

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AFFİNİTE AJANLARININ *ASPERGILLUS ORYZAE*'DE ÜRETİM
PLATFORMUNUN OLUŞTURULMASI

DOKTORA TEZİ

Elif KARAMAN

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Doktora Programı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Serdar UYSAL

HAZİRAN 2023

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AFFİNİTE AJANLARININ *ASPERGILLUS ORYZAE*'DE ÜRETİM
PLATFORMUNUN OLUŞTURULMASI

DOKTORA TEZİ

Elif KARAMAN
(185314007)

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Doktora Programı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Serdar UYSAL

HAZİRAN 2023

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 185314007 numaralı Doktora Öğrencisi Elif KARAMAN, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “AFFİNİTE AJANLARININ *ASPERGILLUS ORYZAE*'DE ÜRETİM PLATFORMUNUN OLUŞTURULMASI” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Dr. Öğr. Üyesi Serdar UYSAL**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Fahri AKBAŞ**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Cem ALBAYRAK
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Şeref GÜL
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Alper YILMAZ
Yıldız Teknik Üniversitesi

Teslim Tarihi : 13 Temmuz 2023
Savunma Tarihi : 13 Haziran 2023



Aileme,

ÖNSÖZ

Bu tez, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 20AG044 numaralı 1004 projesi ile desteklenmiştir.

Bu tez çalışmasının hayata geçirilmesinde yardım ve desteğini esirgemeyen değerli danışmanım Dr. Öğr. Üyesi UYSAL'a yol göstericiliği için teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Doktora öğrenimim süresince, bilimsel bakış açıları ile bana yol gösteren Prof. Dr. Fahri AKBAŞ, Prof. Dr. Asif KHAN ve çalışmada kullanılan plazmid tasarımı için Dr. Öğr. Üyesi Cem Albayrak'a teşekkür ve saygılarımı sunarım. Ayrıca, SPR analizi için Alp Ertunga Eyüpoğlu'na, qPZR ve transformasyon deneyinde destekleri için Kübra Cansu Yıldırım ile Kübra Bayrak Altunay'a teşekkür ederim.

Süreç boyunca desteklerini hissettiğim başta çalışma arkadaşlarım ve dostlarım olan Dr. Gözde DEVECİ ile Dr. Lena Mahmoudi Azar'a ve emeği geçen diğer çalışma arkadaşlarıma destek ve yardımları için teşekkür ederim.

En önemlisi, bu zorlu yolda yürürken desteklerini her zaman yanımda hissettiğim, varlıklarıyla bana güç veren, sıkıntılı zamanlarımı benimle birlikte üstlenen ve benim için her zaman en iyisini dileyen ve yapan değerli babam Ali KARAMAN'a, kıymetli annem Fatma KARAMAN'a ve sevgili kardeşim Eda KARAMAN'a sonsuz teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

Haziran 2023

Elif KARAMAN
(Biyomühendis)

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.



Elif KARAMAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	iv
BEYAN.....	vxi
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR	viii
SEMBOLLER	ix
TABLO LİSTESİ.....	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
ÖZET.....	xiii
SUMMARY	xv
1. GİRİŞ	1
1.1 Tezin Amacı	3
1.2 <i>Aspergillus oryzae</i>	4
1.3 Güvenli Bir Konak Mikroorganizma Olarak <i>Aspergillus oryzae</i>	5
1.4 İfadeleme Sistemi Olarak <i>Aspergillus oryzae</i>	6
1.5 Oksotrofi	7
1.6 <i>Aspergillus oryzae</i> Transformasyonu.....	9
2. AFFİNİTE AJANLARI.....	11
2.1 Monoklonal Antikorlar ve Üretimleri	11
2.2 Ağır Zincir Antikorları.....	12
2.3 Tek Domainli Ağır Zincir Antikorlar (VHH)	14
Affinite ajanı olarak VHH.....	16
3. REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ İLE VHH ÜRETİMİ	19
3.1 Bakteriyel Sistemlerde VHH İfadeleme.....	19
3.2 Maya İfadeleme Sistemlerinde VHH İfadeleme.....	20
3.3 İpliksi Fungi İfadeleme Sistemlerinde VHH İfadeleme.....	20
3.4 Hipotez	20
4. GEREÇ ve YÖNTEM.....	21
4.1 Kullanılan Materyaller, Cihazlar ve Kültür Koşulları.....	21
4.2 Oksotrof <i>A. oryzae</i> 'nin Oluşturulması.....	23
4.2.1 <i>pyrG</i> delesyon vektörünün tasarımı ve transformasyona hazırlanması	23
4.2.2 <i>pyrG</i> oksotrofisinin sağlanması.....	25
4.2.3 <i>pyrG</i> oksotrofisinin doğrulanması.....	26
4.3 Anti-RNaz A VHH'in İfadeleme.....	29
4.3.1 İfadeleme vektörünün <i>pyrG</i> (-) <i>A. oryzae</i> 'e transformasyonu	29
4.3.2 Rekombinant anti-RNaz A VHH'nin küçük ölçekte ifadenmesi.....	30
4.3.3 Rekombinant anti-RNaz A VHH'nin fermentörde ifadenmesi	31
4.4 Rekombinant Anti-RNaz A VHH'nin Saflaştırılması	31

4.5 Rekombinant Anti-RNaz A VHH'nin Antijeni ile Spesifik Etkileşiminin İncelenmesi	33
4.5.1 Pull-down analizi	33
4.5.2 Jel filtrasyonu kromatografi analizi	33
4.5.3 Yüzey plazmon rezonans analizi.....	34
5. BULGULAR VE TARTIŞMA	35
5.1 Oksotrof <i>A. oryzae</i> 'nin Elde Edilmesi ve Test Edilmesi	35
5.1.1 <i>pyrG</i> delesyon vektörü	35
5.1.2 <i>pyrG</i> oksotrofik <i>A. oryzae</i> kolonisinin oluşturulması	35
5.1.3 Oksotrofik kolonilerin doğrulanması	38
5.2 Rekombinant Anti-RNaz A VHH Affinite Ajanının İfadelenmesi.....	42
5.3 Rekombinant Anti-RNaz A VHH'nin Affinite Ajanının Saflaştırılması	43
5.4 Rekombinant Anti-RNaz A VHH'nin Antijeni ile Spesifik Etkileşimi.....	46
5.4.1 Pull-down analizi ile spesifik etkileşimin gösterilmesi.....	46
5.4.2 Jel filtrasyonu kromatografi analizi ile spesifik etkileşimin gösterilmesi. 47	
5.4.3 Yüzey plazmon rezonans analizi ile bağlanma affinitesinin tayini.....	50
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	55
KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİŞ.....	67

KISALTMALAR

5-FOA	: 5-Fluoroorotik asit
8xHis-tag	: Birbiri ardına sekiz adet histidinden oluşan aminoasitler kuyruğu
ATCC	: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
BSA	: Bovin serum albumin
CD	: Czapex Dox
CDR	: Tamamlayıcılık belirleyici bölge
CH	: Ağır zincir sabit bölge
CL	: Hafif zincir sabit bölge
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
Fab	: Antijen bağlanma fragmanı
Fc	: Effektör bölge
FDA	: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
GRAS	: Genel Olarak Güvenli
H	: Ağır zincir
HCAbs	: Ağır zincir antikorları
HRP	: Yabanturpu peroksidaz
Ig	: İmmunoglobulin
IMAC	: İmmobilize metal affinite kromatografisi
L	: Hafif zincir
LB	: Luria Broth
mAbs	: Monoklonal antikorlar
MWCO	: Molekül ağırlığı ayırma sınırı
Ni-NTA	: Nikel nitrilotriasetik asit
ORF	: Açık okuma çerçevesi
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PEG	: Poli(etilen) glikol
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
rRNA	: Ribozomal ribonükleik asit
RNaz A	: Ribonükleaz A
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit jel elektroforezi
scFv	: Tek zincir fragman değişkenleri
SPR	: Yüzey plazmon rezonans
TNFα	: Tümör nekrosis faktör
qPCR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
VH	: Ağır zincir değişken bölge
VHH	: Tek domainli ağır zincir antikor
VL	: Hafif zincir değişken bölge
TE	: Tris-Etilendiamin tetraasetik asit

SEMBOLLER

°C	: Derece Santigrat
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
Ct	: Döngü eşiği
dk	: Dakika
g	: Gram
h	: Saat
kb	: Kilobaz çifti
kDa	: Kilodalton
L	: Litre
M	: Molar
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
ng	: Nanogram
nM	: Nanomolar
OD ₆₀₀	: 600 nanometre dalgaboyundaki optik yoğunluk
<i>pyrG</i> (-)	: <i>pyrG</i> oksotrof
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
s	: Saniye
SS	: Sinyal dizisi
xg	: Bağıl merkezkaç kuvveti

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 4.1 : pUC- <i>pyrGA</i> vektörünün restriksiyon enzimlerle kesim reaksiyonu.....	25
Tablo 4.2 : qPZR uygulamasında kullanılan primerler	28
Tablo 4.3 : qPZR reaksiyonları	28
Tablo 4.4 : Uygulanan qPZR parametreleri	28
Tablo 4.5 : Plazmid-VHH'in restriksiyon enzimlerle kesim reaksiyonu	29
Tablo 5.1 : qPZR verilerinin Livak metodu yardımıyla relative quantification (göreceli miktar belirleme) analizi	41
Tablo 5.2 : Rekombinant anti-RNaz A VHH'in SPR kinetik analiz sonuçları.....	51

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1	: <i>A. oryzae</i> 'nin minimal ortamda morfolojik özellikleri.	5
Şekil 1.2	: Aktif <i>pyrG</i> geninin primidin yolakta 5-FOA varlığında timidilat üretimini inhibe etmesi ve <i>pyrG</i> oksotrofisinin şematik gösterimi.....	8
Şekil 2.1	: Affinite ajanı olarak kullanılan antikör yapıları.	13
Şekil 2.2	: Monoklonal antikör ve ağır zincir antikorda hafif zincirin bulunmama durumu.	14
Şekil 4.1	: <i>pyrG</i> delesyon vektörünün (pUC- <i>pyrG</i> Δ) oluşturulmasının şematik gösterimi.....	23
Şekil 4.2	: Anti-RNaz VHH ifadenme vektörünün (plazmid-VHH) şematik gösterimi.....	29
Şekil 5.1	: Transformasyon sonrası selektif ortama yayılan hücrelerin beklenen davranışı.....	36
Şekil 5.2	: Transformasyon sonrası selektif rejenerasyon ortamına yayılan sferoblastların davranışı.	37
Şekil 5.3	: Transformasyon sonrası hücrelerin urasil ve üridin içeren selektif olmayan ortama yayılması 37	37
Şekil 5.4	: Yalnızca urasil ve üridin içeren selektif olmayan DPY besiyerinde büyütülen transformant hücre karışımının seyreltilerek; urasil, üridin ve 5-FOA içeren selektif ortamlara yayılması.	38
Şekil 5.5	: <i>pyrG</i> (-) kolonilerin selektif ortamlarda çoğaltılması 39	39
Şekil 5.6	: qPZR verilerinin grafiğe aktarılmış hali 40	40
Şekil 5.7	: İfadenme çalışmaları için seçilen <i>pyrG</i> (-) <i>A. oryzae</i> 'nin ve yabani tip <i>A. oryzae</i> kolonisinin selektif ve selektif olmayan ortamda gösterilmesi..... 42	42
Şekil 5.8	: İfadenme çalışmalarında, inkübe edilen kolonilerin kültür ortamından alınan örneklerin SDS-PAGE jel profilleri 43	43
Şekil 5.9	: Anti-RNaz A VHH affinite ajanının büyük hacimde ifadenmesi sonrası yapılan, IMAC tekniği ile saflaştırma prosesinden toplanan örneklerin SDS-PAGE analizi..... 44	44
Şekil 5.10	: İfadelenen anti-RNaz A VHH affinite ajanının karşılaştırmalı olarak SDS-PAGE jelinde (A) ve Western blot analizinde (B) incelenmesi 44	44
Şekil 5.11	: PD10 Desalting kolon kullanılarak PBS içinde olacak şekilde elde edilen saf rekombinant anti-RNaz A VHH elde edilmesi..... 45	45
Şekil 5.12	: Saflaştırılan rekombinant anti-RNaz A VHH proteininin gel filtrasyon kromatogramı..... 45	45
Şekil 5.13	: Anti RNaz A VHH ile RNaz A arasındaki spesifik etkileşiminin pull-down analizi ile gösterilmesi..... 46	46
Şekil 5.14	: Jel filtrasyon kromatografisi ile spesifik etkileşimin gösterilmesi için yalnızca rekombinant anti-RNaz A VHH'in Superdex 200 Increase 10/300 GL kolondan geçirilmesi ile elde edilen jel filtrasyon kromatogramı..... 48	48

Şekil 5.15 : Jel filtrasyon kromatografi ile spesifik etkileşimin gösterilmesi için yalnızca RNaz A proteininin Superdex 200 Increase 10/300 GL kolondan geçirilmesi ile elde edilen jel filtrasyon kromatogramı	49
Şekil 5.16 : Jel filtrasyon kromatografi ile spesifik etkileşimin gösterilmesi için birlikte inkübe edilen anti-RNaz A VHH ile RNaz A proteini karışımının inkübasyon sonrası Superdex 200 Increase 10/300 GL kolondan geçirilmesi ile elde edilen jel filtrasyon kromatogramı.....	49
Şekil 5.17 : Yüzey plasmon rezonans analizinden elde edilen sensorgramlar.....	50



AFFİNİTE AJANLARININ *ASPERGILLUS ORYZAE*'DE ÜRETİM PLATFORMUNUN OLUŞTURULMASI

ÖZET

Biyoteknolojik uygulama alanlarında affinite ajanı olarak kullanılan monoklonal antikorlar(mAbs)'ın yüksek verimde heterolog olarak ifadenmeleri; fonksiyonellik için üç boyutlu katlanma ve çözünürlük özelliklerinde karşılaşılan problemler ve/veya maliyetli üretim yöntemlerine ihtiyaç duyulması nedeniyle sınırlanmaktadır. Tek domainli ağır zincir antikorlar(VHH) ise, mAbs'e kıyasla önemli üstünlüklere sahip ve yalnızca tek bir ağır zincirden oluşması sebebiyle daha küçük boyuttaki, eşsiz antikor parçalarıdır. VHH'ler küçük boyutu, düşük immünojenikliği ve yüksek çözünürlüğü ile dikkat çekici affinite ajanları olarak, tanı, tedavi ve görüntüleme teknikleri dahil olmak üzere pek çok biyoteknolojik uygulamada mAbs'nin yerlerini almaya başlamıştır.

Aspergillus oryzae (*A. oryzae*), uzun yıllardır fermentasyon teknolojisinde ve biyoteknolojik ürünlerin endüstriyel ölçekte üretiminde tercih edilen ve Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından Genel Olarak Güvenli (GRAS) statüsü verilmiş olan ipliksi fungidir. Taksonomik olarak kendisine en yakın *Aspergillus* türleri ile kıyaslandığında, *A. oryzae* genomunda özellikle hidrolitik enzimleri kodlayan genler bakımından daha fazla gene sahiptir. Bu güçlü salgılama mekanizması *A. oryzae*'i affinite ajanlarının büyük ölçekte ve güvenilir olarak üretimi için ideal bir platform haline getirmektedir.

Bu tez çalışmasında, *pyrG* geni bakımından oksotrof haline getirilen *A. oryzae*'nin konak mikroorganizma olarak kullanıldığı biyoteknolojik bir platformun inşa edilmesi ve inşa edilen bu ifadenme platformunun affinite ajanlarının üretiminde kullanılabileceğinin kanıtlanması amaçlanmıştır. Bu amaçla affinite ajanı olarak seçilen ribonükleik asit A (RNaz A)'ya karşı spesifik olan anti-RNaz A VHH proteininin, küçük ölçekte ve fermentör düzeyinde üretilerek saflaştırılmasının gerçekleştirilmesi istenmiştir.

A. oryzae'de, fonksiyonel ve yüksek verimde ürün alabilmek, ayrıca saflaştırma aşamalarında uygulanabilir kullanışlı metodolojilerin izlenebilmesi için, ifadenmeyi sağlayacak olan gen kasedinin dizaynı ve oluşturulması önem arz etmektedir. Bunun için, *pyrG* oksotrofisinin homolog rekombinasyon yoluyla sağlanmasında, *pyrG* genini kodlayan açık okuma dizisinin bitişiğindeki dizileri barındıran ve doğrusal hale getirilmiş delesyon vektörünün, yabani tip *A. oryzae* suşuna aktarılması gerekmektedir. Bu tez çalışmasında, yabani tip *A. oryzae* RIB40 konak mikroorganizması, *pyrG* geni olmaksızın, *pyrG* geninin açık okuma çerçevesinin yukarı ve aşağı bölgelerinden oluşturulan delesyon vektörü ile transforme edilmiştir.

Böylece homolog rekombinasyon yoluyla *pyrG* geninin yabancı tip *A. oryzae* genomundan silinmesi sağlanmıştır. Gen delesyonunun seçici kültür koşullarında, tekrarlı kültürleme ve qPCR analizi yöntemleri ile doğrulaması gerçekleştirilmiştir. Doğrulan *pyrG* oksotrof *A. oryzae* mikroorganizması rekombinant anti-RNaz A VHH proteininin ifadenmesi çalışmalarında kullanılmıştır.

Anti-RNaz A VHH proteinini kodlayıcı dizi, C-terminaline bağlı 8xHis-tag ile amilaz sinyal sekansı kullanılarak, amilaz promotörü altında olacak şekilde, *A. oryzae*'e göre kodon optimize olarak sentezlettirilmiştir. Transformasyon çalışmaları protoplast aracılı transformasyon yöntemi ile sağlandıktan ve rekombinant anti-RNaz A VHH proteinini ifadeleyen koloninin doğrulanması çalışmaları yapıldıktan sonra, küçük ölçekte ifadenme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Küçük ölçekte ifadenmenin başarı ile gerçekleştirilmesini takiben, 6 L'lik fermentörde büyük ölçekte üretim çalışmaları hayata geçirilmiştir.

İfadelenen rekombinant anti-RNaz A VHH proteini, C-terminalindeki 8xHis-tag'den yararlanılarak immobilize metal affinite kromatografisi (IMAC) yöntemiyle saflaştırılmıştır. Buna göre; küçük ölçekte ifadenmeden elde edilen verim 44 mg/L olarak tespit edilirken, fermentörde yapılan ifadenmeden elde edilen verim 1.4 g/L olarak belirlenmiştir. İleri saflaştırma işlemleri jel filtrasyon kromatografisi ile sağlanmış ve ifadelenen rekombinant anti-RNaz A VHH proteininin monomerik özellikte olduğu bu yöntem ile kanıtlanmıştır. Toplam üretilen protein ve ifadelenen rekombinant protein konsantrasyonu dansitometrik olarak analiz edilmiş ve bovin serum albümin(BSA)'inin standart olarak kullanıldığı Bradford tekniğiyle belirlenmiştir.

Anti-RNaz A VHH'in, hedef antijeni olan RNaz A ile spesifik etkileşiminin belirlenmesinde; pull-down analizi, jel filtrasyon kromatografi analizi ve yüzey plazmon rezonans (SPR) analizi gerçekleştirilmiştir. Pull-down analizi spesifik etkileşimin varlığını gösterirken, jel filtrasyon kromatografi analizi ifadelenen anti-RNaz A VHH'in hedef antijeni ile bağlanabilen doğru üç boyutlu katlanma yapısında olduğunu kanıtlamıştır. SPR analizinde ise hedef antijen ile bağlanma affinitesi 1.9 nM olarak ölçülmüştür. Ölçülen bağlanma affinitesi, *Escherichia coli* (*E. coli*)'de üretilen anti-RNaz A VHH'in bağlanma affinitesinden yaklaşık 18.3 kat daha fazladır.

Elde edilen veriler, kurulan *pyrG* oksotrof *A. oryzae* platformunda, anti-RNaz A VHH affinite ajanının büyük ölçekte ve yüksek bağlanma affinitesi ile doğru üç boyutlu formda ve monomerik olarak üretilerek, başarılı bir şekilde saflaştırıldığını ortaya koymaktadır.

Buradan hareketle tez kapsamında varılan sonuçlar; çeşitli biyoteknolojik uygulama ve araştırma çalışmalarında ihtiyaç duyulan yüksek hacimde ve hedef antijenine yüksek bağlanma affinitesi gösteren VHH affinite ajanlarının, düşük maliyetle ifadenmesinde, tez kapsamında inşa edilen *pyrG* oksotrof *A. oryzae* ifadenme sisteminin, güçlü salgılama yeteneği sayesinde ideal bir platform olduğunu kanıtlar niteliktedir.

Anahtar Kelimeler: *Aspergillus oryzae*, *pyrG*, affinite ajanı, VHH, nanokorlar, RNaz A, bağlanma affinitesi, biyoteknolojik platform

DEVELOPING A BIOTECHNOLOGICAL PLATFORM FOR THE PRODUCTION OF AFFINITY REAGENTS IN *ASPERGILLUS ORYZAE*

SUMMARY

Antibodies are important molecules produced by living organisms' immune systems in reaction to foreign particles or antigens. For many years, monoclonal antibodies (mAbs) have been employed for therapeutic, diagnostic, and imaging applications. However, it is well known that mAb production has been limited by recombinant technologies due to their large (150 kDa) and complex structure, which includes disulfide bonds and precise post-translational modification required for the functionality. The main difficulties encountered in producing mAbs on a large scale include solubility and folding issues in *Escherichia coli* (*E. coli*) expression systems and the requirement of expensive and time-consuming production methods for obtaining low levels of mAbs in mammalian expression systems.

Single-domain heavy chain antibody (VHH), also referred to as a nanobody, is a distinct class of antibody that Hamers first identified in camelids in 1993 as a component of heavy-chain antibodies (HCAbs). Due to its size of 4 nm and 2.5 nm in diameter, VHH is approximately 13 kDa and free of the light (L)-chain. Despite the fact that VHH only has three complementarity-determining regions (CDRs), it ensures extremely specific antigen binding affinity when compared to typical mAbs, which have six CDRs to sustain binding to an antigen. Furthermore, the prolonged CDR3 loop of VHH expands the binding surface by forming a convex structure to bind the concave antigens with great specificity, allowing it to interact with antigens like enzymes that mAbs cannot. The hydrophobic amino acids in the VL domain of conventional mAbs were replaced with smaller hydrophilic amino acids to compensate for the lack of the VL domain in VHH. Therefore, VHH can easily penetrate tissues owing to its small size compared to mAbs. The immunogenicity of VHH is low as domains share high sequence identity with human VH, but it can be arranged if it is required as VHH is easily modified. Due to its small size, high specificity and affinity, resilience to heat and denaturing chemicals, low immunogenicity, and high tissue penetration capability, VHH possesses special qualities that make it suitable as an affinity reagent.

High-yield heterologous expression of mAbs, which are utilized as affinity reagents in biotechnological applications, is hampered by issues with three-dimensional folding and solubility challenging, as well as the requirement for expensive production procedures. On the other hand, VHHs are unique antibody fragments that are smaller in size than mAbs and have considerable advantages over them. VHHs have begun to

replace mAbs in various biotechnological applications, including diagnostic, therapeutic, and imaging technologies, due to their small size, low immunogenicity, and excellent solubility behaviour.

Aspergillus oryzae (*A. oryzae*) is a filamentous fungus that has been preferred in fermentation technology and industrial-scale production of biotechnological products for many years, and has been given a Generally Safe (GRAS) status by the United States Food and Drug Administration (FDA). Compared to the taxonomically closest *Aspergillus* species, *A. oryzae* possesses more genes in its genome, especially in terms of genes encoding hydrolytic enzymes. *A. oryzae*'s robust secretion system makes it an ideal platform for the large-scale and reliable production of affinity reagents.

The purpose of this thesis is to construct a biotechnological platform using *A. oryzae* as a host, which has evolved to become *pyrG* auxotrophic, and to demonstrate that a *pyrG* auxotrophic *A. oryzae* expression platform can be used to produce affinity reagents. Additionally, it was desired to purify the anti-RNase A VHH protein, which is specific to ribonucleic acid A (RNase A), which was chosen as the affinity reagent, on a small scale and at the fermenter level.

The wild type *A. oryzae* RIB40 host microorganism was initially transformed by a deletion vector constructed from the upstream and downstream regions of the *pyrG* gene's open reading frame, without *pyrG* gene. Thus, homologous recombination was used to eliminate the *pyrG* gene from the wild-type *A. oryzae* genome. The *pyrG* gene encodes the orotidine monophosphate decarboxylase enzyme, which plays a role in the pyrimidine pathway; therefore, a *pyrG* auxotroph colony develops resistance to 5-FOA (5-fluoroorotic acid) and requires uracil and uridine for survival. To confirm gene deletion, repeated streaking method on selective culture medium and qPCR analysis were performed. The expression studies of the recombinant anti-RNase A VHH protein were carried out using the *pyrG* auxotroph *A. oryzae* bacterium, whose gene deletion was confirmed.

The coding sequence of the anti-RNase A VHH protein, which was codon-optimized for *A. oryzae*, was synthesized under the amylase promoter, using the amylase signal sequence and an 8xHis tag attached to the C-terminus of the protein. After the transformation was achieved by the protoplast-mediated transformation method and the confirmation studies of the colony expressing the recombinant anti-RNase A VHH protein were performed, small-scale expression was carried out. VHH was successfully produced and secreted in the soluble form at approximately 13 kDa. Following the successful implementation of small-scale expression, large-scale production was practiced in a 6 L fermenter.

Recombinant anti-RNase A VHH, which was expressed in *A. oryzae*, was purified by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) method utilizing the 8xHis-tag at the C-terminus. The production yield achieved from small-scale expression was calculated to be 44 mg/L, and the yield from expression in the fermenter was calculated to be 1.4 g/L. Gel filtration chromatography was conducted for further purification, and it was demonstrated that the expressed recombinant anti-RNase A VHH protein is monomeric. Total produced protein and expressed recombinant protein concentration were analyzed densitometrically and determined by the Bradford assay using bovine serum albumin (BSA) as a standard.

Pull-down, gel filtration, and surface plasmon resonance (SPR) analyses were completed to ascertain the specific interaction of anti-RNase A VHH with its target antigen, RNase A. Gel filtration chromatography assay revealed that the expressed

anti-RNase A VHH possessed the correct three-dimensional folding structure and could bind with its target antigen, while pull-down assay confirmed the existence of a specific interaction between anti-RNase A VHH and RNase A. The binding affinity of anti-RNase A VHH expressed in *A. oryzae* against RNase A was determined to be 1.9 nM in the SPR analysis.

According to the results, the anti-RNase A VHH affinity reagent was successfully purified on a large scale with a high binding affinity, resulting in the correct three-dimensional structure and monomeric behaviour on the established *pyrG* auxotroph *A. oryzae* platform.

From this perspective, the conclusions reached within the scope of the thesis prove that the *pyrG* auxotroph *A. oryzae* expression system, thanks to its strong secretion ability, is an ideal platform for the cost-effective production of VHH affinity reagents, which are required in various biotechnological applications and research studies, in high volume and with high binding affinity to the target antigen.

Keywords: *Aspergillus oryzae*, *pyrG*, affinity reagents, VHH, nanobodies, RNase A, binding affinity, biotechnological platform

1. GİRİŞ

Birçok uygulama için kritik öneme sahip olan ucuz ve yenilenebilir kaynaklardan gelen affinite ajanlarına erişimin önemi her geçen gün artmaktadır. Biyoteknolojik uygulamalarda, çeşitli özelliklere sahip çok sayıda fonksiyonel protein heterolog sistemlerde rekombinant DNA teknolojisinden yararlanılarak üretilmiştir.

Rekombinant proteinler bakteriler, mayalar, ipliksi funguslar, memeli hücreleri ve böcek hücreleri olmak üzere çeşitli ifadelenme sistemlerinde üretilmektedir ve her sistemin birbirine göre avantajları ve dezavantajlarından bahsetmek mümkündür [1].

