

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ENTOMOPATOJEN FUNGUSLARA AİT HİDROFOBİN GENLERİNİN
ARAŞTIRILMASI, HİDROFOBİN-İNFEKTİVİTE İLİŞKİSİNİN
BELİRLENMESİ VE *İN VİTRO* SİSTEMDE İFADESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Dilek CİVELEK

MART 2022
TRABZON



**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ENTOMOPATOJEN FUNGUSLARA AİT HİDROFOBİN GENLERİNİN
ARAŞTIRILMASI, HİDROFOBİN-İNFEKTİVİTE İLİŞKİSİNİN BELİRLENMESİ
VE *İN VİTRO* SİSTEMDE İFADESİ**

Dilek CİVELEK

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nce
“YÜKSEK LİSANS (BİYOLOJİ)”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 18 / 02 / 2022
Tezin Savunma Tarihi : 24 / 03 / 2022**

Tez Danışmanı Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ

Trabzon 2022

ÖNSÖZ

“Entomopatojen Funguslara ait Hidrofobin Genlerinin Araştırılması, Hidrofobin-İnfektivite İlişkisinin Belirlenmesi ve *in vitro* Sistemde İfadesi” isimli bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda ‘Yüksek Lisans Tezi’ olarak hazırlanmıştır.

Yüksek Lisans tez konusunu belirleyen, çalışmalarım sırasında karşılaştığım tüm güçlüklerin üstesinden gelmemi sağlayan, her türlü desteği ve imkânı vaktinde sağlayarak, çok kıymetli bilgilerinden yararlandığım danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımın çeşitli aşamalarında desteklerini esirgemeyen hocalarım Sayın Prof. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU’na, Sayın Prof. Dr. İsmail DEMİR’e, Sayın Doç. Dr. Hacer MURATOĞLU’na ve tüm mikrobiyoloji laboratuvarı çalışanlarına şükranlarımı sunuyorum.

Tez çalışmam sürecinde bana her türlü maddi ve manevi desteği sağlayan annem, babam, kardeşlerim, yeğenlerim (Nurdilara ve Hayrunnisa KORKMAZ)’e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, Karadeniz Teknik Üniversitesi FBA-2021-9439 no’lu Bilimsel Araştırma Projesiyle desteklenmiştir. Katkılarından dolayı Karadeniz Teknik Üniversitesi’ne teşekkür ederim.

Dilek CİVELEK
Trabzon, 2022

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Entomopatojen Funguslara ait Hidrofobin Genlerinin Araştırılması, Hidrofobin - İnfektivite İlişkisinin Belirlenmesi ve *in vitro* Sistemde İfadesi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’ın sorumluluğunda tamamladığımı, örnekleri kendim topladığımı, deneyleri ilgili laboratuvarımda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma süresince bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 24/03/2022

Dilek CİVELEK

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER	V
ÖZET	VIII
SUMMARY	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ	XII
SEMBOLLER DİZİNİ.....	XIII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. Entomopatojen Funguslar	2
1.3. Hidrofobinler	4
1.3.1. <i>Ascomycetes</i> türlerinde Hidrofobinler	6
1.3.1.1. <i>Beauveria bassiana</i> ve Hidrofobinleri	7
1.3.1.2. <i>Metarhizium</i> türleri ve Hidrofobinleri	8
1.3.1.3. <i>Isaria fumosorosea</i> ve Hidrofobinleri.....	8
1.3.2. <i>Basidiomycetes</i> türlerinde Hidrofobinler	9
1.4. Hidrofobinlerin Yapısı	10
1.5. Hidrofobinlerin Sınıflandırılması	11
1.6. Funguslarda Hidrofobinlerin Rollerı	14
1.7. Hidrofobinlerin Biyoteknolojik Uygulamaları	15
1.7.1. Sulu İki Fazlı Sistemlerdeki (ATPS) Saflaştırmalarda Hidrofobinler	16
1.7.2. İlaç Çözünürlüğünde ve Taşınımında Hidrofobinler	17
1.7.3. Yüzey Modifikasyonlarında Hidrofobinler	18
1.7.4. Alkollü ve Gazlı İçeceklerde Meydana Gelen Köpürme Olayında Hidrofobinlerin Rolü.....	21
1.7.5. Protein İmmobilizasyonunda Hidrofobinler.....	22
1.7.6. Yapay Materyal Üretimi	22
1.8. Hidrofobinlerin Orta Ölçekte Üretimi	23
1.8.1. Doğal Fungusların Kullanılması ile Geleneksel Hidrofobin Üretimi.....	23

1.8.2.	Rekombinant DNA Teknolojisinin Kullanılması ile Hidrofobin Üretimi	24
1.9.	Tez Çalışmasının Önemi.....	26
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR	27
2.1.	Çalışmada Kullanılan Funguslar	27
2.2.	Funguslardan DNA İzolasyonu	28
2.3.	Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Hidrofobin Genlerini Çoğaltma.....	29
2.3.1.	Hidrofobin Gen Bölgesinin Ara Vektöre Klonlanması	31
2.3.2.	<i>E. coli</i> DH10 β Kompetent Hücrelerinin Hazırlanması	31
2.3.3.	<i>E. coli</i> DH10 β Kompetent Hücrelerine Transformasyon	31
2.3.4.	Plazmit İzolasyonu ve Restriksiyon Analizi	32
2.4.	<i>Beauveria bassiana</i> KTU-57 (Rh) Hidrofobin Geninin İfadesi.....	34
2.4.1.	RNA İzolasyonu	35
2.4.2.	cDNA'ların Oluşturulması ve Klonlanması.....	36
2.4.3.	Hidrofobin Geninin pPICZ α C Vektörüne Klonlanması.....	37
2.4.4.	Rekombinant pPICZ α C+ <i>hyd</i> Vektörünün <i>SacI</i> Enzimi ile Analizi	39
2.4.5.	Maya Kompetent Hücrelerinin Hazırlanması	40
2.4.6.	Elektroporasyon Yolu ile Lineer Rekombinant Vektörün Maya Kompetent Hücrelerine Transformasyonu	40
2.4.6.1.	Rekombinant <i>Pichia pastoris</i> X-33 ve GS115 Maya Hücrelerinden DNA Saflaştırması ve PCR Analizi.....	41
2.4.7.	Rekombinant <i>Pichia pastoris</i> (X-33)'te Protein İfadesi	41
2.4.7.1.	Hücre Dışı Protein İfadesi	42
2.4.7.2.	Hücre İçi Protein İfadesi	42
2.4.8.	Rekombinant <i>Pichia pastoris</i> (X-33)'te İfade Edilen Hidrofobin Proteininin Western Blot Analizi	43
3.	BULGULAR	45
3.1.	Besin Ortamında Büyütülen-Tanımlanmış ve İnsektisidal Özellikleri Bilinen Entomopatojen Funguslar	45
3.2.	Entomopatojen Fungus Kültürlerinden İzole Edilen DNA'lar.....	48
3.3.	Fungus İzolatlarının PCR ile Çoğaltılan Hidrofobin Gen Bölgeleri	48
3.4.	Hidrofobin Gen Dizilerinin Analizi.....	50
3.4.1.	Hidrofobin Gen Dizilerinin Sınıflarının Belirlenmesi.....	50
3.4.2.	Hidrofobin Gen Dizilerine Göre EPF'lerin Filogenetik İlişkileri	51
3.4.3.	Fungus İzolatlarının Hidrofobin Gen Dizileri Kullanılarak 3 Boyutlu Yapılarının Elde Edilmesi	54

3.5.	İnsektisidal Etki ile Hidrofobin Proteinlerinin Karşılaştırılması.....	55
3.6.	Hidrofobin Geninin <i>Pichia pastoris</i> 'te İfade Edilmesi.....	58
3.6.1.	KTU-57 (Rh) İzolatından RNA İzolasyonu	58
3.6.2.	cDNA'ların Elde Edilmesi ve Ara Vektöre Klonlama	59
3.6.3.	pPICZ α C Maya Vektörünün Kesimi ve Rekombinant Maya Vektörünün Elde Edilmesi	60
3.6.4.	Rekombinant Maya Vektörü (pPICZ α C+ <i>hyd</i>)'nün Ekspresyon Konağına Transformasyonu	61
3.6.5.	<i>Pichia pastoris</i> 'te Gen İfadesi	65
4.	TARTIŞMA	67
5.	SONUÇLAR	71
6.	ÖNERİLER	72
7.	KAYNAKLAR.....	73
8.	EKLER.....	83
ÖZGEÇMİŞ		

Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

ENTOMOPATOJEN FUNGUSLARA AİT HİDROFOBİN GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI, HİDROFOBİN-İNFEKTİVİTE İLİŞKİSİNİN BELİRLENMESİ VE *İN VİTRO* SİSTEMDE İFADESİ

Dilek CİVELEK

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ
2022, 92 sayfa

Hidrofobinler, moleküler kütlesi yaklaşık 10 kDa olan filamentli funguslarda üretilen sistein açısından zengin, amfipatik proteinlerdir. Bu özelliklerinden dolayı yüzey kaplamaları, biyosensörler, rekombinant proteinlerin saflaştırılması ve kendi kendini temizleyen yüzeyler gibi birçok endüstriyel uygulamada önemli rol oynarlar. Bu tezde, entomopatojenik funguslarda (EPF) bulunan hidrofobin genlerinin belirlenmesi, hidrofobin özellikleri ile insektisidal özelliklerin karşılaştırılması ve seçilen hidrofobin geninin *Pichia pastoris* maya sisteminde ifade edilerek endüstriyel kullanıma hazırlanması amaçlanmıştır. Bu amaçla Karadeniz Teknik Üniversitesi fungus koleksiyonundan elde edilen 20 adet entomopatojenik fungus izolatında hidrofobin geninin varlığı araştırılmış ve bu izolatların 14'ünde hidrofobin geni (*hyd*) tespit edilmiştir. *hyd* taşıyan tüm izolatların sınıf I hidrofobin grubuna ait oldukları belirlenmiştir.

Hidrofobin geni ihtiva eden entomopatojenik funguslar değerlendirildiğinde, insektisidal aktivite, morfolojik özellikler, hızlı büyüme, konak spektrumu, konak yüzeylerindeki adhezyon derecesi ve yüksek mortaliteye sahip olma özellikleri göz önünde bulundurulduğunda *Beauveria bassiana* KTU-57 izolatına ait hidrofobin geninin *P. pastoris* maya sisteminde ifade edilmesine karar verildi. Bu doğrultuda fungal genomdan ribozomal RNA elde edilerek revers transkriptaz enzimi ile cDNA'sı oluşturuldu. RT-PCR (Reverse Transcriptase-Ters Transkriptaz) ile elde edilen hidrofobin geni, pPICZαC vektörüne klonlandı ve rekombinant maya vektörünün (pPICZαC+*hyd*) *P. pastoris* X-33 gen ifade konağında ifadesi sağlandı. Önemli miktarda protein ifadesi gerçekleştirilmiş olmakla birlikte hidrofobin proteinin endüstriyel amaçlı kullanılması için üretim kapasitesinin artırılmasına yönelik optimizasyon çalışmaları devam etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Hidrofobin, *Pichia pastoris*, *Beauveria bassiana*, Hidrofobin İfadesi

Master Thesis

SUMMARY

INVESTIGATION OF HYDROPHOBIN GENES OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI,
DETERMINATION OF HYDROPHOBIN-INFECTIVITY RELATIONSHIP AND
EXPRESSION IN THE *IN VITRO* SYSTEM

Dilek CİVELEK

Karadeniz Technical University
The Institute of Science
Biology Department
Supervisor: Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ
2022, 92 pages

Hydrophobins are cysteine-rich, amphipathic proteins produced in filamentous fungi with a molecular mass of about 10 kDa. Because of these properties, they play an important role in many industrial applications such as surface coatings, biosensors, purification of recombinant proteins and self-cleaning surfaces. In this thesis, it was aimed to determine the hydrophobin genes found in entomopathogenic fungi (EPF), to compare the hydrophobin properties and insecticidal properties, and to prepare the selected hydrophobin gene for industrial use by expressing it in *Pichia pastoris* yeast system. For this purpose, the presence of hydrophobin gene was investigated in 20 entomopathogenic fungus isolates obtained from the fungus collection of Karadeniz Technical University, and the hydrophobin gene (*hyd*) was detected in 14 of these isolates. It was determined that all isolates carrying the hydrophobin gene belong to the class I hydrophobin group.

When the entomopathogenic fungi containing the hydrophobin gene were evaluated, considering the insecticidal activity, morphological features, rapid growth, host spectrum, degree of adhesion on the host surfaces and high mortality, it was decided to express the hydrophobin gene of *Beauveria bassiana* KTU-57 in the *P. pastoris* yeast system. In this direction, ribosomal RNA was obtained from the fungal genome and its cDNA was created with the reverse transcriptase enzyme. The hydrobin gene obtained by RT-PCR (Reverse Transcriptase-Reverse Transcriptase) was cloned into the pPICZαC vector and expression of the recombinant yeast vector (pPICZαC+*hyd*) in the *P. pastoris* X-33 gene expression host was achieved. Although a significant amount of protein expression has been achieved, optimization studies are continuing to increase the production capacity for the industrial use of hydrophobin protein.

Key Words: Hydrophobin, *Pichia pastoris*, *Beauveria bassiana*, Expression of Hydrophobin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.	Entomopatojen fungusların böcekler üzerindeki etki mekanizması.....	3
Şekil 2.	Entomopatojen fungusların bitkiler üzerindeki etki mekanizması.....	4
Şekil 3.	Hidrofobinlerin biyolojik işlevleri.....	5
Şekil 4.	<i>T. reesei</i> HFBII hidrofobinin yapısı	6
Şekil 5.	<i>B. bassiana</i> (KTU-57) cinsinin morfolojik özellikleri	7
Şekil 6.	<i>M. brunneum</i> (KTU-21) cinsinin morfolojik özellikleri	8
Şekil 7.	<i>I. fumosorosea</i> (KTU-1) cinsinin morfolojik özellikleri	9
Şekil 8.	Hidrofobin polipeptidinin primer dizisi.....	11
Şekil 9.	Sınıf I ve sınıf II hidrofobinlerin morfolojik yapıları.....	12
Şekil 10.	Sınıf I (a,b) ve sınıf II (c) hidrofobinlerin üç boyulu yapıları.....	13
Şekil 11.	Sulu iki fazlı sistemlerde hidrofobin ve hidrofobin füzyonlarının saflaştırılması	17
Şekil 12.	GFP ile etiketli hidrofobinlerle ilaç kaplanması	18
Şekil 13.	Çeşitli hidrofilik ve hidrofobik substratlar üzerinde hidrofobinlerin yapışması ve kendi kendine montajı.....	20
Şekil 14.	Teflon çubuğun Sc3 hidrofobinleri ile kaplanması	21
Şekil 15.	Rekombinant DNA teknolojisiyle hidrofobin elde etmek için kullanılan gen ifade sistemleri	24
Şekil 16.	<i>hyd</i> gen bölgesinin pJET1.2 ara vektörüne klonlanması	34
Şekil 17.	<i>P. pastoris</i> 'te gen ifadesinde izlenen adımlar	35
Şekil 18.	KTU-57 izolatından RNA ekstraksiyonu	36
Şekil 19.	Rekombinant maya vektörünün şematik gösterimi	39
Şekil 20.	Çalışmada kullanılan entomopatojen fungusların PDAY besiyeri üzerindeki koloni morfolojileri	46
Şekil 21.	<i>Metarhizium</i> izolatlarının <i>hyd</i> gen bölgesi.....	49
Şekil 22.	<i>Beauveria bassiana</i> izolatlarının <i>hyd</i> gen bölgesi.....	49
Şekil 23.	<i>Isaria fumosorosea</i> izolatlarının <i>hyd</i> gen bölgesi	50
Şekil 24.	Fungal izolatların hidrofobin gen dizisine göre filogenetik ilişkileri.....	52
Şekil 25.	Fungus izolatlarının Hyd protein dizilerine göre filogenetik ilişkileri.....	53
Şekil 26.	Hidrofobin gen dizileri belirlenen fungus izolatlarının 3D protein yapıları	54

Şekil 27.	KTU-57 EPF'sinden elde edilen toplam RNA	58
Şekil 28.	KTU-57'nin hidrofobin genine ait cDNA	59
Şekil 29.	pJET rekombinant vektörün <i>EcoRI</i> ve <i>Not I</i> ile restriksiyon analizleri	60
Şekil 30.	Rekombinant maya vektörünün <i>HindIII</i> ve <i>SalI</i> ile restriksiyon analizi.....	61
Şekil 31.	Rekombinant maya vektörünün <i>SacI</i> ile restriksiyon analizi	62
Şekil 32.	<i>P. pastoris</i> gen ifade konaklarında transformasyon sonucu oluşan koloniler	63
Şekil 33.	Rekombinant <i>P. pastoris</i> X-33'ün genomunda bulunan hidrofobin geninin PCR ile çoğaltılması.....	64
Şekil 34.	Protein ifadesi için kültürlerin istenilen koşullardaki inkübatörlere yerleştirilmesi.....	65
Şekil 35.	Hidrofobin geninin Western blot analizi	66

TABLÖLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Sınıf I ve sınıf II hidrofobinlerin belirgin özellikleri	13
Tablo 2. Hidrofobin sınıflarına göre korunmuş sisteinler arasındaki aminoasit farklılıkları	14
Tablo 3. Çalışmada kullanılan entomopatojenik fungus izolatları	28
Tablo 4. <i>Beauveria</i> ve <i>Metarhizium</i> hidrofobin genlerini belirlemek için kullanılan primerler	30
Tablo 5. SDS-PAGE için gereken kimyasallar ve kullanılan miktarlar	43
Tablo 6. EPF'lerden izole edilen DNA'ların konsantrasyonları.....	48
Tablo 7. Sınıf I ve sınıf II hidrofobinlerde sistein aminoasitleri arasındaki uzaklıklar	51
Tablo 8. <i>Metarhizium sp.</i> izolatlarının insektisidal aktiviteleri	56
Tablo 9. <i>Isaria fumosorosea</i> izolatlarının insektisidal aktiviteleri	56
Tablo10. <i>Beauveria bassiana</i> izolatlarının insektisidal aktiviteleri.....	57
Tablo11. Maya vektörüne klonlanan hidrofobin geninde yer alan sistein aminoasitleri.....	61

SEMBOLLER DİZİNİ

<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
CaCl ₂	: Kalsiyum klorür
dH ₂ O	: Distile su
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleotit trifosfat
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
kb	: Kilo Baz
kDa	: Kilo Dalton
LB	: Luria Bertani
M	: Molar
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
mM	: Milimolar
mRNA	: Mesajcı RNA
ng	: Nanogram
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik asit
rpm	: Dakikadaki dönüş sayısı
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
U	: Ünite
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
bp	: Baz çifti
His	: Histidin
°C	: Santigrat Derece
<i>hyd</i>	: Hidrofobin geni

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Doğada çeşitli rolleri olan funguslar, ekosistemin önemli bir parçasıdır. Bu canlılar organik maddeleri ayrıştırarak besin maddelerini habitatlarına geri kazandırmalarının yanında bitkiler veya hayvanlarla simbiyotik olarak da yaşarlar. Genellikle nemli, karanlık ortamlarda bulunan ve fotosentez yapma yeteneği olmayan filamentli fungus hücreleri, miselyum oluşturmak ve yiyecekleri emmek ve üremek için ‘hif’ adı verilen uzun boru şeklinde filamentler oluştururlar. Funguslar üreme yapılarına göre Basidiomycota, Ascomycota, Zygomycota ve Deuteromycota olmak üzere 4 şubeye ayrılırlar (Lo, 2018).

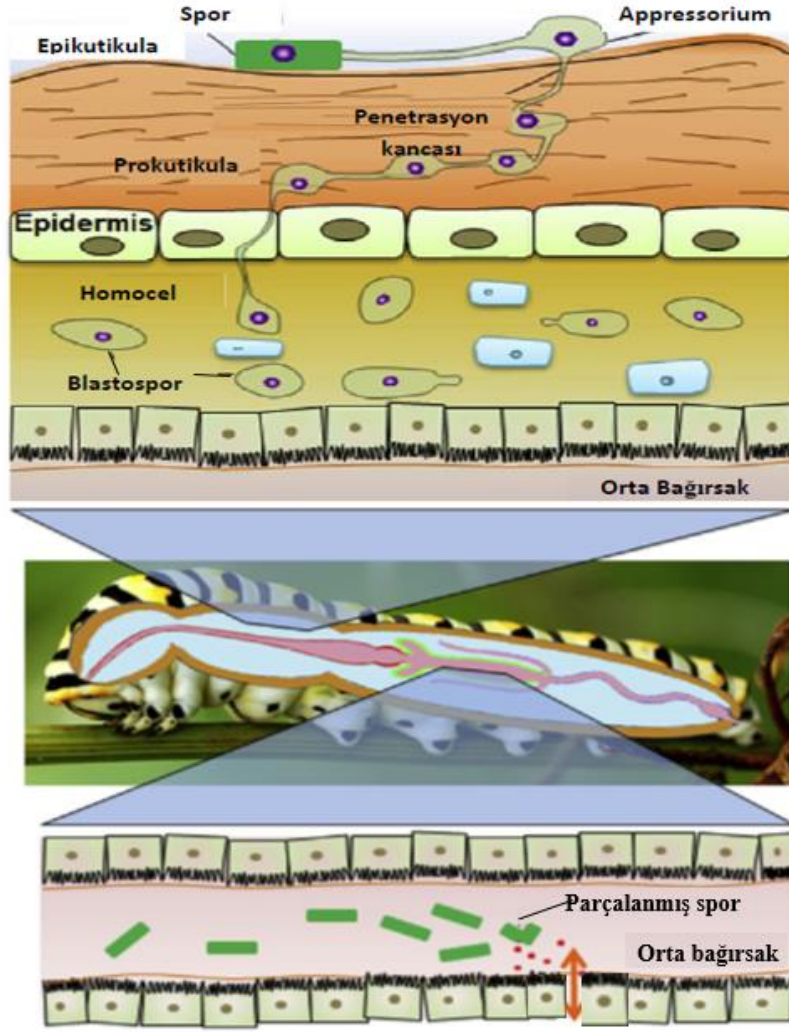
Dünyada ortalama 1.5-5 milyon fungus türü bulunmaktadır (Hibbett ve ark., 2011) ve bu türlerin yaklaşık 750-1000’i böceklerde enfeksiyon oluşturarak (entomopatojen funguslar) varlığını sürdürmektedir (St. Leger ve Wang, 2010). Entomopatojenik funguslar (EPF), böcek popülasyonlarının düzenlenmesinde mikrobiyal mücadele etmeni olarak iyi bir potansiyele sahiptir (Roberts, 1989). Bu sebeple, böceklerin biyolojik mücadelesinde kullanılan ilk patojenler olmuşlardır (Vega ve ark., 2012). İlk olarak Agostino Bassi (1835), ipek böceği larvalarında *Beauveria bassiana* fungusunu keşfetmiş ve bu fungusu izole ederek diğer kelebek larvalarına transfer etmeyi başarmıştır. Araştırmalarına devam eden Bassi, *B. bassiana*’nın zararlı böceklerle karşı kullanılabileceği fikrini önermiştir. EPF’ler taksonomik olarak birbirinden farklı olmasına rağmen, hepsi konakçının kütikülüne veya sindirim sistemine tutunan, çimlenen ve nüfuz eden enfektif sporlar üretir. Örneğin, sucul ortamlarda yaşayan EPF’lerde tutunma işlemi, zoosporların kese oluşurması ile takip edilirken (Castrillo ve ark., 2005); *B. bassiana*, *Metarhizium anisopliae* ve *Nomurae rileyi*’de tutunma işlemi, sporlarda yer alan iyi organize olmuş fasikül rodletler ve böcek kütikulası arasındaki hidrofobik ilişkinin sonucunda meydana gelir (Castrillo ve ark., 2005; St. Leger ve Lovett, 2017). Bu hidrofobik etkileşimler, EPF sporlarının dış yüzeyinde bulunan, hidrofobik epikütiküle yapışmaya aracılık eden ve hücre yüzeyi hidrofobikliğine çeşitli şekillerde katkıda bulunan hidrofobin proteinleri ile sağlanır (St. Leger ve Lovett, 2017).

1.2. Entomopatojen Funguslar

Entomopatojen Funguslar (EPF), eklembacaklıları enfekte etme ve öldürme yeteneğine sahip parazitik mikroorganizmalardır (Goettel ve ark., 2005; Anastasi ve ark., 2013). EPF'ler, böcek popülasyonlarının düzenlenmesinde önemli role sahip olduklarından mikrobiyal mücadele etmeni olarak 100 yılı aşkın bir süredir kullanılmaktadırlar (Goettel ve ark., 2005). Rath'a (2000) göre, şimdiye kadar en azından 90 cinse ait 700 entomopatojenik fungus türü tanımlanmış ve bunlardan *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*) ve *Verticillium lecanii* gibi bazı türler ise birçok ülkede pek çok zararlıyla mücadelede ticari olarak üretilerek kullanılmaktadır (Sevim ve ark., 2014).

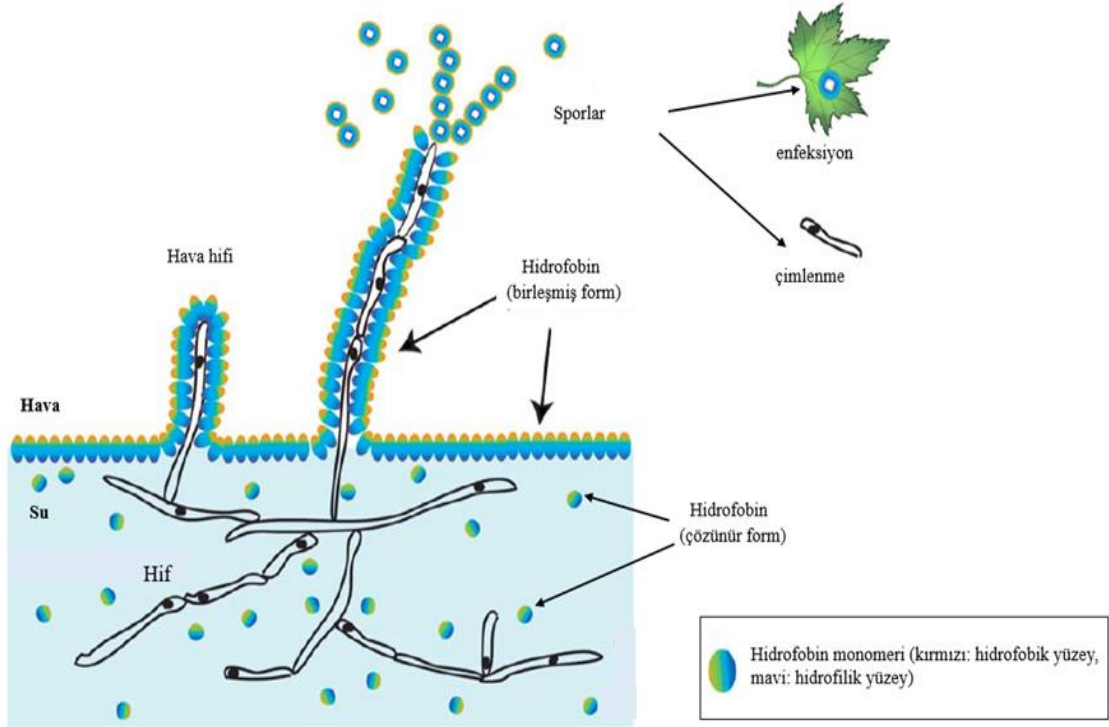
Entomopatojen bakteri ve virüslerden farklı olarak EPF'ler, böceklerin kutikulasından doğrudan girerek enfekte edebilme özelliğine sahiptir (Sevim ve ark., 2015). Dolayısıyla, böceklerin kütiküllerinde ve kabukluların kabuklarında bulunan kitin üzerinde kitinazlar salgılayarak etki ederler. Kitin bozunma süreci, hiflerin ve sporların böcek kütikülleri gibi hidrofobik yüzeye tutunmasıyla başlar (Kulkarni ve ark., 2017). EPF sporlarının dış yüzeyi, onları ıslanmaya ve kurumaya karşı dirençli kılan hidrofobik bir protein tabakası ile çevrilidir. Bu protein tabakası, içerdiği yüksek oranda hidrofobik aminoasitlerden dolayı 'hidrofobin' olarak adlandırılır (Ball ve ark., 2020). EPF sporu, hidrofobinler ve fungusun hücre duvarında yer alan diğer proteinler varlığında (Mad1, Mad2, SsgA, Cwp10, CYP,...) konağın kutikulasına penetre olur. Penetrasyondan sonra spor çimlenerek 'germ tüpünü' oluşturur. Bu esnada apressorium ve melanizasyon olayları meydana gelir. Spor, böceğin epidermisini geçerek hemoseline ulaşır, toksin üretimi ve çoğalma gerçekleştirerek böceği istila eder ve öldürür. Ölen böceği saran funguslardaki sporlar, diğer böcekleri enfekte etmek üzere yeniden çevreye yayılırlar (Şekil 1) (Wessels ve ark., 1991).

Filamentli funguslar, hidrofobik ve hidrofilik ortamlar arasındaki geçişlere aracılık etmek için yaşam döngüsünün farklı aşamalarında çoklu hidrofobin proteinleri ifade ederler. Bunların herbiri üreme, gelişme ve çimlenme gibi aktif rollerle fungusun yaşam döngüsü boyunca hayatta kalma ve büyüme için sinerjistik olarak hareket ederler (Lo, 2018; Ball ve ark., 2020).



Şekil 1. Entomopatojen fungusların böcekler üzerindeki etki mekanizması (Zhao ve ark., 2016’ dan değiştirilerek alınmıştır).

Bitki-entomopatojenik fungus ilişkisinde hidrofobinler, patojenite faktörleri olarak tanımlanmasına rağmen fungus virülansındaki kesin rolleri henüz tam olarak anlaşılmamıştır (Talbot ve ark., 1996). Pirinç patlatma fungusu *Magnaporthe grisea*'da, hidrofobin *mpg1*, patojeniteyi oluşturmak için hidrofovik yaprak yüzeyleri ile etkileşimde bulunarak, appressorium oluşumu için sensör olarak işlev görmektedir (Şekil 2). Yapılan çalışmada, *mpg1* geninin silinmesi, *M. grisea*'nın duyarlı bir pirinç çeşidini enfekte etme ve kolonize etme kapasitesinin azalması ile sonuçlanmıştır (Kim ve ark., 2005).



Şekil 2. Entomopatojen fungusların bitkiler üzerindeki etki mekanizması (Ren ve ark., 2006a' dan değiştirilerek alınmıştır).

Entomopatojen fungusların memeliler üzerinde toksik etki göstermemesi, böceklerde direnç oluşturmaması, uzun süre çevrede kalabilmesi, konukçularının değişik dönemlerini enfekte edebilmesi ve kitle üretimlerinin yapılabilmesi en büyük avantajları olarak gösterilmektedir. Buna karşın kimyasal insektisitlere oranla zararlıyı daha geç öldürmesi, yüksek nem ihtiyacı duyması, üretim ve muhafaza maliyetinin yüksek olması ve fungusitlerle birlikte kullanılamaması ise en büyük dezavantajları olarak gösterilmektedir (Sevim ve ark., 2015).

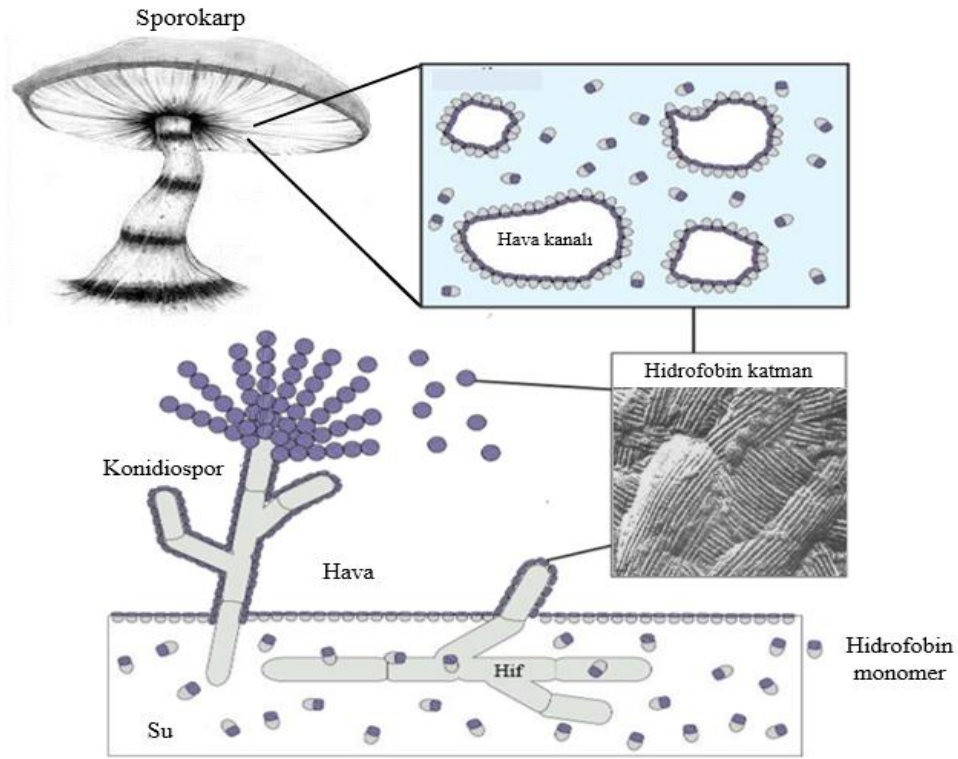
1.3. Hidrofobinler

Hidrofobinler, *Ascomiset* ve *Basidiomiset*'ler gibi çok önemli özelliklere sahip filamentli funguslar tarafından üretilen proteinlerdir (Wösten 2001). Bu proteinler, hidrofilik ve hidrofobik kısımlara sahip amfipatik proteinler olup (Linder ve ark., 2005; Ball ve ark., 2020) büyüme ortamına çözünür proteinler olarak salgılanırlar.

Amfipatik katmanlar oluşturmak için sıvı:hava arayüzünde kendi kendine toplanır ve bu sayede yüzey gerilimini azaltırlar (Şekil 3)(Lugones ve ark., 1999; Lo, 2018).

"Hidrofobin" terimi ilk olarak 1991'de Wessels ve ark.'nın *Schizophyllum commune*'nin hava hiflerinin ve meyve veren cisimlerin oluşumu sırasında ifade edilen Sc1, Sc3 ve Sc4 adlı proteinlerin keşfinin ardından kullanıldı (Lo, 2018).

Interpro veritabanına göre, *Ascomycetes*'ten 428 ve *Basidiomycetes*'ten 1250 olmak üzere toplam 1678 hidrofobin proteini tanımlanmıştır (Kulkarni ve ark., 2017).



Şekil 3. Hidrofobinlerin biyolojik işlevleri (Lo, 2018'den değiştirilerek alınmıştır).

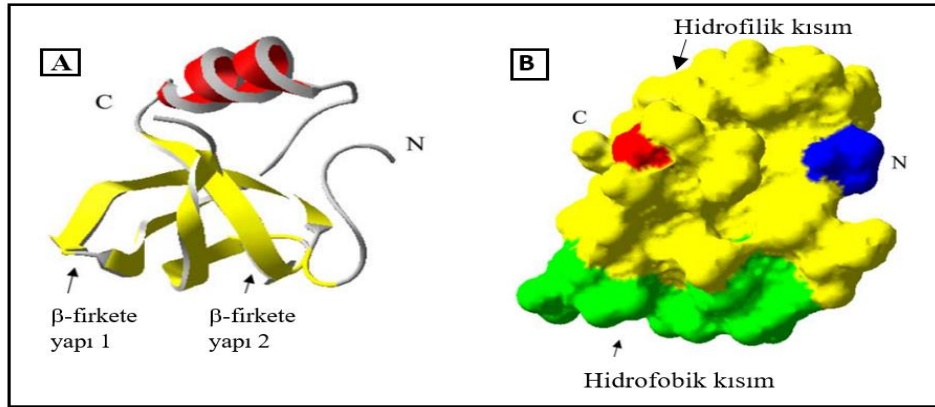
Son çalışmalar, hidrofobinlerin fungusun büyüme ve gelişmesinde çok önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Hidrofobinlerin, fungusun büyüdüğü ortamın yüzey gerilimini azalttığı ve bu ipliksi fungusların hava sporlarını kaplayarak yüzeylerini hidrofobik ve su itici hale getirdiği bildirilmektedir (Hungund ve ark., 2016).

