

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**ENDO H İLE DEGLİKOZİLE EDİLMİŞ PA83 VE PA83 ANTİJENLERİNİN
FARKLI VARYANTLARININ ANTI-PA83 MONOKLONAL ANTİKORLARI
İLE BAĞLANMA AFİNİTE ÇALIŞMALARI**

İrem GÜRBÜZASLAN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞUBAT 2021

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**ENDO H İLE DEGLİKOZİLE EDİLMİŞ PA83 VE PA83 ANTİJENLERİNİN
FARKLI VARYANTLARININ ANTI-PA83 MONOKLONAL ANTİKORLARI
İLE BAĞLANMA AFİNİTE ÇALIŞMALARI**

İrem GÜRBÜZASLAN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ŞUBAT 2021
ANTALYA**

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

**ENDO H İLE DEGLİKOZİLE EDİLMİŞ PA83 VE PA83 ANTİJENLERİNİN
FARKLI VARYANTLARININ ANTI-PA83 MONOKLONAL ANTİKORLARI
İLE BAĞLANMA AFİNİTE ÇALIŞMALARI**

İrem GÜRBÜZASLAN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANSTEZİ

Bu tez TÜBİTAK tarafından 115S077 nolu proje ile desteklenmiştir.

ŞUBAT 2021

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Endo H ile deglikozile edilmiş PA83 ve PA83 antijenlerinin farklı varyantlarının
anti-PA83 monoklonal antikoları ile bağlanma afinite çalışmaları

İrem GÜRBÜZASLAN
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 25.02./2021... tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Tarlan MAMEDOV (Danışman)
Prof. Dr. Nedim MUTLU
Prof.Dr. Yaşar KARAKURT

ÖZET

Endo H ile deglikozile edilmiş PA83 ve PA83 antijenlerinin farklı varyantlarının anti-PA83 monoklonal antikoru ile bağlanma afinite çalışmaları

İrem GÜRBÜZASLAN

Yüksek Lisans Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Tarlan MAMEDOV

Şubat 2021; 54 sayfa

Şarbon, *Bacillus anthracis* bakterisinin neden olduğu, hem insanları hem de hayvanları etkileyen ve tedavi edilmezse ölümlü sonuçlanan bir hastalıktır. Şarbona karşı güvenli, düşük maliyetli, uzun süreli stabil ve yüksek oranda immünojenik bir aşı geliştirmek çok önemlidir. *B. anthracis*'in rekombinant koruyucu antijeni (PA), Şarbona karşı potansiyel bir aşı adayıdır. Rekombinant protein ekspresyon sistemleri arasında yer alan bitkiler, diğer ekspresyon sistemlerine kıyasla düşük maliyetli ve uygun güvenlik profillerine sahip büyük biyo-fabrikalar olarak kullanılabilir. Bitkiler ökaryotik bir translasyon sonrası modifikasyon mekanizmasına sahip olduklarından, rekombinant proteinler, geçici gen ekspresyon yöntemi kullanılarak üretilebilir. Bununla birlikte, koruyucu antijen, bakteriyel bir proteindir ve konağında bir glikoprotein değildir. Mamedov ve ark. 2017'de yapılan çalışmalarda, biyolojik olarak aktif deglikosile edilmiş PA, koruyucu antijen PA ve peptid-N-glikosidaz F (PNGase F) enziminin birlikte ekspresyonu ile üretildi. Bu çalışmada, Endo H ile deglikosile edilmiş koruyucu antijen PA'nın ve ayrıca diğer PA varyantlarının, laboratuvarımızda bitki tarafından üretilen anti-PA83 monoklonal antikoru ve ayrıca ticari olarak satın alınan anti-PA mAb ile bağlanma afinite çalışmalarını gerçekleştirdik. Bitki tarafından üretilen Endo H ile deglikosile edilmiş PA83, PA83'ün diğer varyantlarıyla karşılaştırıldığında güçlü afinite göstermiştir. Ek olarak, *Nicotiana benthamiana*'da Endo H ile deglikosile edilmiş PA83'e karşı üretilen anti-PA83 mAb, ticari anti-PA mAb'ye kıyasla daha yüksek afinite gösterdi.

ANAHTAR KELİMELELER: Antijen-Antikor Afinitesi, *Bacillus anthracis*, Bitki Geçici Ekspresyon Sistemi, Deglikozile PA83, ELISA, *Nicotiana benthamiana*, Şarbon

JÜRİ: Prof. Dr. Tarlan MAMEDOV

Prof. Dr. Nedim MUTLU

Prof.Dr. Yaşar KARAKURT

ABSTRACT

Binding affinity studies of Endo H deglycosylated and different variants of PA83 antigens with anti-PA83 monoclonal antibodies

İrem GURBUZASLAN

Master's Degree Thesis, Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Tarlan MAMEDOV

February 2021; 54 pages

Anthrax is a disease caused by *Bacillus anthracis* bacteria that affects both humans and animals and results in death if left untreated. It is very important to develop a safe, low cost, long-term stable and highly immunogenic vaccine against anthrax. The recombinant protective antigen (PA) of *B. anthracis* is a potential vaccine candidate against Anthrax. Plants that are among the recombinant protein expression systems can be used as great biofactories with low cost and convenient safety profiles compared to other expression systems. Since plants have a eukaryotic post-translational modification mechanism, recombinant proteins can be produced using the transient gene expression method. However, the protective antigen is a bacterial protein and is not a glycoprotein in its host. In Mamedov et al. studies in 2017, biologically active deglycosylated PA was produced by the co-expression of protective antigen PA and peptide-N-glycosidase F (PNGase F) enzyme. In this study, we performed binding affinity studies of Endo H deglycosylated protective antigen PA and also other PA variants, with plant-produced anti-PA83 monoclonal antibody, produced in our lab and also commercially purchased anti-PA mAb. Plant produced Endo H deglycosylated PA83 showed strong affinity compared to other variants of PA83. In addition, anti-PA83 mAb produced against Endo H deglycosylated PA83 in *Nicotiana benthamiana* showed higher affinity compared to commercial anti-PA mAb.

KEYWORDS: Anthrax, Antigen-Antibody Affinity, *Bacillus anthracis*, deglycosylated PA83, ELISA, *Nicotiana benthamiana*, Plant Transient Expression System.

COMMITTEE: Prof. Dr. Tarlan MAMEDOV

Prof. Dr. Nedim MUTLU

Prof.Dr. Yaşar KARAKURT

ÖNSÖZ

Biyoterörizm masum insanlara yöneltilmiş sinsi bir araçtır. Virüslerin, bakterilerin veya diğer mikropların kasıtlı olarak salınmasıdır. Bir biyoterör saldırısı gerçekleşecek olsaydı, şarbona neden olan *Bacillus anthracis*, kullanılması en muhtemel

biyolojik ajanlardan biri olurdu. Çalışmamız sonucunda güvenli, düşük maliyetli, uzun süreli stabilite gösteren ve yüksek afiniteli bir aşı geliştirebilmeyi umuyoruz.

Öncelikle yüksek lisans eğitimim ve çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen kıymetli danışman hocam Prof.Dr.Tarlan MAMEDOV'a teşekkürlerimi sunarım.

Tarımsal Biyoteknoloji bölümünün tüm kıymetli hocalarına, deneysel çalışmalarım boyunca tüm zor anlarımda manevi ve teknik destekleriyle her zaman yanımda olan Damla YÜKSEL, Deniz SAY ve bölümümüzün tüm lisansüstü öğrencilerine teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman yanımda olan canım dostum Zir.Yük.Müh.Meltem MERKEZ ve Dr.Gülşah ÇALIŞKAN'a tüm destekleri için teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim öğretim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgeyemeyen hayatımda ki en kıymetli insanlar olan annem İlkay GÜRBÜZASLAN, babam Aydın GÜRBÜZASLAN, anneannem Özden GÜRBÜZ ve halam Nalan KARDAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım SİZİ ÇOK SEVİYORUM!