Prokaryotik bakteriyel ifadelenme sistemleri; küçük proteinler için uygunken, fonksiyonellik için post-translasyonel modifikasyon gerektiren proteinler için uygun değildir. Bakteriyel ifadelenmede büyüme hızının yüksek olması, düşük maliyet gerektirmesi, genetik manipülasyonun kolay oluşu ve rekombinant bir malzeme oluşturmak için iyi tanımlanmış mevcut yöntemlerin varlığı avantajlar arasında değerlendirilmektedir. Sınırlı sekresyon yolu ve ifadelenen proteinin doğru katlanamaması nedeniyle saflaştırmayı ve geri kazanımı zorlaştıran inklüzyon cisimcikleri şeklinde üretilmeleri ise önemli dezavantajlardır. Inklüzyon cisimcikleri, zaman alıcı ve kapsamlı aşağı akış süreci olan yeniden katlama adımlarını gerektirmektedir [1,2].

Hızlı büyüme hızı, genetik manipülasyonun nispeten kolay oluşu sebebiyle kompleks proteinlerin büyük miktarlarda ifadelenmesi için ökaryotik maya hücreleri kullanılmaktadır. Rekombinant proteinleri hiper-glikolizasyona uğratmaları sebebiyle, üretilen proteinin etkinliği değişebilmekte ve bu proteinlerin kullanıldığı hedef organizmada immünite üzerinde negatif yönde etkileri olabilmektedir. Ayrıca plazmid kararsızlığı ve düşük ifadelenme seviyesi de maya ifadelenme sistemlerinin diğer dezavantajlardır [3].

Yüksek büyüme hızına sahip olması ve yüksek miktarda üretime izin vermesi ile ön plana çıkan böcek hücrelerinde protein ifadelenmesinin maliyeti fazla olduğu gibi, genetik manipülasyonu da zahmetlidir [3].

Yüksek kalitede insan benzeri glikolizasyon yapabilme özelliğe sahip olduğu için terapötik proteinlerin ve affinite ajanlarının çoğunun üretiminde yararlanılan memeli hücrelerinde ise, genetik manipülasyon zahmetli, büyüme hızı ve üretilen ürün miktarı düşük, maliyet yüksek olduğu gibi kontaminasyon riski de fazladır [3].

Mayalar haricinde, kompleks proteinlerin büyük miktarda ve düşük maliyette, ayrıca mayalara göre daha az glikolize formlarının ifadenmesi ipliksi fungilerin aracılığıyla başarılılabilmektedir. İpliksi fungilerin genetik manipülasyonu bakteri ve maya hücreleri kadar kolay olmasa da, en önemli avantajlarından biri çoğunun, büyük miktarda enzim üreterek dış ortama salgılamalarını sağlayan saprofitik yaşama sahip olmalarıdır. Bu özelliklerinden geniş hacimlerde endüstriyel enzimlerin üretiminde faydalanılmaktadır. Ayrıca kültür ortamına büyük miktarda proteinin salgılanmasını sağladıkları için ipliksi fungiler heterolog proteinlerin üretiminde tercih edilen önemli konak organizmalardır [3].

İpliksi fungilerden olan *A. oryzae*, maya hücresi olan *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisia*)'ya kıyasla güçlü salgı sistemi ile büyük hacimlerde rekombinant protein üretimine izin veren özel bir konakçı mikroorganizmadır [4]. Güçlü salgılama kapasitesine sahip olması, *A. oryzae*'nin heterolog protein üretiminde ön plana çıkmasını sağlarken, üretilen heterolog proteinlerin hücre dışı ortama salgılanıyor olması da heterolog protein üretimi sonrası saflaştırma işlemlerini kolaylaştırmaktadır. Ayrıca kültürlenmesi ve rekombinant protein üretimi için gerekli kültür ortamının uygun maliyetli olması, post-translasyonel modifikasyon mekanizması sayesinde kompleks proteinleri üreterek işleyebilme yeteneği ve farklı çevre koşullarına karşı toleransı ile, *A. oryzae* avantajlı bir ifadenme sistemi olarak ortaya çıkmaktadır [3].

A. oryzae, 1876 yılında soya sosunun fermentasyonunda kullanılan koji adı verilen bir üründen H. Alburg tarafından izole edilmiştir. Başlangıçta *Eurotium oryzae* adı verilse de, eşeyli üreme yapmadığının belirlenmesi neticesinde F. Cohn tarafından *Aspergillus oryzae* olarak isimlendirilmiştir [5].

Doğada geniş yayılım gösteren *Aspergillus* türlerinin soğuk koşullarda birkaç ay hayatta kalabilirken, 45 derecenin üzerindeki enlemlerde hayatta kalamayacağı belirlenmiştir [6]. *A. oryzae*'nin doğadan izolasyonuna ilişkin birkaç varsayım bulunmaktadır. Bunlardan biri; 45 derece ve altındaki tropikal enlemlerde orman, sulak arazi ve çöl toprağında *A. oryzae*'e rastlanıldığını belirtirken, diğer varsayımda

bahsedilen coğrafi bölgede rastlanılan bu türün yabancı tip *A. oryzae* olmayıp diğer *Aspergillus* türlerinin bir çeşit izolatu olabileceği şeklindedir [6,7]. Diğer bir varsayımda ise, yüzlerce yıllık geçmişe sahip Japon fermentasyonunda çeşitli fermente ürünlerin üretiminde uzun yıllar boyunca kullanılan *Aspergillus flavus* (*A. flavus*)'un farklılaşmış ve evcilleşmiş hali olduğu vurgulanmaktadır. Bu varsayımda; *A. oryzae*'nin *A. flavus*'a olan yakın benzerliği kritik noktadır. İki türün morfolojik farklılıklarının ise; farklılaşma neticesinde toksik aflatoksin genlerinin inhibe olması ve çevresel koşullara adaptasyon amaçlı sklerot gibi üreme yapılarının kaybedilmesi sonucu gelişmiş olabileceği savunulmaktadır [5,8,9].

A. oryzae'nin çoğalması eşeysiz olarak gerçekleşmektedir ve üremede çevresel koşulların spor oluşumu ve gelişimi üzerinde etkisi bulunmaktadır. Buna göre; mitozla oluşturulan haploid ve tek çekirdekli sporların konidiyofor adı verilen birimlerle havaya yayılması ile kolonize olmaları sağlanmaktadır. Sitokinezsiz nükleer bölünme sayesinde çok çekirdekli tübüler hiflerin oluşması, apikal yönde uzama ve miselyum ağın üretilmesi ile üreme döngüsü tamamlanmaktadır [10].

A. oryzae endoplazmik retikulum, Golgi aygıtı, mitokondri, vakuoller, peroksizomlar, çekirdek ile septal organellerin yanı sıra, hiflerin büyümesi ve morfogenezisten sorumlu Spitzenkörper organeli ile hücrel hasar durumunda bitişik hücreler arasındaki sitoplazmik bağlantıyı sağlayan porları kapatarak hücrel hasarın yayılmasını engelleyen Woronin cisimcikleri adı verilen özelleşmiş organellere sahiptir. Yüksek metabolik aktivitedeki apikal hücrelerin polarizasyonu sonucu koloni meydana getirebilmektedir [11].

1.1 Tezin Amacı

A. oryzae sahip olduğu güçlü salgılayıcı mekanizma ile rekombinant proteinlerin geniş hacimde üretimine imkan tanıyan özel bir konak mikroorganizmadır. *A. oryzae*'nin bu özelliğinden yararlanılarak affinite ajanlarının rekombinant olarak üretimini sağladığının gösterilmesi ve bu amaçla *A. oryzae*'nin hastalıkların tanısı başta olmak üzere, görüntüleme teknikleri ve diğer biyoteknolojik uygulamalar için ihtiyaç duyulan farklı affinite ajanlarının üretimi için kullanılabilecek bir platform olarak inşa edilmesi tez çalışmasının amaçlarını oluşturmaktadır.

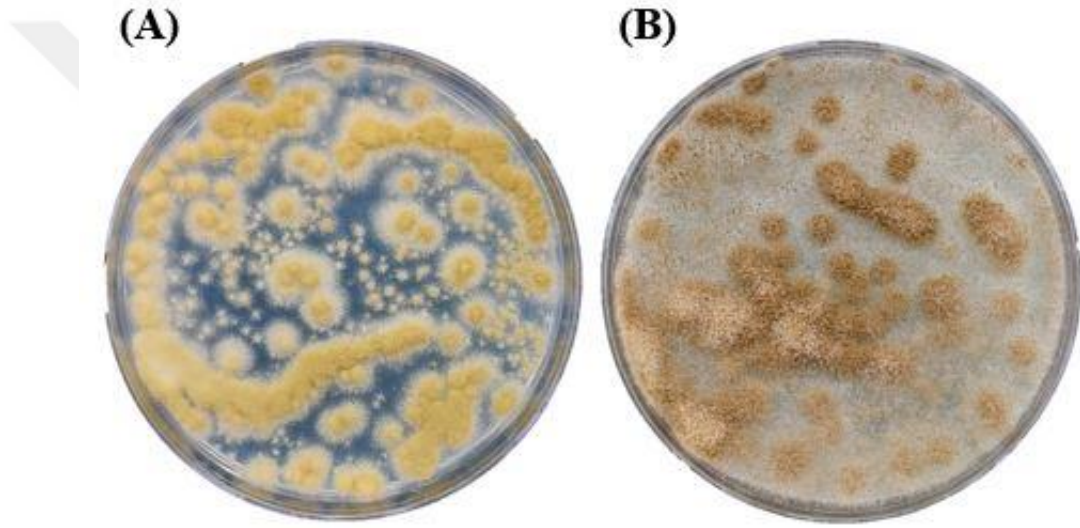
Bu tez çalışmasında, öncelikle *pyrG* oksotrofik *A. oryzae*'nin elde edilmesi ve ardından affinite ajanı olarak seçilen anti-RNaz VHH'ın, bu oksotrofik *A. oryzae*'de ifadenmesi, saflaştırılması, hedef antijeni olan RNaz A ile spesifik etkileşiminin ve bağlanma affinitesinin incelenmesi amaçlanmıştır. Dolayısıyla, tez kapsamında oluşturulan *pyrG* oksotrof *A. oryzae* mikroorganizmasının, protein üretiminde diğer ifadenme konak hücrelerine kıyasla, kısa zamanda, düşük maliyetle ve büyük hacimde affinite ajanlarının üretiminde biyoteknolojik bir platform olarak değerlendirilebileceğinin kanıtlanması hedeflenmiştir. Buna ek olarak, affinite ajanı olarak kullanılan monoklonal antikorların geleneksel yöntemlerle üretilmesinde karşılaşılan, zahmetli, maliyetli ve istenilen miktarda ve saflıkta üretim için karmaşık teknolojinin izlenmesi gibi zorluklara, tez kapsamında GRAS statüsündeki *A. oryzae* ile oluşturulacak platformda üretilen yüksek bağlanma affinitesi gösteren ve endüstriyel üretime uygulanabilir affinite ajanlarının üretimi ile bir çözüm geliştirilmesi amaçlanmaktadır.

1.2 *Aspergillus oryzae*

A. oryzae ökaryotik organizmalardan fungi alemine aittir. Fungi aleminde; her hif segmentinde iki çekirdek barındıran dikarya alt-aleminin ascomycota şubesinde yer almaktadır. Hifli yapıda büyüyen letiomyceta grubuna ve eurotiomycetes sınıfına dahildir. Eurotiales takımından aspergillaceae ailesine ait olan *Aspergillus* cinsi *A. oryzae* ipliksi bir mantardır [12,13].

Aspergillus cinsi mikroorganizmalar birbirinden morfolojik olarak, konidilerin bulunduğu konidial yapının şekil özellikleri, renk ve keseciklerin dizilimi gibi özellikler kullanılarak ayırt edilebilmektedirler [14]. *A. oryzae* etrafı ince, beyaz hifler ile çevrili konidial yapıların çevrelediği sarı-yeşil kesecikler şeklindeki morfolojiye sahiptir (Şekil 1.1). Bu keseciklerin rengi inkübasyon süresindeki artışa bağlı olarak kahverengiye de dönebilmektedir [14-16]. *Aspergillus* türleri arasında saydam konidial yapıya ve geniş konidilere sahip olması ile ayırt edilebilmektedir [16]. Morfolojik farkların haricinde ise ayırt edici genlerden (rRNA, kalmodulin, beta-tubulin) ve karsinojenik metabolit aflatoksin üretilip üretilmemesinden yararlanılarak ayırtılmaktadır [14,17].

A. oryzae, diğer *Aspergillus* türlerine kıyasla genom boyutu, gen sayısı ve metabolik gen bakımından oldukça zengindir. *A. oryzae*'nin 2005 yılında dizilenmiş olan genomu sekiz kromozomdan, 12.074 genden oluşan 37.6 Mb boyutundadır [5,8,11,18]. *Aspergillus nidulans* ve *Aspergillus fumigatus* genomları ile kıyaslandığında %20-30 oranında daha büyük bir genoma sahip olduğu ve bu fazla genlerin, hücre membran biyogenezi, hidrofobik amino asit sentezi, proteinaz ve mitojen etkileşimli protein kinaz düzeyleri ile salgılayıcı mekanizmada geniş ölçüde yer alan hidrolitik enzimleri, güçlü degrade edici enzimleri ve taşıyıcıları kodladığı anlaşılmıştır [5,8,11]. Özellikle, α -amilaz genlerinin *A. oryzae* genomunda duplikasyona uğradığı tespit edilmiştir [5,8,19].



Şekil 1.1 : *A. oryzae*'nin minimal ortamda morfolojik özellikleri. (A) Etrafı ince, beyaz hifler ile çevrili konidial yapıların çevrelediği sarı-yeşil kesecikler şeklindeki morfolojiye sahiptir (B) İnkübasyon süresi uzadıkça keseciklerin rengi kahverengiye dönebilmektedir.

A. oryzae, özellikle *A. flavus* ile %99,5 oranında genomik benzerlik taşımaktadır [17]. İki tür arasında, gelişimsel fark olarak *A. oryzae*'nin sporları az miktardadır ve büyüme hızları yüksektir, morfolojik fark olarak *A. oryzae*'nin daha geniş konidiler oluşturmaktadır [16], ikincil metabolitleri kodlayan genler bakımından ise *A. oryzae* aflatoksin üretmezken *A. flavus* aflatoksin üretmektedir [16,17,20].

1.3 Güvenli Bir Konak Mikroorganizma Olarak *Aspergillus oryzae*

Aspergillus türleri organik asitler, ikincil metabolitler, farmasötikler ve %50'den fazla endüstriyel enzim üretiminde yer alarak endüstriyel biyoteknoloji için önemli bir rol

oynamaktadır [16,21,22]. Ekstrem ortamlara uyum sağlamaları nedeniyle farklı tipte fermantasyon teknolojilerinde kullanılabilmektedirler [23].

Japonya’da yüzyıllardır soya sosu, tahıl, alkollü içecek gibi çeşitli gıda maddelerinin fermantasyonu için kullanılan *A. oryzae*, ilk kez 1988 yılında, deterjanlar için lipaz üretiminde endüstriyel amaçla kullanılmıştır [24]. Diğer *Aspergillus* türlerine kıyasla hidrolitik enzim genleri bakımından üstünlüğü sayesinde, *A. oryzae*’den α -amilaz, aminopeptidaz, glutaminaz, lipaz, glukoamilaz, papain ve ksilinaz enzimlerinin endüstriyel üretiminde faydalanılmaktadır [11,14,25].

A. oryzae patojenik bir tür değildir ve diğer organizmaları kolonize etmemektedir [9]. Güvenilirliği Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü (OECD) tarafından bir GILSP (Good Industrial Large Scale Practice, İyi Endüstriyel Büyük Ölçekli Uygulama) organizması olarak sınıflandırılarak onaylanmıştır [26]. FDA tarafından ise GRAS statüsü verilmiştir [16].

1.4 İfadelenme Sistemi Olarak *Aspergillus oryzae*

Rekombinant protein ifadenmesinde, istenen özelliğe sahip proteinlerin verimli ve saf şekilde üretilmesinde konak mikroorganizma seçimi önemlidir. Toksik metabolitler üretmemesi, ekonomik olarak uygun büyüme koşulları sağlaması, istenilen rekombinant proteini yüksek verimle üretmesi ve yan ürün miktarının düşük seviyelerde olması, seçimde önemlidir [14]. Ayrıca, ifadenmede nihai ürün, rekombinant proteinin kodlama sekansından, ekspresyon vektörünün tasarımından, katlanma mekanizmalarından, toksisitesinden, bozunma hızından ve çevresel değişikliklere karşı direncinden etkilenmektedir [1,27].

A. oryzae’de heterolog bir proteinin üretimi amaçlandığında, transkripsiyonel, translasyonel ve salgılama düzeyinde birkaç parametreden söz edilmesi gerekmektedir. Promotörler, gen kopya sayısı ve entegrasyon bölgesi transkripsiyonel düzeyde etkileyici faktörlerken; mRNA kararlılığı ve kodon optimizasyonunun sağlanması translasyonel düzeyde protein ifadenmesini etkilemektedir [3].

İfadenmede diğer parametre *post-translasyonel modifikasyondur*. Bir *Aspergillus* türü olan *A. niger*’ın araştırılan post-translasyonel yolağı incelendiğinde; translasyonu yapılan proteinler, sinyal tanıma partikülleri aracılığıyla endoplazmik retikuluma getirilerek post-translasyonel modifikasyona uğratılmaktadırlar. Katlanmamış

proteinlerin birikimi şaperon ve foldaz enzimlerini aktive etmekte ve bu sayede proteinlerin katlanması sağlanmaktadır. Doğru şekilde katlanması yapılamayan proteinler sitoplazmaya gönderilerek, burada endoplazmik retikulum ilişkili degradasyon denilen yolda proteozomlar tarafından degradasyona uğratılmaktadır. Endoplazmik retikuluma doğru şekilde katlanmış ve glikolizasyonu gerçekleştirilmiş olan proteinler Coat Protein Complex II adı verilen veziküllerle golgi cisimciğine ulaştırılmaktadır. Ardından hazırlanan proteinler veziküller ile, periplazmik alana salgılanacakları, hücre yüzeyine taşınmaktadır. Diğer taraftan, bu süreç boyunca endoplazmik retikuluma kaçan ya da golgi cisimciğinde yanlış katlanmış olan proteinler Coat Protein Complex I adı verilen veziküller ile endoplazmik retikuluma geri yollanmaktadır. Son olarak, yanlış katlanmış ve fonksiyonel olmayan proteinler vakuollerde degrade edilmektedir [3].

Glikolizasyon iki sınıfta değerlendirilebilir; O-bağlı glikolizasyon; glikan grupların serin ve treonin aminoasitlerinin hidroksil yan gruplarına eklenmesi ile oluşurken, N-bağlı glikolizasyon ise glikan grupların asparajin aminoasidinin amino yan grubuna eklenmesi ile meydana gelmektedir. Glikolizasyon katlanma, fonksiyonellik, stabilizasyon, aktivite ve salgılanma özelliklerini etkilediğinden önem arz etmektedir. *Aspergillus* türleri küçük ve yüksek mannoz grupları şeklinde N-bağlı glikolizasyon oluşturmaktadır [3].

İfadeleme önemli bir diğer kriter *kodon optimizasyonu*dur. Kodon optimizasyonu; heterolog genlerde bulunan ancak konak mikroorganizmada nadir olarak bulunan kodonların yerine, bu kodonların aynı aminoasiti kodlayan ve aynı zamanda konak mikroorganizmada daha sık kullanılan kodonlar ile yer değiştirilmesidir. Kodon optimizasyonu ile hedeflenen, protein ifadenmesi için transkripsiyon aşamasında mRNA stabilizasyonunu arttırmak ve translasyonunu kolaylaştırmaktır. *Aspergillus* türlerinde de kodon optimizasyonu sayesinde elde edilen ürün miktarında artış sağlanabilmiştir [3].

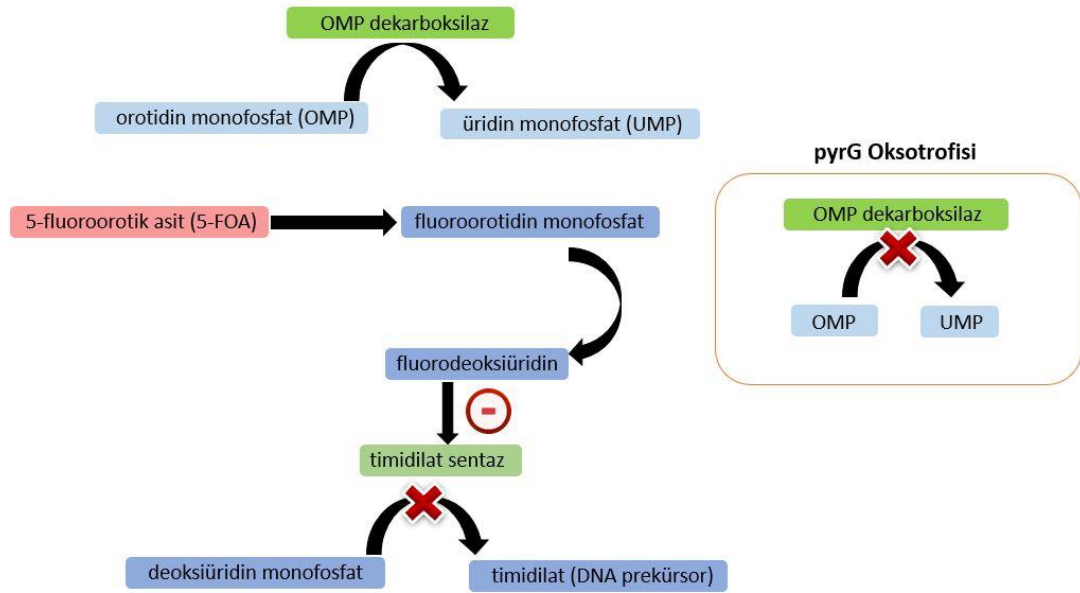
1.5 Oksotrofi

A.oryzae'nin kullanıldığı heterolog proteinlerin ifadenmesinde transformantların seleksiyonunda oksotrofi özelliğinden yararlanılabilmektedir. Oksotrofi yönteminde, transformasyon sonrası aynı fenotipe sahip yabanil tip ile transformantlar arasından rekombinant olanlar, bir direnç belirtecinden yararlanılarak ayırt edilmektedir. Bu

alandanda en sık kullanılan belirteç pirimidin yolakta görevli olan *pyrG* genidir [28]. Benzer şekilde nitrat biyosentezinde *niaD*, adenin biyosentezinde *adeA* ve arjinin biyosentezi için *argB* geni gibi çok sayıda genin kullanımı da mümkündür [29].

pyrG geni (~1.7 kb), *A. oryzae* RIB40 genomunun 7. kromozomunda yer almaktadır. Bu gen, *A. oryzae*'nin yaşamını sürdürebilmesi için üridin ve urasil sentezinde rol oynayan orotidin-5'-monofosfat dekarboksilaz enzimini kodlamaktadır [22]. Bu enzim orotidin monofosfatı üridin monofosfata çevirmektedir. Ayrıca orotidin-5'-monofosfat dekarboksilaz enziminin aktivitesi ile bir mutajen olan 5-FOA, pirimidin biyosentezine katılmakta, pirimidinler fluoroorotidin monofosfata çevrilmekte, fluoroorotidin monofosfat ise fluorodeoksiüridine çevrilmektedir. Bu molekül, deoksiüridin monofosfatı, DNA prokürsörü timidilat'a çeviren enzimin (timidilat sentaz) inhibitörü olarak görev yapmaktadır. Böylece 5-FOA, hücre büyümesini inhibe edici etkide bulunmaktadır (Şekil 1.2) [30].

pyrG geni bakımından oksotrof olan bir organizma, orotidin-5'-monofosfat dekarboksilaz enzimini kodlayamayacağından, orotidin'i üridine dönüştüremeyecek ve 5-FOA'ya karşı direnç kazanacaktır (Şekil 1.2). Bu sebeple, *pyrG* geninin delesyonu yapılan oksotrof *A. oryzae* türlerinden, *pyrG*'nin seleksiyon belirteci olarak kullanıldığı transformasyonda yararlanılmaktadır [30]. Transformantların seleksiyonu selektif ajan olarak 5-FOA'nın bulunduğu seçici agar ortamında yapılmaktadır [31].



Şekil 1.2: Aktif *pyrG* geninin primidin yolakta 5-FOA varlığında timidilat üretimini inhibe etmesi ve *pyrG* oksotrofisinin şematik gösterimi.

A. oryzae'de hedef bir genin kararlı bir şekilde ifadenmesi için genetik manipülasyona başvurulmaktadır. Genetik manipülasyonunda sıklıkla kullanılan yöntem; homolog rekombinasyon aracılı gen hedeflemesidir. Bu yöntemde, genomda silinmek istenen genin kodlayıcı bölgesine bitişik yer alan nükleotit diziler, genomdaki diziye homolog olarak tasarlanır ve bu homolog diziler arasında gerçekleşen rekombinasyonla iki dizi arasında kalan gen bölgesinin genomdan ayrılması sağlanır.

Homolog rekombinasyon yönteminde, hedef bir genin silinmesinin yanı sıra, yeni bir dizinin eklenmesi ve yer değiştirilmesi de mümkündür. Ayrıca genellikle transformasyon verimini artırma ve seleksiyon belirteçlerin oluşturulmasında kullanılmaktadır. Bu yöntemle oluşturulan çeşitli genler bakımından eksik olan suşlar, ifadenme çalışmalarında kullanılmaktadır [32].

pyrG geninin delesyonu ultraviyole ışın-aracılı ya da kimyasal aracılı rastgele mutagenез yoluyla gerçekleştirilse de, kısa bir süre sonra mutant organizmalarda *pyrG* geninin yeniden tamamlandığı anlaşılmıştır. Bu sebeple *pyrG* geni delesyonunun daha stabil olması amacıyla, Du ve ark. yaptığı çalışmada *A. oryzae* suşunda site-directed mutagenез yoluyla *pyrG* geninin delesyonunu sağlamıştır. *pyrG* gen bölgesinin yukarı ve aşağı akış bölgesini kodlayan diziler *A. oryzae* genomik DNA'sından PZR uygulaması ile çoğaltılmış ve ardından overlap uzatma PZR'ı kullanılarak bir araya getirilmiştir. Bu sayede, *pyrG* geninin transformasyonla delesyona uğratılacak bir gen kasedi oluşturulmuş ve başarıyla delesyon sağlanmıştır [33].

Ling ve ark., yaptıkları çalışmada hedefleyici gen yerdeğiştirmesini uygulayarak *pyrG* genini silmiştir. Bu amaçla, *pyrG* geninin yukarı ve aşağı akış bölgelerinden oluşturulan gen kasedi ile *A. oryzae* transformasyonunu gerçekleştirilmiş ve transformantlarda *pyrG* geni silinmiştir. Ardından bu şekilde oluşturulan oksotrofinin, *pyrG* geni taşıyan bir vektör ile transformasyonun yapılması sonucu geri döndürülebileceği de doğrulanmıştır [31].

1.6 *Aspergillus oryzae* Transformasyonu

A. oryzae'nin güçlü hücre duvarı sebebiyle transformasyon verimi diğer fungallara göre düşük olduğundan, transformasyonun etkili bir şekilde gerçekleştirilmesi, klonlama aşamasında önemli bir kritik noktadır. Transformasyon teknikleri

elektroporasyonla transformasyon, *Agrobacterium* aracılığında transformasyon ve en sık kullanılan protoplast aracılı transformasyondur [34].

Protoplast oluşturmada hücre duvarının uzaklaştırılması enzimler aracılığıyla gerçekleştirilmektedir [32]. Protoplast aracılı transformasyonun avantajları, çok sayıda homojenizat elde etmenin kolay olması, kolay ve ucuz bir yöntem olmasıdır. Ayrıca tek bir hücre tipi yerine spor, germ ve miselyumların bu amaçla kullanılabileceği geniş bir uygulama alanının bulunmasıdır [22].

Protoplast aracılı transformasyonda adımlar sırasıyla; kültür oluşturma, protoplast hazırlama, Polietilen glikol (PEG) inkübasyonu ile hedef genin transformasyonu, rejenerasyon ve seleksiyon şeklindedir. Protoplast, hücre duvarı ortadan kaldırılmış hücrelere verilen isimdir, ancak bu işlemde hücrelerin hayatta kalması için transformasyon sonrası hücre duvarının rejenerasyonun tamamlanması da gerekmektedir [32]. Bu yöntemde transformasyon verimi hücre duvarını parçalamada kullanılan enzimlerin etkinliğinden, kültür koşullarından ve çözelti içeriklerinden etkilenmektedir [22].

