

ÖZET**RNA İNTERFERANSININ AZALTILMASI ARACILIĞIYLA ÖKARYOTİK
HÜCRELERDE BİR TRANSGENİN EKSPRESYONUNUN ARTTIRILMASI**

- 5 RNA interferansının (RNAi) azaltılması aracılığıyla ökaryotik hücrelerde bir transgenin ekspresyonunun arttırılmasına yönelik yöntemler ve yöntem tarafından üretilen değişken hücreler açıklanmaktadır. Yöntemler ve değişken hücreler, örneğin ökaryotik hücrelerde terapötik ve endüstriyel polipeptitlerin verimli üretimine yönelik faydalıdır.

İSTEMLER

1. Mantar hücrelerinde bir transgenin ekspresyon seviyesini arttırmaya yönelik bir yöntem olup, aşağıdakileri içerir:
 - 5 mantar hücrelerine genetik bir değişimin uygulanması, burada genetik değişim, genetik değişimin olmadığı durumlarda RNA interferansının miktarına kıyasla hücrelerde meydana gelen RNA interferans miktarını azaltır, burada genetik değişim, Dicer benzeri genlerin (*dcl-1* ve *dcl-2*) parçalanmasını içerir; ve transgenin, ilgi konusu bir proteini eksprese etmeye yönelik hücrelere uygulanması.
2. İstem 1'e göre yöntem olup, özelliği genetik değişimin, hücrelerde siRNA oluşumunu azaltması veya engellemesidir.
- 15 3. İstem 1 veya 2'ye göre yöntem olup, özelliği gen parçalanmasının, genin mutajenezinin sonucu olmasıdır.
4. İstem 3'e göre yöntem olup, özelliği gen parçalanmasının, sahaya özgü rekombinasyon kullanılarak gerçekleştirilmesidir ve/veya gen parçalanmasının,
 - 20 genin genetik bölgesinde seçilebilir bir markörün ilave edilmesi ile birlikte uygulanmasıdır.
5. İstemler 1-4'ten herhangi birine göre yöntem olup, özelliği hücrelerin, genetik değişimden yoksun eşdeğer hücreler tarafından üretilen biyokütle birim miktarı
 - 25 başına protein miktarı ile karşılaştırıldığında, birim biyokütle miktarı başına aynı miktarda toplam protein üretmesidir.
6. İstemler 1-5'ten herhangi birine göre yöntem olup, özelliği mantar hücrelerinin filamentli mantar hücreleri olmasıdır.
- 30 7. İstem 6'ya göre yöntem olup, özelliği filamentli mantar hücrelerinin, Pezizomycotina türü hücreler olmasıdır.
8. İstem 6'ya göre yöntem olup, özelliği filamentli mantar hücrelerinin, *Trichoderma reesei* hücreleri olmasıdır.
- 35

9. Önceki istemlerden herhangi birine göre yöntem olup, özelliği ayrıca, transgenin ilave bir kopyasının hücrelere uygulanmasını içermesidir, burada transgenin ilave kopyasını hücrelere yerleştirdikten sonra transgenin ekspresyon seviyeleri, transgenin ilave kopyasını hücrelere yerleştirmeden önceki transgenin ekspresyon seviyelerinden daha düşük değildir.
10. Önceki istemlerden herhangi birine göre yöntem olup, özelliği ilgi konusu proteini kodlayan transgen, RNA enterferansını azaltan veya engelleyen genetik değişimin uygulanmasından önce hücrelerde bulunur veya ilgi konusu proteini kodlayan transgen, RNA enterferansını azaltan veya önleyen genetik değişimi tanıttıktan sonra hücrelere verilir.
11. İstem 1'e göre yöntem olup, özelliği mantar hücrelerinde bir transgenin ekspresyon seviyesini artırma adımının aşağıdakileri içermesidir:
transgenin, RNA enterferansı ile ilişkili bir genin lokusuna yerleştirilmesi, burada transgenin yerleştirilmesi, RNA enterferansı ile ilişkili geni parçalar ve mantar hücrelerinde RNA enterferansı miktarını azaltır, böylece, transgen ekspresyon seviyesi, RNA enterferansı ile ilişkili genin bozulmamış olduğu mantar hücrelerine kıyasla artırılır.
12. Parental mantar hücrelerinden elde edilen değişken mantar hücreleri olup, değişken mantar hücreleri, parental mantar hücrelerine ve ilgi konusu bir proteini kodlayan bir transgene kıyasla düşük RNA enterferansı sergilemesine neden olan genetik bir değişimi içerir, özelliği genetik değişimin, Dicer benzeri proteinleri (DCL1 ve DCL2) kodlayan genlerin parçalanmasını içermesidir, burada parental mantar hücrelerine kıyasla, değişken mantar hücreleri, transgen tarafından kodlanan ilgi konusu proteinin daha yüksek seviyelerini üretme yeteneğine sahiptir ve/veya değişken mantar hücreleri, transgenin transformasyonunu takiben transgen tarafından kodlanan ilgi konusu proteinin daha yüksek ortalama ekspresyon seviyelerine sahiptir, burada değişken mantar hücreleri, genetik değişimden yoksun eşdeğer mantar hücreleri tarafından üretilen biyokütle birim miktarı başına protein miktarı ile karşılaştırıldığında, birim biyokütle miktarı başına büyük ölçüde aynı miktarda protein üretir.

13. İstem 12'ye göre değişken mantar hücreleri olup, özelliği parçalanmanın, genin mutajenezi olmasıdır; ve/veya parçalanmanın genin bir kısmının veya tamamının delesyonudur; ve/veya genin parçalanmasının, bölgeye özgü rekombinasyon kullanılarak gerçekleştirilmesidir; ve/veya genin parçalanmasının, genin genetik bölgesinde seçilebilir bir markörün ilave edilmesi ile kombinasyon halinde gerçekleştirilmesidir.
- 5
14. İstemler 12-13'ten herhangi birine göre değişken hücre olup, özelliği ayrıca, ilgi konusu bir proteini kodlayan bir transgenin kopyalarının birçoğunu içermesidir.
- 10

TARİFNAME

RNA İNTERFERANSININ AZALTILMASI ARACILIĞIYLA ÖKARYOTİK HÜCRELERDE BİR TRANSGENİN EKSPRESYONUNUN ARTTIRILMASI

5 TEKNİK SAHA

RNA interferansının (RNAi) azaltılması vasıtasıyla ökaryotik hücrelerde bir transgenin ekspresyonunun artırılmasına yönelik yöntemler ve yöntem aracılığıyla üretilen değişken hücreler açıklanmaktadır. Yöntemler ve değişken hücreler, örneğin ökaryotik hücrelerde terapötik ve endüstriyel polipeptitlerin verimli üretimine yönelik faydalıdır.

REFERANSLAR

- Fire, A. et al. (1998). Nature 391:806-11.
- 15 Fulci, V. and Macino, G. (2007) Current Opinion in Microbiology 10:199-203.
- Janus, D. et al. (2009) Microbiology 155:3946-56.
- Nakayashiki, H. (2005) FEBS Letters 579:5950-57.
- Brody, H. and Maiyuran, S. (2009) Industrial Biotechnology 5:53-60.
- McGinnis, K. (2009) Methods in Molecular Biology: Transgenic Maize 526:91-99.

20

ALT YAPI

- RNA interferansı (RNAi), RNA moleküllerinin gen ekspresyonunu inhibe ettiği bir fenomendir. RNAi, tipik olarak bir transgenden kopyalanan bir mRNA, bir RNA-bağımlı RNA polimeraz (RdRP) tarafından çift sarmallı RNA'ya (dsRNA) dönüştürüldüğünde meydana gelir. DsRNA, dsRNA'yı yaklaşık olarak 25 nükleotit veya daha kısa olan küçük interferanslı dsRNA'lara (siRNA) kesen Dicer benzeri proteinlere yönelik bir substrat haline gelir. SiRNA, ilave transgen mRNA'yı, belirli siRNA'nın sekansına bağlı olarak sekansa özgü bir şekilde hedefleyen ve parçalayan bir RNA kaynaklı susturma kompleksi (RISC) içine dahil edilir. Sonuç, bu transgene yeterince benzer nükleotit sekanslarına sahip olan endojen genlerin yanı sıra transgenin ekspresyonunun azaltılmasıdır. Fenomen, ilk olarak, Caenorhabditis elegans'ta Fire ve Mello tarafından tanımlanmıştır (Fire, A. et al. (1998). Nature 391:806-11).

30

RNAi, çok çeşitli ökaryotik hücrelerde meydana gelir ve ortak susturma, transkripsiyon sonrası gen susturma (PTGS) ve baskılama dahil olmak üzere birkaç farklı adıyla bilinir. Baskılama, genellikle mantar moleküler biyolojisinde RNAi için ayrılan terimdir. Bazı mantarlar güçlü bir baskılama tepkisine sahipken, diğerlerinde zayıf bir tepkiye sahip olabilir veya hiç bir baskılama tepkisine sahip olmayabilir. Baskılama, ilk olarak 1990'ların başında *Neurospora*'da tanımlanmıştır (Romano, N. et al. (1992) Mol. Microbiol. 6:3343-53).

Cogoni et al. (P.N.A.S., USA, 94: 10233-10238, 1997), *Neurospora crassa*'da post-transkripsiyonel transgen ile indüklenmiş gen susturma işleminde parçalanmış baskılamada kusurlu (qde) mutantları tarif eder.

Tabara et al. (Cell, 99: 123-132, 1999) *Candida*, *elegans*'ta gerçekleştirilen RNAi çalışmalarını açıklar. WO 00/50581, gen susturma aktivitesine sahip olan bir *Neurospora crassa* proteininin karakterizasyonu ile ilgilidir.

WO 00/32785, bir recQ helikaz bölgesine sahip gen susturma aktivitesine sahip *Neurospora crassa* proteinini tarif eder.

WO 01/29058, çift sarmallı RNA interferansında yer alan genlerde (RNAi yolağı genleri) tanımlanır ve RNAi yolağını araştırmak üzere kullanılır.

Catalanotto et al. (Molecular Cell Biology , Mar 2004, p.2536-2545) *dcl-1* ve *dcl-2* fonksiyonu ile ilgili bir çalışmayı açıklar.

KISA AÇIKLAMA

Buna göre, bir açısına göre mevcut buluş, bir transgenin ekspresyon seviyesini mantar hücrelerinde arttırmaya yönelik bir yöntem sağlar, yöntem, aşağıdakileri içerir:

mantar hücrelerine genetik bir değişimin uygulanması burada genetik değişim, genetik değişimin olmadığı durumlarda RNA interferansının miktarına kıyasla hücrelerde meydana gelen RNA interferans miktarını azaltır, burada genetik değişim, Dicer benzeri genlerin (*dcl-1* ve *dcl-2*) parçalanmasını içerir; ve transgenin, ilgi konusu bir proteini eksprese etmeye yönelik hücrelere uygulanması.

Genetik değişim, hücrelerde siRNA oluşumunu azaltabilir veya engelleyebilir.

Genin parçalanması, genin mutajenezinin sonucu olabilir.

- 5 Genin parçalanması, bölgeye özgü rekombinasyonun kullanılması yoluyla gerçekleştirilebilir ve/veya genin parçalanması, genin genetik bölgesinde seçilebilir bir markörün yerleştirilmesi ile kombinasyon halinde gerçekleştirilebilir.

- 10 Hücreler, genetik değişimden yoksun eşdeğer hücreler tarafından üretilen birim biyokütle miktarı başına düşen protein miktarına kıyasla, birim biyokütle miktarı başına aynı miktarda toplam protein üretebilirler.

Mantar hücreleri filamentli mantar hücreleri olabilir.

- 15 Filamentli mantar hücreleri, *Pezizomycotina* türü hücreleri olabilir. Filamentli mantar hücreleri, *Trichoderma reesei* hücreleri olabilir.

- 20 Yöntem, ayrıca, transgenin ilave bir kopyasını hücrelere yerleştirmeyi içerebilir, burada transgenin ilave kopyasını hücrelere yerleştirdikten sonra transgenin ekspresyon seviyeleri, transgenin ilave kopyasını hücrelere yerleştirmeden önceki transgenin ekspresyon seviyelerinden daha düşük değildir.

- 25 İlgi konusu proteini kodlayan transgen, RNA interferansını azaltan veya önleyen genetik değişimin uygulanmasından önce hücrelerde mevcut olabilir veya ilgi konusu proteini kodlayan transgen, RNA interferansını azaltan veya engelleyen genetik değişimi uygulandıktan sonra hücrelere yerleştirilir.

Mantar hücrelerinde bir transgenin ekspresyon seviyesini arttırma adımı, aşağıdakileri içerebilir:

- 30 transgenin, RNA interferansı ile ilişkili bir genin lokusuna yerleştirilmesi, burada transgenin yerleştirilmesi, RNA interferansı ile ilişkili geni parçalar ve mantar hücrelerinde RNA interferansı miktarını azaltır, böylece, transgen ekspresyon seviyesi, RNA interferansı ile ilişkili genin bozulmamış olduğu mantar hücrelerine kıyasla arttırılır.

Buluş, bir başka açısında, parental mantar hücrelerinden türetilen değişken mantar hücrelerini sağlar, değişken mantar hücreleri, değişken mantar hücrelerinin, parental mantar hücrelerine ve ilgi konusu bir proteini kodlayan bir transgene kıyasla düşük RNA interferansı sergilemesine neden olan bir genetik değişim içerir,

5 burada genetik değişim, Dicer benzeri proteinleri (DCL1 ve DCL2) kodlayan genlerin parçalanmasını içerir,

burada, parental fungal hücrelere kıyasla, değişken mantar hücreleri, transgen tarafından kodlanan ilgili proteinin daha yüksek seviyelerini üretme yeteneğine sahiptir ve/veya burada değişken mantar hücreleri, transgenin dönüşümünü takiben transgen tarafından kodlanan ilgili proteinin daha yüksek ortalama ekspresyon seviyelerine sahiptir,

10 burada değişken mantar hücreleri, büyük ölçüde, genetik değişimden yoksun eşdeğer mantar hücreleri tarafından üretilen birim biyokütle miktarı başına düşen protein miktarına kıyasla birim biyokütle miktarı başına düşen protein miktarı ile aynı miktarda protein üretir.

