



**HİDROFOBİN PROTEİNİ ÜRETİCİ
CLADOSPORİUM TÜRLERİNİN MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

Büşra ALBAYRAK

**Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Serkan ÖRTÜCÜ**

**2019
Her hakkı saklıdır.**



**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HİDROFOBİN PROTEİNİ ÜRETİCİ *CLADOSPORIUM* TÜRLERİNİN
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

BÜŞRA ALBAYRAK

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Serkan ÖRTÜCÜ

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

**Erzurum
2019
Her hakkı saklıdır**

T.C.
ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ ONAY FORMU

HİDROFOBİN PROTEİNİ ÜRETİCİ *CLADOSPORIUM* TÜRLERİNİN
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Dr. Öğr. Üyesi Serkan ÖRTÜCÜ danışmanlığında, Büşra ALBAYRAK tarafından hazırlanan bu çalışma 07 / 01 / 2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **Oy birliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan	: Doç. Dr. Mesut TAŞKIN	İmza	:
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Serkan ÖRTÜCÜ	İmza	:
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Ayşenur YAZICI	İmza	:

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ
Enstitü Müdürü

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

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

07 / 01 / 2019

İmzası

Büşra ALBAYRAK

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİDROFOBİN PROTEİNİ ÜRETİCİ *CLADOSPORIUM* TÜRLERİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

BÜŞRA ALBAYRAK

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Serkan ÖRTÜCÜ

Hidrofofinler filamentöz funguslarda üretilen küçük moleküler ağırlığa sahip amfipatik proteinlerdir. Bu proteinler içerdikleri korunmuş sisteinler arasında oluşan disülfid bağları sayesinde oldukça kararlı bir yapıdadırlar ve bu yapılarından dolayı yüzey modifikasyonları, doku mühendisliği ve ilaç taşıma sistemleri gibi birçok farklı alanda kullanılma potansiyelleri vardır. Bu tez çalışmasında, kültür ortamında süperhidrofobik özellik gösteren fungus izolatlarının hidrofobisitesinden sorumlu olan hidrofobin proteinlerinin belirlenmesi, saflaştırılması ve hidrofobin üretici türlerinin moleküler karakterizasyonunun gerçekleştirilmesi ile yeni hidrofobin üretici türlerin ve yeni hidrofobin proteinlerinin literatüre kazandırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, topraktan izole edilmiş filamentöz fungus izolatları PDA'da bir hafta geliştirildikten sonra suyun değme açısı ölçümüyle yüzey hidrofobisitesi belirlendi. Elde edilen değme açılarına göre derecelendirilip, en yüksek hidrofobisiteye sahip beş farklı fungus klasik yöntemlerle *Cladosporium* olarak tanılandı. Ardından bu izolatların sporları, hidrofobin eldesi için önerilen asetonitril-TFA ve %60'luk etanol çözeltileri içinde ekstrakte edildi. Son olarak, ITS ve D1D2 gen bölgelerine göre *Cladosporium* türlerinin moleküler karakterizasyonu gerçekleştirildi. Sonuç olarak, en yüksek değme açısına sahip A5 izolatı, *C. macrocarpum* olarak tanılandı ve yaklaşık 8kDa'luk hidrofobin proteinine sahip olduğu belirlendi.

2019, 54 Sayfa

Anahtar Kelimeler: *Cladosporium spp.*, Hidrofobin, Moleküler Karakterizasyon, Süper-Hidrofobik Yüzey

ABSTRACT

MS. Thesis

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *CLADOSPORIUM* SPECIES PRODUCING HYDROPHOBINS

BÜŞRA ALBAYRAK

Erzurum Technical University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ

Hydrophobins are amphipathic proteins with small molecular weight produced in filamentous fungi. These proteins are highly stable due to the disulfide bonds formed between the protected cysteines they contain and have the potential to be used in many different fields such as surface modifications, tissue engineering, and drug transport systems. In this study, it was aimed to determine the hydrophobin proteins responsible for the hydrophobicity of the superhydrophobic fungus isolates in the culture medium and to carry out the molecular characterization of the hydrophobin producer species and to introduce new hydrophobin producing species and new hydrophobin proteins. For this purpose, isolates from soil were incubated for one week in PDA and surface hydrophobicity was determined by measuring the water contact angle. Five different fungi with the highest hydrophobicity were classified as *Cladosporium* by classical methods. The spores of these isolates were then extracted in acetonitrile-TFA and 60% ethanol solutions recommended for obtaining hydrophobins. Finally, molecular characterization of *Cladosporium* species was performed according to ITS and D1D2 gene regions. As a result, the A5 isolate with the highest contact angle was identified as *C. macrocarpum* and it was determined to have a hydrophobin protein of about 8kDa.

2019, 54 pages

Keywords: *Cladosporium* spp., Hydrophobin, Molecular Characterization, Super-Hydrophobic Surface

TEŞEKKÜR

Bu tez alıŐması, Erzurum Teknik Üniversitesi, Yüksek Teknoloji Araştırma Merkezinde (YÜTAM) bulunan Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarında yapılmıştır. Lisansüstü eğitimim süresince desteğini esirgemeyen danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Serkan ÖRTÜCÜ'ye teŐekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, tez çalışması süresi boyunca hem uygulama hem de manevi olarak yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi Ayşenur YAZICI'ya ve aynı laboratuvarı paylaŐtıđım bütün arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tez alıŐması sürecinde her türlü manevi desteği sağlayan annem Emsile ALBAYRAK, babam Ahmet ALBAYRAK ve kardeŐlerim Özlem ALBAYRAK ve Özden ALBAYRAK BAHTİYARİ'ye teşekkür ederim.

BÜŞRA ALBAYRAK

01 / 2019

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Hidrofobinler.....	1
1.1.1. Hidrofobinlerin Yapısı	1
1.1.2. Hidrofobinlerin Sınıflandırılması	2
1.1.3. Funguslarda Hidrofobinlerin Fonksiyonları	4
1.1.4. <i>Cladosporium</i> Hidrofobinleri	6
1.2. Hidrofobinlerin Biyoteknolojik Uygulamaları	7
1.2.1. Tedavi ve İlaç Gönderimi.....	8
1.2.2. Çift-faz Sistemlerde Saflaştırma için Hidrofobinler	8
1.2.3. Emülgatör ve Koruyucu olarak Hidrofobinler.....	9
1.2.4. Yüzey Modifikasyonları	9
1.2.4.1. Protein İmmobilizasyonu	10
1.2.4.2. Yapay Mteryal Üretimi	11
1.3. Tez Çalışmasının Önemi	12
2. KAYNAK ÖZETLERİ	14
3. MATERYAL ve YÖNTEM	17
3.1. MATERYAL	17
3.1.1. Fungus Türleri.....	17
3.1.2. Kitler	17
3.1.3. Kimyasallar	17
3.1.4. Cihazlar ve Sarf Malzeme	17
3.2. YÖNTEM	18
3.2.1. Suyun Değme Açısına Göre Fungusların Ön Seçimi	18
3.2.2. Hidrofobin İzolasyonu ve Karakterizasyonu	19
3.2.2.1. Spor İzolasyonu.....	21
3.2.2.2. Spordan Hidrofobin Ekstraksiyonu.....	20
3.2.2.3. Bradford Assay	20
3.2.2.4. SDS-PAGE.....	21

3.2.3. Seçilen Fungus İzolatlarının Tanılanması.....	22
3.2.3.1. Klasik Yöntemlerle Karakterizasyon.....	22
3.2.3.2. Moleküler Yöntemlerle Karakterizasyon.....	23
3.2.3.2.1. DNA İzolasyonu	23
3.2.3.2.2. ITS ve D1-D2 rDNA Bölgelerinin Çoğaltılması	23
3.2.3.2.3. Jelden PZR Ürün Ekstraksiyonu	25
3.2.3.2.4. Ligasyon.....	25
3.2.3.2.5. Transformasyon	25
3.2.3.2.6. Plazmid İzolasyonu	26
3.2.3.2.7. Dizileme	26
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	27
4.1. Suyun Değme Açısına Göre Fungusların Ön Seçimi.....	27
4.2. Hidrofobin İzolasyonu ve Karakterizasyonu	33
4.2.1. Fungustan Spor İzolasyonu ve Spordan Hidrofobin Ekstraksiyonu	33
4.2.2. SDS-PAGE	34
4.3. Seçilen Fungus İzolatların Türlerinin Tanılanması.....	36
4.3.1. Klasik Yöntemlerle Karakterizasyon.....	36
4.3.2. Moleküler Karakterizasyon.....	37
4.3.2.1. DNA İzolasyonu	37
4.3.2.2. D1-D2 DNA bölgesinin Çoğaltılması ve Jelden DNA ekstraksiyonu	38
4.3.2.3. ITS Bölgesinin Çoğaltılması ve Ligasyon	39
4.3.2.4. Transformasyon ve Plazmid İzolasyonu	40
4.3.2.5. Dizileme	40
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	44
KAYNAKLAR	45
EKLER.....	52
ÖZGEÇMİŞ.....	54

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
°	Derece
°C	Santigrat derece
g	Gram
%	Yüzde
µl	Mikrolitre
MoS ₂	Molibden Disülfit
WS ₂	Tungsten disulfide
v/v	Hacimce Yüzde
w/v	Hacimde Ağırlıkça Yüzde
µm	Mikrometre
ml	Mililitre
dk	Dakika

Kısaltmalar

APS	Amonyum per sülfat
BSA	Sığır Serum Albumini
DNA	Deoksiribonukleotid Asit
dH ₂ O	Distile Su
ELISA	Enzim-bağlı immünosorbent testi
GST	Glutasyon S-Transferaz
IPTP	İsopropiltio-β-galaktosit
ITS	Internal Transcribed Spacer
LB	Luria et suyu
NETosis	Nötrofil Ekstrasellüler Tuzak
RNA	Ribonucleotid Asit
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDA	Patetes Dekstroz Agar
PET	Polietilen Tereftalat
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat

SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat - Poliakrilamid Jel Elektroforez
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetrametiletilendiamin
TFA	Trifloroasetik Asit



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Üç boyutlu yapısı ortaya konmuş hidrofobin proteinleri.....	2
Şekil 1.2 Sınıf I (a,b) ve sınıf II (c) hidrofobinlerin üç boyutlu yapılarının şematik gösterimi.....	4
Şekil 1.3 Filamentöz fungusların gelişim ve büyüme süreçlerinde hidrofobinlerin görev şeması	5
Şekil 1.4 Hidrofobinler hidrofilik yüzeylerde öztoplanma yaparak yüzey özelliğini hidrofobikleştirme yetisine sahiptirler	10
Şekil 3.1 Damlaların değme açılarını belirlemek için kullanılan modifiye edilmiş mikroskop sisteminin şematik gösterimi.....	19
Şekil 3.2 Spor izolasyonunun şematik gösterimi	20
Şekil 4.1 Katı kültürde bir hafta geliştirilmiş fungus türlerinden birkaçı.	27
Şekil 4.2 En yüksek değme açılarının ölçüldüğü izolatların bir hafta geliştirilmiş görüntüleri.....	29
Şekil 4.3 A5 izolatının üzerine damlatılmış 10 µl saf su ile birlikte görüntüsü	30
Şekil 4.4 <i>Cladosporium</i> türlerinin yüzeylerindeki su damlalarının (6 µl) ImageJ programı ile değme açılarının ölçüm sonuçları.....	32
Şekil 4.5 A5, A12, A25, A31, D7 örneklerinden izole edilmiş sporların liyofilizatör cihazındaki görüntüleri.	33
Şekil 4.6 BSA standart grafiği	34
Şekil 4.7 Farklı çözeltiler içinde ekstrakte edilen izolatlara ait SDS-PAGE jel görüntüsü.....	35
Şekil 4.8 <i>Trichoderma reesei</i> sporlarından elde edilen proteinler (2→asetonitril+TFA, 3→%60 etanol)	36
Şekil 4.9 Seçilen fungus türlerinin mikroskop altında görüntülenen konidiofor yapıları	37
Şekil 4.10 Seçilen izolatların genomik DNA izolasyonu sonunda %1 lik agaroz jeldeki görüntüleri	38
Şekil 4.11 ITS primerleriyle yapılan PZR'den elde edilen ürünlerin %1'lik agaroz jeldeki görüntüleri	39
Şekil 4.12 Evrimsel tarih, Komşu Birleştirme yöntemi (Saitou and Nei 1987) kullanılarak çıkarıldı. Şube uzunluğu = 0.74476742 toplamı olan en uygun ağaç gösterilmiştir.	41

Şekil 4.13 Evrimsel tarih, Komşu Birleştirme yöntemi (Saitou and Nei 1987) kullanılarak çıkarıldı. Şube uzunluğu = 0.02655032 toplamı olan en uygun ağaç gösterilmiştir.42



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Hidrofobin sınıflarına göre korumuş sisteinler arasındaki amino asit farklılıkları	3
Çizelge 3.1 Kullanılan cihazlar, cihazların marka ve modelleri	17
Çizelge 3.2 Değme açılarına ait skala	19
Çizelge 3.3 SDS-PAGE jeli için gereken kimyasallar ve kullanıla miktarlar.....	21
Çizelge 3.4 PZR malzemeleri ve miktarları.....	24
Çizelge 3.5 PZR koşulları	24
Çizelge 3.6 Ligasyon için malzemeler ve miktarları	25
Çizelge 4.1 Değerlendirilen fungusların değme açıları	31
Çizelge 4.2 Ekstrakte edilen proteinlerin 595 nm'de ölçülen absorbans değerleri ve standart grafiğe göre hesaplanan konsantrasyonları	34
Çizelge 4.3 Elde edilen ITS ve D1-D2 rDNA bölgelerinin GenBank verilerine karşılaştırma sonucu belirlenen türler	41

1. GİRİŞ

1.1. Hidrofobinler

Hidrofobinler küçük moleküler kütleli, filamentöz yapıdaki funguslarda üretilen ve yüzey aktif özellikte proteinlerdir (Bayry *et al.* 2012). Hidrofobinler fungal aleme özgüdürler ve Askomiset, Bazidiomiset'lerde bulunurlar (Wösten 2001). İlk kez, 1990'ların başlarında *Shizophyllum commune*'den, Wessels ve arkadaşları tarafından izole edilmiştir (Wessels *et al.* 1991). Bu nedenle *S. commune* hidrofobinleri (Sc1, Sc2, Sc3, Sc4, Sc5 ve Sc6) üzerine daha çok ve kapsamlı çalışmalar yapılmıştır (Devries *et al.* 1993 ve Wosten *et al.* 1999). *S. commune*'ün yanı sıra, *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, *Dictyoynema glabratum* vb. Bazidiomiset'lere dahil funguslarla da çalışılmıştır. Askomiset'lerden en çok *Trichoderma* cinsi üzerine çalışılmış olsa da *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Neurospora* cinslerine ait bazı hidrofobinler de karakterize edilmiştir. Interpro veri tabanına göre, 428 Askomiset ve 1250 Bazidiomiset olmak üzere toplamda 1678 hidrofobin proteini verisi bulunmaktadır (Kulkarni *et al.* 2017).

Tamamlanan fungal genom analizlerine göre, birçok türün 2 ile 7 hidrofobin üyesi içerdiği tespit edilmiştir. Ancak, *Coprinus cinereus* mantarı 23 tane hidrofobin proteini kodlayan gene sahiptir. Diğer şapkalı mantar türleri için de bu hidrofobin sayısının tipik olduğu söylenmiştir (Sunde *et al.* 2008).

1.1.1. Hidrofobinlerin Yapısı

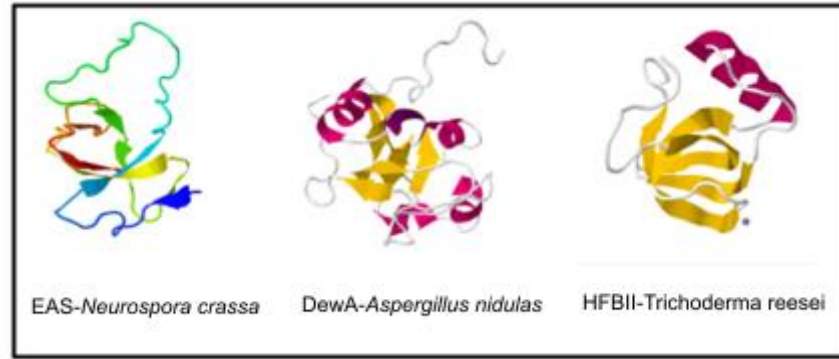
Hidrofobinler 70-350 aralığında aminoasit dizisine sahip, amfipatik küçük proteinlerdir (Wosten and Scholtmeijer 2015). Karakteristik olarak sekiz korunmuş sistein aminoasidi içerirler ve bu sisteinler arasında (C1-C6, C2-C5, C3-C4 ve C7-C8) dört disülfid bağı oluştururlar. Sisteinler dışında, çok az aminoasit dizi benzerliklerine rağmen, hidrofobin proteinleri benzer hidrofobisite gösterirler (Sunde *et al.* 2008). Sekiz sistein aminoasidi arasındaki disülfid bağları hidrofobinlerin kararlı yapı oluşturmada önemli rol oynarlar. Hidrofobinler, özellikle, çözünmüş durumdaki hidrofobinlerin kararlılıklarını korumada önemlidirler (Wosten and Scholtmeijer 2015).

1. GİRİŞ

Hidrofobinler öztoplanma yapabilirler ve amfipatik özelliklerinden dolayı hidrofilik-hidrofobik arayüzelerde tek katmanlı tabaka oluştururlar (Bayry *et al.* 2012). Örneğin; su-hava, su-yağ, su-hidrofobik katı gibi hidrofilik-hidrofobik arayüzlerde öztoplanma yaparlar (Wosten and Scholtmeijer 2015). Hidrofobinler bu yeteneklerinden dolayı yüzey kaplamaları, biyosensörler, kendi kendini temizleyen yüzeyler gibi birçok endüstriyel uygulamada kilit rol oynarlar (Kulkarni *et al.* 2017).

1.1.2. Hidrofobinlerin Sınıflandırılması

Hidrofobinler tek katman oluşturabilmeleri, hidropati özellikleri ve çözünürlükleri temel alınarak iki sınıfa, Sınıf I ve Sınıf II, ayrılırlar (Bayry *et al.* 2012). Askomiset'ler hem Sınıf I hem de Sınıf II'ye ait hidrofobin proteinlerini ifade ederler; Bazidomiset'ler ise sadece Sınıf I hidrofobinleri üretirler (Kulkarni *et al.* 2017). Sınıf I hidrofobinler organik çözücülerde ve % 2 SDS'te çözünmezler, sadece formik asit ve TFA da çözünürler; ayrıca tek katmanlı yapı (rodlet ya da amiloid benzeri) oluşturabilirler (Wessels *et al.* 1991; Devries *et al.* 1993). Sınıf I'in tersine, Sınıf II hidrofobinler % 60 etanolde, % 2 SDS çözeltisinde çözünebilirler ve amiloid benzeri yapı oluşturamazlar (Wosten and de Vocht 2000).