Transforme edilmek istenen yabancı tip *A. oryzae*, hücre duvarını lizis eden enzimlerin yer aldığı solüsyon içinde protoplast oluşturmada kullanılmaktadır. Protoplastlar, hedef gen ile %40-%50 gibi yüksek oranda PEG içeren, CaCl_2 ortamında biraraya getirilerek yabancı DNA'nın hücre içine alınması ve membran geçirgenliği sağlanmaktadır. Protoplastlar osmotik koşullarda dayanıklılık gösteremeyeceğinden ortamda osmotik düzenleyici olarak KCl ve sorbitol bulundurulmaktadır. Transformasyon sağlandıktan sonra, rejenerasyon için katı besiyerine geçirilmektedir [22,32,35].

2. AFFİNİTE AJANLARI

Biyoteknolojik uygulamalarda affinite ajanı olarak, öncelikle mAbs tercih edilmiş, sonrasında tek domainli ağır zincir antikörlerin (VHH) üstün özellikleri ve üretim kolaylıklarının keşfedilmesiyle, VHH'ler affinite ajanı olarak ön plana çıkmıştır [36].

2.1 Monoklonal Antikörler ve Üretimleri

Tam uzunluktaki (geleneksel) antikörler olan mAbs, disülfid bağlarıyla bağlanmış iki özdeş ağır (H) zincir ve iki özdeş hafif (L) zincirden oluşan heterotetramerik bir yapıya sahiptir. H zincirler bir değişken bölgeden (VH) ve üç sabit bölgeden (CH1, CH2 ve CH3) oluşurken, L zincirler bir değişken bölgeden (VL) ve bir sabit bölgeden (CL) oluşmaktadır. Her bir değişken bölge, antijen bağlanmasından sorumlu olan yüksek oranda değişken üç CDR (tamamlayıcılık belirleyici bölge) taşımaktadır. Antijen bağlanma fragmanları (Fab), L zincirlerinin CL ve VL bölgeleri ile H zincirlerinin CH1 ve VH bölgelerini içermektedir. Değişken bölgeler çok sayıda antijenin tanınması için gerekli ve önemli olan çeşitliliğin sağlandığı bölgelerdir. Fc adı verilen bölge ise efektör bölgedir ve immün sistem hücre reseptörleriyle etkileşerek immün yanıtı başlatma görevini üstlenmektedir [37].

Affinite ajanı olarak, immünoglobulinler keşfedildiklerinden bu yana yıllardır yüksek çeşitlilik ve seçicilikleri sayesinde tedavi, tanı ve görüntüleme teknolojilerinde geniş kullanım alanına sahip olmuştur. Bununla birlikte, yıllar içinde hedef bir antijene spesifik olan mAbs'nin ölümsüzleştirilmiş hücrelerden üretilmesini sağlayan hibridoma teknolojilerinin dezavantajları ile karşılaşmıştır. Üretilen mAb miktarının düşük olması, yüksek maliyetli prosesler, üretimden üretime değişkenlik, zaman alan yöntemler ve hedef antijene özgül olan kararlı klonun seçiminin zorluğu ve immünojenisite problemleri hibridoma teknolojisiyle mAbs üretiminde karşılaşılan temel zorluklardır [36].

Disülfid bağları içeren karmaşık yapıları, işlevsellik için doğru post-translasyonel modifikasyon gereklilikleri ve 150 kDa'luk yüksek moleküler ağırlığa sahip olmaları

mAbs'nin mikrobiyal ifadenme sistemleri kullanılarak büyük ölçekte elde edilmelerini de sınırlamaktadır. Özellikle post-translasyonel modifikasyon gerçekleştiremeyen prokaryotik *E. coli* ifadenme sistemlerinde çözünürlük ve katlanma sorunları ile karşılaşmaktadır. Bu nedenle, mAbs ifadenmesinde *E. coli* konak mikroorganizmasının seçilmesi inklüzyon cisimcikleri ve agregatların denatürasyonunu takiben yeniden katlanma işlemlerine gidilmesini [38] veya konak hücre mühendisliği yapılmasını zorunlu kılmıştır. *E. coli*'de mAbs ifadenmesi ile ilgili bir diğer problem de endotoksinlerin varlığıdır [39]. Maya konak mikroorganizmalarında ise ifadenen proteinin, insandan farklı olarak, yüksek mannoz tipi glikanlar ile glikolize edilmesi ve bu hiperglikolize proteinlerin insanda immün yanıtı tetiklemesinin önüne geçmek için gliko-mühendisliği yapılmış özel maya suşlarda mAbs üretimi çalışmaları yapılmaktadır [40].

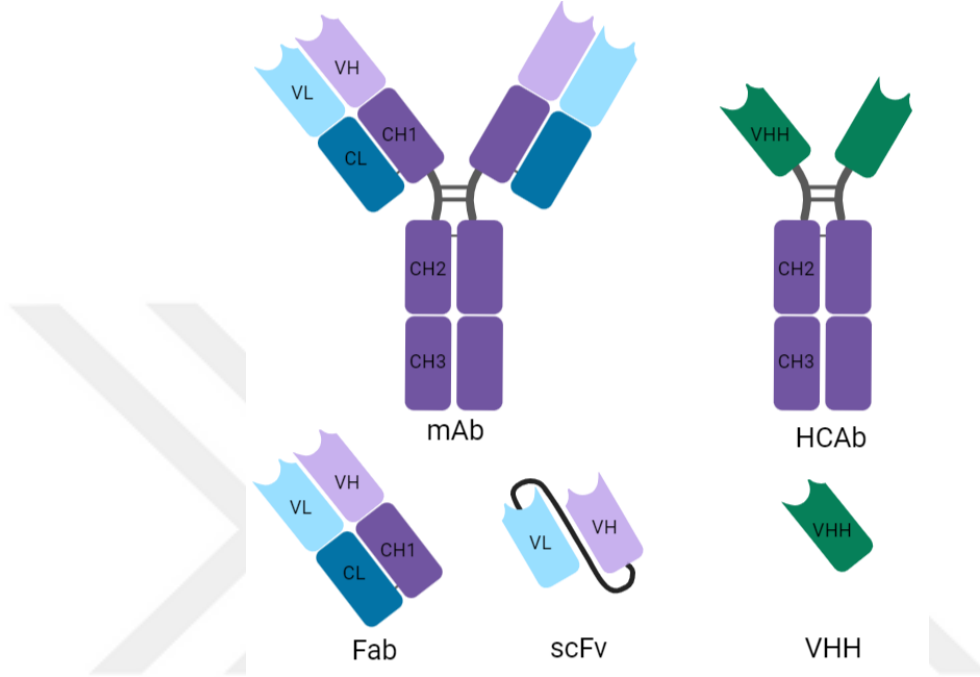
Antikor ve antikor parçalarının *A. oryzae*'de üretimi için literatürde aynı konak mikroorganizma için farklı gen kasedi tasarlama stratejileri kullanılarak etkinlik ve verim arttırılmaya çalışılmaktadır. Hung ve ark., insan anti-TNF α antikor olan adalimumab mAb'yi, Fc bölgesindeki hiper-glikolizasyonu gen delesyonu yoluyla engelleyerek *A. oryzae*'de üretmişlerdir. İki ağır ve iki hafif dizisini ayrı ayrı olacak şekilde, hücre içinde proteazlar tarafından proteolitik yıkıma uğratılması için kesim bölgesi ilave ederek amilaz genine füzyon olacak şekilde farklı vektörler ile ifadelemişlerdir. Yapılan analizlerde ise, fonksiyonel IgG yapısının yanı sıra, istenmeyen ağır zincir dimerlerinin de meydana geldiği anlaşılmıştır [41].

Ward ve ark. iki farklı 'humanized' IgG1(K) ve Fab fragmentlerinin ifadenmesi için *A. niger* konak hücresinde, bu proteinleri glikoamilaza füzyon olacak şekilde üretmişlerdir. Ancak gen kasedinin dizaynında proteaz ayırma bölgesi bulunmasına rağmen, proteazlar tarafından bu diziden kesimin tam olarak meydana gelmeme olasılığının bulunduğu ortaya çıkarılmıştır. Bunun yanı sıra, proteolitik kesimi tamamlanmış olanlar değerlendirildiğinde elde edilmiş olan glikolize form ile memeli hücresinde elde edilen non-glikolize form arasında affinite, avidite, antikor bağımlı hücrel sitotoksiste açısından fark olmadığı ortaya konmuştur [42].

2.2 Ağır Zincir Antikorları

Bir konak hücrede rekombinant olarak tam uzunluktaki mAbs üretiminde karşılaşılan zorluklar, araştırmacıları, tüm uzunluktaki antikorun taşıdığı özelliklere sahip ancak

daha kısa antikor parçalarının mikroorganizmalarda ifadelenmesi yoluna yöneltmiştir. Böylece, konakçı mikroorganizmalar tarafından ifadelenen rekombinant protein yapısının boyutunun en aza indirgenmesi istenmiştir. Bu antikor parçaları arasında scFv (tek zincir fragman değişkenleri), Fab ve ağır zincir antikorları bulunmaktadır [36] (Şekil 2.1).



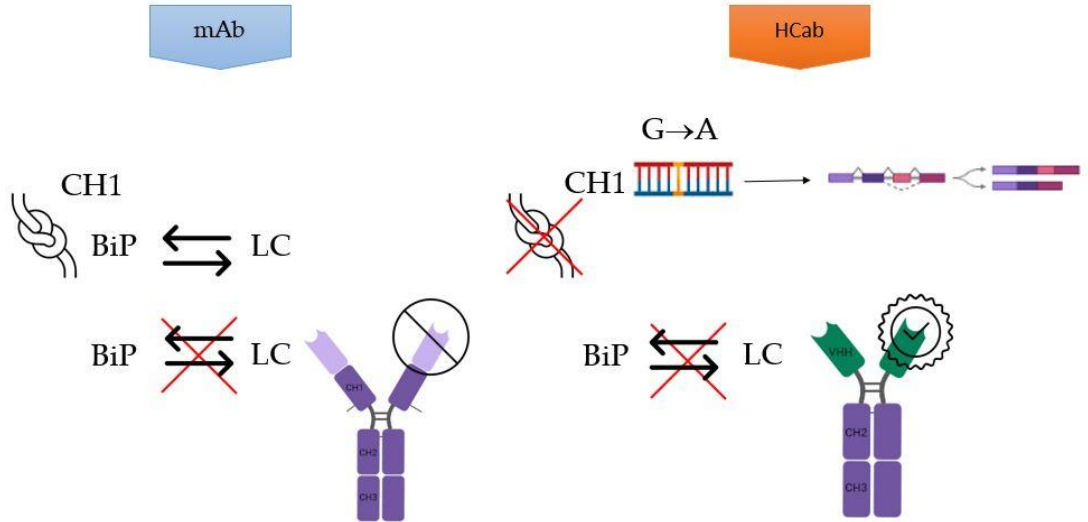
Şekil 2.1: Affinite ajanı olarak kullanılan antikor yapıları.

ScFv, birbirine esnek bir bağlayıcı (GGGGS) ile bağlanan H- ve L- zincirlerinin yalnızca değişken bölgelerinden oluşan 27 kDa'luk antijen bağlama kapasitesine sahip protein yapısıdır. ScFv, bakteri ve memeli sistemlerinde ifade edilebilmiştir, ancak scFv'nin agregasyona eğilimli olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, scFv, Fab ve bunların çok değerlikli formlarının mikrobiyal üretim sürecinin zahmetli olduğu anlaşılmıştır, çünkü bu moleküllerin işlevsellik kazanması için ifadelenen H ve L zincirlerinin doğru dimerizasyonu gereklidir [36]. Düşük ifadelenme seviyesi, agregasyona eğilim ve immünojenisite sorunlarının üstesinden gelebilmek için, yalnızca ağır zincirlerden oluşan fonksiyonel antikorlarla olan çalışmalar hızlanmıştır [36,43].

Yalnızca ağır zincirden oluşan antikorlar ilk kez, VH ve CH1 bölgelerinin bir kısmının delesyonuna neden olan somatik mutasyon sonucu fonksiyonel olmayan antikorlar olarak bir tür patolojik bozukluk şeklinde değerlendirilmiştir [44,45].

Ağır zincir antikorlarının benzersiz bir türü olan HCAs (heavy chain only antibodies) ile karşılaşma ise, Hamers-Casterman ve ark.'nın 1993 yılında Camelidae familyası türlerinden deve ve lamaların serumlarında yeni bir sınıf IgG antikorları keşfetmesi ile olmuştur [46]. Bu antikorların en önemli özellikleri; herhangi bir patolojiye sebep olmadan doğal olarak bulunan fonksiyonel antikorlar olmalarıdır [47].

HCAs'ın ağır zincirlerinde CH1 bölgesinin olmaması nedeniyle, HCAs mAbs'den daha küçük boyuttadırlar. mAb'lerde CH1 bölgesi heterodimerik mAb yapısının salgılanmasını sağlamak için bir hafif zincirle yer değiştirilen BiP şaperon proteini için bağlanma yeridir. Şaperonun hafif bir zincirle yer değiştiremediği durumlarda, hafif zincirsiz antikor yapısının endoplazmik retikulumdan salgılanması engellenmektedir. Böylece, yalnızca ağır zinciri olan işlevsiz antikorların oluşması önlenmektedir [44]. CH1 bölgesini kodlayan dizi HCAs genomunda bulunmasına rağmen, CH1'in 3' ekzonunun sinyal dizisindeki nokta mutasyonu (G→A) nedeniyle mRNA işlenmesi sırasında CH1 uzaklaştırılmaktadır [44,48]. Dolayısıyla, HCAb'lerde ağır zincirin değişken bölgesi CH1 yokluğunda bağlanma şaperonu ile etkileşememekte ve HCAb doğrudan hafif zincir olmadan kolayca salgılanmaktadır [44] (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Monoklonal antikor ve ağır zincir antikorda hafif zincirin bulunmama durumu.

2.3 Tek Domainli Ağır Zincir Antikorlar (VHH)

HCAb'nin bir parçası olarak devegillerde keşfedilen VHH üstün karakteristik özelliklere sahip ağır zincir antikor parçasıdır. VHH, geleneksel mAb'lerin büyük

boyutunun aksine yaklaşık 13 kDa'luk boyuta sahip ve hafif zincirden yoksundur. Dört nm boyutunda ve 2,5 nm çapındadır [49].

Geleneksel mAb'lerde VL zincirinin varlığı çeşitliliğe katkıda bulunarak yüksek antijen repertuarına neden olmaktadır. Hafif zincirin olmadığı VHH'lerde yüksek antijen repertuarına ulaşabilmek için bir dizi yapısal farklılık mevcuttur. mAb'lerin ağır zinciri ile karşılaştırıldığında, VHH'nin CD1 bölgesi genişletilmiştir ve bu sayede geniş bir antijen çeşitliliği sunulmaktadır [44]. Ayrıca antijen bağlanmasında daha fazla rol oynayan CDR3 bölgesi de VHH'lerde 18 aminoasitten oluşurken, insanlarda ağır zincir 14, farelerde 11 aminoasitten meydana gelmektedir. Daha uzun CDR3 alanı antijen çeşitliliğine önemli bir katkı sağlamaktadır [44,50].

Genişletilmiş CD1 ve uzun CDR3 bölgelerinin diğer bir avantajı, içbükey şeklindeki antijenleri yüksek özgüllükte bağlayabilmek için VHH'in yüzey alanını genişleterek dışbükey bir yapı oluşturmaya izin vermesidir. Böylece mAb'lerin aksine yalnızca antijenlerle değil aynı zamanda haptenler, antimikrobiyal ve viral peptitler ile etkileşime girebilmektedir [44,51-53].

VHH'nin CDR3 bölgesinin stabilizasyonu ise, geleneksel mAb'lerde bulunmayan ek bir disülfid bağı bulundurulmasıyla sağlanmıştır. Buna göre, ek disülfid bağı, antijen bağlama alanlarını ve esnekliği kısıtlayarak yapıyı stabilize etmektedir [44,54]. VHH'ler, yalnızca 3 adet CDR bölgesi barındırmasına rağmen, mAb ile kıyaslanabilir bir affiniteye sahiptir [55].

VHH'lerde hafif zincirin olmamasının etkisini ortadan kaldıran diğer özellik, mAb'lerin VH domainindeki hidrofobik amino asitlerin VHH'de küçük hidrofilik amino asitlerle değiştirilmiş olmasıdır. Buna göre mAb ağır zincirlerinde korunan beş amino asit (Leu12, Val42, Gly49, Leu50 ve Trp52) VHH'de sırasıyla Ser, Phe/Thr, Glu, Cys ve Gly ile değiştirilmiştir. Leu12'den Ser'e geçiş, CH1 yokluğunda bir adaptasyondur ve hidrofobik Leu yerine hidrofilik Ser'in gelmesi çözünürlüğü arttırmaktadır. Ayrıca, Val42, Gly49, Leu50 ve Trp52 amino asitleri, mAb hafif zinciri ile büyük bir hidrofobik arayüz oluştururken, bu aminoasitlerin daha küçük hidrofilik aminoasitlerle yer değiştirmesi VHH'de hafif zincir yokluğunda arayüzü hidrofilik tutarak agregasyonu önlemektedir [44].

Affinite ajanı olarak VHH

Biyoteknolojik uygulamalarda kullanılan affinite ajanları için raf ömrü ve stabilite oldukça önemlidir. VHH'lerin, geleneksel mAb'lerin ve birçok proteinin sahip olmadığı mükemmel yeniden katlama kapasitesine sahip olduğunu bildirmiştir. Birçok proteinde ara form veya yanlış katlanmış formlar protein agregasyonuna neden olmaktadır. Ancak, VHH'ler üre, guanidinyum klorür, sıcaklık ve basınç gibi denatüre edici ajanların varlığında yalnızca doğal form ve denatüre form olmak üzere iki geçiş durumunda bulunmaktadır [56,57]. İki geçiş durumu, ara veya yanlış katlanmış protein formlarının neden olduğu agregasyonu önlemektedir. Bu sebeple VHH, kimyasal denatürasyona karşı özellikle tamamen geri dönüşümlüdür [56]. VHH herhangi bir aktivite kaybına uğramadan haftalarca 37 °C'de, aylarca 4 °C'de ve daha uzun sürelerde -20 °C'de depolanabilmektedir [55,58]. Bazı VHH türlerinin 90 °C sıcaklığa kadar [59] veya proteaz varlığında antijen bağlama özelliğini koruyabildiği saptanmıştır [60]. VHH'yi denatüre etmek için yüksek basınç gereklidir [56].

Yüksek stabilitesi ve zor çevresel şartlarda işlevsel kalabilmesi VHH'i mükemmel raf ömrüne sahip ideal bir affinite ajanı yapmaktadır [61]. Kimyasal kararlılığı ve basınç direnci yeteneği sayesinde, VHH yenilenebilir bir matriks olarak immün affinite kolonlarında kullanılabilir. VHH ile kompleks oluşturan proteinler immün affinite kolonlarında saflaştırılabilir [62].

Büyük ve karmaşık yapıları nedeniyle doku penetrasyonu zayıf olan mAb'lerin aksine, VHH'ler hedef dokuya ulaşır [63] ve immün düzenleyici görevi görür. Bazı VHH'ler, küçük boyutu ve doku içine filtre olabilmesi sayesinde kan-beyin bariyerini ve renal filtreyi kendiliğinden geçebilmektedir [64,65].

Tümör hücre ve dokularının radyoaktif olarak in vivo görüntülenmesinde ve radyoimmünoterapide radyoaktif maddenin kandan hızlı temizlenmesi önemlidir [66-68]. Görüntüleme tekniklerinde radyoaktif işaretli VHH kullanıldığında, enjeksiyondan sonraki birkaç saat içinde hızlı bir görüntü elde edilebilmektedir. Tümör hedeflemesinde toksik maddenin VHH'e bağlanması, hızlı kan klirensi sebebiyle tümör hücrelerine ulaşmayı kolaylaştırabilmektedir [69,70]. VHH'nin kan beyin bariyerini geçebilmesi ve amiloid fibrillerinin oluşumunu inhibe etmesi nedeniyle nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılabilir [71]. Enzim aktif

bölgelerine ve gizli epitoplara kolayca erişebildikleri için enzim aktivitelerini veya moleküler etkileşimleri bloke etmede kullanılabilir [64,65].

Affinite ajanının biyoteknolojik uygulamalarda immunojenisitesi de önem arz etmektedir. VHH kodlayıcı bölgeler ile insan ağır zinciri arasında %80 oranında homoloji bulunmaktadır ve immün reaksiyonları tetikleyen Fc bölgesine sahip değildir. Bu nedende VHH'in immunojenisitesi düşüktür. Ayrıca küçük boyut, hidrofiliklik düzeyi, katı monomerik davranışı düşük immünojenisiteye katkıda bulunmaktadır [55]. Literatürde VHH'in neden olduğu herhangi bir immün yanıtı rastlanmamıştır [72,73]. VHH'nin düşük immünojenikliği, herhangi bir konak immün reaksiyonu olmadan tekrarlanan enjeksiyonlara izin verecektir. İlaveten, VHH'in kolayca değiştirilebilen göreceli olarak basit yapısı gerektiğinde immünojenik özelliklerinin düzenlenebilmesine olanak tanımaktadır [74,75]. VHH, CAR-T hücre terapilerinde [76,77] ve bispesifik antikorların [78] oluşturmada kullanılmıştır.

İhtiyaç duyulan biyoteknolojik uygulamaya göre, VHH'ler tek değerlikli veya çok değerlikli formlarda üretilmektedir [79]. Hafif zincirlerinin olmaması yapıya esneklik sağlamaktadır ve bu şekilde diğer moleküller ve bağlayıcı gruplar ile VHH'ler füzyon hale getirilebilmektedir. Bu spesifik formlar, hastalıkların tanı ve tedavisinde ve araştırma çalışmalarında [80,81] kullanılabilmektedir. Örnek olarak yeşil floresan protein gibi floresan özellikteki bir protein ile füzyon hale getirilen VHH hedef proteinin hücre içi ifadesinin izlenmesinde kullanılabilir [82]. Terapötik nitelikte olup klinik faz çalışmalarından başarıyla geçen geliştirilmiş VHH'lerden bazıları onaylanmış Caplacizumab [83] ve faz 2'de olan VHH 203027 [84]'dir.

VHH oldukça kararlı ve çözünür yapısıyla, temel araştırma, immüno-saflaştırma ve biyosensör uygulamalarına uygundur [85]. VHH, protein konformasyonlarını belirlemede kristalleşme partneri olarak, incelenen proteinin solvent ile yüzey alanının artırılmasını sağlamak ve stabilizasyonu arttırabilmektedir [86]. Rekombinant proteinlerin birlikte saflaştırma partneri olarak veya toksinlerin nötrleştirme ajanı olarak kullanılabilir [87-91]. Canlı hücrelerde proteinlerin hücre altı lokalizasyonu belirlenmesini sağlayabilir [92,93]. Görüntüleme ve algılama yeteneğinin yanı sıra, yapısı kolayca değiştirilebildiği için bir sensörün yüzeyine biyosensör probu olarak etkin bir şekilde sabitlenebilir [94]. Kanseri gibi hastalıklarda kullanılan kimyasal veya biyolojik moleküller ile füzyon yapımları halinde bu moleküllerin terapötik etkilerini

arttırabilir [95,96]. Bir hastalığın teşhisinde çözünür prob olarak uygulamaların hassasiyetini ve özgüllüğünü iyileştirmede etkin rol oynayabilir [95,97].

Özetlemek gerekirse; mAb'ler ile karşılaştırıldığında küçük boyutu, yüksek özgüllüğü ve affinitesi, sıcaklığa ve denatüre edici ajanlara karşı toleransı, yüksek stabilitesi, katı monomerik davranışı, düşük immünojenitesi ve yüksek doku penetrasyon kapasitesiyle benzersiz bir molekül olan VHH, tanı, teşhis, görüntüleme, izleme gibi çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda affinite ajanı olarak kullanımda ciddi bir potansiyel barındırmaktadır [74,85,98-101].



3. REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ İLE VHH ÜRETİMİ

Hedef bir antijene karşı spesifik VHH üretim yöntemi, devegillerin bu hedef antijen ile immünizasyonu ve faj görüntüleme metodolojileridir [102,103]. Antijene özgü VHH'ler, doğal veya sentetik faj kütüphanelerinden seçildikten sonra *E. coli* konak mikrorganizmasında ifadelenmektedir [103]. Faj kütüphanelerinden elde edilen VHH'nin affinitesi, düşük nanomolar ve pikomolar denge ayrışma sabitleri arasında değişmektedir [55]. Geleneksel antikorların heterodimerik yapısı mikrobiyal ifadelenmesini zorlaştırırken, VHH'in monomerik yapısı ifadelenmede büyük bir avantajdır.

3.1 Bakteriyal Sistemlerde VHH İfadelenmesi

VHH ifadelenmesinde sıklıkla *E. coli* periplazmik ekspresyonu tercih edilmektedir. Ancak sınırlı periplazmik hacim nedeniyle verimin artırılması için şaperonlarla füzyon yapılmaları, lizis işlemi ve füzyon parçanın uzaklaştırılması için ek saflaştırma adımları gerekebilmektedir. Sitoplazmik *E. coli* ekspresyonunda ise agregasyon ve yanlış katlanma yüksek verime ulaşmanın önünde engeldir [104-108].

Bakteriyel sistemde elde edilen VHH verimi oldukça değişkendir [102]. Kaczmarek ve ark.'nın çalışmasında 5 litre *E. coli* kültüründen 2,1-3,5 mg VHH verim elde edilirken [109], Ji ve ark. sitoplazmik ekspresyon seviyesini 4,8 mg/L'den 57 mg/L'ye *E. coli* konakçısını değiştirerek arttırmıştır [110]. Zarschler ve ark.'nın çalışmasında ise disülfid bağ izomerazını eksprese eden mutant *E. coli* suşu kullanılarak 200 mg/L VHH elde edilebilmiştir [111]. Benzer şekilde Veggiani ve ark.'nın çalışmasında farklı füzyon proteinlerin VHH ekspresyon verimini 2-10 mg/L arasında değiştirdiği saptanmıştır [112]. Yu ve ark.'nın çalışmasında ipek fibroin proteini füzyon yapılarak verim artışı sağlanmıştır [113]. Salema ve ark.'nın füzyon protein olarak maltoz bağlayıcı protein kullanıldıkları çalışmasında ifade edilen VHH'nin büyük bir kısmı saflaştırma adımları sırasında kaybedilmiş ve füzyon haldeki VHH'in affinitesinin tek başına olan VHH'ten düşük olduğu saptanmıştır. Dolayısıyla verimin artırılması sırasında kullanılan füzyon protein affiniteyi etkileyebilmektedir [114].

3.2 Maya İfadelenme Sistemlerinde VHH İfadelenmesi

VHH'nin maya konak mikroorganizmalarında ifadenmesi konağın salgılama kapasitesine bağlıdır [115]. Ticari VHH'ler, GRAS statüsü nedeniyle *S. cerevisiae* tarafından üretilmektedir [116]. Thomassen ve ark.'nın çalışmasında *S. cerevisiae*'de 15 L'lik fermentörden 1,3 kg VHH üretildiği bildirilmiştir [117]. Rahbarizadeh ve ark.'nın çalışmasında ise VHH ifadenmesinde *P. pastoris* konak mikroorganizması kullanılmıştır [118]. Ancak maya konakçılarında üretilen rekombinant VHH'lerinin hiperglikolizasyonu antijen bağlanmasını azaltmaktadır [119].

3.3 İpliksi Fungi İfadelenme Sistemlerde VHH İfadelenmesi

İpliksi mantarlarda VHH ifadenmesi için yapılan ilk çalışmada Joosten ve ark.; *A. awarowi*'de kültür ortamına salgılanacak şekilde VHH üretebilmişler ancak yüksek düzeyde degradasyona uğradığını, bu sebeple degradasyonun önlenmesi için alternatif yollar aranması gerektiğini bildirmişlerdir [120].

A. oryzae'nin VHH üretiminde kullanımına ilişkin ilk rapora ise Okazaki ve ark.'nın gerçekleştirdiği EGFR'a spesifik VHH proteininin 28 aminoasitlik bir füzyon protein ile birlikte üretildiği çalışmadır. Füzyon protein, elde edilen verimi 3.5 kat arttırdığı gibi, post-translasyon modifikasyon sırasında EGFR-spesifik VHH yapısından ayrıldığını göstermişlerdir [121]. Buna ek olarak, literatürde farklı promotör genlerin *A. oryzae*'de human karyonik gonadotropin'e karşı VHH üretimini üzerine etkisinin araştırıldığı Hisada ve ark.'nın çalışmasında promotör seçiminin alınan verim üzerinde önemli bir etkisi olduğu sonucuna varılmıştır [122].

