

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



**GIDA KATKI MADDESİ OLARAK KULLANILABİLECEK
REKOMBİNANT JELATİNİN MAYADA (*PICHIA PASTORIS*) ÜRETİMİ**

Proje No: FBA-2013-4348

Proje Türü: Normal Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü: Doç. Dr. Zülal KESMEN

Mühendislik Fakültesi /Gıda Mühendisliği Bölümü

Araştırmacının Adı Soyadı: Ayten GÜLLÜCE

Mühendislik Fakültesi /Gıda Mühendisliği Bölümü

Mart 2016

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Bu araştırma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından FBA-2013-4348 kodlu proje ile desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

KISALTMA ve SİMGELER	vi
TABLolar LİSTESİ	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xii
GİRİŞ	14
1. BÖLÜM.....	16
GENEL BİLGİLER	16
1.1 Kollajen	16
1.1.1 Kollajen Gen Ailesi.....	16
1.1.2 Kollajenin Yapısı	17
1.2 Jelatin.....	18
1.2.1 Jelatinin Kimyasal Kompozisyonu	20
1.2.1.1 Jelatinin Kimyasal Yapısı.....	20
1.2.2 Jelatinin Fiziksel Özellikleri	22
1.2.3 Jelatinin Endüstriyel Uygulamalarda Kullanımı	23
1.2.4 Dünyada ve Türkiye’de Jelatin Üretimi.....	25
1.2.5 Alternatif Jelatin Kaynakları	26
1.3 Rekombinant Protein Üretimi	28
1.3.1 Hedeflenen Genin Tespit Edilmesi ve Saflaştırılması	29
1.3.2 Saflaştırılan Hedef Genin Klonlama ve/veya Ekspresyon Vektörüne Bağlanması	30
1.3.3 Rekombinant Protein Üretiminde Kullanılan Konak Hücreler	34
1.3.3.1 Konak Hücre Pichia pastoris (P. pastoris).....	35
1.3.3.1.1 P. pastoris’in Metanol Metabolizması	36
1.3.3.1.2 Heterolog Proteinlerin Salgılanması	37
1.3.3.1.3 P. pastoris’in En Yaygın Kullanılan Ekspresyon Suşları.....	38
2. BÖLÜM.....	42

MATERYAL ve METOD	42
2.1 Materyal.....	42
2.1.1 Kimyasal Maddeler, Tampon ve Stok Çözeltiler.....	42
2.1.2 Mikroorganizma Suşları, Klonlama ve Ekspresyon Vektörleri	42
2.1.3 <i>E. coli</i> ve <i>P. pastoris</i> Kültür Ortamları	43
2.2 Metod.....	43
2.2.1 Primerlerin Belirlenmesi	43
2.2.2 Sığır Dokusundan RNA Ekstraksiyonu ve RT-PCR.....	44
2.2.3 PCR Ürünlerinin Klonlama Vektörüne Bağlanması (Ligasyon)	45
2.2.4 Kompetent <i>E. coli</i> DH5 α Hücrelerinin Hazırlanması	46
2.2.5 Ligasyon Ürünlerinin Kompetent <i>E. coli</i> DH5 α Hücrelerine Klonlanması.....	47
2.2.6 pPIC9 Ekspresyon Vektörünün Kompetent <i>E. coli</i> DH5 α Hücrelerine Klonlanması	47
2.2.7 <i>E. coli</i> DH5 α Transformantlarının Kontrolü.....	48
2.2.7.1 <i>E. coli</i> DH5 α Hücrelerinden Plazmid DNA İzolasyonu	48
2.2.7.2 Plazmid DNA'nın PCR Analizi	48
2.2.7.3 PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektrofrezisi	49
2.2.7.4 PCR Ürünlerinin Dizi Analizi	49
2.2.8 Plazmid DNA'ların Ekspresyon Vektörüne Bağlanması (Ligasyon)	49
2.2.9 rCOL-1 Plazmid DNA'ların ve pPIC9 Ekspresyon Vektörünün Linearize Edilmesi .	51
2.2.10 Kompetent <i>P. pastoris</i> Hücrelerinin Hazırlanması	51
2.2.11 Elektroporasyon	52
2.2.12 Rekombinant <i>P. pastoris</i> Hücrelerinin Tespit Edilmesi	52
2.2.12.1 <i>P. pastoris</i> Hücrelerinden DNA Ekstraksiyonu	53
2.2.12.2 Ekspresyonun Kontrolü	54
2.2.12.2.1 <i>P. pastoris</i> Transformantlarından RNA Ekstraksiyonu ve RT-PCR Analizi....	54
3. BÖLÜM.....	56
BULGULAR.....	56
3.1 pCOL-1 Plazmid DNA'ların <i>E. coli</i> DH5 α Hücrelerinde Klonlanması.....	56
3.2 rCOL-1 Plazmid DNA'ların Oluşturulması	59
3.3 Rekombinant <i>P. pastoris</i> Hücrelerinin Tespit Edilmesi.....	61
3.3.1.1 COL-1 Gen Fragmanı İçeren <i>P. pastoris</i> KM71 Transformantlarının Tespiti ve Transkripsiyonun Kontrolü	63
3.3.1.1.1 5'AOX/3'AOX Primer Seti ile Gerçekleştirilen PCR Sonuçları	63

3.3.1.1.2 COL-1 Gen Fragmanının *P. pastoris* KM71 Hücresinde Transkripsiyonunun Kontrolü 64

3.3.1.2 pPIC9 Ekspresyon Vektörünü İçeren *P. pastoris* KM71 Hücrelerinin Tespiti..... 65

4. BÖLÜM..... 67

TARTIŞMA-SONUÇ ve ÖNERİLER..... 67

4.1 Klonlama Sonuçları..... 67

4.2 Ekspresyon Sonuçları 68

4.3 Genel Değerlendirme ve Öneriler 70

KAYNAKLAR 76

EKLER..... 89

Ek-1..... 89

Tampon ve Stok Çözeltiler 89

Ek-2..... 91

E. coli ve *P. pastoris* Kültür Ortamları 91

Ek-3:..... 93

COL-1 gen fragmanı için dizi analizi sonucu 93

Ek-4:..... 95

COL-1 fragmanına ait dizi analizi sonuçlarının *Bos taurus* collagen, type I, alpha 1 (COL1A1), mRNA dizisi ile karşılaştırılması..... 95

KISALTMA ve SİMGELER

°C	:Santigrat derece
~	:Yaklaşık
µL	:Mikrolitre
A°	:Armstrong derece
ABD	:Amerike Birleşik Devletleri
ACE	:Anjiotensin dönüştürücü enzim
AOX	:Alkol oksidaz
ARG4	:Arjinosuksinat liyaz geni
BAP	:Biyoaktif peptidler
BSE	:Bovine spongiform encephalopathy; Sığır süngerimsi ensefalopati
CaCl ₂	:Kalsiyum klorür
COL-1	:Yaklaşık 800 bç'lik hedef gen bölgesi
COL-2	:Yaklaşık 1000 bç'lik hedef gen bölgesi
ddH ₂ O	:Double-distilled water ; çifte distile su
DNA	:Deoksiribo nükleik asit
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
FACIT	:Fibril-associated collagens with interrupted triple helices; Üçlü sarmallarla ilişkilendirilmiş fibril kollajenler
FDA	:Gıda ve İlaç İdaresi; Food and Drug Administration
<i>FLD1</i>	:Formaldehid dehidrojenaz
g/cm ³	:gram/santimetre küp
g/l	:gram/litre
<i>GAP</i>	:Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz
GME	:Avrupa Jelatin Üreticileri; Gelatine Manufactures of Europe
GRAS	: Genellikle Güvenli olarak kabul edilen; Generally Regarded as Safe
HIS4	:Histidinol dehidrojenaz geni
IPTG	:isopropylthiogalactoside
kb	:kilobaz
kDa	:kilo dalton
kV	:Kilo volt
LB	:Lizojeni broth

MD	:Minimal Dekstroz
mg	:Mili gram
mM	:Milimolar
M.Ö.	:Milattan önce
Mut ^s	:Metanolu yavaş kullanan fenotip
Mut [–]	:Metanolu kullanmayan fenotip
Mut ⁺	:Metanolu kullanan fenotip
ng	:Nanogram
OD	:Optik yoğunluk
<i>P4H</i>	:Prolil 4-hidroksilaz
<i>P. pastoris</i>	: <i>Pichia pastoris</i>
PCR	:Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pCR TM 2.1	:klonlama vektörü
pPIC9	:Ekspresyon vektörü
rCOL-1	:COL-1 gen fragmanını içeren rekombinant pPIC9
rCOL-2	:COL-2 gen fragmanını içeren rekombinant pPIC9)
rDNA	:Rekombinant Deoksiribo nükleik asit
RE	:Restriksiyon endonükleaz
RH	:Nisbi rutubet
RNA	:Ribo nükleik asit
RT-PCR	:Revers (geri) transkriptaz-Polimeraz zincir reaksiyonu
TSE	:Transmissible spongiform encephalopathies; Bulaşıcı süngerimsi ensefalopati
UV	:Ultra viyole
V	:Volt
YPD	:YEPD, yeast extract peptone dextrose
X-gal	:5-bromo-4-chloro-indolyl-β-D-galactopyranoside

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.1. Tavuk jelatininin amino asit kompozisyonunun domuz, sığır ve balık jelatinin ile karşılaştırılması.....	18
Tablo 1.2. Gıda katkı maddesi olarak kullanılan jelatinin fonksiyonel özellikleri ve bu özelliklerinden yararlanmak üzere kullanıldığı gıda maddeleri	25
Tablo 1.3. Rekombinant protein üretiminde yaygın kullanılan konakçı hücreler	32
Tablo 1.4. Yaygın Kullanılan <i>P. pastoris</i> suşları.....	39
Tablo 2.1. Çalışmada kullanılan primerler.....	45
Tablo 2.2. RT-PCR karışımı ve reaksiyon koşulları.....	46
Tablo 2.3. Ligasyon Reaksiyon Karışımı.....	47
Tablo 2.4. PCR karışımı ve reaksiyon koşulları.	50
Tablo 2.5. <i>EcoR</i> I ve <i>Not</i> I restriksiyon Enzimleri Kesim Reaksiyon Karışımı.	51
Tablo 2.6. Ligasyon Reaksiyonu Karışımı.....	51
Tablo 2.7. <i>Sal</i> I restriksiyon endonkleaz kesim reaksiyonu.....	52
Tablo 2.8. RT-PCR karışımı ve reaksiyon koşulları.....	56

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	A tipi ve B tipi jelatin eldesi	21
Şekil 1.2.	Jelatinin kimyasal konfigürasyonu.....	22
Şekil 1.3.	Jelatin Üretiminde Kullanılan Kaynaklar ve Dünyada Yıllık Jelatin Üretimi.....	27
Şekil 1.4.	DNA zincirinin restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilmesi.....	27
Şekil 1.5.	pCR®2.1 klonlama vektörü haritası.	33
Şekil 1.6.	PCR ürününün pCR®2.1 klonlama vektörüne bağlanması.	34
Şekil 1.7.	pPIC9 ekspresyon vektörü haritası.	34
Şekil 3.1.	Transformasyondan sonra LB agarda gözlenen mavi-beyaz koloni oluşumu.	58
Şekil 3.2.	Klonlama sonrası <i>E. coli</i> DH5- α transformantlarına ait PCR Sonuçları.	58
Şekil 3.3.	<i>E. coli</i> transformantlarına ait PCR ürünlerinin dizi analizi sonuçları	59
Şekil 3.4.	<i>EcoR</i> I ve <i>Not</i> I endonükleazlar ile kesilmiş pCOL-1 ve pCOL-2 plazmid DNA görüntüleri.	60
Şekil 3.5.	Ligasyon karışımlarına 5'AOX/3'AOX primer seti ile yapılan PCR ürünleri.	61
Şekil 3.6.	COL-1 gen fragmanı için agaroz jel görüntüsü	62
Şekil 3.7.	MD agarda gelişen <i>P. pastoris</i> transformantları.	53
Şekil 3.8.	“5'AOX/3'AOX” primer seti ile gerçekleştirilen PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü	64
Şekil 3.9.	COL-1/F & COL-1/R primer seti ile gerçekleştirilen PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.	65
Şekil 3.10.	pPIC9 ekspresyon vektörünü içeren <i>P. pastoris</i> KM71 hücrelerinin tespiti.	67
Şekil 4.1.	Hedef gen bölgesinin <i>Pichia</i> genomuna entegrasyonu	70

ÖZET

Gıda sanayinde çok amaçlı bir gıda katkı maddesi olarak kullanılan jelatinin hammaddesi, sığır ve domuz gibi hayvanların derisi ve kemiklerini içine alan kesimhane yan ürünleridir. Jelatin elde edilirken kullanılan hayvansal kaynakların inanç ve kültürel değerlere uygun olmama ihtimali (örn; domuz deri ve/veya kemikleri ya da usulüne uygunolarak kesilmemiş herhangi bir hayvana ait kesimhane yan ürünleri) veya helal olmayan hayvansal kaynaklardan elde edilme ihtimali tüketicilerde büyük endişeye sebep olmaktadır. Diğer taraftan hayvansal kaynaklardan elde edilen jelatin, hayvanlarda görülen Spongiform Encephalopathy'lere (TSEs, Transmissible spongiform encephalopathies) sebep olan etkenlerin kontaminasyonuna yol açabilmesi gibi sağlık açısından da risk oluşturmaktadır. Dolayısıyla gerek sağlık ve gerekse inanç hassasiyetlerinin korunmasına katkı sağlamak amacıyla hayvansal kaynaklar dışında jelatin elde edilebilecek farklı kaynakların geliştirilmesi gereği ortadadır. Son yıllarda daha çok medikal uygulamalarda kullanılmak üzere, hayvansal kaynaklı jelatine alternatif mikrobiyal kollajen ve jelatin üretimi öne çıkmıştır. Ancak bu alanda yapılan çalışmalar arasında gıda endüstrisinde kullanılmak üzere jelatin veya kollajen üretmeye yönelik bir araştırmaya rastlanmamıştır.

Gıda sanayinde kaynağı itibari ile güvenilir jelatine duyulan ihtiyaç göz önünde bulundurularak yapılan bu araştırma ile hem sağlık açısından risk taşımayan hem de tüketicilerin inanç değerleri ile çelişmeyen, mikrobiyal jelatin üretim yönteminin sanayi ve tüketicilerin kullanımına sunulması amaçlanmıştır. Araştırma kapsamında sığır (*Bos taurus*) kollajen, tip I, alfa 1 (COL1A1), mRNA dizisi üzerinde belirlenmiş yaklaşık 800 bç'lik uzunluktaki gen fragmanı *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) KM71 maya hücrelerine elektroporasyon uygulaması ile transfer edilmiştir. Transformantlar tarafından hedef gen bölgesinin transkripsiyonu polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile kontrol edilmiş ve hedef gen fragmanı ile örtüşen yaklaşık 800 bç'lik PCR ürünü agaroz jelde görüntülenmiştir. Aynı zamanda PCR ürünlerinin doğruluğu dizi analizi ile de doğrulanmıştır. Analiz sonuçları gen

bankası veri tabanında tarandığında *Bos taurus* collagen, type I, alpha 1 (COL1A1), mRNA dizisi ile eşleştiği görülmüştür.

Sonuç olarak *P.pastoris* hücrelerinde kollajen gen fragmentlerinin başarı ile transkript edilebildiği ancak gıda sanayi için uygun fonksiyonel rekombinant jelatin eldesi için bu alanda daha çok çalışma yapılması gerektiği görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Kollajen, Jelatin, Rekombinant jelatin, *P. pastoris*, Gıda katkı maddesi

ABSTRACT

The gelatin that used as a multipurpose food additive in the food industry, is commonly derived from pig skin, bovine hides and pig and cattle bones. Gelatin is an hidrolized protein that is obtained from acid or alkaline extracted collagen from animal tissue. Consumers and manufacturers have some hesitations about animal derived gelatin usage in food and pharmacology. Because in Islamic beliefs consuming of products derived from non-halal sources (such as porcine gelatin or slaughter in non-halal conditions) is certainly forbidden. On the other hand gelatin derived from animal tissues is a potential source of transported Spongiform Encephalopathy (TSEs Transmissible Spongiform Encephalopathies) contaminants, so that it can cause health risks. In order to contribute to the protection of health and religion precision alternative gelatin sources must be developed instead of animal derived gelatin. In recent years, especially for medical applications, microbial gelatin or collagen production receive attention as an alternative to animal-derived collagen. Up to the our knowledge there is no study on the production of recombinant gelatin for food purposes.

Taking into the consideration of reliable gelatin sources need for food industry, this research was conducted. Thus a microbial gelatin that has no risk on both health and belief considerations, production method has been developed for consumers and manufacturers. In about 800 bp length gene fragment of cattle (*Bos taurus*) collagen, type I, alpha 1 (COL1A1), mRNA sequence was transferred to *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) KM71 yeast strains cells by electroporation. Transcription of these gene fragments checked by polymerase chain reactions (PCR) and about 800 and 1000 bp PCR products were obtained as like targeted gene fragments. Also PCR products accuracy was checked by sequence analysis. When the analysis results screened on gene bank database, it was seen that sequence analysis results matches with *Bos taurus* collagen, type I, alpha 1 (COL1A1) mRNA sequence.

As a result, it was seen that collagen gene fragments can be transcribed in *P. pastoris* cells successfully, but there is more research need to achieve optimal functional recombinant gelatin for the food industry.

Keywords: Collagen, Gelatin, Rekombinant gelatin, *P. pastoris*, Food additive

GİRİŞ

Kollajen, insan ve hayvan organizmalarında en çok bulunan proteinlerinden biridir ve toplam proteinin yaklaşık % 60'ını oluşturur. Bugüne kadar, 27 farklı tipte kollajen tespit edilmiş olup bunlardan en yaygını daha çok deri, kemik ve tendon gibi dokularda bulunan Tip I kollajendir. Kollajen genellikle Glisin-X-Y şeklindeki peptid üçlülerinden oluşur. Buarada X ve Y herhangi bir aminoasit olabilirse de genellikle X pozisyonunda prolin Y pozisyonuna hidroksiprolin bulunur.

Jelatin ise sığır ve domuz gibi hayvanların derisi ve kemiklerini içine alan kesimhane yan ürünlerinden geleneksel olarak asit veya alkali yolla ekstrakte edilmiş kollajenin kısmi hidrolizasyonu ile elde edilmektedir. Pekçok gıda ürününde yaygın kullanımı olan jelatinin elde edildiği kaynağın toplumsal inanç ve kültürel değerlere uygun olmama ihtimali (örn; domuz deri ve/veya kemikleri ya da usulüne uygun kesilmemiş herhangi bir hayvana ait kesimhane yan ürünleri) veya helal olmayan hayvansal kaynaklardan elde edilme ihtimali yada BSE (bovine spongiform encephalopathy) başta olmak üzere hayvanlarda görülen Spongiform Encephalopathy'lere (TSEs, Transmissible spongiform encephalopathies) sebep olan etkenlerin kontaminasyonuna yol açabilme ihtimali tüketicilerde büyük endişeye neden olmaktadır. Bu nedenle günümüzde, gerek sağlık ve gerekse inanç hassasiyetlerinin korunmasına katkı sağlamak amacıyla hayvansal kaynaklar dışında jelatin elde edilebilecek farklı kaynaklara olan ilgi de giderek artmaktadır. Son yıllarda özellikle sağlık üzerine yol açtığı riskler nedeniyle daha çok medikal uygulamalarda kullanılmak üzere hayvansal kaynaklı olmayan kollajen ve jelatin üretimi çalışmaları dikkat çekmektedir. Bunun için çeşitli ekspresyon sistemleri kullanılarak özellikle insan kollajen gen fragmanları ekspres edilmiştir. Ekspresyon sistemleri içerisinde en dikkat çeken ve üzerinde en çok araştırma yapılanı ise rekombinant protein üretiminde pekçok avantaj sağlayan *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) olmuştur.

Bugüne kadar yapılan çalışmalar, medikal ve farmakolojik uygulamalarda hayvansal kaynaklı jelatin kullanımından kaynaklanabilecek alerjik reaksiyonlar veya virus yada prionlar gibi çeşitli kontaminantların bulaşmasını engellemek amacıyla yapılmıştır ve daha çok mikrobiyal insan kollajeni veya jelatini üretmeye yöneliktir. Ayrıca bu çalışmalar sanayiye de kazandırılmış olup mikrobiyal insan kollajeni üretimi yapan firmalar da mevcuttur. Ancak yapılan çalışmalar arasında gıda endüstrisinde kullanılabilecek jelatin veya kollajen üretimine yönelik herhangi bir uygulamaya rastlanmamıştır.

Bu araştırma kapsamında *Bos taurus* collagen, type I, alpha 1 (COL1A1), mRNA dizisi üzerinde (Accession number: NM_001034039) 2284-3210 bazları yer alan yaklaşık 800bç'lik gen fragmanı öncelikle *E.coli* DH5 α hücrelerinde klonlanmış ve daha sonra pPIC9 ekspresyon vektörüne bağlanarak *P.pastoris* KM71 hücrelerine transfer edilmiş ve maya hücrelerinde gen fragmanının transkripsiyonu sağlanmıştır.

Böylece çalışma ile menşei hakkında şüpheler olan, saflaştırılması için uzun ve zahmetli bir izolasyon süreci gerektiren hayvansal kaynaklı jelatine alternatif olarak gıda sanayinde kullanılmak üzere sağlık açısından daha güvenli, inanç hassasiyetlerine uygun ve geleneksel jelatine göre daha kısa ve basit bir izolasyon prosedürü gerektiren mikrobiyal jelatin üretimine yönelik bir metod ortaya konulması hedeflenmiştir.

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

1.1 Kollajen

Kollajen (collagen) kelimesi kökeni 19.yüzyıla dayanan Fransızca bir terim olup bağ dokunun yapışkan madde üretmesine işaret eden bir anlam taşımaktadır. Bu tabir yunanca “kola (xoXXa)” (yapışkan) kelimesi ve –yevos (doğum) ekinin birleşmesi ile ortaya çıkmış bir terimdir. 1865 yıllarında İngilizce’ye “collagen” olarak adapte olmuştur (Van der Rest vd., 1991; Jain vd., 2014).

Kollajen ifadesi geniş bir protein ailesini temsil eder. Fibröz bir protein olan kollajen; deri, tendon, bağ, kıkırdak, kemik, diş, kan damarları, vb. gibi çeşitli bağ dokuların en büyük bileşenidir. Hayvanlarda toplam protein içeriğinin yaklaşık dörtte birini teşkil eder.

1.1.1 Kollajen Gen Ailesi

Kollajen gen ailesi üyeleri COL ifadesi ile başlar, bu ifadeyi kollajen tipini ifade eden bir numara, daha sonra A harfi (alfa zincir için) ve yine α -zinciri belirten başka bir numara izler. Buna göre $\alpha 2(I)$ zinciri için gen bölgesi COL1A2 iken $\alpha 1(II)$ için gen bölgesi COL2A1’dir. Bugüne kadar 45’ten fazla gen tarafından kodlanan kimyasal, genetik ve immünolojik olarak birbirinden farklı 28 kollajen tipi tanımlanmıştır (Abdemami vd., 2011; Bhattacharjee ve Bansal, 2008; Vuorio ve Crombrughe, 1990).

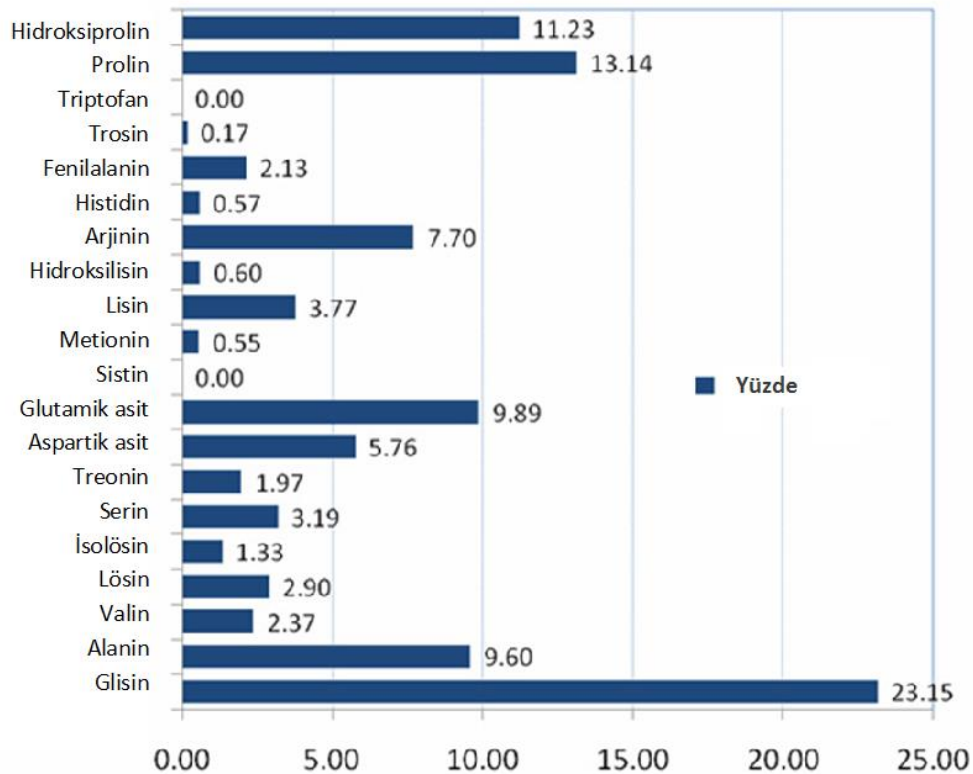
Kollajen genleri 5 kb COL1A1 ile 130kb COL13A1'e kadar geniş bir aralığa sahiptir ve kendi mRNA'larından birkaç kez büyüktürler. Değişik kollajen genlerinin aksine fibril formdaki kollajenler genlerinin benzer eksonları bulunur. Bu genler majör üçlü sarmal bölgesi için 80-2000 nükleotid uzunluğunda intronlar tarafından ayrılmış 42 ekson içerir. Çoğu ekson 54 bç'den oluşur ve bozulmamış glisin kodonu ile başlar. Bu organizasyon büyük ölçüde korunmuş olup fibrilar kollajenin tipinden ve türünden bağımsızdır. Ancak fibrilar olmayan kollajen genlerinin organizasyonu değişiklik gösterir. Örneğin, tip IV kollajen geni için eksonlar 54 bç kuralına uymaz ve sıklıkla bir split glisin kodonu ile başlar. Bu kollajende COL4A1, COL4A2, COL4A3-COL4A4 ve COL4A5-COL4A6 genleri bir nükleotid dizisi tarafından ayrılmış eşsiz bir oryantasyonda

düzenlenmiştir. Tip IX kollajende ekson aralığı 21-400bp arasındadır, lokasyonuna ve bulunduğu dokuya bağlı olarak tip IX'un kısa bir formunu transkript eden alternative bir promotöre sahiptir. Tip VI kollajen geni 34 eksondan oluşur. Tip X kollajen için düzenleme ise diğer kollajenlerden oldukça farklıdır. Bu gende tip X'un üçlü sarmal domain alanını kodlayan yalnızca 2136 bp'lik bir ekson içerir (Vuorio ve Crombrughe, 1990; Jain vd., 2014).

1.1.2 Kollajenin Yapısı

1954 yılında Ramachandran ve Kartha, elyaf kırınım verilerine dayanarak kollajen üçlü heliksi için bir yapı ortaya koymuştur. Bu yapı daha sonra "Madras Heliksi" olarak anılmaya başlanmıştır. 1955'te bu yapı Rich, Crick, North ve arkadaşları tarafından düzenlenmiş ve bugün kabul edilen üçlü sarmal yapı ortaya koyulmuştur (Jain vd., 2014).

Kollajen biyopolimerin Gly-X-Y şeklinde tekrarlayan aminoasit dizilimlerinden oluşur. Bu tekrarlayan tripeptit, "Glisin-X-Prolin" veya "Glisin-X-Hidroksiprolin" şeklinde gösterilebilir ki burada X, herhangi bir amino asit olabilir. Kollajenin yapısındaki amino asitlerin yaklaşık %23'ü glisin, %24'ü prolin ve hidroksiprolin, %20'si alanine ve glutamic asittir (Şekil 1.1). Ayrıca kollajen, triptofan içermeyen bir proteindir (Jain vd., 2014).



Şekil 1.1. Kollajenin amino asit kompozisyonu, (Jain vd., 2014).

Kollojen molekülü birbiri üzerine sarılmış üçlü sarmal görünümünde, α -zincir adı verilen üç adet polipeptid zinciri içermektedir. Bazı kollajen moleküllerinde üç polipeptid zinciri de özdeş iken (homotrimerik kollajen) diğer bazıları α_1 , α_2 ve α_3 olarak adlandırılan iki ya da üç farklı α -zincir içerir (heterotrimerik kollajen).

Kollajen molekülünün üçlü sarmalını oluşturan α zincirlerinin farklılığına göre değişik kollajen tipleri oluşmuş ve bu farklı kollajenler roma rakamları kullanılarak sınıflandırılmıştır. Tüm kollajen tipleri α -zinciri belirten bir numara ve daha sonra parantez içerisinde yazılmış bir roma rakamı ile ifade edilir (örn; $\alpha 1(I)$, $\alpha 2(I)$, $\alpha 1(II)$) (Mouw vd., 2014).

Poliipeptit alt birimler olan α -zincirler, bir ortak eksen etrafında dönerek 3000 Å uzunluğunda ve 15 Å çapında katı bir iplik benzeri bir molekül yapar; bunlar fibrilleri oluştururlar; fibriller de agregre olarak fiberleri oluştururlar. Kollajenin yapısını oluşturan fibriller ve fiberler, deride ve tendonlarda birbirine paralel demetler halinde, akciğerlerde düzensiz bir şekilde, korneada ortogonal tabakalar halinde, kıkırdakta gevşek ağ yapısında, kemik ve dişlerde kalsiyum fosfat kristallerinin matrikslerini oluşturacak şekilde yerleşirler (Pandav, 2014).

1.2 Jelatin

Jelatin; ligamentler, kemik ve deri gibi hayvansal kaynaklı dokulardan asit veya alkali yolla ekstrakte edilmiş kollojenin kısmi hidrolizasyonu ile elde edilen, protein yapısında bir üründür (Schrieber ve Gareis 2007). Jelatin üretiminde kullanılan en önemli kaynaklar domuz derisi (%46), sığır derisi (%29,4) ve domuz ve sığır kemikleri (%23,1)'dir. Balıktan da jelatin elde edilmektedir, ancak bu toplam jelatin üretiminin %1.5'inden daha azdır (Gomez-Guillen vd., 2009). Jelatin üretimi sırasında proteinler asit veya alkali banyolarda ve termal ön işlemlerle ekstrakt edilmektedir. Jelatin üretimi kısaca;

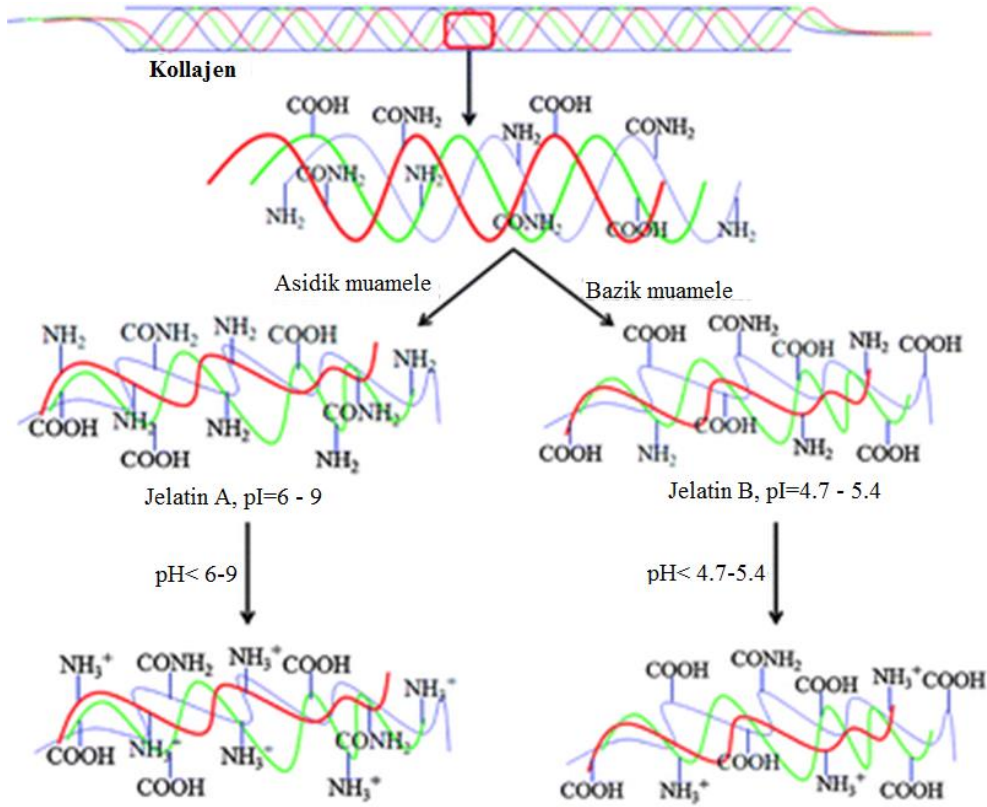
1) Kollajen içeren dokuların jelatin üretimine hazırlanması (yıkama, küçük parçalara bölme, safsızlıkları ayırma, seyreltik asit ve/veya alkali ile yıkama, yağ ve tuzların uzaklaştırılması, kolajen içeren dokunun belli bir dereceye kadar ölçülü bir şekilde parçalanması ile jelatin ekstraksiyonuna hazır hale getirilmesi).