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	i
ÖNSÖZ	ii

AKADEMİK BEYAN	v
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	3
2.1 <i>Bacillus anthracis</i> ve Şarbon.....	3
2.2. Şarbon Toksin Kompleksi	5
2.3. Şarbon Tedavi Yöntemleri	7
2.3.1. Antibiyotik Tedavisi	7
2.3.2. Aşılama	7
2.4. Bitki Bazlı Geçici Ekspresyon Sistemleri ve Agroinfiltrasyon.....	8
2.5. Deglikozilasyon Stratejisi.....	10
3.MATERYAL VE METOT	14
3.1.Kullanılan Organizmalar	14
3.2.Kodon Optimizasyonu.....	14
3.3.Kullanılan Besiyerleri, Tampon Çözeltiler ve Diğerleri	14
3.4. 6-7 Haftalık <i>Nicotiana benthamiana</i> Bitkilerine <i>A. Tumefaciens</i> Aracılığı ile PA83 Varyantlarının İnfiltrasyonu	19
3.5. Western Blot ile Ekspresyon Analizi	21
3.6. Ni-NTA Afinite Kromatografisi (IMAC)	21
3.7. SDS-page ile Rekombinant Protein Miktar Analizi	23
3.8.Enzime Bağlı İmmüno-sorbent Testi Analizi ve Tamponları.....	24
3.9.Verilerin İstatistiksel Analizi.....	27
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	28
4.1. PA83 varyantlarının Western Blot ile Ekspresyon Analizi.....	28
4.2. PA83 Varyantlarının Saflaştırılması ve SDS-Page Analizi	29
4.3. PA83 varyantlarının ELISA Analizleri	31
4.3.1. Ticari anti-PA mAb ile PA83 Antijen Varyantlarının ELISA Analizleri....	31
4.3.2. Bitkide üretilen PA83 Antijen Varyantlarının Termal Stabilitate Örneklerinin Elisa Analizleri	35

4.3.3. Ticari anti-PA mAb ile PA83 Antijen Varyantlarının Termal ELISA Analizleri	35
4.3.4. Bitkide üretilen anti-dPA83(E) mAb ile PA83 Antijen Varyantlarının Termal ELISA Analizleri	37
4.4. İstatistiksel Analizler	39
4.4.1. Ticari anti-PA mAb ile gPA83, dPA83(E), dPA83(P) ve PA83-MQ2 Antijenlerinin Konsantrasyon Değişkenleri Arasında Anova Analizi.....	39
4.4.2. Bitkide Üretilen anti-dPA83(E) mAb ile gPA83, dPA83(E), dPA83(P) ve PA83-MQ2 Antijenlerinin Konsantrasyon Değişkenleri Arasında Anova Analiz.....	44
4.4.3. Ticari anti-PA mAb ve Bitkide Üretilen anti-dPA83(E) mAb göre Konsantrasyonlar ile Antijenler(gPA83, dPA83(E), dPA83(P) ve PA83-MQ2) Arasındaki Farkın Ortaya Konulması İçin Independent Sample T Testi	48
5. SONUÇLAR	51
6. KAYNAKLAR	53
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “ Endo H ile deglikozile edilmiş PA83 ve PA83 antijenlerinin farklı varyantlarının anti-PA83 monoklonal antikorları ile bağlanma afinite çalışmaları ” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

25./02/2021

İrem GÜRBÜZASLAN



g	: Gram
L	: Litre
μ l	: Mikrolitre
μ g	: Mikrogram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
M	: Molar

Kısaltmalar

Asn	: Asparajin ($C_4H_8N_2O_3$)
Anti-PA83	: Koruyucu Antijene özgü Antikor
BSA Standart	: Bovine Serum Albumin Protein Standartı
dG-anti-PA83(E)	: Endo H deglikozilasyon enzimi ile kesilen deglikozile anti-PA83
dG-anti-PA83(P)	: PNGase F deglikozilasyon enzimi ile kesilen deglikozile anti-PA83
dPA83(E)	: Endo H deglikozilasyon enzimi ile kesilen deglikozile PA
dPA83(P)	: PNGase F deglikozilasyon enzimi ile kesilen deglikozile PA
EF	: Ödem Faktörü,
ELISA	: Enzim bağlı immünosorbent deneyi
Endo H	: Endo- β -N-asetilglukosaminidaz H
ETx	: Ödem Toksini
GlcNAc	: N-Asetil-D-glukozamin
gPA83	: Glikozile Koruyucu Antijen
G-anti-PA83	: Koruyucu Antijene özgü üretilen glikozile Antikor
kb	: Kilobaz
kDa	: Kilodalton
LF	: Öldürü Faktör

LeTx	: Öldürücü Toksin
mAb	: Monoklonal Antikor
O.D.	: Optik Dansite
PA	: Koruyucu Antijen (83 kDa)
pH	: Çözeltinin asitlik veya bazlık derecesi
PNGase F	: Peptide-N-glycosidase F
pp-PA83	: Bitkide üretilmiş Koruyucu Antijen
rPA	: Rekombinant Koruyucu Antijen
s	: Saat
SDS Page	: Sodyum Dodesil Sülfat-Poli Akrilamid Jel Elektroforezi
sn	: Saniye
V	: Volt
CV	: Kolon hacmi
Xg	: Rölatif santrifüj kuvveti

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kolda merkezi depresif, etrafı vezikül dolu hemorajik sıvı ve eritem ile karakterize edilen hafif kutanöz şarbonun tipik görünümü.....	4
Şekil 2.2. Şarbon (<i>Bacillus anthracis</i>) bulaşma şekli	5

Şekil 2.3. Şarbon toksinin patolojiye neden olma mekanizması <i>Bacillus anthracis</i> sporları filizlenir ve öldürücü faktör ve PA salgılar.....	6
Şekil 2.4. Agroinfiltrasyon mekanizması.....	10
Şekil 2.5. Bitkilerde ve insanlarda N-glikan yapılarının şematik gösterimi.....	11
Şekil 2.6. Enzim bağlı immünosorbent deneyi(ELISA) çeşitleri	12
Şekil 3.1. <i>Nicotiana benthamiana</i> bitkisine uygulanan agroinfiltrasyon işlemi	20
Şekil 3.2. Polihistidin etiketli proteinleri saflaştırmak için şematik çalışma akışı	22
Şekil 3.3. Analizde kullanılan PVC mikrotitre plakası.....	25
Şekil 4.1. <i>Nicotiana benthamiana</i> da üretilen rekombinant PA83 varyantlarının ekspresyon analizi	28
Şekil 4.2. IMAC ile saflaştırılan rekombinant PA83 varyantlarının SDS-Page Analizi.	29
Şekil 4.3. IMAC ile saflaştırılan rekombinant PA83 varyantlarının SDS-Page Analizi.	30
Şekil 4.4. 96 oyuklu ELISA plakasındaki proteinlerin yükleme şeması	31
Şekil 4.5. 96 oyuklu ELISA plakasındaki proteinlerin yükleme şeması (Termal)	34

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. SDS-PAGE için 10% Poliakrilamid jel hazırlanması.....	18
Çizelge 3.2. PA83 varyantlarının infiltrasyonu için <i>A. tumefaciens</i> kombinasyonları..	20

Çizelge 4.1. (a,b) PA83 varyantlarının ticari bir anti-PA mAb ile karşılaştırmalı afinite çalışmaları.....	32
Çizelge 4.2. (a,b) PA83 varyantlarının bitkide üretilen bir anti-dPA(E) mAb ile karşılaştırmalı afinite çalışmaları	33
Çizelge 4.3. (a,b) Farklı sıcaklıklarda inkübe edilen PA83 varyantlarının ticari bir anti-PA mAb ile karşılaştırmalı afinite çalışmaları.....	35
Çizelge 4.4. (a,b) Farklı sıcaklıklarda inkübe edilen PA83 varyantlarının Bitkide üretilen anti-dPA83(E) mAb ile karşılaştırmalı afinite çalışmaları.....	37
Çizelge 4.5. Ticari anti-PA mAb ile gPA83, dPA83(E), dPA83(P) ve PA83-MQ2 Antijenlerinin Konsantrasyon Değişkenleri arasındaki Anova Analiz Sonuçları.....	40
Çizelge 4.6. Sabit Konsantrasyonlarda gPA83, dPA83(E), dPA83(P) ve PA83-MQ2 Antijenlerinin arasındaki Anova Analiz Sonuçları.....	42
Çizelge 4.7. Bitkide Üretilen anti-dPA83(E) mAb ile gPA83, dPA83(E), dPA83(P) ve PA83-MQ2 Antijenlerinin Farklı Konsantrasyonlarda Anova Analiz Sonuçları.....	44
Çizelge 4.8. Bitkide Üretilen anti-dPA83(E) mAb ile gPA83, dPA83(E), dPA83(P) ve PA83-MQ2 Antijenlerinin Sabit Konsantrasyonlarda Anova Analiz Sonuçları.....	46
Çizelge 4.9. Ticari anti-PA mAb ve Bitki de Üretilen anti-dPA83(E) mAb aynı antijenler üzerindeki etkisi İnpedent Sample T Test Sonuçları.....	48

1. GİRİŞ

Şarbon'a yol açan, *Bacillus anthracis*, hem insanları hem de hayvanları etkileyen akut bir hastalıktır. Şarbona neden olan organizma olan *Bacillus anthracis*, adını, siyah, kömüre benzer kutanöz eskarlara neden olma kabiliyeti nedeniyle Yunanca kömür kelimesinden alır. Büyük gram pozitif, aerobik, spor taşıyan, $1-1,5 \times 3-10 \mu\text{m}$ büyüklüğünde bir basildir (Baillie L. vd 2001).