1.3.1. *Ascomycetes* Türlerinde Hidrofobinler

Aspergillus, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Penicillium* ve *Neurospora* cinslerinin birçok türü, endüstriyel bakımdan önemli olan asitler, enzimler, proteinler üretmektedirler. Bu türlerin bazıları aynı zamanda bir veya daha fazla sayıda hidrofobin proteini salgılamaktadır. *Aspergillus* türlerinden hidrofobinlerin sınıfını incelemek için biyoinformatik analizler yapılmıştır. *Aspergillus*'un 8 türünde yaklaşık 74 adet hidrofobin proteini tanımlanmış ve bu proteinlerin çoğunun sınıf I grubuna ait olduğu (sınıf II hidrofobin üreten *A. terreus* ve *A. clavitus* hariç olmak üzere) belirlenmiştir (Kulkarni ve ark., 2017).

Trichoderma cinsinden hidrofobinler genel olarak *T. reesei* (6 gen), *T. virens* (9 gen) ve *T. atroviridis* (10 gen) olmak üzere yüksek gen kopyalı hidrofobinlere sahiptir. *T. reesei*'den hidrofobinler sınıf I ve II olmak üzere endüstriyel uygulama için başarıyla izole edilmiş, karakterize edilmiş ve üretilmiştir. *T. reesei* HFBII yapısının aydınlatılmasıyla, bir hidrofobinin ilk yüksek çözünürlüklü üç boyutlu yapısı görüntülenmiştir (Şekil 4)(Hakanpaa ve ark., 2006).

Cladosporium, *Fusarium* ve *Neurospora* gibi diğer *Ascomycetes* cinslerine ait hidrofobinlerin izolasyonu ve karakterizasyonu son yirmi yıldır devam etmektedir (Kulkarni ve ark., 2017).

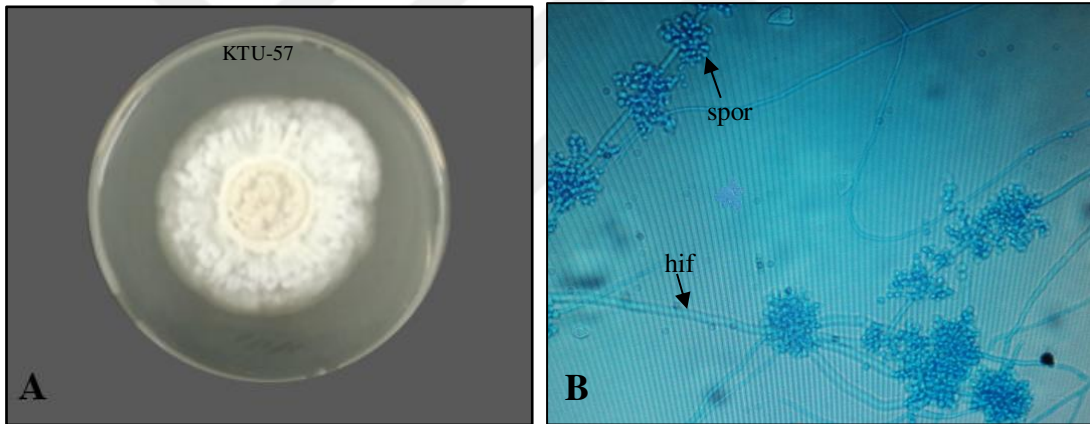


Şekil 4. *Trichoderma reesei* HFBII hidrofobininin yapısı (Kulkarni ve ark., 2017'den değiştirilerek alınmıştır).

1.3.1.1. *Beauveria bassiana* ve Hidrofobinleri

Ascomycota şubesinde yer alan *Beauveria bassiana*, bir EPF'dir. *B. bassiana*, dünyanın ılıman ve tropikal bölgeleri dahil olmak üzere geniş yayılım gösterir ve enfekte olmuş böceklerden, havadan ve topraktan izole edilebilirler (Airaudi ve ark., 1996; Shimazu ve ark., 2002).

B. bassiana kültürde, beyaz bir küf olarak büyür (Şekil 5). Belirgin beyaz spor toplarında birçok kuru ve toz halinde konidia üretir. Her spor topu, konidiyojen hücrelerinin bir kümesinden oluşur. *B. bassiana*'nın konidiyojen hücreleri kısa ve ovaldır ve 'rachis' adı verilen dar bir apikal uzantıyla sonlanır. Her konidium üretildikten sonra rachis uzar ve uzun bir zigzag uzantısı ile sonuçlanır. Konidia tek hücreli, haploid ve hidrofobiktir (Rehner ve ark., 2011).



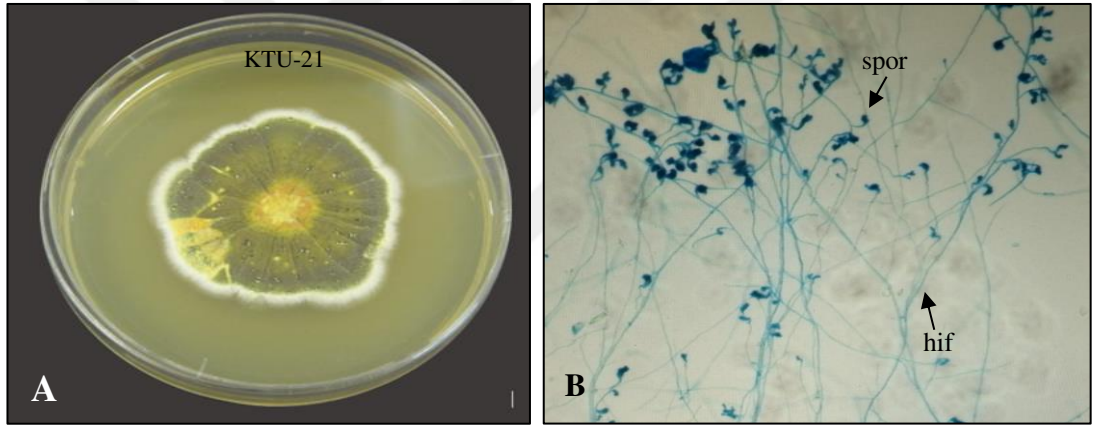
Şekil 5. *B. bassiana* (KTU-57) cinsinin morfolojik özellikleri. A: Koloni morfolojisi; B: Hif ve spor'ların mikroskopik görünümü.

Entomojen filamentli fungus *B. bassiana*, konidiyal hücre duvarının önemli bileşenleri olan iki hidrofobin genini (*hyd1* ve *hyd2*) ifade eder (Zhang ve ark., 2011; Moonjely ve ark., 2018). *B. bassiana*'da, fungus yüzeyini kaplayan hidrofobin proteini ile böcek kütikulası arasındaki hidrofobik etkileşim, fungusun patojenitesinin oluşmasında rol oynar (Zhang ve ark., 2011).

1.3.1.2. *Metarhizium* Türleri ve Hidrofobinleri

Metarhizium, dünya çapında bir çok zararlı böceğe karşı kullanılan Ascomycota sınıfına ait bir fungustur (Goettel ve ark., 2005). Yaklaşık 64,000 türe sahiptir. Bu türlerden bazıları: *Metarhizium brunneum*, *M. flavoviride* ve *M. album*'dür. *M. brunneum*, eski adıyla *M. anisopliae* olarak bilinmektedir (Alkhaibari ve ark., 2016) ve potansiyel bir entomopatojenik fungustur. Bu fungus türünün konidyumları aseptat, silindirik veya ovaldır, genellikle prizmatik veya silindirik sütunlarla kümelenmiş zincirler halinde soluk, parlak yeşil veya sarı yeşil renkli paralel zincirlerden oluşan katı bir kütle oluştururlar (Şekil 6)(Sinha ve ark., 2016).

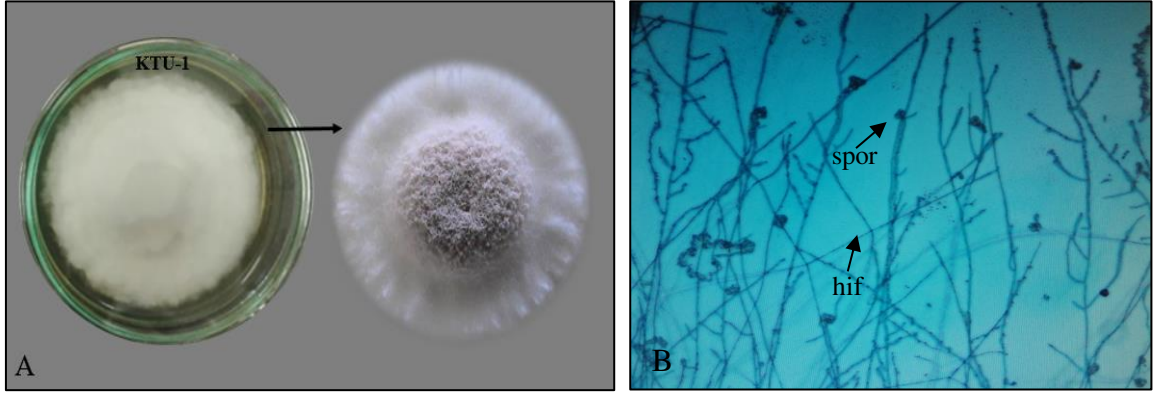
M. brunneum'da bulunan *hyd1* ve *hyd3* genleri, sınıf I hidrofobini kodlarken; *hyd2* geni, sınıf II hidrofobini kodlar (Sevim ve ark., 2012).



Şekil 6. *M. brunneum* (KTU-21) cinsinin morfolojik özellikleri. A: Koloni morfolojisi; B: Hif ve spor'ların mikroskopik görüntüsü.

1.3.1.3. *Isaria fumosorosea* ve Hidrofobinleri

Isaria fumosorosea daha önceleri *Paecilomyces fumosoroseus* olarak bilinen Ascomycota sınıfına ait entomopatojenik bir fungustur (Weng ve ark., 2019). İlk olarak Ukrayna'da şeker pancarı biti *Cleonus punctiventris*'in tek bir larvasından izole edilmiştir. Beyaz koloniler şeklinde büyüyen, sonrasında pembe veya mor tonlara dönüşebilen, hızlı büyüyen bir fungustur (Şekil 7)(Zimmermann, 2008). *Isaria fumosorosea* hidrofobinleri hakkında şimdiye kadar bir labotatuvar çalışması yapılmamıştır (Weng ve ark., 2019).



Şekil 7. *I. fumosorosea* (KTU-1) cinsinin morfolojik özellikleri. A: Koloni morfolojisi; B: Hif ve spor'ların mikroskopik görüntüsü (URL-1, 2021).

1.3.2. *Basidiomycetes* Türlerinde Hidrofobinler

Sporların ve meyve veren gövdelerin yüzeyinde bulunan hidrofobinler, ilk olarak bir *Basidiomycetes* olan *Schizophyllum commune*'den izole edildi. *Schizophyllum commune* hidrofobinleri olan Sc1, Sc3, Sc4 ve Sc6'nın herbiri fungusta farklı bir rol oynamaktadır. Sc3, hem monokaryonlarda hem de dikaryonlarda ifade edilmektedir ve hiflerin büyümesi ve substrat ile bağlanması için su tabakasını kırmada bir role sahiptir. Sc4, sadece dikaryonlarda ifade edilir ve nemli koşullarda meyve veren organların gaz kanallarının su ile dolmasını engeller. Sc1 ve Sc6 hidrofobinlerinin rolleri tam olarak bilinmemektedir (Kulkarni ve ark., 2017).

Basidiomycetes'te, hidrofobin kodlayan genler genellikle 40 üyeye kadar büyük multigen ailelerinden meydana gelir ve türün ekolojik stratejisiyle bağlantılıdır. Fakat hidrofobin gen genişlemesini ve çeşitlenmesini sağlayan nedenler, tam olarak anlaşılamamıştır (Mgbeahuruike ve ark., 2013).

Coprinopsis cinerea, yüksek basidiomycetes funguslarındaki gelişim süreçlerini incelemek için yaygın olarak kullanılan bir model fungustur (Cheng ve ark., 2013). Bu amaçla, *C. cinerea*'daki miRNA benzeri RNA'ların tanımlanması ve fungus gelişiminin erken gelişimsel evrelerindeki ekspresyon modelleri araştırılmıştır. Elde edilen bulgular, doğrulanan miRNA'larda hidrofobin, sitokrom P450, protein kinaz gibi fungusun meyve veren vücut gelişimi ile ilgili genlerin bulunduğunu göstermiştir (Lau ve ark., 2018).

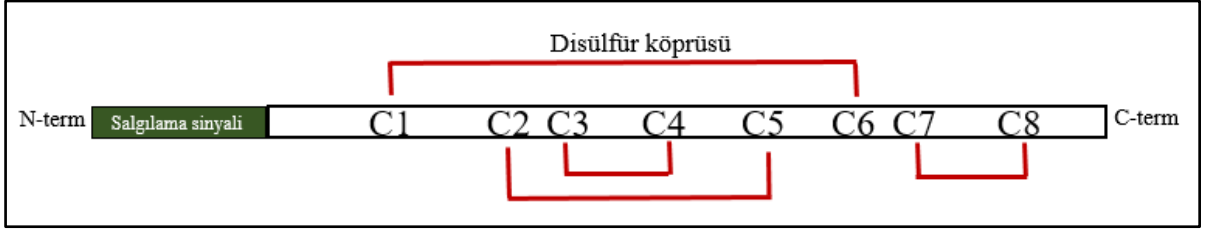
Mutualistik ektomikorizal funguslarda bulunan hidrofobin genleri, konakçı kök hücrelerle simbiyotik arayüzün oluşumunda rol oynar. Yapılan bir çalışmada, ektomikorizal basidiomycetes *Laccaria bicolor* izolatları olan S238N-H82 ve 81306' nın hidrofobin envanteri oluşturması ve konak kolonizasyonu sırasındaki rolleri incelenmiştir. Simbiyotik yaşamda, S238N-H82 *L. bicolor* izolatının 12 genden oluşan hidrofobin gen ailesini kodladığı; 81306 izolatının ise, tümü sınıf I hidrofobinlere karşılık gelen dokuz hidrofobini kodladığı bildirilmiştir (Plett ve ark., 2012).

Diğer bir çalışmada odun aşındıran üç basidiomycetes: *Phlebia brevispora*, *Ganoderma sp.* ve *Bjerkandera adusta*'dan elde edilen hidrofobin genlerinin envanteri ve evrimsel analizi incelenmiştir. Analiz edilen türlerin birçoğunun yüksek derecede dizi benzerliği gösterdiği ve bunun hidrofobinlerin evrimi sırasında gen duplikasyonu (dizi kopyalama)'ndan kaynaklandığı sonucuna ulaşılmıştır (Mgbeahuruike ve ark., 2013).

1.4. Hidrofobinlerin Yapısı

Hidrofobinler, moleküler kütlesi yaklaşık 10 kDa olan ve yaklaşık 100 amino asit içeren küçük, sistein açısından zengin proteinlerdir. Doğada bu proteinler fungusların sporokarplarının dış yüzeyinde bulunur ve onların kuru kalmalarını sağlar (Lugones ve ark., 1996). Tüm hidrofobinler, korunmuş pozisyonlarda sekiz sistein rezidüsü (aminoasit) içerir ve bu sisteinler arasında dört disülfid bağı oluştururlar (Şekil 8). Sistein rezidüleri, proteini çözünür durumda tutmak için önemlidir (Khalesi ve ark., 2015). Sekiz sistein aminoasidi arasındaki disülfid bağları, hidrofobinlerin kararlı yapı oluşturmada etkilidir (Wösten 2001; Hungund ve ark., 2016).

Hem hidrofobik hem de hidrofilik kısımlar içeren bu proteinler, amfipatik proteinler olarak kabul edilir. Hidrofobinlerin amfipatik membranların içerisinde kendiliğinden biraraya gelerek her tipte yüzeylere anında yapışma yeteneği en karakteristik ve göze çarpan özelliğidir. Bunun sonucunda, hidrofilik tarafları ile hidrofil yüzeylere, hidrofobik tarafları ile de hidrofob yüzeylere tutunabilirler (Lugones ve ark., 1996; Zeren ve ark., 2018). Bu özelliklerinden dolayı yüzey kaplamaları, biyosensörler, rekombinant proteinlerin saflaştırma basamaklarında ve kendi kendini temizleyen yüzeyler gibi birçok endüstriyel uygulamada önemli rol oynarlar (Kulkarni ve ark., 2017; Albayrak, 2019).

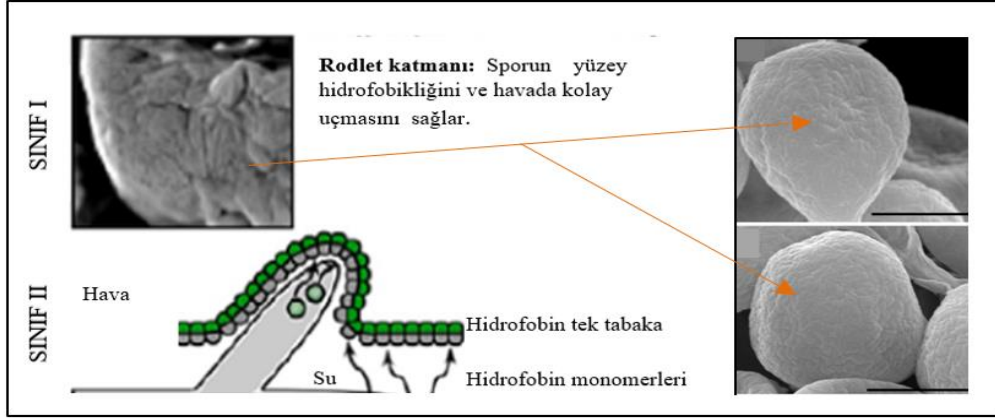


Şekil 8. Hidrofobin polipeptidinin primer dizisi. Yapıları korunmuş bir modelde dört disülfür köprüsü oluşturan, sekiz sisteinden (C) oluşan bir modelle karakterize edilir (Gandier ve Master, 2018).

1.5. Hidrofobinlerin Sınıflandırılması

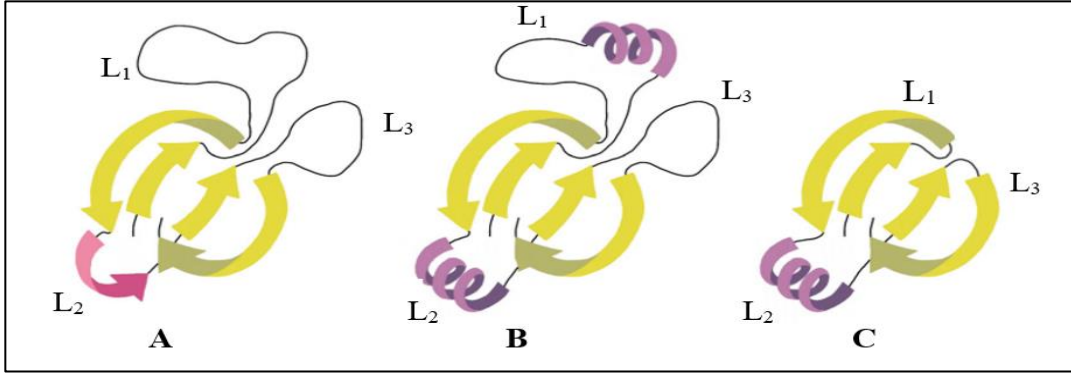
Sistein dağılımına ve hidrofobik ve hidrofilik amino asitlerin kümelenmesine bağlı olarak, hidrofobinler sınıf I ve sınıf II'ye ayrılır. *Ascomycetes*'ler her iki sınıfa ait hidrofobin proteinlerini ifade ederlerken; *Basidiomycetes*'ler sadece sınıf I hidrofobinleri üretirler (Kulkarni ve ark., 2017; Zeren ve ark., 2018).

Sınıf I hidrofobinler, sıklıkla konidia (spor) üzerinde bulunan karakteristik bir rodlet (amiloid) yapısı oluştururken (Pennacchio ve ark., 2018); sınıf II hidrofobinler, hava-su arayüzlerinde amfipatik filmler oluşturur (Zhang ve ark., 2011). Sınıf I hidrofobinlerde konidia'nın hidrofobik dış protein tabakası, rodletler olarak bilinen sıkıca paketlenmiş fibriler yapılardan meydana gelir (Şekil 9)(Pennacchio ve ark., 2018). Rodletler, ilk olarak *Penicillium megasporum* konidilerinin elektron mikroskobu çalışmaları sırasında rapor edilmiştir. Sonraki çalışmalarda ise *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Neurospora* ve *Beauveria bassiana* türlerinde ve diğer pek çok türün sporları üzerinde de karakterize edilmiştir (Zhang ve ark., 2011; Pennacchio ve ark., 2018). *Ascomycota* kökenli *EAS* (*Neurospora crassa*), *Dew A* (*Aspergillus nidulans*) ve *mpg1* (*Magnaporthe grisea*) sınıf I hidrofobinlerinin yüksek çözünürlüklü üç boyutlu protein yapıları aydınlatılmıştır (Pham ve ark., 2016). Bir *Basidiomycetes* olan *Schizophyllum commune* *Sc16*'dan sınıf I hidrofobin, yapısı aydınlatılan hidrofobinlerdendir (Gandier ve ark., 2017).



Şekil 9. Sınıf I ve sınıf II hidrofobinlerin morfolojik yapıları. *B. bassiana* izolatına ait konidial sporlarının taramalı elektron mikroskobu görüntüleri.

Hidrofobinlerin kendi kendine toplanmasına konformasyonel değişiklikler eşlik eder. Monomerik sınıf I ve sınıf II hidrofobinler, β -tabaka yapısı bakımından zengindir ve her iki hidrofobin sınıfı da disülfid bağlarının varlığından dolayı dört β -tabaka çekirdek yapısına sahiptir (Kwan ve ark., 2006). Sınıf I hidrofobinler su-hava arayüzünde daha fazla β -tabaka yapısı elde ederken, su ile hidrofobik bir katı arasındaki arayüzeyinde ise, artan α -sarmallı bir yapı oluştururlar (Wösten, 2001). Dolayısıyla α -sarmal hali, kendi kendine bir araya gelmenin bir ara maddesi gibi görünürken, β -tabaka hali, kararlı son formu oluşturur. Su-hava arayüzünde sınıf I hidrofobinlerin monomerleri, saniyeler içinde α -sarmal duruma ulaşırken, β -tabaka durumuna dönüşüm çok daha yavaştır ve dakikalar hatta saatler sürer. Sınıf II hidrofobinler, L_1 ve L_3 olmak üzere iki kısa ilmek içerirler ve L_2 ilmeğinde, α -sarmal yapısı bulunur (Şekil 10). Sınıf I hidrofobinlerindeki L_1 , sınıf II hidrofobinlere kıyasla daha büyüktür (Ren ve ark., 2013a). Ayrıca sınıf I hidrofobinlerin ilmeklerinin uzunluğu ve yapısı bakımından sınıf II hidrofobinlere göre farklılık gösterir (Wösten, 2001; Kwan ve ark., 2006). Her iki hidrofobin sınıfının katlanma mekanizmaları birbirinden farklıdır, α -sarmal ve β -tabakaların bulunma oranları hidrofobin sınıfına ve proteinin lokasyonuna bağlı olarak değişir (Wösten 2001; Albayrak, 2019).



Şekil 10. Sınıf I (a,b) ve sınıf II (c) hidrofobinlerin üç boyutlu yapıları (Wosten ve Scholtmeijer, 2015'ten alınmıştır).

Hidrofobinler, hidrofilik-hidrofobik arayüzlerde amfipatik membranlarda kendiliğinden toplanırlar. Hidrofobin membranın, bir tarafı orta ile yüksek seviyede hidrofilik iken, diğer tarafı teflon veya parafin kadar hidrofobik bir yüzey özelliği gösterir (Lugones ve ark., 1996). Sınıf I hidrofobinler tarafından oluşturulan membranlar, 100°C sıcaklığa ve %2 sodyum dodesil sülfata (SDS) direnç gösterirler. Bu sınıftaki hidrofobinler, sadece formik asit ve trifloroasetik asit (TFA) gibi kuvvetli asitlerde çözünürler. Buna karşılık sınıf II hidrofobinlerden olan *Ophiostoma ulmi*'nin cerato-ulmin (CU) hidrofobini ile *Cryphonectria parasitica*'nın cryparin (CRP) hidrofobini %60 etanolde ve %2 SDS'de kolayca çözünür (Tablo 1). Ayrıca CU'nun basınç uygulanarak ve soğutularak da ayrıştığı bildirilmiştir (Wösten, 2000).

Tablo 1. Sınıf I ve sınıf II hidrofobinlerin belirgin özellikleri

Sınıf I hidrofobinler	Sınıf II hidrofobinler
Yalnızca kuvvetli asitlerde (formik asit veya %100 TFA gibi) çözünebilen, %2 sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisinde kaynamaya direnen, çözünmeyen gruplar üretirler.	Etanol veya sodyum dodesil sülfata (SDS) daha kolay çözünebilen gruplar üretirler.
100-125 aminoasitten oluşur.	50-100 aminoasit kalıntısı içerir, daha kısadır.
Sınıf I hidrofobinler, <i>Basidiomiset</i> ve asklı mantarlar'da tespit edilmiştir.	Sınıf II hidrofobinler, sadece asklı mantarlar'da tespit edilmiştir.
Amiloid fibriller (bozunmaya dirençli çözünmez lifler-Rodletler) oluştururlar.	Amiloid fibriller oluşturmazlar.
Her iki sınıf, sekiz sistein rezidüsü ve 4 disülfür köprüsü içerir (ortak özellik).	

Hidrofobin sınıfları sekiz sistein dizisine sahip olmaları ve aynı sisteinler arasında disülfid bağları oluşturmalarıyla benzer özelliklere sahip olsalar da sistein dizileri arasında farklı uzunlukta aminoasit dizileri bulundurulur (Tablo 2) (Mgbeahuruike ve ark., 2013). Her iki sınıf da, iki kısımdan oluşur ve 1-4 sisteinleri arasındaki bölge birinci kısmı ve 5-8 sisteinleri de ikinci kısmı oluşturur. Bu iki kısım, sınıfların hidropati özelliklerini ifade eder (Wosten ve de Vocht, 2000; Khalesi ve ark., 2015). Her iki hidrofobin sınıfında yüklü aminoasitler bir tarafta yüklü olmayan aminoasitler diğer tarafta olacak şekilde yerleşmişlerdir ve bu durum, hidrofobinlerin amfipatik yapısını oluşturmuştur (Kwan ve ark., 2006; Ren ve ark., 2013).

Tablo 2. Hidrofobin sınıflarına göre korunmuş sisteinler arasındaki aminoasit farklılıkları (Mgbeahuruike ve ark., 2013)

Sınıf	Korunmuş Sistein Dizileri Arasında Kalan Amino Asit Sayıları				
	C ₁ /C ₂	C ₃ /C ₄	C ₄ /C ₅	C ₅ / C ₆	C ₇ / C ₈
Sınıf I (<i>Basidomiset</i>)	6	26-33	12-13	6	13
Sınıf I (<i>Askomiset</i>)	6-7	26-39	18-21	6-8	15-17
Sınıf II (<i>Askomiset</i>)	9-10	11	15-16	2-7	10

1.6. Funguslarda Hidrofobinlerin Roller

Fungusun yaşam döngüsünün farklı aşamalarında, farklı hidrofobinler ifade edilir. Bunlar funguslardan salgılanır, hiflerin hücre duvarında toplanır, sporların ve hava hiflerinin yüzeylerini kaplar. Son çalışmalar, fungusun büyümesi ve gelişimindeki çeşitli fonksiyonların, hidrofobinler tarafından gerçekleştirildiğini göstermiştir. Bu fonksiyonların çoğu, hidrofobinlerin yüzey aktivitesi ile ilgilidir (Khalesi ve ark., 2015; Ball ve ark, 2020). Bunlar;

1. Havada büyümeye izin vermek için yüzey gerilimini düşürürler. Böylece fungusların su-hava arayüzünü aşmasına ve hif gibi hava yapıları üretmesine izin verirler (Wösten, 2001).

Nemli bir substratta büyüyen hif duvarının yüzeyi hidrofilik iken, hava hiflerinin ve havadaki sporların hücre duvarı yüzeyi, hidrofobiktir. Hücre duvarının yüzey özelliklerindeki bu temel değişiklik, hidrofobinlerin salgılanmasıyla sağlanır. Hava yapılarının ucunda gelişen sporlar, yüzeylerini hidrofobik hale getiren ve ıslanmaya direnen, böylece havada etkili dağılmayı kolaylaştıran bir amfipatik hidrofobin tabakası ile kaplanır. Hidrofobin tabakası güçlü bir şekilde hidrofobik olup, su penetrasyonunu ve buna bağlı olarak su birikmesini önlemek üzere hareket eder ve gaz değişimine karşı oldukça geçirgendir (Sunde ve ark., 2008).

2. Konağa nüfuz etmek için appresorium oluşumunu gerçekleştirirler. Başarılı bir penetrasyon için patojenin konağa bağlanması gerekir. Hidrofobin tabakaları, hidrofobik yüzeylere yapışmayı ve tutunmayı sağlar (Wang ve ark., 2010). Patojen konak ilişkisinde ve simbiyoz yaşamda iki canlının gelişmesi için bu özellik, elzemdir. Örneğin; bir böcek patojeni olan *Beauveria bassiana* sporları ile böcek kitin tabakası arasındaki hidrofobik etkileşim, hidrofobin proteinleri ile sağlanır. Ayrıca, bitki patojeni *Magnaporthe grisea*'da üretilen *mpg1* hidrofobin geni, fungusun bitki ile etkileşimini sağlayan appresorium oluşumunda görevli olduğu bildirilmiştir (Talbot ve ark., 2011; Albayrak, 2019).

3. Fungusun dış yüzeyini (sporokarp) ve sporlarını, ıslanmaya ve kurumaya karşı korurlar (Khalesi ve ark., 2015). Suyun nüfuz etmesini engellerler fakat hava kanallarıyla gaz geçişine izin verirler. Bu sayede hücrelerin dayanıklılığını arttırarak yaşamlarının devam etmesinde rol oynarlar (Sunde ve ark., 2008).

4. Sporların yüzeyindeki tek katmanlı hidrofobinler, bağışıklık sisteminden gizlenmede kritik rol oynar. Hidrofobin tabakası immün hücreleri tarafından patojen olarak algılanmayı engeller ve konak bağışıklık sistemi hücrelerini aktiveleştirmez (Wösten, 2001).

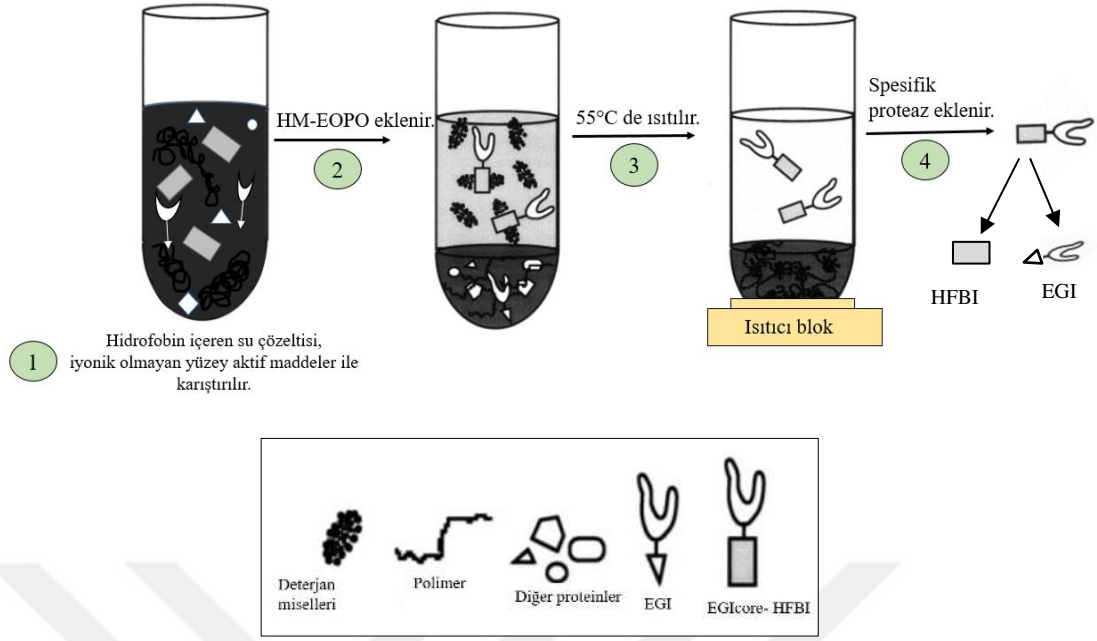
1.7. Hidrofobinlerin Biyoteknolojik Uygulamaları

Hidrofobinler öztoplanma yapabilme, güçlü asitlerde çözünebilme, yüzey özelliklerini değiştirebilme özelliklerinden ve surfaktant olmalarından dolayı birçok biyoteknolojik uygulamada kullanılabilme potansiyeline sahip olan, küçük boyutlu amfipatik proteinlerdir (Piscitelli ve ark., 2017; Albayrak, 2019). Amfipatik membranların içerisinde kendiliğinden biraraya gelerek her tipte yüzeylere anında yapışma yetenekleri sayesinde hidrofilik tarafları ile hidrofil yüzeylere, hidrofobik tarafları ile hidrofob yüzeylere tutunabilirler (Lugones ve ark., 1996; Zeren ve ark., 2018). Tutundukları malzemeler üzerinde katmanlar (10nm)

oluşturabilme (Wessels, 2000) yeteneklerinden dolayı, üzerinde birleştiği yüzeyin özelliklerini değiştirebilir ve bağlanma özelliklerini kontrol edebilirler (Bimbo, 2011). Bu özelliklerinden dolayı yüzey kaplamaları, biyosensörler, rekombinant proteinlerin saflaştırma basamaklarında, üretim proseslerinde köpük oluşumunun engellenmesinde ve kendi kendini temizleyen yüzeyler gibi birçok endüstriyel uygulamada önemli rol oynarlar (Kulkarni ve ark., 2017).