Parçalanma, genin mutajenezi olabilir; ve/veya parçalanma, genin kısmen veya tamamen delesyonu olabilir; ve/veya genin parçalanması, bölgeye özgü rekombinasyon kullanılarak gerçekleştirilebilir; ve/veya genin parçalanması, genin 20 genetik bölgesinde seçilebilir bir markörün ilave edilmesi ile kombinasyon halinde gerçekleştirilebilir.

Değişken hücreler, ayrıca, ilgi konusu bir proteini kodlayan bir transgenin çok sayıda kopyasını içerebilir.

25

ŞEKİLLERİN KISA AÇIKLAMASI

Şekil 1, standart tasarım parçalanma kasetinin şemasıdır. *T. reesei*'de, 5' ve 3'-komşu bölgelerinin uzunluğu 1-1.5 kb'dir ve tekrar bölgesinin uzunluğu 0.5-0.7 kb'dir.

30 Şekil 2, *dcl1* genini içeren *T. reesei*'nin kromozomal bölgesinin şematik görünüşüdür. İki adet *de1* yan bölgesi ve *de1* tekrar bölgesi belirtilir. Trire 2.0 veritabanında protein ID 69494'e karşılık gelen ORF ve en yakın ATG kodonuna 5'-terminal uzantısına sahip olan varsayılan düzeltilmiş ORF gösterilir. Amplifikasyon primerlerine yönelik tavlama lokusları belirtilir.

Şekil 3, *del2* genini içeren *T. reesei*'nin kromozomal bölgesinin şematik görünüşüdür. İki adet *del2* bölgesi ve *del2* tekrar bölgesi belirtilir. Aynı zamanda, Trire 2.0 veritabanında protein ID 79823'e karşılık gelen ORF gösterilir. Amplifikasyon primerlerine yönelik tavlama lokusları belirtilir.

5 Şekil 4A ve 4B, *T. reesei*'nin T. kromozomal bölgesinin, gen parçalanmasından (4A) sonra ve *pyr2* markör geninin (4B) çıkarılmasının ardından oluşturulan şematik görünüşleridir. Delesyon işlemlerini haritalamak üzere kullanılan primerlerin tavlama lokusları belirtilir.

Şekil 5A ve 5B, genlerin parçalanmasından (5A) sonra ve *pyr2* markör geninin (5B) 10 çıkarılmasının ardından *T. reesei*'nin *del2* kromozomal bölgesinin şematik görünüşleridir. Delesyon işlemlerini haritalamak üzere kullanılan primerlerin tavlama lokusları belirtilir.

Şekil 6, iki *T. reesei* suşunun, diğer bir deyişle, DiMorph (RNAi'yi azaltmak üzere manipüle edilmiş) ve CelluLight'ın (RNAi'ye göre doğal fenotip) bireysel 15 transformantlarında ölçülen aminopeptidaz Y (APY) aktivitesinin seviyelerini gösteren bir çubuk grafikidir. Her iki suş, APY ekspresyon kasetini içeren aynı DNA fragmanı ile dönüştürülmüştür. Aktivite, rastgele bir dizi transformantta ölçülmüştür. Her bir çubuk, tek bir klonda tespit edilen APY aktivitesini temsil eder. Veriler, en düşükten en yüksek aktiviteye (iki suşun her birine yönelik bireysel şekilde) sıralanır.

20 Şekil 7, DiMorph ve CelluLight transformantlarındaki APY ekspresyonunun SDS-PAGE analizinin sonuçlarını göstermektedir. Kültür süpernatantları, SDS-PAGE ile ayrılmıştır ve SIMPLYBLUE™ reaktif maddesi (Invitrogen) ile filtrelenmiştir. Her bir kuyu, tek bir transformantı (rastgele sırada) temsil eder.

Şekil 8, 3PP ekspresyon kasetini içeren bireysel DiMorph ve CelluLight 25 transformantlarında ölçülen aminopeptidil tripeptidaz (3PP) aktivitesi seviyelerini gösteren bir çubuk grafikidir. Aktivite, rastgele bir dizi transformantta ölçülmüştür. Her bir çubuk, tek bir klonda tespit edilen 3PP aktivitesini temsil eder. Veriler, en düşükten en yüksek aktiviteye (iki suşun her birine yönelik bireysel şekilde) sıralanır.

Şekil 9, iki farklı markör kullanılarak APY ekspresyon kasetleri ile iki transformant turu 30 sonrasında bireysel DiMorph ve CelluLight transformantlarında ölçülen APY aktivitesinin seviyelerini gösteren bir çubuk grafikidir. Her bir çubuk (grafiğin sağ tarafındaki iki çubuk hariç), tek bir ikinci tur transformantı temsil eder. Sağdaki iki çubuk, ikinci transformant turuna yönelik transformasyon konakçıları olarak kullanılan CelluLight ve DiMorph suşlarının en iyi tek yuvarlak transformantlarını temsil eder.

Şekil 10, iki farklı markör kullanılarak 3PP ekspresyon kasetleri ile iki transformant sonrasında bireysel DiMorph ve CelluLight transformantlarında ölçülen 3PP aktivitesi seviyelerini gösteren bir çubuk grafikdir. Her bir çubuk (grafiğin sağ tarafındaki iki çubuk hariç), tek bir ikinci tur transformantı temsil eder. Sağdaki iki çubuk, ikinci transformant turuna yönelik transformasyon konakçıları olarak kullanılan CelluLight ve DiMorph suşlarının en iyi tek yuvarlak transformantlarını temsil eder.

DETAYLI AÇIKLAMA

10 I. Genel Bakış

RNA interferans (RNAi) mekanizmasının parçalanması aracılığıyla ökaryotik hücrelerde bulunan transgenlerin ekspresyonunun arttırılmasına yönelik yöntemler ve bu tür bir yöntem vasıtasıyla üretilen hücre türleri açıklanmaktadır. RNAi mekanizmasının, birkaç yıl boyunca ökaryotik hücrelerde çalışıldığı ve RNAi'nin, istenmeyen gen ekspresyonunu kasıtlı olarak susturmak üzere kullanıldığı sırada, transgenlerin ekspresyonunu geliştirmek üzere RNAi parçalanmıştır. Mevcut yöntemler ve hücreler, ilgi konusu çok sayıda endüstriyel ve farmasötik proteinin eksprese edilmesine yönelik faydalıdır.

20

II. Açıklamalar

Mevcut suşları ve yöntemleri detaylı bir şekilde tarif etmeden önce, aşağıdaki terimler açıklık bir şekilde anlaşılmasına yönelik tanımlanır. Tanımlanmayan terimler, ilgili teknikte kullanılan sıradan anlamlarına uymalıdır.

25

Burada kullanıldığı şekliyle, "RNA interferansı" terimi, "RNAi" olarak kısaltılır, genel olarak, ökaryotik hücrelerde RNA aracılı bir gen susturma mekanizmasını belirtir. RNAi, bir ökaryotik hücre içinde eksprese edilen bir protein alt kümesinin ekspresyonunun azalması ile sonuçlanır. RNAi, aynı zamanda, bitki moleküler biyolojisi alanında "birlikte bastırma" ve mantar moleküler biyolojisi alanında "baskılama" olarak refere edilir. RNAi, burada belirtilen referansta detaylı olarak tarif edilir.

30

Burada kullanıldığı şekliyle, "baskılama" terimi, mantarlarda RNA aracılı gen susturma anlamına gelir. Baskılama, burada belirtilen referansta detaylı olarak tarif edilir.

35

Burada kullanıldığı şekliyle, bir "transgen", bir konak organizmaya ilave edilen bir ekzojen gendir. Transgenler, transfeksiyon, transformasyon, transdüksiyon veya enfeksiyon yoluyla yerleştirilebilir ve tercihen, konak hücre kromozomuna entegre edilir. Transgenler, tipik olarak, endüstriyel veya farmasötik olarak önemli proteinler gibi ilgi konusu proteinleri kodlar.

Bir transgen, normalde konak hücre tarafından eksprese edilmeyen veya normalde konak hücre tarafından eksprese edilen bir proteini kodlayabilir. Bu durumda, transgen, konak hücrede doğal olarak bulunan bir gen ile aynı olabilir. Bununla birlikte, transgenler ekzojendir ve konak hücrelere genetik manipülasyon aracılığıyla yerleştirilmesi gerekir.

Burada kullanıldığı şekliyle, "doğal fenotip" terimleri, doğada bulunan genleri, proteinleri veya hücreleri refere eder.

Burada kullanılan "değişken", "değişken hücre", "değişken suş" terimleri ve benzer ifadeler, genetik olarak değiştirilmiş bir ökaryotik hücreyi refere eder.

Burada kullanıldığı şekliyle, "büyük ölçüde bir aktiviteden yoksun" veya benzer ifadeler, belirli bir aktivitenin bir karışımda saptanamayacağı veya karışımın istenilen amacına yönelik engel teşkil etmeyecek bir miktarda mevcut olduğu anlamına gelir.

Burada kullanıldığı şekliyle, "polipeptit" ve "protein" terimleri, peptit bağları ile bağlanmış amino asit kalıntılarını içeren herhangi bir uzunluktaki polimerleri refere etmek üzere birbirlerinin yerine kullanılır. Amino asit kalıntılarına yönelik geleneksel tek harfli veya üç harfli kodlar, burada kullanılmaktadır. Terimler, aynı zamanda, doğal olarak veya interferans yoluyla modifiye edilmiş bir amino asit polimeri kapsar; örneğin disülfid bağ oluşumu, glikozilasyon, lipidasyon, asetilasyon, fosforilasyon veya bir etiketleme bileşeni ile konjugasyon gibi başka herhangi bir manipülasyon veya modifikasyonu kapsar. Tanımın içinde, aynı zamanda, örneğin bir amino asit analogunun (örneğin, doğal olmayan amino asitler dahil) bir veya daha fazlasını içeren polipeptitler ve bunun yanı sıra, teknikte bilinen diğer modifikasyonlar yer alır.

Burada kullanılan "türev polipeptit/protein" terimi, N- ve C-terminal ucunun (uçlarının) birine veya her ikisine bir veya daha fazla amino asit ilavesi, amino asit sekansındaki

bir veya daha fazla amino asitin bir veya birkaç farklı bölgede süstitüsüyonu, proteinin bir ucunda veya her iki ucunda veya amino asit sekansındaki bir veya daha fazla bölgede bulunan bir veya daha fazla amino asidin delesyonu ve/veya bir veya daha fazla amino asidin, amino asit sekansındaki bir veya daha fazla bölgeye yerleştirilmesi yoluyla bir proteinden türetilmiş veya türetilabilir bir proteini refere eder. Bir protein türevinin hazırlanması, doğal proteini kodlayan bir DNA sekansının modifiye edilmesi, bu DNA sekansının uygun bir konakçıya transformasyonu ve türev proteini oluşturmak üzere modifiye edilmiş DNA sekansının ekspresyonu yoluyla gerçekleştirilebilir.

10 Burada kullanıldığı şekliyle, "değişken proteinler" terimi, az sayıda amino asit kalıntısında meydana gelen süstitüsyonlar, delesyonlar ve/veya yerleştirmeler aracılığıyla bir referans/parental proteinden (*örneğin*, doğal fenotipli bir protein) farklı olan proteinleri refere eder. Değişken ve parental protein arasında bulunan farklı amino asit kalıntılarının sayısı, bir veya daha fazla, *örneğin* 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 15 30, 40, 50 veya daha fazla amino asit kalıntısı olabilir.

Değişken proteinler, en az yaklaşık olarak %70 oranında, en az yaklaşık olarak %75 oranında, en az yaklaşık olarak %80 oranında, en az yaklaşık olarak %85 oranında, en az yaklaşık olarak %90 oranında, en az yaklaşık olarak %91 oranında, en az yaklaşık olarak %92 oranında, en az yaklaşık olarak %93 oranında, en az yaklaşık olarak %94 oranında, en az yaklaşık olarak %95 oranında, en az yaklaşık olarak %96 oranında, en az yaklaşık olarak %97 oranında, en az yaklaşık olarak %98 oranında veya en az yaklaşık olarak %99 oranında veya daha fazla bir oranda bir referans proteine sahip amino asit sekansı özdeşliğinde paylaşılabilir. Değişken bir protein, aynı zamanda, 20 seçilen motifler, bölgeler, epitoplar, korunmuş bölgeler ve benzerlerinde bir referans proteinden farklı olabilir.

Burada kullanıldığı şekliyle, "homolog protein" veya basitçe "homolog" terimi, bir referans proteine benzer aktiviteye ve/veya yapıya sahip bir proteini refere eder. Bu 30 durumun genellikle bu şekilde meydana gelmemesine rağmen, homologların mutlaka evrimsel olarak ilişkili olması amaçlanmaz. Homologlar, tipik olarak, benzer bir yapıya sahiptir ve birincil sekans analizi, ikincil veya üçüncül yapı analizi, fonksiyonel analiz ve/veya immünolojik çapraz reaktivite ile tanımlanabilir.