- 2) Jelatin ekstraksiyonu (ekstraksiyona hazırlanan dokuların 40 °C'nin üzerindeki sıcaklıklardaki suda karıştırılarak bekletilmesi)
- 3) Ekstraksiyon çözeltisinin süzülmesi
- 4) Deiyonizasyon
- 5) Sterilizasyon
- 6) Kurutma
- 7) Elde edilen kalıntının öğütülmesi ve ambalajlanması aşamalarından ibarettir.

Proses sonunda elde edilen kuru materyal jelatin olarak adlandırılmaktadır. Jelatin üretiminde esas amaç, deri, kemik, tendon gibi dokularda bulunan, suda çözünmeyen kollajenin, hidrolize edilerek daha küçük parçalara bölünmesi, suda çözünür hale getirilmesi ve en iyi jelleşme özelliklerine sahip jelatinin elde edilmesidir. Şekil 1.1'da şematize edildiği üzere asit ve alkali ön işlemleri ile elde edilen jelatinler, sırasıyla A tipi ve B tipi jelatin olarak adlandırılır (Schrieber ve Gareis, 2007; Duconseille vd., 2015).

A tipi jelatin: A tipi jelatin üretiminde yumuşatma işlemi seyreltik asit ile yapılmaktadır ve ham madde olarak genellikle domuz derisi, balık derisi ve bazen de kemikler kullanılmaktadır. Kollajen pH 4 noktasına kadar asitlendirilir ve daha sonra 50°C'den kaynama noktasına kadar ısıtılarak denatüre edilir. Kollajen çözünebilir hale getirilmiş olur. Bu hale gelen kollajen yağından arındırılıp, filtre edilerek berraklaştırılır. Daha sonra vakum evaporasyon ile konsantre edilerek kurutulur. En son kullanım amacına uygun olarak öğütülen jelatin ambalajlanarak hazır hale getirilir (Francis, 2000).

B tipi jelatin: B tipi jelatin üretiminde seyreltik asit yerine alkali kullanılmaktadır. Hammadde olarak da sığır derisi veya yaşlı hayvanların kesimi sırasında elde edilen kollajen kaynakları kullanılabilir. Alkali ile muamelede, kollajen kostik soda veya kireçleme işlemine maruz kalır. Alkali bileşikler asparajin ve glutamin yan zincirlerini hızlı bir şekilde hidrolize ederek glutamik ve aspartik asite dönüştürür. Sonuçta geleneksel olarak, 4.8 ile 5.2 arasında bir izoionik noktaya sahip jelatin üretilir. Ancak, alkali ile muamele süresi kısaltılırsa (7 gün veya daha az) izoionik noktası 6 gibi yüksek olan jelatin üretilmiş olur. Alkali ile muameleden sonra, kollajen alkaliden arındırılır ve son üründe arzu edilen jel gücünü sağlayacak pH değerine getirilmek üzere asit ile muamele edilir. Bu aşamadan sonra, A tipi jelatin üretiminde uygulanan işlem basamakları aynen uygulanmaktadır (Francis, 2000).



Şekil 1.1. A tipi ve B tipi jelatin eldesi, (Schrieber ve Gareis, 2007).

Alkali proses sırasında meydana gelen deaminasyon ile glutamin, glutamik asite; asparajin de aspartik asite dönüşür. Bu nedenle B tipi jelatinde aspartik asit ve glutamik asit oranı A tipi jelatindekinden daha yüksektir (Singh vd., 2002; Singh vd., 2012; Taheri vd., 2009; Zhou vd., 2006).

1.2.1 Jelatinin Kimyasal Kompozisyonu

1.2.1.1 Jelatinin Kimyasal Yapısı

Kollajenin denature edilmiş hali olan jelatinin amino asit kompozisyonu da doğal olarak kollajen ile örtüşmektedir. Ancak, üretim prosesleri dolayısıyla bazı değişiklikler meydana gelir ve jelatin doğal kollajenden çok daha farklı bir yapı kazanır. Jelatin eldesi sırasında gerçekleştirilen asit veya alkali muameleler ve ekstraksiyon aşamasında uygulanan ısı işlemler neticesinde kollajenin molekül içi ve moleküller arası H ve kovalent bağlar zayıflar veya yıkıma uğrar. Böylece kollajenin üçlü sarmal yapısı bozulur ve hatta yer yer amino asitler arasında kopmalar meydana gelir. Bu nedenle başlangıçta iplik şeklinde olan kollajen fiberleri yapısını kaybederek adeta bir yumak şeklini alır ve böylece çözünür özellikteki jelatinin ilk yapısı oluşur (Haug ve Draget, 2009; Gómez-Guillén vd., 2011; Djabourov vd., 1993). Bu değişimler neticesinde değişik kompozisyon ve moleküler ağırlıklara sahip α , β ve γ olarak adlandırılan farklı polipeptid zincirleri meydana gelir. İki α

1.2.2 Jelatinin Fiziksel Özellikleri

Jelatin, % 8-10 arasında nem içeren ve aşağı yukarı $1.3-1.4 \text{ g/cm}^3$ yoğunluğa sahip bir proteindir. Camsı yapıda, kırılğan gevrek formda, çok açık sarı renkli bu protein neredeyse tatsız ve kokusuzdur. Ekstraksiyon aşamasında maillard reaksiyonu gibi şekerlerle oluşan bazı reaksiyonlar jelatinin rengini ve jel özelliklerini değiştirebilir.

Jelatin granülleri soğuk suda çözünmez ancak şişer, ısıtıldığında ise bu şişen granüller bir çözelti oluşturacak şekilde suda çözünür. Sıcaklık, pH, kül içeriği, jelatinin üretim metodu, termal geçmiş ve konsantrasyon gibi pek çok faktör jelatin çözeltilerinin davranışlarını değiştirir. Jelatin gliserol ve propilen glikol gibi polihidrik alkollerin sulu çözeltileri ve asetik asit, trifloro etanol ve formamid gibi polar yapıya sahip organik çözücülerde çözünebilir. Ancak primer alkoller ve dimetilformamid gibi daha az polar organik çözücüler içinde çözünmez (Jones, 2004; Haug vd. 2004).

Genel olarak toz ya da yaprak formda üretilen jelatin hava geçirmez ortamda uzun süre özelliğini koruyabilir. Ancak % 60 nisbi rutubet (RH) değeri ve 45°C sıcaklığın üzerinde yavaş yavaş şişme yeteneğini kaybeder ve çözülür. Çözelti halindeki jelatin amfoterik özelliğe sahiptir. Ayrıca yüksek pH ve mikrobiyal proteolitik enzimlerin varlığı jelatin yapısında degradasyona yol açar. Jelatin konsantrasyonu % 0,5'in üzerinde olan jelatin çözeltilerinin sıcaklığı $35-40^\circ\text{C}$ 'ye düşürüldüğünde viskozitenin arttığı ve çözeltinin jel forma dönüştüğü görülür. Ortaya çıkan jelin sertliği sıcaklık, pH, jelatin konsantrasyonu ve ortamda başka bir jelleştirici ajanın varlığına göre değişir (Eysturskar, 2010; Anonim, 2012).

Yapılan araştırmalar jelatinin termal stabilitesi ile prolin ve hidroksiprolin amino asitlerinin miktarı arasında da bir ilişki olduğunu göstermiştir. Örneğin soğuk su balıklarından elde edilen jelatin daha düşük miktarda prolin ve hidroksiprolin içerdiği için ılık su balıkları ve memeli dokularından elde edilen jelatine göre daha az jelleşme özelliğine sahiptir (Haug vd., 2004; Haug ve Draget, 2009).

Jelatinin endüstriyel açıdan derecelendirilmesinde en önemli kriter ise jelatinin mekanik özelliklerinden biri olan jel gücü/bloom değeridir. Jelatin jelinin analitik ölçüsü olarak tanımlanan bloom değeri ifadesi ilk kez “bloom gelometer” olarak adlandırılan cihaz ile “Yapışkanlar, Jelatinler ve diğerleri için Makine Testi”ni geliştiren Amerikalı bilim adamı Oscar T. Bloom tarafından kullanılmıştır. Bloom değeri, standart sıcaklık ve basınç altında standart ve termostatlı bir jelin belirli bir uzunluğa erişmesi için yüzeyine basınç uygulamak üzere bir pistonun ihtiyaç duyduğu gram ağırlık olarak tanımlanır (Schrieber ve Gareis, 2007). Ticari jelatinler genelde 50-

300 bloom aralığındadır. Jelatinlerin bloom değerleri, yüksek bloom değeri (200-300 g), orta bloom değeri (100-200 g) ve düşük bloom değeri (50-100 g) olmak üzere üç grup altında toplanmıştır. Bloom değeri jelatin jelinin elastikiyeti ile alakalıdır. Yüksek bloom değerine sahip jelatinler genelde yüksek erime ve jelleşme sıcaklığına; düşük jelleşme süresine sahiptir, açık renklidir ve daha doğal tat ve aromaya sahiptirler. pH 4-10 aralığında balık ve memeli jelatinlerinin jel güçleri pH derecesinden oldukça bağımsızdır. Jelleşme bu pH aralığının dışında kayda değer bir şekilde engellenir. Bu durum muhtemelen zincirlerin tekrar birleşme noktalarının uygun pozisyona geçme yeteneğini inhibe eden elektrostatik güce neden olan net pozitif veya negatif yük taşımasından kaynaklanmadır (Haug ve Draget, 2009).

1.2.3 Jelatinin Endüstriyel Uygulamalarda Kullanımı

Hayvansal bir protein olan jelatin antik çağlardan beri kullanılmakta olup ilk olarak M.Ö. 6000’li yıllarda yapıştırıcı madde amaçlı kullanılmıştır. 16. yüzyılda İngiltere kralı VIII. Henry döneminde sarayda verilen ziyafet yemeklerinde kullanımı gıda kompozisyonunda kullanımına verilebilecek ilk örneklerdendir. Zamanla üretimi endüstriyel hale getirilmiş ve kullanımı hızla artmıştır. Günümüzde gıda, fotoğrafçılık, eczacılık, kozmetik ve tıp gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır (Schrieber ve Gareis, 2007).

Jelatin, temel fonksiyonları olan şişme ve çözünürlük dışında pek çok fonksiyonel özelliği sayesinde endüstriyel kullanımlar için vazgeçilmezdir (Schrieber ve Gareis, 2007; Gómez vd., 2011). Jelatinin teknolojik açıdan en önemli özellikleri iki grup altında incelenebilir, bunlar;

- i) jelleşme kabiliyeti ile ilgili olan özellikler, örneğin; jel oluşumu, tekstüre etme, kalınlaştırma ve su bağlama kapasitesi,
- ii) yüzey aktif davranışından kaynaklanan özellikler, örneğin; emülsiye etme, köpük oluşumu ve stabilizasyonu, adhezyon ve kohezyon kuvveti, koruyucu kollaid özellikleri ve film oluşturma kapasitesidir.

Bu fonksiyonel özelliklerin optimizasyonunda konsantrasyon, pH ve iyonik kuvvet etkilidir (Haug ve Draget, 2009; Shrieber ve Gareis, 2007; Gómez vd. 2011).

Jelatin eşsiz fonksiyonel özellikleri nedeniyle bir çok gıda maddesinin üretilmesinde vazgeçilmez bir katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Tablo 1.2.). Isıl tersinir jel oluşturma özelliği, köpük oluşturma ve stabilizasyonu, bağlama, emülsifikasyon ve kontrollü şeker kristalizasyonu gibi fonksiyonları sayesinde özellikle şekerleme endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Tablo 1.2. Gıda katkı maddesi olarak kullanılan jelatinin fonksiyonel özellikleri ve bu özelliklerinden yararlanmak üzere kullanıldığı gıda maddeleri (Kobayashi, 1996).

Fonksiyonel Özellikleri	Kullanım Alanı
Jelleşme ajanı	jöleli tatlılar, etler, şekerlemeler, et sosları
Yapı sağlayıcı (hipping agent)	lokum, koz helvası, kremalar, sufleler, fırın ürünleri vb
Bağlama Ajanı	rulo etler, konserve etler, şekerlemeler, peynirler, süt ürünleri vb
Koloidal yapıyı koruyucu	şekerlemeler, dondurmalar, buzlandırılan ürünler, donmuş tatlılar
Durultma ajanı	bira, şarap, meyve suları ve diğer
Film oluşturu	meyvelerin kaplanması, etler
Koyulaştırıcı	toz içecekler, et suyu, soslar, çorbalar, pudringler, jöleler, şuruplar, süt ürünleri vb
İşlem yardımcısı	tadlandırıcılar, yağ, vitamin ve renklendiricilerin mikroenkapsülasyonu
Emülgatör	çorbalar, soslar, tadlandırıcılar, et ürünleri, kremalar, şekerlemeler, süt ürünleri vb
Stabilizör	krem peynirler, çikolatalı sütler, yoğurt, buzlandırılan ürünler, kremalar, donmuş tatlılar vb
Yapışma ajanı	şekerlemeler, et ürünleri
Köpürmeyi sağlayıcı	şekerlemeler, kremalar, dondurmalar
Kristalizasyonu düzenleyici	dondurmalar, buzlu ürünler, donmuş tatlılar

Jelatinin sulu çözeltileri homojen bir görünüm sergilese de aslında heterojen yapıdadır. Yani jelatin koloidal çözeltiler oluşturan bir hidrokolloiddir. Gıda endüstrisinde farklı amaçlarla kullanılan bir çok hidrokolloid (arap gamı, karagenan, ksantan gam, keçi boynuzu gamı ve guar gam) vardır. Diğer hidrokolloidlerin hepsi karbonhidrat yapısında iken sadece jelatin protein yapıda bir hidrokolloiddir ve diğerlerine kıyasla bir çok üstün özelliğe sahip olması nedeniyle kullanımı daha yaygındır. Örneğin; jelatin düşük sıcaklıklarda kolayca eriyebilir ve jelleşme sıcaklığı ile erime sıcaklığı arasındaki fark azdır (Selestina Gorgieva ve Kokol, 2011; Schrieber ve Gareis, 2007; Djabourov vd., 1993). Jelatin hidrolizatları, gıda katkı maddesi olarak kullanımının yanı sıra bira, şarap ve meyve sularının berraklaştırılmasında da kullanılır (Schrieber ve Gareis, 2007; Haug ve Draget, 2009).

Tüm bu uygulamalar dışında jelatinin, tripsin, kimotripsin, pepsin, alkalaz, properaz E, pronaz, kollajenaz, bromelin ve papain gibi çeşitli enzimlerle proteolizi neticesinde bazı biyoaktif peptidler (BAP) de oluşmaktadır. Bu peptidler, insan beslenmesi ve eczacılık uygulamalarda jelatinin önemini daha da artırmaktadır. Ayrıca yapılan araştırmalar neticesinde, jelatinden elde edilen peptidlerin antioksidant ve antihipertansif (kan basıncını düşüren)/ACE (anjiotensin dönüştürücü enzim) inhibitör aktivite, antimikrobiyel özellik, mineral bağlama kapasitesi, lipid seviyesini

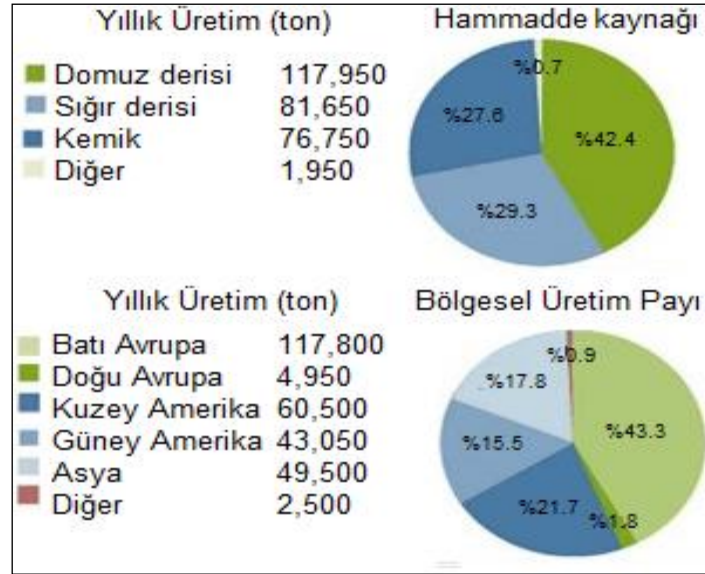
düşürücü etki ve bağışıklık sistemini düzenleyici aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Gómez vd., 2011).

1.2.4 Dünyada ve Türkiye’de Jelatin Üretimi

GME (Avrupa Jelatin Üreticileri; Gelatine Manufactures of Europe) (2008) verilerine göre dünyadaki jelatin üretimi yaklaşık 326000 tondur. Bunun %46'dan fazlası domuz derisinden, %29.4'ü sığır derisinden, %23'ü domuz ya da sığır kemiklerinden ve %1,5'i diğer kaynaklardan elde edilmektedir (Şekil 1.9). Domuz jelatininin asidik muamele ile dokudan ekstraksiyonu, sığır jelatininin alkali muamele ile ekstraksiyonundan daha kısa sürmektedir. Ayrıca domuz, sığıra oranla daha kısa sürede yetiştirmek ve dolayısıyla sığıra oranla daha bol miktarda üretilmektedir. Bu durum domuz jelatininin üretim maliyetini düşürmekte dolayısıyla dünya çapında jelatin hammaddesi olarak domuz dokularının kullanımını diğer kaynaklardan daha cazip kılmaktadır (Anon., 2008; Anon., 2012).

Dünyadaki jelatin üretiminin yaklaşık % 40'ı Batı Avrupa tarafından gerçekleştirilmektedir. Bunu %20'lik oranla Kuzey Amerika, %18 ile Asya ve %17'lik oranla Latin Amerika takip etmektedir (Şekil 1.3) (Anon., 2012). Avrupa’da hammaddenin %69'u domuz, %10'u sığır derisi ve %19'u ise çeşitli hayvan kemiklerinden temin edilmektedir.

2010 yılı verilerine göre ülkemizde yılda yaklaşık 5000 ton civarında jelatin kullanılmakta olup bunun neredeyse tamamı ithal edilmektedir. Jelatin ithalat yaptığımız başlıca ülkeler arasında Almanya, İtalya, Fransa, Kolombiya, Kore, Japonya, Kanada, ABD, Brezilya, Hindistan, Çin, Pakistan gibi pek çok ülke yer almaktadır. Ülkemizde yerli jelatin üretimi için kurulmuş tesisler mevcut ise de kapasiteleri sektör ihtiyacını karşılayabilecek düzeyde değildir (Anon., 2006; Anon., 2010).



Şekil 1.2. Jelatin Üretiminde Kullanılan Kaynaklar ve Dünyada Yıllık Jelatin Üretimi (Anon., 2010).

Jelatin kullanımının en yaygın olduğu sektör yiyecek-içecek sektörüdür ve 2013 yılı itibari ile dünyadaki jelatin kullanımının %28'inin bu sektör tarafından gerçekleştirildiği kaydedilmiştir. Yiyecek-içecek sektörünü ilaç ve farmasötik sanayi takip etmekte olup 2020 yılı itibari ile ilaç sanayinde kullanılan jelatin miktarının 124.5 kilo tona ulaşacağı tahmin edilmektedir (Anon., 2014).

1.2.5 Alternatif Jelatin Kaynakları

Günümüzde, sağlık açısından bir takım riskler ve inanç değerleri açısından bazı hassasiyetler nedeniyle jelatin üretiminde yaygın kullanılan domuz ve sığır dokularına alternatif olacak yeni kaynak arayışları söz konusu olmuştur. Zira jelatinin domuz derisinden elde ediliyor olması İslam ve Yahudilik inanışlarına göre kabul edilemez bir durumdur (Karim ve Bhat, 2008). Sığır dokusundan elde edilen jelatin ise ancak dini gerekliliklere uygun (helal şartlarda) üretilmesi koşulu ile tüketilebilir. Dolayısıyla bu gibi hassasiyetlere sahip tüketicilerin ihtiyaçlarını karşılamak adına alternatif jelatin kaynaklarının geliştirilmesi, her geçen gün önemi giderek artan bir durum haline gelmiştir (Karim ve Bhat, 2008; Cliché vd., 2003; Al-Saidi vd., 2012). Nitekim helal pazar dünyada en kârlı ve etkili piyasa arenalarından biri olarak dikkat çekmektedir. Küresel ticarete helal gıda pazarının 80 milyon dolarlık bir payı bulunmakta ve gıda-tarım ürünleri toplam ticaretin %12'sini oluşturmaktadır. 2025 yılı itibariyle dünyadaki müslüman popülasyonunun %30'lara ulaşacağı ve helal gıda pazarının dünya ticaretinin %20'sini oluşturacağı tahmin edilmektedir (Anon., 2007). Helal ürün talep eden tüketici popülasyonundaki artış ve bu tüketici grubunun gelir seviyesindeki

kayda değer yükselme bu oranın giderek artacağını göstermektedir. Ayrıca jelatin alternatifleri Hindu ve vejetaryan tüketici gruplarının da ilgisini çekmektedir. Dolayısıyla alternatif jelatin sektörünün gün geçtikçe önem kazanan ve büyüyen bir pazar olduğu açıkça ortadadır.

Dini hassasiyetlerin yanı sıra sağlık açısından da bazı riskler oluşturması nedeni ile hayvansal kaynaklı jelatin, tüketicilerde ciddi endişelere yol açmaktadır. Bir mezbaha yan ürünü olan jelatine hayvanlarda ve insanlarda görülen, prion hastalıkları da denilen “bulaşabilir süngerimsi ensefalopatiler” (Transmissible Spongiform Encephalopathy-TSE)’in ve virüslerin kontaminasyonu oldukça muhtemeldir. Bilindiği üzere ilk kez 1985 yılında İngiltere’de ortaya çıkan BSE (mad cow disease=delid dana hastalığı) ve 1995-1996 yıllarında yine İngilterede 10 kişinin ölümüne yol açan yeni varyant Creutzfeldt-Jacob Hastalığı (new variant Creutzfeldt-Jacob Disease - nvCJD) günümüzde halen ciddi endişeler uyandıran bulaşıcı hastalıklardır. Jelatin üretimi sırasında kontaminantların yok edebileceği düşünülse de bu konuda sınırlı sayıda çalışma mevcuttur (Karim ve Bhat, 2008; Grobbs vd., 2004).

Dolayısıyla gerek dini hassasiyetler gerekse jelatinin sağlık açısından güvenilirliği konusunda duyulan endişelerin ortadan kaldırılması adına alternatif jelatin kaynaklarına olan ilgi giderek artmaktadır.

Çeşitli su ürünleri ve kümes hayvanlarından elde edilen dokular ile jelatin üretilmesi, son yıllarda dikkat çeken alternatif üretimler arasındadır. Fletosu dışında balığın pulları, derisi kafası ve kılçıklarını içeren tüm yan ürünler jelatin üretiminde kullanılabilir. Kümes hayvanları içerisinde ise en çok tavuk ve ördek derisi, bacakları ve et kalıntıları hammadde olarak kullanılmıştır. Su ürünleri ve kümes hayvanlarına ait yan ürünlerin jelatin üretiminde alternatif bir hammadde olarak dikkat çekse de bu hammaddelerin sınırlı sayıda üretiliyor olması fiyat açısından memeli dokularından elde edilen jelatin ile rekabeti zorlaştırmaktadır (Karim ve Bhat, 2009). Ayrıca tavuk jelatininde Avian influenza virüsü ya da kuş gribi kontaminantların bulunma riski sağlık açısından endişe oluşturmaktadır (Anon., 2011).

Son yıllarda önemi giderek artan ve üzerinde pek çok araştırmaya yapılan rekombinant jelatin de önemli bir alternatif olarak dikkat çekmektedir. Yapılan çalışmalarda rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak insan ya da hayvana ait kollajen gen fragmanları transfekte memeli hücreleri, böcek hücreleri, mayalar (*Saccharomyces*, *Hansenula*, *Pichia* vb.), *E. coli*, transgenik tütün, mısır gibi farklı ekspresyon sistemlerinde ifade edilerek rekombinant jelatin elde edilebileceği görülmüştür.

Bu sayede hayvan ya da insan kollajen gen bölgeleri çeşitli teknolojik ihtiyaçların karşılanmasına yönelik arzulan özelliklerde ve spesifik molekül ağırlıklarına sahip yüksek kalitede, güvenli ve daha kısa prosedürlerle jelatin üretimi gerçekleştirilebileceği görülmüştür. Bir biyoteknolojik ürün olan rekombinant jelatin virus, prion gibi kantaminantları içermeyeceği için sağlık açısından da daha güvenli bulunmuştur (Olsen vd., 2003b). Ayrıca her ne kadar domuz ya da sığır deri dokusu tip I kollajence zengin ise de, geleneksel yöntemle kollajen eldesinde son ürün değişen miktarlarda tip III ve diğer kollajen tiplerini de içerir ve bunların birbirinden ayrılması yüksek maliyetli bir ticari proses gerektirir (Báez vd., 2005). Oysa rekombinant teknoloji ile istenilen özellikte ve saf halde kollajen/jelatin elde etmek mümkündür. Bu nedenle artık piyasada ticari rekombinant jelatin bulunmakta ve tıbbi uygulamalarda özellikle sert ve yumuşak doku tamirinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Pannone vd., 2007; Gorgieva ve Kokol 2011). Bugüne kadar yapılan çalışmalar daha çok medikal ve farmakolojik uygulamalarda hayvansal kaynaklı jelatin kullanımından kaynaklanabilecek alerjik reaksiyonlar veya virus yada prionlar gibi çeşitli kontaminantların bulaşmasını engellemek amacıyla yapılmış olup genelde mikrobiyal insan kollajeni veya jelatini üretmeye yöneliktir. Ayrıca bu çalışmalar sanayiye de kazandırılmış olup mikrobiyal insan kollajeni üretimi yapan firmalar mevcuttur. Örneğin ABD menşeli “Fibrogen” firması bu alanda faaliyet gösteren önde gelen firmalardandır.

Memeli ve böcek hücrelerinde ekspresyon seviyesinin düşük olması bu ekspresyon sistemlerinin ticari üretim amaçlı kullanımlarını sınırlamaktadır. Ayrıca memeli hücrelerinin hücre kültür maliyetleri *E. coli* ve maya hücrelerinin fermentasyon maliyetinden 5-10 kat daha yüksektir. Çalışmalar maya ekspresyon sistemlerinin kollajen üretimi için ideal olduğunu göstermiştir. Maya ekspresyon sistemleri içerisinde ise *P. pastoris* sistemlerinin mikrobiyal protein eldesinde kullanımının çok yönlü ve avantajlı sistemler olduğunu ortaya koyulmuştur (Datar vd., 1993; Báez vd., 2005).

1.3 Rekombinant Protein Üretimi

Genetik rekombinasyon olaylarının yapay olarak gerçekleştirilmesi temeline dayanan ve günümüzde hızla ilerlemekte olan rekombinant DNA teknolojisi, sayesinde çeşitli amaçlara uygun proteinlerin üretilmesi mümkündür. Bu teknolojiye izlenecek yol haritası kısaca; istenilen bir ürünün (veya proteinin) sentezini kodlayan genin ait olduğu hücre (prokaryotik veya ökaryotik) genomundan (veya kromozomundan) özel yöntemlerle (genellikle, restriksiyon endonukleaz enzimleri ile) kesilerek çıkarılması, bunun bir taşıyıcı (vektör) DNA'sı ile birleştirilerek konak (alıcı) bir hücreye (prokaryotik veya ökaryotik) transfer edilmesi, bu konak hücrede genin ekspresyonunun sağlanmasıdır. Bu işlem aşamaları aşağıda kısaca anlatılmıştır.

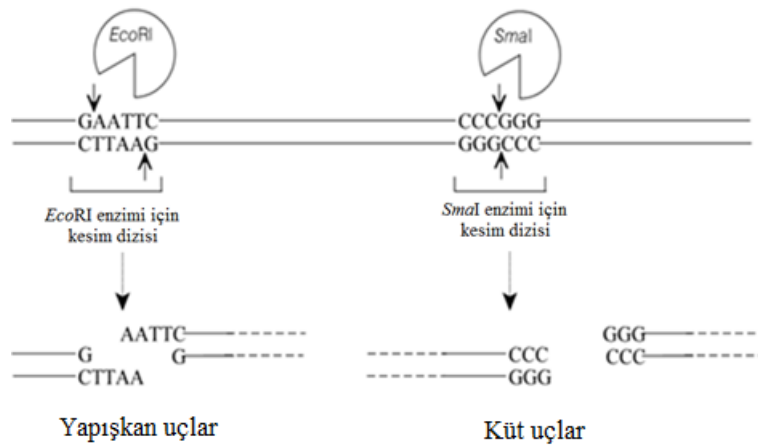
1.3.1 Hedeflenen Genin Tespit Edilmesi ve Saflaştırılması

Rekombinant DNA teknolojisinde istenilen bir ürünün sentezini kodlayan genin ait olduğu hücre genomundan (veya kromozomundan) farklı yöntemlerle elde edilmesi mümkündür.

A-Hedef genin bulunduğu kromozom uygun restriksiyon endonükleaz enzimleri vasıtasıyla kesilir; Restriksiyon endonükleaz (RE)'lar, kısa DNA dizilimlerini özgül olarak tanıyan ve bu dizilimler içindeki spesifik bölgelerden DNA'yı kesen enzimlerdir. Çift zincirli (ds) DNA zinciri üzerindeki 4, 6 ve 8 nükleotidden oluşan ve çoğunlukla genomda iki yönlü simetri oluşturan "polindromik" (tersten ve düzden okunuşu karşılıklı her iki iplikte de aynı olan) bölgelerdeki bazı dizilerini tanıyıp, keserler.

RE'lar prokaryotlarda bulunur, ökaryotlarda bulunmaz. Aslında bu enzimlerin esas biyolojik fonksiyonu, bakteriyel savunma mekanizmasında rol almaktır. Bakteriye giren yabancı DNA'ları da kesebildiklerinden, intraselüler bakteriyel patojenleri inaktive edebilmekte ve bakteriyi virüslerden ve yabancı DNA'lardan korumaktadırlar. RE'lar ilk olarak 1968'de Wilcox vd., tarafından *Haemmophilus influenza* bakterisinden izole edilmiş olup, ilk izole edilen enzim *Hind I*'dir. Mikroorganizmalar kendi RE'larının kendi DNA'larını kesmemesi için metilasyon gibi çeşitli modifikasyonlar kullanmaktadırlar.

RE'lar DNA'daki büyük oluklara tutunur ve bu bölgedeki tanıma dizisinden DNA çift zincirine bağlanır. DNA'nın kesilmesi, tanıma dizisindeki özgül tanıma bölgelerinden olur. Enzimin özelliğine göre ya yapışkan ya da küt uçlu DNA ürünleri oluşur (Şekil 1.4) (Birben, 2007).



Şekil 1.3. DNA zincirinin restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilmesi.
a: Yapışkan uçlu kesim, b: Küt uçlu kesim (Birben, 2007)

RE' lerin isimlendirmesinde ise önce enzimin elde edildiği bakteri cinsinin ilk harfi, daha sonra bakteri türünün ilk iki harfi ve son olarak da soya ait bir harf ile ilk izolasyondan başlayarak Romen rakamı ile enzimin izolasyon sırası belirtilir.