Şarbon, üç farklı enfeksiyon türünde kendini gösterebilir. Maruziyet yoluna bağlı olarak: kutanöz, gastrointestinal ve inhalasyon. İnsanlar ve hayvanlardaki belirtileri benzerdir. Kutanöz şarbonu, daha çok kontamine hayvan derilerine temas edilmesi, aşınma, kesik veya olası böcek ısırığı yoluyla ortaya çıkar ve en yaygın görülen şarbon tipidir. Deri üzerinde birkaç gün içerisinde 1-3 cm çapında siyah yaralar oluşur. Yara acısızdır ancak ateş yüksekliği, mide bulantısı ve kusmaya neden olabilir. Tedavi edilmez ise ölümlü sonuçlanabilir (Dixon vd. 1999).

Şarbonlu hayvanların etlerinin yenmesiyle gastrointestinal şarbon ortaya çıkar. Etlerin iyi pişmemiş olması ya da çiğ tüketilmesi, önemli bir faktördür. Gastrointestinal şarbona ilk semptomlar mide bulantısı, kusma, iştahsızlık ve ateştir. Hastalık ilerledikçe şiddetli karın ağrısı, hematemez ve kanlı ishal meydana gelir, ardından septisemi ve ölüm gelir. Erken tanı konulursa hastalar tedavi edilebilir, ancak spesifik olmayan prezentasyon nedeniyle tanı zordur ve bu da yüksek bir ölüm oranına neden olur (Ndyabahinduka DG vd. 1984). Inhalasyon şarbonunda solunum yoluyla alınan mikrop, akciğerlere yerleşir. Burada yara oluşur ve nefes almada problemler ortaya çıkar. Bakteri vücuda girdikten 5 gün sonra soğuk algınlığı benzeri belirtiler görülür. Kısa süre içerisinde lenf bezleri şişer ve nefes almakta zorluk çekilmeye başlar. Akciğer şarbonuna yakalanan kişiler, erken tedavi edilmediği takdirde ölüm kaçınılmazdır (Kuo SR, Willingham MC vd. 2008).

B. anthracis üç toksin proteini salgılar: ödem faktörü (EF, kalmodüline bağımlı bir adenilat siklaz), öldürücü faktör (LF, bir metaloproteaz) ve iki AB tipi toksin oluşturmak için ikili kombinasyonlarda hareket eden koruyucu antijen (PA), ödem toksini (ET = PA + EF) ve ölümcül toksin (LeTx = PA + LF). Hücre yüzeyine bağlandıktan sonra PA, furin tarafından proteolitik olarak bölünür, bu da 20 kDa'lık bir protein fragmanının salınmasına ve 63 kDa'lık fragmanların bir ön gözenek oluşturmak üzere heptamerizasyonuna neden olur. Heptamerize PA, LF veya EF'yi bağlar ve ekzotoksinin sitoplazmaya girişini kolaylaştırarak hücre ölümüne yol açar (Mamedov vd. 2016; Molloy vd. 1992).

Halihazırda, 1972'de lisanslı olan Anthrax Vaccine Adsorbed (BioThrax®), ABD'deki tek ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) lisanslı insan şarbon aşısıdır. Aşı, mikroaerofilik hücresiz filtratlardan hazırlanan 83-kDa PA proteinini içerir. bir adjuvan olarak alüminyum hidroksit jele adsorbe edilmiş, kapsüllenmemiş *B. anthracis* süşunun kültürlerini içerir. BioThrax'ın ana dezavantajları, aşının, anafilaksi ve hatta ölüm dahil olmak üzere potansiyel olarak ciddi alerjik reaksiyonlara neden olabilen LF ve EF dahil diğer şarbon proteinlerini içerebilmesidir. Ek olarak, aşı yalnızca sınırlı bir koruma sağlar ve koruyucu bağışıklık elde etmek için uzun bir uygulama süreci gerektirir (Mamedov vd. 2016).

Bu dezavantajlar, son yıllarda rekombinant canlı ve rekombinant alt birim aşuları dahil olmak üzere yeni, ikinci nesil şarbon aşuları geliştirme çabalarının artmasına yol açmıştır. En gelişmiş aşı adayları, *Escherichia coli*'de eksprese edilen ve ondan saflaştırılan rekombinant PA'ya (rPA) veya asporojenik, toksijenik olmayan, kapsüllenmemiş *B. anthracis*'in suşundan hazırlanan PA'ya dayanır (Gomord V. ve Faye L. 2004). rPA bazlı aşuların hayvanlarda yüksek titreli anti-PA toksin nötralize edici antikor (TNA) tepkileri indüklediği ve tavşanları ve insan olmayan primatları ölümcül *B. anthracis* tehdidine karşı koruduğu gösterilmiştir; bununla birlikte, bazı çalışmalarda koruma 6 ila 12 ayda dramatik bir şekilde azalmıştır, bu da daha güçlü, daha sağlam ve uzun süreli bağışıklığı indükleyebilecek aşı formülasyonlarına ihtiyaç olduğunu gösteriyor (Pitt M. vd 2001).

Heterolog ekspresyondaki gelişmeler, alt birim rPA bazlı aşı adayları dahil olmak üzere rekombinant proteinlerin üretimi için alternatif bir platform olarak bitkilerin kullanımına olan ilgiyi tetiklemiştir. Bitkiler, memeli patojenlerini barındırmadıkları için güvenlik avantajları ve paslanmaz çelik fermenterler gerekmediğinden maliyet ve ölçeklenebilirlik avantajları vardır. Ek olarak, bitki hücreleri, memeli hücrelerinde bulunanlara önemli ölçüde benzer olan N-bağlantılı glikozilasyon dahil olmak üzere hedef proteinlerin ökaryotik post-translasyonel modifikasyonlarını gerçekleştirir (Gomord V. ve Faye L. 2004). Rekombinant PA, altı potansiyel N-bağlantılı glikozilasyon bölgesi içermesine rağmen, doğal konağında glikozile edilmez. Bu glikozilasyon, proteinin maskelenmesi veya yanlış katlanması nedeniyle belirli anahtar epitopların mevcudiyetini etkileyebilir.

Mamedov vd 2016'da yapılan bir çalışmada; Terapötik proteinler enzimatik deglikozilasyon stratejisi kullanılarak geçici bir bitki ekspresyon sisteminde güçlü bir strateji olduğu olduğunu kanıtlamışlardır. Bakteriyel deglikozilasyon enzimi olan PNGase F ile PA83 proteinin *In vivo* olarak *Nicotiana benthamiana* biyofabrikasında geçici ekspresyon sağlanmıştır. Bitki tarafından üretilen deglikozile PA83'ün, yine bitki tarafından üretilen glikozile PA83 formu ile karşılaştırıldığında, immünize edilmiş farelerde daha yüksek seviyelerde toksin nötrleştirici antikor titreleri sağladığı bulunmuştur.

Bitki bazlı geçici ekspresyon sistemi kullanılarak rekombinant alt ünite aşı adayları olan gPA83, dPA83(E), dPA83(P) ve PA83-MQ2 üretilmiştir. Yürütülen tez çalışması kapsamında Endoglikozidaz H enzimi ile deglikozile olan PA83 varyantı antijenin, ticari anti-PA mAb ve bitkide üretilen anti-PA83(E) mAb'ye karşı diğer muadillerine kıyasla daha yüksek afinite gösterdiği kanıtlanmıştır. Sonuçta, dPA83(E)'nin şarbona karşı güvenli, etkili ve düşük maliyetli bir alt ünite aşısı için iyi bir aday olabileceğini göstermektedir.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. *Bacillus anthracis* ve Şarbon

Bacillus anthracis tarafından üretilen şarbon, vahşi hayvanlarda ve bazı kümes hayvanlarında keçi, koyun, sığır, at ve domuz gibi insanlara bulaşabilen zoonotik bir hastalıktır (Hugh-Jones ve Vos 2002). *B. anthracis* patojeni gram-pozitif, spor oluşturan, hareketsiz ve çubuk şeklindeki bir bakteridir (Marcus H. vd 2004). Vejetatif formları olumsuz çevresel koşullara dayanıklı değildir. Ajan hava ile temas ettikten sonra spor formuna dönüşür. Hastalık, kontamine su veya besin maddeleri ile şarbon sporları alan hayvanlardan bulaşır. Enfeksiyon insidansı kuru havalarda tozun solunması veya yağmurlu havalarda aşırı otlatma ile artabilir. Nefes teması, doğrudan temas ve hayvanlar arasındaki kontaminasyon nadirdir. Bazen batma sineklerinin doğrudan bulaşmada rol oynayabileceği bildirilmiştir. *Bacillus anthracis*, toprakta taşınan bir bakteridir. En iyi kalsiyum içeren siyah bozkır topraklarında ve pH: 5.0-8.0 seviyelerinde yaşar. Endemik şarbon alanları, daha yüksek sıcaklıklar, daha yüksek toprak nem içeriği ve topografya ile ilişkilendirilmiştir (Van Ness G. ve Stein CD. 1956).