1.7.1. Sulu İki Fazlı Sistemlerdeki (ATPS) Saflaştırmalarda Hidrofobinler

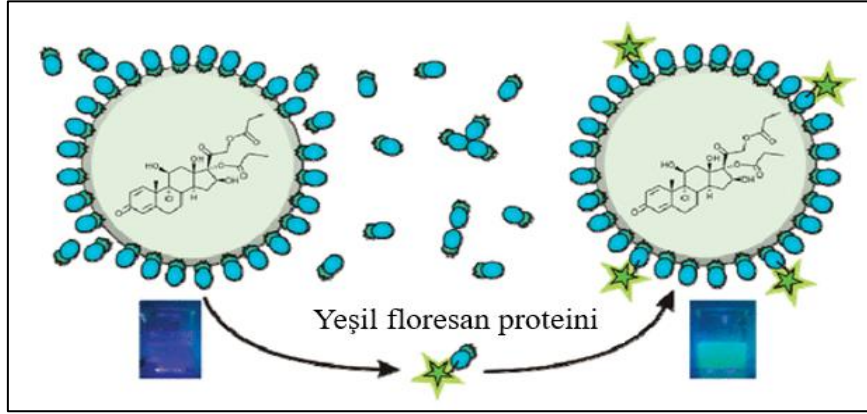
Hidrofobinler, sulu iki fazlı sistemlerde (ATPS) yüksek ayrılma davranışı gösterirler. Örneğin; *T. reesei*'nin hem HFBI hem de HFBII hidrofobinleri özellikle HFBI içeren bir su çözeltisi, değişen uzunluklarda hidrofilik ana gruplara sahip iyonik olmayan yüzey aktif maddelerle karıştırıldığında hidrofobin proteinleri, iyonik olmayan yüzey aktif madde fazından ayrılır. ATPS bu nedenle, hidrofobinlerin seçici saflaştırılması için mükemmel bir teknik sağlar. ATPS'deki verimli ayırma nedeniyle hidrofobinler, ilgili rekombinant proteinlerin seçici saflaştırılmasında füzyon ortakları olarak da kullanılabilir (Collen ve ark., 2002). Örneğin; *T. reesei*'nin endoglukanaz EGI'si bir füzyon partneridir (Linder ve ark., 2004). Bu proteinin fungus tarafından üretilen hücre dışı protein karışımından saflaştırılması füzyon proteini olmadan zordur. Yaklaşık 40 kDa büyüklüğünde olan, bir katalitik çekirdek ve bir selüloz bağlanma domaini (CBD)'nden oluşan EGI proteininin C terminaline, N teminalinde iki CBD bulunan HFBI proteini bağlanır. Hidrofobinlerin ATPS'deki yüksek ayrılma kabiliyetlerinden dolayı EGI-HFBI, diğer proteinlerden ayrılır. Füzyon proteinleri neredeyse sadece üst (yüzey aktif madde) fazdan geri kazanılırken, diğer hücre dışı proteinler (endojen EGI dahil) ve hifler alt (sulu) fazda toplanır (Collen ve ark., 2001). Bu çok alanlı moleküllerin iyi ayırma özellikleri ve EGI kısmının değişmeden kalması, hidrofobin füzyon proteinlerinde alan katlanmasının doğru bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Son olarakta, spesifik proteazlar kullanılarak EGI füzyon partneri, hidrofobin proteininden ayrılabilir (Şekil 11) (Collen ve ark., 2002). Diğer bir çalışmada ise Reuter ve ark. (2017), Transferrin ve HFBI, HFBII ve HFBIV proteinlerini kullanarak ürettikleri füzyon ürünleriyle silikon nanopartiküllerini kaplayarak, *in vitro* koşullarda MDA-MB-231 hücre hattında etkinliği denendiğinde, etkili bir biçimde hücrenin Tf reseptörleri aracılığı ile bu partikülleri aldığını belirlemişlerdir.



Şekil 11. Sulu iki fazlı sistemlerde hidrofobin ve hidrofobin füzyonlarının saflaştırılması (Collen ve ark., 2002'den değiştirilerek alınmıştır).

1.7.2. İlaç Çözünürlüğünde ve Taşınımında Hidrofobinler

Hidrofobinler, amfipatik özelliklerinden dolayı hidrofobik ilaçları formüle etmek için kullanılabilecek önemli adaylardır (Akanbi ve ark., 2010). Yapılan bir çalışmada, çok küçük boyutlardaki ilaç formülasyonlarının istenen vücut bölgelerine etkili bir şekilde verilmesini sağlamak için hidrofobin proteinleri kullanılmış, küçük boyutlardaki ilaçların yüzey alanları artırılarak ilacın vücutta istenilen bölgeye etkisinin artırılması sağlanmıştır. Çalışmada, ilacın yüzeyinin hidrofobin ile kaplandığını takip edebilmek için hidrofobin geni, GFP (yeşil floresans proteini) ile etiketlenmiştir (Şekil 12). Aynı zamanda hidrofobin proteinleri ile ilacın yüzey özellikleri etkilenecek, düşük çözünürlükteki ilaçların vücuttaki çözünme özellikleri artırılabilir (Hanna ve ark., 2010). Diğer taraftan hidrofobinler, organik çözücülerde daha etkili olan enzimler için hem yağlı hem de sulu ortamda kapsülleme ajanı olarak hizmet edebilir ve böylece ortamın değişimini kolaylaştırabilirler (Hahl ve ark., 2017).



Şekil 12. GFP ile etiketli hidrofobinlerle ilaç kaplanması (Hanna ve ark., 2010'dan alınmıştır).

Sc3 hidrofobini, hidrofobik cyclosporine A ve nifedipine ilaçlarının süspansiyonlarına katıldığında, bu ilaçların biyoyararlanımları 4 ila 6 kat arasında arttırılmıştır (Akanbi ve ark., 2010). Ayrıca hidrofobin Sc3, farelerle yapılan iki tümörlü (sarkoma ve melanoma) kanser modellerinde güçlü bir anti-tümör etkiye sahiptir (Akanbi ve ark., 2013). Sc3 ile tedavi, hücrel bağışıklık cevabını uyarmış ve herhangi bir toksik etki göstermemiştir. Bu sayede hidrofobinlerin kemoterapi ve radyasyonla beraber adjuvan olarak faydalı olabildiği, hidrofobinlerin anti-kanser ilaçlarının formülüne eklenebildiği ve kanser hücrelerine spesifik hedefleme yapmak için hidrofobin içeren moleküller üretilebildiği belirtilmiştir (Wosten and Scholtmeijer, 2015).

Bimbo ve ark. (2011), gözenekli silikon (PSİ) partiküllerini HFBII proteini ile kaplayarak ilaç salınımindan ödün vermeden bu proteinin, partiküllerin biyoyuurluluğunu iyileştirdiğini gözlemlemişlerdir. Ayrıca HFBII'nin pH arttıkça partiküllerin yüzeyinden kısmen ayrıldığı sonucuna varmışlardır.

1.7.3. Yüzey Modifikasyonlarında Hidrofobinler

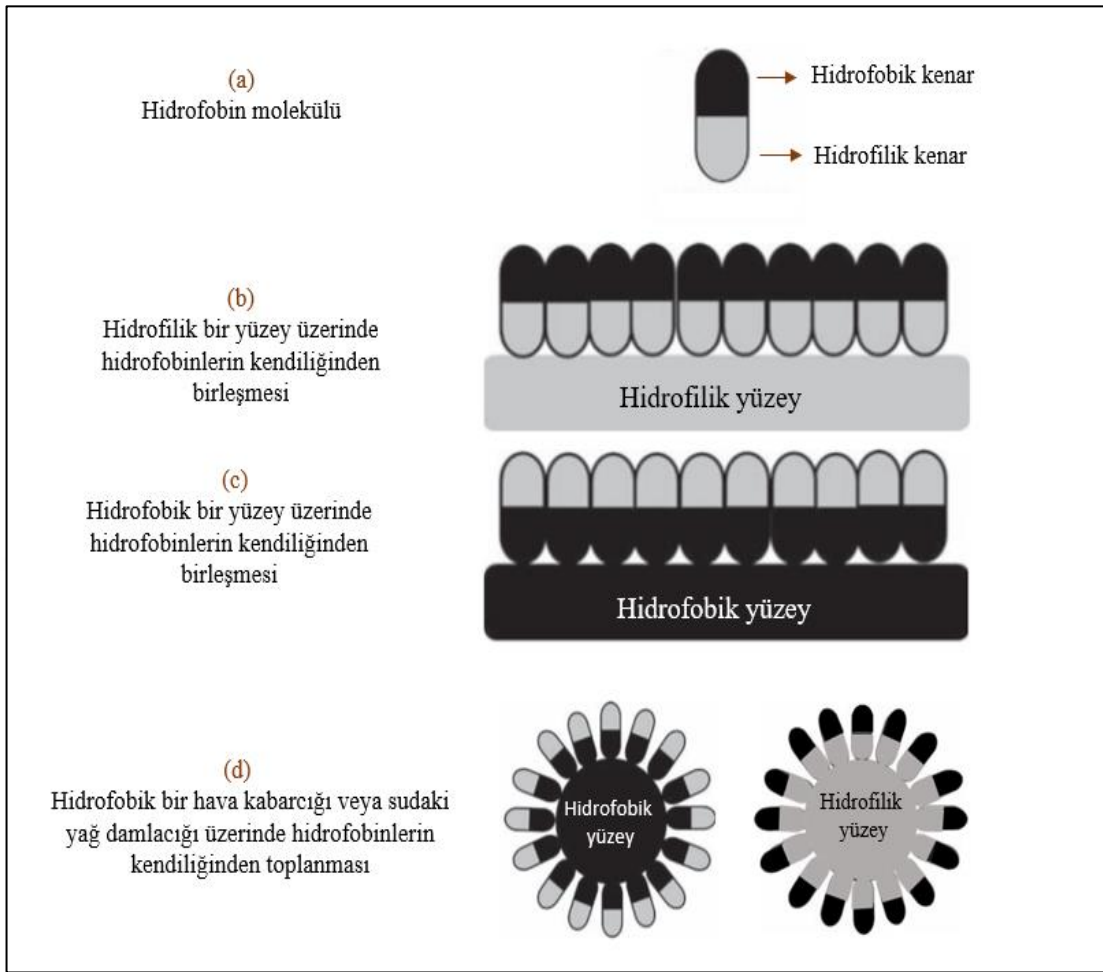
Hidrofobinlerin amfipatik bir membranda kendiliğinden toplanarak her tür yüzeye anında yapışma kabiliyetleri, hidrofilik ve hidrofobik tarafa sahip özel iki işlevli moleküler yapılarından kaynaklanmaktadır (Janssen ve ark., 2004). Bu biyofonksiyonel özellikleri sayesinde, çeşitli yüzey uygulamalarında kullanımları mümkün olmaktadır. Bu proteinler,

yüzeye adsorbe olduktan sonra konformasyonel değişim göstermeye yatkın olmadıkları için yüzey uygulamalarında tercih edilebilmektedir (Linder ve ark., 2005).

Diğer taraftan, hidrofobinlerin küçük molekülleri, proteinleri veya enzimleri bir yüzey üzerinde hareketsiz hale getirme yeteneği ve algılama sırasında gelişmiş hassasiyete izin vermesi, onların biyosensörlerin geliştirilmesinde kullanılmalarına olanak tanımaktadır (Della Ventura ve ark., 2016).

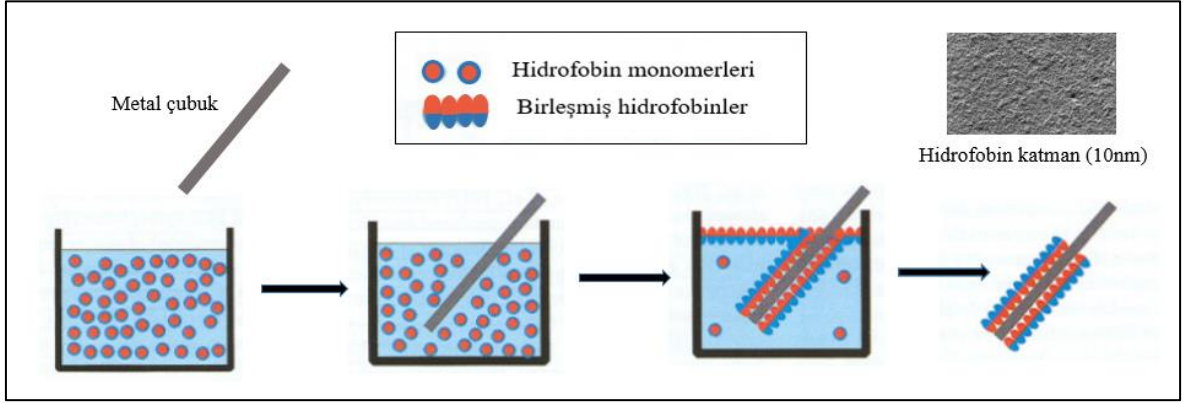
Hidrofobinler, öztoplanma yapabilme ve sıvı-sıvı, katı-sıvı ara yüzlerinde tek katmanlı tabaka oluşturabilme özelliklerinden dolayı ince film oluşturmada önemli adaydırlar. Santhiya ve ark. (2010), DewA hidrofobiniyle yaptıkları silikon kaplamanın 90°C'ye kadar dayanıklı olduğunu ve suyun değme açısının kaplama sonrasında 0°C'den 67°C'ye yükseldiğini belirlemişlerdir.

Hidrofobinler, yüzeylerin hidrofilitesini değiştirebildiği yani hidrofob bir yüzeyi hidrofil hale getirebildiği gibi tam tersi özellik de sağlayabilirler (Mahltig, 2015). Örneğin; tekstil malzemesinin özelliklerine bağlı olarak hidrofobinin hidrofobik ve hidrofilik kısmı yüzey üzerine yerleşir, karşıt özelliğe sahip olan kısım üst kısımda kaldığından tekstil malzemesi bu özelliği kazanmış olur (Zeren ve ark., 2018) (Şekil 13).



Şekil 13. Çeşitli hidrofilik ve hidrofobik substratlar üzerinde, hidrofobinlerin yapışması ve kendi kendine montajı (Opwis ve Gutmann, 2011'den alınmıştır).

Diğer bir çalışmada Wessels (2000), teflon bir çubuğu Sc3 hidrofobinlerinin bulunduğu su dolu bir kaba daldırmıştır. Teflon çubuğun hidrofobik yüzü, Sc3 hidrofobinlerinin hidrofobik yüzeyi ile birleşmiş ve başlangıçta hidrofobik olan teflon yüzeyi, çubuğun çözeltiden çıkarılmasından sonra hidrofilik hale gelmiştir. Çubuğun yüzeyi 10nm kalınlığında hidrofobin proteinleri ile kaplanmış ve bu kaplamanın sıcak deterjanlar ile muamelesinden etkilenmediği sonucuna varılmıştır (Şekil 14).



Şekil 14. Teflon çubuğun Sc3 hidrofobinleri ile kaplanması (Teflon çubuğun kalınlığı:100nm) (Wessels, 2000'den değiştirilerek alınmıştır).

1.7.4. Alkollü ve Gazlı İçeceklerde Meydana Gelen Köpürme Olayında Hidrofobinlerin Rolü

Gazlı içecek şişelerinin açılmasından hemen sonra meydana gelen kontrolsüz sıvı çıkışı veya aşırı köpüklenme olayı, istenmeyen bir durumdur (Sarlin ve ark., 2011). Bu tür içeceklerde fişkırmaya olayı, birincil ve ikincil gruplara ayrılmıştır. Birincil fişkırmaya, hammaddenin düşük kalitesinden yani fungus kontaminasyonundan kaynaklanırken; ikincil fişkırmaya, teknolojik faktörlerden kaynaklanmaktadır (Lutterschmid ve ark., 2010). Birincil fişkırmada malılamada kullanılan arpanın kalitesi çok önemlidir (Linder ve ark., 2005) ve özellikle arpanın *Fusarium*, *Nigrospora* ve *Trichoderma* gibi fungus patojenleri ile kontamine olduğu yıllarda ortaya çıkmaktadır (Khalesi ve ark., 2015). Bu funguslara ait hidrofobinlerin 0,003 ppm'lik konsantrasyonları, kuvvetli bira fişkırmasını indüklediği bildirilmiştir. Sarlin ve ark. (2011), arpanın *Fusarium* enfeksiyonu tarafından indüklenen yüksek fişkırmaya potansiyeline sahip olduğunu ve fişkıran bileşenlerin amfipatik özellik gösterdiğini vurgulamışlardır. İlk karakterize edilen fişkıran indükleyicinin 16,5 kDa olduğu, 8 disülfür köprüsü içerdiği ve güçlü yüzey aktivitesi olan bir polipeptit olduğu rapor edilmiştir. Daha sonra bunların sınıf II hidrofobin dimerleri olduğu belirtilmiştir. Fişkırmayı tetiklemek için sınıf II hidrofobinlerin hidrofofik yaması, gaz halindeki CO₂ molekülleri ile etkileşime girmekte ve sınıf II hidrofobin membranı tarafından CO₂ nano kabarcıkları oluşturulmaktadır. Gazlı içeceklerin şişesi açıldığında ise bu nano kabarcıklar patlayarak enerji salınımına neden olabilmektedir (Linder ve ark., 2005).

1.7.5. Protein İmmobilizasyonunda Hidrofobinler

Hidrofobinler, geleneksel yüzey modifikasyon yöntemleri için kovalent olmayan bir alternatif sunarlar ve proteinlerin yüzeylere adsorbe olmalarını sağlarlar. Bir substrata adsorbe edilen hidrofobinler, proteinleri immobilize etmek için kullanılabilir (Wösten and Scholtmeijer, 2015). Örneğin; sınıf I hidrofobinler, sadece güçlü asitlerde çözülebilen kimyasal olarak sağlam katmanlar (rodletler) oluştururlarki bu katmanlar, farklı yüzeylere yapışarak yüzeylerin ıslanabilirliklerini değıştirirler ve diğier proteinlerin bu yüzeylere bağlanmasına izin verirler (Piscitelli, 2017). Benzer şekilde, MALDI çelik numune yükleme plakalarının hidrofobin Vmh2 ile kaplanması, denature ediciler ve tuzların varlığında, protein ve peptit karışımlarının verimli bağlanmasını sağlayarak proteomik uygulamalara uygun, basit ve etkili bir tuz giderme yönteminin elde edilmesine imkan tanımıştır (Longobardi ve ark., 2014; Wösten and Scholtmeijer, 2015). Diğier bir çalışmada, endüstriyel fungus *Aspergillus oryzae* PBSA içeren bir ortamda büyütüldüğünde, *A. oryzae*'de bulunan RolA hidrofobini yüksek oranda üretilerek elde edilen sonuç, immün boyama ile doğrulanmıştır. Aynı koşullar altında *A. oryzae*, eş zamanlı olarak PBSA'yı hidrolize eden kütinaz I (CutI)'i üretti. PBSA'nın RolA ile ön inkübasyonu, PBSA'nın kütinaz I tarafından hidrolize olmasını engellemiştir. Bu durum, PBSA yüzeyine bağlı RolA'nın gerekli olduğunu göstermiştir. Dolayısıyla immün boyama, RolA ile kaplanmış PBSA filmlerinin kütinaz I' i spesifik olarak adsorbe ettiğini ortaya çıkarmıştır (Takahaski, 2005).

1.7.6. Yapay Materyal Üretimi

Hidrofobinler, sentetik yüzeyleri değıştirmede dikkate değier bir yetenek sergileyen filamentli mantarlar tarafından salgılanan, amfipatik proteinlerdir (Wosten, 2001). Cerrahi müdahalelerde ve çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılan alet ve cihazların, doku hasarını en aza indirmek ve cihazın uzun süreli kullanımını sağlamak için düşük sürtünmeli yüzeyler büyük önem taşımaktadır. İstenilen yüzeyleri sağlamak amacıyla sıklıkla ya cihazın yapımında floropolimerler kullanılmakta ya da yüzeyin kayganlığını sağlamak amacıyla silikon yağı, gliserin, jöle gibi malzemeler kullanılmaktadır. Bunlar, başlangıçta düşük yüzey gerilimi sağlasalar da, zayıf adhezyon kuvvetlerinden dolayı performanslarını uzun süre koruyamazlar. Bu amaçla yapılan çalışmada, Sc3 hidrofobini ile kaplanan yüzeylerde oluşan

yüzey sürtünme değerinin, diğer materyallere göre %50-80 arasında azaltıldığı açıklanmıştır (Misra ve ark., 2006). Yapılan diğer bir çalışmada, aşınmış dişleri yeniden onarmak için proteinler ve peptitlerden oluşan biyomimetik bir yaklaşım sergilenmiştir. Deneyde, dişlerde yeniden hidroksiapatite oluşumunu sağlamak için, içlerinde iki tane hidrofobin füzyon proteini yer alan çeşitli proteinlerin bağlanma ve çekirdeklenme aktiviteleri incelenmiştir. 27 aday üzerinde yapılan bu çalışmada, hidroksiapatitin DewA-4,5 hidrofobinleri ile birlikte çekirdeklenme yaparak dokuda iyileşme sağladığı belirtilmiştir (Melcher ve ark., 2016).

1.8. Hidrofobinlerin Orta Ölçekte Üretimi

Hidrofobin'lerin geniş uygulama yelpazesi, bu proteinlerin başarılı bir şekilde üretilmesi ve saflaştırılması için daha fazla araştırmaya duyulan ihtiyacın altını çizmektedir. Ancak, bu proteinlerin üretimi bugüne kadar laboratuvarın ötesine geçmemiş ve bu da endüstriyel uygulamaları olumsuz etkilemiştir (Wohlleben ve ark., 2010; Kulkarni ve ark., 2017). Hidrofobinlerin fungus yaşam döngüsünde gerçekleştirdikleri rollerinin biyolojik mekanizmasının anlaşılması, hidrofobin üretiminin gelişmesine yardımcı olacaktır.

Hidrofobinlerin verimini artırmak için bazı stratejiler kullanılmaktadır (Kulkarni ve ark., 2017). Bunlar; doğal habitattan fungusların kullanılması, diğeri ise hidrofobin'lerin hücre içi ekspresyonu için rekombinant DNA teknolojisi'nin kullanılmasıdır.

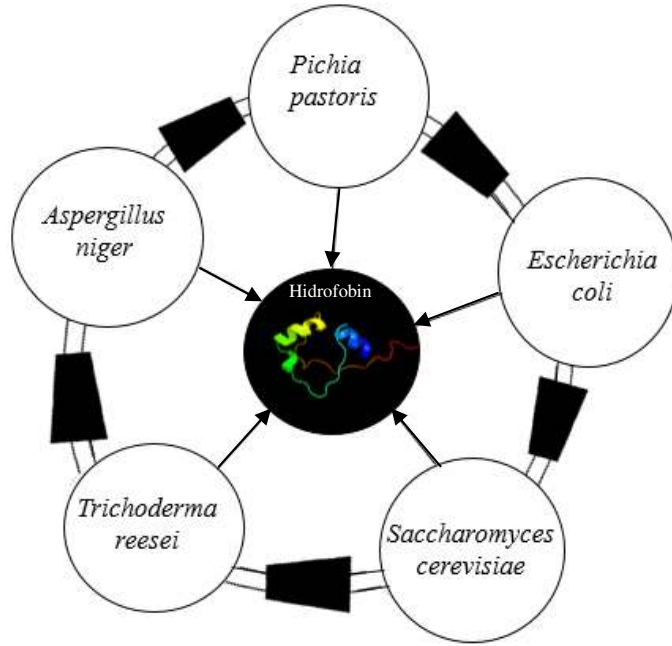
1.8.1. Doğal Fungusların Kullanılması ile Geleneksel Hidrofobin Üretimi

Hidrofobinler, doğal funguslarda sadece miligram miktarlarında bulunur (Wohlleben ve ark., 2010). Doğal funguslardan hidrofobinlerin fermentatif üretimi, çalışma sürelerinin fazla olması ve kontaminasyonların sık olarak gerçekleşmesinden dolayı (Kulkarni ve ark., 2017) rekombinant yöntemlere göre daha az tercih edilmektedir. Bu yöntem ile hidrofobin üretimi, sıvı (batık) kültür fermantasyonu ve katı hal fermantasyonu (SSF) olmak üzere iki şekilde yapılmaktadır (Rocha-Pino ve ark., 2015). SSF ile mikroorganizmaların düşük nem içeriğine sahip katı bir substrat üzerinde büyümesi sağlanırken; sıvı kültür yani daldırılmış fermantasyon ile mikroorganizmaların % 95'ten fazla su içeriğine sahip sıvı bir ortamda kültivasyonu sağlanır. SSF, fungusların karasal habitatlarındaki yaşam koşullarını taklit ettiğinden hidrofobin üretimi için ideal olmakla beraber sıvı kültürde hidrofobin üretimi,

düşük seviyelerdedir (Kulkarni ve ark., 2017). Vigueras ve ark. (2014), *Purpureocillium lilacinum* fungusunu hidrofobik substrat (perlit) içeren katı ve sıvı fermantasyonlarda büyüttüğünde, katı fermantasyonda büyüyen fungusun hücre duvarında *P.lilacinum* hidrofobininin bulunduğunu fakat sıvı fermantasyonda büyütülen fungusun hücre duvarında hidrofobin bulunmadığını ifade etmişlerdir.

1.8.2. Rekombinant DNA Teknolojisi'nin Kullanılması ile Hidrofobin Üretimi

Günümüzde bakteriler, mayalar, küfler, memeliler, bitkiler ve böcekler dahil olmak üzere rekombinant proteinlerin üretimi için farklı gen ifade sistemleri kullanılmaktadır (Acar, 2020). Hidrofobinlerin rekombinant DNA teknolojisiyle üretilmesinde kullanılan sistemler (Kulkarni ve ark., 2017) aşağıda şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 15. Rekombinant DNA Teknolojisiyle hidrofobin elde etmek için kullanılan gen ifade sistemleri.

A. niger, *S. cerevisiae*, *T. reesei* gibi gen ifade sistemlerinde hidrofobin ifadesi başarılmış olsa da ökaryotik sistemlerde kullanılmamaları, katlanma mekanizmalarındaki aksaklıklar ve elde edilen verimin düşük olması nedeniyle bu sistemler, pek kullanılmamaktadır. Son yıllarda *E. coli* ve *P. pastoris* maya sistemleri, rekombinant DNA teknolojisi ile protein ifadesinde daha çok tercih edilmektedir (Kulkarni ve ark., 2017).

E. coli gen ifade sistemi, rekombinant protein üretimi için basit ve dönüştürülmesi kolay bir model sistemi olduğu için hidrofobinlerin ekspresyonunda başarıyla kullanılmaktadır (Kirkland ve ark., 2011). Gen transferi yönteminin kolaylığına rağmen bu sistem, doğal fungus ve *P. pastoris* kullanılarak yapılan diğer rekombinant üretim proseslerine kıyasla 10 ila 100 kat daha düşük olan hidrofobinlerin üretim seviyelerinde etkili değildir (Kirkland ve ark., 2011; Kulkarni ve ark., 2017). Örneğin; *Optiostoma ulmi*'nin cerato ulmin (CU) hidrofobininin *E. coli* ekspresyon sistemi ile ifade edilmesiyle elde edilen verim litrede 80 µg iken, *O. ulmi*'den doğal olarak elde edilen cerato ulmin miktarı litrede 140 mg'dır. Dolayısıyla bu iki değer karşılaştırıldığında *E. coli* ile elde edilen hidrofobin verimi, ihmal edilebilir düzeyde kalmıştır (Bolyard ve ark., 1992).

Rekombinant hidrofobin üretiminde kullanılan diğer bir ifade sistemi de, *P. pastoris* gen ifade sistemidir (Acar, 2020). Bu sistem, en yaygın kullanılan ökaryotik ekspresyon sistemlerinden biridir ve özellikle biyofarmasötiklerin ve endüstriyel enzimlerin üretimi için tasarlanmıştır (Looser ve ark., 2015; Vogl ve ark., 2018). Metilotrofik bir maya olan *P. pastoris* diğer bir adıyla *Komagataella pastoris*, 1-5 µm çapında, 5-30 µm uzunluğunda, oval şekilli, tek hücreli, karbon ve enerji kaynağı olarak sadece metanolü kullanabilen bir organizmadır (Cregg, 1999; Mattanovich, 2017). *P. pastoris*, çok yüksek hücre yoğunluklarına kadar büyütülebilen, hem hücre içi hem de hücre dışı kültür ortamına salgılanabilen, yüksek rekombinant protein üretimini gerçekleştirebilmektedir (Spohner ve ark., 2015; Karbalaee ve ark., 2019). Przylucka ve ark. (2017), *Trichoderma virens*'ten sınıf II HFB4 ve HFB7 hidrofobinleri, *E. coli* ve *P. pastoris*'te üreterek bu iki ekspresyon sistemi arasındaki farkları karşılaştırmışlardır. *E. coli*'deki üretim inklüzyon cisimcikleri nedeniyle denatürasyon/ renatürasyon aşamaları gerektirdiğinden bu işlemler, mayada üretilen ve salgılanan hidrofobinlere de uygulanmıştır. Sonuçta her iki sistemde üretilen hidrofobin verimleri benzer olmasına rağmen, *E. coli* tarafından üretilen her iki hidrofobinin de *P. pastoris*'te üretilen hidrofobinlere kıyasla daha az yüzey aktif özellikte olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, *E. coli* ifade sisteminde HFB4, HFB7 hidrofobin verimleri sırasıyla 1,9 mg/g ve

3,0 mg/g olarak elde edilirken; *P. pastoris* ifade sisteminde HFB4, HFB7 hidrofobin verimleri sırasıyla 6,9 mg/g ve 8,1 mg/g olarak elde edilmiştir.

P. pastoris'in; yüksek hücre yoğunluğuna kısa sürede ulaşabilmesi, endotoksin ve bakteriyofaj kontaminasyonlarını elimine etmesi, üretim verimliliğinin yüksek olması, iyi karakterize edilmiş ekspresyon vektörlerinin kolayca manipüle edilebilmesi, birçok promotora sahip olup farklı karbon kaynakları ile indüklenebilmesi, ifade edilen proteinlerin; polipeptit katlanmaları, glikolizasyon, metilasyon, asilasyon gibi translayon sonrası modifikasyonları gerçekleştirebilmesi, salgılanan doğal proteininin düşük miktarda olması ve hedef proteinleri hücre içi veya hücre dışı olarak yüksek miktarlarda eksprese edebilmesi, bu sistemin protein ifadesinde tercih edilmesini kolaylaştırmaktadır (Cereghino ve Cregg, 2000). Yukarıdaki sebeplerden ötürü bu çalışmada, *P. pastoris* maya sistemi kullanılmıştır.

1.9. Tez Çalışmasının Önemi

Şu ana kadar genellikle böcek patojeni (entomopatojen) fungusların biyolojik mücadele materyali olarak kullanılma potansiyelleri üzerinde durulmuştur (Linder ve ark., 2005). Biyoteknolojik öneme sahip olan hidrofobinlerin, 1991 yılında Wessels ve arkadaşları tarafından keşfedilmesinden bu yana, bu alanda yapılan çalışmalar hidrofobinlerin yeni özelliklerinin keşfedilmesiyle hız kazanmıştır. Bununla beraber, laboratuvar koşullarında hidrofobin üretimi başarılmış olsa da endüstriyel üretim, henüz istenilen koşullarda sağlanamamıştır. Hidrofobinlerin endüstride güvenilir bir şekilde kullanılabilmesi için doğru ve etkili bir şekilde yüksek saflıkta üretilmeleri gerekmektedir. Ancak, saf ve verimli bir şekilde üretilen hidrofobinler, endüstride kullanılabilme potansiyeline sahip olabilmektedir. Dolayısıyla hidrofobinlerin performansının kapsamlı bir şekilde araştırılması, biyoteknolojik uygulamaların nihai kullanımları için büyük önem taşımaktadır. Bu sebeplerden ötürü günümüz şartlarında, süperhidrofobik ve süperhidrofilik yüzeylerin oluşturulmasında kullanılmak üzere doğal fungusların keşfine ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu tez çalışmasında, entomopatojen funguslarda bulunan hidrofobin genlerinin belirlenmesi, hidrofobin özellikleri ile insektisidal özelliğin karşılaştırılması ve seçilecek hidrofobin genininin *Pichia pastoris* maya sisteminde ifadesi edilmesi sağlanarak endüstriyel kullanım için hazırlanması amaçlanmaktadır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Çalışmada Kullanılan Funguslar

Entomopatojen fungus (EPF) kökenli hidrofobin genlerinin belirlenmesi, hidrofobin özellikleri ile insektisidal özelliğin karşılaştırılması ve seçilecek hidrofobin geninin ifadesi sağlanarak endüstriyel kullanım için hazırlanması amacıyla yürütülen bu tez çalışmasında kullanılan fungus kültürleri, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Laboratuvarında bulunan entomopatojen kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Bu doğrultuda, *Metarhizium anisopliae*'den 7 izolat, *Beauveria bassiana*'dan 11 izolat ve *Isaria fumorosea*'dan 2 izolat bu çalışma için kullanılmıştır (Tablo 3). Bu cinslere ait fungusların seçilme sebebi, bunların ülkemizden izole edilmiş yerel suşlar olması ve test edilen zararlılar üzerinde yüksek öldürücü etki göstermesidir (Biryol, 2020).

Çalışmada ayrıca *P. pastoris* pPICZαC gen ifade vektörü ve *P. pastoris*'e ait X-33, GS115 gen ifade konakçısı, GS115 albumin kontrol konakçısı (Eskişehir Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoteknoloji ve Enzimoloji Laboratuvarı'ndan temin edildi) kullanıldı.

Tablo 3. Çalışmada kullanılan entomopatojenik fungus izolatları

İzolat	Kaynak	Türü	Referans
As-2	<i>Amphimallon solstitialis</i>	<i>M. flavoviride</i>	Kocaçevik vd. 2015
As-18	<i>Amphimallon solstitialis</i>	<i>M. flavoviride</i>	Kocaçevik vd. 2015
KTU-2 (Ardeşen)	Toprak	<i>M.brunneum</i>	Sevim vd. 2010b
KTU-21 (117)	Toprak	<i>M.brunneum</i>	Sevim vd. 2010b
289	Toprak	<i>M.brunneum</i>	Sevim vd. 2010b
Gg-12	<i>Gryllotalpa gryllotalpa</i>	<i>M.brunneum</i>	Sönmez vd. 2012
287	Toprak	<i>M.brunneum</i>	Sevim vd. 2010b
KTU-42 (68-b)	Toprak	<i>I. fumosorosea</i>	Sevim vd. 2010b
KTU-1 (Y2)	Toprak	<i>I. fumosorosea</i>	Sevim vd. 2010b
KTU-24 (Çk)	<i>Thaumetopea pityocampa</i>	<i>B. bassiana</i>	Sevim vd. 2010a
KTU-57 (Rh)	<i>Rhynchites baccus</i>	<i>B. bassiana</i>	Sevim vd. 2010b
K4	<i>Hypera postica</i>	<i>B. bassiana</i>	Yücel vd. 2018
K5	<i>Hypera postica</i>	<i>B. bassiana</i>	Yücel vd. 2018
Pa-4	<i>Pristiphora abietina</i>	<i>B. bassiana</i>	Biryol vd.2021
Pa-5	<i>Pristiphora abietina</i>	<i>B. bassiana</i>	Biryol vd.2021
HpA-4	<i>Hypera postica</i>	<i>B. bassiana</i>	Yücel vd. 2018
HpA-5	<i>Hypera postica</i>	<i>B. bassiana</i>	Yücel vd. 2018
Oj-3	<i>Orosanga japonica</i>	<i>B. bassiana</i>	Basılmamış veri
Oj-7	<i>Orosanga japonica</i>	<i>B. bassiana</i>	Basılmamış veri
LdA1 (Yal)	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	<i>B. bassiana</i>	Basılmamış veri

2.2. Funguslardan DNA İzolasyonu

Laboratuvar stoklarında bulunan *M. brunneum* & *M. flavoviridae*, *B. bassiana* ve *I. fumosorosea* izolatları için, seçilen izolatların stok kültürlerinden canlandırılmaları yapıldı. Bu amaçla ilk olarak PDAY besiyerine ekim yapıldı ve 5-7 gün boyunca 28°C’ de inkübasyona bırakıldı. Fungal/ Bacterial DNA MiniPrep Kiti (Zymo Research) kullanılarak kültürlerden DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Büyüyen funguslardan 50-100 mg ağırlığında örnek, petri yüzeyi taranarak alındı. Doku lizis tüplerine aktarıldıktan sonra üzerine 750 µl lizis solüsyonu eklenerek doku parçalayıcı içinde homojenize edildi. Doku parçalayıcıdan alınan tüpler 10.000 x g’de 1 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısımdan 400 µl pipet ile alınarak filtrasyon tüpüne aktarıldıktan sonra 8000 x g’de 1 dakika santrifüj edildi. Filtrenin altında kalan sıvıya 1.200 µl genomik lizis solüsyonu eklendi. Oluşan karışımdan 800 µl alınarak DNA’nın tutunacağı filtreli tüplere aktarıldı, karışım bitene kadar işlem tekrarlandı. Ardından 10.000 x g’de 1 dk santrifüj edildi. Daha sonra filtre, 200 µl ön yıkama solüsyonu ile yıkandı

ve 10.000 x g'de 1 dakika santrifüj edilerek tüpün altında kalan sıvı uzaklaştırıldı. Tüplere 500 µl fungal-bakteriyal DNA yıkama solüsyonu eklenerek 10.000 x g'de 1 dk santrifüj edildi. Tüpün altında kalan sıvı uzaklaştırılarak, filtrede kalan yıkama çözeltisi kalıntılarını uzaklaştırmak için filtre, 10.000 x g'de 1 dk santrifüj edildi. Daha sonra DNA 'nın tutunduğu filtreler temiz mikrosantrifüj tüplerine alınarak üzerlerine 50 µl tampon (elution buffer) eklendi ve 30 saniye 10.000 x g'de santrifüj edildi. Son olarak tüpler, 37°C'de 3 dk inkübe edilerek elde edilen DNA örnekleri kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Hidrofobin Genlerini Çoğaltma

Metarhizium cinsi fungus izolatlarında bulunan hidrofobin gen bölgesinin çoğaltılması polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile gerçekleştirildi. Elde edilen hidrofobin geninin hangi sınıfa (sınıf I, sınıf II) ait olduğunu belirlemek amacıyla Tablo 4'te gösterilen primerler kullanıldı (Sevim ve ark., 2011). *hyd1* gen bölgesi için mhyd1F ve mhyd1R primer çifti; *hyd2* gen bölgesi için mhyd2Fcb ve mhyd2Rcb primer çifti; *hyd3* gen bölgesi için mhyd3F ve mhyd3R primer çifti kullanıldı. Bu primerler kullanılarak *Metarhizium* izolatlarında bulunan 616 bp'lik hidrofobin gen bölgesi çoğaltıldı (Sevim ve ark., 2011).