Örneğin *EcoRI* enzimi için;

E = cins (*Escherichia*)

co = tür (*coli*)

R = suş (RY 13)

I = Bu mikroorganizmadan izole edilen ilk RE olduğunu belirtir.

B- Hedef genin cDNA sentezi ile elde edilmesi: Bunun için hücrelerden klonlanması amaçlanan genin transkripsiyon ürününü de içeren RNA saflaştırılır. Daha sonra ters (revers) transkriptaz enzimiyle bu RNA moleküllerinin tamamlayıcısı olan DNA kopyaları çıkarılır. Meydana gelen RNA/DNA melezinin RNA kısmı enzimin ribonükleaz H aktivitesiyle hidroliz edilip yok edilir, daha sonra DNA polimeraz aktivitesiyle cDNA çift zincirli hale getirilir. Bu yöntem özellikle fazla miktarda DNA içeren karmaşık gen yapısı gösteren ve çoğu geninde intron bulunan ökaryotik canlılardan gen izolasyonu için kullanılmaktadır.

C- Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile hedef genin eldesi: 1986 yılında geliştirilen PCR yöntemi DNA moleküllerindeki istenilen gen bölgesinin in-vitro koşullarda çoğaltılmasına olanak verir. Genomdan seçilen küçük miktardaki bir gen bölgesinin bile milyonlarca kopyası bu yöntemle oluşturulabilmektedir (Mullis, 1990).

1.3.2 Saflaştırılan Hedef Genin Klonlama ve/veya Ekspresyon Vektörüne Bağlanması

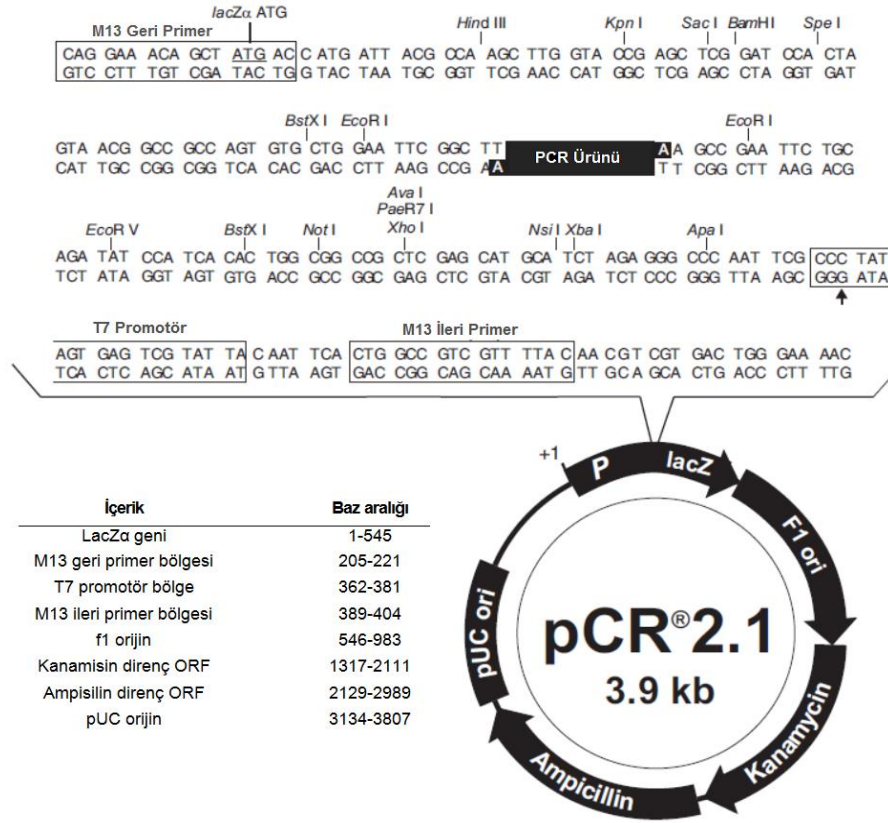
Rekombinant DNA teknolojisinde saflaştırılan hedef gen bölgesi uygun bir vektöre bağlanmak suretiyle konak hücreye aktarılır. Bunun için taşıyıcı vektör ve hedef DNA restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak ayrı ayrı kesilir ve ardından ligaz enzimi bulunan ortamda birbirleri ile birleşmeleri sağlanır.

Vektörler kolayca manipulasyona uğratılabilen, bağımsız replikasyon yeteneğine sahip kromozom dışı çift zincirli halkasal veya süper sarmallı DNA molekülleridir. rDNA teknolojisinde kullanılacak vektörün sahip olması gereken başlıca özellikler hedef genin vektöre sokulmasını sağlayacak uygun kesim bölgelerini içermesi, rekombinant molekülün tanımlanması ve kolayca geri kazanılması için uygun mekanizmaya sahip olmasıdır. rDNA teknolojisinde kullanılan vektörler klonlama ve ekspresyon vektörleri olarak gruplandırılabilir. Eğer DNA fragmanının çoğaltılması için

kullanılıyorsa klonlama vektörü, DNA fragmanının kodladığı proteinin ifade edilmesi için kullanılıyorsa ekspresyon vektörü olarak adlandırılırlar.

Klonlamada kullanılan vektörler, çoğu durumda halkasal yapıya sahip bir plazmid vektördür. Plazmidler, 4-400 kilobaz (kb) büyüklüğünde olabilirler ve genellikle 10kb'a kadar insert DNA taşıyabilirler. Plazmid vektörlerde, bir replikasyon orijini (ori), antibiyotik direnç genleri (marker gen), restriksiyon enzimlerinin tanıma dizilerini içeren bir polylinker bölge (birçok farklı restriksiyon enziminin kesim dizilerinin bir arada bulunduğu bölge) bulunmalıdır. Bakteriyel plazmidler dışında Ti plazmidler, bakteriyofajlar, kozmidler, maya yapay kromozomları (Yeast artificial chromosomes (YACs), bakteri yapay kromozomları (Bacterial artificial chromosomes (BACs)) da klonlama vektörü olarak kullanılırlar.

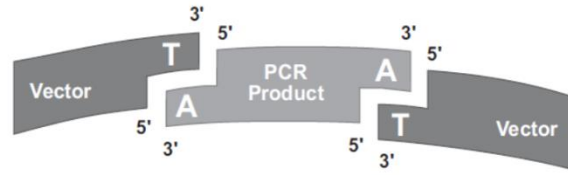
Bu araştırma kapsamında kullanılan pCR™2.1 klonlama vektörü (Şekil 1.5) in vitro koşullarda RNA transkripsiyonu ve dizilemesi için T7 promotör, insert genin kolayca kesip çıkarılması için *EcoR* I tanıma dizileri, sekans analizinde kullanılmak üzere M13 ileri ve geri primer dizileri içermektedir. Vektör üzerinde yer alan kanamisin direnç genleri ve ampisilin direnç genleri normal şartlarda antibiyotiklere karşı hassas olan konakçı hücrenin içerisine plazmid vektör transfer edildikten sonra söz konusu antibiyotiklere direnç kazanmasını sağlar. Böylece bu antibiyotikleri içeren seçici besiyeri ortamlarında transformantların tespit edilmesi mümkün olur. Ayrıca pCR 2.1 vektörü β -galaktozidaz enzimi sentezinden sorumlu bir *LacZ α* geni (laktoz operonu) içerir. β -galaktozidaz enzimi bir disakkarit olan laktozu, galaktoz ve glukozu katabolize eder.



Şekil 1.5. pCR®2.1 klonlama vektörü haritası (Invitrogen, 2004).

Transforme hücreler seçilirken kullanılan besiyerine antibiyotik dışında IPTG (isopropylthiogalactoside) ve X-gal (5-bromo-4-chloro-indolyl-β-D-galactopyranoside) eklenir. IPTG, β-galactosidase geni için bir uyarıcıdır yani eğer ortamda IPTG varsa enzim sentezlenir. X-gal ise laktoz analogu olarak kullanılan ve β-galaktozidaz enzimi tarafından parçalandığında mavi renk oluşumuna yol açan renksiz, kromojen bir maddedir. Transforme olmayan hücreler antibiyotik direnci içermediklerinden dolayı antibiyotikli besiyerinde hayatta kalamazlar. Plazmid içeren fakat ilgilenilen geni içermeyen plazmidi bulunduran hücreler antibiyotik direncine sahiptir. Bu yüzden antibiyotikli besiyerinde hayatta kalırlar. Fakat çoklu klonlama bölgelerindeki *LacZ* geninin bütünlüğü bozulmadığı için ortamda bulunan X-gal maddesini parçalar ve mavi renk açığa çıkar. Fakat ilgilenilen geni içeren plazmid DNA'daki *LacZ* gen bütünlüğü bozulduğu için X-gal maddesini parçalayacak enzim sentezlenmez ve böylelikle hücreler mavi renk oluşturmaz, beyaz renkli kalırlar. Ayrıca pCR™2.1 klonlama vektörü 3' deoksitimidin (T) rezidüsü bulunduran lineer bir klonlama vektörü olup hedef PCR ürünü vektöre bağlandıktan sonra plazmid halini almaktadır. Bilindiği gibi Taq polimerazın, PCR ürünlerinin 3' ucuna kalıptan bağımsız olarak tek bir deoksiadenozin (A) ekleme aktivitesi vardır. Böylece PCR ürünü DNA ligaz enzimi

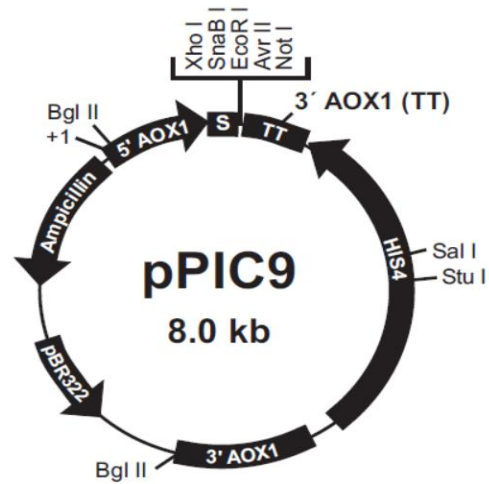
katalizörlüğünde bu deoksiadenozin (A) ucundan pCR2.1 lineer klonlama vektörünün 3' ucunda yer alan tek bir 3' deoksitimidin (T) rezidüsüne bağlanır (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. PCR ürününün pCR®2.1 klonlama vektörüne bağlanması (Invitrogen, 2004).

Klonlama vektörlerinin genel özelliklerine sahip olan ekspresyon vektörleri ise klonlama vektörlerinden farklı olarak bir promotör ve terminatör bölge ve bir poliadenilasyon bölgesi içermelidir. Protein ekspresyonu çalışmalarında hedef genin kopya sayısının artırılmasını sağlayan birçok ticari *Pichia* ekspresyon vektörü bulunmaktadır. Şekil 1.7’de görülen pPIC9 ekspresyon vektörü metanolla indüklenebilir ekspresyonlarda, ekspres edilen proteinin hücre dışına salgılanmasını sağlayan bir *P. pastoris* HIS4 vektörüdür.

İçerik	Baz aralığı
5' AOX1 promotör fragmanı	1-948
5' AOX1 primer bölgesi	855-875
α -faktör salgılama sinyali [S]	949-1215
α -faktör primer bölgesi	1152-1172
Çoklu klonlama bölgesi	1192-1241
3' AOX1 primer bölgesi	1327-1347
3' AOX1 transkripsiyon terminasyonu [TT]	1253-1586
HIS4 ORF	4514-1980
3' AOX1 fragmanı	4870-5626
pBR322 orijini	6708-6034
Ampisilin direnç geni	7713-6853



Şekil 1.74. pPIC9 ekspresyon vektörü haritası (Invitrogen, 2010).

Vektör üzerindeki çoklu klonlama bölgesi sayesinde hedef genin çoklu kopyaları tek bir vektörde klonlanabilir. Ayrıca bu vektör, yüksek seviyede indüklenebilir ekspresyon sağlayan AOX1

promotörü, pozitif transformantların kolayca seçilmesini sağlayan HIS4 geni ve Pichia konakçı genomuna hedef genin entegrasyonunu sağlayan 3'AOX1 gen bölgesi içermektedir.

1.3.3 Rekombinant Protein Üretiminde Kullanılan Konak Hücreler

Yabancı bir genin klonlanmak ya da ekspres edilmek üzere hücreye taşınması için birçok yol ve bu amaçla kullanılan bir çok konakçı hücre vardır. Rekombinant protein üretiminde yaygın olarak kullanılan protein ekspresyon sistemleri bakteriler, mayalar, baculovirus/böcekler ve memeli hücrelerinden oluşur. Ayrıca son yıllarda *Myceliophthora thermophila* gibi ticari olarak önemli filamentli küfler de ekspresyon sistemleri içerisinde yer almaktadır (Tablo 1.3).

Genel olarak 30kDa'dan küçük proteinler prokaryotik sistemlerde ekspres edilirken 100kDa'dan büyük proteinlerin ekspresyonu için ökaryotik sistemler tercih edilir. Bakteriyal sistemler, basit hücre yapısına sahip olmaları, kısa jenerasyon süreleri ve düşük maliyetlerle yüksek miktarda ürün eldesi sağladığı için tercih edilirken tek hücreli mayalar kolayca manipule edilebildikleri, büyük ve kompleks proteinlerin üretimine uygun oldukları ve kültür ortamında en az bakteriler kadar hızlı ve yoğun gelişebildikleri için avantajlı görülmektedirler.

Tablo 1.3. Rekombinant protein üretiminde yaygın kullanılan konakçı hücreler (Sodoyer, 2004)

Bakteriyal sistemler	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Corynebacterium</i>
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Ökaryotik sistemler	<i>Saccharomyces cerevisiae, Pichia pastoris</i>
	İpliksi mantarlar
	Bakulovirüs enfekte hücreler
	Böcek hücreleri
	Leishmania
	Bitki sistemleri
	Memeli sistemleri

Gram negatif bir bakteri olan *E. coli* rekombinant protein üretiminde en yaygın kullanılan bakteriyal sistemdir. *E. coli*'nin kültür ortamında hızlı gelişiyor olması, düşük maliyetli substratlarla kısa sürede yüksek hücre yoğunluklarına ulaşması, kolayca manipule edilebilmesi ve fizyoloji ve metabolizmasının çok iyi biliniyor olması rekombinant protein üretiminde tercih edilmesinin asıl sebepleridir. Ancak bakterilerin ilkel immün sistemleri nedeniyle heterolog proteinler proteolize uğratılır. Günümüzde bu problemin üstesinden gelmek için proteaz üretmeyen mutantlar oluşturulmuştur. Ancak buna rağmen bu mutantlarda stabil kalamayan ve proteolize uğrayan pek çok protein tespit edilmiştir. Ayrıca bazı proteinler *E. coli* için son derece toksiktir. Bu nedenle

çoğu durumda heterolog genlerin indüklenmesinden kısa süre sonra protein sentezi durur (Sodoyer, 2004; Terpe, 2006).

Günümüzde kullanılan *E. coli*'nin tüm yaygın laboratuvar suşları K-12 ve B olarak adlandırılan iki ayrı izolattan elde edilmiştir. 1920'de bir hastadan izole edilmiş olan K-12'den türetilen DH5α ve DH10b (TOP10 olarak da adlandırılır) alt suşları ise rekombinant DNA teknolojisiinde oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır.

1.3.3.1 Konak Hücre *Pichia pastoris* (*P. pastoris*)

Mayalar, endüstriyel rekombinant protein üretimi için oldukça yaygın kullanılan konakçı hücrelerdir. Bir ekspresyon sistemi olarak mayaların kullanımı 1980'li yıllara dayanmakta olup rekombinant protein üretiminde ilk kullanılan maya hücresi zayıf ekspresyon gücüne sahip *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) olmuştur. *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Kluyveromyces lactis*, *Arxula adeninivorans* ve *Yarrowia lipolytica* diğer dikkat çeken maya ekspresyon sistemleri arasında yer alsa da bunlar arasında birçok olumlu özelliği nedeniyle en çok kullanılan ekspresyon sistemi *P. pastoris* olmuştur (Çelik ve Çalık, 2012; Gellissen, 2005; Ausubel vd., 2001; Romanos vd., 1992).

P. pastoris tek hücreli bir mikroorganizmadır ve bu nedenle tıpkı bakteriler gibi kültür ortamında hızlı gelişir ve manipüle edilmesi pahalı değildir. Ancak bakterilerin aksine mayalar ökaryottur ve insan da dahil diğer gelişmiş ökaryotlar ile benzer hücre içi yapıya sahiptirler (Qu H., 2014). *P. pastoris* GRAS (Genellikle Güvenli Olarak Kabul Edilen; Generally Regarded as Safe) statüsünde olmamasına rağmen, *P. pastoris*'te üretilen bir enzim preparatının GRAS statüsünde olduğu FDA (Gıda ve İlaç İdaresi; Food and Drug Administration) tarafından kabul edilmiştir (Anon., 2006).

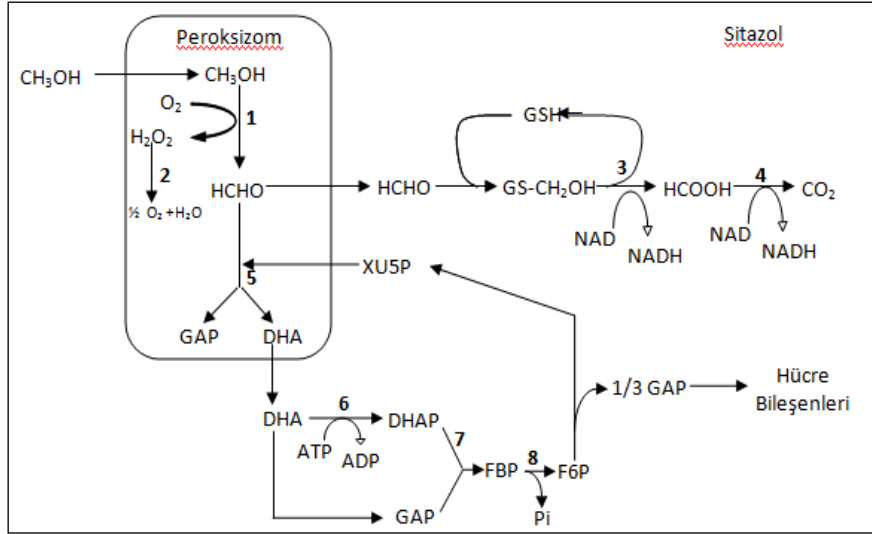
Bir ökaryot olarak *P. pastoris* protein prosleme, protein katlama ve posttranslasyonel modifikasyon gibi birçok avantaj sağlayan bir ökaryotik ekspresyon sistemidir. *P. pastoris*'i diğer ekspresyon sistemlerine göre daha başarılı kılan iki faktör vardır. Bu faktörlerden ilki, ekmek mayası *S.cerevisiae* ve diğer pekçok maya türünün aksine şekerleri veya diğer karbon kaynaklarını fermente etmek yerine daha çok oksijenli solunumu tercih etmesidir. Bunun yanı sıra kültür ortamında kayda değer miktarda toksik fermentasyon ürünü ve etanol oluşturmaması onun yüksek hücre yoğunluğuna ulaşmasını kolaylaştırır. Rekombinant protein prosesinin hacimsel verimliliği genel olarak gelişen biyokütle ile orantılıdır. Dolayısıyla *P. pastoris*'in çok yüksek hücre yoğunluğuna ulaşması rekombinant protein üretiminde tercih edilmesinin en önemli nedenidir. Diğer faktör ise yegane karbon ve enerji kaynağı olarak metanolü kullanabilme kabiliyetidir.

Metanolde gelişme bir grup özel metabolik enzimin indüksiyonunu gerektirmektedir. Bu enzimlerden ikisi alkol oksidaz (AOX) ve dihidroksi aseton sentazdır (DHAS)'dır (Jahid, 2003; Cregg, 2008; Qu, 2014). Heterolog genlerin ekspresyonu etkili ve sıkı bir şekilde düzenlenmiş AOX promotörü tarafından yürütülür. Bu promotör glukoz, gliserol ya da diğer karbon kaynaklarında gelişen hücrelerde yüksek seviyede baskılanır fakat metanol bulunan ortamda kuvvetlice indüklenir. Bu hassas regülasyon sayesinde *P. pastoris* hücreleri gliserol bulunan kültür ortamında geliştirilir ve ardından hücreler indüksiyonun gerçekleşeceği metanol içeren kültür ortamına alınır. Her ne kadar bazı rekombinant proteinler hücre içinde üretilse de *P. pastoris*'in ürettiği rekombinant proteini kültür ortamına salgılama kabiliyeti de vardır (Jahid, 2003; Krainer vd., 2012). Ayrıca lineer vektörler *P. pastoris* genomuna kolayca entegre edilebilir ve stabil transformantlar meydana getirilebilir.

1.3.3.1.1 *P. pastoris*'in Metanol Metabolizması

P. pastoris, metanolü metabolize edebilen dört farklı cins mayaya ait 12 maya türünden biridir. *Pichia* dışında bu özelliğe sahip diğer maya cinsleri *Candida*, *Hansenula* ve *Torulopsis*'tir. Metanol metabolizmasındaki ilk basamak metanolün alkol oksidaz (AOX) enzimi tarafından, moleküler oksijen kullanılarak metanolün formaldehite oksitlenmesi ve buarada hidrojen peroksitin açığa çıkmasıdır. Hidrojen peroksitin toksisitesini engellemek için metanol metabolizmasının bu aşaması peroksizom adı verilen, toksini hücreden atan özel bir organelde gerçekleşir. Alkol oksidazın oksijen afinitesi düşüktür ve *Pichia* fazla miktarda enzim üreterek bu durumu telafi eder (Şekil 1.8) (İnvitrogen, 2010; Çelebi, 2009; Balamurugan vd., 2007).

P. pastoris'te AOX'ı kodlayan AOX1 ve AOX2 olmak üzere iki farklı gen vardır. Fakat hücrede alkol oksidaz aktivitesinden daha çok AOX1 geni sorumludur. AOX1 geninin yüksek seviyede ekspresyonu metanol tarafından sıkıca düzenlenir ve indüklenir. Bu nedenle *P. pastoris* ekspresyon vektörleri metanol ile indüklenen alkol oksidaz (AOX) promotörü içerir (Çelebi, 2009; Balamurugan vd., 2007).



Şekil 1.5. *P. pastoris* metanol metabolizması: 1)Alkol oksidaz, 2) Katalaz, 3)Formaldehit dehidrogenaz, 4)Formatdehidrogenaz, 5) Dihidroksiasetonsentaz, 6) Dihidroksikinaz, 7) Fruktoz 1,6 bifosfat aklolaz, 8) Fruktoz 1,6 bifosfataz (Krainer, 2012).

1980'li yıllarda araştırmacılar tarafından *P. pastoris*'e ait alkol oksidaz enzimini kodlayan AOX1 geninin ve promotörünün saflaştırılmasının ardından *P. pastoris*'in genetik manipülasyonunu sağlayacak vektörler, suşlar ve metodlar geliştirilmiştir. AOX'un oksijen hassasiyeti çok düşüktür ve hücre çok miktarda enzim üreterek bunu telafi eder. Bu nedenle metanol ile regüle edilen kültür ortamlarında AOX1 geni yüksek seviyede ekspres edilir. Bu hassas regülasyonun en büyük avantajı, baskı altındaki kültür ortamlarında geliştirildiğinde, hücre için toksik etkiye sahip ürünleri kodlayan genlerin ekspresyonunun gerçekleşmediği suşların seçilmesini sağlamaktır (Jahid, 2003). Bu sayede birçok rekombinant protein AOX promotörü eşliğinde *P. pastoris* hücrelerinde litrede milligram seviyesinden gram seviyesine kadar değişik oranlarda başarıyla üretilebilir.

Kültür ortamında metanolün kullanımının uygun olmadığı durumlarda kullanılabilecek GAP (gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz) promotörü ve karbon kaynağı olarak metanol ya da nitrojen kaynağı olarak metilaminin kullanıldığı kültür ortamlarında indüklenen *FLD1* (formaldehid dehidrojenaz) promotörleri ise *P. pastoris*'in alternatif promotörleridir.

1.3.3.1.2 Heterolog Proteinlerin Salgılanması

P. pastoris tarafından heterolog proteinler hücre içi veya kültür ortamında ekspres edilebilir. *P. pastoris* endojen proteinleri çok düşük seviyede salgılayabildiği ve bulunduğu kültür ortamında ilave proteinler içermediği için salgılanmış bir heterolog protein kültür ortamındaki toplam proteinin büyük çoğunluğunu oluşturur. Bu nedenle salgılanan hücresel protein kitlesinden rekombinant proteinlerin ayrılması işlemi oldukça kolay olmaktadır (Çelebi, 2009; Balamurugan vd., 2007).

1.3.3.1.3 *P. pastoris*'in En Yaygın Kullanılan Ekspresyon Suşları

P. pastoris'in tüm ekspresyon suşları, NRRL-Y 11430 (Northern Regional Research Laboratories, Peoria, Ill.)'den türetilmiştir (Tablo 1.4). Metanolü kullanma yetenekleri farklı olan *P. pastoris* suşları bu özellikleri dikkate alındığında Mut⁺ (metanolü kullanan fenotip; AOX1 ve AOX2 sağlam), Mut^s (metanolü yavaş kullanan fenotip; AOX1 bozulmuş, AOX2 sağlam) ve Mut⁻ (metanolü kullanmayan fenotip; AOX1 ve AOX2 bozulmuş) olarak adlandırılmaktadır (Çelik ve Çalık, 2012). Bazı *P. pastoris* suşları ise oksotroftur ve biyosentetik yolda gerekli bazı enzimlerin sentezini engelleyen mutasyonlar taşır. Örneğin yaygın olarak kullanılan GS115 ve KM71 suşları, histidinol dehidrogenaz geninde, kendilerinin histidin sentezlemesini engelleyen bir mutasyona sahiptir (*his4*).

Tablo 1.5. Yaygın Kullanılan *P. pastoris* suşları (Jahid, 2003.)

Suş	Mutasyon taşıyan gen
Oksotrofik suşlar	
Y-11430	Mutasyonsuz (Wild Tip)
JC220	<i>ade1</i>
GS190	<i>arg4</i>
GS115	<i>his4</i>
JC254	<i>ura3</i>
JC227	<i>ade1 arg4</i>
JC304	<i>ade1 his4</i>
JC305	<i>ade1 ura3</i>
GS200	<i>arg4 his4</i>
JC306	<i>arg4 ura3</i>
JC307	<i>his4 ura3</i>
JC300	<i>ade1 arg4 his4</i>
JC301	<i>ade1 his4 ura3</i>
JC302	<i>ade1 arg4 ura3</i>
JC303	<i>arg4 his4 ura3</i>
JC308	<i>ade1 arg4 his4 ura3</i>
KM71	$\Delta aox1$: : <i>SARG4 his4 arg4</i>
MC100-3	$\Delta aox1$: : <i>SARG4</i> $\Delta aox2$: : <i>Phis4 his4 arg4</i>
Proteaz-eksik suşlar	
SMD1168	$\Delta pep4$: : <i>URA3 his4 ura3</i>
SMD 1165	<i>prb1 his4</i>
SMD 1163	<i>pep4 prb1 his4</i>

ade1: mutasyon içeren PR-aminoimidazolesuccinocarboxamide synthase sentezinden sorumlu ADE1 genini; ***arg4***: mutasyon içeren argininosuccinate lyase sentezinden sorumlu ARG4 genini; ***his4***: mutasyon içeren histidinol dehydrogenase enzimini kodlayan HIS4 genini; ***ura3***: mutasyon içeren orotidine-5' -phosphate decarboxylase enzimini kodlayan URA3 genini ifade eder.

Tüm ekspresyon plazmidleri konakçı hücrede mutasyonlu *his4* geninin tamamlayıcısı olan HIS4 genini taşır. Bu yüzden transformantlar yetersiz histidin bulunan ortamda gelişebilme kabiliyetine göre seçilir. Ayrıca KM71'in ata suşu arjinosuksinat liyaz geninde de (ARG4), arjinin yokluğunda suşun gelişebilmesini engelleyen bir mutasyona sahiptir (*arg4*). Doğal (Wildtype) ARG4 geni, AOX1 bütünlüğünü bozmak için (*aox::ARG4*) kullanılmış ve Mut^s, Arg⁺, His⁻ bir suş olan KM71 meydana getirilmiştir. KM71 suşları YPD gibi kompleks ortamlarda gelişir, histidin içermeyen minimal mediumda gelişemez (İnvitrogen, 2010; Fickers, 2014; Balamurugan vd., 2007).

Bazı proteinler proteazlar etkisi ile çok çabuk degradasyona uğradıkları için *P. pastoris* kültür ortamında stabil kalamazlar. Proteaz aktivitesi düşük bazı suşların (SMD1163, SMD1165, SMD1168) kültür ortamındaki proteinleri üzerindeki degradasyonu daha azdır. Bu nedenle proteazlara karşı hassas proteinlerin eldesinde bu suşların kullanımı elde edilecek ürün verimini artırmaktadır.

P. pastoris, mikrobiyal rekombinant protein üretimi için en yaygın kullanılan ve üzerinde en çok çalışma yapılan mikroorganizma olarak dikkat çekmektedir. Bu sistemi kullanarak hem yüksek kalitede rekombinant protein elde etmek ve hem de salgılanmış protein ürünlerinin kalitesini artırmak mümkündür. Endüstriyel alanda rekombinant protein üretimi için mükemmel özelliklere sahip bu konukçu organizmalarda bugüne kadar 550 'nin üzerinde rekombinant proteinin üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu konuda son yıllarda yapılan çalışmalar *P. pastoris* sistemlerinin rekombinant protein eldesinde kullanımının çok yönlü ve avantajlı sistemler olduğunu ortaya koymaktadır. Kullanılan suşlardaki gelişmeler sayesinde ticari anlamda geniş kullanılabilirliği olan peptid ve proteinlerin fazla miktarda üretilebilmesi mümkün olmaktadır (Daly ve Hearn, 2005; Jungo vd., 2007; Báez vd., 2005).

Farklı kollajen tiplerinin de *P. pastoris*'te üretimi için bir çok çalışma yapılmıştır. Vuorela vd. (1997), tarafından yapılan bir çalışmada *Pichia* sisteminin yüksek seviyede mikrobiyal kollajen eldesi için ideal olduğu vurgulanmıştır. Werten vd. (1999;2001), fare tip I ve tip II tabanlı mikrobiyal non-hidroksil jelatin eldesi için *P. pastoris* sisteminden faydalanmıştır. Çalışma sonucunda jelatin üretiminin 14,8 g/l' seviyesinin üzerine çıktığı tespit edilmiştir. Farklı çalışmalarda, kararlı yapıda hidroksillenmiş üçlü heliks yapıda kollajen üretebilmek için tip I, II ve III mikrobiyal insan kollajeninin (rhC) prolil 4-hidroksilaz (*P4H*) enzimi ile birlikte *P. pastoris*'de koekspresyonu sonucunda 1-1.5 g/l seviyesinde rhC elde edildiği belirtilmiştir (Francis, 2000;

Friess, 1998; Keizer-Gunnink, 2000). Nokelainen vd. (2001), tarafından yapılan başka bir çalışmada ise, ikisi tip I prokollajenin pro α 1 ve pro α 2 zincirlerini, diğer ikisi prolil 4-hidroksilazın (4-PH) iki alt birimini kodlayan dört insan geni *P. pastoris*'e aktarılmıştır. Bu dört genin her birinin sadece tekli kopyası ile 0.5 g/l ürün elde etmek mümkün olmuş bu sistemin optimize edilmesi ile mikrobiyal insan tip I kollajenin daha fazla miktarda elde edilebileceği belirtilmiştir. Bir başka çalışmada Abdemami vd. (2011), yüksek hidrofilik özellikte jelatinin üretildiği bir *Pichia* sisteminde tekli kopya transformantları ile sentezlenen ürün seviyesinin 3-6 g/l arasında olduğu tespit edilmiştir. Bodo vd. (2004), tarafından yapılan çalışmada fermentasyon kontrol parametreleri optimize edildiğinde ve gerekli genetik değişiklikler yapıldığında mikrobiyal prokollajen üretiminin *P. pastoris* sistemi kullanılarak 15mg/l seviyesinden 1,5g/l seviyesine çıkarılabileceği ortaya koyulmuştur. Olsen vd. (2003; 2005), *P. pastoris*'in kullanıldığı ekspresyon sisteminde elde edilen rekombinant ve tip I, tip II ve tip III kollajenlerin hücre içi birikim seviyelerinin sırası ile 1.1 g/l, 0.7 g/l ve 1.5 g/l olduğunu belirtmişlerdir. Duan vd. (2011), *P. pastoris* KM71 suşunda mikrobiyal insan jelatini üretimine yönelik gerçekleştirdikleri çalışmada metanol indüklemesi ile *P. pastoris* KM71'de mikrobiyal jelatinin başarıyla ekspres edildiğini göstermişlerdir.