Şekil 1.1. Üç boyutlu yapısı ortaya konmuş hidrofobin proteinlerinden bazıları. Sırasıyla; EAS (*Neurospora crassa*) ve DewA (*Aspergillus nidulus*) sınıf I hidrofobinler ve HFBII (*Trichoderma reesei*) sınıf II hidrofobini (www.rcsb.org)

Hidrofobin sınıfları sekiz sistein dizisine sahip olmaları ve aynı sisteinler arasında disülfid bağları oluşturmalarıyla benziyor olsalar da sistein dizileri arasında farklı uzunlukta aminoasit dizileri içerirler (Çizelge 1.1) (Mgbeahuruike *et al.* 2013). Ancak, her iki sınıf da iki kısımdan oluşur ve 1-4 sisteinleri arasındaki bölge birinci

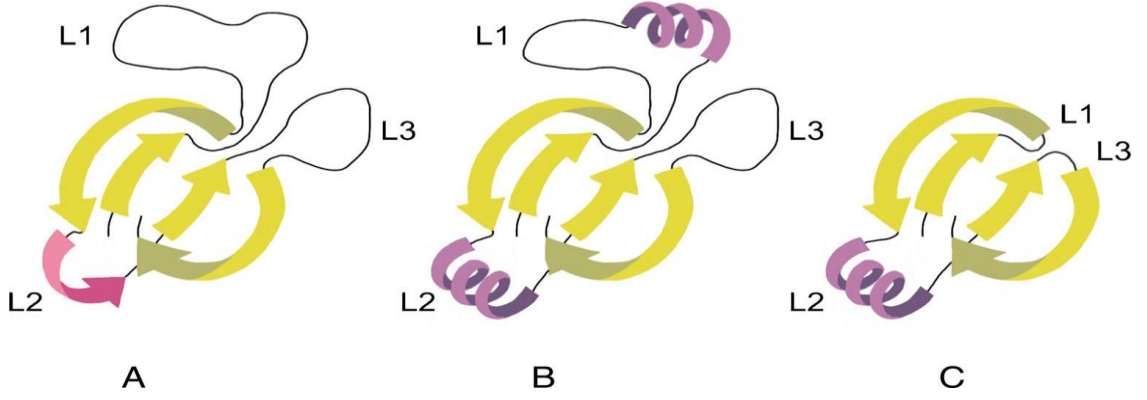
1. GİRİŞ

kısmı ve 5-8 sisteinleri de ikinci kısmı oluştururlar. Bu iki kısım sınıfların hidropati kalıplarını ifade ederler (Wosten and de Vocht 2000). Bununla birlikte, her iki hidrofobin sınıfında yüklü aminoasitler bir tarafta yüklü olmayan aminoasitler diğer tarafta olacak şekilde konumlanmışlardır ve bu hidrofobinlerin amfipatik yapısını oluşturmuştur (Kwan *et al.* 2006; Morris *et al.* 2013; Ren *et al.* 2013).

Çizelge 1.1. Hidrofobin sınıflarına göre korunmuş sisteinler arasındaki amino asit farklılıkları

Sınıf	Korunmuş Sistein Dizileri Arasında Kalan Amino Asit Sayıları				
	C1-C2	C3-C4	C4-C5	C5-C6	C7-C8
Sınıf I (Basidomiset)	6	26-33	12-13	6	13
Sınıf I (Askomiset)	6-7	26-39	18-21	6-8	15-17
Sınıf II	9-10	11	15-16	2-7	10

Sınıf I hidrofobinlerden EAS (*Neurospora crassa*), DewA (*Aspergillus nidulus*), MPGI (*Magnaporthe grisea*), HYD1 (*S.commune*) RodA (*A. fumigatus*), ve sınıf II hidrofobinlerden HFBI, HFBII (*Trichoderma reesei*), NC2 (*N. crassa*)'nın üç boyutlu yapıları çözümlenmiştir (Şekil 1.1) (www.rcsb.org). Hidrofobin sınıflarının her ikisi de disülfid bağlarının varlığından dolayı dört β -tabaka çekirdek yapısına sahiptirler (Şekil 1.2). Sınıf II hidrofobinleri L1 ve L3 olmak üzere iki kısa ilmek içerirler; L2 ilmeğinde ise α -sarmal yapısı bulunur (Şekil 1.2). Sınıf I hidrofobinleri hem ilmeklerin uzunluğu ve yapısı bakımından farklılık gösterirler hem de β -tabaka içeriği sınıf II hidrofobinlerine göre fazladır (Kwan *et al.* 2006). Örneğin; C3-C4 arasındaki ilmek (L1) Sc3 hidrofobinin hidrofobik yüzeylere bağlanmasında ve tek katmanlı yapı oluşturmasında önemliyken, EAS proteini çalışmaları C7-C8 arasındaki ilmeğin (L3) kritik olduğunu göstermiştir (Bayry *et al.* 2012).



Şekil 1.2. Sınıf I (a,b) ve sınıf II (c) hidrofobinlerin üç boyulu yapılarının şematik gösterimi (Wosten and Scholtmeijer 2015)

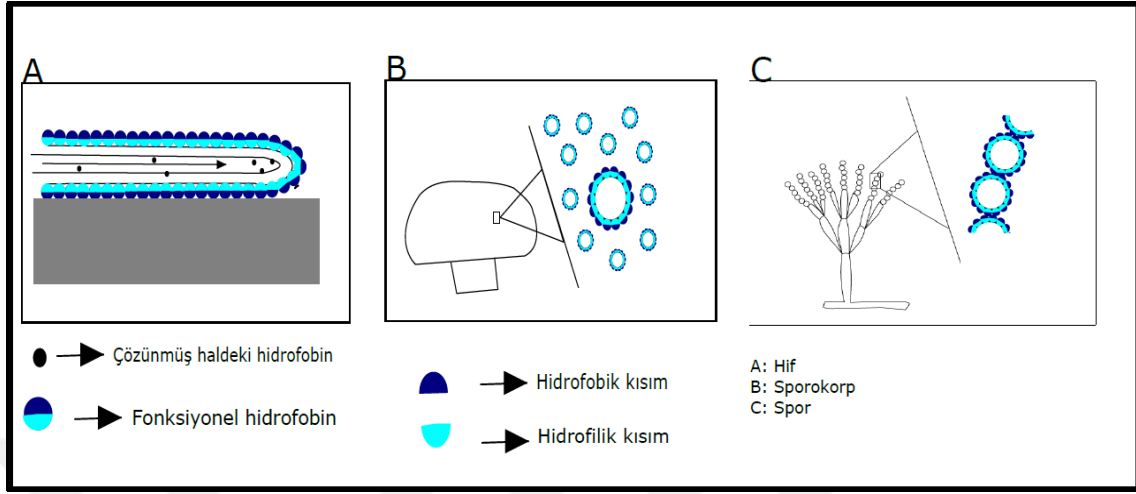
Primer diziyeye ait homoloji çalışmalarına göre benzer rolleri yerine getiren hidrofobinler türler arasında birbiriyle benzerlik sergilerler; ancak dizi farklılıkları, büyüklük ve kimyasal özelliklerini etkiler (Wösten 2001; Scholtmeijer *et al.* 2004). Her iki hidrofobin sınıfının primer dizisi tek bir polipeptit zincirinden oluşur fakat katlanma mekanizmaları birbirinden farklıdır, α -sarmal ve β -tabakaların bulunma oranları hidrofobin sınıfına ve proteinin lokasyonuna göre değişir (Wösten 2001). Örneğin; su-hava arayüzünde sınıf I hidrofobinlerin β -tabaka varlığında artış görülürken, su-hidroforik katı arasındaki arayüzde α -sarmal yapısında artış saptanmıştır. α -sarmal yapısı için proteinlerin kendiliğinden düzenlenmesi saniyeler içerisinde oluşurken, β -tabaka oluşumu daha uzun sürmektedir ve bu yapı proteinin en kararlı halini oluşturur. Diğer yandan, hidrofobin sınıfları karşılaştırıldığında sınıf II hidrofobinlerde su-hava arayüzünde öztoplanma sırasında konformasyonel bir değişikliğe raslanmamış ve rodlet yapı oluşturamaması buna bağlanmıştır (Meister *et al.* 2016).

1.1.3. Funguslarda Hidrofobinlerin Fonksiyonları

Filamentöz funguslar hif adı verilen dallı yapı oluşturarak ve bu yapıların uç kısımlarında spor içeren yapılar üreterek büyürler. Makroskobik türlerde ise sporokarp oluşturmak için hifler bir araya gelirler. Hiflerin ve sporokarpların dış yüzeylerini kaplayan (Şekil 1.3) hidrofobinler doğal surfektant özelliktedirler ve büyümeye yardımcı olarak yüzey gerilimini düşürürler. Bu sebeple, hidrofobinler su-hava arayüzünde fungusların havai hif yapılarını ve sporokarp oluşturmalarına olanak sağlarlar. Aynı şekilde amfipatik olan hidrofobinlerle kaplı sporlar da hidrofobik

1. GİRİŞ

yüzeyle sahip olup havada kolayca yayılabilirler ve su direnci oluştururlar (Şekil 1.3.) (de Vries *et al.* 1999; Sunde *et al.* 2008).



Şekil 1.3. Filamentöz fungusların gelişim ve büyüme süreçlerinde hidrofobinlerin görev şeması. (A) hiflerin dış yüzeyini kaplayan hidrofobinler, (B) sporokarp yapılarında bulunan hidrofobinler, (C) sporların dış yüzeyindeki hidrofobinler.

Fungus yüzeylerini kaplayan hidrofobinler yüzeylerinin hidrofobik olmasını sağlarlar. Hidrofobinlerin varlığıyla hidrofobik olan yüzeyleri sayesinde, funguslar birçok başka fonksiyonu da gerçekleştirebilirler. Bunların ilki, hidrofobin tabakaları hidrofobik yüzeylere yapışmayı ve tutunmayı kolaylaştırır (Wang *et al.* 2010). Özellikle patojen konak ilişkisinde ve simbiyoz yaşamda iki canlının etkileşimi için gereklidir (Wösten 2001). Örneğin; böcek patojeni olan *Beauveria bassiana* sporları ile böcek kitin tabakası arasındaki hidrofobik etkileşimi hidrofobinlerle sağlanır (Zhang *et al.* 2011). Buna benzer olarak, bitki patojeni *Magnaporthe grisea*'da üretilen Mpg1 hidrofobini fungusun bitki ile etkileşimini sağlayan appresorium oluşumunda görevli olduğu söylenmiştir. MPG1 geninin susturulmasıyla appresorium oluşumunda azalma görülmüş, suyla kolayca etkileşebilir hale gelmiş ve patojen özelliği azalmıştır (Talbot *et al.* 1996). İkinci olarak, hidrofobinler suyun nüfuz etmesini engeller fakat hava kanallarıyla gaz geçişine izin verirler ve hücrelerin dayanıklılığını artırırken yaşamlarının devam etmesinde rol oynarlar (de Vries *et al.* 1999; Sunde *et al.* 2008). Hidrofobinlerin yüzey aktivitelerinden dolayı yukarıda da bahsedildiği gibi havai hiflerin gelişimi, spor yayılımını kolaylaştırır ve sporokarpları ıslanmaya ve kurumaya karşı korurlar (Khalesi *et al.* 2015). *S. commune*'e ait Sc3 hidrofobin ekspresyonu az olduğunda havai hiflerin oluşmayacağı ve benzer olarak Sc1, Sc4 hidrofobinlerinin de

az miktarda olması durumunda sporokarp üretilmeyeceği bildirilmiştir (Wessels *et al.* 1991). Bazı monomer yapıdaki hidrofobinler toksik özellik gösterebilirler, sınıf II hidrofobini cerato-ulmin buna örnektir (Wösten 2001). Diğer bir hidrofobin fonksiyonu ise sporların yüzeyindeki tek katmanlı hidrofobinlerin immün sisteminden gizlenmede kritik rol oynamalarıdır. Hidrofobin tabakası immün hücreleri tarafından patojen olarak algılanmayı engeller ve konak immün sistemi hücrelerini aktifleştirmeyi engeller. *A. fumigatus* hidrofobini RodA, nötrofil hücrelerinden salgılanan maddelerin patojen membranı parçalanması ve nükleer DNA'yı açığa çıkması olan NETosis'e ve makrofajlarca öldürülmeye karşı fungusu direnç kazandırır (Bayry *et al.* 2012). Sonuç olarak, hidrofobinler fungus hayat döngüsü sürecinde farklı aşamalarda ve bölümlerde ifade edilirler ve üretilen hidrofobin açısından da değişiklik gösterirler (Khalesi *et al.* 2015).

1.1.4. *Cladosporium* Hidrofobinleri

Cladosporium, Askomiset şubesine ait 500'den fazla türe sahip bir cinsidir. *Cladosporium* türleri deri eşyalarda, odunsu ürünlerde, bitki yaprak yüzeylerinde ve atıklarında ve çeşitli toprak türlerinde bulunurlar. Açık ve kapalı ortamlarda çokça rastlanırlar. Bu sebeple yiyecek kontaminasyonlarına ve laboratuvarlarda da kültür kontaminasyonuna sebep olabilirler (Bensch 2012).

Cladosporium kolonileri kadifemsi ve tozlu bir görünümde; renkleri yeşil ve kahverengi arasında değişebilir. Katı kültür içinde ters görüntüleri kuyu kahve veya siyahtır. Mikroskopik morfolojilerinde, konidioforlar koyu renkte pigmentlere sahiptirler ve ağaç benzeri dallanma yaparlar. Ayrıca, bölmeli, koyu renkli ve yukarı doğru dik hipler oluştururlar. Spor yapısına gelince, küre, oval veya limon benzeri olabilirler ve uzun dallanmış zincir haldedirler (Bensch 2012).

Cladosporium'lar genellikle insan patojeni olmazlar fakat havada fazlaca bulunmaları, kolayca sporlanma ve yayılabilme özelliklerinden dolayı bazı türlerinin (örneğin; *C. herbarum*, *C. cladosporioides*) özellikle solunum ve deri alerjilerine neden oldukları görülmüştür (Sharpe *et al.* 2015 ve Rick *et al.* 2016). Diğer yandan, klinik çalışmalar *Cladosporium* türlerinin yoğun olarak solunum yollarında bulunduğu ve azol gibi antifungal ilaçlara karşı direnç gösterdikleri açığa çıkarılmıştır (Sandoval-Denis *et*

al. 2015). *Cladosporium* türleri insan patojeni olarak düşünülmesine de *Cladosporium* cinsiyle ilişkili alerjilerde etkili proteinleri vardır ve bununla ilgili olarak *C. sphaerospermum* türüne ait Cla h HCh1 ve *C. herbarum* türünden HCh1 (10,5 kDa) hidrofobinlerinin bu proteinlerden olduğu ortaya çıkarılmıştır (Weichel *et al.* 2003; Yew *et al.* 2016).

Cladosporium'lar yaşam döngülerinin farklı aşamalarında üretilen hidrofobin proteinleri içerirler (Whiteford *et al.* 2004; Lacroix *et al.* 2008); ancak, *Cladosporium* hidrofobini çalışmaları domates yaprak patojeni olan *C. fulvum* üzerine yoğunlaşmıştır. *C. fulvum* HCf-1, 2, 3, 4, 5, 6 olmak üzere altı hidrofobin içerir ve bu hidrofobinlerden HCf-1, 2, 3, 4 sınıf I, HCf-5,6 sınıf II hidrofobinlere aittirler (Spanu 1997; Segers *et al.* 1999; Nielsen *et al.* 2001). 83 aminoasitten oluşan ve 8 kDa büyüklüğünde olan HCf-1 hidrofobini, *C. fulvum*'un yaşam döngüsünün her aşamasında üretilir; karbon ve nitrojen eksikliğinden etkilenmez, konidyanın su ile yayılımında ve fungusun su tutmasını engellemede görev alır (Spanu 1997; Whiteford and Spanu 2001). HCf-1, 3, 6 hidrofobinleri bitkiyi enfekte etme sırasında üretilirler (Lacroix *et al.* 2008; Lacroix and Spanu 2009), HCf-6 adezyonu sağlamada görevli olan proteinlerden biridir (Whiteford *et al.* 2004). HCf-5 fungusun gelişimi sırasında genç havai hiflerde bulunurken HCf-4 agar içinde büyüyen hiflerde bulunur (Lacroix *et al.* 2008). Diğer yandan nitrojen eksikliğinde, HCf-4, 5 hidrofobin üretimleri indüklenir (Segers *et al.* 1999).

1.2. Hidrofobinlerin Biyoteknolojik Uygulamaları

Hidrofobinler funguslarda misellerin ve sporların yüzeylerinde bulurlar, yaşam döngülerinin farklı aşamalarında üretilirler; patojenitede, hidfobisite oluşturmada ve funguslara dayanıklılık kazandırmada görev alırlar. 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 *et al.* 2017). İlaçların biyoyararlanımı, yüzey modifikasyonları, hidrofobik materyallerin sulu çözeltilerde dağıtılması, üretim proseslerinde köpük oluşumunun engellenmesi, biyosensörler, rekombinant proteinlerin saflaştırma basamaklarında ve kendi kendini temizleyen materyallerin üretimi gibi alanlar hidrofobinlerin en güncel uygulamaları olarak listelenebilir (Kulkarni *et al.* 2017).

1.2.1. Tedavi ve İlaç Gönderimi

Hidrofobinler, nanopartikül oluşturmak ve stabilize etmek için basit ve türe özgü alternatifler (Wosten and Scholtmeijer 2015). Amfipatik özelliklerinden dolayı damardan, ağızdan veya bölgesel verilecek, aynı zamanda suda çözünmeyen ilaçların formulasyonuna eklenebilirler. Örneğin; Sc3 hidrofobini, hidrofobik cyclosporine A ve nifedipine ilaçlarının süspansiyonlarına eklendiklerinde biyoyararlanımları 6 kata kadar arttırılmıştır (Akanbi *et al.* 2010). Bölgesel ilaç gönderimi için ilaç nanopartiküllerini doğrudan kaplamak yerine ilaç yüklenmiş porlu silikon ya da selüloz tabakalarının yüzey stabilitesini sağlamak ve biyoyuumluluğunu arttırmak amacıyla kullanılabilirler (Valo *et al.* 2010; Bimbo *et al.* 2011). Dahası, lipidler yerine HFBI proteiniyle çift tabakalı zar veya hem dayanıklı hem de stabil vezikül üretmek amacıyla ve hidrofobinlerin bu amaç için işlevsel olduğu gösterilerek yapay membran üretiminde kullanılması konusunda adımlar atılmıştır (Hahl *et al.* 2017).

Sc3 hidrofobini, farelerle yapılan sarkoma ve melanoma kanser modellerinde güçlü bir anti-tümör etkiye sahiptir (Akanbi *et al.* 2013). Sc3 kullanımı toksik etki göstermeden bağışıklık cevabını uyarmış ve böylece hidrofobinlerin kemoterapi ve radyasyonla beraber adjuvan olarak faydalı olabildiği veya hidrofobik anti-kanser ilaçlarının formülüne eklenebildiği gösterilmiştir. Bununla birlikte, kanser hücrelerine spesifik hedefleme yapmak için genetik mühendisliğiyle hidrofobin içeren moleküller üretilebilir olduğu vurgulanmıştır (Wosten and Scholtmeijer 2015). Transferrin ve HFBI, HFBI, HFBIIV proteinleri kullanılarak üretilen füzyon ürünleriyle silikon nanopartikülleri kaplanarak *in vitro* olarak MDA-MB-231 hücre hattında etkinliği deneğinde etkili bir biçimde hücre içine Tf reseptör aracılığıyla yönlendirilerek hücrenin bu partikülü aldığı belirlenmiştir (Reuter *et al.* 2017).

1.2.2. Çift-faz Sistemlerde Saflaştırma için Hidrofobinler

Hidrofobinler rekombinant protein saflaştırmasında sulu çift-faz sistemlerde füzyon etiketi olarak kullanılabilirler. Bu yaklaşımla, selüloz endoglukanaz I (EGI) ve selüloz bağlanma bölgesi olan cellobinhidrolaz 1 ve 2 (CBHI-II) saflaştırılması için HFBI hidrofobini füzyon etiketi olarak kullanılmıştır (Linder *et al.* 2004). Diğer

1. GİRİŞ

yandan, hidrofobinlerin füzyon etiketi olarak kullanılmasıyla proteinbadileri oluşturarak rekombinant protein birikmesini artırdığı ve proteinbadiler hedeflenerek saflaştırma yapılabilirliği gösterilmiştir (Joensuu *et al.* 2010; Mustalahti *et al.* 2013).

1.2.3. Emülgatör ve Koruyucu Olarak Hidrofobinler

Hidrofobinlerin oldukça kararlı emülsiyerler oluşturma yeteneği, özellikle farmasötik uygulamalarda stabil preparatların hazırlanmasında önemlidir (Linder *et al.* 2005; Kirkland and Keyhani 2011). Emülgatör olarak yiyeceklerde, ilaç endüstrisinde ve temizlik malzemelerinde kullanılabilirler (Linder *et al.* 2005).

