

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



ŞARBON AŞI ADAYI OLARAK PA83'ÜN YENİ MUTANT FORMUNUN *N. BENTHAMIANA* BİTKİSİNDE TASARLANMASI, EKSPRESYONU, SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Rıfat ÜNGÖR

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ARALIK 2017

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ŞARBON AŞI ADAYI OLARAK PA83'ÜN YENİ MUTANT FORMUNUN *N. BENTHAMIANA* BİTKİSİNDE TASARLANMASI, EKSPRESYONU,
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Rıfat ÜNGÖR

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez Tübitak tarafından 115S077 nolu proje ile desteklenmiştir.

ARALIK 2017

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ŞARBON AŞI ADAYI OLARAK PA83'ÜN YENİ MUTANT FORMUNUN N.
BENTHAMİANA BİTKİSİNDE TASARLANMASI, EKPREZYONU,
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Rıfat ÜNGÖR
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 25/12/17 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV (Danışman)
Prof. Dr. Nedim MUTLU
Doç. Dr. Ufuk ÇELİKKOL AKÇAY

ÖZET

ŞARBON AŞI ADAYI OLARAK PA83'ÜN YENİ MUTANT FORMUNUN *N. BENTHAMIANA* BİTKİSİNDE TASARLANMASI, EKSPRESYONU, SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Rıfat ÜNGÖR

Yüksek Lisans Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV

Aralık 2017, 33 sayfa

Bacillus anthracis potansiyel biyolojik savaş ajanı olarak bilindiğinden beri, güvenli, düşük maliyetli, etkinliği yüksek ve uzun süreli stabiliteye sahip şarbon aşısını geliştirebilmek oldukça yüksek önem taşımaktadır. Son yıllardaki çalışmalar yüksek ekspresyon kapasitesi ve değerli rekombinant proteinlerin güvenli, hızlı ve ucuz üretimine olanak sağlaması nedeniyle bitki temelli transient ekspresyon sisteminin umut vaad edici teknoloji olduğunu göstermektedir. *B. Anthracis*'in bitkide üretilen koruyucu antijeni (PA) şarbona karşı güvenli, etkili ve düşük maliyetli aşı geliştirmede büyük potansiyele sahiptir. *B. Anthracis*'in koruyucu antijeni glikoprotein değildir. Buna rağmen, dizisi 9 tane olası potansiyel glikolizasyon bölgesine sahiptir ve *Nicotiana benthamiana* bitkilerinde eksprese edildikleri zaman aşırı derecede glikozillenme gösteriyorlar. Son zamanlarda PA83 antijeninin glikozillenmemiş versiyonları, ya *in vivo* deglikolizasyon stratejisi (PNGase F veya Endo H temelli), (Mamedov vd. 2012; Mamedov vd. 2016; Mamedov vd. 2017) ya da mutasyon (6 tane N-glikolizasyon bölgesine yönlendirilmiş mutagenез), (Mamedov vd. 2016) yaklaşımı vasıtasıyla üretilebilmiştir. PA83'ün bu mutant formunu analiz ettiğimizde, bir önceki çalışmada mutasyon yapılmamış bölge olan fakat glikozillenme düzeyine sahip olan bir bölge olan Asn-39'u bulduk. Bu çalışmada, koruyucu antijeninin Asn-39 dahil 7 tane N-glikolizasyon bölgesinin mutasyonu ile oluşturulmuş yeni mutant formu tasarlandı, kodon optimize edildi, eksprese edildi ve *N.benthamiana* bitkisinde üretildi. Kıyaslama yapabilmek amacıyla PA83'ün 6 olası N-glikolizasyon bölgesinde nokta mutasyonu taşıyan versiyonu *N.benthamiana* bitkisinde üretildi. PA83'ün her iki mutant formu IMAC afinite kolon kromatografisi yöntemi kullanılarak saflaştırıldı ve saflaştırılmış protein stabilite analizi için değerlendirildi.

ANAHTAR KELİMELER: Geçici gen anlatımı, *in vivo* deglikolizasyon, Koruyucu Antijen, Şarbon aşısı adayı.

JÜRİ: Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV

Prof. Dr. Nedim MUTLU

Doç. Dr. Ufuk ÇELİKKOL AKÇAY

ABSTRACT

ENGINEERING, EXPRESSION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF NEW MUTANT FORM OF PA83 IN *N.* *BENTHAMIANA* PLANTS AS ANTHRAX VACCINE CANDIDATE

Rifat UNGOR

MSc Thesis in Agricultural Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV

December 2017, 33 pages

Bacillus anthracis has long been considered a potential biological warfare agent, and therefore, developing safe, low-cost and highly efficient anthrax vaccine with long-term stability is important. Numerous studies in recent years demonstrated that plant based transient expression system is a promising technology with high expression capacity and provides safe, fast, inexpensive production of valuable recombinant proteins. Plant produced PA of *B. anthracis* has great potential as a target for a safe, effective, and low-cost vaccine against anthrax. Protective antigen of *B. anthracis* is not a glycoprotein, however, its sequence has nine potential glycosylation sites and it has been shown to be aberrantly glycosylated when expressed in *Nicotiana benthamiana* plants. Recently, a non-glycosylated versions of PA83 antigen was produced by *in vivo* deglycosylation strategy (PNGase F or Endo H based) (Mamedov et al 2012; Mamedov et al 2016; Mamedov et al 2017) or by site-directed mutagenesis-based approach, by mutation of six N-Glycosylations sites (Mamedov et al 2016). When we analyzed this mutant form of PA83, we found that Asn-39 site, which was not mutated in the previous studies has some level of glycosylation. In this study, a new mutant form by mutation of seven N-glycosylation sites (including Asn-39) of protective antigen was engineered, codon optimized, expressed and produced in *N. benthamiana* plant. For comparison, version of PA83 containing point mutations in six potential N-glycosylation sites was also produced in *N. benthamiana*. Both PA83 mutants were purified using IMAC affinity column and purified protein were subjected for stability analysis.

KEYWORDS: Anthrax vaccine candidate, *in vivo* deglycosylation, Protective Antigen, Transient gene expression.

COMMITTEE: Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV
Prof. Dr. Nedim MUTLU
Assoc. Prof. Ufuk ÇELİKKOL AKÇAY

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında Şarbon hastalığında tedavi amaçlı kullanılacak rekombinant PA83 proteininin mutant varyantlarının karakterizasyonu ve tanımlanması çalışmaları yürütülmüştür. Öncelikle tez konunun belirlenmesi aşamasından itibaren, yönlendirmeleri ve yardımları sayesinde tezimin sonuçlandırılmasında bana danışmanlık yapan hocam Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV'a teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarım boyunca teknik olarak yardımlarını esirgemeyen ve her zaman yanımda olan, desteklerini hiç esirgemeyen İlahı MUSAYEVA, Kader ÇİÇEK, Hemra KHOZEİNİ, Burcu GÜLEÇ'e ve laboratuvarındaki tüm arkadaşlarıma teşekkürü borç bilirim. Bu zorlu süreçte tüm motivasyonumu bu kişilere borçluyum.

Uzun süreli çalışmalarım sırasında her zaman desteğini esirgemeyen aileme ve tüm dostlarıma sonsuz teşekkür ve minnetimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
AKADEMİK BEYAN.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1.GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	2
2.1. Şarbon Hastalığı.....	2
2.2. <i>Bacillus Anthracis</i>	3
2.3. Şarbona Karşı Aşı Geliştirme.....	5
2.4. N- Bağlı ve O- Bağlı Glikolizasyon.....	6
2.5. Transient Ekspresyon Sistemi.....	9
3. MATERYAL VE METOT.....	11
3.1 Mutant Genlerin Tasarlanması ve Kodon Optimizasyonu.....	11
3.2. Genlerin Klonlanması.....	12
3.3. <i>A.tumefaciens</i> 'e Transformasyon ve <i>N. Benthamiana</i> Bitkisine İnfiltrasyonu ...	12
3.4. SDS-PAGE ve Western Blot Analizleri.....	13
3.5. Rekombinant HisTaq (His6) Etiketli MQ1 ve MQ2 Proteinlerinin Saflaştırılması.....	14
3.6. Saflaştırılmış MQ1 ve MQ2 Proteinlerinin Glikan Saptama Analizleri.....	14
3.7. Saflaştırılmış MQ1 ve MQ2 proteinlerinin Stabilite Analizleri.....	15
3.8. Deneylerde Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması.....	15
3.9. Kompetan Hücre Hazırlanması.....	19
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	20
4.1. MQ1 Geninin Klonlanması.....	20
4.2. MQ2 Geninin Klonlanması.....	21
4.3. Plazmidlerin Oluşturulması ve Proteinlerin Heterolog Ekspresyonu.....	22
4.4. Rekombinant MQ1 ve MQ2 Proteinlerinin Üretimi.....	22

4.5. Rekombinant HisTaq (His6) Etiketli MQ1 ve MQ2 Proteinlerinin Saflaştırılması.....	23
4.6. Saflaştırılmış MQ1 ve MQ2 Proteinlerinin Glikan Saptama Analizi	23
4.7. Saflaştırılmış MQ1 ve MQ2 Proteinlerinin Stabilite Analizleri	24
4.7.1. Saflaştırılmış MQ1 ve MQ2 Proteinlerinin Stabilite Sonrası SDS-PAGE Analizi	24
4.7.2. Saflaştırılmış MQ1 ve MQ2 Proteinlerinin Stabilite Sonrası Western Blot-Analizi	26
5. SONUÇ	27
6. KAYNAKLAR	28
ÖZGEÇMİş	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Şarbon aşısı adayı olarak PA83’ün yeni mutant formunun *N. benthamiana* bitkisinde tasarlanması, ekspresyonu, saflaştırılması ve karakterizasyonu” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak bulunduğunu belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

25/12/2017

Rıfat ÜNGÖR

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

bp : Baz çifti

dk : Dakika

g : Gram

kb : Kilobaz

kDa : Kilodalton

kg : Kilogram

l : Litre

ml : Mililitre

s : Saat

sn : Saniye

°C : Santigrat

µg : Mikrogram

µl : Mikrolitre

µm : Mikrometre

Kısaltmalar

Asn	: Asparajin
EF	: Edema Faktör
ER	: Endoplazmik Retikulum
ET	: Edema Toksin
His	: Histidin
Hyp	: Hidroksiprolin
LF	: Letal Faktör
LT	: Letal Toksin
PA	: Protective Antijen
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat-Poli Akrilamid Gel Elektroforez
vd	: ve diğerleri

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Bacillus Anthracis</i> 'in taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü.....	3
Şekil 2.2. Şarbon toksinlerinin moleküler seviyedeki etkisi.....	4
Şekil 2.3. N-bağlı şeker zincirlerinin prekürsör ve çekirdek bölge yapısının çizimi (Hudson vd. 2010).....	6
Şekil 2.4. O-bağlı glikolizasyon yolağının küçük bir kısmının çizimi (Hudson vd. 2010).....	7
Şekil 2.5. PNGase F ve N-bağlı glikanların çekirdeğinde endoglikozidaz hassas bağlar.....	7
Şekil 3.1. MQ1 ve MQ2 genleri arasındaki amino asit sekans farkı	11
Şekil 4.1. MQ1 geninin <i>E.coli</i> 'den plazmid izolasyonu sonrası enzimlerle kesilerek elde edilen agaroz jel görüntüsü.....	20
Şekil 4.2. MQ2 geninin <i>E.coli</i> 'den plazmid izolasyonu sonrası enzimlerle kesilerek elde edilen agaroz jel görüntüsü.....	21
Şekil 4.3. MQ1 ve MQ2 proteinlerinin Western blot görüntüsü	22
Şekil 4.4. Saflaştırılmış MQ1 ve MQ2 proteinlerinin SDS-PAGE ve Western blot analizi	23
Şekil 4.5. Saflaştırılmış MQ1 ve MQ2 proteinlerinin glikan saptama analizi sonucu ...	24
Şekil 4.6. Saflaştırılmış MQ1 ve MQ2 proteinlerinin farklı sıcaklıklardaki stabilite analizi sonrası SDS-PAGE görüntüsü.....	24
Şekil 4.7. Saflaştırılmış MQ1 ve MQ2 proteinlerinin 37°C'de stabilite analizi sonrası SDS-PAGE görüntüsü	25
Şekil 4.8. Saflaştırılmış MQ1 ve MQ2 proteinlerinin 37°C'de stabilite analizi sonrası Western Blot görüntüsü	26

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Rekombinant terapötik üretim sistemlerinin kıyaslanması.....	8
Çizelge 4.1. Saflaştırılmış MQ1 ve MQ2 proteinlerinin SDS-PAGE analizleri sonrası stabilite değerlendirmesi	25
Çizelge 4.2. Saflaştırılmış MQ1 ve MQ2 proteinlerinin Western Blot analizleri sonrası stabilite değerlendirmesi	26

1. GİRİŞ

Şarbon hastalığı (Anthrax) genellikle ot yiyen hayvanlarda görülmektedir. Şarbon hastalığı bulaşmış hayvanlarla temas ya da bunları besin olarak tüketmekle insana bulaşan, *Bacillus Anthracis* bakterisinin etken olduğu bir hastalıktır. Bu hastalığın, ölümle sonuçlanabilme ihtimali olduğundan riski göz önünde bulundurulmalıdır. Çoğunlukla Akdeniz ülkelerinde görülmektedir. Asya, Afrika, Güney Amerika da hastalığın dünyada görüldüğü yerlerdir.

Amerika Birleşik Devletleri'nde, 11 Eylül 2001 tarihinde yaşanan biyoterörizm eylemleriyle şarbon bütün ülkelerde yeniden dikkatleri çeken bir hastalık olmuştur. Şarbonun ortaya çıkış şekli ve kaynağı henüz bilinmemektedir. Bu hastalığın biyolojik bir silah olarak kullanıldığı ve laboratuvar çalışmaları sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir. Daha ucuz bir silah olması, kaynağının bol olması, saklanabilen bir mikrobun yol açması, şarbonun neden biyolojik silah olarak kullanıldığını açıklamaktadır.

Şarbon tedavisinde kullanılan yöntem antibiyotik tedavidir. Birçok antibiyotik şarbon bakterisini yok edebilir. Fakat bakterilerin gün geçtikçe antibiyotiklere karşı direnç kazanması tedavide farklı yöntemlerin geliştirilmesini gerektirmektedir. Bu hastalığın tedavisinde en etkili yöntemlerden biri de aşılama yoluyla bağışıklık kazandırılıp önlem alınmasıdır.

Bu çalışmada şarbona karşı, rekombinant protein üretilerek aşı geliştirilmesi hedeflenmektedir. Rekombinant proteinlerin geliştirilmesinde en önemli nokta işlevsel protein üretmektir. İşlevsel protein üretebilmek için birçok organizma konak olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada rekombinant proteinleri üretmek için bitki ekspresyon sisteminden yararlanılmıştır. Bitkiler üretim sistemleri olarak hayvan patojenlerinin kontaminasyonu bakımından güvenilir olmaları, yüksek üretim kapasitesi ve nispeten düşük yatırım gerektirmesi gibi bazı avantajlara sahiptir. Bitki temelli transient ekspresyon sistemi aşı antijenleri, terapötik proteinler, antibodiler ve endüstriyel enzimler dahil çeşitli rekombinant proteinlerin üretimi için etkili olabilecek teknolojidir. Bu sistemler diğer ekspresyon sistemlerine kıyasla üstün yararlar sunmaktadır; hızlı üretim, düşük maliyet, yüksek ölçeklenebilirlik, yüksek üretim kapasitesi ve hiçbir memeli patojenlerini içermemeleri bunlardan en önemlileridir.

Yaptığımız çalışmada, şarbona karşı aşı geliştirme konusunda bilinen PA83 proteinini deglikozillenmiş formda *N.benthamiana* bitkisinde üretebilmek için proteinlerin olası glikolizasyon bölgelerinden amino asit değişimi yapılarak tasarlanan genler kullanılmıştır. Mutant olarak tasarlanan genler sayesinde şarbon aşı adayı proteinlerinin deglikolize formda üretimi başarılı şekilde gerçekleştirilmiştir. Üretilen proteinlerin stabilite değerlendirmeleri yapıldığında, aynı proteinin glikozillenmiş formda olanına göre çok daha yüksek stabiliteye sahip olduğu gösterilmiştir.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Şarbon Hastalığı

Şarbon sporları 1-2 µm çapındadır ve bu ölçü, sporların soluma yoluyla vücut içine alınabilmesi ve alveolar yüzeylerde birikmesi için optimaldir (Dixon vd. 1999). Sporların soluma yoluyla vücut içine alınması antimikrobiyal terapi sağlansa bile öldürücüdür (Friedlander 2000). İnsanlar şarbon sporları ile deri aşınması, beslenme ve soluma yoluyla enfekte olur. Deri yoluyla bulaşan şarbon, antibiyotikler ile tedavi edilebilir. Soluma yoluyla bulaşan şarbon en öldürücü olan formudur (Plotkin vd. 1960). Sporlar soluma yoluyla alındığında alveolar yüzey üzerinde birikir ve yerel makrofajlar tarafından inert partiküller olarak sindirilir (Dixon vd. 1999; Friedlander 2000). Sporlar enfekte makrofajlardan mediastinal ve peribronşiyal lenf nodüllerine taşınır. Bacilli makrofajlardan kurtulur ve bölgesel hemorajik lenfadenitiye neden olan lenfatik sistem içinde engellenememiş hücre dışı çoğalma geçirir. Bacilli kan dolaşımında yayılır ve hızlıca replikasyona devam eder (Smith vd. 2000). Başlangıç belirtiler kızgınlık ve yorgunluk ve öksürüktür. 2-5 günden sonra ateş, üşüme, yanak ve boyunda deri altı ödem gibi ani başlangıç belirtiler ortaya çıkmaya başlar. Solunumun sekteye uğraması nedeniyle 24 saat içinde ölüm gerçekleşir (Brachman vd. 1999).