B. anthracis'in neden olduğu şarbon, oldukça bulaşıcı ve ölümcüldür. Şarbonun insanlık tarihi ile uzun bir ilişkisi vardır ve Avrupa'da (MÖ 1190-1491) ve Çin'de (MÖ 3000) biliniyordu. Şarbon, Yunanlıların, Romalıların ve Hinduların literatüründe tanımlanmıştır. Şarbon adı, kömür siyahı deri lezyonları şarbonun kutanöz formunda olduğu için kömür anlamına gelen Yunanca "anthrakis" kelimesinden türemiştir.

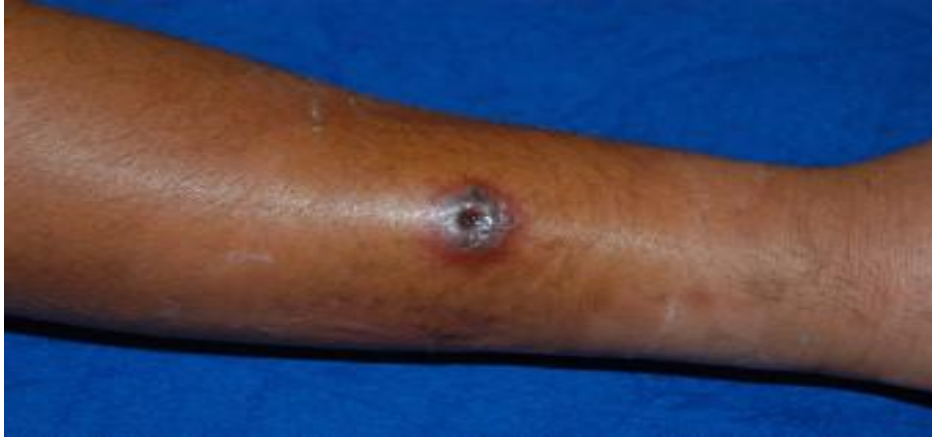
Bacillus anthracis'in vejetatif formları kimyasal ve fiziksel etkimelere karşı çok az dirençlidir. Vejetatif basiller 55-58°C'de 10-15 dakika içinde ölmektedir. Kadavralarda anaerobik kokuşmayla 2-3 günde ölürlür. Antraks basilinin sporlarının ise fiziksel metotlarla öldürülmesi, % 0.5 sodalı suda kaynatmakla, otoklavda 121°C'de 15 dakikada veya kuru ısı ile 120-130°C'de 1-2 saatte sağlanır. Toprakta doğal olarak bulunan şarbon sporları ısıya, ultraviyole ışığa, gama ışınlamasına ve birçok dezenfektana karşı oldukça dirençlidir. Şarbon sporları yaklaşık 1-2 milimetre çapındadır, bu da alveolar alanlarda nefes almalarına izin verir (Wang ve Roehrl 2005). Bu küçük ve dayanıklı sporlar, bombalar, füzeler ve uçaklarla kolaylıkla dağılabilir ve büyük popülasyonlara aerosol haline getirilebilir. Böylece dirençli sporlar yıllarca bulaşıcı kalır.

Biyolojik saldırı (biyoterörizm), insanları, hayvanları veya ekinleri hasta edebilen/öldürebilen virüslerin, bakterilerin veya diğer mikropların kasıtlı olarak salınmasıdır. Şarbona neden olan bakteri olan *Bacillus anthracis*, biyolojik bir saldırıda kullanılması en olası araçlardan biridir (CDC, Centers for disease control and prevention). Teröristler tarafından yayılan sporların solunması biyolojik savaşta önemli bir bulaşma şeklidir. Biyoterörizmde şarbon sporlarının olası kullanımı günümüzde büyük bir endişe kaynağıdır. Biyoterörizmdeki silah dereceli şarbon sporları, kitle etkisi için bir aerosol olarak veya sınırlı spor yayılması ve mektuplar veya paketler aracılığıyla kontaminasyon yoluyla dağıtılabilir (FBI, 2001 Anthrax Attacks).

Şarbonun etki ettiği duruma göre dört farklı tipi bulunmaktadır. Bulaşma yoluna bağlı semptomlar: kutanöz şarbon, enjeksiyon şarbonu, inhalasyon(solunma, akciğer) şarbonu, gastrointestinal şarbon. Kutanöz şarbon, insan şarbon tiplerinin % 95'ini oluşturur, hastalık vakalarının yaklaşık % 5'i inhalasyon yoluyla şarbonudur. Bu şiddetli

hastalık, aerosol haline getirilmiş sporların solunması ile bulaşan, yaklaşık % 86-89'luk bir ölüm oranına sahiptir (Hull ve diğerleri 2005).

Cilt şarbonu, şarbonun kutanöz (deri) formu, kırmızı, kabarcıklar ve yavaş yavaş sertleşen kırmızı kahverengi kabarık lekelerle başlar. Lekenin ortasında kanlı bir akıntı ve kola adı verilen siyah bir kabuk olan ülser bir krater vardır. Genel olarak kutanöz lezyonlar bir tanedir, ancak bazen iki veya daha fazla lezyon mevcut olabilir. Örneğin enfekte bir ölü hayvanın derisini yüzenlerde, çoklu lezyonlar; ellerde, bileklerde veya kollarda görülebilir. Belirtiler arasında kas ağrıları, baş ağrıları, ateş, bulantı ve kusma yer alır. Hastalık genellikle yaklaşık altı haftada düzeler ancak hasta uygun antibiyotikleri almazsa ölüme neden olabilir.

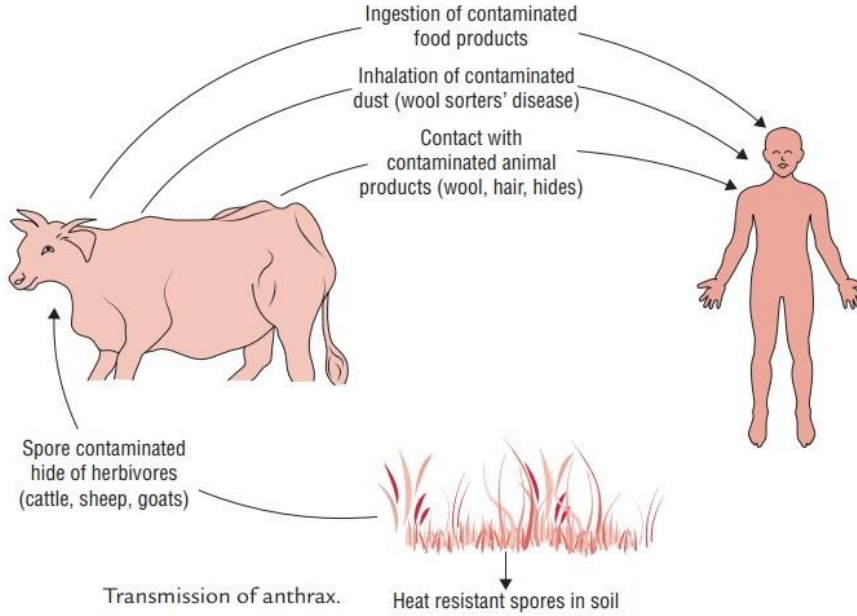


Şekil 2.1. Kolda merkezi depresif, etrafı vezikül dolu hemorajik sıvı ve eritem ile karakterize edilen hafif kutanöz şarbonun tipik görünümü (CDC)

Enjeksiyon şarbonu, bu yeni şarbon türü, kuzey Avrupa'da eroin enjekte eden uyuşturucu kullanıcılarında tespit edilmiş ve henüz Amerika Birleşik Devletleri'nde rapor edilmemiştir. Belirtilerin ortaya çıkması günler ile aylar sürebilir. Enjeksiyon şarbonunun belirti ve semptomları, enjeksiyon bölgesinde kaşıntı yapabilen küçük kabarcıklar veya şişlikler, ateş ve titreme, yaraların etrafında şişlik ve deri veya kas altında derin apseler olabilir. Siyah merkezli ağrısız cilt yaraları (koyu kabuklar), kabarcıklar veya şişlikler geliştikten sonra ortaya çıkabilir (CDC).

