



**HİDROFOBİK PROTEİN DewA'NIN *Pichia pastoris*
İLE REKOMBİNANT ÜRETİMİ VE
BİYOTEKNOLOJİK UYGULAMALARI**

Alpgiray TURGUT

**Doktora Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: Doç.Dr. Serkan ÖRTÜCÜ**

2022

Her hakkı saklıdır.



FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZİ

**HİDROFOBİK PROTEİN DewA’NIN *Pichia pastoris* İLE REKOMBİNANT
ÜRETİMİ VE BİYOTEKNOLOJİK UYGULAMALARI**

Alpgiray TURGUT

Tez Danışmanı: Doç.Dr. Serkan ÖRTÜCÜ

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Erzurum

2022

Her hakkı saklıdır

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki tüm bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

16 / 03 / 2022

Alpgiray TURGUT

ÖZET

DOKTORA TEZİ

HİDROFOBİK PROTEİN DewA’NIN *Pichia pastoris* İLE REKOMBİNANT ÜRETİMİ VE BİYOTEKNOLOJİK UYGULAMALARI

Alpgiray TURGUT

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç.Dr. Serkan ÖRTÜCÜ

Hidroforbinler, yüzey karakteristiğini değiştirebilme özelliklerinden dolayı birçok biyoteknolojik uygulamada büyük potansiyele sahiptir. Son yıllarda, hidroforbinlerin biyoteknolojik uygulamalarında belirgin bir artış olmakla birlikte, endüstriyel boyutlarda üretimi verim problemlerinden dolayı hala başarılımış değildir. Bu nedenle hidroforbinlerin rekombinant üretimi üzerine daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Bu tez çalışmasında literatürde yüksek temas açısına sahip olduğu belirlenen *Aspergillus nidulans*’a ait sınıf I hidroforbin DewA proteininin rekombinant olarak üretimi amaçlanmıştır. Bu amaçla, DewA geninin (UNIPROT: 52750) salgı sinyali dizisi ve dur kodonu çıkarılmıştır. Daha sonra elde edilen diziyi kesmeyen restriksiyon enzimleri biyoinformatik programı kullanılarak tespit edilmiş ve diziye EcoRI ve XbaI enzim kesim bölgeleri eklenmiştir. Ardından kodon optimizasyonu gerçekleştirilerek, dizi sentezletirilmiştir. Sonuçta DewA proteinini pPICZα-A vektörüne aktararak AOX1 promotörü altında *Pichia pastoris* X-33 suşu kullanılarak rekombinant olarak üretilmiştir. En yüksek verim 96. saatte 77 mg/L olarak %1’lik metanol konsantrasyonunda elde edilmiştir. DewA proteininin cam yüzeye kaplanması sonucunda, yüzeyin karakteristiğini değiştirerek hidroforbik hale getirdiğı; teflon yüzeylerde ise yüzey karakteristiğini değiştirerek, hidrofilik hale getirdiğı kanıtlanmıştır. Ardından bu yüzeylere sıcak SDS ve UV uygulaması yapılarak proteinin yüzey stabilitesi değerlendirilmiştir. Sonuçta yüzeye kaplanmış olan DewA proteininin hem cam hem de teflon yüzeylerde sıcak SDS uygulamasına dirençli olduğu; UV uygulamasında ise, cam yüzeylerde UV maruziyeti ile protein degrade olurken, teflon yüzeylerde yapısını koruduğı anlaşılmıştır. Tez çalışması ile *A. nidulans*’a ait DewA proteinini, pPICZα-A vektörüne klonlanarak, *P. pastoris* X-33 suşunda AOX promotörü kontrolünde ilk kez rekombinant olarak üretilmiştir.

2022, 76 sayfa

Anahtar Kelimeler: DewA, Sınıf I hidroforbin, *Pichia pastoris*

ABSTRACT

Ph.D

RECOMBINANT PRODUCTION AND BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS OF THE HYDROPHOBIC PROTEIN DewA by *Pichia pastoris*

Alpgiray TURGUT

Erzurum Technical University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ

Hydrophobins have great potential in many biotechnological applications due to changing their surface characteristics. In recent years, although there has been a significant increase in the biotechnological applications of hydrophobins, industrial production has still not been achieved due to yield problems. Therefore, more studies are needed on the recombinant production of hydrophobins. In this thesis, the recombinant production of class I hydrophobin DewA protein belonging to *Aspergillus nidulans*, which is determined to have high contact angle in the literature, was aimed. For this purpose, the secretion signal sequence and the stop codon of the DewA gene (UNIPROT:52750) were removed. Then, the restriction enzymes that did not cut the obtained sequence were determined using the bioinformatics program and EcoRI and XbaI enzyme cutting sites were added to the sequence. Then, sequence synthesis was made after codon optimization. As a result, DewA protein was recombinantly produced using *P. pastoris* X-33 strain under AOX1 promoter by transferring into pPICZ α -A vector. The highest yield was obtained at 1% methanol concentration as 77 mg/L in 96 hours. As a result of coating the DewA protein on the glass surface changes the surface characteristics and makes it hydrophobic; On teflon surfaces, it has been proven to change the surface characteristics and make them hydrophilic. Then, the surface stability of the protein was evaluated by applying hot SDS and UV to these surfaces. The surface-coated DewA was resistant to hot SDS application on both glass and teflon surfaces; in the UV application, it was understood that while the protein was degraded by UV exposure on glass surfaces, it preserved its structure on teflon surfaces. In the thesis study, the DewA protein of *A. nidulans* was cloned into the pPICZ α -A vector and recombinantly produced for the first time in the *P. pastoris* X-33 strain under the control of the AOX promoter.

2022, 76 page

Keywords: DewA, Class I hydrophobin, *Pichia pastoris*

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışma Erzurum Teknik Üniversitesi, Yüksek Teknoloji ve Araştırma merkezinde (YÜTAM) bulunan Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarında yapılmıştır. Değerli bilgi ve katkıları ile tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç.Dr. Serkan ÖRTÜCÜ'ye en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Ayrıca tez jürimde yer alan, Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL, Prof. Dr. Mesut TAŞKIN, Prof. Dr. Arzu GÖRMEZ ve Dr. Öğretim Üyesi Ayşenur YAZICI'ya katkıları, önerileri, eleştirileri ve destekleri için çok teşekkür ediyorum.

Çalışmam boyunca deneylerimde her zaman yanımda olan maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen başta manevi abim Doç.Dr. Murat KARAMEŞE, Dr.Öğretim üyesi Mustafa ÇİÇEK ve laboratuvardaki çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteği ile yanımda olan anneme, babama ve kardeşime teşekkür ederim.

Alpgiray TURGUT
Mart 2022

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	3
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Hidrofobinler.....	1
1.2. Hidrofobinlerin Yapısı ve Özellikleri	2
1.3. Hidrofobinlerin Sınıflandırılması.....	4
1.4. Funguslarda Hidrofobinlerin Fonksiyonları.....	7
1.5. Hidrofobinlerin Biyoteknolojik Uygulamaları.....	9
1.5.1. Proteinlerin rekombinant üretiminde kullanılan konakçılar	11
2. KAYNAK ÖZETLERİ	20
3. MATERYAL ve YÖNTEM	24
3.1. Materyal	24
3.1.1. Kullanılan cihazlar	24
3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler.....	25
3.1.3. Çalışmada kullanılan kitler	25
3.1.4. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar	25
3.1.5. Çalışmada kullanılan pPICZ α -A vektörü.....	25
3.1.6. Çalışmada kullanılan restriksiyon enzimleri.....	27
3.1.7. pPICZ α A vektörüne ait primerler	28
3.1.8. Çalışmada kullanılan besiyerleri ve kullanılan tampon-stok çözeltiler	28
3.2. Yöntem.....	34
3.2.1. Kodlama bölgesinin tasarımı.....	34
3.2.2. Kompetent <i>Escherichia coli</i> hücrelerinin hazırlanması.....	35
3.2.3. pGSI-DewA plazmitinin transformasyonu	35
3.2.4. <i>E. coli</i> hücrelerinden plazmit DNA izolasyonu	36

3.2.5. pGSI-DewA ve pPICZ α -A plazmit vektörlerinin restriksiyon enzimleriyle kesimi.....	36
3.2.6. pPICZ α -A-DewA plazmitinin <i>E. coli</i> hücrelerine transformasyonu	38
3.2.7. <i>Escherichia coli</i> Transformatlarının Kontrolü	39
3.2.8. pPICZ α -A-DewA vektörünün <i>Pichia pastoris</i> X-33 hücrelerine transformasyonu	40
3.2.9. Rekombinant <i>Pichia pastoris</i> X-33 hücrelerinin tespit edilmesi ve kontrolü.....	42
3.2.10. DewA'nın rekombinant üretimi ve saflaştırılması	43
3.2.11. Rekombinant proteinler ile yapılan analizler	44
3.2.12. Temas açısı ölçümü.....	47
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	48
4.1. pGSI-DewA Plazmitinin Transformasyonu	48
4.2. <i>E. coli</i> Hücrelerinden Plazmit DNA İzolasyonu	48
4.3. pGSI-DewA ve pPICZ α -A Plazmit Vektörlerinin Restriksiyon Enzimleriyle Kesimi	50
4.3.1. pGSI-DewA plazmit vektörünün restriksiyon enzimleriyle kesimi ve jelden saflaştırılması.....	50
4.4. pPICZ α -A Plazmit Vektörünün Restriksiyon Enzimleriyle Kesimi ve Saflaştırılması.....	50
4.5. DewA'nın pPICZ α -A Vektörüne Ligasyonu	51
4.6. pPICZ α -A-DewA Plazmitinin <i>E. coli</i> Hücrelerine Transformasyonu ve Plazmit İzolasyonu	52
4.7. pPICZ α -A-DewA Vektörünün PCR ile Kontrolü ve Dizi Doğrulaması.....	54
4.8. pPICZ α -A-DewA Vektörünün <i>Pichia Pastoris</i> X-33 Hücrelerine Transformasyonu	55
4.8.1. pPICZ α -A-DewA vektörünün lineer hale getirilmesi	55
4.8.2. Elektroporasyon, transformantların seçilimi ve PCR ile kontrolü	56
4.9.1. Rekombinant olarak elde edilen proteinin bradford ile miktarlarının belirlenmesi.....	60
4.10.2. DewA proteinin cam ve teflon yüzeylere kaplanması ve temas açılarının belirlenmesi	63
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	67
KAYNAKLAR	69

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
%	Yüzde
°C	Santigrat Derece
µl	Mikrolitre
Aa	Aminoasit
Amp	Ampisilin
dk	Dakika
gr	Gram
His	Histidin
kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mikrolitre
ml	Mililitre
mm	Mikrometre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
nm	Nanometre
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
sn	Saniye
V	Volt
Zeo	Zeosin

Kısaltmalar

AOX1	Alkol Oksidaz
APS	Amonyum Per Sülfat
Bç	Baz Çifti

BMGY	Tamponlanmış Karmaşık Gliserol Besiyeri (Buffered Glycerol Complex)
BMMY	Tamponlanmış Karmaşık Metanol Besiyeri (Buffered Methanol Complex)
BSA	Sığır Serum Albumini
dH ₂ O	Distile Su
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleotid Trifosfat
gDNA	Genomik Deoksiribonükleik Asit
LB	Luria Bertani
LSLB	Düşük Tuzlu Luria Bertani (Low Salt Luria Bertani)
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel Elektroforez
TCA	Trikloroasetik Asit
TE	Tris EDTA
TEMED	Tetrametiletilendiamin
TFA	Trifloroasetik Asit
TAE	Tris Asetik asit EDTA
UV	Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Hidrofobinlerin funguslarda bulunma yerleri.....	1
Şekil 1.2. Sınıf I ve Sınıf II hidrofobinlerinin amino asit dizileri karşılaştırılması ve sistein bölgeleri gösterilmiştir.	2
Şekil 1.3. Üç boyutlu yapısı ortaya konulmuş hidrofobin proteinlerinden bazıları.....	5
Şekil 1.4. Sınıf I ve Sınıf II hidrofobinlerin monomerik ve polimerik yapıları.....	5
Şekil 1.5. Sınıf I ve Sınıf II hidrofobinlere ait α -heliks ve β -tabaka yapıları	6
Şekil 1.6. P. pastoris'te metanolün metabolik yolu	14
Şekil 3.1. pPICZ α -A vektörü	26
Şekil 3.2. pPICZ α -A vektöründe mevcut olan çoklu klonlama bölgesine ait nükleotid Sekansı (EasySelect™ Pichia -Thermo Fisher).....	27
Şekil 3.3. pGSI plazmit haritası (2857bp)	35
Şekil 3.4. Damlaların değme açılarını belirlemek için kullanılan modifiye edilmiş mikroskop sistemi.....	47
Şekil 4.1. Transformasyon sonrası elde edilen koloniler	48
Şekil 4.2. Plazmitlerin %1'lik agaroz jel görüntüsü	49
Şekil 4.3. A3 örneğinin restriksiyon enzimleri ile ikili kesim reaksiyonu sonucu elde edilen jel görüntüsü.....	50
Şekil 4.4. pPICZ α -A plazmitinin restriksiyon enzimleri ile ikili kesim reaksiyon görüntüsü	51
Şekil 4.5. Ligasyon ürününün %1'lik agaroz jelde görüntüsü.....	52
Şekil 4.6. İçeriğinde pPICZ α -A-DewA bulunduran E. coli hücrelerinin transformasyonu sonucu elde edilen koloniler	52
Şekil 4.7. Transformasyon sonucunda elde edilen plazmitlerin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü	53
Şekil 4.8. pPICZ α -A-DewA plazmit DNA'larından transformasyon kontrolü. Marker, DewA gen bölgesini içermeyen pPICZ α -A, A1-A17: low salt LB agardan seçilen koloniler	54
Şekil 4.9. A18-A21: low salt LB agardan seçilen koloniler	54
Şekil 4.10. Sekans analizi ile elde edilen nükleotid dizisinin DewA geni ile karşılaştırılması	55
Şekil 4.11. Lineer rekombinant vektörün agaroz jel elektroforez görüntüsü	56

Şekil 4.12. Elektroporasyon sonrasında YPDS agar plakta gelişen koloniler	57
Şekil 4.13. Pozitif örneğin AOX primerleriyle gerçekleştirilen PCR sonucu	57
Şekil 4.14. Jel ekstraksiyon sonrasında pozitif örneğin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü.....	58
Şekil 4.15. Sekans analizi ile elde edilen nükleotid dizisinin DewA geni ile karşılaştırılması	58
Şekil 4.16. Çalkamalı kültürde belirlenen saatlerde verilen %0.5 saf metanol sonrası OD ₆₀₀ değerleri.....	59
Şekil 4.17. Çalkamalı kültürde belirlenen saatlerde verilen %1 saf metanol sonrası OD ₆₀₀ değerleri.....	59
Şekil 4.18. Çalkamalı kültürde belirlenen saatlerde verilen %1,5 saf metanol sonrası OD ₆₀₀ değerleri.....	60
Şekil 4.19. BSA ile hazırlanan standart grafik.....	61
Şekil 4.20. Farklı metanol konsantrasyonlarında üretilen protein miktarları (mg/L)	61
Şekil 4.21. Üç farklı metanol konsantrasyonunun 96 saat inkübasyonu sonunda elde edilen protein bantları.....	62
Şekil 4.22. 16 saat inkübasyon süresi sonunda kontrol grubunda ölçülen temas açıları a) cam yüzey b) teflon yüzey	63
Şekil 4.23. Protein kaplanmamış cam (a) ve teflon (b) yüzeylerin kontrolleri ile protein kaplı cam (c) ve teflon (d) karşılaştırılması	64

TABLÖLAR DİZİNİ

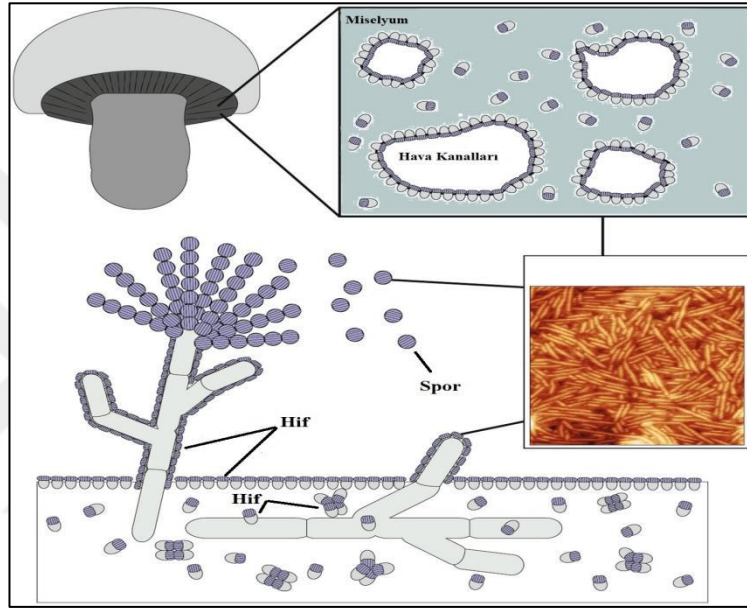
Tablo 1.1. Şekil 1.2'de kullanılan kısaltmaların organizma isimleri ve UNIPROT erişim numaraları gösterilmiştir.	3
Tablo 1.2. Hidrofobinlerin biyolojik fonksiyonları	8
Tablo 1.3. <i>Pichia pastoris</i> 'in yapısal ve İndüklenebilir promotorları	15
Tablo 1.4. Genel olarak kullanılan <i>P. pastoris</i> suşları genotip, fenotip, promotor ve tetikleyici özellikleriyle listelenmiştir (Looser et al. 2015).	16
Tablo 1.5. <i>P. pastoris</i> 'in <i>S. cerevisiae</i> 'ye göre avantajları	17
Tablo 3.1. Tez Çalışmasında kullanılan cihazlar ve modelleri	24
Tablo 3.2. Kesim enzimlerinin tanıma dizileri ve kesim bölgeleri (EasySelect™ <i>Pichia</i> -Thermo Fisher)	27
Tablo 3.3. pPICZαA-DewA vektörünü PCR'da çoğaltmak için kullanılan primerler (EasySelect™ <i>Pichia</i> -Thermo Fisher).....	28
Tablo 3.4. DewA proteinine ait sekanslar	34
Tablo 3.5. pGSI-DewA plazmid ikili kesim reaksiyonu	37
Tablo 3.6. pPICZα-A plazmit ikili kesim reaksiyonu	37
Tablo 3.7. Ligasyon reaksiyon karışımı	38
Tablo 3.8. pPICZα-A-DewA vektörünün PCR reaksiyonu.....	39
Tablo 3.9. pPICZαA-DewA'nın SacI restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesim reaksiyonu	40
Tablo 3.10. PCR karışımı ve reaksiyon koşulları.....	43
Tablo 3.11. SDS-PAGE yükleme ve ayırma jel miktarları	45
Tablo 4.1. Plazmit örneklerinin plazmit DNA miktarları.....	49
Tablo 4.2. Elde edilen 21 plazmitin nanodrop cihazında ölçülen DNA miktarları (ng/ µl) ve Saflık oranları (A260/280)	53

1. GİRİŞ

1. GİRİŞ

1.1. Hidrofobinler

Hidrofobinler fungusların havai hiflerinin ve üreme yapılarının etrafında bulunan (Şekil 1.1), son derece kararlı yaklaşık 100-150 aminoasitten oluşan, küçük yüzey aktif proteinlerdir (Sarlin et al. 2012).



Şekil 1.1. Hidrofobinlerin funguslarda bulunma yerleri (Victor L et al. 2019)

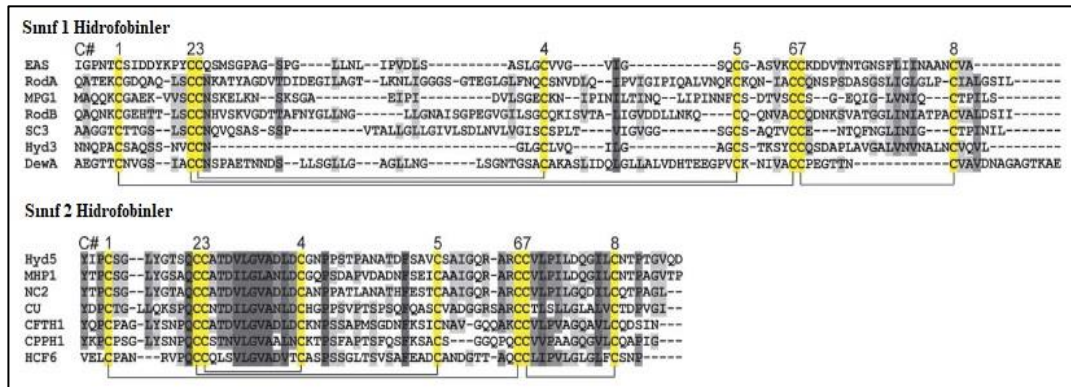
Hidrofobinler fungal alem kökenli olup, *Askomiset* ve *Bazidiomiset*'lerde bulunurlar (Wösten 2001). Hidrofobin proteini ilk olarak *Schizophyllum commune*'den izole edilmiştir, bu nedenle hidrofobinler ile ilgili en kapsamlı araştırmalar bu türe ait SC1, SC2, SC3, SC4, SC5 ve SC6 hidrofobinleri üzerine yoğunlaşmıştır (Wessels 1996; Wösten et al. 1999). SC3 hem monokaryonlarda hem de dikaryonlarda ifade edilirken; SC4 sadece dikaryonlarda ifade edilir. SC3 proteininin, hiflerin büyümesi için su tabakasının kırılmasında ve substratla bağlanmada rol oynadığı yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. SC4, meyve veren cisimlerin gaz kanallarının nemli koşullarda su ile dolmasını engeller. SC1 ve SC6'nın rolleri ise, henüz bilinmemektedir (Wösten et al. 1995). Diğer araştırmalar ise, güvenilir organizmalar olarak sınıflandırılan (GRAS) *Agaricus bisporus* ve *Pleurotus ostreatus* funguslarında hidrofobinlerin varlığı ve spesifik rollerini araştırmaya odaklanmıştır (Kulkarni et al. 2017).

1. GİRİŞ

Yaygın olarak araştırılan diğer bir cins ise *Trichoderma*'dır. Bu cinse ait hidrofobinler genel olarak, yüksek gen kopya sayısına sahiptir (Kubicek et al. 2008). *Trichoderma reesei*'e ait sınıf II hidrofobinler olan HFBI ve HFBII, özellikle yüzey modifikasyonu olmak üzere birçok sanayi uygulamaları için başarıyla izole edilerek karakterize edilmiştir. Ayrıca *Aspergillus* türlerinin biyoinformatik yaklaşımlarla taranması sonucu sadece 8 türde çoğu sınıf I olmak üzere yaklaşık 74 muhtemel hidrofobin bulunduğunu gösterilmiştir (Littlejohn et al. 2012). Hidrofobinler, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus oryzae* ve *Aspergillus nidulans*'dan başarıyla izole edilmiş ve karakterize edilmiştir. *Cladosporium*, *Fusarium* ve *Neurospora* gibi diğer cinslerindeki izolasyon ve karakterizasyon çalışmaları, son yıllarda artan bir şekilde devam etmektedir (Kulkarni et al. 2017).

1.2. Hidrofobinlerin Yapısı ve Özellikleri

Hidrofobinler düşük moleküler ağırlıklı, yapısında hidrofobinlerin kararlı yapı oluşturmada rol oynayan 4 disülfid bağı bulunduran (C1-C6, C2-C5, C3-C4 ve C7-C8) ve karakteristik olarak sekiz korunmuş sistein amino asidi içeren amfipatik yüzey aktif proteinlerdir. Şekil 1.2'de Sınıf I ve Sınıf II hidrofobinlerinin amino asit dizileri karşılaştırılması ve sistein Tablo 1.1'de ise hidrofobin üretici organizmalar, proteinleri ve UNIPROT erişim numaraları gösterilmiştir. Korunan sistein kalıntıları sarı renkte belirtilmiştir (Ren Q et al. 2013).



Şekil 1.2. Sınıf I ve Sınıf II hidrofobinlerinin amino asit dizileri karşılaştırılması ve sistein bölgeleri gösterilmiştir.

1. GİRİŞ

Tablo 1.1. Şekil 1.2'de kullanılan kısaltmaların organizma isimleri ve UNIPORT erişim numaraları gösterilmiştir.

Organizma	Hidrofobin	Uniport Erişim Numarası
SINIF I		
<i>N. crassa</i>	EAS	Q04571
<i>A. fumigatus</i>	RodA	P41746
<i>A. fumigatus</i>	RodB	EAL91055
<i>M. grisea</i>	MPG1	P52751
<i>S. commune</i>	SC3	EFI96359
<i>A. nidulans</i>	DewA	P52750
<i>G. moniliformis</i>	Hyd3	AAO16869
SINIF II		
<i>G. moniliformis</i>	Hyd5	AAN76355
<i>M. grisea</i>	MHP1	AAD18059
<i>N. crassa</i>	NC2	XP_959282
<i>O. ulmi</i>	CU	Q06153
<i>C. fusiformis</i>	CFTH1	Q9UVI4
<i>C. purpurea</i>	CPPH1	CAD10781
<i>P. fulva</i>	HCF6	Q9C2X0

Hidrofobinler amfipatik özelliklere sahip olduklarından hidrofilik-hidrofobik ara yüzeylerde tek katmanlı tabaka oluştururlar (Bayry et al. 2012). Örneğin; su-hava, su-yağ, su-hidrofobik katı gibi hidrofilik-hidrofobik ara yüzlerde öztoplanma yaparlar (Wösten and Scholtmeijer 2015). Hidrofobinler bu özelliklerinden dolayı yüzey kaplamaları, biyosensörler, kendi kendini temizleyen yüzeyler gibi pek çok endüstriyel uygulamada önemli rol oynarlar (Kulkarni et al. 2017).

