiyeri hem besiyeri kompozisyonu hem de X-33 beta glukozidazına kıyasla daha yüksek aktivite farkı göstermesi bakımından, zeytin beta glukozidazının *Pichia pastoris* mayasının hücre içerisinde heterolog üretiminde tercih edilebilir görönmektedir.
2. SDS-PAGE yöntemi ile belirtilen zaman aralıklarında alınan örnekler analiz edilmiş ve aktivite sonuçlarını doğrulayacak şekilde MM besiyerinde 72. Saatte, BMMY besiyerinde ise 48. Saatte diğer saatlerden daha farklı boyutta bir bant gözlenmiştir. Görüntölenen rekombinant proteine ait bantlar yaklaşık olarak 70-72 kDa boyutundadır. Eksprese edilen rekombinant proteinin, 2009 yılında W.WANG, yine 2009 yılında Romero-Segura ve ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda belirttikleri, zeytin Beta glukozidazına ait sırasıyla 61 [77] ve 65.4

kDa'luk [78] proteinden daha büyük olduğu gör÷lmektedir. Bunun olası nedeninin translasyon sonrasında hücrede meydana gelen modifikasyonlar olabileceği düşün÷lmektedir.

Afinite kromatografisi ile yapılan saflaştırma çalışmaları sonucunda rekombinant enzim saf bir şekilde elde edilememiştir. Bunun nedeninin, *Pichia pastoris*'in hücre lizatında bulunan ve nikel taşıyan resine bağlanabilen proteinler olduğu düşün÷lmüştür. 2013 yılında yapılan bir çalışmada, *Pichia pastoris*'e ait başta mitokondriyal alkol dehidrogenaz olmak üzere diğerk kontaminantların nikel taşıyan resine bağlanabildikleri ve bu proteinlerin “knock out” mutasyon ile elimine edilmesinin ardından hedeflenen proteinin saflaştırılmasının sağlandığı bildirilmiştir [76].

Bu çalışma içerisindeki saflaştırma işleminin farklı basamaklarında kolondan elde edilen örnekler SDS-PAGE ile analiz edilmiş ve ‘altta kalan sıvı’ örneğinde gör÷lmeyen, ancak ‘elüsyon’ örneğinde yoğun bir şekilde bulunan bir bantın varlığı gözlenmiştir. Bu bantın mitokondriyal alkol dehidrogenaz enzimine (yaklaşık 37 kDa) ait olabileceği ve bu enzimin söz konusu resine güçlü bir şekilde bağlanması nedeniyle rekombinant enzimin kolona bağlanamadığı düşün÷lmektedir.

Ayrıca proteinin katlanması sırasında C-terminalde bulunan histidin kuyruğunun proteinin iç kısımlarında kalarak afinite kolona bağlanamamış olması olasılığı düşün÷lmüş ve saflaştırma denatüre koşullarda da tekrarlanmıştır. Ancak yine mitokondriyal alkol dehidrogenaz enzimine ait bantın gözlenmiş olması, rekombinant enzimin rezine bağlanamamış olması olasılığını güçlendirmektedir.