- Sekanslar arasındaki homoloji derecesi, teknikte bilinen herhangi bir uygun yöntem kullanılarak belirlenebilir (bakınız, *örneğin*, Smith and Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482; Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol., 48:443; Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444; GAP, BESTFIT, FASTA gibi
- 5 programlar ve Wisconsin Genetik Yazılım Paketi'nde (Genetics Computer Group, Madison, WI) bulunan TFASTA); ve Devereux et al. (1984) Nucleic Acids Res. 12:387-95). *Örneğin*, PILEUP, sekans homolojisi seviyelerini belirlemek üzere yararlı bir programdır. PILEUP, aşamalı, çift yönlü hizalamalar kullanarak ilgili bir sekans grubundan çoklu sekans hizalaması oluşturur. Bu, aynı zamanda, hizalamayı
- 10 gerçekleştirmek üzere kullanılan kümelenme ilişkilerini gösteren bir ağaç çizebilir. PILEUP, Feng ve Doolittle'in aşamalı hizalama yönteminin bir basitleştirilmesini kullanır (Feng and Doolittle (1987) J. Mol. Evol. 35: 351-60). Yöntem, Higgins ve Sharp ((1989) CABIOS 5: 151-53) tarafından tarif edilene benzerdir. Faydalı PILEUP parametreleri, 3.00'lük bir varsayılan boşluk ağırlığı, 0.10'lık bir varsayılan boşluk uzunluğunun ağırlığı
- 15 ve ağırlıklı uç boşlukları içerir. Faydalı bir algoritmanın başka bir örneği, Altschul et al. ((1990) J. Mol. Biol. 215:403-10) ve Karlin et al. ((1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-87) tarafından açıklanan BLAST algoritmasıdır. Özellikle faydalı bir BLAST programı, WU-BLAST-2 programıdır (bakınız, *örneğin*, Altschul et al. (1996) Meth. Enzymol. 266:460-80). "W," "T" ve "X" parametreleri, hizalamanın hassasiyetini ve
- 20 hızını belirtir. BLAST programı, varsayılan olarak, 11'lik kelime uzunluğu (W), 50'lik BLOSUM62 sayma matrisi (bakınız, *örneğin*, Henikoff and Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915) hizalamaları (B), 10'luk olasılık (E), M'5, N'-4 ve her iki ipliğin karşılaştırmasını kullanır.
- 25 Burada kullanıldığı gibi, en az iki nükleik asit veya polipeptit bağlamında "büyük ölçüde benzer" ve "büyük ölçüde özdeş" ifadeleri, tipik olarak, referans (doğal fenotip) sekansı ile karşılaştırıldığında, bir polinükleotidin veya polipeptidin, en az yaklaşık olarak %70 oranında özdeşliğe, en az yaklaşık olarak %75 oranında özdeşliğe, en az yaklaşık olarak %80 oranında özdeşliğe, en az yaklaşık olarak %85 oranında özdeşliğe, en az
- 30 yaklaşık olarak %90 oranında özdeşliğe, en az yaklaşık olarak %91 oranında özdeşliğe, en az yaklaşık olarak %92 oranında özdeşliğe, en az yaklaşık olarak %93 oranında özdeşliğe, en az yaklaşık olarak %94 oranında özdeşliğe, en az yaklaşık olarak %95 oranında özdeşliğe, en az yaklaşık olarak %96 oranında özdeşliğe, en az yaklaşık olarak %97 oranında özdeşliğe, en az yaklaşık olarak %98 oranında
- 35 özdeşliğe, en az yaklaşık olarak %99 oranında özdeşliğe veya daha fazlasına sahip

olan bir sekans içerdği anlamına gelir. Sekans özdeşliği, standart parametrelerin kullanıldığı BLAST, ALIGN ve CLUSTAL gibi bilinen programlar kullanılarak belirlenebilir (bakınız, *örneğin*, Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Henikoff et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915; Karin et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873; ve Higgins et al. (1988) Gene 73:237-244). BLAST analizlerini gerçekleştirmek üzere kullanılan yazılım, Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi'nden temin edilebilir. Aynı zamanda, veritabanları, FASTA kullanılarak aratılabilir (Pearson et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-48). İki polipeptidin büyük ölçüde özdeş olduğunun bir göstergesi, birinci polipeptidin, ikinci polipeptit ile immünolojik olarak çapraz reaktif olmasıdır. Tipik olarak konservatif amino asit süstitüsyonları ile farklılık gösteren polipeptitler immünolojik olarak çapraz reaktiftir. Bu nedenle, bir polipeptit, *örneğin* iki peptidin yalnızca konservatif bir süstitüsyon ile farklılık gösterdiği ikinci bir polipeptit ile büyük ölçüde özdeştir. İki nükleik asit sekansının büyük ölçüde özdeş olduğunu gösteren bir başka gösterge, iki molekülün bağlayıcı koşullar (*örneğin*, orta ila yüksek bağlayıcı aralığı içerisinde) altında birbirine melezleşmesidir.

Burada kullanıldığı şekliyle, "gen" terimi, bir protein veya RNA'nın ekspresyonunu kodlayan ve yönlendiren bir nükleik asidi belirtmek üzere "alel" terimi ile eş anlamlıdır. Filamentli mantarların vejetatif formları, genellikle haploittir, bu nedenle belirli bir fenotipi vermek üzere belirli bir genin (yani tek bir alel) tek bir kopyası yeterlidir.

Burada kullanıldığı şekliyle, "bir genin delesyonu", bir konak hücrenin genomundan bunun çıkarılmasını ifade eder. Bir genin, bir genin kodlama sekansına hemen bitişik olmayan kontrol elemanlarını (*örneğin*, hızlandırıcı elemanlar) içerdği durumda, bir genin delesyonu, kodlama sekansının delesyonuna ve isteğe bağlı olarak bitişik promotör ve/veya sonlandırıcı sekanslarına karşılık gelir.

Burada kullanıldığı şekliyle, "bir genin parçalanması" genel olarak, bir konak hücrede, bir hücrenin, *örneğin* bir protein gibi bir fonksiyon gen ürününü üretmesini büyük ölçüde engelleyen herhangi bir genetik veya kimyasal manipölasyonu ifade eder. Örnek parçalanma yöntemleri arasında, bir polipeptit kodlama sekansı, bir promotör, bir hızlandırıcı veya başka bir düzenleyici eleman veya bunun mutajenezini içeren bir genin herhangi bir kısmının tamamen veya kısmen delesyonunu içerir, burada mutajenez, süstitüsyonlar, yerleştirmeler, delesyonlar, evrilmeler ve bunların

kombinasyonlarını ve çeşitlerini kapsar, bu mutasyonlardan herhangi biri, bir fonksiyon gen ürününün üretimini büyük ölçüde engeller.

5 Burada kullanıldığı şekliyle, "genetik manipülasyon", örneğin, tercihen önceden seçilmiş nükleik asit sekansı üzerinde etkili olan makromoleküller (diğer bir deyişle, enzimler ve/veya nükleik asitler) kullanılarak önceden seçilmiş bir nükleik asit hedef sekansının değiştirilmesini refere eder. Bu şekilde, genetik manipülasyon, kimyasal manipülasyondan farklıdır, burada küçük moleküller, önceden seçilmemiş olan bir nükleik asit sekansında meydana gelen değişiklikleri rastgele etkilemek üzere kullanılır.

10

Burada kullanıldığı şekliyle, bir "genetik değişim", genetik manipülasyondan kaynaklanan bir hücrenin DNA'sındaki bir değişimdir ve kimyasal manipülasyondan kaynaklanan bir hücrenin DNA'sındaki değişimden farklıdır.

15 Burada kullanıldığı şekliyle, "birincil genetik belirleyici", diğer genlerin yokluğunda belirtilen bir fenotipi veya bunun genetik manipülasyonlarını vermek üzere gerekli ve yeterli olan bir geni veya bunun genetik manipülasyonunu refere eder.

20 Burada kullanıldığı şekliyle, bir "fonksiyonel polipeptit/protein", bir enzimatik aktivite, bir bağlayıcı aktivite, bir yüzey aktif özellik veya benzeri gibi bir aktiviteye sahip olan ve bu aktiviteyi ortadan kaldırmak veya azaltmak üzere mutajene edilmemiş, kesilmemiş veya başka bir şekilde modifiye edilmemiş bir proteindir. Fonksiyonel polipeptitler, belirtildiği gibi termostabil veya termolabil olabilir.

25 Burada kullanıldığı şekliyle, "fonksiyonel bir gen", tipik olarak bir protein olan bir aktif gen ürünü üretmek üzere hücresel bileşenler tarafından kullanılacak bir gendir. Fonksiyonel genler, aktif bir gen ürünü üretmek üzere hücresel bileşenler tarafından kullanılamayacak şekilde modifiye edilen, parçalanmış genlerin antitezidir.

30 Burada kullanıldığı şekliyle, varyant hücreler ve bir parental hücre arasındaki protein ekspresyonundaki farkın, yaklaşık olarak %20'den az, yaklaşık olarak %15'ten az, yaklaşık olarak %10'dan az, yaklaşık olarak %7'den az, yaklaşık olarak %5'ten az veya yaklaşık olarak % 3'ten az olması durumunda, değişken hücreler (veya bir değişken suş), parental hücrelere (veya bir parental suşa) kıyasla "yüksek seviyede protein

35 ekspresyonu ve/veya sekresyonunu muhafaza eder veya sürdürür".

Burada kullanıldığı şekliyle, "ilgi konusu bir protein", bir konak hücrede üretilmesi istenen bir proteindir. Genel olarak, ilgi konusu proteinler, endüstriyel veya farmasötik kullanıma yönelik ticari olarak önemlidir ve büyük miktarlarda üretilmeleri arzu edilir. İlgiilenen proteinler, genellikle, ürünler olarak ilgi çekici olmayan ve temel olarak, alt yapı protein kontaminantları olarak kabul edilen, filamentöz mantar hücreleri tarafından eksprese edilen sayısız diğer proteinlerden ayırt edilmelidir.

Burada kullanıldığı şekliyle, değişken hücreler (veya değişken bir suş), parental hücreler tarafından üretilen protein miktarına kıyasla azaltılmış olarak, değişken hücrelerin ürettiği protein miktarının, %20'den fazla olmaması, %15'ten fazla olmaması,% 10'dan fazla olmaması, %5'ten fazla olmaması durumunda, parental hücreler (veya bir parental suşu) olarak birim biyokütle miktarı başına "büyük ölçüde aynı miktarda" protein üretir, burada protein miktarı, protein üretiminin ölçüldüğü hücrelerin toplam biyokütle miktarına normalize edilir, burada biyokütle, ıslak (örneğin, hücre peleti) veya kuru ağırlık olarak eksprese edilebilir.

Burada kullanıldığı şekliyle, değişken hücreler ve parental hücreler tarafından eksprese edilen ilgi konusu protein miktarı, değişken hücreler ve parental hücreler arasında bulunan ekspresyondaki farkın, yaklaşık olarak %20'den daha az, yaklaşık olarak %15'ten daha az, yaklaşık olarak %10'dan daha az, yaklaşık olarak %5'ten daha az, yaklaşık olarak %4'ten daha az, yaklaşık olarak %3'ten daha az, yaklaşık olarak %2'den daha az, yaklaşık olarak %1'den daha az olması durumunda, "büyük ölçüde benzerdir".

Burada kullanıldığı şekliyle, "bir" "tek" ve "bu" tekileri, bağlam aksini açıkça belirtmediği sürece çoğul referansları kapsar. Aşağıdaki kısaltmalar/kısa isimler, aksi belirtmediği sürece, aşağıdaki anlamları içerir:

EC	enzim komisyonu
30 kDa	kiloDalton
kb	kilobaz
MW	moleküler ağırlık
w/v	ağırlık/hacim
w/w	ağırlık/ağırlık
35 v/v	hacim/hacim

	wt%	ağırlık yüzdesi
	°C	santigrat derece
	H ₂ O	su
	H ₂ O ₂	hidrojen peroksit
5	dH ₂ O veya DI	deiyonize su
	dH ₂ O	deiyonize su, Milli-Q filtrasyon
	g veya gm	gram
	µg	mikrogram
	mg	milligram
10	kg	kilogram
	lb	paund
	µL ve µl	mikrolitre
	mL ve ml	millilitre
	mm	millimetre
15	µm	mikrometre
	M	molar
	mM	millimolar
	µM	mikromolar
	U	birim
20	ppm	milyon başına düşen parça
	sec ve "	saniye
	min ve '	dakika
	hr	saat
	EtOH	etanol
25	eq.	eşdeğer
	N	normal
	PCR	polimeraz zincirleme reaksiyonu
	SDS-PAGE	sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
	DNA	deoksiribonükleik asit
30	RNA	ribonükleik asit
	FOA	floroorotik asit
	ATP	adenozin-5'-trifosfat
	UV	ultraviyole
	AAPN	Ala-Ala-Phe-p-nitroanilid
35	A ₅₄₀	540 nm dalga boyunda ölçülen absorbans

	CMC	karboksimetil selüloz
	rpm	dakikada başına düşen devir sayısı
	Δ	bir delesyon ile ilgili
	RNAi	RNA interferansı
5	PTGS	transkripsiyon sonrası gen susturma
	dsRNA	çift iplikli RNA
	RdRP	RNA bağımlı RNA polimeraz
	siRNA	küçük interferans dsRNA
	POI	ilgi konusu protein(ler)
10	PPD	PAZ piwi bölgesi
	DOE	Enerji Bölümü
	JGI	Ortak Genom Enstitüsü
	APY	aminopeptidaz Y
	3PP	aminopeptidil tripeptidazlar
15	CBH1	sellobiyohidrolaz 1
	CBH2	sellobiyohidrolaz 2

III. RNAi mekanizmasının parçalanması ile transgen ekspresyonunun arttırılması

- 20 RNA interferansının (RNAi) miktarını azaltan hücrelerde genetik bir değişikliğin uygulanması ile ökaryotik hücrelerde bir transgenin ekspresyon seviyesini arttırmaya yönelik bir yöntem açıklanır. Aynı zamanda, böyle bir yöntem ile üretilen hücreler açıklanır. Gen ekspresyonunu azaltmak üzere RNAi kullanma tarif edilirken, bir transgen ekspresyonunu arttırmak üzere RNAi'nin parçalanması şimdiye kadar
- 25 keşfedilmemiştir. Mevcut durumda, RNAi'ya yönelik eksik olan hücrelerin, hücrelerdeki maksimum ekspresyon seviyelerinin arttırılması, çok sayıda dönüştürücünün ortalama seviyesini veya ifadesini arttırılması ve bir transgenin çoklu kopyaları hücrelere yerleştirildiğinde, bazı durumlarda gözlenen ekspresyondaki azalmanın üstesinden gelinmesi dahil olmak üzere transgenler tarafından kodlanan, ilgi konusu proteinlerin
- 30 (POI) yüksek düzeyde ekspresyonuna yönelik mükemmel üretim konakları yaptığı gözlenmiştir. Parçalanmış RNAi içeren hücrelerinin, en azından bir batırılmış kültür partisi fermentasyonu olmadığı durumlarda, büyüme kusurlarından muzdarip olduğu gözlenmez.