3.4 Hipotez

A. oryzae'nin heterolog protein üretimindeki üstünlüğünden yararlanılarak inşa edilen *pyrG* oksotrofik (-) *A. oryzae* biyoteknolojik platformunun; yapısı ve antijenine bağlanma affinitesi bilinen bir affinite ajanı olarak anti-ribonükleaz A (anti-RNaz A) VHH'in, büyük miktarlarda, fonksiyonel ve antijenine karşı yüksek bağlanma affinitesine sahip olacak şekilde rekombinant olarak üretilmesi bu tezin hipotezini oluşturmaktadır. Bu çalışma, *A. oryzae*'nin, affinite ajanı olarak kullanım için yüksek bağlanma affinitesine sahip VHH'lerin büyük ölçekli üretiminde uygun bir platform olduğunu göstermektedir.

4. GEREÇ ve YÖNTEM

Tez çalışması Bezmialem Vakıf Üniversitesi Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji Enstitüsü'nde gerçekleştirilmiştir.

4.1 Kullanılan Materyaller, Cihazlar ve Kültür Koşulları

Klonlama çalışmalarında yararlanılan *E.coli* TOP10 (#C404010) bakteri mikroorganizması Thermo Fisher Scientific (MA, ABD)'den, ifadenme çalışmalarında kullanılan konak mikroorganizma olan *A. oryzae* RIB40 (#42149) ise ATCC (American Type Culture Collection, VA, ABD)'den satın alınmıştır. Gen sentezi GenScript Biotech PTE. LTD (NJ, ABD) firmasına yaptırılmıştır. Primer sentezi Sentebiolab Biyoteknoloji (Türkiye) aracılığıyla yaptırılmıştır. DNA sekanslama Triogen Biyoteknoloji (İstanbul, TR) firması aracılığıyla yaptırılmıştır.

Plazmid izolasyon kiti (#K12143) Qiagen (Germany) firmasından, nikel rezin (HisPur™ Ni-NTA Resin, #88221) ve jel ekstraksiyon kiti (#K0691, GeneJET) Thermo Fisher Scientific (MA, ABD) firmasından satın alınmıştır. Yatalaz enzimi (#T017) Takara Bio Inc (Japonya) firmasından satın alınırken, RNaz A Biofroxx (#1263MG050, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Restriksiyon enzimleri ve DNA ligasyon kit New England Biolabs (MA, ABD)'den tedarik edilmiştir. Plazmid izolasyon kiti Amicon® Ultra-15 santrifüj filtresi (#UFC900308) Merck Millipore (MA, ABD)'den satın alınmıştır. qpZR uygulamasında kullanılan 2x SYBR green real time master mix (#NP041010220, Türkiye) Nepenthe Araştırma Teknolojileri firmasından satın alınmıştır. Ultrafiltrasyon membranı (Sartocon® Slice 200) ise Sartorius (GÖ, Almanya) firmasından tedarik edilmiştir. HRP ile konjüge anti-6x His tag® antikor (#ab1269) Abcam (Cambridge, İngiltere) firmasından satın alınmıştır. Nitroselüloz membran (Amersham™ Protran® Premium, #10600003), PD-10 Desalting kolonu (#17085101) ve Superdex 200 Increase 10/300 GL kolonu (#28990944) GE Healthcare (IL, ABD)'den satın alınmıştır. Kemilüminesans belirleme kiti (Western Bright TM Sirius, #K-12043-D10) Advansta (CA, ABD)'den temin edilmiştir. Protein marker (Gangnam-Stain Protein Ladder, #24052) Intron

Biotechnology (Güney Kore)'den satın alınmıştır. Fermentör çalışmalarında kullanmak üzere 6 litre total hacmindeki fermentör (Minifors 2) INFORS HT (İsviçre) firmasından satın alınmıştır.

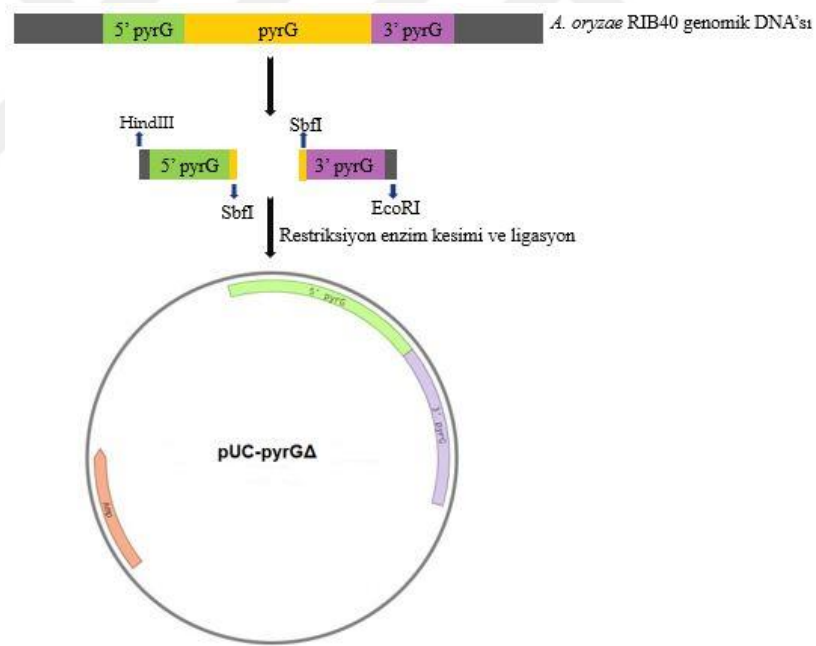
Kullanılan diğer cihazlar; inkübatör (Thermo Scientific / Heratherm IMC18), çalkalamalı inkübatör (Infors HT / Ecotron), Santrifüj sistemleri (Beckman Coulter / Allegra X-30R, Beckman Coulter / Avanti JXN-26 ve Thermo Scientific / Micro CL21R), pH metre (HANNA / HI2002), su banyosu (Witeg / WB-11), otoklav (Eryiğit Tıbbi Cihazlar), ultrapure su sistemi (Sartorius /Arium Comfort), Western blot cihazı (Amersham Biosciences / TE70), ısıtma bloğu (Thermo Scientific / Drybath Std), terazi (OHAUS / PA4102), ısıtmalı manyetik karıştırıcı (Benchmark Scientific/Digital Hotplate Strirrer), absorbans ölçüm cihazı (ThermoFisher Scientific / NanoDrop One C), vorteks karıştırıcı (Isolab / IP42), masaüstü çalkalayıcı (Benchmark / Benchrocker 2D), yatay ve dikey elektroforez sistemi (GE Healthcare / Mini VE), Hızlı performanslı sıvı kromatografisi (Akta Pure kromatografi sistemleri), çapraz akışlı filtrasyon sistemi (Sartorius Stedim Smart) şeklindedir.

Bakterilerin büyüme ortamı olarak, %1 tripton, %0,5 maya ekstraktı ve %1 NaCl içeren Luria Broth (LB) besiyeri kullanılmıştır. Rekombinant bakteriler için besiyeri ortamına 100 µg/mL ampisilin eklenmiştir. *A. oryzae* büyüme ortamı olarak %2 dekstrin, %1 polipepton, %0,5 maya ekstraktı, %0,5 KH₂PO₄ ve %0.05 MgSO₄.7H₂O içeren DPY besiyeri (pH 5.5) kullanılmıştır. İfadelenme aşamasında ise %4 dekstrin, %1 polipepton, %0,5 maya ekstraktı, %0,5 KH₂PO₄ ve %0.05 MgSO₄.7H₂O içeren 2x DPY besiyeri ortamı kullanılmıştır. Minimal besi ortamı olarak %0.2 NaNO₃, %0.1 K₂HPO₄, %0.05 MgSO₄.7H₂O, %0.05 KCl, %0.001 FeSO₄.7H₂O, %3 sükroz, %5 NaCl ve %2 agar bulunduran Czapek-Dox (CD) besiyeri ortamı kullanılmıştır. Oksotrof haline getirilen *A. oryzae* mikroorganizması için sıvı DPY besiyerine 20 mM üridin ve %0,2 urasil eklenirken, katı CD ortamına 20 mM üridin, %0,2 urasile ilaveten 1.6 mg/mL 5-FOA eklenmiştir.

4.2 Oksotrof *A. oryzae*'nin Oluşturulması

4.2.1 *pyrG* delesyon vektörünün tasarımı ve transformasyona hazırlanması

pyrG geni GenBank erişim numarası GQ496621.1'dir. *pyrG* geni bakımından oksotrof *A. oryzae* oluşturmak için; yabancı tip *A. oryzae* RIB40 genomik DNA'sı kalıp olarak kullanılmıştır. *pyrG* delesyon işleminin homolog rekombinasyon yoluyla gerçekleşebilmesi için; *A. oryzae* RIB40 genom dizisinden yedinci kromozomdaki *pyrG* geninin [GQ496621.1 (2219667...2220565)] 1.3 kb'lık 5' yukarı akış bölgesi [5' *pyrG* (2218358...2219657)] ve 1.2 kb'lık 3' aşağı akış bölgesi [3' *pyrG* (2220555...2221755)] belirlenmiştir. Yukarı yöndeki 1.3 kb'lık nükleotit dizi 5' ucunda *HindIII* ve 3' ucunda *SbfI* restriksiyon enzim tanıma bölgelerini içerecek şekilde sentezletirilmiştir. Aşağı yöndeki 1.2 kb'lık nükleotit dizi 5' ucunda *SbfI* ve 3' ucunda *EcoRI* restriksiyon enzim tanıma bölgelerini içerecek şekilde sentezletirilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 : *pyrG* delesyon vektörünün (pUC-*pyrG*Δ) oluşturulmasının şematik gösterimi. *pyrG* genini kodlayan açık okuma çerçevesinin yukarı yönde 1.3 kb'lık bölgesi (5' *pyrG*), 5' ucunda *HindIII* ve 3' ucunda *SbfI* restriksiyon enzim tanıma bölgeleri taşımaktadır. Aşağı yöndeki 1.2 kb'lık bölgesi (3' *pyrG*) ise 5' ucunda *SbfI* ve 3' ucunda *EcoRI* restriksiyon enzim tanıma bölgeleri taşımaktadır.

5' *pyrG* ve 3' *pyrG* dizilerinin biraraya getirilmesi için, sentezlettirilen 5' *pyrG* ve 3' *pyrG* dizileri, aralarında *SbfI* restriksiyon enzim bölgesi içerecek şekilde dizayn edilen primerler ile çoğaltılmıştır. Restriksiyon enzimleri *HindIII*, *SbfI* ve *EcoRI* ile kesilerek birbirine uyumlu hale getirilen diziler, ligasyon yoluyla bir araya getirilmiş ve *HindIII* ile *EcoRI* ile kesilmiş olan pUC19 vektör omurgasına klonlanmıştır (Şekil 4.1). Oluşturulmuş olan delesyon vektörü (pUC-*pyrGΔ*) sekanslama işlemi yapılarak doğrulanmıştır.

Tez kapsamında gerçekleştirilen alt klonlama çalışmalarında yetenekli hale getirilmiş *E. coli* TOP10 kullanılmıştır. Bunun için; *E. coli* TOP10 mikroorganizmasından tekli koloni 5 mL LB Broth besiyerine aşılanarak 16 saat boyunca 180 rpm ve 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası gelişen bakteri solüsyonu 100 mL taze LB Broth besiyerine 1:100 oranında seyreltilecek şekilde aktarılmıştır. Hazırlanan bakteri solüsyonu OD₆₀₀ değeri 0.4'e ulaşınca kadar 250 rpm ve 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası bakteri solüsyonu 10 dk buzda bekletilmiş ve 6000 rpm'de, 4 °C'de 10 dk santrifüjlenmiştir. Oluşan bakteri çökeltisi önceden soğutulmuş 10 mL 100 mM CaCl solüsyonu ile yeniden sulandırılmış ve 20 dk boyunca buzda inkübe edilmiştir. 6000 rpm'de ve 4 °C'de 10 dk boyunca santrifüjlemenin ardından, oluşan pelet, içerisinde %15 oranında gliserol bulunan 100 mM CaCl çözeltisinin 5 mL'si ile çözülmüştür ve elde edilen kompetent hücreler 100'er µL olacak şekilde alikotlanarak -80 °C'de transformasyona kadar saklanmıştır. Bu kompetent hücreler tez kapsamında gerçekleştirilen ısı şoku ile bakteriyal transformasyon uygulamalarında kullanılmıştır. Delesyon kasedini içeren pUC vektörü (pUC-*pyrGΔ*) yetenekli hale getirilmiş olan *E. coli* TOP10 mikroorganizmasına ısı şoku uygulamasıyla transforme edilmiştir. Bu amaçla, 100 µL kompetent bakteri hücrelerine 1 µL (~100 ng) pUC-*pyrGΔ* vektörü eklenmiş ve 30 dk buzda bekletilmiştir. Kontrol grup olarak, herhangi bir vektör DNA'nın ilave edilmediği 100 µL kompetent bakteri hücresi kullanılmıştır. Ardından bakteri solüsyonlarını içeren tüpler 42 °C'de 45 s boyunca tutulduktan sonra 500 µL LB broth ile sulandırılmış ve 1 saat boyunca 200 rpm ve 37 °C'de çalkalanmıştır. İnkübasyonun ardından bakteri solüsyonları ampisilin içeren LB agar plakalara yayılmıştır. Plakalar 37 °C'de bir gece tutularak transformant kolonilerin gelişmesi sağlanmıştır. Gelişen tekli transformant kolonilerden biri gliserol stok almak ve sonraki aşamalar için gereken miktarda pUC-*pyrGΔ* vektörü elde edebilmek için 100 µg/mL ampisilin içeren 100 mL LB sıvı besiyerine aktarılarak bir gece süreyle 37 °C

ve 200 rpm’de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından bakteri solüsyonundan -80 °C’de tutulmak üzere gliserol stok alınmış ve Qiagen izolasyon kiti yardımıyla pUC-pyrGΔ vektörünün izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen pUC-pyrGΔ vektörü, *A. oryzae* mikroorganizmasına transformasyon için *EcoRI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleri kullanılarak doğrusal hale getirilmiştir (Tablo 4.1). Kesim sonrası, %1’lik agaroz jelde elektroforezi yapılan doğrusal delesyon kasedini barındıran DNA, jelden GeneJET jel izolasyon kiti yardımıyla geri kazanılmıştır.

Tablo 4.1: pUC-pyrGΔ vektörünün restriksiyon enzimlerle kesim reaksiyonu.
Reaksiyon koşulu: 37 °C, 2 h.

Reaktan	Hacim (μL)
10x restriksiyon enzim kesim tamponu	5
<i>EcoRI</i>	1
<i>HindIII</i>	1
pUC-pyrGΔ vektörü	20 (~4 μg)
Nükleazlardan arındırılmış su	23
Toplam hacim	50

4.2.2 pyrG oksotrofisinin sağlanması

Tasarımı yapılarak doğrusal hale getirilmiş olan *pyrG* delesyon kasedi *A. oryzae* yabani tip RIB40 suşuna protoplast aracılı transformasyonla aktarılmıştır. *A. oryzae*’nin güçlü hücre duvarı sebebiyle transformasyon verimi düşük olduğundan, transformasyonun etkili bir şekilde gerçekleştirilmesi, klonlama aşamasında önemli bir kritik noktadır ve transformasyonda kullanılacak plazmid konsantrasyonunun, jelden saflaştırıldıktan sonra 1,5-2.0 μg aralığında olması sağlanmıştır.

Tez kapsamında gerçekleştirilen *A. oryzae* transformasyonları için Sakai ve ark.’nın protokolünden yararlanılmıştır [123]. Protoplast hazırlamak amacıyla, *A. oryzae* RIB40 mikroorganizması 50 mL’lik DPY besiyeri içerisinde OD₆₀₀ değeri 0.4 olacak şekilde aşılınmış ve bir gece boyunca 30 °C ve 180 rpm’de inkübe edilmiştir. Ardından, kültür süspansiyonundaki miselyum, ultraviyole ışık altında sterilize edilmiş microcloth adı verilen bir tülbent yardımıyla filtrelenmiştir. Kültür solüsyonundan ayrıştırılan ve microcloth üzerinde kalan miselyum toplanarak, hücre duvarının lizisini sağlayan Yatalaz enzimin %1 oranında bulunduğu lizis tampon

çözelti (0,2 M Malat Tampon (pH 5.5), 0,6 M (NH₄)SO₄) içine aktarılmıştır. Lizis işlemi için 30 °C ve 180 rpm’de 4 saatlik inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonun ardından karışım, steril koşulda microcloth yardımıyla filtrelenmiştir ve lizis sonucu oluşan sferoplastlar diğer bileşenlerden ayrıştırılmıştır. Elde edilen sferoplast bulunan sıvı çözelti, 10 mM Tris-Cl (pH 7.5), 50 mM CaCl₂·2H₂O ve 1,2 M sorbitol içeren yıkama çözeltisi ile karıştırılarak 800 xg’de 8 dk boyunca oda sıcaklığında santrifüjlenmiştir. Yıkama işleminin ardından, sferoplast çözeltisinden örnek alınarak hemasitometri camı yardımıyla mikroskop altında sferoplast sayısı yapılmıştır. Sferoplast çözeltisi 1.6x10⁶ sayısında olacak şekilde tüplere aktarılmıştır. Deney grubu olan tüpe önceden hazırlanmış olan doğrusal *pyrG* delesyon kasedi aktarılmış ve 30 dk buz içerisinde inkübe edilmiştir. Kontrol grup olan tüp ise, herhangi bir DNA eklenmeden, doğrudan buz üzerine alınmıştır. Süre sonunda, deney ve kontrol tüplere 10 mM Tris-Cl (pH 7.5), 50 mM CaCl₂·2H₂O ve %60 PEG 4000 içeren solüsyon eklenmiş ve 20 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Karışımlar yıkama çözeltisi eklenerek 800 xg’de 8 dk boyunca santrifüjlenmiş ve pelletler 500 µL yıkama çözeltisinde sulandırılmıştır. Bu aşamadan itibaren, hücrelerin rejenerasyonu için, tüplerdeki karışım % 0.5 agar içeren CD besiyeri ile nazıkçe karıştırılarak, önceden hazırlanmış 20 mM üridin, %0,2 urasil ve %2 agar içeren CD plakalara yayılmıştır. Plakalar 30 °C’de 5-6 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol grup için aynı protokol izlenmiştir ancak, kontrol grubun farkı herhangi bir DNA içermemesidir.

PyrG delesyonu için Ling ve ark.’nın çalışması referans alınmış ve modifiye edilmiştir [31]. Buna göre; transformasyon sonrası rejenerasyon CD ortamındaki *A. oryzae* transformant hücreleri, steril su yardımıyla toplanarak, her birinde 4x10⁶ hücre olacak şekilde 20 mM üridin ve %0,2 urasil içeren 20 mL’lik DPY besiyerlerine aktarılmıştır. Bir gece süreyle 30 °C ve 180 rpm inkübe edilen kültürlerden 0.5 mL alınarak selektif ortam olan 20 mM üridin ve %0,2 urasil ile 1,6 mg/mL 5-FOA içeren %2’lik CD agar plakalara yayılmıştır. Plakalar, kolonilerin gelişimi için 30 °C’de 5-6 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır.

4.2.3 *pyrG* oksotrofinin doğrulanması

İnkübasyon sonrası, yayımı yapılmış plakalar yüzeyinde gelişen toplamda 16 adet *A. oryzae* kolonisi steril distile su ile toplanarak yeniden selektif ortama (20 mM üridin, %0,2 urasil ile 1,6 mg/mL 5-FOA içeren % 2’lik CD agar) yayılmış ve aynı koşullarda

inkübasyona bırakılmıştır. *pyrG* oksotrof *A. oryzae* kolonilerinde delesyonun kalıcılığının izlenmesi için; bu işlem peş peşe üç kez tekrarlanarak, *pyrG* delesyonun kalıcılığı test edilmiştir. Selektif ortamda gelişen 5-FOA dirençli kolonilerden sekiz tanesi ileri analizler için seçilmiştir.

Seçilen 5-FOA dirençli kolonilerin her biri 20 mM üridin ve %0,2 urasil içeren selektif DPY besiyerine ve selektif olmayan DPY besiyerine (üridin ve urasil içermeyen) OD₆₀₀ değeri 0,4 olacak şekilde aktarılmıştır. Selektif ve selektif olmayan kültürler aynı koşullar altında (180 rpm, 30 °C) inkübe edilmiş ve 24. saatin sonunda ölçülen OD₆₀₀ değerleri ile başlangıç OD₆₀₀ değerleri ve selektif-selektif olmayan ortam bakımından karşılaştırılmıştır.

Genomik DNA izolasyonu için; izolasyon yapılmak istenen koloniler, 20 mM üridin ve %0,2 urasil içeren 5 mL'lik DPY besiyerinde 180 rpm, 30 °C'de bir gece süreyle inkübe edilerek büyütülmüştür. İnkübasyon sonrası, gelişen miselyumlar toplanarak 200 µL lizis tamponu (10 mM Tris-Cl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0), % 2 Triton X-100, %1 SDS ve 0.1 M NaCl) ile sulandırılmıştır. İki döngü olacak şekilde, yaklaşık 20 dk -80 °C'de ve 2 dk 95 °C'de tutularak dondur-çöz işlemine tabi tutulmuştur. İki dk süreyle güçlü bir şekilde vortekslelendikten sonra 200 µL kloroform eklenmiş ve 20.000 xg'de, 3 dk oda sıcaklığında santrifüjlenmiştir. Ardından süpernatant toplanarak önceden soğutulmuş 400 µL %100 etanol ile karıştırılmış ve 5 dk'lık inkübasyon sonrası 20.000 xg'de, 5 dk oda sıcaklığında santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmış ve elde edilen pelet 500 µL %70 etanol ile 20.000 xg'de, 1 dk oda sıcaklığında santrifüjlenerek yıkanmış ve kurumaya bırakılmıştır. Elde edilen genomik DNA 20 µL TE (Tris-EDTA) tampon çözeltisinde sulandırılmış ve 1 µL RNaz eklenerek 37 °C'de 1-2 saat süreyle tutulmuştur. Tüm bu işlemler sonrası elde edilen genomik DNA'lar, kolonilerin *pyrG* oksotrof olduklarından emin olmak için qPZR çalışmasında kullanılmıştır.

qPZR çalışması için, delesyon kasedini oluşturan *pyrG* 3' ve 5' bölgelerine komplementer olacak şekilde tasarlanmış primerler ile, internal kontrol için housekeeping gen olarak 18s rRNA primer çifti kullanılmıştır. Kullanılan primerler Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2: qPZR uygulamasında kullanılan primerler.

Primer	Nükleotit Dizisi
<i>pyrG</i> ileri primer	ATATCCTCTCCGATTTTCAGCGAAGA
<i>pyrG</i> ters primer	ATGGTACTGCTTTTGGACTGTGTTT
18s rRNA ileri primer	GAAACTCACCAGGTCCAGACAAAAT
18s rRNA ters primer	GCAGACAAATCACTCCACCAACTAA

Kalibrator (kontrol grup) olarak yabancı tip *A. oryzae* RIB40 genomik DNA'sı kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak herhangi bir DNA içermeyen reaksiyon hazırlanmıştır. Tüm genomik DNA'lar 50 ng/μL ve 5 ng/μL olacak şekilde ayrı ayrı ve çift tekrarlı çalışılmıştır. Hazırlanan reaksiyon karışımları Tablo 4.3'te temsil edilmiştir.

Tablo 4.3: qPZR reaksiyonları.

Reaktan	Hacim (μL)	Reaktan	Hacim (μL)
2x SYBR green RT master mix	10	2x SYBR green RT master mix	10
<i>pyrG</i> ileri primer (10 μM)	0,75	18s rRNA ileri primer (10 μM)	0,75
<i>pyrG</i> geri primer (10 μM)	0,75	18s rRNA geri primer (10 μM)	0,75
Genomik DNA	1	Genomik DNA	1
Nükleazlardan arındırılmış su	7,5	Nükleazlardan arındırılmış su	7,5
Toplam hacim	20	Toplam hacim	20

qPZR reaksiyon koşulları ise Tablo 4.4'te gösterilmektedir.

Tablo 4.4: Uygulanan qPZR parametreleri.

Döngü sayısı	İşlem	Sıcaklık (°C)	Zaman (s)
40 döngü	İlk denatürasyon	95	40
	Denatürasyon	95	10
	Yeniden birleşme	60	15
	Uzama	72	10

4.3 Anti-RNaz A VHH'in İfadelenmesi

4.3.1 İfadelenme vektörünün *pyrG* (-) *A. oryzae*' e transformasyonu

Tez kapsamında, *pyrG* (-) *A. oryzae*'de üretiminin gösterilmesi için affinite ajanı olarak seçilen VHH, ribonükleaz A (RNaz A) ile spesifik olarak etkileşen VHH (anti-RNaz VHH) yapısıdır [124]. Seçilen VHH 123 aminoasitten oluşmakla birlikte disülfid bağı kuran iki sistein kalıntısı içermektedir ve NCBI ulaşım numarası 2P49_B'dir.

A. oryzae mikroorganizması için kodon optimize edilen anti-RNaz A VHH proteinini kodlayıcı dizi, *A. oryzae*'de yüksek düzeyde üretilen amilaz promotörü altında, *A. oryzae* ifadenme vektöründe olacak şekilde sentezlettirilmiştir. Ek olarak, saflaştırma prosesinde yararlanılacağı için dizinin C-terminal bölgesine 8x Histag eklenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 : Anti-RNaz VHH ifadenme vektörünün (plazmid-VHH) şematik gösterimi. SS: sinyal dizisi.

Sentezlettirilen plazmid-VHH vektörünün yetenekli hale getirilmiş *E. coli* TOP10 bakteri hücrelerine ısı şoku uygulaması ile, 4.2.1 başlığında anlatıldığı gibi, bakteriyel transformasyonu yapılmıştır. Gelişen tekli kolonilerden biri, gliserol stok almak ve plazmid izolasyonu yapabilmek için 100 µg/mL ampisilin içeren 100 mL LB sıvı besiyerine aktarılarak bir gece süreyle 37 °C ve 200 rpm'de inkübe edilmiştir. Qiagen izolasyon kiti yardımıyla izole edilen plazmid, *A. oryzae* transformasyonu için restriksiyon enzimler ile kesilerek (Tablo 4.5) doğrusal hale getirilmiştir ve ilgilenilen DNA bandı saflaştırma kiti yardımıyla agaroz jelden kazanılmıştır.

Tablo 4.5: Plazmid-VHH'in restriksiyon enzimlerle kesim reaksiyonu. Reaksiyon koşulu: 37 °C, 2 h.

Reaktan	Hacim (µL)
10x restriksiyon enzim kesim tamponu	2
<i>EcoRI</i>	1,5
<i>HindIII</i>	1,5
pUC- <i>pyrGA</i> vektörü	7 (~5 µg)
Nükleazlardan arındırılmış su	8
Toplam hacim	20

Jelden geri kazanılan, ilgilenilen DNA, *pyrG* gen delesyonu yapılmış ve doğrulanmış *pyrG* oksotrof *A. oryzae* mikroorganizma hücrelerine protoplast aracılı olarak transforme edilmiştir. Bunun için; *pyrG* oksotrof *A. oryzae* hücreleri 20 mM üridin ve %0.2 urasil içeren 50 mL'lik DPY besiyeri içerisinde OD₆₀₀ 0.4 olacak şekilde aşıl原因arak ön kültür hazırlanmıştır. Bir gece boyunca 30 °C ve 180 rpm'de inkübe edilmiştir. Ardından, 4.2.2 başlığında anlatıldığı gibi *A. oryzae* transformasyon adımları izlenmiştir. Elde edilen sferoblastlara, jelden geri kazanılmış doğrusal ilgilenilen DNA eklenmiştir. Kontrol gruba herhangi bir DNA eklenmemiştir. Gerekli inkübasyon ve yıkama işlemleri sonrası, sferoblastlar %0,5 agar içeren CD besiyeri ile nazıkçe karıştırılarak, önceden hazırlanmış yalnızca %2 agar içeren CD plakalara yayılmıştır. Plakalar 30 °C'de 6 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır.