Biyolojik süreçlerde çeşitli organik yüzeyler saniyeler içerisinde proteinler tarafından kaplanabilmektedir. Hidrofobinler bu özellikleri sayesinde rejeneratif tıp ve doku mühendisliği gibi alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Yüzeylere proteinlerin kaplanması üzerine yapılan çalışmalar, bir substrata veya yüzeye proteinlerin adezyonunun, sıcaklık, iyonik güç ve tampon bileşimi ile kontrol edilebileceğini göstermiştir. Ayrıca adezyon ve yüzeydeki kalıcılık proteinin boyutu, yapısal stabilitesi

1. GİRİŞ

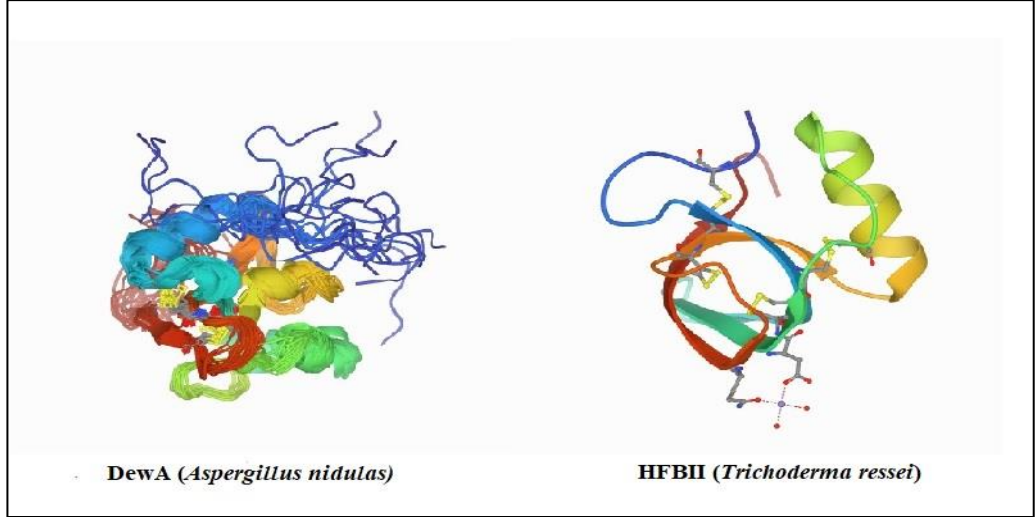
ve bileşimi ile de yakından ilişkilidir. Küçük ve rijit yapıdaki proteinler, yüzey adsorpsiyonundan sonra konformasyonel değişim göstermeye yatkın olmadığından yüzey uygulamalarında tercih sebebidirler. Böyle bir protein olan hidrofobinler, içerdikleri yapıyı stabilize eden disülfüt bağları nedeniyle çok kararlı küçük proteinlerdir (Rabe et al. 2011; Linder et al. 2005).

Yukarıda belirtilen özelliklerinin yanı sıra hidrofobinler toksik özellik göstermemeleri nedeniyle de biyoteknolojik uygulamaların odağı haline gelmiştir. Biyoteknolojik uygulamalarda kullanılan birçok sentetik molekülün hücre üzerinde toksisitesi olduğu bilinmektedir. Bu nedenle araştırmacılar amfipatik özelliğe sahip, biyosüpfektanlar gibi diğer organik moleküllere yönelmişlerdir. Glikolipitlerin, lipoproteinlerin, lipopolisakkaritlerin ve fosfolipitlerin içinde bulunduğu bu yüzey aktif maddelerin de model organizmalar üzerinde yapılan çalışmalarda güvenli olduğu bildirilmiştir. Fakat biyosüpfektanlar termodinamik özelliklerinden dolayı hücre zarlarıyla etkileşime girerek zarın muhtevasını bozarlar. Hidrofobinler organizmaların plazma zarları ile etkileşime girmediklerinden ötürü avantaj konumundadırlar (Wösten 2001; Winterburn et al. 2011). Çünkü hidrofobinlerin yüzey aktif özelliği, lipit yapıdan değil dizideki belirli amino asitlerden kaynaklanmaktadır (Scholtmeijer et al. 2004).

1.3. Hidrofobinlerin Sınıflandırılması

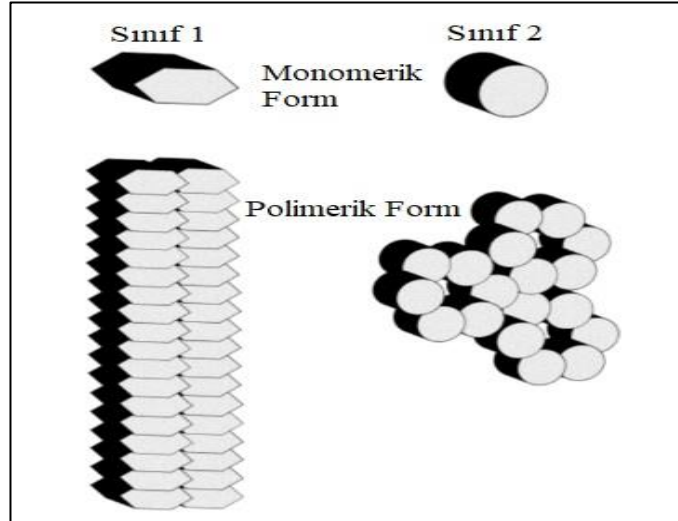
Hidrofobinler içerdikleri 8 adet oldukça korunmuş sistein kalıntısının diziliminden gösterdikleri farklılıklara ve kararlılıklarına göre sınıf I ve sınıf II olmak üzere iki sınıfa ayrılır (Sunde et al. 2008). *Askomisetler*'e ait olan türlerde her iki sınıf hidrofobinlere rastlanırken; Bazidiyomisetlere ait türlerde ise yalnızca sınıf I proteinler bulunur (Akanbi et al. 2010; Sarlin et al. 2012). *Neurospora crassa*'dan EAS ve *S. commune*'den SC3, *A. nidulans*'tan DewA gibi Sınıf I hidrofobinlerin birincil yapısı, daha fazla amino asit içerir ve Sınıf II'den daha fazla özellik ortaya koyar. Ayrıca morfolojik olarak farklılık göstermektedirler (Victor L et al. 2014). Şekil 1.3'te DewA ve HFBII hidrofobinlerinin üç boyutlu yapıları gösterilmiştir. Moleküler seviyede hidrofobinler, korunmuş sekiz sistein kalıntısının varlığı dışında homoloji göstermemektedirler (Shokribousjein et al. 2011). DewA (*Aspergillus nidulas*) sınıf I hidrofobin ve HFBII (*Trichoderma reesei*) sınıf II hidrofobin (www.rcsb.org).

1. GİRİŞ



Şekil 1.3. Üç boyutlu yapısı ortaya konulmuş hidrofobin proteinlerinden bazıları

Bu iki sınıfın hidrofobik özellikleri ve saflaştırmak için izlenmesi gereken yöntemler birbirinden farklıdır. Sınıf I, TFA ve formik asit gibi güçlü asitlerde çözünen sınıf II'ye göre daha kararlı hidrofobinlerdir ve genellikle fungal sporların yüzeyinde bulunurlar (Lunkenbein et al. 2011). Sınıf II hidrofobinler ise etanol ve sıcak sodyum dodesil sülfat (SDS) yardımı ile kolaylıkla çözülebilirler (Kirkland and Keyhani 2011). Şekil 1.4'de morfolojik yapıları gösterilmiştir (Victor L et al. 2014).

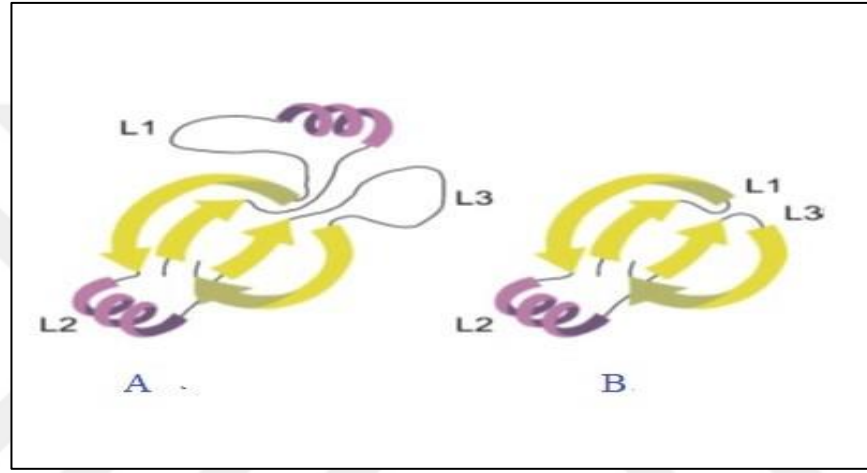


Şekil 1.4. Sınıf I ve Sınıf II hidrofobinlerin monomerik ve polimerik yapıları

Primer diziye ait homoloji çalışmaları, benzer rolleri yerine getiren hidrofobinlerin türler arasında birbiriyle benzerlik sergilediğini göstermiştir. Her iki hidrofobin sınıfının primer dizisi yalnızca bir polipeptit zincirinden oluşur ve katlanmış

1. GİRİŞ

son konformasyon α -heliks ve β -tabakalardan oluşmakla birlikte β -tabaka yönünden zengindir. α -heliks ve β -tabakaların nispi miktarları hidrofobin sınıfına ve proteinin lokasyonuna göre değişiklik gösterir. Örneğin, su-hava ara yüzünde sınıf I hidrofobinlerin β -tabaka yapısında artış görülürken; su-hidrofobik katı arasındaki ara yüzde α -heliks yapısında artış vardır. α -heliks yapısı proteinlerin kendiliğinden düzenlenmesi sonucu saniyeler içerisinde gerçekleşirken, β -tabaka yapısına dönüş daha uzun zaman almaktadır ve bu yapı kendiliğinden düzenlenmenin en kararlı halini oluşturur. Şekil 1.5’de Sınıf I ve Sınıf II hidrofobinlere ait α -heliks ve β -tabaka yapıları gösterilmiştir (Wösten 2001).



Şekil 1.5. Sınıf I ve Sınıf II hidrofobinlere ait α -heliks ve β -tabaka yapıları

EAS ve SC3 gibi bazı Sınıf I hidrofobinlerin primer yapısının Sınıf II proteinlerden daha fazla amino asit içerdiği ve bu nedenle daha fazla çeşitlilik gösterdiği bilinmektedir (Hektor and Scholtmeijer 2005). Ayrıca bu iki sınıf arasındaki hidrofobisitenin de farklılıklar gösterdiği bilinmektedir (Linder et al. 2005). Sınıf I hidrofobinler konidi yüzeyinde amiloid yapıdaki proteinlere benzer fibriller oluşturur. Rodlet yapısı olarak adlandırılan bu fibriller 4 ila 6 öncü filamentten oluşur ve yoğun şekilde β -tabaka yapısı içerdiğinden ötürü proteazlara karşı oldukça dirençlidir (Paris et al. 2003; Wang et al. 2010).

Sınıf I hidrofobinlerden HFBI geni, glikoz ve sorbitol içeren ortamda ifade edilirken laktoz ve selüloz içeren ortamda ifade edilmez. Sınıf II Hidrofobinlerden, HFBII ve HFBIII karbon kaynağı içeren ortamlarda ifade edilir, ancak glikoz varlığındaki ifadesi düşüktür. HFBI ve HFBIII, misel hücre duvarlarından izole edilirken, HFBII sporlardan izole edilmiştir (Askolin et al. 2006).

1. GİRİŞ

1.4. Funguslarda Hidrofobinlerin Fonksiyonları

Hidrofobinler, doğal yüzey aktif maddeler olarak hareket ederler ve büyüme ortamının yüzey gerilimini azaltırlar. Bu şekilde mantarların su-hava ara yüzünü kırmasına ve hidrofobik olan hif gibi havai yapıların yüzeylere yapışmasına izin verirler (Wösten et al. 1999; Setälä 1997). Bu hidrofobik yapı ise fungusu ıslanmaya ve kurumaya karşı dirençli hale getirir.

Hidrofobinlerin funguslara kazandırdığı diğer fonksiyonlar ise, patojen-konak ilişkisi ve simbiyoz yaşamda iki canlının etkileşimi için gereklidir (Wösten 2001). Örneğin; böcek patojeni olan *Beauveria bassiana* sporları ile böceğin kitin tabakası arasındaki etkileşim buna örnek olarak verilebilir (Zhang et al. 2011). Buna benzer olarak, bitki patojeni *Magnaporthe grisea*'da üretilen Mpg1 hidrofobini fungusun bitki ile etkileşimini sağlayan apresoryum oluşumunda rol oynadığı ve Mpg1 geninin susturulmasıyla apresoryum oluşumu buna bağlı olarakta patojenitesinde azalmanın olduğu belirlenmiştir (Talbot et al. 1996).

Başka bir hidrofobin fonksiyonu ise, yüzeyinde bulunan tek katmanlı hidrofobinler sayesinde sporların bağışıklık sisteminden gizlenmede önemli rol oynamalarıdır. Hidrofobin tabakası bağışıklık hücrelerinin sporları antijen olarak algılamasına mâni olur ve bu sayede konak immün sistemi hücreleri tetiklenmez. *A. fumigatus* hidrofobini RodA, makrofajlar tarafından parçalanmaya karşı fungusu direnç kazandırır (Bayry et al. 2012). Kısaca bazı hidrofobinlerin biyolojik fonksiyonları Tablo 1.2'de gösterilmiştir.

1. GİRİŞ

Tablo 1.2. Hidrofobinlerin biyolojik fonksiyonları

Organizma	Hidrofobinler	Biyolojik Fonksiyonları	Mutant Fenotipi Belirlenenler	Kaynak
Ascomycetes				
<i>Aspergillus fumigatus</i>	RodA / HYP1	Spor kısımların hidrofobikliğini sağlar.	+	Paris et al. 2003
<i>Aspergillus nidulans</i>	DewA	Spor kısımların hidrofobikliğini sağlar.	+	Timberlaket and Stringer 1995
<i>Aspergillus nidulans</i>	RodA	Spor kısımların hidrofobikliğini sağlar.	+	Stringer et al. 1995
<i>Cladosporium fulvum</i>	HCf-1	Konidia ve Hif kısımlarında bulunur.	+	Whiteford and Spanu 2002
<i>Cladosporium herbarum</i>	HCh-1	Nadir bir insan alerjeni	+	Weichel et al. 2003
<i>Fusarium verticillioides</i>	Hyd1	Mikrokonidia zincir oluşumu	+	Fuchs et al. 2004
<i>Fusarium verticillioides</i>	Hyd2	Mikrokonidia oluşumu	+	Fuchs et al. 2004
<i>Magnaporthe grisea</i>	MPG1	Konidia'nın hidrofobikliğini etkiler.	+	Talbot et al. 1993
<i>Neurospora crassa</i>	EAS	Fungusun konidal kısmında bulunur.	+	Lauter et al. 1992
Basidiomycetes				
<i>Agaricus bisporus</i>	ABH1 / HYPA	Özellikleri tam olarak bilinmemektedir.		Lugones et al. 1998

1. GİRİŞ

1.5. Hidrofobinlerin Biyoteknolojik Uygulamaları

Hidrofobinler, çeşitli yüzeylere kazandırdıkları özelliklerden dolayı biyoteknolojide birçok pratik uygulamada büyük bir potansiyele sahiptir. Bunların arasında kendi kendini temizleyen yüzeyler (Hektor and Scholtmeijer 2005; Rieder et al. 2011) ve biyometaryaller (Kirkland and Keyhani 2011; Rieder et al. 2011) sayılabilir. Tıbbi biyoteknoloji uygulamalarında ise, hidrofobik yüzeylere kazandırılan hidrofilik özellikler sayesinde bazı medikal uygulaması olan yüzeylere hücre adezyonu artırılarak biyoyumlu metaryallerin oluşturulması sağlanır (Jensen et al. 2003).

Diğer taraftan, hidrofobinlerin oldukça kararlı emülsiyerler oluşturma yeteneği, özellikle farmasötik uygulamalarda stabil preparatların hazırlanmasında önemlidir (Linder et al. 2005; Kirkland and Keyhani 2011). Ayrıca hidrofobinler, yüzey özelliklerinin modifikasyonu (Janssena et al. 2002) ve protein immobilizasyonu gibi çeşitli uygulamalar için önerilmiştir (Kisko et al. 2008). Nanobiyoteknoloji uygulamalarında ise hidrofobinlerin kullanımının biyosensörlerin duyarlılığını (Khalesi et al. 2015), kalitesini ve kullanım ömrünü arttırabileceği bildirilmiştir (Chakarova and Carlson 2004).

Özellikle 90'lı yıllarda lotus bitkisinin 140 derecenin üzerinde temas açısına sahip su tutmayan hidrofobik yaprak yüzeylerinin keşfinden bu yana, bilim insanları su ve kir tutmayan süper hidrofobik yüzeylere odaklanmış ve bu yüzeyler birçok farklı sektörde endüstriyel uygulamalarda kullanılmaya başlanmıştır. Bu yüksek temas açılarına sahip yüzeylerin hidrofobisitenin sonucu olarak sadece 3 derecelik bir açıda yüzeye tutunamayan su damlacığının yer çekimi kuvveti ile akışı, beraberinde yüzeyde bulunan toz partiküllerinde giderilmesine neden olmakta ve bu olay kendi kendine temizleme olarak adlandırılmaktadır (Wagner et al. 2003).

Hidrofobinlerin çeşitli yüzeylerin özelliklerini değiştirebilme yetenekleri sayesinde hidrofilik yüzeylere hidrofobik özellikler kazandırılarak kirlenmeyen ya da mikroorganizmaların tutunmasını engelleyen süper hidrofobik yüzeyler elde edilebilmektedir (Hektor and Scholtmeijer 2005; Rieder et al. 2011). Gemilerde olduğu gibi, yüzeyin hidrofobikliğini artırarak veya antibakteriyel bileşiklerle kombinasyon

1. GİRİŞ

halinde hidrofobin kaplamaları kullanarak bakteri üremesi engellenebilir (Hektor and Scholtmeijer 2005). Kremler ve merhemler içindeki emülsiyonları stabilize etmek için hidrofobinler kullanılabilir. Hidrofobik ve hidrofilik arayüzlerde hidrofobinlerin emülsiyonları stabilize edebileceği bilinmektedir (Wösten et al. 1994). Biyosensörlerde kullanılmak üzere enzimlerin hareketsizleştirilmesindeki yaygın bir sorun, yüzeydeki proteinlerin denatürasyonudur. Bu denatürasyonun üstesinden gelmek ve biyosensörün kalitesini, özgüllüğünü ve duyarlılığını artırmak için yüzeyin hidrofobin ile kaplanması yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Linder et al. 2002). İlaç olarak kullanılan nanopartiküllerin yüzey özellikleri, partiküllerin stabilitesini, vücutla etkileşimlerini ve ilaçların hedefleme potansiyellerini belirler. Bu partiküllerin yüzey özellikleri, hidrofobin (HFB) proteinleri kullanılarak daha fonksiyonel hale getirilebilir (Valo et al. 2010).

Bu uygulamalar hidrofobinlerin endüstriyel kullanım alanlarını oldukça genişletmektedir. Bilindiği gibi sıvıların katı zeminlerde davranış şekilleri, yüzeyin hidrofilik ya da hidrofobik oluşuna göre değişiklik gösterir. Su temas açısı (θ^0), suyun katı ile temasta bulunduğu noktada kolayca ölçülebilen ve yüzeyin hidrofobisitesi hakkında yararlı bilgiler sunan bir değerdir. Temas açısı 10° 'den daha küçük olan yüzeyler süperhidrofilik ve 150° 'den yüksek olan yüzeyler ise süperhidrofobik olarak adlandırılır (Starov et al. 2010).

Hidrofobinlerin üretimi ve veriminin artırılması için kullanılan başlıca stratejiler yabancı suşların kullanımı ve rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak hidrofobinlerin ifadesini arttırmaya yöneliktir (Vergara et al. 2006). Özellikle bazı yabancı suşların hidrofobinleri kültür ortamına salgılamamaları büyük ölçekli üretimi zorlaştırmaktadır (Bayry et al. 2012). Yabancı suşlar ile yapılan çalışmalarda verimin artırılmasına yönelik strateji genellikle kültürün optimizasyonudur. Örneğin, *Ceratocystis ulmi*'den hidrofobin üretimi farklı karbon kaynakları ve azot kaynakları kullanılarak 5 kattan fazla arttırılmıştır (Takai and Richards 2008). Kültürün çeşidi de ayrı bir önem taşımaktadır, bazı araştırmacılar hidrofobin üretiminde batık kültür yerine özellikle katı hal fermantasyonu'nun etkili bir alternatif olabileceğini vurgulamışlardır (Vigueras et al. 2009).

1. GİRİŞ

Yabanıl suşların düşük verim problemleri nedeniyle araştırmacılar yüksek üretim miktarlarına ulaşabilmek için genetiği değiştirilmiş organizmaların kullanılması gerektiğini vurgulamışlardır (Kulkarni et al. 2017). Rekombinant yöntemler kullanarak hidrofobinlerin üretiminin klasik yöntemlerle doğal suşlardan yapılan üretime kıyasla daha etkili olduğu açıktır. Ancak buna rağmen bazı rekombinant suşlar hariç çoğu fungusun hidrofobin üretim kapasitesi 150 mg/L'nin altındadır (Scholtmeijer et al. 2001; Kulkarni et al. 2017). Her ne kadar mevcut üretim yöntemleri, tıbbi uygulamalar, biyosensörler ve ilaç formülasyonları gibi küçük ölçekli uygulamalar için yeterli görünse de (Bayry et al. 2012; Scholtmeijer et al. 2001), daha büyük endüstriyel uygulamalar için üretim verimi mutlaka arttırılmalıdır (Khalesi et al. 2015).

Yakın zamana kadar hidrofobinlerle ilgili birçok uygulama patentlenmiştir, ancak bunların çoğu düşük üretim veriminden dolayı henüz endüstriye uygulanamamıştır (Khalesi et al. 2015). Bu konuda birçok araştırmacının ortak çözüm önerisi, yeni fungus türlerinde hidrofobinlerin taranması, izolasyonu ve karakterizasyonunun yapılmasıdır (Khalesi et al. 2013). Araştırmacılar ancak bu yolla üretim verimi arttırmak için etkili bir stratejinin ortaya konulabileceğini vurgulamışlardır (Ying and Feng 2004; Kulkarni et al. 2017).

Interpro veritabanında (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) yapılan 12.03.2022 tarihli taramaya göre Ascomycetes'den 1.245 ve Basidiomycetes'den 2.945 olmak üzere toplam 4.190 ayrı hidrofobin kaydı bulunmaktadır. Kulkarni et al. (2017) tarafından bu yılın ortalarında yayımlanan bir çalışmada bu sayı 1.678 olarak verilmiştir. Son 5 yılda veritabanına yapılan protein girişindeki yaklaşık %250'lik artış araştırmacıların son yıllarda bu konu üzerine yoğun bir şekilde odaklandıklarını ve bu konunun bilim dünyasında oldukça popüler olduğunu göstermektedir.

1.5.1. Proteinlerin rekombinant üretiminde kullanılan konakçılar

Proteinlerin rekombinant üretiminde konakçı seçimi maliyet, verim ve güvenilirlik gibi faktörler açısından avantaj ve dezavantajlarına göre yapılır.

1. GİRİŞ

***Escherichia coli*'de rekombinant üretim**

Heterolog proteinlerin üretiminde *E. coli*, yaygın kullanılan konakçılardan birisidir (Terpe 2006). Bu konakçıların hızlı büyümesi, hızlı ifadesi, kültür kolaylığı ve yüksek ürün verimi bu sistemin avantajları arasında sayılmaktadır (Gerold et al. 1996). Ayrıca genetiğinin, diğer mikroorganizmalardan çok daha iyi anlaşılmış olması ve gelişmiş genetik araçların varlığı ile birlikte *E. coli*'nin rekombinant üretimdeki önemi daha da artmıştır (Demain and Vaishnav 2009).

E. coli'de rekombinant üretimin bahsedilen avantajlarının yanı sıra hücre içi agregasyon, yanlış katlanma, lipopolisakkarit üretimi, posttranslasyonel modifikasyon eksikliği ve proteazlara bağlı protein degradasyonu gibi bazı dezavantajları da vardır (Rosano and Ceccarelli 2014). *E. coli*'de inklüzyon cisimcikleri olarak üretilen proteinler genellikle inaktif olup, çözünmeleri çok zordur ve yeniden katlanma gerektirir (Rieder et al. 2011). Ek olarak, birçok disülfüt bağına sahip proteinlerin üretimi ve yeniden katlanması son derece zordur (Demain and Vaishnav 2009).

E. coli'de bu olumsuz durumları iyileştirmek için; farklı promotörler ve farklı konakçı suşlar kullanılarak, fermentasyon ortamının (karbon ve nitrojen kaynakları, indüksiyon koşulları) ve kültür koşullarının (Sıcaklık, pH ve O₂) optimizasyonu gibi bazı alternatif yöntemler bulunmaktadır (Choi and Lee 2004).

Mayalar'da Rekombinant üretim

Mayalar, katlanma veya glikozilasyon ihtiyacıyla ilgili sorunlar nedeniyle *E. coli*'de iyi üretilmeyen rekombinant proteinleri üretmek için sıklıkla kullanılır.

Maya suşları genetik olarak iyi karakterize edilmiştir ve birçok posttranslasyonel modifikasyon gerçekleştirdikleri bilinmektedir. Diğer alternatif sistemlere göre uygulanabilirliğinin kolay ve maliyetinin düşük olması nedeniyle fermentasyon işlemlerinde avantaj sağlarlar (Demain and Vaishnav 2009).