Laboratuvarımızda ekspresyonu yapılmış olan zeytin beta glukozidazına ait saflaştırma çalışmaları devam edecektir. Rekombinant proteinimizin saflaştırılması için öncelikli olarak SEC (Size Exclusion Chromatography) uygulanarak proteinlerin boyutlarına göre ayırımı sağlanacak ve beta glukozidaz aktivitesi gösteren fraksiyonlar bir araya getirilerek IMAC saflaştırma işlemleri denenebilecektir. Sonraki çalışmalarda saflaştırılan enzimin biyokimyasal karakterizasyonunun yapılması da planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Henrissat, B., (1991). "A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities", *Biochem. J*, 280: 309-316.
- [2] Henrissat, B. ve Bairoch, A., (1996). "Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases", *Biochem. J*, 316: 695-696.
- [3] Xu, Z. Escamilla-Treviño, L. Zeng, L. Lalgondar, M. Bevan, D. Winkel, B. Mohamed, A. Cheng, C.-L. Shih, M.-C. ve Poulton, J., (2004). "Functional genomic analysis of *Arabidopsis thaliana* glycoside hydrolase family 1", *Plant molecular biology*, 55: 343-367.
- [4] Cantarel, B.L. Coutinho, P.M. Rancurel, C. Bernard, T. Lombard, V. ve Henrissat, B., (2009). "The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics", *Nucleic acids research*, 37: D233-D238.
- [5] Cairns, J.R.K. ve Esen, A., (2010). "β-Glucosidases", *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67: 3389-3405.
- [6] Webb, E.C., (1992). *Enzyme nomenclature 1992. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes*: Academic Press.
- [7] Esen, A., (1992). "Purification and partial characterization of maize (*Zea mays* L.) β-glucosidase", *Plant physiology*, 98: 174-182.
- [8] Koffi, Y.G. Konan, K. Kouadio, E. Dabonné, S. ve Kouamé, L., (2012). "Purification and biochemical characterization of beta-glucosidase from cockroach *Periplaneta americana*", *Journal of Animal and Plant Sciences*, 13: 1747-1757.
- [9] Opassiri, R. Pomthong, B. Akiyama, T. Nakphaichit, M. Onkoksoong, T. Ketudat, C.M. ve Ketudat, C.J., (2007). "A stress-induced rice (*Oryza sativa* L.) beta-glucosidase represents a new subfamily of glycosyl hydrolase family 5 containing a fascin-like domain", *Biochem. J*, 408: 241-249.
- [10] Beta Glukozidazların sınıflandırılmaları, <http://www.cazy.org/>, 15 Ekim 2015.

- [11] Koudounas, K. Banilas, G. Michaelidis, C. Demoliou, C. Rigas, S. ve Hatzopoulos, P., (2015). "A defence-related *Olea europaea* β -glucosidase hydrolyses and activates oleuropein into a potent protein cross-linking agent", *Journal of experimental botany*, 66: 2093-2106.
- [12] Terra, W.R. ve Ferreira, C., (1994). "Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function", *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 109: 1-62.
- [13] Bayer, E.A. Chanzy, H. Lamed, R. ve Shoham, Y., (1998). "Cellulose, cellulases and cellosomes", *Current opinion in structural biology*, 8: 548-557.
- [14] Yildiz, Y. Matern, H. Thompson, B. Allegood, J.C. Warren, R.L. Ramirez, D.M. Hammer, R.E. Hamra, F.K. Matern, S. ve Russell, D.W., (2006). "Mutation of β -glucosidase 2 causes glycolipid storage disease and impaired male fertility", *Journal of Clinical Investigation*, 116: 2985.
- [15] Marana, S.R. Jacobs-Lorena, M. Terra, W.R. ve Ferreira, C., (2001). "Amino acid residues involved in substrate binding and catalysis in an insect digestive β -glycosidase", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1545: 41-52.
- [16] Ferreira, A.H. Marana, S.R. Terra, W.R. ve Ferreira, C., (2001). "Purification, molecular cloning, and properties of a β -glycosidase isolated from midgut lumen of *Tenebrio molitor* (Coleoptera) larvae", *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31: 1065-1076.
- [17] Lipka, V. Dittgen, J. Bednarek, P. Bhat, R. Wiermer, M. Stein, M. Landtag, J. Brandt, W. Rosahl, S. ve Scheel, D., (2005). "Pre-and postinvasion defenses both contribute to nonhost resistance in *Arabidopsis*", *Science*, 310: 1180-1183.
- [18] Niemeyer, H.M., (1988). "Hydroxamic acids (4-hydroxy-1, 4-benzoxazin-3-ones), defence chemicals in the Gramineae", *Phytochemistry*, 27: 3349-3358.
- [19] Morant, A.V. Jørgensen, K. Jørgensen, C. Paquette, S.M. Sánchez-Pérez, R. Møller, B.L. ve Bak, S., (2008). " β -Glucosidases as detonators of plant chemical defense", *Phytochemistry*, 69: 1795-1813.
- [20] Poulton, J.E., (1990). "Cyanogenesis in plants", *Plant physiology*, 94: 401-405.
- [21] Zagrobelny, M. Bak, S. ve Møller, B.L., (2008). "Cyanogenesis in plants and arthropods", *Phytochemistry*, 69: 1457-1468.
- [22] Leahy, R. Kigel, J. Svendsen, I. ve Mundy, J., (1995). "Biochemical and Molecular Characterization of a Barley Seed B-Glucosidase".
- [23] Hrmova, M. MacGregor, E.A. Biely, P. Stewart, R.J. ve Fincher, G.B., (1998). "Substrate binding and catalytic mechanism of a barley β -D-glucosidase/(1, 4)- β -D-glucan exohydrolase", *Journal of Biological Chemistry*, 273: 11134-11143.
- [24] Hrmova, M., "AJ Harvey, J. Wang, NJ Shirley, GP Jones, BA Stone, PB Hoj, and GB Fincher. 1996. Barley beta-D-glucan exohydrolases with beta-D-glucosidase activity: purification, characterization, and determination of primary structure from a cDNA clone", *J. Biol. Chem*, 271: 5277-5286.