Diğer taraftan, hidrofobinler emülsiyon stabilize eden ajanlarla birleştirildiklerinde aylarca stabil kalabilen homojen karışımlar elde edilebilmiş, dahası köpük stabilizasyonunu artırmışlardır (Wosten and Scholtmeijer 2015). Örneğin; HFBII, hva proteinlerini diğer proteinlere göre daha iyi stabilize eder ve neredeyse 2,5 yıla kadar hiç kayıp olmadan köpükleri stabil tutabilmiştir (Cox *et al.* 2009; Blijdenstein *et al.* 2010).

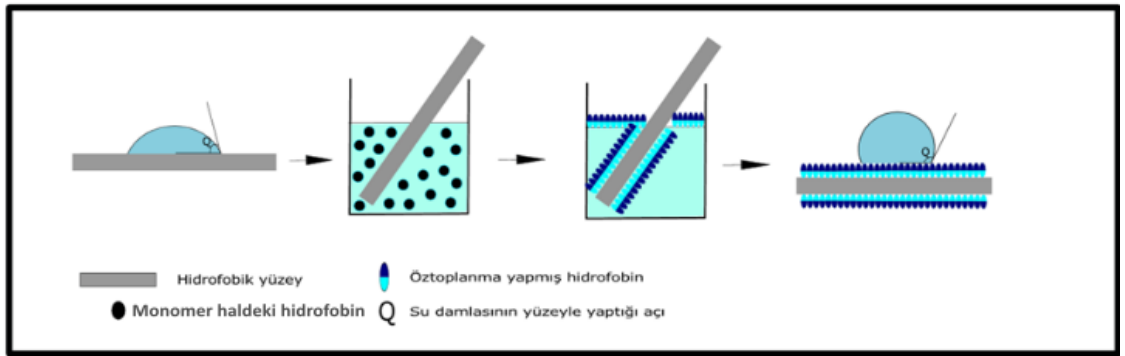
1.2.4. Yüzey Modifikasyonları

Hidrofobinler içerdikleri yapıyı stabilize eden disülfid bağları nedeniyle son derece kararlı yapıdadırlar ve bilinen en iyi yüzey aktif proteinlerdir (Cooper and Kennedy 2010). Saniyeler içinde öztoplanma yapabilen hidrofobinler suda çözünmemeye özellikleri ve amfipatik yapılarıyla hidrofilik yüzeyleri hidrofobik yapabilir, hidrofobik yüzeyleri ise hidrofilikleştirebilirler. Özellikle; sınıf I hidrofobinlerin suda çözünmemeleri, kaynayan SDS çözeltisine dirençleri ve TFA gibi güçlü çözücülerde çözünmeleri onları yüzey modifikasyonları için önemli adaylar yapar (Scholtmeijer *et al.* 2004). Yüzey aktif olmalarının sadece sahip oldukları aminoasit dizisinden gelmesi ve küçük proteinler olmaları hem genetik modifikasyonlarla istenilen özelliğin kolayca kazandırılabilmesine hem de yüzeyin nanometre düzeyinde değiştirilebilmesine olanak sağlar. Ayrıca sitotoksik olmadıkları için implant yüzeylerinde doku adezyonunu artıran ve aynı zamanda biyoyumlu implantlar elde edilebilmiştir (Janssen *et al.* 2004; Scholtmeijer *et al.* 2004).

1. GİRİŞ

Yukarıda bahsedilen özelliklerinden dolayı hidrofobin proteinleri yüzeye adsorbe olduktan sonra konformasyonel değişim göstermeye yatkın değildirlir ve yüzey uygulamalarında tercih sebebidirler. Bir substrata veya yüzeye proteinlerin adezyonunun sıcaklık, iyonik güç ve tampon bileşimiyle kontrol edilebileceği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Linder *et al.* 2005; Rabe *et al.* 2011). Ek olarak hidrofobinler, yüzey modifikasyonları (Janssen *et al.* 2002; Qin *et al.* 2007) ve protein immobilizasyonu sağlayan yüzey kaplamalar için önerilmiştir (Kisko *et al.* 2008).

90'lı yıllarda lotus bitkisinin 140° derecenin üzerinde temas açısına sahip su tutmayan hidrofobik yaprak yüzeylerinin keşfinden bu yana süper-hidrofobik yüzeylere odaklanılmaya başlanmıştır. Temas açısı 10° 'nin altında olan yüzeyler süper-hidrofilik ve 150° 'nin üzerinde olan yüzeyler süper-hidrofobik olarak kabul edilmiştir (Starov *et al.* 2007). Yüksek temas açısına sahip yüzeylerin hidrofobisitenin sonucu olarak yüzeye tutunamayan su damlacığının yer çekimi kuvveti ile akışı ve yüzeyde bulunan toz partiküllerinin de beraberinde giderilmesine neden olan bu olay kendi kendine temizleme olarak adlandırılmaktadır (Neinhuis and Barthlott 1997; Wagner *et al.* 2003). Hidrofobinlerin yüzey özelliklerini değiştirebilme yetenekleri sayesinde kirlenmeyen ve mikroorganizmaların tutunmasını önleyen hidrofobik yüzeyler elde edilmiştir (Hektor and Scholtmeijer 2005; Rieder *et al.* 2011). Bu özellikler yüzeyin ıslanabilirliğinin bir ölçütüdür ve yüzeye adsorbe olan hidrofobin miktarından ve tabaka kalınlığından etkilenmiştir (Gruner *et al.* 2012).



Şekil 1.4. Hidrofobinler hidrofilik yüzeylerde öztoplanma yaparak yüzey özelliğini hidrofobikleştirme yetisine sahiptirler. Yüzey hidrofobikliği şekilde gösterildiği gibi su damlasının yüzeye yaptığı temas açısına göre belirlenir.

İnce metal filmler oluşturmak için sol-jel gibi yüksek sıcaklık ve pahalı ekipmanlar gerektiren yöntemlere alternatif olarak sulu depolama yöntemi ile birlikte öztoplanma yapabilen moleküller önerilir. Hidrofobinler öztoplanma yapabilme ve sıvı-sıvı, katı-sıvı ara yüzlerinde tek katmanlı tabaka oluşturabilme özelliklerinden dolayı ince film oluşturmada önemli adaydırlar (Şekil 1.4). DewA hidrofobiniyle yapılan silikon kaplama değerlendirildiğinde 90°C ye kadar dayanıklı olduğu ve suyun değme açısının kaplama sonrasında 0°'dan 67°'ye yükseldiği belirlenmiştir (Santhiya *et al.* 2010). Bunun dışında, Vmh2 ve Pac3 hidrofobinleri kullanılarak yapılan kaplamaların *Staphylococcus epidermis* türünün farklı suşlarının yüzeye adezyonunu ve biyofilm oluşumunu engellediği tespit edilmiştir (Artini *et al.* 2017).

1.2.4.1. Protein İmmobilizasyonu

Hidrofobinler geleneksel yüzey modifikasyonları için kovalent olmayan bir alternatif sunmalarıyla proteinlerin yüzeylere adsorbe olmalarını sağlamada kullanılabilirler (Zhang *et al.* 2011). MALDI plakaların Vmh2 hidrofobiniyle kaplayarak denatüre edicilerin ve tuzların varlığında protein karışımlarının daha etkili bağlanmasıyla sonuçlanması (Longobardi *et al.* 2014) örnek olarak verilebilir. Ayrıca, biyosensörlerde protein immobilizasyonu PET üzerine HFB4, HFB7 (*Trichoderma spp.*) ve RolA (*A. oryzae*) kaplamalarına kütinaz enziminin adsorbasyonu tanımlanmıştır (Takahashi *et al.* 2005; Espino-Rammer *et al.* 2013). Benzer şekilde, Vmh2 hidrofobini ile pestisit tespit edebilmek için GST enziminin yüzeye immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir (Piscitelli *et al.* 2017). Polistiren çoklu kuyulu-plaklar hidrofobinlerle kaplanarak üretilen ELISA sistemlerinde maya feromonlarının az miktarlarını dahi saptayabilir biyosensörler elde edilmiştir (Gross *et al.* 2011). Enzim ve proteinlerin yanı sıra, quantum dots, grafen oksit ve kadmiyum tellür gibi nanopartiküllerin biyosensörlerde kullanılmak üzere yüzeye sabitlenmesi Vmh2 kaplama ile başarılı olmuştur (Gravagnuolo *et al.* 2015).

1.2.4.2. Yapay Materyal Üretimi

Kateterler gibi biomedikal ürünler için yüzey sürtünmelerini azaltmak doku hasarını azaltmak anlamındadır. Yaygın olarak kullanılan gliserin ve silikon yağı gibi

lübrikant moleküllerin yüzeylere adezyonları zayıftır. Alternatif olarak, hidrofobin kaplanan materyallerin yüzey sürtünmesini %50-80 arasında azalttığı görülmüştür (Misra *et al.* 2006). Benzer şekilde, biyouyumlulukları, immün sistemini uyarmamaları ve patojen adezyonunu bir dereceye kadar engelleyebilmeleri nedeniyle doku mühendisliğinde de kullanılabilirliği gösterilmiştir (Hou *et al.* 2008; Li *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2011). Başka bir çalışmada karbon nanopartikülleri, grafen, MoS₂ ve WS₂ gibi metallerle iki boyutlu biyouyumlu nanomateryal üretiminde hidrofobinlerden yararlanılmıştır (Kaur *et al.* 2017). Bu materyallerden üretilen nano-biyo yapının oldukça kararlı ve yüzey potansiyelinin çeşitli alanlarda kullanımı için geliştirilebilir olduğu bildirilmiştir. Dental uygulamalara gelince, hidroksiapetitin DewA-4,5 hidrofobinleriyle birlikte çekirdekleşme yaparak dokuda iyileşme sağladığı ortaya konulmuştur (Melcher *et al.* 2016).

1.3. Tez Çalışmasının Önemi

Yakın zamana kadar hidrofobinlerle ilgili birçok uygulama patentlenmiştir, ancak bunların hiç biri henüz endüstriye uygulanamamıştır (Khalesi *et al.* 2015). Bu durum düşük üretim verimi ile ilişkilendirilmektedir. Laboratuvar ölçeğinde hidrofobin üretimi başarılı olsa da, endüstriyel üretim için gerekli verim elde edilememiştir (Khalesi *et al.* 2015). Bu konuda birçok araştırmacının ortak çözüm önerisi, yeni fungus türlerinde hidrofobinlerin taranması, izolasyonu ve karakterizasyonunun yapılmasıdır. Araştırmacılar ancak bu yolla üretim verimi artırmak için etkili bir stratejinin ortaya konulabileceğini vurgulamışlardır (Ying ve Feng 2004; Viguera *et al.* 2008; Kulkarni *et al.* 2017).

Yukarıda belirtilen nedenlerle, özellikle süperhidrofobik yüzeylerin oluşturulmasında kullanılmak üzere yeni hidrofobin üretici doğal fungusların keşfine ihtiyaç vardır. Interpro veritabanında (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) yapılan 14.12.2018 tarihli taramaya göre ascomycetes'den 913 ve basidiomycetes'den 1642 olmak üzere toplam 2555 ayrı hidrofobin bulunmaktadır. Kulkarni *et al.* 2017 tarafından bu yılın ortalarında yayımlanan bir çalışmada bu sayı 1678 olarak verilmiştir. Son bir yılda veritabanına yapılan protein girişindeki yaklaşık %50'lik artış araştırmacıların son

1. GİRİŞ

yıllarda bu konu üzerine yoğun bir şekilde odaklandıklarını ve bu konunun bilim dünyasında oldukça popüler olduğunu göstermektedir.

Bu tez çalışmasında, kültür ortamında süperhidrofobik özellik gösteren *Cladosporium* izolatlarının hidrofobisitesinden sorumlu olan hidrofobin proteinlerinin belirlenmesi, saflaştırılması ve hidrofobin üretici *Cladosporium* türlerinin moleküler karakterizasyonunun gerçekleştirilmesi ile yeni hidrofobin üretici türlerin ve yeni hidrofobin proteinlerinin literatüre kazandırılması amaçlanmıştır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Joseph G. H. Wessels ve arkadaşları (1991) Sc3 hidrofobin proteinini *S. commune* miselyumlarından ekstrakte ederek ilk defa tanımlamışlardır. Sc3 proteinini diğer proteinlerden SDS çözeltisinde 100 °C'de çözünebilirliğiyle ekstrakte edilebilmiştir (Wessel *et al.* 1991).

Onno M. H. de Vries ve arkadaşları (1993) *S. commune* türüne ait Sc3 ve Sc4 olmak üzere iki farklı hidrofobin proteini ekstrakte ettiler. Aynı şekilde, *Pleurotus osteratus*, *Coprinus cinereus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Agaricus bisporus*, *Aspergillus nidulans*, *Penicillium chrysogenum* ve *Mucor mucedo* türlerinden aynı yöntemle hidrofobinler ekstrakte ettiler. Araştırmacılar, hidrofobinlerin TFA ile ekstraksiyonu sonucunda monomerlerine tamamen ayrılabilirdiğini ortaya koymuşlardır (de Vries *et al.* 1993).

Nakari Setala ve arkadaşları tarafından (1995) *Trichoderma reesei*'den ekstrakte edilen HFBI proteini Edman degradasyonu ile 75 aminoasit içerdiğini ve moleküler ağırlığını 7,5 kDa olarak tanımlanmış; *Trichoderma reesei*'de hfbI geninin glikoz içeren ortamda yoğun olarak ifade edildiği açığa çıkarılmıştır (Setala *et al.* 1995).

Pietro Spanu (1996) domates patojeni olan *Cladosporium fulvum* türünden HCF-1 hidrofobin proteinini SDS-PAGE ile moleküler ağırlığı 10 kDa ve Edman degradasyonu ile 83 aminoasitlik bir protein olarak tanımlamıştır (Spanu *et al.* 1996).

Nakari Setala ve arkadaşları (1997), HFBII hidrofobin proteinini *Trichoderma reesei* sporlarından ekstraksiyonu ve karakterizasyonu için yaptıkları çalışmalarda HFBII proteininin büyüklüğü yaklaşık olarak 8 kDa olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışmada, %20 asetonitril + %0.1 TFA ve %60'lık etanol çözeltilerinin her ikisi kullanılarak spordan hidrofobin ekstrakte edilerek çözeltilerin etkinlikleri değerlendirilmiştir. Ayrıca elde edilen hidrofobinin aminoasit dizisi Edman degradasyonu yöntemiyle belirlenmiş ve daha önce karakterize edilmiş HFBI hidrofobini ile dizileri karşılaştırılmıştır (Setala *et al.* 1997).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Maria M. Penas ve arkadaşları (1998) tarafından *Pleurotus ostreatus* türünden sporokarp yapısına spesifik olan Fbh1 hidrofobini tanımlanmıştır. Bu hidrofobinin mRNA dizisi elde edilerek aminoasit sayısı yaklaşık 113 olarak tahmin edilmiş, moleküler ağırlığı 12 kDa olarak belirlenmiştir (Penas *et al.* 1998).

G. C. Sefers ve arkadaşları tarafından (1999) *C. fulvum*'dan HCF-1'e ek olarak beş farklı hidrofobin daha tanımlanmıştır. Bu beş hidrofobin proteinin fungus gelişiminin farklı aşamalarında üretildiklerini saptamış, ayrıca hem nitrojen hem de karbon yokluğuna bağlı hidrofobinlerin üretim miktarlarını belirlemişlerdir (Sefers *et al.* 1999).

Onno M. H. de Vries ve arkadaşları (1999) tarafından sıvı kültürde gelişimi sağlanan *Claviceps fusiformis*'ten CFTH1'i, sınıf II hidrofobini, karakterize edilmiş ve bu hidrofobin proteini ile teflon yüzey kaplandıktan sonra yüzey hidrofobitesi değerlendirilmiştir. SDS-PAGE'de 55 kDa civarında görüntülenmesine rağmen, MALDI-TOF yöntemiyle CFTH1 hidrofobin proteininin moleküler ağırlığı 36,5 kDa olduğu belirlenmiş ve bu farkın post-translasyonel modifikasyonlardan kaynaklandığı belirtilmiştir. Hidrofobik teflon yüzeyinin kaplanması sonrasında ise hidrofilik özellik kazandığı suyun değme açısı ölçümüyle gösterilmiştir (de Vries *et al.* 1999).

Peter S. Nielsen ve arkadaşları tarafından (2001) *C. fulvum*'dan yeni bir sınıf II hidrofobin olan HCf-6 tanımlanmıştır. Tanımlama için *S. crevisiae*'da üretilmesi sağlanmış ve sonucunda 184 aminoasit içerdiği belirlenmiş ve diğer bir *C. fulvum* hidrofobiniyle, HCf-5, karşılaştırması yapılmıştır (Nielsen *et al.* 2001).

Miroslav Sulc ve diğerleri tarafından (2009), *Aspergillus* sporlarından protein profili oluşturularak tür tayini yapılması amacıyla bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu amaç için, %40 asetonitril + %0.1 TFA çözeltisi ile birlikte farklı solüsyonlarla katı kültürden elde edilen spordan protein ekstraksiyonları yapılmıştır. %12'lik SDS-PAGE ile *A. fumigatus* türünden diğer proteinlerle birlikte 14 kDa civarında hidrofobin tanımlanmıştır. Aynı şekilde, kullandıkları diğer türlerin sporları için protein profili ortaya çıkarılmıştır (Sulc *et al.* 2009).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Katerina Zelena ve arkadaşlarının (2013) çalışmasında öncelikle katı kültürdeki *Paecilomyces farinosus*'dan elde edilen liyofilize miselyumlardan hidrofobin ekstraksiyonu kaynayan SDS çözeltisi ile gerçekleştirilmiştir. PfaH2 sınıf I hidrofobini 13,69 kDa büyüklüğündedir. Diğer yandan, pfaH2 geninin dizilemesi yapılarak PfaH2'nin aminoasit dizisi 134 aminoasit olarak ortaya konmuştur. Son olarak, PfaH1 ve ekstrakte edilen PfaH2'nin teflon ve cam yüzey kaplamalarındaki aktiviteleri karşılaştırılması sonucu her iki hidrofobinin de teflon ve cam yüzeyde kaplama oluşturabildiği ve suyun değme açısında artışa neden olduğu belirlenmiştir (Zelena *et al.* 2013).

Michelina Ruocco ve arkadaşları (2015) tarafından yapılan çalışmada *Trichoderma longibachiatum* MK1 suşundan Hyt101 geniyle ilişkili HYTLO1 hidrofobini karakterize edilmiştir. Bu hidrofobin 71 aminoasite sahiptir, moleküler ağırlığı 7, 218 kDa olarak belirlenmiştir. Hyt101 geni navkavt edilerek antagonist özelliğinde önemli bir azalma görülmüştür ve HYTLO1 hidrofobininin *T. longibachiatum* ile bitki kökleri arasındaki mutualist yaşamda rol oynadığı ortaya çıkarılmıştır (Ruocco *et al.* 2015).

Agens Przulucka ve arkadaşlarının (2017) yaptığı çalışmada yeni bir hidrofobin (HFB7) aynı soydan gelen *Trichoderma virens* ve *T. hazarium* türlerinden karakterize edilmiştir. Fonksiyonel hidrofobinin 76 aminoasit içerdiği ve teorik moleküler ağırlığının 7,4837 kDa olduğu belirlenmiştir. HFB7'nin bu türün oksidatif stres faktörlerine karşı savunmasında görev aldığı ve nemli ortamlarda büyümesine yardımcı olduğu ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca, *T.reesei*'de üretilen HFB2 proteiniyle primer dizide önemli farklılıklar taşımalarına rağmen hidrofobik kısımların korunduğu da gösterilmiştir (Przulucka *et al.* 2017).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. MATERYAL

3.1.1. Fungus Türleri

Kullanılan tüm fungus türleri Erzurum Teknik Üniversitesi fungus koleksiyonundan temin edilmiştir.