Beauveria bassiana cinsi fungus izolatlarında yer alan hidrofobin gen bölgelerinin tespit edilebilmesi için ilk olarak gene spesifik primerler tasarlandı. Bunun için NCBI gen bankasından *Beauveria bassiana*'ya ait olan hidrofobin gen bölgeleri toplanarak BLAST programında kontrol edildi ve hepsinde ortak olan gen bölgesi tespit edilerek intron bölgeleri çıkarıldı. Ekzon bölgeleri yapıştırılarak, genin başlangıç ve bitiş kısımlarına uygun primerler tasarlandı. Primerlerin uçlarına klonlamada kullanılmak amacıyla restriksiyon endonükleaz kesim bölgeleri (5' uca *EcoRI*, 3' uca *NotI* enzimi) eklendi. Bu amaçla, ileri olarak bsclass1-Fw ve geri olarak bsclass1-Rv primer çifti, 514 bp'lik bölgeyi çoğaltmak için kullanıldı (URL-2, 2020).

Isaria fumosorosea cinsi fungus izolatları için ayrıca primer tasarlanmadı. *B. bassiana* izolatları için tasarlanan primerler, *I. fumosoresea* izolatlarında da kullanılarak istenilen hidrofobin gen bölgesinin tespit edilmesi sağlandı.

Tablo 4. *Beauveria* ve *Metarhizium* hidrofobin genlerini belirlemek için kullanılan primerler

Primer Adları	Kullanılan Diziler	Uzunluk (bp)
mhyd1F mhyd1R	5'-CCACATTCACCTTACACTCCAATC-3' 5'-CATGATCCATAGGCTATTCCACC-3'	616
mhyd2Fcb mhyd2Rcb	5'-TACAGCRWCCCACARTGYTG-3' 5'-GCAGAGAACRBCTTGKCC-3'	616
mhyd3F mhyd3R	5'-CATCATCTCACTCTCACTCAC-3' 5'-CAAACCACCTGACTAGCTTC-3'	616
bsclass1-Fw bsclass1-Rv	5'- <u>GAATTC</u> CATGCGTTTCGCTCTTGCCATC-3' 5'- <u>GCGGCCGC</u> CTACTGGATAAGACTGCCAATG-3'	514

* Primerlerdeki koyu ve altı çizili olan GAATTC sırası *EcoRI*, GCGGCCGC sırası *NotI* restriksiyon enzim kesim yerlerini göstermektedir.

PCR Reaksiyonu:

Genomik DNA (25ng)	: 2 µl
10X enzim tamponu	: 10 µl
10mM dNTP (10mM)	: 1 µl
Fw primer (10µM)	: 1 µl
Rv primer (10µM)	: 1 µl
Taq DNA polimeraz (5U /µl)	: 0,5 µl
H ₂ O	: 34,5 µl

PCR Koşulları:

95°C	: 2'
95°C	: 30''
50°C -53°C -55°C	: 30''
72°C	: 2'
72°C	: 5'
12°C	: ∞

35 döngü

Primer bağlanma sıcaklığı *hyd1* için 53°C, *hyd2* için 55°C, *hyd3* için 50°C (*B. bassiana* ve *I. fumosorosea* için 50°C)'dir. PCR reaksiyonu sonucunda çoğaltılan DNA fragmentleri, 0,5 µg/ml etidyum bromür ihtiva eden %1'lik agaroz jelde yürütülerek jel görüntüleme sistemi (Gel Logic; Kodak) ile görüntülendi. Oluşan hedef bant agaroz jelden kesildikten sonra Nucleospin Extract DNA Saflaştırma (Macherey-Nagel) kiti kullanılarak jelden temizlendi ve mikrosantrifüj tüpünde toplanan DNA'nın saflığı ve konsantrasyonu nanodropla (Thermo Scientific) tespit edildi.

2.3.1. Hidrofobin Gen Bölgesinin Ara Vektöre Klonlanması

Taq DNA Polimeraz enzimi yapışkan uç yaptığı için pJET vektörüne klonlanmadan önce bu uç uzaklaştırıldı. Bunun için; 10 µl (2X) reaksiyon tamponu, 7 µl (15 ng) insert, 1 µl DNA blunt enzim konularak toplam hacim 18 µl'ye tamamlandı. Mikrosantrifüj tüp, 3-5 saniye santrifüj edildikten sonra, 5 dk 70°C'de inkübasyona bırakıldı. Yapışkan uç uzaklaştırılarak ligasyon reaksiyonu kuruldu. Bunun için inkübasyondan sonra buz üzerine alınan tüp içerisine, 1 µl (0,05 pmol) pJET1.2/blunt enzim ve 1 µl T4 DNA ligaz konularak toplam hacim 20 µl'ye tamamlandı. Ardından 3-5 saniye santrifüj yapıldı ve 16°C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı.

2.3.2. *E. coli* DH10β Kompetent Hücrelerinin Hazırlanması

Petri kabında büyütülmüş olan *E. coli* DH10β hücrelerinden tek koloni seçilerek 3ml Luria Bertani (LB) sıvı besiyerine aşılama yapıldı. Sallayıcı inkübatörde 37 °C'de 16 saat büyüyen kültürden, 29 ml taze sıvı besiyerine 1 ml aşılama yapıldı. Hücre yoğunluğu 600 nm dalga boyunda 0,45-0,55 olana kadar 37 °C'lik sallayıcıda yaklaşık 1 saat 15 dk büyütüldü. İstenen yoğunluğa ulaşan kültür, 50 ml'lik falkon tüpe aktarıldı ve 4.500 rpm, 4°C'ye ayarlı santrifüj ile 5 dk santrifüj edildi. Santrifügasyondan sonra süpernatant atıldı ve pellet 10 ml soğuk 100 mM CaCl₂ ile çözüldü ve 30 dk buz üzerinde bekletildi. Tekrar santrifüjleme (4.500 rpm, 4°C, 5 dk) yapıldı ve süpernatant atıldı. Pellet 2 ml soğuk 100 mM CaCl₂ ile çözüldü ve 4°C'de 2 saat bekletilerek kullanıma hazır hale geldi.

2.3.3. *E. coli* DH10β Kompetent Hücrelerine Transformasyon

Hazırlanan kompetent hücrelerden 100 µl alındı ve buz üzerinde çözülene kadar bekletildi. Ardından 5 µl ligasyon ürünü kompetent hücrelerin üzerine bırakılarak örnekler buz üzerinde yarım saat bekletildi. İki dakika 45 °C'lik ısı şoku uygulandıktan sonra tekrar buz üzerinde 1 dakika kadar bekletildi. Örnekler 1 ml sıvı LB besiyeriye aktararak 1 saat boyunca 37 °C'de büyümeye bırakıldı. Kültür, 6.000 x g'de 3 dakika çöktürme işleminden sonra sıvı kısım, geride 50 µl kalacak şekilde döküldü. Hücreler, geride kalan sıvı içerisinde

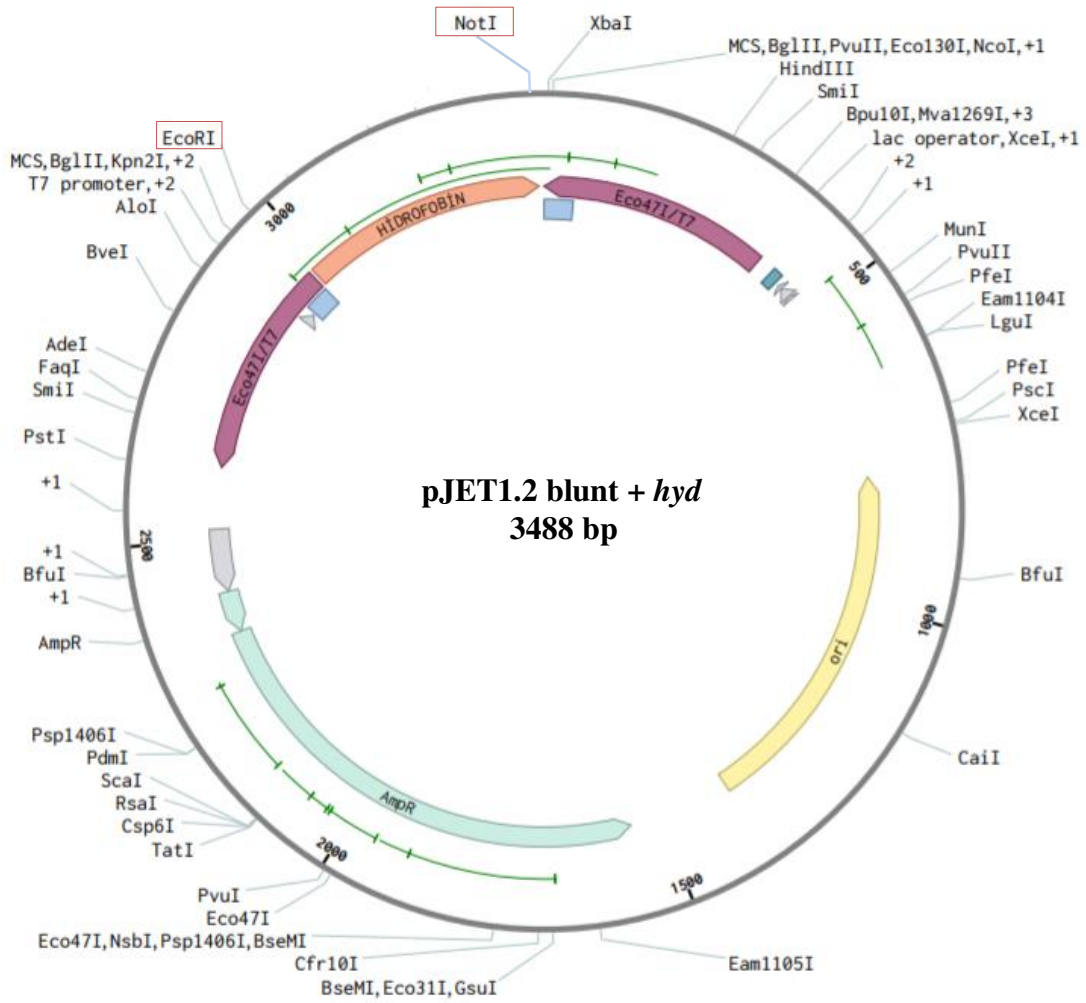
         seçici antibiyotik (ampisilin) ihtiva eden katı besiyeri üzerine cam bagetle yayıldı. Petriler gece boyunca 37   C'de inkübe edildi.   nk  basyon sonucunda antibiyotikli agar LB besiyerinde büyüyen kolonilerde transform edilen plazmidin varlığını doğrulamak amacıyla gece kültürleri hazırlandı. Bunun için, steril k  rdan yardımıyla kolonilere dokunuldu ve ampisilin içeren 3 ml sıvı besiyeriye inokülasyon yapılarak gece boyunca 37   C'de büyütüldü.

2.3.4. Plazmit   zolasyonu ve Restriksiyon Analizi

Büyüyen sıvı kültürlerden ~100   l alınarak 4  C'deki mikrobiyal hücre dolabına koyuldu, geri kalanı 6.000 x g'de 3 dakika     t  r  ld   ve hücreler pellet haline getirildi. Üst sıvıdan geride 50   l besiyeri kalacak şekilde döküldü. Hücre pelleti, kalan besiyeri içerisinde vortekslenerek iyice çözüldü.   zerine 300   l TENS tamponu (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 0.1 N NaOH, %5 SDS) ilave edildi, karıştırıldı ve yaklaşık 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Ardından 150   l sodyum asetat (3M, pH 5.2) ilave edildi ve 4-5 defa alt üst edildikten sonra 10 dakika 14.000 x g'de     t  rme yapıldı. Üst sıvılar yeni mikrosantrifüj tüplere aktarılarak üzerlerine 900   l %96'lık EtOH ilave edildi. Alt   st edildikten sonra yüksek hızda 3 dakika     t  rme yapıldı. Sıvı kısım tamamen uzaklaştırıldı ve pelletlerin üzerine 500   l %70'lik EtOH konulup tekrar 2 dakika     t  rme yapıldı. Alkol uzaklaştırıldı ve pelletler kuruyana kadar tüplerin kapakları açık şekilde 37   C'de bekletildi. Ardından pelletler 30   l su içinde çözüldü. Bu şekilde izole edilen plazmit DNA'ların, viral DNA fragmentlerini içerip içermediği restriksiyon enzimleri ile kesim yapılarak belirlendi.

Kesim reaksiyonu için tüplere (vektör: insert oranı 1:3 olacak şekilde) 5   l plazmit DNA, 1   l restriksiyon endonükleaz enzimi (*BgIII*), 2   l (10X) enzim tamponu konularak reaksiyonun son hacmi 20   l'ye RNaz'lı su ile tamamlandı. Hazırlanan reaksiyonlar, 37   C'de 4 saat inkübe edildikten sonra yürütme boyası ilave edilerek agaroz jelde görüntüleme yapıldı. Görüntüleme sonucunda dolu olduğu belirlenen plazmitlerin bulunduğu hücrelerden (4  C'de mikrobiyal hücre dolabında tutulan), 5 ml ampisilinli LB besiyerine gece kültürü hazırlandı. Büyüyen kültürden Gene Jet Plazmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) ile plazmid izolasyonu, kit içerisinde yer alan kullanma yöntemi takip edilerek yapıldı.   lk olarak 5 ml'lik gece kültürü, mikrosantrifüj t  p içerisine koyularak 13.000 rpm'de 4 dakika     t  r  ld  . Her seferinde süpernatant atıldı ve işlem, gece kültürü bitinceye kadar devam edildi.     ken pelletin etrafındaki tüm LB besiyeri pipetle alınarak, üzerine 250   l süspansiyon tamponu

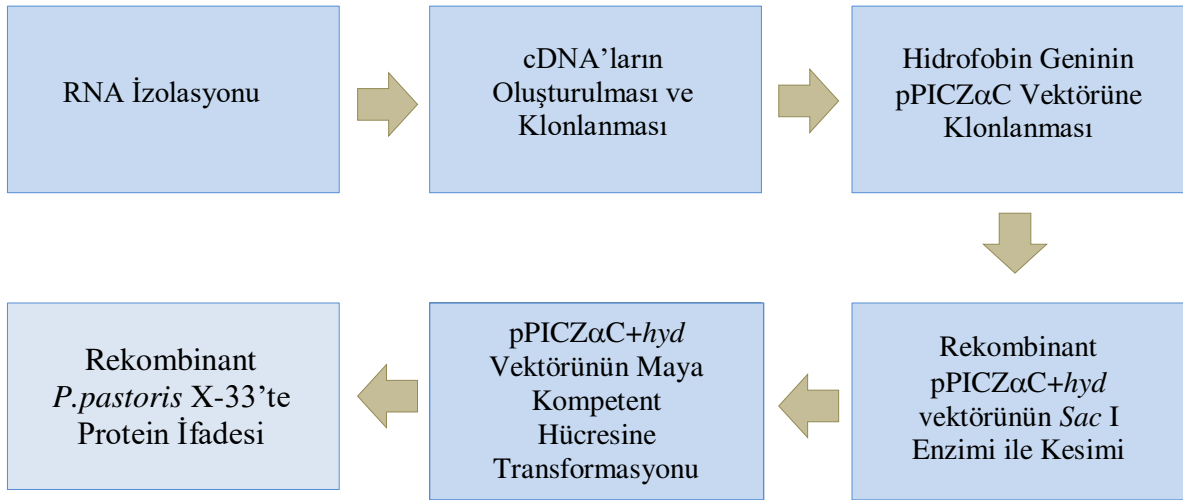
eklendi ve pellet tamamen çözülene kadar pipetlendi. Ardından 250 µl parçalama tamponu ilave edildi, vorteks yapılmadan 4-5 kez alt üst yapıldı ve 5 dakika beklendi. Daha sonra 350 µl bağlama tamponu eklendi ve homojen bir karışım elde edebilmek için tüp, vorteks yapılmadan 20-30 kez alt-üst edildi. Daha sonra 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılarak süpernatant alındı ve kitte bulunan, içlerinde filtre ihtiva eden kolonlardan süzüldü. Tekrar 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama kabındaki solüsyon dökülerek, filtre iki kez yıkama solüsyonu ile yıkandı ve her seferinde 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama kabındaki solüsyon yeniden dökülerek, filtre 13.000 rpm'de 2 dakika boş olarak santrifüj edildi. Daha sonra filtre, temiz bir mikrosantrifüj tüp içine koyuldu ve üzerine 40 µl ddH₂O eklendi, 2-3 dakika beklenerek 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Bu sayede rekombinant plazmit elde edildi (Şekil 16) ve konsantrasyonu nanodrop ile ölçülerek, dizi analizi için Macrogen (Hollanda) firmasına gönderildi.



Şekil 16. *hyd* gen bölgesinin pJET1.2 ara vektörüne klonlanması. Turuncu bölge klonlanan *hyd* genini göstermektedir.

2.4. *Beauveria bassiana* KTU-57 (Rh) Hidrofobin Geninin İfadesi

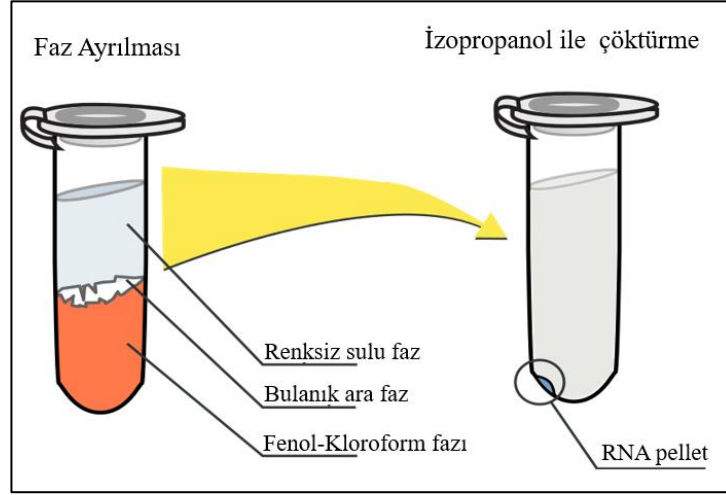
Çalışmada kullanılan EPF'ler (20 adet) üzerinde yapılan literatür araştırmaları neticesinde, *Beauveria bassiana* KTU-57 izolatının insektisidal aktivite ve morfolojik özellikleri yanında hızlı büyümesi, konak spektrumu dikkate alındığında, canlı türler üzerinde gerçekleştirdiği adhezyon ve ardından meydana gelen yüksek ölüm (Sevim ve ark., 2013) oranlarındaki artış sebebiyle, bu izolatta yer alan hidrofobin geninin *P. pastoris* maya sisteminde ifade edilmesi planlandı. *P. pastoris*'te hidrofobin geninin ifadesinde uygulanan yöntemler aşağıda şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 17. *P. pastoris*'te gen ifadesinde izlenen adımlar.

2.4.1. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu Chauhan ve ark., (2018) tarafından anlatılan metoda göre gerçekleştirildi. İlk olarak KTU-57 (Rh) fungus izolatı, 50 ml YPD broth besiyerinde 28°C'de 3 gün boyunca büyütüldü. Büyüyen fungus kültürleri 6.000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonucunda elde edilen pelletten bir havan içerisine ~100 mg alındı ve üzerine fungusun kitin tabakasını parçalaması amacıyla sıvı azot ilave edilerek iyice ezildi. Daha sonra üzerine 1 ml Trizol ilave edilip, çeker ocakta karıştırılmaya devam edildi. Nükleoprotein komplekslerinin tam olarak ayrışması için 5 dk 30°C'de inkübe edildi. Üzerine 200 µl kloroform eklenerek, el ile 15 saniye kuvvetlice çalkalandı. 30°C'de 3 dk inkübe edilerek, 2-8°C'de 15 dk 12.000 x g'de santrifüj edildi. RNA içeren sulu faz (berrak faz) yeni bir tüpe aktarıldı (Sulu fazın hacmi, Trizol hacminin yaklaşık %60 kadardır). Üzerine 500 µl soğuk izopropanol alkol eklenerek sulu fazdan RNA çöktüldü (Şekil 18). Ardından 10 dk 30°C'de inkübe edildikten sonra 2-8°C'de 10 dk 12.000 x g'de santrifüj edildi (Bu aşamada RNA çöktürüldü ve jel benzeri bir pellet oluştu). Daha sonra süpernatant atıldı ve RNA pelleti 1 ml %75 etanol ile yıkandı. Vorteksenerek karıştırıldı. 2-8°C'de 5dk 7.500 x g'de santrifüjlendi.



Şekil 18. KTU-57 izolatından RNA ekstraksiyonu.

RNA pelleti 10 dk havada kurutuldu ve 30 μ l DEPC ile muamele edilmiş RNaz içermeyen su ile çözüldü. Elde edilen çözelti, yavaş bir şekilde pipet ucundan geçirilerek, 55-60°C’de 10 dk inkübe edildi. DNaz I ile muamele edildikten sonra nanodropta ölçüm yapılarak, -20°C’de muhafaza edildi.

2.4.2. cDNA’ların Oluşturulması ve Klonlanması

Elde edilen RNA’lardan 1’er μ g alınarak, 1 μ l dNTP karışımı (10mM) ve 2 μ l (20pmol) gene özgü primerler ile karıştırıldı. Karışım, hacmi dH₂O ile 10 μ l’ye tamamlandı ve 65°C’de 5 dakika inkübe edildi. Buz üzerinde soğutulduktan sonra santrifüjle tüpün dibinde toplanan örnekler tekrar buz üzerine bırakıldı. Üzerine 2 μ l reaksiyon tamponu (10X) ve 1 μ l revers transkriptaz enzimi (GoldBio, 200U/ μ l) ilave edilerek yavaş bir şekilde karıştırıldı. Bir saat boyunca 42 °C’de inkübe edilen örnekler, 65 °C’de 20 dakika bekletildi ve böylece reaksiyon sonlandırıldı. Bu şekilde tek zincirli cDNA’lar elde edildi.

RT-PCR’ın ikinci kısmı olan, tek zincirli cDNA’lardan çift zincirli DNA’ların sentezlenmesi için PCR reaksiyonu koşulları aşağıdaki gibi oluşturuldu.

Reaksiyon Karışımı:

Kalıp (cDNA)	: 2 µl
10X enzim tamponu	: 5 µl
10mM dNTP (10mM)	: 1 µl
Fw primer (10µM)	: 1 µl
Rv primer (10µM)	: 1 µl
Taq DNA polimeraz (5U/µl)	: 0,5 µl
MgCl ₂ (50mM)	: 5 µl
H ₂ O	: 34,5 µl

PCR Koşulları:

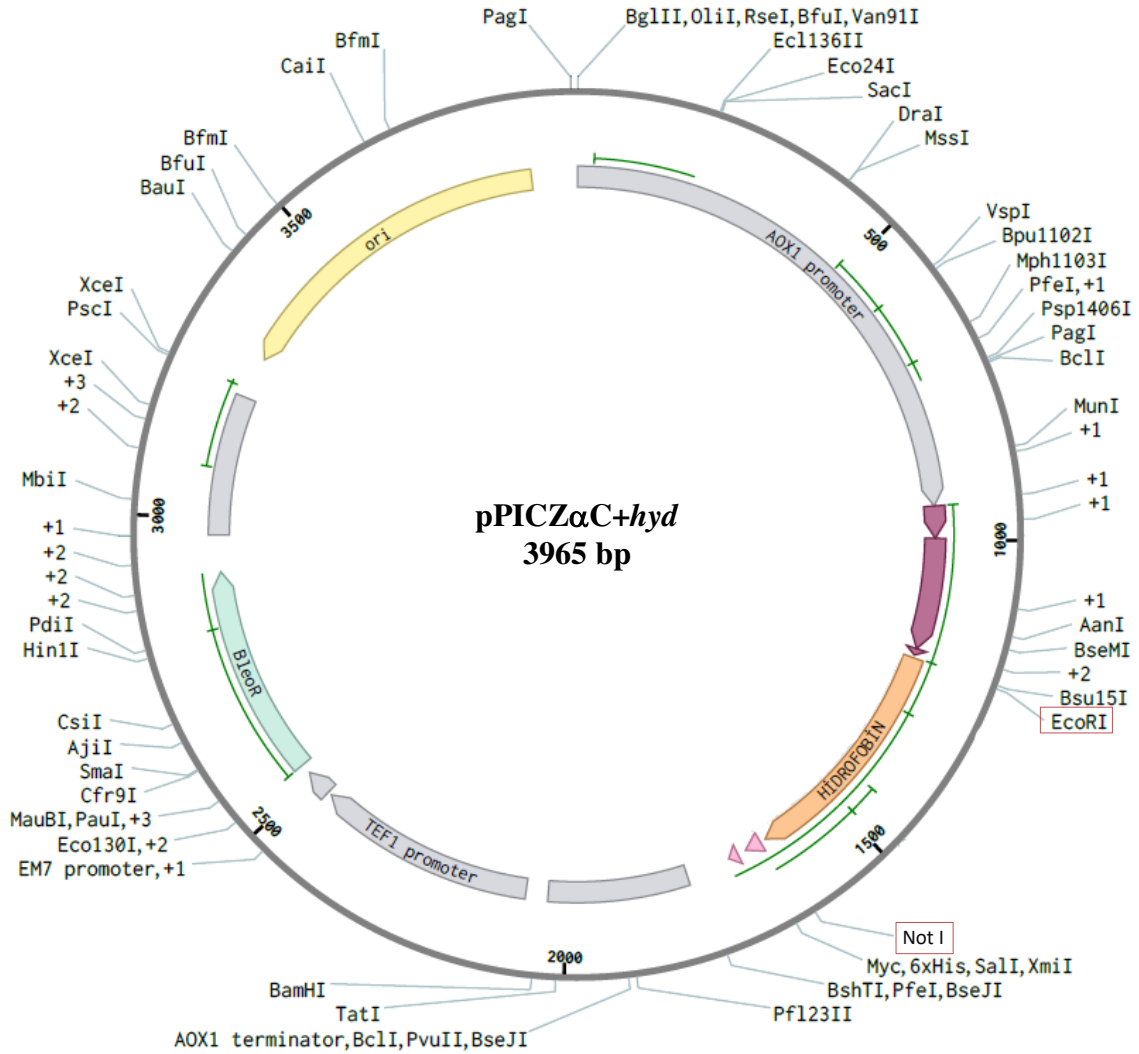
95°C	: 2'	
95°C	: 30''	} 35 döngü
50°C	: 30''	
72°C	: 2'	
72°C	: 5'	
12°C	: ∞	

%1'lik agaroz jel elektroforezi ile etidyum bromür varlığında görüntülenen PCR ürünlerinin oluşturduğu bant, jelden kesilip mikrosantrifüj tüpüne alındı. Ürünün jelden temizlenmesi DNA temizleme kiti (Macherey-Nagel) ve kitin içindeki kullanma talimatı takip edilerek gerçekleştirildi. Mikrosantrifüj tüplerine bırakılan jel parçalarının üzerlerine, her 100 mg jel parçası için 300 µl jel eritme tamponu ilave edildi. Karışım 50°C'de, 15 dakikadan az olmayacak şekilde jel eriyinceye kadar bekletildi. Her 5 dakikada bir alt üst edilerek karıştırıldı. İyice eridikten sonra, kitte bulunan ve içlerinde filtre ihtiva eden kolonlardan süzüldü. Süzme işleminin ardından kolonlar iki kez yıkama tamponu ile santrifüj edilerek yıkandı. Kolonlar 1 dakika boş olarak santrifüj edilerek yıkama tamponu kalıntıları uzaklaştırıldı. Daha sonra kolonlar temiz mikrosantrifüj tüplere alındı, üzerlerine 25 µl tampon (elution buffer) ilave edildi ve 13.000 x g'de 1 dk santrifüj yapıldı. Bu şekilde DNA'lar temizlendikten sonra konsantrasyonları nanodrop (Thermo Scientific) aracılığıyla belirlendi. Bölüm 2.3.2'de ifade edildiği gibi ligasyon reaksiyonu kuruldu ve istenilen gen bölgesinin pJET1.2 vektörüne klonlanması sağlandı. Rekombinant ara vektör *E. coli* DH10β kompetent hücrelerine transform edildi. Oluşan kolonilerden hidrofobin genini ihtiva eden bir koloni belirlendi ve dizin analizi için MacroGen firmasına gönderildi.

2.4.3. Hidrofobin Geninin pPICZαC Vektörüne Klonlanması

pJET1.2 vektöründeki hidrofobin geni, dizin analizi ile doğrulandıktan sonra bu vektör *Eco*RI ve *Not*I enzimleri ile kesildi ve hidrofobin geni jelden temizlenerek bol miktarda elde

edildi. Bu arada 25 µg/ml zeocin içeren besi ortamında gece kültürü hazırlanan, pPICZαC vektörünün bulunduğu *E. coli* hücrelerinden bu vektör izole edildi. pPICZαC vektörü de aynı enzimler ile (*EcoRI* ve *NotI*) muamele edilerek lineer hale getirildi. Hem vektörün hem de hidrofobin geninin konsantrasyonları nanodropta belirlendikten sonra aralarında ligasyon reaksiyonu kuruldu. Ligasyon tüpüne 2 µl reaksiyon tamponu (10X), 4 µl (95,2ng) pPICZαC vektörü, 1 µl (5U/µL) T4 DNA ligaz ve 3 µl (60,3 ng) hidrofobin geni ilave edildi. Son hacim 20 µl'ye ddH₂O ile tamamlandı. Ligasyon reaksiyonu 16°C'de bir gece bekletildi. Ardından transformasyon işlemi Bölüm 2.3.2.2'de belirtildiği gibi gerçekleştirildi. Transform edilen hücreler, zeocin (25µg/ml) ihtiva eden tuzsuz LB agar (Ek 1) üzerine cam bagetle yayıldı. Petriler gece boyunca 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda antibiyotikli agar besiyerinde büyüyen kolonilerde transform edilen plazmidin varlığını doğrulamak amacıyla tuzsuz LB broth besiyerine (Ek 2) gece kültürleri hazırlandı. Hazırlanan gece kültürlerinden plazmit izolasyonu yapılarak pPICZαC+*hyd* vektörü elde edildi (Şekil 19). Elde edilen rekombinant vektörün konsantrasyonu nanodrop ile ölçülerek sekans edilmek üzere MacroGen (Hollanda) şirketine gönderildi. Sekans sonucunda elde edilen gen dizisi, Expacy Translate ile protein formuna dönüştürüldü ve hidrofobin genleri için ayırt edici bir özellik olan sistein rezidüleri (aminoasitleri) (Ball ve ark., 2020) biyoinformatik olarak incelendi.



Şekil 19. Rekombinant maya vektörünün şematik gösterimi. *hyd* gen bölgesi turuncu ile gösterilmiştir.

2.4.4. Rekombinant pPICZαC+ *hyd* Vektörünün *SacI* Enzimi ile Analizi

Rekombinant pPICZαC+*hyd* vektörü, maya hücrelerine lineer veya dairesel formlarda transform edilebilmektedir. Dairesel olarak transform edildiğinde 50-100 µg rekombinant vektöre ihtiyaç duyulurken, lineer olarak transform edildiğinde gerekli olan miktar, 5-10 µg'dır. Bu çalışmada rekombinant vektör *SacI* enzimi ile lineer hale getirilerek kullanıldı ve kullanılan enzimin genin içinde bulunmamasına dikkat edildi. Kesim reaksiyonu için tüplere 1 µg plazmit DNA, 1 µl *SacI* enzim (Thermo), 3 µl enzim tamponu (10X) koyularak reaksiyon hacmi 30 µl'ye ddH₂O ile tamamlandı. Ayrıca negatif kontrol için pPICZαC vektörüne de

aynı kesim reaksiyonu kuruldu ve hazırlanan reaksiyonlar, 37 °C’de bir gece inkübe edildikten sonra yürütme boyası ilave edilerek agaroz jelde görüntüleme yapıldı.

2.4.5. Maya Kompetent Hücrelerinin Hazırlanması

50ml’lik falkon tüp içine (3 adet) 5’er ml YPD besiyeri (Ek 3) koyuldu. Taze hazırlanmış YPD agar besiyeri (Ek 5) üzerinde büyütülen GS115 ve X-33 ekspresyon konakları ile GS115 albumin kontrol konakçısının bulunduğu petrilere steril kürdan ile tek koloniden örnek alınarak falkon tüplerin içine bırakıldı ve bir gece boyunca 30°C’deki etüve koyuldu. 100’er ml taze YPD besiyerlerine, büyüyen kültürlerden 100’er µl aşılama yapılarak konsantrasyonları OD₆₀₀’de 1,3-1,5 olana kadar tekrar 30°C’deki etüvde bir gece boyunca bırakıldı. İstenilen konsantrasyon değerine ulaşan kültürler, 4°C ve 1.500 x g’de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj’den sonra süpernatantlar atıldı ve pelletler 100ml’lik steril soğuk ddH₂O’da çözülerek aynı santrifüj koşullarında 5 dakika santrifüj edildi. Daha sonra tekrar süpernatantlar atıldı ve pelletler 50ml’lik steril soğuk ddH₂O’da çözülerek 4°C ve 1500 x g’deki santrifüjde 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar atıldı. Ardından pelletler, soğuk 4 ml, 1M’lık sorbitol ile muamele edildi ve yeniden aynı santrifüj koşullarında santrifüj edildi. Son kez süpernatantlar atıldı ve pelletler, 1ml sorbitol (1M)’de çözülerek maya kompetent hücreleri hazırlandı.

2.4.6. Elektroporasyon Yolu ile Lineer Rekombinant Vektörün Maya Kompetent Hücrelerine Transformasyonu

Öncelikle elektroporasyon kuvvetleri ve deney içinde kullanılan diğer malzemeler buz içerisinde bekletildi. Sonra 80 µl X-33 maya kompetent hücresi 5 µl lineer hale getirilmiş rekombinant vektör (1,2 µg) ile karıştırıldı ve soğuk 0,2 cm lik elektroporasyon kuvvetine aktararak 5 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edildi. Ardından elektroporasyon cihazı (BIO-RAD, MicroPulser)’na yerleştirilen tüpler 1,5kV akım uygulandıktan sonra hızlı bir şekilde cihazdan alındı ve üzerine soğuk 1 ml (1M) sorbitol ilave edilerek tüp içeriği, soğuk deney tüpüne aktarıldı. Aynı işlemler negatif kontrol için, GS115 ve GS115 albumin maya kompetent hücrelerine de uygulandı. Bunun için 80 µl GS115 ile 80 µl GS115 albumin maya

kompetent hücrelerinin içerisine ayrı ayrı 5 µl lineer hale getirilmiş pPICZαC vektör (1µg) ilave edilerek, yukarıdaki işlemler titizlikle takip edildi. Ardından deney tüpleri sallanma olmadan 30°C'deki etüvde 1-2 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hücreler 10, 25, 50, 100, 200 µl olacak şekilde zeocinli (100 µl/ml) YPDS (Ek 6) içeren petrilere bagetle yayılarak 30°C'de 3-4 gün inkübe edildi. Büyüyen kolonilerden 10-20 koloni seçilerek, seçilen koloniler zeocinli (100 µl/ml) YPD veya YPDS içeren petrilere saflaştırıldı (Not: GS115 maya hücreleri, histidinli ortamda büyüdüklerinden GS115 rekombinant hücreleri için daha önceden (%0,004) histidin (Ek 7) aminoasiti içeren zeocinli YPDS petrilere hazırlandı).