Transfeksiyon kontrolü olarak, yalnızca *pyrG* genini içeren vektör, restriksiyon enzimlerle kesilerek doğrusal hale getirilmiş ve transformasyon sırasında transfeksiyon kontrol grubu olarak sferoblastlara eklenmiştir. Transformasyon protokolü deney grubu ile aynı olacak şekilde takip edilmiştir.

İnkübasyonun 6. gününde gelişen tekli kolonilerden rastgele seçilen 9 koloni, steril distile su yardımıyla ayrı ayrı toplanmış ve ifadenme testinde gereken başlangıç konsantrasyonunu elde edebilmek için taze CD agar plakalara yayılmıştır. Plakalar 5-6 gün boyunca 30 °C'de inkübe edilmiştir.

4.3.2 Rekombinant anti-RNaz A VHH'nin küçük ölçekte ifadenmesi

İnkübasyon sonrası, yayımı yapılmış CD plakalar yüzeyinde gelişen transformant *A. oryzae* kolonileri steril distile su ile toplanarak 15 mL DPY besiyerinde 4×10^6 hücre olacak şekilde kültür başlatılmıştır. Kültürler 180 rpm ve 30 °C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Süre sonunda, kültürler 1:10 oranında seyreltme uygulanarak 75 mL 2x DPY besiyerine aşılanmıştır. Aşılanan kültürler 180 rpm ve 30 °C'de 7 gün süreyle inkübe edilmiştir. İfadenme testi kapsamında inkübasyon süresi boyunca, protein ifadenmesinin kontrolü ve takibi için üçüncü, beşinci ve yedinci günlerde kültürlerden toplanan örnekler SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit jel elektroforezi) yöntemi ile analiz edilmiştir. Bunun için, kültür örneğinin 30 µL'si, 6 µL 6x laemmli tamponu ile karıştırılmış, 95 °C'de 15 dakika tutulduktan sonra %15 oranında hazırlanan SDS-PAGE jeline yüklenmiştir. 110 V'da 1,5-2 saat yürütülen jel coomasie mavisi boya çözeltisi ile boyama işlemlerine alınmıştır. Buna göre belirlenen

transformant koloniden gliserol stok alınarak ileri çalışmalara bu koloni ile devam edilmiştir.

4.3.3 Rekombinant anti-RNaz A VHH'in fermentörde ifadenmesi

Belirlenen transformant koloni ile fermentasyon çalışmaları yapılmıştır. Bunun için, transformant koloni 20 g/L dekstrin, 10 g/L pepton, 5 g/L maya ekstraktı, 1.5 g/L KH_2PO_4 , 0.15 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (pH 3,5) içeren 400 mL'lik besiyerinde 30 °C ve 250 rpm'de bir gece boyunca büyütülmüştür (Ön-kültür). İnkübasyon sonrası, fermentör içinde hazırlanarak steril hale getirilmiş olan 30 g/L dekstrin, 7.5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3 g/L maya ekstraktı, 1.5 g/L KH_2PO_4 , 1 g/L pepton, 1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L NaCl, 0.1 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.5 mL/L iz element solüsyonu (10.75 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.9 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.38 g/L $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10.4 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ve 1 mL/L küpük engelleyici solüsyondan oluşan büyüme ortamına, ön-kültür 1:10 oranında seyreltilerek aktarılmıştır. Fermentasyon sıcaklığı 30 °C, pH 5.5, hava akışı dakikada 1 L, karıştırıcı hızı 400-750 rpm ve çözünmüş oksijen konsantrasyonu %20 olarak ayarlanmıştır. Fermentasyon 120. saatin sonunda sonlandırılmıştır.

4.4 Rekombinant Anti-RNaz A VHH'nin Saflaştırılması

Kültür flaskı ile yapılan ifadenme çalışmalarında yedi günlük inkübasyonun ardından, fermentör çalışmasında beş günlük inkübasyon süresi sonunda, rekombinant VHH proteinini ifadeleyen *A. oryzae* kültürü Whatman filtre kağıdından geçirilmiş ve kaba filtreleme yoluyla kültür mediumu konak hücrelerin kalanından ayrıştırılmıştır. Elde edilen sıvı kültür, rekombinant anti-RNaz A VHH'in saflaştırılması için, 5 kDa'luk molekül ağırlık ayırma sınırına (molecular weight cut off) sahip membran kullanılarak 10 kat konsantre edilmiştir. Konsantre örnekteki rekombinant anti-RNaz A VHH, C-ucunda yer alan 8x-histag sayesinde immobilize edilmiş metal affinite kromatografisinden (IMAC) yararlanılarak doğal (native) koşullarda saflaştırılmıştır. Bunun için ilk olarak konsantre örnek ile nikel rezin bir araya getirilerek 4 °C'de 2 saat süre ile çalkalanmıştır. Ardından, örnek ve rezin yer çekimi akışlı kolona yüklenmiş ve örneğin kolondan ard arda 2 kez geçmesi sağlanmıştır. Yıkama çözeltisi (50 mM NaH_2PO_4 , 500 mM NaCl, pH 7.4) ile gerçekleştirilen yıkama işleminin ardından rezine bağlı rekombinant anti-RNaz A VHH proteinlerinin kolondan ayrılması elüsyon çözeltisi (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 250 mM imidazol, pH 7.4) ile

sağlanmıştır. Bu işlemler sırasında toplanan örneklerin %15'lik SDS-PAGE jelinde analizi ve Western blot analizi yapılmıştır.

IMAC ile saflaştırılan rekombinant anti-RNaz A VHH proteinin olduğu elüsyon çözeltisindeki imidazolün uzaklaştırılması için, PD10 Desalting kolon yardımıyla tampon çözelti değişimi yapılmıştır. PBS tampon çözeltisine (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, and 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7.4) geçirilen rekombinant anti-RNaz A VHH proteininin ileri saflaştırma işlemi için ÄKTA pure kromatografi sisteminde gel filtrasyonu yapılmıştır. Bunun için Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare, Chicago, IL, ABD) kolonu kullanılmıştır. Oda sıcaklığında gerçekleştirilen gel filtrasyon tekniğinde, denge (equilibration), yıkama ve elüsyon aşamalarında PBS tampon çözeltisi kullanılmıştır. Akış hızı 0,5 mL/dk olarak uygulanmıştır. Anti-RNaz A VHH içeren fraksiyonlar toplanarak 3 kDa'luk molekül ağırlığı ayırma sınırına sahip Amicon konsantre edici membran sisteminde konsantre edilmiştir. Saflık analizi SDS-PAGE ve Western blot teknikleri ile analiz edilmiştir. Total protein verimi dansitometrik olarak ImageJ 1.53t programı (Ulusal Sağlık Enstitüleri, NIH, ABD) ile belirlenmiştir. Total proteinin ve üretilen anti-RNaz A VHH'in konsantrasyonu, Bradford reaktifi ile 595 nm'de verilen absorbansa göre spektrofotometrik olarak Bradford metodu ile incelenmiş ve standart protein olarak BSA kullanılmıştır.

Western blot analizi için; SDS-PAGE elektroforez yöntemi ile örneklerin jelde yürütüldükten, nitroselüloz membrana yarı ıslak ortamda elektrik alanda transfer edilmiştir (blotlama). Transfer tampon çözelti olarak; 25 mM Tris-Cl (pH 8,3), 192 mM glisin ve %20 metanolden oluşan Towbin tamponu kullanılmıştır. Blotlanan membran distile su ve yıkama çözeltisi (10 mM Tris-Cl (pH 7,4), % 0,9 NaCl, % 0,2 Tween20) ile ardışık olarak üç döngü olacak şekilde yıkandıktan sonra, %5 oranında süt tozu içeren yıkama çözeltisi içine alınarak 4 °C'de bir gece düşük hızda çalkalanmıştır (bloklama). Bloklama işleminin ardından fazla bloklama çözeltisinin uzaklaştırılması için membran, yıkama çözeltisi ile çalkalanmıştır. HRP ile konjüge anti-6x His tag® antikor, %5 süt tozu içeren yıkama çözeltisinde 1:5000 oranında hazırlanmıştır. Yıkanan membran HRP ile konjüge anti-6x His tag® antikor ile 2,5 saat süreyle 4 °C'de düşük hızda çalkalanarak inkübe edilmiştir. Gerçekleştirilen yıkama işlemleri sonrası Western Blot kiti kullanılarak membran kemilüminesans olarak incelenmiştir.

4.5 Rekombinant Anti-RNaz A VHH'in Antijeni ile Spesifik Etkileşiminin İncelenmesi

4.5.1 Pull-down analiz

Pull-down analiz HisPur™ Ni-NTA rezin kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deney grubu rekombinant anti-RNaz A VHH ve RNaz A'dan oluşurken, kontrol grubu yalnızca RNaz A içermektedir. Her iki grup için de, 50'şer µL rezin mikrosantrifüj tüplere alındıktan sonra, 700 xg'de 2 dk 4 °C'de santrifüjlenerek önce 400 µL dH₂O daha sonra 400 µL yıkama çözeltisi (20 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 7.4) ile yıkanmıştır. Ardından, deney grubu rezinine, PBS içinde hazırlanmış 1.5 mg/L konsantrasyonundaki anti-RNaz A VHH'den 100 µL eklenmiş ve 4 °C'de 1 saat süreyle çalkalanarak inkübe edilmiştir. Kontrol grubu rezinine 100 µL PBS çözeltisi eklenerek inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası yıkama çözeltisi ile yapılan yıkama işlemlerini takiben, deney ve kontrol grubu rezinleri 150 µL RNaz A çözeltisi ile 37 °C'de 1 saat süreyle çalkalarak inkübe edilmiştir. Gerçekleştirilen yıkama adımlarının ardından, rezine bağlı proteinlerin ayrıştırılması için elüsyon çözeltisi (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 300 mM imidazol, pH 7.4) kullanılmıştır. Analiz boyunca uygulanan adımlardan alınan örnekler SDS-PAGE jelde incelenmiştir.

4.5.2 Jel filtrasyon kromatografi analizi

Öncelikle rekombinant anti-RNaz A VHH proteini saflaştırıldıktan sonra PBS tampon çözelti ile seyreltilmiş ve 0,2 mg/mL konsantrasyonunda 500 µL olacak şekilde ÄKTA pure kromatografi sisteminde Superdex 200 Increase 10/300 GL kolonundan geçirilmiştir.

RNaz A, PBS içinde çözülerek 1 mg/mL konsantrasyonunda 500 µL olacak şekilde hazırlanmıştır. Ardından, rekombinant anti-RNaz A VHH proteini ile aynı koşullarda Superdex 200 Increase 10/300 GL kolonundan geçirilmiştir.

RNaz A ile rekombinant anti-RNaz A VHH proteini, son hacim 500 µL olacak şekilde 1:1 oranında biraraya getirilmiş ve 37 °C'de 30 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından önceki uygulamalardaki aynı koşullar takip edilerek Superdex 200 Increase 10/300 GL kolonundan geçirilmiştir.

Tüm uygulamalarda denge, yıkama ve elüsyon aşamalarında PBS tampon çözelti kullanılmış, akış hızı 0,5 mL/dk olarak ayarlanmıştır.

4.5.3 Yüzey plazmon rezonans analizi

Yüzey plazmon rezonans analizi için BIAcore T200 sistemi (Cytiva, Sweden) ve ticari sensör çipi olarak Series S sensor chip CM5 kullanılmıştır. Saflaştırılmış Anti-RNaz VHH 10 µL/dk akış hızında 60 s süreyle akış hücresi üzerinde yakalanmıştır. Bağlanma kinetiği analizi için; 0 nM, 2 nM, 10 nM ve 50 nM konsantrasyonlarındaki RNaz A, 30 µL/dk akış hızında, 75 s birleşme (association) ve 225 s ayrılma (dissociation) boyunca uygulanmıştır. Analizler oda sıcaklığında; 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA ve 0.005% Surfactant P20 (pH 7,4) içeren tampon çözeltide gerçekleştirilmiştir. Kinetik hesaplamalar için Biacore T200 Evaluation Software (version 3.2.1, Cytiva) 1:1 bağlanma modeli kullanılmıştır.



5. BULGULAR ve TARTIŞMA

5.1 Oksotrof *A. oryzae*'nin Elde Edilmesi ve Test Edilmesi

5.1.1 *pyrG* delesyon vektörü

pyrG oksotrofik *A. oryzae*'nin oluşturulmasında gerekli delesyon vektörü (Şekil 4.1) yabani tip *A. oryzae* RIB40 genomundan belirlenen *pyrG* genini kodlayan dizinin açık okuma çerçevesine (ORF, open reading frame) bitişik 1.3 kb boyutundaki 5' yukarıakış (5' *pyrG*) ve 1.2 kb boyutundaki 3' aşağıakış bölgesi (3' *pyrG*)'nin, aralarında *pyrG* ORF olmaksızın biraraya getirilmesi ile oluşturulmuştur.

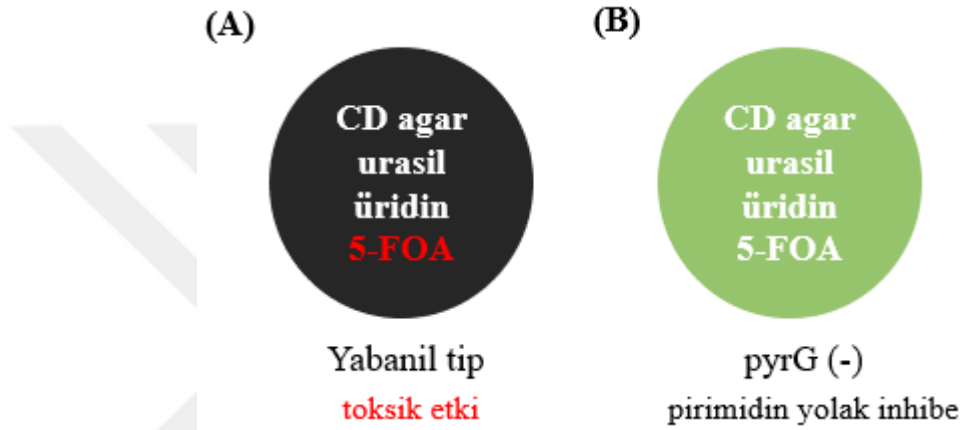
Tasarımı yapılan primer çiftleri ile, 5' *pyrG* bölgesi *HindIII* ve *SbfI* restriksiyon enzimlerini, 3' *pyrG* bölgesi ise *SbfI* ve *EcoRI* restriksiyon enzimlerini taşıyacak şekilde PZR uygulaması ile çoğaltılmıştır. Çoğaltılan bu bölgeler *SbfI* ile kesilerek birbirine uyumlu hale getirilmiş ve ligasyon ile biraraya gelmeleri sağlanmıştır ve pUC19 vektör omurgasına aktarılmışlardır. Oluşturulan bu delesyon vektöre pUC-*pyrGΔ* adı verilmiştir.

5.1.2 *pyrG* oksotrofik *A. oryzae* kolonisinin oluşturulması

pyrG delesyon mekanizması; pUC-*pyrGΔ* delesyon vektöründeki 5' *pyrG* ile 3' *pyrG* bölgelerinin, yabani tip *A. oryzae*'nin *pyrG* gen lokusundaki 5' yukarıakış ve 3' aşağıakış bölgeleri ile homolog rekombinasyon sonucu yer değiştirmesi prensibine dayanmaktadır [31]. Bu nedenle *pyrG* oksotrofik *A. oryzae* kolonileri, *EcoRI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleri kullanılarak doğrusal hale getirilen pUC-*pyrGΔ* delesyon vektörünün, yabani tip *A. oryzae* RIB40 suşuna protoplast aracılı transformasyonu yoluyla meydana getirilmiştir.

Yapılan protoplast aracılı transformasyonda sferoblast haline getirilen hücrelerin hayatta kalması için transformasyon sonrası rejenerasyonun tamamlanması da gerekmektedir [32]. Bunun için başlangıçta, transforme edilen hücreler, önceden hazırlanmış üridin, urasil ve 5-FOA içeren selektif CD agar plakalara yayılmıştır (Şekil 5.1). *pyrG* delesyonu gerçekleşmiş olan (*pyrG* (-)) hücrelerin selektif ortamda hayatta

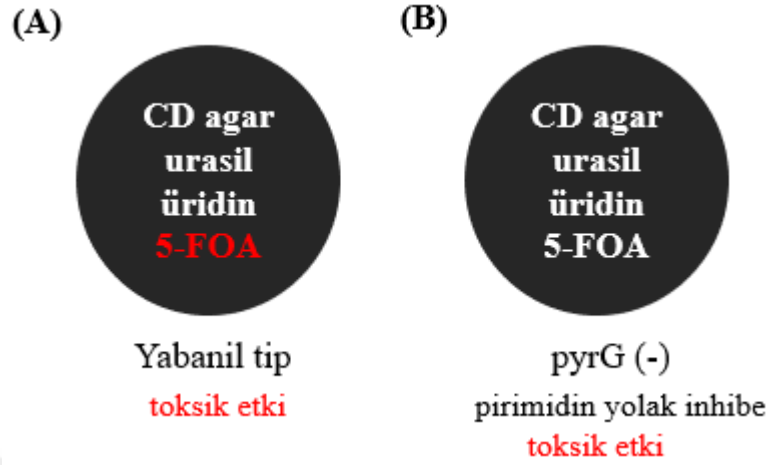
kalırken, delesyona uğramamamış yabancı tip hücrelerin ise selektif ortamda hayatta kalamayacağı beklenmiştir. Bunun sebebi, yabancı tip hücrelerdeki aktif *pyrG* geninin 5-FOA'yı pirimidin biyosentezine katarak metabolize etmesi ve 5-FOA'nın hücre büyümesi üzerindeki inhibe edici etkisi sebebiyle hücrenin hayatta kalmasını önleyecek olmasıdır. Diğer taraftan *pyrG* (-) hücreler ise, inaktif *pyrG* nedeniyle 5-FOA'yı metabolize edemeyerek 5-FOA'ya karşı direnç kazanacaklar ve aynı zamanda hücrenin gelişimi ve hayatta kalması için gerekli olan üridin ve urasili selektif ortamdan karşıladıklarından hayatta kalacaklardır (Şekil 5.1).



Şekil 5.1: Transformasyon sonrası selektif ortama yayılan hücrelerin beklenen davranışı. Yabani tip hücreler 5-FOA varlığında toksik etki sebebiyle hayatta kalamazken (A), *pyrG* delesyonu tamamlanmış hücreler (*pyrG* (-)) pirimidin yolak inhibe olduğundan 5-FOA'ya karşı direnç kazanarak hayatta kalacaklardır (B).

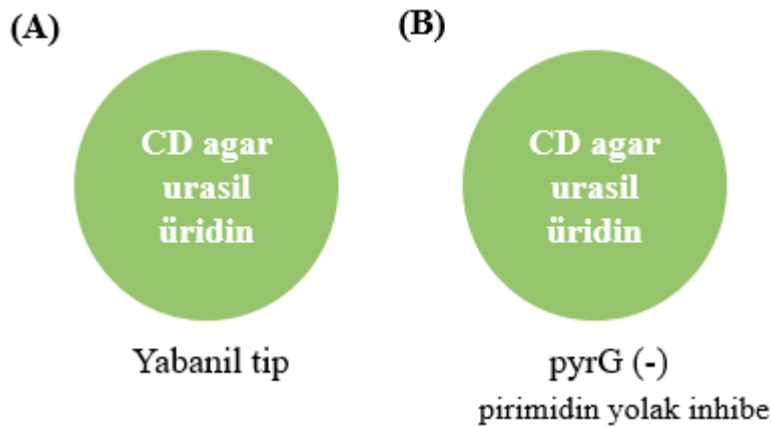
Yapılan ilk denemelerde, 5-FOA'nın varlığı yabancı tip *A. oryzae*'nin gelişmesini önlese de, beklenenin aksine *pyrG* delesyonuna uğramış herhangi bir *A. oryzae* kolonisi hayatta kalamamıştır. Plakalarda herhangi bir mikrobiyal üreme gerçekleşmemiştir (Şekil 5.2). Bunun üzerine *pyrG* delesyonu ile alakalı literatür çalışmaları tekrar değerlendirilmiş ve Ling ve ark.'nın [31] gerçekleştirdiği çalışmada benzer bir durum ile karşılaşmıştır. Çalışmada belirtildiği üzere, transformasyon sırasında çoklu çekirdek yapısına sahip sferoblastların tamamı homolog rekombinasyonla delesyona uğramamaktadır. Bu sferoblastların tamamının 5-FOA'nın bulunduğu rejenerasyon ortamına yayılması, aralarında aktif *pyrG* lokusuna sahip transforme olmamış (yabancı tip) sferoblastların 5-FOA'yı metabolize ederek intihar inhibitörüne dönüşmesine sebep olmuştur. Transforme olmuş *pyrG* (-) sferoblastlar ise, aktif *pyrG* lokusuna sahip yabancı tip sferoblastların ortaya çıkardığı

intihar inhibitörleri ile aynı ortamda bulunduklarından, 5-FOA'ya karşı direnç kazanmış olmaları hayatta kalmaları için yeterli olmamıştır (Şekil 5.2).



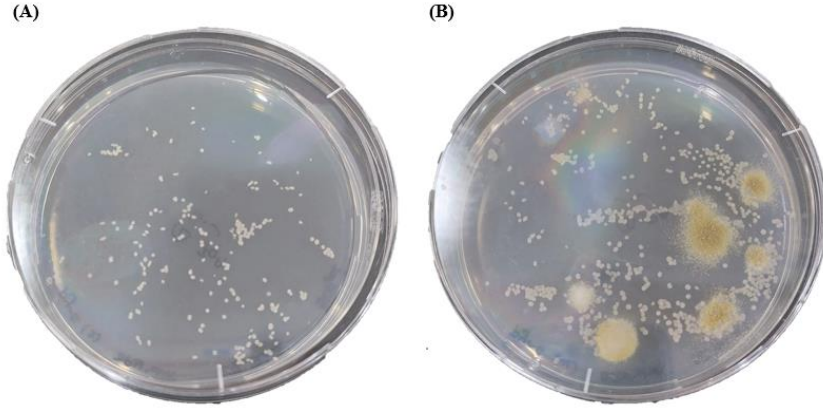
Şekil 5.2: Transformasyon sonrası selektif rejenerasyon ortamına yayılan sferoblastların davranışı. Transforme olmamış yabani tip hücreler 5-FOA varlığında toksik etki sebebiyle hayatta kalamamıştır (A). *pyrG* (-) hücreler ise 5-FOA'ya karşı dirençli olsalar da, ortamdaki yabani tipteki hücrelerin ürettiği intihar inhibitörleri nedeniyle hayatta kalamamıştır (B).

Sonraki transformasyon denemelerinde; *pyrG* delesyon vektörü ile transformasyon sonrası, sferoblastlar yalnızca urasil ve üridin içeren CD agar plakalara yayılmıştır. Burada, ortama 5-FOA eklenmeyerek, yabani tip ve *pyrG* (-) *A. oryzae* hücrelerinin çoğalmasını sağlayacak bir ortam sağlanmıştır. İnkübasyonun ardından, plakaların tüm yüzeyini kaplayacak şekilde *A. oryzae* gelişimi olduğu görülmüştür (Şekil 5.3).



Şekil 5.3: Transformasyon sonrası hücrelerin urasil ve üridin içeren selektif olmayan ortama yayılması. Yayılan hücrelerden, yabani tip ve *pyrG* (-) hücrelerin tamamı 5-FOA'nın yokluğunda koloni oluşturarak hayatta kalabilmiştir.

Selektif olmayan ortamda gelişen tüm *A. oryzae* kolonilerinin arasından yabancı tiplerin elimine edilmesi ve yalnızca *pyrG* (-) olanların seleksiyonun yapılabilmesi için, hücreler toplanarak uridin ve urasil içeren DPY besiyerinde büyütülmüştür. Daha sonra; uridin, uracil ve 5-FOA içeren selektif CD agar plakalara dilüsyon yapılarak yayılmıştır. Beklenildiği gibi (Şekil 5.2), yabancı tipteki hücreler seçici ortamda 5-FOA varlığında gelişemezken, *pyrG* (-) hücreler bu ortamda gelişebilmiştir (Şekil 5.4).



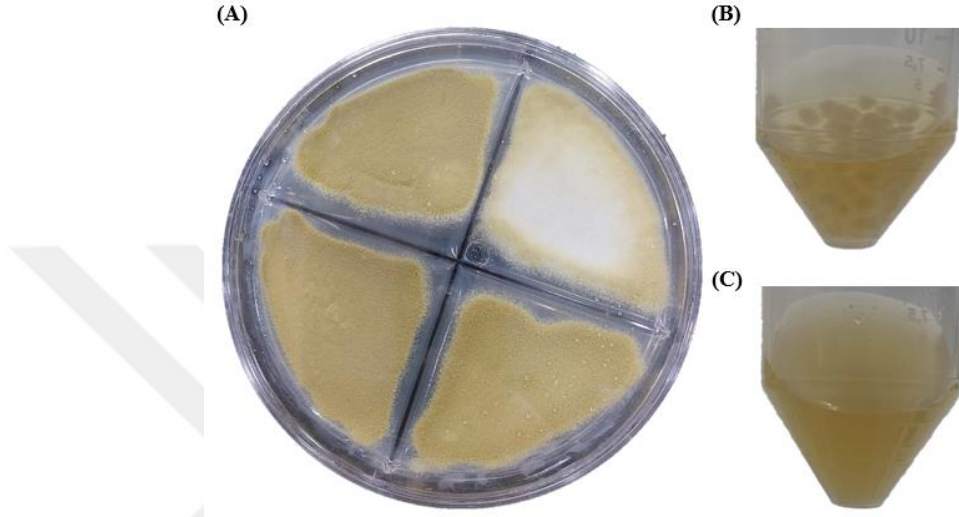
Şekil 5.4: Yalnızca urasil ve üridin içeren selektif olmayan DPY besiyerinde büyütülen transformant hücre karışımının seyreltilerek; urasil, üridin ve 5-FOA içeren selektif ortamlara yayılması. (A) Selektif ortama yayılan transformant hücre karışımında delesyona uğramış hücre bulunmamaktadır, bu sebeple 5-FOA varlığında koloni gelişimine rastlanmamıştır. Plaka yüzeyinde görülen hücreler DPY besiyerinden yayılan başlangıçtaki hücrelerdir ve koloni geliştirmemişlerdir. (B) Selektif ortama yayılan transformant hücre karışımında var olan *pyrG* (-) koloniler 5-FOA'ya dirençli olduklarından koloni geliştirebilmişlerdir. (A) ve (B) plaka yüzeyinde görülen kültürlenmemiş diğer hücreler ise DPY besiyerinden yayılan başlangıçtaki hücrelerdir ve *pyrG* delesyonuna uğramamış olduklarından koloni geliştirememişlerdir.

5.1.3 Oksotrofik kolonilerin doğrulanması

Selektif ortamda gelişen *pyrG* (-) kolonilerinin (Şekil 5.4(B)) delesyonunun kararlılığını incelemek amacıyla, *pyrG* (-) koloniler toplanmış, yeniden urasil, üridin ve 5-FOA'lı selektif ortama yayılarak inkübe edilmiştir (Şekil 5.5). Bu adım peş peşe 3 kez tekrarlanarak, delesyonun kalıcılığı gösterilmiştir.

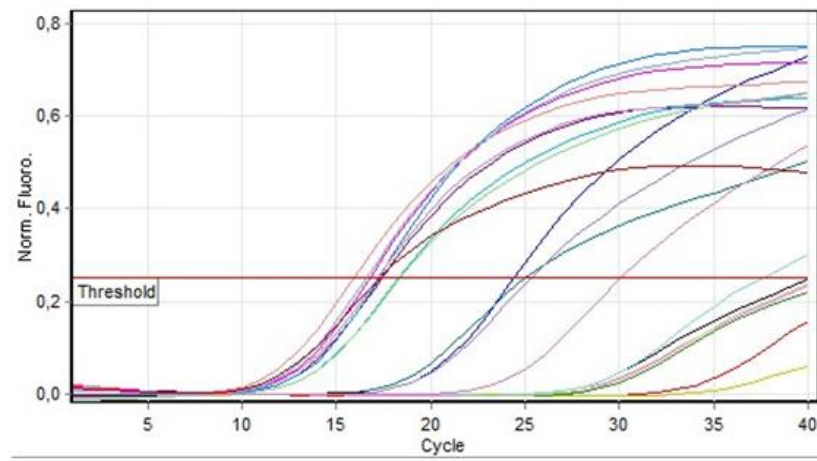
Oksotrof kolonilerin selektif ve selektif olmayan ortamdaki davranışı izlenerek oksotrof olduklarını doğrulamak ve büyüme davranışında urasil ve üridinin önemini gözlemlemek için, *pyrG* (-) koloniler selektif ve selektif olmayan DPY besiyerine aşılanmıştır (Şekil 5.5(B) ve Şekil 5.5(C)). İnkübasyon sonrasında, urasil ile üridin içermeyen DPY besiyerinde *pyrG* (-) hücrelerinin OD₆₀₀ değerinde anlamlı bir fark

gözlenmezken (Şekil 5.5(C)), urasil ile üridin içeren DPY besiyerinde OD₆₀₀ değerinde 10 kat artış (başlangıç OD₆₀₀:0.4 ve inkübasyon sonrası OD₆₀₀:4.32) görülmüştür (Şekil 5.5(B)). Beklenildiği üzere, *pyrG* (-) kolonilerinin hayatta kalması ve çoğalması için urasil ve üridinin dış ortama eklenmesi gerekmektedir. Ek olarak, yapılan çalışmalarda, oksotrof haline getirilen organizmada morfolojik herhangi bir değişim gözlenmemiştir.