- [25] Hrmova, M. Burton, R. Biely, P. Lahnstein, J. ve Fincher, G., (2006). "Hydrolysis of (1, 4)-beta-D-mannans in barley (*Hordeum vulgare* L.) is mediated by the concerted action of (1, 4)-beta-D-mannan endohydrolase and beta-D-mannosidase", *Biochem. J*, 399: 77-90.
- [26] HÖSEL, W. SURHOLT, E. ve BORGMANN, E., (1978). "Characterization of β -Glucosidase Isoenzymes Possibly Involved in Lignification from Chick Pea (*Cicer arietinum* L.) Cell Suspension Cultures", *European Journal of Biochemistry*, 84: 487-492.
- [27] Brzobohaty, B. Moore, I. Kristoffersen, P. Bako, L. Campos, N. Schell, J. ve Palme, K., (1993). "Release of active cytokinin by a beta-glucosidase localized to the maize root meristem", *Science*, 262: 1051-1054.
- [28] Schliemann, W., (1984). "Hydrolysis of Conjugated Gibberellins by β -Glucosidases from Dwarf Rice (*Oryza sativa* L. cv.«Tan-ginbozu»)", *Journal of plant physiology*, 116: 123-132.
- [29] Dietz, K.J. Sauter, A. Wichert, K. Messdaghi, D. ve Hartung, W., (2000). "Extracellular β -glucosidase activity in barley involved in the hydrolysis of ABA glucose conjugate in leaves", *Journal of experimental botany*, 51: 937-944.
- [30] Mattiacci, L. Dicke, M. ve Posthumus, M.A., (1995). "beta-Glucosidase: an elicitor of herbivore-induced plant odor that attracts host-searching parasitic wasps", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92: 2036-2040.
- [31] Ciafardini, G. ve Zullo, B., (2002). "Microbiological activity in stored olive oil", *International journal of food microbiology*, 75: 111-118.
- [32] Kara, H.E. Sinan, S. ve Turan, Y., (2011). "Purification of beta-glucosidase from olive (*Olea europaea* L.) fruit tissue with specifically designed hydrophobic interaction chromatography and characterization of the purified enzyme", *Journal of Chromatography B*, 879: 1507-1512.
- [33] El Riachy, M. Priego-Capote, F. León, L. Rallo, L. de Castro, L. ve Dolores, M., (2011). "Hydrophilic antioxidants of virgin olive oil. Part 2: Biosynthesis and biotransformation of phenolic compounds in virgin olive oil as affected by agronomic and processing factors", *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113: 692-707.
- [34] El Riachy, M. Priego-Capote, F. León, L. Rallo, L. de Castro, L. ve Dolores, M., (2011). "Hydrophilic antioxidants of virgin olive oil. Part 1: Hydrophilic phenols: A key factor for virgin olive oil quality", *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113: 678-691.
- [35] Panizzi, L. Scarpati, M. ve Oriente, G., (1960). "Chemical structure of oleuropein, bitter glucoside of olive with hypo-tensive activity", *Gazzette Chimica Italiana*, 90: 1449-1485.
- [36] Winkelhausen, E. Pospiech, R. ve Laufenberg, G., (2005). "Antifungal activity of phenolic compounds extracted from dried olive pomace", *Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedonia*, 24: 41-46.