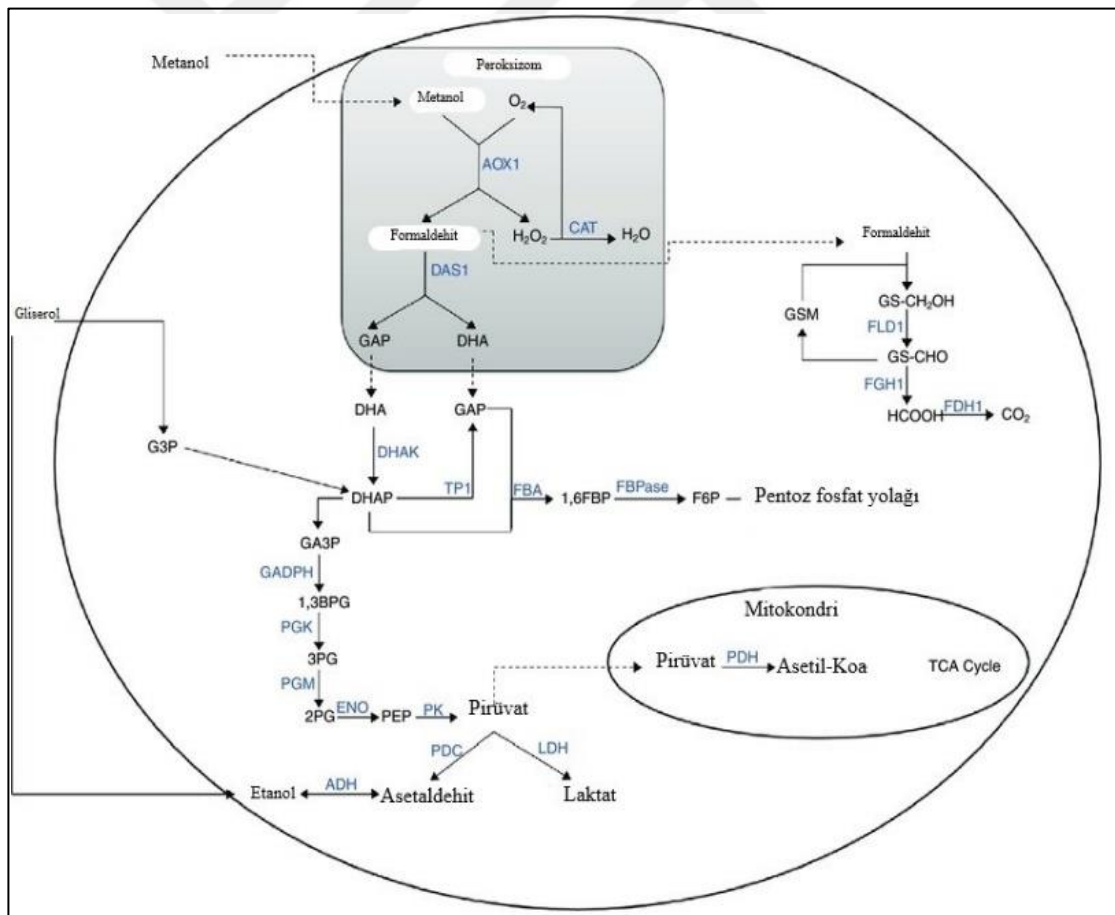
***Pichia pastoris*'de Rekombinant üretim**

P. pastoris, 1-5 µm çapında, 5-30 µm uzunluğunda olup, oval şekilli ve tek hücreli ökaryotik canlıdır (Higgins and Cregg 1998). Fungi alemi, Ascomycota şubesi, Saccharomycetes sınıfı, Saccharomycetales takımı, Saccharomycetaceae familyası ve son zamanlarda yapılan çalışmalarda yeni bir cins olan *Komagataella* olarak yeniden sınıflandırıldı ve 3 türe ayrıldı *K. pastoris*, *K. phaffii* ve *K. pseudopastoris*. Biyoteknolojik uygulamalar için kullanılan suşlar, önerilen iki türe aittir: *K. pastoris* ve *K. phaffii* (Kurtzman 2011). *P. pastoris* genetik mühendisliğinde sıkça kullanılan metilotrofik maya olup heterolog proteinlerin miligramdan gram'a kadar verimli bir şekilde ekspresyonu için yararlı bir sistemdir (Cereghino et al. 2002).

P. pastoris'in rekombinant protein üretiminde önemli olmasının birkaç sebebi vardır:

1. Organizmanın büyümesi için spesifik kültür ortamına ihtiyaç duymaz.
2. Genetik uygulamalar için kolay teknikler mevcuttur.
3. Protein ekspresyonu yüksek miktarda gerçekleştirilir.
4. Disülfid bağ oluşumu ve glikozilasyon gibi protein modifikasyonlarını gerçekleştirebilir.
5. Ekspresyon işleminin gerçekleştirilmesi için pek çok güçlü promotor bulundurlar (Cereghino et al. 2002; Cereghino et al. 2013).

Ancak diğer sistemlerde olduğu gibi *Pichia pastoris* sisteminde'de bazı dezavantajlar bulunmaktadır. Transformasyon aşamasında, bakteriyel sistemin aksine kompetent hücreler büyük miktarlarda (µg düzeyinde) plazmid gerektirir (Wu and Letchworth 2004). Ayrıca rekombinant protein üretimini düzenleyen en önemli 2 promotör (AOX ve PGAP) bulunmaktadır (Rajamanickam et al. 2017). PGAP, oldukça kısa işlem sürelerinde yüksek ürün verimleri sağlar (Cos et al. 2006). Bununla birlikte, hücre büyümesi ve rekombinant protein üretimi doğrudan bağlantılı olup, hücreler için yüksek metabolik yüke neden olur ve bu da istenmeyen metabolitlerin üretimine ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. Ayrıca metanol ile indüklenen *P. pastoris* suşlarında, metanol



1. GİRİŞ

Ayrıca bu sistemler için en çok tercih edilen genler AOX genleridir. En önemli olan AOX1 geni sayesinde yabancı proteinlerin transkripsiyonu kontrol edilebilir. Ayrıca ekspre edilen proteinin toksik etki özelliği olsada, hücre ekspresyona devam eder. AOX2 promotorünün, AOX1 promotoruna göre verimliliği çok düşük olduğundan dolayı AOX1 geni *Pichia pastoris*'in en çok tercih edilen promotorudur. Diğer bir promotor olan GAP (gliseraldehit 3-fosfatdehidrogenaz) promotorünün proteinlerin *Pichia pastoris*'te üretilmesinde sitotoksik etki yapabileceği düşünülmektedir (Patrick et al, 2005). Ayrıca başka bir çalışmada α -glukuronidazın üç farklı promotör kullanılarak ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. YPT1 promotörü kullanıldığında genin ekspresyon seviyesi GAP promotörü kullanıldığında 10 kat daha az, metanol ile indüklenen AOX1 promotörü kullanıldığında ise 80 kat daha az bulunmuştur (Sears and Wong 1998). Ancak AOX1 geninin methanol konsantrasyonu'nun problemlerle izlenmesinin zorluğu ve metanolün yanıcı etkiye sahip olması gibi bir takım dezavantajları da bulunmaktadır (Patrick et al. 2005; Çelik ve Çalık 2012).

Pichia pastoris'te ürünün verimini büyük oranda etkileyen yapısal ve indüklenebilir promotörler vardır. Tablo 1.3'de listelenmiştir. (Çelik ve Çalık 2012).

Tablo 1.3. *Pichia pastoris*'in yapısal ve İndüklenebilir promotörleri

Promotör	Tür
AOX1	İndüklenebilir (Metanol)
AOX2	İndüklenebilir (Metanol)
Fld1	İndüklenebilir (Metanol, Metilamin)
GAP	Yapısal
Pex8	İndüklenebilir (Metanol, Oleat)
Ypt1	Yapısal
Adh3	İndüklenebilir (Etanol)

Ekspresyonda verimli bir şekilde ürün alınmasını sağlayan metanolün alkol oksidaz tarafından oksidasyonunu sağlayan genlerden (AOX1 ve AOX2) birinin veya ikisinde silinmesiyle farklı fenotipte suşlar ortaya çıkar (Looser et al. 2015). Metanol kullanımından dolayı *P.pastoris* üç fenotipte incelenir; Mut⁺, Mut^s ve Mut⁻ fenotipindeki suşlar metanolün olduğu ortamda gelişir ve büyük ölçekli fermantasyon üretimlerinde fazla miktarda metanole ihtiyaç duyarlar. Mut^s fenotipindeki suşlarda,

1. GİRİŞ

AOX1 geni olmadığından metanol metabolizması AOX2 geni ile devam eder. Karbon kaynağı olarak yeterince var olan metanollü ortamlarda, Mut⁺ fenotipindeki suşların 30°C'deki maksimum büyüme oranı Mut^s fenotipindeki suşlardakine göre daha yüksektir. Tablo 1.4'de yaygın olarak kullanılan *P. pastoris*'in suşları genotip, fenotip, promotor ve tetikleyici özellikleri listelenmiştir

Tablo 1.4. Genel olarak kullanılan *P. pastoris* suşları genotip, fenotip, promotor ve tetikleyici özellikleriyle listelenmiştir (Looser et al. 2015).

Suş	Genotip	Fenotip	Promotor	İndükleyici
Y-11430	Yabanıl Suş	NRRL	AOX1 ve AOX2	Metanol
GS115	His4	Mut ⁺ His ⁻	AOX1 ve AOX2	Metanol
KM71	Aox, Sarg4 His4arg4	Mut ^s His ^s	AOX2	Metanol
X-33	Yabanıl Suş	Mut ⁺	AOX1 ve AOX2	Metanol
MC100-3	Aox, Sarg4 AOX2, phis4 His4arg4	Mut ⁻ His ⁻	-	Metanol
SMD1168	Pep4his4	Mut ⁺ His ⁻ Proteaz A eksik	AOX1 ve AOX2	Metanol
SMD1165	Prb1his4	Mut ⁺ His ⁻ Proteaz B eksik	AOX1 ve AOX2	Metanol

P.pastoris'in *E.coli*'ye göre en büyük avantajları arasında, disülfid bağları ve proteinlerin O- ve N-glikozilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonları gerçekleştirebilmesidir. Bu, disülfid bağlarının gerekli olduğu durumlarda, *Escherichia coli*'nin genellikle inaktif veya çözünmez olan yanlış katlanmış bir protein üretebileceği anlamına gelir. Ek olarak, *Pichia pastoris*in yalnızca bir karbon kaynağı ve bir nitrojen kaynağı içeren ortamda büyüebildiğinden, diğer mayalara kıyasla ekstra bir avantaj sağlar (Choi and Ryoo 2003). *Escherichia coli* 'de proteinlerin uygun glikozilasyonunun olmamasından dolayı da bazı rekombinant proteinlerin işlevi değişebilir (Jenkins et al. 2003).

1. GİRİŞ

P. pastoris'in, bir klonlama konakçı olarak *S. cerevisiae*'ye göre avantajları Tablo 1.5'de gösterilmiştir (Jellison et al. 1997).

Tablo 1.5. *P. pastoris*'in *S. cerevisiae*'ye göre avantajları

• Gelişim evresinde oksijenli solunum tercih etmesi
• Yüksek miktarda verimli protein üretimi
• Hiperglikozilasyondan kaçınma
• Pek çok mikroorganizmayı öldürecek güçlü metanol çözeltilerinde büyüme
• Sürdürülmesi ucuz olan bir sistem
• Kültüre alının kolaylığı
• Çok sayıda insört DNA'nın kromozomal DNA'ya entegrasyonu ve kararlı transformantlar

Glikozilasyon, *S. cerevisiae*'den daha kısa N-bağlantılı yüksek mannoz oligosakkarit zincir uzunlukları nedeniyle, *P. pastoris*'te *S. cerevisiae*'dekine göre daha verimlidir (Mayson et al. 2003). *P. pastoris* ayrıca *S. cerevisiae*'de α -1, 3-bağlantılı mannosil terminal bağlantıları üreten ve hastalarda oldukça antijenik bir tepkiye neden olan α -1, 3-bağlantılı mannosil transferazdan yoksundur. *Pichia pastoris*, hücre dışı ortamda yüksek seviyelerde memeli rekombinant proteinleri üretebilir (Mayson et al. 2003; Wang et al. 2001).

Ekspresyon için uygun vektörün seçilmesi

Vektör seçimi yapılırken amaca yönelik olmanın yanı sıra kısa sürede yüksek miktarda ürün alabilmeyi kolaylaştırmak için, restriksiyon haritalarının, gen fonksiyonlarının, hücre içi replikasyon mekanizmalarının bilinmesi gerekmektedir. *Pichia pastoris* mayasında protein ekspresyonu için pPICZ ve pGAPZ vektörleri uygundur. Fakat yüksek miktarda üretim için pPICZA B C, vektörleri daha uygun olup, basit klonlama ve seçim, yüksek seviyede protein ifadesi ve rekombinant proteinin hızlı tespiti ve saflaştırılması için tasarlanmıştır. Bu vektörler, zeosin direnç geni

1. GİRİŞ

içerdiklerinden dolayı suşlarının doğrudan seçilmesi için uygundurlar (EasySelect™ Pichia - Thermo Fisher).

Rekombinant peptitlerin üretiminde prokaryotik konakçılardan genel olarak *Bacillus subtilis* ve *Escherichia coli*; ökaryotik konakçılardan ise özellikle *Pichia pastoris* ve *Saccharomyces cerevisiae* kullanılmaktadır. Ancak laboratuvar araştırmalarında uygulanabilirliğinin kolay olması, az maliyet ile yüksek miktarda üretim sağlayabilmesi, glikolizasyon, metilasyon, proteolitik parçalanma gibi posttranslasyonel modifikasyonları gerçekleştirebilmesi, düşük miktarda endojen protein üretimi dolayısıyla (Cereghino et al. 2002) *P. pastoris* yaygın olarak tercih edilmektedir. Ayrıca şimdiye kadar yapılan çalışmalarda heterolog proteinlerin verimli bir şekilde üretilmesi için en başarılı sistem *Pichia pastoris*'te metanol varlığında yapılan ekspresyon sistemleridir. Bu sistemler için en çok tercih edilen genler AOX genleri olup, özellikle AOX1 geni sayesinde yabancı proteinlerin transkripsiyonu ayarlanıp kontrol edilebilmektedir. Ayrıca eksprese edilen protein hücre için toksik etki yapsa bile hücre ekspresyona devam eder. AOX2 promotörü, AOX1 promotörüne göre verimlilik oldukça düşüktür. Dolayısıyla AOX1 geni *P. pastoris*'in en çok kullanılan promotörüdür. Ancak diğer sistemlerde olduğu gibi *P. pastoris* sisteminde'de bazı dezavantajlar bulunmaktadır. Örneğin transformasyon sırasında, bakteriyel sistemlerin aksine kompetent hücreler büyük miktarlarda (μ g düzeyinde) plazmit gerektirir. *E. coli*'de DNA başına μ g düzeyinde transformatlarının sayısı *P. pastoris* transformatlarının sayısından daha yüksektir (Wu and Letchworth 2004).

Ayrıca rekombinant protein üretimini düzenleyen en önemli 2 promotör AOX ve PGAP olup, PGAP promotörünün sürekliliği bulunmamaktadır (Rajamanickam et al. 2017). PGAP, oldukça kısa işlem sürelerinde yüksek ürün verimleri sağlar (Cos et al. 2006). Bununla birlikte, hücre büyümesi ve rekombinant protein üretimi doğrudan bağlantılı olup, hücreler için yüksek metabolik yüke neden olur ve bu da istenmeyen metabolitlerin üretimine ve hatta hücre ölümüne yol açabilir (Nocon et al. 2016).

Literatürde var olan bu bilgiler ışığında bu çalışmada *Aspergillus nidulans*'a ait DewA proteinini pPICZ α -A vektöründe metanol ile indüklenebilir AOX1 promotörünün

1. GİRİŞ

(alkol oksidaz 1) kontrolü altında ekstrasellüler protein üretiminin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Wessels ve arkadaşları (1991) SC3 hidrofobin proteinini *S. commune* miselyumlarından ekstrakte eden ilk ekip olarak bilinirler (Wessels et al. 1991).

Sarlin ve arkadaşları (2005) tarafından yapılan bir çalışmada *Fusarium graminearum* ve benzer türlerden hidrofobin izole etmişlerdir. Elde edilen dizileri literatürde mevcut olan markov modelleriyle karşılaştırarak elde edilen diziye karşılık gelen GzHYD5 ve FpHYD5 hidrofobinlerinin 0.003 ppm'lik konsantrasyonlarının kuvvetli bira fişkırmasını indüklediğini gözlemlemişlerdir (Sarlin et al. 2005).

Wösten ve arkadaşları (1999) *Schizophyllum commune*'nin SC3 proteini sayesinde yüzey su-hava arayüzünde kararlı bir yapı oluşturduğunu gözlemlemişlerdir. Bu sebeple'de sulu ortamlarda yaşayan mantarların büyük miktarlarda hidrofobin salgıladıklarını ifade etmişlerdir (Wösten et al. 1999).

Schmoll ve arkadaşları (2010) tarafından yapılan bir çalışmada *Aspergillus nidulans*'dan DewA proteinini üretmek için karbon kaynağı olarak laktozu ve promotör olarak ise hfb2 ve cel7A'yı kullanmışlardır. Hfb2 promotörü altında 33mg/L protein izole edilirken, cel7A promotörü altında ise DewA proteini izole edilememiştir. Proteini hfb2 promotörü altında 135 ml kültür filtratından başarıyla izole ettikten sonra proteini 1mg/ml guanidinyum hidroklorür çözeltisinde çözdükten sonra bu solüsyondan 100 µl alınarak üzerine 1 ml tampondan (50 mM Tris/HCl, 1 mM CaCl₂, pH 8) ilave edilerek kaplama solüsyonu hazırlanmıştır. Bu solüsyon cam ve teflon yüzeylere uygulanıp, %1 SDS ile muamele edildiğinde temas açısındaki değişiklik belirlenmiştir. 80°C'de 16 saat inkübasyondan sonra teflon ve cam parçalar iki kez su ile yıkanmış ve 60 °C'de 10 dakika kurutulmuştur. Temas açıları OCA temas açısı sistemi (Dataphysic Instruments GmbH, Almanya) kullanılarak belirlenmiştir. Yapılan deney sonucunda cam yüzey için, %1 SDS uygulamadan önce temas açısı 72,9±9,48° iken, %1 SDS uygulamasından sonra temas açısı 70,3±4,03° olarak belirlenirken, teflon yüzey için %1 SDS uygulamadan önce temas açısı 50,8±4,81 iken, %1 SDS uygulamasından sonra temas açısı 79,2±13,2° olarak belirlenmiştir (Schmoll et al. 2010).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Winandy ve arkadaşları (2018) tarafından yapılan bir çalışmada *Aspergillus nidulans*'dan DewA, DewC, DewD, DewE ve *Trichoderma reesei*'den HFBI proteinlerini *Escherichia coli*'de üretilerek, bu hidrofobinlerin yüzey kaplama özelliklerini karşılaştırılmışlar. Elde sonuçlara göre en iyi temas açısını DewA ve DewE sırasıyla $76,3\pm0,6^\circ$ ve $76,8\pm1,2^\circ$, DewC ve DewD sırasıyla $66,0\pm1,2^\circ$ ve $62,2\pm1,9^\circ$ ve Sınıf II hidrofobin HFBI'nin hidrofobik etkisi $71,8\pm1,4^\circ$ olarak belirlenmişlerdir (Winandy et al. 2018).

Rieder ve arkadaşları (2011) tarafından yapılan bir çalışmada H*Protein A, 46,5 kDa'lık bir moleküler ağırlığa ve 19,1 kDa'lık H*Protein B'ye sahip olan rekombinant füzyon proteinlerinin cam yüzeylerde yüzey ıslanabilirliğinin değişimi, su temas açısı ölçümleriyle belirlenmiş ve hidrofobisitede $60-62^\circ$ aralığında bir artış gösterdiği tesbit edilmiştir. Tek tabakaların homojenliği, immünofloresan mikroskopi ile gösterilirken, kaplanmış malzemelerin tek tip dokusunu görselleştirmek için atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile görselleştirilmiştir. Ayrıca yapılan başka bir deneyde biyofilmlerin üzerine etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Rieder et al. 2011).

Nejad ve arkadaşları (2016) tarafından yapılan bir çalışmada; Sınıf II'ye ait *Trichoderma reesei*'den HFBI hidrofobinini pPICZAa vektöründe %0,5 metanol ile indüklenebilir AOX1 promotörünün (alkol oksidaz 1) kontrolü altında *Pichia pastoris*'te başarıyla ifade etmişlerdir. Salgılanan HFBI miktarı, %0,5 metanol indüksiyonu kullanılarak 90. saatte üretilmiştir. Rekombinant HFBI, His etiketi ve köpük oluşumuna dayalı olarak saflaştırılarak 300mg/L'de protein elde edilmiştir (Nejad et al. 2016).

Pedersen ve arkadaşları (2011) tarafından yapılan bir çalışmada; *Aspergillus fumigatus*'sun konidia yüzeyinde bulunan patogeneze rol oynayan 14 kDa ağırlığında RodA ve biyolojik olarak henüz rolü bilinmeyen 12 kDa ağırlığında RodB hidrofobinlerini rekombinant olarak üretmeyi amaçlamışlardır. Bu amaç doğrultusunda *Pichia pastoris*'te her iki hidrofobini başarıyla üretmişlerdir. Hidrofobinlerin ekstrasellüler üretimini sağlamak için pPICZ α -A hemde pPICZB vektörlerine aktararak *Saccharomyces cerevisiae* α -faköör sinyal ve %1 metanol indüksiyonu ile AOX1 promotörü kontrolünde *P. pastoris*'te 5 gün sonunda üretim sağlanmıştır. Üretim sonucunda RodA 21mg/L üretilirken, RodB 24mg/L üretilmiştir (Pedersen et al. 2011).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Sallada ve arkadaşları (2019) hidrofobinlerin düşük rekombinant verimliliklerinden dolayı, yüksek miktarda üretimin gen kopya sayılarının artırılmasının bu durumun önüne geçip geçmeyeceğini araştırmışlardır. Bu amaçla sınıf II'ye ait HFBI genini pPICZ α -A'ya aktardıktan elde edilen plazmitler ile 5 günlük %0,5 metanol indüksiyonu ile AOX1 promotörü kontrolünde *P. pastoris*'te üretim sağlanmıştır. *P. pastoris*'te elde edilen 1, 2 ve 4'lü kopyaların üretim miktarları karşılaştırıldığında önemli bir fark görülmemiştir. Fakat şaperonlar gibi salgı proteinleriyle birlikte 3 kopyalı HFBI ekspresyonu miktarını artırmışlardır (Sallada et al. 2019).

Gruner ve arkadaşları (2012) tarafından yapılan bir çalışmada; Hidrofobinlerin polar bir yüzeye nasıl bağlanabileceğini anlamak daha da hidrofobik hale getirmek için *T. reesei*'den sınıf 2 HFBI, HFBII ve HFBIII'ün protein adsorpsiyonu için farklı tamponlar ve pH'lar kullanılmıştır. Diskler daha sonra gece boyunca ortam sıcaklığında (21 °C) etanol içinde çözülmüş 10 mM tamponlar içinde daldırılmıştır. 0,1 mg/mL'lik hidrofobinler (HFBI, HFBII ve HFBIII) belirtilen tamponlar içinde çözüldükten sonra 300 μ L protein solüsyonundan alınarak yüzeylere kaplanmıştır. Daha sonra protein kaplanan yüzeylere 6 μ L su damlatılarak temas açıları ölçülmüştür. HFBI ile kaplanan yüzey 39° ile 56° arasında, HFBII ile kaplanan yüzey 38° ile 50° arasında açı verirken pH 9'da açı alınanmıştır. Katyonik yüzeylerde HFBI maksimum pH 9.0'da 62,6°; HFBII, maksimum 69,0° ve HFBIII, pH 8.0'da maksimum 61,9° temas açısı elde edilmiştir. Anyonik yüzeylerde ise düşük pH'da, tek tabakaya yakın miktarlarda önemli protein bağlanması elde edilmiştir, ancak artan pH ile bağlanma hızla azalmış ve temas açıları oldukça düşük çıkmıştır. Sonuç olarak Hidrofobinler katyonik yüzeylere bağlanırken, anyonik yüzeylere bağlanamamışlardır (Gruner et al. 2012).

Riveros ve arkadaşlarının (2015) tarafından yapılan bir çalışmada; *Trichoderma reesei*'den HFBI ve HFBII, *Fusarium graminearum*'dan FgHYD5 hidrofobinlerini izole etmek ve bu proteinlerin hidrofobik ve hidrofilik yüzeyde su ile temas açılarını belirlemek için PDB besi yerinde 25 °C 'de 200 rpm'da 5 gün büyütülmüştür. Süre sonunda sıvı kültür süzildükten sonra toplam kültürün 3 katı kadar etanol ile süspanse edilip 1 saat santrifüj sonunda süpernatant kısım toplanarak kromatografik kolon ile saflaştırılmıştır. Santrifüj işleminden sonra kalan pellet kısım 0,1 mg/ml protein içeren distile su ile çözüldükten sonra Nanodrop (Thermo Scientific) ile 280 nm'de miktarları belirlenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Daha sonra hidrofobik ve hidrofilik yüzeylerin kaplamadan önce ve sonra olacak şekilde temas açıları belirlenmiştir. HFBI hidrofobinin; hidrobobik yüzeyde kaplamadan önce $94,3^{\circ} \pm 1,2^{\circ}$, kaplamadan sonra $64,3^{\circ} \pm 1,5^{\circ}$, hidrofilik yüzeyde kaplamadan önce $15,4^{\circ} \pm 1,1^{\circ}$, kaplamadan sonra $47^{\circ} \pm 2,3^{\circ}$, HFBII hidrofobinin; hidrobobik yüzeyde kaplamadan önce $90,1^{\circ} \pm 2,3^{\circ}$, kaplamadan sonra $66,4^{\circ} \pm 2,1^{\circ}$, hidrofilik yüzeyde kaplamadan önce $14,2^{\circ} \pm 1,3^{\circ}$, kaplamadan sonra $33,8^{\circ} \pm 1,9^{\circ}$, FgHYD5 hidrofobinin; hidrobobik yüzeyde kaplamadan önce $96,5^{\circ} \pm 0,6^{\circ}$, kaplamadan sonra $53,2^{\circ} \pm 3,6^{\circ}$, hidrofilik yüzeyde kaplamadan önce $17,8^{\circ} \pm 2,1^{\circ}$, kaplamadan sonra $54^{\circ} \pm 2,4^{\circ}$ olarak tespit edilmiştir (Riveros et al. 2015).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan cihazlar

Tez çalışmasında Erzurum Teknik Üniversitesi, Yüksek Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi Laboratuvarında bulunan ve aşağıda listesi verilen cihazlar (Tablo 3.1) kullanılmıştır.

Tablo 3.1. Tez Çalışmasında kullanılan cihazlar ve modelleri

Cihaz Adı	Modeli
+4 Soğutucu	J.P. Selecta
-20 Soğutucu	J.P. Selecta
Çalkalamalı İnkübatör	Zhicheng-ZHWY-2102C
Elektroforez Sistemi	BioRad Mini ReadySub-Cell™
Hassas Terazı	Shimadzu ATX 224
Işık Mikroskobu	ZEISS, Primo Star
Jel Görüntüleme Sistemi	BioRad ChemiDoc™ MP
Magnetik Isıtıcı	Daihan, shr
Mikrobiyolojik Steril Kabin	ESCO NordicSafe™
Otoklav	JSR, JSAC-60
pH Metre	OHAUS ST 3100F
PCR Cihazı	SensoQuest Thermocycler
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Zentrifugen Universal 320R
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore, Q-3W
Vorteks	Wisd Wisemix VM-10
Lizofilizatör	CHRIST-Alpha 1-2 LD plus
Stereo Mikroskop	Leica, ES2
Sonik su banyosu	Vevor
Santrifüj	HETTICH, Zentrifugen Universal 320R
Mini-Santrifüj	Daihan-Wisd, WiseSpin
Tartı	Desis-Model NHB

3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler

Sigma Aldrich (USA) ve Merck A.S. (USA) firmalarından temin edilmiştir. Besiyerleri, Oxoid A.S. (UK), Sigma ve LABm firmasından temin edilmiştir.