Literatüre bakıldığında daha çok medikal uygulamalarda kullanılmak üzere hayvansal kaynaklı olmayan kollajen ve jelatin üretimi için çeşitli mikroorganizma türleri kullanılarak uygun ekspresyon vektörleri ile mikrobiyal insan kollajeni üretimi öne çıkmaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalar genelde medikal ve farmakolojik uygulamalarda hayvansal kaynaklı jelatin kullanımından kaynaklanabilecek alerjik reaksiyonlar veya virus yada prionlar gibi çeşitli kontaminantların bulaşmasını engellemek amacıyla yapılmış olup daha çok mikrobiyal insan kollajeni veya jelatini üretmeye yöneliktir. Literatür taraması neticesinde, yapılan çalışmalar arasında gıda endüstrisinde kullanılabilecek jelatin veya kollajen üretmeye yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır. Dolayısıyla bu araştırma sığira bir kollajen gen fragmanı *P. pastoris* maya hücrelerinde ekspres edilerek gıda sanayi için alternatif bir jelatin kaynağı oluşturmak üzere dizayn edilmiş olup aşağıdaki amaç ve hedeflere ulaşılmaya çalışılmıştır.

1. Rekombinant jelatin üretimi ile hayvansal kaynaklı jelatinin gıda sanayinde kullanımı ile ilgili yaşanan bazı tereddütlerin çözümüne katkı sağlanabilir. Nitekim, üretilmesi ön görülen mikrobiyal jelatin için kullanılan gen bölgesi sığır menşeli olduğu için tüketicin inanç hassasiyetleri nedeniyle jelatinin orijini ile ilgili soru işaretleri ortadan kalkacaktır.

2. Rekombinant jelatin kullanımı hayvansal kaynaklı jelatine göre sağlık açısından daha güvenlidir. Çünkü hayvansal dokulardan elde edilen jelatine hayvansal kaynaklı çeşitli bulaşanların kontaminasyon riski tüketici sağlığını tehdit etmekte iken mikrobiyal jelatin üretiminde böyle bir risk söz konusu değildir. Dolayısıyla hem sağlık açısından risk taşımayan hem de etik değerlerle çelişmeyen mikrobiyal jelatin sanayi ve tüketicilerin kullanımına sunulmuş olacaktır.
3. Geleneksel yöntemle jelatin üretimi sırasında kollajenin asit veya alkali yolla kısmi hidrolizi kontrol edilmesi güç bir proses aşaması olduğu için her bir üretimde üretilen jelatinin kollajen fragmanı kompozisyonu ve dolayısıyla amino asit kompozisyonu bir önceki üretimden farklı olmaktadır. Bu durum üretilen jelatinin de her seferinde farklı teknolojik özellikler göstermesine yol açmaktadır. Ancak rekombinant jelatin üretiminde önceden belirlenmiş uzunlukta ve baz dizisinde gen bölgeleri maya hücrelerinde ekspres edileceği için elde edilecek mikrobiyal jelatinin fragman uzunluğu ve amino asit kompozisyonu kontrol altında olacaktır. Bu sayede istenilen teknolojik özelliğe sahip standart kalitede jelatin kompozisyonları da rahatça oluşturulabilecektir.
4. Ayrıca mevcut geleneksel yöntemle üretilen jelatinin üretimi haftalar sürerken rekombinant jelatin üretim süresinin çok daha kısa olabileceği ve bu durumun maliyeti düşürücü bir etki oluşturabileceği düşünülmüştür.

2. BÖLÜM

MATERYAL ve METOD

Bu araştırma kapsamında gıda sanayinde katkı maddesi olarak kullanılabilecek jelatin üretimi için sığira ait bir kollajen gen fragmanı öncelikle *E.coli* DH5 α hücrelerinde klonlanmış ve daha sonra bu gen fragmanı *P. pastoris* KM71 maya hücrelerinde transkripsiyonu gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan materyaller ve uygulanan metodlar aşağıda ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır.

2.1 Materyal

2.1.1 Kimyasal Maddeler, Tampon ve Stok Çözeltiler

Bu çalışmada kullanılan tüm kimyasal maddeler moleküler biyoloji çalışmalarına uygun teknik özelliklerde seçilmiştir. Kullanılan tüm tampon ve stok solüsyonların içeriği ve hazırlanışına ait bilgilere Ek 1’de ayrıntılı bir şekilde yer verilmiştir.

2.1.2 Mikroorganizma Suşları, Klonlama ve Ekspresyon Vektörleri

Bu çalışmada gen bölgelerini klonlanması için rutin klonlama prosedürleri için laboratuvar ortamında geliştirilmiş ve yüksek transformasyon etkinliğine sahip *Escherichia coli* DH5- α suşu (Invitrogen) seçilmiştir. Ekspresyon için ise özellikle endüstriyel alanda rekombinant protein üretimi için mükemmel özelliklere sahip konukçu bir mikroorganizma olan *Pichia pastoris*’e ait KM71 (Invitrogen) suşu kullanılmıştır.

Klonlama vektörü olarak; PCR ürünlerinin direkt bağlanması için 3'-T çıkıntısı, in vitro koşullarda RNA transkripsiyonu ve dizilemesi için T7 promotör, insert genin kolayca kesip çıkarılması için çoklu kesim bölgeleri, sekans için kullanılmak üzere M13 ileri ve geri primer dizileri içeren pCRTM2.1(Invitrogen) kullanılmıştır.

Ekspresyon vektörü olarak ise; bir HIS4 seçilebilir marker, bir alkol oksidaz 1 (AOX1) promotör/terminatör kaset ve *Saccharomyces cerevisiae* α -faktör prepro salgı sinyali içeren pPIC9 (İnvitrogen) kullanılmıştır.

2.1.3 *E. coli* ve *P. pastoris* Kültür Ortamları

E. coli DH5- α suşunun geliştirilmesi için esas olarak bakteri gelişiminde kullanılan, besin öğeleri açısından oldukça zengin LB (Lysogeny broth, Sigma Aldrich) besiyerlerinden faydalanılmıştır. Klonlamadan sonra *E. coli* DH5- α hücreleri S.O.C medium (Super Optimal broth with Catabolite repression, İnvitrogen)'da geliştirilmiş ve pozitif *E. coli* transformantlarının seçilmesi için Ampicillin (İnvitrogen) içeren ve yüzeyine, X-GAL (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside, İnvitrogen) ve IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) solüsyonu yayılmış besiyerleri kullanılmıştır. *P. pastoris* hücrelerinin geliştirilmesi için ise, mayaların gelişimi için ideal bir besiyeri olan YPD (YEPD, yeast extract peptone dextrose) kullanılmıştır. *P. pastoris* transformantları histidin içermeyen MD (Minimal Dextrose) besiyeri ortamında seçilmiştir. Tüm besiyerlerinin hazırlanışı EK-2'de ayrıntılı bir şekilde yer almaktadır.

2.2 Metod

2.2.1 Primerlerin Belirlenmesi

Bos taurus collagen, type I, alpha 1 (COL1A1), mRNA dizisi üzerinde (Accession number: NM_001034039) yer alan 2284-3210 bazları arasındaki yaklaşık 800bp'lik ilk bölgenin amplifikasyonu için Bell vd. (2007), tarafından dizayn edilmiş ileri ve geri primerler modifiye edilerek kullanılmıştır. Primerlerin 5' uçlarına sırasıyla *EcoR* I ve *Not* I restriksiyon endonükleaz kesim bölgeleri eklenmiştir. Söz konusu primer seti ile çoğaltılan hedef gen bölgesi "COL-1" olarak kodlanmıştır. Ekspresyon vektörü üzerindeki AOX bölgesinin amplifikasyonu için ise ekspresyon kiti (Invitrogen) içerisinde yer alan 5' AOX1 ve 3' AOX1 primerleri kullanılmıştır (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Çalışmada kullanılan primerler

Primer adı	RE kesim bölgesi	Baz Dizisi (5'-3')	Fragman Kodu	Fragman Uzunluğu	Referans
COL-1/F	EcoRI 5'...G▼AATTC...3' 3'...CTTAAG▲G...5'	CGGAATTCCTGGCCTTC AAGGAATGCC	COL-1	800 bp	Bell vd., 2007
COL-1/R		GATGCGGCCGCGCGCCA GGAGAACCATCTCG			
5' AOX1	NotI 5'...GC▼GGCCGC...3' 3'...CGCCGG▲CG...5'	GACTGGTTCCAATTGAC AAGC	--	492 bp	İnvitrogen, 2010
3' AOX1		GCAAATGGCATTCTGAC ATCC			

2.2.2 Sığır Dokusundan RNA Ekstraksiyonu ve RT-PCR

RNA ekstraksiyonu için öncelikle üzerindeki kıllar uzaklaştırılan sığır deri dokusundan 100 mg örnek alınmıştır. Daha sonra bu dokudan ticari RNA ekstraksiyon kiti (RNeasy Mini Kit, Qiagen) ile üretici firmanın yönergelerinde bazı değişiklikler yapılarak aşağıdaki şekilde RNA ekstraksiyonu yapılmıştır.

- 100 mg sığır deri dokusu 450 µl RLT buffer içeren steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılmış ve kuvvetlice vortekslenerek homojen bir karışım elde edilmiştir.
- Tüp içerikleri kit içerisinde yer alan lila renkli spin kolonlara aktarılmıştır. Spin kolon 2ml'lik toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
- Maksimum hızda 2 dk santrifüj uygulanmıştır.
- Altta kalan süpernatant temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır. Üzerine tüp içeriğinin yarısı kadar etanol (%96-100) eklenmiştir. Pipetaj yapılarak karıştırılmıştır.
- Tüp içeriği kit içerisinde yer alan pembe renkli spin kolonlara aktarılmıştır. Spin kolon 2ml'lik toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
- 8000xg'de 1 dk santrifüj uygulanmıştır. Alt faz uzaklaştırılmış, toplama tüpü yenisi ile değiştirilmiştir.
- Spin kolona 700 µl RW1 buffer eklenmiştir. Tekrar 8000xg'de 1 dk santrifüj uygulanmıştır. Alt faz uzaklaştırılmış, spin kolon temiz bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
- Spin kolona 500 µl RPE buffer eklenmiş ve 8000xg'de 1 dk santrifüj uygulanmıştır. Yine altta kalan süpernatant uzaklaştırılmıştır. Bu işlem basamağı iki kez tekrarlanmıştır.
- Spin kolon temiz bir toplama tüpüne yerleştirilip maksimum hızda 1 dk santrifüj uygulanarak kolonun kuruması sağlanmıştır.
- Kolon membranı üzerine 25 µl RNAase-free su eklenip 1 dk bekletilmiştir. Spin kolon temiz bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilip 8000xg'de 1 dk santrifüj uygulanarak membrandaki RNA'nın tüpte toplanması sağlanmıştır.

- RNA konsantrasyonları mikro hacimli spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür.
- RNA'lar kullanılıncaya kadar -20° C'de depolanmıştır.

Hedef bölgelerin amplifikasyonu için ekstrakte edilen RNA'lar ile ticari RT-PCR kiti (QuantiTect SYBR® Green RT-PCR Kit, Qiagen) kullanılarak Tablo 2.2.'de belirtilen şekilde reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Reaksiyon termal döngü cihazı (Roche LightCycler Nano, Almanya) aracılığı ile Tablo 2.2.'deki sıcaklık programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 2.2. RT-PCR karışımı ve reaksiyon koşulları

RT-PCR Karışımı		RT-PCR Koşulları			
Bileşen	Hacim (µL)	Aşama	Süre (saniye)	Sıcaklık (°C)	Döngü sayısı
2x QuantiFast SYBR Green RT-PCR Master Mix	10	Ters Transkripsiyon	1500	50	1
İleri Primer (100pMol)*	0.15	İlk Aktivasyon	900	95	1
Geri Primer (100pMol)**	0.15	Denatürasyon	5	95	
QuantiFast RT Mix	0.20	Bağlanma	30	65	35
RNase-free water	7.50	Uzama	40	72	
Kalıp RNA (100 ng)	2				
Toplam Reaksiyon Hacmi	20				

*: COL-1/F, **: COL-1/R

2.2.3 PCR Ürünlerinin Klonlama Vektörüne Bağlanması (Ligasyon)

Klonlama işlemleri ticari klonlama kiti (TA Cloning Kit, İnvitrogen) kullanılarak yürütülmüştür. Sığır deri dokusundan elde edilen RNA'ların kalıp olarak kullanıldığı RT-PCR ürünleri pCR™2.1 vektörüne bağlanmadan önce aşağıdaki formül kullanılarak ihtiyaç duyulacak PCR ürünü miktarı belirlenmiştir.

$$X = \frac{(Y) \cdot (50 \text{ ng pCR}^{\text{TM}}2.1 \text{ vektör})}{\text{Vektörün uzunluğu} (= \sim 3900 \text{ bç})}$$

X: Ligasyon reaksiyonunda kullanılacak PCR ürünü miktarı (ng);

Y: Ligasyon reaksiyonunda kullanılacak PCR ürününün uzunluğu (bç)

Kullanılacak PCR ürünü miktarı belirlendikten sonra Tablo 2.3.'te içeriği belirtilen ligasyon reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Bu karışım T4 DNA Ligase enziminin optimum çalışma sıcaklığı olan 16°C'de 8 saat bekletilmiştir. Böylece PCR ürünleri klonlama vektörüne bağlanarak pCOL-1 (COL-1 gen bölgesini içeren plazmid) plazmidleri oluşturulmuştur. Daha sonra T4 DNA Ligase enziminin inaktivasyonu için 65°C'de 15 dk ısı işlem uygulanmıştır.

Tablo 2.3. Ligasyon Reaksiyon Karışımı

Bileşen	Miktarı (µl)
PCR	X ng
10X Ligasyon Buffer	1
pCR™2.1 vektör	2
T ₄ DNA Ligase	1
Steril ddH ₂ O	10 µl'ye tamamlanır.
Toplam hacim	10

2.2.4 Kompetent *E. coli* DH5α Hücrelerinin Hazırlanması

pCOL-1 DNA'larının klonlanacağı kompetent *E. coli* DH5-α hücrelerinin hazırlanması için öncelikle LB agar besiyerine ekim yapılmış ve 37±1°C'deki inkübatörde (Memmert IN 110, Almanya) 24 saat inkübasyon uygulanarak taze kültür elde edilmiştir. Daha sonra aşağıdaki işlem basamakları takip edilerek kompetent *E. coli* DH5-α hücreleri oluşturulmuştur.

- LB agarda gelişen tek kolonilerden seçilip 4 ml steril LB sıvı besiyeri içeren 15mL'lik deney tüpüne inoküle edilmiştir. Daha sonra 37±1°C'ye ayarlı çalkalayıcılı inkübatörde (IKA KS 4000i, Almanya) 18 saat inkübasyon uygulanmıştır.
- İnkübasyon sonunda kültür ortamının OD₆₀₀ değerinin 0.45-0.55 arasına ulaşmış ulaşılmadığı kontrol edilmiş, gerektiğinde inkübasyon süresi uzatılmıştır.
 - o Absorbans ölçümü için kullanılacak spektrofotometre (Shimadzu UV-1700, Japonya) 1:9 oranında steril LB sıvı besiyeri:distile su karışımı ile hazırlanan tanık çözelti ile sıfırlanmıştır.
 - o Ardından kültür ortamı vortekslenip 1:9 oranındaki kültür:distile su karışımı kuvars spektrofotometre küvetine aktararak 600 nm dalga boyunda absorbansı ölçülmüştür.
- OD₆₀₀ değeri 0.45-0.55 aralığına ulaşan kültürden, 3/(10xOD₆₀₀ değeri) formülü ile hesap edilen mL hacim kadar alınıp, 30mL LB sıvı besiyeri içeren 50mL'lik falkon tüpe inoküle edilmiştir.
- Falkon tüp, 37±1°C'deki inkübatörde 1-2 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- İlk bir saatlik inkübasyondan sonra OD₆₀₀ değerinin 0.045-0.055 aralığına ulaştığı görülünceye kadar 15 dakikada bir absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir.

- İstenen absorbans değerine ulaşıldığında inkübasyon durdurulmuş ve kültür, 4°C’de 4400 devir/dakika hıza ayarlı santrifüjde (Hettich Mikro 200R, Almanya) 10 dakika santrifüjlenmiştir.
- Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra üzerine 10 mL soğuk 100 mM kalsiyum klorür (CaCl₂) (Merck) ilave edilip tüpe hafif vurulmak suretiyle hücre çökeltisi çözüldürülmüş ve kuru buz üzerinde 35-45 dakika bekletilmiştir.
- Süre sonunda kültür, tekrar 4°C’de 4400 devir/dakika hızda 10 dakika santrifüjlenmiştir.
- Santrifüj sonrası oluşan süpernatant yine dikkatlice uzaklaştırılmıştır.

Hücre çökeltisi üzerine 2 mL soğuk 100 mM CaCl₂ eklenmiş ve tüpe hafif vurularak hücre çökeltisinin çözünmesi sağlanmıştır. Böylece hazır hale getirilen kompetent hücrelerin aynı gün içerisinde transformasyonda kullanılmasına dikkat edilmiştir.

2.2.5 Ligasyon Ürünlerinin Kompetent *E. coli* DH5α Hücrelerine Klonlanması

Hazırlanan kompetent *E. coli* DH5-α hücrelerinden 200 µL alınmış, 2 mL’lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Üzerine, daha önce hazırlanan ligasyon reaksiyonu karışımından 7 µL ilave edilmiş ve hafif pipetaj yapılarak karıştırılmıştır. Bu karışım buz üzerinde 30 dakika bekletilmiş ardından hemen 43°C’ye ayarlanmış ısıtıcı blok üzerine alınarak 3 dakika ısı şok yapılmıştır. Daha sonra, tüpe 250 µL S.O.C. Medium (Invitrogen) ilave edilerek 37°C’ye ayarlı inkübatörde 1 saat inkübasyon uygulanmıştır. Bu arada, 100 µg/mL oranında ampicilin (Gibco-Life Technologies) içeren LB agar yüzeyine, önce 40 µL 40 mg/mL X-GAL (Sigma-Aldrich) solüsyonu, sonra 40 µL 100 mM IPTG (Sigma-Aldrich) solüsyonu yayılarak klonlama besiyerleri hazırlanmıştır. Daha sonra S.O.C. Medium içinde 1 saatlik inkübasyonunu tamamlamış transformasyon karışımından 100 µL alınıp hazırlanan bu LB agar petrilere yayma yöntemi ile ekim yapılmıştır. 37±1°C’deki inkübatörde 18 saat inkübasyon sonrası, petrilere beyaz ve mavi koloni oluşumu takip edilmiştir. Beyaz koloniler, hedef gen bölgesini içeren *E. coli* DH5 transformantları olarak kabul edilmiştir. Bu kolonilerden, klonlama besiyerlerine ekim yapılmış ve gelişen kolonilerden plazmid DNA izole edilmiştir.

2.2.6 pPIC9 Ekspresyon Vektörünün Kompetent *E. coli* DH5α Hücrelerine Klonlanması

Yukarıda açıklanan klonlama prosedürü uygulanarak pPIC9 ekspresyon vektörü de *E. coli* DH5-α hücrelerine klonlanmıştır. Bu amaçla ligasyon karışımı yerine 7 µL ekspresyon vektörü kullanılmıştır. Transformasyondan sonra *E. coli* DH5-α hücreleri ampicilin içeren LB agar ortamında seçilmiştir. Böylece pPIC9 vektörünün *E. coli* DH5-α’de stoklanması ve ihtiyaç duyulduğunda bu hücrelerden plazmid DNA izolasyonu yapılarak kullanılması sağlanmıştır.

2.2.7 *E. coli* DH5a Transformantlarının Kontrolü

2.2.7.1 *E. coli* DH5a Hücrelerinden Plazmid DNA İzolasyonu

Klonlama besiyerinde geliştirilmiş *E. coli* DH5-α transformantlarından plazmid DNA ekstraksiyonu Birnboim ve Doly (1979)'in metodunda bazı modifikasyonlar yapılarak aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir;

- Petride gelişen koloniler steril öze yardımı ile toplanmış ve 300µl GTE buffer içeren mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Kuvvetlice vorteks uygulanarak hücre kitlesinin buffer içerisinde çözünmesi sağlanmıştır.
- Tüplere 600µl SDS/NaOH eklenip, 5 kez ters-yüz edilmek sureti ile karıştırılmıştır.
- Tüpler 5dk buz üzerinde bekletilmiştir.
- 450µl soğuk KOAc/Asetik asit çözeltisi eklendikten sonra tüpler yine 5 kez ters-yüz edilmek sureti ile karıştırılmıştır.
- Tekrar 5dk buzda bekletilmiştir.
- 20000xg'de 5 dk santrifüj uygulandıktan sonra süpernatant temiz mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır.
- Tüplere eşit hacimde isopropanol eklendikten sonra 30dk -20°C'de bekletilmiştir.
- 20000xg'de 5 dk santrifüj uygulandıktan sonra supernatant uzaklaştırılmıştır.
- Tüplere 300µl %100'lük etanol eklenmiş ve çok hafif vorteks uygulanmıştır.
- Maksimum devirde 2-3dk santrifüj uygulandıktan sonra supernatant uzaklaştırılmıştır.
- Tüpler oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.
- Kuruma işlemi tamamlandıktan sonra tüplere 20 µl TE buffer eklenerek plazmid DNA'lar çözündürülmüştür.
- DNA konsantrasyonları Mikro Hacimli Spektrofotometre (Nanodrop) kullanılarak ölçülmüştür.
- DNA'lar kullanılıncaya kadar -20° C'de depolanmıştır.

2.2.7.2 Plazmid DNA'nın PCR Analizi

Elde edilen plazmid DNA'lar kalıp olarak kullanılarak “COL-1/F&COL-1/R primer seti ile ayrı ayrı PCR yapılmıştır. *E. coli*'den izole edilen pPIC9 vektörü ise 5'AOX/3'AOX primer seti primerleri kullanılarak analiz edilmiştir. PCR karışımı ve reaksiyon koşulları Tablo 2.4.'te verilmiştir.

Tablo 2.4. PCR karışımı ve reaksiyon koşulları

PCR Karışımı		PCR Koşulları			
Bileşen	Hacim (µL)	Aşama	Süre (saniye)	Sıcaklık (°C)	Döngü sayısı
SYBR Green PCR Master Mix	10	İlk Aktivasyon	300	95	1
İleri Primer (100pMol)*	0.15	Denatürasyon	30	95	
Geri Primer (100pMol)**	0.15	Bağlanma	25	55/65***	30
RNase-free water	7.50	Uzama	40	72	
Kalıp DNA (100 ng)	2	Son Uzama	300	72	1
Toplam Reaksiyon Hacmi	20				

*: COL-1/F veya 5'AOX ; **: COL-1/R veya 3'AOX; ***:5'AOX/3'AOX primer seti için 55°C, COL-1/F&COL-1/R primer seti için 65°C,

2.2.7.3 PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi

Araştırma boyunca PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi yapılarak kontrolü edilmiştir. %1.5 (w/v) konsantrasyonda jel hazırlamak için 1,5g agaroz 100ml 1XTAE buffer içerisinde çözülmüş ve karışım mikrodalga yardımıyla kaynatılmıştır. Çözeltilinin yaklaşık 55°C'ye soğuması beklendikten sonra 5 µl of ethidium bromide (Sigma-10mg/ml) ilave edilmiştir. Hazırlanan jel uygun hacimde bir kalıba dökülüp uygun tarak takıldıktan sonra donması beklenmiştir. PCR ürünleri 1 µl 6X jel yükleme boyası ile boyandıktan sonra 0,1-10kb aralıklı DNA marker eşliğinde 1X TBE buffer ile doldurulan elektrophorez tankına yerleştirilen agaroz jelle yüklenmiştir. 100 V'da 45-75 dk uygulanan elektrophorez sonrasında görüntüleme cihazına alınan agaroz jeldeki DNA bantları UV ışık altında incelenmiştir.

2.2.7.4 PCR Ürünlerinin Dizi Analizi

Agaroz jel elektrofrezinde pozitif sonuç veren PCR ürünlerinin dizi analizi için MedSanTek (İstanbul) firmasından hizmet alımı yapılmıştır. Analiz sonuçları gen bankası veri tabanında taranıp *Bos taurus* collagen, type I, alpha 1 (COL1A1), mRNA dizisi ile eşleşip eşleşmediği kontrol edilmiştir. Sekans analizi ile de doğruluğu teyit edilen pozitif *E. coli* DH5-α transformantları %20 gliserol içeren LB sıvı besiyeri ortamına alınıp -80°C'lik derin dondurucuda depolanmıştır.

2.2.8 Plazmid DNA'ların Ekspresyon Vektörüne Bağlanması (Ligasyon)

Ligasyon işlemine geçmeden önce pCOL-1 plazmid DNA'ları *EcoR* I ve *Not* I endonükleazlar ile kesilip insert DNA'lar oluşturulmuştur. Aynı zamanda pPIC9 da kendi AOX bölgesi üzerinde yer alan *EcoR* I ve *Not* I endonükleaz kesim bölgelerinden kesilerek ligasyona hazır hale getirilmiştir. Kesim için reaksiyon karışımı aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır (Tablo 2.5).

Tablo 2.5. *EcoR* I ve *Not* I restriksiyon Enzimleri Kesim Reaksiyon Karışımı

Bileşen	Miktarı
10X buffer H	2 µl
<i>EcoR</i> I	1 µl
<i>Not</i> I	1 µl
Substrat DNA*	≤1µg
Steril ddH ₂ O	20µl'ye tamamlanır.
Toplam Hacim	20 µl

*: *pCOL-1* veya *pPIC9*.

Hazırlanan reaksiyon karışımı 37°C'de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra enzimlerin inaktivasyonu için 65°C'de 15dk ısı işlem uygulanmıştır. Plazmid DNA'larına ait kesim miksleri jel yükleme boyası (10X Loading buffer, Invitrogen) ile boyanıp %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Bantlar jelden kesilip saflaştırma kiti (NucleoSpin ® Gel and PCR Clean-up, Macherey Nagel) ile üretici firmanın önerdiği işlem basamakları takip edilerek saflaştırılmıştır. pPIC9 ekspresyon vektörüne ait kesim miksi ise jelde yürütülmeye gerek duyulmadan direkt uygun saflaştırma kiti ile (PureLink® PCR Purification Kit, Invitrogen) saflaştırılmıştır. Elde edilen saflaştırılmış insert DNA ve pPIC9 vektör kullanılarak insert:vektör molar oranı 3:1 olacak şekilde ligasyon reaksiyon karışımı hazırlanmıştır (Tablo 2.6).

Tablo 2.6. Ligasyon Reaksiyonu Karışımı

Bileşen	Miktarı
5X Ligase Reaksiyon Miksi	4 µl
Vektör ¹	3-30 fmol
Insert ²	9-90 fmol
Toplam DNA	0.01-0.1 µg
T4 DNA Ligase	0.1 unite
Steril ddH ₂ O	20 µl'ye tamamlanır.
Toplam Hacim	20 µl

¹Vektör: *EcoR* I ve *Not* I enzimleri ile kesilip saflaştırılmış pPIC9 ekspresyon vektörü, ²Insert: *EcoRI* ve *NotI* enzimleri ile kesilip saflaştırılmış, ekspresyon vektörüne bağlanmaya hazır plazmid DNA parçası

Ligasyon reaksiyon karışımı 16°C'de yaklaşık 8 saat bekletilerek insert DNA'ların pPIC9 vektörüne bağlanması sağlanmıştır. Daha sonra enzimin inaktivasyonu için 65°C'de 15 dk ısı işlem uygulanmıştır. Böylece elde edilen yeni rekombinant vektörler, içerdiği gen bölgelerine atfen rCOL-1 (COL-1 gen fragmanını içeren rekombinant pPIC9) olarak adlandırılmıştır. Ligasyonun gerçekleşip gerçekleşmediğinden emin olmak için ticari ekspresyon kiti (*Pichia* Expression Kit, Invitrogen)

içerisinde yer alan ve vektör üzerindeki AOX bölgesinin amplifikasyonuna uygun 5'AOX/3'AOX primer seti ile PCR yapılmış ve PCR ürünleri agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir.

Daha sonra rCOL-1, *E. coli* DH5- α hücrelerine ısı şoku ile klonlanmıştır. Trasformantlar ampisilin içeren LB agar besiyerinde seçilmiş ve çoğaltılmıştır. Ardından plazmid DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen plazmid DNA'lar PCR reaksiyonu ile amplifiye edilmiştir. PCR ürünleri agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiş ve sonuçlar sekans analizi ile de doğrulanmıştır.

2.2.9 rCOL-1 Plazmid DNA'ların ve pPIC9 Ekspresyon Vektörünün Linearize Edilmesi

E. coli DH5- α transformantlarından ekstrakte edilen rCOL-1 plazmidleri ve pPIC9 ekspresyon vektörü konakçı *P. pastoris* hücrelerine transfer edilmeden önce *Sal* I (Invitrogen) restriksiyon endonükleaz enzimi ile lineer hale getirilmiştir. Elektroporasyon işleminde 5–20 μ g linearize DNA kullanılacağı için kesim reaksiyon hacmi yüksek tutulmuş ve aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır (Tablo 2.7).

Tablo 2.7. *Sal* I restriksiyon endonükleaz kesim reaksiyonu

Bileşen	Miktarı
10X buffer H	20 μ l
<i>Sal</i> I	10 μ l
Plazmid DNA*	~15 μ g
Steril ddH ₂ O	200 μ l'ye tamamlanır.
Toplam Hacim	200 μl

*: rCOL-1 veya pPIC9

Reaksiyon karışımı 37°C'de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra *Sal* I enziminin inaktivasyonu için 65°C'de 15dk ısı işlem uygulanmıştır. Reaksiyon karışımına 2,5 katı hacminde isopropanol eklenip vortekslendikten sonra reaksiyon tüpleri santrifüje yerleştirilmiştir. Maksimum devirde 20 dk santrifüj uygulanarak kesilmiş plazmid DNA'ların dibe çökmesi sağlanmıştır. Santrifüj bittikten sonra tüplerdeki süpernatant uzaklaştırılmış ve tüpler oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra tüplerin dibinde yer alan DNA'lar ~15 μ l steril ddH₂O ile çözündürülmüştür. Böylece transformasyon için hazır lineer plazmid DNA'lar elde edilmiştir.

2.2.10 Kompetent *P. pastoris* Hücrelerinin Hazırlanması

Öncelikle *P. pastoris* KM71 hücreleri YPD agar ortamında 30°C'de 48 saat inkübasyona tabi tutularak taze kültür elde edilmiştir. Daha sonra aşağıdaki adımlar takip edilerek kompetent *P. pastoris* hücreleri oluşturulmuştur.

- YPD agarda gelişen tek kolonilerden seçilip 5 ml steril YPD içeren 50 ml'lik falkon tüplere inokülasyon yapılmıştır.
- Hücreler 30°C'de bir gece inkübasyona tabi tutulmuştur.
- Daha sonra bu kültür ortamından 0.1–0.5 ml alınıp 500ml steril taze YPD içeren 2 litrelik flasklara aktarılmıştır.
- Hücreler orbital çalkalayıcılı inkübatörde (IKA KS 4000i, Almanya) 30°C'de bir gece inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonunda OD₆₀₀ değerinin 1.3–1.5 aralığında olup olmadığı kontrol edilmiş, gerektiğinde inkübasyon süresi uzatılmıştır.
- Uygun OD₆₀₀ değerine ulaşan kültürler 1500xg'de 5 dk santrifüj edilerek çöktürülmüştür.
- Pellet, üzerine 500ml soğuk su ilave edilerek çözündürülmüştür.
- Daha sonra tekrar 1500xg'de 5 dk santrifüj uygulanmıştır.
- Oluşan pelletin üzerine 250 ml soğuk su ilave edilerek çözünmesi sağlanmıştır.
- Tekrar 1500xg'de 5 dk santrifüj uygulanmıştır.
- Pellet, üzerine bu kez 20ml, 1M soğuk sorbitol eklenerek çözündürülmüştür.
- 1500xg'de 5 dk santrifüj uygulanmış ve süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- Elde edilen pelletten, 1ml 1M soğuk sorbitol içeren mikrosantrifüj tüpüne son hacim 1,5 ml olacak şekilde ilave edilmiştir. Böylece elektroporasyon için hazır kompetent *P. pastoris* hücreleri elde edilmiştir.