2.4.6.1. Rekombinant *P. pastoris* X-33 ve GS115 Maya Hücrelerinden DNA Saflaştırması ve PCR Analizi

Transformasyon sonucunda rekombinant X-33 *P. pastoris* mayasından 3 koloni ve rekombinant GS115 *P. pastoris* mayasından ise 1 koloni seçildi. Seçilen kolonilerden zeocinli YPD plaklara ekim yapıldı ve büyümeleri için 28°C'de 3 gün inkübasyona bırakıldı. Büyüyen kolonilerden Fungal Miniprep Kit (Zymo Research) ile DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Akabinde hidrofobin geni için spesifik primerler kullanılarak bu DNA'lardan PCR yapıldı. PCR reaksiyonu, bölüm 2.3.1'de anlatıldığı gibi yapıldı.

2.4.7. Rekombinant *P. Pastoris* (X-33)'te Protein İfadesi

Transformasyon sonucunda oluşan ve *hyd* genini içerdiği belirlenen *P. pastoris* X-33 transformantlarından bir koloni seçilerek, steril 250 ml'lik bir erleninde 25 ml BMGY besiyeri (Ek 13) içine inoküle edildi. Kültür OD₆₀₀ = 2-6 (yaklaşık 16-18 saat) değerine ulaşana kadar çalkalamalı inkübatörde 250-300 rpm'de, 30°C'de büyütüldü. Hücreler uygun konsantrasyona ulaştığında gliserol stoğu hazırlandı. Bunun için büyüyen kültürlerden 800 µl alınarak steril bir mikrosantrifüj tüpe aktarıldı. Üzerine steril gliserol (%87)'den 200 µl ilave edilip karıştırılarak -80°C'ye koyuldu. 25 ml'lik kültürün geri kalanı 50 ml'lik falkon tüpe aktararak oda sıcaklığında 3.000 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve kalan ortamı çıkarmak için tüpler ters çevrilerek bir doku üzerine yerleştirildi. Daha sonra pelletin

içinde kalan BMGY ortamını uzaklaştırmak için pellet, 20 ml'lik BMMY besiyeri (Ek 14)'nde yeniden çözüldü ve oda sıcaklığında 3.000 x g'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Daha sonra hücre pelleti yaklaşık 100 ml'lik BMMY besiyeri içinde OD₆₀₀ =1.0 olacak şekilde yeniden çözüldü ve kültür 1 litrelik steril erlene aktarıldı. Erlenin ağzı, çift katlı steril tülbent ile kapatılarak 30 °C'deki sallamalı inkübatöre koyuldu. Ekspresyonu devam ettirmek için her 24 saatte bir % 0,5 steril edilmiş saf metanol eklendi (Weidner ve ark., 2010). Ekspresyonun başlamasından sonra belirli zamanlarda kültürlerden 1ml örnek alınarak 1,5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüplere aktarıldı ve 14.000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Süpernatant ve pellet farklı mikrosantrifüj tüplerde olacak şekilde kullanılıncaya kadar -80°C'de muhafaza edildi. Yukarıda ifade edilen işlemler, ayrıca *P. pastoris* GS115 ve GS115 albumin rekombinant maya vektörleri için de yapıldı.

2.4.7.1. Hücre Dışı Protein İfadesi

Gen ifadesi aşamasında kültürlerden alınan örnekler santrifüj edilerek pellet ve süpernatant olarak ayrıldı ve kullanılıncaya kadar -80°C'de muhafaza edildi. Süpernatantlar ilk olarak, protein konsantrasyonlarını arttırmak amacıyla liyofilizatör ile konsantre hale getirildi. Daha sonra konsantre hale getirilmiş süpernatantlardan 50 µl alınarak üzerine 50 µl 2X SDS-PAGE yükleme tamponu (sample buffer) ilave edildi ve protein denatürasyonu için 10 dakika 95°C'de kaynatıldı ve kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

2.4.7.2. Hücre İçi Protein İfadesi

-80°C'de tutulan 1 ml hacmindeki hücre pelleti hızlı bir şekilde çözüldükten sonra buz üzerine koyuldu. Üzerine 100 µl kırma tamponu (Breaking Buffer) (Ek 15) eklenerek karıştırıldı. Asitle yıkanmış cam boncuklar (0,5mm) hücre pelleti ile aynı hacimde olacak şekilde karışıma ilave edildi. 30 saniye vorteksleme, 30 saniye buz üzerinde tutma işlemi 8 döngü halinde tekrar edildi. Ardından 4°C'de 10 dakika, maksimum hızda santrifüj edildi ve süpernatant farklı bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Süpernatanttan 50 µl alınarak üzerine 50 µl 2X SDS-PAGE yükleme tamponu (sample buffer) ilave edildi ve protein denatürasyonu için 10 dakika 95°C'de kaynatıldı ve kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

2.4.8. Rekombinant *P. pastoris* (X-33)'te İfade Edilen Hidrofobin Proteininin Western Blot Analizi

İfade edilen hidrofobin proteinlerini yürütmek için % 15'lik SDS-PAGE jeli hazırlandı. Jelde kullanılan kimyasallar ve miktarları Tablo 5'te verilmiştir. Elde edilen karışımın donması için 30 dakika beklendi ve havayla temasını kesmek için dH₂O, jelin havayla temas eden üst kısmına pipet yardımıyla döküldü.

Tablo 5. SDS-PAGE için gereken kimyasallar ve kullanılan miktarlar

Ayrırma Jeli	
Kimyasal	Miktar
dH ₂ O	3,3 ml
Tris (pH:8,8, 1,5M)	2,5 ml
Akrilamide (%30)	4,0 ml
SDS (%10)	100 µl
APS (%10)	100µl
TEMED	4µl
Yükleme Jeli	
dH ₂ O	1,4 ml
Tris (pH:6,8, 1M)	250 µl
Akrilamide (%30)	330 µl
SDS (%10)	20µl
APS (%10)	20µl
TEMED	2µl

95 µl yükleme boyası içerisine 5µl Beta-merkaptetanol eklendi ve karıştırıldı. Daha sonra bu karışımdan 10 µl alınıp, 10 µl örnek üzerine (1:1) ilave edildi. Proteinlerin denatürasyonu için, 95°C'de 10 dakika kaynatılıp buz üzerine alındı. Protein örnekleri %15'lik jele ~15 µl yüklendikten sonra SDS-PAGE iki saat boyunca 80V'ta çalıştırıldı. Yürüme işlemi tamamlandıktan sonra blotlama işlemine geçildi. Bunun için 6 adet kromotografi kağıdı (Cytiva) SDS-PAGE jelinin boyutlarında kesildi. Kesilen kromotografi kağıtlarından 3 tanesi %80 elektroblotting tamponu + %20 metanol karışımına batırıldı ve blotlama cihazına koyuldu. Üzerine %100 metanol'e batırılan (aynı boyutlarda kesilmiş) nitroselüloz membran

yerleştirildi ve SDS-PAGE jeli de bu membran üzerine koyuldu. Son olarak, kalan kromotografi kağıtları (3 adet) %80 elektroblotting tamponu + %20 metanol karışımına batırılarak jel üzerine koyuldu ve blotlama cihazı 40 mA’de 1,5 saat çalıştırıldı. Blotlama işleminin ardından membran, yıkama solüsyonu (1X PBS, %0,5 süt tozu, %0,05 Tween 20) ile 2 dakika yıkandı. Ardından %5’lik süt tozu (1X PBS, %5 süt tozu, %0,05 Tween 20)’nda 2 saat bekletilerek yıkama solüsyonu (1X PBS, %0,5 süt tozu, %0,05 Tween 20) ile 3x10 dakika yıkandı. Daha sonra birinci antikor (monoklonal anti-polyhistin antikor, 1:1000 sulandırılmış) ile membran muamele edildi ve 8 ml yıkama solüsyonu içine 4 µl birinci antikor eklenerek hazırlanan solüsyon oda sıcaklığında bir gece boyunca çalkalanarak membranla muamele edildi. Membran birinci antikor ile muamele edildikten sonra, 3x10 dakika yıkama solüsyonu (1X PBS, %0,5 süt tozu, %0,05 Tween 20) ile yıkandı. Daha sonra membran ikinci antikor anti-fare IgG (alkalin fosfataz antikor, 1:1000 sulandırılmış) ile muamele edilerek 8 ml yıkama solüsyonu içine 4 µl ikinci antikor eklendi ve bu solüsyon ile membran 1 saat oda sıcaklığında hafifçe çalkalandı. Daha sonra membran, 3x10 dakika yıkama solüsyonu ile yıkandı ve 2x10 dakika da AP (Alkalin fosfataz) tamponu ile muamele edildi. Son olarak 100 µl nitroblue tetrazolium ve bromochloroindolyl fosfat (NBT/BCIP stok solüsyonu, Roche) içeren 10 ml AP tamponunda yıkanarak bantlar görünür hale gelene kadar hafifçe sallandı. Bantlar görüldüğünde hemen solüsyon uzaklaştırıldı ve bol dH₂O ile membran yıkandı.

3. BULGULAR

Entomopatojen funguslarda (EPF)'larda bulunan hidrofobin geninin, önemli bir maya ekspresyon sistemi olan *P. pastoris*'te ifade edilmesine yönelik yapılan bu çalışmada tanımlanmış ve insektisidal özellikleri bilinen *Metarhizium sp.* (7), *Beauveria bassiana* (11) ve *Isaria fumosoresea* (2) türlerine ait toplam 20 izolat kullanıldı. Bu doğrultuda ilk olarak fungus izolatlarının besin ortamında büyütülmesi sağlandı. Büyüyen EPF kültürlerinden DNA izolasyonları, ardından Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile gene özgü spesifik primerler ile hidrofobin gen bölgeleri belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre fungus izolatlarının 16'sında hidrofobin genine rastlanırken, 4'ünde hidrofobin geni tespit edilememiştir. Hidrofobin geni tespit edilen izolatların benzerlik oranlarının belirlenmesi amacıyla biyoinformatik analizleri yapıldı. İkinci olarak, literatürdeki infektivite bilgileri kullanılarak hidrofobin ile infektivitenin ilişkilendirilmesi sağlandı ve en yüksek infektivite etkisine sahip izolat belirlendi. Son olarakta, seçilen izolata ait hidrofobin geninin *P. pastoris* maya sisteminde ifade edilmesi sağlandı. Yapılan çalışmalarda aşağıdaki sonuçlara ulaşıldı.

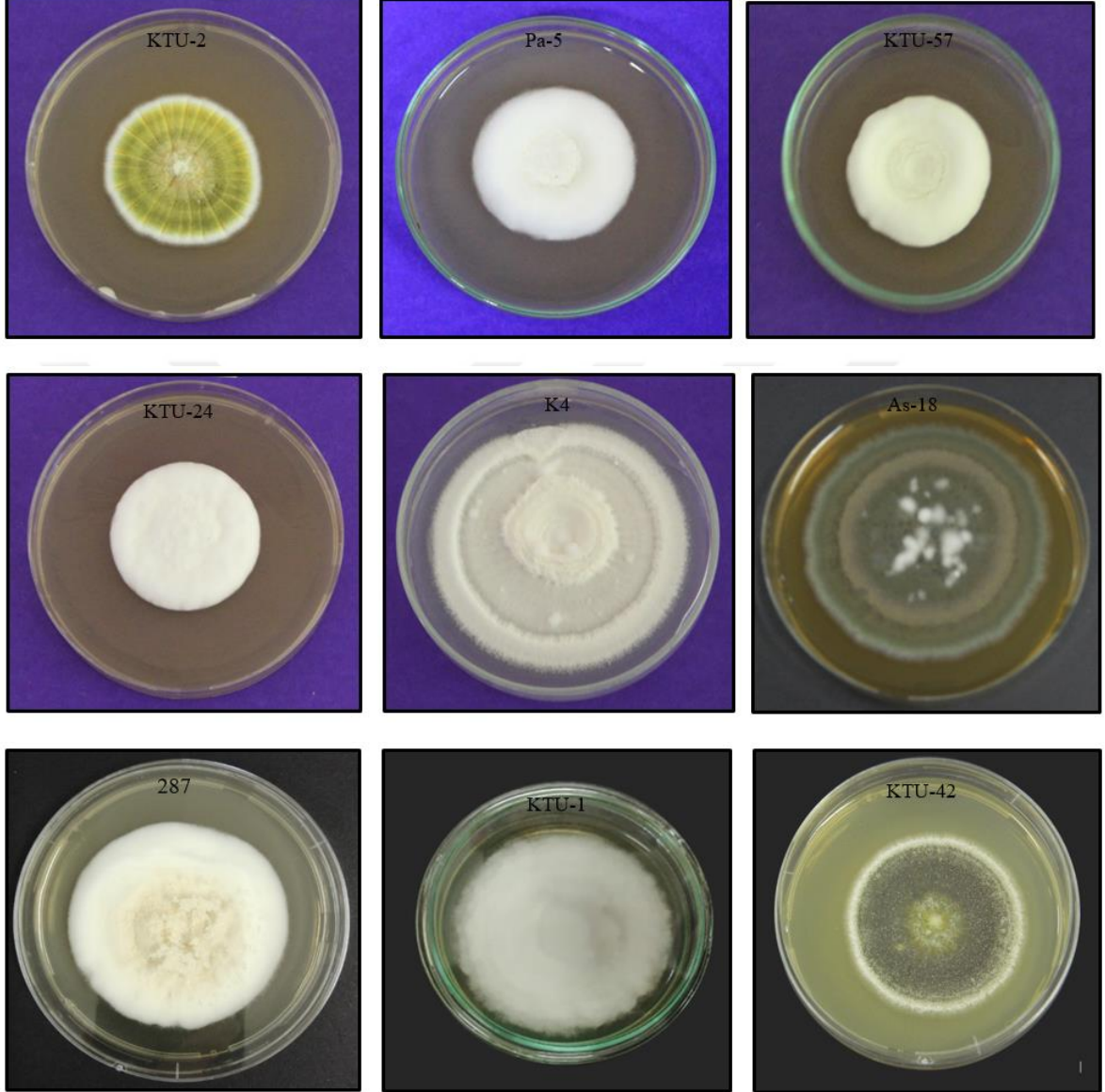
3.1. Besin Ortamında Büyütülen-Tanımlanmış ve İnsektisidal Özellikleri Bilinen Entomopatojen Funguslar

Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan temin edilen fungus izolatları PDAY besiyerinde, 28°C'de, 5-7 gün boyunca büyütüldü (Şekil 20).

Beauveria ve *Isaria* cinsine ait funguslar yüzeyi tozsu, pamuksu görünümde, düzgün yuvarlak koloniler oluşturdu. *Isaria* kolonileri başlangıçta beyaz, sonradan pembe bir renk aldı. *Metarhizium* cinsine ait funguslar ise, tozsu yeşil renkte sporlar oluşturdu (287 nolu izolat hariç).

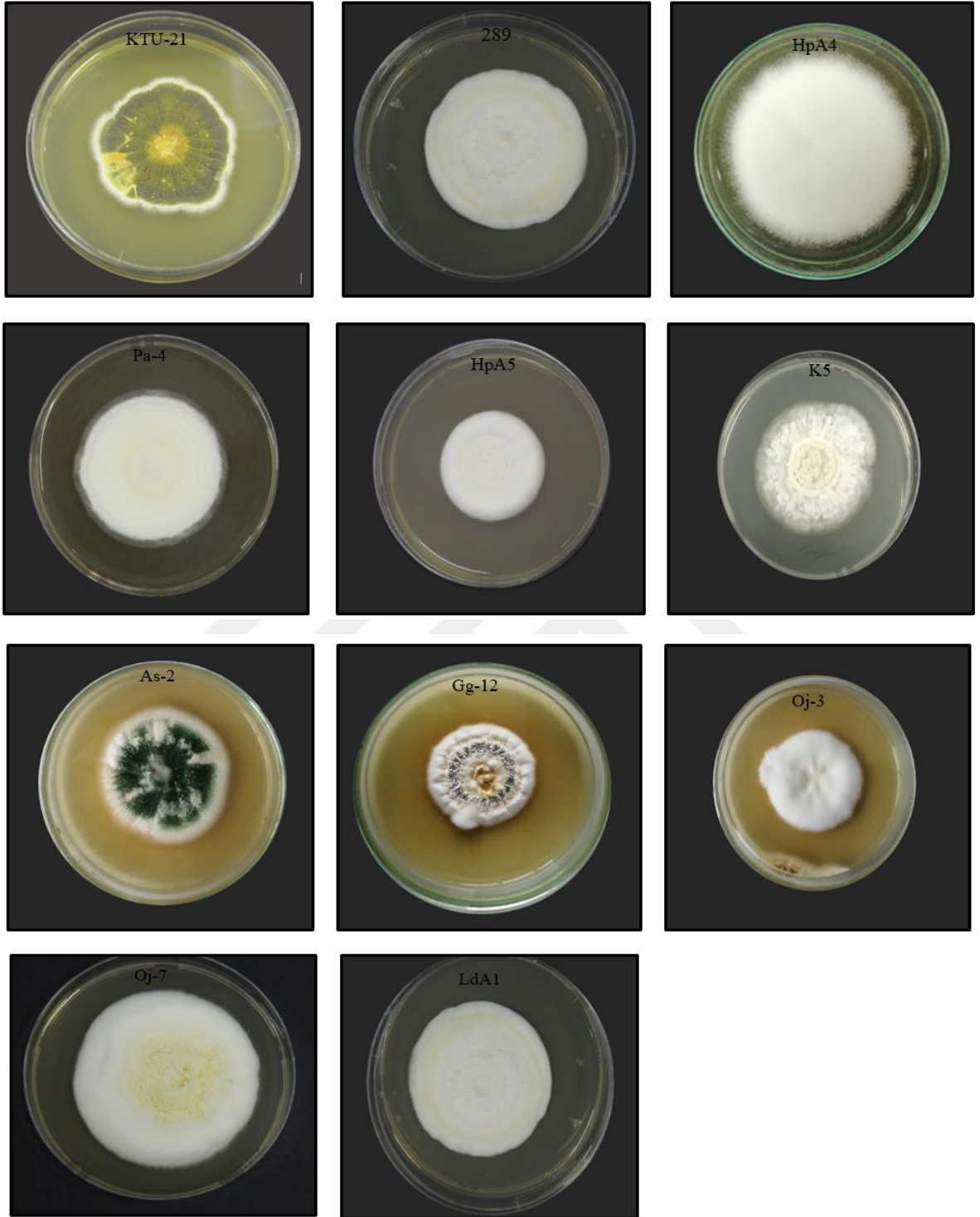
Metarhizium anisopliae'den 7 izolat (As-2, As-18, KTU-2 (Ardeşen), KTU-21 (117), 289, Gg-12, 287), *Beauveria bassiana*'dan 11 izolat (KTU-24 (Çk), KTU-57 (Rh), K4, K5,

Pa4, Pa5, HpA4, HpA5, Oj3, Oj7, LdA1) ve *Isaria fumorosea*'dan 2 izolat (KTU-42 (68-b), KTU-1(Y2)) bu çalışma için kullanıldı.



Şekil 20. Çalışmada kullanılan entomopatojen fungusların PDAY besiyeri üzerindeki koloni morfolojileri. Not: Şekiller üzerindeki kısaltmalar ve detaylar Tablo 6'da açıklanmıştır.

(Şekil 20'nin devamı)



3.2. Entomopatojen Fungus Kültürlerinden İzole Edilen DNA'lar

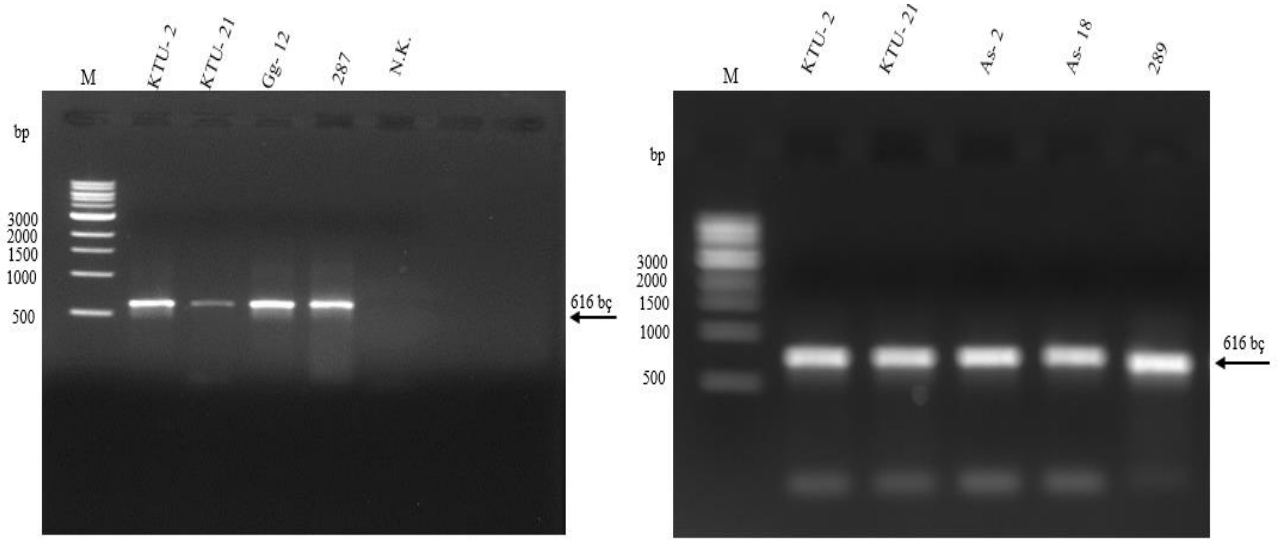
Büyüyen kültürlerden, Fungal/Bacterial DNA MiniPrep Kiti (Zymo Research) kullanılarak DNA izolasyonu yapıldı. 20 adet fungus kültüründen izolat başına toplam 102 ng ile 748 ng arasında DNA elde edildi. Fungusların DNA miktarları Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6. EPF'lerden izole edilen DNA'ların konsantrasyonları

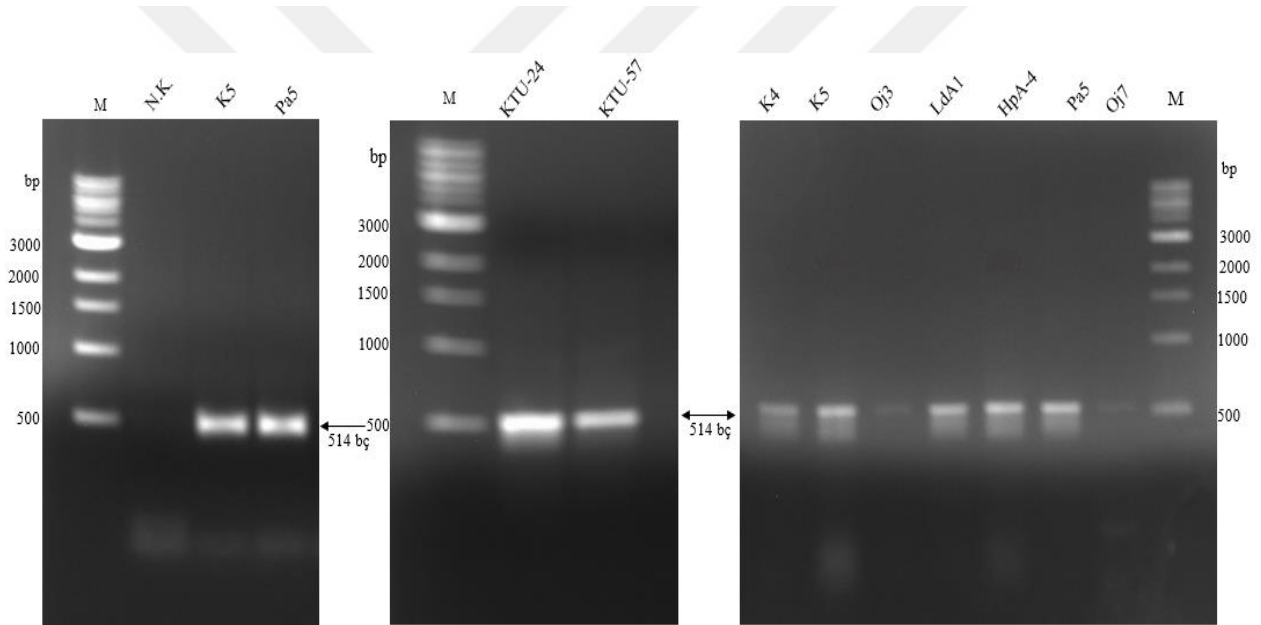
İzolat	Tür	DNA konsantrasyonu (ng/μl)	İzolat	Tür	DNA konsantrasyonu (ng/μl)
As-2	<i>M. flavoviride</i>	551	KTU-24	<i>B. bassiana</i>	357
As-18	<i>M. flavoviride</i>	380	KTU-57	<i>B. bassiana</i>	134
KTU-2	<i>M. brunneum</i>	308	K4	<i>B. bassiana</i>	395
KTU-21	<i>M. brunneum</i>	605	Pa-4	<i>B. bassiana</i>	155
Gg-12	<i>M. brunneum</i>	657	Pa-5	<i>B. bassiana</i>	540
287	<i>M. brunneum</i>	108	HpA-4	<i>B. bassiana</i>	627
289	<i>M. brunneum</i>	502	HpA-5	<i>B. bassiana</i>	602
Oj3	<i>B. bassiana</i>	678	K5	<i>B. bassiana</i>	555
Oj7	<i>B. bassiana</i>	605	KTU-1	<i>I. fumosorosea</i>	102
LdA1	<i>B. bassiana</i>	748	KTU-42	<i>I. fumosorosea</i>	364

3.3. Fungus İzolatlarının PCR ile Çoğaltılan Hidrofobin Gen Bölgeleri

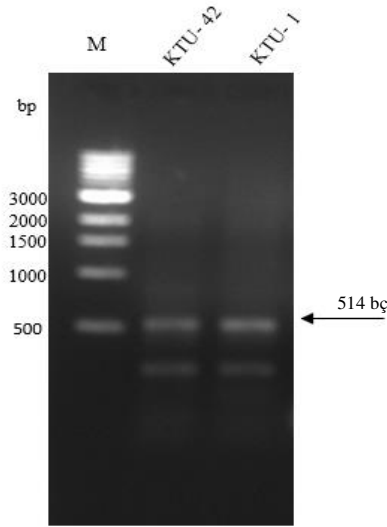
Fungal izolatların hidrofobin gen bölgelerinin tespit edilmesi amacıyla *Metarhizium* izolatları için 616 bp'lik (Şekil 21), *B. bassiana* izolatları için 514 bp'lik (Şekil 22) ve *Isaria* izolatları için 514 bp'lik (Şekil 23) gen bölgesi Tablo 4'te belirtilen primerler kullanılarak PCR ile çoğaltıldı. Daha sonra PCR ürünleri Nucleospin Extract DNA Saflaştırma (Macherey-Nagel) kiti ile saflaştırılarak DNA dizi analizi yapıldı.



Şekil 21. *Metarhizium* izolatlarının *hyd* gen bölgesi, M: Marker (1kb, NEB), NK: Negatif kontrol.



Şekil 22. *Beauveria bassiana* izolatlarının *hyd* gen bölgesi, M: Marker (1kb, NEB), NK: Negatif kontrol.



Şekil 23. *Isaria fumosorosea* izolatlarının *hyd* gen bölgesi, M: Marker (1kb, NEB).

PCR ile elde edilen hidrofobin gen dizileri ara vektöre (pJET 1.2) klonlandı (Bölüm 2.3.2) ve DNA dizin analizi için Macrogen (Hollanda) şirketine gönderildi. Sekans sonucu incelendiğinde, klonlamaların yapıldığı rekombinant vektörlerin 14'ünde hidrofobin gen dizisi tespit edilirken, 2'sinde hidrofobin benzerliği gösteren gen dizisi bulunamadı.

3.4. Hidrofobin Gen Dizilerinin Analizi

3.4.1. Hidrofobin Gen Dizilerinin Sınıflarının Belirlenmesi

Hidrofobin gen dizileri kullanılarak hidrofobinlerin sınıfları belirlendi. Bunun için ilk olarak her fungus türünün kendi hidrofobin geni içindeki (varsa) intron bölgeleri NCBI veri tabanından taranarak belirlendi ve bu bölgeler (Ek 16) hidrofobin gen dizisinden uzaklaştırılarak Expasy programı ile aminoasit yapısına çevrildi ve sistein aminoasitleri arasındaki aminoasit uzaklıklarından (Tablo 7), izolatların hidrofobin sınıfları tespit edildi (Şekil 25).

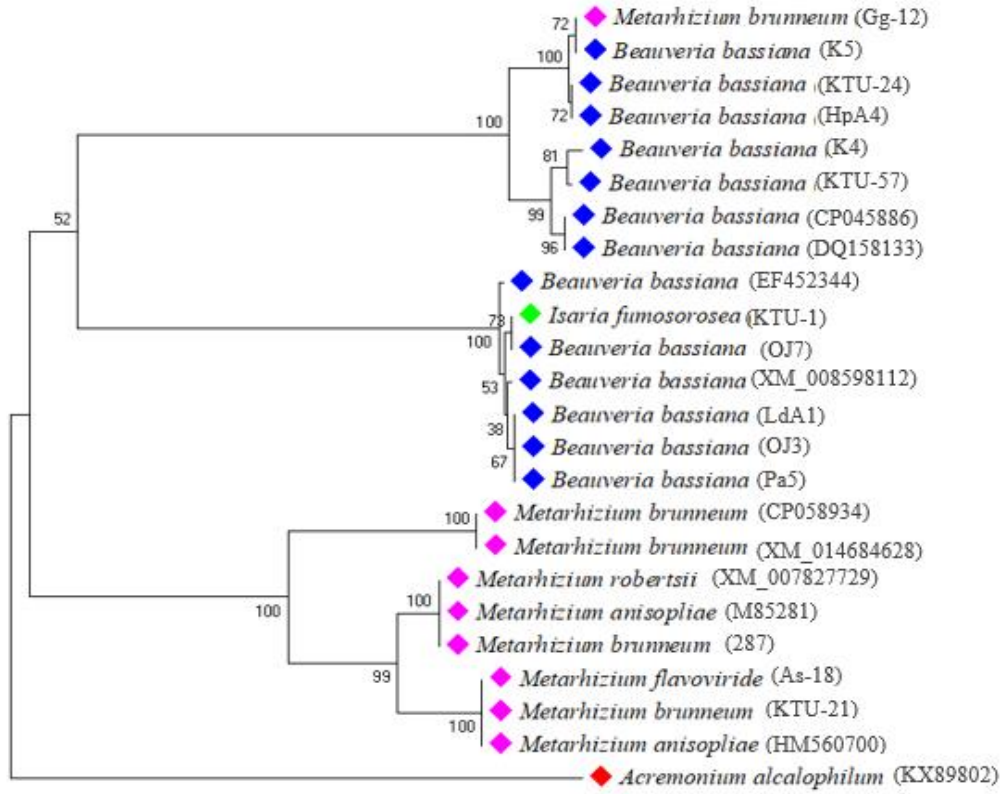
Tablo 7. Sınıf I ve sınıf II hidrofobinlerde sistein aminoasitleri arasındaki uzaklıklar (Ball ve ark., 2020).

Sınıf	Hidrofobin Genlerinde Bulunan Sistein Aminoasitleri Arasındaki Uzaklıklar
Sınıf I	X ₂₆₋₈₅ - C ₁ - X ₅₋₇ - C ₂ - C ₃ - X ₁₉₋₃₉ - C ₄ - X ₈₋₂₃ - C ₅ - X ₅ - C ₆ - C ₇ - X ₆₋₁₈ - C ₈ - X ₂₋₁₃
Sınıf II	X ₁₇₋₆₇ - C ₁ - X ₉₋₁₀ - C ₂ - C ₃ - X ₁₁ - C ₄ - X ₁₆ - C ₅ - X ₈₋₉ - C ₆ - C ₇ - X ₁₀ - C ₈ - X ₆₋₇

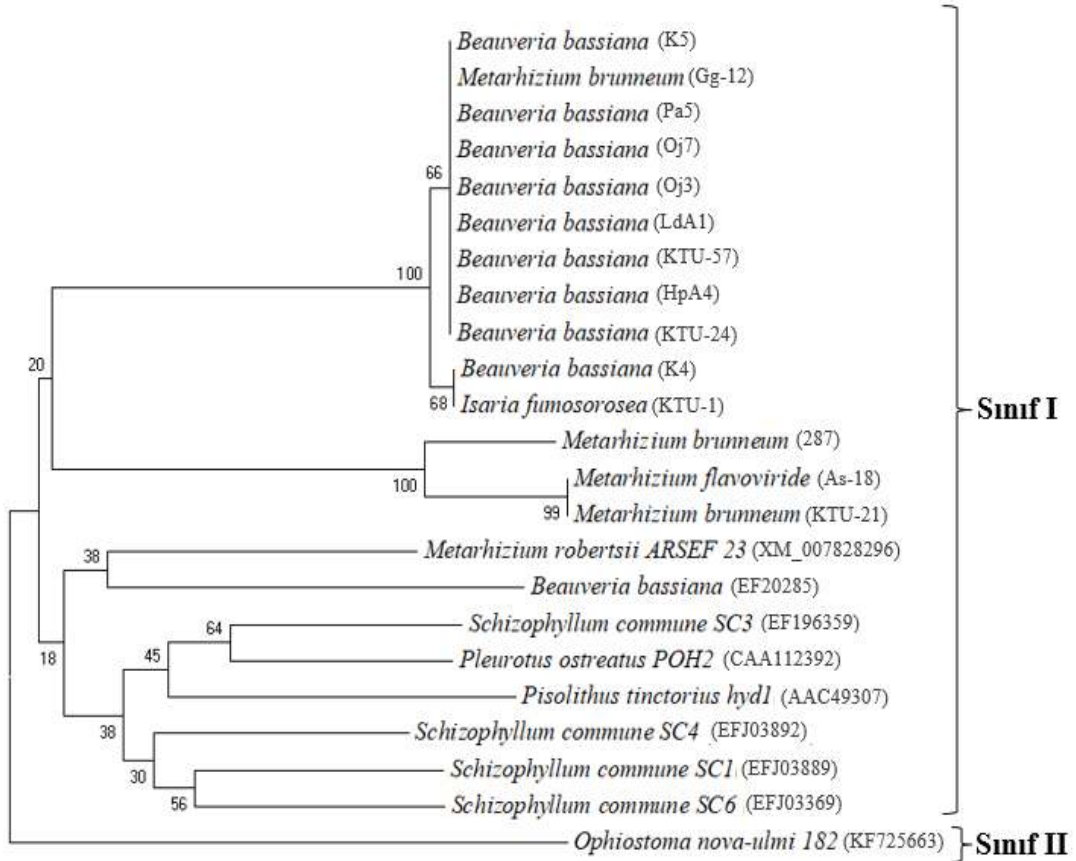
3.4.2. Hidrofobin Gen Dizilerine Göre EPF'lerin Filogenetik İlişkileri

Hidrofobin gen dizileri, NCBI GenBank'ta bulunan diğer hidrofobin genleri ile nükleotit (Şekil 24) ve aminoasit (Şekil 25) seviyesinde karşılaştırıldı. Karşılaştırma BioEdit ve Mega7 programları ile yapıldı.