3.1.3. Çalışmada kullanılan kitler

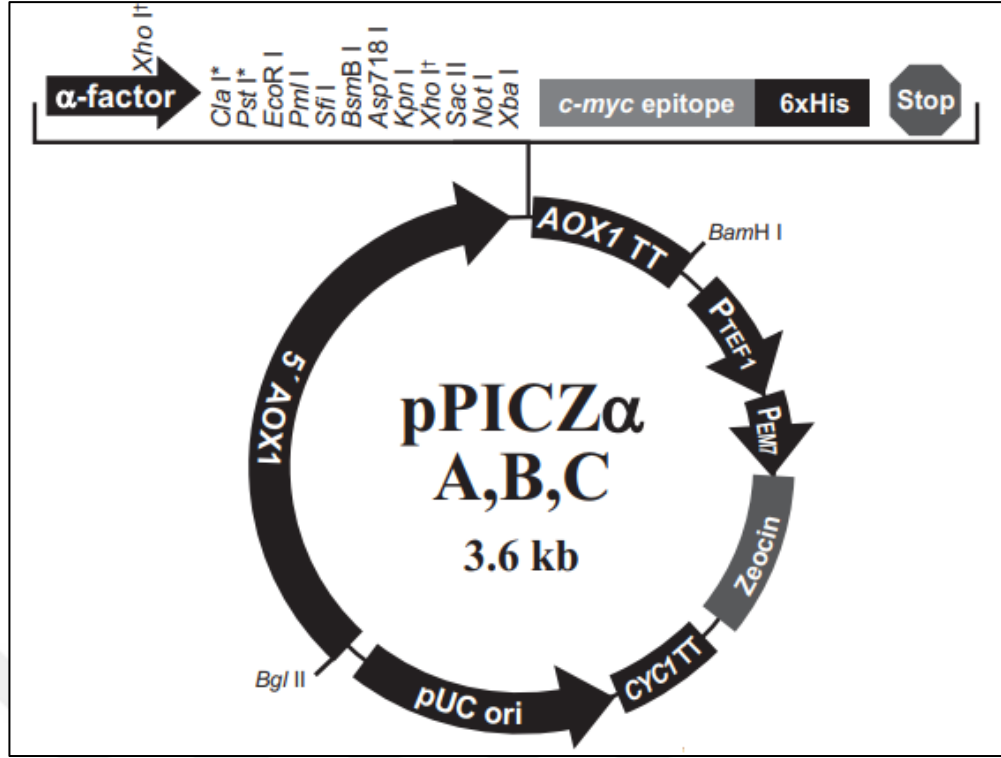
Çalışmada kullanılan kitler Eco-Tech ve İntron-Biotechnology firmalarından temin edilmiştir.

3.1.4. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar

Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar *Pichia pastoris* X-33 mayası ve *Escherichia coli* One Shot TOP10 bakterisi ise Erzurum Teknik Üniversitesi, Yüksek Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezinden temin edilmiştir.

3.1.5. Çalışmada kullanılan pPICZ α -A vektörü

pPICZ α -A vektörü Erzurum Teknik Üniversitesi, Yüksek Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezinden temin edildi. Şekil 1’de gösterilmiştir (EasySelect™ *Pichia* - Thermo Fisher).



Şekil 3.1. pPICZα-A vektörü

Vektörde yer alan bölgeler ve işlevleri; 5' AOX1 promotörü; metanolle indüklenerek rekombinant genin ekspresyonunu, α sekresyon sinyal faktörü; Rekombinant proteinin salgılanmasını, Zeosin antibiyotik direnç geni; *E. coli* ve *P. pastoris*'te transformantların seçilimini, PUC orjin bölgesi; *E. coli*'de yüksek kopya replikasyonunu sağlarken, Çoklu klonlama bölgesi; 12 endonukleaz kesim enziminin tanıma sekansını içerir, AOX1 terminatör bölgesi; Transkripsiyonun etkili terminasyonu için gereklidir. Polihistidin (6xHis) kuyruğu bulunduran C-terminal peptit ve C-myc epitop bölgesi; Rekombinant proteinin kültür ortamından kolay bir şekilde saflaştırılmasında rol oynar (EasySelect™ Pichia -Thermo Fisher).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

	5' end of AOX1 mRNA	5' AOX1 priming site
811	AACCTTTT TTTATCATCA TTATTAGCTT ACTTTCATAA TTGCGACTGG TTCCAATTGA	
871	CAAGCTTTTG ATTTTAACGA CTTTAAACGA CAACTTGAGA AGATCAAAAA ACAACTAATT	
931	ATTCGAAACG ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCT GTT TTA TTC GCA GCA Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala	
983	TCC TCC GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA ACG GCA Ser Ser Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala	
	α-factor signal sequence	
1034	CAA ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT TTC Gln Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe	
1085	GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG TTT Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu Phe	
		XhoI*
1136	ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA TCT CTC Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val Ser Leu	
	Kex2 signal cleavage	EcoRI PmlI SfiI BamBI Asp718I
1187	GAG AAA AGA GAG GCT GAA GC GAATTCAC GTGGCCCGAG CCGGCCGTC TCGGATCGGT Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala	
	Ste13 signal cleavage	
1244	ACCTCGAGCC GCGGCCGCC GCCAGCTTTC TA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala	
	KpnI XhoI SacII NotI XbaI	c-myc epitope
1299	GAT CTG AAT AGC GCC GTC GAC CAT CAT CAT CAT CAT TGA GTTTGTAGCC Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His ***	
		polyhistidine tag
1351	TTAGACATGA CTGTTCTCA GTTCAAGTTG GGCACCTACG AGAAGACCGG TCTTGCTAGA	
		3' AOX1 priming site
1411	TTCTAATCAA GAGGATGTCA GAATGCCATT TGCCTGAGAG ATGCAGGCTT CATTTTGTAT	
		3' polyadenylation site
1471	ACTTTTTTAT TTGTAACCTA TATAGTATAG GATTTTTTTT GTCATTTTGT TTCTTCTCGT	

Şekil 3.2. pPICZα-A vektöründe mevcut olan çoklu klonlama bölgesine ait nükleotid Sekansı (EasySelect™ Pichia -Thermo Fisher).

3.1.6. Çalışmada Kullanılan restriksiyon enzimleri

Çalışmada Kullanılan EcoRI, XbaI ve SacI restriksiyon enzimleri, ThermoFisher Scientific firmasından temin edilmiştir. Restriksiyon enzimlerine ait tanıma dizileri ve kesim bölgeleri Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Kesim enzimlerinin tanıma dizileri ve kesim bölgeleri (EasySelect™ Pichia -Thermo Fisher).

Enzim İsimleri	Hedef Bölge Dizileri
EcoRI	5'-G ^A AATTC-3'
XbaI	5'-T ^A CTAGA-3'
SacI	5'- GAGCT ^A C-3'

3.1.7. pPICZαA vektörüne ait primerler

Rekombinant pPICZαA-DewA vektörünü PCR’da çoğaltıp kontrol etmek ve sekans analizi yapmak üzere aşağıdaki primerler kullanılmıştır. Tablo 3.3’de gösterilmiştir.

Tablo 3.3. pPICZαA-DewA vektörünü PCR’da çoğaltmak için kullanılan primerler (EasySelect™ Pichia -Thermo Fisher).

Primer	Baz dizisi (5’-3’)	Tm (°C)	Fragment uzunluğu
5’AOX1	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	59	21
3’AOX1	GCAAATGGCATTCTGACATCC	59	21
α-faktör signal	TACTATTGCCAGCATTGCTGC	59	21

3.1.8. Çalışmada kullanılan besiyerleri ve kullanılan tampon-stok çözeltiler

LB agar (1 Litre için): Ticari olarak satın alınan ve 14 gr/L LB broth (Sigma) tartılıp dH₂O’de çözünmesi sağlandıktan sonra sterilizasyon için 121 °C ‘de otoklav uygulanarak kullanılır hale getirilmiştir.

Ampisilinli LB agar: LB agar hazırlandıktan sonra; Besiyeri 55°C ‘ye soğutulduktan sonra 100µg/mL oranında ampisilin eklenerek karıştırılır. Hazırlanan besiyeri petrilere dökülerek katılaşması beklenmiştir. Petriler kullanılıncaya kadar 4°C ‘de depolanmıştır.

LB (Luria-Bertani) broth (1 Litre için): Ticari olarak satın alınan ve 25 gr/L LB broth (Sigma) tartılıp dH₂O’de çözünmesi sağlandıktan sonra sterilizasyon için 121 °C ‘de otoklav uygulanarak kullanılır hale getirilmiştir.

Ampisilinli LB (Luria-Bertani) broth: LB broth hazırlandıktan sonra; Besiyeri 55°C ‘ye soğutulduktan sonra 100µg/mL oranında ampisilin eklendikten sonra mikroorganizmaların inokülasyonu sağlanmıştır.

LSLB (Low Salt Luria-Bertani) agar (1 Litre için): Ticari olarak hazır alınan ve 35gr /L’de bulunan besiyerinden kullanılacak hacime göre oran-orantı yöntemi ile miktar belirlendikten sonra yine aynı şekilde 15gr/L’de agar bulunan besiyerinden miktar belirlenerek kullanılacak hacimde dH₂O’de çözünmesi sağlandıktan sonra sterilizasyon için 121°C ‘de otoklav uygulanarak kullanılır hale getirilmiştir. Hazırlanan besiyeri 10 cm’lik petrilere dökülerek katılaşması gerçekleştikten sonra, kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Zeosinli LSB (Low Salt Luria-Bertani) agar: Hazırlanan LSB besiyeri 55°C ‘ye soğutulduktan sonra 50µg/mL oranında zeosin eklenmiş ve iyice karışması sağlandıktan sonra hazırlanan besiyeri karanlık ortamda petrilere dökülerek katılaşması beklenmiştir. Petriler kullanılıncaya kadar 4°C ‘de depolanmıştır.

LSLB (Low Salt Luria-Bertani) broth: Ticari olarak hazır alınan ve 20gr /L’de bulunan besiyerinden kullanılacak hacime göre oran-orantı yöntemi ile miktar belirlendikten sonra kullanılacak hacimde dH₂O’de çözünmesi sağlandıktan sonra sterilizasyon için 121°C ‘de otoklav uygulanarak kullanılır hale getirilmiştir.

Zeosinli LSB (Low Salt Luria-Bertani) broth: Hazırlanan LSB Broth besiyeri 55°C ‘ye soğutulduktan sonra 100µg/mL oranında zeosin eklenerek mikroorganizmaların inokülasyonu karanlık ortamda sağlanmıştır.

YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) Agar: Ticari olarak hazır alınan ve içeriğinde Agar 15 g/L, Bakteriyal peptone 20 g/L, glukoz 20 g/L ve Maya özütü 10 g/L bulunan besiyerinden belirlenen miktarlar tartıldıktan sonra uygun hacimde çözünmesi sağlandıktan sonra sterilizasyon için 121°C ‘de otoklav uygulanarak kullanılır hale getirilmiştir.

Zeosinli YPD agar için: Hazırlanan YPD agar Besiyeri 55°C ‘ye soğutulduktan sonra karanlık ortamda 50µg/mL oranında zeosin eklenmiş ve iyice karışması sağlandıktan sonra hazırlanan besiyeri petrilere dökülerek katılaşması beklenmiştir. Petriler kullanılıncaya kadar 4°C ‘de depolanmıştır.

YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) broth: Ticari olarak hazır alınan ve içeriğinde Bacteriological peptone 20 g/L, Glucose 20 g/L ve Yeast extract 10 g/L bulunan besiyerinden belirlenen miktarlar tartıldıktan sonra uygun hacimde çözünmesi sağlandıktan sonra sterilizasyon için 121°C 'de otoklav uygulanarak kullanılır hale getirilmiştir.

Zeosinli YPD broth için: Hazırlanan YPD broth Besiyeri 55°C 'ye soğutulduktan sonra karanlık ortamda 100µg/mL oranında zeosin eklendikten sonra mikroorganizmaların inokülasyonu sağlanmıştır.

YPDS (Yeast Extract Peptone Dextrose medium with Sorbitol) agar: Ticari olarak hazır alınan ve içeriğinde Agar 15 g/L, Bacteriological peptone 20 g/L, Glucose 20 g/L ve Yeast extract 10 g/L bulunan besiyerinden belirlenen miktarlar tartıldıktan sonra üzerine 1 M Sorbitol eklenerek uygun hacimde çözünmesi sağlanır daha sonra sterilizasyon için 121°C 'de otoklav uygulanarak kullanılır hale getirilmiştir. Hazırlanan besiyeri 10 cm'lik petrilere dökülerek katılaşması beklenmiştir. Petriler kullanılıncaya kadar 4°C 'de depolanmıştır.

Zeosinli YPDS (Yeast Extract Peptone Dextrose medium with Sorbitol) agar: Hazırlanan YPDS agar besiyeri 55°C 'ye soğutulduktan sonra karanlık ortamda 100µg/mL oranında zeosin eklenmiş ve iyice karışması sağlandıktan sonra hazırlanan besiyeri 10 cm'lik petrilere dökülerek katılaşması beklenmiştir. Petriler kullanılıncaya kadar 4°C 'de depolanmıştır.

YPDS (Yeast Extract Peptone Dextrose medium with Sorbitol) broth: Ticari olarak hazır alınan ve içeriğinde Bacteriological peptone 20 g/L, Glucose 20 g/L ve Yeast extract 10 g/L bulunan besiyerinden belirlenen miktarlar tartıldıktan sonra üzerine 1 M Sorbitol eklenerek uygun hacimde çözünmesi sağlandıktan sonra sterilizasyon için 121°C 'de otoklav uygulanarak kullanılır hale getirilmiştir.

Zeosinli YPDS (Yeast Extract Peptone Dextrose medium with Sorbitol) broth için: Hazırlanan YPDS broth besiyeri 55°C 'ye soğutulduktan sonra karanlık ortamda

100µg/mL oranında zeosin eklenmiş ve iyice karışması sağlandıktan sonra inokülasyon yapılmıştır.

500X B (%0.02 Biotin): 20 mg biotini 100 ml suda eritilir ve 0.22 ya da 0.45 µm'lık filtre ile sterilize edilir. Saklama koşulu 4°C'dir.

10X YNB (Yeast Nitrogen Base with Ammonium Sulfate without amino acids): %13,4'lük hazırlamak için; 13.4 gr YNB 1000 ml dH₂O içerisinde ısıtıcı bulokta çözünmesi sağlandıktan sonra 0.22 ya da 0.45 µm'lık filtre ile sterilize edilir. Saklama koşulu 4°C'dir.

10X M (%1 Metanol): 10 ml metanol ile 90 ml su karıştırılır ve 0.22 ya da 0.45 µm'lık filtre ile sterilize edilir. Saklama koşulu 4°C'dir.

10X GY (%10 Gliserol): 10 ml gliserolü 90 ml su ile karıştırılır ve 0.22 ya da 0.45 µm'lık filtre ya da otoklav ile sterilize edilir. Saklama koşulu oda sıcaklığıdır.

1 M potasyum fosfat tamponu, pH 6.0: 132 ml 1 M K₂HPO₄ ile 868 ml 1 M KH₂P0₄ karıştırılır ve Ph = 6,0'ya Fosforik asit veya KOH ile ayarlanılır. Otoklavlayarak sterilize edilir. Saklama koşulu oda sıcaklığıdır.

BMGY (Buffered Glycerol-complex Medium): 100 ml için; 1 gr maya özütü ve 2 gr pepton 70 ml dH₂O'da çözündürüldükten sonra otoklava alınarak 70°C'de sterilizasyonu sağlanır. Daha sonra hazırlanan 70 ml solüsyon içerisine 10 ml YNB, 10 ml Potasyum fosfat, 200 µl biotin, 10 ml gliserol ilave edilerek inokülasyon için hazır hale getirilir.

BMMY (Buffered Methanol-complex Medium): 100 ml için; 1 gr maya özütü ve 2 gr pepton 70 ml dH₂O'da çözündürüldükten sonra otoklava alınarak 70°C'de sterilizasyonu sağlanır. Daha sonra hazırlanan 70 ml solüsyon içerisine 10 ml YNB, 10 ml Potasyum fosfat, 200 µl biotin, 10 ml methanol ilave edilerek inokülasyon için hazır hale getirilir.

Breaking Buffer

- 1 mM PMSF (fenilmetilsülfonil florür veya diğer proteaz inhibitörleri)
- 1 mm EDTA
- %5 gliserol hazırlandıktan sonra;

1 L için;

- 6 gr sodyum fosfat (monobazik)
- 372 mg EDTA
- 50 ml gliserol 900 ml dH₂O'da çözündürüldükten sonra NaOH ile Ph ayarlandıktan sonra total hacim 1 L'ye tamamlanır. Hazırlanan solüsyon 4°C'de saklanır.

1,5 M Tris tamponu (pH 8,8): 11,82 gr Tris-Base 30 mL distile suda çözöldükten sonra 1N NaOH ile pH 8,8'e getirilerek distile su ile 50 ml' ye tamamlanmıştır.

0,5 M Tris tamponu (pH 6,8): 3,94 gr Tris-Base 30 mL distile suda çözöldükten sonra 2M HCl ile pH 6,8' e ayarlanarak distile su ile 50 ml''ye tamamlanmıştır (Shukolyukol 2011).

%30 Akrilamid Karışımı: 29 gr Akrikamid, 1 gr N, N'-Methylenebisacrylamide 60 ml dH₂O'da çözöndüröldükten sonra 100 ml'ye tamamlanır. Daha sonra 0.45 µm'lık filtreden geçirilerek steril edilir.

SDS-PAGE 1X Running Buffer: 3 gr Tris (C₄H₁₁NO₃), 14 gr Glisin, 1 gr SDS tartılarak 900 ml steril dH₂O ile çözöndüröldükten sonra pH 8.8'e ayarlanılarak 1 L'ye tamamlanır.

SDS-PAGE Yıkama Tamponu: 100 ml asetik asit, 300 ml Ethanol ve 600 ml dH₂O karışıtırılarak hazır hale getirilir.

%10 SDS: 10 gr SDS 100 ml steril ddH₂O ile çözündürüldükten sonra 0.45 µm'lik steril filtreden geçirilerek hazır hale getirilir. Solüsyon alimünyum folyoya sarılarak 4°C'de saklanır.

%10 APS (Amonyum persülfat): 0.5 gr APS 100 ml steril ddH₂O ile çözündürüldükten sonra, 0.45 µm'lik steril filtreden geçirilerek hazır hale getirilir.

4x Laemmli Sample Buffer: Yüklenecek örnek miktarı belirlendikten sonra 3:1 oranında örnek ve Laemmli Sample Buffer karıştırılmıştır.

Jel fiksasyon çözeltisi: 40 ml Ethanol, 10 ml Asetik Asit karışımı, total hacim 100 ml oluncaya kadar distile su ile tamamlanmıştır.

Hassaslaştırıcı/sensitizer çözelti: 0,04 gr Sodyum tiyosülfat 200 ml distile su ile çözündürülmüştür.

Gümüş boyama çözeltisi: 0,2 gr Gümüş nitrat ve %0,02 Formaldehit karışımı total hacim 200 ml oluncaya kadar distile su ile tamamlanmıştır.

Geliştirici/developer çözeltisi: 7,5 gr Sodyum karbonat ve %0,05 Formaldehit karışımı total hacim 250 ml oluncaya kadar distile su ile tamamlanmıştır.

Durdurucu çözelti (%0,5 Asetik Asit): 0,5 ml Asetik Asit total hacim distile suyla 100 ml'ye tamamlanmıştır

3.2. Yöntem

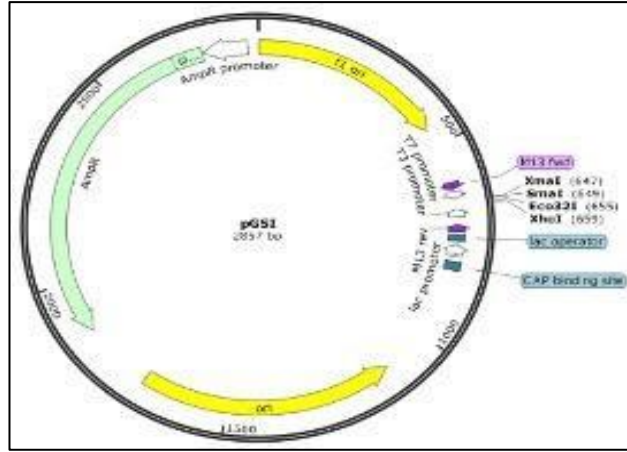
3.2.1. Kodlama bölgesinin tasarımı

P. pastoris'te süper hidrofobik proteinlerin üretimi amacıyla; literatürde yüksek değme açısına sahip olduğu belirlenen DewA hidrofobin proteini seçilmiş, GenBank'tan bu genin dizi bilgisine ulaşıp, kodon optimizasyonu gerçekleştirilerek sentezletirilmiştir. Bu hidrofobine ait (Uniprot ID: P52750) aa dizisi uniprot (<https://www.uniprot.org/>)' dan alınmıştır. Öncelikle, bu diziye ait dizide salgı sinyali sekans bölgesi ve pPICZ α -A'da His tag bölgesinin de çoğaltımı için geninin dur kodonu (stop kodonu) çıkarılmıştır. Ardından elde edilen diziyi kesmeyen restriksiyon enzimleri, biyoinformatik program (<http://www.restrictionmapper.org/>) kullanılarak tespit edilerek, EcoRI ve XbaI kesim bölgesi diziye eklenmiştir. Ayrıca, GENEWIZ aracı kullanılarak kodon optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. DewA proteinine ait sekans ve kodon optimizasyonu sonucu elde edilen sekans bilgisi Tablo 3.4'de sunulmuştur.

Tablo 3.4. DewA proteinine ait sekanslar

DewA (Uniprot ID: P52750)	ATGCGCTTCATCGTCTCTCTCCTCGCCTTCACTGCCGCGGCCACCGCAACCGC CCTCCCGGCCCTCTGCCGCAAAGAACGCGAAGCTGGCCACCTCGGCGGCCCTTC GCCAAGCAGGCTGAAGGCACCACCTGCAATGTCGGCTCGATCGCTTGCTGCA ACTCCCCCGCTGAGACCAACAACGACAGTCTGTTGAGCGGTCTGCTCGGTGC TGGCCTTCTCAACGGGCTCTCGGGCAACACTGGCAGCGCCTGCGCCAAGGCG AGCTTGATTGACCAGCTGGGTCTGCTCGCTCTCGTCGACCACACTGAGGAAG GCCCCGTCTGCAAGAACATCGTCGCTTGCTGCCCTGAGGGAACCACCAACTG TGTTGCCGTCGACAACGCTGGCGCCGGTACCAAGGCTGAGTAA
Kodon Optimizasyonu	GGAATTCATGAGATTTATTGTTTCTTTATTGGCTTTTACTGCTGCTGCTACTGC TACTGCTTTGCCTGCTTCTGCTGCTAAAAATGCTAAATTGGCTACTTCTGCTG CTTTTGCTAAACAAGCTGAAGGTACTACGTGTAATGTTGGTTCTATTGCTTGT TGTAATTCTCCTGCTGAAACTAATAATGATTCTTTGTTGTCTGGTTTGTGGG TGCTGGTTTGTGAATGGTTTGTCTGGTAATACTGGTTCTGCTTGTGCTAAAG CTTCTTTGATTGATCAATTGGGTTTGTCTAGCTTTGGTTGATCATACTGAAGAA GGTCTGTTTGTAAAAATATTGTTG

Elde edilen dizi ticari bir firma aracılığıyla seleksiyon için Amp direnç geni içeren pGSI vektörü içerisinde sentezletirilmiştir. Şekil 3.3 (Zhu et al. 2013).



Şekil 3.3. pGSI plazmit haritası (2857bp)

3.2.2. Kompetent *Escherichia coli* hücrelerinin hazırlanması

Kompetent *E. coli* hücreleri hazırlanırken ilk olarak taze kültür elde etmek amacıyla LB agar besi yerine ekim yapılarak 37°C’de 1 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. LB agarda büyüyen kolonilerden bir tanesi alınıp 5 ml otoklavlanmış LB sıvı besiyeri içeren 50 ml’lik falkona inoküle edilerek çalkayıcı inkübatörde 37°C’de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. OD600 değerinin en az 0.40 olduğunda hücre kültürü 4°C’de 4500 rpm de 10 dk santrifüjlenmiştir. Daha sonra süpernatant uzaklaştırılıp pellete 10 ml soğuk 100 mM kalsiyum klorür eklenerek hücrelerin çözünmesi sağlanıp 50 dk buz üzerinde inkübe edilmiştir. Süre sonunda kültür 4°C’de 4500 rpm’de 10 dk santrifüjlenmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet kısmına 2 ml soğuk 100 mM kalsiyum klorür eklenerek hücreler çözündürülmüştür (EasySelect™ Pichia Expression Kit).

3.2.3. pGSI-DewA plazmitinin transformasyonu

İçeriğinde DewA geni bulunan ve ticari olarak temin edilen pGSI plazmiti (şekil 3-1’de haritası gösterilmiştir) ilk olarak thermofisher protokolüne göre ısı şoku yoluyla *E. coli* hücrelerine transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla liyofilize olarak temin edilen plazmit üzerine 10 ul dH₂O eklenerek çözünmesi sağlandıktan sonra buz üzerine alınmıştır. Ardından 3 ul plazmit DNA komponent hücreye ilave edilmiş ve örnekler 5 dk buz üzerinde bekletildikten sonra, 42°C’deki kuru blokta 30 sn inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra örnekler 1 dk buz üzerinde bekletilmiş ve 500 µl AMP içeren

LB broth eklenerek 5 dk daha buzda bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda örneklerden 50, 100 ve 150 µl alınarak 100mg/ml AMP bulunduran LB agarlara baget yardımıyla yayılmış ve 24 saat boyunca 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda elde edilen yaklaşık 10 koloni ayrı ayrı isimlendirilerek 100mg/ml AMP bulunduran 5 ml LB broth besisi yerine inokülasyon yapılarak 37°C’de 225 rpm’de 24 saat çalkalayıcı inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.4. *E. coli* hücrelerinden plazmit DNA izolasyonu

İnkübasyon sonrasında elde edilen kolonilerden 10 tanesi seçilerek ve her koloni ayrı ayrı hazırlanan steril 15 ml falkonlar’da içeriğinde 100mg/ml AMP bulunduran 8 ml LB brot’a inokülasyon yapılarak 24 saat boyunca 37°C’de 225 rpm’de çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır. İzolasyonlar EcoSpin Plasmid Isolation Kit ile firmanın önerdiği protokole göre yapılmıştır. İzolasyon sonrasında örnekler %1’lik agaroz jelde 80 V’da 60 dk yürütülerek doğrulanmıştır.