3.1.2. Kitler

Plazmid izolasyon kiti Promega firmasından ve Jel Ekstraksiyon Kiti QIAGEN firmasından temin edilmiştir.

3.1.3. Kimyasallar

Kullanılan bütün kimyasallar Merck, Sigma, BioLab, HiMedia ve Honeywell firmalarından temin edilmiştir.

3.1.4. Cihazlar ve Sarf Malzeme

Sarf malzemeler Isolab, Termo Fisher, Merck ve Axygen firmalarından temin edilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan cihazlar, cihazların marka ve modelleri

Cihaz	Marka ve Model
Liyofilizasyon	CHRIST-Alpha 1-2 LD plus
PZR Cihazı	Sensoquest-Labcycler
Santrifüj	HETTICH, Zentrifugen Universal 320R
Mini-Santrifüj	Daihan-Wisd,WiseSpin

Çizelge 3.1. (Devamı) Kullanılan cihazlar, cihazların marka ve modelleri

Otoklav	Tomy SX-500E
Spektrofotometre	ThermoScientific, Multiskan GO
İnkübatör Çalkalayıcı	Zhicheng, zhwy-2102c
Vorteks	Daihan-Wisd ,Wisemix VM-10
İnkübatör	Memmert, IN110
Hassas Terazı	Shimadzu, ATX224
Tartı	Desis-Model NHB
Sonikatör	Vevor
Elektroforez Sistemleri	BioRad, Mini ReadySub-Cell™
Jel Görüntüleme Cihazı	BioRad, ChemiDoc™ MP
Stereo Mikroskop	Leica, ES2
Derin Dondurucu(-20°)	Templow, J.P. Selecta
Saf Su Cihazı	Millipore Direct- Q-3 UV

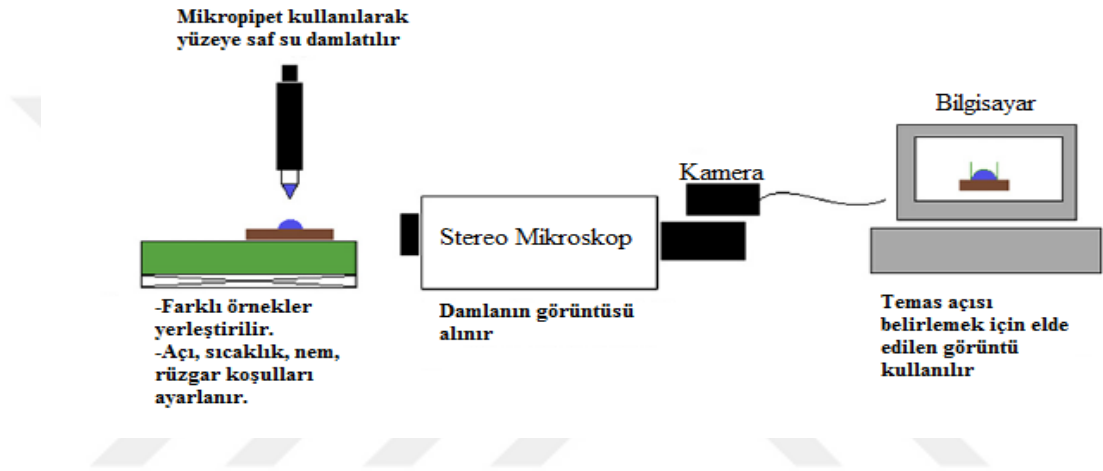
3.2. YÖNTEM

3.2.1. Suyun Değme Açısına Göre Fungus Seçimi

Kültür koleksiyonundan alınan 72 farklı fungus türü PDA besiyerine ekilerek 7 gün boyunca. Şekil 3.1'deki sistem kullanılarak 10 µl ve 6 µl'lik saf su damlaları 1x2 cm boyutlarında kesilen fungus yüzeylerine damlatıldı. Ardından damlaların mikroskop fotoğrafları çekilerek bilgisayara aktarıldı. İmageJ programı, çekilen fotoğraflardaki su damlalarının değme açılarını hesaplamak için kullanıldı (Chau et al, 2009). Hesaplanan değme açıları Çizelge 3.2'de belirtilen skalaya göre değerlendirilerek kullanılacak fungusların seçimi yapıldı. Bu derecelendirme temel alınarak kullanılacak fungus seçimi yapıldı.

Çizelge 3.2. Değme açılarına ait skala

Suyun Değme Açısı	
145° – 150°	*
150° – 155°	**
155° – 160°	***

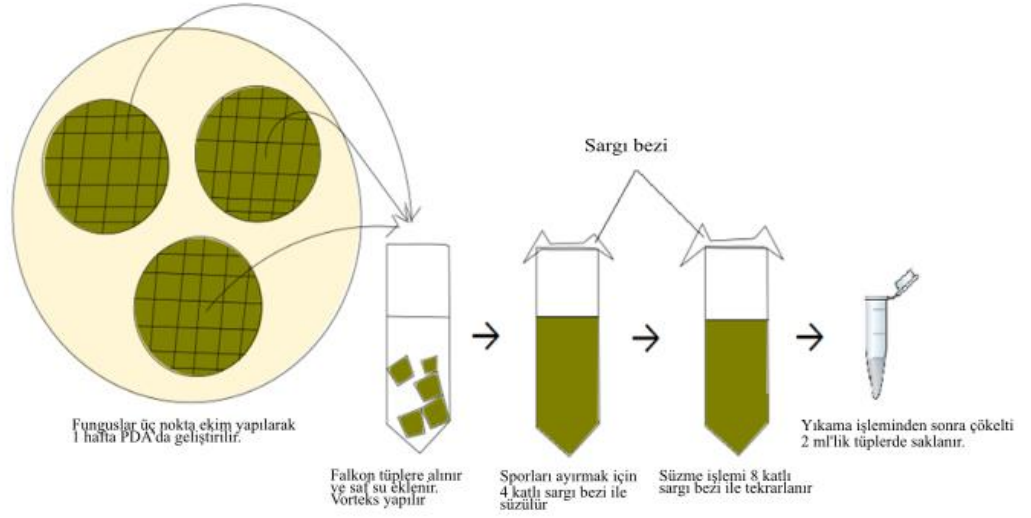


Şekil 3.1. Damlaların değme açılarını belirlemek için kullanılan modifiye edilmiş mikroskop sisteminin şematik gösterimi (Chau et al, 2009)

3.2.2. Hidrofobin İzolasyonu ve Karakterizasyonu

3.2.2.1. Spor İzolasyonu

Üç nokta ekim yapılarak 1 hafta geliştirilen katı kültürlerden fungus kolonileri parçalara ayrılarak 50 ml'lik falkon tüplere konuldu. Bu falkonlara otoklavlı saf su eklenerek 10'ar dakika vortekslendi. Sporları ayırmak için vorteks yapılmış tüpler 4 katlı steril sargı bezi yardımıyla yeni falkonlara süzülde ve bu işlem 8 katlı steril sargı bezi ile tekrarlandı. Süzölen sporlara 2 kez saf su ile yıkama yapıldı. Son yıkama 1,5 ml'lik tüplere dağıtılarak yapıldı ve oluşarı çökelti bu tüplerde saklandı. Yıkamış olan sporlar daha sonra kullanılmak üzere -20 °C'ye kaldırıldı. Yapılan spor izolasyonu Şekil 3.2'de özetlenmiştir.



Şekil 3.2. Spor izolasyonunun şematik gösterimi

3.2.2.2. Spordan Hidrofobin İzolasyonu

İzole edilen sporlar $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'den çıkarılarak liyofilize edildi. Liyofilize spor miktarının belirlenmesi için 1,5 ml'lik boş tüpleri ve liyofilizasyondan sonra kuru sporları içeren tüpler hassas terazide tartıldı. 10 mg liyofilize edilmiş spor üzerine 100 μl asetonitril+TFA (%40 asetonitril, %0,1 TFA) çözeltisi ve %60'lık etanol çözeltisi olacak şekilde, farklı tüplere bu çözeltiler eklendi ve tüpler vortekslendi. Daha sonra, çözelti içindeki sporlar sonikatör su banyosunda, maksimum güçte 15'er dakika bekletildi. Sonikasyondan sonra, tüpler santrifüjlendi, supernatantlar yeni tüplere alındı (Sulc *et al.* 2009).

3.2.2.3. Bradford Assay

İlk olarak 5X Bradford boyası hazırlamak için 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 50 ml etanol ve %85'lik fosforik asit içinde çözülüp saf su ile 250 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 0,22 μm 'lik filtreden geçirildi ve saf su ile 1X'e seyreltildi.

Standart grafik oluşturmak için BSA kullanıldı. Bunun için 1 ml'de 200 mg BSA çözüldü ve 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 'ye kadar seri seyreltme yapıldı. BSA çözeltilerinin her birinden 40 μl olacak şekilde 96 kuyulu plakalara üçer tekrarlı konuldu ve üzerine 160 μl hazırlanan

boyadan eklendi. 595 nm'de alınan ölçümler ve BSA çözelti konsantrasyonlarıyla standart grafik oluşturuldu.

Proteinler, aynı şekilde, 96 kuyulu plaka'ya boyayla birlikte yüklenerek 595 nm'de absorbans değerleri ölçüldü ve standart grafiğe göre konsantrasyonları belirlendi.

3.2.2.4. SDS-PAGE

İzole edilen hidrofobin proteinleri % 15'lik SDS-PAGE jeline yüklendi. Jel Çizelge 3.3'de belirtilen kimyasallar ve miktarlarına göre hazırlandı ve tabloda verilen sırayla eklendi. Elde edilen karışım donması için sisteme yüklendi ve havayla temasını kesmek için propanol jelin havayla temas eden üst kısmına pipet yardımıyla döküldü.

Çizelge 3.3. SDS-PAGE jeli için gereken kimyasallar ve kullanılan miktarlar

Ayrırma Jeli	
Kimyasal	Miktar
dH ₂ O	2.85 ml
Tris(pH:8.8, 2M)	1.95 ml
Akrilamide(%30)	5 ml
SDS(%10)	100 µl
APS(%10)	100 µl
TEMED	10 µl
Yükleme Jeli	
dH ₂ O	3.6 ml
Tris(pH:6.8, 1M)	625 µl
Akrilamide(%30)	670 µl
SDS(%10)	50 µl
APS(%10)	50 µl
TEMED	5µl

Ayırma jeli katılaştıktan sonra propanol uzaklaştırıldı ve kurutuldu. Örnekleri yükleyeceğimiz kuyucukların oluşturulması için yükleme jeli Çizelge 3.4'te verilen kimyasallar ve ekleme sırasına göre hazırlandı.

Protein örnekleri jele yüklenmeden hemen öncesinde toplamda 20 µl olacak şekilde 5 µl yükleme boyası 15 µl protein örneğiyle karıştırıldı. Daha sonra 5 dk 95 °C sıcaklıkta bekletildi. Protein miktarını belirleyebilmek için protein örnekleriyle birlikte ayrıca 5 µl marker ilk jel kuyucuğuna yüklendi. Elektroforez sistemi 150 dk 80 voltta yürütüldü.

Jelde protein görüntülemek amacıyla gümüş boyama yapıldı. İlk olarak %50 (v/v) etanol, %12 (v/v) asetik asit çözeltisi ile 30 dk boyunca fiksasyon gerçekleştirildi. Fiksasyondan sonra, %30 etanol ve 2,4 g sodyum-tiyosülfat içeren ve pH'sı 6 olan redüksiyon çözeltisi ile 30 dk muamele edildi. Daha sonra, jel üç defa saf su ile 5'er dk yıkandı. Boyama için, %0,1 (w/v) gümüş nitrat, ve %0,01 (v/v) formaldehit oranlarında hazırlanan boyama çözeltisi hazırlandı ve 20 dk çözelti içinde muamele edildi. Boyama bittikten sonra, jel birinci %1,4 (w/v) sodyum karbonat ve %0,74 (v/v) formaldehit içeren yıkama solüsyonuna alındı ve jelde protein bantları görüntülenene kadar çalkalandı. İkinci yıkama için %5 (v/v) asetik asit ve %0,4 gliserin ile hazırlanan çözelti ile muamele edildi ve proteinler jelde görüntülendi.

3.2.3. Seçilen Fungus İzolatlarının Türlerinin Tanınması

3.2.3.1. Klasik Yöntemlerle Karakterizasyonu

Değme açıları belirlendikten sonra, koloni oluşturma özellikleri ve stereo mikroskopu kullanılarak morfolojik özelliklerine ve son olarak ışık mikroskopu yardımıyla konidi, spor ve hif yapılarına göre bir hafta PDA'da geliştirilmiş funguslar cinsleri belirlenmek üzere incelendiler.

3.2.3.2. Moleküler Yöntemlerle karakterizasyon

3.2.3.2.1. DNA İzolasyonu

Bir hafta 25 °C’de, PDA’da büyütülen izolatlarının miselyumları bisturi yardımıyla kazınarak alev ortamında 2 ml’lik tüplere konuldu ve üzerlerine 1 ml liziz tamponu eklendi. Tüplerin içine 3 mm çapında metal boncuk atıldıktan sonra tüpler homojenizatör içinde 30 dk, son hızda hücrelerin parçalanması sağlandı. Sonrasında, tüpler 12.000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi, üst sıvı yeni tüpe alındı. Daha sonra 2 µl RNAz eklenerek 37 °C’de 15 dk bekletildi. Tüpteki miktar kadar fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) tüplerin içine eklendi ve tekrar aynı koşullarda santrifüj yapıldı. En üstteki sıvı yeni tüpe alındı. Alınan sıvıyla eşit hacimde soğuk %100 etanol eklendikten sonra -20 °C’de 30 dk bekletildi. Bekleme süresinden sonra, -20 °C’deki tüpler alınarak aynı koşullarda santrifüj edildi. Santrifüjden sonra, üst sıvı döküldü ve %70’lik soğuk etanol ile 3 kez yıkama yapıldı. Son olarak, altta kalan çökelti 1X-TE tampon içinde çözülerek konsantrasyon belirlendi. En son aşamada, izolasyon ürünü %1’lik agaroz jelde yürütülerek DNA’nın büyüklüğü belirlendi ve varlığı gösterildi.

3.2.3.2.2. ITS ve D1-D2 rDNA Bölgelerinin Çoğaltılması

Seçilen fungus türlerinin tanımlaması için 18S rDNA’nın korunmuş ITS bölgeleri çoğaltıldı. Bu işlem Çizelge 3.4’te verilen malzeme ve miktarlarına ve Çizelge 3.5’teki PZR koşullarına göre yapıldı. PZR için ITS1 (5’-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3’) ve ITS4 (5’-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3’) primerleri kullanıldı (White, et al, 1990). Diğer yandan, D1-D2 rDNA bölgesinin çoğaltılması için NL1 (5’-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3’) ve NL4 (5’-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3’) primerleri kullanıldı (Petti 2008). Her iki PZR için aynı malzeme miktarları kullanıldı (Çizelge 3.4) ve aynı koşullar uygulandı (Çizelge 3.5).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Çizelge 3.4. PZR malzemeleri ve miktarları

Malzeme	Miktar
dH ₂ O	37,2 µl
Tampon Çözelti	5 µl
MgCl ₂	3 µl
dNTP	0,7 µl
F(primer)	0,8 µl
R(primer)	0,8 µl
DNA	2 µl
Taq polymerase	0,5 µl

Çizelge 3.5. PZR koşulları (35 döngü)

Sıcaklık (°C)	Süre
95	2 dk
94	45 sn
55	45 sn
72	1 dk
72	10 dk

3.2.3.2.3. Jelden PZR Ürün Ekstraksiyonu

%1'lik agaroz jelde istenmeyen bağlanmaların görüldüğü D1-D2 rDNA bölgeleri jelden QIAGEN adlı firmadan temin edilen jel ekstraksiyon kiti ile gerçekleştirildi.

3.2.3.2.4. Ligasyon

PZR sonrasında jelde tek bant olarak görüntülenen ürünler için ligasyon yapıldı. Ligasyon pGEM vektörü ve T4 ligaz enzimi kullanılarak gerçekleştirildi. Çizelge 3.6'e göre hazırlanan ligasyon karışımı 4 °C'de bir gece (16 saat) inkübe edildi.

Çizelge 3.6. Ligasyon için malzeme miktarları

Malzeme	Miktar
pGEM	1 µl
PZR örneği	3 µl
Ligasyon tamponu	5 µl
T4 ligaz	1 µl

3.2.3.2.5. Transformasyon

Her biri 100 µl kompetent hücre, *E.coli* JM101, içeren tüp -80 °C'den alındı ve buzda çözünmeleri beklendi. Bu hücrelerin üzerine ligasyon sonucu oluşan ürünlerden 10 µl eklenerek 30 dk buzda bekletildi. Daha önceden hazırlanmış 42 °C'lik su banyosunda hücreler 45 saniye bekletildi, ardından hemen buza alındı. Buzda 5 dk bekletilen hücrelerin üzerine 250 µl LB besi yeri eklendi ve 37 °C'de 1 saat inkübasyon için çalkalayıcıya konuldu. Hücreler çalkalayıcıdayken, her bir petri için 40 µl Xgal ve 7 µl IPTP ayrı bir ependorfta karıştırıldı. Bu karışım ampisilin içeren LB agarların üzerlerine yayıldı, 15 dk yüzey tarafından emilmeleri için beklendi. 1 saat sonunda

çalkalayıcıdaki hücreler alınarak her birinden 100 µl, 50 µl, 25 µl alınarak farklı petrilere yayıldılar. 16 saat için 37 °C’de inkübasyona bırakıldılar. İnkübasyondan sonra, beyaz olan kolonilerden seçim yapılarak ampisilin içeren LB sıvı besiyerine ekilerek tekrar 16 saat 37 °C’de inkübe edildi.

3.2.3.2.6. Plazmid İzolasyonu

Plazmid izolasyonu Promega firmasına ait kitle, kit için önerilen izolasyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Plazmid konsantrasyonları belirlendi. Daha sonra, T7 (5’-TAATACGACTCACTATAGGG-3’) ve SP6 (5’-ATTTAGGTGACACTATAG-3’) primerleri kullanılarak ve 3.2.3.3’de belirtilen protokole göre tekrar PZR yapıldı.

3.2.3.2.7. Dizileme

Seçilen fungus türleri için her türe ait ITS rDNA bölgelerini içeren plazmidler ve agaroz jelden ekstrakte edilen D1-D2 rDNA örnekleri Oligomer adlı firmaya gönderilerek dizileme hizmeti alındı. Dizi sonuçları elde edildikten sonra, BioEdit programında değerlendirilerek ITS ve D1-D2 rDNA dizileri belirlendi. Belirlenen diziler BLASTIN 2.8.1+ programı (Zhang *et al.* 2000) kullanılarak GenBank’ta bulunan dizilerle karşılaştırıldı.