RNAi mekanizmasının parçalanması, RNAi mekanizması ile ilişkili bir veya daha fazla geni parçalayan bir veya daha fazla genetik değişimin gerçekleştirilmesi aracılığıyla başarılabilir. Örnek genler, bir ATP'ye bağlı şekilde yaklaşık olarak 21-25 nükleotide sahip siRNA'lar üretmek üzere dsRNA moleküllerinin işlenmesinde yer alan Dicer benzeri proteinleri kodlayan *dcl-1* ve *dcl-2*'yi içerir. Dicer proteinlerinin bazı organizmalarda kısmen yedekli fonksiyonlara sahip olduğu gözlenir. Bu genlerin homologları, filamentli mantarlar, memeli hücreleri, bitki hücreleri ve böcek hücreleri dahil olmak üzere türlerde veya organizmalarda tanımlanmıştır. Diğer homologlar, amino asit dizilimi ve diğer iyi bilinen biyoinformatik teknikler ile tanımlanabilir.

10

Bu genlerin bir veya daha fazlasının parçalanması, bir veya daha fazla gen tarafından kodlanan bir fonksiyon proteininin ekspresyonunu büyük ölçüde önleyen herhangi bir uygun yöntemin kullanılması aracılığıyla gerçekleştirilebilir. Örnek niteliğindeki parçalanma yöntemleri, örneğin kodlama sekansı, promotör, sonlandırıcı, bir hızlandırıcı veya başka bir düzenleyici elemanın tamamen veya kısmen delesyonu dahil olmak üzere bir genin tamamen veya kısmen delesyonunu içerir. Bir genin parçalanması, aynı zamanda, genin herhangi bir bölümünü içeren bir kromozomun bir kısmının tamamen veya kısmen delesyonu aracılığıyla gerçekleştirilebilir. Bir genin parçalanması, aynı zamanda, örneğin kodlama dizisi, promotör, sonlandırıcı, bir hızlandırıcı veya başka bir düzenleyici eleman gibi genin herhangi bir kısmına nükleotit süstitüsyonları veya ilavelerinin yapılması ile gerçekleştirilebilir. Tercihen, delesyonlar, yerleştirmeler ve/veya süstitüsyonlar (toplu olarak, mutasyonlar olarak refere edilir), aynı zamanda, kimyasal mutajenez yoluyla gerçekleştirilebilmesine rağmen, sekansa özgü moleküler biyoloji teknikleri kullanılarak genetik manipülasyon yoluyla gerçekleştirilir.

25

Bir gende meydana gelen mutasyonlar, promotörün verimini düşürebilir, bir hızlandırıcının verimini düşürebilir, mRNA'nın birleşmesini veya düzenlenmesini engelleyebilir, mRNA'nın translasyonunu engelleyebilir, tam uzunluktaki proteinin translasyonunu engellemek üzere kodlama sekansına bir durdurma kodonu verebilir, daha az aktif veya inaktif bir protein üretmek veya diğer hücre bileşenleri ile protein etkileşimini azaltmak üzere proteinin kodlama sekansını değiştirebilir, daha az stabil bir protein üretmek üzere proteinin kodlama sekansını değiştirebilir veya yok etmeye yönelik proteini hedefleyebilir, proteinin yanlış katlanmasına veya yanlış şekilde modifiye edilmesine (örneğin, glikozilasyon aracılığıyla) veya bir proteinin hücresel

35

trafiğin engellenmesine neden olabilir. Genel olarak, bu ve diğer genetik manipülasyonların amacı, fonksiyonel bir RNAi-ilişkili proteinin ekspresyonunu azaltmak veya önlemek veya bu gibi proteinlerin normal biyolojik aktivitesini azaltmak veya önlemektir.

5

Bir genin parçalanmasına yönelik örnek yöntemler arasında, bölgeye özgü rekombinasyon, hedeflenmiş yerleştirme, transpoze edilebilir elemanların kullanımı, virüsler ile transdüksiyon ve kimyasal mutajenez bulunur. Gen parçalanmasına, örneğin seçilebilir bir markör, bir floresan veya diğer ayırt edilebilir markör, bir klonlama bölgesi veya klonlama kaseti, suşun daha sonra tanımlanmasına olanak sağlayan bir dizi parmak izi veya elde edilen hücrelere farklılık veya fonksiyonellik eklemek üzere diğer genetik modifikasyonların eşzamanlı veya sıralı olarak yerleştirilmesi eşlik edebilir.

15 RNAi mekanizmasının parçalandığı hücreler, halihazırda, yüksek seviyelerde eksprese edilmesi istenen bir transgenin bir veya daha fazla kopyasını içerebilir. Alternatif olarak, ilgi konusu bir transgenin bir veya daha fazla kopyası, RNAi mekanizmasının parçalanmasını takiben hücrelere ilave edilebilir. Başka bir alternatifte, RNAi ile ilişkili bir genin parçalanması sürecinde ilgilenilen bir transgenin bir veya daha fazla kopyası ilave edilebilir. Bu şekilde, mevcut yöntemler, RNAi ile ilişkili bir genin bölgesinde bir transgenin, entegrasyonunu tasarlar, böylece RNAi mekanizması parçalanırken, eşzamanlı olarak bir hücrenin kromozomuna transgen ilave edilir.

RNAi mekanizmasının parçalandığı ökaryotik hücreler, Çin hamsteri yumurtalık (CHO) hücreleri, NIH/3T3 hücreleri, COS hücreleri, 293 hücreleri ve VERO hücreleri, *Drosophila* ve *lepidopteran* hücreleri gibi böcek hücreleri, tütün, mısır, pirinç, alg ve lemna hücreleri gibi bitki hücreleri ve maya ve filamentli mantar hücreleri gibi mantar hücreleri gibi, insanlar, maymunlar ve kemirgenlerden elde edilen hücreleri içerir. Örnek niteliğindeki filamentli mantar hücreleri, phylum Ascomycota, subphylum Pezizomycotina'dan, özellikle vejetatif hipha durumuna sahip olanlardan elde edilir. Özel örnek niteliğindeki mantar hücreleri, ticari açıdan önemli endüstriyel ve farmasötik proteinlerin üretimine yönelik kullanılır, *Schizosaccharomyces* spp., *Trichoderma* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp., *Penicillium* spp., *Chrysosporium* spp., *Cephalosporium* spp., *Talaromyces* spp., *Geosmithia* spp., *Myceliophthora* spp., and *Neurospora* spp. Özel organizmalar *Trichoderma reesei* (daha önce *Trichoderma*

35

longibrachiatum ve *Hypocrea jecorina* olarak sınıflandırılmış), *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus itaconicus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus sojae*, *Aspergillus japonicus*, *Scedosporium prolificans*, *Neurospora crassa*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium chrysogenum*, *Talaromyces* (5 *Geosmithia*) *emersonii*, *Fusarium venenatum*, *Myceliophthora thermophila* ve *Chrysosporium lucknowense* içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir.

Mevcut yöntemler ve değişken hücreler, sayısız uygulamaya sahiptir. Bunlar, endüstriyel veya farmasötik proteinler üretilirken, verimi artırmak ve göreceli saflığı arttırmak amacıyla üretim organizmalarında bir transgenin ekspresyon seviyelerini arttırmak üzere kullanılabilirler. Bunlar, transfeksiyon, transformasyon veya transgen ile transdüksiyon sonrası yüksek düzeyde eksprese edici hücreleri tanımlamak üzere gereken süreyi azaltabilirler. Bunlar, yüksek düzeyde eksprese edici üretim konaklarını tanımlamak üzere gereken süreyi kısaltabilirler. Bunlar, bazı konak organizmalarda protein ekspresyonunu önemli ölçüde azaltabilen, birden fazla transgen kopyası ile ilişkili problemleri azaltabilirler. Bunlar, hücrelerdeki bir transgenin ekspresyonunu arttırmak üzere kullanılabilirler, burada transgen tarafından kodlanan protein miktarındaki artış, ilgi konusu bir metabolitin artırılmış bir miktarını üretir.

Bu yöntemlerin ve değişken hücrelerin bu ve diğer açıları ve düzenlemeleri, yukarıda tarif edilen açıklamalar ve ekteki örnekler ışığında uzman kişiler tarafından açıkça anlaşılacaktır.

ÖRNEKLER

25

Örnek 1. Parçalanmış *del1* ve *dcl2* genleri ile bir *T. reesei* suşu yapısı

A. *T. reesei*'deki *dicer* genlerinin tanımlanması

30 DURA AEG5 18 suşu tarif edilmiştir (WO2012/054554 ve US2012107872). Bu örneğin 653MU adlı bir türevi, bu örneğe yönelik başlangıç noktası olarak kullanılmıştır. DURA ΔEG5 18 ile karşılaştırıldığında, 653MU üç ilave delesyon içerir (iki selülaz geni, *egl3* ve *egl6*, ayrıca mannanaz geni, *man1*). 653MU'da fonksiyonel bir *pyr2* geni (orotat fosforibosiltransferazı kodlar) mevcut değildir. Bu delesyon işlemlerinin hiçbirisi, mevcut 35 yöntemler veya değişken hücelere yönelik önemli değildir.

İki varsayılan Dicer benzeri enzimi kodlayan *T. reesei* genleri, sırasıyla *dcl1* ve *dcl2* genleri tarafından kodlanan *Neurospora crassa* DCL1 ve DCL2 proteinlerinin sekanslarını kullanarak homoloji araştırmalarına dayanan Enerji Bölümü (DOE) Ortak Genom Enstitüsü (JGI) veritabanında tanımlanmıştır. Trire 2.0'daki protein ID 69494, *N. crassa* DCL1 proteinine en yüksek homolojiyi gösterir ve burada, *dcl1* olarak refere edilen, kodlayan gen ile *T. reesei* DCL1 proteini olarak refere edilir. JGI ek açıklamasına göre, protein Trire 2.0 69494, ek açıklamanın tamamen doğru olmadığını öne sürerek, bunun N terminalinde bir metiyonin kalıntısına sahip değildir. Mevcut Örneklerin amaçları doğrultusunda, doğru N-terminalinin, JGI ek açıklamalı sekansında bulunan birinci kalıntının 126 amino asitlik kalıntı kadar yukarısında bulunduğu varsayılmıştır. *T. reesei*'deki öngörülen DCL1 proteininin toplam uzunluğu, gen parçalanmasına yönelik yeterli hedef sağlayan 1.400 amino asit kalıntısını aşar. Trire 2.0'daki protein ID 69494, *N. crassa* DCL2 proteinine en yüksek homolojiyi gösterir ve burada, *dcl2* olarak refere edilen, kodlayan gen ile *T. reesei* DCL2 proteini olarak refere edilir.

B. Bir *dcl1* parçalanma vektörünün üretilmesi

Parçalanmaya yönelik kullanılan DNA yapıları, daha önce, selüloz genlerinin parçalanmasına yönelik kullanılan yapılar ile aynı yaklaşımı takip etmiştir (bakınız, *örneğin*, WO2012/054554 and US2012107872). Parçalanma kasetleri, aşağıda bulunan segmentleri (sırayla 5' ile 3') içermektedir: (i) 1-1.5 kb *pyr2* markör geninin 5'-yan bir bölgesi, (ii) 5'-yan bölgeden daha yukarıda yer alan orijinal kromozomal sekanstan seçilen 0.5-0.7 kb'lik bir "tekrar" bölgesi ve son olarak, (iii) 1-1.5 kb'lik 3'-yan bölge. Bu yaklaşım, Şekil 1 ile gösterilmektedir.

Bu gibi bir parçalanma kasetinin birleşimi, pek çok standart teknik kullanılarak çok farklı şekillerde gerçekleştirilir. Alternatif olarak, bir parçalanma kaseti, *de novo* sentezlenebilir. *Dcl1* genini parçalamak üzere kullanılan özel yöntem, aşağıda detaylı olarak açıklanmaktadır. Primerler, Tablo 1'de listelenir.

Tablo 1. Dcl1 parçalanma vektörünün yapımına yönelik kullanılan PCR primerleri

Primer	Primer sekansı	SEQ ID NO
DCL1_3		1

Primer	Primer sekansı	SEQ ID NO
	5'-CTTACCCAAACGCGAACGATTGC TAGCTCTGGGCTAC-3'	
DCL1_31	5'-CTGTGCTAGGTGACGGCTCTCCTTGGT GCCAGTATGCGAAGCTTTCTTTG-3'	2
DCL1_51	5'-CATACTGCCACCAAGGAGACCCGTCA CCTAGCACAGGGCCATACGGACGGC-3'	3
DCL1_5	5'-GCGCCCAGGAAGCAGCGGCAACAGCAGC AGCAGGAG-3'	4
DCL1R_5	5'-GGTGTCGACTCTAGATCTTCAGCCCATTAT TGC'CCAGGCGGACTGGCCAAG-3'	5
DCL1R_3	5'-CTGTGGGATCCAGATTTGGAAGACTTGAT ACGGGTTC-3'	6
oPYR2_35	5'-TTGCAATTGACTAGTGGATCCAACGCCGGC TATTAGGCCATAAG-3'	7
oPYR2_55	5'-AGTACTAGTCAATTGCTCGAGTTTATAAGT GACAAATGC-3'	8

İlk olarak, 5'-yan bölgeyi ve 3'-yan bölgeyi belirleyen alanlar (Şekil 2), Primer çiftleri DCL_5 artı DCL_31 ve DCL_51 artı DCL_3 kullanılarak genişletilmiştir, şablon olarak *T. reesei* 653MU kromozomal DNA'sı kullanılmıştır. 1.6 ve 1.5 kb'lik ürünler, agaroz jel

5 elektroforezi ile saflaştırılmıştır, yaklaşık olarak 1: 1 oranında karıştırılmıştır ve 3.1 kb'lik

bir füzyon ürünü üretmek üzere bir çift primer DCL_5 artı DCL_3 ile bir PCR reaksiyonuna yönelik bir şablon olarak kullanılmıştır. Parça, Invitrogen tarafından sağlanan bir kit kullanılarak pCR™-Blunt II-TOPO® vektörüne klonlanmıştır, böylece plazmid pCR (DCL1UD) üretilmiştir.