Teorik olarak bazı yaklaşımlar mevcuttur: (i) Hastalık gelişimini önlemek için aşılama (ii) Sporların eliminasyonu (iii) Hastalık sistemik düzeye ulaşmadan vejetatif bacilli'yi öldürecek antibiyotikler (iv) Şarbon toksinlerine karşı bileşik antitoksin terapi (Duesbery vd. 1999) bunlardan bazılarıdır. *B. Anthracis* enfeksiyonunda kritik aşamalar: Sporun dahil olması, çimlenmesi, bacillar çoğalma, yayılma ve toksin üretimidir. Şarbon sporu, dıştan içe doğru morfolojik olarak ekzospor, spor ceketi, korteks, spor membranı ve çekirdek gibi birbirinden farklı katmanlardan oluşur. Bu yapılar sıkı-sıkıya birbirine bağlıdır ve bu sayede sporun genetik materyalini koruyarak zor çevre koşullarına karşı şarbon sporlarını koruyarak uzun süre canlı kalabilmesini sağlar (Hachisuka vd. 1966).

Doğal olarak meydana gelen şarbon, şarbonla infekte olmuş hayvanlarla veya hayvansal ürünlerle temas sonrasında ortaya çıkmaktadır. İnsanlarda üç tip şarbon enfeksiyonu meydana gelebilir. Doğal olarak ortaya çıkan solunum yoluyla bulaşan şarbon, şuanda nadiren insanlarda hastalığa neden olabilmektedir. ABD'de 1978-1979 tarihleri arasında sadece 18 vaka bununla ilgili olarak rapor edilmiştir (Brachman vd. 1980). Deri yoluyla bulaşan şarbon, yıllık tahmini olarak 2000 vaka ile en yaygın ortaya çıkan şarbon çeşididir (Brachman vd. 1999). Hastalık tipik olarak şarbonla infekte olmuş hayvanlarla temas sonrasında ortaya çıkmaktadır. ABD'de 1940-1944 tarihleri arasında sadece 224 vaka bununla ilgili olarak rapor edilmiştir (Thomas vd. 1999). 1979-1985 tarihleri arasında Zimbabve'de 10000 insan vakası belirlenmiştir ki, vakaların nerdeyse

Sindirim yoluyla bulaşan şarbon yaygın olarak görülmemektedir ve yetersiz pişmiş, kontaminasyona uğramış etle beslendiğinde ortaya çıkmaktadır. 1982'de kuzey Tayland'da 24 vaka tespit edilmiştir (Tekin vd. 1997).

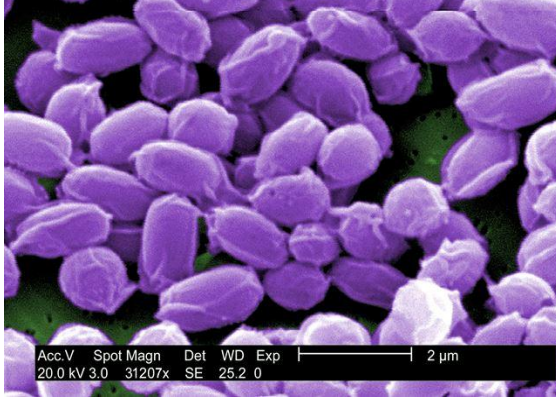
Solunum yoluyla bulaşan şarbon, spor taşıyan partiküllerin alveolar alanın 1-5 µm'lik kısmına yayıldığında ortaya çıkar (Hatch 1961). Sporların bazılarını makrofajlar

sindirir, bazıları ise liziz ve bozulmaya maruz kalır. Hayatta kalan sporlar lenfatik sistem aracılığıyla mediastinal lenf nodüllerine taşınıyor ki, burda 60 gün sonrasına kadar çimlenme meydana gelir (Lincoln vd. 1965). Bu süreç sporların vejetatif hücrelere transformasyonunun geciktirilmesinden sorumludur. Sporlar çimlenmeye başladığı andan itibaren hastalık hızlı bir şekilde seyretmeye başlar. Çoğalan bakteriler toksin salgılamaya başlıyor, bu da hemoraji (kanama), edema ve nekroza neden olur (Friedlander 1997). İnsan için LD₅₀ (hastalığa maruz kalan kişilerin %50'ni öldürmeye yetecek doz) 2500/55000 solunan şarbon sporlarıdır.

Deri yoluyla bulaşan şarbon, özellikle enfeksiyona duyarlı derideki daha önceden oluşmuş kesik veya aşınmalarda hastalık etmeni organizmanın birikmesiyle oluşuyor (Pile vd. 1998). Sporlar deri dokusunda çimlenmeye başladıktan sonra süreç, toksin üretimiyle ve bölgesel edemayla sonuçlanır. Sindirim yoluyla bulaşan şarbon ise, sindirim borusunun üst ve alt bölgelerinde hastalık etmeni sporların birikmesi ve çimlenmesiyle ortaya çıkmaktadır.

2.2. *Bacillus Anthracis*

B. Anthracis, Gram-pozitif, aerobik, fakültatif anaerobik, 1-1.5 µm genişliğinde, 3-10 µm uzunluğunda çubuk şekilli bakteridir. *B. Anthracis*'in en önemli yönü dormant sporlar oluşturabilmesidir (Julia vd. 2005). Şarbon sporları dünyanın her yerinde toprakta doğal olarak bulunur, uzun süre varlığını koruyabilir, ısı, kuraklık, ultraviyole ışınları, gamma ışınması gibi zor koşullara karşı oldukça yüksek direnci vardır (Driks 2002).



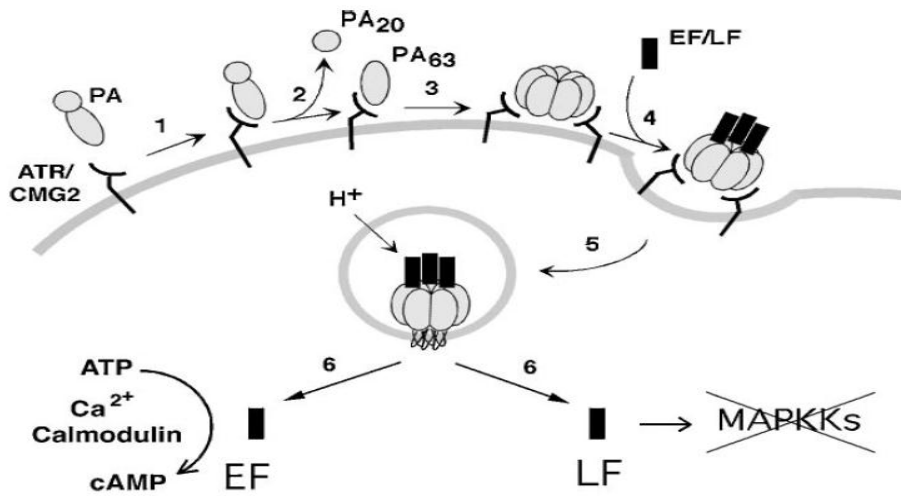
Şekil 2.1. *Bacillus Anthracis*'in taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü.

(Fotoğraf : CDC - Janice Haney Carr).

Bacillus anthracis'in başlıca virulans faktörleri poli-D-glutamik asit ve üç tane protein eksotoksin bileşiğidir: Koruyucu antijen (PA, 83 kDa), letal faktör (LF, 90 kDa) ve edema faktör (EF, 89 kDa) (Vodkin 1983; Robertson 1988; Ezzell 1999). Şarbon toksini, letal toksin ve edema toksini içerir ve bunlar ikili kompleks oluşturup, sırasıyla edema faktör (EF), letal faktör (LF) ve koruyucu antijenle (PA) birleşir. Bu proteinler birbirlerinden ayrı şekilde toksik olmayan monomerler olarak salgılanırlar (Mamedov vd. 2016). EF kalmodulin-bağımlı adenilat siklazdır ve konağın ATP'sini kullanarak hücre içi siklik AMP'nin üretimini katalizler (Drum vd. 2002). LF, mitojenle aktive

olan protein kinazkinazı inaktif eden çinko metalloproteazıdır ve özellikle makrofajlarda etki gösterir (Pannifer vd. 2001; Hanna 1999). Şarbonun şiddetli belirtilerinin açığa çıkmasına letal toksin neden olur. Letal ve edema toksin ikisi birlikte konak savunma mekanizmasının bozulmasında yer alırlar.

Bacillus anthracis'in başlıca virulans faktörleri tam virulans için gerekli olan pXO1 ve pXO2 plazmidlerinden eksprese olmaktadır. pXO1 iki bileşkenli antraks toksinlerinin üç bileşkenini eksprese etmektedir; edema faktör (EF), letal faktör (LF, enzimatik olarak aktif altünite) ve PA (bağlama altünitesi). EF ve LF yarışmalı olarak PA ile bağlanarak biyolojik olarak aktif ikili toksinler olan sırasıyla LT ve ET'yi oluşturmaktadır (Keitel 2006). PA için hücrel reseptörler; tümör endotelyum marker (TEM)-8 varyant 2, (TEM)-8 varyant 1 ve insan kapiler morfogenez gen 2'dir (Scoble vd. 2003; Barth vd. 2004). Spesifik hücrel reseptörlere bağlandıktan sonra 83 kDa'lık PA konak hücre yüzeyinde Furin tarafından proteolitik aktivasyona maruz kalıyor. PA₈₃'ün PA₆₃'e kesilmesi hücre membranında halka biçimli homo heptamerik, pH-bağımlı ion geçirgen kanalın birleşmesiyle sonuçlanır (Petosa vd. 1997). Prepor heptamer daha sonra EF veya LF ile kompleks oluşturur. Toksin kompleksleri endositoza maruz kalır ve asidik kompartmana taşınır. pH bağımlı konformasyonel değişimi takiben kanal LF ve EF'nin sitozola taşınmasını üstlenerek şaperon benzeri işlev görür (Krantz vd. 2005; Lacy vd. 2005).



Şekil 2.2. Şarbon toksinlerinin moleküler seviyedeki etkisi. 1) Koruyucu antijen bir reseptöre bağlanır (ATR veya CMG2). 2) Furin proteazı ile ayrılma PA₂₀'yi çıkarır. 3) PA₆₃'ler bir araya gelerek heptamerik yapıyı oluşturmaya başlar. 4) EF ve LF heptamere bağlanır. 5) Kompleks endositize edilir ve asidik intraselüler bölüm ile alışveriş yapılır. 6) Bu yapı düşük pH'nın etkisi ile bir gözenek haline dönüşür ve EF ve LF sitozole yerleşiyor. EF, cAMP oluşumunu katalize eder ve LF, proteolitik olarak MAPKKs'yi inaktif eder.

LF, mitojenle aktive olan protein kinaz kinaz (MAPKK) 1 ve 2'yi keserek MAPK sinyal transdüksiyon yolağını inhibe eden 85 kDa'lık metalloproteazdır (Duesbery vd. 1998). LT, makrofajlardan sitokinlerin salınmasını stimüle eder, aktive olmuş makrofajların apoptozonu indükler, dendritik hücre işlevini bozar, hipoksiyi

indükler ve insan endotelial hücrelerinin apoptozuna neden olur (Kirby 2004). LT ilaveten platelet işlevini bozar ve nörotrofilaktin temelli hareketi felç eder (During vd. 2005).

EF, hücreler arası siklik adenozin monofosfat (cAMP) düzeyini yükselten 89 kDa'lık kalmodulin bağımlı adenilat siklazdır (Leppla 1982). Bu artış lenfosit çoğalması, fagositoz, oksidatif artış, bozulmuş hücre-immün yanıtı ve proinflamatuvar sitokinlerin salınımının stimüle edilmesi gibi çeşitli hücrel yanıtı inhibe eder. ET ise, hücre ölümüne aracılık etmektedir. ET ve LT aracılı toksisite innat ve adaptif immün yanıtın ikisini de bozar ve nekroz, edema, efüzyonlar, kanama, hipoksi ve şok ile sonuçlanmaktadır (Inglesby vd. 2002).

pXO2 poli-D-glutamik asit sentezlenmesinden sorumlu proteinleri eksprese etmektedir. Kapsül içerisine alınmış organizmalar fagositoza karşı dirençlidir fakat kapsüllenememiş olanlar fagositler tarafından öldürülür (Makino vd. 2002). Kapsül endosporu serum içindeki diğer bakterisidal bileşiklerden koruma işlevi görür. Bu kapsül şarbon enfeksiyonu süresince önemli rol oynamaktadır ama hastalık fazı süresince önemli değildir.

2.3. Şarbona Karşı Aşı Geliştirme

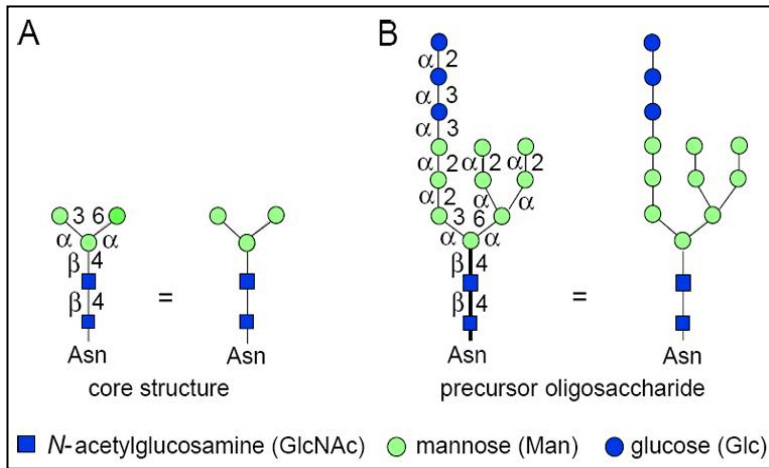
Koruyucu antijen (PA), şarbon hastalığına karşı aşı geliştirmesinde en önemli moleküldür (Aziz vd. 2002). *Bacillus anthracis*'in başlıca virulans faktörleri poli-D-glutamik asit ve üç tane protein eksotoksin bileşimidir; koruyucu antijen (PA, 83 kDa), letal faktör (LF, 90 kDa) ve edema faktör (EF, 89 kDa) (Vodkin 1983, Robertson 1988, Ezzell 1999). Bu üç proteinin hiç birisi tek başına toksik değildir, fakat PA, letal faktör ile birleştiğinde letal toksin oluşuyorken edema faktör ile birleştiğinde edema toksin oluşuyor (Leppla 2000). Bu toksinler sırasıyla hücre ölümüne ve edemaya neden olur. PA kodlayan gen *Bacillus anthracis*'in pXO1 plazmidinin pagA lokusunda bulunur (Hoffmaster 1999; Okinaka vd. 1999). Bu gen AT'ce zengin (69%), sistein taşımayan, 735 a.a büyüklüğünde protein salgılayan, 2205 bp kodlanan 2319 bp uzunluğunda açık okuma çerçevesinden oluşur (Bhatnagar vd. 2001).

Şarbon aşlarının insan kullanımına uygun şekilde geliştirilmesi 1940'larda başlamış ve şarbonun biyolojik silah olarak kullanımına başlanmasıyla aşı geliştirilmesine odaklanılmıştır. 1970 tarihinde koruyucu antijen (PA) hücre serbest filtratından hazırlanmış altünite aşısı olarak kullanılan Adsorbe olmuş şarbon aşısı olarak isimlendirilen AVA veya Biotraks tek ruhsatlı şarbon aşısıdır (Turnbull 1991). Aşının hazırlanmasında kullanılan soy toksigenik, non enkapsüle soy olarak bilinen V770-NP1-R'dir (Joellenbeck 2002). Filtrat, PA içeren hücrel ürünlerin karışımından oluşmaktadır ve adjuvant olarak işlev gören alüminyum hidroksid üzerine adsorbe olmuştur (Turnbull 2000). Biotraks kullanımının oluşturduğu en büyük engellerden bir tanesi aşı LF, EF dahil diğer şarbon proteinlerini içerebilmekte, bu durum anafilaksi dahil bazı alerjik reaksiyonlara ve hatta ölüme neden olabilmektedir. İlaveten aşı yalnızca kısıtlı koruma sağlamaktadır (Friedlander vd. 1999; Schneemann vd. 2009).