2.2.11 Elektroporasyon

Elektroporasyon için 80 µL kompetent hücre ile 15 µg linearize edilmiş DNA (~10-12 µL) steril bir mikrosantrifüj tüpünde karıştırıldıktan sonra 0.2 cm'lik soğuk elektroporasyon küvetine aktarılmıştır. Küvet elektroporator (Micropulser, BioRad, Almanya) cihazına yerleştirilip 1,5kV'ta elektriksel akım oluşturulmasını sağlayan "Sc2" programında elektroporasyon uygulanmıştır. Küvetlere hemen 1ml 1M soğuk sorbitol eklemiştir. Daha sonra küvet içeriğinden 500 µL alınıp MD agar petrilere yayma yöntemi ile ekim yapılmıştır. Petriler 30°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ikinci gününden itibaren koloni gelişimi gözlenmiştir. Gelişen koloniler taze MD agarlara steril öze yardımı ile ekilerek çoğaltılmıştır.

2.2.12 Rekombinant *P. pastoris* Hücrelerinin Tespit Edilmesi

Transformasyondan sonra MD agar'da geliştirilen *P. pastoris* kolonilerinin hedef gen bölgesini içeren hücreler olup olmadığı PCR ile kontrol edilmiştir. Bunun için öncelikle *P. pastoris* hücrelerinden DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen DNA'lara "AOX ileri/geri" primer seti ile

PCR yapılmış ve PCR ürünleri 0,1-10kb aralıklı DNA marker eşliğinde agaroz jelde yürütülmüştür. Jel görüntülerine göre hedef gen bölgesini içeren pozitif *P. pastoris* transformantları tespit edilmiştir. Daha sonra bu pozitif *P. pastoris* transformantlarından RNA saflaştırılıp “COL-1/F & COL-1/R” kollajen primer seti ile PCR yapılarak hedef gen bölgelerinin transkripsiyonunun kontrol edilmesi aşamasına geçilmiştir.

2.2.12.1 *P. pastoris* Hücrelerinden DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu için ticari DNA ekstraksiyon kiti (EZ-10 Spin Column Fungal Genomic DNA Kit, Biobasic) kullanılmıştır. Ekstraksiyon üretici firmanın yönergelerinde bazı modifikasyonlar uygulanarak aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir.

- MD agarda geliştirilen hücreler steril öze yardımı ile toplanmış ve 180 µl Universal Digestion Buffer içeren mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Tüp iyice vortekslenerek hücrelerin buffer içerisine homojen karışması sağlanmıştır.
- Tüplere 25µl Proteinaz K (Qiagen) ilave edilip karıştırıldıktan sonra 56° C’de 1 gece inkübasyon uygulanmıştır.
- Tüplere 100µl Universal Buffer PF eklenip karıştırıldıktan sonra -20 ° C’de 5dk bekletilmiştir.
- 12,000xg’de 5dk santrifüj uygulanmış ve süpernatant temiz bir santrifüj tüpüne alınmıştır.
- Tüplere 200µl Universal Buffer BD eklenip vortekslenmiştir.
- Daha sonra tüplere 200µl etanol (%96-100) eklenmiş ve yine vorteks uygulanarak karıştırılmıştır.
- Tüp içerikler spin kolona (EZ-10 column) transfer edilmiş ve kolonlar 2ml’lik toplama tüplerine yerleştirilmiştir.
- 9,000 x g’de 1dk sanrtifüj uygulanmıştır.
- Toplama tüpünde biriken sıvı kısım uzaklaştırılmış ve kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
- Kolona 500µl PW solüsyonu eklenmiştir.
- 9,000xg’de 1dk sanrtifüj uygulanmıştır.
- Yine toplama tüpünde biriken sıvı kısım uzaklaştırılmış ve kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
- Spin kolona 500µl Universal Wash Solution eklendikten sonra 9,000 x g’de 1dk sanrtifüj uygulanmıştır.
- Spin kolon temiz bir toplama tüpüne yerleştirilerek 20,000xg’de 2dk santrifüj uygulanmak suretiyle kolon membranının kuruması sağlanmıştır.

- Spin kolon membranı üzerine 20-25 µl TE buffer eklenip oda sıcaklığında 5 dk bekletilmiştir.
- Spin kolon temiz bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilip 20,000xg'de 3dk santrifüj uygulanarak kolon membranındaki DNA'nın tüpte toplanması sağlanmıştır.
- DNA konsantrasyonları mikro hacimli spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür.
- DNA'lar kullanılıncaya kadar -20° C'de depolanmıştır.

2.2.12.2 Ekspresyonun Kontrolü

2.2.12.2.1 *P. pastoris* Transformantlarından RNA Ekstraksiyonu ve RT-PCR Analizi

P. pastoris hücrelerinden RNA ekstraksiyonu için ticari RNA ekstraksiyon kiti (RNeasy® Plant Mini Kit, Qiagen) kullanılmıştır. Ekstraksiyon, kit protokolünde bazı değişiklikler yapılarak aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir.

- MD agarda geliştirilen *P. pastoris* transformantları steril bir öze yardımı ile toplanmış ve bir öze dolusu hücre, 450 µl RLT buffer içeren steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır.
- Kuvvetlice vorteks uygulanarak hücrelerin buffer içerisine homojen dağılması sağlanmıştır.
- Tüp içerikleri, kit içerisinde yer alan lila renkli spin kolonlara aktarılmıştır. Spin kolon 2ml'lik toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
- Maksimum hızda 2 dk santrifüj uygulanmıştır.
- Altta kalan süpernatant temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır. Üzerine tüp içeriğinin yarısı kadar etanol (%96-100) eklenmiş ve pipetaj yapılarak karıştırılmıştır.
- Tüp içeriği kit içerisinde yer alan pembe renkli spin kolonlara aktarılmıştır. Spin kolon 2ml'lik toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
- 8000xg'de 1 dk santrifüj uygulanmıştır. Alt faz uzaklaştırılmış, toplama tüpü yenisi ile değiştirilmiştir.
- Spin kolona 700 µl RW1 buffer eklenmiştir. Tekrar 8000xg'de 1 dk santrifüj uygulanmıştır. Alt faz uzaklaştırılmış, toplama tüpü yenisi ile değiştirilmiştir.
- Spin kolona 500 µl RPE buffer eklenmiş ve 8000xg'de 1 dk santrifüj uygulanmıştır. Yine altta kalan süpernatant uzaklaştırılmıştır. Bu işlem basamağı iki kez tekrarlanmıştır.
- Spin kolon temiz bir toplama tüpüne yerleştirilip maksimum hızda 1 dk santrifüj uygulanarak kolonun kuruması sağlanmıştır.
- Spin kolon temiz bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir. Kolon membranı üzerine 25 µl RNAase içermeyen su eklenip 1 dk bekletilmiş ve ardından 8000xg'de 1 dk santrifüj uygulanarak membrandaki RNA'nın tüpte toplanması sağlanmıştır.

- RNA konsantrasyonları mikro hacimli spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür.
- RNA'lar kullanılıncaya kadar -20° C'de depolanmıştır.

Elde edilen RNA'lar ile "COL-1/F & COL-1/R" kollajen primer seti kullanılarak RT-PCR karışımları hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımları Tablo 2.8'de verilen koşullar altında RT-PCR analizine tabi tutulmuştur. PCR ürünleri 0,1-10kb aralıklı DNA marker eşliğinde agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir. Ayrıca RT-PCR ürünlerinin dizi analizi yapılarak sonuçlar gen bankası veri tabanında taranıp *Bos taurus* collagen, type I, alpha 1 (COL1A1), mRNA dizisi ile eşleştiği doğrulanmıştır.

Tablo 2.8. RT-PCR karışımı ve reaksiyon koşulları

RT-PCR Karışımı		RT-PCR koşulları			
Bileşen	Hacim (µL)	Aşama	Süre (saniye)	Sıcaklık (°C)	Döngü sayısı
2x QuantiFast SYBR Green RT-PCR Master Mix	10	Ters Transkripsiyon	1500	50	1
İleri Primer (100pMol)*	0.15	İlk Aktivasyon	900	95	1
Geri Primer (100pMol)**	0.15	Denatürasyon	5	95	35
QuantiFast RT Mix	0.20	Bağlanma	30	65	
RNase-free water	7.50	Uzama	40	72	
Kalıp RNA (100 ng)	2				
Toplam Reaksiyon Hacmi	20				

*: COL-1/F , **: COL-1/R

3. BÖLÜM

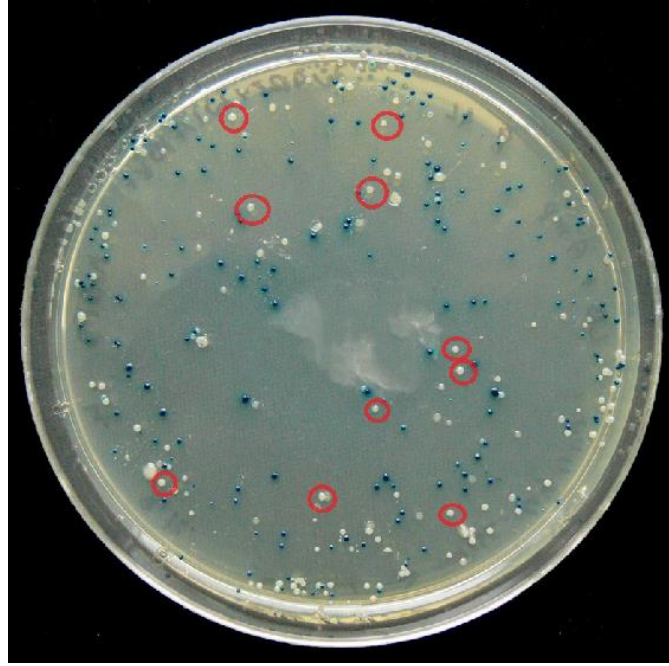
BULGULAR

Gıda sanayinde katkı maddesi olarak kullanılabilecek jelatin üretimi için sığıra ait yaklaşık 800 bç'lik kollajen gen fragmanının öncelikle *E.coli* DH5 α hücrelerinde klonlandığı ve daha sonra *P. pastoris* KM71 maya hücrelerinde transkripsiyonunun gerçekleştirildiği bu çalışma sonucunda elde edilen bulgular aşağıda ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır.

3.1 pCOL-1 Plazmid DNA'ların *E. coli* DH5 α Hücrelerinde Klonlanması

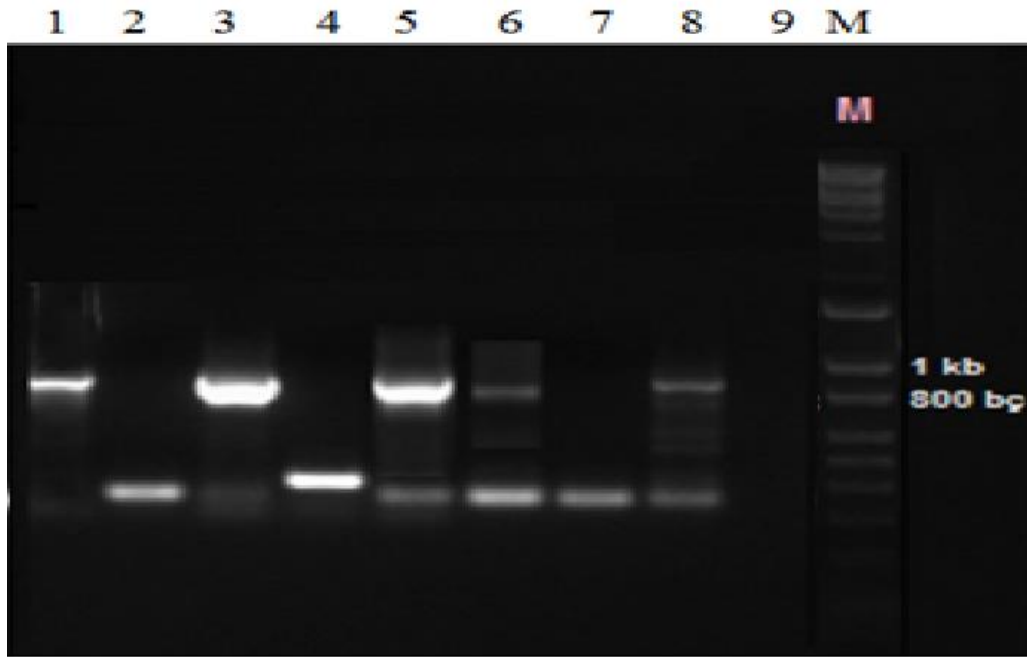
Sığır deri dokusundan elde edilen RNA'ların kalıp olarak kullanıldığı RT-PCR ürünleri pCR™2.1 klonlama vektörüne bağlandıktan sonra *E. coli* DH5- α hücrelerine transfer edilmiştir. Transformantlar, yüzeyine önce 40 μ L 40 mg/mL X-GAL (Sigma-Aldrich) solüsyonu, sonra 40 μ L 100 mM IPTG (Sigma-Aldrich) solüsyonu yayılmış 100 μ g/mL oranında ampisilin (Gibco-Life Technologies) içeren LB agar besiyerinde geliştirilmiştir. Inkübasyon sonunda LB agar ortamında mavi beyaz koloni oluşumu gözlenmiştir ve beyaz koloniler pozitif transformantlar olarak yorumlanmıştır (Şekil 3.1).

Bu beyaz kolonilerin COL-1 ve COL-2 gen fragmanlarını içerip içermediklerinden emin olmak için 5-10 beyaz koloni ampisilin içeren taze LB agarda geliştirilmiş ve bu kolonilerden saflaştırılan plazmid DNA'lar kalıp olarak kullanılarak COL-1/F&COL-1/R" primer seti ile PCR gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri agaroz jelde 0,1-10kb aralıklı DNA marker eşliğinde yürütülmüştür ve jel görüntüleri yorumlanmıştır.



Şekil 3.1. Transformasyondan sonra LB agarda gözlenen mavi-beyaz koloni oluşumu

PCR analizi neticesinde elde edilen agaroz jel görüntüleri Şekil 3.2’de yer almaktadır. Görüldüğü üzere COL-1 gen fragmanını içeren kolonilere ait PCR ürünleri marker ile kıyaslandığında toplam 5 koloniye (1,3,5,6 ve 8.koloniler) ait DNA beklendiği üzere yaklaşık 800 bp uzunluğunda pozitif bant vermiştir. Geri kalan 3 koloniye (2,4 ve 7. koloniler) ait DNA’nın ise herhangi bir ürün vermediği görülmüştür.



Şekil 3.2. Klonlama sonrası *E. coli* DH5α transformantlarına ait PCR Sonuçları. : 1-8. kuyucuklar pCOL-1 içeren beyaz kolonilerden elde edilen DNA ile yapılan PCR ürünleri; 9. kuyucuk negatif kontrol; M: marker

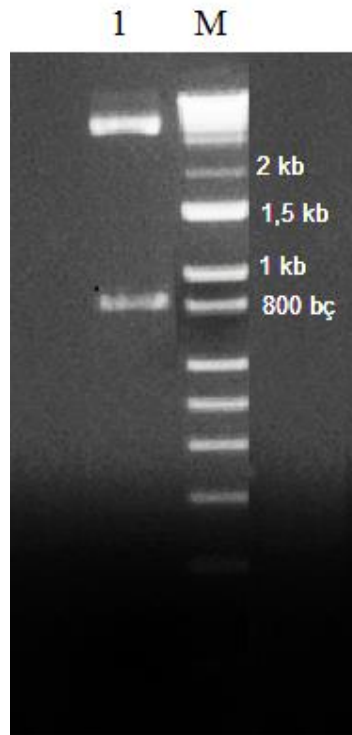
Pozitif bant veren kolonilere ait PCR ürünleri dizi analizi ile de kontrol edilmiş ve Şekil 3.3'te verilen nükleotid dizileri elde edilmiştir. Analiz sonuçları gen bankası veri tabanında tarandığında *Bos taurus* collagen, type I, alpha 1 (COL1A1), mRNA dizisi ile eşleştiği görülmüştür ancak bu eşleşme birebir olmayıp parçalı bir eşleşme söz konusu olmuştur (Ek-3, Ek-4 ve Ek-5). Sekans analizi ile de doğruluğu teyit edilen pozitif *E. coli* DH5-α transformantları %20 gliserol içeren LB sıvı besiyeri ortamına alınıp -80°C'lik derin dondurucuda depolanmıştır.

COL-1 gen fragmanı için dizi analizi

5'GACTTGCATGGATCTGACAGTCGCATTCTCCCCATCCAGGGAATGCTGGACCCCT
 GGCCCTCCTGGCCCTGCTGGCAAAGAAGGCAGCAAAGGCCCCCGCGGTGAGACTGGC
 CCGCTGGGCGTCCCGGTGAAGTCGGTCCCCCTGGTCCCCCTGGCCCCGCTGGTGAGA
 AAGGAGCCCCCTGGTGCTGACGGACCTGCTGTAAGTGCCCCCTCCAGAGGGGTCCAGA
 GTCGGGGGGCGTCGCCCTGGCCACTGGGAGTCATCTACCCCCGTCTGCCCCACCA
 CAGGGAGCTCCTGGCGCTCCTGGACCTCAAGGTATTGCTGGACAGCGTGGTGTGGTGG
 GCCTGCCTGGTCAGAGAGGAGAAAGAGGCTTCCCTGGTCTTCCTGGCCCCCTCTGTGAG
 TGCCCCCTCACCTTGGGGCAGGACCATTGCAGGACTTGGAGGGTGCAGGATGGGGGT
 GGTAGGGTCAGCAAGGACCAATGTGGGGGACCATCAGGCCCTCTCCCACCCCATCTCT
 GGCTGACTCTTTCTTTCCCTCAGGTTGAACCCCGCAAACAAGGTCTTCTGGAGCA
 AGTGGTGAACGTGGCCCCCTGGTCCCATGGGCCCCCTGGATTGGCTGGACCCCTG
 GCGAGTCTGGACGTGGAGGTTGCCGTGGTGGCAGCCCCACGCCAGCGCCCTCACT
 GTGGCCATTTTGGGGCCTTGGGCCTGAGGCTCCCCTTTTCCTTGGGCTGATGTTTACC
 CTCCCCGCCCCCACAGGGAGCTCCTGGGTGCTGAAGGATCTCCTGACAGTACCGGGG
 GGGGGGGGCCGAAAAAATGATTCTC'3

Şekil 3.3. *E. coli* DH5α transformantlarına ait PCR ürünlerinin dizi analizi sonuçları (Tarañ bölge Bos *taurus* collagen, type I, alpha 1 (COL1A1), mRNA dizisi ile birebir eşleşmektedir.)

pCOL-1 plazmid DNA'ları *EcoR* I ve *Not* I endonükleazlar ile kesilmek üzere reaksiyon karışımları hazırlanmış ve reaksiyon karışımı 37°C'de 1 gece inkübasyondan sonra agaroz jelde yürütülmüştür (Şekil 3.4.). Her iki kesim miksi ile de jelde çift bant görülmüştür. Hiçbir gen fragmanı bağlanmamış yalın pCR™2.1 klonlama vektörünün uzunluğu 3,9 kb'dır. Dolayısıyla Şekil 3.4'te görülen yaklaşık 4kb'lık bant klonlama vektörüne, 800bç'lik bant vektörden kesilmiş COL-1 gen fragmanına, 1000bç'lik bant ise vektörden kesilmiş COL-2 gen fragmanına aittir. COL-1 ve COL-2 bantları jelden kesilip saflaştırılarak insert DNA'lar oluşturulmuştur.



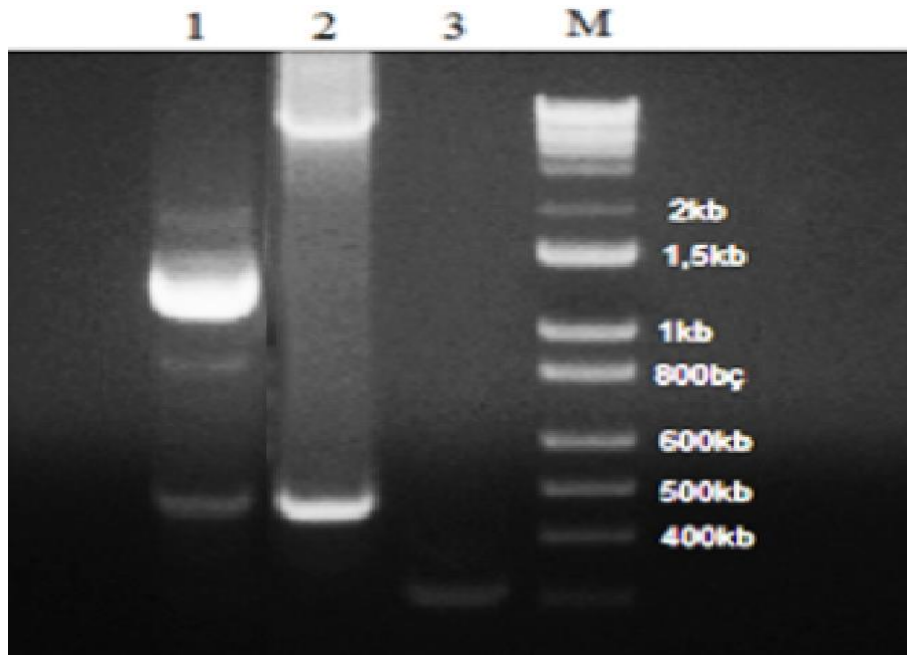
Şekil 3.4. *EcoR* I ve *Not* I endonükleazlar ile kesilmiş pCOL-1 plazmid DNA görüntüsü
1: *EcoR* I ve *Not* I endonükleazlar ile kesilmiş pCOL-1; M: marker

Aynı zamanda pPIC9 ekspresyon vektörü de kendi AOX bölgesi üzerinde yer alan *EcoR* I ve *Not* I endonükleaz kesim bölgelerinden kesilip jelde yürütülmeye gerek duyulmadan saflaştırılmıştır.

3.2 rCOL-1 Plazmid DNA'ların Oluşturulması

rCOL-1 plazmid DNA'larını elde etmek üzere insert DNA'ların kesim bölgelerinden vektöre bağlanmaları (ligasyonu) sağlanmıştır. Ligasyonun gerçekleşip gerçekleşmediğinden emin olmak için reaksiyon karışımlarından alınan örneklerle 5'AOX/3'AOX primer seti ile PCR yapılmış ve PCR ürünleri agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir (Şekil 3.5). COL-1 insert DNA'sı ile hazırlanan ligasyon karışımını temsil eden PCR ürünü 1. kuyucuğa, hiçbir insert içermeyen (yalın)

pPIC9 vektörüne ait PCR ürünü ise 2. kuyucuğa yüklenmiştir. Yalın pPIC9 ekspresyon vektörünün kendi AOX bölgesi 495 bç'dir. Dolayısıyla jelde görülen yaklaşık 500bç'lik ürünler bu AOX bölgesine aittir. COL-1 bölgesi vektörün AOX bölgesi üzerindeki kesim bölgelerinden bağlandığı için insert DNA'ları içeren vektörde amplifiye olan AOX bölgesinin uzunluğu insert DNA uzunluğu kadar artmıştır. Dolayısıyla şekil 3.4.'te de görüldüğü üzere COL-1 gen fragmanını içeren vektöre ait PCR ürünü yaklaşık 1300 bç uzunluktadır. Ayrıca ligasyon karışımında insert DNA'nın bağlanmadığı ekspresyon vektörü de bulunacağı için 1. kuyucukta olduğu gibi vektöre ait 495bç'lik ikinci bir bant da görülmektedir.

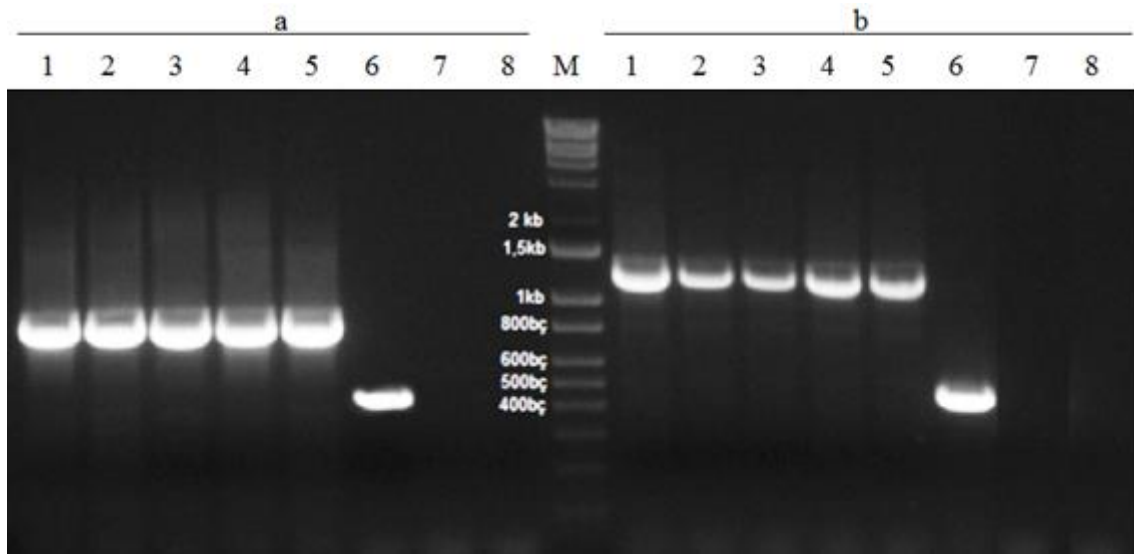


Şekil 3.5. Ligasyon karışımlarına 5'AOX/3'AOX primer seti ile yapılan PCR ürünleri
1: COL-1 insert DNA'sı ile hazırlanan ligasyon karışımını temsil eden PCR ürünü; 2:
hiçbir insert içermeyen (yalın) pPIC9 vektörüne ait PCR ürünü; 3: negatif kontrol;
M:marker

Ligasyonun başarısı PCR ile teyit edildikten sonra rCOL-1 plazmid DNA'ları ısı şoku ile *E. coli DH5-α* hücrelerine transfer edilmiştir. Trasformantlar ampicillin içeren LB agar besiyerinde seçilip geliştirildikten sonra hücrelerden plazmid DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen plazmid DNA'lar kalıp olarak kullanılarak hem COL-1/F&COL-1/R'' primer seti ile hem de 5'AOX/3'AOX primer seti ile PCR yapılmıştır.

rCOL-1 plazmidinin transfer edildiği *E. coli DH5-α* hücrelerinden elde edilen plazmid DNA ile gerçekleştirilen PCR sonuçları şekil 3.6.'da verilmiştir. Şekilde görülen 1-5. kuyucuklar rCOL-1 plazmid DNA içeren *E. coli DH5-α* hücrelerinden elde edilmiştir. Bu plazmid DNA'lar COL-

1/F&COL-1/R” primer seti ile yaklaşık 800bç’lik bant vermiştir. Dolayısıyla hedef bölgemiz olan COL-1 uzunluğu ile aynı büyüklükte bant elde edilmiştir. Aynı plazmid DNA’ların 5’AOX/3’AOX primer seti ile ise yaklaşık 1300 bç’lik bant verdiği görülmüştür. İnsert DNA’yı içeren pPIC9 vektörünün AOX bölgesi hedef gen fragmanının uzunluğu kadar artmış olması gerektiğinden elde edilen bantlar, PCR ürünlerinin pozitif transformantlara ait olduğunu doğrulamaktadır. Şekilde görülen 6. kuyucuklar hiçbir insert DNA bağlanmamış pPIC9 vektörü ile yapılan PCR ürünlerine aittir. Görüldüğü üzere “COL-1/F&COL-1/R” primer seti ile yapılan PCR hiçbir ürün vermezken 5’AOX/3’AOX primer seti ile gerçekleştirilen PCR’da yaklaşık 500bç uzunluğunda bant görülmüştür. Bu bant pPIC9 vektörünün kendi AOX bölgesinin uzunluğuna eş değerdir. Şekilde görülen 7. Kuyucuklar hiçbir plazmid DNA veya vektör içermeyen *E. coli DH5-α* hücrelerinden elde edilen DNA’larla yapılan PCR ürünlerine aittir. Görüldüğü üzere her iki primer seti ile de herhangi bir ürün gözlenmemiştir. Dolayısıyla kullanılan primerlerin *E. coli DH5-α* ‘ya ait DNA’larla herhangi bir çapraz reaksiyonu bulunmamaktadır. 8. Kuyucuklar ise negatif kontrollere aittir olup PCR sonucunda negatif kontrollere aittir hiçbir bant gözlenmemiştir.



Şekil 3.6. COL-1 gen fragmanı için agaroz jel görüntüsü. A: “COL-1/F&COL-1/R”primer seti ile gerçekleştirilen PCR ürünleri, B: 5’AOX/3’AOX primer seti ile gerçekleştirilen PCR ürünleri

3.3 Rekombinant *P. pastoris* Hücrelerinin Tespit Edilmesi

E. coli DH5-α transformantlarından ekstrakte edilen rCOL-1 plazmidleri ve pPIC9 ekspresyon vektörü konakçı *P. pastoris* KM71 hücrelerine transfer edilmeden önce *Sal I* (İnvitrogen) restriksiyon endonükleaz enzimi ile lineer hale getirilmiştir ve daha sonra elektroporasyon uygulaması ile maya hücrelerine transfer edilmiştir.

P. pastoris KM71 konakçı hücreleri histidin oksotroftur ve ayrıca histidin sentezinden sorumlu histidinol dehidrojenaz geninde (his4) bir mutasyona sahiptirler. Dolayısıyla MD gibi histidin bulunmayan kültür ortamında gelişemezler. Ancak ekspresyon vektörü konakçı hücredeki his4 geninin komplementeri olan HIS4 gen bölgesi içerir. Bu sayede transformasyon sonrası hücre HIS4 genine sahip olur ve histidin bulunmayan kültür ortamında gelişebilme kabiliyeti kazanır. Bu nedenle transformantlar histidinsiz besiyeri ortamında seçilmiştir. Her iki hücre de transformasyondan sonra MD agar besiyerinde çok sayıda beyaz koloni oluşturmuştur(Şekil 3.7).



Şekil 3.7. MD agarda gelişen *P. pastoris* transformantları

Transformasyondan sonra MD agarda geliştirilen *P. pastoris* kolonilerinin hedef gen fragmanını içeren hücreler olup olmadığı PCR ile kontrol edilmiştir. Bunun için öncelikle *P. pastoris* hücrelerinden DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen DNA'lara "5'AOX/3'AOX" primer seti ile PCR yapılmış ve PCR ürünleri 0,1-10kb aralıklı DNA marker eşliğinde agaroz jelde yürütülmüştür. Jel görüntülerine göre hedef gen fragmanını içeren pozitif *P. pastoris* transformantları tespit edilmiştir. Daha sonra bu pozitif *P. pastoris* transformantlarından RNA saflaştırılıp "COL-1/F & COL-1/R" kollajen primer setleri ile PCR yapılarak hedef gen bölgelerinin transkripsiyonunun kontrol edilmiştir.