3.2.5. pGSI-DewA ve pPICZα-A plazmit vektörlerinin restriksiyon enzimleriyle kesimi

pGSI-DewA plazmit vektörünün restriksiyon enzimleriyle kesimi ve jelden saflaştırılması

pGSI-DewA plazmit vektörü EcoRI ve XbaI enzimleri ile ikili kesim (Double Digestion) reaksiyonuna tabi tutulmuştur. Kesim reaksiyonu (Tablo 3.5’de kesim reaksiyonu verilmiştir) 20 µl lik hacimlerde 37 °C’de 15 dk’lik inkübasyon ile 4 set olarak gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda enzimlerin inaktivasyonu için 65°C’de 20 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Ardından reaksiyon karışımları birleştirilerek 90V’da 45 dakika boyunca %1’lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş, DewA geni (Yaklaşık 411 bp’lik bölge) jelden kesilerek Ecotech Gel Extraction Kit ile firmanın önerdiği protokole göre saflaştırılmıştır.

Tablo 3.5. pGSI-DewA plazmid ikili kesim reaksiyonu

Reaksiyon İçeriği	Reaksiyon Miktarları	Reaksiyon Koşulları
Plazmit Dna	4 µl (1 µg)	37 °C’de 15 dk 65°C’de 20 dk
EcoRI (200 unite/ µL)	1 µl	
XbaI (200 unite/ µL)	1 µl	
10 X Green Buffer	2 µl	
dH ₂ O	12 µl	
Total Hacim	20 µl	

pPICZα-A plazmit vektörünün restriksiyon enzimleriyle kesimi ve saflaştırılması

Kesim reaksiyonu (Tablo 3.6’de verilmiştir) pGSI-DewA plazmiti için ikili enzim reaksiyonunda kullanılan enzimler ile 37 °C’de 5 dk’lik inkübasyonla gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda enzimlerin inaktivasyonu 65°C’de 20 dakika inkübasyon ile gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonkarışımından linner pPICZα-A’nın (yaklaşık 3.6 kb) saflaştırılması için Ecotech PCR Extraction Kit kullanılmış ve saflaştırma firmanın önerdiği protokole göre gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.6. pPICZα-A plazmit ikili kesim reaksiyonu

Reaksiyon İçeriği	Reaksiyon Miktarları	Reaksiyon Koşulları
Plazmit pPICZα-A	4 µl (1 µg)	37 °C’de 5 dk 65°C’de 20 dk
EcoRI (200 unite/ µl)	1 µl	
XbaI (200 unite/ µl)	1 µl	
10 X Green Buffer	2 µl	
dH ₂ O	12 µl	
Total Hacim	20 µl	

DewA'nın pPICZα-A vektörüne ligasyonu

Ligasyon reaksiyonu 4 °C'de 16 saat'lik inkübasyon ile gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda enzimin inaktivasyonu için 70°C'de 10 dakika inkübasyon yapılmıştır. Tablo 3.7'de ligasyon reaksiyon karışımı gösterilmiştir. Elde edilen rekombinant vektörler daha sonra kompetent *E. coli* hücrelerine ısı şoku uygulanarak klonlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.7. Ligasyon reaksiyon karışımı

Reaksiyon Malzemeleri	Miktarlar
T ₄ Ligaz	1 µl
2X T ₄ Ligaz Buffer	10 µl
pPICZα-A Plazmit	60 ng
DNA	100 ng
dH ₂ O	0 µl
Total Hacim	20 µl

3.2.6. pPICZα-A-DewA plazmitinin *E. coli* hücrelerine transformasyonu

5 µl ligasyon ürünü komponent hücrelere ilave edildikten sonra hücreler 5 dk buz üzerinde bekletilmiş ve 42°C'deki kuru blokta 30 sn inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra örnekler tekrar 1 dk buz üzerinde bekletildikten sonra içeriğinde 500 µl Zeosinli low salt LB broth eklendikten sonra karışım 37°C'de 225 rpm'de yaklaşık 1,5 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun sonunda örneklerden 50, 100 ve 150 µl alınarak içeriğinde 100 mg/ml Zeosin bulunduran low salt LB agarı baget yardımıyla yayılarak, 24 saat boyunca 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır.

Escherichia coli hücrelerinden plazmit DNA izolasyonu

İnkübasyon sonrasında elde edilen kolonilerden 21 tanesi seçilerek ve her koloni ayrı ayrı hazırlanan steril 15 ml falkonlar'da içeriğinde 100µg/ml Zeosin bulunduran 8 ml low salt LB broth besiyerine inokülasyon yapılarak 24 saat boyunca 37°C'de 225 rpm'de çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda pozitif olan örnekler için

%40-50 gliserol içeren total hacmi 1 ml olacak şekilde frozeen stokları yapılmıştır. Kalan örneklerden ise EcoSpin Plasmid Isolation Kit kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokole göre plazmit izolasyonları yapılmıştır. İzolasyon sonrasında plazmitler %1'lik agaroz jelde 80 V'da 60 dk yürütülerek kontrol edilmiştir.

3.2.7. *Escherichia coli* transformatlarının kontrolü

pPICZ α -A-DewA vektörünün PCR ile kontrolü ve dizi doğrulaması

Transformasyonu doğrulamak amacıyla 3'AOX ve α -signal primerleri kullanılarak, PCR reaksiyonu kurulmuştur (Tablo 3.8'de reaksiyon karışımı gösterilmiştir). Reaksiyon sonrasında örnekler %1'lik agaroz jelde 90 V'da yaklaşık 60 dk uygulanan elektroforez sonrasında oluşan bantlar görüntülenerek kontrol sağlanmıştır. Pozitif çıkan örnekler daha sonra dizilerin doğruluğunu tespit etmek amacıyla her iki primerle çift yönlü olarak okutulmuştur.

Tablo 3.8. pPICZ α -A-DewA vektörünün PCR reaksiyonu

Reaksiyon	Miktarlar (μ l)	Reaksiyon Koşulları
EcoTaq 2x master mix	10 μ l	98 °C 30 saniye
3'AOX primer	0,5 μ l	94 °C 10 saniye
α -signal primer	0,5 μ l	59 °C 15 saniye
Plazmit DNA	3 μ l	72 °C 15 saniye
dH ₂ O	6 μ l	72 °C 1 dk
Total hacim	20 μ l	4 °C ∞

3.2.8. pPICZ α A-DewA vektörünün *Pichia pastoris* X-33 hücrelerine transformasyonu

pPICZ α A-DewA vektörünün lineer hale getirilmesi

pPICZ α A-DewA vektörü elektroporasyonda kullanılmak üzere lineer hale getirmek için, SacI restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesim reaksiyonuna tabi tutulmuştur (Kesim reaksiyonu Tablo 3.9’de gösterilmiştir). Kesim reaksiyonu 20 μ l lik hacimlerde 37 °C’de 15 saat’lik inkübasyon ile 10 set olarak gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda enzimlerin inaktivasyonu için 65°C’de 20 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Ardından reaksiyon karışımları birleştirilmiş ve 90V’da 45 dakika boyunca %1’lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek kontrolü sağlanmıştır.

Tablo 3.9. pPICZ α A-DewA’nın SacI restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesim reaksiyonu.

Reaksiyon Malzemeleri	Miktarları (μ l)	Reaksiyon Koşulları
Buffer (10x)	2 μ l	37 °C’de 16 saat 65°C’de 20 dakika
Plazmit DNA (1 μ g)	1 μ l	
SacI	1 μ l	
dH ₂ O	16 μ l	

Lineer hale getirilen pPICZ α A-DewA’nın saflaştırılması

İnkübasyon sonunda pPICZ α A-DewA’nın saflaştırılması amacıyla; kesim reaksiyonuna ait 10 adet örnek bir ependorf tüpünde toplanarak total hacim dH₂O ile 600 μ l’ye tamamlanmıştır. Ardından 600 μ l fenol-kloroform-izopropil alkol karışımı (25:24:1) eklenerek 10-15 saniye vortekslelendikten sonra 10000 g’de 10 dk santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrasında ependorfdaki üst faz yeni bir ependorf tüpe alınarak 600 μ l kloroform ilavesinden sonra karıştırmak için, tekrar 10-15 saniye vortekslenmiştir. Daha sonra 10000 g’de 10 dk santrifüj yapılmıştır. Süre sonunda ependorfdaki üst faz yeni bir ependorf tüpe alınarak, alınan hacmin 1/10’i kadarı kadar 3 M Sodyum Asetat (C₂H₃NaO₂) eklenerek 10-15 saniye vortekslenerek karıştırılmıştır. Oluşan hacmin 2 katı kadar soğuk etanol (%100) eklendikten sonra -80 °C’de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Süre sonunda 20000 g'de 20 dk santrifüj yapılarak, süpernatant uzaklaştırılarak pellete soğuk %70'lik etanol eklenmiştir. 20000 g'de 5 dk santrifüj işleminden sonra, süpernatant uzaklaştırılarak steril ortamda pellet kurutulmuştur. Son olarak kurutulan pellet 15 µl dH₂O su ile çözülerek, nanodrop cihazında miktarını ölçülmüştür.

Elektrokompotent *Pichia pastoris* X-33 hücrelerinin hazırlanması

İlk olarak *P. pastoris* X-33 hücreleri 50 ml steril falkona 5 ml'lik YPD besiyerine inoküle edildikten sonra, büyümeleri için 30°C'de 225 rpm'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda kültürden 100 µl alınarak 1 L'lik erlen içerisinde bulunan 250 ml'lik YPD besiyerine inokülasyon yapılmış ve OD₆₀₀ değerinin 1,3-1,5 aralığına gelene kadar büyümesi sağlanmıştır. İstenilen OD₆₀₀ değeri elde edildikten sonra, kültürün 50 ml'si 5 dk 13500 rpm'de santrifüj edilmiştir. Elde edilen karışımdaki süpernatant uzaklaştırılıp pellet 50 ml soğuk su ile çözdürüldükten sonra tekrar aynı koşullarda santrifüj yapılmıştır. Daha sonra pellet soğuk 25 ml su ile muamele edilerek aynı koşullarda santrifüj işlemi yapılmış ve bu kez pellete 20 ml 1M soğuk sorbitol ilave edilmiştir. Tekrar santrifüj işleminden sonra süpernatant uzaklaştırılarak, pellete 1 mL 1M soğuk sorbitol ilave edilip pipetaj yapıldıktan sonra ependorf tüplerine dağıtılarak elektroporasyon için kullanılır duruma getirilmiştir.

Elektroporasyon

Elektroporasyon için 80 µl komponent hücre ve yaklaşık 15 µg lineer DNA steril PCR tüpünde karıştırıldıktan sonra 0.2 cm'lik soğuk elektroporasyon küvetine alınarak 5-6 dk buz üzerinde inkübasyona bırakılmıştır. Küvet elektroporator cihazına yerleştirilip 1.5 kV'ta elektriksel akım oluşturularak elektroporasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Elektroporasyon işleminden hemen sonra hızlı bir şekilde küvet içerisine 1ml 1M soğuk sorbitol eklenip, tüm sıvı 15 ml'lik steril falkona alınmıştır. Daha sonra 30°C'de 2 saat inkübasyonun ardından 50- 200 µl alınıp 100µg/ml zeosin içeren YPDS agara ekilerek 30°C'de 2-3 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda elde edilen koloniler tek tek alınarak YPDS agara çizgi ekim yapılmıştır.

3.2.9. Rekombinant *Pichia pastoris* X-33 hücrelerinin tespit edilmesi ve kontrolü

Transformasyondan sonra zeosin içeren YPDS agarda gelişen *P. pastoris* kolonilerden DNA izolasyonu yapıp, agaroz jelde doğruluğu belirlendikten sonra istenilen geni alıp almadığını tekrar kontrol amaçlı PCR reaksiyonu kurularak kontrol edilmiştir.

Pichia pastoris Transformatlarından DNA izolasyonu ve PCR analizi

P. pastoris hücrelerinden DNA izolasyonu için; ilk olarak YPDS agarda gelişim gösteren kolonilerin 50ug/ml Zeosin içeren 3 ml YPD broth'a inokülasyonları yapılarak 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda sıvı kültürler 6000 rpm'de 5 dk santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrasında süpernatant atılarak pellet kısmına 600 µl lysis buffer eklenip, 15-20 saniye vortekslenerek iyice karıştırılmıştır. Karışımı yapılan solüsyona steril 1 adet metal bilye koyularak 5-10 dk yüksek hızda homojenizasyona tabi tutulmuştur. Homojenizasyondan sonra örnekler 12.000 rpm'de 10 dk santrifüj yapılarak süpernatant yeni bir tüpe alınmıştır. Daha sonra tüpe 2 µl RNAz eklenerek 15 dk 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda 600 µl fenol-kloroform-izomilalkol eklenerek çökelti oluşturmak amacıyla 1 dk vortekslenerek +4°C', 120000 rpm'de 10 dk santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrasında üst faz yeni tüpe alınarak eşit hacimde soğuk etanol eklenerek -80°C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda +4°C'de, 120000 rpm'de 10 dk santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrasında süpernatantı atarak, pellete 1 ml %70'lik soğuk etanol eklenerek aynı koşullarda santrifüj yapılarak 3 kere yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Son yıkama işleminden sonra kabin içerisinde yaklaşık 20 dk pelletin kuruması beklenilmiştir. Süre sonunda pellete 50 µl TE Buffer eklenerek çözündürülmüştür. İzolasyon işlemi tamamlandıktan sonra DNA'lar, kendilerine özgü primerler ile PCR reaksiyonu kurularak çoğaltılmış ve daha sonra %1'lik agaroz jelde kontrolü sağlanmıştır. Tablo 3.10'da PCR reaksiyon koşulları gösterilmiştir.

Tablo 3.10. PCR karışımı ve reaksiyon koşulları

Reaksiyon Malzemeleri	Miktarları (µl)	Reaksiyon Koşulları		
		Sıcaklık (°C)	Süre (sn)	Döngü Sayısı
2X EcoTaq Master Mix	10 µl	98 °C	25 saniye	1
3'AOX Primer	0,5 µl	94 °C	10 saniye	35
5'AOX Primer	0,5 µl	59.2 °C	20 saniye	
DNA	7,5 µl (700 ng)	72 °C	40 saniye	
DH ₂ O	1,5 µl	72 °C	1 dk	
Total Hacim	20 µl	4 °C	∞	1

3.2.10. DewA'nın rekombinant üretimi ve saflaştırılması

DewA'nın rekombinant üretimi

Organizmaya ait spesifik primerlerle yapılan PCR sonuçlarına göre organizma genomunda DewA genini taşıdığı tespit edilen koloni, rekombinant protein üretimi için hazırlanan 25 ml BMGY besiyerine inoküle edilerek 24 saat boyunca 30°C'de 150 rpm'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası çoğalan hücreler 3000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra kalan pellet gliserolün uzaklaştırılması için 3 ml BMYY besiyerinde çözdürüldükten sonra tekrar aynı koşullarda santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra tekrar süpernatant uzaklaştırılarak pellet 1 ml BMYY besiyerinde çözdürüldükten sonra, protein üretimi için hazırlanan 100 ml BMMY besiyerine transfer edilerek, 30°C'de 150 rpm'de 120 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Metanol indüksiyonunun optimizasyonu ise %0,5, %1 ve %1,5 oranlarında gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süresince her 24 saatte bir 2 ml örnek alınarak, OD₆₀₀ ölçümünden sonra santrifüjlenerek pelet ve kültür filtratı protein izolasyonu için kullanılıncaya kadar -80°C'de saklanmıştır.

Rekombinant DewA'nın saflaştırılması

Kültür filtratından rekombinant proteinlerin izolasyonu Schmoll M ve arkadaşlarının (2010) önerdiği protokole göre yapılmıştır. Bu protokole göre; proteinler metanol/kloroform ile çöktürmek için; 50 ml falkon içerisine 20 ml metanol, 5 ml kloroform, 15 ml dH₂O üzerine 5 ml kültür kültür filtratı ilave edildikten sonra iyice karıştırılıp 10000g'de 25 dk santrüfuj yapılmıştır. Süre sonunda üst faz uzaklaştırılıp kalan faz üzerine 5 ml tekrar metanol ilave edildikten sonra iyice karıştırılmıştır. Ardından 10000g'de 15 dk santrifuj yapılarak süpernatant uzaklaştırılarak, pellet steril ortamda kurutulmuştur. Kurutulan pellet üzerine 200 µl TFA (Trifloro asetik asit) eklenerek süspanse edilmiştir. Daha sonra TFA azot gazı altında uçurularak 1mg/ml 6 M Guanidin Hidroklorür'den 100 µl ilave edilerek proteinler çözündürülmüştür.

3.2.11. Rekombinant proteinler ile yapılan analizler

Proteinin konsantrasyonunun belirlenmesi

Protein konsantrasyonu, Bradford Assay yöntemi ile belirlenmiştir. Bu yöntemde ilk olarak örneklerin standart grafiğe göre belirlenmesi için gerekli olan 5x Bradford boyası hazırlanmıştır. Ardından 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 50 ml etanol ve %85'lik fosforik asit içinde çözülüp saf su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır. Daha sonra steril ortamda 0,22 µm'lik filtreden geçirilmiş ve saf su ile 1X'e seyreltilmiştir. Sığır serum albümini (BSA) ile hazırlanan standart grafiğin formülü kullanılarak protein konsantrasyonu belirlemek için 1 ml'de 2,5 mg BSA çözündürülerek, 4.8 µg/ml'ye kadar seri seyreltme yapılmıştır. BSA çözeltilerinin her birinden 10 µl olacak şekilde 96 kuyulu plakalara üçer tekrarlı koyulduktan sonra, üzerine 90 µl hazırlanan boyadan eklenmiştir. Proteinler'de aynı şekilde, 96 kuyulu plaka'ya boyayla birlikte yüklenerek 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyonun ardından 595 nm'de absorbans değerleri ölçülerek, standart grafiğe göre konsantrasyonları belirlenmiştir (Bradford 1976).

SDS-PAGE

SDS-PAGE elde edilen proteinin yüklerinden bağımsız olarak, moleküler ağırlıklarına göre ayırmak amacıyla kullanılmıştır. Bu çalışmada sigmanın önerdiği protokol kullanılmıştır. İçerik ve miktarlar Tablo 3.11’de gösterilmiştir.

Tablo 3.11. SDS-PAGE yükleme ve ayırma jel miktarları

%10’luk Ayırma Jeli		%3’lük Yükleme Jeli	
İçerik	Miktar	İçerik	Miktar
dH ₂ O	1,78 ml	dH ₂ O	2.76 ml
1.5M Tris	1,25 ml	0.5 M Tris	500 µL
%30 Akrikamid	1,67 ml	%30 Akrikamid	400 µL
%10 SDS	50 µL	%10 SDS	40 µL
%10 APS	250 µL	%10 APS	300 µL

Elektroforez cam plakaları (8x10cm) jel hazırlama aparatına yerleştirilerek, hazırlanan ayırma jeli plakalar arasına üstten 1,5 cm boşluk kalacak şekilde dökülmüştür. Jel yüzeyinin düzgün olması ve jelin hızlı bir şekilde polimerleşmesi için jelin yüzeyini kapatacak şekilde izopropanol ilave edilmiştir. Yaklaşık 30 dk sonra ayırma jelinin polimerleşmesi tamamlandıktan sonra izopropanol kurutma kâğıdı yardımı ile uzaklaştırılmış ve yükleme jeli ilave edilerek tarak yerleştirilmiştir. Yaklaşık 1 saat sonra polimerleşme gerçekleştikten sonra, plakalar elektroforez tankına yerleştirilerek tarak çıkarılıp üzerine 1x’lik Tris-Glisin-SDS yürüme tamponu ilave edilmiştir. Jele yüklenecek örnekler, 4x laemmli sample buffer (EcoTech) ile 3:1 oranında ependorf içerisinde karıştırılarak yaklaşık 95°C’de 5 dk kaynatılmıştır. Hazırlanan örneklerden kuyulara 20 µL, 180 kDa’lık protein markırdan ise 3 µL yüklenerek önce 80 V ‘de 30 dk daha sonra 120 V’da 120 dk yürütülmüştür.

Gümüş boyama

Elektroforez işlemi sonrası proteinleri görüntülemek amacıyla cam plakalar arasından çıkarılan jel, 1 saat fiksasyon solüsyonunda +4 °C’de bekletildikten sonra yaklaşık 1 saat dH₂O ile yatay çalkalayıcıda yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda dH₂O uzaklaştırılarak üzerine proteinleri denatüre etmek için sensitizer solüsyonu eklenerek 1 dk çalkalayıcıda inkübasyon yapılmıştır. Daha sonra 10 dk’dan 3 tekrarlı olacak şekilde dH₂O ile çalkalayıcıda yıkama işlemi gerçekleştirildikten sonra dH₂O uzaklaştırılarak %0,1’lik gümüş solüsyonuna alınmıştır. Gümüş partiküllerini ortamdan uzaklaştırmak için 10 dk’dan 3 tekrarlı dH₂O ile çalkalayıcıda yıkama işlemi gerçekleştirildikten sonra jel yeni tanka alınarak üzerine Developer solüsyonu ilave edilmiş ve görüntü alınana kadar beklenilmiştir. Görüntü alındıktan sonra tanktan developer solüsyonu uzaklaştırılıp jel üzerine dH₂O ilave edilerek çalkalayıcıda yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Son olarak jel üzerine %0,5 asetik asit ilave edilerek reaksiyon sonlandırılıp Bio-Rad jel görüntüleme sistemi ile fotoğrafı çekilmiştir (Lee et al. 2014).

DewA proteinin cam ve teflon yüzeylere kaplanması

Kaplama deneylerinde hidrofilik yüzey olarak cam, hidrofobik yüzey olarak ise teflon tercih edilmiştir.

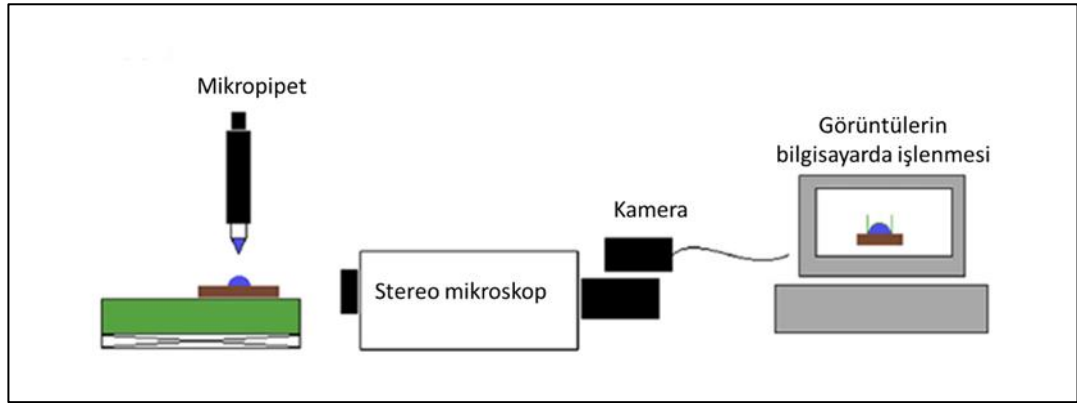
Teflon ve cam parçaları (1x1 cm) %70’lik alkolden geçirilip alev ile muamele edildikten sonra 120°C’de otoklavda steril edilerek kaplama deneylerine hazırlanmıştır. Daha sonra protein 1mg/ml olacak şekilde 6M GuHCL içinde çözündürülüp, bu solüsyondan 100 µl alınarak üzerine total hacim 1.2 ml olacak şekilde kaplama tamponu (50 mM Tris/HCl, 1 mM CaCl₂, pH 8) eklenmiştir (Schmoll et al. 2010). Kaplama yapılacak cam ve teflon parçaları well plate içerisine alınmış ve her örnek seti için ayrı ayrı kontrol grubu dahil edilerek üzerlerine 250 µl kaplama solüsyonundan koyulduktan sonra 80°C’de inkübasyona bırakılmıştır.

Kaplanmış yüzeylerin stabilite testleri

Kaplanan yüzeylerin stabiliteleri sıcak SDS ve UV uygulaması ile belirlenmiştir. SDS stabilitesi için; kaplanmış cam ve teflon yüzeyler 80°C’de 60 dk boyunca %1 SDS’e maruz kaldıktan sonra temas açıları ölçülmüş ve işlem görmemiş kontrol grubuna göre yorumlanmıştır. UV stabilitesi için ise, kaplanmış cam ve teflon yüzeyler 30, 60 ve 90 dk boyunca UV ışığına maruz bırakıldıktan sonra temas açıları ölçülmüş ve işlem görmemiş kontrol grubuna göre yorumlanmıştır.

3.2.12. Temas açısı ölçümü

Kaplama yapılan cam ve teflon yüzeylerin temas açıları (Chau et al. 2009)’un önermiş olduğu yan yatırılmış stereo mikroskop kullanılarak hazırlanan Şekil 3.4’de görülen sistemde çekilen fotoğrafların İmageJ programında Drop Snake Analysis ile değerlendirilmesi ile ölçülmüştür. Bu amaçla 2 µl’lik saf su damlaları mikropipet yardımıyla kaplanmış yüzeylerin her birine 3 adet olmak üzere damlatılmıştır. Ardından damlaların fotoğrafları çekilerek bilgisayara aktarılmış ve temas açılarını hesaplanmıştır.

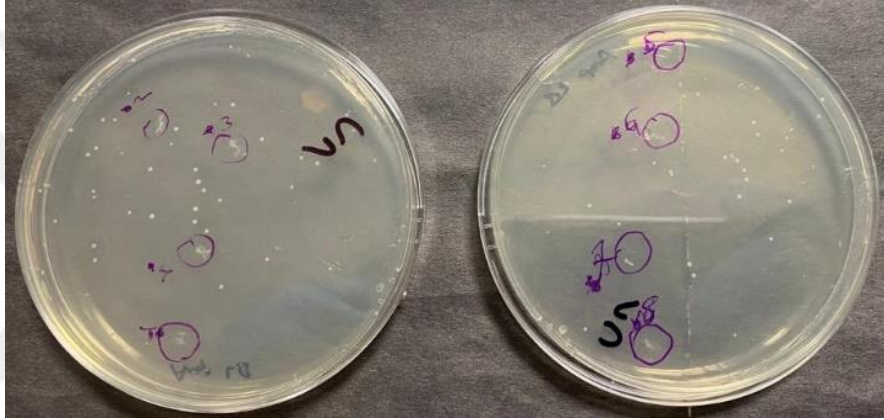


Şekil 3.4. Damlaların değme açılarını belirlemek için kullanılan modifiye edilmiş mikroskop sistemi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. pGSI-DewA Plazmitinin Transformasyonu

DewA genini içeren ve ticari olarak sentezlettirilen pGSI-DewA plazmiti ilk olarak ısı şoku metoduyla *E. coli* hücrelerine transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Transformasyon sonunda AMP antibiyotiğine direnç gösteren yaklaşık 10 koloni (Şekil 4.1’de gösterilmiştir) seçilmiş ve A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10 olarak isimlendirilmiştir.