- [37] Amiot, M.J. Fleuriet, A. ve Macheix, J.J., (1986). "Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34: 823-826.
- [38] Esti, M. Cinquanta, L. ve La Notte, E., (1998). "Phenolic compounds in different olive varieties", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 32-35.
- [39] Ryan, D. Robards, K. ve Lavee, S., (1999). "Changes in phenolic content of olive during maturation", *International journal of food science & technology*, 34: 265-274.
- [40] Casas-Sanchez, J. Alsina, M.A. Herrlein, M.K. ve Mestres, C., (2007). "Interaction between the antibacterial compound, oleuropein, and model membranes", *Colloid and Polymer Science*, 285: 1351-1360.
- [41] Marsilio, V. ve Lanza, B., (1998). "Characterisation of an oleuropein degrading strain of *Lactobacillus plantarum*. Combined effects of compounds present in olive fermenting brines(phenols, glucose and NaCl) on bacterial activity", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76: 520-524.
- [42] Yıldız, G. ve Uylaşer, V., (2011). "Doğal bir antimikrobiyel: oleuropein".
- [43] Tripoli, E. Giammanco, M. Tabacchi, G. Di Majo, D. Giammanco, S. ve La Guardia, M., (2005). "The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health", *Nutrition Research Reviews*, 18: 98-112.
- [44] Visioli, F. Poli, A. ve Gall, C., (2002). "Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil", *Medicinal research reviews*, 22: 65-75.
- [45] Visioli, F. Bellosta, S. ve Galli, C., (1998). "Oleuropein, the bitter principle of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages", *Life sciences*, 62: 541-546.
- [46] Owen, R.W. Giacosa, A. Hull, W.E. Haubner, R. Würtele, G. Spiegelhalder, B. ve Bartsch, H., (2000). "Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants", *The lancet oncology*, 1: 107-112.
- [47] Micol, V. Caturla, N. Pérez-Fons, L. Más, V. Pérez, L. ve Estepa, A., (2005). "The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV)", *Antiviral Research*, 66: 129-136.
- [48] Gikas, E. Bazoti, F.N. ve Tsarbopoulos, A., (2007). "Conformation of oleuropein, the major bioactive compound of *Olea europea*", *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 821: 125-132.
- [49] Carluccio, M.A. Siculella, L. Ancora, M.A. Massaro, M. Scoditti, E. Storelli, C. Visioli, F. Distante, A. ve De Caterina, R., (2003). "Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation antiatherogenic properties of mediterranean diet phytochemicals", *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 23: 622-629.

- [50] Visioli, F. Bellomo, G. Montedoro, G. ve Galli, C., (1995). "Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents", *Atherosclerosis*, 117: 25-32.
- [51] Tuck, K.L. ve Hayball, P.J., (2002). "Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects", *The Journal of nutritional biochemistry*, 13: 636-644.
- [52] Fleming, H. Walter, W. ve Etchells, J., (1973). "Antimicrobial properties of oleuropein and products of its hydrolysis from green olives", *Applied microbiology*, 26: 777-782.
- [53] Renis, H.E., (1975). "Inactivation of myxoviruses by calcium elenolate", *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 8: 194-199.
- [54] Saija, A. Trombetta, D. Tomaino, A. Cascio, R.L. Princi, P. Uccella, N. Bonina, F. ve Castelli, F., (1998). "In vitro evaluation of the antioxidant activity and biomembrane interaction of the plant phenols oleuropein and hydroxytyrosol", *International Journal of Pharmaceutics*, 166: 123-133.
- [55] Kurtzman, C.P., (2009). "Biotechnological strains of *Komagataella* (*Pichia*) *pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis", *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 36: 1435-1438.
- [56] Jahic, M., "PICHIA PASTORIS: A PLATFORM ORGANISM TO PRODUCE PROTEINS".
- [57] Faber, K.N. Harder, W. Ab, G. ve Veenhuis, M., (1995). "Methylotrophic yeasts as factories for the production of foreign proteins", *Yeast*, 11: 1331-1344.
- [58] Macauley-Patrick, S. Fazenda, M.L. McNeil, B. ve Harvey, L.M., (2005). "Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system", *Yeast*, 22: 249-270.
- [59] Gellissen, G., (2000). "Heterologous protein production in methylotrophic yeasts", *Applied microbiology and biotechnology*, 54: 741-750.
- [60] Daly, R. ve Hearn, M.T., (2005). "Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production", *Journal of molecular recognition*, 18: 119-138.
- [61] Cereghino, J.L. ve Cregg, J.M., (2000). "Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*", *FEMS microbiology reviews*, 24: 45-66.
- [62] Ahmad, M. Hirz, M. Pichler, H. ve Schwab, H., (2014). "Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production", *Applied microbiology and biotechnology*, 98: 5301-5317.
- [63] Himeno, N. Saburi, W. Wakuta, S. Takeda, R. Matsuura, H. Nabeta, K. Sansenya, S. KETUDAT CAIRNS, J.R. Mori, H. ve Imai, R., (2013). "Identification of rice β -glucosidase with high hydrolytic activity towards salicylic acid β -D-glucoside", *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 77: 934-939.