İnhalasyon(soluma) şarbonu, ilk semptomlar, boğaz ağrısı, baş ağrısı, grip benzeridir. Ancak birkaç gün içinde hastalık kötüleşir; nefes darlığı ve göğüs ve / veya kaslarda ağrı ile birlikte ciddi solunum sıkıntısı olabilir. Bazı hastalar kan öksürmeye başlayabilir. Bunu şok, koma ve ölüm izler. Soluma şarbonu gerçek bir zatürreye neden olmaz. Aslında, sporlar akciğerlerde makrofaj adı verilen çöpçü hücreler tarafından toplanır. Sporların çoğu bu şekilde öldürülür. Ancak bazıları hayatta kalır ve göğüsteki lenf düğümleri adı verilen bezlere taşınır. Lenf düğümleri şişebilir. Lenf düğümlerinde hayatta kalan sporlar çoğalır, ölümcül toksinler üretir ve vücuda yayılır. Göğüste bu lenf düğümlerinde şiddetli kanama ve doku ölümü (nekroz) meydana gelir. Oradan hastalık bitişik akciğerlere ve vücudun geri kalanına yayılır. Soluma şarbonu çok ciddi bir hastalıktır ve maalesef etkilenen bireylerin çoğu uygun antibiyotikler alsalar bile ölür. Antibiyotikler bakterileri öldürmede etkilidir, ancak şarbon bakterileri tarafından salınan ölümcül toksinleri yok edemezler (Wang ve Roehrl 2005).

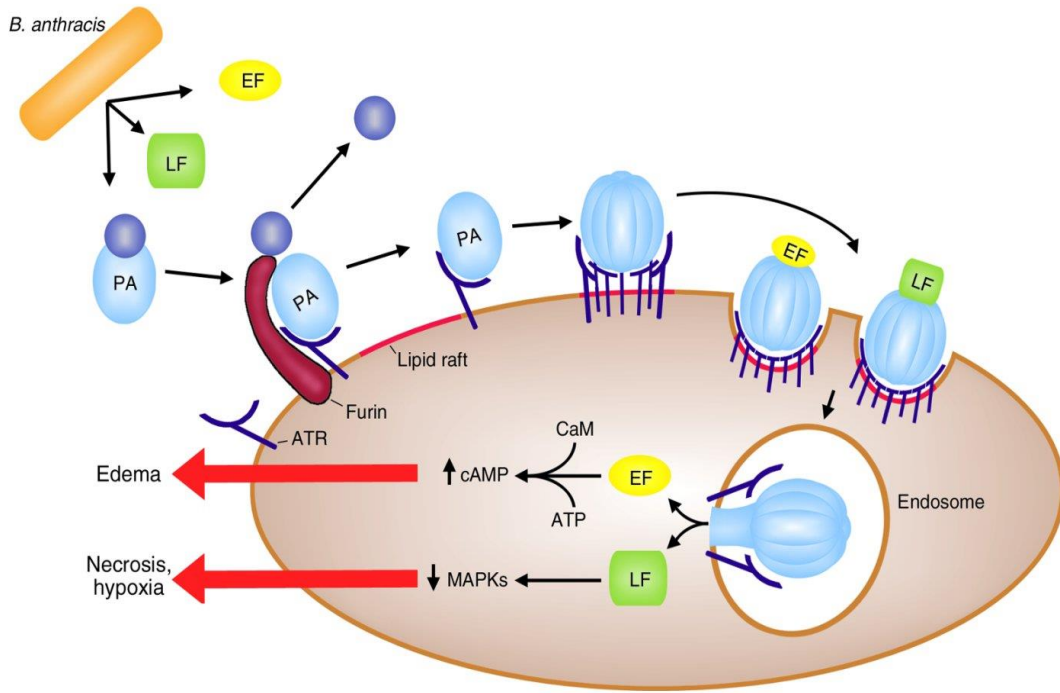
Gastrointestinal şarbon (bağırsak şarbonu), az pişmiş, kontamine et yemenin sonucudur. Bu şarbon türünün semptomları arasında mide bulantısı, iştahsızlık, kanlı ishal, ateş ve ardından karın ağrısı bulunur. Bakteriler bağırsak duvarını istila eder. Daha sonra enfeksiyon, ölümcül toksisite ile kan dolaşımı (septisemi) yoluyla vücuda yayılır. Enfeksiyon genellikle 1 ila 7 gün sonra gelişir. Tedavi olmaksızın, gastrointestinal şarbonlu hastaların yarısından fazlası ölür. Bununla birlikte, uygun tedavi ile hastaların % 60'ı ancak hayatta kalır.



Şekil 2.2. Şarbon (*Bacillus anthracis*) bulaşma şekli

2.2. Şarbon Toksin Kompleksi

Şarbonun patofizyolojisinde rol alan patolojik etkenler LT, öldürücü toksin; eT, ödem toksini; ANTXR1 / 2, düşük (ANTXR1, önceden tümör endotelial markörü) veya yüksek (ANTXR2, daha önce kapiler morfojeniz proteini) tip 1 transmembran reseptörleri; LRP6, düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü ile ilgili protein 6; MAPKK, mitojenle aktive olan protein kinaz kinazlar; CReB, cAMP tepki elemanı bağlayıcı protein; CRe, cAMP-tepki elemanları; cAMP, siklik adenosin monofosfat. Şarbon genomu, kovalent olarak kapalı tek bir kromozomdan oluşur. Sırasıyla immünolojik olarak inert kapsülün ve şarbon toksininin sentezlenmesinden sorumlu iki virülan plazmit, pXO1 ve pXO2 içerir. 15 Kapsül, poli- γ -D-glutamil amino asitlerden oluşur ve bakterileri fagositozdan korur (Read TD. vd. 2003 ve Jefferds MD. vd. 2001).



Şekil 2.3. Şarbon toksinin patolojiye neden olma mekanizması. *Bacillus anthracis* sporları filizlenir ve öldürücü faktör ve PA salgılar (Alice S. 2003)

- Başlangıçta PA, 83 kDa'lık bir monomerdur.
- PA 83, konakçı hücrede ANTXR1 / 2 transmembran reseptörlerine bağlanır değildir (Lacy & Collier, 2002).
- Bir hücre yüzeyi proprotein konvertazı olan Furin, PA 83'ü PA 20 ve PA 63 fragmanlarına ayırır. PA 20 fragmanı ayrılırken PA 63 reseptöre bağlı kalır.
- Proteolitik olarak işlenmiş PA 63 monomerleri, bir heptamerik veya oktamerik PA ön gözeneği halinde birleşir. PA ön gözenekleri, üç veya dört ölümcül faktör veya monomer bağlayabilir (Moayeri vd, 2003).
- Prepore kümeleri, reseptör aracılı endositoz yoluyla LRP6 koreseptörü ile veya olmadan içselleştirilir ve bu da endozom oluşumu ile sonuçlanır.
- Endozomun asitleştirilmesi, bir transmembran iletim gözeneğine ön gözenekli dönüşümle sonuçlanır (Moayeri vd, 2003).
- Hücre içinde öldürücü faktör ve ödem faktörünün salınması. Bir çinko metaloproteinaz olan ölümcül faktör, MAPKK'yi inaktive ederek, lenfosit aktivasyonunun bozulmasına, B hücresi proliferasyonuna ve ayrıca sitozolik inflammasom yolunun aktivasyonu yoluyla makrofaj apoptozuna neden olur (Moayeri vd, 2003).
- Kalsiyum bağımlı ve kalmodüline bağımlı bir adenilat siklaz, hücre içi cAMP'yi artırarak cAMP yanıt genlerinin aktivasyonu ile sonuçlanır. Enfekte makrofajların lenf düğümlerine göçünün yanı sıra T hücresi aktivasyonunun inhibisyonu, bozulmuş fagositoz, oksidatif patlama ve sitokin düzensizliği uyarılır. cAMP, ödeme yol açan vazodilatasyona neden olur (Moayeri vd, 2003).