Şekil 4.1. Transformasyon sonrası elde edilen koloniler

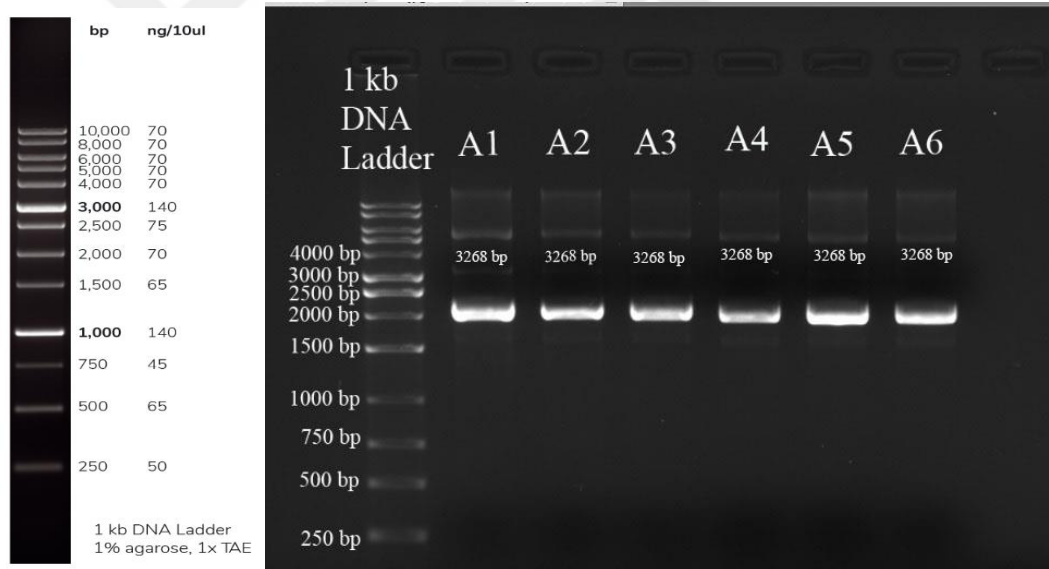
4.2. *E. coli* Hücrelerinden Plazmit DNA İzolasyonu

Bir önceki basamakta elde edilen izolatlardan rastgele 6 tanesi seçilmiş ve 100µg/ml AMP bulunduran 5 ml LB broth besi yerine inokülasyon yapılarak, 37°C’de 24 saat çalkalayıcı’da inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrası plazmitlerin izolasyonları gerçekleştirilmiş ve 62,35-91,76 ng/µl aralığında plazmit DNA elde edilmiştir (Tablo 4.1). Plazmitlerin tamamının A260/280 oranları ise 1,8 olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.1.Plazmit örneklerinin plazmit DNA miktarları

Örnek ismi	Plazmit DNA miktarı (ng/ul)	Safılık oranı (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)
A1 nolu koloni	81,86 ng/μl	1,8
A2 nolu koloni	62,35 ng/μl	1,8
A3 nolu koloni	91,76 ng/μl	1,8
A4 nolu koloni	66,27 ng/μl	1,8
A5 nolu koloni	71,96 ng/μl	1,8
A6 nolu koloni	63,73 ng/μl	1,8

Elde edilen plazmitlerin miktarları ölçüldükten sonra %1'lik agaroz jelde 90V'da 45 dakika boyunca elektroforezde yürütülmüştür (Şekil 4.2'de gösterilmiştir). pGSI plazmiti 2.857 bç, DewA geni ise 411 bç uzunluğunda olduğundan hedef bantların yaklaşık 3.268 bç olduğu tespit edilmiştir.

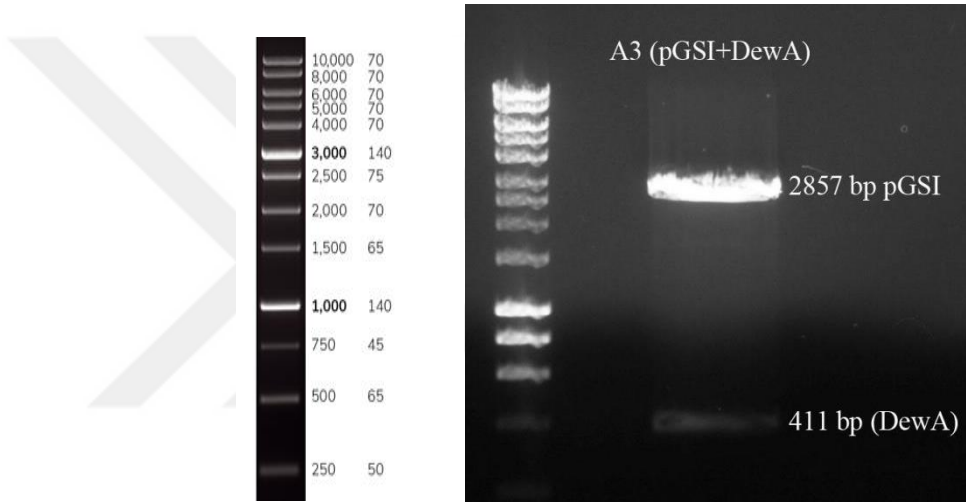
**Şekil 4.2.** Plazmitlerin %1'lik agaroz jel görüntüsü

Elde edilen sonuçlara göre 6 örneğin tamamının istenilen bölgede bant verdiği tespit edildiğinden en yüksek DNA verimine sahip A3 izolatu seçilmiş ve bir sonraki deneyde kullanılmıştır.

4.3. pGSI-DewA ve pPICZα-A Plazmit Vektörlerinin Restriksiyon Enzimleriyle Kesimi

4.3.1. pGSI-DewA plazmit vektörünün restriksiyon enzimleriyle kesimi ve jelden saflaştırılması

A3 örneği EcoRI ve XbaI fast enzimleri ile ikili kesim (Double Digestion) reaksiyonuna tabi tutulduktan sonra kesim ürünleri %1'lik agaroz jel hazırlanarak, 90V'da 45 dakika boyunca yürütülmüştür.



Şekil 4.3. A3 örneğinin restriksiyon enzimleri ile ikili kesim reaksiyonu sonucu elde edilen jel görüntüsü.

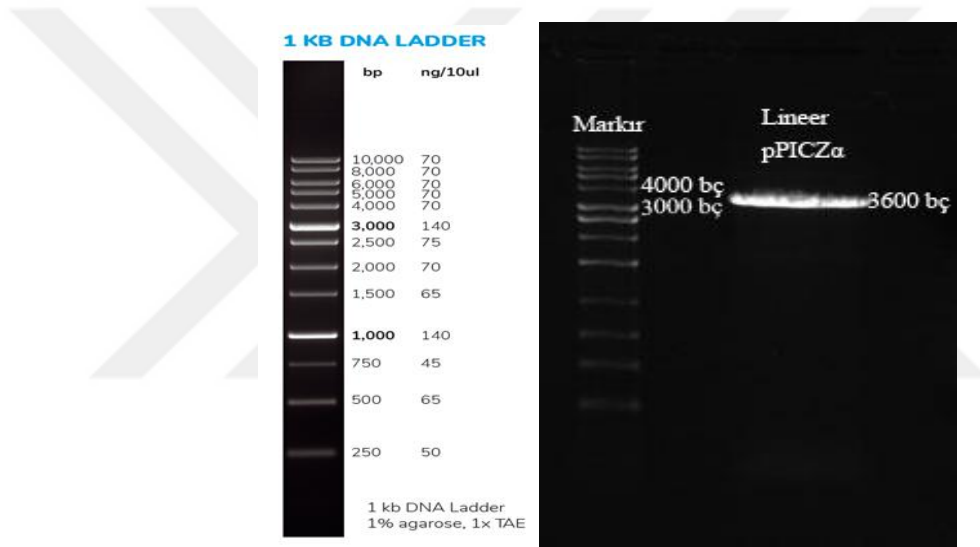
Şekil 4.3'te görülen DewA genine ait yaklaşık 411 bp bölge jelden kesilerek Ecotech Gel PCR Purification Kit ile üretici firmanın önerdiği protokole göre saflaştırılmıştır. Purifikasyon işleminden sonra DNA miktarı nanodrop cihazında ölçülmüş ve 16ng/µl miktarında DNA elde edildiği belirlenmiştir.

4.4. pPICZα-A Plazmit Vektörünün Restriksiyon Enzimleriyle Kesimi ve Saflaştırılması

pPICZα-A plazmiti içeren *E. coli* hücreleri içeriğinde 50µg/ml zeosin bulunan 5 ml low salt LB Broth besiyerine inoküle edilmiş ve 37°C'de 225 rpm'de 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ardından EcoTech Plasmid Isolation Kit ile üretici firmanın

önerdiği protokole göre izolasyonlar gerçekleştirilmiştir. Daha sonra nanodrop cihazında ölçüm yapılmış ve ölçüm sonucunda yaklaşık 1 µg/µl plazmit DNA elde edilmiştir.

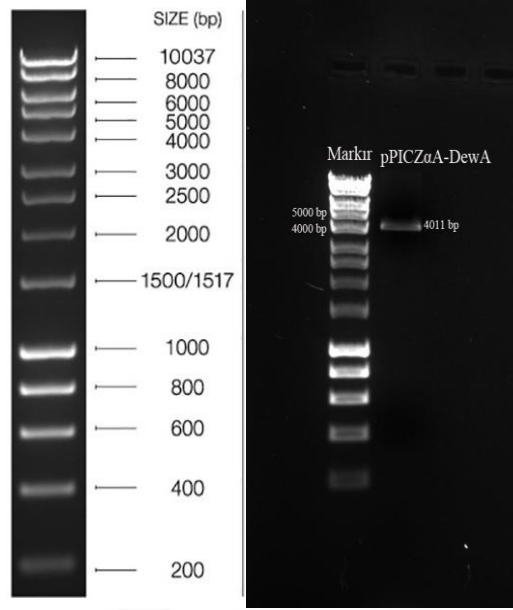
Plazmit DNA EcoRI ve XbaI fast enzimleri ile ikili kesim (Double Digestion) reaksiyonuna tabi tutulduktan sonra örnekler %1'lik agaroz jelde 90V'da 60 dk boyunca yürütülmüştür (Şekil 4.5'de gösterilmiştir). Daha sonra linear plazmit içeren kesim reaksiyonu ürünü ligasyon basamağında kullanılmak üzere EcoTech PCR Purification Kit kullanılarak üretici firmanın önerdiği pürifikasyon protokole göre saflaştırılmıştır. Saflaştırılma sonrasında DNA miktarını nanodrop cihazında ölçülmüş ve yaklaşık 120ng/µl DNA elde edilmiştir.



Şekil 4.4. pPICZα-A plazmitinin restriksiyon enzimleri ile ikili kesim reaksiyon görüntüsü.

4.5. DewA'nın pPICZα-A Vektörüne Ligasyonu

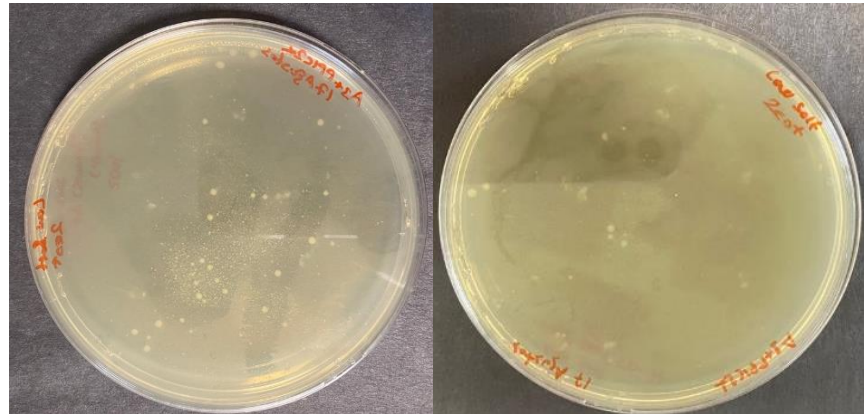
Ligasyon aşamasında restriksiyon enzimleriyle ayrı ayrı kesilen pPICZα-A ve DewA geni T₄ ligaz enzimiyle reaksiyona tabi tutulmuş ve reaksiyon karışımından 2 µl alınarak %1'lik agaroz jelde yürütülerek doğrulanmıştır (Şekil 4.6). Ligasyon reaksiyonu sonucunda pPICZα-A-DewA plazmiti başarıyla elde edilmiştir.



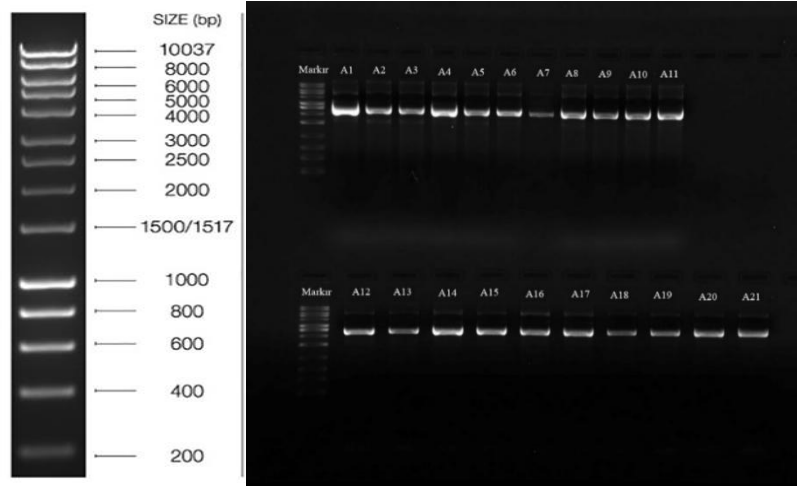
Şekil 4.5. Ligasyon ürününün %1'lik agaroz jelde görüntüsü.

4.6. pPICZα-A-DewA Plazmitinin *E. coli* Hücrelerine Transformasyonu ve Plazmit İzolasyonu

Bir önceki ligasyon basamağında elde edilen pPICZα-A-DewA plazmitinin elektroporasyon öncesi yüksek miktarda üretilmesi için öncelikle kompetent *E. coli* hücrelerine ısı şoku uygulaması ile transformasyonu sağlanmıştır. Transformasyon sonucunda zeosin antibiyotiğine direnç gösteren koloniler (Şekil 4.7'da gösterilmiştir) A1-A21 olarak isimlendirilmiş ve bu kolonilerden plazmit izolasyonları gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.8'de gösterilmiştir). Daha sonra her plazmitin DNA miktarları nanodrop cihazında ölçüldü elde edilen miktarlar Tablo 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.6. İçeriğinde pPICZα-A-DewA bulunduran *E. coli* hücrelerinin transformasyonu sonucu elde edilen koloniler.



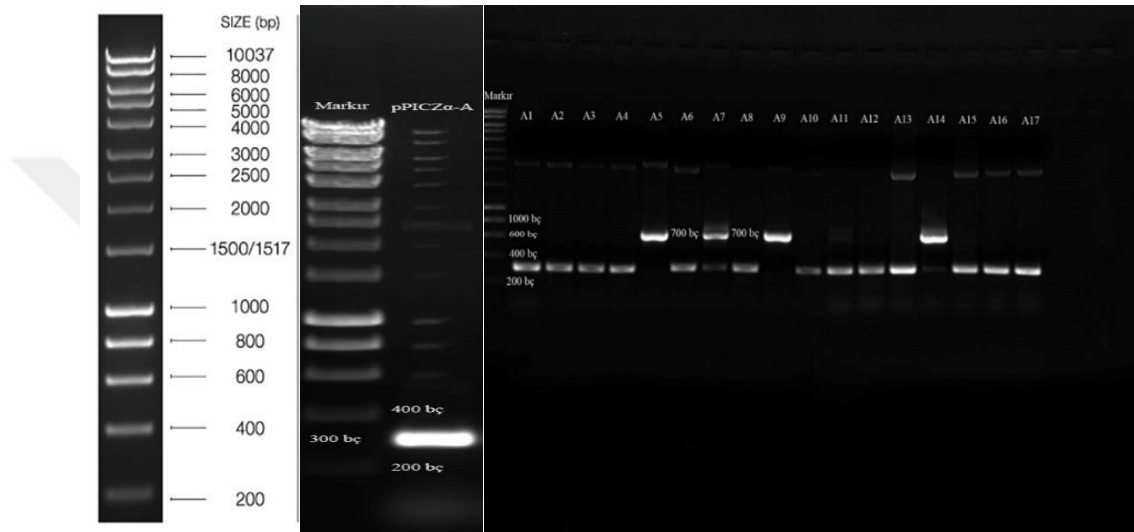
Şekil 4.7. Transformasyon sonucunda elde edilen plazmitlerin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü.

Tablo 4.2. Elde edilen 21 plazmitin nanodrop cihazında ölçülen DNA miktarları (ng/µl) ve Safılık oranları (A₂₆₀/A₂₈₀).

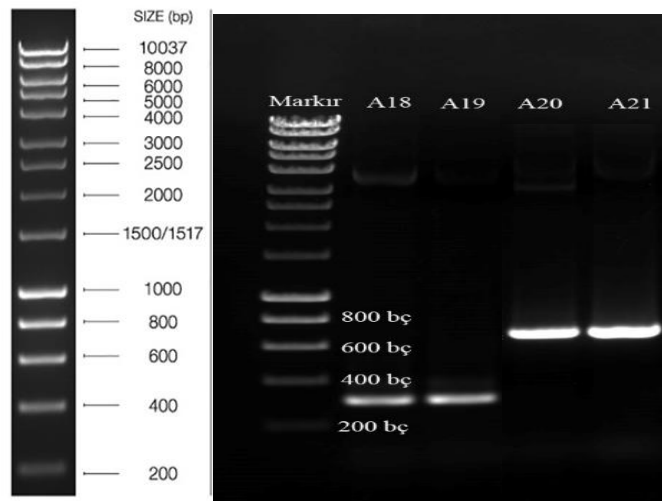
Örnekler	Plazmit DNA miktarları	Safılık oranları (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)
A1	173 ng/ µl	1.8
A2	182 ng/ µl	1.8
A3	127 ng/ µl	1.8
A4	154 ng/ µl	1.8
A5	254 ng/ µl	1.8
A6	218 ng/ µl	1.8
A7	179 ng/ µl	1.8
A8	152 ng/ µl	1.9
A9	1480 ng/ µl	2.01
A10	34 ng/ µl	1.8
A11	51 ng/ µl	1.8
A12	68 ng/ µl	1.9
A13	480 ng/ µl	2.01
A14	340 ng/ µl	1.8
A15	1350 ng/ µl	1.9
A16	1207 ng/ µl	1.9
A17	1182 ng/ µl	1.9
A18	1193 ng/ µl	1.9
A19	1382 ng/ µl	1.8
A20	862 ng/ µl	1.8
A21	476 ng/ µl	1.8

4.7. pPICZ α -A-DewA Vektörünün PCR ile Kontrolü ve Dizi Doğrulaması

3'AOX ve α -signal primerleri ile gerçekleştirilen PCR sonucunda, hedef gen bölgesini içermeyen pPICZ α -A vektörü kullanılan markıra göre yaklaşık 300 bç boyutunda PCR ürünü verirken; pPICZ α -A-DewA içeren kolonilere (A5, A9, A20 ve A21) ait PCR ürünleri ise beklenildiği üzere 700 bç uzunluğunda bant vermiştir (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10).



Şekil 4.8. pPICZ α A-DewA plazmit DNA'larından transformasyon kontrolü. Marker, DewA gen bölgesini içermeyen pPICZ α -A, A1-A17: low salt LB agardan seçilen koloniler.



Şekil 4.9. A18-A21: low salt LB agardan seçilen koloniler

Agaroz jel elektroforezinde pozitif sonuç veren A5, A9, A20 ve A21 nolu koloniler dizi doğrulaması için sekans analizine gönderilmiştir. PCR ürünlerinin dizi analiz neticesinde, sekansı belirlenen dizilerin hedef gen bölgelerinin kodon optimizasyonuna göre uyarlanan diziler ile aynı olduğu tespit edilmiştir. pPICZ α -DewA plazmit DNA'sına ait 4 örnekten (A5,A9,A20 ve A21) saflığı ve miktarı en yüksek olan A21 örneğinin 3'AOX ve 5'AOX primerleriyle gerçekleştirilen sekans analizi ile elde edilen nükleotid dizisinin blast sonucu şekil 4.11'de gösterilmiştir.

[Download](#) [Graphics](#)

Sequence ID: **Query_37207** Length: **419** Number of Matches: **1**

Range 1: 2 to 418 [Graphics](#)
[Next Match](#) [Previous Match](#)

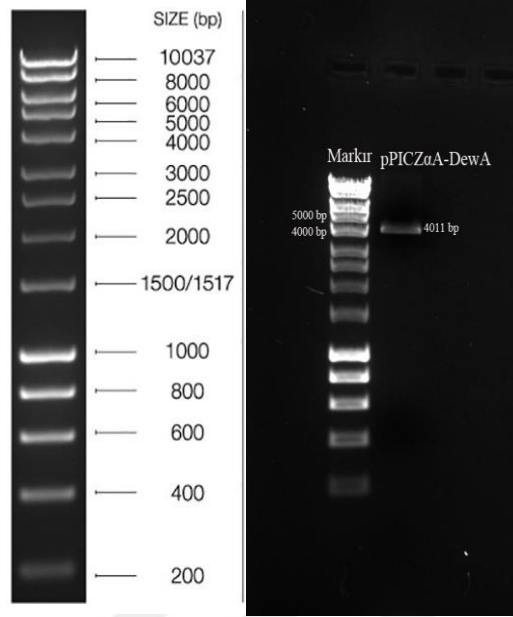
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
771 bits(417)	0.0	417/417(100%)	0/417(0%)	Plus/Plus
Query 830	GAATTCATGAGATTTATTGTTCTTTATTG	gcttttactgctgctgctactgctactgct	889	
Sbjct 2	GAATTCATGAGATTTATTGTTCTTTATTGGCTTTTACTGCTGCTGCTACTGCTACTGCT		61	
Query 890	ttgctgtccttctgctgctaaaaatgctaaattggctacttctgctgcttttgcctaaacAA		949	
Sbjct 62	TTGCCCTGC TCTGCTGCTAAAAATGCTAAATTGGCTACTTCTGCTGCTTTTGCTAAACAA		121	
Query 950	GCTGAAGGTACTACGTGTAATGTTGGTTCTATTGCTTGTGTGAATTCCTCGCTGAAACT		1009	
Sbjct 122	GCTGAAGGTACTACGTGTAATGTTGGTTCTATTGCTTGTGTGAATTCCTCGCTGAAACT		181	
Query 1010	AATAATGATTCCTTGTGTGCTGGTTTGTGGGTGCTGGTTTGTGGAATGGTTTGTCTGGT		1069	
Sbjct 182	AATAATGATTCCTTGTGTGCTGGTTTGTGGGTGCTGGTTTGTGGAATGGTTTGTCTGGT		241	
Query 1070	AATACTGGTTCTGCTTGTGCTAAAGCTTCTTTGATTGATCAATTGGGTTTGTCTAGCTTTG		1129	
Sbjct 242	AATACTGGTTCTGCTTGTGCTAAAGCTTCTTTGATTGATCAATTGGGTTTGTCTAGCTTTG		301	
Query 1130	GTTGATCATACTGAAGAAGGTCCTGTTTGTAAAAATATTGTTGCTTGTGTGCTGCTGAAGGT		1189	
Sbjct 302	GTTGATCATACTGAAGAAGGTCCTGTTTGTAAAAATATTGTTGCTTGTGTGCTGCTGAAGGT		361	
Query 1190	ACTACTAATTGTGTTGCTGTTGATAATGCTGGTGCTGGTACTAAAGCTGAATCTAGA		1246	
Sbjct 362	ACTACTAATTGTGTTGCTGTTGATAATGCTGGTGCTGGTACTAAAGCTGAATCTAGA		418	

Şekil 4.10. Sekans analizi ile elde edilen nükleotid dizisinin DewA geni ile karşılaştırılması.

4.8. pPICZ α -A-DewA Vektörünün *Pichia Pastoris* X-33 Hücrelerine Transformasyonu

4.8.1. pPICZαA-DewA vektörünün lineer hale getirilmesi

Pichia pastoris X-33 hücrelerinin transformasyonu için saf olarak elde edilen rekombinant vektör (pPICZ α -A-DewA), SacI enzimi ile lineer hale getirilmiştir. Kesim ürünlerinden 2 μ l agaroz jelde yürütülmüştür. Görüntüleme sonucu beklendiği gibi yaklaşık 4kb karşılığında tek bant elde edilmiş ve rekombinant vektörün kesimi doğrulanmıştır (Şekil 4.12).



Şekil 4.11. Lineer rekombinant vektörün agaroz jel elektroforez görüntüsü

Lineer hale getirildiği doğrulanan vektöre ait 10 kesim reaksiyonu ürünü birleştirilerek fenol-kloroform yöntemi ile saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonucunda 601 ng/µl 1.8 saflığında vektör DNA'sı elde edilmiştir.

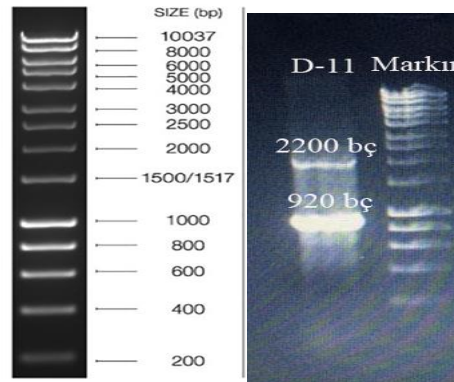
4.8.2. Elektroporasyon, transformantların seçilimi ve PCR ile kontrolü

Elektroporasyon ile gerçekleştirilen transformasyon sonrası 100mg/ml Zeosin içeren YPDS agar plaklarda gelişen maya transformantlarından seçilen yaklaşık 85 koloninin (Şekil 4.13'de gösterilmiştir) her biri ayrı ayrı 100 mg/ml Zeosin içeren YPDS broth besiyerine alınarak 30°C'de 250 rpm'de 48 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda sıvı besiyerinde büyüyen kolonilerden fenol-kloroform yöntemi ile genomik DNA izolasyonu yapıldıktan sonra spesifik primerler ile Tablo 3.8'da gösterilen koşullar altında PCR reaksiyonu kurulmuştur.