- [64] Le Thuy Mai, V.N.T., "Cloning of a β -Glucosidase Gene (BGL1) from Traditional Starter Yeast *Saccharomycopsis fibuligera* BMQ 908 and Expression in *Pichia pastoris*".
- [65] Harhangi, H.R. Steenbakkers, P.J. Akhmanova, A. Jetten, M.S. van der Drift, C. ve den Camp, H.J.O., (2002). "A highly expressed family 1 β -glucosidase with transglycosylation capacity from the anaerobic fungus *Piromyces* sp. E2", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1574: 293-303.
- [66] Hong, J. Tamaki, H. ve Kumagai, H., (2007). "Cloning and functional expression of thermostable β -glucosidase gene from *Thermoascus aurantiacus*", *Applied microbiology and biotechnology*, 73: 1331-1339.
- [67] Liu, D. Zhang, R. Yang, X. Zhang, Z. Song, S. Miao, Y. ve Shen, Q., (2012). "Characterization of a thermostable b-glucosidase from *Aspergillus fumigatus* Z5, and its functional expression in *Pichia pastoris* X-33", *Microb Cell Fact*, 11: 1-15.
- [68] Berrin, J.G. McLauchlan, W.R. Needs, P. Williamson, G. Puigserver, A. Kroon, P.A. ve Juge, N., (2002). "Functional expression of human liver cytosolic β -glucosidase in *Pichia pastoris*", *European Journal of Biochemistry*, 269: 249-258.
- [69] Uchima, C.A. Tokuda, G. Watanabe, H. Kitamoto, K. ve Arioka, M., (2012). "Heterologous expression in *Pichia pastoris* and characterization of an endogenous thermostable and high-glucose-tolerant β -glucosidase from the termite *Nasutitermes takasagoensis*", *Applied and environmental microbiology*, 78: 4288-4293.
- [70] Cairns, J.R.K. Champattanachai, V. Srisomsap, C. Wittman-Liebold, B. Thiede, B. ve Svasti, J., (2000). "Sequence and expression of Thai Rosewood β -glucosidase/ β -fucosidase, a family 1 glycosyl hydrolase glycoprotein", *Journal of biochemistry*, 128: 999-1008.
- [71] Lööke, M. Kristjuhan, K. ve Kristjuhan, A., (2011). "Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications", *Biotechniques*, 50: 325.
- [72] Zou, H. Luo, Q. ve Zhou, D., (2001). "Affinity membrane chromatography for the analysis and purification of proteins", *Journal of biochemical and biophysical methods*, 49: 199-240.
- [73] Wilchek, M. ve Chaiken, I., (2000). "An overview of affinity chromatography", *Affinity Chromatography: Methods and Protocols*: 1-6.
- [74] Konak, Ü.İ. Turhan, İ. ve Certel, M., (2014). "Proteinlerin Kromatografik Yöntemlerle Saflaştırılması", *Academic Food Journal/Akademik GIDA*, 12.
- [75] Laemmli, U.K., (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *nature*, 227: 680-685.
- [76] Chen, Y. Li, Y. Liu, P. Sun, Q. ve Liu, Z., (2014). "Optimized expression in *Pichia pastoris* eliminates common protein contaminants from subsequent His-tag purification", *Biotechnology letters*, 36: 711-718.