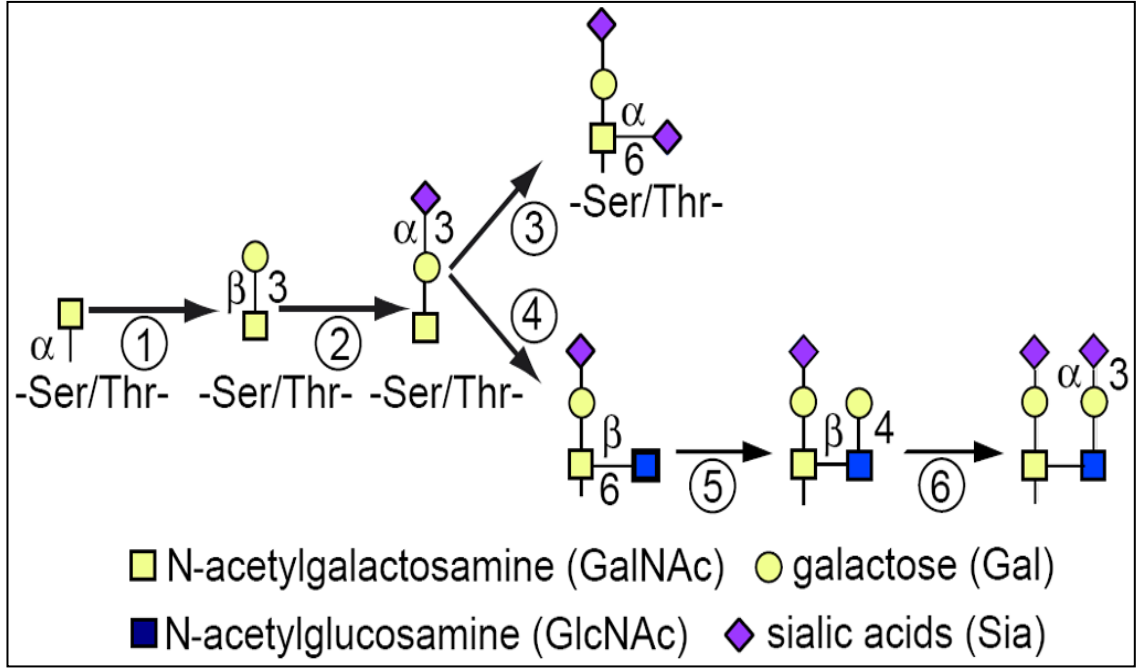
2.4. N- Bağlı ve O- Bağlı Glikolizasyon

Ökaryotlarda N-glikan sentezi endoplazmik retikulumda (ER) kısmen korunmuş olmasına rağmen golgi cisimciğinde N-glikan ve O-glikan biyosentezi büyük oranda spesifikdir ve bitki ve memelilerde glikoproteinlere bağlı farklı oligosakkarit yapısı ile sonuçlanmaktadır (Gomord vd. 2010). Terapötik glikoproteinlerin üretimi için memeli hücre hatlarına alternatif olarak bitkilerin kullanılması bitkide protein N-glikolizasyonunun bitkiye uygun olarak optimizasyonunu gerektirmektedir. Swiss-Prot veri bankasında biofarmasötik olarak kabul edilen ökaryotik proteinlerin %50 den çoğu glikoproteinlerdir (Walsh vd. 2006). Karbonhidratların proteinlere bağlanması iki farklı kategoride sınıflandırılır. N-Glikanlar, protein zincirinde asparajinin (Asn) amid grubuna bağlanır ve O-Glikanlar, serin (Ser) treonin (Thr) hidroksilizin veya hidroksiprolin (Hyp) kalıntılarına bağlanıyor.

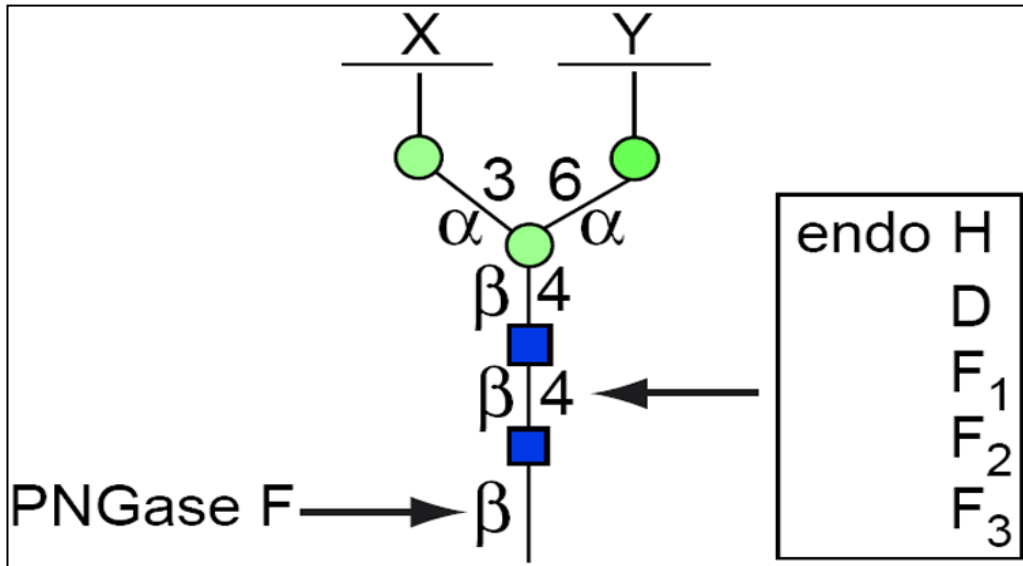
N-glikolizasyon lipid-bağlı oligosakkaritlerin yeni oluşmuş polipeptidlere eş-translasyon veya translasyon sonrası transferi olacak şekilde endoplazmik retikulumda (ER) gerçekleşir. O-Glikanlar endoplazmik retikulum (ER) ve golgi cisimciğinde katlanmış proteinlere monosakkaritlerin transferi aşamasında sentezlenir (Gomord vd. 2010). İnsan hastalıklarının tedavisinde bitkide üretilmiş farmasötiklerin kullanımında en büyük engel biofarmasötiklerde bitkilerin insan tipi glikolizasyon yapamamasıdır. Bitki hücrelerinde protein N-glikolizasyonu oligosakkarit prekürsörün, (Glc3Man9GlcNAc2) dolikol lipit taşıyıcıdan korunmuş N-glikolizasyon dizisinin (Asn-X-Ser/Thr) spesifik Asn kalıntısına transferiyle başlar. Öncelikle olgunlaşmamış proteine transfer başlıyor, sonra glikoprotein salgı yolağı boyunca taşınıyor ve N-glikan yüksek mannoz tipi N-glikanları oluşturmak için glukoz ve mannoz kalıntılarının uzaklaştırılması gibi aşamaları içeren bazı olgunlaşma işlemlerine maruz kalıyor ve en sonunda ER ve golgi aparatında kompleks N-tipi glikan oluşumuna neden olan yeni şekerlerin ilavesi gerçekleşiyor. Bitkilerde bulunan β 1,2-ksiloz ve α 1,3-fukoz memelilerde bulunmazken, memelilerde bulunan β 1,4-galaktoza bağlı sialik asit bulunmaz (Lerouge vd. 1998).



Şekil 2.3. N-bağlı şeker zincirlerinin prekürsör ve çekirdek bölge yapısının çizimi (Hudson vd. 2010).



Şekil 2.4. O-bağlı glikolizasyon yolağının küçük bir kısmının çizimi (Hudson vd. 2010).



Şekil 2.5. PNGase F ve N-bağlı glikanların çekirdeğinde endoglikozidaz hassas bağlar. PNGase F GlcNAc ve Asn arası bağı kesiyor ve Asn'yi Asp'ye dönüştürüyor. Endoglikozidazlar (H, D, and F) çekirdek bölgede iki GlcNAc arası bağı keserek bir tane GlcNAc'yi proteine bağlı olarak bırakıyor (Hudson vd. 2010).

Memeli ve bitki hücrelerinin her ikisinde de glikan işleme mekanizmaları endoplazmik retikulum (yüksek mannoz) ve golgi aparatında (kompleks glikan) yerleşiyor. Hedef proteinin bitkide üretilmesi iki temel stratejiyle gerçekleşiyor; transgenik ve transient gen ekspresyonu (Mamedov 2010). Transgenik sistemde, hedef gen bitki nükleer genomuna veya kloroplast genomuna birleşir. Transient gen ekspresyon sisteminde ise, hedef geni taşıyan genetik olarak tasarlanmış bitki virüsleri

bitkiye dahil oluyor ve rekombinant protein bitki konak genomuna dahil olmadan eksprese oluyor (Franken vd. 1997; Daniell vd. 2001). Transient gen ekspresyonu stabil transformasyona kıyasla çeşitli avantajlara sahiptir; zaman açısından verimli olması, hedef proteinin yüksek ekspresyonu, sistemin ölçeklenebilir ve istikrarlı olması, daha az çevresel hasarla üretim olanağına sahip olmasıdır (Yusibov vd. 2006; Roy vd. 2010).

Çizelge 2.1. Rekombinant terapötik üretim sistemlerinin kıyaslanması

Konak	Üretim maliyeti	Üretim zamanı	Üretim kalitesi	Glikolizasyon	Patojen riski	Saklama maliyeti	Etik endişeler
Bakteri	Düşük	Kısa	Düşük	Yok	Orta	Orta	Orta
Maya	Orta	Orta	Orta	Var (kullanışsız)	Düşük	Orta	Orta
Memeli	Yüksek	Uzun	Çok yüksek	Var	Yüksek	Pahalı	Orta
Böcek	Yüksek	Uzun	yüksek	Var (küçük farklılıklar)	Orta	Pahalı	Orta
Transgenik Memeli	Yüksek	Çok uzun	Çok yüksek	Var	Yüksek	Pahalı	Yüksek
Bitki hücre kültürü	Orta	Orta	yüksek	Var (küçük farklılıklar)	Düşük	Orta	Orta
Transgenik Bitki	Düşük- orta	Uzun	Yüksek	Var (küçük farklılıklar)	Düşük	Düşük	Orta

Genellikle çoğu terapötik protein bioaktiviteleri, farmakokinetikleri, stabilite ve çözünürlükleri için en azından proteolitik kesilme ve glikolizasyona gereksinim duymaktadır.

Çoğu bitki proteini salgı yollarında preprotein olarak sentezlenir. Diğer ökaryotik hücrelerde olduğu gibi bitki hücresinde de proteinler salgı yollarına amino terminal sinyal peptidiyle yönlendirilir. Sinyal peptidleri kesildikten sonra proteinler ER lümenine salınır. Artık protein doğru bir şekilde katlanabilir veya birleşebilir. Çoğu bitki proteinleri ER lümenini proprotein olarak terk eder ve proprotein, proteinin salgı yolağında proteolitik olgunlaşması sırasında kaybolacak polipeptidler içerir. Terapötik proteinlerin çoğunda şeker Asparajinin amid nitrojenine (N-glikolizasyon) veya peptid zincirdeki Treonin veya Serinin hidroksil ucuna (O-glikolizasyon) bağlanır. Karbohidratların polipeptid zincire bağlanması proteinin termal denatürasyona dayanıklılık, proteolitik parçalanmadan korunması ve çözünürlüğü gibi fizikokimyasal özelliklerini kuvvetli bir şekilde etkiler (Gomord vd. 2004). Aynı zamanda proteinin immünojenetik özelliği, spesifik aktivitesi ve ligand-reseptör etkileşimi gibi önemli biyolojik işlevlerini değiştirebilir. Glikoprotein salgı yolağı boyunca taşınırken Asparajine N-bağlı oligosakkarit ER ve golgi cisimciğinde şeker ilavesi veya kesilme süreçlerini içeren bazı protein olgunlaşma reaksiyonlarına maruz kalır. Bitki ve memeli N-glikan olgunlaşmalarındaki temel farklılık; memelilerde golgi cisimciğinde α (1,6)-bağlı fukoz kalıntıları ve terminal sialik asit oluşurken; bitkilerde β (1,2) ksiloz ve α (1,3) fukoz dallanması oluşur. Bitkilerde N-glikolizasyonun dizaynı sırasında farklı stratejiler uygulanabilir. En mantıklı strateji immünojenik glikanların bitkide üretilecek

farmasötiklere ilavesini engellemektir. Bunun için protein ER içerisinde depolanmalı yani immunojenik glikopeptidlerin eklendiği Golgi sisternasına geçişi engellenmelidir. Bu nedenle proteinin karboksi terminaline KDEL dizisi eklenir. Bu sayede proteinin immunojenik aktivitesini düşürecek yüksek mannoz tipi N-glikanların proteine eklenmesi engellenmiş olacaktır. Bir diğer önemli strateji ise Golgi glikoziltransferazların inhibisyonudur. α (1,3) fukoziltransferaz ve β (1,2) ksiloziltransferazların genlerinin susturulması proteinin bitkiye spesifik glikoepitoplar olmadan üretimini sağlıyor (Koprinovova vd. 2003). Bir diğer cazip strateji ise bitkilerde bitki N-glikanlarını memeli glikoziltransferazlarını eksprese edecek şekilde tasarlamaktır. Antikorlar, kan proteinleri ve interferonlar gibi çoğu terapötik glikoproteinlerin biyolojik aktivitesi onların glikolizasyon durumuna bağlıdır ve bu biofarmasötiklerin heterolog ekspresyon sisteminde glikolizasyon yetenekleriyle birlikte üretilmesi durumunu açıklamaktadır (Balen vd. 2007).

Bacillus anthracis'in potansiyel biyolojik silah olarak kullanılmaya başlandığından beri acil durumlarda toplu olarak aşılamanın yapılabilmesi için uzun dönem stabiliteye sahip güvenli, düşük maliyetli, yüksek verimli şarbon aşısına gereksinim duyulmaktadır. Bilim insanları şarbon toksininin önemli bileşeni olan rekombinant koruyucu antijen (rPA) temelli şarbon aşısı üretmek için çeşitli girişimlerde bulunmuştur. Bu bağlamda bitkiler rekombinant protein üretimi için nispeten düşük üretim maliyeti, hızlı ölçeklenebilirliği ve güvenilir olmaları bakımından umut vaat edici platformdur. *Bacillus anthracis*'in koruyucu antijeni doğal ortamında bir glikoprotein değildir; buna rağmen potansiyel N-bağlı glikolizasyon bölgeleri taşıyor ve bu sayede bitkiler dahil herhangi bir ekspresyon sisteminde aşırı miktarda glikozillenerek, proteinin yanlış katlanmasına yol açtığından epitoplarının maskelenmesine neden olmaktadır. Bir önceki çalışmada *in vivo* deglikolizasyon yapabilmek için mutasyona uğratılmış rekombinant olarak üretilmiş PA83'ün sahip olduğu gelişmiş immünojenite nedeniyle şarbon hastalığına karşı güvenli, etkili ve düşük üretim maliyetli altünite aşısı olarak kullanılabilmesi gösterilmiştir (Mamedov vd. 2016). Ayrıca heterolog ekspresyon sistemindeki gelişmeler, şarbon hastalığına karşı altünite rPA-temelli aşı adayları dahil rekombinant proteinlerin üretimi için alternatif sistem olarak bitkilerin kullanılmasını tetiklemiştir (Mamedov vd. 2016).

2.5. Transient Ekspresyon Sistemi

Bitkilerde hedef proteinlerin transient ekspresyonu ya ekspresyon vektörünün plazmit DNA'sı veya *in vitro* sentezlenmiş RNA transkripti olarak direkt yöntemle ya da *Agrobacterium tumefaciens* aracılı ekspresyon kasedi ile dolaylı olarak bitki dokusuna girmesi temeline dayanmaktadır (Musiychuk vd. 2007). Transient gen ekspresyonunda, bitki RNA virüsleri yabancı protein ekspresyonu için vektör olarak kullanılır (Pogue vd. 2002; Canizares vd. 2005; Grill vd. 2006; Yusibov vd. 2006; Roy vd. 2010).