5

Paralel olarak, *dc1* tekrar bölgesi (Şekil 2), DCL1R_5 artı DCL1R_3 primerleri ile genişletilmiştir ve *T. reesei*'nin *pyr2* geni, şablon olarak *T. reesei* 653MU'nun kromozomal DNA'sı kullanılarak, oPYR2_55 ve oPYR2_35 primerleri ile genişletilmiştir. Her iki fragman, sırasıyla pCR (DCL1R) ve pCR (FlexiPyr2) plazmidlerinin elde edildiği pCR™ -Blunt II-TOPO® vektörüne bireysel olarak klonlanmıştır. Plazmid pCR (DCL1UD), kısıtlama endonükleazları *Sall* ve *Bgl*II ile sindirilmiştir ve 5.7 kb'lik DNA fragmanı, hazırlayıcı agaroz elektroforezi ile izole edilmiştir. Plazmid pCR (DCL1R), *dc1* tekrar bölgesini içeren 0.6 kb'lik bir fragmanın kesilip çıkarılarak *Xba*I ve *Bam*HI ile sindirilmiştir. Plazmid pCR (FlexiPyr2), *pyr2* genini içeren 1.7 kb'lik bir fragmanın kesilip çıkarılarak *Xho*I ve *Spe*I ile sindirilmiştir. Saflaştırmanın ardından, bu iki DNA fragmanı, *Sall* artı *Bgl*III ile sindirilmiş pCR (DCL1UD) vektörüyle, *Xho*I ve *Sall*, *Spe*I ve *Xba*I ve *Bam*HI ve *Bgl*II tarafından üretilen uyumlu uçlara dayanarak DNA ligaz mevcudiyetinde inkübe edilmiştir. Elde edilen vektör pCR(DCL1RPy), *dc1* gen parçalanma kasetinin son birleşimini taşımıştır.

20

C. Bir *dc12* parçalanma vektörünün üretilmesi

Dcl2 parçalanma vektörlerinin üretimi, *dc11*'inkine benzer bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Yöntem, aşağıda detaylı olarak açıklanmaktadır ve primerler Tablo 1'de listelenmiştir.

25

Tablo 2. *Dcl2* bozulma vektörünün üretimine yönelik kullanılan PCR primerleri

Primer	Primer sekansı	SEQ ID NO
oDCL2_36	5'-GTTGGATAGGTACCTAGATGTAAGATTCTA TATAAGTC-3'	9
DCL2_56	5'-CATCTTCATCATCGGCAGCCCACGTAACC TGTGCCAG-3'	10

Primer	Primer sekansı	SEQ ID NO
DCL2_57	5'-CAGGCGAAAGAGGAGGAGATCTCAAAATT CGTCCCCGAAGGCTCGTGGACCAGTG-3'	11
DCL2_37	5'-TTCGGGGACGAATTTTGAGATCTCCTCCT CTTTCGCCTGCCACTTCAAGATCGCAG-3'	12
DCL2_56	5'-CATCTTCATCATCGGCAGCCACGTAACCT GTGCCAG-3'	13
DCL2_57	5'-CAGGCGAAAGAGGAGGAGATCTCAAAATT CGTCCCCGAAGGCTCGTGGACCAGTG-3'	14
oDCL2R_3	5'-GGTTGGATCCGCGGAAAGGTCAATAAAATG GGAGTTACTGAG-3'	15
oDCL2R_5	5'-GGTTGTCGACTCTAGATCTGCCCTGTCCAG CATCGAGCTGACCTCTCTATIG-3'	16

5'-yan (1.6 kb) ve 3'-yan (1.3 kb) bölgeleri, sırasıyla, oDCL2_56 artı oDCL2_37 ve oDCL2_57 artı oDCL2_36 primer çiftleri kullanılarak PCR ile genişletilmiştir. Füzyon PCR, iki PCR ürününün agaroz jel elektroforezi ile saflaştırılması ve bunların

5 karışımlarının, oDCL2_56 artı oDCL2_36 primerleri ile reaksiyona yönelik bir şablon olarak kullanılması aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen 2.9 kb füzyon ürünü, plazmid pCR (DCL2_UD) oluşturmak üzere pCR™-Blunt II-TOPO® vektörüne klonlanmıştır.

- 10 *Dcl1* tekrar bölgesi (0.7 kb), oDCL2R_5 artı oDCL2R_3 ile genişletilmiştir. PCR ürünü, *XbaI* ve *BamHI* ile sindirilmiştir. pCR (DCL2_UD) *SalI* ve *BglII* ile sindirilmiştir ve büyük

fragman saflaştırılmıştır. *Pyr2* geni, daha önce olduğu, gibi *XbaI* ve *SpeI* ile sindirim aracılığıyla pCR'den (FlexiPyr2) kesilip çıkarılmıştır. Üç fragman, *dcl2* geni bozulma vektörü, pCR(DCL2RPyr, yine *SpeI* ve *XbaI* ve *BamHI* ve *BglII* tarafından üretilen uyumlu uçlara dayanarak) üretmek üzere DNA ligaz varlığında, birlikte inkübe edilir.

5

Parçalanmış bir *dcl1* genine sahip bir *T. reesei* suşu üretmek üzere, 653MU suşu, şablon olarak pCR (DCL1RPyr) ve primer olarak DCL1_5 artı DCL1_3 kullanılarak elde edilen yaklaşık 4.4 kb PCR ürünü ile dönüştürülmüştür. Bir dizi stabil prototrofik transformant izole edilmiştir ve bunların kromozomal DNA'ları, primer çifti oDCL1R_D1 artı oDCL1D_R1 kullanılarak PCR ile izole edilmiştir ve analiz edilmiştir (Tablo 3 ve Şekil 3). 1.67 kb'lik bir PCR ürününün üretilmesi, dönüştürücü DNA'nın, *T. reesei* kromozomunun *dcl1* lokusunda homolog bir şekilde entegre edildiğini göstermiştir. Böyle bir klonun DNA'sı, bun ek olarak, oDCL1R_D1 artı oDCL1D_R2 primerleri kullanılarak analiz edilmiştir. 1.8 kb'lik bir ürünün ortaya çıkışı, *dcl1* lokusundaki parçalanmış kasetin doğru entegrasyonunu onaylamıştır. Parçalanmış *dcl1* genini taşıyan transformantın, sporlar üretmesine olanak sağlamıştır ve spor süspansiyonu, 1.2 g/L floroorotik asit (FOA) ile takviye edilmiş minimal agar ortamı üzerinde kaplanmıştır. Bu suşun kromozomunda "tekrar bölgesinin" iki kopyasının bulunması nedeniyle (Şekil 4A), FOA-dirençli *pyr2*-mutantları, iki tekrar sekansı arasında homolog rekombinasyon ile yüksek frekansta üretilir. Genellikle "ilmek çıkarma" olarak adlandırılan bir işlem sırasında, tekrar sekansının iki kopyası arasındaki DNA, Şekil 4B'de gösterilen yapıyı oluşturarak kaybolur. *Dcl1* geninin delesyonundan ve *pyr2* markörünün kesilip çıkarılmasından sonra, *dcl1* kromozomal alanının doğru yapısını onaylamak üzere, DNA, birkaç FOA dirençli izolattan ayrılıp çıkarılmıştır. ODCL1FU_D1 artı oDCL1D_R2 ve oDCL1FU_D2 artı oDCL1D_R1 primer çiftleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR analizleri, test edilen tüm klonlarda, sırasıyla 2.3 ve 2.4 kb'lik PCR ürünlerinin saptanmasına neden olmuştur. Bu, markörün kesilip çıkarılmasından sonra silinen *dcl1* geni etrafındaki kromozomal yapıya yönelik beklenen PCR ürünlerinin boyutudur (Şekil 4B). Beklenen PCR ürünlerini üreten bu FOA-dirençli klonlardan biri, 356MUΔ*dcl1* suşu olarak belirlenmiştir.

30

Tablo 3. *dcl1* ve *dcl2* delesyonlarını eşlemeye yönelik kullanılan primerler

Primer	Sekans	SEQ ID NO
oDCL1D_R1		17

Primer	Sekans	SEQ ID NO
	5'-CAGACTCGGACGTCGACTCCTTTC G'GGCAAGTATC-3'	
oDCL1D_R2	5'-GGGAGATGATTCTTGCGGCGAATCC ATCTTCATCTC-3'	18
oDCL1FU_D1	5'-CCATGTCATTTACCCAGAGACAGCAA ATGTCCGAAG-3'	19
oDCL1FU_D2	5'-CCATCAAGAAGATTGAGGAGGCCATC AAAGACCTCCG-3'	20
oDCL1R_D1	5'-GAGCGCTTTATGACAAGCAATGACAG AGGGCAACTG-3'	21
oDCL2_5F	5'-CTAATTTTCAGTATTCTAGGTCATGCTA CGCAATAAC-3'	22
oDCL2D_R1	5'-CCAATCAAACACCACCACCACTCAGA ATCTGCATCCTC-3'	23
oDCL2D_R2	5'-CCAGCCAACCCTCGACTCAAAAGAAGA CCAAAACCTCCG-3'	24
oDCL2R_D1	5'-GTGCATTAATTAGTCACTGCTACCAAT GGTGATTCCTG-3'	25
oDCL2R_D2		26

Primer	Sekans	SEQ ID NO
	5'-GAAGGTGATGATGACGGTCTGCCTACA TACCTTAGATC-3'	

Suş 356MUΔdcl1, şablon olarak plazmid pCR (DCL2RPyr) ve primer olarak oDCL2_56
artı oDCL2_36 primerleri kullanılarak üretilen 4.75 kb PCR ürünü ile transformasyon
yoluyla üridin prototrofisine dönüştürülmüştür. Stabil prototrofik transformantlar,
5 bireysel klonların kromozomal DNA'sının izole edilmesi ve primer çiftleri oDCL2R_D1
artı oDCL2D_R1 kullanılarak PCR analizinin gerçekleştirilmesi aracılığıyla taranmıştır.
Beklenen boyutta (1.86 kb) PCR ürünü üreten bir transformant, ayrıca, farklı bir primer
seti (oDCL2R_D2 ve oDCL2D_R2) ile analiz edilmiştir. Bu klonda parçalanma kasetinin
dcl2 bölgesinde entegre olduğunu doğrulayan 2.1 kb'lik bir PCR ürünü gözlenmiştir
10 (Şekil 5B). Bu klon, yukarıda tarif edilen ile aynı şekilde FOA kullanılarak markörün
kesilip çıkarılması prosedürüne tabi tutulmuştur. Bir FOA dirençli klon, primer
oDCL2_5F ve oDCLD_R1 primerleri kullanılarak PCR ile analiz edilmiştir. Beklenen
boyutta (2.4 kb) bir PCR ürünü elde edilmiştir, PCR™-Blunt II-TOPO® vektöründe
klonlanmıştır ve DNA sıralamasına tabi tutulmuştur. Sıralama verileri, dcl2 kromozomal
15 lokusunun, dcl2 geninin delesyonundan ve pyr2 markörünün kesilip çıkarılmasından
sonra beklenen yapıya sahip olduğunu doğrulamıştır. Tüm PCR ve sıralama
kontrollerini geçen suş, DiMorph olarak adlandırılmıştır ve *T. Reesei*'deki baskılama
sisteminin inaktivasyon etkilerini incelemek üzere kullanılmıştır.

20 **Örnek 2. Baskılamaya yetkin ve baskılamayı kesen ilgi konusu proteinlerin ekspresyonunun ve *T. Reesei* suşlarının test edilmesi**

T. reesei'deki baskılama sisteminin inaktivasyon etkisini incelemek üzere iki adet farklı
salgılanan proteolitik protein kullanılmıştır. Bir protein, çeşitli organizmalarda
25 aminopeptidaz Y ile homologdur ve APY (Trire 2.0'da Protein ID 81070) olarak refere
edilir. Diğer protein, bir aminopeptidil tripeptidaz homologudur ve 3PP (Trire 2.0'da
Protein ID 82623) olarak refere edilir. APY ve 3PP için ekspresyon kasetleri, *T. reesei*
ekspresyon çalışmasında rutin olarak kullanılan fonksiyonel elemanların kullanılması
aracılığıyla oluşturulmuştur. Ekspresyon, bir cbhl promotörü tarafından tahrik edilmiştir
30 ve kodlama sekansı, 3'-uçlu bya cbhl transkripsiyonel sonlandırıcıda kuşatılmıştır. İlgi
konusu her gene yönelik, benzer iki ekspresyon vektörü oluşturulmuştur: (i) amdS

markör genini (diğer bir deyişle, pTrex3gM (APY) ve pTrex3gM (3PP)) taşıyan bir vektör ve (ii) *pyr2* markör genini (diğer bir deyişle, pTrex8gM(APY) ve pTrex8gM (3PP)) taşıyan bir vektör.