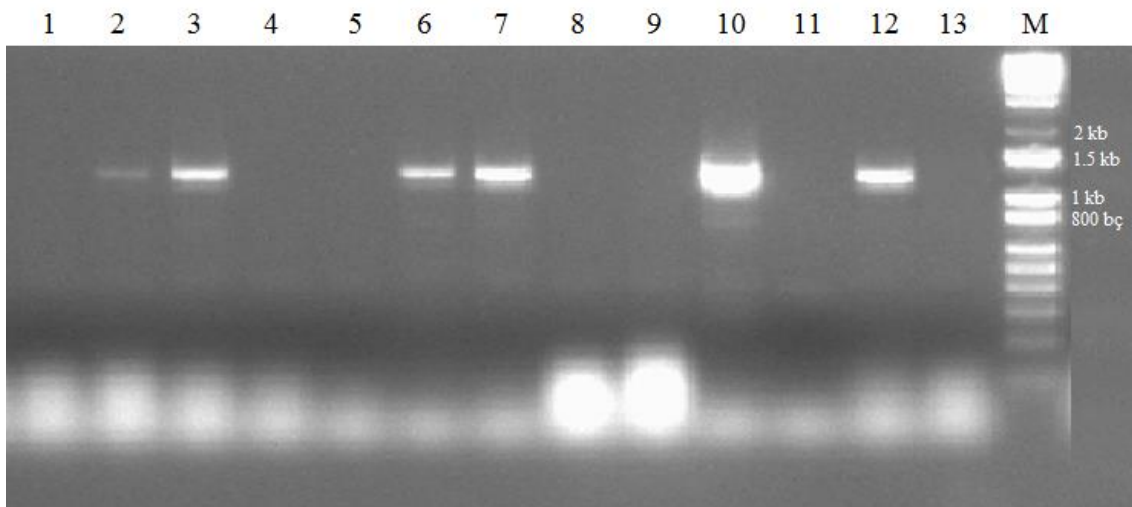
3.3.1.1 COL-1 Gen Fragmanı İçeren *P. pastoris* KM71 Transformantlarının Tespiti ve Transkripsiyonun Kontrolü

3.3.1.1.1 5'AOX/3'AOX Primer Seti ile Gerçekleştirilen PCR Sonuçları

COL-1 gen fragmanı içeren *P. pastoris* KM71 transformantlarının tespiti için MD agar'da gelişen kolonilerinden rastgele seçilen 20 koloniden DNA saflaştırılmıştır. Elde edilen DNA'lar kalıp olarak kullanılarak "5'AOX/3'AOX" primer seti ile PCR gerçekleştirilmiştir. Kontrol amacıyla daha önceden rCOL-1 plazmidini içerdiğinden emin olduğumuz *E. coli* DH5- α plazmid DNA'sı ve hiçbir gen fragmanı içermeyen *P. pastoris* KM71 konak hücre DNA'sı da aynı primer seti ile çoğaltılmıştır. PCR ürünleri agaroz jelde yürütülmüştür (Şekil 3.8) ve sonuçlar marker ile kıyaslanarak pozitif transformantlar tespit edilmiştir.

P. pastoris KM71 konakçı hücresinin kendi AOX gen bölgesinde bir mutasyon söz konusudur. Bu nedenle 5'AOX/3'AOX primer seti ile amplifiye olabilecek bir gen bölgesi taşımadığı için plazmid içermeyen *P. pastoris* KM71 hücrelerine ait PCR ürünü de bulunmaz. Şekil 3.14'te de görüldüğü gibi 11. kuyucuğa yüklenen konakçı *P. pastoris* KM71 hücrelerine ait PCR sonucu 5'AOX/3'AOX primer seti ile herhangi bir amplifikasyon söz konusu değildir.

rCOL-1 plazmidinin transformasyonu sonucu MD agar'da gelişen kolonilerden elde edilen DNA'lar ile gerçekleştirilen PCR ürünleri 1-10. kuyucuklara yüklenmiştir. Bu kuyucuklardan toplam 5 tanesinde yaklaşık 1300 bp'lik bant görülmüştür. Dolayısıyla bu 5 kuyucuktaki bantların COL-1 gen fragmanını taşıyan pozitif *P. pastoris* KM71 transformantlarına ait oldukları sonucuna varılmıştır. 12. kuyucukta yer alan, rCOL-1 plazmidini içeren *E. coli* DH5- α 'ya ait PCR ürünü de beklendiği gibi 1300bp uzunlukta bant vermiştir.



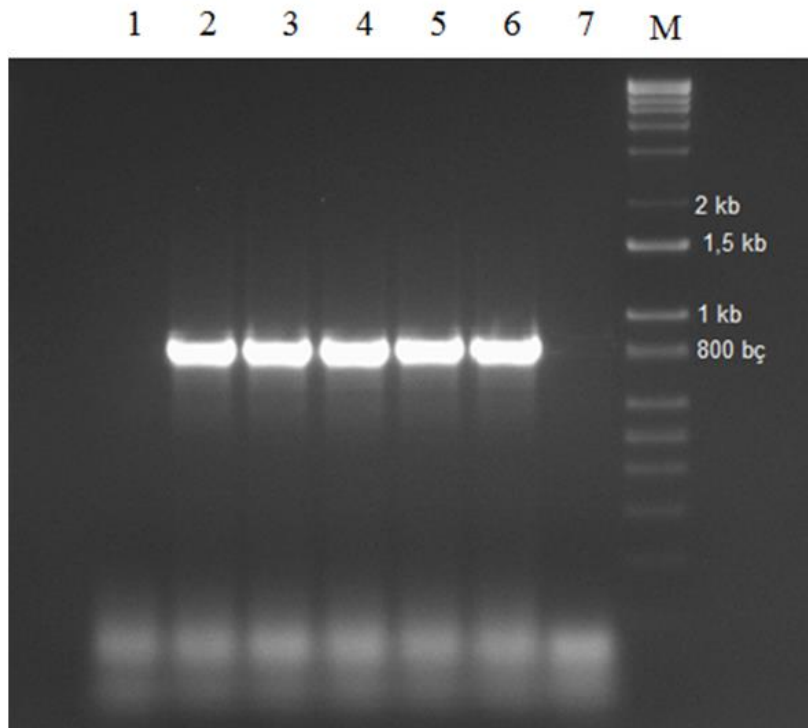
Şekil 3.8. "5'AOX/3'AOX" primer seti ile gerçekleştirilen PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü. 1-10:MD agar'da gelişen *P. pastoris* KM71 hücreleri; 11: konakçı *P. pastoris* KM71 hücresi; 12:COL-1 gen fragmanını içeren *E. coli* DH5- α ; 13-negatif kontrol; M: marker

3.3.1.1.2 COL-1 Gen Fragmanının *P. pastoris* KM71 Hücresinde Transkripsiyonunun Kontrolü

Pozitif *P. pastoris* KM71 transformantları belirlendikten sonra seçilen 5 adet rekombinant hücreden RNA saflaştırılıp “COL-1/F & COL-1/R” primer seti kullanılarak RT-PCR yapılmıştır. Kontrol amacıyla hiçbir gen fragmanı içermeyen *P. pastoris* KM71 konak hücre RNA’sı da aynı primer seti ile çoğaltılmıştır. PCR ürünleri marker eşliğinde agaroz jelde yürütülerek gen fragmanının transkripsiyonu kontrol edilmiştir (Şekil 3.9).

Şekil 3.15’de görülen 1. kuyucuğa hiçbir gen fragmanı içermeyen konakçı *P. pastoris* KM71 hücresinde ait RT-PCR ürünü yüklenmiştir ve hiçbir bant görülmemiştir. Dolayısıyla COL-1/F & COL-1/R primer seti konakçı hücre RNA’sı ile herhangi bir çapraz reaksiyon vermemektedir.

2-6. kuyucuklarda görülen bantlar ise pozitif *P. pastoris* KM71 transformantlarının RT-PCR ürünlerine aittir. Bu kuyucuklarda hedef gen fragmanı olan COL-1 ile aynı uzunlukta yaklaşık 800 bç’lik pozitif bantlar gözlenmiştir. Bu durum hücrelerde hedef gen fragmanının transkript edildiğini göstermektedir.



Şekil 3.9. COL-1/F & COL-1/R primer seti ile gerçekleştirilen PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü. 1: Konakçı *P. pastoris* KM71 hücresi; 2-6: COL-1 gen bölgesini içeren rekombinant *P. pastoris* KM71 hücreleri; 7: negatif kontrol, M: marker

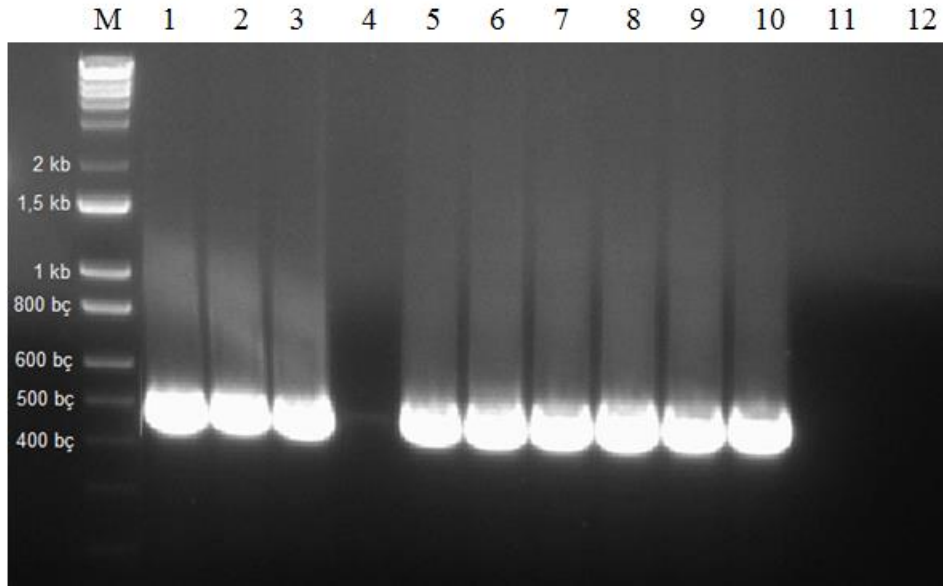
Transkripsiyonun kontrolü için pozitif bant veren RT-PCR ürünlerinden biri dizi analizi yapılarak doğrulanmış, dizi analizi sonuçları gen bankası veri tabanında taranıp *Bos taurus* collagen, type I, alpha 1 (COL1A1), mRNA dizisi ile eşleştigi görülmüştür (Ek-3 ve Ek-5).

3.3.1.2 pPIC9 Ekspresyon Vektörünü İçeren *P. pastoris* KM71 Hücrelerinin Tespiti

pPIC9 ekspresyon vektörünü içeren *P. pastoris* KM71 transformantlarını tespit etmek için elektroporasyondan sonra MD agar ortamında gelişen kolonilerden rastgele 9 tanesi seçilmiş ve bu kolonilerden DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA'lar kalıp olarak kullanılarak 5'AOX/3'AOX primer seti ile PCR yapılmıştır. Kontrol amacıyla pPIC9 vektörü ve hiçbir gen fragmanı içermeyen *P. pastoris* KM71 konak hücre DNA'sı da aynı primer seti ile çoğaltılmıştır. PCR ürünleri agaroz jelde yürütülmüştür ve sonuçlar marker ile kıyaslanarak pozitif transformantlar tespit edilmiştir (Şekil 3.10).

Şekil 3.18'de görülen 1. kuyucukta pPIC9 vektörü ile gerçekleştirilen PCR ürünü bulunmaktadır. PCR ürününün vektör üzerindeki AOX bölgesinin amplifikasyonuna işaret eden yaklaşık 500 bp'lik bant verdiği görülmüştür.

2-10. kuyucukta pPIC9 vektörünün transfer edildiği *P. pastoris* KM71'e ait DNA ile gerçekleştirilen PCR ürünü yer almaktadır. Kuyucuklardan 8 tanesinde beklenen 500 bp'lik pozitif bant gözlenmiştir. Bu PCR ürünlerinin ait olduğu *P. pastoris* KM71 hücrelerinin, pPIC9 ekspresyon vektörünü taşıyan pozitif transformantlar oldukları sonucuna varılmıştır. 4. Kuyucukta ise hiç bant gözlenmemesi bu kuyucuğa yüklenen PCR ürününün ekspresyon vektörünü taşımayan negatif *P. pastoris* KM71 transformantına ait olduğunu göstermiştir. 11. kuyucuğu yüklenen *P. pastoris* KM71 konak hücre DNA'sı ile elde edilen PCR ürünü de beklendiği gibi hiçbir bant vermemiştir.



Şekil 3.10. pPIC9 ekspresyon vektörünü içeren *P. pastoris* KM71 hücrelerinin tespiti. 1: pPIC9 vektörü; 2-10: pPIC9 vektörünü içeren rekombinant *P. pastoris* KM71 hücreleri; 11: Konakçı *P. pastoris* KM71 hücresi; 12: negatif kontrol, M: marker

4. BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu bölümde, gıda sanayinde katkı maddesi olarak kullanılabilecek jelatin üretimi için sığira ait bir kollajen gen fragmanının öncelikle *E.coli* DH5 α hücrelerinde klonlandığı ve daha sonra *P. pastoris* KM71 maya hücrelerinde transkripsiyonunun gerçekleştirildiği bu araştırma neticesinde elde edilen sonuçlar yapılan benzer çalışmalar ile kıyaslanarak değerlendirilmiştir. Ayrıca çalışmada geliştirilmesi öngörülen hususlar, ileri araştırmalarda ne gibi değişikliklerin yapılması gerektiği, gıda sanayi için fonksiyonel bir rekombinant jelatin üretmek için daha ne gibi araştırmalar yapılarak bu ve benzeri çalışmaların yürütülmesi gerektiğine dair önerilere geniş bir şekilde yer verilmiştir.

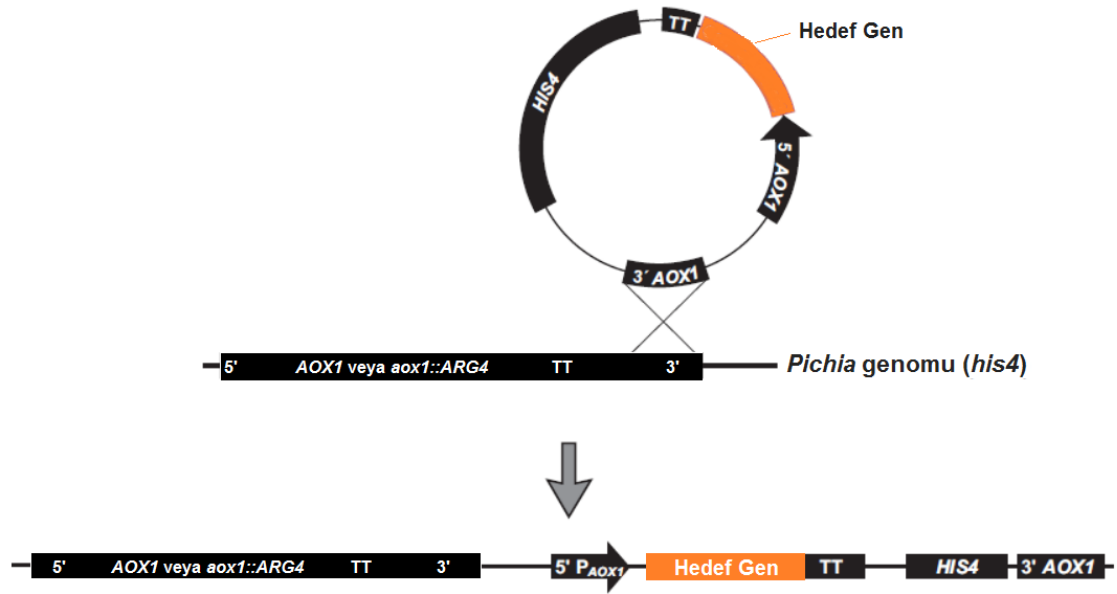
4.1 Klonlama Sonuçları

Bu araştırma sığır COL1A1 geni üzerindeki yaklaşık 800 bp'lik fragman *P. pastoris* hücresinde ekspres edilerek rekombinant kollajen $\alpha 1(I)$ prokollajen elde etmeye yönelik tasarlanmıştır. Çalışma kapsamında sığır deri dokusundan elde edilen RNA, 5' uçlarına *EcoR* I; 3' uçlarına *Not* I resitruksiyon endonükleaz kesim bölgesi eklenmiş COL-1/F&COL-1/R" primer seti ile amplifiye edilmiştir. RT-PCR ürünleri pCR™2.1 klonlama vektörüne bağlanarak pCOL-1 plazmidleri oluşturulmuş ve bu plazmidler ısı şoku kullanılarak *E. coli* DH5- α hücrelerinde klonlanmıştır. Yapılan benzer çalışmalara bakıldığında ısı şokunun özellikle *E. coli*'nin kullanıldığı transformasyonlarda yaygın olarak kullanılan bir yöntem olduğu görülmektedir. *E. coli*, hücre membranının iç ve dış kısmında birbiri ile kaynaşmış çok sayıda adhezyon bölgesi içerir. Hücre membranındaki lipid tabakası yüzeyindeki fosfat grupları tıpkı DNA molekülünde olduğu gibi kuvvetli negatif yüke sahiptir. Bu nedenle membran ve DNA molekülleri birbirlerini iterler. Kompetent hücre hazırlanırken kullanılan CaCl_2

solüsyonu hücre membranına daha nötral yapı kazandırır. Dolayısıyla DNA hücre membranı ile yakın ilişki kurabilir. Isı şoku uygulaması ile ani ısı değişimleri meydana getirilerek hücre yüzeyinde açılan porlar sayesinde plazmid DNA'nın membran üzerindeki adhezyon bölgelerinden kolayca hücre içerisine girmesi sağlanmıştır (Sarkar,2002). Plazmid DNA'yı içeren pozitif transformantlar Ampisilin, IPTG ve X-gal içeren kültür ortamında mavi-beyaz koloni oluşumu takip edilerek seçilmiştir. Antibiyotiğe dirençli beyaz koloniler seçilip PCR ile kontrol edildiğinde pCOL-1 plazmidlerini içeren çok sayıda *E. coli* DH5- α kolonilerinin elde edildiği başarılı bir klonlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

4.2 Ekspresyon Sonuçları

Restriksiyon endonükleaz kesim bölgelerinden uygun enzimlerle kesilerek plazmid DNA'dan ayrılan hedef gen fragmanı yine aynı enzimlerle kesilmiş pPIC9 ekspresyon vektörüne bağlanmak suretiyle rekombinant rCOL-1 olarak adlandırılan vektör oluşturulmuştur. Hedef gen fragmanının bağlanacağı bölge vektörün AOX bölgesi (495 bç) üzerinde yer almaktadır. Dolayısıyla rekombinant vektöre ait AOX bölgeleri hedef genin uzunluğuna göre değişmiştir (rCOL-1 için yaklaşık 1300 bç). Konak hücre genomuna AOX lokusundan entegre olabilmesi için (*aox1::ARG4* (KM71)) *Sal* I restriksiyon endonükleaz aktivitesi ile lineer hale getirilen rekombinant vektörler elektroporasyon uygulaması ile konakçı *P. pastoris* hücrelerine transfer edilmiştir (Şekil 4.1). Daha önce de bahsedildiği üzere *P. pastoris*'in heterolog protein üretimi için uygun birçok suşu mevcuttur. Bu çalışma kapsamında en yaygın kullanılan suşlar arasında yer alan KM71 suşu seçilmiştir. His- olan bu suş histidin içermeyen ortamda gelişemeyeceği bilindiğinden *HIS4* gen fragmanı içeren ekspresyon vektörü (Şekil 4.1) seçilerek transformasyondan sonra rekombinant mayaların histidin içermeyen kültür ortamında kolayca seçilmesi sağlamıştır.



Şekil 4.1. Hedef gen bölgesinin *Pichia* genomuna entegrasyonu. Hedef gen KM71 genomuna aox1::ARG4 lokusundan entegre edilmiştir. aox::ARG4: *P. pastoris* KM71 genomunda ARG4 geninin entegrasyonu ile bütünlüğü bozulmuş AOX1 bölgesini ifade eder. HIS4: KM71 genomlarında mutasyona uğramış halde bulunan his4 geninin vektör üzerindeki komplementeri

Histidin içermeyen kültür ortamında seçilen transformantlardan elde edilen DNA'lar 5'AOX/3'AOX primer seti ile amplifiye edildiğinde hedef gen fragmanlarını içeren ve konakçı hücre genomuna doğru şekilde entegre olmuş çok sayıda rekombinant *P. pastoris* hücresi elde edildiği görülmüştür. COL-1 gen fragmanını içeren rekombinant *P. pastoris* hücrelerine ait DNA'larla gerçekleştirilen PCR sonucunda hem *P. pastoris* KM71'in kendi AOX1 gen bölgesi bozulmuş olduğundan yalnızca rekombinant vektörün hücre genomuna entegre olduğunu doğrulayan yaklaşık 1300 bp'lik PCR ürünleri elde edilmiştir. Böylece transformasyonun gerçekleştirildiği ve hedef genlerin *P. pastoris* hücre genomlarına doğru şekilde entegre edildiği sonucuna varılmıştır.

Hedef genlerin *P. pastoris* hücreleri tarafından ekspres edilip edilmediklerine ise transformantlardan elde edilen RNA'ların "COL-1/F&COL-1/R" primer setleri ile amplifiye edilmesi sonucunda karar verilmiştir. *P. pastoris* KM71 RNA'larının kalıp olarak kullanıldığı RT-PCR sonucunda COL-1/F&COL-1/R primer seti ile yaklaşık 800 bp'lik PCR ürünü elde edilmiştir. PCR ürünleri sekans dizi analizi ile de doğrulanmış ve dizi analizi sonuçlarının *Bos taurus* collagen, type I, alpha 1 (COL1A1), mRNA dizisi ile eşleştiği tespit edilmiştir. Ancak bu eşleşme parçalı bir eşleşme olup COL-1 gen fragmanının bazı bölgeleri *Bos taurus* COL1A1 mRNA dizisi ile birebir örtüşürken, dizi analizi sonucunda var olan bazı bölgelerin *Bos Taurus* COL1A1 mRNA dizisi

üzerinde olmadığı görülmüştür (Ek-5). Dolayısıyla gen bankası veri tabanında bulunan *Bos Taurus* COL1A1 mRNA dizisinin eksik fragmanları içerdiği kanısına varılmıştır.

Sonuç olarak sığır COL1A1 geni üzerinde bulunan COL-1 (~800bp) hedef gen fragmanı *P. pastoris* KM71 hücrelerinde başarılı bir şekilde transkript olmuştur.

4.3 Genel Değerlendirme ve Öneriler

Rekombinant sistemlerde üretilen biyopolimerlerden birçoğu günümüzde ticarileştirilmiş ve esas kaynakları olan hayvan ya da insan kaynaklı biyomateriyaller yerine kullanılmaktadır. Hatta bu teknoloji, üretilen biyopolimerin çeşitli özelliklerinin değiştirilmesine ya da geliştirilmesine imkân sağladığı için rekombinant ürünlerin üretilmesi tercih edilir hale gelmiştir. Yapılan çalışmalar doğal ya da sentetik kollajen fragmanlarının farklı biyolojik sistemlerde ekspres edilerek rekombinant kollajen/jelatin üretililebileceğini göstermiştir. Ayrıca bu alanda yapılan çalışmalar ticarileştirilmiş, elde edilen rekombinant kollajen/jelatinler medikal uygulamalar başta olmak üzere farklı sektörlerde tüketici ve araştırmacıların kullanımına sunulmuştur. Örneğin *P. pastoris* tarafından ekspres edilen düşük molekül ağırlıklı (8.5kDa) rekombinant jelatin, dokulara enjekte edilen biyolojik ürünlerde stabilizör olarak kullanılmıştır (Olsen et al. 2003a; Olsen et al. 2005). Rekombinant kollajen/jelatin, hayvansal kökenli kollajen / jelatin, ile kıyaslandığında sağlık açısından daha güvenli bulunmuştur. Ayrıca hayvansal jelatinin aksine istenilen uzunlukta ve baz dizisinde gen bölgeleri kullanıldığı için rekombinant jelatinin fragman uzunluğu ve amino asit kompozisyonunun rahatça kontrol altında tutulabildiği ve bu sayede istenilen teknolojik özelliğe sahip standart kalitede jelatin kompozisyonlarının oluşturulabildiği kaydedilmiştir (Olsen vd., 2003; Báez vd., 2005).

Bu güne kadar rekombinant kollajen ve jelatin üretmek için birçok ekspresyon sistemi kullanılmıştır. Başlangıçta memeli ve böcek hücreleri rekombinant sistem olarak kullanılmış olsa da memeli hücrelerinde protein verimi 0.6-20 mg/l civarında iken böcek hücrelerinde ancak 40 mg/l'nin üzerinde üretim yapılabilmiştir. Fakat bu üretim seviyesinin ticari üretim için oldukça düşük olduğu görülmüş ve memeli ya da böcek hücrelerinin ticari rekombinant kollajen/jelatin eldesi için oldukça pahalı sistemler olduğu kanaatine varılmıştır. Rekombinant protein eldesinde maya ya da bakteriyel sistemlerde gerçekleştirilen fermantasyon prosesi ile üretim miktarının 5-10 kat

artırılabilceği görülmüştür (Olsen vd., 2003). Yapılan çalışmalarda mayaların tekrarlayan genleri ekspres etmekte daha başarılı olduğunun görülmesi, rekombinant protein üretiminde bakteriler yerine mayaların daha çok tercih edilmesini sağlamıştır (Strausberg ve Link, 1990; Fahnestock ve Bedzyk, 1997). Metilotrofik bir maya olan *P. pastoris* heterolog proteinlerin üretimi için mükemmel bir ev sahibi olarak kabul edilmiştir. *P. pastoris*'in kültür ortamında çok yüksek hücre yoğunluğuna (>500 g/L yaş hücre ağırlığı) ulaşması, yüksek miktarda rekombinant kollajen birikimi (>1 g/L) ile birleştiğinde bu tablo ticari ölçekte rekombinant kollajen üretimi için *P. pastoris*'in etkili ve ekonomik bir sistem olduğunu göstermektedir (Yang vd., 2004; Li vd., 2015; Báez vd., 2005).

Mevcut avantajları göz önünde bulundurularak bu araştırma kapsamında da konakçı hücre olarak *P. pastoris* tercih edilmiştir. Daha önce de bahsedildiği üzere *P. pastoris*'in heterolog protein üretimi için uygun birçok suşu mevcuttur. Bu çalışma kapsamında en yaygın kullanılan suşlar arasında yer alan KM71 suşu seçilmiştir.

P. pastoris'te heterolog protein ekspresyonu hücre içi ya da hücre dışı olarak gerçekleştirilebilir. Ancak hücre dışına salgılama çok daha avantajlıdır. Çünkü *P. pastoris* kültür ortamına çok az miktarda kendi doğal proteinlerini salgılamaktadır. Bu nedenle üretilen rekombinant protein kültür ortamındaki toplam proteinin çoğunluğunu oluşturur. Bu durum rekombinant proteinin kültür ortamından saflaştırılmasını kolaylaştırır ve daha purifikasyonun ilk basamağında rekombinant proteini elde etmek mümkündür (Barr vd., 1992). Proteinin hücre dışına salgılanması için bir salgılama işaret dizisi gereklidir. Bugüne kadar başarı ile kullanılan birçok farklı işaret dizisi mevcut ise de yapılan çalışmalarda en çok *S. cerevisiae* faktör prepro peptid salgılama işaret dizisi (α -mating factor prepro signal) kullanılmıştır (İnvitrogen, 2010; Cregg vd., 1993; Scorer vd., 1993). Bu çalışmada kullanılan pPIC9 ekspresyon vektörü de 949-1215 bazları arasında bu işaret dizisini taşıyan ve ekspres edilen proteinin hücre dışına salgılanmasını sağlayan bir *P. pastoris* HIS4 vektörüdür. Bu vektör üzerindeki çoklu klonlama bölgesi sayesinde hedef genin çoklu kopyaları tek bir vektörde klonlanabilir. Yapılan bir çalışmada pPIC9 ekspresyon vektörü seçilerek fare tip II ve tip I kollajen fragmanlarının ekspres edildiği *P. pastoris* sisteminde, kondalanan dizinin 15 kopyasını aynı anda içeren hücreler kullanılarak 14.8g/l rekombinant protein elde edildiği kaydedilmiştir. Tekli kopya içeren transformantlarda üretilen rekombinant jelatin

miktarının ise 3-6 g/l olduğu belirtilmiştir (Werten vd., 1999; Báez vd., 2005). Ancak pPIC9 ekspresyon vektörü kültür ortamına salınan rekombinant proteinin kolayca ortamdan saflaştırılmasını sağlayan antikor bölgesi (polyhistidine (6×His) tag içerir) içermez. Bu eksiklik rekombinant protein üretimine engel değildir ancak salgılanan rekombinant proteinin kültür ortamından saflaştırılması zorlaşır. Bu araştırmada görülmüştür ki rekombinant jelatinin *P. pastoris*'te ekspresyonu için antikor bölgesi içeren vektörlerin (örn: pPICZα A, B, and C) ekspresyon vektörü olarak kullanılması daha uygundur.

Rekombinant kollajenin *P. pastoris* sisteminde ekspresyonu alkol oksidaz promotörünün kontrolü altında gerçekleşir. Bu nedenle metanol geri beslemesi rekombinant protein üretimini indükler. Bir maya sisteminde ekspres edilen rekombinant materyal %90-95 oranında monomoleküler kollajen ve kollajen tipine bağlı olarak yaklaşık %5-10 dimer içerir. Oysa dokudan elde edilen doğal kollajen lisil oksidazın aktivitesi nedeniyle daha yüksek oranda dimer, trimer ve diğer yüksek moleküler oligomerleri içerir. Örneğin deriden izole edilen doğal sığır tip I kollajenin (Vitrogen®) rekombinant tip I kollajen ile birlikte analiz edildiğinde doğal kollajenin yalnız %46'sı monomerik üçlü sarmal molekül olduğu geriye kalan %54'lük kısmın ise dimer, trimer ve diğer yüksek moleküler oligomerlerin bir karışımı olduğu görülmüştür. Dolayısıyla rekombinant kollajen ile hayvansal dokudan elde edilen doğal kollajen arasında oldukça dikkat çekici bir fark mevcuttur. Bu nedenle maya sistemlerinde üretilen rekombinant kollajen dokudan elde edilen doğal kollajenden çok daha homojen bir yapıya sahiptir (Yang vd., 2004).

Bilindiği üzere kollajen, Gly-X-Y şeklinde tekrarlayan üçlü peptid dizilerinden oluşmaktadır. X ve Y herhangi bir amino asit olabilmesine karşın X pozisyonunda genelde prolin; Y pozisyonunda ise hidroksiprolin bulunur. Hidroksiprolin rezidüleri kollajenin kompleks basamaklardan oluşan biyosentezi sırasında Y pozisyonundaki prolininin, prolil 4-hidroksilaz (*P4H*) enzimi aktivitesi ile hidroksillenmesi sonucu oluşur. Hidroksiprolin prokollajenin uygun katlanması için elzemdir ve kollajenin jel kapasitesini ve jelin stabilitesini etkiler. Dolayısıyla rekombinant jelatin için de hidroksiprolin, jelatinin çözünme ve jelleşme gibi özelliklerine etki eder. Rekombinant kollajenin, rekombinant *P4H* ile birlikte ifadesi, doğal kollajenle benzer fibril yapısına

ve ısıl stabiliteye sahip hidroksillenmiş rekombinant protein sentezlenmesini sağlamaktadır (Báez vd., 2005).