Enfekte cDNA klonlarının uygunluğu, genetik manipülasyonun kolaylığı, hedef proteininin kısa sürede ekspresyonu gibi özellikler bu stratejiyi oldukça cazip kılmaktadır. İlaveten, konak bitkiyi genetik olarak değiştirmeye de gerek yoktur. Hedef gen viral genoma yerleştiğinde, transgen konak bitkinin enfeksiyonu sayesinde çoğalır ve rekombinant protein transient olarak eksprese olur. Hem viral vektörün çoğalması hem de hedef genin ekspresyonu hücre sitoplazmasıyla sınırlıdır. Şimdiye kadar,

Tobacco mosaic virus (TMV), *Potato virus X*, *Alfalfa mosaic virus* (AIMV) ve *Cowpea mosaic virus* dahil bazı bitki RNA virüsleri ekspresyon vektörü geliştirmek için kullanılmıştır (Pogue vd. 2002; Yusibov ve Rabindran, 2004; Roy vd. 2010). Yabancı gen dizilerinin bitki virüsleri kullanılarak eksprese edilmesinde yaygın olarak kullanılan yaklaşımlar; i) hedef diziyle önemsiz olan viral genlerin değiştirilmesi (Agrobacterium vasıtasıyla protein ekspresyonu da aynı prensibe dayanır) ii) hedef dizinin viral genomu ilave bir gen olarak yerleştirilmesi ve ikinci bir promotör tarafından ekspresyonunun sağlanması.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Mutant Genlerin Tasarlanması ve Kodon Optimizasyonu

Bitkide üretilen koruyucu antijenin (pp-PA83) iki mutant versiyonu (MQ1 ve MQ2) tasarlandı ve kodon optimizasyonu yapıldı. pp-PA83'ün 9 tane olası N- Bağlı glikolizasyon bölgesi vardır ve bu bölgelerde asparajin-X-serin/treonin motifinde asparajin glikozillenmektedir. Yapılan bir çalışmada glikolizasyon profillemeye analizine göre 9 tane olası glikolizasyon bölgesinden 6 tanesinin (Asn-275, 357, 417, 505, 599, 693) glikozillendiği belirlenmiştir (Chichester vd. 2013). Yaptığımız çalışmada, şarbona karşı aşı geliştirme konusunda bilinen PA83 proteinini deglikozillenmiş formda üretebilmek için yukarıda bahsi geçen çalışmada glikolizasyon profillemeye bilgisi baz alınarak belirlenen amino asit değişimiyle mutasyon yapılması hedeflendi. MQ1 geni, N275Q, N357Q, N417Q, N505Q, N599Q ve N693Q şeklinde 6 tane amino asit değişiklikleriyle mutasyon yapılarak tasarlanmıştır (Mamedov vd. 2015). Bu çalışmada yeni tasarlanmış olan MQ2 geni, N39Q, N275Q, N357Q, N417Q, N505Q, N599Q ve N693Q şeklinde 7 tane amino asit değişiklikleriyle mutasyon yapılarak tasarlandı. İlaveten *N. benthamiana* bitkisinde proteini doğru şekilde üretebilmek için MQ1 ve MQ2'ya ait optimize edilen gen bölgeleri N- terminal tütün patogeneziyle ilişkili protein 1a sinyal dizisi (PR-1a: MGFVLFSQLPSFLLVSTLLLFLVISHSCRA, protein sekresyonu süresince kesilip çıkarılmaktadır), C- terminal çoklu histidin affinite protein saflaştırma etiketi (His₆) ve yine C-terminal endoplazmik retikulum tutunma sinyali olan KDEL dizisi içerecek şekilde tasarlandı. Bu çalışmada kullanılan genler Integrated DNA Technologies (IDT Ames, Iowa, ABD) şirketine sentezletildi.

MQ1 ve MQ2 genleri arasındaki tasarım farkı Şekil 3.1'de belirtilen amino asit sekans bilgisinde gösterilmiştir.

			↓			
MQ1	1	MGFVLFSQLPSFLLVSTLLLFLVISHSCRAEVKQENRLL		ME	SESSSQGLLGYYSFLNLFQ	60
		MGFVLFSQLPSFLLVSTLLLFLVISHSCRAEVKQENRLL		E	SESSSQGLLGYYSFLNLFQ	
MQ2	1	MGFVLFSQLPSFLLVSTLLLFLVISHSCRAEVKQENRLL		Q	SESSSQGLLGYYSFLNLFQ	60
		MGFVLFSQLPSFLLVSTLLLFLVISHSCRAEVKQENRLL		E	SESSSQGLLGYYSFLNLFQ	
MQ1	61	AMVWVTSSTTGDLSIPSELENIPSENYQFSALWSGFIKVKKSDVTFATSAIDNHVTMW				120
		AMVWVTSSTTGDLSIPSELENIPSENYQFSALWSGFIKVKKSDVTFATSAIDNHVTMW				
MQ2	61	AMVWVTSSTTGDLSIPSELENIPSENYQFSALWSGFIKVKKSDVTFATSAIDNHVTMW				120
		AMVWVTSSTTGDLSIPSELENIPSENYQFSALWSGFIKVKKSDVTFATSAIDNHVTMW				
MQ1	121	VDDQEVINKASNSKIRLEKGRLYQKIQVQRENPTKGLDFKLYWTDQNKKEVSSIDN				180
		VDDQEVINKASNSKIRLEKGRLYQKIQVQRENPTKGLDFKLYWTDQNKKEVSSIDN				
MQ2	121	VDDQEVINKASNSKIRLEKGRLYQKIQVQRENPTKGLDFKLYWTDQNKKEVSSIDN				180
		VDDQEVINKASNSKIRLEKGRLYQKIQVQRENPTKGLDFKLYWTDQNKKEVSSIDN				
MQ1	181	LQLELQKQSSNSRKRRTSAGPTVDRDNDGIPDSLEVEGYTVDVVKHRTFLSPWISNI				240
		LQLELQKQSSNSRKRRTSAGPTVDRDNDGIPDSLEVEGYTVDVVKHRTFLSPWISNI				
MQ2	181	LQLELQKQSSNSRKRRTSAGPTVDRDNDGIPDSLEVEGYTVDVVKHRTFLSPWISNI				240
		LQLELQKQSSNSRKRRTSAGPTVDRDNDGIPDSLEVEGYTVDVVKHRTFLSPWISNI				
MQ1	241	HEKKGTLKTKSSSEKWSASDPYSDFEKVITGRIDKQVSPEARHFLVAAYIVHVDMENII				300
		HEKKGTLKTKSSSEKWSASDPYSDFEKVITGRIDKQVSPEARHFLVAAYIVHVDMENII				
MQ2	241	HEKKGTLKTKSSSEKWSASDPYSDFEKVITGRIDKQVSPEARHFLVAAYIVHVDMENII				300
		HEKKGTLKTKSSSEKWSASDPYSDFEKVITGRIDKQVSPEARHFLVAAYIVHVDMENII				
MQ1	301	LSKNEQSTQNTDSETRTISKNTSRSRHTSEVHGNALVHASFDIGGSVSAAGFSNSQSS				360
		LSKNEQSTQNTDSETRTISKNTSRSRHTSEVHGNALVHASFDIGGSVSAAGFSNSQSS				
MQ2	301	LSKNEQSTQNTDSETRTISKNTSRSRHTSEVHGNALVHASFDIGGSVSAAGFSNSQSS				360
		LSKNEQSTQNTDSETRTISKNTSRSRHTSEVHGNALVHASFDIGGSVSAAGFSNSQSS				
MQ1	361	TVAIDHSLSLAGERTWAETMGLNTADTARLNANIIRYVNTGTAPIFYNVLPFTLSLVLGWQQT				420
		TVAIDHSLSLAGERTWAETMGLNTADTARLNANIIRYVNTGTAPIFYNVLPFTLSLVLGWQQT				
MQ2	361	TVAIDHSLSLAGERTWAETMGLNTADTARLNANIIRYVNTGTAPIFYNVLPFTLSLVLGWQQT				420
		TVAIDHSLSLAGERTWAETMGLNTADTARLNANIIRYVNTGTAPIFYNVLPFTLSLVLGWQQT				
MQ1	421	LATIKAKENQLSQILAPNNYYPKONLAPIALNAQDDFSSSTPITMNYQFLELEKTKQLRL				480
		LATIKAKENQLSQILAPNNYYPKONLAPIALNAQDDFSSSTPITMNYQFLELEKTKQLRL				
MQ2	421	LATIKAKENQLSQILAPNNYYPKONLAPIALNAQDDFSSSTPITMNYQFLELEKTKQLRL				480
		LATIKAKENQLSQILAPNNYYPKONLAPIALNAQDDFSSSTPITMNYQFLELEKTKQLRL				
MQ1	481	DTDQVYGNIAITYNFENGRVVDVTSQVSEVLQIQETTARIIFNGKDLNLVERRIAAVNP				540
		DTDQVYGNIAITYNFENGRVVDVTSQVSEVLQIQETTARIIFNGKDLNLVERRIAAVNP				
MQ2	481	DTDQVYGNIAITYNFENGRVVDVTSQVSEVLQIQETTARIIFNGKDLNLVERRIAAVNP				540
		DTDQVYGNIAITYNFENGRVVDVTSQVSEVLQIQETTARIIFNGKDLNLVERRIAAVNP				
MQ1	541	SDPLETTKFDMTLKEALKIAPGFNFPNGNLQYQGGKITEFDNFDDQQTQSNIKKQLAELQ				600
		SDPLETTKFDMTLKEALKIAPGFNFPNGNLQYQGGKITEFDNFDDQQTQSNIKKQLAELQ				
MQ2	541	SDPLETTKFDMTLKEALKIAPGFNFPNGNLQYQGGKITEFDNFDDQQTQSNIKKQLAELQ				600
		SDPLETTKFDMTLKEALKIAPGFNFPNGNLQYQGGKITEFDNFDDQQTQSNIKKQLAELQ				
MQ1	601	ATNIFYVLDKIKLNAKMNILIRDKRFHYDRNNIAVGADESUVKEAAREVINSSTEGLLLN				660
		ATNIFYVLDKIKLNAKMNILIRDKRFHYDRNNIAVGADESUVKEAAREVINSSTEGLLLN				
MQ2	601	ATNIFYVLDKIKLNAKMNILIRDKRFHYDRNNIAVGADESUVKEAAREVINSSTEGLLLN				660
		ATNIFYVLDKIKLNAKMNILIRDKRFHYDRNNIAVGADESUVKEAAREVINSSTEGLLLN				
MQ1	661	IKDKIRKILSGYIVEIEDTEGLKEVINDRYDMLQISSLRQDGKTFIDFKKYNDRKLFYIS				720
		IKDKIRKILSGYIVEIEDTEGLKEVINDRYDMLQISSLRQDGKTFIDFKKYNDRKLFYIS				
MQ2	661	IKDKIRKILSGYIVEIEDTEGLKEVINDRYDMLQISSLRQDGKTFIDFKKYNDRKLFYIS				720
		IKDKIRKILSGYIVEIEDTEGLKEVINDRYDMLQISSLRQDGKTFIDFKKYNDRKLFYIS				
MQ1	721	NENKQVNVAVTKENTLINDPSENGDSTNGIKKILLIIFSKKGYEIGKLRHHHHHDKDEL				777
		NENKQVNVAVTKENTLINDPSENGDSTNGIKKILLIIFSKKGYEIGKLRHHHHHDKDEL				
MQ2	721	NENKQVNVAVTKENTLINDPSENGDSTNGIKKILLIIFSKKGYEIGKLRHHHHHDKDEL				777
		NENKQVNVAVTKENTLINDPSENGDSTNGIKKILLIIFSKKGYEIGKLRHHHHHDKDEL				

Şekil 3.1. MQ1 ve MQ2 genleri arasındaki amino asit sekans farkı.

3.2. Genlerin Klonlanması

PA83 geninde bir önceki başlıkta anlatıldığı üzere belirli amino asit bölgeleri değiştirilerek mutasyon yapılmıştır. Mutant olarak tasarlanan MQ1 ve MQ2 genlerinin başlangıç ve bitiş noktalarına PacI ve XhoI enzimlerinin tanıyıp kesim yapabilmesi için bu enzimlere uygun kesim bölgelerini içeren plazmitler MQ1 ve MQ2 genleri için ayrı ayrı tasarlandı. Tasarlanan bu plazmitler uygun vektör içerisine yerleştirilmiş olarak satın alındı. Plazmit içerisinde korunan MQ1 ve MQ2 genlerini içeren bölgeler, PacI ve XhoI enzimleri ile kesilip çıkarıldı. Kalıp DNA fragmentleri, 1xTAE tampon çözeltisi içerisinde %1'lik agaroz jelde yürütülüp genler ve plazmitin büyüklük farkına dayanarak jelde ayırılma gözlemlendi.

MQ1 ve MQ2 genlerini satın alınan vektörden uzaklaştırmak için, 40µL örnek üzerine 8 µL yükleme boyası (Thermo Scientific 6x, Katalog No: R0611) eklendi. GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific) ile birlikte jele yüklenerek 110V 60 dk yürütülerek 2331 bp boyutundaki bant bistiği yardımıyla jelden kesilerek, üretici firmanın (Zymoclean Gel DNA Recovery Kit, Katalog No: D4007) önermiş olduğu protokol kullanılarak jelden geri kazanım gerçekleştirildi. Geri kazanım sonrası 1µL örneğin üzerine 9µL DNAaz/RNAaz/Poteaz içermeyen su ve 2µL yükleme boyası (Thermo Scientific 6x, Katalog No: R0611) eklenerek GeneRuler 1kb DNA Ladder ile birlikte jele yükleme yapılır. Genin boyutuna bakarak doğruluğu belirlendikten sonra modifiye edilmiş pGREEN vektörü, MQ1 ve MQ2 genleriyle ligasyona uğratıldı.

Ligasyon reaksiyonu; 0,5 µl modifiye edilmiş pGREEN vektörü, 1 µl MQ1 geni, 10 µl 2x Ligasyon Tamponu, 8,5 µl DNAaz/RNAaz içermeyen su ve 1 µl Quick Ligase (NEB, ABD); 0,5 µl modifiye edilmiş pGREEN vektörü, 1 µl MQ2 geni, 10 µl 2x Ligasyon Tamponu, 8,5 µl DNAaz/RNAaz içermeyen su ve 1 µl Quick Ligase (NEB, ABD) 20 dk oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Hemen sonra ligasyon ürünü plazmid, ısı şoku metodu kullanılarak, *E.coli* XL₁Blue kompetan hücrelerine transforme edildi. Bu metoda göre, ligasyon ürünü (21µl) *E.coli* XL₁Blue kompetan hücrelerinin (100µl) üzerine eklendi ve buzda 5 dk inkübe edildi. Sonrasında karışım 42°C'de su banyosunda 50 sn bekletildi ve hemen buza aktarılarak 5 dk buzda bekletildi. Örnekler üzerine, 400 µl LB besiyeri eklendi ve 37°C'de 225 rpm'de 1 saat inkübe edildi. Sonuçta elde edilen kültürden 2000xg'de 3 dk santrifüj işlemi yapılarak hücrelerin çökmesi sağlandı. Daha sonra süpernatanttan 100 µl alınıp çökmüş durumda olan hücrelerin üzerine eklenip çökmüş durumda olan hücrelerin tekrar pipetaj yapılarak çözdürülmesi suretiyle konsantr olarak 50µg/ml kanamisin içeren LB plakaya önceden steril edilmiş cam öze yardımıyla yayma işlemi yapıldı ve 37°C'de bir gece inkübatörde bırakıldı. Yaklaşık 24 saat sonra platerlerde koloniler gözlemlendi. Ardından uygun koloniler seçildi ve 50 µg/ml kanamisin içeren 5 ml sıvı LB besiyerine ekilerek 37°C'de 225 rpm'de bir gece inkübe edildi. *E.coli* XL₁Blue hücreleri içerisinde bulunan plazmidler, Zypzy Plasmid Miniprep Kitiyle (Zymo Research, ABD), üreticinin tavsiyelerine uygun olarak izole edildi.

3.3. *A.tumefaciens*'e Transformasyon ve *N. Benthamiana* Bitkisine İnfiltrasyonu

E.coli XL₁Blue hücresinde çoğaltılan pGREEN vektörü içerisine aktarılmış MQ1 ve MQ2 genleri klonlama kısmında anlatılan deneyler yapılarak doğru koloniler belirlendikten sonra *E.coli* XL₁Blue hücrelerinden izole edilen plazmidler (1 µl),

rekombinant MQ1 ve MQ2 proteinlerini eksprese etmek için, *A.tumefaciens* AGL₁psoup suşu kompetan hücrelerine (100µl) elektroporasyon yoluyla elektrik şokuna uğratarak aktarıldı. Daha sonra bu bakteriler 50 µg/ml kanamisin içeren LB plakaya steril öze yardımıyla yayma yapıldı ve 28°C’de inkübasyona bırakıldı. 2-3 gün sonra koloniler gözlemlendi. Uygun koloniler seçilip kanamisin içeren sıvı BBL besi ortamına aktarıldı ve 28°C’de 225 rpm’de çalkalamaya bırakıldı. Yaklaşık 24 saat sonra çoğalmış olan bakterilerin O.D. (Optik Dansite)’si ölçüldü (O.D. değerinin ≥ 1 olması gerekmektedir). Bakteri solüsyonunun bir kısmı ayrılarak %90’lık gliserol ile stok hazırlanıp -80°C’de saklanmıştır.

O.D. değerleri ölçülüp kaydedildikten sonra bakteriler 5000xg’de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant boşaltılıp dibe çökmüş olan bakterilerin üzerine içerisine 100 mM asetosyringene ilave edilmiş (100 ml içerisine 15 µl) MMA besi yeri konuldu. Daha sonra bakteriler manyetik karıştırıcıda 2 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı.

Bu işlemten sonra bakteriler artık bitkiye infiltrasyon için hazır hale gelmiştir. İnfiltrasyon için tohumların ekiminden itibaren 6-7 haftalık belirli büyüklüğe ulaşmış bitkiler kullanıldı. Bakteri solüsyonu şırınga kullanılarak bitki yapraklarının içerisine enjekte edilmiştir. pGREEN-MQ1 ve pGREEN-MQ2 bitkiye infiltre edilirken bitki bağışıklık sistemini baskılayıp protein üretimini artırmak amacıyla bitki immün sistem represör proteinini kodlayan gen ile birlikte ekspresyonu sağlanmıştır. Bu represör geni de diğer genlerle aynı işlemlerden geçerek infiltrasyona hazır hale getirildi ve 9:1 oranında pGREEN-MQ1 ve pGREEN-MQ2 ile ayrı ayrı karıştırılarak infiltrasyon işlemi tamamlandı.