- [77] Wang, W. Li, C. ve Hu, X., (2009). "Developmental expression of β -glucosidase in olive leaves", *Biologia plantarum*, 53: 138-140.
- [78] Romero-Segura, C. Sanz, C. ve Perez, A.G., (2009). "Purification and characterization of an olive fruit β -glucosidase involved in the biosynthesis of virgin olive oil phenolics", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 7983-7988.

DİZİN ANALİZİ SONUÇLARI**A-1 pGEM-T EASY VEKTÖRÜNE KLONLANMIŞ KALIP OLARAK KULLANILAN ZEYTİN
BETA GLUKOZİDAZ DNA'SININ DİZİN ANALİZİ SONUÇLARI****A-1.1 T7 İLERİ PRİMER KULLANILARAK YAPILAN DİZİLEME SONUCU**

AAACTCCCCGGGTCGGCCTGGCGGCCGCGGGATTGATTCCGGAATTCATGGATATCCAAAG
CACCTTCCTGACGATTACTAGCGGATCCTCACCAACTGACACTTCCTCCAATGGTCAGGCAGCC
AAATCCACCAAAGAAAGGATCAAACGCTCTGATTTTCCCAGTGACTTTGTATTTGGCGCTGCAA
CTGCTTCATATCAAGTTGAAGGTGCATGGAACGAAGGAGGTAAAGGCATGAGTAATTGGGAT
TACTTTACACAGAGTCAACCAGGTGGTATTTCCGACTTTAGCAATGGCACTATTGCAATTGATC
ACTTTAATATGTTCAAGGACGATGTTGTCGTGATGAAGAAATTGGGTTTGAAAGCATACAGAT
TTTCACTTTCATGGCCTAGAATCTTGCCAGGAGGAAGACTGTGTCACGGTGTATCTAAAGAAG
GAGTTCAGTTCTATAACGATCTCATTGATGCTCTCTTGGCAGCTGACATAGAGCCATATATAAC
TATCTTTCACTGGGATATTCCCCAATGTTTGCAACTAGAGTATGGTGGCTTCCTACATGAAAGA
GTTGTGCAGGATTTTATTGAGTATTCTGAGATTTGCTTCTGGGAATTTGGTGATCGGGTGAAA
TATTTGGATTACCTGAATGAGCCATGGTCCTTTTACTGTTTCAAGGATATGTGGCTGGTGCTT
TTCCGCCCAATCGTGGTGTAACCTCCGAAAGATACTGAAGAACTAAAAAGCATGCCCCGTCTTC
ATAGAGGTGGAGGAAAACCTTCTAGTCTGCTTTCAAGTATGGAAATCCCGGCACGGAACCATAT
AAAGTGCAACACAATTTAATCCTTTGTCATGCACCATGCTGTGGGACATATACAGAACGAATA
TTCATGAACAGTCAGGGAGGGTAGATAGGGATTACAAATTTGCATTAGTTGGAATGAGCCTTC
TTACTTGACTCCTCAAGAAGATTAAGATGCTGCTACTAGAGGAAATGATTTTTATGCTTTGAAT
GGTTGTGGAACCCATGGTACCTGGACAGTACCCAAAAGATGAATTAATATTGCTGGCCATCG
CCTTTCTAAATTTCTGGAAAAGAGGAAAAGCTAGTGAAAGGAATCCTCCGATCTTTCTAGGC
TAAACCTATACATACCGGCCTACTTATTACCCCGCATGAATCCCTACAAAGTCGAGCTACCTAG
TATTACTTTACGTATCTCGCACCTTAAGAGCTTCCAGTAACGCATTAGGTTGCCTATGCTTG