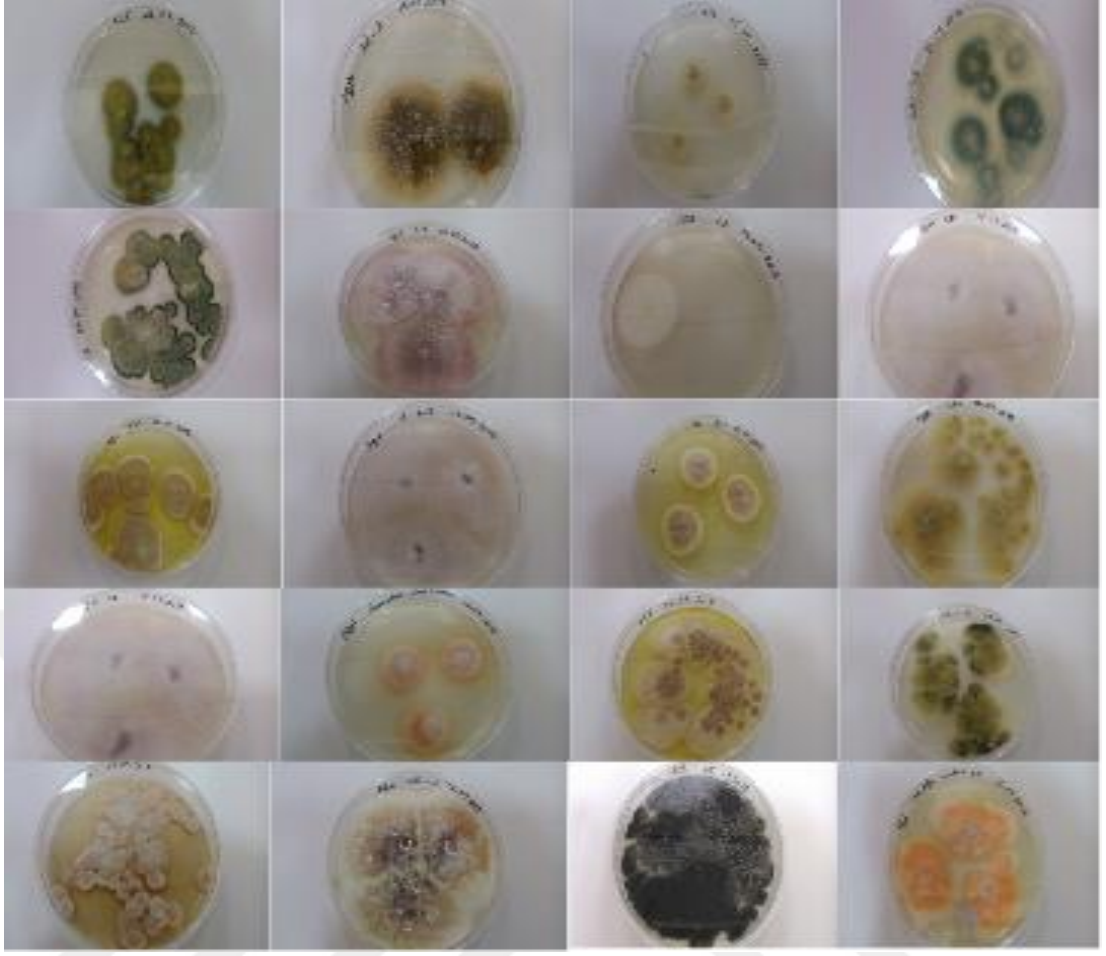
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Suyun Değme Açısına Göre Fungusların Ön Seçimi

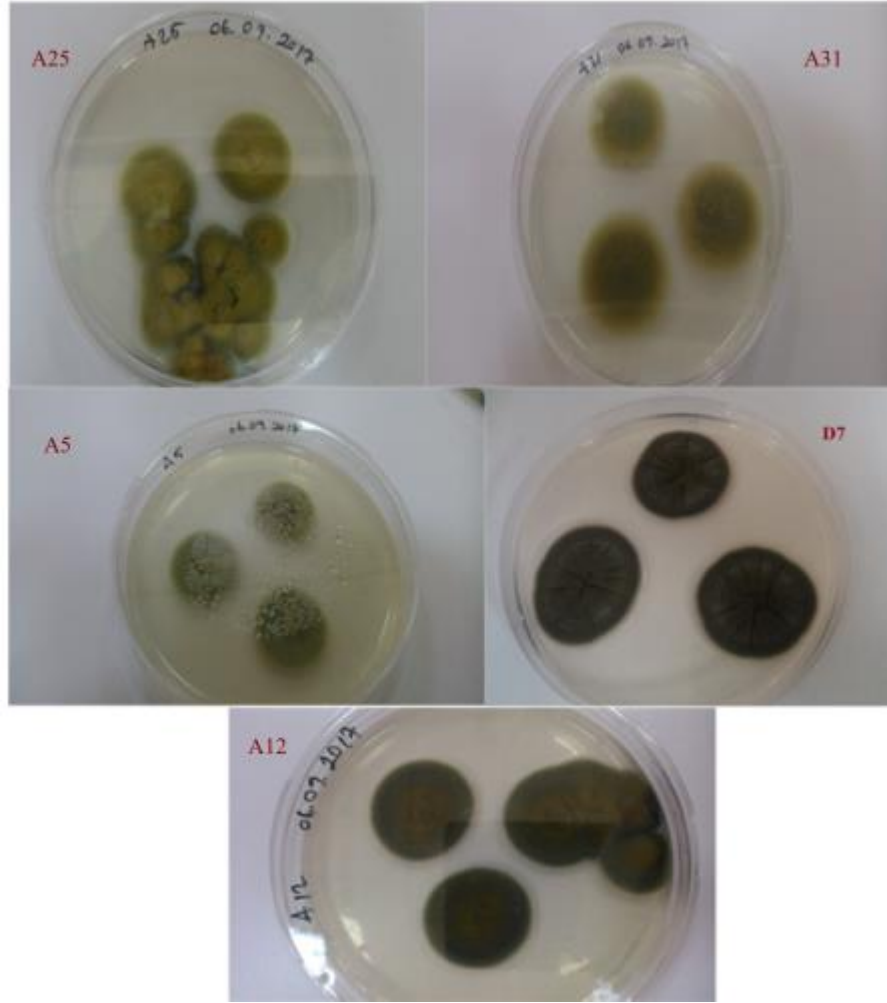
Topraktan izole edilmiş olan ve Erzurum Teknik Üniversitesi fungus koleksiyonundan temin edilen farklı cinslere ait 72 farklı fungus türü PDA besi yerine ekildi ve 1 hafta süreyle 28 °C’de inkübe edildiler (Şekil 4.1). PDA agarda 1 hafta geliştirilen funguslardan parçalar kesilerek Şekil 1.1’de gösterilen düzeneğe yerleştirildiler ve üzerlerine hem 6 µl hem de 10 µl saf su damlatılarak yüzeydeki su damlaları fotoğraflandılar.



Şekil 4.1. Katı kültürde 1 hafta geliştirilen fungus türlerinden bazıları



Şekil 4.1. (Devamı) Katı kiltirde 1 hafta geliştirilen fungus turlerinden bazıları



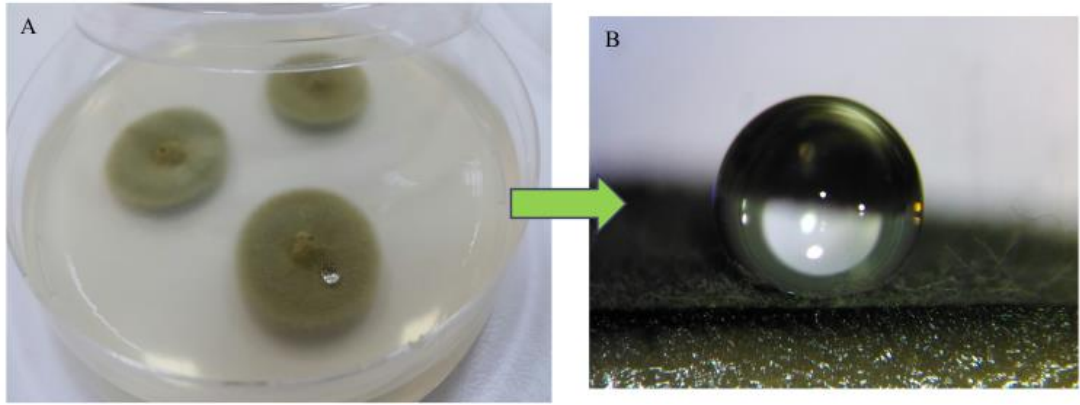
Şekil 4.2. En yüksek değme açılarının ölçüldüğü izolatların (A5, A12, A25, A31, D7) bir hafta geliştirilmiş görüntüleri

Elde edilen fotoğraflar ImageJ programında DropSnake eklentisi yardımıyla değme açıları ölçüldü (Çizelge 4.1, Şekil 4.4). En büyük değme açısına sahip fungus yüzeyinin hidrofobitesinin en yüksek olduğu (Starov et al. 2007) kabul edilerek seçim gerçekleştirildi. Çizelge 4.1'e göre, en yüksek değme açısı elde edilen fungusların *Cladosporium*, *Aspergillus* ve *Penisilyum* cinslerine ait olduğu belirlendi. Çizelge 3.2 'de gösterilen skalaya göresuyun değme açıları temel alınarak yapılan seçimde, *Cladosporium* cinsine ait 140°-160° arasında farklı derecelere sahip beş tür (A5, A12, A25, A31, D7) tespit edildi (Şekil 4.2, 4.4). Yapılan seçimde en büyük değme açısına sahip fungus yüzeyinin hidrofobik özelliği en yüksek yüzey olduğu (Starov et al. 2007) söylendi. En yüksek değme açısı sol 154.916° ve sağ 160.206° ile A5 kodlu izolatın (Şekil 4.3) ve sol 155.631° ve sağ 157.142° açılarıyla ikinci sırada ikinci sırada ise A12 kodlu izolatın sahip olduğu belirlendi. Sağ ve sol açılarının farklı olmalarının nedeni ise fungus yüzeylerinin homojen olmamalarına bağlandı. Farklı miktarda su damlalarının

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

yüzeyle damlatılması ile damla büyüklüğünün etkisi değerlendirildi. Bu değerlendirme sonucunda ölçülen değerlere etkisinin olmadığı belirlendi.

Elde edilen en yüksek değme açıların *Cladosporium* cinsine ait olması, araştırmacılar tarafından bu cinsine ait birçok türün bitki patojeni olmasına bağlandı; *Cladosporium* türlerinin yaprak yüzeyleri gibi hidrofobik yüzeylerle etkileşimlerinin sağlanabilmesi için hidrofobik özellikte olmaları (Wang *et al.* 2010 ve Zhang *et al.* 2011) gerekmektedir. Diğer yandan, Henry Wai Chau ve arkadaşlarının (2009) yaptığı benzer bir çalışmada *C. cladosporioides* ve *C. minourae* türlerini de içeren fungus yüzeylerinin hidrofobisitelelerini değerlendirmek amacıyla 10 µl saf su damlası ile suyun değme açıları belirlenmiştir. Bu makaleye göre en yüksek hidrofobisiteye sahip olan türler *Cladosporium* cinsine aittir ve *C. cladosporioides* ve *C. minourae* için elde edilen değme açıları her iki tür için de aynı ve 142°'dir. Bu tez çalışmasında elde edilen A25 izolatu ile yakın değme açısına sahiptir.



Şekil 4.3. A5 izolatu üzerine damlatılmış 10 µl saf su ile birlikte görüntüsü. A→Petride bulunan fungus yüzeyindeki su damlası, B→Fungus kesiti üzerinde fotoğraflanan su damlası

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

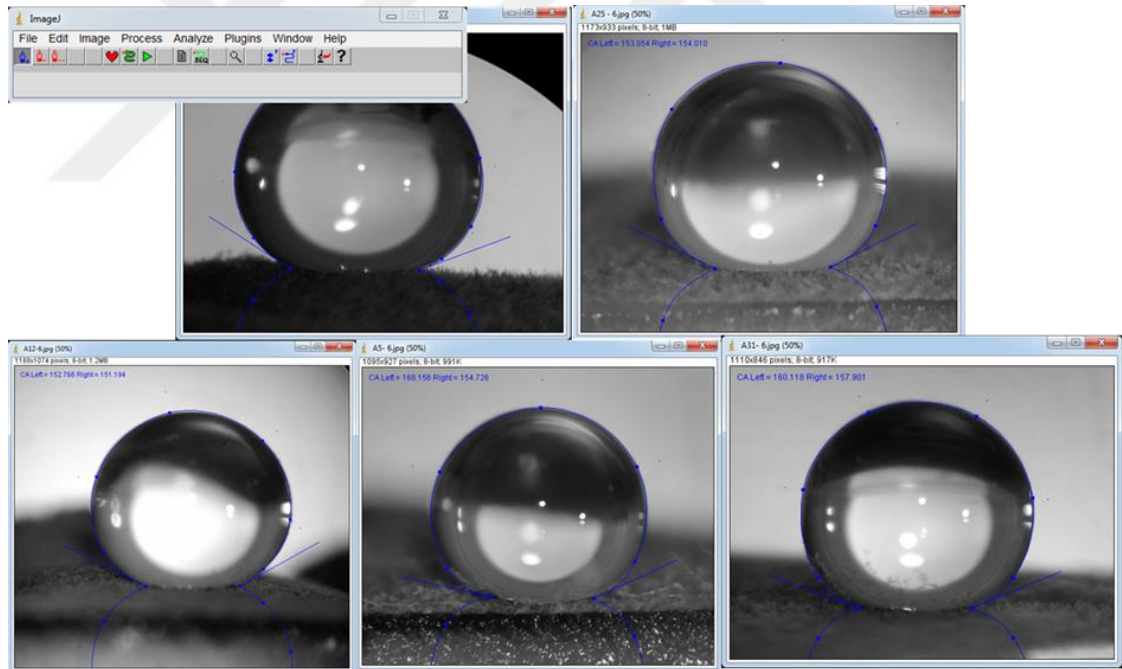
Çizelge 4.1. Katı kültürde büyütülen fungusların yüzeylerine damlatılan 6 ve 10 µl saf su damlalarının yüzeyle yaptıkları açılar ve değme açılarına göre asterisk işaretiyle derecelendirilmeleri

Fungus izolat numarası- Damla(mikrolitre)	Sol Açı	Sağ Açı		Fungus numarası- Damla(mikrolitre)	Sol Açı	Sağ Açı	
A5-10	154.916	160.206	***	C7-10	133.394	136.318	
A5-6	168.156	154.726		C7-6	124.524	122.304	
A6.2-10	111.172	105.682		CBS-LA-10	147.248	135.729	*
A6.2-6	115.445	128.956		CBS-LA-6	140.163	146.254	
A7-A-10	135.616	146.744		C8-10	134.120	139.021	
A7-A-6	135.112	130.943		C8-6	142.225	141.179	
A12-10	155.631	157.142	***	C9-10	147.180	157.957	**
A12-6	152.766	151.194		C9-6	140.497	150.225	
A17-10	156.216	148.633	**	CBS23-10	142.886	151.497	*
A17-6	146.169	140.344		CBS23-6	131.441	130.458	
A23-10	151.955	148.264	**	CBS25-10	156.649	141.008	*
A23-6	166.504	146.799		CBS25-6	152.782	140.573	*
A24-10	120.425	120.418		CBS26-10	152.094	158.312	
A24-6	130.114	122.221		CBS26-6	154.779	140.894	*
A25-10	145.469	149.747	*	CBS44-10	155.545	140.904	
A25-6	153.054	154.010		CBS44-6	119.558	143.858	
A26-10	123.864	130.694		D2-10	149.503	140.274	*
A26-6	152.288	148.889		D2-6	145.040	146.537	
A28-10	141.273	135.400		D7-10	147.564	159.238	**
A28-6	136.458	139.782		D7-6	147.740	142.170	
A31-10	149.980	155.867	**	D8-10	143.709	146.114	*
A31-6	160.118	157.901		D8-6	135.899	133.063	
A32-10	139.618	130.779		D10-10	127.322	138.048	

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Çizelge 4.1. (Devamı) Katı kültürde büyütülen fungusların yüzeylerine damlatılan 6 ve 10 µl saf su damlalarının yüzeyle yaptıkları açılar ve değme açlarına göre asterisk işaretiyle derecelendirilmeleri

A32-6	150.262	143.107		D10-6	139.464	145.391	
A33-10	135.477	129.830		ET4-10	115.069	140.101	
A33-6	147.439	140.123		ET4-6	139.618	132.159	
A35-10	124.125	121.323		ET14-10	120.780	129.091	
A35-10	110.542	98.200		ET14-6	131.108	128.820	
C2-10	144.770	143.175	*	LC9-10	150.423	159.251	***
C2-6	157.485	151.690		LC9-6	135.952	131.574	
C3-10	146.358	139.129	*	LC14-10	149.588	158.887	**
C3-6	136.513	132.474		LC14-6	134.975	136.596	



Şekil 4.4. *Cladosporium* türlerinin yüzeylerindeki su damlalarının (6 µl) ImageJ programı ile değme açılarının ölçüm sonuçları

4.2. Hidrofobin İzolasyonu ve Karakterizasyonu

4.2.1. Fungustan Spor İzolasyonu ve Spordan Hidrofobin Ekstraksiyonu

Şekil 3.2’de özetlenen yöntemle sporlar ve miselyumlar saf su kullanılarak ayrımları yapıldı. Sterilsargı bezi kullanılarak süzülen sporlar daha sonra santrifüj ile çöktürülerek saf su uzaklaştırıldı. Çökelti olarak elde edilen sporlar daha sonra liyofilize edilmek üzere -20 °C’de saklandı.

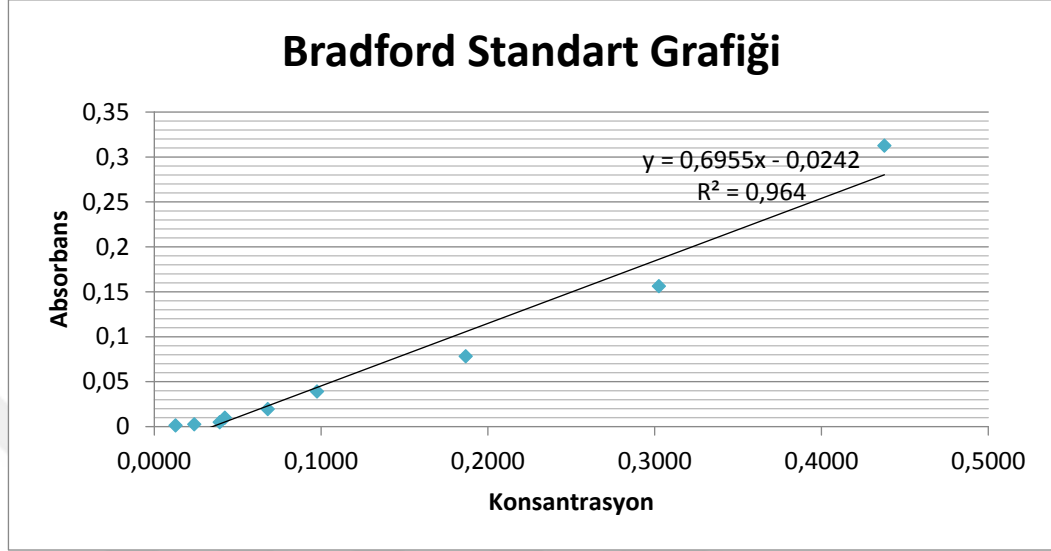
Sporlar -20 °C’den çıkarılıp süblimasyon aşamasında liyofilizasyon cihazına konuldu (Şekil 4.5). Kuru spor miktarlarını belirlemek için 2 ml’lik tüplerin boş ağırlıkları ve liyofilizasyon sonrasında kuru sporları içeren tüpler hassas terazide ölçüldü. Ölçümler sonucunda belirlenen A5, A12, A25, A31 ve D7 izolatlarına ait kuru spor ağırlıkları sırasıyla 26 mg, 28 mg, 42 mg, 15 mg ve 16 mg olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.5. A5, A12, A25, A31 ve D7 örneklerinden izole edilmiş sporların liyofilizasyon cihazındaki görüntüleri

Liyofilize edilmiş spordan hidrofobin ekstraksiyonu, %40 asetonitril+ %0,1 TFA içeren çözelti içinde sonikasyonla gerçekleştirildi. Sonikasyondan sonra, hidrofobin protein konsantrasyonları Şekil 4.6’deki BSA proteini ile oluşturulan standart

grafik yardımıyla hesaplandı. Her fungus izolatu için hidrofobin konsantrasyonları ($\mu\text{g/ml}$) Çizelge 4.2’de gösterilen absorbands değerleri kullanılarak $A5=0,2950$, $A12=0,3265$, $A25=0,3073$, $A31=0,2956$, $D7=0,4087$ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.6. BSA standart grafiği

Çizelge 4.2. Ekstrakte edilen proteinlerin 595 nm’de ölçülen absorbands değerleri ve standart grafiğe göre hesaplanan konsantrasyonları