B. bassiana ve *I. fumosorosea* izolatlarının gen dizilerindeki 109 bç büyüklüğündeki intron bölgeleri uzaklaştırıldı (KTU-57 izolatının intron bölgeleri 'splicing' ile uzaklaştırıldı.) ve intronsuz gen dizileri proteine dönüştürülerek sistein aminoasitleri arasındaki uzaklıklar hesaplandı. Hidrofobin geni ihtiva eden 14 adet izolatın gen dizileri, Expasy Translate programı ile protein formuna dönüştürüldü ve sistein aminoasitleri arasındaki uzaklıklar Tablo 11'de gösterildiği gibi değerlendirildi. Elde edilen bulgulara, bu tez çalışmasında kullanılan ve hidrofobin genine sahip fungus izolatlarının tümünün sınıf I hidrofobin grubunda yer aldığı belirlendi (İzolatların *hyd* nükleotit dizileri Ek 16'da verilmiştir). Ayrıca biyoinformatik olarak sınıfları belirlenen izolatların filogenetik analizleri de yapıldı. Bunun için NCBI veri bankasından sınıf I hidrofobin genine sahip farklı fungus türleri kullanıldı ve elde edilen benzerlik oranları, 14 adet fungus izolatının sınıf I hidrofobin grubunda olduğunu destekledi.



Şekil 24. Fungal izolatların hidrofobin gen dizisine göre filogenetik ilişkileri. Mavi renk, *B. bassiana* izolatlarını; yeşil renk, *I. fumosorosea* izolatlarını; mor renk, *Metarhizium* sp. izolatlarını ve kırmızı renk ise dış grubu ifade etmektedir.

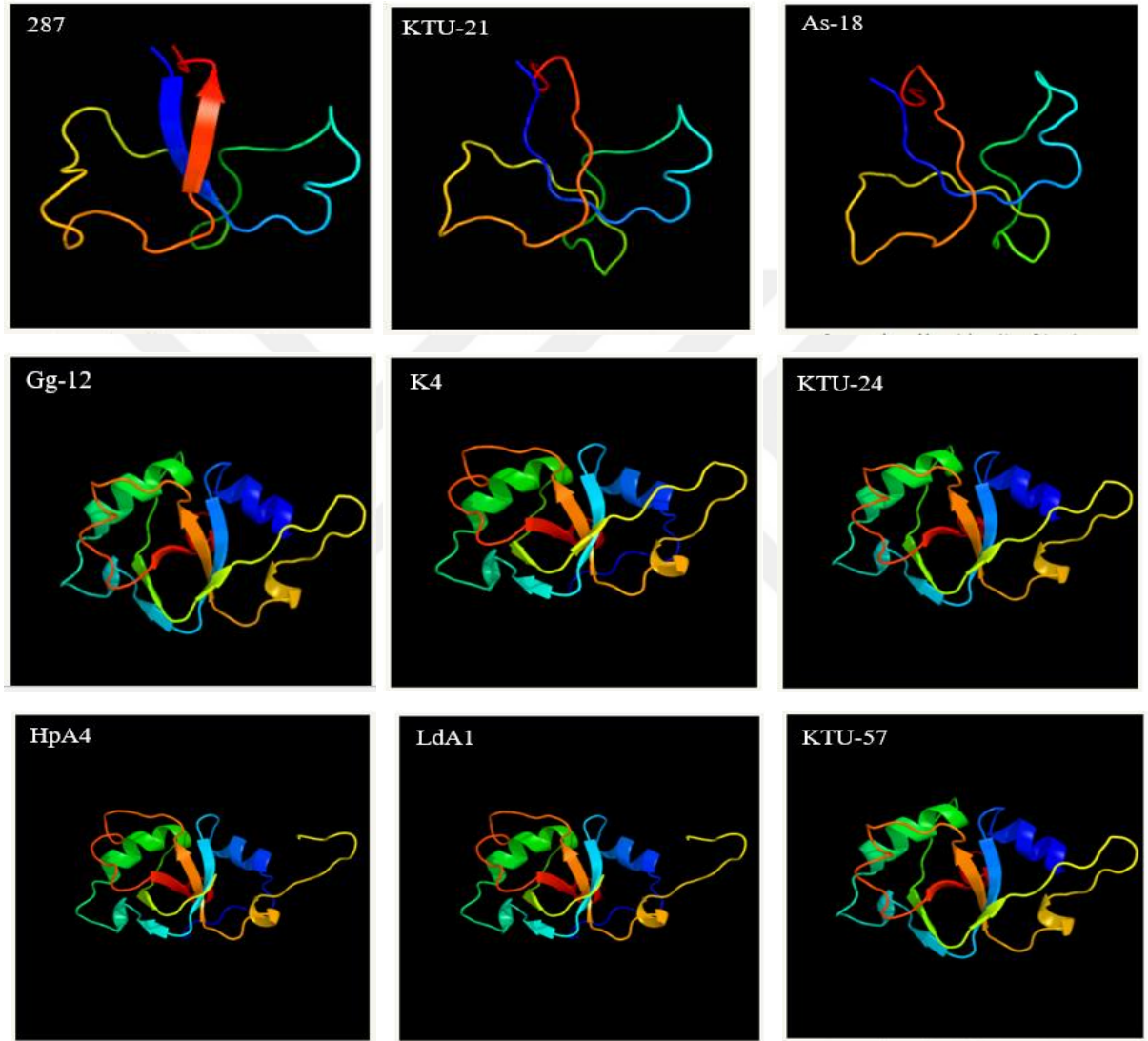


Şekil 25. Fungus izolatlarının Hyd protein dizilerine göre filogenetik ilişkileri. Dış grup olarak sınıf II hidrofobin proteinine sahip *Ophiostoma nova-ulmi* fungusu kullanılmıştır.

Bu tez çalışmasında 20 adet EPF izolatının 14'ünde hidrofobin geni tespit edildi. Hidrofobin gen dizilerine göre yapılan filogenetik analiz sonucunda, *I. fumosoresea* ve *B. bassiana* izolatlarına ait hidrofobin genlerinin kendi içlerinde birbirlerine %52 oranında, *Metarhizium* izolatlarına ait hidrofobin genlerinin ise kendi içlerinde birbirlerine %100 benzerlik gösterdiği tespit edildi. Ayrıca *M. brunneum* Gg-12 hidrofobininin *Metarhizium* olarak tanımlanmasına rağmen *B. bassiana* izolatları arasında yer alması ve *B. bassiana* K5 hidrofobin geni ile % 72 oranında benzerlik göstermesi dikkat çekiciydi. Öte yandan *I. fumosoresea* KTU-1 hidrofobin geninin *B. bassiana* izolatlarından OJ7 hidrofobin geni ile %73 oranında benzerlik göstermesi diğer bir dikkat çekici noktaydı. Dış grup olarak ise, *Acremonium alcalophilum* fungusunun gen sırası kullanıldı.

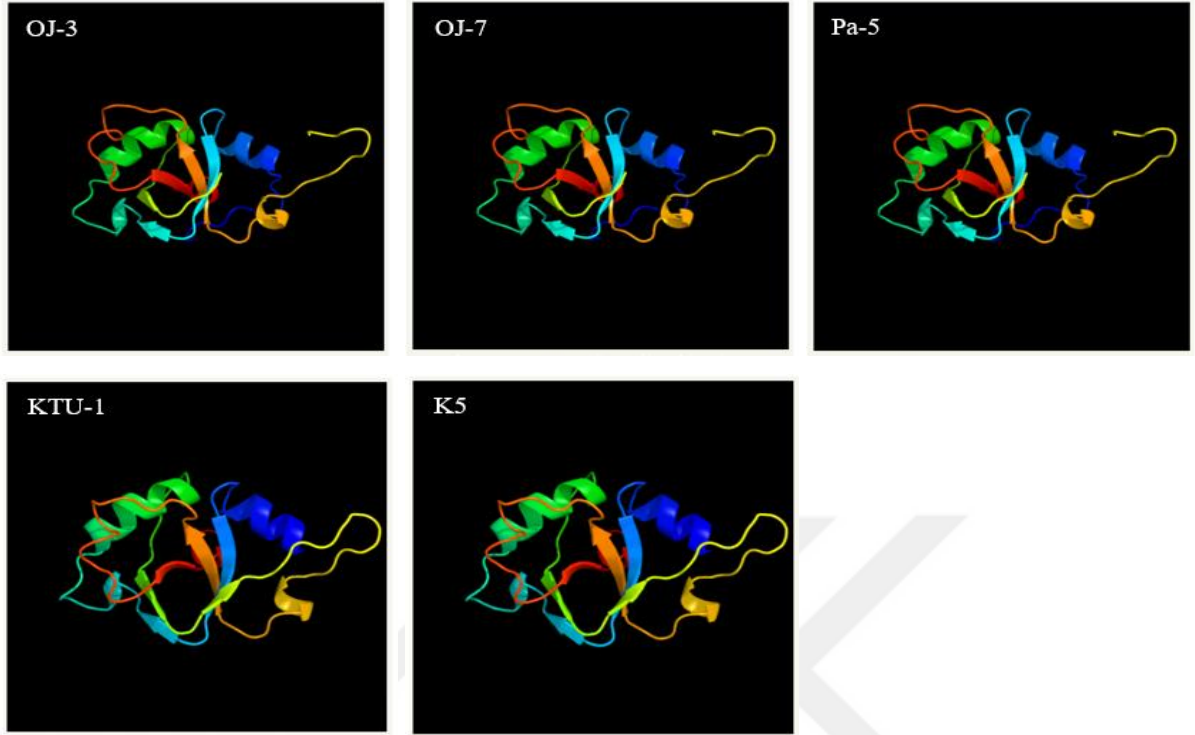
3.4.3. Fungus İzolatlarının Hidrofobin Gen Dizileri Kullanılarak 3 Boyutlu Yapılarının Elde Edilmesi

Hidrofobin gen dizileri belirlenen 14 fungus izolatının üç boyutlu yapıları, Phyre² programı (URL-3, 2022) ile belirlendi (Şekil 26).



Şekil 26. Hidrofobin gen dizileri belirlenen fungus izolatlarının 3D protein yapıları.

Şekil 26'nın devamı



Proteinlerin katlanma özellikleri incelendiğinde, *Metarhizium* izolatlarından As-18 ve KTU-21'in protein katlanma özelliklerinin benzer olduğu görülmektedir. Bunun yanında, *B. bassiana* izolatlarından KTU-24, KTU-57, K4 ve K5 kendi içlerinde; HpA4, LdA1, Oj-3, Oj-7 ve Pa5 kendi içlerinde benzer katlanma özellikleri sergilemektedir. Ayrıca *I. fumosoresea* KTU-1 ve *M. brunneum* Gg-12 hidrofobinlerinin katlanma özelliklerinin, *B. bassiana* KTU-24, KTU-57, K4 ve K5 ile benzerlik taşıdığı görülmektedir.

3.5. İnsektisidal Etki ile Hidrofobin Proteinlerinin Karşılaştırılması

Tez çalışmasında kullanılan EPF'lerin insektisidal etkileri, Tablo 8-9-10'da gösterilmiştir.

Tablo 8. *Metarhizium sp.* izolatlarının insektisidal aktiviteleri

İZOLAT (<i>Metarhizium sp.</i>)	İNSEKTİSİDAL AKTİVİTELER		Hidrofobin Proteini (Hyd)	REFERANS
	Etki Oranı (%)	Konukçu Canlı		
As-2	93	<i>Amphimallon solstitiale</i>	Sınıf I (Hyd3)	Biryol ve ark., 2020
As-18	96	<i>Amphimallon solstitiale</i>	Sınıf I (Hyd1, Hyd3)	Biryol ve ark., 2020
KTU-2 (Ardeşen)	92 83 80-90	<i>Agelastica alni</i> <i>Corythucha ciliata</i> (ergin) <i>Corythucha ciliata</i> (larva)	Sınıf I (Hyd1, Hyd3)	Sevim ve ark., 2013
KTU-21 (117)	75 60-70	<i>Agelastica alni</i> <i>Corythucha ciliata</i>	Sınıf I (Hyd1, Hyd3)	Sönmez ve ark., 2017
287	80-90	<i>Agelastica alni</i>	Sınıf (Hyd1)	Sevim ve ark., 2013
289	80-90	<i>Agelastica alni</i>	Bulunamadı	Sevim ve ark., 2013
Gg-12	93 100	<i>Lobesia botrana</i> <i>G. gryllotalpa</i> (larva)	Sınıf (Hyd1)	Sönmez ve ark., 2016

Tablo 9. *Isaria fumosoresea* izolatlarının insektisidal aktiviteleri

İZOLAT (<i>I.fumosoresea</i>)	İNSEKTİSİDAL AKTİVİTELER		Hidrofobin Proteini (Hyd)	REFERANS
	Etki Oranı (%)	Konukçu Canlı		
KTU-1 (Y2)	0-20	<i>Tenebrio molitor</i> (larva)	Sınıf I (Hyd)	Sevim, 2020
KTU-42 (68-b)	60-70	<i>Corythucha ciliata</i>	Bulunamadı	Sevim ve ark., 2013

Tablo 10. *Beauveria bassiana* izolatlarının insektisidal aktiviteleri

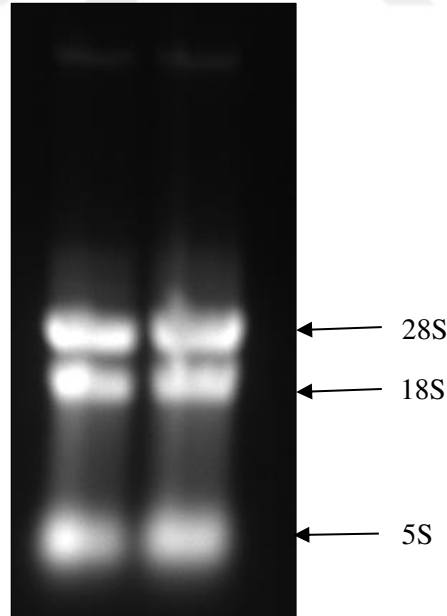
İZOLAT (<i>B. bassiana</i>)	İNSEKTİSİDAL AKTİVİTELER		Hidrofobin Proteini (Hyd)	REFERANS
	Etki Oranı (%)	Konukçu Canlı		
KTU-24 (Çk)	100	<i>Agelastica alni</i>	Sınıf I (Hyd)	Sönmez ve ark., 2016 Sönmez ve ark., 2017
	77-83	<i>Coryhucha arcuata</i>		
	86	<i>Coryhucha ciliata</i> (ergin)		
	80-90	<i>Coryhucha ciliata</i> (larva)		
	100	<i>Thaumetopea pityocampa</i>		
KTU-57 (Rh)	75	<i>Coryhucha ciliata</i> (ergin)	Sınıf I (Hyd)	Sevim ve ark., 2013 Biryol ve ark., 2021
	70	<i>Coryhucha ciliata</i> (larva)		
	75	<i>Orosanga japonica</i> (ergin)		
	75	<i>Orosanga japonica</i> (larva)		
K4	98-100	<i>Hypera postica</i> (ergin) <i>Hypera postica</i> (larva)	Sınıf I (Hyd)	Yücel ve ark., 2018
Pa-4	60-70	<i>Myzus persicae</i>	Bulunamadı	Biryol ve ark., 2021
Pa-5	70-80	<i>Myzus persicae</i>	Sınıf I (Hyd)	Biryol ve ark., 2021
Oj3	70-80	<i>O. japonica</i>	Sınıf I (Hyd)	Yayına dönüştürülmedi
Oj7	70-80	<i>O. japonica</i>	Sınıf I (Hyd)	Yayına dönüştürülmedi
LdA1	80-90	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Sınıf I (Hyd)	Yıldırım, 2021
HpA-4	97	<i>Hypera postica</i> (ergin) <i>Hypera postica</i> (larva)	Sınıf I (Hyd)	Yücel ve ark., 2018
HpA-5	97	<i>Hypera postica</i> (ergin) <i>Hypera postica</i> (larva)	Bulunamadı	Yücel ve ark., 2018
K5	80-90	<i>Hypera postica</i> (ergin) <i>Hypera postica</i> (larva)	Sınıf I (Hyd)	Yücel ve ark., 2018

3.6. Hidrofobin Geninin *Pichia pastoris*'te İfade Edilmesi

B. bassiana türünün insektisidal etkilerinin yüksek olması, morfolojik özellikleri dikkate alındığında hızlı sporlaşma göstermeleri ve hif yapılarından ötürü bu türe ait bir izolatın ekspresyonda kullanılabileceğine karar verildi ve bu amaçla elimizdeki EPF'ler içerisinde bu koşullara en uygun izolatın KTU-57 (Rh) izolatı olduğu sonucuna varıldı.

3.6.1. KTU-57 (Rh) İzolatından RNA İzolasyonu

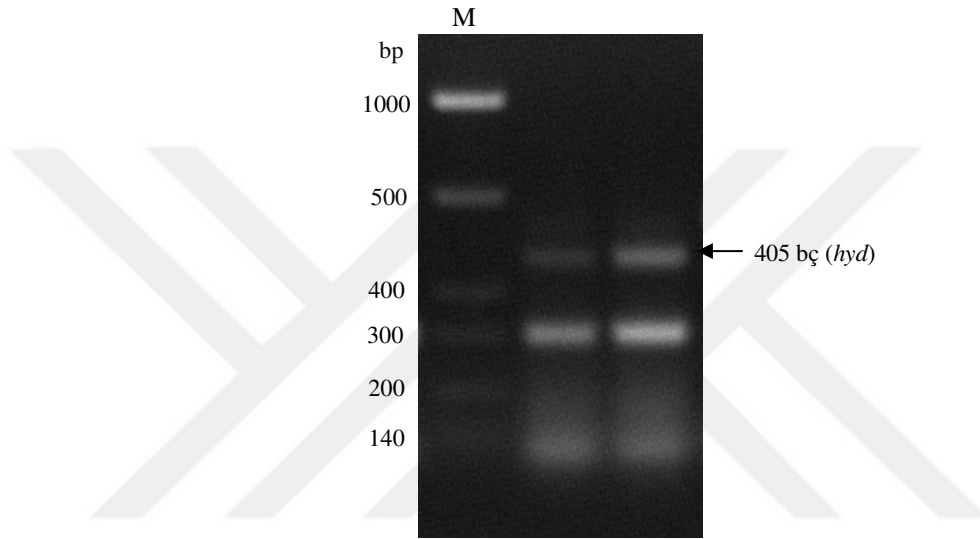
KTU-57 (Rh)'nin hidrofobin geni *P. pastoris*'te ifade edilmek üzere belirlendi. Bunun için ilk olarak bu izolattan toplam RNA izolasyonu yapıldı ve elde edilen RNA'lar, DEPC ile muamele edilmiş %1'lik agaroz jel üzerinde yürütüldü (Şekil 27). Jel üzerinde ribozomal RNA alt birimlerine ait bantların net olarak görünmesi, saflaştırılan RNA örneğinin sağlam, kırılmamış olduğunu ve cDNA çalışması için kullanılabileceğini gösterdi.



Şekil 27. KTU-57 EPF'sinden elde edilen toplam RNA.

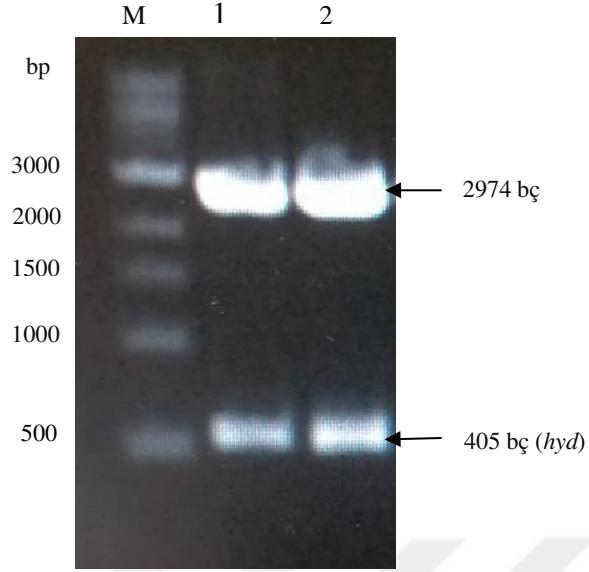
3.6.2. cDNA'ların Elde Edilmesi ve Ara Vektöre Klonlama

Elde edilen RNA'lardan ilk olarak revers transkriptaz enzimi (GoldBio) varlığında tek zincirli cDNA'lar, daha sonra ise bu tek zincirli cDNA'lardan PCR ile çift zincirli DNA'lar elde edildi. Sonuç olarak, beklenildiği gibi 405 baz çifti uzunluğunda hidrofobin genine ait cDNA elde edilmiş oldu (Şekil 28).



Şekil 28. KTU-57'nin hidrofobin genine ait cDNA.

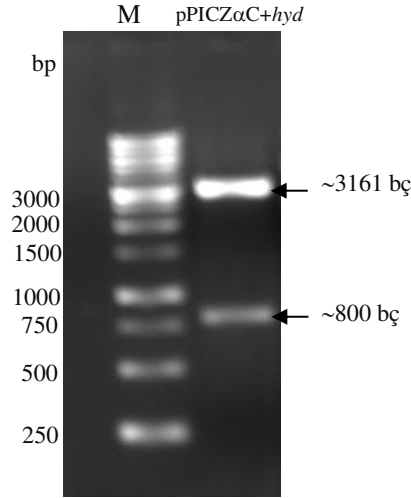
Agaroz jelde görüntülemesi yapılan cDNA'lar jelden temizlenerek, pJET1.2 ara vektörüne klonlandı. Klonlama işleminin akabinde rekombinant pJET1.2 vektörü, *EcoRI* ve *NotI* enzimleri ile kesildi (Şekil 29). Kesim sonucunda oluşan vektör (2974 bç) ve hedef gen (405 bç) bantları jel üzerinde görüntülendikten sonra, hidrofobin geni jelden kesilerek temizlendi.



Şekil 29. pJET rekombinant vektörün *EcoRI* ve *NotI* ile restriksiyon analizi. 1,2: pJET+*hyd* (*EcoRI/NotI*), M:1kb, NEB.

3.6.3. pPICZαC Maya Vektörünün Kesimi ve Rekombinant Maya Vektörünün Elde Edilmesi

P. pastoris pPICZαC vektörü *EcoRI* ve *NotI* enzimleriyle kesildi ve konsantrasyonu belirlenen hidrofobin geni ile ligasyon kuruldu. Ligasyon reaksiyonu ve transformasyon işlemleri, bölüm 2.4.3'te anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Sonuçta, rekombinant maya vektörü (pPICZαC+*hyd*) elde edildi. Elde edilen rekombinant maya vektörü, *HindIII* ve *SalI* enzimleriyle kesilerek doğrulandı (Şekil 30).



Şekil 30. Rekombinant maya vektörünün *HindIII* ve *SalI* ile restriksiyon analizi.

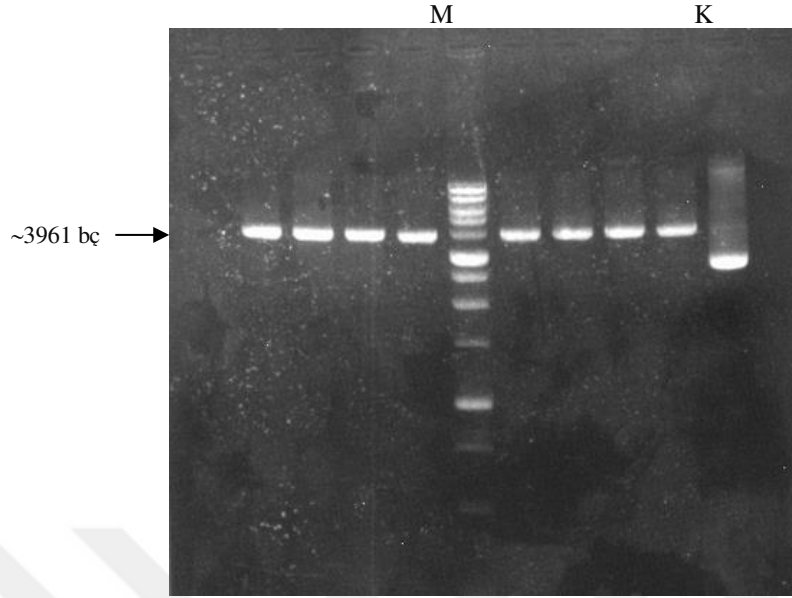
Hidrofobin geninin maya vektörü içerisindeki yerleşiminin doğruluğunu teyit etmek amacıyla rekombinant maya vektörü dizin analizi için MacroGen (Hollanda) firmasına gönderildi. Analiz sonucunda *hyd* gen dizisinin vektördeki yerleşiminde bir problem olmadığı belirlendi. Elde edilen *hyd* gen dizisi, Expasy programı ile proteine dönüştürüldü ve hidrofobinler için önem teşkil eden 8 sistein (C) amino asidi dizide gösterildi (Tablo 11).

Tablo 11. Maya vektörüne klonlanan hidrofobin geninde yer alan sistein aminoasitleri

MTLGQAGDRCGADQSIYCCNEKTTKIEHSSPETGLGGLLGATVGADGLLSHLLGTCTKIPVNVLA VGNLLQSEC
TNRAACCHNTPSVAYGGLVNLALPCVAIGSLIQAAASFLEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH-

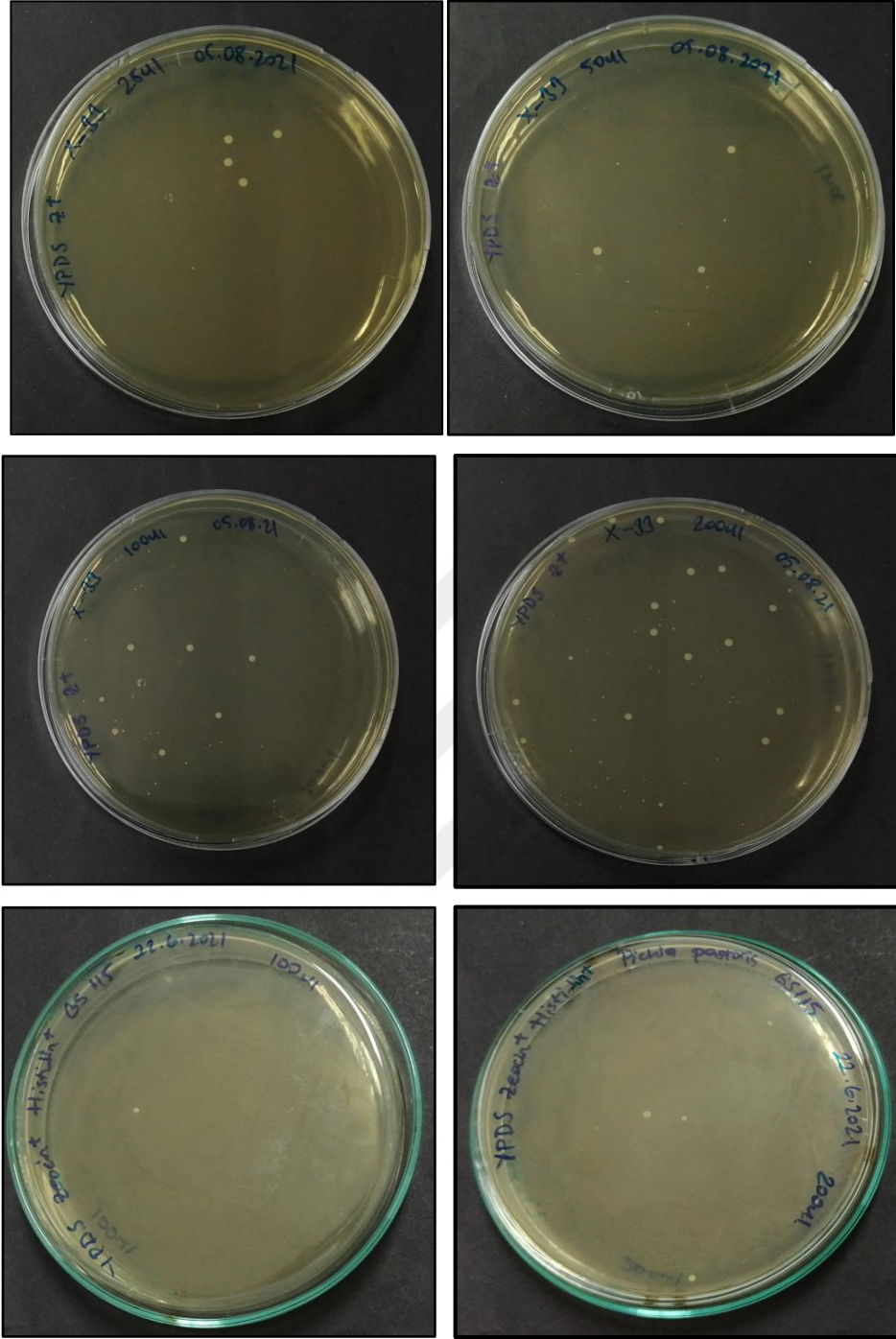
3.6.4. Rekombinant Maya Vektörü (pPICZαC+*hyd*)'nün Ekspresyon Konağına Transformasyonu

Rekombinant maya vektörünü konağına aktarmak için lineer hale getirmemiz gerekmektedir. Bunun için rekombinant vektör, *SacI* restriksiyon enzimi ile muamele edildi (Şekil 31) ve kesim sonucunda elde edilen bant büyüklüğü ~3961 baz çifti olarak belirlendi.



Şekil 31. Rekombinant maya vektörünün *SacI* ile restriksiyon analizi.
M:1 kb NEB, K: Kesilmemiş plazmit.

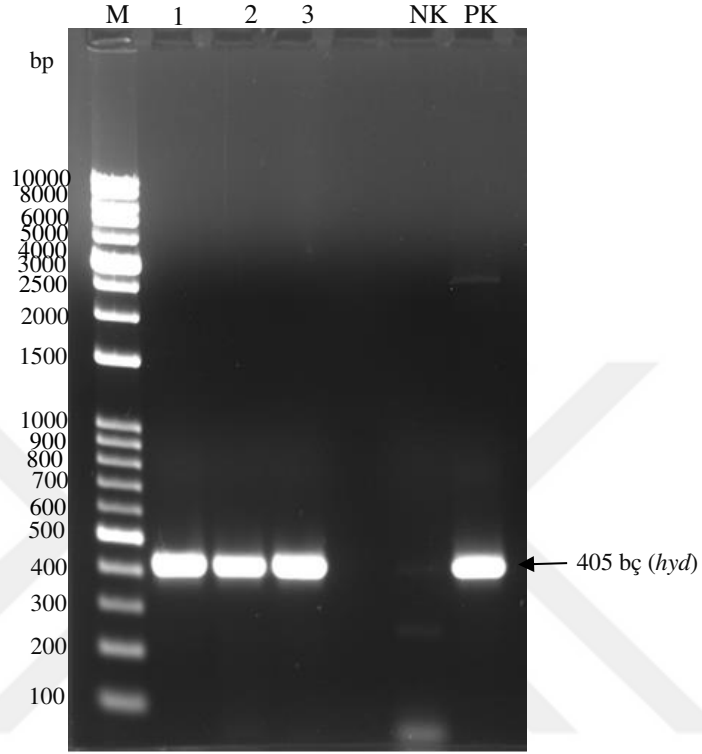
Lineer hale getirilen rekombinant maya vektörü elektroporasyon yolu ile *P. pastoris* X-33 ekspresyon konağına aktarıldı. Ayrıca kontrol olarak hazırlanan ve lineer hale getirilen pPICZαC vektörü de hem GS115 ekspresyon konağına hem de GS115 albumin kontrol konakçısına aktarıldıktan sonra tüpler, sallanma olmadan 30°C'deki etüvde 1-2 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hücreler 10, 25, 50, 100, 200 µl olacak şekilde zeocinli (100 µl/ml) YPDS plaklarına bagetle yayıldı ve büyümeleri için 30°C'de 3-4 gün inkübe edildi. Büyüyen kolonilerden 10 adet seçildi ve seçilen koloniler zeocinli (100 µl/ml) YPDS plaklarında saflaştırıldı ve stok kültürleri hazırlandı (Şekil 32).



Şekil 32. *P. pastoris* gen ifade konaklarında transformasyon sonucu oluşan koloniler.

Büyüyen kolonilerden Fungal/Bacterial DNA MiniPrep Kit (Zymo Research) kullanılarak DNA izolasyonları yapıldı. İzole edilen DNA'lar kullanılarak yapılan PCR

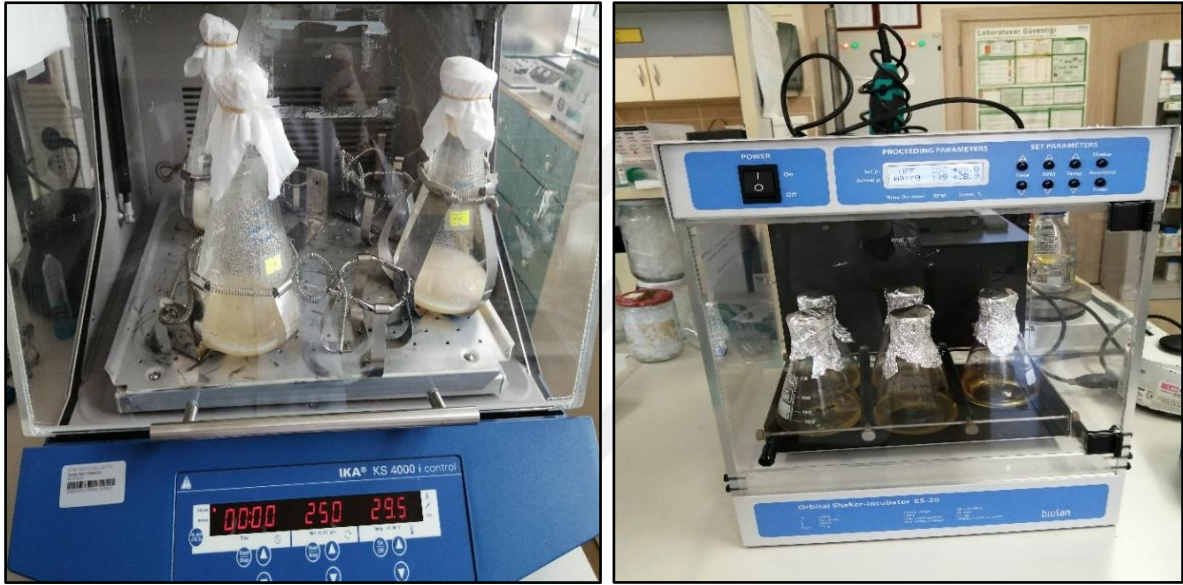
sonucunda, jel üzerinde 405 bç büyüklüğünde hedef bandın gözlenmesiyle mayanın genomunda hidrofobin geninin olduğu doğrulandı (Şekil 33).



Şekil 33. Rekombinant *P. pastoris* X-33'ün genomunda bulunan hidrofobin geninin PCR ile çoğaltılması. M: Marker 1kb DNA Ladder Plus, NK: Negatif kontrol (GS115), PK: Pozitif kontrol.