A-1.2 SP6 GERİ PRİMER KULLANILARAK YAPILAN DİZİLEME SONUCU

AAGAATTTAGTCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGGAATTCAGTAG
TGATTAACCTCGAGCTAGGTGCTGCCTCTAAGCCTTTTACGACGATCTTCAGATTTTTTACAGGTT
CATTCTTCAATGGAAGCTGCTGTAGGCTTGGTGAGGAAGTTCCTCCACCATACAGCTGAACGTTT
TGGCAACCTTGTGTAACGACCATTAGCGTAGTCTACATACATAACGCCAAATCTAACACTGAAT
CCAGCAGCCCATTCAAAATTGTGCAACAACGACCATATGAAGTAACCTTCAAATTTACACCTT
GGTCCATCGCTAGCTTAAGGTAGTAGAGATGTTCTTGGTGATAGTGAATCCTTATATCATCCTT
GAGAGCTTCGGTACTAGTCTTGGACTTATCATTTACTTCATCCACTCCATTCTCTGTAATGTAAA
TAACCGGATCATTATATCTTTTTCTTCATATCAACCATAACTCTGTAAATTCCCCATGGAAGTATG
TATAACCAATCCGAACCAGCCTGTGCACCAATAGGCACCTTATTGCGTTCATGTGAAGTCTTAG
TGTGCGAATCAGTAAAGTAACTATCAGTTGTCGGCTTTGTTGGATCATCGCTGGTATAAGTAG
ACGTGTAGTAGTTTATGCCTAGAAAGTCGTAGGATCCTTTCAGTACTTCTCCTCTTTTTTACAGAA
AATTTAGGAAGGCGATCGCCAACATATTTAATCATACTTTCTGGGTACTCTCCAGTTACCACTG
GTTCCACAAACCATCCAAGCATAAAATCATTTCTCTAGTAGCAGCATCTTTATCTTCTTGAGA
GTCAGTAAGAGGCTCATTCCAATAATGCAATTTGTAATCCCTATCTTACCTCCCTGACTTTCTT
GATATTTTCGTTCTGTATATGTCCACAGCATGTGCATGACAAGGATTAAATTGTGTGCCACTTTA
TATGGTTCCGTGCCGGGATTTCCATACTTGAAGCAGCTAGAGTTTTCTTCACTCTATGAGACGC
ATGCTTTTAGTTCTTCAGTATCTTTTCGGAGTACACCACGATGGCGAAAGCACAGCCACATATCT
GACAGTTACGACATGCTCAATCAAGTATCATATTCACGATCACCGATTCTGAAGCCATCTCGAAT
ACTCATATCTGCACCTTCAGTAGAGCTCCAATCCTAGTGCAACATTGGGAT

A-2 İNSERT İÇEREN REKOMBİNANT VEKTÖRE AİT DİZİN ANALİZİ SONUÇLARI

A-2.1 5' AOX1 PRİMERİ İLE YAPILAN DİZİLEME SONUCU

GGTGTGTTTAGGCTTTTACGTTGCTTTTCGACACTTGAGAGATCAAAAACAATAATTATTCGA
AACGAGGAATTCAGCATGGATATCCAAGCAACGTCCTGACGATTACTAGCGGATCCTCACCA
ACTGACACTTCCTCCAATGGTCAGGCAGCCAAATCCACCAAAGAAAGGATCAAACGCTCTGAT
TTTCCCAGTGACTTTGTATTTGGCGCTGCAACTGCTTCATATCAAGTTGAAGGTGCATGGAACG
AAGGAGGTAAAGGCATGAGTAATTGGGATTACTTTACACAGAGTCAACTAGGTGGTATTTCC
GACTTTAGCAATGGCACTATTGCAATTGATCACTTTAATATGTTCAAGGACGATGTTGTCTGTGA
TGAAGAAATTGGGTTTGAAAGCATAACAGATTTTCACTTTTATGGCCTAGAATCTTGCCAGGAG
GAAGACTGTGTACGGTGTATCTAAAGAAGGAGTTCAGTTCTATAACGATCTCATTGATGCTC
TCTTGGCAGCTGACATAGAGCCATATATAACTATCTTTCACTGGGATATTTCCCAATGTTTGCA
ACTAGAGTATGGTGGCTTCTACATGAAAGAGTTGTGCAGGATTTTATTGAGTATTCTGAGAT
TTGCTTCTGGGAATTTGGTGATCGGGTGAAATATTGGATTACCTGAATGAGCCATGGTCTTTT
ACTGTTCAAGGATATGTGGCTGGTGCTTTTCCGCCCAATCGTGGTGTAACCTCCGAAAGATACT
GAAGAAACTAAAAAGCATGCCCCTTTCATAGAGGTGGAGGAAAATCTAGCTGCTTTCAAG
TATGGAAATCCCGGCACGGAACCATATAAAGTGGCACACAATTTAATCCTTTGTCATGCACAT
GCTGTGGACATATACAGAACGAAATATCAGAAAGTCAGGGAGGTAAGATAGGGATTACAAAT
TGCATTAGTTGGAATGAGCCTCTTACTGACTCTCAAGAAGATAAAGATGCTGCTACTAGAGGA
AATGATTTTATGCTTGGATGGTTTGTGGAACCAAGTGGTAACTGGAGAGTACCCAGAAAGTATG
ATTAAATATGTTGGCGATTGCCTTCTTAATTTTCTGAAAAAGAGGAGAAGCTAGTGAAAGGAT
CCTACGACTTTCTAGGCATAAACTACCTACACGTCTTACTTTATGCAAGCGAATGATCAACAAA
GCGACAACCTGATAGGTTACCTGTTACCGATTCCCACCCCT