Şekil 5.5: *pyrG* (-) kolonilerin selektif ortamlarda çoğaltılması. (A) Delesyonun kalıcılığının gösterilmesi amacıyla *pyrG* (-) kolonilerin urasil, üridin ve 5-FOA içeren selektif CD ortamında tekrarlı çoğaltılması. (B) *pyrG* (-) koloninin urasil ve üridin içeren DPY ortamında gelişimi. (C) *pyrG* (-) koloninin urasil ve üridin içermeyen DPY ortamında gelişimi.

5-FOA dirençli kolonilerden, ileri analizler için izole edilen genomik DNA’lardan *pyrG* ve 18s rRNA primer çiftleri ile iki farklı konsantrasyon için qPZR çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen Ct değerlerine göre (Şekil 5.6), relative quantification (göreceli miktar belirleme) analizi gerçekleştirilmiş ve veriler referans gen olan 18s rRNA genine karşı normalize edilerek ‘fold difference’ belirlenmiştir. Bunun için, Livak metodu [125] adı da verilen $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılmıştır.



Şekil 5.6: qPZR verilerinin grafiğe aktarılmış hali.

Livak metodunda;

Öncelikle, hedef gen olan *pyrG*'nin test edildiği kolonilerin ve referans gen olan 18s rRNA'nın test edildiği kolonilerin ortalama Ct değerleri alınmıştır. Bu değer kullanılarak, *pyrG* primer çifti ile elde edilen Ct değerinin, referans gen ile normalizasyonu hem test edilen örnekler hem de kontrol grup ile yapılmıştır (Denklem 5.1 ve Denklem 5.2):

$$\Delta Ct (test) = Ct (test, pyrG) - Ct (test, 18s rRNA) \quad (5.1)$$

$$\Delta Ct (kontrol) = Ct (kontrol, pyrG) - Ct (kontrol, 18s rRNA) \quad (5.2)$$

Test edilen örneklerin ΔCt değerinin kontrol örneğinin ΔCt değeri ile normalizasyonu yapılmıştır (Denklem 5.3):

$$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct (test) - \Delta Ct (kontrol) \quad (5.3)$$

Son olarak, ifadenme oranı (fold difference, fold increase/decrease) hesaplanmıştır (Denklem 5.4):

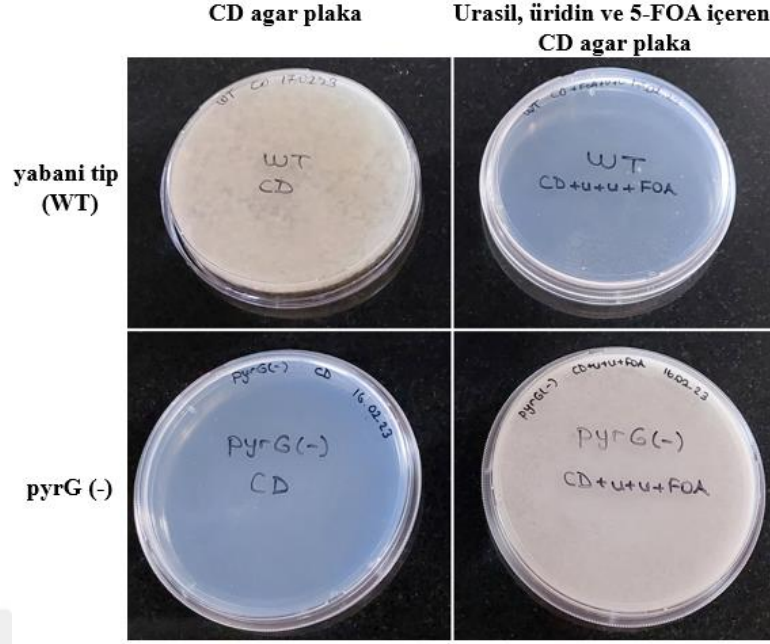
$$2^{-\Delta \Delta Ct} = ifadenme \text{ oranı} \quad (5.4)$$

Elde edilen veriler Tablo 5.1’da verilmiştir. Sonuçlara göre; #1, #3, #4, #5 ve #6 olarak isimlendirilen *pyrG* (-) kolonilerinde *pyrG* gen delesyonu işlemi %100 oranında başarıyla gerçekleştirilmiştir.

Tablo 5.1: qPZR verilerinin Livak metodu yardımıyla relative quantification (göreceli miktar belirleme) analizi.

Örnek	Primer çifti	Ct	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	%delesyon
Kör	<i>pyrG</i>	40	0	-	-	-
	18s rRNA	40				
RIB40	<i>pyrG</i>	24,4	7	-	-	-
	18s rRNA	17,4				
#1	<i>pyrG</i>	40	22,75	15,75	$1,81459 \times 10^{-5}$	100
	18s rRNA	17,25				
#2	<i>pyrG</i>	24,93	9,01	2,01	0,248273124	75
	18s rRNA	15,92				
#3	<i>pyrG</i>	40	23,25	16,25	$1,28311 \times 10^{-5}$	100
	18s rRNA	16,75				
#4	<i>pyrG</i>	40	21,71	17,71	$3,7312 \times 10^{-5}$	100
	18s rRNA	18,29				
#5	<i>pyrG</i>	40	21,63	14,63	$3,94395 \times 10^{-5}$	100
	18s rRNA	18,37				
#6	<i>pyrG</i>	37,56	21	14	$6,10352 \times 10^{-5}$	100
	18s rRNA	16,56				
#7	<i>pyrG</i>	25,25	8,08	1,08	0,473028823	53
	18s rRNA	17,17				
#8	<i>pyrG</i>	30,02	12,74	5,74	0,018710605	98
	18s rRNA	17,28				

Elde edilen veriler sonucunda, %100 delesyon oranı belirlenmiş *pyrG* (-) kolonilerinden biri (Şekil 5.7) ile tez kapsamındaki rekombinant protein üretim çalışmalarına geçilmiştir.

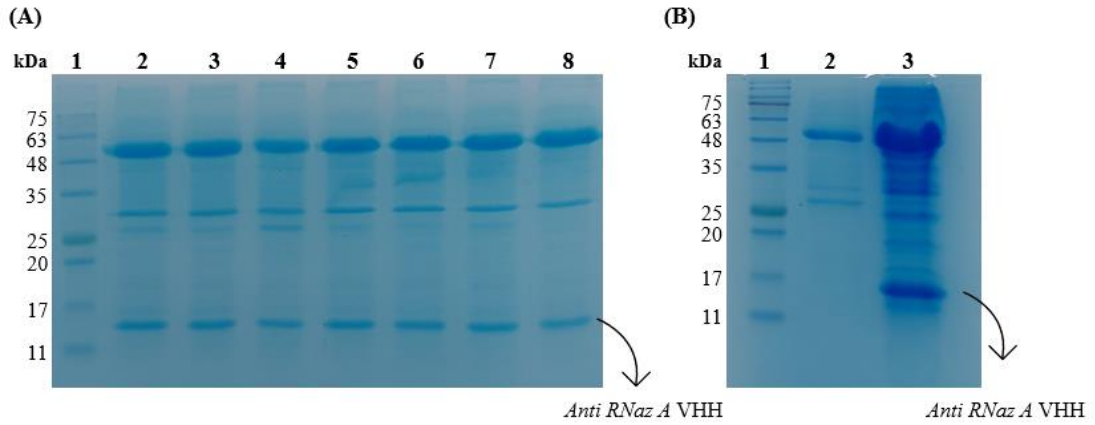


Şekil 5.7: İfadeleme çalışmaları için seçilen *pyrG* (-) *A. oryzae*'nin ve yabani tip *A. oryzae* kolonisinin selektif ve selektif olmayan ortamda gösterilmesi. Yabani tip *A. oryzae* CD agar plakada gelişmekte (sol üst), 5-FOA içeren CD agar plakada gelişmemektedir (sağ üst). Seçilen *pyrG* (-) *A. oryzae* urasil ile üridinin bulunmadığı CD agar plakada gelişmezken (sol alt), 5-FOA'ya dirençli olduğu için urasil ve üridinin de olduğu CD agar plakada gelişmiştir (sağ alt).

5.2 Rekombinant Anti-RNaz A VHH Affinite Ajanının İfadeleme

Affinite ajanı olarak anti-RNaz A VHH'in kültür flaskında ve fermentörde üretimi başarıyla gerçekleştirilmiştir. Buna göre; plazmid-VHH ile *pyrG* oksotrof *A. oryzae* transforme edilmiştir. CD agar plakalarda gelişen *A. oryzae* transformant kolonilerinden seçilen çok sayıdaki koloninin kültür flasklarında yapılan ifadeleme testi için, kültürlerden toplanan örnekler SDS-PAGE jelinde analiz edilmiştir (Şekil 5.8 (A)). Jel incelendiğinde; seçilen tüm kolonilerin yaklaşık 13 kDa boyutundaki anti-RNaz A VHH affinite ajanını ifadelediği tespit edilmiştir. Şekil 5.8 göstermektedir ki transformant *A. oryzae* kolonileri konak hücreye ait olan proteinlere ek olarak, güçlü salgılama kapasiteleri sayesinde rekombinant anti-RNaz A VHH proteini hücre dışına salgılamıştır ve bu sebeple kültür ortamında konağa ait doğal proteinler ve ifadelenen rekombinant anti-RNaz A VHH proteini rahatlıkla görülebilmektedir. Ayrıca transformant kolonilerin arasında ifadeleme düzeyi olarak bir fark olmadığı anlaşılmıştır (Şekil 5.8(A)). Ek olarak transfeksiyon kontrolü olarak, yalnızca *pyrG* geninin bulunduğu plazmidle yapılan transformasyon sonrası CD agar plakada gelişen kolonilerden biri ile ifadeleme testi yapılmış ve inkübasyonun yedinci gününde

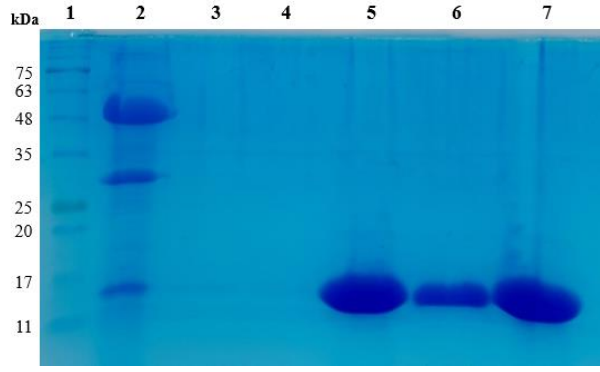
alınan örnek SDS-PAGE jelinde incelenmiştir (Şekil 5.8(B), şerit2). Yaklaşık 13 kDa boyutundaki anti-RNaz A VHH'e benzer herhangi bir protein bandına transfeksiyon kontrolü örneğinde rastlanmamıştır. Küçük hacimde yapılan kültür flaskı denemeleri sonrası büyük hacimde üretim için; anti-RNaz A VHH ifadeleyen kolonilerden seçilen biri ile fermentörde üretim yapılmıştır. Fermentasyonun 120. saatinde alınan örnek SDS-PAGE jelinde transfeksiyon kontrol ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir (Şekil 5.8 (B), şerit3).



Şekil 5.8: İfadeleme çalışmalarında, inkübe edilen kolonilerin kültür ortamından alınan örneklerin SDS-PAGE jel profilleri. (A) Anti-RNaz AVHH ifadeleyen *A. oryzae* transformant kolonilerden elde edilen örneklerin jel profili. Şerit 1: Protein belirteci. Şerit 2-8: Seçilen transformant kolonilerin kültür örnekleri. (B) Transfeksiyon kontrol örneğinin ve fermentörde ifadeleme çalışması yapılan anti-RNaz A VHH ifadeleyen koloninin kültür ortamından alınan örneğin jel profili.

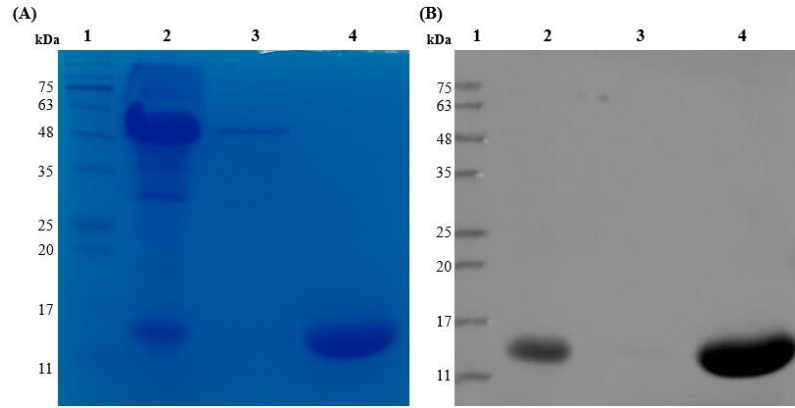
5.3 Rekombinant Anti-RNaz A VHH Affinite Ajanının Saflaştırılması

A. oryzae RIB40 *pyrG*(-) mikroorganizmasında ifadelenen anti-RNaz A VHH affinite ajanının saflaştırılması, dizinin C-terminal ucuna eklenen 8xHis-tag dizisinden yararlanılarak doğal (native) koşullarda gerçekleştirilmiştir. IMAC tekniği ile yapılan saflaştırma işlemi sırasında toplanan örneklerin SDS-PAGE jel analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 5.9).



Şekil 5.9: Anti-RNaz A VHH affinite ajanının büyük hacimde ifadelenmesi sonrası yapılan, IMAC tekniği ile saflaştırma prosesinden toplanan örneklerin SDS-PAGE analizi. Şerit 1: Protein belirteci. Şerit 2: anti-RNaz A VHH ifadeleyen *A. oryzae* kültür ortamı örneği. Şerit 3-4: IMAC rezine spesifik olmayan bağlanmaların giderilmesi için ard arda yapılan yıkama aşamalarından toplanan örnekler. Şerit 5-7: IMAC rezinden elüsyon çözeltisi geçirilmesiyle toplanan örnekler.

Şekil 5.9'daki jel incelendiğinde; başlangıçta kültür örneğinde (Şekil 5.9, şerit2) bulunan yaklaşık 13 kDa'daki rekombinant anti-RNaz A proteini resin ile etkileşmiştir ve rezinden elüsyon çözeltisi yardımıyla ayrıştırılmıştır. SDS-PAGE analizine ek olarak, ifadelenen rekombinant anti-RNaz VHH'ın doğrulaması, C-ucunda 8xHistag taşıdığı için, 6xHis Tag Monoklonal Antikor kullanılarak Western blot tekniği ile de gerçekleştirilmiştir (Şekil 5.10).

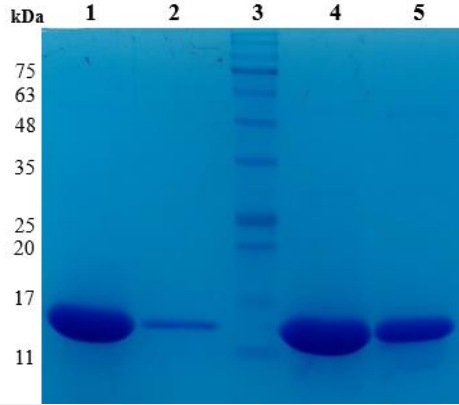


Şekil 5.10: İfadelenen anti-RNaz A VHH affinite ajanının karşılaştırmalı olarak SDS-PAGE jelinde (A) ve Western blot analizinde (B) incelenmesi. Şerit1: Protein belirteci. Şerit 2: Kültürden alınan örnek. Şerit 3: IMAC rezininin yıkama aşamasından toplanan örnek. Şerit 4: IMAC rezinden elüsyon çözeltisi geçirildikten sonra toplanan elüsyon örneği.

SDS-PAGE ve Western blot analizlerinde görüldüğü üzere yaklaşık 13 kDa boyutundaki anti-RNaz A VHH üretimi ve saflaştırma işlemi başarıyla gerçekleştirilmiştir ve yalnızca IMAC kullanarak yüksek saflıkta rekombinant VHH

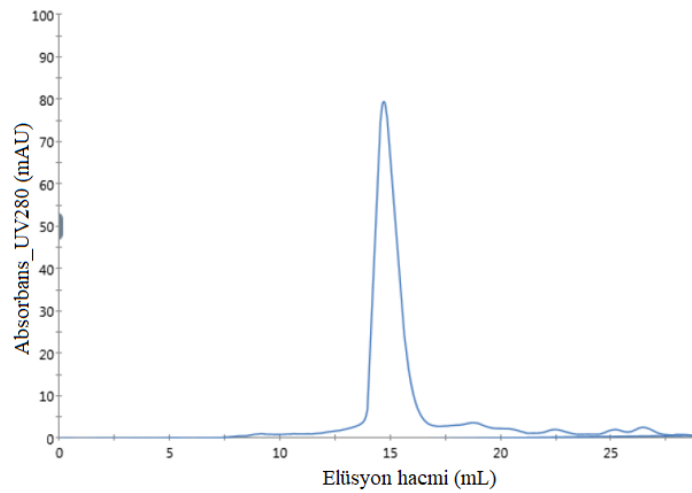
proteinin elde edilebildiği anlaşılmıştır, dolayısıyla kompleks aşağı-akış uygulamalarına ihtiyaç duyulmamıştır.

Saflaştırılan anti-RNaz A VHH affinite ajanının olduğu elüsyon çözeltisindeki imidazolün uzaklaştırılması için, anti-RNaz A VHH, PD10 Desalting kolon yardımıyla PBS çözeltisine geçirilmiştir (Şekil 5.11).



Şekil 5.11: PD10 Desalting kolon kullanılarak PBS içinde olacak şekilde elde edilen saf rekombinant anti-RNaz A VHH elde edilmesi. Şerit 1-2: PD10 kolona yüklenen imidazol içeren örnek. Şerit 3: Protein belirteci. Şerit 4-5: PD10 kolondan elde edilen PBS içindeki saf anti-RNaz A VHH.

PBS tampon çözelti içindeki rekombinant anti-RNaz A VHH proteinini, ileri saflaştırma işlemi için Superdex 200 Increase 10/300 GL kolon kullanılarak gel filtrasyonuna tabi tutulmuştur. Elde edilen kromatogram (Şekil 5.12), saf anti-RNaz A VHH proteinini ve literatür ile uyumlu şekilde monomerik davranışını göstermiştir.



Şekil 5.12: Saflaştırılan rekombinant anti-RNaz A VHH proteininin gel filtrasyon kromatogramı

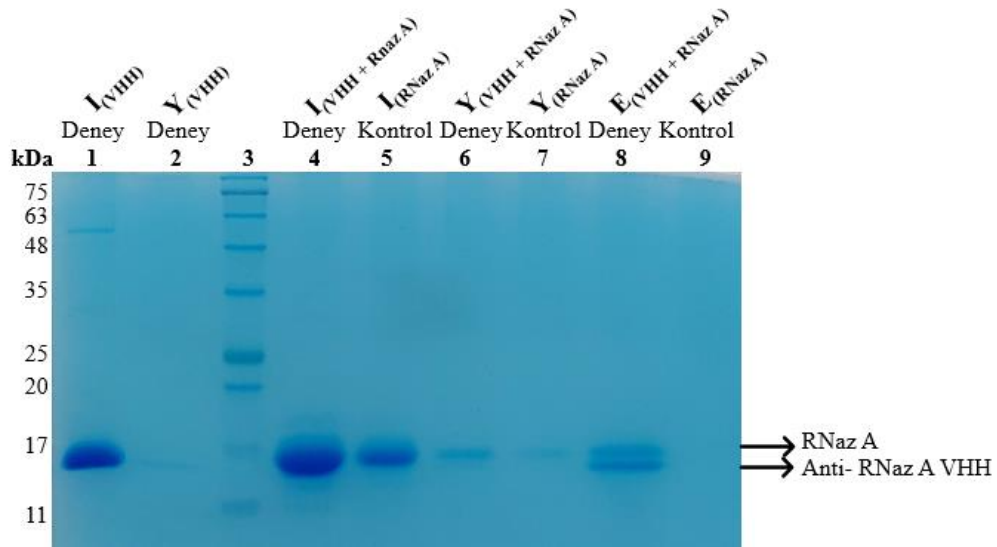
Saflaştırılan anti-RNaz A VHH proteinini dansitometrik olarak ve Bradford analizinde incelenmiştir ve kültür flaskında saf anti-RNaz A VHH verimi 44 mg/L olarak belirlenirken, fermentördeki üretimin verimi 1.4 g/L olarak ölçülmüştür.

5.4 Rekombinant Anti-RNaz A VHH ‘in Antijeni ile Spesifik Etkileşimi

Saflaştırılan rekombinant anti-RNaz A VHH affinite ajanının, antijeni olan RNaz A ile spesifik etkileşimi üç farklı metot ile gösterilmiştir; pull-down analizi, jel filtrasyon kromatografi analizi ve SPR analizi. SPR yöntemi ile anti-RNaz A VHH’in, RNaz A ile bağlanma affinitesi tespit edilmiştir.

5.4.1 Pull-down analizi ile spesifik etkileşimin gösterilmesi

Rekombinant anti-RNaz A VHH ile RNaz A arasındaki etkileşimi incelemek üzere doğal (native) koşullar altında pull-down analiz gerçekleştirilmiştir ve analiz aşamalarından elde edilen örnekler SDS-PAGE jelde analiz edilmiştir (Şekil 5.13).



Şekil 5.13: Anti RNaz A VHH ile RNaz A arasındaki spesifik etkileşiminin pull-down analizi ile gösterilmesi. Şerit 1: Deney grubu rezinin anti-RNaz A VHH inkübasyonu sonucu elde edilen örnek. Şerit 2: Deney grubu rezinin anti-RNaz A VHH ile inkübasyon sonrası yıkama örneği. Şerit 3: Protein Belirteci. Şerit 4: Deney grubu rezinin anti-RNaz A VHH sonrası RNaz A ile inkübasyonundan alınan örnek. Şerit 5: Kontrol grubu rezinin RNaz A inkübasyonundan alınan örnek. Şerit 6: Deney grubu rezinin RNaz A ile inkübasyon sonrası yıkama örneği. Şerit 7: Kontrol grubu rezinin RNaz A ile inkübasyon sonrası yıkama örneği. Şerit 8: Deney grubu rezinin elüsyon örneği. Şerit 9: Kontrol grubu rezinin elüsyon örneği. I: İnkübasyon aşaması. Y: Yıkama aşaması. E: Elüsyon aşaması.

Şekil 5.13 incelendiğinde; şerit 1’de görüldüğü üzere deney grubu rezini ile etkileştikten sonra, rezinin kapasitesinin aşılması sebebiyle bağlanamayan fazla miktardaki anti-RNaz A VHH santrifüj sonrası rezinden uzaklaştırılmıştır. Şerit 2’de spesifik olmayan etkileşimlerin önlenmesi için gerçekleştirilen ilk yıkamadan alınan örnek görülmektedir, burada kalan fazla miktardaki anti-RNaz A VHH, yıkama ile uzaklaştırılmıştır. Şerit 4’de anti-RNaz A VHH ile inkübe edilerek yıkandıktan sonra RNaz A ile muamele edilen deney grubu rezini görülmektedir. Şerit 4’de görüldüğü gibi, rezine bağlı durumdaki anti-RNaz A VHH ile etkileştikten sonra, kalan etkileşmemiş fazla miktardaki RNaz A santrifüj sonrası rezinden uzaklaştırılmıştır. Şerit 5’de ise yalnızca RNaz A ile inkübe edilen kontrol grup görülmektedir ve RNaz A histag içermediğinden kontrol grubu reziniyle etkileşmeyerek santrifüj aşamasında geri toplanmıştır. Şerit 6’da, anti-RNaz A VHH ve RNaz A ile inkübasyonu sonrası deney grubu rezininin yıkama çözeltisinde RNaz A’nın fazlasının santrifüj ile geri alındığı görülmektedir. Şerit 7’de kontrol grubu rezinin yıkanması sonucu RNaz A’nın tamamen rezinden uzaklaştığı anlaşılmaktadır. Son olarak, şerit 8’de deney grubu rezinine bağlı konumdaki anti-RNaz A VHH ile sonradan rezinle inkübe edilen RNaz A arasında gerçekleşen etkileşim sonucu, elüsyon örneğinde hem anti-RNaz A VHH ve hem de RNaz A’ya ait protein bantları görülmektedir. Ancak şerit 9’da kontrol grubu rezin başlangıçta anti-RNaz A VHH ile inkübe edilmediği için, RNaz A ile etkileşim meydana gelmemiştir ve elüsyon aşamasına gelene kadar kontrol grubu rezini tüm RNaz A proteininden yıkama aşamalarında kurtulmuştur ve elüsyon çözeltisinde herhangi bir protein bandına rastlanmamıştır.

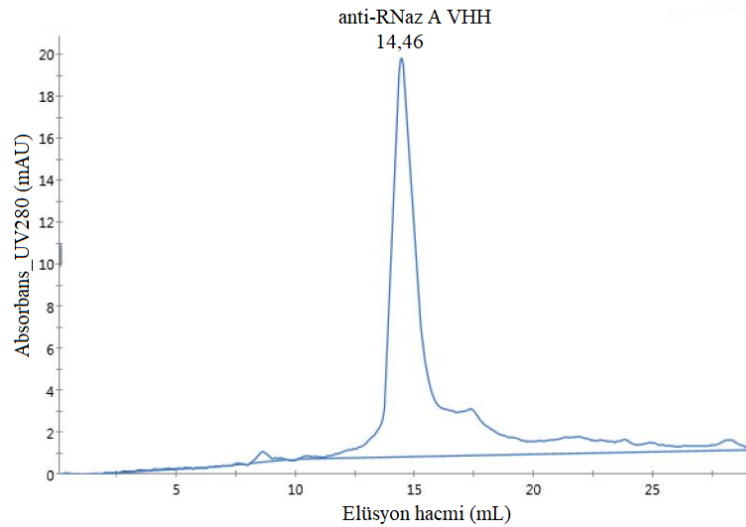
5.4.2 Jel filtrasyon kromatografi analizi ile spesifik etkileşimin gösterilmesi

Jel filtrasyon kromatografi tekniğinde, üç boyutlu yapıdaki anti-RNaz A VHH’nin RNaz A proteini ile etkileşerek bir kompleks yapı meydana getirebilmesi için doğru üç boyutlu yapıda olması gerekmektedir. Jel filtrasyon analizinde; anti-RNaz A VHH’in RNaz A ile oluşturduğu kompleks yapıya ait bir pik elde edilmiştir. Buna göre; *A. oryzae*’de ifadelenecek saflaştırılmış olan anti-RNaz A VHH’in bu etkileşim için doğru konformasyonel formdadır.