- 5 Ekspresyon kasetlerini birleştirme yöntemleri, rutin genetik mühendisliği yöntemleridir ve burada detaylı olarak açıklanmamaktadır. Kısaca, APY ve 3PP genlerinin kodlama sekansları PCR ile genişletilmiştir ve pENTR™/D TOPO® vektörüne (Invitrogen) klonlanmıştır, bunu takiben, Gateway® LR Clonase® Enzyme MIX (Invitrogen) kullanılarak *cbhl* promotörü ve sonlandırıcı arasında klonlanmış kodlama sekansları
- 10 yerleştirilir. APY ve 3PP ekspresyon kasetleri, alternatif olarak, ticari bir DNA sentez servisi sağlayıcısından sipariş edilebilir. Bakteriyel vektör dizileri olmayan ekspresyon kasetleri, yukarıda belirtilen vektörlerin şablon olarak kullanılması ve Tablo 4'te listelenen primerlerin kullanılması aracılığıyla hazırlanmıştır. Primer oTrex3_AMP_5, sens prime olarak tüm reaksiyonlarda kullanılmıştır. Primer oTrex3_Amds_3, *amdS*
- 15 markörü (şablon olarak pTrex3gM (APY) ve pTrex3gM (3PP) kullanılır) taşıyan ekspresyon kasetlerini genişletmek üzere anti-sens primer olarak kullanılmıştır ve primer oTrex8_Pyr2_3, *pyr2* markörü (şablon olarak pTrex8gM (APY) ve pTrex8gM (3PP) kullanılır) taşıyan kasetleri genişletmek üzere benzer şekilde kullanılmıştır. Son olarak, ko-transformasyon deneylerinde "yolcu" DNA'sı olarak kullanılan işaretsiz
- 20 ekspresyon kasetlerini genişletmek üzere antisens-primer oCBHT_3, (şablon olarak pTrex3gM (APY) ve pTrex3gM (3PP) kullanılır) kullanılmıştır.

Tablo 4. APY ve 3PP genlerine yönelik ekspresyon kasetlerini genişletmek üzere kullanılan primerler

Primer	Sekans	SEQ ID NO
oCBHT_3	5'-TGGTACTGGGATACACGAAGAG CGGCGATTCTACGGGTTATG-3'	27
oTrex3_AmdS_3	5'-CTAGACTGGAAACGCAACCCCT GAAGGGATTCTTCCTTTG-3'	28
oTrex3_AMP_5		29

Primer	Sekans	SEQ ID NO
	5'-GTATAGTAATACGAGTCGCAT CTAAATACTCCGAAGC-3'	
oTrex8_Pyr2_3	5'-GGAGGGGACGATACACGCACCA TGGACCCCACTGGGGAAGC-3'	30

Baskılama bozma ilgi konusu proteinin ekspresyonunun etkisini değerlendirmek üzere, DiMorph ve neredeyse izogenik bir baskılama-pozitif *T. reesei* suşu, CelluLight (endoglukanaz 4'ü kodlayan *egl4* geninin ilave bir delesyonunu taşıyan 653MU), APY ve 3PP ekspresyon kasetleri ile transformasyon markörü olarak *pyr2* kullanılarak dönüştürülmüştür. Her transformasyon deneyine yönelik olarak, *pyr2* taşıyan yaklaşık 10 µg PCR ürünü ve bu ilgi konusu geni taşıyan 30 µg işaretsiz ekspresyon kaseti kullanılmıştır. Transformasyon, standart protoplast-PEG yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Penttilä, M. et al. (1987) *Gene* 61:155-164).

10

Pyr2 markörü kullanılarak, APY ekspresyon kaseti ile dönüştürülmüş DiMorph ve CelluLight suşları kullanılarak gerçekleştirilen bir birinci deneyde, stabil fenotipler sergileyen her suşun yaklaşık olarak 30 transformantı, glisin-soproz ortamında (glisin 6 g/L; amonyum sülfat 4.7 g/L; potasyum dihidrojen fosfat 5 g/L; magnezyum sülfat heptahidrat 1 g/L; PIPPS 33 g/L; ve otoklavlama sonrası kalsiyum klorür 1 g/L; glikoz 16 g/L ve soproz 0,3 g/L) 6 gün boyunca işlenmiştir. APY proteininin aminopeptidaz aktivitesi, oda sıcaklığında (25°C) 1 mM çinko klorür ve 2 mM Lys-p-nitroanilit içeren pH 7.5, 0.1 M Tris-HCl tamponunda test edilmiştir. Reaksiyon, kinetik olarak 410 nm'de seyretmiştir. Şekil 6'da bulunan çubuk grafikten görülebileceği gibi, APY aktivitelerinin iki transformant setindeki dağılımı oldukça farklı olmuştur. Baskılama-pozitif CelluLight suşundaki tüm transformantların yaklaşık olarak yarısı ölçülebilir bir APY aktivitesi üretmezken, Baskılama bozma DiMorph suşunun hemen hemen tüm transformantları APY üretmiştir. Ortalama ve maksimum ekspresyon seviyeleri, baskılama bozma suşunda açıkça daha yüksek olmuştur. Aktivite ölçümlerine dayanan gözlemler, SDS-PAGE verisi ile yakından ilişkilidir (Şekil 7).

25

Pyr2 markörü kullanılarak 3PP ekspresyon kaseti ile dönüştürülmüş DiMorph ve CelluLight suşlarının kullanıldığı ikinci bir deneyde, stabil fenotipler sergileyen her bir suşun yaklaşık olarak 40 transformantı, yukarıda olduğu gibi indükleyici ortamda işlenmiştir. Transformantlar, daha sonra, bir substrat olarak tripeptit türevi Ala-Ala-Phe-p-nitroanilit (AAPN; Bachem) kullanılarak tripeptidaz aktivitesine yönelik test edilmiştir. Deney, 410 nm'de absorbans aracılığıyla ölçülen p-nitroanilin kinetik salınımı ile oda sıcaklığında 1 mM AAPN ile, pH 4.0'da, 0.1 sodyum asetat tamponunda gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, APY ekspresyon deneyinde elde edilen sonuçlara benzerdir, bununla birlikte, baskılama bozma and baskılama yapabilen suşlarında (sırasıyla, DiMorph ve CelluLight) ekspresyon etkinliği arasındaki kontrast daha çarpıcı bir hal almıştır (Şekil 8). Hemen hemen tüm DiMorph transformantları, önemli tripeptidaz aktivitesi üretirken, sadece birkaç CelluLight transformantı, önemli tripeptidaz aktivitesi üretmiştir. Ortalama ve maksimum ekspresyon seviyeleri, baskılama bozma suşunda, açıkça daha yüksek olmuştur.

15

Örnek 3. Tekrarlanan transformasyon turlarının, baskılama negatif ve baskılama pozitif suşlarda ilgi konusu proteinlerin ekspresyon seviyelerine etkisi

Örnek 2'deki *pyr2* markörü ile APY ekspresyon kasetini içeren en yüksek düzeyde eksprese eden DiMorph ve CelluLight Transformantları, ikinci bir transformasyon turuna yönelik konak olarak kullanılmıştır. Transformasyon, amdS geninin seçilebilir markör olarak kullanılması dışında, birinci tur transformasyon ile aynı şekilde gerçekleştirilmiştir. DiMorph veya CelluLight konaklarından türetilen 48 stabil, çift transformant, glisin-soforoz ortamı içinde genişletilmiştir ve daha önce olduğu gibi, APY aktivitesi açısından test edilmiştir. Baskılama yapabilen *T. reesei* suşunda, 48'in sadece bir ikinci tur transformantı, tek tur transformantın herhangi birinden daha yüksek olan APY aktivitesine sahip olmuştur (Şekil 9). İkinci tur transformantların büyük bir çoğunluğu, ilave bir transformasyon turundan sonra aktivitedeki artıştan ziyade bir düşüş göstermiştir. Tüm çift transformantların yaklaşık üçte biri ölçülebilir APY aktivitesini kaybetmiştir. Baskılama bozma DiMorph suşu ile, sonuçlar farklı olmuştur. Bazı ikinci tur transformantların APY aktivitesinin, parent suştan daha düşük olmasına rağmen, bunların hiçbirisi APY aktivitesini tamamen kaybetmemiştir ve tüm çift transformantların yaklaşık olarak dörtte biri, bunların parent tek tur transformantından daha fazla APY aktivitesine sahip olmuştur. DiMorph alt yapısında en iyi APY eksprese

20

25

30

eden suş, baskılama yapabilen CelluLight alt yapısında bulunan en iyi suştan yaklaşık olarak %50 oranında daha yüksek APY ekspresyon seviyesine sahip olmuştur.

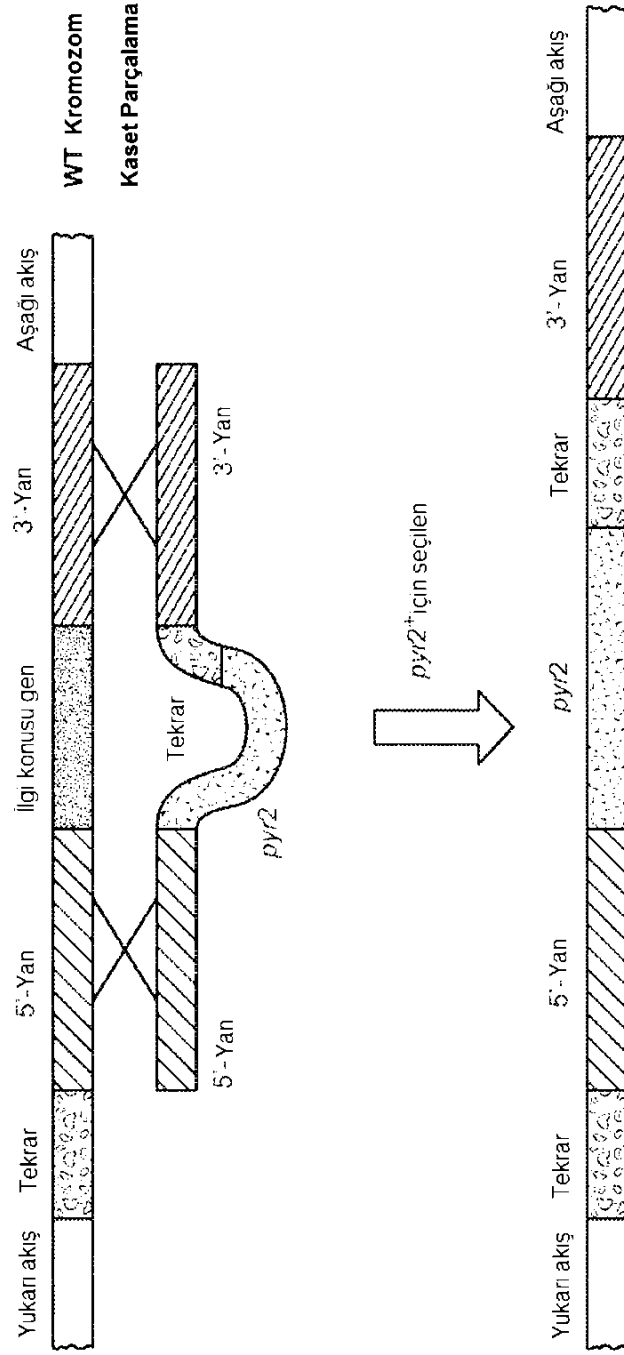
Benzer bir deney, Örnek 2'deki *pyr2* markörü ile 3PP ekspresyon kaseti içeren en yüksek düzeyde eksprese eden DiMorph ve CelluLight transformantları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu deneyde, kalitatif trendler, APY kaseti ile çift dönüşüm deneyindekilere benzer olmuştur. Bununla birlikte, çok büyük nicel farklılıklar meydana gelmiştir (Şekil 10). Baskılama yapabilen suşta (CelluLight), çoğu ikinci tur transformant, 3PP üretiminin çoğunu veya tamamını kaybetmiştir. 48'in sadece bir çift transformantı, en iyi tek turlu 3PP transformantı olan bunun parenti üzerinde marjinal bir gelişme göstermiştir Baskılama bozma suşunda (DiMorph), ikinci transformasyon turundan elde edilen bir dizi transformant, transformant parentlerinin birinci turuna göre ekspresyon seviyesini iki katına çıkarmıştır. Bununla birlikte, DiMorph suşundaki çift transformantların hiçbirisi, ilave transformasyon turunun bir sonucu olarak 3PP ekspresyonunu tamamen kaybetmemiştir. Dikkat çekici bir şekilde, en iyi genel DiMorph 3PP transformantı (tek ve çift yuvarlak transformantlar arasında) en iyi CelluLight 3PP transformantından yaklaşık olarak 3 kat daha üretken bir hale gelmiştir.

Örnek 4. Baskılama yapabilme ve baskılama bozma ve *T. Reesei*'nin suşları ile ilgilenen başka bir proteinin ekspresyonunun test edilmesi

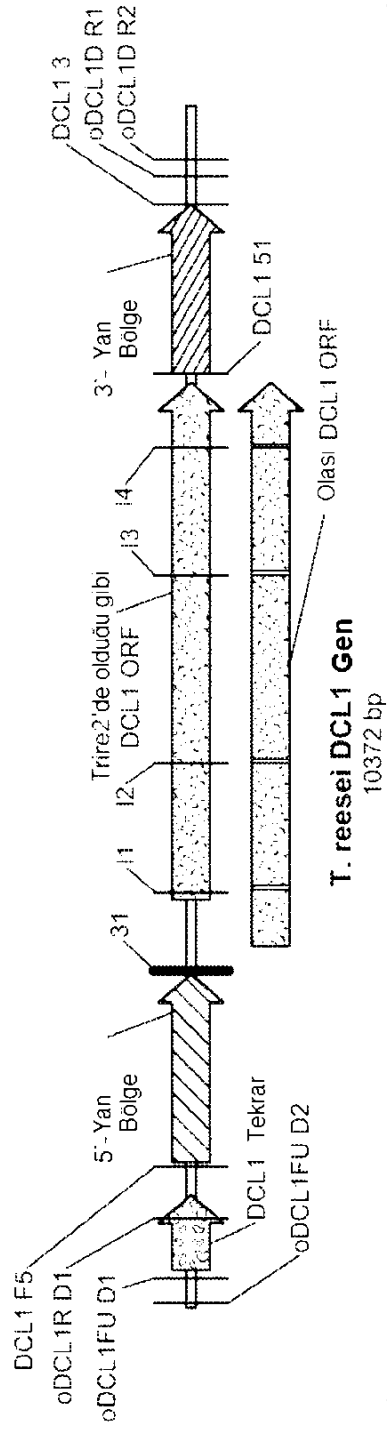
Parçalanmış *dcl1* ve *dcl2* genlerine sahip olan ilave *T. reesei* suşları, her ikisi *T. reesei* selülohidrolaz 1 (CBH1) promotörünü kontrol altında tutan *Aspergillus clavatus* α -amylase ve *T. reesei* sellobiyohidrolaz 2 (CBH2) dahil olmak üzere diğer entegre transgenlerin ekspresyonunu değerlendirmek üzere gerçekleştirilmiştir ve kullanılmıştır. Her iki durumda, çok sayıda transformant arasında maksimum protein ekspresyonu seviyeleri ve ortalama protein ekspresyonu seviyeleri, parçalanmış *dcl1* ve *dcl2* genlerine sahip *T. reesei* hücrelerinde, bozulmamış bir RNA interferans mekanizmasına sahip eşdeğer hücrelere kıyasla daha büyük olmuştur (veriler gösterilmemiştir).