Bakteri ve mayalar *P4H* aktivitesine sahip değildir, böcek ve memeli hücrelerinde ise yeterli seviyede *P4H* aktivitesi bulunmaz. Dolayısıyla birçok sistemde ekspres edilen rekombinant kollajen/jelatin üçlü sarmal yapısında polipeptid zincir içermeyen ya da düşük sıcaklıklarda stabilitesi bozulan üçlü sarmal yapıya sahip, fonksiyonel olmayan ürünlerdir (Vuorela vd., 1997). Oysa hayvansal dokulardan elde edilen doğal jelatin, yapısındaki sarmal yapıyı stabilize eden yüksek hidroksi prolin içeriği nedeniyle yüksek jelleşme sıcaklığına sahiptir. Werten vd. (1999), 21-72kDa aralığındaki fare tip III ve tip I kollajen fragmanlarını *P. pastoris* hücrelerinde ekspres etmiştir. *P. pastoris*'in hiçbir endojen *PH4* aktivitesi olmadığı için rastgele sarılmış, jelleşme özelliği olmayan ve proteolitik degradasyona duyarlı hidroksillenmemiş α -zincirleri elde edilmiştir. Bu durum göstermiştir ki fiziksel ve kimyasal yapısı ile hayvansal jelatin ile benzer rekombinant jelatin üretebilmek için kollajen gen fragmanlarının *P4H* ile birlikte ekspres edilmesi gerekmektedir. Ancak düşük sıcaklık gerektiren bazı uygulamalarda jelatinin bu yüksek sıcaklıkta jelleşme kabiliyeti istenmeyen bir özelliktir (örneğin aşılar) (Olsen, 2003a). Ayrıca kollajen dizilerinin aktivitesi üçlü heliks yapı gerektirse de hücre membran adhezyon adaptörü olarak tanınan Arg-Gly-Asp (RGD) tripeptidleri gibi bazı üçlü sarmal konformasyonlar doğal kollajen polipeptid yapısı içerisinde iken fonksiyonel olmayabilir. Bu tip peptidlerin rekombinant olarak eldesi için de hidroksillenmeye ihtiyaç yoktur. Diğer yandan doku mühendisliği biyometaryalleri oluşturmak için başka polimer veya kimyasallara bağlanmak üzere bazı kollajen benzeri proteinler de hidroksillendirme yapılmadan dizayn edilip ekspres edilmiştir. Li vd., (2015), hidroksillenmemiş tek zincirli insan COL3A1 tam gen fragmanını AOX1 promotörünün kontrolü altında *P. pastoris* hücresinde ekspres etmiştir (Li vd., 2015). Abdemami vd. (2011), tarafından gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise insan deri fibroblastından elde edilen RNA, iki farklı primer aracılığı ile amplifiye edilmiş ve bu kollajen fragmanlarını içeren iki farklı ekspresyon vektörü hazırlanmıştır. Böylece hidroksillenmemiş insan tip I kollajen fragmanlarının maya hücresinde ekspresyonu için uygun ekspresyon vektörleri oluşturulmuştur. Kollajen tip I'in genomik fragmanı 1999 yılında Toman vd. (1999), tarafından farelerde klonlanmış ve fare sütünde rekombinant kollajen üretilmiştir. Üretilen kollajenin çok düşük miktarda hidroksiprolin içerdiği ve

fonksiyonel açıdan da arzu edilen özellikte olmadığı kaydedilmiştir (Toman vd., 1999). Bir yıl sonra Ruggiero vd. (2000), kollajen tip I genini tütün bitkisinde klonlamış ve ekspres etmiştir (Ruggiero vd., 2000). Daha sonra Merle ve ark. (2002) insan kollajen tip III genini ipek böceğinde ekspres ederek üçlü heliks formda olmayan ve hidroksillenmemiş rekombinant kollajen elde etmiştir. 2000 yılında başka bir çalışma ile rekombinant hidroksillenmemiş insan tip I prokollojen trimerleri de aynı şekilde *S.cerevisiae*'da ekspres edilmiştir (Toman vd., 2000).

Her ne kadar bugüne kadar yapılan bazı çalışmalarda *P4H* enziminin eksik olduğu ekspresyon şartlarında, hidroksillenmemiş jelatin fragmanları ekspres edilmiş olsa da günümüzde *P4H* ve kollajen polipeptid zinciri eş zamanlı olarak ekspres edilerek stabil rekombinant kollajen/jelatin üretilmektedir (Lamberg vd., 1996; Myllyharju vd., 1997; John vd., 1999; Vuorela vd., 1999; Toman vd., 2000; Nokelainen vd., 2001; Merle vd., 2002). *P. pastoris*'in rekombinant suşlarının hücre içi hidroksillenmiş üçlü sarmal yapıda rekombinant insan kollajeni üretimleri 1.5 g/l'nin üzerine çıktığı gösterilmiştir. Ayrıca hayvansal kaynaklı jelatinin yerine kullanılabilecek fizikokimyasal özelliklere sahip, farklı uzunluk ve kompozisyonlarda rekombinant kollajeni yüksek seviyede (3 -14 g/l) üreterek hücre dışına salgılayabilecek *P. pastoris* sistemleri oluşturulmuştur. (Olsen vd., 2003b). 8.7-53 kDA aralığında ürün veren tip I ve tip III kollajen fragmanları de *P4H* enzimi ile birlikte *P. pastoris* hücresinde başarı ile ekspres edilmiş ve hücre kültür ortamına salınmıştır (Werten vdl., 1999; Olsen vd., 2003b, Olsen vd., 2005). Pakkanen vd. (2006), tarafından 45 ve 9 kDa uzunlukta tek zincirli iki adet tip I kollajen fragmanı *P. pastoris* hücresinde ekspres edilmiştir. *P. pastoris* tarafından insan pro α 1(I) zincirinin farklı uzunluktaki fragmanları ekspres edilerek değişen büyüklüklerde (56-1014 amino asit) rekombinant jelatin üretilmiştir (Olsen vd., 2000; Olsen vd., 2003b). Duan vd. (2011), ise insan α 1(I) prokollajen gen fragmanını *P4H* enzimi ile birlikte *P. pastoris* KM71'de ekspres etmiştir. Yine Vuorela vd. (1997), insan kollajen tip II geninin ve Nokelainen vd. (2001), insan kollajen tip I geninin *P. pastoris*'te ekspresyonu sonucunda yüksek miktarlarda rekombinant kollajen elde edilebileceğini kaydetmiştir.

Görüldüğü gibi farklı kaynaklardan elde edilen kollajen gen fragmanları ile farklı ekspresyon sistemlerinde hidroksillenmiş ya da hidroksillenmemiş kollajen/jelatin üretimine yönelik birçok çalışma vardır. Bugüne kadar yapılan çalışmalar daha çok

medikal ve farmakolojik uygulamalarda kullanılabilecek mikrobiyal insan kollajeni veya jelatini üretmeye yöneliktir. Oysa hayvansal kaynaklardan elde edildiği için bir çok tereddüde neden olan jelatin gıda sanayi için de vazgeçilmez bir katkı maddesidir ve bugüne kadar gıda sanayinde kullanılmak üzere rekombinant jelatin üretimine yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu araştırmada sığır COL1A1 geni üzerinde bulunan yaklaşık 800 bç'lik gen fragmanının *P. pastoris* hücrelerinde transkripsiyonu sağlanmış ancak transformasyon *P4H* enzimi eşliğinde gerçekleştirilmediği için hidroksillenmemiş rekombinant $\alpha 1(I)$ prokollajen fragmanları transkript edilmiştir. Bu araştırma, gıda sanayi için rekombinant sığır jelatini üretimine yönelik olarak yapılmış ilk çalışmadır. Gıda sanayi için uygun fonksiyonel özelliklere sahip rekombinant jelatinin *P. pastoris*'te ekspresyonu için aşağıdaki sonuç ve öneriler dikkate alınarak daha ileri çalışmalar yapılması önerilmektedir.

Sonuç olarak bu araştırma ile ulaşılan sonuçlar aşağıdaki gibidir;

- Bu araştırma kapsamında sığıra ait yalnızca yaklaşık 800 bç'lik kollajen gen fragmanı *P. pastoris* ekspresyon sisteminde başarıyla transkript edilmiştir. Ancak gıda sanayinde kullanılan jelatin, kollajenin kısmi degradasyonu ile elde edildiğinden çok sayıda farklı uzunluk ve moleküler ağırlığa sahip kollajen fragmanlarından oluşmaktadır. Bu durum jelatinin fiziko kimyasal özelliklerini etkilemektedir. Dolayısıyla fonksiyonel bir rekombinant jelatin elde etmek için daha farklı kollajen fragmanlarının da maya hücresinde ifade edilmesi gereklidir. Hatta farklı uzunluk ve moleküler ağırlıklara sahip kollajen fragmanları aynı anda ekspres edilerek uygun jelatin kompozisyonları denemelidir.
- Bu araştırma kapsamında hedef gen fragmanlarının *P4H* enzimi eşliğinde ekspresyonu gerçekleştirilmemiştir. Dolayısıyla ifade edilen fragmanlar hidroksillenmemiş haldedir. Oysa *P4H* enziminin jelatinin jelleşme kabiliyeti üzerine önemli bir etkisi vardır. Ekspresyonun *P4H* enzimi eşliğinde gerçekleştirilmesi halinde fonksiyonel açıdan gıda sanayinin kullanımına uygun hidroksillenmiş rekombinant jelatin elde edilebilecektir. Dolayısıyla bu çalışma ışığında kollajen gen fragmanları *P4H* enzimi ile birlikte ekspres edilmeli ve hatta farklı seviyelerde hidroksillendirilmiş, farklı jelleşme kabiliyetlerine sahip rekombinant jelatin üretimleri denemelidir.

- Bu araştırma kapsamında kullanılan pPIC9 ekspresyon vektörü antikor bölge içermeyen bir vektördür. Bu vektör yerine rekombinant proteinin kolayca ortamdan saflaştırılmasını sağlayan antikor bölgesi içeren alternatif ekspresyon vektörlerinin kullanılmasının rekombinant proteinin tespitini kolaylaştıracağı düşünülmektedir.
- Daha önce de bahsedildiği üzere memeli dokularından elde edilen jelatin farklı uzunluk, amino asit dizilimi ve moleküler ağırlıklara sahip kollajen fragmanları içerir. Ancak geleneksel yöntemle yapılan jelatin üretiminde kollajenin kısmi hidroksilasyonu ile oluşan kollajen fragmanlarının uzunluklarına müdahale etmek mümkün değildir. Oysa rekombinant jelatin üretiminin en önemli avantajlarından birisi de ifade edilecek genin seçilebilmesi, modifiye edilebilmesi ve farklı gen kombinasyonlarının aynı anda ifade edilebilmesidir. Bu nedenle bu çalışma ışığında farklı uzunlukta gen fragmanları ekspres edilerek gıda sanayi için farklı fonksiyonel özelliklere sahip, istenilen teknolojik özelliklerde rekombinant jelatinler elde edilebilir. Böylece farklı sektörlerde kullanılmak üzere farklı amino asit kompozisyonlarına ve farklı jelleşme kabiliyetlerine sahip rekombinant jelatin üretimleri denenebilir.
- Ayrıca üretim maliyeti rekombinant protein eldesinde önemli bir husustur. Üretim miktarını artırmak için hedef gen fragmanlarının birçok kopyası aynı anda ekspresyon vektörlerinin çoklu klonlama bölgesine bağlanarak tek bir hücrenin daha yüksek oranda rekombinant jelatin üretmesi için çalışmalar yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Abdemami, B., Shokrgozar, M.A., Shahreza H.K., Ghavami M., 2011. Design and Construction of Two Yeast Shuttle Vectors Containing Human Procollagen Genes Expression Cassette for Expression in Yeast. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**, 3 (1): 11-18.
2. Al-Saidi, G. S., Al-Alawi, A., Rahman, M. S., Guizani, N., 2012. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopic Study of Extracted Gelatin from Shaari (Lithrinus Microdon) Skin: Effects of Extraction Conditions. **International Food Research Journal**, 19 (3): 1167-1173.

3. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter P., 2008. Molecular Biology of The Cell (5th Ed.). Garland Science, New York, USA, 1725pp.
4. Anonim, 2006. <http://www.gelatine.org/en/gelatine/overview/127.htm>.
5. Anonim, 2007. Global Halal Food Market.
http://ats.agr.gc.ca/africa/4352_e.htm#_Toc171306542.
6. Anonim, 2008. All About Gelatin. Gelatine Manufactures of Europe,
<http://www.gelatine.org/en.html>.
7. Anonim, 2010. <http://halalmedia.my/gelatin-and-why-muslims-should-be-wary.html>
8. Anonim, 2011. *Avian influenza*. PubMed Health. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0004522/>.
9. Anonim, 2012. Gelatin handbook. Gelatin Manufacture Institute of America, http://www.gelatin-gmia.com/images/GMIA_Gelatin_Manual_2012.
10. Anonim 2014. Gelatin Market Analysis By Raw Material (Pig Skin, Bovine Hides, Bones), By Application (Food & Beverage, Nutraceuticals, Pharmaceuticals, Photography, Cosmetics) And Segment Forecasts To 2020.
<http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/gelatin-market-analysis>.
11. Ausubel, E. F., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Struhl, K., 2001. Current Protocols in Molecular Biology. Michigan University, Michigan, ABD, 1600pp.
12. Báez, J., Olsen, D., Polarek, J. W., 2005. Recombinant Microbial Systems For The Production of Human Collagen and Gelatin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **69**: 245–252.
13. Bailey, A. J., Light, N. D., 1989. Connective Tissue in Meat and Meat Products (19th ed.). Elsevier Applied Science, United Kingdom, 356pp.
14. Balamurugan, V., Reddy, G. R., Suryanarayana V. V. S., 2007. *Pichia pastoris*: A Notable Heterologous Expression System for The Production of Foreign Proteins—Vaccines. **Indian Journal of Biotechnology**, **6**: 175-186.
15. Barr, K. A., Hopkins, S. A., Sreekrishna, K., 1992. Protocol for Efficient Secretion of HSA Developed from *Pichia pastoris*. **Pharmaceutical_Engineering**, **12**: 48-51.
16. Bhattacharjee, A., Bansal, M., 2008. Collagen Structure: The Madras Triple Helix and the Current Scenario. *IUBMB Life*, **57** (3): 161-172.

17. Bell, M. P., Neff, T. B., Polarek, J. W., Seeley, T. W., 2007. Bovine Collagen and Method For Producing Recombinant Gelatin. European Patent, PCT/US2000/030792, October, 3, 2007.
18. Bickle, T. A., Krüger, D. H., 1993. Biology of DNA Restriction. **Microbiology Reviews**, 57 (2): 434–50.
19. Birben, E., 2007. Polimeraz Zincir Reaksiyonu - Restriksiyon Parça Uzunluğu Polimorfizmi (PCR-RFLP) DNA'nın Restriksiyon Endonükleazlar ile Kesimi. **Astım Allerji İmmünoloji**, 5 (1):53-55.
20. Bodo, B., Chang, R., Hamalainen, E., Leigh, S., McMullin, H., Olsen, D., Revak, T., Yang, C., Polarek, J., 2004. Production of Triple-Helical Recombinant Human Collagen in *P. Pastoris*. Annual Meeting Industrial Microbiology and Biotechnology, Anaheim, CA, USA.
21. Boran, G., Regenstein, J. M., 2010. Fish Gelatin, pp. 119-144. *In: Advances in Food and Nutrition Research* (Eds. S. L., Taylor,), Academic Press, UK.
22. Boran, G., 2011. Bir Gıda Katkısı Olarak Jelatin: Yapısı, Özellikleri, Üretimi, Kullanımı ve Kalitesi. **GIDA**, 36 (2): 97-104.
23. Bruin, E. C., Wolf F. A., Laane, N. C., 2000. Expression and Secretion Of Human Alpha1(I) Procollagen Fragman by *Hansenula Polymorpha* as Compared to *Pichia pastoris*. **Enzyme and Microbial Technology**. 26:640–644.
24. Bruin, E. C., Werten, M. W., Laane, C., Wolf, F. A., 2002. Endogenous Prolyl 4-Hydroxylation in *Hansenula Polymorpha* and Its Use for the Production of Hydroxylated Recombinant Gelatin. **FEMS Yeast Research**, 1:291–298.
25. Bulleid, N. J., John, D. C., Kadler, K. E., 2000. Recombinant Expression Systems For The Production of Collagen. **Biochemical Society Transactions**, 28:350–353.
26. Chavez, F. V., Hellstrand, E., Halle, B., 2006. Hydrogen Exchange and Hydration Dynamics in Gelatin Gels. **The Journal of Physical Chemistry B**, 110: 21551-21559.
27. Cheng, F.Y., Hsu, F.W., Chang, H.S., Lin, L.C. and Sakata, R., 2009. Effect of Different Acids on the Extraction of Pepsin-Solubilised Collagen Containing Melanin From Silky Fowl Feet. **Food Chemistry**, 113: 563–567.
28. Chiou B., Avena-Bustillos R. J., Bechtel P. J., Imam S. H., Glenn G. M., McHugh T. H., and Orts W. J., 2011. Fish Gelatin, pp. 143-157. *In: Renewable Resources*

- and Renewable Energy (Eds. P., Fornasiero, M., Graziani). Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, US.
29. Cliché, S., Amiot, J., Avezard, C., Gariepy, C., 2003. Extraction and Characterization of Collagen With or without Telopeptides from Chicken Skin. **International Journal of Poultry Science**, **82**: 503-509.
 30. Cole, B., 2000. Gelatin, pp. 1183-1188. *In: Encyclopedia of Food Science and Technology*, 2nd edition, (Eds. F.J., Francis), John Wiley & Sons, New York.
 31. Cregg, J. M., Vedvick, T. S., and Raschke, W. C. (1993) Recent Advances in the Expression of Foreign Genes in *Pichia pastoris*. **Bio/Technology**, **11**:905-910.
 32. Cregg, J. M., 2008. DNA-Mediated Transformation, pp. 27-42. *In: Pichia Protocols* (Eds. J. M., Cregg), Humana Press, Totowa.
 33. Cregg, J. M., Tolstorukov, I., Kusari, A., Sunga, J., Madden, K., Chappell, T., 2009. Expression in the Yeast *Pichia pastoris*. **Methods in Enzymology**, **463**: 169-189.
 34. Çelebi, E., 2009. Krabrolinin *P. pastoris*'te Üretimi ve Optimizasyonu. Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir, 62 s.
 35. Çelik, E., Çalık, P., 2012. Production of Recombinant Proteins by Yeast Cells. **Biotechnology Advances**, **30**: 1108–1118.
 36. Daly, R., Hearn, M. T., 2005. Expression of Heterologous Proteins in *Pichia Pastoris*: a Useful Experimental Tool in Protein Engineering and Production. **Journal of Molecular Recognition's**, **18** (2): 119-138.
 37. Datar, R.V., Cartwright, T., Rosen, C. G., 1993. Process Economics of Animal Cell and Bacterial Fermentations: A Case Study Analysis of Tissue Plasminogen Activator. **Bio/technology**, **11**: 349– 357.
 38. Dickinson, E., 2003. Hydrocolloids at Interfaces and the Influence on the Properties of Dispersed Systems. **Food Hydrocolloids**, **17** (1): 25-39.
 39. Djabourov, M., Lechaire, J., ve Gaill, F., 1993. Structure and Rheology of Gelatin and Collagen Gels. **Biorheology**, **30** (3-4): 191-205.
 40. Duan, H., Umar, S., Xiong, R., Chen, J., 2011. New Strategy for Expression of Recombinant Hydroxylated Human-Derived Gelatin in *Pichia pastoris* KM71. . **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **59**: 7127-7134.

41. Duconseille A., Astruc T., Quintana N., Meersman F., Sante-Lhoutellier V. (2015) Gelatin Structure and Composition Linked to Hard Capsule Dissolution: A Review, *Food Hydrocolloids*, 43:360-376.
42. Eastoe, J. E., 1955. The Amino Acid Composition of Mammalian Collagen and Gelatin. **Biochemical Journal**, 61(4): 589–600.
43. Engel, J., Bachinger H.P., 2005. Structure, Stability and Folding of the Collagen Triple Helix, pp. 7-33. *In: Collagen: Primer in Structure, Processing and Assembly*, (Eds. J., Brinckmann, H., Notbohm, P. K., Muller), Springer, USA.
44. Eskelin K, Ritala A, Suntio T, Blumer S, Holkeri H, Wahlstrom EH, et al. 2009. Production of a Recombinant Full-Length Collagen Type I Alpha-1 and of a 45-Kda Collagen Type I Alpha-1 Fragment in Barley Seeds. **Plant Biotechnology Journal**, 7 (7): 657-672.
45. Eyre, D. R., Wu, J. J., 2005. Collagen Cross-Links. **Topics in Current Chemistry**, 247: 207-229.
46. Eysturskarð, J., 2010. Mechanical Properties of Gelatin Gels; Effect of Molecular Weight and Molecular Weight Distribution. Norwegian University of Science and Technology, Department of Biotechnology, Ph.D. Thesis, Norwegian, 152 pp.
47. Fahnestock, S. R., Bedzyk, L. A., 1997. Production of Synthetic Spider Dragline Silk Protein in *Pichia Pastoris*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 47 (1):33-9.
48. Fickers, P., 2014. *Pichia Pastoris*: a Workhorse for Recombinant Protein Production. *Current Research in Microbiology and Biotechnology*, 2 (3): 354-363.
49. Friess, W., 1998. Collagen – Biomaterial for Drug Delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 45:113–136.
50. Francis, F. J., 2000. Gelatin. *Encyclopedia of Food Science and Technology*, 2nd edition. 4 Vols. New York: John Wiley & Sons, 1183-1188.
51. Gellissen, G., 2005. *Production of Recombinant Proteins*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 429.
52. Gómez-Guillén, M. C., Turnay, J., Fernández-Díaz, M. D., Ulmo, N., Lizarbe, M. A., Montero, P., 2002. Structural and Physical Properties of Gelatin Extracted

- from Different Marine Species: A Comparative Study. **Food Hydrocolloids**, **16** (1): 25-34.
53. Gómez-Guillén, M. C., Perez-Mateos, M., Gómez-Estaca, J., Lopez-Caballero, E., Gimenez, B., Montero, P., 2009. Fish Gelatin: A Renewable Material for Developing Active Biodegradable Films. *Trends in Food Science And Technology*, **20**: 3-16.
 54. Gómez-Guillén, M. C., Giménez, B., López-Caballero, M.E., Montero, M.P., 2011. Functional and Bioactive Properties of Collagen and Gelatin From Alternative Sources: A review. **Food Hydrocolloids**, **25**: 1813-1827.
 55. Gorgieva, S., Kokol, V., 2011. Collagen- vs. Gelatine-Based Biomaterials and Their Biocompatibility, 17-52 pp. In: *Biomaterials Applications for Nanomedicine* (Eds. R., Pignatello). InTech, Rijeka, Croatia.
 56. Griffith, F., 1928. The Significance of Pneumococcal Types. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, **27**: 113-159.
 57. Grobbs, A. H., Steele, P. J., Somerville, R. A., Taylor, D. M., 2004. Inactivation of the Bovine-Spongiformencephalopathy (BSE) Agent by the Acid and Alkaline Processes Used in The Manufacture of Bone Gelatin. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, **39** (3): 329–338.
 58. Guo, L., Colby, R. H., Lusignan, C. P., Whitesides, T. H., 2003. Kinetics of Triple Helix Formation in Semidilute Gelatin Solutions. **Macromolecules**, **36**: 999-1008.
 59. Hafidz, R. M., Yaakob, C. M., Amin, I., Noorfaizan, A., 2011. Chemical and Functional Properties of Bovine and Porcine Skin Gelatin Porcine Skin Gelatin. **International Food Research Journal**, **18**: 813-817
 60. Haug, I. J., Draget, K. I., Smidsrod, O., 2004. Physical and Rheological Properties of Fish Gelatin Compared to Mammalian Gelatin. **Food Hydrocolloids**, **18** (2): 203-213.
 61. Haug, I. J., Draget, K. I., 2009. Gelatin, pp. 67-86. In: *Handbook of Hydrocolloids*, (Eds. G. O., Phillips, P. A., Williams), Woodhead Publishing Ltd., Cambridge.
 62. Invitrogen, 2010. User Manual of Pichia Expression Kit For Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*. Catalog no. K1710-01.
 63. Invitrogen, 2004. User Manual of TA Cloning® Kit. Catalog no. K2020-20

64. Jahid M., 2003. Process Techniques for Production of Recombinant Proteins with *Pichia pastoris*. Royal Institute of Technology, Department of Biotechnology, Master of Science, Stockholm, 62.
65. Jain, S., Kaur, H., Pandav, G., Dewan, A., Saxena, D., 2014. Collagen: Basis of Life. **Universal Research Journal of Dentistry**, **4** (1): 1-9.
66. Jones, R. T., 2004. Gelatin: Manufacture and Physico-Chemical Properties, pp. 23-60. *In*: Pharmaceutical Capsules, (Eds. F. Podczek, B. E. Jones Pharmaceutical Press. United Kingdom, London.
67. Jungo, C., Marison, I., von Stockar, U., 2007. Mixed Feeds of Glycerol and Methanol Can Improve the Performance of *Pichia Pastoris* Cultures: A Quantitative Study Based on Concentration Gradients in Transient Continuous Cultures. **Journal of Biotechnology**, **128**: 824-837.
68. Karim A.A., and Bhat R., 2008. Gelatin Alternatives for the Food Industry: Recent Developments, Challenges and Prospects, A review. **Trends in Food Science & Technology**, **19**: 644-656.
69. Keenan, T. R., 1997. Gelatin, pp. 406-416. *In*: Encyclopedia of Chemical Technology (Eds. J. K., Kirk-Othmer). Wiley, New York.
70. Keizer-Gunnink I, Vuorela A, Myllyharju J, Pihlajaniemi T, Kivirikko KI, Veenhuis M., 2000. Accumulation of Properly Folded Human Type III Procollagen Molecules in Specific Intracellular Membranous Compartments in the Yeast *Pichia Pastoris*. **Matrix Biology**, **19** (1): 29-36.
71. Kobayashi, T., 1996. Properties and Functions of Gelatin. **Foods & Food Ingredients Journal of Japan**, **170**: 82-88.
72. Kobayashi, T., 2004. Restriction-Modification Systems as Minimal Forms of Life, pp 19-62. *In*: Restriction endonucleases (M. P., Alfred), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.
73. Krainer, F. W., Dietzsch C., Hajek, T., Herwig, C., Spadiut, O., Glieder, A., 2012. Recombinant Protein Expression In *Pichia Pastoris* Strains with an Engineered Methanol Utilization Pathway. **Microbial Cell Factories**, **11**: 22-36.
74. Li, P., Anumanthan, A., Gao, X. G., Ilangoan, K., Suzara V. V., Düzgüneş, N., Renugopalakrishnan, V., 2007. Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, **142**: 105–124.

75. Li, L. Fan, D., Ma, X., Deng, J. He, J., 2015. High-Level Secretory Expression and Purification of Unhydroxylated Human Collagen A1(III) Chain in *Pichia Pastoris* GS115. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, **62** (4): 467-75.
76. Lim, J., Oh, S. and Kim, K.O., 2001. The Effects of Processing Conditions on The Properties of Chicken Feet Gelatin. **Food Science and Biotechnology**, **10** (6): 638-645.
77. Lin, Y. K. and Liu, D. C., 2006. Effects of Pepsin Digestion at Different Temperatures and Times on Properties of Telopeptide-Poor Collagen from Bird Feet. **Food Chemistry**, **94**: 621–625.
78. Liu, D.C., Lin Y.K. and Chen M.T., 2001. Optimum Condition of Extracting Collagen from Chicken Feet and Its Characteristics. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, **14** (11): 1638-1644.
79. Merle, C., Perret, S., Lacour, T., Jonval, V., Hudaverdian, S., Garrone, R., 2002. Hydroxylated Human Homotrimeric Collagen I in *Agrobacterium Tumefaciens*-Mediated Transient Expression and in Transgenic Tobacco Plant. **FEBS Letters** **515** (1): 114- 118.
80. Mohtar, N. F., Perera, C. O. and Quek, S. Y., 2011. Utilisation of Gelatine From NZ Hoki (*Macruronus Novaezelandiae*) Fish Skins. **International Food Research Journal**, **18** (3): 1111-1115.
81. Mouw, J. K., Ou, G., Weaver, V. M., 2014. Extracellular Matrix Assembly: A Multiscale Deconstruction. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, **15**: 771–785.
82. Mullis, K., B., 1990. Recombinant DNA Technology and Molecular Cloning. **Scientific American**, **262**:36
83. Myllyharju, J., Nokelainen, M., Vuorela, A., Kivirikko, K. I., 2000. Expression of Recombinant Human Type I-III Collagens in the Yeast *P. Pastoris*. **Biochemical Society Transactions**, **28**: 353-357.
84. Myllyharju, J., Kivirikko, K. I., 2004. Collagens, Modifying Enzymes and Their Mutations in Humans, Flies and Worms. *Trends in Genetics*, **20** (1): 33-43.
85. Myllyharju, J., 2009. Recombinant Collagen Trimers from Insect Cells and Yeast. **Methods in Molecular Biology**, **139**: 39-48.
86. Nagai, T., Suzuki, N., 2000. Isolation of Collagen From Fish Waste Material Skin, Bone and Fins. **Food Chemistry**, **68**: 277-281.

87. Nik Aisyah, N. M., Nurul, H., Azhar, M. E., Fazilah, A., 2014. Poultry as an Alternative Source of Gelatin. **Health and the Environment Journal**, 5 (1): 37-49.
88. Nokelainen, M., Tu, H., Vuorela, A., Notbohm, H., Kivirikko, K. I., Myllyharju, J., 2001. High-Level Production of Human Type I Collagen in the Yeast *Pichia Pastoris*. **Yeast**, 18: 797–806.
89. Norizah, M. S., Badii, F., Howell, N. K., 2013. Preparation and Characterisation of Chicken Skin Gelatin as an Alternative to Mammalian Gelatin. **Food Hydrocolloids**, 30: 143-151.
90. Olsen, D., Chang, R., Jiang, J., Pirskanen, A., Myllyharju, J., Yang, C., Bodo, M., Jarvinen, M., Nevalainen, T., Hamalainen, E. R., Perala- Heape, M., Nokelainen, M., Kivirikko, K. I., Polarek, J., 2000. Development of Recombinant Human Gelatins and Specific Molecular Type Human Gelatins. Cambridge Healthtech Institute's 2nd Annual International Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSE Issues). Alexandria, VA (abstract)
91. Olsen, D., Chang, R., Sakaguchi, M., Leigh, S., Lundgard, R., Buschman, F., Lonergan, M., McMullin, H., Luehrs, C., Beardsley, A., Revak, T., Polarek, J. 2003a. Formulation Strategies for Biopharmaceuticals. Development of Recombinant Human Gelatin for Use as a Stabilizer in Biopharmaceuticals. Philadelphia, PA (abstract).
92. Olsen, D., Yang, C., Bodo, M., Chang, R., Leigh, S., Baez, J., Carmichael, D., Perala, M., Hamalainen, E., Jarvinen, M., Polarek, J., 2003b. Recombinant Collagen and Gelatin for Drug Delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 55: 1547– 1567.
93. Olsen, D., 2004. Recombinant Human Gelatin Vaccine Stabilizer: A Substitute for Animal-Derived Gelatin with Superior Features. The Seventh Annual Conference on Vaccine Research, May 24-26, 2004. Arlington, VA, USA (abstract).
94. Olsen, D., Jianga, J., Chang, R., Duffy, R., Sakaguchi, M., Leigh, S., Lundgard, R., Ju, J., Buschman, F., Truong-Le, V., Pham, B., Polarek, J. W., 2005. Expression and Characterization of a Low Molecular Weight Recombinant Human Gelatin: Development of a Substitute for Animal-Derived Gelatin With Superior Features. **Protein Expression and Purification**, 40: 346–357.

95. Page, A. P., Winter, A. D., 2003. Enzymes Involved in the Biogenesis of the Nematode Cuticle. **Advances in Parasitology**, **53**: 85–148.
96. Pakkanen, O., Pirskanen, A., Myllyharju, J., 2006. Selective Expression of Nonsecreted Triple-Helical and Secreted Single-Chain Recombinant Collagen Fragments in the Yeast *Pichia Pastoris*. **Journal of Biotechnology**, **123**: 248–256.
97. Palomares, L. A., Estrada-Mondaca, S., Ramirez, O. T., 2004. Production of Recombinant Proteins, pp. 15-51. In: Recombinant Gene Expression, (Eds. B., Paulina, L., Argelia), Humana Press, New York.
98. Pandav, G., Saxena, D., Kaur, H., Jain, S., Dewan, A., 2014. Collagen: Basis of Life. **Universal Research Journal of Dentistry** **4** (1):1.
99. Pannone, P. J., 2007. Trends in Biomaterials Research (first edition), Nova Science Publishers, ISBN-13: 978-1600213618, New York
100. Parenteau-Bareil, R., Gauvin, R., Berthod, F., 2010. Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. **Materials**, **3** (3): 1863-1887.
101. Prockop, D. J., Kivirikko, K. I., 1995. Collagens: Molecular Biology, Diseases, and Potential For Therapy. **Annual Review of Biochemistry**, **64**: 403–434.
102. Qu, H., 2014. Development of Secretion System for Heterologous Recombinant Protein Expression in *E. coli* Bacteria and *Pichia pastoris* Yeast. University Of California, Master of Science, Riverside, 62 pp.
103. Ramachandran, G. N., & Kartha, G., 1954. Structure of Collagen. **Nature**, **174**: 269-270.
104. Rammaya, K., Voon, Q. Y., Babji, A. S., 2012. Physicochemical Analysis of Gelatin Extracted from Mechanically Deboned Chicken Meat Residue. **International Journal of Food, Nutrition and Public Health**, **5** (1/2/3): 147-168.
105. Ritala, A., Wahlström, E. H., Holkeri, H., Hafren, A., Mäkeläinen, K., Baez, J., Mäkinen, K., Nuutila, A. M., 2008. Production of a Recombinant Industrial Protein Using Barley Cell Cultures. **Protein Expression and Purification**, **59**: 274–281.
106. Romanos, M. A., Scorer, C. A., Clare, J. J., 1992. Foreign Gene Expression in Yeast. **Yeast**, **8**: 423–488.