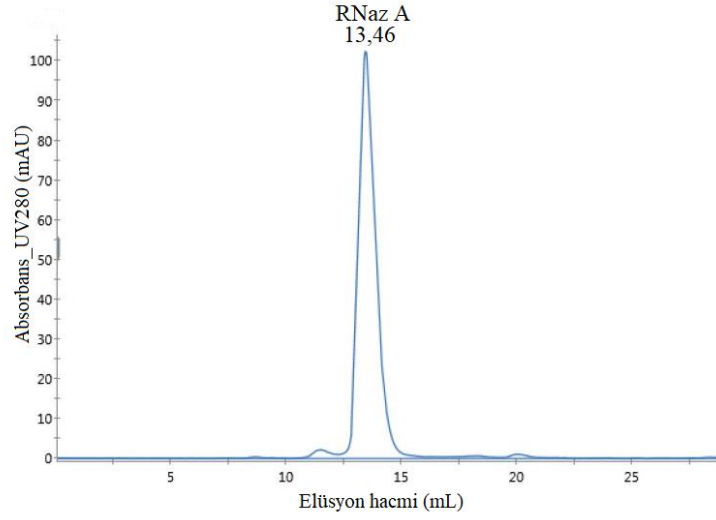
Analizde, ~13 kDa moleküler ağırlığa sahip saf rekombinant anti-RNaz A VHH proteininin (Şekil 5.14) ve ~13.7 kDa moleküler ağırlığa sahip RNaz A proteininin (Şekil 5.15) ayrı ayrı olacak şekilde Superdex 200 Increase 10/300 GL gel filtrasyon

kolonundan geçirilerek jel filtrasyon kromatogramları elde edilmiştir. Ardından, birlikte inkübe edilen rekombinant anti-RNaz A VHH ve RNaz A protein karışımının jel filtrasyon kromatogramı elde edilmiştir (Şekil 5.16).

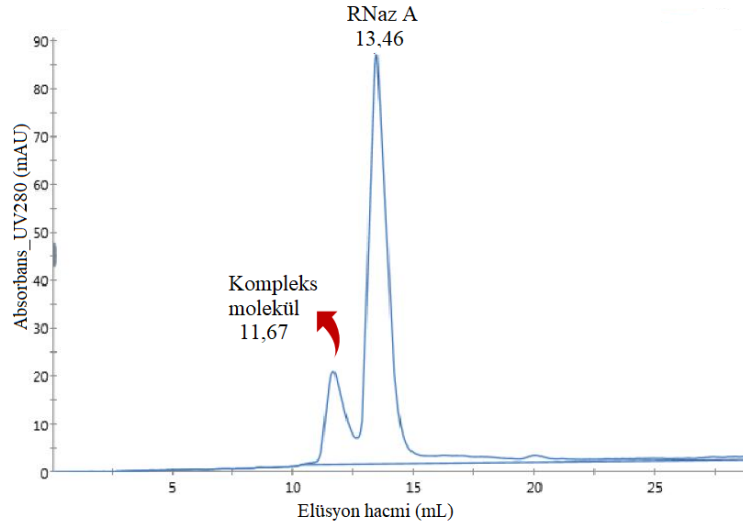
Kromatogramlar incelendiğinde; yalnızca saf rekombinant anti-RNaz A VHH proteininin yer aldığı uygulamada; 14.46 mL elüsyon hacminde (Şekil 5.14) ve yalnızca RNaz A'nın yer aldığı uygulamada ise 13.46 mL elüsyon hacminde (Şekil 5.15) birer pik görülmektedir. Rekombinant anti RNaz A VHH ile RNaz A karışımının yer aldığı uygulamada ise; RNaz A'ya ait olan 13.46 mL elüsyon hacmindeki pike ek olarak, daha yüksek moleküler ağırlığa sahip olduğu için kolondan daha önce ayrılan (11.67 mL elüsyon hacminde) farklı bir moleküle ait pik alınmıştır. Ayrıca, karışıma ait olan kromatogramda rekombinant anti-RNaz A VHH'e ait olan pike (14.46 mL elüsyon hacmindeki) rastlanmamıştır. Buna göre; elde edilen bu pikin karışım içindeki, rekombinant anti RNaz A VHH'in RNaz A molekülleri ile etkileşerek kompleks oluşturması neticesinde oluştuğu kanısına varılmıştır (Şekil 5.16).



Şekil 5.14: Jel filtrasyon kromatografisi ile spesifik etkileşimin gösterilmesi için yalnızca rekombinant anti-RNaz A VHH'in Superdex 200 Increase 10/300 GL kolondan geçirilmesi ile elde edilen jel filtrasyon kromatogramı.



Şekil 5.15: Jel filtrasyon kromatografisi ile spesifik etkileşimin gösterilmesi için yalnızca RNaz A proteininin Superdex 200 Increase 10/300 GL kolondan geçirilmesi ile elde edilen jel filtrasyon kromatogramı.



Şekil 5.16: Jel filtrasyon kromatografisi ile spesifik etkileşimin gösterilmesi için birlikte inkübe edilen anti-RNaz A VHH ile RNaz A proteininin inkübasyon sonrası Superdex 200 Increase 10/300 GL kolondan geçirilmesi ile elde edilen jel filtrasyon kromatogramı.

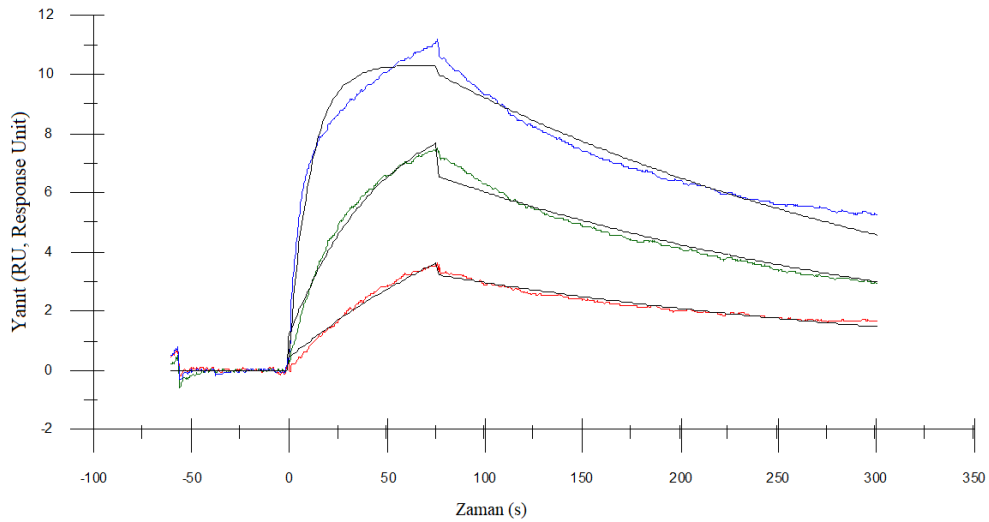
Sonuç olarak; jel filtrasyon kromatografisi analizi *pyrG* (-) *A. oryzae*'de üretilen rekombinant anti-RNaz A VHH affinite ajanının hedef antijeni olan RNaz A ile başarılı bir şekilde üç boyutlu kompleks oluşturduğunu doğrulamıştır.

Pull-down analiz ve jel filtrasyon kromatografisi analiz sonuçları, *A. oryzae*'de ifadelenen rekombinant anti-RNaz A VHH affinite ajanı ile RNaz A arasında etkileşim

olduğunu dolayısıyla üretilen rekombinant anti-RNaz A VHH'in fonksiyonel özellik gösterdiğini doğrulamıştır.

5.4.3 Yüzey plazmon rezonans ile bağlanma affinitesinin tayini

Saflaştırılan rekombinant anti-RNaz A VHH proteini ile, RNaz A arasındaki etkileşim gel filtrasyon kromatografi ve pull-down analizi ile incelendikten sonra yüzey plazmon rezonans tekniğiyle de incelenmiştir. Elde edilen SPR sensorgramları Şekil 5.17'de görülmektedir. Rekombinant anti-RNaz A VHH, anti-histag antikoru immobilize edildiği akış hücresinin yüzeyinde yakalanmıştır. Kinetik analiz *pyrG* (-) *A. oryzae*'de üretilen rekombinant anti-RNaz A VHH ile RNaz A'nın artan konsantrasyonu arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir.



Şekil 5.17: Yüzey plasmon rezonans analizinden elde edilen sensorgramlar.

Sensorgramlarda renkli çizgiler ölçülen eğrileri, siyah çizgiler uyum eğrilerini göstermektedir. Kırmızı eğri en düşük RNaz A konsantrasyonunu gösterirken, mavi eğri en yüksek RNaz A konsantrasyonunu göstermektedir. Her eğrinin blank (kör) ile farkı alındıktan sonra RNaz A ile bağlanma etkinliği incelenmiştir.

Anti-RNaz A VHH'nin RNaz A'ya bağlanma affinitesi 1.91 nM olarak ölçülmüştür (Tablo 5.2). Bu değer, *E. coli* konak hücresinde üretilen anti-RNaz A VHH'in bağlanma affinitesi olan 35 nM ile kıyaslandığında, *pyrG* oksotrofik *A. oryzae*'de üretilen anti-RNaz A VHH'in RNaz A ile yaklaşık 18,3 kat daha yüksek affinite gösterdiğine işaret etmektedir.

Tablo 5.2: Rekombinant anti-RNaz A VHH'in SPR kinetik analiz sonuçları. (ka: bağlanma hız sabiti, kd: ayrılma hız sabiti, Kd: bağlanma affinitesi.

Ka (Ms⁻¹)	kd (s⁻¹)	Kd (nM)
1,827x10 ⁶	0,003488	1,91

Bu tez çalışmasında; anti-RNaz A VHH affinite ajanı, oluşturulan *pyrG* oksotrofik *A. oryzae* ifadelenme sisteminde yüksek hacimde ve fonksiyonel olarak üretilmiştir. Küçük hacim ifadelenme çalışmasından alınan verim 44 mg/L iken, fermenter ortamında sağlanan daha kontrollü şartlarda alınan verim 1.4 g/L olarak belirlenmiştir. *A. oryzae*'nin uzun yıllardır fermentasyon teknolojisinde kullanılan güvenilir bir mikroorganizma olması ve yüksek düzeyde salgılama kapasitesine sahip oluşu fonksiyonel özellikte affinite ajanlarının yüksek ölçekte üretimi için ideal bir ifadelenme sistemi olduğu bu çalışma ile kanıtlanmıştır.

Rekombinant VHH üretiminde, düşük maliyet, yüksek büyüme hızı ve kolay genetik manipülasyon avantajları nedeniyle *E. coli* ifadelenme sistemleri kullanılmaktadır. Bu kapsamda, literatür çalışmaları incelendiğinde; oldukça değişken sonuçların alındığı görülmüştür [2]. Üretilen VHH verimindeki değişimin, konak hücreye, üretilmek istenen VHH'in yapısına, ve kullanılan füzyon tag tipine bağlı olarak değiştiği anlaşılmaktadır [105,108]. Bu sebeplerle, doğru katlanmış formda VHH üretilmesi için çeşitli mutagenез, optimizasyon, farklı füzyon tag kullanımları ve yeniden katlanma stratejilerine ihtiyaç duyulmuştur [126]. Salema ve ark.'nın bir çalışmasında, *E. coli*'de üretilen VHH'in ifadelenme veriminin oldukça değişken olduğu ve maltoz-bağlayıcı protein ile füzyon yapılarak verimin 12 mg/L düzeyine arttırılabildiği görülmüştür. Ancak, Salema ve ark.'nın çalışmasında, maltoz bağlayıcı protein ile füzyon halde bulunan VHH'in affinitesinde, monomerik VHH'e kıyasla azalma olduğu anlaşılmıştır. Ek olarak, monomerik VHH yapısının elde edilmesi amacıyla, füzyon protein kullanımına bağlı olarak saflaştırma işlemlerinde amiloz rezin ile saflaştırma, enzimatik uygulama ve IMAC adımlarını gerektiren çoklu alt-akış prosesleri gerekmiştir [114]. Başka bir çalışmada ise, yeni nesil ipek fibroinin füzyon protein olarak kullanılmasının üretilen VHH'in affinitesinde kayba neden olmadığı bulunmuştur [113]. *E.coli* ifadelenme sisteminde yüksek hacimde VHH üretimi sağlanan çalışmalar da bulunmaktadır. Bunlardan birinde Zarschler ve ark. yeni bir kültürlenme ve ifadelenme stratejisi kullanarak 200 mg/L'ye kadar verime ulaşmıştır [111]. Dolayısıyla, başarılı sonuçlar alınmış olmakla birlikte, *E. coli* ifadelenme sisteminin; sınırlı moleküler şaperonları olması, sınırlı periplazmik hacme sahip

olması, ifadelenen rekombinant proteinin hücre içeriğinden izole edilmesi için hücre lizis yöntemlerine başvurulmasını gerektirmesi, özellikle disülfid bağına sahip VHH yapısına bağlı olarak inklüzyon cisimciklerinin oluşması sebebiyle yeniden katlanma gibi uğraştırıcı metotların izlenmesini gerektirmesi bu sistemde yüksek hacimde fonksiyonel VHH üretiminde karşılaşılan zorluklardır [1,2]. Ayrıca endotoksin varlığı da güvenilir ürün üretimi konusundaki diğer bir endişe olarak değerlendirilmektedir. Bu tez çalışmasında, RNaz A ile spesifik etkileşen VHH proteini *A. oryzae*'de doğal koşullarda ve hücre lizisi veya yeniden katlanma gibi herhangi bir kompleks alt-akış prosesine ihtiyaç kalmadan yüksek verimde üretilmiştir.

Bakteriyal ifadelenme sistemleri haricinde, özellikle disülfid bağı içeren VHH'lerin fonksiyonel üretiminde translasyonel-sonrası modifikasyon yapma kabiliyetine sahip oldukları için ökaryotik ifadelenme sistemlerinin avantajlarından da yararlanılmıştır [76,105,108,126]. Memeli hücrelerinde ifadelenme sistemleri zaman alıcı, maliyetli ve kompleks yöntemler gerektirdiği için yüksek ölçekte üretim için pratik olmadığından, maya ifadelenme sistemleri kullanışlı sistemler olarak karşımıza çıkmaktadır [2]. Frenken ve ark.'nın çalışmasında *S. cerevisia* konak mikroorganizmasında 100 mg/L VHH verimine ulaşılabilmektedir [127]. Rahbarizadeh ve ark.'nın çalışmasında ise ilk kez *P. pastoris* konak mikroorganizmasında geniş ölçekte VHH 10-15 mg/L verimde üretilenmiştir [118]. Ancak maya ifadelenme sisteminin VHH üretim düzeyi, konak hücrenin salgılama verimine bağlı olarak değişmekte olduğu da bilinmektedir. *A. oryzae* ise ökaryotik konak mikroorganizmalar arasında güçlü salgılama kapasitesi ile öne çıkmaktadır [129]. Ek olarak, translasyon-sonrası modifikasyonlar açısından kıyaslandığında; *S. cerevisia* ürettiği rekombinant proteinleri yüksek mannoz içeriği ile glikolize ederken *A. oryzae* ürettiği rekombinant proteinlere kısa oligo-glikan yapılar ilave etmektedir. İki konak hücre arasındaki bu fark, üretilmesi istenen rekombinant proteinin işlevselliğinde ve kullanım alanına bağlı olarak immün yanıtı tetikleyici olma gibi özelliklerinde önem arz eden farklar doğurabilmektedir [128].

Joosten ve ark.'nın çalışmasında, *A. awaromi*'de üretilen ve azo boyalara spesifik bağlanabilen VHH'in (7.5 mg/L) %80'inin fungal hücre duvarı ile etkileşim halinde olması sebebiyle degradasyona uğradığı tespit edilmiştir [120]. Joosten ve ark. başka bir çalışmada, peroksidaz geni ve bir azo boyaya bağlanma aktivitesi gösteren kodlama dizisinden oluşan iki işlevli VHH'ler üretmişlerdir. Salgılanan rekombinant VHH'lerin proteolitik bozulmasını azaltmak ve ayrıca nihai verimi artırmak için kültür ortamına

BSA eklemişlerdir. Bununla birlikte, eksprese edilen iki işlevli VHH'lerin önemli bir kısmının, yanlış katlanmanın nedeniyle hücre içinde kaldığını tespit etmişlerdir [130]. Bu tez çalışmasında rekombinant anti-RNaz VHH yüksek saflıkta ve 44 mg/L verimde monomerik olarak üretilmiştir. Yedi günlük küçük hacimde ifadelenme ve 120 saatlik fermentörde ifadelenme çalışmalarında günlük toplanan örneklerde kültür ortamına salgılanan rekombinant anti-RNaz A VHH proteinde uzun dönem -20 °C depolama koşulunda herhangi bir degradasyona rastlanmamıştır.

Okazaki ve ark.'nın niaD mutant *A. oryzae*'de ürettikleri anti-EGFR VHH proteinini füzyon bir proteinle ve mangan süperoksit dismutaz promotörü altında ifadelenmiştir [121]. On günlük inkübasyon sürecinden sonra, üretilen rekombinant anti-EGFR VHH sırasıyla seramik hidroksiapatit kolon, katyon değişimi ve gel filtrasyon teknikleriyle saflaştırılmıştır. Füzyon partneri olmadan 21 mg/L verim elde edilmişken, füzyon partneri ile birlikte 73,8 mg/L verim alınmıştır. Füzyon partnerin ise post-translasyonel modifikasyonlar sırasında proteazlar tarafından yapıdan ayrılabilirdiği de anlaşılmıştır [121]. Farklı raportör proteinlerin rekombinant VHH üretimi üzerine etkisinin araştırıldığı Hisada ve ark.'nın çalışmasında, taka-amilaz, glikoamilaz, endoglunaz A ve endoglunaz B raportör proteinler arasından en yüksek verime 0.155 mg/mL ile glikoamilaz ile ulaşmışlardır [122]. Ayrıca elde ettikleri glikolize formdaki rekombinant VHH yapılarının *E. coli*'de ifade edilen VHH'e benzer bağlanma kabiliyetine sahip olduğu tespit edilmiştir [122]. Bu tez çalışmasında disülfid bağına sahip VHH affinite ajanlarının yüksek verimde fonksiyonel olarak üretimi için önerilen ve elde edilen bulgularla işlevselliği ispatlanan ifadelenme sistemi amilaz promotörün kullanıldığı *pyrG* oksotrofik *A. oryzae* ifadelenme sistemidir.

Affinite ajanı olarak görüntüleme, tanı ve tespit sistemlerinde kullanılacak bir molekülün hedef antijeni ile olan bağlanma affinitesi, söz konusu affinite ajanının kullanım etkinliğini geliştireceği gibi, daha hızlı ve etkili sonuçların alınmasını sağlayacaktır. Tez çalışmasında üretilen anti-RNaz A VHH daha önce *E. coli* ifadelenme sisteminde üretilmiş olan ve üç boyutlu yapısı bilinen VHH yapısıdır ve RNaz A ile bağlanma affinitesi daha önce yüzey plazmon rezonans ile 35 nM olarak ölçülmüştür [124]. Bu tez kapsamında ise *A. oryzae*'de ifadelenen anti-RNaz A VHH'in bağlanma affinitesi yüzey plazmon rezonans ile 1.91 nM olarak belirlenmiştir. Bu değer, *E. coli*'de üretilenden 18.3 kat daha fazla bağlanma

affinitesine işaret etmektedir ve *A. oryzae*'de üretilen anti-RNaz A VHH'in affinite ajanı olarak değerlendirilme potansiyelini önemli ölçüde yükseltmektedir.

A. oryzae'de ifadelenen anti-RNaz A VHH'in aminoasit dizisinde *A.oryzae*'de glikolize olma ihtimali bulunan bir glikolizasyon motifi bulunmamaktadır. Ancak, aminoasit içeriğinin, glikolizasyona uygun olan tirozin ve serin bakımından zengin olması glikolizasyon potansiyelini yükseltmiştir. Bağlanma affinitesindeki 18,3 oranındaki artış tirozin ve serin kalıntılarına eklenen glikan yapıların neticesi olarak yorumlanabilir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Görüntüleme, teşhis, tedavi ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanılan mAb'lerin eksikliklerinin üstesinden gelmede affinite ajanı olarak VHH'ler önemli üstünlükler göstermektedir. Bu üstünlüklerden en önemlileri; yüksek affinite, yüksek termal ve denatüre edici ajanlara karşı kararlılık, katı monomerik davranış, yüksek çözünürlük, küçük boyutu ile hedefe ulaşma ve mikrobiyal sistemlerde ifadenme kolaylığı ve son olarak immünojenik yanıtları tetikleyen bir Fc bileşeninin bulunmamasıdır. Bu özellikleri VHH'leri birçok biyoteknolojik uygulamaya mükemmel uyum sağlayan çok yönlü affinite ajanları olmalarını sağlamaktadır. Bu nedenle, çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda, tanı, teşhis ve görüntülemedeki affinite ajan ihtiyacını karşılamak için işlevsel, büyük miktarda VHH üretimi sağlayan, ekonomik bir alternatif platformun kurulması gereklidir.

Tez çalışması kapsamında GRAS statüsünde güvenilir olan, güçlü heterolog protein salgılama kabiliyetine sahip ve endüstriyel ölçekte üretime uygulanabilir olan *A. oryzae* ifadenme sistemi kullanılarak yüksek verimde, fonksiyonel ve antijenine karşı yüksek bağlanma affinitesi gösteren VHH üretilmiştir. Üretilen VHH'in işlevselliğinin analizini gerçekleştirebilmek adına daha önce *E. coli*'de üretilmiş, üç boyutlu yapısı ve hedef antijeni bilinen anti-RNaz A VHH ifadenen affinite ajanı olarak seçilmiştir. Üretimde yüksek verim elde edebilmek için, literatür çalışmalarından yararlanılarak amilaz promotör geni kullanılmıştır. Oksotrofi olarak kararlı ve sınırsız şekilde kullanıma izin veren bir platform inşası sağlayan *pyrG* oksotrofisi tercih edilmiştir. *pyrG* oksotrofisi kararlılığın sağlanması için ultraviyole ya da kimyasal ajan kullanmak yerine homolog rekombinasyon yoluyla gen değişimi sonucu üretilmiştir [33].

Küçük hacimde elde edilen sonuçların geniş hacimde, dolayısıyla endüstriye uyarlanabilirliğinin ispatlanması için fermentörde ifadenme çalışması da başarıyla gerçekleştirilmiştir. Buna göre; küçük hacimde üretim verimi 44 mg/L iken, fermentörde üretim verimi 1.4 g/L olarak saptanmıştır. Aynı zamanda üretilen, yüksek saflıktaki anti-RNaz A VHH'in monomerik davranışı jel filtrasyon tekniği ile

gösterilmiştir. Anti-RNaz A VHH'in hedef antijeni olan RNaz A'ya karşı bağlanma affinitesi ise 1,91 nM'lık değeri ile, *E.coli*'de üretilen benzerine kıyasla 18.3 kat daha yüksektir. Dolayısıyla, *A. oryzae*'de ifadelenen anti-RNaz A VHH yüksek affiniteye sahiptir.

Tez kapsamında elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, oluşturulan *pyrG* oksotrofik *A. oryzae* ifadenme sisteminin çeşitli affinite ajanlarının ifadenmesi için kolay uygulanabilir ve güçlü bir alternatif platform olduğu kanıtlanmıştır. Özellikle, *E. coli* ifadenme sisteminde güçlükle karşılaşılan VHH'lerin ifadenmesinde kurulan *pyrG* oksotrofik *A. oryzae* umut vericidir. Ayrıca, bu tez çalışması, gelecekteki biyoteknolojik uygulamalara hizmet edecek etkili affinite ajanları arayışında, antijenlerine yüksek bağlanma aktivitesine sahip VHH'lerin verimli ve uygun maliyetli üretimine yönelik talebi karşılamada ileri çalışmaların önünü açma potansiyeline sahiptir.

KAYNAKLAR

- [1] Arbabi-Ghahroudi, M., Tanha, J., & MacKenzie, R. (2005). Prokaryotic expression of antibodies. *Cancer and Metastasis Reviews*, 24(4), 501-519.
- [2] Liu, Y., & Huang, H. (2018). Expression of single-domain antibody in different systems. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(2), 539-551.
- [3] Ntana, F., Mortensen, U. H., Sarazin, C., & Figge, R. (2020). *Aspergillus*: A powerful protein production platform. *Catalysts*, 10(9), 1064.
- [4] Archer, D. B., & Peberdy, J. F. (1997). The molecular biology of secreted enzyme production by fungi. *Critical reviews in biotechnology*, 17(4), 273-306.
- [5] Machida, M., Yamada, O., & Gomi, K. (2008). Genomics of *Aspergillus oryzae*: learning from the history of Koji mold and exploration of its future. *DNA research*, 15(4), 173-183.
- [6] Klich, M.A., (2002). 'Biogeography of *Aspergillus* Species in Soil and Litter', *Mycologia*; 94: 21-27.
- [7] PHAC 2017, Final Screening Assessment for *Aspergillus oryzae* ATCC 11866, Environment Canada, Health Canada.
- [8] Kobayashi, T., Abe, K., Asai, K., Gomi, K., Juvvadi, P.R., Kato, M., Kitamoto, K., Takeuchi, M., ve Machida, M., (2007). 'Genomics of *Aspergillus oryzae*', *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71(3): 646-670.
- [9] US EPA, United States Environmental Protection Agency (US EPA), 1997, 'Final Risk Assessment of *Aspergillus oryzae*'.
- [10] Ward, M., Lin, C., Victoria, D. C., Fox, B. P., Fox, J. A., Wong, D. L., . . . Wang, H. (2004). Characterization of humanized antibodies secreted by *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(5), 2567-2576.
- [11] Kitamoto, K., (2015). 'Cell biology of the koji mold *Aspergillus oryzae*', *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Vol. 79 (6): 863-869.
- [12] *Aspergillus oryzae*, Genome, Organism Overview, NCBI Taxonomy, [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Aspergillus%20oryzae\[Organism\]&cmd=DetailsSearch](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Aspergillus%20oryzae[Organism]&cmd=DetailsSearch), 05.05.2023.
- [13] Kitamoto, K. (2002). Molecular biology of the Koji molds. *Advances in applied microbiology*, 51, 129-154.
- [14] Park, H-S., Jun, S-C., Han, K-H, Hong, S-B, ve Yu, J-H, (2017). 'Diversity, Application, and Synthetic Biology of Industrially Important *Aspergillus* Fungi, *Advances in Applied Microbiology*, Vol 100: 161-202.
- [15] Wicklow, D.T., Wilson, D.M., and Nelsen, T.C. (1993). 'Survival of *Aspergillus flavus* sclerotia and conidia buried in soil in Illinois or Georgia', *Phytopathology* 83, 1141-1147.

- [16] Barbesgaard, P., Heldt-Hansen, H. P., & Diderichsen, B. (1992). On the safety of *Aspergillus oryzae*: a review. *Applied microbiology and biotechnology*, 36(5), 569-572.
- [17] Gibbons, J.G., ve Rokas, A., (2013). 'The function and evolution of the *Aspergillus* genome', *Trend Microbiology*, Jan: 21(1): 14-22.
- [18] Machida, M., Asai, K., Sano, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Terai, G., Kusumoto, K., Arima, T., Akita, O., Kashiwagi, Y., Abe, K., Gomi, K., Horiuchi, H., Kitamoto, K., Kobayashi, T., Takeuchi, M., Denning, D. W., Galagan, J. E., Nierman, W. C., Yu, J., Archer, D. B., Bennett, J. W., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., Fedorova, N. D., Gotoh, O., Horikawa, H., Hosoyama, A., Ichinomiya, M., Igarashi, R., Iwashita, K., Juvvadi, P. R., Kato, M., Kato, Y., Kin, T., Kokubun, A., Maeda, H., Maeyama, N., Maruyama, J., Nagasaki, H., Nakajima, T., Oda, K., Okada, K., Paulsen, I., Sakamoto, K., Sawano, T., Takahashi, M., Takase, K., Terabayashi, Y., Wortman, J. R., Yamada, O., Yamagata, Y., Anazawa, H., Hata, Y., Koide, Y., Komori, T., Koyama, Y., Minetoki, T., Suharnan, S., Tanaka, A., Isono, K., Kuhara, S., Ogasawara, N. and Kikuchi, H., (2005). 'Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*', *Nature*, 438, 1157-1161.
- [19] Abe, K., Gomi, K., Hasegawa, F., ve Machida, M., (2016). 'Impact of *Aspergillus oryzae* genomics on industrial production of metabolites', *Mycopathologia*, 162: 143-153.
- [20] Lee, C.Z., Liou, G.Y., ve Yuan, G.F., (2006). 'Comparison of the aflR gene sequences of strains in *Aspergillus* section Flavi', *Microbiology*; 152: 161-170.
- [21] Yoder, W. T., & Lehmbeck, J. (2004). Heterologous expression and protein secretion in filamentous fungi. In J. Tkacz, & L. Lange, *In Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture, and medicine* (pp. 201-219). Springer, Boston, MA.
- [22] He, B., Tu, Y., Jiang, C., Zhang, Z., Li, Y., & Zeng, B. (2019). Functional genomics of *Aspergillus oryzae*: Strategies and progress. *Microorganisms*, 7(4), 103.
- [23] Meyer, V., Wu, B., & Ram, A. F. (2011). *Aspergillus* as a multi-purpose cell factory: current status and perspectives. *Biotechnology letters*, 33(3), 469-476.
- [24] Christensen, T., Woeldike, H., Boel, E., Mortensen, S.B., Hjortshøj, K., Thim L. and Hansen M.T. (1988) High level expression of recombinant genes in *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology* 6, 1419-1422.
- [25] Ichishima, E., (2016). 'Development of enzyme technology for *Aspergillus oryzae*, *A. Sojae*, and *A. Luchuensis*, thenationalmicroorganisms of Japan', *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Vol 80, 1681-1692.
- [26] OECD (Organisation For Economic Co-operation and Development), (1992). 'safety Consideratiions For Biotechnology 1992.
- [27] Gerngross, T. U. (2004). Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nature biotechnology*, 22(11), 1409-1414.