3.4. SDS-PAGE ve Western Blot Analizleri

SDS-PAGE %10 akrilamid jellerde uygulandı ve sonrasında jeller koomassie parlak mavi boya ile boyandı. İmmunoblot analizi için, %10 akrilamid jelde yürütme tamponu kullanılarak 100V, 13 dk/200V, 45 dk örneklerin yürütülmesinden sonra, jel transfer tamponu kullanılarak 100 V’da 1 saat polivinilidin florid membranlara (Millipore, Billerica, MA) blotlandı. Membranlar ilk olarak 5 dk 0.5% I-Block (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) çözeltisi içerisinde çalkalanmaya bırakılarak buffer solüsyonlarının uzaklaştırılması sağlandıktan sonra 0.5% I-Block reaktifli 1xTBS’le (Tris Tamponlanmış Salin) oda sıcaklığında 1 saat bloklandı ve I-Block reaktifli 1xTBS’e eklenmiş anti-6xHis monoklonal antikorla (Cat. no. 652502, BioLegend) oda sıcaklığında 1 saatte işaretlendi. Bağlanmamış birincil antikorları uzaklaştırmak amacıyla 5 dk’lık 3 defa I-Block çözeltisi ile yıkamadan sonra, membranlar, ikincil antikor olarak goat anti-mouse IgG H&L (HRP)’le (Cat. No. ab98790, Abcam, ABD) 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi, devamında 5 dk’lık 3 defa 0.5% I-Block çözeltisi (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) ve 5 dk’lık 1 defa 1xTBS’le yıkama yapıldı ve son olarak, kemiluminesans tespit, ECL western-blotting reaktifleri olan SuperSignal West Pico Stable Peroxide (2,5 ml) ve Luminol/ Enhancer (2,5 ml) solüsyonları (SuperSignal West Pico, Thermo Fisher Scientific Grand Island, NY) uygulandı. Fotoğraflar GeneGnome XRQ Chemiluminescence görüntüleme sistemi (Syngene Corp, ABD) kullanılarak çekildi. GeneTools Software yardımıyla protein miktarları matematiksel olarak hesaplandı.

3.5. Rekombinant HisTaq (His₆) Etiketli MQ1 ve MQ2 Proteinlerinin Saflaştırılması

Protein saflaştırma yöntemi olarak nikel yüklenmiş, immobilize metal afinite kromatografisi (IMAC) yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem uygulanırken, HisPur™ Ni-NTA resin (Cat. No. 88221, Thermo Fisher Scientific) ve HisTrap FF 5 mL (GE Healthcare, UK) olmak üzere iki farklı kolon kullanılmıştır.

HisPur Ni-NTA kolon ile PGREEN-MQ1 ve PGREEN-MQ2 için protein saflaştırma aşamaları kısaca şöyledir: 5dpi'da (dpi-infiltrasyon sonrası geçen gün sayısı) 30 gram yaprak ağırlığının 3 katı kadar 1mM DIECA (Sodyum Dietilditiyokarbamat) içeren 20 mM fosfat temelli tamponda homojenize ve ekstrakte edildi, ekstre 12000xg, 30 dakika, +4°C'de santrifüj yapılarak temizlendi. Süpernatant daha önceden dengeleyici tamponla (20 mM sodyum fosfat, 0,3 M NaCl, 10 mM imidazol, pH 7,4) yıkanmış HisTaq kolondan geçirilmiştir. Daha sonra kolon hacminin 10 katı (10CV) kadar yıkama tamponu (20 mM sodyum fosfat, 0,3 M NaCl, 25 mM imidazol, pH 7,4) geçirildi. Kolon içerisine bağlanmış olan HisTaq etiketli proteinleri kolondan ayırıp hedef proteini elde etmek için kolon hacminin 10 katı (10CV) kadar elüsyon tamponu (20 mM sodyum fosfat, 0,3 M NaCl, 250 mM imidazol, pH 7.4) ile yıkandı. Elüsyon sonrası pürifiye edilmiş proteinleri içeren fraksiyonlar tüplere toplandı ve fraksiyonlardaki total protein miktarı Bradford yöntemiyle tespit edildi. Hemen sonrasında proteinlerin moleküler ağırlığına uygun olarak seçilmiş Millipore 10K concentrator yardımıyla konsantre hale getirilerek -80°C'de saklandı.

HisTrap FF kolon ile yapılan saflaştırmada kısaca şöyledir: 50 gram donmuş infiltre edilmiş bitki yaprakları 3 katı kadar 1mM DIECA (Sodyum Dietilditiyokarbamat) içeren 50 mM fosfat temelli tamponda homojenize ve ekstrakte edildi. Ekstre 20000xg, 25 dakika, +4 °C'de santrifügasyon yöntemiyle temizlendi. Süpernatant 0.45 µm'lik filtreden (Millipore) geçirildi. Filtreden geçirilmiş süpernatant daha önceden dengeleyici tamponla (50 mM sodyum fosfat, 0,5 M NaCl, 20 mM imidazol, pH 7.4) yıkanmış HisTrap FF 5 mL kolondan (GE, Cat. No. 17-5255-01) 5.0 mL/dk akış hızına ayarlanmış peristaltik pump yardımıyla geçirildi. Kolon hacminin 10 katı (10CV) kadar dengeleyici tamponla yıkandı. Daha sonra bağlanmış proteinler kolon hacminin 10 katı (10CV) kadar elüsyon tamponu (50 mM sodyum fosfat, 0,5 M NaCl, 150 mM imidazol, pH 7.5) ile yıkandı. Elüsyon sonrası pürifiye edilmiş proteinleri içeren fraksiyonlar tüplere toplandı ve fraksiyonlardaki total protein miktarı Bradford yöntemiyle tespit edildi. Hemen sonrasında proteinlerin moleküler ağırlığına uygun olarak seçilmiş Millipore 10K concentrator yardımıyla konsantre hale getirilerek -80°C'de saklandı.

3.6. Saflaştırılmış MQ1 ve MQ2 Proteinlerinin Glikan Saptama Analizleri

Saflaştırılmış MQ1 ve MQ2 protein örneklerinde glikanların saptama analizi Pro-Q Emerald 300 glikoprotein boyama kiti kullanılarak yapılmıştır. Öncelikle protein örnekleri 10% SDS-PAGE'de yürütüldükten sonra jel Pro-Q Emerald 300 glikoprotein boyama kiti ile üretici tarafından belirtilen protokole uygun olarak boyama yapılmıştır.

3.7. Saflaştırılmış MQ1 ve MQ2 proteinlerinin Stabilite Analizleri

Saflaştırılmış MQ1 ve MQ2 proteinleri ilk olarak 37°C’de 1 saat ve 4°C’de 72 saat olacak şekilde stabilite analizi yapıldı. Daha sonra 37°C’de 1, 4, 8, 16, 24 ve 32 saat bekletildi ve daha sonra örnekler uygun miktarda SDS yükleme boyası eklendikten sonra SDS PAGE ve Western blot analizi yapılması amacıyla -20°C’ye bırakıldı. Western blot analizi yapıldığında örnekler 5dk 100°C’ye ayarlanmış su banyosunda kaynatıldıktan sonra 1000xg’de 5-10 sn kısa bir santrifüjden sonra poliakrilamid jele yükleme yapıldı ve yürütüldü, ardından görüntü alınıp GeneTools yazılımı kullanılarak gerekli değerlendirme ve hesaplamalar yapılmıştır.

3.8. DeneYlerde Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

- **%1’lik agaroz jel:** 0,6 gr agaroz tartılıp behere konuldu ve üzerine 60 ml 1x TAE buffer eklendi. Agaroz tamamen çözünene kadar yaklaşık olarak 1-2 dk mikrodalga fırında bekletildi. Çözeltinin sıcaklığı düştükten sonra 1,2 µL Etidyum Bromid (EtBr) eklendi. Karışım önceden hazır hale getirilmiş yatay elektroforez tankına kabarcık kalmadan döküldü ve uygun tarak yerleştirildi. Jelin katılaşması beklendi.
- **50xTAE tampon çözeltisi hazırlanması:** 242 gr Tris otoklavlanmış 700 ml ddH₂O içerisinde çözüldü. Karışıma 100 ml 0,5 M EDTA (pH : 8) ve 57,1 ml Glasiyal asetik asit eklenerek çözdürüldü. pH 8,5-8,6 olacak şekilde ayarlandıktan sonra son hacim otoklavlanmış ddH₂O ile 1000 ml’e tamamlandı.
- **1xTAE tampon çözeltisinin hazırlanması:** 20 ml 50xTAE tampon çözeltisinden alınarak son hacim otoklavlanmış ddH₂O ile 1000 ml’e tamamlandı.
- **1 M CaCl₂:** 1.47gr CaCl₂ tartıldı ve 10 mL otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözüldü.
- **0.1 M CaCl₂:** 1ml 1M CaCl₂ çözeltisinden alındı ve 9 ml bidistile suda çözüldü. 0.1M 10 ml CaCl₂ hazırlandı.
- **0.1M CaCl₂ /%15 gliserol:** 1 mL 1M CaCl₂ çözeltisinden alındı ve 3mL %50 gliserol, 6 mL otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözüldü.
- **LB-Broth:** 25 gr LB-Broth 1000 ml saf su içerisinde çözüldü. 121°C’de 30dk otoklavlandı.
- **%70’lik alkol:** 70 ml etil alkol son hacim 100 ml olacak şekilde bidistile su ile karıştırıldı.
- **I-block:** 0,5 gr I-block son hacim 100 ml olacak şekilde 1xTBS içerisinde manyetik karıştırıcı üzerinde 3-5 saat tamamen çözününceye kadar karıştırıldı.

- **%10'luk SDS:** 10 gr Sodyum dodesil sülfat (SDS) ve üzerine 90 ml otoklavlanmış ddH₂O eklenerek tamamen çözünmesi için bırakıldı.
- **1xRunning Tamponu:** 3,03 gr Tris, 14,3 gr glisin, 10 ml %10 SDS alınarak son hacim 1000 ml olacak şekilde otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözüldü.
- **1xTransfer Tamponu:** 5,8 gr Tris, 2,93 gr glisin, 370 µL alınarak son hacim 1000 ml olacak şekilde otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözüldü.
- **5xTBS hazırlanması:** (20 mM Tris (pH:5,5), 150 mM NaCl) 12,115 gr Tris, 43,88 gr NaCl 800 ml olacak şekilde otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözüldü. pH 7,5 olacak şekilde HCl ile ayarlama yapıldı ve son hacim otoklavlanmış ddH₂O ile 1000 ml'e tamamlandı.
- **1xTBS hazırlanması:** 200 ml 5xTBS alındı ve son hacim otoklavlanmış ddH₂O ile 1000 ml'e tamamlandı.
- **%10'luk APS:** 60 mg APS tartıldı ve son hacim 600 µl olacak şekilde otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözüldü.
- **1,5 M Tris-HCl (pH: 8,8):** 92,5 gr Tris tartıldı ve 400 ml otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözüldü. pH 6N HCl ile 8,8'e ayarlandıktan sonra son hacim otoklavlanmış ddH₂O ile 500 ml'e tamamlandı.
- **0,5 M Tris-HCl (pH: 6,8):** 30 gr Tris tartıldı ve 400 ml otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözüldü. pH 6N HCl ile 6,8'e ayarlandıktan sonra son hacim otoklavlanmış ddH₂O ile 500 ml'e tamamlandı.
- **%10'luk Resolving jel (dört jel için):** 9,7 ml otoklavlanmış ddH₂O, 5 ml %40 Akrilamit-Bis solüsyonu, 5 ml 1,5 M Tris-HCl, 200 µL %10 SDS, 10 µL TEMED ve 100 µL %10'luk APS eklenerek hazırlandı.
- **%10'luk Stacking jel (dört jel için):** 7,95 ml otoklavlanmış ddH₂O, 1,25 ml %40 Akrilamit-Bis solüsyonu, 3,15 ml 1,5 M Tris-HCl, 125µL %10 SDS, 12,5µL TEMED ve 62,5 µL %10'luk APS eklenerek hazırlandı.
- **Birincil Antikor (Western Blot 1:500):** 10 µL antikor alındı ve 10 ml I-block içerisinde çözüldü.
- **İkincil Antikor (Western Blot 1:2500):** 4 µL antikor alındı ve 10 ml I-block içerisinde çözüldü.
- **0,5M EDTA hazırlanması:** 14,612 gr EDTA tartıldı ve 80 ml otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözüldü. pH 8'e ayarlandıktan sonra son hacim otoklavlanmış ddH₂O ile 100 ml'e tamamlandı.

- **1M Tris çözeltisinin hazırlanması:** 12.114 gr Tris tartıldı ve 100 mL otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözdürüldü.
- **%0.01 Bromofenol mavi çözeltisinin hazırlanması:** 100 mg Bromofenol tartıldı ve 20 mL otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözdürüldü.
- **SDS/Western Jel Yükleme Solüsyonu (5x)-Laemli Buffer'ın hazırlanması:** 50 mL falkon içerisine 7.5 mL %25'lik 2-merkaptolanol kondu. Üzerine 100 mg/20 mL Bromofenol mavi stok çözeltisinden 660 µL ilave edilip karıştırıldı. Karışıma 11.9 mL Gliserol, 1M Tris çözeltisinden 9.375 mL ve 3.333 mL SDS ilave edilerek pH=6.8'e HCl ile ayarlandı. Daha sonra karışım 1mL olacak şekilde tüplere aliquout edilir. Tüpler kullanılmak üzere -20°C'de saklandı. Protein örnekleri jele yüklenmeden önce hacminin 1/4'i kadar (5x) Laemli Buffer eklenip kaynatılır.
- **SDS jel boyama çözeltisinin (Coomassie staining) hazırlanması:** 100 ml Asetik asit, 500 ml metanol ve 1 gr Coomassie Blue R250 son hacim 1000 mL olacak şekilde otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözüldü.
- **SDS jel boya uzaklaştırma çözeltisinin (destaining) hazırlanması:** 200 ml metanol ve 100 ml Asetik asit son hacim 1000 mL olacak şekilde otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözüldü.
- **SYS mediumun hazırlanması:** 10 gr soyhidroлизat, 5 gr yeast extract ve 5 gr NaCl 800 ml otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözüldü. pH 1M KOH veya NAOH ile 7,0'a ayarlandıktan sonra son hacim otoklavlanmış ddH₂O ile 1000 mL'e tamamlandı. 121°C'de 30dk otoklavlandı.
- **SOC mediumun hazırlanması:** 20 gr bactotripton, 5 gr bacto yeast extract, 2 ml 5M NaCl, 2,5ml 1M KCl, 10 ml 1M MgCl₂, 10 ml 1M MgSO₄ 800 ml otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözüldükten sonra son hacim 1000 ml'e tamamlanarak 121°C'de 30dk otoklavlandı. Çözelti otoklavdan çıkarıldıktan sonra sıcaklığın 50°C'ye kadar düşmesi beklendi. Daha sonra steril kabin altında 20 ml 1M glukoz eklendi ve +4°C'ye bırakıldı.
- **MMA mediumun hazırlanması:** 1,952 gr MES ve 10 ml 1M MgCl₂ 800 ml otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözüldü. pH 1M KOH veya NAOH ile 5,8'e ayarlandıktan sonra son hacim otoklavlanmış ddH₂O ile 1000 mL'e tamamlandı. 121°C'de 30dk otoklavlandı.
- **Asetosyringene (AS) 100mM stok çözeltisinin hazırlanması:** 0,3924 gr Asetosyringene tartıldı ve 12 ml %95'lik etanolda çözdürülerek üzerine 8 ml bidistile su eklenerek son hacim 20 ml'e tamamlandı. 1L MMA için 150µl Asetosyringene gereklidir.
- **1X PBS tablet çözeltisinin hazırlanması:** 1 tablet PBS (137 mM NaCl, 2 mM KCl ve 10 mM fosfat buffer içeriyor) 100 ml otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözüldü.

- **250 mM NaH₂PO₄:** 6,8995 gr NaH₂PO₄·xH₂O tartıldı ve 250 ml otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözüldü.
- **250 mM Na₂HPO₄:** 8,8725 gr Na₂HPO₄ tartıldı ve 250 ml otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözüldü.
- **Sodyum fosfat tamponu (protein pürifikasyonu için, 20mM):** 15,48 ml 1M Na₂HPO₄ ve 4,52 ml 1M NaH₂PO₄ 800 ml otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözüldü ve üzerine 17,53 gr NaCl ilave edilip tamamen çözdürülünceye kadar karıştırıldı. pH 7,4'e ayarlandıktan sonra son hacim otoklavlanmış ddH₂O ile 1000 ml'e tamamlandı.
- **10 mM Binding Buffer:** 5 ml 100 mM imidazol stok çözeltisinden alındı ve üzerine 45 ml 50 mM Sodyum Fosfat (PBS) ilave edilip karıştırıldı.
- **25 mM Wash Buffer:** 12,5 ml 100 mM imidazol stok çözeltisinden alındı ve üzerine 37,5 ml 50 mM Sodyum Fosfat (PBS) ilave edilip karıştırıldı.
- **250 mM Elution Buffer:** 0,851 gr imidazol tartıldı ve üzerine 50 ml 50 mM Sodyum Fosfat (PBS) içerisinde çözüldü.
- **500 mM NaCl:** 29,22 gr NaCl tartıldı ve ve 1000 ml otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözüldü.
- **50 mM Sodyum Fosfat (PBS) Pürifikasyon Çözeltisinin Hazırlanması:** 500 ml otoklavlanmış ddH₂O içerisinde 29,22 gr NaCl çözdürüldü. Karışım içerisinde 162 ml 250 mM Na₂HPO₄ solüsyonu eklendi ve karıştırıldı. pH 7,5 olacak şekilde 250 mM NaH₂PO₄ kullanılarak ayarlandı ve son hacim 1L'e tamamlandı. Solüsyon 0,45 µm'lik filtreden geçirelerek steril edildi.
- **100 mM imidazol stok çözeltisinin hazırlanması:** 0,3404 gr imidazol tartıldı ve 50 ml 50 mM Sodyum Fosfat (PBS) içerisinde çözüldü.
- **20 mM Binding Buffer:** 10 ml 100 mM imidazol stok çözeltisinden alındı ve üzerine 40 ml 50 mM Sodyum Fosfat (PBS) ilave edilip karıştırıldı.
- **20 mM Wash Buffer:** 10 ml 100 mM imidazol stok çözeltisinden alındı ve üzerine 40 ml 50 mM Sodyum Fosfat (PBS) ilave edilip karıştırıldı.
- **300 mM Elution Buffer:** 1,0212 gr imidazol tartıldı ve üzerine 50 ml 50 mM Sodyum Fosfat (PBS) içerisinde çözüldü.