Yukarıda belirtilen bileşimler ve yöntemler, açık bir şekilde anlaşılması amacıyla açıklama ve örnekleme yoluyla detaylı olarak tarif edilmiş olmasına rağmen, teknikte uzman kişiler tarafından, belirli değişiklik ve modifikasyonların yapılabileceği açıkça görülecektir.

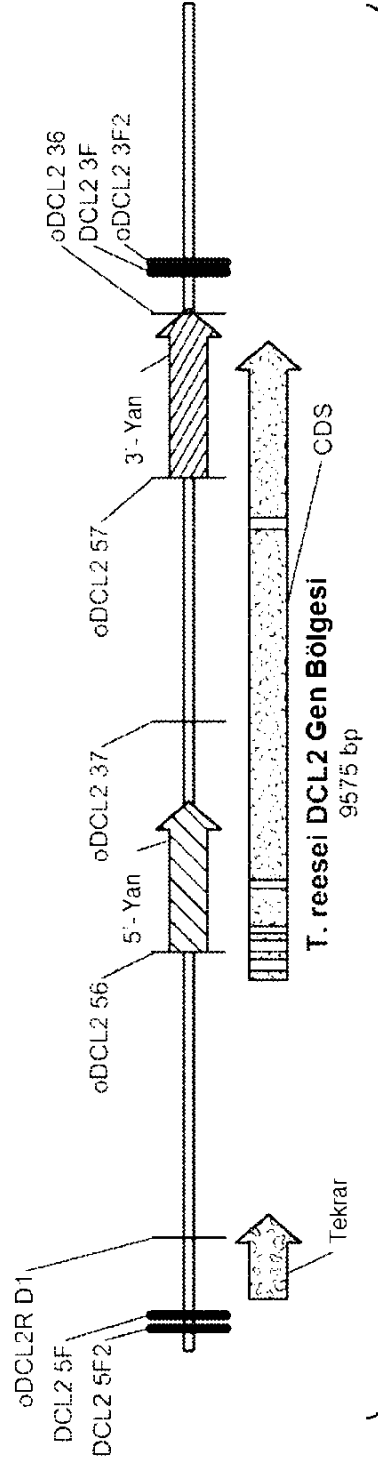
Standart Gen Kaset Parçalama Tasarımı



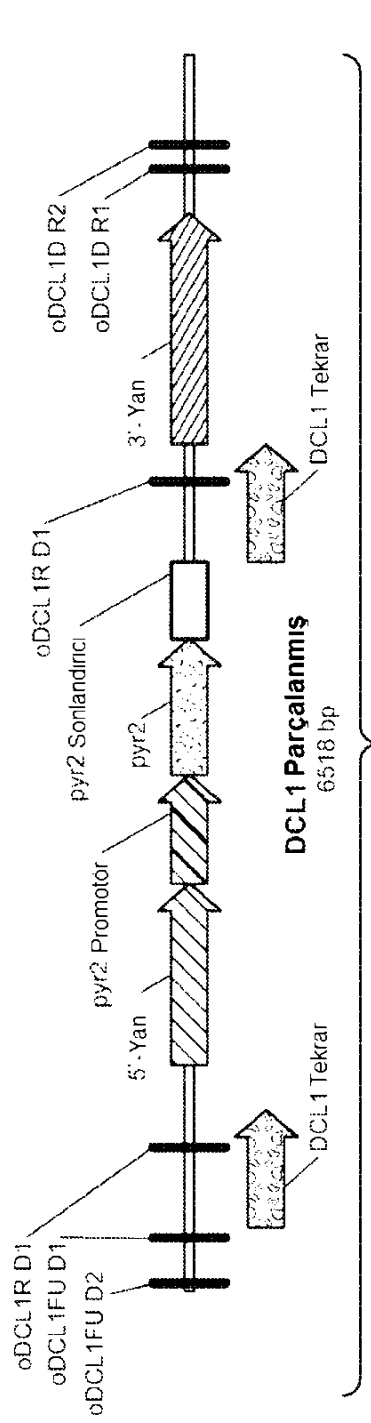
ŞEKİL 1



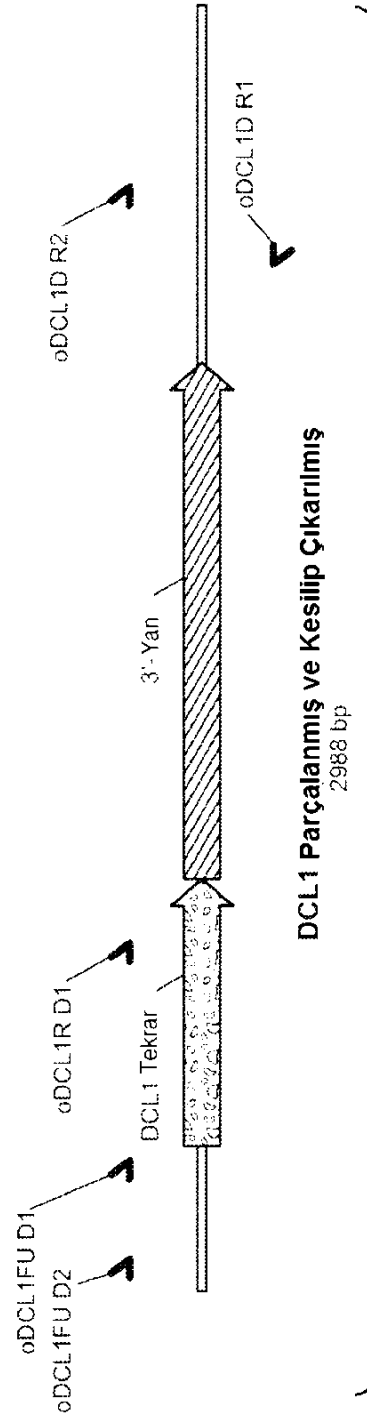
ŞEKİL 2



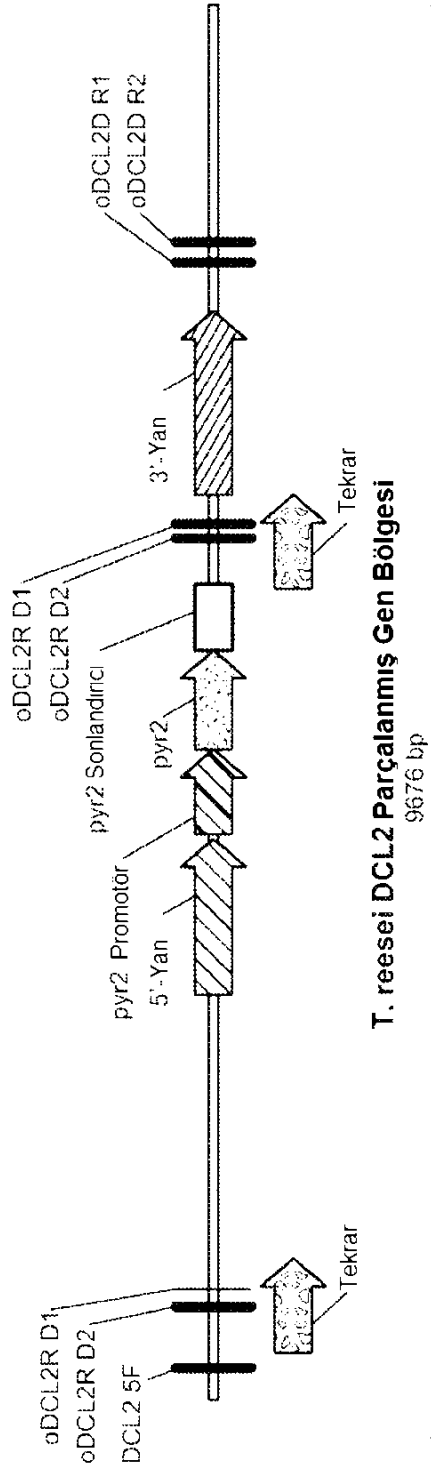
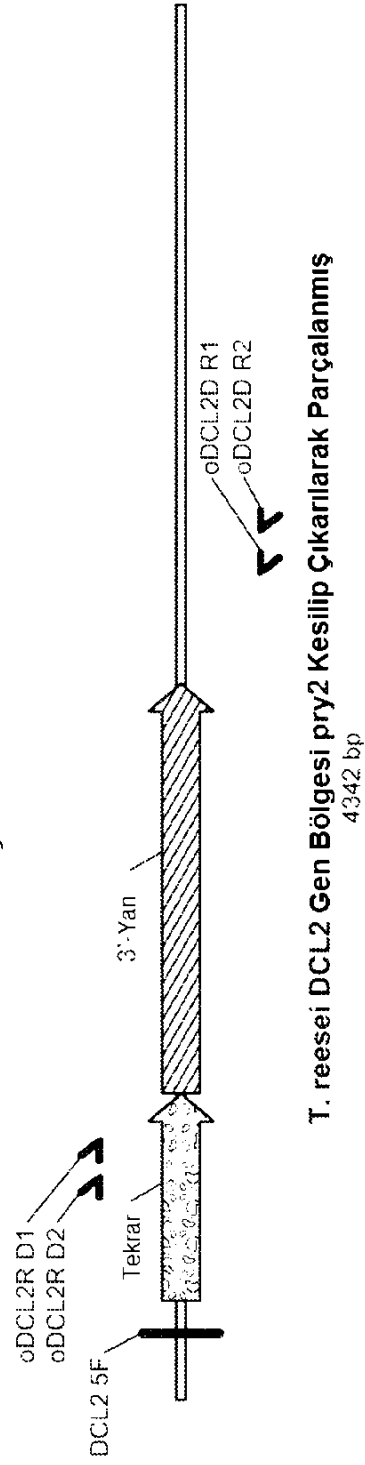
ŞEKİL 3