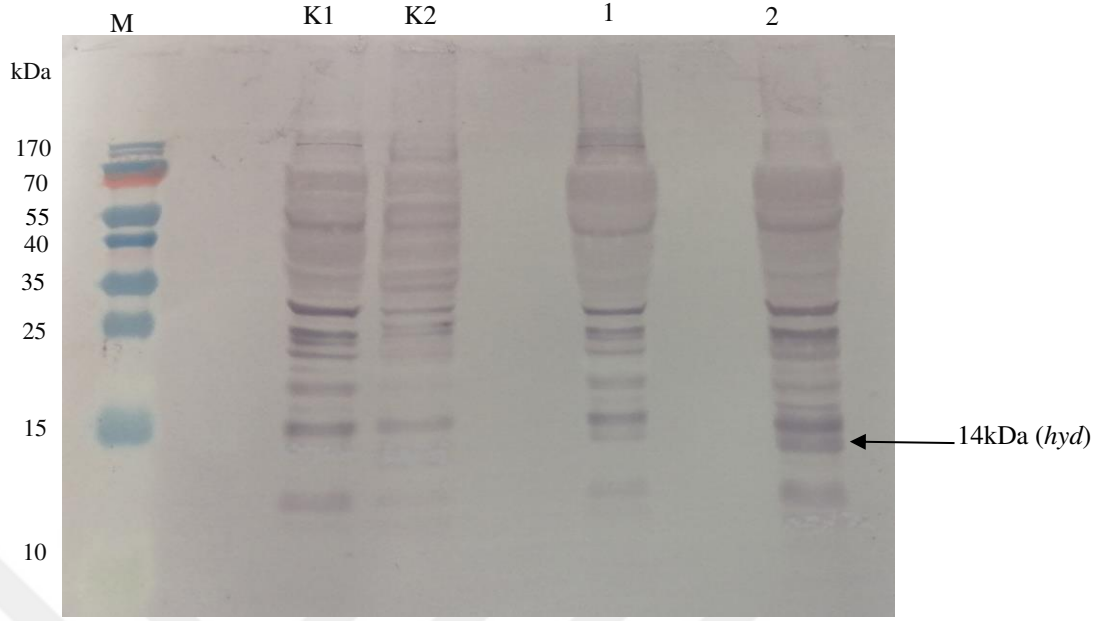
3.6.5. *Pichia pastoris*'te Gen İfadesi

Gen ifadesi için transformasyon sonrası büyüyen rekombinant *P. pastoris* X-33 mayasından 2 koloni, rekombinant *P. pastoris* GS115 ve GS115 albumin mayalarından ise 1'er koloni alındı ve ortam koşulları *P. pastoris*'te gen ifadesi için uygun hale getirildi (Bölüm 2.4.7). Kullanılan inkübatörlerin sıcaklığının 28-30°C'de olmasına dikkat edildi (Şekil 34).



Şekil 34. Protein ifadesi için kültürlerin istenilen koşullardaki inkübatörlere yerleştirilmesi.

Protein ifadesi için 24. saat ve 48. saatlerdeki kültürlerden 1 ml örnek alındı ve bu örnek santrifüj ile süpernatant ve pellet olarak farklı mikrosantrifüj tüplerine konuldu. Daha sonra hücrenin pelletinde ve süpernatantında ifade edilen Hyd proteinleri (Bölüm 2.4.7.1 ve 2.4.7.2) SDS-PAGE jeline yüklendi ve Western Blot ile görüntülemeleri yapıldı (Şekil 35).



Şekil 35. Hidrofobin geninin Western blot analizi. M: Marker, K1: GS115+pPICZ α C, K2: GS115Albumin+pPICZ α C, 1: pPICZ α C+*hyd* (48.h), 2: pPICZ α C+*hyd* (24.h).

Sonuç olarak, rekombinant X-33 maya hücresinde ifade edilen hidrofobin proteinine hücrenin pelletinde rastlandı ve büyüklüğü, Western blot analizi ile ~14 kDa olarak belirlendi.

4. TARTIşMA

Entomopatojenik funguslar, pek çok zararlı böcek popülasyonunun kontrol altında tutulmasında önemli rol oynayan biyolojik mücadele etmenleridir. Bu organizmalar, zorlu evre koşullarına dayanıklılık kazanabilmek için hidrofobin proteinleri üretirler. Hidrofobinler, hava hiflerine ve konidialara hidrofobiklik sağlayan, mantarların konak yüzeylere tutunmasını destekleyen, ipliksi funguslara özgü küçük ve yüzey aktif özellikte olan proteinlerdir (Ball ve ark., 2020). Bu proteinler, fungus sporlarının etrafında monolayer (tek sıralı) katmanlar halinde bulunur. İçerdikleri disülfid bağları nedeniyle son derece kararlı yapıda olup fungusa yaşam süresi boyunca birçok avantaj sağlar. Sporun çimlenmesinde, zararlı ışınlar (UV ışını gibi) karşı sporun kendini korumasında (stres direnci oluşturmasında), sporun konukçuya yapışmasında ve konukçu üzerinde virülans (enfeksiyon) oluşturmasında etkilidirler (Blango ve ark., 2019).

Bu tez çalışmasında entomopatojen funguslarda bulunan hidrofobin genlerinin belirlenmesi, hidrofobin özellikleri ile insektisidal özelliğin karşılaştırılması ve seçilecek hidrofobin geninin *Pichia pastoris* maya sisteminde ifade edilmesi sağlanarak endüstriyel kullanım için hazırlanması amaçlanmaktadır. Özellikle hidrofobinler öztoplanma yapabilme, güçlü asitlerde çözünebilme, yüzey özelliklerini değiştirebilme özelliklerinden ve surfektant olmalarından dolayı birçok biyoteknolojik uygulamada umut vaat eden küçük boyutlu amfipatik proteinlerdir (Piscitelli ve ark., 2017; Ball ve ark., 2020). İlaçların biyoyararlanımı, yüzey modifikasyonları, hidrofobik materyallerin sulu çözeltelerde dağıtılması, üretim proseslerinde köpük oluşumunun engellenmesi, biyosensörler, rekombinant proteinlerin sağlaştırma basamakları ve kendi kendini temizleyen materyallerin üretimi gibi alanlar, hidrofobinlerin en güncel uygulama alanları olarak sıralanabilir (Kulkarni ve ark., 2017). Hidrofobinler, amfipatik özelliklerinden dolayı nanopartikül oluşturmak ve stabilize etmek için kullanılabilme potansiyeline sahip, basit ve tre özgü alternatiflerdir (Wosten ve Scholtmeijer, 2015). Hidrofobinlerin oldukça kararlı emlsiyerler oluşurma yeteneği, onların farmasötik uygulamalarda stabil preparatların hazırlanmasında, ilaç endüstrisinde ve temizlik malzemelerinde emülgatör olarak kullanılabilirliğini sağlamaktadır (Linder ve ark., 2005).

Bu amaçla *Metarhizium*, *Beauveria* ve *Isaria* türlerinden oluşan 20 adet EPF izolatı PDAY besiyeri üzerinde büyütülerek DNA izolasyonları yapıldı ve türe özgü, gene spesifik primerler ile hidrofobin gen bölgeleri çoğaltıldı. Sevim ve ark. (2012), *Metarhizium* KTU-60 izolatında gene spesifik primerler ile sınıf I (*hyd1*, *hyd3*) ve sınıf II (*hyd2*) hidrofobinleri elde ederek 616 bç'lik hidrofobin gen bölgesini çoğaltmışlardır. Bu tez çalışmasında ise *Metarhizium* izolatlarından As-18, KTU-21, Gg-12 ve 287'de aynı primerler kullanılarak sınıf I (*hyd1*, *hyd3*) hidrofobini tespit edildi ve 616 bç'lik hidrofobin gen bölgesi çoğaltıldı. Ayrıca, *B. bassiana* ve *I. fumosorosea* izolatlarından elde edilen hidrofobin genlerinin (514 bç) sınıf I grubuna ait olduğu biyoinformatik ve filogenetik analizler ile doğrulandı. Sınıf I hidrofobinlerin monomerleri, α -sarmal duruma saniyeler içinde ulaşırken, β - tabaka durumuna dönüşümleri çok daha yavaştır (Ren ve ark., 2013a) ve bu durum onların katlanma davranışlarını etkilemektedir. Bununla birlikte fungus izolatlarının hiçbirinde sınıf II hidrofobinine rastlanılamadı. Literatürde hidrofobinler üzerine yapılan çalışmalarda He ve ark. (2017), sınıf II *Trichoderma reesei*'den *Trhfb3* hidrofobin genini elde ederek bu genin fungus üzerindeki işlevini karakterize etmişlerdir. Zhang ve ark. (2011), *B. bassiana*'dan sınıf I (*hyd1*, *hyd2*) hidrofobini; Rafeeq ve ark. (2021), *Pleurotus floridanus*'tan sınıf I (PfH) hidrofobinini; Tao ve ark. (2019), *Flammulina filiformis*'ten *hyd9* genini elde etmişlerdir. Moonjely ve ark. (2018) ise, *B. bassiana* sınıf I (*hyd1*, *hyd2*) hidrofobin geninin etkinliğini azaltarak bu genlerin fungus üzerindeki fonksiyonunu gözlemişlerdir. Sonuçta, fungusun fasülye kökleri ile etkileşiminin büyük ölçüde azaldığını, büyüme hızının, spor oluşturma kabiliyetinin ve oosporein üretiminin etkilendiğini bildirmişlerdir.

Metarhizium türü funguslar, yeşil veya sarı yeşil renkli paralel zincirlerden oluşan bir yapı oluştururlar (Sinha ve ark., 2016). Bu çalışmada kullanılan *Metarhizium* 287 izolatı ise bu durumun aksine beyaz, pamuksu bir morfoloji gösterdi. Bunun yanında moleküler özellikleri ve filogenetik analizler, onun bir *Metarhizium* olduğunu doğruladı (Şekil 24-25). Bu çalışma ile entomopatojenik fungus *Metarhizium*'ların katı besiyeri üzerindeki morfolojik yapılarının, sadece yeşil ve yeşilin tonlarında değil, beyaz ve pamuksu yapıda da olabileceğini gösterdi (Şekil 20).

Metarhizium türlerinden 7 izolat, *B. bassiana*'dan 11 izolat ve *I. fumosoresea*'dan 2 izolat bu çalışma için kullanılmıştır. Bu izolatların 14'ünde hidrofobin genine rastlanmıştır (As-18, KTU-21, Gg-12, 287, KTU-24, KTU-57, K4, Pa-5, HpA4, K5, OJ3, OJ7, LdA, KTU-1). Bu sonuçlar ile tüm entomopatojen fungusların hidrofobin genine sahip olmadığı, fakat

%70'inin hidrofofin geni taşıdığı belirlenmiştir. Ancak hidrofofin proteini kodlamayan fungus izolatlarında alternatif bir protein olup olmadığı cevap arayan sorular arasındadır.

Gen ifadesinde kullanılacak izolatın seçimi için literatür taraması yapılarak, izolatların canlı türler üzerindeki adhezyon derecesi, mortalite özellikleri, spor oluşturma yetenekleri ve abiyotik faktörlere (UV, sıcaklık vs.) karşı gösterdikleri direnç araştırıldı. Biryol ve ark. (2020), *Metarhizium flavoviride* As-18 izolatının *Amphimallon solstitiale* ergin ve larvaları üzerinde %96; Sönmez ve ark. (2017), *Metarhizium brunneum* KTU-21 izolatının *Agelastica alni* ve *Coryhucha ciliata* üzerinde sırasıyla %75, %70-80; Sönmez ve ark. (2016), *Metarhizium brunneum* Gg-12 izolatının *Lobesia botrana* ve *G. gryllotalpa* larvaları üzerinde sırasıyla %90, %100; Sevim ve ark. (2013), *Metarhizium brunneum* 289 izolatının *Agelastica alni* üzerinde % 80-90 oranında mortalite gösterdiğini bildirmişlerdir. Yücel ve ark. (2018), *Beauveria bassiana* K4, K5, HpA4 ve HpA5 izolatlarının *Hypera postica* ergin ve larvaları üzerindeki insektisidal etkilerini araştırmışlardır. Elde ettikleri bulgularda K4 izolatının %98-100, K5 izolatının %80-90, HpA4 ve HpA5 izolatlarının %97 oranında etki gösterdiğini; Biryol ve ark. (2021), *Beauveria bassiana* Pa-4 ve Pa-5 izolatlarının *Myzus persicae* üzerindeki insektisidal etkilerini sırasıyla %60-70 , %70-80 olduğunu bildirmişlerdir. Yıldırım (2021), LdA1 izolatının *B. bassiana* *Leptinotarsa decemlineata* üzerinde %80-90 düzeyinde etki gösterdiğini açıklamıştır. *B. bassiana* KTU-24 ve KTU-57 izolatlarının her ikisi de canlı konaklar üzerinde yüksek mortalite özelliği göstermektedir (Sevim ve ark., 2013; Sönmez ve ark., 2016 ve 2017; Biryol ve ark., 2021). Özellikle *Coryhucha ciliata* ergin ve larvaları üzerinde KTU-24 izolatı %77-86; KTU-57 izolatı ise %75-83 oranında insektisidal etki göstermektedir. KTU-57'nin insektisidal etkilerinin yanında, abiyotik faktörlere karşı gösterdiği direnç (Biryol ve ark., 2021) göz önünde bulundurularak bu izolatta yer alan hidrofofin geninin *P. pastoris* maya sisteminde ifade edilmesi kararlaştırıldı.

P. pastoris, 1980'lerde rekombinant proteinler için bir üretim sistemi olarak tasarlanmıştır. Bu maya, çok yüksek hücre yoğunluklarına kadar büyütülebilir ve hücre içi olarak eksprese edilebilen veya kültür ortamına salgılanabilen yüksek rekombinant protein üretimini gerçekleştirebilir (Spohner ve ark., 2015). Glikoz ve diğer karbon kaynaklarının yanı sıra metanolde de büyüme kabiliyetine sahip olması, onu biyoteknolojik uygulamalar için vazgeçilmez yapmaktadır (Mattanovich, 2017). Pedersen ve ark. (2011), entomopatojenik fungus *Aspergillus fumigatus*'tan ribozomal RNA izolasyonu gerçekleştirerek, bu RNA'dan revers transkriptaz enzimi varlığında cDNA elde ettiler. Daha sonra RT-PCR ile elde ettikleri

DNA'dan *rodA* ve *rod B* hidrofobin genlerini izole ederek TOPO® (ara) vektörüne ardından *P. pastoris* pPICZαA ekspresyon vektörüne klonladılar. *SacI* enzimi ile lineer hale getirdikleri rekombinant vektörü, elektroporasyon ile *P. pastoris* X-33 gen ifade konağına transform ederek ifade ettikleri Rod A ve Rod B hidrofobin proteinlerinin büyüklüklerini sırasıyla 14 kDa ve 12 kDa olarak tespit ettiler. Niu ve ark. (2011), cDNA ile elde ettikleri *Trichoderma reesei* hidrofobin geni (*hfbI*)'ni PMD19-T ara vektörüne oradan da pPIC9 vektörüne klonladılar. *StuI* enzimi ile lineer hale getirdikleri rekombinant vektörü *P. pastoris* GS115 gen ifade konağına elektroporasyon ile transform ederek ürettikleri hidrofobin proteininin büyüklüğünü 7.5 kDa olarak belirlediler. Benzer şekilde Wang ve ark. (2010), *Grifola frondosa* hidrofobin geni (*hfbI*)'ni GS115 ekspresyon konağında ifade ederek, elde ettikleri HFBI proteininin büyüklüğünü 8 kDa olarak tespit ettiler. Diğer taraftan Kirkland ve ark. (2010), entomopatojenik fungus *B. bassiana* sınıf I hidrofobin genini ifade edebilmek için, *E. coli* gen ifade sistemini kullanmışlardır. İlk başta, istenilen proteinin *E. coli*'de önemli miktarda üretilmesi sağlanamamıştır. Bunun için proteinin pH aracılı bölünmesini optimize etmek için, proteinin N-terminali değiştirilmiştir. Protein ekspresyonu *E. coli* Rosetta 2 (DE3) izolatı kullanılarak yapılmış ve elde edilen hidrofobin proteinin büyüklüğü ~10 kDa olarak belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında da, rekombinant protein üretimi için konakçı organizma olarak *P. pastoris* X-33 izolatı kullanılmıştır (Pedersen ve ark., 2011). *P. pastoris* X-33 izolatında ekstrasellüler olarak rekombinant üretimi gerçekleştirdiğinde, enzimin N-terminal kısmında bulunan α- faktör sinyal ve Kex2 sinyal dizilerinin varlığına rağmen rekombinant proteinin hücre içi üretiminin daha fazla gerçekleştirildiği gözlenmiştir. Bunun sebebi olarak da rekombinant maya hücrelerinde endoplazmik retikulumdaki oksidatif stres sonucu proteinlerin yanlış katlanması, bunun akabinde hücrelerin tepki oluşturması ve protein salınımının bozulması gösterilmiştir (Massahi, 2017). Bu nedenle üretilen proteinin hücre içine toplanmış olabileceği düşünülmektedir.

Bu tez boyunca yürütülen çalışmalardan elde edilen sonuçlar, literatürdeki çalışmalarla uyumludur. Çalışma sonunda önemli miktarda protein ifadesi gerçekleştirilmiş olmakla birlikte, hidrofobin proteinin endüstriyel amaçlı kullanılması için üretim kapasitesinin artırılmasına yönelik optimizasyon çalışmaları devam etmektedir.

5. SONUÇLAR

Yüksek lisans tezi olarak hazırlanan ‘Entomopatojen Funguslara Ait Hidrofobin Genlerinin Araştırılması, Hidrofobin-İnfektivite İlişkisinin Belirlenmesi ve *in vitro* Sistemde İfadesi’ isimli bu çalışmada aşağıdaki sonuçlar elde edildi.

1) Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Laboratuvarından temin edilen entomopatojen fungus kültürlerinin (20 adet) katı besiyeri üzerinde büyümeleri sağlanarak, morfolojik yapıları incelendi. Elde edilen bulgularda, bir entomopatojenik fungus olan *Metarhizium*’ların sadece yeşil ve tonlarında morfolojik yapı oluşturmayacakları, bazılarının da beyaz ve pamuksu yapı oluşturabilecekleri sonucuna varıldı. Ardından fungus izolatlarının DNA izolasyonları yapıldı.

2) DNA izolasyonu yapılan fungus kültürlerinden gene özgü spesifik primerler ile hidrofobin gen bölgeleri tarandı ve 4 tanesinde 616 bp büyüklüğünde, 10 tanesinde ise 514 bp büyüklüğünde hidrofobin geni (*hyd*) bulundu. Bu kapsamda, tüm entomopatojenik fungusların hidrofobin genine sahip olmadığı, bu çalışma ile 20 adet entomopatojenik fungusun sadece %70’inde hidrofobin geni bulunduğu sonucuna varıldı.

3) Hidrofobin genleri ara vektöre (pJET1.2) klonlanarak dizin analizi gerçekleştirildi. Sekans sonucuna göre fungus izolatlarının filogenetik analizleri yapıldı ve benzerlik oranları tespit edildi. Elde edilen verilere göre Gg-12’nin bir *Metarhizium* izolatı olmasına rağmen *B. bassiana* izolatları ile %72 benzerlik gösterdiği, *B. bassiana* izolatları ile aynı intron bölgeleri içerdiği ve 3D protein yapılarının da aynı olduğu gözlemlendi.

4) *B. bassiana* ve *I. fumosorosea* izolatlarının gen dizilerindeki 109 bp büyüklüğündeki intron bölgeleri uzaklaştırıldı (KTU-57 izolatının intron bölgeleri ‘splicing’ ile uzaklaştırıldı.) ve intronsuz gen dizileri proteine dönüştürülerek sistein aminoasitleri arasındaki uzaklıklar hesaplandı ve filogenetik analizleri yapıldı. Sonuçta, çalışmada kullanılan tüm izolatların sınıf I grubuna ait olduğu belirlendi.

5) *B. bassiana* KTU-57 izolatına ait hidrofobin geninin rekombinant *P. pastoris* (X-33) maya sisteminde ifade edilmesiyle ~ 14 kDa büyüklüğünde protein elde edildi.

6. ÖNERİLER

Bu çalışma ile entomopatojen fungus izolatlarında (14 adet) bulunan hidrofobin genleri tespit edilerek en yüksek insektisidal etkiye sahip olan izolatın hidrofobin geni önce ara vektöre (pJET1.2), ardından *P. pastoris* pPICZαC maya vektörüne klonlandı ve *P. pastoris* (X-33) maya sisteminde ifadesi sağlandı. Bu tez çalışmasından sonra yapılabilecek olan çalışmaları şu şekilde önerebiliriz.

- 1) Hyd proteinlerinin biyoteknolojik olarak kullanılabilmesi için yüksek saflıkta ve büyük ölçekte üretilmeleri gerekmektedir. Bunun için endüstriyel düzeyde üretilmeleri sağlanmalıdır.
- 2) Üretilen proteinlerin toksik özellikleri belirlenmelidir.
- 3) İstenilen düzeyde üretimi gerçekleştirilen hidrofobin proteinlerinin süper hidrofobik ve süper hidrofilik yüzey oluşturma uygulamalarında denenmeleri sağlanmalıdır. Dolayısıyla hidrofobinlerin yüksek stabilitesi, uzun süreli kullanımda veya sert koşullar altında yüzeylerin kaplanmasında çok yararlı olabilir.

7. KAYNAKLAR

- Acar, M., 2020. *Pectobacterium chrysanthemi* Pektin Metilesteraz Enziminin *Pichia pastoris* ile Rekombinant Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, A.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Akanbi, M. H. J., Post, E., Meter-Arkema, A., Rink, R., Robillard, G. T., Wang, X. Q., Wosten, H. A. B. ve Scholtmeijer, K., 2010. Use of hydrophobins in formulation of water insoluble drugs for oral administration, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 75, 2, 526-531.
- Akanbi M. H. C., Post, E., van Putten, S. M., de Vries, L., Smisterova, J., Meter-Arkema A. H., Wösten, H. A. B., Rink, R. ve Scholtmeijer, K., 2013. The antitumor activity of hydrophobin SC3, a fungal protein, Applied Microbiol and Biotechnology, 97, 4385-4392.
- Albayrak, B., 2019. Hidrofobin Proteini Üretici *Cladosporium* türlerinin moleküler karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, E.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Alkhaibari, A. M., Carolino, A. T., Yavaşoğlu, S. I., Maffei, T., Mattoso, T. C., Bull, J. C., Samuels, R. I. ve Butt, T. M., 2016. *Metarhizium brunneum* Blastospore Pathogenesis in *Aedes aegypti* larvae: attack on several fronts accelerates mortality, Plos Pathogens, 12, 1-19.
- Anastasi, A., Tigini, V. ve Varese, G. C., 2013. The bioremediation potential of different ecophysiological groups of fungi, In *Fungi as bioremediators*, Springer, 29-49.
- Rehner, S. A., Minnis, A. M., Sung, G. H., Luangsa-ard, J. J., Devotto, L. ve Humber, R. A., 2011. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*, Mycologia, 103, 1055-1073.
- Airaudi, D. ve Filipello-Marchisio, V., 1996. Fungal biodiversity in the air of turin, Mycopathologia, 136, 95-102.
- Avan , M. ve Kotan, R., 2021. Fungusların mikrobiyal gübre veya biyopestisit olarak tarımda kullanılması, Uluslararası Doğu Anadolu Fen Mühendislik ve Tasarım Dergisi, 3, 1, 167-191.
- Ball, S., Kwan, A. ve Sunde, M., 2020. Hydrophobin rodlets on the fungal cell wall, Current Topics in Microbiology and Immunology, 425, 29-51.

- Biryol, S., 2020. *Myzus persicae* (Hemiptera:Aphididae) ile mücadelede kullanılmak üzere yeni bir mikoinsektisit üretilmesi, Doktora Tezi, KTU, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Biryol, S., Efe, D., Eski, A., Demirbağ, Z. ve Demir, İ., 2020. Fungal pathogens of *Amphimallon solstitiale* Linnaeus, 1758 (Coleoptera: Scarabaeidae), Türkiye Entomoloji Dergisi, 44, 3, 375-384.
- Biryol, S., Güney, E., Eski, A., Bayramoğlu, Z., Sezen, K., Demirbağ, Z. ve Demir, İ., 2021. Development of mycoinsecticide formulations with *Beauveria bassiana* and *Metarhizium brunneum* for the control of *Orosanga japonica* (Hemiptera:Ricanidae), Annals of Applied Biology, 179, 3, 319-330.
- Blango, M. G., Kniemeyer, O. ve Brakhage, A. A., 2019. Conidial surface proteins at the interface of fungal infections, Plos Pathogens, 15, 9, 1-8.
- Bolyard, M. G. ve Sticklen, M. B., 1992. Expression of a modified dutch elm disease toxin in *Escherichia coli*, Molecular Plant-Microbe Interactions, 5, 6, 520–524.
- Castrillo, L. A., Roberts, D. W. ve Vandenberg, J. D., 2005. The fungal past, present and future: Germination, ramification and reproduction, Journal of Invertebrate Pathology, 89, 46-56.
- Cereghino, J. L. ve Cregg, J. M., 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, FEMS Microbiology Reviews, 24, 45-66.
- Chauhan, A., Sharma, J. N., Modgil, M., ve Bidochka, M. J., 2018. Comparison of various RNA extraction methods, cDNA preparation and isolation of calmodulin gene from a highly melanized isolate of apple leaf blotch fungus *Marssonina coronaria*, Journal of Microbiological Methods, 151, 7-15.
- Cheng, C. K., Au, C. H., Wilke, S. K., Stajich, J. E., Zolan, M. E., Pukkila, P. J. ve Kwan, H.S., 2013. 5'-Serial analysis of gene expression studies reveal a transcriptomic switch during fruiting body development in *Coprinopsis cinerea*, BMC Genomics, 14, 2-17.
- Cregg, J.M., 1999. Gene expression systems, The Mycota, 273-285.
- Collen, A., Penttilä, M., Stalbrand, H., Tjerneld, F., ve Veide, A., 2001. Extraction of endoglucanase I (Cel7B) fusion proteins from *Trichoderma reesei* culture filtrate in a poly (ethylene glycol)–phosphate aqueous two-phase system, Journal of Chromatography, 943, 55-62.
- Collen, A., Person, J., Linder, M., Nakari-Setälä, T., Penttilä, M., Tjerneld, F. ve Sivars, U., 2002. A novel two-step extraction method with detergent / polymer systems for primary recovery of the fusion protein endoglucanaseI – Hydrophobin I, Biochimica et Biophysica Acta (BBA), 1569, 139-150.

- Della Ventura, B., Rea, I., Calio, A., Giardina, P., Gravagnuolo, A., Funari, R., Altucci, C., Velotta, R. ve De Stefano, L., 2016. Vmh2 hydrophobinlayer entraps glucose: Aquantitative characterization by label-free optical and gravimetric methods, Applied Surface Science, 364, 201-207.
- Deshmukh, R., Khardenavis, A. A. ve Purohit, H. J., 2016. Diverse metabolic capacities of fungi for bioremediation, Indian Journal of Microbiology, 56, 3, 247-264.
- Gandier, J. A., Langelaan, D. N., Won, A., O'Donnell, K., Grondin, J. L., Spencer, H. L., Wong, P., Tillier, E., Yip, C., Smith, S. P. ve Master, E. R., 2017. Characterization of a Basidiomycota hydrophobin reveals the structural basis for a high-similarity Class I subdivision, Scientific Reports, 7, 45863.
- Gandier, J. A. ve Master, E. R., 2018. *Pichia pastoris* is a suitable host for the heterologous expression of predicted class I and class II hydrophobins for discovery, study, and application in biotechnology, Microorganisms, 6, 1, 2-20.
- Goettel, M. S., Eilenberg, J. ve Glare, T., 2005. Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations, In: Comprehensive Molecular Insect Science, Gilbert LI, Gill SS(eds) Elseiver, 361-405.
- Hahl, H., Vargas, J. N., Griffo, A., Laaksonen, P., Szilvay, G., Lienemann, M., Jacobs, K., Seemann, R. ve Fleury, J. B., 2017. Pure protein bilayers and vesicles from native fungal hydrophobins, Advanced Materials, 29, 1, 1-6.
- Hakanpaa, J., Szilvay, G. R., Kaljunen, H., Maksimainen, M., Linder M. ve Rouvinen, J., 2006. Two crystal structures of *Trichoderma reesei* hydrophobin HFBI-The structure of a protein amphiphile with and without detergent interaction, Protein Science, 15, 9, 2129-2140.
- He, R., Li, C., Feng, J. ve Zhang, D., 2017. A class II hydrophobin gene, Trhfb3, participates in fungal asexual development of *Trichoderma reesei*, FEMS Microbiology Letters, 364, 8,1-21.
- Hibbett, D.S., Ohman, A., Glotzer, D., Nuhn, M., Kirk, P. ve Nilsson, R. H., 2011. Progress in molecular and morphological taxon discovery in fungi and options for formal classification of environmental sequences, Fungal Biological Reviews, 25, 38-47.
- Higgins, D. R. ve Cregg, J. M., 1998. Introduction to *Pichia pastoris*, In: *Pichia* Protocols, 1-15.
- Hungund, B., Habib, C., Hiregoudar, V., Umloti, S., Wondkar, S. ve Tennalli, G., 2016. Production and Characterization of Hydrophobins from Fungal Source, Biotechnology and Biochemical Engineering, 5, 47-53.

- Invitrogen, 2010. Easy Select *Pichia* Expression Kit User Manual; Invitrogen: Carlsbad, CA, USA.
- Janssen, M. I., van Leeuwen, M. B. M., van Kooten, T. G., de Vries, J., Dijkhuizen, L. ve Wosten, H. A. B., 2004. Promotion of fibroblast activity by coating with hydrophobins in the beta-sheet end state, Biomaterials, 25, 14, 2731-2739.
- Khalesi, M., Gebruers, K. ve Derdelinckx, G., 2015. Recent advances in fungal hydrophobin towards using in industry, The Protein Journal, 34, 243-255.
- Kim, S., Ahn, II-P., Rho, H-S., ve Lee, Y-H., 2005. MHP1, a *Magnaporthe grisea* hydrophobin gene, is required for fungal development and plant colonization, Molecular Microbiology, 57, 5, 1224-1237.
- Kirkland, B. H. ve Keyhani, N. O., 2011. Expression and purification of a functionally active class I fungal hydrophobin from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in *E. coli*, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 38, 327–335.
- Kulkarni, S., Nene, S. ve Joshi, K. 2017. Production of Hydrophobins from fungi, Process Biochemistry, 61,1-11.
- Kwan, A. H. Y., Winefield, R. D., Sunde, M., Matthews, J. M., Haverkamp, R. G., Templeton, M. D. ve Mackay, J. P., 2006. Structural basis for rodlet assembly in fungal hydrophobins, PNAS, 103, 3621–3626.
- Yu, L., Zhang, B., Szilvay, G. R., Sun, R., Janis, J. ve Wang, Z., 2008. Protein HGF I from the edible mushroom *Grifola frondosa* is a novel 8 kDa class I hydrophobin that forms rodlets in compressed monolayers, Microbiology, 154 , 1677–168.
- Lau, A. Y. T., Cheng, X., Cheng, C. K., Nang, W., Cheung, M. K., Chan, R. H. F., Hui, J. H. L. ve Kwan, H. S., 2018. Discovery of microRNA-like RNAs during early fruiting body development in the model mushroom *Coprinopsis cinerea*, Plos One, 13, 1-24.
- Linder, M. B., Qiao, M. Q., Laumen, F., Selber, K., Hyytia, T., Nakari-Setälä, T. ve Penttilä, M. E., 2004. Efficient purification of recombinant proteins using hydrophobins as tags in surfactant-based two-phase systems, Biochemistry, 43, 37, 11873-11882.
- Linder, M. B., Szilvay, G. R., Nakari-Setälä, T. ve Penttilä, M.E., 2005. Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi, National Library of Medicine, 29, 877-896.
- Lo, V., 2018. Hydrophobins: Biological application of fungal proteins, School of Medicine Department of Pharmacology University of Sydney.
- Looser, V., Bruhlmann, B., Bumbak, F., Stenger, C., Costa, M., Camattari, A., Fotiadis, D. ve Kovar, K., 2015. Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review, Biotechnology Advances, 33, 6, 1177–1193.

- Lugones, L. G., Wösten, H. A., Birkenkamp, K. U., Sjollema, K. A., Zagers, J., ve Wessels, G. G., 1999. Hydrophobins line air channels in fruiting bodies of *Schizophyllum commune* and *Agaricus bisporus*, Mycolological Research, 103, 5, 635-640.
- Lugones, L. G., Bosscher, J., Scholtmeyer, K., de Vries, O. M. H. ve Wessels, J. G. H., 1996. An abundant hydrophobin (ABHI) forms hydrophobic rodlet layers in *Agaricus bisporus* fruiting bodies, Microbiology, 142, 1321-1329.
- Lutterschmid, G., Stübner, M., Vogel, R. F. ve Niessen, L., 2010. Induction of gushing with recombinant Class II hydrophobin FcHyd5p from *Fusarium culmorum* and the impact of hop compounds on its gushing potential, Journal of the Institute of Brewing, 116, 339-347.
- Longobardi, S., Gravagnuolo, A. M., Rea, I., De Stefano, L., Marino, G. ve Giardina, P., 2014. Hydrophobin-coated plates as matrix-assisted laser desorption/ionization sample support for peptide/protein analysis, Analytical Biochemistry, 449, 9-16.
- Mahltig, B., 2015. Hydrophobic and oleophobic finishes for textiles, functional finishes for textiles improving comfort, performance and protection, Paul, R.(Eds), Woodhead Publishing, 387-428.
- Massahi, A., 2017. Effect of signal sequences and promoters in recombinant extracellular protein production by *Pichia pastoris*. Doctoral thesis, The Graduate School Of Natural and Applied Sciences, Ankara, Turkey.
- Melcher, M., Facey, S. J., Henkes, T.M. Subkowski, T. ve Hauer, B., 2016. Accelerated nucleation of hydroxyapatite using an engineered hydrophobin fusion protein, Biomacromolecules, 17, 5, 1716-1726.
- Mgbeahuruike, A., Kovalchuk, A., Chen, H., Ubhayasekera, W., ve Asiegbu, F. O., 2013. Evolutionary analysis of hydrophobin gene family in two wood-degrading basidiomycetes, *Phlebia brevispora* and *Heterobasidion annosum s.l.*, BMC Evolutionary Biology, 13, 1, 1-16.
- Mgbeahuruike, A., Kovalchuk, A. ve Asiegbu, F. O., 2013. Comparative genomics and evolutionary analysis of hydrophobins from three species of wood-degrading fungi, Mycologia, 105, 6, 1471-1478.
- Misra, R., Li, J., Cannon, G. C. ve Morgan, S. E., 2006. Nanoscale reduction in surface friction of polymer surfaces modified with Sc3 hydrophobin from *Schizophyllum commune*, Biomacromolecules, 7, 5, 1463-1470.
- Moonjely, S., Keyhani N. O. ve Bidochka, M. J., 2018. Hydrophobins contribute to root colonization and stress responses in the rhizosphere-competent insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana*, National Library of Medicine, 164, 517-528.

- Nakari-Setälä, T., Azeredo, J., Henriques, M., Oliveira, R., Teixeira, J., Linder, M. ve Penttilä, M., 2002. Expression of a fungal hydrophobin in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall: Effect on cell surface properties and immobilization, Applied Environmental Microbiology, 68, 3, 3385-3391.
- Niu, B., Wang, D., Yang, Y., Xu, H. ve Qiao, M., 2011. Heterologous expression and characterization of the hydrophobin HFBI in *Pichia pastoris* and evaluation of its contribution to the food industry, Amino Acids, 43, 2, 763-771.
- Opwis, K. ve Gutmann, J. S., 2011. Surface modification textile materials with hydrophobins, Textile Research Journal, 81, 15, 1594 -1602.
- Pedersen, M. H., Borodina, I., Moresco, J. L., Svendsen, W. E., Frisvad, J. C. ve Søndergaard, Ib., 2011. High-yield production of hydrophobins RodA and RodB from *Aspergillus fumigatus* in *Pichia pastoris*, Applied Microbiology and Biotechnology, 90, 6, 1923-1932.
- Pennacchio, A., Cicatiello, P., Notomista, E., Giardina, P. ve Piscitelli, A., 2018. New clues into the self-assembly of Vmh2, a Basidiomycota class I hydrophobin, Biological Chemistry, 399, 895-901.
- Pham, C. L. L., Rey, A., Lo, V., Soulès, M., Ren, Q., Meisl, G., Knowles, T. P. J., Kwan, A. H. ve Sunde, M., 2016. Self-assembly of MPG1, a hydrophobin protein from the rice blast fungus that forms functional amyloid coatings, occurs by a surface-driven mechanism, Scientific Reports, 6, 25288.
- Piscitelli, A., Cicatiello, P., Gravagnuolo, A. M., Sorrentino, I., Pezzella, C. ve Giardina, P., 2017. Applications of functional amyloids from fungi: surface modification by class I hydrophobins, Biomolecules, 7, 3, 1-11.
- Plett, J. M., Gibon, J., Kohler, A., Duffy, K., Hoegger, P. J., Velagapudi, R., Han, J., Kües, U., Grigoriev, I. V. ve Martin, F., 2012. Phylogenetic, genomic organization and expression analysis of hydrophobin genes in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*, Fungal Genetics and Biology, 49, 3, 199-209.
- Rafeeq, C. M., Vaishnav, A. B. ve Ali, P. P. M., 2021. Characterisation and comparative analysis of hydrophobin isolated from *Pleurotus floridanus* (PfH), Protein Expression and Purification, 182, 1-6.
- Rath, A. C., 2000. The use of entomopathogenic fungi for control of termites, Biocontrol Science and Technology, 10, 563- 581.
- Ren, Q., Kwan A. H., ve Sunde, M., 2013a. Two forms and two faces, multiple states and multiple uses: properties and applications of the self- assembling fungal hydrophobins, Peptide Science, 100, 6, 601–612.