3.9. Kompetan Hücre Hazırlanması

E.coli XL₁Blue kompetan hücre hazırlanması:

- 1- 100 µL XL₁Blue hücreleri 10 mL LB'ye inoküle edilerek 37°C ısıtmalı çalkalayıcıda 1 gece bekletildi.
- 2- Ertesi gün O.D ölçüldü.O.D=4.12
- 3-1 gün önceki kültürden 412 µL alınarak 100 mL LB'ye inoküle edilerek 37°C ısıtmalı çalkalayıcıda 3 saat çalkalamaya bırakıldı.
- 4- Örnekler 10 dk buz üzerinde bırakıldı.
- 5- 1 M CaCl₂ (1.47 gr CaCl₂ + 10mL ddH₂O=1M CaCl₂) hazırlandı.
- 6- 10 mL 0.1M CaCl₂ (1M CaCl₂ + 9 mL ddH₂O=0.1M CaCl₂) hazırlanarak buz üzerine bırakıldı.
- 7- Hücreler 50 mL falkon içerisine transfer edildi ve 600 rpm, +4°C'de 3 dk santrifüjlendi. Süpernatant atıldı.
- 8- Pellet üzerine 10 mL soğuk 0.1M CaCl₂ eklenerek pellet çözdürüldü.
- 9- Çözdürüldükten sonra karışım 20 dk buz üzerinde bekletildi.
- 10- 0.1M CaCl₂/ %15 gliserol hazırlandı.
- 11- Buz üzerindeki karışımın üzerine 5 mL soğuk 0.1M CaCl₂/ %15 gliserol eklenerek, invert edilerek karıştırıldı.
- 12- 100 µL olacak şekilde 1.5mL ependorf tüplere aliqout edilerek -80°C dondurucuya bırakıldı.

p-soup içeren Agl₁ kompetan hücre hazırlanması:

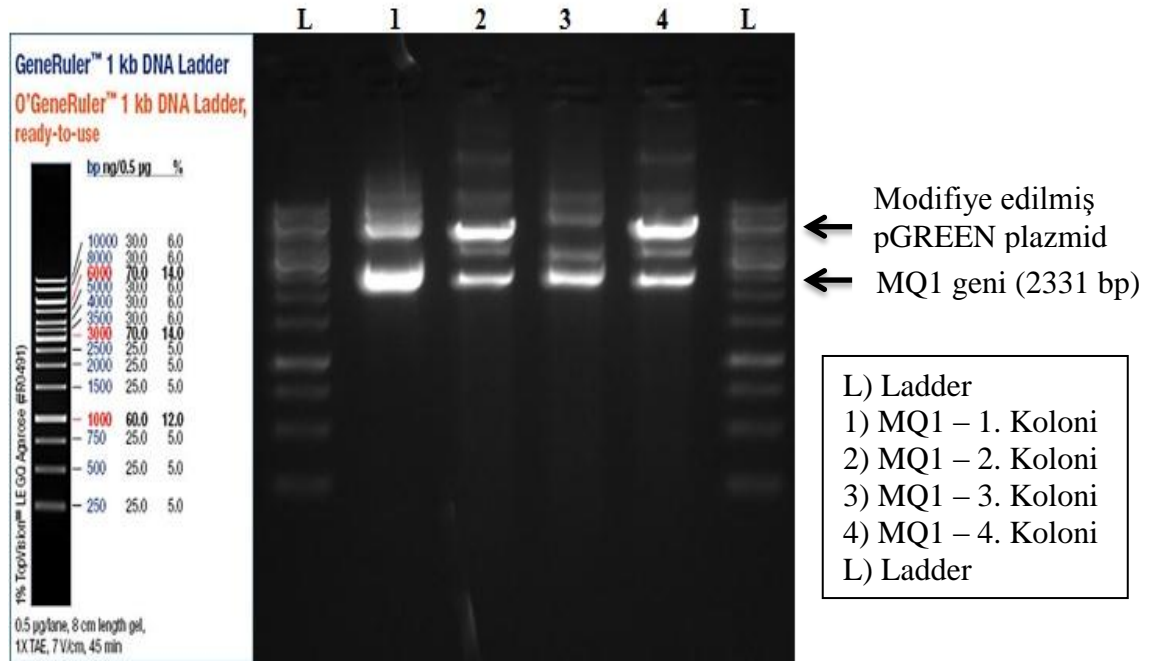
- 1- 100 µL p-soup içeren Agl₁ hücreleri içerisine 15 µL karbamisilin ve 3 µL rifamisin eklenmiş 5 mL LB'ye inoküle edilerek 28°C ısıtmalı çalkalayıcıda 1 gece bekletildi.
- 2- Ertesi gün O.D ölçüldü.O.D=4.152
- 3- Hücreler 50 mL falkon içerisine transfer edildi ve 5 dk buz üzerinde bırakıldı.
- 4- 3000xg +4°C'de 5 dk santrifüjlendi. Süpernatant atıldı. Pellet üzerine %10'luk gliserol eklenerek karıştırıldı.
- 5- 3000xg +4°C'de 5 dk santrifüjlendi. Süpernatant atıldı. Pellet üzerine 2,5 ml %10'luk gliserol eklenerek karıştırıldı.
- 6- 100 µL olacak şekilde 1.5mL ependorf tüplere aliqout edilerek -80°C dondurucuya bırakıldı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. MQ1 Geninin Klonlanması

PA83 geninin nükleotid dizisi verileri NCBI veri tabanında mevcuttur. PA83 geni belirli bölgelerde amino asit değişikliği yapılarak mutant hale getirilip MQ1 geni dizayn edilmiştir. Bu dizilere dayanarak, MQ1 geninin kodlama bölgesinin uçlarında PacI ve XhoI kesim bölgesi içeren vektörler dizayn edildi. Enzim kesimi ve jelden geri kazanım işlemleri materyal ve metot'da belirtilen şekilde uygulandı. Daha sonra MQ1 geni modifiye edilmiş pGREEN vektörüne klonlandı ve ekspresyon suşu XL₁BLUE'a transforme edildi, ardından kanamisin içeren LB Agar plate'e yayma yöntemiyle ekildi. Yaklaşık 24 saatlik inkübasyondan sonra uygun koloniler seçildi ve kanamisin içeren LB sıvı besiyerine inokule edildi. Bir gün sonra çoğalmış olan bakterilerden Zippy Plasmid Miniprep Kitiyle (Zymo Research, ABD), üreticinin tavsiyelerine uygun olarak plazmid izolasyonu yapıldı. Agaroz jele yükleme yapılarak doğru koloniler seçildi.

Şekil 4.1'de görüldüğü üzere doğru koloniler olarak belirlenen 1, 2 ve 4 no'lu koloniler taşıyıcı vektör olan modifiye edilmiş pGREEN plazmidini ve 2331 bp boyutundaki MQ1 genini taşımaktadır. Bu koloniler hem istediğimiz geni hem de doğru plazmid taşımaktadır. Belirlenmiş kolonilerden % 90'lık gliserol ile stok hazırlanarak -80°C'de saklanmıştır.

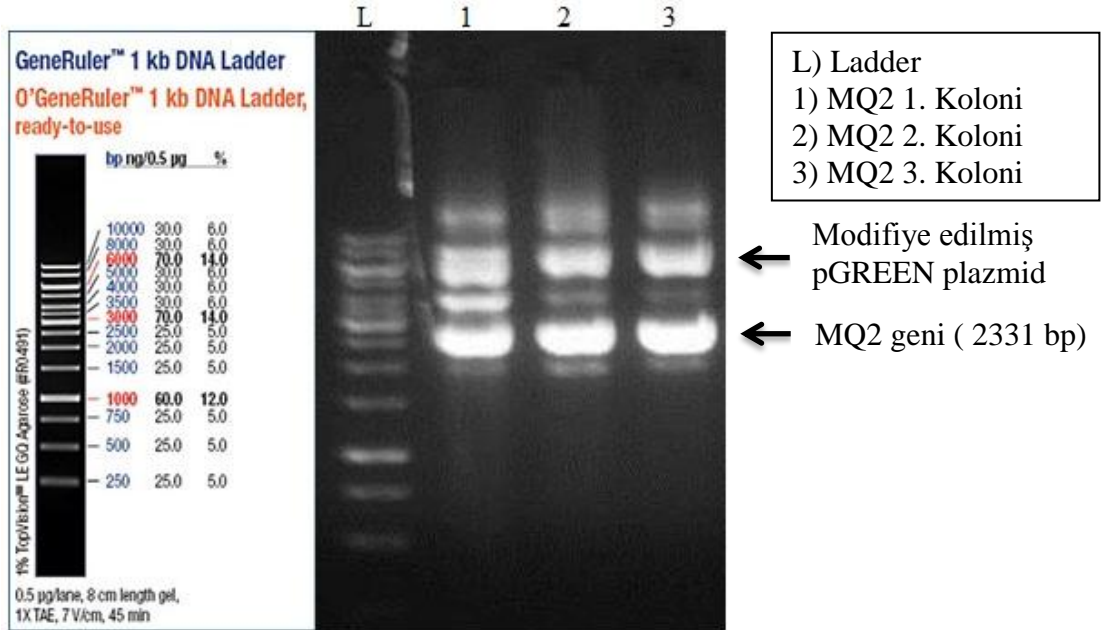


Şekil 4.1. MQ1 geninin *E.coli*' den plazmid izolasyonu sonrası enzimlerle kesilerek elde edilen agaroz jel görüntüsü.

4.2. MQ2 Geninin Klonlanması

PA83 geninin nükleotid dizisi verileri NCBI veri tabanında mevcuttur. PA83 geni belirli bölgelerde amino asit değişikliği yapılarak mutant hale getirilip MQ2 geni dizayn edilmiştir. MQ2 geninin MQ1 geninden farklı olan kısmı materyal ve metod bölümünde ayrıntılı açıklanmıştır. Bu dizilere dayanarak, MQ1 geninin kodlama bölgesinin uçlarında PacI ve XhoI kesim bölgesi içeren vektörler dizayn edildi. Enzim kesimi ve jelden geri kazanım işlemleri materyal ve metod'ta belirtilen şekilde uygulandı. Daha sonra MQ2 geni modifiye edilmiş pGREEN vektörüne klonlandı ve ekspresyon suşu XL₁BLUE'a transforme edildi, ardından kanamisin içeren LB Agar plate'e yayma yöntemiyle ekildi. Yaklaşık 24 saatlik inkübasyondan sonra uygun koloniler seçildi ve kanamisin içeren LB sıvı besiyerine inokule edildi. Bir gün sonra çoğalmış olan bakterilerden Zyppe Plasmid Miniprep Kitiyle (Zymo Research, ABD), üreticinin tavsiyelerine uygun olarak plazmid izolasyonu yapıldı. Agaroz jele yükleme yapılarak gerçek koloniler seçildi.

Şekil 4.1'de görüldüğü üzere doğru koloniler olarak belirlenen 1, 2 ve 3 no'lu koloniler taşıyıcı vektör olan modifiye edilmiş pGREEN plazmidini ve 2331 bp boyutundaki MQ2 genini taşımaktadır. Bu koloniler hem istediğimiz geni hem de doğru plazmid taşımaktadır. Belirlenmiş kolonilerden % 90'lık gliserol ile stok hazırlanarak -80 C'de saklanmıştır.



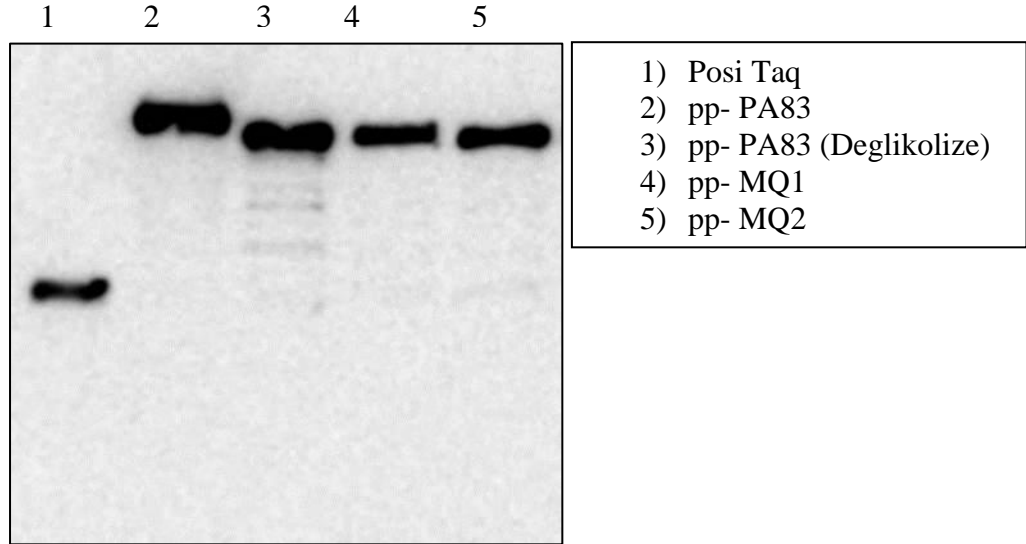
Şekil 4.2. MQ2 geninin *E.coli*'den plazmid izolasyonu sonrası enzimlerle kesilerek elde edilen agaroz jel görüntüsü.

4.3. Plazmidlerin Oluşturulması ve Proteinlerin Heterolog Ekspresyonu

MQ1 ve MQ2 genlerinin işlevsel bir proteini kodladığını deneysel olarak kanıtlamak amacıyla, genin varyantlarının kodlama bölgeleri *E. coli* ekspresyon vektörü modifiye edilmiş pGREEN plazmidine klonlandı ve ekspresyon suşu XL₁BLUE'a transforme edildi. Modifiye edilmiş pGREEN plazmidlerinin, klonlama bölgesi PacI ve XhoI enzimleriyle kesilip genlerin ligasyonundan sonra yapılan deneylerde plazmidlerin doğru şekilde kurulduğu gösterildi. Rekombinant MQ1 ve MQ2 varyantları Agl₁psoup kompotent hücrelerinde, fazladan 6 N-bakiyeli terminal uzatmayla (Histidin etiketi), füzyon proteini olarak eksprese edildi. Beklenen protein boyutları Western blot ve SDS-PAGE analizleriyle gösterildi.

4.4. Rekombinant MQ1 ve MQ2 Proteinlerinin Üretimi

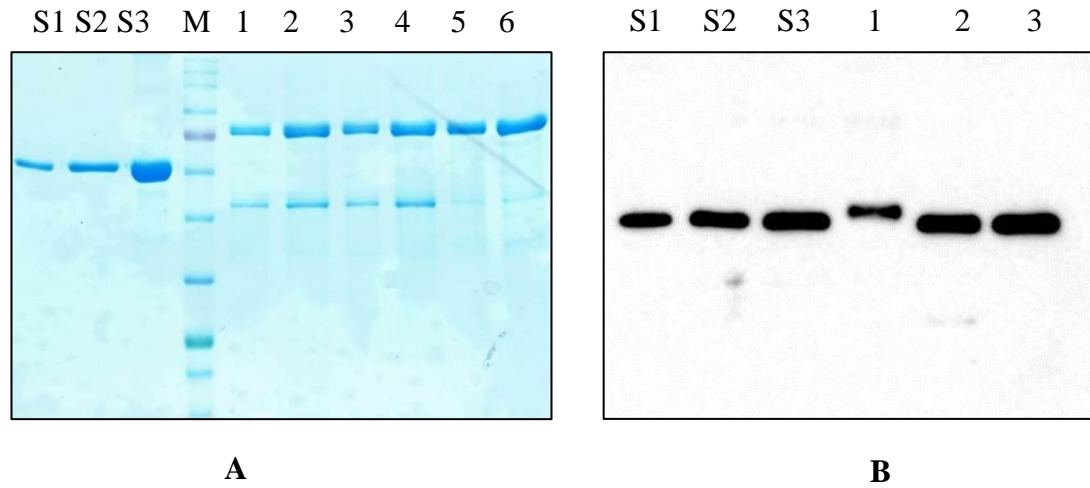
MQ1 ve MQ2 genlerinin plazmide aktarılması, doğrulanması ve *E. coli*'de çoğaltılıp tekrar plazmidlerin izole edilmesi aşamalarından sonra plazmidlerin Agl₁psoup'a transformasyon aşamasına geçilmiştir. Agl₁psoup'a transformasyon materyal ve metot'da açıklandığı gibi gerçekleştirildi. pGREEN-MQ1 ve pGREEN-MQ2 plazmidlerini içeren Agl₁ psoup hücreleri 6-7 haftalık *N. benthamiana* bitkisine materyal ve metot'da anlatıldığı gibi infiltrasyon işlemi yapıldı. İnfiltrasyondan 5 gün sonra infiltre edilmiş olan yapraklar toplandı. Materyal ve metot'da belirtildiği gibi ekstraksiyon yapılarak proteininin üretilip üretilmediğini kontrol etmek amacıyla Western blot analizi yapıldı. Elde edilen bulgular doğrultusunda (Şekil 4.3) 83 kDa boyutundaki MQ1 ve MQ2 proteinlerinin *in vivo* olarak üretilebildiği gösterildi.