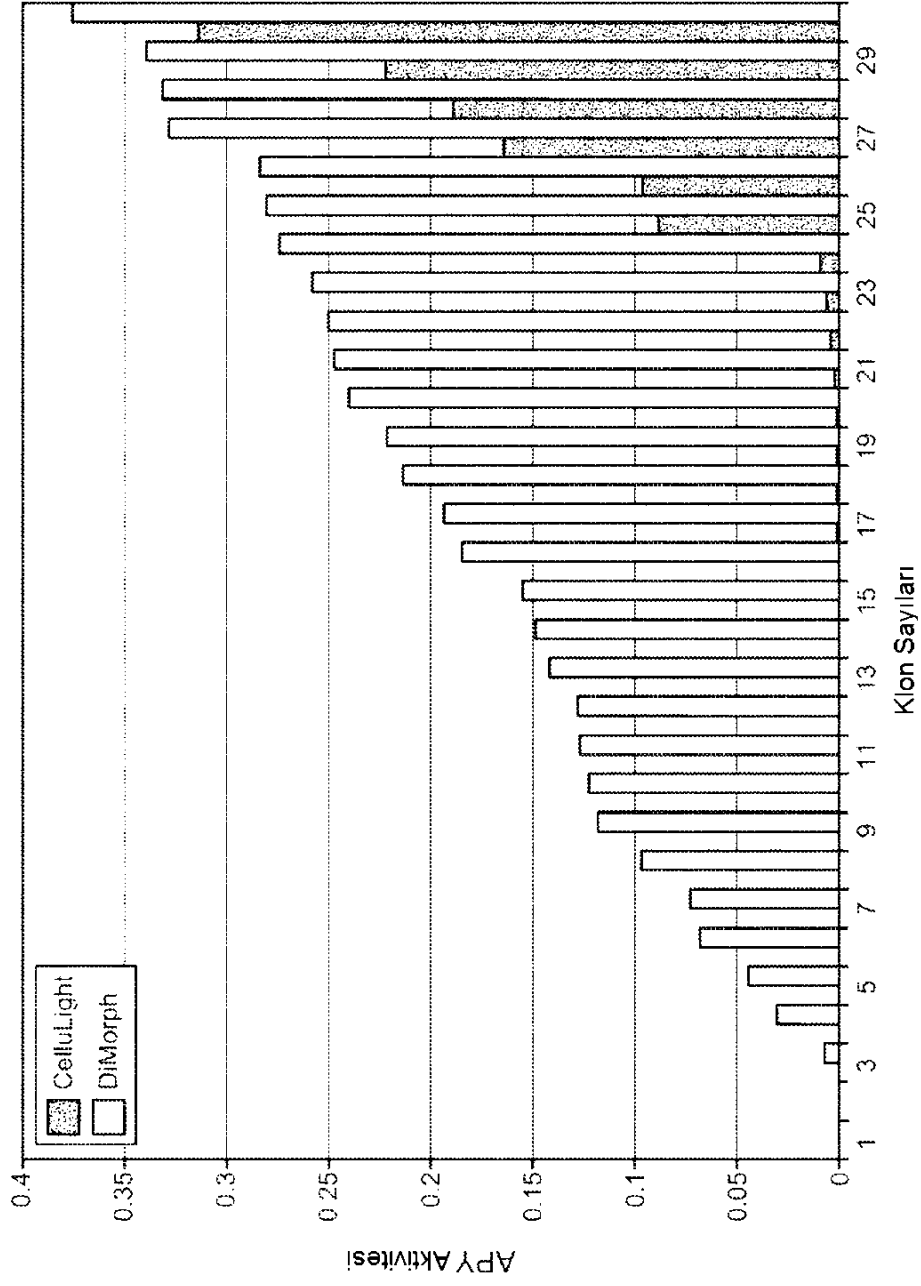


ŞEKİL 4A

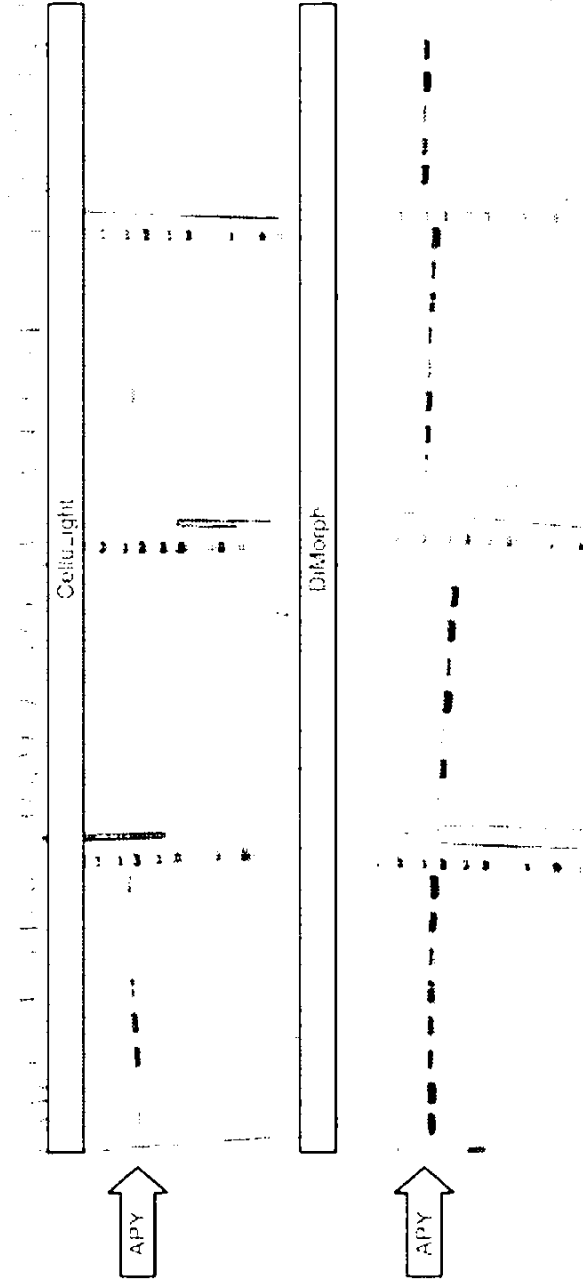


ŞEKİL 4B

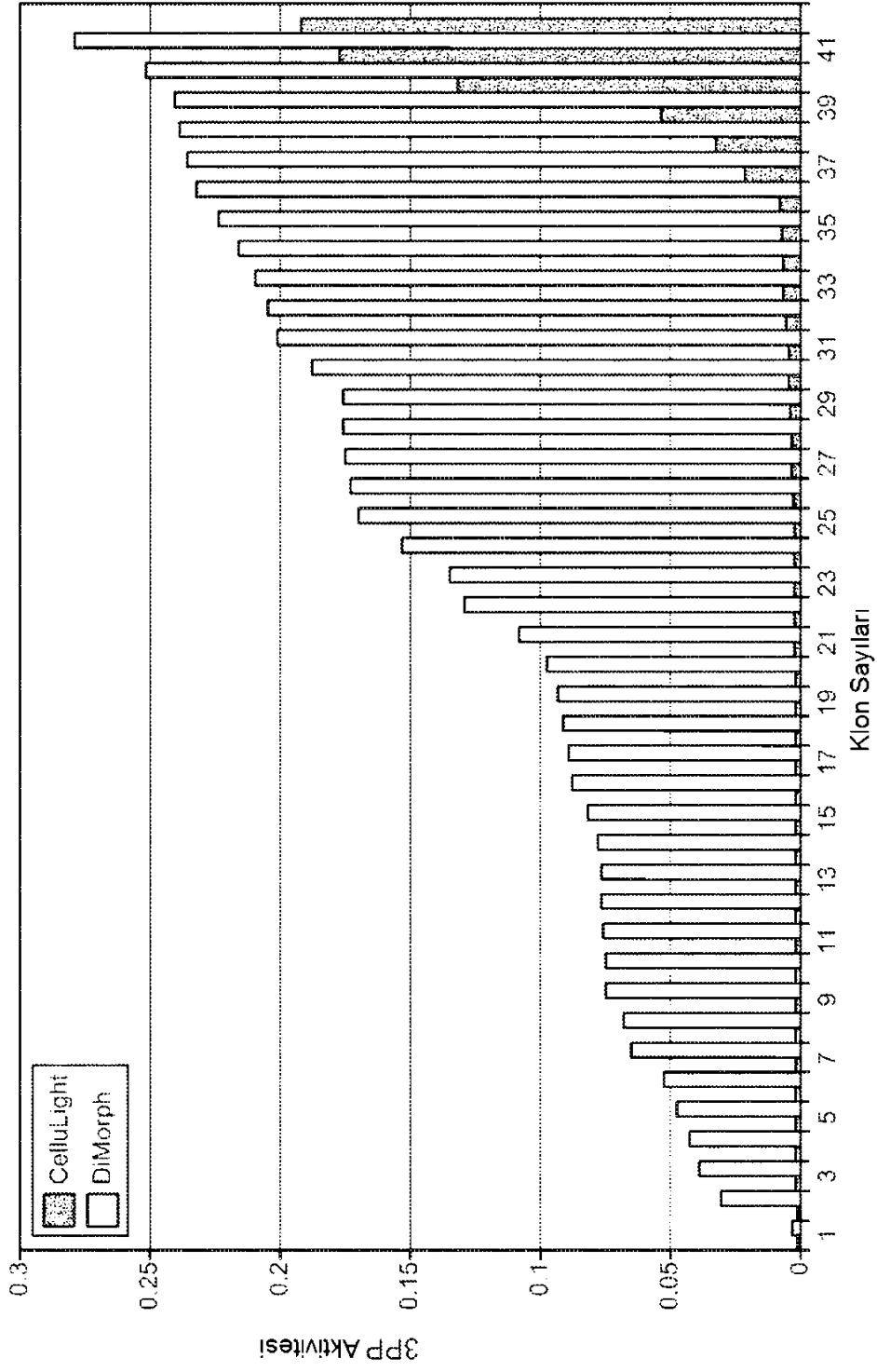
**ŞEKİL 5A****ŞEKİL 5B**



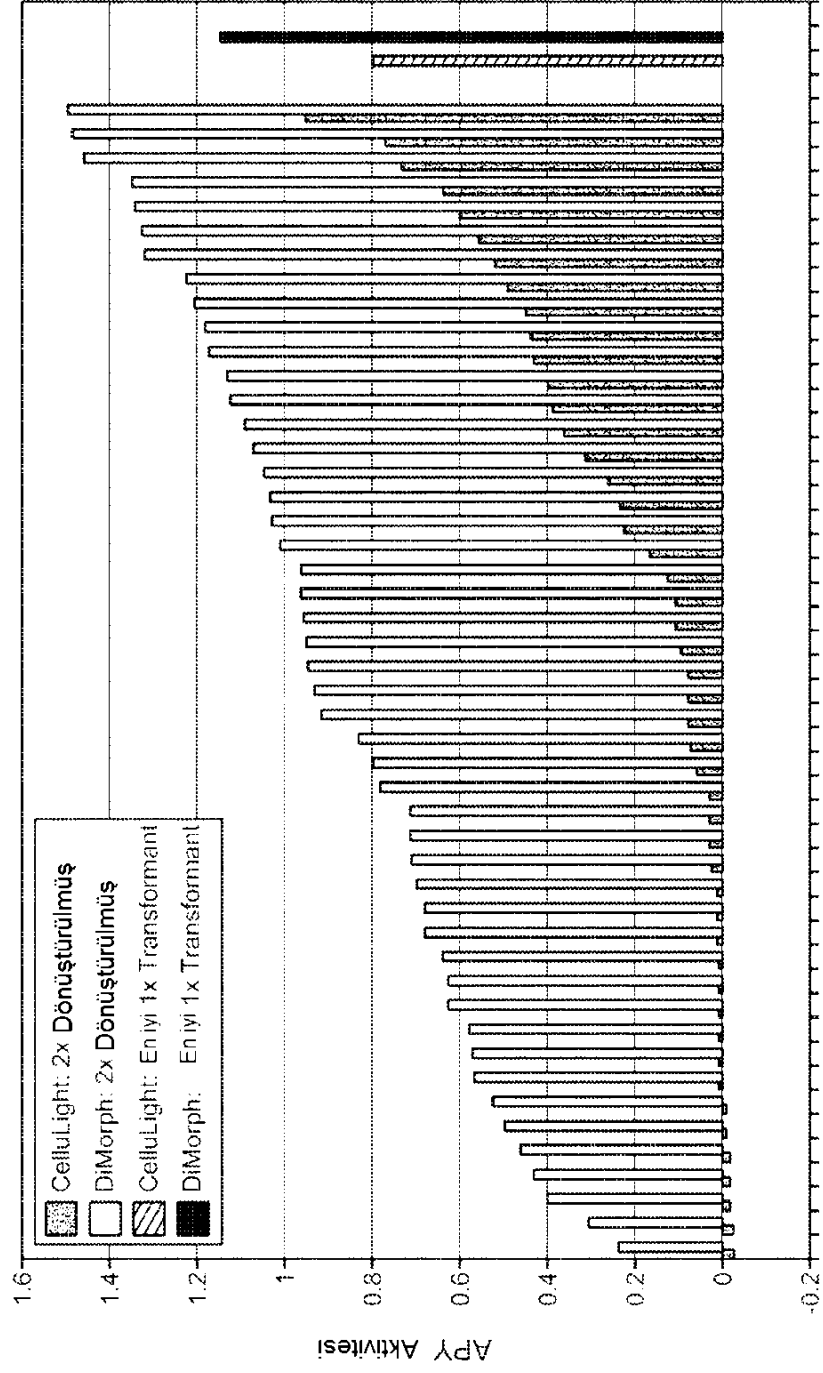
ŞEKİL 6



ŞEKİL 7

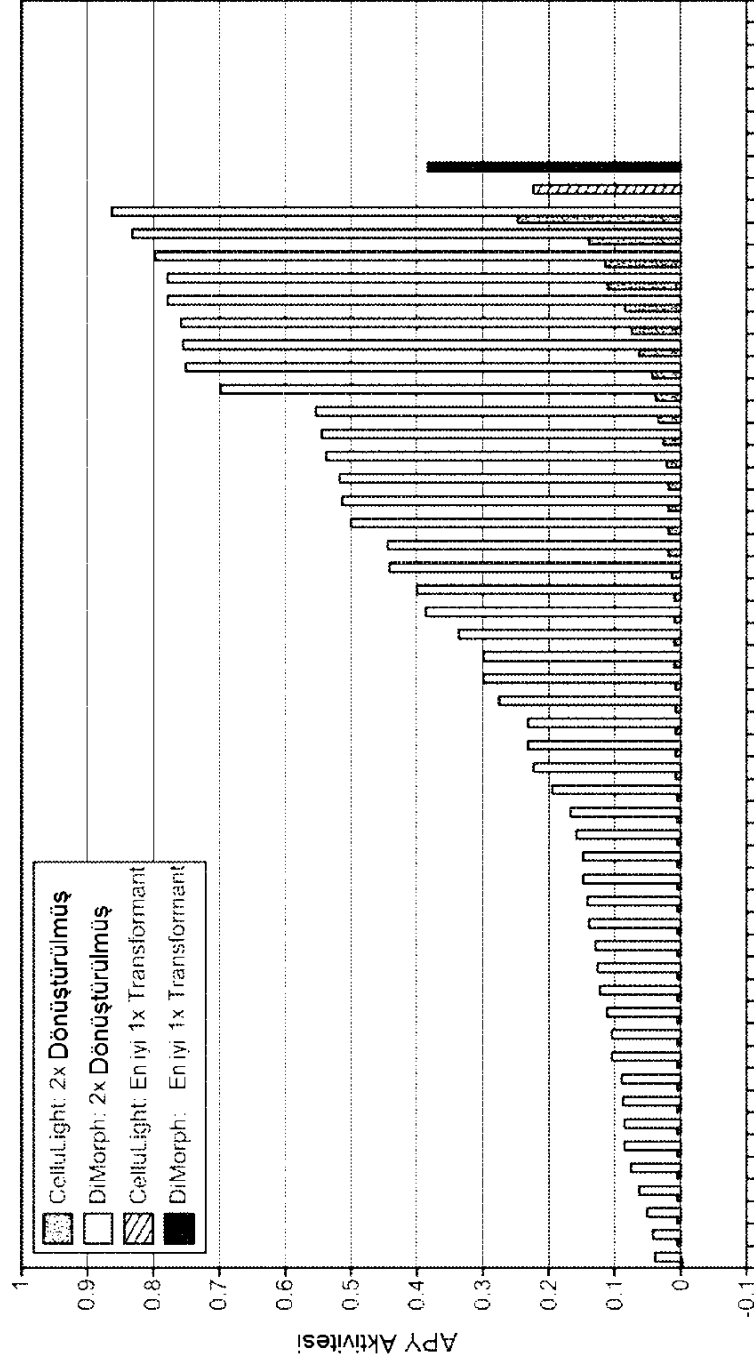


ŞEKİL 8



Klon Sayıları

ŞEKİL 9



Klon Sayıları

ŞEKİL 10