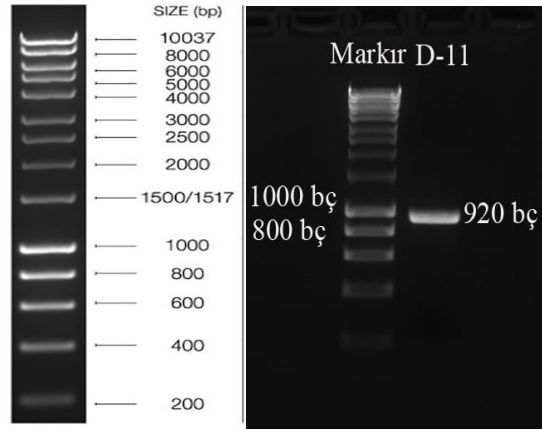


Şekil 4.12. Elektroporasyon sonrasında YPDS agar plakta gelişen koloniler

Reaksiyon sonrasında PCR ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve görüntülenmiştir (Şekil 4.14'de gösterilmiştir). Bu aşamada yaklaşık 900 bç boyutunda DewA genini içeren bant ve 2200 bç boyutlarında *P. pastoris* genomunda bulunan AOX bölgesinin çoğaltıldığı kontrol bandının görülmesi beklenmektedir. Şekil 4.14 incelendiğinde tek bir örnekte (D11 örneği) her iki bandında bulunduğu belirlenmiş ve D11 örneğinde DewA geninin aktarıldığı doğrulanmıştır. Ardından dizi doğrulaması için hedef bant bistüri yardımıyla jelden kesilerek Ecotech Gel Purification Kit ile üretici firmanın önerdiği protokole göre saflaştırılmıştır. Saflaştırma işleminden sonra aynı koşullarda tekrar %1'lik agaroz jelde yürütülerek bu işlem doğrulanmıştır (Şekil 4.15). Saflaştırma işleminden sonra DNA miktarı nanodrop cihazında ölçülmüş ve 44 ng/µl miktarında DNA elde edildiği belirlenmiştir.



Şekil 4.13. Pozitif örneğin AOX primerleriyle gerçekleştirilen PCR sonucu



Şekil 4.14. Jel ekstraksiyon sonrasında pozitif örneğin %1’lik agaroz jeldeki görüntüsü

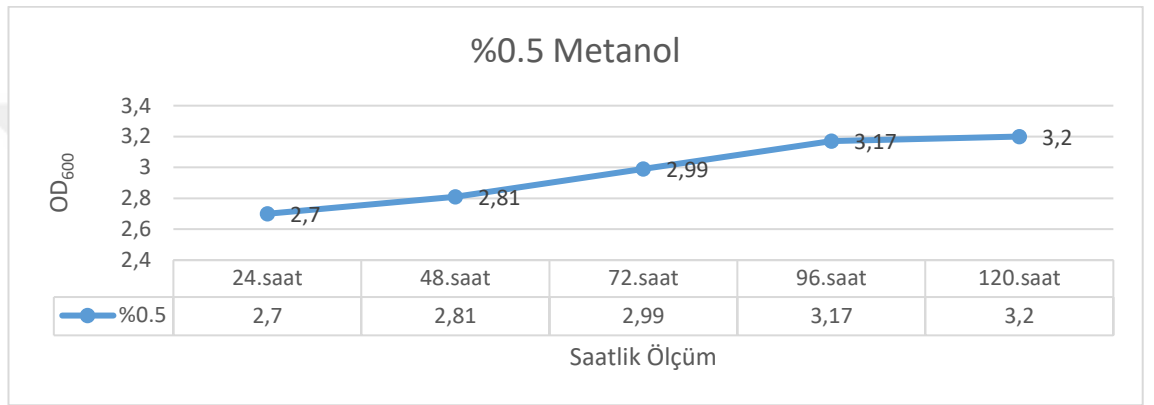
Daha sonra jelden saflaştırılan DNA her iki AOX primeri ile okutulmak üzere sekans analizine gönderilmiştir. Elde edilen okumalar birleştirilerek tek bir sekans haline getirilmiş ve kodon optimize dizi ile karşılaştırılarak mutasyon olup olmadığı belirlenmiştir. Şekil 4.16 incelendiğinde *P. pastoris*’e entegre edilen DewA geninde herhangi bir mutasyon olmadığı anlaşılmaktadır. Sonuçta elektroporasyon sonrası elde edilen toplam 85 koloniden yalnızca D11 kodlu izolatin DewA genini içerdiği tespit edilmiş ve üretim çalışmaları bu izolatla gerçekleştirilmiştir.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
774 bits(419)	0.0	419/419(100%)	0/419(0%)	Plus/Plus
Query 915	GGAATTCATGAGATTATTGTTTCTTTATTG	gcttttactgctgctgctactgctactgc		974
Sbjct 1	GGAATTCATGAGATTATTGTTTCTTTATTGGCTTTTACTGCTGCTGCTACTGCTACTGC			60
Query 975	tttgctgcttctgctgctaaaaatgctaaattggctacttctgctgcttttgctaaaCA			1034
Sbjct 61	TTTGCCTGCTTCTGCTGCTAAAAATGCTAAATTGGCTACTTCTGCTGCTTTTGCTAAACA			120
Query 1035	AGCTGAAGGTACTACGTGTAATGTTGGTTCTATTGCTTGTGTAATTCTCCTGCTGAAAC			1094
Sbjct 121	AGCTGAAGGTACTACGTGTAATGTTGGTTCTATTGCTTGTGTAATTCTCCTGCTGAAAC			180
Query 1095	TAATAATGATTCTTTGTTGTCTGGTTTGTGGGTGCTGGTTTGTGAATGGTTTGTCTGG			1154
Sbjct 181	TAATAATGATTCTTTGTTGTCTGGTTTGTGGGTGCTGGTTTGTGAATGGTTTGTCTGG			240
Query 1155	TAATACTGGTTCTGCTTGTGCTAAAGCTTCTTTGATTGATCAATTGGGTTTGCTAGCTTT			1214
Sbjct 241	TAATACTGGTTCTGCTTGTGCTAAAGCTTCTTTGATTGATCAATTGGGTTTGCTAGCTTT			300
Query 1215	GGTTGATCATACTGAAGAAGGTCTGTTTGTA AAAAATATTGTTGCTTGTGTCCTGAAGG			1274
Sbjct 301	GGTTGATCATACTGAAGAAGGTCTGTTTGTA AAAAATATTGTTGCTTGTGTCCTGAAGG			360
Query 1275	TACTACTAATTGTGTTGCTGTTGATAATGCTGGTGGTACTAAAGCTGAATCTAGAG			1333
Sbjct 361	TACTACTAATTGTGTTGCTGTTGATAATGCTGGTGGTACTAAAGCTGAATCTAGAG			419

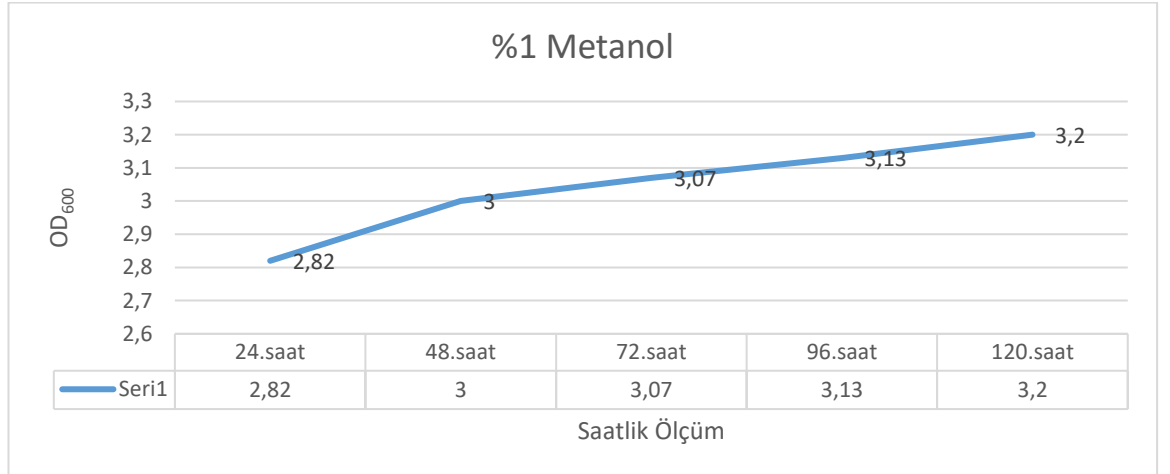
Şekil 4.15. Sekans analizi ile elde edilen nükleotid dizisinin DewA geni ile karşılaştırılması.

4.9. DewA'nın Rekombinant Üretimi ve Saflaştırılması

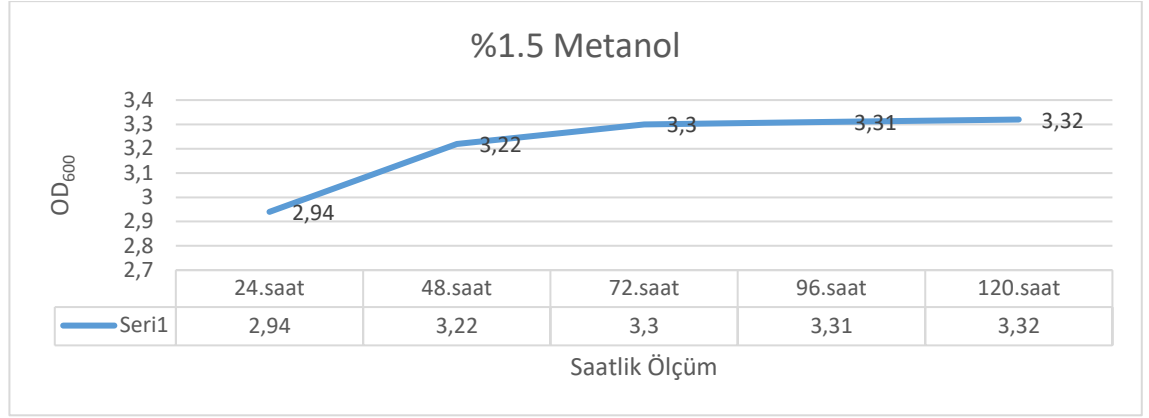
D11 izolatı ile BMYE besiyerinde çalkamalı kültürde yapılan çalışmalarda %0,5, %1 ve %1,5 olmak üzere 3 farklı metanol konsantrasyonunda indükleme yapılarak DewA proteininin üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretim sırasında 120. Saate kadar her 24 saatte bir örnek alınarak OD₆₀₀ değeri ölçülmüş ve protein izolasyonları yapılarak üretim miktarları belirlenmiştir. Çalkamalı kültürde farklı metanol indüklemelerinde elde edilen OD₆₀₀ değerleri şekil 4.17, 4.18 ve 4.19'de gösterilmiştir.



Şekil 4.16. Çalkamalı kültürde belirlenen saatlerde verilen %0.5 saf metanol sonrası OD₆₀₀ değerleri.



Şekil 4.17. Çalkamalı kültürde belirlenen saatlerde verilen %1 saf metanol sonrası OD₆₀₀ değerleri.

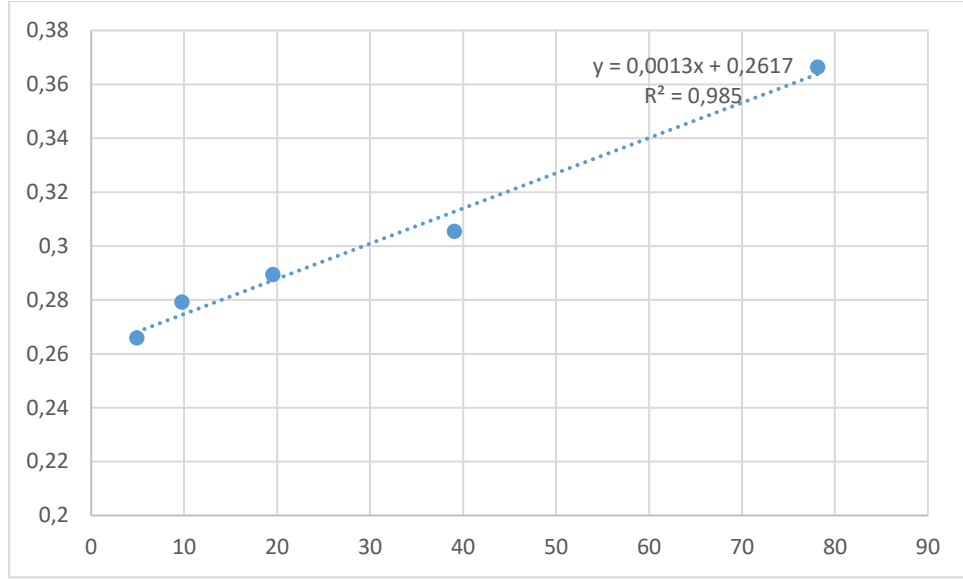


Şekil 4.18. Çalkamalı kültürde belirlenen saatlerde verilen %1,5 saf metanol sonrası OD₆₀₀ değerleri.

Şekil; 4.17, 4.18 ve 4.19 incelendiğinde %0,5'lik metanol indüklemesinde 96. saatten itibaren; %1,5'luk metanol indüklemesinde ise 72. saatten itibaren hücre büyümesinin stabil hale geldiği anlaşılmaktadır. Ancak %1'lik metanol indüklemesinde ise 120. saate doğru sürekli bir artış görülmektedir. 3 farklı metanol indüklemesine ait hücre büyümeleri kendi aralarında karşılaştırıldığında OD₆₀₀ değerlerinde %0,5 ve %1'lik metanol konsantrasyonları arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir ($p < 0.05$).

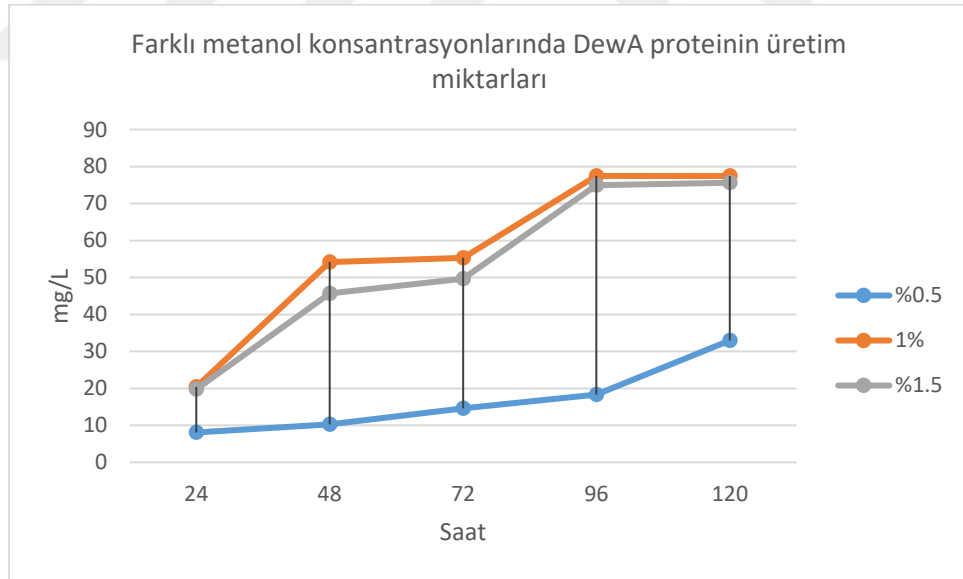
4.9.1. Rekombinant olarak elde edilen proteinin bradford ile miktarlarının belirlenmesi

Protein konsantrasyonu, Bradford Assay yöntemi ile belirlenmiştir. Sığır serum albümini (BSA) ile hazırlanan standart grafik ($R^2 = 0,985$) Şekil 4.20' de verilmiştir.



Şekil 4.19. BSA ile hazırlanan standart grafik

Protein üretimi sırasında 120. Saate kadar her 24 saatte bir örnek alınmış ve bu örneklerden protein izolasyonları yapılarak hazırlanan standart grafiğe göre protein miktarları mg/L cinsinden Şekil 4.21’de verilmiştir.

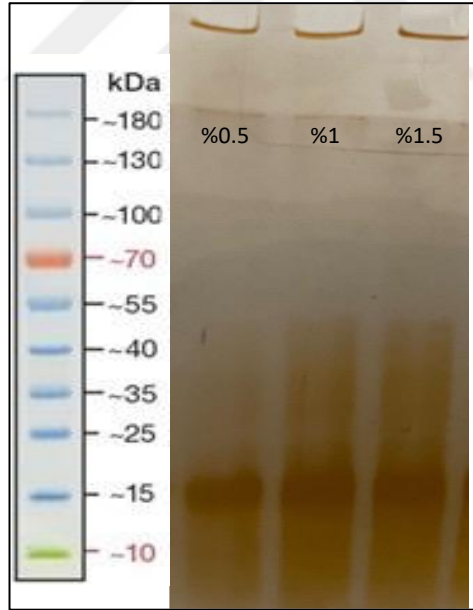


Şekil 4.20. Farklı metanol konsantrasyonlarında üretilen protein miktarları (mg/L)

Şekil 4.21 incelendiğinde %0,5’lik metanol konsantrasyonunda protein üretimi 24. Saatten başlayarak 120. saate kadar artış göstermiştir. Ancak %1 ve %1,5’luk metanol konsantrasyonlarında üretim 96. saatte maksimuma ulaşmış olarak görülmektedir. Ayrıca %0,5’lik metanol konsantrasyonunda protein üretimi, %1 ve %1,5’lik metanol

konsantrasyonlarına göre yaklaşık iki kat daha düşüktür. %1 ve %1,5'lik metanol konsantrasyonları kendi aralarında değerlendirildiğinde özellikle 96. ve 120. saatlerdeki protein üretimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). En yüksek üretim verimine %1'lik metanol konsantrasyonunda 96. saatlik inkübasyon süresinde ulaşılmıştır (77,42mg/L). Bu nedenle %2 veya daha fazla metanol konsantrasyonları denemeye alınmamıştır.

Proteinlerin SDS-PAGE jelde görüntülenmesi için 3 farklı metanol konsantrasyonuna ait 96. saatlerde elde edilen proteinler kullanılmıştır. Yürütme işleminden sonra jel gümüş boyama işlemine tabi tutularak görüntülenmiştir. Burada DewA proteini yaklaşık 13 kDa olup, pPICZa vektöründen gelen c-myc epitop bölgesi ve His-Taq ise bu proteine 2.5 kDa ekleme yapmıştır. Dolayısıyla rekombinant DewA proteininin jelde yaklaşık 15 kDa'lık markıra denk gelen bölgede bant vermesi beklenilmektedir. Şekil 4.22 incelendiğinde elde edilen bandın hedeflenen boyutta olduğu görülmektedir.



Şekil 4.21. Üç farklı metanol konsantrasyonunun 96 saat inkübasyonu sonunda elde edilen protein bantları.

Şekil 4.22.'de görülen bantların Şekil 4.21 de verilen protein miktarları ile uyumlu olduğu anlaşılmıştır. %0,5 metanol konsantrasyonunun (18,30mg/L), %1 (77,42mg/L) ve

%1,5 (74,96 mg/L) metanol konsantrasyonlarından elde edilen protein miktarlarına göre oldukça düşük bant yoğunluğuna sahip olduğu net bir şekilde görülmektedir.

Bu tez çalışmasında en yüksek DewA proteini üretimi 96. saatte %1'lik metanol konsantrasyonunda elde edilmiştir. *P. pastoris* ile gerçekleştirilen başka bir çalışmada, *Trichoderma reesei*'den HFBI hidrofobini pPICZαA vektöründe AOX1 promotörünün kontrolü altında %0,5 metanol konsantrasyonunda 90. saatte 300mg/L'de hidrofobin üretilmiştir (Nejad et al. 2015). Ancak bu protein Sınıf 2 hidrofobinlere dahildir. DewA gibi sınıf 1 hidrofobin olan başka bir protein ise RodA ve RodB olup; yine *P. pastoris*'te AOX promotörü altında üretilmiş ve sonuçta %0,5 metanol konsantrasyonunda 120. saatte sırasıyla 21mg/L ve 24mg/L miktarlarında üretilmiştir (Pedersen et al. 2011).

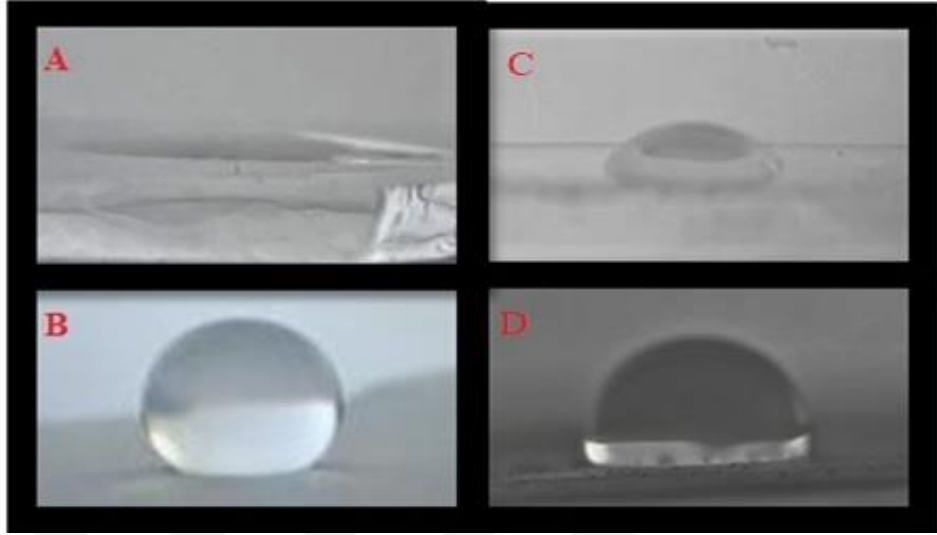
4.10.2. DewA proteinin cam ve teflon yüzeylere kaplanması ve temas açılarının belirlenmesi

Kaplama deneylerinde hidrofilik yüzey olarak cam, hidrofobik yüzey olarak ise teflon tercih edilmiştir. Her bir kaplama deneyinde 1x1 cm boyutlarındaki cam ve teflonlar için 100 µg DewA proteini kullanılmıştır. Su temas açısı (θ_0), suyun katı ile temasta bulunduğu noktada kolayca ölçülebilen ve yüzeyin hidrofobisitesi hakkında yararlı bilgiler sunan bir değerdir. Temas açısı 10° 'den daha küçük olan yüzeyler süperhidrofilik ve 150° 'den yüksek olan yüzeyler ise süperhidrofobik olarak adlandırılır (Starov et al. 2010).



Şekil 4.22. 16 saat inkübasyon süresi sonunda kontrol grubunda ölçülen temas açıları a) cam yüzey b) teflon yüzey.

Hidrofilik olarak tercih edilen cam yüzeyin protein uygulaması yapılmadan sadece tampon çözelti ile 16 saat muamelesi sonucunda ölçülen temas açısı cam yüzeyde $6,174 \pm 1,25^\circ$ iken; teflon yüzeyde ise bu açı $132,878 \pm 8,55^\circ$ olarak belirlenmiştir (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. Protein kaplanmamış cam (a) ve teflon (b) yüzeylerin kontrolleri ile protein kaplı cam (c) ve teflon (d) karşılaştırılması.

Temas açıları ölçümü sonucunda cam yüzeylerde $6,174^\circ$ olarak belirlenen açı, 100 μg DewA proteini kaplaması sonucunda $70,125 \pm 5,18^\circ$ 'ye ulaşmıştır (Şekil 4.24). Diğer taraftan $132,878^\circ$ olarak belirlenen teflon yüzey açısı ise $114,814 \pm 7,25^\circ$ 'ye düşmüştür. Beklenildiği üzere DewA proteini hidrofilik bir yüzeyi görece hidrofobikleştirmiş; hidrofobik bir yüzeyi ise hidrofilik hale getirmiştir.

Ayrıca rekombinant olarak üretilen proteinin dayanıklılığını ve yüzeylerde kalıcılığını belirlemek amacıyla kaplanmış yüzeylere ait stabilite testleri gerçekleştirilmiştir. Sıcak SDS uygulaması yapılan deney gruplarında cam yüzeylerde uygulama öncesi temas açısı $70,125^\circ$ iken; 60 dk'lık uygulama sonucunda $69,250 \pm 6,35^\circ$ olarak belirlenmiştir. Teflon yüzeylerde ise uygulama öncesi $114,814^\circ$ iken; uygulama sonrası $123,388 \pm 10,72^\circ$ olarak ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre SDS uygulaması ile cam yüzeye kaplı proteinlerin miktarında ve konformasyonunda herhangi bir değişiklik belirlenmemiştir. Bu duruma zıt olarak teflon yüzeyde ölçülen temas açısı ise artış göstermiştir. Rekombinant olarak üretilen DewA proteini sınıf I protein olup, SDS gibi yüzey aktif maddeler içere çözeltilerde çözünmemektedir. Bu nedenle cam yüzeylerden elde edilen sonuçlara göre temas açısının değişmemesi şaşırtıcı değildir.

Teflon yüzeylerde meydana gelen açı değişikliği ise SDS uygulaması sonucunda amfipatik karakterde olan DewA proteininin hidrofobik bölgesinin yüzeye tutunma davranışlarında değişikliğe yol açması ile yorumlanabilir. Nitekim Schmoll M ve arkadaşları (2010) tarafından yapılan bir çalışmada da DewA proteininin kaplama deneylerinden benzer sonuçlar elde edilmiş ancak araştırmacılar bu durumu yorumsuz bırakmışlardır. Söz konusu çalışmada 80 °C'de 16 saat inkübasyondan sonra cam yüzey için, %1 SDS uygulamadan önce temas açısı $72,9 \pm 9,48^\circ$ iken, uygulamasından sonra temas açısı $70,3 \pm 4,03^\circ$ olarak belirlenmiş; teflon yüzey için ise %1 SDS uygulamadan önce temas açısı $50,8 \pm 4,81^\circ$ iken, %1 SDS uygulamasından sonra temas açısı $79,2 \pm 13,2^\circ$ olarak belirlenmiştir.

Hidrofobinlerin yüzeylere adezyonu ve kalıcılığının, proteinin boyutu, yapısal stabilitesi, sıcaklık, iyonik güç ve tampon bileşimi ile değişiklik göstereceği bilinmektedir. Ayrıca küçük ve rijit yapıdaki proteinler, yüzey adsorpsiyonundan sonra konformasyonel değişim göstermeye yapılarındaki disülfüt bağları nedeniyle yatkın olmadığından yüzey uygulamalarında tercih sebebidirler (Rabe et al. 2011; Linder et al. 2005). Bu çalışmada SDS uygulamasında özellikle cam yüzeylerde DewA proteininin göstermiş olduğu yüksek stabilite, muhtemelen içerdiği disülfüt bağlarından kaynaklanmaktadır.