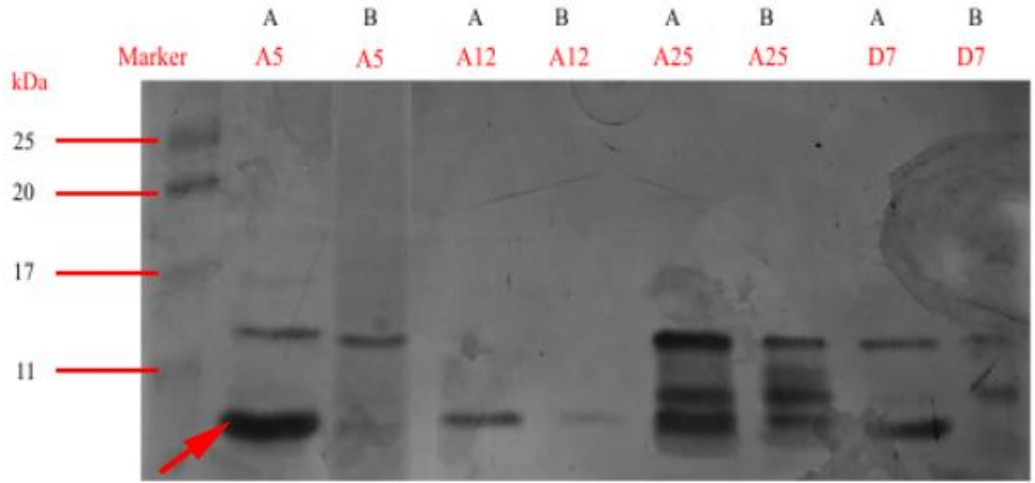
	A5	A12	A25	A31	D7
Abs-Ortamala	0,1810	0,2029	0,1895	0,1814	0,2601
Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	0,2950	0,3265	0,3073	0,2956	0,4087

4.2.2. SDS-PAGE

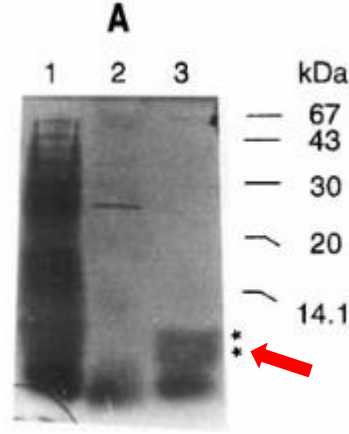
Konsantrasyonları belirlenen ve asetonitril+TFA çözeltisi içinde bulunan A5, A12, A25, A31 ve D7 izolatlarına ait protein örnekleri tek boyutlu ayırma sisteminde (SDS-PAGE) görüntüledi (Şekil 4.7). Bu SDS-PAGE görüntüsüne göre asetonitril+TFA çözeltisi içinde sonikasyonla ekstrakte edilen tüm proteinler 25 kDa’un altındadır. Hidrofobinler küçük moleküler ağırlığa sahiptirler ($30 \text{ kDa} >$) (Wosten and Scholtmeijer 2015) ve az miktarlarda üretilirler (Schmoll *et al.* 2010 ve Wang *et al.* 2010). Aynı zamanda, hidrofobinler için önerilen ekstraksiyon yönteminin uygulanması

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

nedeniyle SDS-PAGE' de görüntülenen proteinler hidrofobin veya hidrofobinler içermektedir. Ayrıca, seçilen izolatlardan %60 etanol kullanılarak ekstrakte edilen proteinler de görüntülendi (Şekil 4.7). Seçilen izolatlardan iki farklı çözelti ile ekstraksiyonu sonucu oluşan protein profilleri karşılaştırıldı. Karşılaştırma için Nakari Setala ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada kullanılan çözelti değerlendirmesi temel alındı (Şekil 4.8) ve bu çalışmada HFBII hidrofobininin moleküler ağırlığı 7,2 kDa olarak hesaplanmıştır. A5 kodlu izolat için %60'lık etanol çözeltisi ile SDS-PAGE'de sadece iki protein bandı ve %40 acetonitril+TFA çözeltisi ile ekstraksiyon sonucu jelde ikiden fazla protein görüntülenmiştir. Böylece, A5 sporlarından elde edilecek proteinler için %60 etanol çözeltisi ayırt edici özelliindedir (Şekil 4.7). Diğer izolatlar için çözeltiler değerlendirildiğinde belirgin bir fark görülmedi.



Şekil 4.7. Farklı çözeltiler içinde ekstrakte edilen izolatlara ait SDS-PAGE jel görüntüsü (A→ Asetonitril+TFA, B→%60'lık etanol)



Şekil 4.8. *Trichoderma reesei* sporlarından elde edilen proteinler (2→asetonitril+TFA, 3→%60 etanol)

Bütün bu sonuçlarla birlikte, fungus sporlarında bulunan hidrofobin proteinlerini izole etmek için spesifik bir yöntemin (Nakari- Setälä *et al.* 1997veChau *et al.* 2009) uygulanması dolayısıyla en yüksek değme açısına sahip A5 izolatına ait proteinlerden en yoğun olan jel bandının (~8 kDa) hidrofobin olduğuna karar verildi. Diğer taraftan, hidrofobinlerin tanımlanmaları için protein dizilerinde bulunan sekiz korunmuş ve belirli bir sırayla dizilenmiş sisteinler en önemli ölçütlerdir (Linder *et al.* 2005veSunde *et al.* 2008).

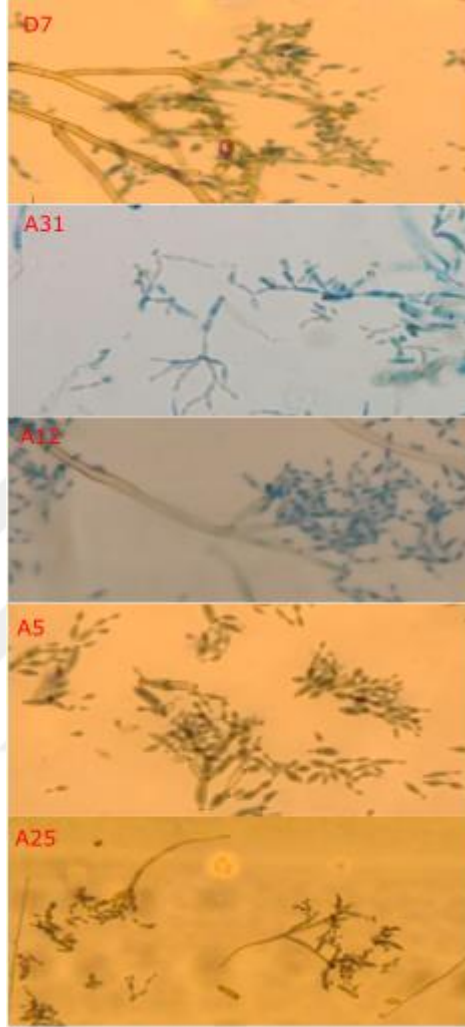
4.3. Seçilen Fungus İzolatların Türlerinin Tanınması

4.3.1. Klasik Yöntemlerle Karakterizasyon

Fungus koleksiyonundan temin edilmiş fungus türleri klasik karakterizasyon yöntemleriyle, stereo mikroskop altında doğrudan petride geliştirilen fungusları inceleyerek ve lam üzerinde mikroskop altında bakarak spor ve hif yapılarına, renklerine ve kolonilerin dış görünüşlerine göre, incelendiler. Fungusların *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* ve *Cladosporium* cinslerine ait oldukları görüldü.

Suyun değme açalarına göre seçilen A5, A12, A25, A31 ve D7 izolatları da yukarıda belirtilen kriterlerle incelendi. Seçilen izolatların her birinin mikroskopik morfolojilerinde, konidioforlarının koyu renkte pigmentlere sahip ağaç benzeri

dallanma yapan, konidileri küre, oval veya limon benzeri görünen ve uzun dallanmış zincir haldeki sporlar üreten (Bensch *et al.* 2018) yapıları içerdiği belirlendi ve bu izolatlar *Cladosporium* cinsine ait olarak karakterize edildi (Şekil 4.9).



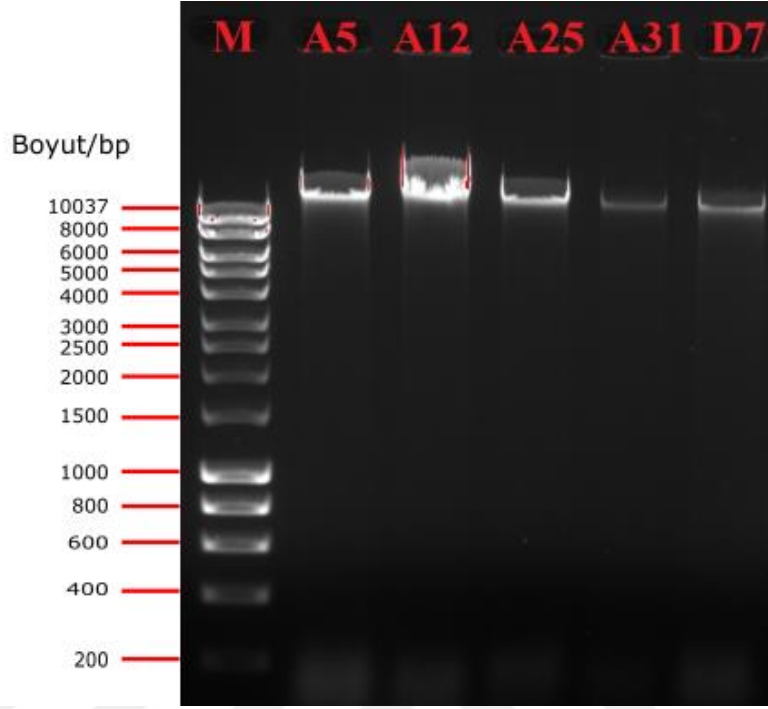
Şekil 4.9. Seçilen fungus türlerinin mikroskop altında görüntülenen konidiofor yapıları

4.3.2. Moleküler Karakterizasyon

4.3.2.1. DNA İzolasyonu

Seçilen izolatlara ait genomik DNA'lar 3.2.3.2 bölümünde verilen yönteme göre izole edilmiştir. Seçilen beş izolat için DNA konsantrasyon ölçümü yapılarak elde edilen değerler yardımıyla konsantrasyonları hesaplandı (izelge 4.3). Bu hesaplama sonucu A5, A12, A25, A31, ve D7 izolatları için sırasıyla 402 ng/ μ l, 672,5 ng/ μ l,685,8

ng/µl, 1534 ng/µl ve 3440 ng/µl olarak hesaplandı. Daha sonra ekstrakte edilen genomik DNA'lar %1'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülendi (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Seçilen izolatların genomik DNA izolasyonu sonunda %1 lik agaroz jeldeki görüntüleri

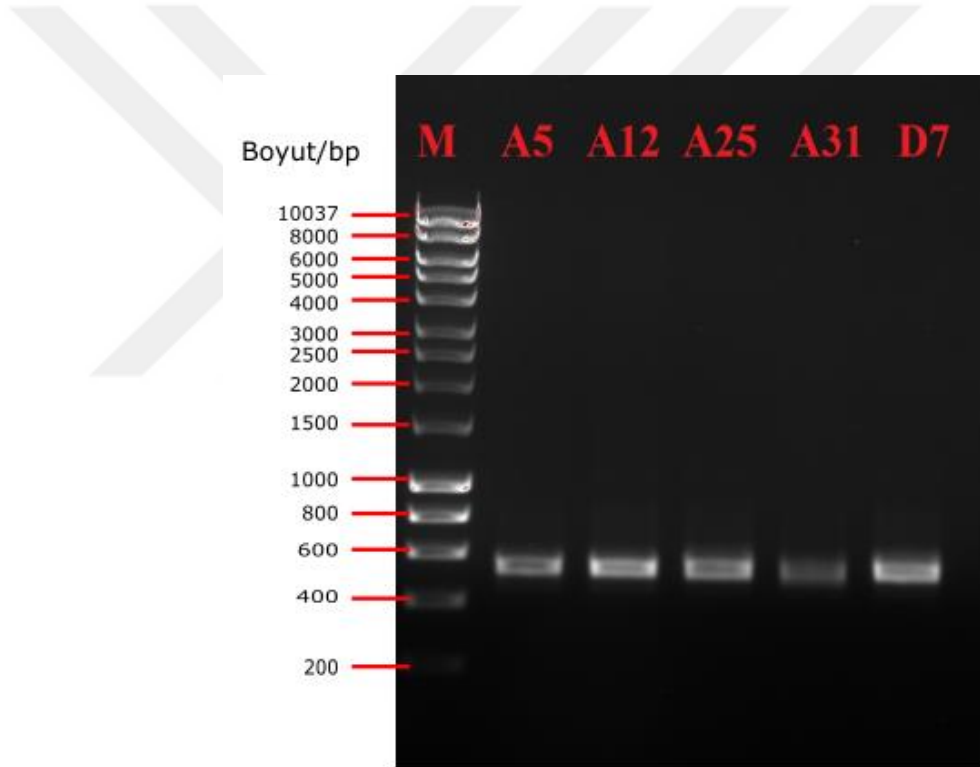
4.3.2.2. D1-D2 DNA Bölgesinin Çoğaltılması ve Jelden DNA Ekstraksiyonu

D1-D2 ribozom bölgesinin DNA dizilerinin belirlenmesiyle tanılamamanın doğrulanması amaçlanmıştır. Bu sebeple NL1 ve NL4 primerleri kullanılarak PZR gerçekleştirildi ve %1'lik agaroz jelde bu dizi görüntülendi ve bu diziler beklenildiği üzere 500-600 bp arasındaydı.

PZR ürünlerinin jelde yürütülmesi sonunda, jelde primerlerin spesifik olduğu bölge uzunluğundan farklı uzunlukta bantlara rastlandı. Bu bantlar primerlerin spesifik olmayan bağlanmalar yapmaları sonucu oluşan bantlar olarak yorumlandı. Kullanılan primerler arasındaki rDNA dizisini elde edebilmek için bilinen uzunluktaki rDNA dizilerini içeren bu bantlar jelden kesilerek ekstrakte edildiler. Ekstrakte edilen DNA dizilerinin doğrulanması için tekrar %1'lik agaroz jele yüklenerek yürütüldüler ve ilgili DNA dizilerinin elde edildiği doğrulandı.

4.3.2.3. ITS Bölgesinin Çoğaltılması ve Ligasyon

Ekstrakte edilen izolatların genomik DNA'larından ITS bölgesinin çoğaltılması amacıyla ITS 1 ve 4 primerleri kullanıldı. ITS 1 ve 4 primerleri rDNA bölgesinin 5.8S ribozom bölgesinin tamamını, 18S ve 28S ribozom bölgelerinin bir kısmını, küçük ve büyük alt birimler arasındaki (ITS) bölgeleri içine alan diziyi çoğaltmak için kullanılırlar (White, et al, 1990). 3.2.3.3 bölümünde belirtilen koşullara ve miktarlara göre PZR gerçekleştirildikten sonra, elde edilen PZR ürünlerinin saflığı ve beklenen yaklaşık büyüklüklerini belirlemek amacıyla %1'lik agaroz jelde yürütüldü. Jel görüntüsü Şekil 4.11'de gösterildiği gibidir ve bu görüntüye göre PZR ürünleri beklenildiği gibi 400-600 bp arasındadır.



Şekil 4.11. ITS primerleriyle yapılan PZR'den elde edilen ürünlerin %1'lik agaroz jeldeki görüntüleri

pGEM vektörüne PZR sonu elde edilen ITS bölgelerini eklemek amacıyla T4 ligaz enzimi kullanıldı. Ligasyon için hazırlanan karışım +4 °C'de gece boyu (16 saat) bekletildi.

4.3.2.4. Transformasyon ve Plazmid İzolasyonu

Transformasyonda ligasyon ürünlerinin *E.coli* JM101 kompetent hücrelerine aktarılması amaçlandı. Hücrelerin plazmidleri alıp almadıklarını kontrol etmek için ampisilin içeren besi yerinde büyütülerek direnç taraması ve ortama Xgal eklenerek mavi-beyaz taraması yapıldı. Buna göre ampisiline dirençli olan hücreler besi yerinde koloni oluşturmali, Xgal'i parçalayan hücre kolonileri mavi renkte parçalamayanlar ise ilgili nükleotid dizisini aldığı için beyaz renktedir (Madigan *et al.* 2017) ve beklenildiği gibi petrilere beyaz renkte koloniler oluştu (Şekil 4.13). Böylece beyaz kolonilerdeki hücrelerin plazmidleri almış oldukları doğrulandı. İlgili plazmidler çoğaltıldıktan sonra *E. coli* JM101 hücrelerinden izole edildiler. A5, A12, A25, A31 ve D7 izolatları için konsantrasyonlar sırasıyla 164,3 ng/ µl, 94,0 ng/ µl, 182,0 ng/ µl, 111,8 ng/ µl ve 363,0 ng/ µl olarak hesaplandı.

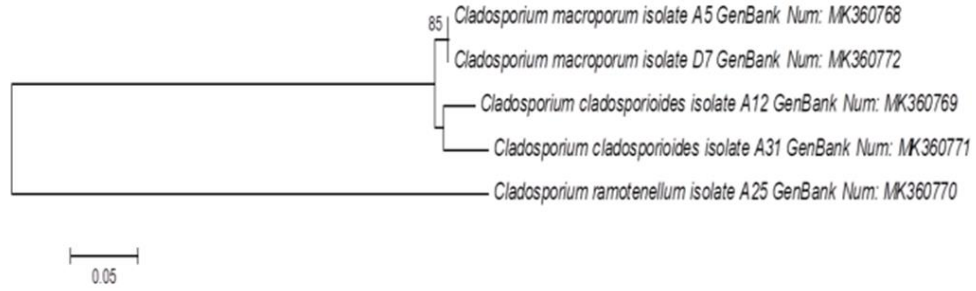
4.3.2.5. Dizileme

Elde edilen dizi sonuçları BioEdit programı kullanılarak ITS ve D1-D2 ribozom bölgelerinin DNA dizileri belirlendi. Diziler çift taraflı okuma yapıldığı için öncelikle bu iki dizinin karşılaştırması yapıldı ve daha iyi okunmuş bölgeler yine BioEdit programı yardımıyla "Conting" komutuyla birleştirilerek tek dizi elde edildi. A5, A12, A25, A31, D7 izolatları için ITS bölgesinin uzunlukları sırasıyla 552 bç, 558 bç, 549 bç, 515 bç, 552 bç'dir (Ek-1). Her bir izolat için D1-D2 ribozom bölgelerinin uzunlukları ise sırasıyla 555 bç, 586 bç, 584 bç, 576 bç, 572 bç'dir (Ek-2). Elde edilen son diziler BLASTIN 2.8.1+ programı (Zhang *et al.* 2000) kullanılarak GenBank'ta bulunan dizilerle karşılaştırıldı *Cladosporium* türlerinin moleküler karakterizasyonları gerçekleştirildi. Karşılaştırma sonucu aynı benzerlik oranına sahip türler Çizelge 4.3'te; Mega 6 programında yapılan komşuluk analizi ise Şekil 4.12 ve 4.13'te verilmiştir.