2.3. Şarbon Tedavi Yöntemleri

2.3.1. Antibiyotik tedavisi

Hayvanlarda veya insanlarda doğal olarak edinilmiş şarbon vakalarından elde edilen herhangi bir taze *B. anthracis* izolatının penisiline duyarlı olma olasılığının çok yüksek olduğu varsayılabilir. Organizma aynı zamanda çok sayıda diğer geniş spektrumlu antibiyotiğe duyarlıdır. Penisilin kullanımının kontrendike olması durumunda, aminoglikozidler, makrolidler, kinolonlar ve tetrasiklinler arasında çok çeşitli alternatif seçenekler mevcuttur. Kloramfenikolün tatmin edici bir alternatif olduğu ve in vitro duyarlılık gösterdiği belirtilmiştir, ancak ilk deneysel çalışmalarda Lincoln ve ark. (1964) farelerde veya maymunlarda etkili olmadığını buldu. Vankomisin, klindamisin, klaritromisin, rifampin, levofloksasin, gatifloksasin, moksifloksasin, ofloksasin, imipenem, sefazolin ve linezolid, şarbon mektubu olaylarından sonra yayınlanan makalelerde, in vitro hassasiyetleri temelinde değerlendirmeye değer olarak adlandırılmıştır (Sejvar vd, 2005). Şarbondaki ölümün temeli toksindir. Antibiyotiklerin erken uygulanmasının önemi hala vurgulanmalıdır; çok geç uygulandığında enfeksiyonu temizleyebilirler ancak yine de hasta insanı veya hayvanı kurtaramazlar (Baggett HC vd, 2005).

2.3.2. Aşılama

Şarbon hastalığından aşılardan korunmak, en uygun tedavi biçimlerinden biridir. Koruyucu antijen (PA), şarbon toksininin üç bileşeninden biridir. Moleküler ağırlığı 83 kDa olan, salgılanan toksik olmayan bir proteindir ve şu anda ruhsatlı insan şarbon aşısının ana bileşenidir. İlk hayvan aşısı 1881'de bulunurken, insan aşıları yirminci yüzyılın ortalarında geliştirilmeye başlandı. Şarbon sporlarının biyolojik ajan olarak kullanılmasıyla ortaya çıkan şarbon tedavisi için aşılar, 1940'larda insan kullanımı için geliştirilmeye başlandı. 1972'de lisanslı Adsorbe Edilen Şarbon Aşısı (BioThrax®), ABD'deki tek ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) lisanslı insan şarbon aşısıdır. Aşı; mikroaerofilik hücresiz filtratlardan hazırlanan 83 kDa PA proteinini içerir (Schneemann ve Manchester 2009) bir avirulent, kapsüllenmemiş B suşunun kültürleri bulunur. Adjuvan olarak alüminyum hidroksit jeline adsorbe edilmiş anthracis . BioThrax'ın ana dezavantajları, aşının, anafilaksi ve hatta ölüm dahil olmak üzere ciddi alerjik reaksiyonlara neden olabilecek LF ve EF dahil olmak üzere başka şarbon proteinleri içerebilmesidir. Ek olarak, aşı yalnızca sınırlı koruma sağlar ve koruyucu bağışıklık elde etmek için uzun bir uygulama süreci gerektirir (Mamedov 2016).

Koruyucu antikolarla pasif aşılama, şarbonun mevcut maruziyet sonrası tedavisini arttırmak için çekici bir seçeneği temsil eder, çünkü konakçı tepkisine bağlı olmayan anında ve kapsamlı koruma sağlayabilir. PA'nın şarbon patofizyolojisindeki merkezi rolü, onu mükemmel bir terapötik hedef haline getirir. PA bazlı insan şarbon aşısı veya saflaştırılmış PA ile aşılama, koruyucu bir immün yanıtın oluşmasına neden olur. PA'ya karşı poliklonal antikolarla pasif immünizasyon, *B. anthracis* sporları ile mücadeleye karşı oldukça koruyucudur. Bu antikolar,

- (i) Reseptör bağlanması inhibisyonu,

- (ii) PA heptamer oluşumuna müdahale,
- (iii) LF veya EF'nin PA'ya bağlanmasına müdahale gibi farklı mekanizmalarla PA'yı nötralize eder,
- (iv) PA'nın PA63'e enzimatik bölünmesinin tıkanması
- (v) ve bir süper kompleks oluşumu yoluyla önceden oluşturulmuş PA heptamerinin bozulması(Felows P.F. vd. 2001)

2.4. Bitki Bazlı Geçici Ekspresyon Sistemleri ve Agroinfiltrasyon

Son yıllarda yapılan çok sayıda çalışma, bitki bazlı geçici ekspresyon sisteminin yüksek ekspresyon kapasitesine sahip olduğunu ve kısa bir zaman çerçevesi içinde değerli rekombinant proteinlerin güvenli, hızlı ve ucuz üretimini sağladığını göstermiştir. Bitki ekspresyon sistemleri, hayvanlarda patojenlere karşı pasif koruma sağlayabilen fonksiyonel rekombinant antijenler üretmek için etkili sistemlerdir. Antijenler memeli ekspresyon sistemlerinde sentezleri sırasında insan patojenleri ile kontamine olabilir, ancak bitki ekspresyon sistemi, insan patojenleri için herhangi bir risk taşımaz (Yusibov ve Mamedov 2010).

Koruyucu antijen (PA), şarbon toksininin üç bileşeninden biridir. Moleküler ağırlığı 83 kDa olan PA, toksik olmayan bir proteindir ve şu anda ruhsatlı insan şarbon aşısının ana bileşenidir. *Nicotiana benthamiana* bitkilerinde bitki viral vektör tabanlı geçici ekspresyon, çeşitli bulaşıcı hastalıklara karşı rekombinant aşı adaylarının zaman ve maliyet açısından verimli bir şekilde üretilmesinde başarıyla kullanılmıştır (Mett vd, 2011).

Agrobacterium tumefaciens'in tanımlanmış bir DNA segmentini (T-DNA) bitki çekirdeğine transfer etme kabiliyetinden yararlanılarak (Gelvin vd, 2003), bitkilerin moleküler genetik modifikasyonu çoğunlukla ikili vektör sistemleri kullanılarak gerçekleştirilir. Bu vektörler iki kısımdan oluşur: ilk bileşen, bitki hücrelerine aktarılan T-DNA içeren kasettir; İkinci bileşen, her ikisi için plazmid replikasyon işlevlerini taşıyan vektör omurgası, bir *Escherichia coli* ve *A. tumefaciens* (plazmid mobilizasyon fonksiyonları kodlayan, isteğe bağlı olarak bakteri ve seçilebilir marker genleri, gen). Son zamanlarda *Nicotiana benthamiana* tercih edilen deneysel bitki konakçısı haline gelmiştir (Goodin ve diğerleri, 2008). Bitkilerde anlatım için vektör sistemlerinin oluşturulmasında kendi kendini kopyalayan virüslerde bulunan dizilerden yararlanılır. Kendi kendine çoğalan viral vektörlerin temel olarak birkaç farklı bitki virüsü kullanılmıştır: Tobacco mosaic virus (TMV), Potato X virus (PVX), Cowpea mosaic virus (CPMV), Tobacco etch virus (TEV). Bu tür vektörler, *Agrobacterium* süspansiyonları ile yaprak dokusunun infiltrasyonu sırasında vektörün bitki hücrelerine aktarılması için bir araç temin eden bir ikili plazmidin T-DNA kısmı içine yerleştirilebilir.

Bakteriler, santrifüjlenir ve pelletler OD: 1.0 olacak şekilde MMA ile yeniden süspense edilir. Kültürler daha sonra 2–4 saat oda sıcaklığında hafif sallama ile inkübe edilir. Bakteriler, künt uçlu plastik bir şırınga kullanılarak ve hafif basınç uygulanarak 6-8 haftalık bitkilerin yapraklarının alt tarafına verilir.