Şekil 4.3. MQ1 ve MQ2 proteinlerinin Western blot görüntüsü. pp- PA83; Bitkide üretilmiş PA83 proteini (Kontrol). Deglikolize pp- PA83; Bitkide üretilmiş *in vivo* deglikozillenmiş PA83 proteini (Kontrol). pp- MQ1; Bitkide üretilmiş MQ1 proteini. pp- MQ2; Bitkide üretilmiş MQ2 proteini.

4.5. Rekombinant HisTaq (His6) Etiketli MQ1 ve MQ2 Proteinlerinin Saflaştırılması

Rekombinant MQ1 ve MQ2 proteinlerinin saflaştırılması materyal ve metot'da anlatıldığı gibi yapıldı. *N. bethamiana* bitkisinde rekombinant olarak başarıyla üretimi gerçekleştirilen MQ1 ve MQ2 proteinleri etkili şekilde saflaştırılmış olup, saflık oranının yaklaşık %90 olduğu düşünülmektedir. Ayrıca bu proteinlerin yüksek derecede çözülebilir olduğu görülmüştür.

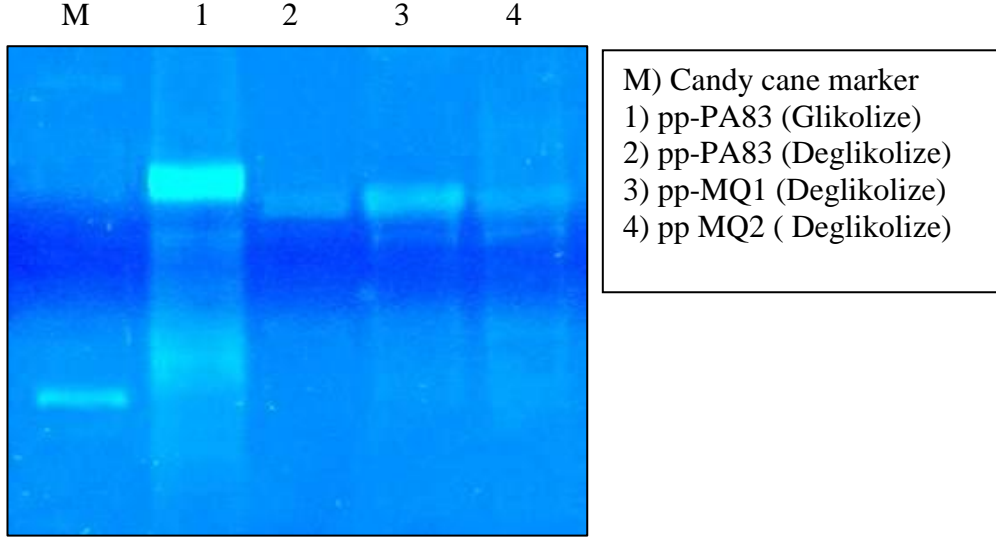


Şekil 4.4. Saflaştırılmış MQ1 ve MQ2 proteinlerinin SDS-PAGE ve Western blot analizi. **A)** Saflaştırılmış MQ1 ve MQ2 proteinlerinin SDS-PAGE (Coomassie Blue'yla boyanmış) analizleri: **A) S1:** BSA standart (1µg) **S2:** BSA standart (2,5 µg) **S3:** BSA standart (5 µg) **M:** Protein standartı (NEB, ABD cat. no. P7712 S) **1:** Saflaştırılmış MQ1 (2,5 µg) **2:** Saflaştırılmış MQ1 (5µg) **3:** Saflaştırılmış MQ2 (2,5 µg) 1. fraksiyon **4:** Saflaştırılmış MQ2 (5µg) 1.fraksiyon **5:** Saflaştırılmış MQ2 (2,5 µg) 2.fraksiyon **6:** Saflaştırılmış MQ2 (5µg) 2.fraksiyon **B) S1:** Deglikolize pp- PA83 standart (25 ng) **S2:** Deglikolize pp-PA83 standart (50 ng) **S3:** Deglikolize pp- PA83 standart (100 ng) **1:** Saflaştırılmış PA83 (100 ng) **2:** Saflaştırılmış MQ1 (100 ng) **3:** Saflaştırılmış MQ2 (100 ng).

Saflaştırma sonrası SDS-PAGE analiziyle MQ1 ve MQ2 proteinleri dışında bitkilerde genellikle yoğun olarak bulunan kendi proteini olan Rubisco da bazen gözlenmiştir. Fakat Western blot analizi yapılarak proteinlerimizin, spesifik antikorlar aracılığıyla doğruluğu gösterilmiştir.

4.6. Saflaştırılmış MQ1 ve MQ2 Proteinlerinin Glikan Saptama Analizi

Öncelikle protein örnekleri 10% SDS-PAGE'de yürütüldükten sonra jel Pro-Q Emerald 300 glikoprotein boyama kiti ile üretici tarafından belirtilen protokole uygun olarak bu deney yapılmıştır.

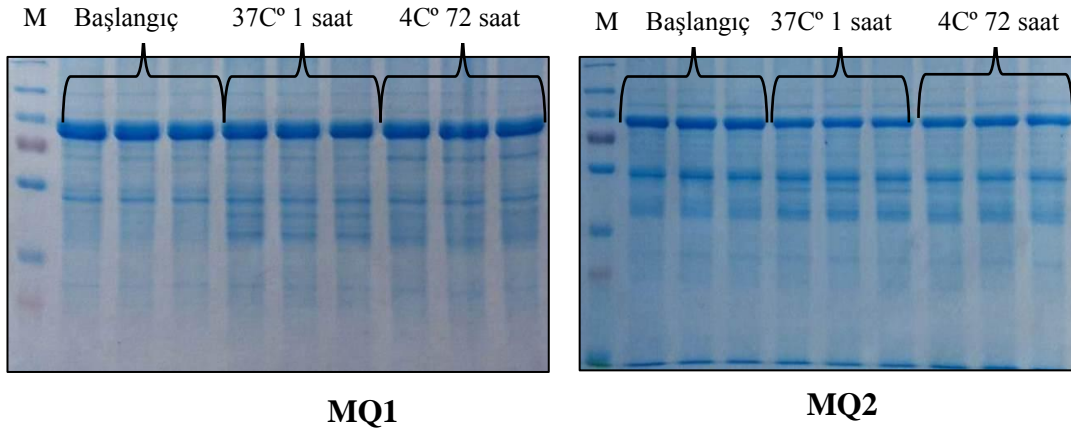


Şekil 4.5. Saflaştırılmış MQ1 ve MQ2 proteinlerinin glikan saptama analizi sonucu.

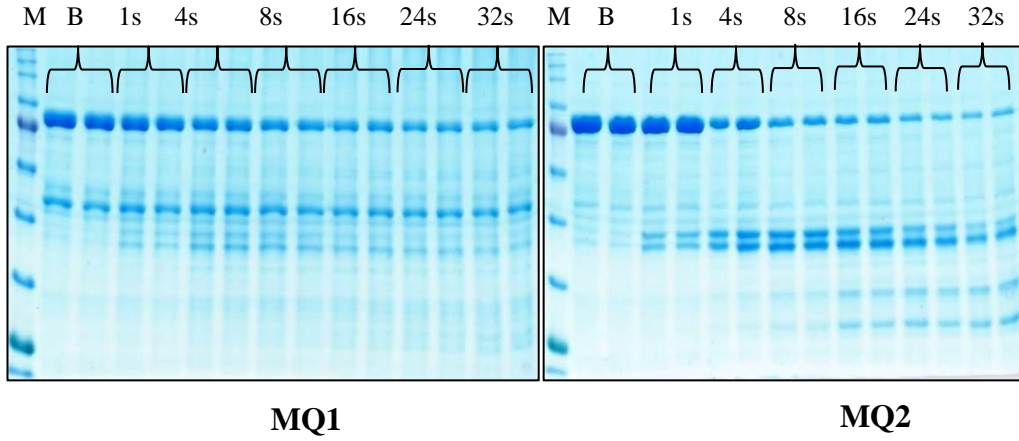
4.7. Saflaştırılmış MQ1 ve MQ2 Proteinlerinin Stabilite Analizleri

Stabilite analizleri materyal ve metot'da açıklandığı gibi yapılmış olup SDS-PAGE ve Western blot analizi sonuçları aşağıdaki şekillerde ayrıntılı gösterilmiştir. Her iki protein için de, materyal ve metot'da açıklandığı şekilde iki farklı stabilite analizi yapılmıştır.

4.7.1. Saflaştırılmış MQ1 ve MQ2 Proteinlerinin Stabilite Sonrası SDS-PAGE Analizleri



Şekil 4.6. Saflaştırılmış MQ1 ve MQ2 proteinlerinin farklı sıcaklıklardaki stabilite analizi sonrası SDS-PAGE görüntüsü. **M:** Protein standartı (Thermo prestained protein standart).



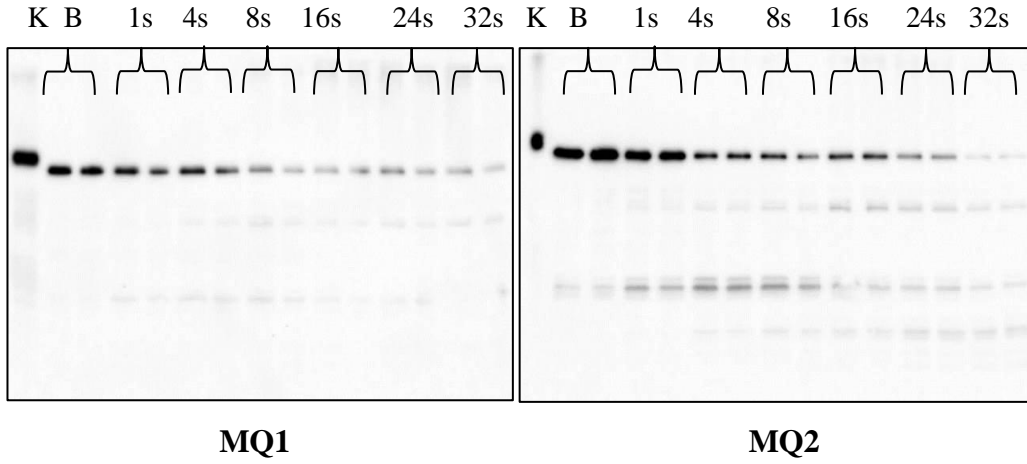
Şekil 4.7. Safleştirilmiş MQ1 ve MQ2 proteinlerinin 37°C’de stabilite analizi sonrası SDS-PAGE görüntüsü (Her kuyucuğa 5 µg protein yüklendi). **M:** Protein standartı (NEB, ABDcat. no. P7712 S) **B:** Başlangıç.

Çizelge 4.1. Safleştirilmiş MQ1 ve MQ2 proteinlerinin SDS-PAGE analizleri sonrası stabilite değerlendirmesi

	Başlangıç	37 °C 1 saat	37 °C 4 saat	37 °C 8 saat	37 °C 16 saat	37 °C 24 saat	37 °C 32 saat
MQ1 Safleştirilmiş Protein	100,00%	84,50%	60,16%	54,07%	41,88%	33,49%	31,27%
Parçalanmış protein (%)							
	0,00%	15,50%	39,84%	45,93%	58,12%	66,51%	68,73%
MQ1 Yarılanma Ömrü	8,70 saat						
MQ2 Safleştirilmiş Protein	100,00%	99,58%	59,34%	37,86%	30,45%	21,79%	16,89%
Parçalanmış protein (%)							
		0,42%	40,66%	62,14%	69,55%	78,21%	83,11%
MQ2 Yarılanma Ömrü	4,92 saat						

Safleştirilmiş MQ1 ve MQ2 proteinlerinin 37°C’de 1, 4, 8, 16, 24, 32, 48 saat bekletildikten sonra yapılan SDS-PAGE analiz sonuçlarından sonra alınan görüntüler Gene Tools programı yardımıyla başlangıç proteine 100 değeri verilerek diğer proteinlere denk gelen değerler hesaplandı. Bu sonuca göre; MQ1 proteinin yarı ömrü **8,70** saat, MQ2 proteinin yarı ömrü ise **4,92** saat olarak hesaplanmıştır.

4.7.2. Saflaştırılmış MQ1 ve MQ2 Proteinlerinin Stabilite Sonrası Western Blot Analizleri



Şekil 4.8. Saflaştırılmış MQ1 ve MQ2 proteinlerinin 37°C 'de stabilite analizi sonrası Western blot görüntüsü (Her kuyucuğa 100 ng protein yüklendi). **K:** Kontrol, saflaştırılmış glikolize PA83 (100 ng) **B:** Başlangıç.

Çizelge 4.2. Saflaştırılmış MQ1 ve MQ2 proteinlerinin Western blot analizleri sonrası stabilite değerlendirmesi

	Başlangıç	37 °C 1 saat	37 °C 4 saat	37 °C 8 saat	37 °C 16 saat	37 °C 24 saat	37 °C 32 saat
MQ1 Saflaştırılmış Protein	100,00%	79,14%	78,63%	34,86%	17,57%	16,72%	10,94%
Parçalanmış protein (%)							
	0,00%	20,86%	21,37%	65,14%	82,43%	83,28%	89,06%
MQ1 Yarılma Ömrü	5,57 saat						
MQ2 Saflaştırılmış Protein	100,00%	86,82%	48,76%	47,08%	41,77%	22,61%	3,85%
Parçalanmış protein (%)							
		13,18%	51,24%	52,92%	58,23%	77,39%	96,15%
MQ2 Yarılma Ömrü	7,53 saat						

Saflaştırılmış MQ1 ve MQ2 proteinlerinin 37°C'de 1, 4, 8, 16, 24 ve 32 saat bekletildikten sonra yapılan SDS-PAGE analiz sonuçlarından sonra alınan görüntüler Gene Tools programı yardımıyla başlangıç proteine 100 değeri verilerek diğer proteinlere denk gelen değerler hesaplandı. Bu sonuca göre; MQ1 proteinin yarı ömrü **5,57** saat, MQ2 proteinin yarı ömrü ise **7,53** saat olarak hesaplanmıştır.

5. SONUÇ

Şarbon hastalığına karşı aşı geliştirme kapsamında yapılan bu çalışmada strateji olarak, bilinen en önemli molekül olan PA83'ün glikolizasyon bölgelerinden amino asit değişimleri yaparak mutasyona uğratarak deglikolize olarak bitki ekspresyon sisteminde üretimini sağlamak üzerine kurulmuştur. Bu kapsamda üretilecek proteinleri kodlayan genlerin *N. benthamiana* bitkisine uygun kodon optimizasyonunun yapılması, genlerin klonlanması, bitkiye aktarılması ve bitkide protein üretiminin sağlanması deney sonuçlarında da gösterildiği gibi başarıyla yapılmıştır.

Rekombinant proteinlerin üretiminde ekspresyon sistemi olarak memeli yerine bitkilerin kullanılması proteinlerin benzer post-translasyonel modifikasyonlar geçirmesi ve üretim maliyetleri bakımından tercih sebebidir. Bitkide rekombinat protein üretimi için transient ekspresyon sisteminin kullanılmış olması zaman ve iş yükü açısından avantaj sağlandığı düşünülmektedir.

MQ1 geninde materyal ve metot'da bahsedildiği gibi 6 tane mutasyon bölgesi, yeni tasarlanmış olan MQ2 geni ise 7 tane mutasyon bölgesi olacak şekilde tasarlanmıştır. Bu durumda MQ2 MQ1'a göre daha deglikolize olarak üretilmesi beklenmektedir. Bunu belirlemek amacıyla yapılan glikan saptama analizi sonucuna göre gerçekten de MQ2 proteininin MQ1 proteinine göre daha deglikolize olduğu kanıtlanmıştır.