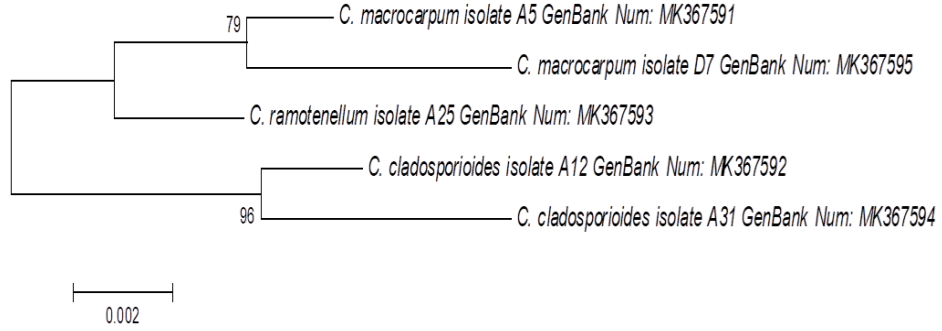
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Çizelge 4.3. Elde edilen ITS ve D1-D2 rDNA bölgelerinin GenBank verileriyle karşılaştırma sonucu belirlenen türler

İzolot Numarası	ITS	D1-D2
A5	<i>C. limoniforme</i>	<i>C. macrocarpum</i>
	<i>C. macrocarpum</i>	<i>C. herbarum</i>
	<i>C. cladosporioides</i>	<i>C. limoniforme</i>
A12	<i>C. cladosporioides</i>	<i>C. cladosporioides</i>
	<i>C. vicinum</i>	<i>C. tenuissimum</i>
A25	<i>C. ramotenellum</i>	<i>C. ramotenellum</i>
A31	<i>C. cladosporioides</i>	<i>C. phaencomae</i>
	<i>C. phaencomae</i>	<i>C. cladosporioides</i>
D7	<i>C. limoniforme</i>	<i>C. limoniforme</i>
	<i>C. tenellum</i>	<i>C. macrocarpum</i>
	<i>C. macrocarpum</i>	<i>C. herbarum</i>



Şekil 4.12. Filogeni, Komşuluk analizi yöntemi (Saitou and Nei 1987) kullanılarak çıkarıldı. Şube uzunluğu = 0.74476742 toplamı olan en uygun ağaç gösterilmiştir. İlişkili taksonların önyükleme testinde (1000 kopya) bir araya getirildiği kopya ağaçların yüzdesi, dalların yanında gösterilmektedir (Felsenstein 1985). Ağaç, filogenetik ağacın çıkarımında kullanılan evrimsel mesafelerle aynı birimdeki dal uzunlukları ile ölçeklendirilir. Evrimsel mesafeler, Maksimum Bileşik Olabilirlik yöntemi (Tamura *et al.* 2004) kullanılarak hesaplandı ve saha başına baz ikame sayısının birimlerinde yer alıyor. Analiz 5 nükleotid dizisini içermiştir. Evrimsel analizler MEGA6'da yapıldı (Tamura *et al.* 2013).



Şekil 4.13. Filogeni, Komşuluk analizi yöntemi (Saitou and Nei 1987) kullanılarak çıkarıldı. Şube uzunluğu = 0.02655032 olan en uygun ağaç gösterilmiştir. İlişkili taksonların önyüklem testi (1000 kopya) bir araya getirildiği kopya ağaçların yüzdesi, dalların yanında gösterilmektedir (Felsenstein 1985). Evrimsel mesafeler, Maksimum Bileşik Olabilirlik yöntemi (Tamura *et al.* 2004) kullanılarak hesaplandı ve saha başına baz ikame sayısının birimlerinde yer alıyor. Analiz 5 nükleotid dizisini içermiştir. Evrimsel analizler MEGA6'da yapıldı (Tamura *et al.* 2013).

Elde edilen sonuçlara göre, ITS ve D1D2 bölgelerine ait moleküler verilerin yalnızca A25 izolatında tek bir türe işaret ettiği belirlendi ve bu izolatın tanısı *C. ramotenellum* olarak gerçekleştirildi. Ancak diğer 4 izolatın her iki gen bölgesine ait dizide de %98-100 tanılama yüzdelerinde birden fazla tür ile uyduğu anlaşıldı. Bu nedenle konvensiyonel tekniklerle elde edilen veriler tür tanısında belirleyici olarak kullanıldı. Öncelikle Şekil 4.12 ve 4.13'de verilen komşuluk analizleri incelendiğinde A5 ve D7 izolatları ile A12 ve A31 izolatlarının filogenetik olarak birbirine daha yakın olduğu anlaşılmaktadır. Bunun yanında Çizelge 4.3'de verilen olası türlere ait MycoBank veribankası (<http://www.mycobank.org/>) kayıtları incelendiğinde; konidiyoforların terminal ya da interkalar nodoz (şişkin) olup olmaması, 500µm'den uzun olup olmamaları, havai hiflerin uçlarının spiral olarak kıvrık ya da düz olması; konidilerin boyutu ve yüzeyinin pürüzlü ya da düz oluşuna göre farklılıklar içerdiği tespit edilmiştir. Bu nedenle A5 ve D7 izolatları, konidiyoforlarının nodoz olup, 500µm'den kısa olması ve havai hiflerinin spiral olarak kıvrık olmaması nedeniyle *C. macrocarpum*; A12 ve A31 izolatları ise konidiyoforların nodoz olmaması ve konidilerinin küresel olmaması nedeniyle *C. cladosporioides* olarak karakterize

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

edilmiştir. Ardından tanılanan bu izolatların ITS ve D1D2 bölgelerine ait ayrı ayrı GenBank'a kayıtları gerçekteŐtirilmiŐ ve eriŐim numaraları alınmiŐtir.



5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Hidrofobinler kararlı yapıları ve yüzeylerde öztoplanma yapabilme yetenekleriyle farklı alanlarda kullanılma potansiyeline sahip olan proteinlerdir. Hidrofobinlerin amfipatik özellikleri, hidrofilik ve hidrofobik yüzeyleri değiştirmek için önemlidir. Süper-hidrofobik yüzeylerin oluşturulması amacıyla, hidrofobin üreticisi olan filamentöz funguslardan seleksiyon çalışması ve en yüksek hidrofobisiteye sahip fungusların seçilimi amaçlanmıştır. Bu tez çalışmasının sonucunda, biyoteknolojide birçok alanda kullanılmak üzere, süper-hidrofobik özelliklere sahip hidrofobinler elde edilmiştir. Yapılan seleksiyon çalışmasında farklı cinslere ait toplam 72 filamentöz fungus arasından süper-hidrofobik özelliklere sahip olanlar seçilmiş ve ilginç bir şekilde bu fungusların tamamının *Cladosporium* cinsine ait olduğu belirlenmiştir.

Süper-hidrofobik yüzeyler oluşturmada kullanılacak hidrofobin proteini seçiminde suyun değme açısının ölçümünün hızlı ve etkili bir yöntem olduğu bu tez çalışması ile doğrulanmıştır.

Bu çalışma ile izole edilip, saflaştırılan hidrofobin proteinlerinin biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilmesi için farklı çalışmalara ihtiyaç vardır. Sonraki çalışmalar için öneriler aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

1. SDS-PAGE ile görüntülenen proteinlerin daha ayrıntılı karakterizasyonları Edman sekanslama ile yapılmalıdır.
2. Bu proteinlerin biyoteknolojik ürünlerde uygulanabilmeleri için büyük ölçekte elde edilmeli ve rekombinant olarak üretilmelidir.
3. Biyogüvenlik kontrollü açısından toksik özellikleri belirlenmelidir.
4. Tanımlanan hidrofobin proteinlerinin yüzey kaplamalarında süper-hidrofobik yüzey oluşturma uygulamalarında denenmelidir.

KAYNAKLAR

- Akanbi, M.H.J., Post, E., Meter-Arkema, A., Rink, R., Robillard, G.T., Wang, X.Q., Wosten, H.A.B. and Scholtmeijer, K. 2010. Use of hydrophobins in formulation of water insoluble drugs for oral administration. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 75(2), 526-531.
- Akanbi, M.H.J., Post, E., van Putten, S.M., de Vries, L., Smisterova, J., Meter-Arkema, A.H., Wosten, H.A.B., Rink, R. and Scholtmeijer, K. 2013. The antitumor activity of hydrophobin SC3, a fungal protein. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(10), 4385-4392.
- Artini, M., Cicatiello, P., Ricciardelli, A., Papa, R., Selan, L., Dardano, P., Tilotta, M., Vrenna, G., Tutino, M.L., Giardina, P. and Parrilli, E. 2017. Hydrophobin coating prevents *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation on different surfaces. *Biofouling*, 33(7), 601-611.
- Bayry, J., Aimanianda, V., Guijarro, J.I., Sunde, M. and Latge, J.P. 2012. Hydrophobins-Unique Fungal Proteins. *Plos Pathogens*, 8(5), 1-4.
- Bensch, K. 2012. The Genus *Cladosporium*. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, P.O. Box 85167, 3508 AD Utrecht, The Netherlands.
- Bensch, K., Groenewald, J., Meijer, M., Dijksterhuis, J., Jurjević, Ž., Andersen, B., Houbraeken, J., Crous, P. and Samson, R. 2018. *Cladosporium* species in indoor environments. *Studies in mycology*, 89,177-301.
- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N. and Bourne, P.E. 2000. The Protein Data Bank Nucleic Acids Research, 28: 235-242.
- Bimbo, L.M., Makila, E., Raula, J., Laaksonen, T., Laaksonen, P., Strommer, K., Kauppinen, E.I., Salonen, J., Linder, M.B., Hirvonen, J. and Santos, H.A., 2011. Functional hydrophobin-coating of thermally hydrocarbonized porous silicon microparticles. *Biomaterials*, 32(34), 9089-9099.
- Blijdenstein, T.B.J., de Groot, P.W.N. and Stoyanov, S.D. 2010. On the link between foam coarsening and surface rheology: why hydrophobins are so different. *Soft Matter*, 6(8), 1799-1808.
- Chau, H.W., Si, B.C., Goh, Y.K. and Vujanovic, V. 2009. A novel method for identifying hydrophobicity on fungal surfaces. *Mycological Research*, 113(10), 1046-1052.
- Cooper, A. and Kennedy, M.W. 2010. Biofoams and natural protein surfactants. *Biophysical Chemistry*, 151(3), 96-104.
- Cox, A.R., Aldred, D.L. and Russell, A.B. 2009. Exceptional stability of food foams using class II hydrophobin HFBII. *Food Hydrocolloids*, 23(2), 366-376.
- Crous, P.W., Gams, W., Stalpers, J.A., Robert, V. and Stegehuis, G. 2004. MycoBank: an online initiative to launch mycology into the 21st century. *Studies in Mycology* 50: 19-22
- de Vries, O.M.H., Moore, S., Arntz, C., Wessels, J.G.H. and Tudzynski, P. 1999. Identification and characterization of a tri-partite hydrophobin from *Claviceps*

- fusiformis - A novel type of class II hydrophobin. *European Journal of Biochemistry*, 262(2), 377-385.
- Devries, O.M.H., Fekkes, M.P., Wosten, H.A.B. and Wessels, J.G.H. 1993. Insoluble Hydrophobin Complexes in the Walls of *Schizophyllum commune* and other filamentous Fungi. *Archives of Microbiology*, 159(4), 330-335.
- Espino-Rammer, L., Ribitsch, D., Przylucka, A., Marold, A., Greimel, K.J., Acero, E.H., Guebitz, G.M., Kubicek, C.P. and Druzhinina, I.S. 2013. Two Novel Class II Hydrophobins from *Trichoderma spp.* Stimulate Enzymatic Hydrolysis of Poly(Ethylene Terephthalate) when Expressed as Fusion Proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(14), 4230-4238.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783-791.
- Gravagnuolo, A.M., Morales-Narvaez, E., Longobardi, S., da Silva, E.T., Giardina, P. and Merkoci, A. 2015. In Situ Production of Biofunctionalized Few-Layer Defect-Free Microsheets of Graphene. *Advanced Functional Materials*, 25(18), 2771-2779.
- Gross, A., Rodel, G. and Ostermann, K. 2011. Application of the yeast pheromone system for controlled cell-cell communication and signal amplification. *Letters in Applied Microbiology*, 52(5), 521-526.
- Gruner, L.J., Ostermann, K., and Rodel, G. 2012. Layer Thickness of Hydrophobin Films Leads to Oscillation in Wettability. *Langmuir*, 28(17), 6942-6949.
- Hahl, H., Vargas, J.N., Griffo, A., Laaksonen, P., Szilvay, G., Lienemann, M., Jacobs, K., Seemann, R. and Fleury, J.B. 2017. Pure Protein Bilayers and Vesicles from Native Fungal Hydrophobins. *Advanced Materials*, 29(1), 1-6.
- Hektor, H.J. and Scholtmeijer, K. 2005. Hydrophobins: proteins with potential. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(4), 434-439.
- Hou, S., Yang, K., Qin, M., Feng, X.Z., Guan, L., Yang, Y.L. and Wang, C. 2008. Patterning of cells on functionalized poly(dimethylsiloxane) surface prepared by hydrophobin and collagen modification. *Biosensors & Bioelectronics*, 24(4), 912-916.
- Janssen, M.I., van Leeuwen, M.B.M., Scholtmeijer, K., van Kooten, T.G., Dijkhuizen, L. and Wosten, H.A.B. 2002. Coating with genetic engineered hydrophobin promotes growth of fibroblasts on a hydrophobic solid. *Biomaterials*, 23(24), 4847-4854.
- Janssen, M.I., van Leeuwen, M.B.M., van Kooten, T.G., de Vries, J., Dijkhuizen, L. and Wosten, H.A.B. 2004. Promotion of fibroblast activity by coating with hydrophobins in the beta-sheet end state. *Biomaterials*, 25(14), 2731-2739.
- Joensuu, J.J., Conley, A.J., Lienemann, M., Brandle, J.E., Linder, M.B. and Menassa, R. 2010. Hydrophobin Fusions for High-Level Transient Protein Expression and Purification in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiology*, 152(2), 622-633.
- Kaur, J., Vergara, A., Rossi, M., Gravagnuolo, A.M., Valadan, M., Corrado, F., Conte, M., Gesuele, F., Giardina, P. and Altucci, C. 2017. Electrostatically driven scalable synthesis of MoS₂-graphene hybrid films assisted by hydrophobins. *Rsc Advances*, 7(79), 50166-50175.

- Khalesi, M., Gebruers, K. and Derdelinckx, G. 2015. Recent Advances in Fungal Hydrophobin Towards Using in Industry. *Protein Journal*, 34(4), 243-255.
- Kirkland, B.H. and Keyhani, NO. 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 & Biotechnology*, 38(2), 327-335.
- Kisko, K., Szilvay, G.R., Vainio, U., Linder, M.B. and Serimaa, R. 2008. Interactions of hydrophobin proteins in solution studied by small-angle x-ray scattering. *Biophysical Journal*, 94(1), 198-206.
- Kulkarni, S., Nene, S. and 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. and Mackay, JP. 2006. Structural basis for rodlet assembly in fungal hydrophobins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(10), 3621-3626.
- Lacroix, H. and Spanu, P.D. 2009. Silencing of Six Hydrophobins in *Cladosporium fulvum*: Complexities of Simultaneously Targeting Multiple Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(2), 542-546.
- Lacroix, H., Whiteford, J.R. and Spanu, P.D. 2008. Localization of *Cladosporium fulvum* hydrophobins reveals a role for HCF-6 in adhesion. *Fems Microbiology Letters*, 286(1), 136-144.
- Li, X.X., Hou, S., Feng, X.Z., Yu, Y., Ma, J.J. and Li, L.Y. 2009. Patterning of neural stem cells on poly(lactic-co-glycolic acid) film modified by hydrophobin. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 74(1), 370-374.
- Linder, M.B., Qiao, M.Q., Laumen, F., Selber, K., Hyytia, T., Nakari-Setälä, T. and 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. and Penttilä, M.E. 2005. Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. *Fems Microbiology Reviews*, 29(5), 877-896.
- Longobardi, S., Gravagnuolo, A.M., Rea, I., De Stefano, L., Marino, G. and Giardina, P. 2014. Hydrophobin-coated plates as matrix-assisted laser desorption/ionization sample support for peptide/protein analysis. *Analytical Biochemistry*, 449, 9-16.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J. 2013. *Brock biology of microorganisms* (Thirteenth edition). Boston, Pearson.
- Meister, K., Baumer, A., Szilvay, G.R., Paananen, A. and Bakker, H.J. 2016. Self-Assembly and Conformational Changes of Hydrophobin Classes at the Air-Water Interface. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 7(20), 4067-4071.
- Melcher, M., Facey, S.J., Henkes, T.M. Subkowski, T. and Hauer, B. 2016. Accelerated Nucleation of Hydroxyapatite Using an Engineered Hydrophobin Fusion Protein. *Biomacromolecules*, 17(5), 1716-1726.
- Mgbeahuruike, A.C., Kovalchuk, A., Chen, H.X., Ubhayasekera, W. and 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*, 13,1-16.
- Mitchell, A.L, Attwood, T.K, Babbitt, P.C, Blum, M., Bork. P., Bridge, A., Brown S.D., Chang, H.Y., El-Gebali, Sara., Fraser, M.I., Gough, J., Haft, D.R., Huang, H., Letunic, I., Lopez, R., Luciani, A., Madeira, F., Marchler-Bauer, A., Mi, H., Natale, D.A., Necci, M., Nuka, G., Orengo, C., Pandurangan, A.P., Paysan-Lafosse, T., Pesseat, S., Potter, S.C., Qureshi, M.A., Rawlings, N.D., Redaschi, N., Richardson, L.J., Rivoire, C., Salazar, G.A., Sangrador-Vegas, A., Sigrist, C.J.A., Sillitoe, I., Sutton, G.G., Thanki, N., Thomas, P.D., Tosatto, S.C.E., Yong S.Y. and Finn, R.D. 2019. InterPro in 2019: improving coverage, classification and access to protein sequence annotations. *Nucleic Acids Research*, Jan 2019; doi: 10.1093/nar/gky1100
- Misra, R., Li, J., Cannon, G.C. and Morgan, S.E. 2006. Nanoscale reduction in surface friction of polymer surfaces modified with Sc3 hydrophobin from *Schizophyllum commune*. *Biomacromolecules*, 7(5), 1463-1470.
- Morris, V.K., Kwan, A.H. and Sunde, M. 2013. Analysis of the Structure and Conformational States of DewA Gives Insight into the Assembly of the Fungal Hydrophobins. *Journal of Molecular Biology*, 425(2), 244-256.
- Mustalahti, E., Saloheimo, M. and Joensuu, J.J. 2013. Intracellular protein production in *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) with hydrophobin fusion technology. *New Biotechnology*, 30(2), 262-268.
- Nakari- Setälä, T., Aro, N., Ilmén, M., Muñoz, G., Kalkkinen, N. and Penttilä, M. 1997. Differential Expression of the Vegetative and Spore- Bound Hydrophobins of *Trichoderma Reesei* Cloning and Characterization of the Hfb2 Gene. *European Journal of Biochemistry*, 248(2), 415-423.
- Neinhuis, C. and Barthlott, W. 1997. Characterization and distribution of water-repellent, self-cleaning plant surfaces. *Annals of Botany*, 79(6), 667-677.
- Nielsen, P.S., Clark, A.J., Oliver, R.P., Huber, M. and Spanu, P.D. 2001. Hcf-6, a novel class II hydrophobin from *Cladosporium fulvum*. *Microbiological Research*, 156(1), 59-63.
- Petti, C.A. 2008. Interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing (Second edition). *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 1-25.
- Piscitelli, A., Cicatiello, P., Gravagnuolo, A.M., Sorrentino, I., Pezzella, C. and Giardina, P. 2017. Applications of Functional Amyloids from Fungi: Surface Modification by Class I Hydrophobins. *Biomolecules*, 7(3), 1-11.
- Przylucka, A., Akcapinar, G.B., Chenthamara, K., Cai, F., Grujic, M., Karpenko, J., Livoi, M., Shen, Q., Kubicek, C.P. and Druzhinina, I. S. 2017. HFB7—a novel orphan hydrophobin of the Harzianum and Virens clades of *Trichoderma*, is involved in response to biotic and abiotic stresses. *Fungal Genetics and Biology*, 102, 63-76.
- Qin, M., Hou, S., Wang, L.K., Feng, X.Z., Wang, R., Yang, Y.B., Wang, C., Yu, L., Shao, B. and Qiao, MQ. 2007. Two methods for glass surface modification and their application in protein immobilization. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 60(2), 243-249.