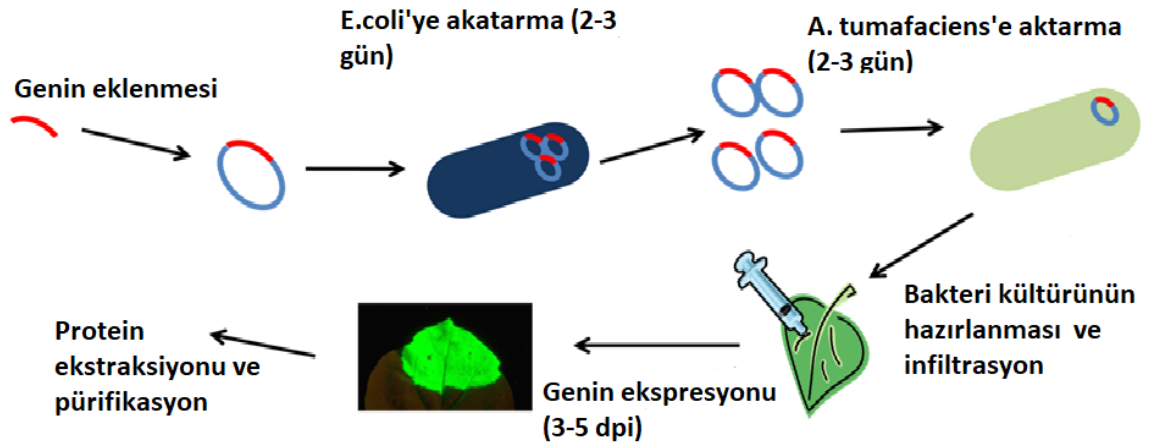
Genel olarak, elektroporasyon yoluyla iletilen geni içeren *agrobacterium*, agroinfiltrasyon olarak bilinen bir işlem olan fiziksel veya vakum infiltrasyon yoluyla hücre dışı yaprak boşluklarına sokulur (Norkunas vd, 2018). Agroinfiltrasyon, hedef geni

şırınga ile yaprak alanına taşıyan rekombinant *Agrobacterium* klonunun infiltrasyonuna dayanır. *Agrobacterium* suşu AGL1 tarafından taşınan geni kullanır. AGL1, elektroporasyon yoluyla *A. tumefaciens* suşlarına mobilize edilir. Rekombinant agrobakteriler, tek bir rekombinant bakteri kolonisi seçilerek sıvı BBL ortamında geliştirilir(OD:1.0 / 4.0 civarında) Kültürler, çalkalanarak (225rpm) 28°C'de gece boyunca inkübe edilir. Ardından hedef genlerin infiltrasyonu için MMA ortamında pellet hücrelerinin yeniden süspanse edilmesini içerir. *Agrobacterium* aracılı geçici dönüşüm, bitki savunma yanıtlarının bir sonucu olarak dokularda nekrotik yanıtlar ortaya çıkarabilir (Du ve diğerleri 2014).

Son yıllarda, aşı antijenleri, antikolar ve terapötik proteinler dahil olmak üzere rekombinant protein üretimi için bitkilerin kullanımında artan bir ilgi gözlemlenmiştir. Bitkiler, rekombinant terapötik proteinlerin biyolojik aktivitesi için gerekli olan ökaryotik post-translasyonel modifikasyonlar(PTM) dahil olmak üzere bir üretim platformu olarak çeşitli avantajlar sunar. Bitkiler ayrıca güvenli, düşük maliyetli ve N- glikozilasyon gerektirmeyen ilaçların ökaryotik tipte ifadesi nedeniyle mükemmel bir üretim sistemini temsil eder (Mett vd, 2011).

Rekombinant proteinler, bitkilerde kalıcı veya geçici ekspresyonda üretilir. Kalıcı ekspresyonda, yabancı DNA, sonraki nesiller boyunca kalıtsal hale gelir ve diğer ifade sistemlerinininkinden çok daha fazla gelişmiş ölçeklenebilirliğe izin verir. Bununla birlikte stabil transgenik bitki hatlarının üretilmesi, birkaç aydan bir yıla kadar sürebilen hat seçilmesi ve onaylanması işlemleri zaman verimliliği açısından yöntemin dezavantajıdır.

Bitkilerde rekombinant proteini ifade etmenin ikinci yöntemi geçici ekspresyon yoludur. Bu yöntemde, ilgilenilen geni barındıran virüs türevi vektörler, *A. tumefaciens* yoluyla, Agro İnfiltrasyon adı verilen bir işlemle tam gelişmiş bitkilere iletilir. Bitki genomuna entegre olmak yerine, verilen gen yapısı kısa bir inkübasyon süresinden sonra toplanıp izole edilebilen istenen proteinin geçici üretimine izin vermekte dir (Leuzinger 2013). Geçici olarak üretilen genler, bitki dokularının enfeksiyonundan 2-4 gün sonra maksimum seviyeyi gösterir ve daha sonra ekspresyon seviyesinde bir düşüş meydana gelir. Stabil ekspresyon konakçı genomda eksprese edilecek geni taşıyan T-DNA'nın entegrasyonu ile gerçekleştirilir ve üretim genleri bitki dokularının enfeksiyonundan 10-14 gün sonra artar (Krenek vd, 2015). Geçici gen ekspresyonu, kararlı dönüşüme kıyasla zaman verimliliği, kısa sürede yüksek ekspresyon seviyesi, ölçeklenebilirlik ve benzeri gibi bir dizi avantaja sahiptir. Hedef antikor için vektör içeren transkripsiyonel olarak aktif hedef gen, partikül bombardımanı, viral vektör enfeksiyonu veya *Agrobacterium* vektörlerini taşıyan hedef genin tütün yaprağı dokularına sokulma yolu olan Agroinfiltrasyon kullanılarak bitki dokularına sokulur. Tütün (*Nicotiana benthamiana*) yaprağı, agroinfiltrasyonun basitliği ve yüksek dönüşüm verimliliği için yaygın olarak kullanılmaktadır (Krenek vd, 2015).



Şekil 2.4. Agroinfiltrasyon mekanizması

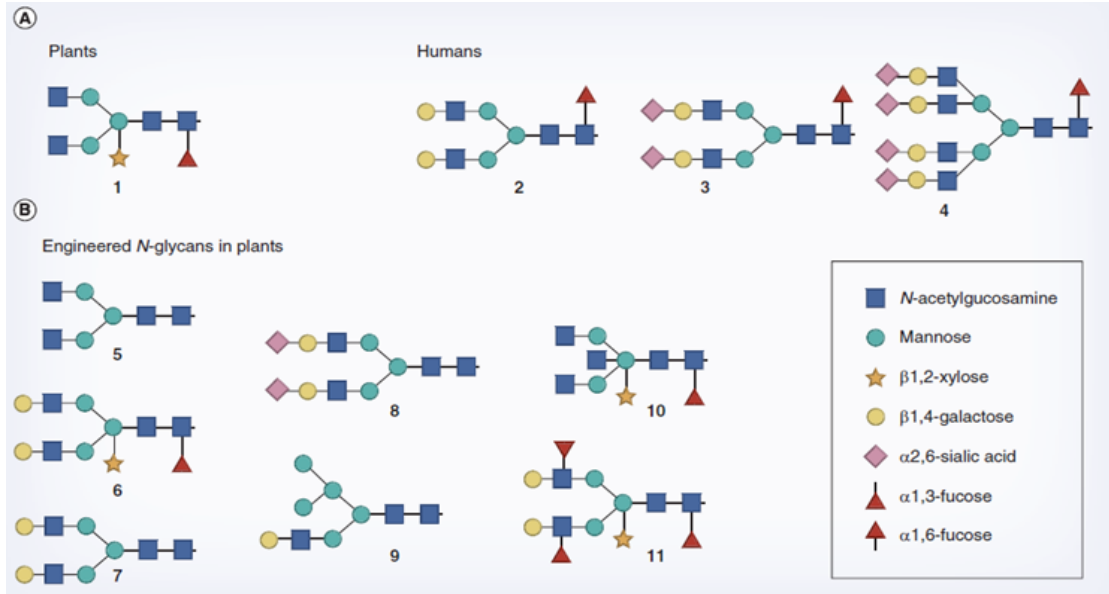
2.5. Deglikozilasyon Stratejisi

Glikoproteinler polipeptid iskeletlerine kovalent olarak bağlı oligosakkarit (glikan) zincirlerini içeren proteinlerdir. Glikoproteinlerin karbonhidrat kısmında başlıca 7 çeşit monosakkarid bulunur. Bu monosakkaridler, değişik sıralama ve farklı bağ yapıları ile bir araya gelirler ve sonuçta çok sayıda karbonhidrat zinciri yapısı ortaya çıkar. Glikoproteinlerde yer alan monosakkaridler; glikoz, galaktoz, mannoz, fukoz, N-asetil glikozamin, N-asetil galaktozamin, N-asetilnöraminik asit (sialik asit)'tir. Bunlardan başka daha az sıklıkla rastlanan arabinoz ve ksiloz vardır. (Oligosakkarit zincirleri glikoproteinlerin peptid omurgasına 5 ayrı amino asit artığının birinden bağlanmışlardır. Bunlar; asparajin, serin, treonin, hidroksilizin veya hidroksiprolindir (Karaçalı S., 2003).