- [28] Mattern, I. E., Unkles, S., Kinghorn, J. R., Pouwels, P. H., & van den Hondel, C. A. (1987). Transformation of *Aspergillus oryzae* using the *A. niger pyrG* gene. *Molecular and General Genetics MGG*, 210(3), 460-461.
- [29] Yoon, J., Maruyama, J. I., & Kitamoto, K. (2011). Disruption of ten protease genes in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* highly improves production of heterologous proteins. *Applied microbiology and biotechnology*, 89, 747-759.
- [30] Nguyen, K. T., Ho, Q. N., Do, L. B., Mai, L. T., Pham, D. N., Tran, H. T., . . . Tran, V. G. (2017). A new and efficient approach for construction of uridine/uracil auxotrophic mutants in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(6), 1-11.
- [31] Ling, S. S., Storms, R., Zheng, Y., Rodzi, M. M., Mahadi, N. M., Illias, R. M., . . . Abu Bakar, F. D. (2013). Development of a *pyrG* mutant of *Aspergillus oryzae* strain S1 as a host for the production of heterologous proteins. *The Scientific World Journal*, 1-7.
- [32] Son, Y. E., & Park, H. S. (2021). Genetic Manipulation and Transformation Methods for *Aspergillus* spp. *Mycobiology*, 49(2), 95-104.
- [33] Du, Y., Xie, G., Yang, C., Fang, B., & Chen, H. (2014). Construction of brewing-wine *Aspergillus oryzae pyrG*– mutant by *pyrG* gene deletion and its application in homology transformation. *Acta Biochim Biophys Sin*, 46(6), 477-483.
- [34] Li, C., Tang, Z., Hu, Z., Wang, Y., Yang, X., Mo, F., & Lu, X. (2018). Natural single-domain antibody-nanobody: a novel concept in the antibody field. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 14(11), 1-19.
- [35] Fincham, J. (1989). Transformation in fungi. *Microbiological reviews*, 53(1), 148-170.
- [36] Teillaud, J. L. (2012). From whole monoclonal antibodies to single domain antibodies: think small. In D. Saerens, & S. Muyldermans, *Single domain antibodies, Methods and Protocols* (pp. 3-13). New York: Humana Press.
- [37] Padlan, E. A. (1994). Anatomy of the antibody molecule. *Molecular immunology*, 31(3), 169-217.
- [38] Hakim, R., & Benhar, I. (2009). “Inclonals” IgGs and IgG-enzyme fusion proteins produced in an *E. coli* expression-refolding system. In MABs. *Taylor & Francis*, 1(3), 281-287.
- [39] Robinson, M. P., Ke, N., Lobstein, J., Peterson, C., Szkodny, A., Mansell, T. J., . . . Berkmen, M. (2015). Efficient expression of full-length antibodies in the cytoplasm of engineered bacteria. *Nature communications*, 6(1), 1-9.
- [40] Potgieter, T. I., Cukan, M., Drummond, J. E., Houston-Cummings, N. R., Jiang, Y., Li, F., . . . d'Anjou, M. (2009). Production of monoclonal antibodies by glycoengineered *Pichia pastoris*. *Journal of biotechnology*, 139(4), 318-325.
- [41] Huynh, H. H., Morita, N., Sakamoto, T., Katayama, T., Miyakawa, T., Tanokura, M., . . . Maruyama, J. I. (2020). Functional production of human antibody by the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Fungal biology and biotechnology*, 7(1), 1-15.

- [42] Ward, M., Lin, C., Victoria, D. C., Fox, B. P., Fox, J. A., Wong, D. L., . . . Wang, H. (2004). Characterization of humanized antibodies secreted by *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(5), 2567-2576.
- [43] Asaadi, Y., Jouneghani, F. F., Janani, S., & Rahbarizadeh, F. (2021). A comprehensive comparison between camelid nanobodies and single chain variable fragments. *Biomarker Research*, 9(1), 1-20.
- [44] Vincke, C., & Muyldermans, S. (2012). Introduction to heavy chain antibodies and derived Nanobodies. In D. Saerens, & S. Muyldermans, *Single Domain Antibodies* (pp. 15-26). New York: Humana Press.
- [45] Alexander, A., Steinmetz, M., Barritault, D., Frangione, B., Franklin, E. C., Hood, L., & Buxbaum, J. N. (1982). Gamma Heavy chain disease in man: cDNA sequence supports partial gene deletion model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(10), 3260-3264.
- [46] Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Bajjana Songa, E., . . . Hammers, R. (1993). Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*, 363(6428), 446-448.
- [47] Cogne, M., Preud'homme, J. L., & Guglielmi, P. (1989). Immunoglobulin gene alterations in human heavy chain diseases. *Research in immunology*, 140(5-6), 487-502.
- [48] Nguyen, V. K., Hamers, R., Wyns, L., & Muyldermans, S. (1999). Loss of splice consensus signal is responsible for the removal of the entire CH1 domain of the functional camel IGG2A heavy-chain antibodies. *Molecular immunology*, 36(8), 515-524.
- [49] Harmsen, M. M., & De Haard, H. J. (2007). Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Applied microbiology and biotechnology*, 77(1), 13-22.
- [50] Inoue, H., Ihara, A., Takahashi, H., Shimada, I., Ishida, I., & Maeda, Y. (2011). Affinity transfer to a human protein by CDR3 grafting of camelid VHH. *Protein Science*, 20(12), 1971-1981.
- [51] De Genst, E., Silence, K., Decanniere, K., Conrath, K., Loris, R., Kinne, J., . . . Wyns, L. (2006). Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(12), 4586-4591.
- [52] Henry, K. A., & MacKenzie, C. R. (2018). Antigen recognition by single-domain antibodies: structural latitudes and constraints. *MAbs. Taylor & Francis*, 10(6), 815-826.
- [53] Wrapp, D., De Vlieger, D., Corbett, K. S., Torres, G. M., Wang, N., Van Breedam, W., . . . McLellan, J. S. (2020). Structural basis for potent neutralization of betacoronaviruses by single-domain camelid antibodies. *Cell*, 181(5), 1004-1015.
- [54] Govaert, J., Pellis, M., Deschacht, N., Vincke, C., Conrath, K., Muyldermans, S., & Saerens, D. (2012). Dual beneficial effect of interloop disulfide bond for single domain antibody fragments. *Journal of Biological Chemistry*, 287(3), 1970-1979.

- [55] Muyldermans, S. (2013). Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annual Review of Biochemistry*, 82(1), 775-797.
- [56] Dumoulin, M., Conrath, K., Van Meirhaeghe, A., Meersman, F., Heremans, K., Frenken, L. G., . . . Matagne, A. (2002). Single-domain antibody fragments with high conformational stability. *Protein Science*, 11(3), 500-515.
- [57] Pérez, J. M., Renisio, J. G., Prompers, J. J., van Platerink, C. J., Cambillau, C., Darbon, H., & Frenken, L. G. (2001). Thermal unfolding of a llama antibody fragment: a two-state reversible process. *Biochemistry*, 40(1), 74-83.
- [58] Ghahroudi, M. A., Desmyter, A., Wyns, L., Hamers, R., & Muyldermans, S. (1997). Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS letters*, 414(3), 512-526.
- [59] van der Linden, R. H., Frenken, L. G., de Geus, B., Harmsen, M. M., Ruuls, R. C., Stok, W., . . . Verrips, C. T. (1999). Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1431(1), 37-46.
- [60] Hussack, G., Hiram, T., Ding, W., MacKenzie, R., & Tanha, J. (2011). Engineered single-domain antibodies with high protease resistance and thermal stability. *PLOS One*, 6(11), e28218.
- [61] Ewert, S., Cambillau, C., Conrath, K., & Plückthun, A. (2002). Biophysical properties of camelid VHH domains compared to those of human VH3 domains. *Biochemistry*, 41(11), 3628-3636.
- [62] Verheesen, P., Ten Haaf, M. R., Lindner, N., Verrips, C. T., & De Haard, J. J. (2003). Beneficial properties of single-domain antibody fragments for application in immunoaffinity purification and immuno-perfusion chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1624(1-3), 21-28.
- [63] Perruchini, C., Pecorari, F., Bourgeois, J. P., Duyckaerts, C., Rougeon, F., & Lafaye, P. (2009). Llama VHH antibody fragments against GFAP: better diffusion in fixed tissues than classical monoclonal antibodies. *Acta neuropathologica*, 118(5), 685-695.
- [64] Li, T., Bourgeois, J. P., Celli, S., Glacial, F., Le Sourd, A., Mecheri, S., . . . Lafaye, P. (2012). Cell-penetrating anti-GFAP VHH and corresponding fluorescent fusion protein VHH-GFP spontaneously cross the blood-brain barrier and specifically recognize astrocytes: application to brain imaging. *The FASEB Journal*, 26(10), 3969-3979.
- [65] Gao, Y., Zhu, J., & Lu, H. (2021). Single domain antibody-based vectors in the delivery of biologics across the blood–brain barrier: A review. *Drug Delivery and Translational Research*, 11(5), 1818-1828.
- [66] Erreni, M., Schorn, T., D'Autilia, F., & Doni, A. (2020). Nanobodies as versatile tool for multiscale imaging modalities. *Biomolecules*, 10(12), 1695.
- [67] Piramoon, M., Khodadust, F., & Hosseinimehr, S. J. (2021). Radiolabeled nanobodies for tumor targeting: From bioengineering to imaging and therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1875(2), 188529.

- [68] Altunay, B., Morgenroth, A., Beheshti, M., Vogg, A., Wong, N. C., Ting, H. H., . . . Mottaghy, F. M. (2021). HER2-directed antibodies, affibodies and nanobodies as drug-delivery vehicles in breast cancer with a specific focus on radioimmunotherapy and and radioimmunoimaging. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 48(5), 1371-1389.
- [69] Vaneycken, I., D'huyvetter, M., Hernot, S., De Vos, J., Xavier, C., Devoogdt, N., . . . Lahoutte, T. (2011). Immuno-imaging using nanobodies. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(6), 877-881.
- [70] Broisat, A., Hernot, S., Toczek, J., De Vos, J., Riou, L. M., Martin, S., . . . Devoogdt, N. (2012). Nanobodies targeting mouse/human VCAM1 for the nuclear imaging of atherosclerotic lesions. *Circulation research*, 110(7), 927-937.
- [71] Pain, C., Dumont, J., & Dumoulin, M. (2015). Camelid single-domain antibody fragments: Uses and prospects to investigate protein misfolding and aggregation, and to treat diseases associated with these phenomena. *Biochimie*, 111, 82-106.
- [72] Cortez-Retamozo, V., Backmann, N., Senter, P. D., Wernery, U., De Baetselier, P., Muyldermans, S., & Revets, H. (2004). Efficient cancer therapy with a nanobody-based conjugate. *Cancer research*, 64(8), 2853-2857.
- [73] Baral, T. N., Magez, S., Stijlemans, B., Conrath, K., Vanhollebeke, B., Pays, E., . . . De Baetselier, P. (2006). Experimental therapy of African trypanosomiasis with a nanobody-conjugated human trypanolytic factor. *Nature medicine*, 12(5), 580-584.
- [74] Salvador, J., Vilaplana, L., & Marco, M. (2019). Nanobody: outstanding features for diagnostic and therapeutic applications. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 411(9), 1703-1713.
- [75] Barakat, S., Berksoz, M., Zahedimaram, P., Piepoli, S., & Erman, B. (2020). Nanobodies as molecular imaging probes. *Free Radical Biology and Medicine*, 260-275.
- [76] Bao, C., Gao, Q., Li, L. L., Han, L., Zhang, B., Ding, Y., . . . Wu, X. H. (2021). The application of nanobody in CAR-T therapy. , 11(2), 238. *Biomolecules*, 11(2), 238.
- [77] Safarzadeh Kozani, P., Naseri, A., Mirarefin, S. J., Salem, F., Nikbakht, M., Evazi Bakhshi, S., & Safarzadeh Kozani, P. (2022). Nanobody-based CAR-T cells for cancer immunotherapy. *Biomarker Research*, 10(1), 1-18.
- [78] Behar, G., Siberil, S., Groulet, A., Chames, P., Pugniere, M., Boix, C., . . . Baty, D. (2008). Isolation and characterization of anti-FcγRIII (CD16) llama single-domain antibodies that activate natural killer cells. *Protein Engineering, Design & Selection*, 21(1), 1-10.
- [79] Conrath, K. E., Lauwereys, M., Wyns, L., & Muyldermans, S. (2001). Camel single-domain antibodies as modular building units in bispecific and bivalent antibody constructs. *Journal of Biological Chemistry*, 276(10), 7346-7350.
- [80] Van Heeke, G., Allosery, K., De Brabandere, V., De Smedt, T., Detalle, L., & de Fougerolles, A. (2017). Nanobodies® as inhaled biotherapeutics for lung diseases. *Pharmacology & therapeutics*, 169, 47-56.

- [81] Gelkop, S., Sobarzo, A., Brangel, P., Vincke, C., Romão, E., ..., & Lobel, L. (2018). The development and validation of a novel nanobody-based competitive ELISA for the detection of foot and mouth disease 3ABC antibodies in cattle. *Frontiers in veterinary science*, 5, 250.
- [82] Rothbauer, U., Zolghadr, K., Tillib, S., Nowak, D., Schermelleh, L., Gahl, A., . . . Leonhardt, H. (2006). Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies. *Nature methods*, 3(11), 887-889.
- [83] Knoebl, P., Cataland, S., Peyvandi, F., Coppo, P., Scully, M., Kremer Hovinga, J. A., . . . Callewaert, F. (2020). Efficacy and safety of open-label caplacizumab in patients with exacerbations of acquired thrombotic thrombocytopenic purpura in the HERCULES study. *Journal of thrombosis and haemostasis*, 18(2), 479-484.
- [84] Sarker, S. A., Jäkel, M., Sultana, S., Alam, N. H., Bardhan, P. K., Chisti, M. J., . . . Frenken, L. G. (2013). Anti-rotavirus protein reduces stool output in infants with diarrhea: a randomized placebo-controlled trial. *Gastroenterology*, 145(4), 740-748.
- [85] Hassanzadeh-Ghassabeh, G., Devoogdt, N., De Pauw, P., Vincke, C., & Muyldermans, S. (2013). Nanobodies and their potential applications. *Nanomedicine*, 8(6), 1013-1026.
- [86] Dmitriev, O. Y., Lutsenko, S., & Muyldermans, S. (2016). Nanobodies as probes for protein dynamics in vitro and in cells. *Journal of Biological Chemistry*, 291(8), 3767-3775.
- [87] Koide, S. (2009). Engineering of recombinant crystallization chaperones. *Current opinion in structural biology*, 19(4), 449-457.
- [88] Rasmussen, S. G., Choi, H. J., Fung, J. J., Pardon, E., Casarosa, P., Chae, P. S., . . . Kobilka, B. K. (2011). Structure of a nanobody-stabilized active state of the β_2 adrenoceptor. . . . *Nature*, 469(7329), 175-180.
- [89] Khireghesh, M. R., Safari, F., & Akbari, B. (2021). Sharifi, J., Safari, F., & Akbari, B. (2021). Immunotoxins and nanobody-based immunotoxins: Review and update. *Journal of drug targeting*, 29(8), 848-862.
- [90] Adams, H., Brummelhuis, W., Maassen, B., van Egmond, N., Khattabi, M. E., Detmers, F., . . . Verrips, T. (2009). Specific immuno capturing of the staphylococcal superantigen toxic-shock syndrome toxin-1 in plasma. *Biotechnology and bioengineering*, 104(1), 143-151.
- [91] Lafaye, P., & Li, T. (2018). Use of camel single-domain antibodies for the diagnosis and treatment of zoonotic diseases. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 60, 17-22.
- [92] Kirchhofer, A., Helma, J., Schmidthals, K., Frauer, C., Cui, S., Karcher, A., . . . Rothbauer, U. (2010). Modulation of protein properties in living cells using nanobodies. *Nature structural & molecular biology*, 17(1), 133-138.
- [93] de Beer, M. A., & Giepmans, B. N. (2020). Nanobody-based probes for subcellular protein identification and visualization. *Frontiers in cellular neuroscience*, 14, 573278.
- [94] Bastos-Soares, E. A., Sousa, R. O., Gómez, A. F., Alfonso, J., Kayano, A. M., Zanchi, F. B., . . . Fernandes, C. C. (2020). Single domain antibodies in the

development of immunosensors for diagnostics. , 165, 2244-2252. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 2244-2252.

- [95] Brilhante-da-Silva, N., de Oliveira Sousa, R. M., Arruda, A., Dos Santos, E. L., Marinho, A., Stabeli, R. G., . . . Pereira, S. (2021). Camelid Single-Domain Antibodies for the Development of Potent Diagnosis Platforms. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 25(4), 439-456.
- [96] Van Audenhove, I., & Gettemans, J. (2016). Nanobodies as versatile tools to understand, diagnose, visualize and treat cancer. *EBioMedicine*, 8, 40-48.
- [97] Soetens, E., Ballegeer, M., & Saelens, X. (2020). An inside job: applications of intracellular single domain antibodies. *Biomolecules*, 10(12), 1663.
- [98] Steeland, S., Vandenbroucke, R. E., & Libert, C. (2016). Nanobodies as therapeutics: big opportunities for small antibodies. *Drug discovery today*, 21(7), 1076-1113.
- [99] Fatima, A., Wang, H., Kang, K., Xia, L., Wang, Y., Ye, W., . . . Wang, X. (2014). Development of VHH antibodies against dengue virus type 2 NS1 and comparison with monoclonal antibodies for use in immunological diagnosis. *PloS one*, 9(4), e95263.
- [100] Jovčevska, I., & Muyldermans, S. (2020). The therapeutic potential of nanobodies. *BioDrugs*, 34(1), 11-26.
- [101] Leow, C. H., Fischer, K., Leow, C. Y., Cheng, Q., Chuah, C., & McCarthy, J. (2017). Single domain antibodies as new biomarker detectors. *Diagnostics*, 7(4), 52.
- [102] Liu, W., Song , H., Chen, Q., Yu, J., Xian, M., Nian, R., & Feng, D. (2018). Recent advances in the selection and identification of antigen-specific nanobodies. *Molecular immunology*, 96, 37-47.
- [103] Nguyen, V. K., Desmyter, A., & Muyldermans, S. (2001). Functional heavy-chain antibodies in Camelidae. *Adv. Advances in Immunology*, 79, 261-296.
- [104] Shriver-Lake, L. C., Goldman, E. R., Zabetakis, D., & Anderson, G. P. (2017). Improved production of single domain antibodies with two disulfide bonds by co-expression of chaperone proteins in the Escherichia coli periplasm. *Journal of Immunological Methods*, 443, 64-67.
- [105] Veggiani, G., & de Marco, A. (2011). Improved quantitative and qualitative production of single-domain intrabodies mediated by the co-expression of Erv1p sulfhydryl oxidase. *Protein expression and purification*, 79(1), 111-114.
- [106] Rahbarizadeh, F., Rasaee, M. J., Forouzandeh-Moghadam, M., & Allameh, A. A. (2005). High expression and purification of the recombinant camelid anti-MUC1 single domain antibodies in Escherichia coli. *Protein expression and purification*, 44(1), 32-38.
- [107] Götzke, H., Kilisch, M., Martínez-Carranza, M., Sograte-Idrissi, S., Rajavel, A., Schlichthaerle, T., . . . Frey, S. (2019). The ALFA-tag is a highly versatile tool for nanobody-based bioscience applications. *Nature communications*, 10(1), 1-12.
- [108] Järviluoma, A., Strandin, T., Lülfi, S., Bouchet, J., Mäkelä, A. R., Geyer, M., . . . Saksela, K. (2012). High-affinity target binding engineered via fusion of a

single-domain antibody fragment with a ligand-tailored SH3 domain. *PLoS One*, 7(7), e40331.

- [109] Kaczmarek, J. Z., & Skottrup, P. D. (2015). Selection and characterization of camelid nanobodies towards urokinase-type plasminogen activator. *Molecular Immunology*, 65(2), 384-390.
- [110] Li, D., Ji, F., Huang, C., & Jia, L. (2019). High expression achievement of active and robust anti- β 2 microglobulin nanobodies via *E. coli* hosts selection. *Molecules*, 24(16), 2860.
- [111] Zarschler, K., Witecy, S., Kapplusch, F., Foerster, C., & Stephan, H. (2013). High-yield production of functional soluble single-domain antibodies in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microbial cell factories*, 12(1), 1-13.
- [112] Veggiani, G., Giabbai, B., Semrau, M. S., Medagli, B., Riccio, V., Bajc, G., . . . de Marco, A. (2020). Comparative analysis of fusion tags used to functionalize recombinant antibodies. *Protein Expression and Purification*, 166, 105505.
- [113] Yu, J., Guo, Y., Gu, Y., Fan, X., Li, F., Song, H., . . . Liu, W. (2022). A novel silk fibroin protein-based fusion system for enhancing the expression of nanobodies in *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology*, 106(5), 1967-1977.
- [114] Salema, V., & Fernández, L. Á. (2013). High yield purification of nanobodies from the periplasm of *E. coli* as fusions with the maltose binding protein. *Protein expression and purification*, 91(1), 42-48.
- [115] Thomassen, Y. E., Verkleij, A. J., Boonstra, J., & Verrips, C. T. (2005). Specific production rate of VHH antibody fragments by *Saccharomyces cerevisiae* is correlated with growth rate, independent of nutrient limitation. *Journal of biotechnology*, 118(3), 270-277.
- [116] Gorlani, A., Haard, H. D., & Verrips, T. (2012). Expression of VHHs in *Saccharomyces cerevisiae*. In D. Saerens, & S. Muyldermans, *In Single Domain Antibodies* (pp. 277-286). Totowa, NJ: Humana Press.
- [117] Thomassen, Y. E., Meijer, W., Sierkstra, L., & Verrips, C. T. (2002). Large-scale production of VHH antibody fragments by *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and microbial technology*, 30(3), 273-278.
- [118] Rahbarizadeh, F., Rasaee, M. J., Forouzandeh, M., & Allameh, A. A. (2006). Over expression of anti-MUC1 single-domain antibody fragments in the yeast *Pichia pastoris*. *Molecular immunology*, 43(5), 426-435.
- [119] Ezzine, A., M'Hirsi el Adab, S., Bouhaouala-Zahar, B., Hmila, I., Baciou, L., & Marzouki, M. N. (2012). Efficient expression of the anti-AahI'scorpion toxin nanobody under a new functional form in a *Pichia pastoris* system. *Biotechnology and applied biochemistry*, 59(1), 15-21.
- [120] Joosten, V., Gouka, R. J., Van Den Hondel, C. A., Verrips, C. T., & Lokman, B. C. (2005). Expression and production of llama variable heavy-chain antibody fragments (VHHs) by *Aspergillus awamori*. *Applied microbiology and biotechnology*, 66(4), 384-392.
- [121] Okazaki, F., Aoki, J. I., Tabuchi, S., Tanaka, T., Ogino, C., & Kondo, A. (2012). Efficient heterologous expression and secretion in *Aspergillus oryzae* of a llama

- variable heavy-chain antibody fragment VHH against EGFR. *Applied microbiology and biotechnology*, 96(1), 81-88.
- [122] Hisada, H., Tsutsumi, H., Ishida, H., & Hata, Y. (2013). High production of llama variable heavy-chain antibody fragment (VHH) fused to various reader proteins by *Aspergillus oryzae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(2), 761-766.
- [123] Sakai, K.; Kinoshita, H.; Nihira, T. Heterologous expression system in *Aspergillus oryzae* for fungal biosynthetic gene clusters of secondary metabolites. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2012, 93(5), 2011-2022; DOI: 10.1007/s00253-011-3657-9.
- [124] Decanniere, K.; Desmyter, A.; Lauwereys, M.; Ghahroudi, M.A.; Muyldermans, S.; Wyns, L. A single-domain antibody fragment in complex with RNase A: non-canonical loop structures and nanomolar affinity using two CDR loops. *Structure* 1999, 7(4), 361-337.
- [125] Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *methods*, 25(4), 402-408.
- [126] Xue, X., Fan, X., Qu, Q., & Wu, G. (2016). Bioscreening and expression of a camel anti-CTGF VHH nanobody and its renaturation by a novel dialysis–dilution method. *AMB Express*, 6(1), 1-11.
- [127] Frenken, L. G., Van Der Linden, R. H., Hermans, P. W., Bos, J. W., Ruuls, R. C., De Geus, B., & Verrips, C. T. (2000). Isolation of antigen specific llama VHH antibody fragments and their high level secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of biotechnology*, 78(1), 11-21.
- [128] Maras, M.; Die, I.V.; Contreras, R.; van den Hondel, C.A. Filamentous fungi as production organisms for glycoproteins of bio-medical interest. *Glycotechnology* 1999, 19-27.
- [129] Gorlani, A., Lutje Hulsik, D., Adams, H., Vriend, G., Hermans, P., & Verrips, T. (2012). Antibody engineering reveals the important role of J segments in the production efficiency of llama single-domain antibodies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Engineering, Design & Selection*, 25(1), 39-46.
- [130] Joosten, V., Roelofs, M. S., Van den Dries, N., Goosen, T., Verrips, C. T., Van den Hondel, C. A., & Lokman, B. C. (2005). Production of bifunctional proteins by *Aspergillus awamori*: Llama variable heavy chain antibody fragment (VHH) R9 coupled to *Arthromyces ramosus* peroxidase (ARP). *Journal of biotechnology*, 120(4), 347-359.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Elif Karaman

Doğum Tarihi ve Yeri :

E-posta :

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2014, Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya Metalurji Fakültesi, Biyomühendislik
- **Lisans** : 2017, Anadolu Üniversitesi, İktisat Fakültesi, Uluslararası İlişkiler
- **Yüksek lisans** : 2016, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri, Biyomühendislik Yüksek Lisans Programı

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 2018-2023 Araştırma Görevlisi, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji Enstitüsü
- Best Visual Presentation, The Construction Of Affinity Agent Production Platform by using *pyrG* Auxotroph *Aspergillus oryzae* and the Production of the Nanobodies (VHH), *6th International Congress on Advances in Bioscience and Biotechnology (ICABB)*, August 25-29 2022, Aksaray, Turkey.

DOKTORA TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Karaman E., Uysal S.** (2022). The Construction Of Affinity Agent Production Platform by using *pyrG* Auxotroph *Aspergillus oryzae* and the Production of the Nanobodies (VHH). *6th International Congress on Advances in Bioscience and Biotechnology (ICABB)*, August 25-29 2022, Aksaray, Turkey.
- **Karaman E., Eyüpoğlu A.E., Mahmoudi Azar L., Uysal S.** (2023). Large-scale production of anti-RNase A VHH expressed in *pyrG* auxotrophic *Aspergillus oryzae*. *Current Issues in Molecular Biology*.

DİĞER YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Mahmoudi Azar, L., Öncel, M.M., Karaman E., Soysal, L.F., Choi, S.B., Fatima, A., Eyüpoğlu A.E., Erman, B., Khan, M.A., Uysal S.** (2023). Human

ACE2 orthologous peptide sequences show better binding affinity to SARS-CoV-2 RBD domain: implications for drug design. Computational and Structural Biotechnology.

- **Mahmoudi Azar, L., Karaman E., Beyaz, B., Göktan, I., Eyüpoğlu A.E., Kizilel, S., Erman, B., Gül, A., Uysal S. (2023).** Expression and characterization of recombinant IL-1Ra in *Aspergillus oryzae* as a system, BMC Biotechnology.