Bitki ekspresyon sisteminde deglikolize olarak üretilen proteinlerin canlı vücudunda kan dolaşımında yarılanma ömrünün belirlenmesi amacıyla insan vücudunda olduğu gibi proteinler 37°C'de tutulmuş ve proteinin ne kadar zamanda ne kadarının parçalandığı yüzde olarak gösterilip, yarılanma ömrü hesaplanmıştır. Bu hesaplamaları en doğru şekilde yapabilmek için hem SDS-PAGE hem de Western blot analizleri yapıldı ve analiz sonrası GeneTools programı kullanılarak hata payı en aza indirgenmeye çalışıldı. Stabilite sonuçları değerlendirildiğinde; SDS-PAGE sonuçlarına bakacak olursak MQ1 proteinin yarılanma ömrünün MQ2 proteininden daha fazla olduğu görülmektedir. Fakat aynı koşullarda SDS-PAGE'ye göre spesifik bir deney olan Western blot analizi de yapılmıştır. Western blot sonucuna göre MQ2 proteininin yarılanma ömrünün MQ1 proteininden daha fazla olduğu gösterilmiştir.

Rekombinat protein üretiminde mutasyon yapılarak üretilen proteinler doğal yapısının bozulmuş olması riskinden dolayı pek tercih edildiği söylenemez fakat bu konuda ortaya konulmuş kesin kanıtlarda henüz mevcut değildir. Bu çalışmada uygulanan stratejilerin sadece şarbona karşı aşı geliştirme çalışmalarında değil diğer birçok aşı ve terapötik protein geliştirme çalışmalarına da ışık tutabileceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- AZIZ, M.A., Sing, A.S., Kumar, P.A., Bhatnagar, R. 2002. Expression of protective antigen in transgenic plants: a step towards edible vaccine against anthrax. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 299: 345–351.
- Balen, B., Krsnik-Rasol, M. 2007. N-Glycosylation of Recombinant Therapeutic Glycoproteins in Plant Systems, *Food Technol. Biotechnol*, 45 (1) 1–10.
- Barth, H., Aktorles, K., Popoff, M.R., Stilles, B.G. 2004. Binary bacterial toxins: biochemistry, biology and applications of common *Clostridium* and *Bacillus* proteins. *Microbiol. Mol.Biol. Rev*, 68 (3), 373-402.
- Bhatnagar, R., Batra, S. 2001. Anthrax toxin, *Crit. Rev. Microbiol*, 27: 167–200.
- Brachman, P.S., Friedlander, A.M. Anthrax. 1999. In Vaccines Third edition. Edited by: Plotkin, S.A., Orenstein, W.A. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 629-637.
- Canizares, M.C., Lomonossoff, G.P., Nicholson, L. 2005. Use of viral vectors for vaccine production in plants. *Immunol. Cell Biol*, 83: 263-270.
- Chichester, J.A., Manceva, S.D., Rhee, A., Coffin, M.V., Musiychuk, K., Mett, V. 2013. A plant-produced protective antigen vaccine confers protection in rabbits against a lethal aerosolized challenge with *Bacillus anthracis* Ames spores. *Hum Vaccin Immunother*, 9: 544–552. PMID: 23324615.
- Collier, R.J., Young, J.A.T. 2003. Anthrax Toxin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*, 19: 45–70.
- Daniell, H., Streatfield, S.J., Wycoff, K. 2001. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Pl. Sci.*, 6: 219-226.
- Dixon, T.C., Meselson, M., Guillemin, J., Hanna, P.C. 1999. Anthrax. *N Engl JMed*, 341: 815-26.
- Driks, A. 2002. Overview: Development in bacteria: spore formation in *Bacillus subtilis*. *Cell Mol Life Sci*, 59: 389-91.
- Drum, C.L., Yan, S.Z., Bard, J., Shen, Y.Q., Lu, D, Soelaiman, S., Grabarek, Z., Bohm, A., Tang, W.J. 2002. Structural basis for the activation of anthrax adenylyl cyclase exotoxin by calmodulin. *Nature*, 415: 396-402.
- Duesbery, N.S., Vande, W. G.F. 1999. Anthrax toxins. *Cell Mol Life Sci*, 55: 1599-609.
- Duesbery, N.S., Webb, C.P., Leppla, S.H. 1988. Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor. *Science*, 280: 734-737.

- During, R.L., Li, W., Hao, B. 2005. Anthrax lethal toxin paralyzes neutrophil actin-based motility. *J. Infect Disease*, 192: 837-845.
- Ezzell, J.W., Welkos, S.L. 1999. The capsule of *Bacillus anthracis*, a review, *J. Appl. Microbiol*, 87: 250–250.
- Franken, E., Teuschel, U., Hain, R. 1997. Recombinant proteins from transgenic plants. *Curr. Opin. Biotechnol*, 8: 411-416.
- Friedlander, A. Anthrax. In: Zajtchuk, R., Bellamy, R.F., eds. Textbook of Military Medicine: Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare. Washington, DC: Office of the Surgeon General, US Dept of the Army; 1997: 467-478.
- Friedlander, A.M., Pittman, P.R., Parker, G.W. 1999. Anthrax vaccine: evidence for safety and efficacy against inhalational anthrax. *JAMA* 282: 2104–2106. PMID: 10591317.
- Friedlander, A.M. 2000. Anthrax: clinical features, pathogenesis, and potential biological warfare threat. *Curr Clin Top Infect Dis*, 20: 335-49.
- Gomord, V., Faye, L. 2004. Post-translational modification of therapeutic proteins in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 7:171–181. pmid:15003218.
- Gomord, V., Fichette, A.C., Menu-Bouaouiche, L., Saint-Jore-Dupas, C., Plasson, C., Michaud, D., Faye, L. 2010. Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production. *Plant Biotechnology Journal*, 8: pp.564–587.
- Grill, L.K., Palmer, K.E., Pogue, G.P. 2006. Use of Plant Viruses for Production of Plant-Derived Vaccines. *Crit. Rev. Pl. Sci*, 24: 309-323.
- Hachisuka, Y., Kojima, K., Sato, T. 1966. Fine filaments on the outside of the exosporium of *Bacillus anthracis* spores. *J Bacteriol*, 91: 2382-4.
- Hanna, P. 1999. Lethal toxin actions and their consequences. *J Appl Microbiol*, 87: 285-7.
- Hatch, T.F. 1961. Distribution and deposition of inhaled particles in respiratory tract. *Bacteriol Rev*, 25: 237-240.
- Hoffmaster, A.R., Koehler, T.M. 1999. Autogenous regulation of the *Bacillus anthracis* pag operon, *J. Bacteriol*. 181 4485–4492.
- Hudson, H.F., Christian, K. 2010. Endoglycosidase and Glycoamidase Release of N-Linked Glycans. *Curr Protoc Mol Biol*.

- Inglesby, T.V., O'toole, T., Henderson, D.A., Bartlett, J.G., Ascher, M.S., Eitzen, E., Friedlander, A.M., Gerberding, J., Hauer, J., Hughes, J., et al. 2002. Anthrax as a biological weapon, 2002: updated recommendations for management. *Jama*, 287: 2236-52.
- Joellenbeck, L., Zwanziger, L., Durch, J., Strom, B., (eds): The Anthrax Vaccine. Is It Safe? Does It Work? Washington, DC: *National Academy Press*; 2002.
- Julia, Y.W., Michael, H.R. 2005. Anthrax vaccine design: strategies to achieve comprehensive protection against spore, bacillus, and toxin. *Medical Immunology*, 4:4 doi:10.1186/1476-9433-4-4.
- Keitel, W.A. 2006. Recombinant protective antigen (rPA102): profile of a second-generation anthrax vaccine. *Expert Rev. Vaccines*, 5(4), 417-430.
- Kirby, J. 2004. Anthrax lethal toxin induces human endothelial cell apoptosis. *Infect. Immun*, 72 (1), 430-439.
- Koprinovova, A., Lienhart, O., Decker, E.L., Stemmer, C., Wagner, S., Gorr, G. Modifying glycosylation patterns in moss, Conference on Plant-Made Pharmaceuticals: 2003 March 16-19; Quebec City, California. CPMP, 2003.(<http://www.cpmp2003.org/pages/en/home/home.html>).
- Krantz, B.A., Melnyk, R.A., Zhang, S. 2005. A phenylalanine clamp catalyzes protein translocation through the anthrax toxin spore. *Science*. 309, 777-785.
- Lacy, D.B., Mourez, M., Fouassier, A., Collier, R.J. 2002. Mapping the anthrax protective antigen binding site on the lethal and edema factors. *J. Biol. Chem*, 277: 3006–10.
- Lacy, D.B., Lin, H.C., Melnyk, R.A. 2005. A model of anthrax toxin lethal factor bound to protective antigen. *Proc Natl Acad. Sci*, 102 (45), 16409-16414.
- Leppla, S. 1982. Anthrax toxin edema factor: A bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentrations in eukaryotic cells. *Proc Natl Acad. Sci* 79, 3162-3166.
- Leppla, S. H., Friedlander, A. M., Cora, E. 1988. in *Bacterial Protein Toxins* pp. 111-112, Gustav Fischer, New York.
- Leppla, S. H., Freidlander, A. M., Singh, Y., Cora, E. M., Bhatnager, R. 1990. *Salisbury Med. Bull.* 68, (suppl.) 41-43.
- Leppla, S.H. 2000. Anthrax toxin, in: K. Aktories, I. Just (Eds.), *Handbook of Experimental Pharmacology, Bacterial Protein Toxins*, vol. 145, Springer, Berlin, pp. 445–471.

- Lerouge, P., Cabanes-Macheteau, M., Rayon, C., Fischette-Laine, A.C., Gomord, V., Faye, L. 1998. N-glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends. *Plant Mol. Biol.*, 38: 31–48.
- Lincoln, R.E., Hodges, D.R., Klein, F, et al. 1965. Role of the lymphatics in the pathogenesis of anthrax. *J Infect Dis*, 115: 481-494.
- Makino, S., Watarai, M., Cheun, H., Shirahata, T., Uchida, I. 2002. Effect of the lower molecular capsule released from the cell surface of *Bacillus Anthracis* on the pathogenesis on anthrax. *J.Infect Disease*, 186: 227-233.
- Mamedov, T., Yusibov, T. 2010. Plants as an Alternative System for Expression of Vaccine Antigens. *Proceedings of ANAS (Biological Sciences)*, 65(5-6): 195-200.
- Mammedov, T., Ghosh, A., Jones, R., Mett, V., Farrance, C., Musiychuk, K., HORSEY, A., YUSİBOV, V. 2012. Production of non-glycosylated recombinant proteins in *Nicotiana benthamiana* plants by co-expressing bacterial PNGase F. *Plant Biotechnology Journal* 10, pp. 773–782 doi: 10.1111/j.1467-7652.2012.00694
- Mamedov, T., Chichester, J. A., Jones, R. M., Ghosh, A., Coffin, M.V., Herschbach, K., Prokhnovsky, A.I., Streatfield, S.J., Yusibov, M. 2016. Immunogenic Non-Glycosylated Protective Antigen from *Bacillus anthracis* in *Nicotiana benthamiana* by Co-Expression with Peptide-N-Glycosidase F (PNGase F) of *Flavobacterium meningosepticum*. *PLOS ONE* DOI:10.1371/journal.pone.0153956 April 21.
- Mamedov, T., Cicek, K., Gulec, B., Ungor, R., Hasanova, G. 2017. *In vivo* production of non-glycosylated recombinant proteins in *Nicotiana benthamiana* plants by co-expression with Endo- β -N-acetylglucosaminidase H (Endo H) of *Streptomyces plicatus*. *PLOS ONE* DOI:10.1371/journal.pone.0183589 August 21.
- Milne, J.C., Furlong, D., Hanna, P.C., Wall, J.S., Collier, R.J. 1994. Anthrax protective antigen forms oligomers during intoxication of mammalian cells. *J. Biol. Chem*, 269: 20607–12.
- Molloy, S.S., Bresnahan, P.A., Leppla, S.H., Klimpel, K.R., Thomas, G. 1992. Human Furin is a Calcium-dependent Serine Endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves Anthrax Toxin Protective Antigen. *The Journal of Biological Chemistry*, 16396-16402.
- Musiychuk, K., Stevenson, N., Bi, H., Farrance, C.E., Orozovic, G., Brodelius, M., Brodelius, P., Horsey, A., Ugulava, N., Shamloul, A.M., Mett, V., Rabindran, S., Streatfield, S.J., Yusibov, V. 2007. A launch vector for the production of vaccine antigens in plants. *Influenza and other Respiratory Viruses*, 1: 19-25.

- Myenye, K.S., Siziya, S., Peterson, D. 1996. Factors associated with human anthrax outbreak in the Chikupo and Ngandu villages of Murewa district in Mashonal and East Province, Zimbabwe. *Cent Afr J Med*, 42: 312-315.
- Okinaka, R.T., Cloud, K., Hampton, O., Hoffmaster, A.R., Hill, K.K., Keim, P., Koehler, T.M., Lamke, G., Kumano, S., Mahillon, J., Manterm, D., Martinez, Y., Ricke, D., Svensson, R., Jackson, P.J. 1999. Sequence and organization of pXO1, the large *Bacillus anthracis* plasmid harboring the anthrax toxin genes, *J. Bacteriol*, 181: 6509–6515.
- Pannifer, A.D., Wong, T.Y., Schwarzenbacher, R., Renatus, M., Petosa, C., Bienkowska, J., Lacy, D.B., Collier, R.J., Park, S., Leppla, S.H., et al. 2001. Crystal structure of the anthrax lethal factor. *Nature*, 414: 229-33.
- Petosa, C., Collier, R.J., Klimpel, K.R., Leppla, S.H., Liddington, C. 1997. Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen. *Nature*.
- Pile, J.C., Malone, J.D., Eitzen, E.M., Friedlander, A. 1998. Anthrax as a potential biological warfare agent. *Arch Intern Med*, 158: 429-434.
- Plotkin, S.A., Brachman, P.S., Utell, M., Bumford, F.H., Atchison, M.M. 2002. An epidemic of inhalation anthrax, the first in the twentieth century: I. Clinical features. 1960. *Am J Med*, 112: 4-12. Discussion 2–3.
- Pogue, G.P., Lindbo, J.A., Garger, S.J., Fitzmaurice, W.P. 2002. Making an ally from an enemy: plant virology and the new agriculture. *Annu. Rev. Phytopathol*, 40: 45-74.
- Robertson, D.L., Tippetts, M.T., Leppla, S.H. 1988. Nucleotide sequence of the *Bacillus anthracis* edema factor gene (cya): a calmodulin dependent adenylate cyclase, *Gene*, 73: 363–371.
- Roy, G., Weisburg, S., Rabindran, S., Yusibov, V. 2010. A novel two-component Tobacco mosaicvirus-based vector system for high-level expression of multiple therapeutic proteins including a human monoclonal antibody in plants. *Virology*, 405: 93-99.
- Schneemann, A., Manchester, M. 2009. Anti-toxin antibodies in prophylaxis and treatment of inhalation anthrax. *Future Microbiol*, 4: 35–43. doi: 10.2217/17460913.4.1.35 PMID: 19207098.
- Scoble, H., Ralney, J., Bradley, K., Young, J. 2003. Human capillary morphogenesis protein 2 functions as an anthrax receptor. *Proc Natl Acad. Sci*, 100: 5170-5174.
- Singh, Y., Chaudhary, V. K., Leppla, S. H. 1989. *J. Biol. Chem*, 264: 19103-19107.
- Smith, H., Keppie, J., Stanley, J. L. 1955. *Br. J. Exp. Pathol*, 36: 460-472.

- Smith, H. 2000. Discovery of the anthrax toxin: the beginning of *in vivo* studies on pathogenic bacteria. *Trends Microbiol*, 8: 199-200.
- Tekin, A., Bulut, N., Unal, T. 1997. Acute abdomen due to anthrax. *Br J Surg*, 84: 813.
- Thomas, V., Inglesby, D.A., Henderson, J.G., Bartlett, M.S., Ascher, E.E., Arthur, M., Friedlander, J.H., Joseph, M., Michael, T., Osterholm, T.T., Gerald, P., Trish, M.P., Philip, K.R., Kevin, T. 1999. Anthrax as a Biological Weapon. *JAMA*, 281: 1735-1745.
- Turnbull, P.C. 1991. Anthrax vaccines: past, present and future. *Vaccine*, 9: 533-9.
- Turnbull, P.C. 2000. Current status of immunization against anthrax: old vaccines may be here to stay for a while. *Curr Opin Infect Dis*, 13: 113-120.
- Walsh, G., Jefferis, R. 2006. Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nat. Biotechnol*, 24: 1241–1252.
- Vodkin, M.H., Leppla, S.H. 1983. Cloning of the protective antigen gene of *Bacillus anthracis*, *Cell*, 34: 693–697.
- Yusibov, V., Rabindran, S. 2004. Plant viral expression vectors: History and Developments. In: Eds. R.FISCHER, S.SCHILLBERG. *Molecular Farming*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KgaA: 77-90.
- Yusibov, V., Rabindran, S., Commandeur, U., Twyman, R.M., Fischer, R. 2006. The potential of plant virus vectors for vaccine production. *DrugsR&D*, 7: 203-217.

ÖZGEÇMİŞ

Rıfat ÜNGÖR
rft.ungor@gmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2015-2017	Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü - ANTALYA
Lisans 2011-2015	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü - SAMSUN

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

Mamedov, T., Cicek, K., Gulec, B., Ungor, R., Hasanova, G. 2017. *In vivo* production of non-glycosylated recombinant proteins in *Nicotiana benthamiana* plants by co-expression with Endo- β -N-acetylglucosaminidase H (Endo H) of *Streptomyces plicatus*. *PLOS ONE* DOI:10.1371/journal.pone.0183589 August 21.