- Rabe, M., Verdes, D. and Seeger, S. 2011. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, 162(1-2), 87-106.
- Ren, Q., Kwan, A.H. and Sunde, M. 2013. Two Forms and Two Faces, Multiple States and Multiple Uses: Properties and Applications of the Self-Assembling Fungal Hydrophobins. *Biopolymers*, 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. and Ritala, A. 2017. Coating Nanoparticles with Plant-Produced Transferrin-Hydrophobin Fusion Protein Enhances Their Uptake in Cancer Cells. *Bioconjugate Chemistry*, 28(6), 1639-1648.
- Rick, E.M., Woolnough, K., Pashley, C.H. and Wardlaw, A.J. 2016. Allergic Fungal Airway Disease. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 26(6), 344-354.
- Rieder, A., Ladnorg, T., Woll, C., Obst, U., Fischer, R. and Schwartz, T. 2011. The impact of recombinant fusion-hydrophobin coated surfaces on E-coli and natural mixed culture biofilm formation. *Biofouling*, 27(10), 1073-1085.
- Ruocco, M., Lanzuise, S., Lombardi, N., Woo, S.L., Vinale, F., Marra, R., Varlese, R., Manganiello, G., Pascale, A. and Scala V. 2015. Multiple roles and effects of a novel *Trichoderma* hydrophobin. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28, 167-179.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.
- Sandoval-Denis, M., Sutton, D.A., Martin-Vicente, A., Cano-Lira, J.F., Wiederhold, N., Guarro, J. and Gene, J. 2015. *Cladosporium* Species Recovered from Clinical Samples in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(9), 2990-3000.
- Santhiya, D., Burghard, Z., Greiner, C., Jeurgens, L.P.H., Subkowski, T. and Bill, J. 2010. Bioinspired Deposition of TiO₂ Thin Films Induced by Hydrophobins. *Langmuir*, 26(9), 6494-6502.
- Schmoll, M., Seibel, C., Kotlowski, C., Vendt, F.W.G., Liebmann, B. and Kubicek, C.P. 2010. Recombinant production of an *Aspergillus nidulans* class I hydrophobin (DewA) in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) is promoter-dependent. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(1), 95-103.
- Scholtmeijer, K., Janssen, M.I., van Leeuwen, M.B.M., van Kooten, T.G., Hektor, H. and Wosten, H.A.B. 2004. The use of hydrophobins to functionalize surfaces. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 14(4), 447-454.
- Segers, G.C., Hamada, W., Oliver, R.P. and Spanu, P.D. 1999. Isolation and characterisation of five different hydrophobin-encoding cDNAs from the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Molecular and General Genetics*, 261(4-5), 644-652.
- Sharpe, RA. Bearman, N. Thornton, CR. Husk, K. and Osborne, NJ. 2015. Indoor fungal diversity and asthma: A meta-analysis and systematic review of risk factors. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135(1), 110-122.
- Spanu, P. 1997. HCF-1, a hydrophobin from the tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Gene*, 193(1), 89-96.

- Starov, V.M., Velarde, M.G. and Radke, C.J. 2007. Wetting and spreading dynamics (First edition). CRC press, Boca Raton, Florida, 544.
- Sulc, M., Peslova, K., Zabka, M., Hajduch, M. and Havlicek, V. 2009. Biomarkers of *Aspergillus* spores: strain typing and protein identification. *International Journal of Mass Spectrometry*, 280(1-3), 162-168.
- Sunde, M., Kwan, A.H.Y., Templeton, M.D., Beever, R.E. and Mackay, J.P. 2008. Structural analysis of hydrophobins. *Micron*, 39(7), 773-784.
- Takahashi, T., Maeda, H., Yoneda, S., Ohtaki, S., Yamagata, Y., Hasegawa, F., Gomi, K., Nakajima, T. and Abe, K. 2005. The fungal hydrophobin RoIA 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. and 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.
- Tamura, K., Nei, M. and Kumar, S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(30), 11030-11035.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A. and Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725-2729.
- Valo, H.K., Laaksonen, P.H., Peltonen, L.J., Linder, M.B., Hirvonen, J.T. and Laaksonen, T.J. 2010. Multifunctional Hydrophobin: Toward Functional Coatings for Drug Nanoparticles. *Acs Nano*, 4(3), 1750-1758.
- Wagner, P., Furstner, R., Barthlott, W. and Neinhuis, C. 2003. Quantitative assessment to the structural basis of water repellency in natural and technical surfaces. *Journal of Experimental Botany*, 54(385), 1295-1303.
- Wang, Z.F., Feng, S.R., Huang, Y.J., Qiao, M.Q., Zhang, B.H. and Xu, H.J. 2010. Prokaryotic expression, purification, and polyclonal antibody production of a hydrophobin from *Grifola frondosa*. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, 42(6), 388-395.
- Weichel, M., Schmid-Grendelmeier, P., Rhyner, C., Achatz, G., Blaser, K. and Cramer, R. 2003. Immunoglobulin E-binding and skin test reactivity to hydrophobin HCh-1 from *Cladosporium herbarum*, the first allergenic cell wall component of fungi. *Clinical & Experimental Allergy*, 33(1), 72-77.
- Wessels, J.G.H., Devries, O.M.H., Asgeirsdottir, S.A. and Schuren, F.H.J. 1991. Hydrophobin genes involved in formation of aerial hyphae and fruit bodies in *Schizophyllum*. *Plant Cell*, 3(8), 793-799.
- Whiteford, J.R. and Spanu, P.D. 2001. The hydrophobin HCF-1 of *Cladosporium fulvum* is required for efficient water-mediated dispersal of conidia. *Fungal Genetics and Biology*, 32(3), 159-168.
- Whiteford, J.R., Lacroix, H., Talbot, N.J. and Spanu, P.D. 2004. Stage-specific cellular localisation of two hydrophobins during plant infection by the pathogenic fungus *Cladosporium fulvum*. *Fungal Genetics and Biology*, 41(6), 624-634.

- Wösten, H.A. 2001. Hydrophobins: multipurpose proteins. *Annual Reviews in Microbiology*, 55(1), 625-646.
- Wosten, H.A.B. and de Vocht, M.L. 2000. Hydrophobins, the fungal coat unravelled. *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Biomembranes*, 1469(2), 79-86.
- Wosten, H.A.B. and Scholtmeijer, K. 2015. Applications of hydrophobins: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(4), 1587-1597.
- Wosten, H.A.B., van Wetter, M.A., Lugones, L.G., van der Mei, H.C., Busscher, H.J. and Wessels, J.G.H. 1999. How a fungus escapes the water to grow into the air. *Current Biology*, 9(2), 85-88.
- Yew, S.M., Chan, C.L., Ngeow, Y.F., Toh, Y.F., Na, S.L., Lee, K.W., Hoh, C.C., Yee, W.Y., Ng, K.P. and Kuan, C.S. 2016. Insight into different environmental niches adaptation and allergenicity from the *Cladosporium sphaerospermum* genome, a common human allergy-eliciting Dothideomycetes. *Scientific Reports*, 6, 1-13.
- Zhang, S.Z., Xia, Y.X., Kim, B. and 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(3), 811-826.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. and Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational biology*, 7(1-2), 203-214.

EKLER

EK-1 ITS Dizileri

A5

TCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCTACCTGATCCGAGTCAACCTTA GAAATGG
GGTGTGTTTACGGCGTAGCCTCCC GAAC ACCCTTTA GC GAATA GTTCCACA ACGCTTAGGGGA CAGAA
GACCCAGCCGGACGATTT GAGGC ACGCGGC GG ACC GC GTTGCC CAATAC CAA GC GAGGCTT GAGT GGT
GAAATGACGCTCGAACAGGCAT GCC CCC GGAATAC CAGGGGGC GEAAT GTGCGTTCA AAGATTCGAT G
ATTCACTGAATTCGCAATTCACATTACTTATCGATTTGCTGCGTTCCTC ATC GAT GCCA GAA CCAA G
AGATCCGTTGTTAAAAGTTTAAATTTAATTAATTAAGTTTACTCAGACT GCAA AGTTAC GCA AGAGTTGA
AGTGTCCACCCGGAGCCC CCGCCC GAA GGCA GG GTC GCCCC GGA GGC AACA GATC GGA AATCAA AGG
GTTGTCAGTCCCAGCTGTACAA GCCTGGGTGA ACTTATAAT GATCCCTC CGC AGGTTAC CTA CGGA
→ 552 bp

A12

TCCTCCGCTTATTGATATAGCTTAAC TTTTTCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTAC
AAATGGGGTGTGTTTACGGCGTA GCCTCC GAACA CCCTTTA GCGAATA GTTCCACAA CCGCTTAGGGG
ACAGAAGACCCAGCCGTC GATTTGAGGCAC GC GGCGGACC GC GTTGC CCAATA CCAA GC GA GGCCTG
AGTGGTGAATGACGCTC GAAC AGGCAT GCC CCC GGAATACC AGGGGGC GEAAT GTGC GTTCAA AGA
TTCCGATGATTCACTGAATTCGCAATTCACATTACTTATCGC ATTTGCT GCGTTCCTC ATC GAT GCC AG
AACCAAGAGATCCGTTGTTAAA GTTTAATTTAATTAAGTTTACTCA GACT GCAA AGTTAC GCA AG
AGTTTGAAGTGTCCACCCGGA GCC CCC GCC GAA GGCA GG GTC GCCC CGGA GGC AAC AGA GTC GGACA
ACAAAGGGTTATGAACATCCCGGTA GTTAGACC GG GTC ACTTGTATGATC CCTCC GCA GTTCACT
ACGGA → 558 bp

A25

TCGGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTAC AAGT GAC CCC GGCTACGGC CGGGATGTT CATA ACCCTT
TGTTGTCCGACTCTGTTGCTCCGGGGC GACCTGCTTCGGGC GGGGGCTC CGGGTGGACA CTTCAAA
CTCTTGGTAACCTTTCAGTCTGAGTAACTTAATTAATAAATTA AAA ACTTTAACA ACGGATCTCTT GGT
TCTGGCATCGATGAAGAACGCA GCGAAAT GCGATAA GTAAATGT GAATT GCA GAATTC A GTGAATCATC G
AATCTTTGAACGCACATTCGCCCCCT GGTATTC GGGGGCATGC CTGTTG GA GGTCA ATTTCAACA C
TCAAGCTCGCTTGGTATTGGGC AAC GC GGTCC GC CGC GTGCTCAA ATGCTC CGGCT GG GTCTCTGT
CCCCAAGCGTTGTGGAACTATTC GCTAAA GGT GTTCGGGAGGCTA CGC GTA AAAA ACCC CATT
CTAAGTTGACCTCGGATCAGGTA GGGATAC CCGCTGA ACTTAA GCATATCAATAAGCGGAGGA → 549
bp

A31

TCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTA GCC CTACCT GATTTGAGGCCA GATCAT GAATAT G
TGGGGTATCAGCCACCCAGAA GGAT GAA ACGTATTA CATCCA AGTGGCTTATGTCTTAA GGC GAGCC
TTTAGCAAGGCAACACCCAATACAC CACC GCTCA GGCAA AAAC CCAA GTGGGT GA GGTTCAT GACA C
TCAAAACAGGATGCCCTTCGGA ATACCA AA GGGC GCAA GGTGC GTTCAA AGATTG GAT GATTCACT GAA
TTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTGCTGCGTTCCTCATGATGC GAGA GCA AGA GATC CGTT G
TTAAAAGTTTGTGTTTGTATGATATTACATTCACTTAACAGTTTGTGATGGCC GAA GGCA CAGTTCA
CGTGTGTATGGAAACCTCTTCTTGC GAGA GAGCA GATCTA ACCCA ATGATTT GCATCA AAGGGCAC
TATTAATGATCCTTCGAGGTTCACTACGGA → 520 bp

B7

TCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCTACCTGATCCGAGTCAACCTTA GAAATGG
GGTGTGTTTACGGCGTAGCCTCCC GAAC ACCCTTTA GC GAATA GTTCCACA ACGCTTAGGGGA CAGAA
GACCCAGCCGGACGATTT GAGGC ACGCGGC GG ACC GC GTTGCC CAATAC CAA GC GAGGCTT GAGT GGT
GAAATGACGCTCGAACAGGCAT GCC CCC GGAATAC CAGGGGGC GEAAT GTGCGTTCA AAGATTCGAT G
ATTCACTGAATTCGCAATTCACATTACTTATCGATTTGCTGCGTTCCTC ATC GAT GCCA GAA CCAA G
AGATCCGTTGTTAAAAGTTTAAATTTAATTAAGTTTACTCAGACT GCAA AGTTAC GCA AGAGTTGA
AGTGTCCACCCGGAGCCC CCGCCC GAA GGCA GG GTC GCCCC GGA GGC AACA GATC GGA AATCAA AGG
GTTGTCAGTCCCAGCTGTACAA GCCTGGGTGA ACTTATAAT GATCCCTC CGC AGGTTAC CTA CGGA
→ 552 bp

EK-2 D1-D2 rDNA Dizileri

A5

TATTTTAGCCGATCCTAGCCGAGCGGGGACCTCGCCGGCGCTCGCTGCATCACAAAGGCTATAACA
CTCCGAGGGAGCTACATTCTCAAGTCTTATCAAGGGCAACAGACGATGCTGGCTGCAACGGCGG
AGTAGACCGGTACAGAAACCGGGGAAACCCGCAGCAAGTCTGGTTCAGATCCCTTCCCTTTAAACA
TTTCACGTGCTTTTAACTCTCTTCCAAAGTGTCTTTCATCTTTCGATCACTCTACTTGTGGCTATCGG
TCTCTGGCCAATATTTAGCTTTAGAAGAAATTTACCTCCATTAGAGCTGCATTCCAAACAACTCGAC
TCGTCAAGGAGCTACGTATAAGCGCTTTCCGACCGCATACGGATTCTCAACCTCTATGACGTCTG
TTCCAAAGAACTTAGTTCGGTGGCCACTCAAGAGCATCCTCTACAATTACAACCTCGGACGTCGAA
GCCAGATTTCAAATTTGAGCTATTGCTGCTTCACTCGCGTACTAGAACAATCCCTGTGGTTCCTTT
CCTCCGCTTATTGATATGC → 555bp

A12

ATCCTGTGTTATTTGACAGCATCCTAGCCGAAAGCGCGACCTCGCCGGCGCTCGCTGCATCACAA
GGCTATAACACTCCCGAGGGAGCTACATTCCTCAAATCTTATCCAAGCGCACCAAGCGATGCTGGC
CAACCGCGGAGTAGACCGGTCAAGAGACCGGGGAAACCCGCAGCAAGTCTGGTTCAGATCCCTTC
CTTTTAAACAATTTACAGTGTCTTTTAACTCTCTTCCAAAGTGTCTTTCATCTTTCGATCACTCTA
TTGTGCTATCGGTCTCTGGCCAATATTTAGCTTTAGAAGAATTTACCTCCATTAGAGCTGCATTC
AACAACCTCGACTGTCGAAGGAGCTACGTATAGAGCACCTTTCCGACCGCATACGGGATTCTCAC
TATGACGTCTGTTCGAAGGAACTTAGGTGGTTCCTCAAGCAATCTCTACAATTTAACTCGGG
ACGTCAAGAGCCAGATTTCAAATTTGAGCTATTGCTGCTTCACTCGCCGTTACTAGAGCAATCCCT
TGGTTCTTTTCTCCGCTTATTGATATGC → 586bp

A25

TGACACCTCGTTTTGTGACGATCCTATCGAGCGGGACCTCGCCGGCGCTCGCTGCATCACAAAG
CTATAACACTCCCGAGGGAGCTACATTCCTCAAGTCTTATCCAAGCGCACCAAGCGATGCTGGC
ACCGCGGAGTAGACCGGTCAAGAGACCGGGGAAACCCGCAGCAAGTCTGGTTCAGATCCCTTC
TTTTAAACAATTTACAGTGTCTTTTAACTCTCTTCCAAAGTGTCTTTCATCTTTCGATCACTCTA
TTGTGCTATCGGTCTCTGGCCAATATTTAGCTTTAGAAGAATTTACCTCCATTAGAGCTGCATTC
AACAACCTCGACTGTCGAAGGAGCTACGTATAAGCGCTTTCCGACCGCATACGGGATTCTCAC
TGAAGTCTGTTCGAAGGAACTTAGGTGGTTCCTCAAGCAATCTCTACAATTTAACTCGGG
CGTCAAGAGCCAGATTTCAAATTTGAGCTATTGCTGCTTCACTCGCCGTTACTAGAGCAATCCCT
GTTTCTTTTCTCCGCTTATTGATATGC → 584 bp

A31

TGTTACGCCAGCATCCTAGCCGAGCGGGACCTCGCCGGCGCTCGCTGCATCACAAAGGCTATAACA
CTCCGAGGGAGCTACATTCCTCAAGTCTTATCCAAGCGCACCAAGCGATGCTGGCCTGCAACGG
AGTAGACCGGTACAGAAACCGGGGAAACCCGCAGCAAGTCTGGTTCAGATCCCTTCCCTTTAAACA
TTTCACGTGCTTTTAACTCTCTTCCAAAGTGTCTTTCATCTTTCGATCACTCTACTTGTGGCTATCGG
TCTCTGGCCAATATTTAGCTTTAGAAGAAATTTACCTCCATTAGAGCTGCATTCCAAACAACTCGAC
TCGTCAAGGAGCTACGTATAAGCGCTTTCCGACCGCATACGGGATTCTCACCTCTATGACGTCT
GTTCCAAAGGAACTTAGTTCGGTGGTTCCTCAAGCAATCTCTACAATTTAACTCGGG
CGCCAGATTTCAAATTTGAGCTATTGCTGCTTCACTCGCCGTTACTAGAGCAATCCCTGTGGTTC
TCTCCGCTTATTGATATGC → 576 bp

D7

ATTATAAGCTCCTAGCCGAGCGGGACCTCGCCGGCGCTCGCTGCATCACAAAGGCTATAACA
CTCCGAGGGAGCTACATTCCTCAAGTCTTATCCAAGCGCACCAAGCGATGCTGGCCTGCAACGG
GACCGGTACAGAAACCGGGGAAACCCGCAGCAAGTCTGGTTCAGATCCCTTCCCTTTAAACA
ACGTGCTTTTAACTCTCTTCCAAAGTGTCTTTCATCTTTCGATCACTCTACTTGTGCGCTATC
TGGCCAATATTTAGCTTTAGAAGAAATTTACCTCCATTAGAGCTGCATTCCAAACAACTCGAC
TCGTCAAGGAGCTACGTATAAGCGCTTTCCGACCGCATACGGGATTCTCACCTCTATGACGTCT
CAAAGAACTTAGTTCGGTGGCCACTCAAGAGCATCCTCTACAATTACAACCTCGGACGTCGAA
AGATTTCAAATTTGAGCTATTGCTGCTTCACTCGCGTACTAGAACAATCCCTGTGGTTCCTTT
CGCTTATTGATATGC → 572 bp

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı-Soyadı : Büşra ALBAYRAK
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti
Doğum Tarihi ve Yeri : 04.01.1991
Medeni Hali : Bekar
Telefon : +905416196801
e-mail : busra.albayrak.b@gmail.com

Eğitim

Derece	Üniversite	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Erzurum Teknik Üniversitesi	2019
Lisans	İstanbul Teknik Üniversitesi	2016
Lise	Mecidiye Anadolu Lisesi	2009

Uluslararası Kongre Sunum

ALBAYRAK BÜŞRA, YAZICI AYŞENUR, ORTUCU SERKAN (2018). THE HYDROPHOBICITY OF THE SURFACE OF FUNGI COMES FROM HYDROPHOBINS* International Symposium on Innovative Approaches in Scientific Studies(ISAS 2018) (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:4512312)

ÜSTÜN AYŞE, TURGUT ALPGİRAY, ALBAYRAK BÜŞRA, DAŞ ABDÜLSALTUK BUĞRA, YAZICI AYŞENUR (2018). ANTIBIOFILM EFFECT OF LEVOFLOXACIN-LOADED POLYMERIC NANOPARTICLES AGAINST *Staphylococcus aureus*. International Symposium on Applied Sciences and Engineering (ISASE 2018) (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:4512296)