Kaplanan yüzeylerin UV stabilitesi ise 30, 60 ve 90 dk boyunca UV ışığına maruz bırakıldıktan sonra temas açıları ölçülmüş ve işlem görmemiş kontrol grubuna göre yorumlanmıştır. Cam yüzeylerde uygulama öncesi temas açısı $70,125^\circ$ iken; 30 dk'lık UV uygulaması sonucunda $7,25 \pm 1,5^\circ$ olarak belirlenmiştir. Elde edilen temas açısı ile cam yüzeyin protein kaplanmadan önceki temas açıları arasında istatistiki ($p < 0.05$) olarak fark yoktur. Bu sonuç UV uygulaması ile cam yüzeye kaplanan proteinlerin 30 dk içerisinde tamamen degrede olduğunu göstermektedir. 60 dk ve 90 dk'lık UV uygulamaları bu nedenle gerçekleştirilmemiştir.

Teflon yüzeylerde ise uygulama öncesi $114,814^\circ$ iken; 30, 60 ve 90 dk UV uygulaması sonrasında temas açısı $120,704 \pm 11,15^\circ$ olarak ölçülmüştür. Farklı sürelerdeki UV uygulamaları ile kontrol temas açıları arasındaki farklar istatistiki ($p < 0,05$) olarak

önemsiz bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre ilginç bir şekilde teflon yüzeylerde UV uygulaması ile protein degrede olmamıő ve aktivitesini korumuőtur.

Proteinlerdeki, triptofan ve tirozin yan zincirlerinin UV uyarımı ile disülfid köprülerinin yapsına zarar veridėi bilinmektedir (Neves-Petersen et al 2002, 2009). Bu çalışmada özellikle cam yüzeylerde 30 dk ve sonrasında meydana gelen DewA degradasyonu proteinin rijit yapısını oluőturan disülfid bağlarının UV maruziyeti altında zarar görmesi ile açıklanabilir



5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Hidrofobinler, yüzeylere adeze olarak, özelliklerini değiştirebilme özelliklerinden dolayı biyoteknolojide ve birçok pratik uygulamada büyük potansiyele sahiptir. Son yıllarda, hidrofobinlerin biyoteknolojik uygulamalarında belirgin bir artış olmakla birlikte endüstriyel boyutlarda üretimi verim problemlerinden dolayı hala başarılımsız değildir (Hektor and Scholtmeijer 2005). Bu nedenle hidrofobinlerin rekombinant üretimi üzerine daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (Wösten and Scholtmeijer 2015). Literatürde hidrofobinlerin rekombinant üretiminde prokaryotik ve ökaryotik olmak üzere birçok konakçı kullanılmış; hidrofobin genleri farklı promotörler altında eksprese edilmiştir.

Bu çalışmada amiloid yapıdaki proteinlere benzer, rodlet yapısı olarak adlandırılan fibriller oluşturmaları ve yoğun şekilde β -tabaka yapısı içerdiğinden dolayı proteazlara karşı oldukça dirençli (Paris et al. 2003; Wang et al. 2010) olması dolayısıyla sınıf I hidrofobin grubuna dahil olan DewA proteini seçilmiştir. Konak organizma olarak ise çok sayıda disülfüt bağına sahip proteinlerin ifadesinde yaygın olarak kullanılan (Demain and Vaishnav 2009) *P. pastoris* X-33 mayası tercih edilmiştir. DewA geni, literatürde DewA proteini üretiminde daha önce kullanılmamış olması ve AOX2 promotörüne göre 10-20 kat daha fazla verimliliğe sahip olması nedeniyle AOX1 promotörünün altına yerleştirilmiştir. Sonuçta *Aspergillus nidulans*'a ait sınıf 1 hidrofobin olan DewA proteini pPICZ α -A vektörüne aktararak AOX1 promotörü altında *P. pastoris* X-33 suşu kullanılarak rekombinant olarak üretilmiştir. En yüksek verim 96. saatte 77 mg/L olarak %1'lik metanol konsantrasyonunda elde edilmiştir. Elde edilen rekombinant proteinin moleküler ağırlığı yaklaşık 15 kDa olarak bulunmuş ve kültür filtratından kısmi olarak saflaştırıldıktan sonra hidrofilik karakterde cam ve hidrofofik karakterde teflon yüzeylere kaplama için kullanılmıştır. DewA proteinin cam yüzeye kaplanması sonucunda yüzeyin karakteristiğini değiştirerek hidrofofik hale getirdiği; teflon yüzeylerde ise yine yüzey karakteristiğini değiştirerek hidrofilik hale getirdiği kanıtlanmıştır. Ardından bu yüzeylere sıcak SDS ve UV uygulaması yapılarak proteinin yüzey stabilitesi değerlendirilmiştir. Sonuçta yüzeye kaplanmış olan DewA proteininin hem cam hem de teflon yüzeylerde sıcak SDS uygulamasına dirençli olduğu; UV uygulamasında ise cam yüzeylerde UV maruziyeti ile protein degrade olurken, teflon

yüzeylerde yapısını koruduğu anlaşılmıştır. Tez çalışması ile *A. nidulans*'a ait DewA proteini, pPICZ α -A vektörüne klonlanarak, *P. pastoris* X-33 suşunda AOX promotörü kontrolünde ilk kez rekombinant olarak üretilmiştir. Bu çalışmada elde edilen verilere dayanarak aşağıda bazı öneriler sunulmuştur;

1. DewA proteininin cam ve teflon yüzeylerde göstermiş olduğu farklı yüzey karakteristiklerinin nedenleri araştırılmalıdır.
2. Erlen skalasında gerçekleştirilerek optimize edilen üretim prosesi, fermentör skalasına taşınarak optimize edilmelidir.
3. Rekombinant üretimde farklı karbon ve azot kaynaklarının etkisi değerlendirilerek üretim verimi ve maliyeti optimize edilmelidir.
4. DewA geninin kopya sayısı şaperon proteinleri ile doğru orantılı bir şekilde arttırılarak üretim verimi arttırılmalıdır.

KAYNAKLAR

- Akanbi, M. H. J., Post, E., Anita, M. A., Rink, R., Robillard, G. T., Wang, X., Wösten, H. A., Scholtmeijer, K. 2010. Use of hydrophobins in formulation of water insoluble drugs for oral administration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, (2)75, 526–531.
- Askolin, S. 2006. Characterization of the *Trichoderma reesei* Hydrophobins HFBI and HFBII. Dissertation for the degree of doctor of science in technology, VTT Biotechnology, 38-99.
- Bayry, J., Aimanianda, V., Guijarro, J. I., Sunde, M., Latge, J. P. 2012. Hydrophobins-Unique fungal proteins. *PLoS pathog*, 8(5), 1-16.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248-254.
- Celik, E., ve Calık, P., 2012. Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnol Adv*, 30(5), 1108-18.
- Cereghino, G. P., Cereghino, J. L., Ilgen, C., Cregg, J. M. 2002. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 329–332.
- Cereghino, G. P., Stark, C. M., Kim, D., Chang, J., Shaheen, N., Poerwanto, H., Agari, K., Moua, P., Kristin, N., William, J., Archan, C. 2013. The effect of α -mating factor secretion signal mutations on recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Gene*, (2)519, 311-317.
- Chakarova, S. D and Carlsson, A. E. 2004. Model study of protein unfolding by interfaces. *Physical Review E*, (2)69, 1-9.
- Choi, J. H., and Lee S. Y. 2004. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Microbiol Biotechnology*, 64, 625–635.
- Choi, M., and Ryoo R., 2003. Ordered nanoporous polymer–carbon composites. *Nature Materials*, 2, 473–476.
- Cos, O., Ramón, R., Montesinos, J. M., Valero, F. 2006. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters. A review .*Microbial Cell Factories*, (April), 5-17.
- Demain, A. L and Vaishnav, P. 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, (3)27, 297-306.
- EasySelect™ *Pichia* - Thermo Fisher. For Expression of Recombinant Proteins Using.

- Fuchs, U., Czymbek, K. J., Sweigard, J. A. 2004. Five hydrophobin genes in *Fusarium verticillioides* include two required for microconidial chain formation. *Fungal Genetics and Biology*, (9)41, 852-864.
- Gerold, P., Schofield, L., Blackman, M. J., Holder, A. A., Schwarz, R.T. 1996. Structural analysis of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of the merozoite surface proteins-1 and -2 of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, (1)48, 131-143.
- Gruner, M. S., Szilvay, G. R., Berglin, M., Lienemann, M., Laaksonen, P., Linder, M. B. 2012. Self-assembly of Class II Hydrophobins on Polar Surfaces. *Langmuir*, (9)28, 4293–4300.
- Hektor, H. and Scholtmeijer, K. 2005. Hydrophobins: proteins with potential. *Current Opinion in Biotechnology*, (4)16, 434-439.
- Higgins, D. R. and Cregg, J. M. 1998. *Pichia* Protocols. *Methods in Molecular Biology*, 1-103, Totowa.
- Janssens, M. I., Leeuwen, V., Scholtmeijer, K., Kooten, T. G., Dijkhuizen, L., Wösten H. A. B. 2002. Coating with genetic engineered hydrophobin promotes growth of fibroblasts on a hydrophobic solid, *biomaterials*, (2)23, 4847–4854.
- Jellison, J., Smith, K. T., Shortle, W. C. 1997. Changes in cation concentrations in red spruce wood decayed by brown rot and white rot fungi. *Canadian Journal of Forest Research*, (4)27, 567-571.
- Jenkins, M. B., Hartel, P. G., Olexa, T. J., Stuedemann, J. A. 2003. Putative Temporal Variability of *Escherichia coli* Ribotypes from Yearling Steers. *Qual*, (1)32, 305–309.
- Jensen, T. R., Reitzel, N., Balashev, K., Peters, G. H., Kjaer, K., Bjørnholm, T. 2003. Water in contact with extended hydrophobic surfaces. Direct Evidence of Weak Dewetting. *Physical review letters*, (8)90, 1-4.
- Khalesi, M., Gebruers, K., Derdelinckx, G. 2015. Recent Advances in Fungal Hydrophobin Towards Using in Industry. *Protein J*, (4)34, 243–255,
- Khalesi, M., Venken, T., Deckers, S., Winter, J., Shokribousjein, Z., Gebruers, K., Verachtert, H., Delcour, J., Martin, P., Derdelinckx, G. 2013. A novel method for hydrophobin extraction using CO₂ foam fractionation system. *Industrial crops and products*, 43, 372-377.
- Kirkland B. H, and Keyhani N. O. 2011. Expression and purification of a functionally active class I fungal hydrophobin from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in *E. coli*. *Microbiol Biotechnology*, (2)38, 327–335.
- Kisko, K., Szilvay, G. R., Vainio, U., Linder, M. B. 2008. Serimaa R. Interactions of Hydrophobin Proteins in Solution Studied by Small-Angle X-Ray Scattering. *Biophysical journal*, 94, 198-206.

- Kubicek, C. P., Zelazowska, M. K., Irina, S. 2008. Fungal genus *Hypocrea*/*Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. *Journal of Zhejiang University Science B* (9)10, 753-763.
- Kulkarni, S., Nene, S., Joshi, K. 2017. Production of Hydrophobins from fungi. *Process Biochemistry*, 61, 1-11.
- Kurtzman, C. P. 2011. *Komagataella* Y. Yamada, Matsuda, Maeda, Mikata. *The Yeasts* Chapter, 491-495.
- Lauter, F. R., Russo, V. E., Yanofsky, C. 1992. Developmental and light regulation of *ras*, the structural gene for the rodlet protein of *Neurospora*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, (6)12, 2373-238.
- Lee, D., Lee, Y. L., Grimaud, A., Hong, W. T., Biegalski, M. D., Morgane, D. 2014. Strontium influence on the oxygen electrocatalysis of $\text{La}_{2-x}\text{Sr}_x\text{NiO}_{4\pm\delta}$ ($0.0 \leq x \leq 1.0$) thin films. *Journal of Materials Chemistry A*, 18, 6480-6487.
- Linder, M. B., Szilvay, G. R., Nakari-Setälä, T., Penttilä, M. E. 2005. Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi, *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 877-896.
- Linder, M., Szilvay, G. R., Nakari-Setälä, T., Derlund, H. S., Penttilä, A. 2002. Surface adhesion of fusion proteins containing the hydrophobins HFBI and HFBII from *Trichoderma reesei*. *Protein science*, (9)11, 2257-2266.
- Littlejohn, K. A., Hooley, P., Phil, W. 2012. Bioinformatics predicts diverse *Aspergillus* hydrophobins with novel properties. *Food Hydrocolloids*, (2)27, 503-516.
- Looser, V., Bruhlmann, B., Bumbak, F., Stenger, C., Costa, M., Camattari, A., Fotiadis D., Kovar, K. 2015. Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*. *Biotechnology Advances*, (6)33, 1177-1193.
- Lugones, L. G., Wösten, H. A. B., Wessels, J. G. H. 1998. A hydrophobin (ABH3) specifically secreted by vegetatively growing hyphae of *Agaricus bisporus* (common white button mushroom). *Microbiology* (8)144, 2345-2353.
- Lunkenbein, S., Takenberg, M., Nimtz, M., Berger, R. G. 2011. Characterization of a hydrophobin of the ascomycete *Paecilomyces farinosus*. *Journal of Basic Microbiology*, (4)51, 404-414.
- Marc, W., Werten, T., Tanja, J., Bosch, V. D. 1999. High-yield Secretion of Recombinant Gelatins by *Pichia pastoris*. *Yeast*, (11)15, 1087-1096.
- Mayson, B. E., Kilburn, D. G., Zamost, B. L., Raymond, C. K., Lesnicki, G. J. 2003. Effects of methanol concentration on expression levels of recombinant protein in fed-batch cultures of *Pichia methanolica*. *Biotechnol Bioengineering*, (3)81, 291-298.
- Nakari-Setälä, T., Aro, N., Ilmén, M., Muñoz, G., Kalkkinen, N., Penttilä, M. 1997. Differential expression of the vegetative and spore-bound hydrophobins of *Trichoderma reesei*. *Eur. J. Biochem.* (2)248, 415-423.

- Nejad, A. L., Mahani, M. T., Hosseinkhan, S. 2016. Heterologous expression of a hydrophobin HFB1 and evaluation of its contribution to producing stable foam. *Protein Expression and Purification*, 118, 25-30.
- Petersen N., Gajula, G. P., Petersen, S. B. 2002. UV Light Effects on Proteins. From Photochemistry to Nanomedicine, 128-130, Braga.
- Nocon, J., Steiger, M., Mairinger, T., Hohlweg, J., Rußmayer, H., Hann, S., Gasser, B., Mattanovich, D. 2016. Increasing pentose phosphate pathway flux enhances recombinant protein production in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnology*, 100, 5955–5963.
- Paris, S., Debeaupuis, J. P., Crameri, R., Carey, M., Charlès, F., Prévost, M. C., Schmitt, C., Philippe, B., Latgé, J. P. 2003. Conidial Hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, (3)69, 1581-1588.
- Patrick, S., Fazenda, M. L., Harvey, L. M. 2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, (4)22, 249-270.
- Pedersen, M. H., Borodina, I., Moresco, J. L., Svendsen, W. E., Frisvad, J. C., Søndergaard, I. 2011. High-yield production of hydrophobins roda and rodb from *Aspergillus fumigatus* in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol*, (6)90, 1923–1932.
- Ren Q., Kwan, A. K., Sunde, M. 2013. Properties and Applications of the Self-Assembling Fungal Hydrophobins. *Biopolymers (Peptide Science)*, (4)16, 601–612.
- Rabe, M., Verdes, D., Seeger, S. 2011. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, (2)162, 87-106.
- Rajamanickam, V., Metzger, K., Schmid, C., Spadiut, O. 2017. A novel bi-directional promoter system allows tunable recombinant protein production in *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact*, (1)16, 152.
- Richard, A., Stephanie, P., Dilworth, M. V., Bill, R. M. 2012. Which Yeast Species Shall I Choose?. *Saccharomyces cerevisiae* versus *Pichia pastoris* (Review), 11-23.
- Rieder, A., Ladnorg, T., Wöll, C., Obst, U., Fischer, R., Schwartz, T. 2011. The impact of recombinant fusion-hydrophobin coated surfaces on *E. coli* and natural mixed culture biofilm formation. *The Journal of bioadhesion and biofilm research* (10)27, 1073–1085.
- Riveros, G., Shokribousjein, Z., Khalesi, M. R., Cordova, K., Michiels, C., Delcour, A., Verachtert, H., Wagner, P., Derdelinckx, G. 2015. Comparison of Structure, Sequence, Physical Interactions and its Effects on Primary Gushing among Several Class II Hydrophobins. *Brewing science*, 68, 38-45.
- Rosano, G., L and Ceccarelli, E. A. 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol*, 1-17, Argentina.

- Sallada, N. D, Harkins., L. E, Berger, B. W. 2019. Effect of gene copy number and chaperone coexpression on recombinant hydrophobin HFBI biosurfactant production in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*, (8)116, 2029-2040.
- Sarlin, T., Kivioja, T., Kalkkinen, N., Linder, M. B., Nakari-Setälä, T. 2012. Identification and characterization of gushing-active hydrophobins from *Fusarium graminearum* and related species. *Journal of Basic Microbiology*, (2)52, 184-194.
- Sarlin, T., Nakari-Setälä, T., Linder, M. B., Penttilä, M., Haikara, A. 2005. Fungal Hydrophobins as Predictors of the Gushing Activity of Malt. *Journal of the Institute of Brewing*, (2)111, 0718-283.
- Schmoll, M., Seibel, C., Kotlowski, C., Vendt, F. W., Liebmann, B., Kubicek, C. P. 2010. Recombinant production of an *Aspergillus nidulans* class I hydrophobin (DewA) in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) is promoter-dependent. *Appl Microbiol Biotechnol*, 88, 95-103.
- Scholtmeijer, K., Janssen, M. I., Leeuwen, M., Kooten, K. V., Hektor, H., Wösten, H. A. B. 2004. The use of hydrophobins to functionalize surfaces, *Bio-Medical Materials and Engineering*, (4)14, 447-454.
- Scholtmeijer, K., Wessels, J., Wösten, H. A. B. 2001. Fungal hydrophobins in medical and technical applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 56, 1-8, February.
- Sears, P. and Wong, C. H. 1998. Enzyme action in glycoprotein synthesis. *CMLS Cell Mol Life Sci*. (3)54, 223–252.
- Setälä, M. 1997. Differential Expression of the Vegetative and Spore-Bound Hydrophobins of *Trichoderma Reesei* Cloning and Characterization of the *Hfb2* Gene. *Eur. J. Biochem*, (2)248, 415-423.
- Starov, V., Ivanova, N., Rubio, R. G. 2010. Why do aqueous surfactant solutions spread over hydrophobic substrates?. *Advances in Colloid and Interface Science*, (1)161, 153–162.
- Sunde, M., Kwan, A. H. Y., Templeton, M. D., Beever, R. E., Mackay, J. P. 2008. Structural analysis of hydrophobins. *Micron*, (7)39, 773-784.
- Takai, S. and Richards, W. C. 2008. Cerato-ulmin, a Wilting Toxin of *Ceratocystis ulmi*: Isolation and some Properties of Cerato-ulmin from the Culture of *C. Ulmi*. *Journal of Phytopathology* (2)91, 129 -146.
- Talbot, N. J., Kershaw, M. J., Wakley, G. E., Vries, D., Wessels, J. G. H., Hamer, J. E. 1996. MPG1 Encodes a Fungal Hydrophobin Involved in Surface Interactions during Infection-Related Development of *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell*, (6)8, 985-999.
- Talbot, N. J., Ebbole, D. J., Hamer, J. E. 1993. Identification and characterization of MPG1, a gene involved in pathogenicity from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *The plant cell*, (5)11, 1575–1590.

- Terpe, K. 2006. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Microbiol Biotechnol*, 72, 211–222.
- Thau, N., Monod, M., Crestani, B., Rolland, C., Tronchin, G., Latgé, J. P., Paris, S. 1994. Rodletless mutants of *Aspergillus fumigatus*. *Infection and immunity*, (10)62, 4380-4388.
- Timberlake, W. E and Stringer, M. A. 1995. DewA encodes a fungal hydrophobin component of the *Aspergillus* spore Wall. *Molecular Microbiology*, (1)16, 33-44.
- Ünver, Y. 2014. İnsan Paraoksonaz 1 (pon1) geninin klonlanması, *Pichia pastoris*'te ekspresyonu, rekombinant enzimin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik. Erzurum.
- Ünver, Y., Yildiz, M., Kilic, D., Taskin, M., Firat, A., and Askin, H. 2018. Efficient expression of recombinant human telomerase inhibitor 1 (hpinx1) in *Pichia pastoris*. *Prep Biochem Biotechnology*, (6)48, 535-540.
- Valo, H. K., Laaksonen, P. H., Peltonen, L. J., Linder, M. B., Hirvonen, J. T., Laaksonen, T. J. 2010. Multifunctional Hydrophobin. Toward Functional Coatings for Drug Nanoparticles. *American chemical society*, (4)3, 1750–1758.
- Veenhuis, M. and Klei, I. J. 2006. Yeast and filamentous fungi as model organisms in microbody research. *Biochimica et Biophysica Acta*, (2)1763, 1364-1373.
- Vergara, A., Hernández, S., Revah, S. 2006. Phenomenological Model of Fungal Biofilters for the Abatement of Hydrophobic VOCs. *Biotechnology and bioengineering*, (6)101, 1182–1192.
- Victor, L., Ren, Q., Pham, C. L., Morris, V. K., Kwan, A. H., Sunde, M. 2014. Fungal Hydrophobin Proteins Produce Self-Assembling Protein Films with Diverse Structure and Chemical Stability. *Nanomaterials*, (3)4, 827-843.
- Victor, L., Jennifer, I., Chun, L., Sunde, M. 2019. Fungal Hydrophobins and Their Self-Assembly into Functional Nanomaterials. *Biological and bio-inspired nanomaterials*, 1114, 161-185.
- Vigueras, G., Arriaga, S., Shirai, K., Morales, M., Revah, S. 2009. Hydrophobic response of the fungus *Rhinoctadiella similis* in the biofiltration with volatile organic compounds with different polarity. *Biotechnology Letters* (8)31, 1203–1209.
- Wagner, P., Fürstner, R., Barthlott, W., Neinhuis, C. 2003. Quantitative assessment to the structural basis of water repellency in natural and technical surfaces. *Journal of Experimental Botany* (15)385, 1295–1303.
- Wang, D., Zheng, P., Chen, P. 2001. Production of a Recombinant α -L-Rhamnosidase from *Aspergillus niger* CCTCC M 2018240 in *Pichia pastoris*. *Biochemistry and biotechnology*, (3)189, 1020–1037.

- Wang, Z., Huang, Y., Li, S., Xu, H., Linder, M. B., Qiao, M. 2010. Hydrophilic modification of polystyrene with hydrophobin for time-resolved immunofluorometric assay. *Biosensors and bioelectronics* (3)26, 1074–1079.
- Weichel, M., Grendelmeier, P. S., Rhyner, C., Achatz, G., Blaser, K., Cramer, R. 2003. Immunoglobulin E-binding and skin test reactivity to hydrophobin HCh-1 from *Cladosporium herbarum*, the first allergenic cell wall component of fungi. *Clin Exp Allergy*, (1)33, 72-77.
- Wessels, J. G. H., Vries, D., Asgeirsdottir, S. A., Schuren, F. H. J. 1991. Hydrophobin Genes Involved in Formation of Aerial Hyphae and Fruit Bodies in *Schizophyllum*. *The Plant Cell*, (3)8, 793-799.
- Wessels, J. G. H. 1994. Developmental regulation of fungal cell wall formation. *Ann Rev of Phytopathol* 32, 413-437.
- Wessels, J. G. H. 1996. Hydrophobins: Proteins that Change the Nature of the Fungal Surface. *Advances in Microbial Physiology*, 38, 1-45.
- Wessels, J. G. H. 1997. Hydrophobins: Proteins that Change the Nature of the Fungal Surface. *Advances in Microbial Physiology*, 38, 1-45.
- Whiteford, J. R and Spanu, P. D. 2002. Hydrophobins and the interactions between fungi and plants. *Molecular Plant Pathology* 3(5), 391–400.
- Winandy, L., Hilpert, F., Schlebusch, O., Fischer, R. 2018. Comparative analysis of surface coating properties of five hydrophobins from *Aspergillus nidulans* and *Trichoderma reesei*. *Scientific Reports*, 8, 1-10.
- Winterburn, J. B., Russell, A. B., Martin, P. J. 2011. Integrated recirculating foam fractionation for the continuous recovery of biosurfactant from fermenters. *Biochemical Engineering Journal*, (2)54, 132–139.
- Wösten, H. A., Schuren, F. H., Wessels, J. G. 1994. Interfacial self-assembly of a hydrophobin into an amphipathic protein membrane mediates fungal attachment to hydrophobic surfaces. *The EMBO Journal*, (13)24, 5848-5854.
- Wösten, H. A. and Scholtmeijer, K. 2015. Applications of hydrophobins: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*, 99, 1587–1597.
- Wösten, H. A., Annevan, M., Lugones, L. G., Busscher, H. J., Wessels, J. G. 1999. How a fungus escapes the water to grow into the air. *Current Biology*, (2)9, 85-88.
- Wösten, H. A., Ruardy, T. G., Busscher, H. J., Wessels, J. G. 1995. Interfacial self-assembly of a *Schizophyllum commune* hydrophobin into an insoluble amphipathic protein membrane depends on surface hydrophobicity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, (3)5, 189-195.
- Wösten, H. A. and Wessels, J. G. 1997. Hydrophobins, from molecular structure to multiple functions in fungal development. *Mycoscience*, (38), 363–374.

- Wösten, H. A. 2001. Hydrophobins: Multipurpose Proteins, Annual review of microbiology, 55, 625-646.
- Wu, S. and Letchworth, G. J. 2004. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. BioTechniques, (1)36, 152-154.
- Ying, S. Y. and Feng, M. G. 2004. Relationship between thermotolerance and hydrophobin-like proteins in aerial conidia of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* as fungal biocontrol agents. Journal of applied microbiology, (2)97, 323-331.
- Zahra, S., Sylvie, M., Kurt, G., Lorgouilloux, Y., Baggermanc, G., Verachtert, H., Delcour, A. J., Etiennee, P., Rock J. M., Michiels, C., Derdelinckx, G. 2011. Hydrophobins, beer foaming and gushing. *Cerevisia* (4)35, 85-101.
- Zepeda, A. B, Pessoa, A., Farías J. G. 2018. Carbon metabolism influenced for promoters and temperature used in the heterologous protein production using *Pichia pastoris* yeast. *Brazilian Journal of Microbiology*, (3)8, 119-127.
- Zhang, S., Xia, Y. X., Kim, B., Keyhani, N. O. 2011. Two hydrophobins are involved in fungal spore coat rodlet layer assembly and each play distinct roles in surface interactions, development and pathogenesis in the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *Molecular Microbiology* 3(80), 811-826.
- Zhu, C., Gupta, A., Hall, V. L. 2013. Using defined finger-finger interfaces as units of assembly for constructing zinc-finger nucleases. *Nucleic Acids Research*, (1)4, 2455-2465.