A-2.2 3' AOX1 PRİMERİ İLE YAPILAN DİZİLEME SONUCU

TAGGGAACAAGCAGACCGGTCTTCTCGTAGTGCCCAACTTGAAGTGAAGAACAGTCATGTCTA
AGGCTACAAACTCAATGATGATGATGATGATGGTCGACGGCGCTATTCAGATCCTCTTCTGAG
ATGAGTTTTTGTCTAGAAAGCTGGCGGCCGCCGCGGCTCGAGGGTGCTGCCTCTAAGCCTTT
TACGACGATCTTCAGATTTTTTCAGGTTCAATCTTCAATGGAAGTGTGTAGGCTTGGTGAGGAA
GTTCTCCACCATACAGCTGAACGTTTTGGCAACCTTGTGTAACGACCATTAGCGTAGTCTACA
TACATAACGCCAAATCTAACTGAATCCAGCAGCCCATTCAAAATTGTCGAACAACGACCAT
ATGAAGTAACCTTCAAATTTACACCTTGGTCCATCGCTAGCTTAAGGTAGTAGAGATGTTCTT
GGTGATAGTGAATCCTTATATCATCCTTGAGAGCTTCGGTACTAGTCTTGGACTTATCATTTAC
TTCATCCACTCCATTCTCTGTAATGTAAATAACCGGATCATTATATCTTTTCTTCATATCAACCAT
AACTCTGTAAATTCCCATGGAAGTATGTATAACCAATCCGAACCAGCCTGTGCACCAATAGGC
ACCTTATTGCGTTCATGTGAAGTCTTAGTGTGCGAATCAGTAAAGTAACTATCAGTTGTCGGCT
TTGTTGGATCATCGCTGGTATAAGTAGACGTGTAGTAGTTTATGCCTAGAAAGTCGTAGGATC
CTTCACTAGCTTCTCCTCTTTTTCAGAAAATTTAGGAAGGCGATCGCCAACATATTTAATCATA
CTTCTGGGTACTCTCCAGTTACCACTGGTTCACAAACCATCCAAGCATAAAATCATTTCTCT
AGTAGCAGCATCTTTATCTTCTTGAGAGTCAGTAAGAGGCTCATTCCAATAATGCAATTTGTA
ATCCCTATCTTACCTCCCTGACTTTCCTGATATTTCTGTTCTGTATATGTCCACAGCATGTGCATG
ACAAAGGATTAAATTGTGTGCACTTTATATGGGTTCCGTGCCGGGATTTCCATACTTGAAGCA
GCTAGAAGTCTTCTCCACTCTATGAGACGGGCATGCTTTTTAGTTTCTTCAGTATCTTTGAGT
ACACTCACGATGGGACGAAAGCACAGCCACATATTCTTGAAACAGTAGACATGCTCAATCAGT
ATTCCATATTTTCACCCCGAATCACCCAAATC

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Gözde ZEYTUN
Doğum Tarihi ve Yeri : 04.05.1990 Bakırköy/İSTANBUL
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : gzd90_bio@hotmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lisans	Biyoloji	Ege Üniversitesi	2012
Lise	Sayısal	Ataköy Cumhuriyet Lisesi	2007

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2013-2015	Yıldız Teknik Üniversitesi	Asistan Öğrenci