- Reuter, L. J., Shahbazi, M. A., Makila, E. M., Salonen, J. J., Saberianfar, R., Menassa, R., Santos, H. A., Joensuu, J. J. ve Ritala, A., 2017. Coating nanoparticles with plant-produced transferrin-hydrophobin fusion protein enhances their uptake in cancer cells. Bioconjugate Chemistry, 28, 6, 1639-1648.
- Rey, A. A., Hocher, A., Kwan, A. H. ve Sunde, M., 2013. Backbone and sidechain ¹H, ¹³C and ¹⁵N chemical shift assignments of the hydrophobin MPG1 from the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*, Biomol NMR Assign, 7, 109–112.
- Roberts, D. W., 1989. Word Picture of Biological of Control of Insect by Fungi, Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 84, 89-100.
- Rocha-Pino, Z., Viguera, G., Sepulveda-Sanchez, J. D., Hernandez-Guerrero, M., Campos-Teran, J., Fernandez, F. J. ve Shiral, K., 2015. The hydrophobicity of the support in solid state culture affected the production of Hydrophobins from *Lecanicillium lecanii*, Process Biochemistry, 50, 14-19.
- Santhiya, D., Burghard, Z., Greiner, C., Jeurgens, L. P. H., Subkowski, T. ve Bill, J., 2010. Bioinspired deposition of TiO₂ thin films induced by hydrophobins, Langmuir, 26, 9, 6494-6502.
- Sarlin, T., Kivioja, T., Kalkkinen, N., Linder, M. B. ve Nakari-Setälä, T., 2012. Identification and characterization of gushing-active hydrophobins from *Fusarium graminearum* and related species, Journal of Basic Microbiology, 52, 184 -194.
- Sevim, A., Donzelli G. G. A., Wu, D., Demirbağ, Z., Gibson, D. M. ve Turgeon, B. G., 2012. Hydrophobin genes of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium brunneum*, are differentially expressed and corresponding mutants are decreased in virulence, Current Genetics, 58, 2, 79-92.
- Sevim, A., Demir, İ., Sönmez, E., Kocaçevik, S., ve Demirbağ, Z., 2013. Evaluation of entomopathogenic fungi against the sycamore lace bug, *Corythucha ciliata* (Say) (Hemiptera: Tingidae), Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 37, 5, 595-603.
- Sevim, A., Sevim, E. ve Demirbağ, Z., 2015. Entomopatojenik Fungusların Genel Biyolojileri ve Türkiye’de zararlı böceklerin mücadelesinde kullanılma potansiyelleri, Erzincan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 8, 1, 115-147.
- Sevim, 2010. Doğu Karadeniz Bölgesi’nden Entomopatojenik Fungusların İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Virülanslarının Belirlenmesi, Doktora Tezi, KTU, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Schmoll, M., Seibel, C., Kotlowski, C., Vendt, F. W. G., Liebmann, B. ve Kubicek, C. P., 2010. Recombinant production of an *Aspergillus nidulans* class I hydrophobin (Dew A) in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) is promoter-dependent. Applied Microbiology and Biotechnology, 88, 95-103.

- Shimazu, M., Sato, H. ve Maehara, N., 2002. Density of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* Vuillemin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) in forest air and soil, Applied Entomology and Zoology, 37, 1, 19–26.
- Sinha, K. K., Choudhary A. K. ve Kumari, P., 2016. Entomopathogenic fungi, Ecofriendly Pest Management for Food Security, Omkar (Eds), Academic Press, 475-505.
- Sönmez, E., Sevim, A., Demirbağ, Z. ve Demir, İ., 2016. Isolation, characterization and virulence of entomopathogenic fungi from *Gryllotalpa gryllotalpa* (Orthoptera: Gryllotalpidae), Applied Entomology and Zoology, 51, 2, 213-223.
- Sönmez, E., Kocaçevik, S., Sevim, A., Demirbağ, Z. ve Demir, İ., 2017. Efficacy of Entomopathogenic Fungi against the Alder Leaf Beetle *Agelastica alni* (L.) (Coleoptera : Chrysomelidae), Applied Zoology, 69, 4, 575-581.
- Spohner, S. C., Müller, H., Quitmann, H. ve Czermak, P., 2015. Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*, Journal of Biotechnology, 202, 118–134.
- Sunde, M., Kwan, A. H. Y., Templeton, M. D., Beever, R. E. ve Mackay, J. P., 2008. Structural analysis of hydrophobins, Micron, 39, 773-784.
- Takahashi, T., Maeda, H., Yoneda, S., Ohtaki, S., Yamagata, Y., Hasegawa, F., Gomi, K., Nakajima, T. ve Abe, K., 2005. The fungal hydrophobin RolA recruits polyesterase and laterally moves on hydrophobic surfaces, Molecular Microbiology, 57, 6, 1780-1796.
- Talbot, N. J., Kershaw, M. J., Wakley, G. E., deVries, O. M. H., Wessels, J. G. H. ve Hamer, J. E., 1996. MPG1 encodes a fungal hydrophobin involved in surface interactions during infection-related development of *Magnaporthe grisea*, Plant Cell, 8, 6, 985-999.
- Tao, Y., Chen, R., Yan, J., Long, Y., Tong, Z. ve Song, H., 2019. A hydrophobin gene, *Hyd9*, plays an important role in the formation of aerial hyphae and primordia in *Flammulina filiformis*, Gene, 706, 84-90.
- Wang, Z., Feng, S., Huang, Y., Qiao, M., Zhang, B. ve Xu, H., 2010. Prokaryotic expression, purification and polyclonal antibody production of a hydrophobin from *Grifola frondosa*, Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 42, 388-395.
- Weng, Q., Zhang, X., Chen, W. ve Hu, Q., 2019. Secondary Metabolites and the Risks of *Isaria fumosorosea* and *Isaria farinosa*, Molecules, 24, 1-17.
- Wessels, J. G. H., Devries, O. M. H., Asgeirsdottir, S. A. ve Schuren, F. H. J., 1991. Hydrophobin genes involved in formation of aerial hyphae and fruit bodies in *Schizophyllum*, Plant Cell, 3, 8, 793-799.

- Wessels, J. G. H., 1994. Developmental Regulation of Fungal Cell Wall Formation, Annual Review of Phytopathology, 32, 413-37.
- Wessels, J. G. H., 1997. Hydrophobins: Proteins That Change the Nature of the Fungal Surface, Advances in Microbial Physiology, 38, 1-45.
- Wessels, J. G. H., 2000. Hydrophobins, unique fungal proteins, Plos Pathogens, 14, 153-159.
- Mattanovich, D., Sauer, M., Gasser, B., 2017. Industrial microorganisms: *Pichia pastoris*. In: Wittmann, C., Liao, J. C. (eds). Industrial Biotechnology: Microorganisms. Weinheim, DE: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
- Wohlleben, W., Subkowski, T., Bollschweiler, C., Vacano, B. V., Liu, Y., Schrepp, W. ve Baus, U., 2010. Recombinantly produced hydrophobins from fungal analogues as highly surface-active performance proteins, European Biophysics Journal, 39, 3, 457-468.
- Wösten, H. A. B., Moukha, S. M., Sietsma, J. H. ve Wessels J. G. H., 1991. Localization of growth and secretion of proteins in *Aspergillus niger*, Journal of General Microbiology, 137, 2017-2023.
- Wösten, H. A. B., de Vocht, M. L., 2000. Hydrophobins the fungal coat unravelled, Biochimica et Biophysica Acta (BBA), 1469, 79-86.
- Wösten, H. A. B., 2001. Hydrophobins: multipurpose proteins, Annual Reviews in Microbiology, 55, 1, 625-646.
- Wösten, H. A. B. ve Scholtmeijer, K., 2015. Applications of hydrophobins: current state and perspectives, Applied Microbiology and Biotechnology, 99, 4, 1587-1597.
- URL-1, <https://alchetron.com/Paecilomyces-fumosoroseus>, 25/11/2021.
- URL-2, NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, 20/07/2020.
- URL-3, Phyre², <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>, 06/04/2022.
- Valo, H. K., Laaksonen, P. H., Peltonen, L. J., Linder, M. B., Hirvonen, J. T. ve Laaksonen, T. J., 2010. Multifunctional Hydrophobin: Toward Functional Coatings for Drug Nanoparticles, Acs Nano, 4, 3, 1750-1758.
- Vega, F. E., Meyling, N. V., Luangsa-ard, J. J. ve Blackwell, M., 2012. Fungal entomopathogens Insect Pathology, Academic Press, 171-220.

- Vigueras, G., Shiral, K., Hernandez-Guerrero, M., Morales, M. ve Revah, S., 2014. Growth of the fungus *Paecilomyces lilacinus* with n-hexadecane in submerged and solid-state cultures and recovery of Hydrophobin proteins, Process Biochemistry, 49, 10, 1606 - 1611.
- Vogl, T., Gebbie, L., Palfreyman, R. W. ve Speight R., 2018. Effect of plasmid design and type of integration event on recombinant protein expression in *Pichia pastoris*, Applied and Environmental Microbiology, 84, 6.
- Yıldırım, K., 2021. Patates Böceği (*Leptinotarsa decemlineata*, Coleoptera: Chrysomelidae)'nin Fungal Patojenlerinin Araştırılması ve Prototip Fungal Mücadele Ürününün Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, KTU, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Yücel, B., Gozuacik, C., Gencer, D., Demir, İ. ve Demirbağ, Z., 2018. Determination of fungal pathogens of *Hypera postica* (Gyllenhall) (Coleoptera: Curculionidae): isolation, characterization, and susceptibility, Egyptian Journal of Biological pest Control, 28, 1-8.
- Zapf, M. W., Theisen, S., Vogel, R. F. ve Niessen, L., 2006. Cloning of Wheat LPT1500 and two *Fusarium culmorum* Hydrophobins in *Saccharomyces cerevisiae* and assessment of their gushing inducing potential in experimental wort fermentation, Journal of The Institute of Brewing, 112, 3, 237-245.
- Zeren, E., Akşit, A. ve Sergin, E., 2018. Hidrofobinler: Çevre Dostu Kimyasallar ve Tekstilde Uygulamaları, Dergi Park Akademik, 25, 362-369.
- Zhao, H., Lovett, B. ve Fang, W., 2016. Genetically Engineering Entomopathogenic Fungi, Advances in Genetics, 94, 138-158.
- Zhang, S., Xia X. Y., Kim, B. ve 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, 80, 811-826.
- Zimmermann, G., 2008. The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): Biology, ecology and use in biological control, Biocontrol Science and Technology, 18, 865-901.

8. EKLER

Ek 1. Tuzsuz LB agar (pH 7,5) 1 Litre için

<u>Kimyasal</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
Trypton	10g
Maya Özütü	5g
NaCl	5g
Agar	15g

Hazırlanan besiyeri, agar ilave edilmeden önce pH 7,5'e ayarlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 15 dk sterilize edilmiştir.

Ek 2. Tuzsuz LB broth (pH7,5) 1 Litre için

<u>Kimyasal</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
Trypton	10g
Maya Özütü	5g
NaCl	5g

Hazırlanan besiyeri pH 7,5'e ayarlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 15 dk sterilize edilmiştir.

Ek 3. YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose), 500 mL için

<u>Kimyasal</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
Maya Özütü	5g
Pepton	10g

Hazırlanan besiyeri otoklavda 121°C'de 15 dk sterilize edildikten sonra üzerine 50ml 10X D (%20 Dekstroz) ilave edilmiştir.

Ek 4. 10X D (%20 Dekstroz), 250mL için

50 g D-glukoz

250 ml dH₂O

Otoklav ile sterilizasyon

Ek 5. YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) agar, 500 mL için

<u>Kimyasal</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
-----------------	---------------------

Maya Özüü	5g
Pepton	10g
Agar	10g

Hazırlanan besiyeri otoklavda 121°C’de 15 dk sterilize edildikten sonra üzerine 50ml 10X D (%20 Dekstroz) ilave edilmiştir.

Ek 6. YPDS +Zeocin™ besiyerisi, 500 mL için

<u>Kimyasal</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
-----------------	---------------------

Maya Özüü	5g
Pepton	10g
Agar	10g
Sorbitol	91g

Hazırlanan besiyeri otoklavda 121°C’de 15 dk sterilize edildikten sonra üzerine 50ml 10X D (%20 Dekstroz) ve 500 µl zeocin (100mg/ml) ilave edilmiştir.

Ek 7. 100X H (%0,4 Histidin), 20mL için

80 mg L-histidin

20 ml dH₂O

Filtre ile sterilizasyon

Ek 8. 1M Potasyum Fosfat Tampon (pH 6,0) 100 mL için

1M K₂HPO₄

1M KH₂PO₄

Hazırlanan tampon, pH 6,0’ya getirildikten sonra filtre ile steril edilmiştir.

Ek 9. 10X YNB (%13,4 Yeast Nitrogen Base with Ammonium Sulfate without Amino acids)

67 g YNB

500 ml ddH₂O

Filtre ile sterilizasyon

Ek 10. 500X B (%0,02 Biotin), 100mL için

20 mg Biotin

100ml ddH₂O

Filtre ile sterilizasyon

Ek 11. 10X M (%5 Metanol), 100mL için

5 ml Metanol

95 ml ddH₂O

Filtre ile sterilizasyon

Ek 12. 10X GY (%10 Gliserol), 100mL için

10 ml Gliserol

90 ml dH₂O

Otoklav ile sterilizasyon

Ek 13. BMGY (Gliserol Tamponlu-Kompleks Besiyeri), 500mL için

<u>Kimyasal</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
-----------------	---------------------

Maya Özü	5g
----------	----

Pepton	10g
--------	-----

Yukarıdaki kimyasallar 350 mL dH₂O çözündürüldükten sonra otoklavda 20 dk steril edilmiştir. Ardından ~60°C'ye soğutulan besiyerine aşağıdaki tamponlar ilave edilmiştir.

50 mL, 1M Potasyum Fosfat Tampon (pH 6,0)

50 mL, 10X YNB

1 mL, 500X B

50 mL, 10X GY

Ek 14. BMMY (Metanol Tamponlu-Kompleks Besiyeri), 500mL için

<u>Kimyasal</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
Maya Özütü	5g
Pepton	10g

Yukarıdaki kimyasallar 350 mL dH₂O çözündürüldükten sonra otoklavda 20 dk steril edilmiştir. Ardından ~60°C'ye soğutulan besiyerine aşağıdaki tamponlar ilave edilmiştir.

50 mL, 1M Potasyum Fosfat Tampon (pH 6,0)

50 mL, 10X YNB

1 mL, 500X B

50 mL, 10X M

Ek 15. Kırma Tamponu (Breaking Buffer), 500mL için

<u>Kimyasal</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
NaH ₂ PO ₄ (50mM)	3g
Gliserol (%5)	25ml
EDTA (1mM)	186mg

Yukarıdaki kimyasallar 400 mL dH₂O çözündürüldükten sonra NaOH ile pH 7,4'e ayarlanmıştır. Kullanılmadan önce proteaz inhibitörü ilave edilmiştir.

Ek 16. Fungus İzolatlarına Ait *hyd* Gen Dizileri

Metarhizium brunneum 287'nin *hyd* Gen Bölgesinin Baz Sırası

CCACATTCACTTACACTCCAATCCAACACTTCTACACCAACAACCTTTCCC
 CAAAACCAACCAACCACCCCATCCTTCAAAATGTTCAAGGCTCTCATCG
 TCGCTCTTGCCGCCGTCGCGGCCGCCATCCCAACTCAGCAGCCTAGCAGCA
 ATGAGATGAATTGCGACAGCGGCGTGTATTGCTGCAACAAAGTGGCGCAA
 AACACTGGCATTGTCTGTCCTCCATCGACGCCCTCAGTTCCACTTGCGGCGAC
 ACGCTGAACTTGTTACAGTTGACGCCCTCAATGACAAATGCACCTCGCAG
 ACTGTCTGCTGCAACAATGTCCAGCAAAATGTCAGTATACAAGACCAACTT
 TCTCGCAAATCTATTACAAAATACTAAATGACATCTACAGGGTCTTGTC
 AACGTGGCCTGCACTCCCATCGATGTGTAAATTCATTGTACAATGCTCTAC
 TCACACTCGAGCCTTGTCGAGAAAAGTGACGATAATATCTACACCGTTGGA
 AGTAATGGCTTTTTAGCTTCTGGGGGAGAAAAGTACAAAGGAGGTGTCGG
 ATAAGAGATAATTTTTCGCTTCTAAAGCCCAAGGTGGAATAGCCTATGGAT
 CATG

Metarhizium flavoviride As-18'in *hyd* Gen Bölgesinin Baz Sırası

CCACATTCACGAACACTCACAATCCAACACTTCAACAACAACAACCTTTTCC
 CCCAAAACCAACCAACCACCCCTATCCTTCAAAATGTTCAAGGCTCTCATC
 GTCGCTCTTGCCGCCGTCGCGGCCGCCATCCCAACTCAGCAGCCTAGCAGC
 AATGAGATGGAGTGCAACAGCGGCTCGTATTGCTGCAACAAAGTAGCGCA
 AAACACTGGCATTGTCTGTCCTCCATCGACGCCCTCACTGCCGCTTGCGGCGG
 GACGCTGAAATTTGTTACAGCTGACGTCTCAATGACGAATGCACCTCGCA
 GACTGTCTGCTGCAACAATGTCAAGCAAAGTGTCAGTATACAAGACCAAC
 TTTCTCGCAAATCTATTACAACTCTAACTAAATGGTATCTATAGGGTATGG
 TCAACGTTGCCTGTTCTCCCATCGCGGTGTAAATTCATTGTACAGAGCTCC
 AGCCACACTCTCGAGCCTTGTCGAGAAAAGTGACGATAATATCTACACCGT
 TGGAAGTAATGGCTTTTTAGCTTCTGGGGGAGAAGAGTACAAAGGAGGTG
 TCGGATAAGAGATAATTTTTCGCTTCTAAAGCCCAAGGTGGAATAGCCTAT
 GGATCATG

Metarhizium brunneum Gg-12'nin *hyd* Gen Bölgesinin Baz Sırası

ATTGTAGAGACTTCTAGAAGATGATTCCCGTTTCGCTCTTGCCATCACCAC
 CCTCATCGCCGCTGTGACTGCTGCTCCCTCCGGCCACCATGGTGGAAGGA
 TCTGCACAAGATGACTCTCGGCCAGGCTGGCGACAGGTGCGGTGCCGACC
 AGTCCATCTACTGCTGCAACGAGAAGACGACCAAGATCGAGCACTCCTCC
 CCCGAAACCGGCCTCGGCGGCCTGCTCGGTGCCACTGTCGGTGCTGATGGT
 CTTCTTTCTCACCTTCTCGGTACCTGCACCAAGATCCCGTCAATGGTAAGC
CTCAAGTGGTCGATAAAGTCGCAGAGCAAGTACTAACAAGTCTCCAGTTCT
 CGCTGTGCGCAACCTTCTCCAGTCCGAGTGCACCAACCGTGCGGCCTGCTG

CCACAACACTCCCTCTGTCGTAAGTTATATCAAGCGTCTCATTGACTCCTGT
CCCGACTTTAACAATGCAATTAGGCTTACGGTGGTCTTGTC AACCTTGCCC
 TGCCTTGCGTCGCCATTGGCAGTCTTATCCAGGCGGCCGCATCTTGCTGAA
 AAACCTCGAGCCATCCGGAAGATCTGGC

***Metarhizium brunneum* KTU-21'in hyd Gen Bölgesinin Baz Sırası**

ACATTCACTTACACTCCAATCCAACACTTCTACAACAACAACCTTTTCCCCC
 AAAACCAACCAACCACCCCATCCTTCAAAATGTTCAAGGCTCTCATCGTC
 GCTCTTGCCGCCGTCGCGGCCGCCATCCCAACTCAGCAGCCTAGCAGCAAT
 GAGATGGAGTGCAACAGCGGCTCGTATTGCTGCAACAAAGTAGCGCAAAA
 CACTGGCATTGTCGTCCCCATCGACGCCCTCACTGCCGCTTGCGGGCGGGAC
 GCTGAAATTTGTTACAGCTGACGTCCTCAATGACGAATGCACCTCGCAGAC
 TGTCTGCTGCAACAATGTCAAGCAAAGTGTCAGTATACAAGACCAACTTTC
 TCGCAAATCTATTACAACCTCTAACTAAATGGTATCTATAGGGTATGGTCAA
 CGTTGCCTGTTCTCCCATCGCGGTGTAAATTCATTGTACAGAGCTCCAGCC
 AACTCTCGAGCCTTGTCGAGAAAAGTGACGATAATATCTACACCGTTGGA
 AGTAATGGCTTTTTAGCTTCTGGGGGAGAAGAGTACAAAGGAGGTGTCGG
 ATAAGAGATAATTTTTTCGCTTCTAAAGCCCAAGGTGGAATAGCCTATGGAT
 CATGATCTTTCTAGAAGATCTCCTACAAT

***Beauveria bassiana* KTU-24'ün hyd Gen Bölgesinin Baz Sırası**

CTTCTAGAAAGATAATTCCCGTTTCGCTCTTGCCATCACCACCCTCATCGCCG
 CTGTGACTGCTGCTCCCTCCGGCCACCATGGTGGAAAGGATCTGCACAAGAT
 GACTCTCGGCCAGGCTGGCGACAGGTGCGGTGCCGACCAGTCCATCTACTGC
 TGCAACGAGAAGACGACCAAGATCGAGCACTCCTCCCCCGAAACCGGCCTCG
 GCGGCCTGCTCGGTGCCACTGTGCGGTGCTGATGGTCTTCTTTCTCACCTTCTCG
 GTACCTGCACCAAGATCCCCGTCAATGGTAAGCCTCAAGTGGTCGATAAAGT
CGCAGAGCAAGTACTAACAAGTCTCCAGTTCTCGCTGTGCGCAACCTTCTCCA
GTCCGAGTGACCAACCGTGCGGCCTGCTGCCACAACACTCCCTCTGTCTGTA
GTTATATCAAGCGTCTCATTGACTCCTGTTCCGACTTTAACAATGCAATTAGG
 CTTACGGTGGTCTTGTC AACCTTGCCCTGCCTGCGTCGCCATTGGCAGTCTTA
 TCCAGGCGGCCATCTGCTGAAAACTCGAGCC

***Beauveria bassiana* KTU-57'nin hyd Gen Bölgesinin Baz Sırası (mRNA)**

CCGTTTCGCTCTTGCCATCACCACCCTCATCGCCGCTGTGACTGCTGCTCCC
 TCCGGCCACCATGGTGGAAAGGATCTGCACAAGATGACTCTCGGCCAGGC
 TGGCGACAGGTGCGGTGCCGACCAGTCCATCTACTGCTGCAACGAGAAGA
 CGACCAAGATCGAGCACTCCTCCCCCGAAACCGGCCTCGGCGGCCTGCTC
 GGTGCCACCGTCGGTGCTGATGGTCTTCTTTCCACCTTCTCGGTACCTGCA

CCAAGATCCCCGTCAATGGTAAGCCTCAAGTGGTCGATAAAAGTCGCAGAG
 CAAATACTAACAAGTCTCCAGTTCTCGCTGTCGGCAACCTTCTCCAGTCCG
 AGTGACCAACCGTGCGGCCTGCTGCCACAACACTCCCTCTGTCGTAAGTT
 ATATCAGTCTCTAATTGACTGCTGTTTCAGGATCTAACGATATAATTAGGCT
 TACGGTGGTCTTGTC AACCTTGCCCTGCCTTGCCTCGCCATTGGCAGTCTTA
 TCCAGGCGGCCGC

***Beauveria bassiana* HpA-4'ün *hyd* Gen Bölgesinin Baz Sırası**

TTCTAGAAAGATGAATTCCCGTTTCGCTCTTGCCATCACCACCCTCATCGCC
 GCTGTGACTGCTGCTCCCTCCGGCCACCATGGTGGAAGGATCTGCACAAG
 ATGACTCTCGGCCAGGCTGGCGACAGGTGCGGTGCCGACCAGTCCATCTA
 CTGCTGCAACGAGAAGACGACCAAGATCGAGCACTCCTCCCCCGAAACCG
 GCCTCGGCGGCCTGCTCGGTGCCACTGTCGGTGCTGATGGTCTTCTTTCTCA
 CCTTCTCGGTACCTGCACCAAGATCCCCGTCAATGGTAAGCCTCAAGTGGT
 CGATAAAGTCGCAGAGCAAGTACTAACAAGTCTCCAGTTCTCGCTGTCGGC
 AACCTTCTCCAGTCCGAGTGCACCAACCGTGCGGCCTGCTGCCACAACACT
 CCCTCTGTCGTAAGTTATATCAAGCGTCTCATTGACTCCTGTTCCGACTTTA
 ACAATGCAATTAGGCTTACGGTGGTCTTGTC AACCTTGCCCTGCCTTGCCT
 CGCCATTGGCAGTCTTATCCAGGCGGCCGCATCTGCT

***Beauveria bassiana* K4'ün *hyd* Gen Bölgesinin Baz Sırası**

GAAAGATGAATTCCCGTTTCGCTCTTGCCATCACCACCCTCATCGCCGCTG
 TGACTGCTGCTCCCTCCGGCCACCATGGTGGAAGGATCTGCACAAGATG
 ACTCTCGGCCAGGCTGGCGACAGGTGCGGTGCCGACCAGTCCATCTACTGC
 TGCAACGAGAAGACGACCAAGATCGAGCACTCCTCCCCCGAAACCGGCCT
 CGGCGGCCTGCTCGGTGCCACCGTCGGTGCTGATGGTCTTCTTTCCACCTT
 CTCGGTACCTGCACCAAGATCCCCGTCAATGGTAAGCCTCAAGTGGTCGAT
 AAAGTCGCAGAGCAAATACTAACAAGTCTCCAGTCTCGCTATCGGCAAC
 CTTCTCCAGTCCGAGTGCACCAACCGTGCGGCCTGCTGCCACAACACTCCC
 TCTGTCGTAAGTTATATCAAGTCTCTAATTGACTGCTGTTTCAGGATCTAAC
 GATATAATTAGGCTTACGGTGGTCTTGTC AACCTTGCCCTGCCTTGCCTCG
 CCATTGGCAGTCTTATCCAGGCGGCCGCATCT

***Beauveria bassiana* LdA1'in *hyd* Gen Bölgesinin Baz Sırası**

GATGAATTCCCGTTTCGCTCTTGCCATCACCACCCTCATCGCCGCTGTGACT
 GCTGCTCCCTCCGGCCACCATGGTGGAAGGATCTGCACAAGATGACTCTC
 GGCCAGGCTGGCGACAGGTGCGGTGCCGACCAGTCCATCTACTGCTGCAA
 CGAGAAGACGACCAAGATCGAGCACTCCTCCCCCGAAACCGGCCTCGGCG
 GCCTGCTCGGTGCCACTGTCGGTGCTGATGGTCTTCTTTCTCACCTTCTCGG
 TACCTGCACCAAGATCCCCGTCAATGGTAAGCCTCAAGTGGTCGATAAAGT
 CGCAGAGCAAGTACTAACAAGTCTCCAGTTCTCGCTGTCGGCAACCTTCTC
 CAGTCCGAGTGCACCAACCGTGCGGCCTGCTGCCACAACACTCCCTCTGTC
 GTAAGTTATATCAAGCGTCTCATTGACTCCTGTTCCGACTTTAACAATGCA

ATTAGGCTTACGGTGGTCTTGTCAACCTTGCCCTGCCTTGCGTCGCCATTGG
CAGTCTTATCCAGGCGGCCGCATCTTTCTAGAAGATCTC

***Beauveria bassiana* Oj3'ün hyd Gen Bölgesinin Baz Sırası**

CCCGAACTTTTCGGAGGCTCGAGTTTTTCAGCAAGATGAATTCCCGTTTTTCGC
 TCTTGCCATCACCACCCTCATCGCCGCTGTGACTGCTGCTCCCTCCGGCCAC
 CATGGTGGAAAGGATCTGCACAAGATGACTCTCGGCCAGGCTGGCGACAG
 GTGCGGTGCCGACCAGTCCATCTACTGCTGCAACGAGAAGACGACCAAGA
 TCGAGCACTCCTCCCCCGAAACCGGCCTCGGCGGCCTGCTCGGTGCCACTG
 TCGGTGCTGATGGTCTTCTTTCTCACCTTCTCGGTACCTGCACCAAGATCCC
 CGTCAATGGTAAGCCTCAAGTGGTCGATAAAGTCGCAGAGCAAGTACTAA
CAAGTCTCCAGTTCTCGCTGTGCGCAACCTTCTCCAGTCCGAGTGCACCAA
CCGTGCGGCCTGCTGCCACAACACTCCCTCTGTCTGTAAGTTATATCAAGCG
TCTCATTGACTCCTGTTCCGACTTTAACAATGCAATTAGGCTTACGGTGGTC
 TTGTCAACCTTGCCCTGCCTTGCGTCGCCATTGGCAGTCTTATCCAGGCGG
 CCGCATCTTTCTAGAAGATCTCCTACA

***Beauveria bassiana* Oj7'nin hyd Gen Bölgesinin Baz Sırası**

TTCGGGATGGCTCGAGTTTTTCAGCAAGATGAATTCCCGTTTCGCTCTTGCC
 ATCACCACCCTCATCGCCGCTGTGACTGCTGCTCCCTCCGGCCACCATGGT
 GGAAAGGATCTGCACAAGATGACTCTCGGCCAGGCTGGCGACAGGTGCGG
 TGCCGACCAGTCCATCTACTGCTGCAACGAGAAGACGACCAAGATCGAGC
 ACTCCTCCCCCGAAACCGGCCTCGGCGGCCTGCTCGGTGCCACCGTCGGTG
 CTGATGGTCTTCTTTCCACCTTCTCGGTACCTGCACCAAGATCCCCGTCAA
 TGGTAAGCCTCAAGTGGTCGATAAAGTCGCAGAGCAAATACTAACAAGTC
TCCAGTTCTCGCTGTGCGCAACCTTCTCCAGTCCGAGTGCACCAACCGTGC
GGCTGCTGCCACAACACTCCCTCTGTCTGTAAGTTATATCAAGTCTCTAAT
TGACTGCTGTTCAAGGATCTAACGATATAATTAGGCTTACGGTGGTCTTGTC
 AACCTTGCCCTGCCTTGCGTCGCCATTGGCAGTCTTATCCAGGCGGC

***Beauveria bassiana* Pa-5'in hyd Gen Bölgesinin Baz Sırası**

GATGAATTCCCGTTTCGCTCTTGCCATCACCACCCTCATCGCCGCTGTGACT
 GCTGCTCCCTCCGGCCACCATGGTGGAAAGGATCTGCACAAGATGACTCTC
 GGCCAGGCTGGCGACAGGTGCGGTGCCGACCAGTCCATCTACTGCTGCAA
 CGAGAAGACGACCAAGATCGAGCACTCCTCCCCCGAAACCGGCCTCGGCG
 GCCTGCTCGGTGCCACTGTGCGGTGCTGATGGTCTTCTTTCTCACCTTCTCGG
 TACCTGCACCAAGATCCCCGTCAATGGTAAGCCTCAAGTGGTCGATAAAGT
TGCAGAGCAAGTACTAACAAGTCTCCAGTTCTCGCTGTGCGCAACCTTCTC
CAGTCCGAGTGCACCAACCGTGCGGCCTGCTGCCACAACACTCCCTCTGTC
GTAAGTTATATCAAGCGTCTCATTGACTCCTGTTCCGACTTTAACAATGCA

ATTAGGCTTACGGTGGTCTTGCCAACCTTGCCCTGCCTTGCGTCGCCATTG
GCAGTCTTATCCAGGCGGCCGCATCTTTCTAGAAGATCTC

***Beauveria bassiana* K5'in *hyd* Gen Bölgesinin Baz Sırası**

GATTCCCGTTTCGCTCTTGCCATCAACCACCCTCATCGCCGCTGTGACTGCT
 GCTCCCTCCGGCCACCATGGTGGAAAGGATCTGCACAAGATGACTCTCGG
 CCAGGCTGGCGACAGGTGCGGTGCCGACCAGTCCATCTACTGCTGCAACG
 AGAAGACGACCAAGATCGAGCACTCCTCCCCGAAACCGGCCTCGGCGGC
 CTGCTCGGTGCCACTGTGCGGTGCTGATGGTCTTCTTTCTCACCTTCTCGGTA
 CCTGCACCAAGATCCCCGTCAATGGTAAGCCTCAAGTGGTTCGATAAAGTC
GCAGAGCAAGTACTAACAAGTCTCCAGTTCTCGCTGTCGGCAACCTTCTCC
AGTCCGAGTGCACCAACCGTGCGGCCTGCTGCCACAACACTCCCTCTGTCTG
TAAGTTATATCAAGCGTCTCATTGACTCCTGTCCCGACTTTAACAATGCAA
TTAGGCTTACGGTGGTCTTGTC AACCTTGCCCTGCCTTGCGTCGCCATTGGC
 AGTCTTATCCAGGCGGCCGC

***Isaria fumosorosea* KTU-1'in *hyd* Gen Bölgesinin Baz Sırası**

ACTGCTGCTCCCTCCGGCCACCATGGCGGAAAGGATCTGCACAAGATGAC
 TCTCGGCCAGGCTGGCGACAGGTGCGGTGCCGACCAGTCCATCTACTGCTG
 CAACGAGAAGACGACCAAGATCGAGCACTCCTCCCCGAAACCGGCCTCG
 GCGGCCTGCTCGGTGCCACCGTGCGGTGCTGATGGTCTTCTTTCCACCTTCT
 CGGTACCTGCACCAAGATCCCCGTCAATGGTAAGCCTCAAGTGGTTCGATA
AAGTCGCAGAGCAAATACTAACAAGTCTCCAGTTCTCGCTATCGGCAACCT
TCTCCAGTCCGAGTGCACCAACCGTGCGGCCTGCTGCCACAACACTCCCTC
TGTCGTAAGTTATATCAAGTATCTAATTGACTGCTGTT CAGGATCTAACGA
TATAATTAGGCTTACGGTGGTCTTGTC AACCTTGCCCTGCCTTGCGTCGCCA
 TTGGCAGTCTTATCCAGGCGGCCGCATCTTTCTAGAAGATCTCCTACAAT

*Gen dizilerindeki altı çizili sıralar, intron bölgelerini göstermektedir.

ÖZGEÇMİŞ

Eğitim hayatına Şehit Yüzbaşı Cengiz Topel İlköğretim Okulu'nda başladıktan sonra, lise eğitimini İstanbul'da AlpArslan Anadolu Lisesinde tamamladı. 2008 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği bölümünde lisans öğrenimine başladı. 2012 yılında mezun oldu. Mezun olduktan sonra 5 yıl özel sektörde Gıda Mühendisi olarak çalıştı. 2018 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümünde Bilimsel Hazırlık dersleri aldı ve 2019 yılında aynı bölümde yüksek lisansa başladı. İyi derecede İngilizce bilmektedir.