107. Ruggiero, F., Exposito, J. Y., Bournat, P., Gruber, V., Perret, S., Comte, J., Olaghier, B., Garrone, R., Theisen, M., 2000. Triple Helix Assembly and Processing of Human Collagen Produced in Transgenic Tobacco Plants. **FEBS Letters**, 469 (1): 132-136.
108. Sarkar, S., Chaudhuri, S., Basu, T., 2002. Mechanism of Artificial Transformation of *E. Coli* With Plazmid DNA – Clues from the Influence of Ethanol. **Current Science**, 83 (11): 1376-1380.
109. Schrieber, R., Gareis, H., 2007. Gelatine Handbook. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 335 pp.
110. Scorer, C. A., Buckholz, R. G., Clare, J. J., and Romanos, M. A., 1993. The Intracellular Production and Secretion of HIV-1 Envelope Protein in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. **Gene**, 136: 111-119.
111. Shoulders, M. D., Raines, R. T., 2009. Collagen Structure and Stability. **Annual Review of Biochemistry**, 78: 929-958.
112. Singh, S., Rama, Rao, K. V., Venugopal, K., Manikandan, R., 2002. Alteration in Dissolution Characteristics of Gelatin-Containing Formulations. **Pharmaceutical Technology**, 32: 36–42.
113. Singh B., Fleury C., Jalalvand F., Riesbeck K., 2012. Human Pathogens Utilize Host Extracellular Matrix Proteins Laminin and Collagen for Adhesion and Invasion of The Host. **FEMS Microbiology Reviews**, 36: 1122-1180.
114. Sjoberg, J. S., Bulterijs, S., 2009. Characteristics, Formation and Pathophysiology of Glucosepane: A Major Protein Cross-Link. **Rejuvenation Research**, 12 (2): 137-148.
115. Sodoyer, R., 2004. Expression Systems for the Production of Recombinant Pharmaceuticals. **Biodrugs**, 18 (1): 51-62.
116. Strausberg, R. L., Link, R. P., 1990. Protein-Based Medical Adhesives. **Trends Biotechnology**, 8 (2): 53-7.
117. Taheri, A., Kenari, A. M., Gildberg, A., Behnam, S., 2009. Extraction and Physicochemical Characterization of Greater Lizardfish (*Saurida tumbil*) Skin and Bone Gelatin. **Journal of Food Science**, 74 (3): 160-165.
118. Terpe, K., 2006. Overview of Bacterial Expression Systems for Heterologous Protein Production: From Molecular and Biochemical Fundamentals to Commercial Systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 72: 211–222.

119. Toman, P. D., Pieper, F., Sakai, N., Karatzas, C., Platenburg, E., Wit, I., 1999. Production of recombinant human type I procollagen homotrimer in the mammary gland of transgenic mice. **Transgenic Research**, **8** (6): 415-427.
120. Toman, P. D., Chisholm, G., McMullin, H., Giere, L. M., Olsen, D. R., Kovach, R. J., 2000. Production of Recombinant Human Type I Procollagen Trimers Using a Four-Gene Expression System in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, **275** (30): 23303-23309.
121. Van der Rest, M., Garrone, R., 1991. Collagen Family of Proteins. **FASEB Journal**, **5**: 2814–2823.
122. Vuorela, A., Myllyharju, J., Nissi, R., Pihlajaniemi, T., Kivirikko K., 1997. Assembly of Human Prolyl 4-Hydroxylase and Type III Collagen in the Yeast *Pichia Pastoris*: Formation of a Stable Enzyme Tetramer Requires Coexpression with Collagen And Assembly of a Stable Collagen Requires Coexpression with Prolyl 4-Hydroxylase. **The EMBO Journal**, **16** (22): 6702–6712.
123. Vuorio, E., Crombrughe, B., 1990. The Family of Collagen Genes. Annual Review of Biochemistry, **59**: 837-872.
124. Werten, M. W. T., Jansenvan den Bosch, T. J., Mooibroek, H., Wolf, F. A., 1999. High-Yield Secretion of Recombinant Gelatins by *Pichia pastoris*. **Yeast**, **15**: 1087–1096.
125. Werten, M. W. T., Wisselink, W. H., Jansenvan den Bosch, T. J., Bruin, E. C., Wolf, F. A., 2001. Secreted Production of a Custom-designed, High hidrophilic Gelatin in *Pichia pastoris*. **Protein Engineering**, **14** (6): 447-454.
126. Williams, R. J., 2003. Restriction Endonucleases: Classification, Properties and Applications. **Molecular Biotechnology**, **23** (3): 225-43.
127. Yang, C., Hillas, P. J., B'aez, J. A., Nokelainen, M., Balan, J., Tang, J., Spiro, R., Polare, J. W., 2004. The Application of Recombinant Human Collagen in Tissue Engineering. **Biodrugs**, **18** (2): 103-119.
128. Yetim, H., 2011. Jelatin Üretimi, Özellikleri ve Kullanımı, s86-94, 1. Ulusal Helal ve Sağlıklı Gıda Kongresi. 19 - 20 Kasım 2011, Ankara.
129. Yılmaz, H., 2002. Prion Hastalıkları-Bulaşabilen Süngerimsi Ensefalopatiler. **Ankem Dergisi**, **16** (3): 161-166.

130. Yung, K. L., Deng, C. L., 2006. Effects of Pepsin Digestion at Different Temperatures and Times on Properties of Telo peptide-Poor Collagen from Bird Feet. **Food Chemistry**, **94**: 621-625.
131. Zhang, C., Baez, J., Glatz, C. E., 2009. Purification and Characterization of a 44-kDa Recombinant Collagen I r 1 Fragman from Corn Grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **57**: 880–887.
132. Zhang, F., Xu, S., Wang, Z., 2011. Pre-treatment Optimization and Properties of Gelatin Drom Freshwater Fish Scales. **Food and Bioproducts Processing**, **89**: 185-193.
133. Zhou, P., Mulvaney, S. J., Regenstein, J. M., 2006. Properties of Alaska Pollock Skin Gelatin: A Comparison with Tilapia and Pork Skin Gelatins. **Journal of Food Science**, **71** (6): 313-321.

EKLER

Ek-1

Tampon ve Stok Çözeltiler

10X YNB (%13.4 yeast nitrogen base with ammonium sulfate without amino acids):

- amonyum sülfatlı ve hiç amino asit içermeyen yeast nitrogen base (YNB) (İnvitrogen)'den 134 g tartılıp 1 litre distile suda çözülür.
- Çözelti 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek steril edilir ve kullanılıncaya kadar 4°C'de depolanır.

500X B (0.02% Biotin):

- 20 mg biotin (.....) 100 ml distile suda çözülür.
- Çözelti 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek steril edilir ve kullanılıncaya kadar 4°C'de depolanır.

100X H (0.4% Histidin):

- 400 mg L-histidin 100 mL distile suda çözülür (çözünme güçtür bu nedenle çözelti 50°C'yi geçmeyecek şekilde hafif ısıtılarak gerçekleştirilir).
- 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek steril edilir ve kullanılıncaya kadar 4°C'de depolanır.

10X D (20% Dekstroz):

- 200 g D-glukoz 1 L distile suda çözülür.
- Çözelti 121°C'de 15 dk otaklav uygulanarak steril edilir.
- Kullanılıncaya kadar 4°C'de depolanır.

10X M (5% metanol)

- 5 mL metanol 95 mL distile su ile karıştırılır.
- Karışım 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek steril edilir ve kullanılıncaya kadar 4°C'de depolanır.

10X GY (10% Gliserol):

- 100 mL gliserol 900 mL distile su ile karıştırılır.
- Karışım 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek steril edilir.
- Kullanılıncaya kadar oda sıcaklığında depolanır.

100X AA (Tüm amino asitlerden %0.5):

- L-glutamik asit, L-metionin, L-lisin, L-lösin ve L-izolösin amino asitlerinin her birinden 500'er mg tartılır ve 100 ml distile su içerisinde çözülür.
- Çözelti 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek steril edilir ve kullanılıncaya kadar 4°C'de depolanır

1 M Potasyum Fosfat Buffer, pH 6.0:

1 M K₂HPO₄ çözeltisi hazırlama: 174 g K₂HPO₄ 750 mL distile suda çözündürülür, daha sonra son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlanır.

1 M KH₂PO₄ çözeltisi hazırlama: 136 g KH₂PO₄ 750 mL distile suda çözündürülür, daha sonra son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlanır.

1 M potasyum buffer oluşturmak için;

- 132 mL 1 M K₂HPO₄ çözeltisi ile , 868 mL of 1 M KH₂PO₄ çözeltisi karıştırılır.
- Fosforik asit ya da KOH kullanılarak pH 6.0±0.1 olacak şekilde ayarlanır.
- Çözelti 121°C'de 15 dk otaklav uygulanarak steril edilir ve kullanılıncaya kadar oda sıcaklığında depolanır.

Ampisilin Solüsyonu (100µg/mL):

- 200 mg ampisilin (Gibco) 20 mL steril suda çözündürülür.
- 1'er mL'lik tüplere porsiyonlandıktan sonra kullanılıncaya kadar -20 °C'de depolanır.

X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) (40 mg/mL) Solüsyonu:

- 40 mg X-Gal, 1 mL dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde çözülür.
- Çözeltiyi ışık geçirmeyen kahverengi şişe içerisine alınır ve -20 °C'de depolanır.

IPTG (isopropyl-β-d-thiogalactopyranoside) (100mM) Solüsyonu:

- 0.238 g IPTG tartılır 10 mL steril suda çözündürülür.
- Çözelti 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek steril edilir.
- 1'er mL'lik tüplere porsiyonlandıktan sonra kullanılıncaya kadar -20 °C'de depolanır.

CaCl₂ (Kalsiyum Klorür) Çözeltisi (100mM):

- 1.47 g CaCl₂ tartılır ve 100 mL distile suda çözündürülür.
- Çözelti oda sıcaklığında depolanır.

Ek-2***E. coli* ve *P. pastoris* Kùltür Ortamları****LB (Luria-Bertani) Sıvı Besiyeri:**

- 10 g tripton(Fluka), 5 g yeast ekstrakt(Merck), 10 g NaCl (Merck) tartılıp 950 mL distile suda çözölür.
- pH 7.0'a ayarlandıktan sonra çözeltinin son hacmi distile su ile 1 L'ye tamamlanır.
- 121°C'de 15 dk otoklav uygulanarak steril edilir.
- Besiyeri kullanılıncaya kadar 4°C'de depolanır.

*Eğer antibiyotikli besiyeri hazırlanacaksa otoklav edildikten sonra besiyeri ~55°C'ye soğutulur ve 100 µg/mL oranında ampisilin eklenir.

**E. coli* DH5α kùltürlerini uzun süre muhafaza etmek için 20:80 (v/v) oranda gliserol:LB medium ortamı hazırlanarak hücreler bu ortam içerisine alındıktan sonra -80°C'de depolanır.

LB agar:

- LB mediuma otoklav edilmeden önce 15 g/L oranında agar agar (Merck) eklenir ve iyice çözünmesi sağlanır.
- 121°C'de 15 dk otoklav uygulanarak steril edilir.
- Hazırlanan besiyeri 10 cm'lik petrilere çökölerek katılaşması beklenir.
- Petriler kullanılıncaya kadar 4°C'de depolanır
- *Eğer antibiyotik, IPTG veya X-gal eklenecekse otoklav edildikten sonra eklenecekse besiyeri ~55°C'ye soğutulur 100 µg/mL oranında ampisilin eklendikten sonra petrilere dökölür. Petrilerde bulunan besiyeri katılaştıktan sonra yüzeyine steril bir drigalski öze yardımı ile 40 µl X-gal (40 mg/mL) ve 40 µl IPTG (100mM) solüsyonu sürölür.

YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) Sıvı Besiyeri:

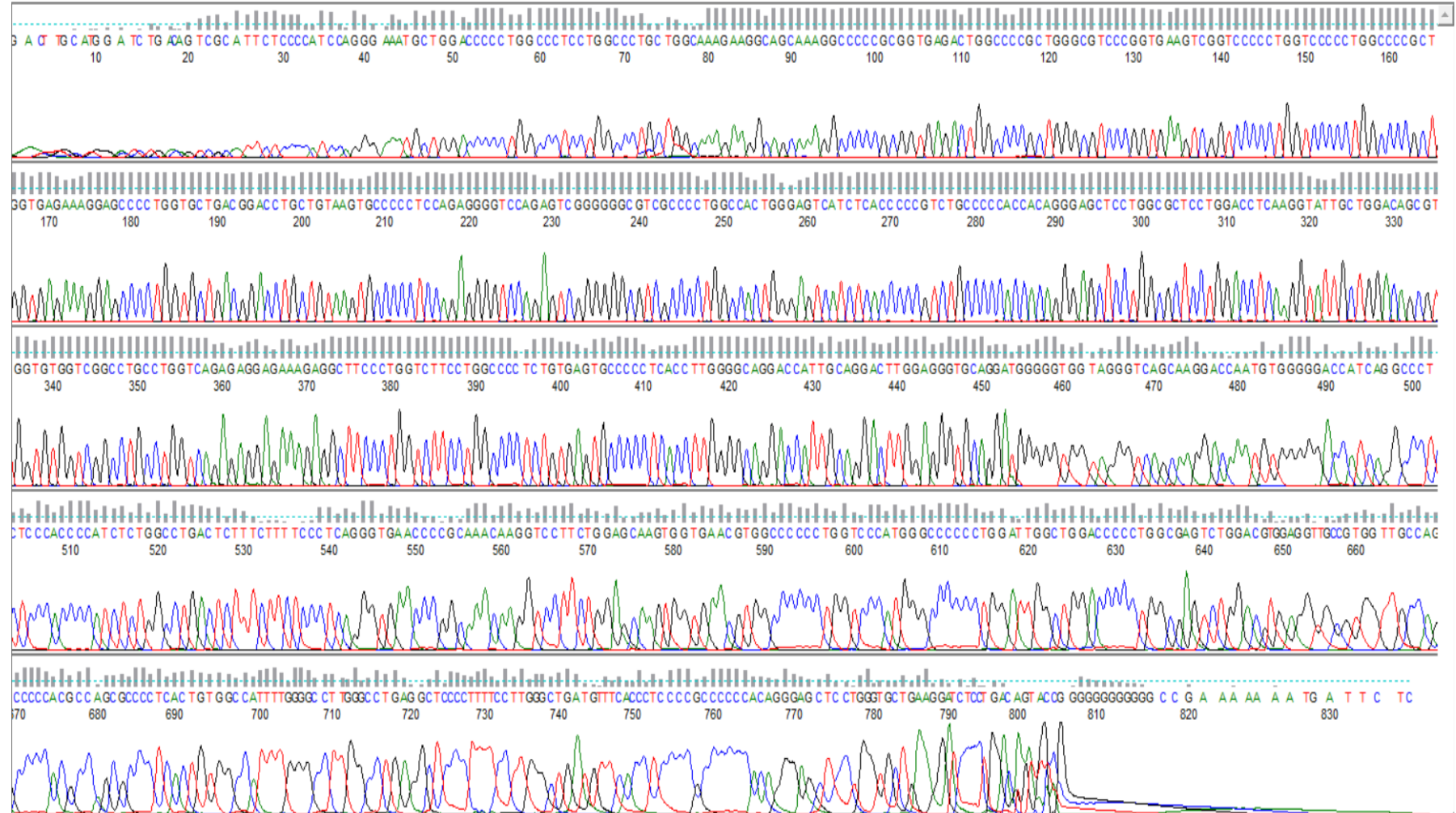
- 10 g yeast ekstrakt ve 20 g pepton (Merck) 900 mL distile suda çözölürölür.
- 121°C'de 15 dk otoklav uygulanarak steril edilir.
- Otoklavdan sonra besiyeri sıcaklığı yaklaşık 65°C'ye geldiğinde 100 mL steril 10XD eklenir.
- Besiyeri 4°C'de depolanır.

YPD Agar:

- YPD mediuma otoklav edilmeden önce 15 g/L oranında agar agar (Merck) eklenir ve iyice çözünmesi sağlanır.
- 121°C'de 15 dk otoklav uygulanarak steril edilir.
- Hazırlanan besiyeri 10 cm'lik petrilere çökülerek katılaşması beklenir.
- Petriler kullanılıncaya kadar 4°C'de depolanır

MD (Minimal Dekstoz)Agar:

- 3.75 g agar agar tartılır ve 500ml'lik cam şişe içerisine aktarılır.
- Üzerine 200 mL distile su eklenir ve 121°C'de 15 dk otoklav uygulanarak steril edilir
- Otoklavdan sonra besiyeri sıcaklığı yaklaşık 65°C'ye geldiğinde;
 - 25 ml steril 10XYNB
 - 0.5 ml steril 500XB
 - 25 ml steril 10XD eklenir ve iyice karıştırılır.
- Hazırlanan besiyeri 10 cm'lik petrilere çökülerek katılaşması beklenir.
- Petriler kullanılıncaya kadar 4°C'de depolanır

Ek-3:**COL-1 gen fragmanı için dizi analizi sonucu**

Ek-3 devamı

1	GACTTGCATG	GATCTGACAG	TCGCATTCTC	CCCATCCAGG
41	GAAATGCTGG	ACCCCCTGGC	CCTCCTGGCC	CTGCTGGCAA
81	AGAAGGCAGC	AAAGGCCCCC	GCGGTGAGAC	TGGCCCCGCT
121	GGGCGTCCCG	GTGAAGTCGG	TCCCCCTGGT	CCCCCTGGCC
161	CCGCTGGTGA	GAAAGGAGCC	CCTGGTGCTG	ACGGACCTGC
201	TGTAAGTGCC	CCCTCCAGAG	GGGTCCAGAG	TCGGGGGGCG
241	TCGCCCCCTGG	CCACTGGGAG	TCATCTCACC	CCCGTCTGCC
281	CCCACCACAG	GGAGCTCCTG	GCGCTCCTGG	ACCTCAAGGT
321	ATTGCTGGAC	AGCGTGGTGT	GGTCGGCCTG	CCTGGTCAGA
361	GAGGAGAAAAG	AGGCTTCCCT	GGTCTTCCTG	GCCCCTCTGT
401	GAGTGCCCCC	TCACCTTGGG	GCAGGACCAT	TGCAGGACTT
441	GGAGGGTGCA	GGATGGGGGT	GGTAGGGTCA	GCAAGGACCA
481	ATGTGGGGGA	CCATCAGGCC	CTCTCCCACC	CCATCTCTGG
521	CCTGACTCTT	TCTTTTCCCT	CAGGGTGAAC	CCCGCAAAACA
561	AGGTCCTTCT	GGAGCAAGTG	GTGAACGTGG	CCCCCCTGGT
601	CCCATGGGCC	CCCCTGGATT	GGCTGGACCC	CCTGGCGAGT
641	CTGGACGTGG	AGGTTGCCGT	GGTTGCCAGC	CCCCACGCCA
681	GCGCCCCTCA	CTGTGGCCAT	TTTGGGGCCT	TGGGCCTGAG
721	GCTCCCCCTT	TCCTTGGGCT	GATGTTTCAC	CCTCCCCGCC
761	CCCCACAGGG	AGCTCCTGGG	TGCTGAAGGA	TCTCCTGACA
801	GTACCGGGGG	GGGGGGGCCG	AAAAAAATGA	TTCTC

Ek-4:

COL-1 fragmanına ait dizi analizi sonuçlarının *Bos taurus* collagen, type I, alpha 1 (COL1A1), mRNA dizisi ile karşılaştırılması
(COL-1 ve COL-2 gen fragmanlarının *Bos taurus* COL1A1 mRNA dizisi ile birebir eşleştiği noktalar aynı renkle işaretlenerek belirtilmiştir)

Bos taurus collagen, type I, alpha 1 (COL1A1), mRNA

NCBI Reference Sequence: NM_001034039.2

```
GCAGACGGGAGTTTCTCCTCGGGGTCGGAGCAGGAGGCACGCGGAGTGTGAGGCCACGCATGAGCGGACG
CTAACCCCCACCCAGCCGCAAAGAGTCTACATGTCTAGGGTCTAGACATGTTTGTGGACCTCC
GGCTCCTGCTCCTCTTAGCGGCCACCGCCCTCCTGACGCACGGCCAAGAGGAGGGCCAGGAAGAAGGCCA
AGAAGAAGACATCCCACCAGTCACCTGCGTACAGAACGGCCTCAGGTACCATGACCGAGACGTGTGAAAA
CCCGTGCCCTGCCAGATCTGTGTCTGCGACAACGGCAACGTGCTGTGCGATGACGTGATCTGCGACGAAC
TTAAGGACTGTCTAACGCCAAAGTCCCCACGGACGAATGCTGCCCCGTCTGCCCCGAAGGCCAGGAATC
ACCCACGGACCAAGAAACCACCGGAGTCGAGGGACCGAAAGGAGACACTGGCCCCCGAGGCCCAAGGGGA
CCCGCCGGCCCCCCCCGGCCGAGATGGCATCCCTGGACAACCTGGACTTCCCGGACCCCCCTGGACCCCCCG
GACCTCCCGGACCCCCCTGGCCTCGGAGGAAACTTTGCTCCCCAGTTGTCTTACGGCTATGATGAGAAATC
AACAGGAATTTCCGTGCCTGGTCCCATGGGTCTTCTGGTCTCGTGGTCTCCCTGGCCCCCTGGCGCA
CCTGGTCCCCAAGGTTTCCAAGGCCCCCTGGTGAGCCTGGCGAGCCAGGAGCCTCAGGTCCCATGGGTC
CCCGTGGTCCCCCTGGCCCCCTGGCAAGAACGGAGATGATGGCGAAGCTGGAAAGCCTGGTTCGTCTGG
TGAGCGCGGGCCTCCCGGACCTCAGGGTGCTCGGGGATTGCCTGGAACAGCTGGCCTCCCTGGAATGAAG
GGACACAGAGGTTTCAGTGGTTTGGATGGTGCCAAGGGAGATGCTGGTCTGCTGGCCCCAAGGGCGAGC
CTGGTAGCCCCGGTGAAAATGGAGCTCCTGGTCAGATGGGCCCCCGTGGTCTGCCTGGTGAGAGAGGTCTG
```

devam1

CCCCTGGCCCCGCTGGTCCTCCTGGTTTCCCTGGTGCTGTGGGTGCTAAGGGTGAAGGTGGTCCCCAAG
GACCCCGAGGTTCTGAAGGTCCCCAGGGTGTACGTGGTGAGCCTGGCCCCCCTGGCCCTGCTGGTGCTGC
TGGCCCTGCTGGCAACCCTGGTGCTGATGGACAGCCTGGTGCTAAAGGAGCCAATGGCGCTCCTGGTATT
GCTGGTGCTCCTGGCTTCCCTGGTGCCCGAGGCCCCCTCTGGACCCCAGGGCCCCAGCGGCCCCCCTGGCC
CCAAGGGTAACAGCGGTGAACCTGGTGCTCCTGGCAGCAAAGGAGACACTGGCGCCAAGGGAGAACCCGG
TCCCCTGGTATTCAAGGCCCCCCTGGCCCCGCTGGGGAAGAAGGAAAGCGAGGAGCCCGAGGTGAACCT
GGACCTGCTGGCCTGCCTGGACCCCCCTGGCGAGCGTGGTGGACCTGGAAGCCGTGGTTTCCCTGGCGCCG
ACGGTGTTGCTGGTCCCAAGGGTCCTGCTGGTGAACGCGGTGCTCCTGGCCCTGCTGGCCCCAAAGGTTT
TCCTGGTGAAGCTGGTCGCCCCGGTGAAGCTGGTCTGCCCCGGTGCCAAGGGTCTGACTGGAAGCCCTGGC
AGCCCGGGTCCTGATGGCAAACTGGCCCCCCTGGTCCCGCCGGTCAAGATGGCCGCCCTGGACCTCCAG
GCCCTCCCGGTGCCCCGTGGTCAGGCTGGCGTGATGGGTTTCCCTGGACCTAAAGGTGCTGCTGGAGAGCC
TGGAAGAGCTGGAGAGCGAGGTGTTCTGGACCCCCCTGGCGCTGTTGGTCCTGCTGGCAAAGACGGAGAA
GCTGGAGCTCAGGGACCCCCAGGACCTGCTGGCCCCGCTGGTGAGAGAGGCCAACAAGGCCCTGCTGGCT
CCCCTGGATTCCAGGGTCTCCCCGGCCCTGCTGGTCCTCCTGGTGAAGCAGGCAAACCTGGTGAACAGGG

devamı

TGTTCTGGAGATCTTGGTGCCCCCGGCCCTCTGGAGCAAGAGGCGAGAGAGGTTTCCCCGGCGAGCGT
 GGTGTGCAAGGGCCGCCCCGGTCTGCAGGTCCCCGTGGGGCCAATGGTGCCCCCTGGCAACGATGGTGCTA
 AGGGTGATGCTGGTGCCCCCTGGAGCCCCCGGTAGCCAGGGTGCCCCCTGGCCTTCAAGGAATGCCTGGTGA
 ACGAGGTGCAGCTGGTCTTCCAGGCCCTAAGGGTGACAGAGGGGATGCTGGTCCCAAAGGTGCTGATGGT
 GCTCCTGGCAAAGATGGCGTCCGTGGTCTGACTGGTCCCATCGGTCTCCTGGCCCCGCTGGTGCCCCCTG
 GTGACAAGGGTGAAGCTGGTCCTAGTGGCCCAGCCGGTCCCCTGGAGCTCGTGGTGCCCCCGGTGACCG
 TGGTGAGCCTGGTCCCCCGGCCCTGCTGGCTTCGCTGGCCCCCTGGTGCTGATGGCCAACCTGGTGCT
 AAAGGCGAACCTGGTGATGCTGGTGCTAAAGGTGACGCTGGTCCCCCGGCCCTGCTGGGCCCGCTGGAC
 CCCCCGGCCCCATTGGTAACGTTGGTGCTCCCGGACCCAAAGGTGCTCGTGGCAGCGCTGGTCCCCCTGG
 TGCTACTGGTTTCCCAGGTGCTGCTGGCCGAGTCGGTCCCCCGGCCCTCTGGAAATGCTGGACCCCCT
 GGCCCTCCTGGCCCTGCTGGCAAAGAAGGCAGCAAAGGCCCCCGCGGTGAGACTGGCCCCGCTGGGCGTC
 CCGGTGAAGTCGGTCCCCCTGGTCCCCCTGGCCCCGCTGGTGAGAAAGGAGCCCCCTGGTGCTGACGGACC
 TGCTGGAGCTCCTGGCACTCCTGGACCTCAAGGTATTGCTGGACAGCGTGGTGTTGGTTCGGCCTGCCTGGT
 CAGAGAGGAGAAAGAGGCTTCCCTGGTCTTCTGGCCCCCTCTGGTGAACCGGCAACAAGGTCTTCTG
 GAGCAAGTGGTGAACGTGGCCCCCTGGTCCCATGGGCCCCCTGGATTGGCTGGACCCCCTGGCGAGTC
 TGGACGTGAGGAGCTCCTGGTGCTGAAGGATCCCCCTGGACGAGATGGTTCTCCTGGCGCCAAGGGTGAC
 CGTGGTGAGACCGGCCCTGCTGGACCTCCTGGTGCTCCTGGCGCTCCCGGTGCCCCCGGCCCTGTCCGAC
 CTGCCGGCAAGAGCGGTGATCGTGGTGAGACCGGTCTGCTGGTCCCTGCTGGTCCCATTGGCCCCGTGG
 TGCCCGTGGCCCCGCTGGACCCCAAGGCCCCCGTGGTGACAAGGGTGAGACAGGCGAACAGGGCGACAGA
 GGCATTAAGGGTACCGTGGCTTCTCTGGTCTCCAGGGTCCCCCGGCCCTCCCGGTCTCCTGGTGAGC

COL-1 gen fragmanı için dizi analizi sonucu

GACTTGCAATGGATCTGACAGTCGCATTCTCCCCA
 TCCAGGGAAATGCTGGACCCCCTGGCCCTCCTG
 GCCCTGCTGGCAAAGAAGGCAGCAAAGGCCCCC
 GCGGTGAGACTGGCCCCGCTGGGCGTCCCGGTG
 AAGTCGGTCCCCCTGGTCCCCCTGGCCCCGCTGG
 TGAGAAAGGAGCCCCCTGGTGCTGACGGACCTGC
 TGTAAGTGCCCCCTCCAGAGGGGTCCAGAGTCG
 GGGGGCGTCGCCCTGGCCACTGGGAGTCATCT
 CACCCCGTCTGCCCCCACCACAGGGAGCTCCT
 GCGCTCCTGGACCTCAAGGTATTGCTGGACAG
 CGTGGTGTTGGTTCGGCCTGCCTGGTCAGAGAGGA
 GAAAGAGGCTTCCCTGGTCTTCTGGCCCCCTCTG
 TGAGTGCCCCCTCACCTTGGGGCAGGACCATTG
 CAGGACTTGGAGGGTGCAGGATGGGGGTGGTAG
 GGTGAGCAAGGACCAATGTGGGGGACCATCAGG
 CCTCTCCCACCCCATCTCTGGCCTGACTCTTTC
 TTTTCCCTCAGGCTGAACCCCGCAAACAAGGTC
 CTTCTGGAGCAAGTGGTGAACGTGGCCCCCTG
 GTCCCATGGGCCCCCTGGATTGGCTGGACCCC
 CTGGCGAGTCTGGACGTGGAGGTTGCCGTGGTT
 GCCAGCCCCACGCCAGCGCCCTCACTGTGGC
 CATTTTGGGGCCTTGGGCCTGAGGCTCCCCTTT
 CCTTGGGCTGATGTTTACCCTCCCCGCCCCCA
 CAGGGAGCTCCTGGGTGCTGAAGGATCTCCTGA
 CAGTACCGGGGGGGGGGGGCCGAAAAAATGA
 TTCTC

AGATGGACTCAATGGTCTCCCAGGCCCATCGGTCCCCCTGGGCCTCGAGGTGCGACTGGTGATGCTGGT
CCTGCTGGTCCTCCCGGCCCTCCTGGACCCCCCTGGTCCCCCAGGTCTCCCAGCGGCGGCTACGACTTGA
GCTTCCTGCCCCAGCCACCTCAAGAGAAGGCTCACGATGGTGGCCGCTACTACCGGGCTGATGATGCCAA
TGTGGTCCGTGACCGTGACCTCGAGGTGGACACCACCCTCAAGAGCCTGAGCCAGCAGATCGAGAACATC
CGGAGCCCCTGAAGGCAGCCGCAAGAACCCCGCCCGCACCTGCCGTGACCTCAAGATGTGCCACTCTGACT
GGAAGAGCGGAGAATACTGGATTGACCCCAACCAAGGCTGCAACCTGGATGCCATTAAGGTCTTCTGCAA
CATGGAAACCGGTGAGACCTGTGTATACCCCACTCAGCCCAGCGTGGCCCAGAAGAACTGGTATATCAGC
AAGAACCCCAAGGAAAAGAGGCACGTCTGGTACGGCGAGAGCATGACCGGCGGATTCCAGTTCGAGTATG
GCGGCCAGGGGTCCGATCCTGCCGATGTGGCCATCCAGCTGACTTTCCTGCGCCTGATGTCCACCGAGGC
CTCCCAGAACATCACCTACCACTGCAAGAACAGCGTGGCCTACATGGACCAGCAGACTGGCAACCTCAAG
AAGGCCCTGCTCCTCCAGGGCTCCAACGAGATCGAGATCCGGGCCGAGGGCAACAGCCGCTTCACCTACA
GCGTCACCTACGATGGCTGCACGAGTCACACCGGAGCCTGGGGCAAGACAGTGATCGAATACAAAACCAC
CAAGACCTCCCGCTTGCCCATCATCGATGTGGCCCCCTTGACGTTGGCGCCCCAGACCAGGAATTCGGC
TTCGACGTTGGCCCTGCCTGCTTCCTGTAACTCCTTCCACCCCAACCTGGCTCCCTCCCACCCAACCCA
CTTGCCCCTGACTCTGGAAACAGACAAACAACCCAACTGAAACCCCCGAAAAGCCAAAAAATGGGAGAC
AATTTACATGGACTTTGGAAAATATTTTTTTCCTTTGCATTCATCTCTCAAACCTAGTTTTTATCTTTG
ACCAACTGAACATGACCAAAAACCAAAAGTGCATTCAACCTTACCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