Glikozilasyon, bir proteinin spesifik aktivite, ligand-reseptör etkileşimi ve immünojenite gibi fizikokimyasal özelliklerini güçlü bir şekilde etkiler (Yusibov vd, 2016). Çoğu protein, fonksiyonel özellikler elde etmek için translasyon sonrası modifikasyonlara ihtiyaç duyar. Bir proteinde, aminoasitin üzerine bağlı karbonhidratın yerine göre glikoproteinler kategorize edilir. O-bağlı glikoproteinler, karbonhidratın amino asit treonin veya serinenin R grubunun hidroksil grubunun oksijen atomuna bağlı olanlardır. O-bağlı karbonhidratlarda hidroksilizin veya hidroksiprolin bağlı olabilir. Bu işleme O-bağlı glikozilasyon denir. O-bağlı glikoproteinler; golgi kompleksi içerisinde şeker ile bağlıdır. N-bağlı glikoproteinler, amino asit asparajinin R grubunun amino grubunun nitrojenine bağlı bir karbonhidrata sahiptir (Blom vd, 2004). R grubu genellikle amid asparajinin yan zinciridir. Bu birleştirme işlemine N-bağlı glikozilasyon denir. N-bağlı glikoproteinler şekerlerini endoplazmik retikulumdan kazanırlar ve sonra modifikasyon için golgi kompleksine taşınırlar. N-bağlı glikoproteinler ve O-bağlı glikoproteinler en yaygın formlardır. N-bağlı glikozilasyon, rekombinant proteinler de dahil olmak üzere birçok proteinin doğru katlanması, protein-protein etkileşimi, stabilitesi ve fizyolojik aktivitesi gibi birçok biyolojik süreç için gereklidir. Bitki hücrelerinde proteinlerin N-glikozilasyonu, olgunlaşmamış proteini oluşturmak için oligosakkarit öncüsünün spesifik Asn kalıntısına (Asn-X-Ser / Thr) aktarılmasıyla başlar. Bu olgunlaşmamış glikoprotein daha sonra ER ve Golgi aparatını içeren salgı yolu

boyunca taşınır ve yüksek mannoz içeren N-glikanlar üretmek için glikoz ve mannoz kalıntılarının çıkarılması gibi bazı olgunlaşma işlemlerine tabi tutulur (Gomord vd, 2010). Bitki ve hayvanların N-bağlı glikozilasyon mekanizmaları benzerlik gösterse de yine de farklıdır. Glikoproteinlerin çekirdek glikan yapısı bitkiler ve hayvanlar arasında korunurken, terminal grupları birbirinden farklıdır. Bitkilerden türetilen glikoproteinler, α -1,3-fukoz ve β -1,2-ksiloz kalıntısını içerir ancak insanlar, β -1,4-galaktoz ve sialik asit kalıntısını içerir (Yusibov vd, 2016).

Bakteriyel proteinler ve bazı ökaryotik proteinler, doğal konakta N-glikanlar içermeyebilir, ancak bu proteinler birden fazla potansiyel glikozilasyon bölgesi içerebildiğinden, ökaryotik ekspresyon sistemlerinde eksprese edildiğinde anormal glikozilasyona maruz kalabilir.



Şekil 2.5. Bitkilerde ve insanlarda N-glikan yapılarının şematik gösterimi (Bosch and Schots 2010)

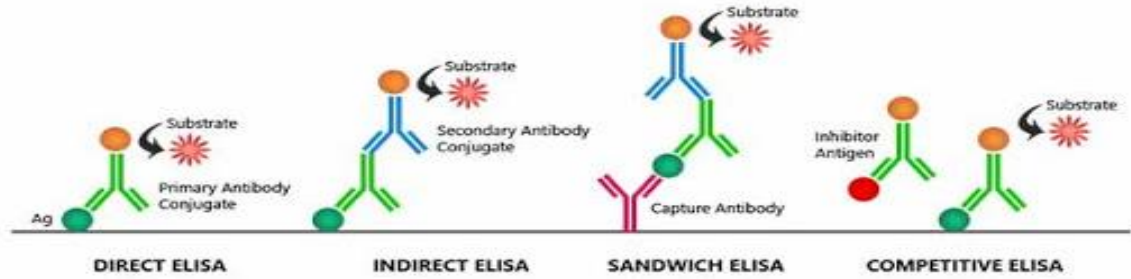
PNGase F, gram-negatif bakteri olan *Flavobacterium meningosepticum* tarafından salgılanan N-Asetil-D-glukozamin (GlcNAc) ile asparajin kalıntısı arasındaki bağı kıran bir 34.8 kDa enzimdir (Mamedov vd, 2012; Mamedov vd, 2013). PNGase F; GlcNAc ve Asn arasındaki bağı kesip tüm şeker zincirini serbest bıraktığında, asparajinin aspartata deamidasyonu nedeniyle deglikozile edilmiş proteinin glikozilasyon bölgesinde (N-X-S / T) bir amino asit değişikliği meydana gelir (Mamedov ve diğerleri 2017). Mamedov vd. 2016 yaptığı çalışmalarda proteinlerin enzimlerle deglikozilasyonun PNGase F enzimi ile mümkün olduğunu ve *in vivo* bir ortamda tedavi edici proteinlerin üretimi için başarılı bir strateji olduğunu göstermiştir. Aynı çalışmada *Nicotiana benthamiana*da üretilen PA83 üretilen varyantlarının gliko protein PA83'e kıyasla immünize edilmiş farelerde daha yüksek seviyelerde toksin nötrleştirici antikor titreleri sağladığı bulunmuştur. Yapılan araştırmalarda PNGase F ile birlikte ekspresyon yoluyla üretilen deglikozile proteinler, glikozile muadillerine kıyasla üstün fonksiyonel özellikler göstermiş olsalar da, PNGase F (*In vivo* veya *in vitro* deglikozilasyonu) glikozilasyon alanındaki (N-X-S/T) deglikozilatlanmış proteinde Asparajinin aspartata deamidasyonu

nedeniyle bir amino asit değişikliğine neden olmaktadır (Mamedov 2012; Hagglund 2004).

Başka bir enzim olan Endo- β -N-asetilglukozaminidaz H (Endo H), yüksek mannozlu kompleks olmayan N-bağlı glikan zincirinin iç bölgesindeki iki GlcNAc kalıntısı arasındaki bağı keser. EndoH glikanı ortadan kaldırdığında, tek N-Asetil-D-glukozamin kalıntısı, asparaginin eşzamanlı deamidasyonu olmaksızın proteine bağlanmaya devam eder (Gomord vd, 2010). Endo H'in birlikte ifade stratejisinin şarbona karşı bir aşı, sıtmaya karşı TB aşılı ve ayrıca terapötik kullanım için terapötik proteinler, antikorlar ve rekombinant enzimler de dahil olmak üzere önemli aşı antijenleri üretmek için başka bir fırsat sağladığı gerçeğini desteklemektedir. Bir ekspresyon konağı olarak kullanılmak üzere Endo H'yi eksprese eden stabil transgenik bitkilerin geliştirilmesi, faydalı bir araç olabilir. Endo H *in vivo* deglikozilasyon teknolojisinin moleküler tarımda, farmasötikler alanında alt birim aşılı, terapötik proteinler ve deglikozile edilmiş formlarda antikorlar üretmek için potansiyel uygulamalara sahip olması beklenebilir (Mamedov vd, 2017).

2.6. Enzime Bağlı İmmünosorbent Testi (ELISA)

Enzime bağlı immünosorbent testi olarak da bilinen ELISA, antikor tabanlı bir doğrulama prosedürüdür. Sıvı bir numunede bir antijeni saptamak ve ölçmek için enzimatik bir renk değişikliğine dayanır. Bu deney, antikorların PA83'ün çeşitli formlarına bağlanma afinitesini belirlemek için kullanıldı.



Şekil 2.6. Enzim bağlı immünosorbent deneyi(ELISA) çeşitleri

✓ Dolaylı Elisa

Bir hedef protein, mikropılaka kuyularının yüzeyinde immobilize edilir ve hedef proteine (birincil antikor) yönelik bir antikorla inkübe edilir, ardından birincil antikora karşı ikincil bir antikor izler. Yıkamadan sonra, mikropılakada iyi bağlanmış enzimin aktivitesi ölçülür. Dolaylı ELISA, doğrudan ELISA'dan daha fazla adım gerektirmesine rağmen, etiketli ikincil antikorlar ticari olarak temin edilebilir ve birincil antikoru etiketleme ihtiyacını ortadan kaldırır (ABCAM).

✓ Doğrudan Elisa

Bir hedef protein (veya bir hedef antikor), mikrolaka kuyularının yüzeyinde immobilize edilir ve hedef proteine (veya hedef antikora spesifik bir antijen) yönelik bir enzim etiketli antikorla inkübe edilir. Yıkamadan sonra, mikrolakada iyi bağlanmış enzimin aktivitesi ölçülür (ABCAM).

✓ Sandviç Elisa

Bir hedef proteine yönelik bir antikor, mikrolaka kuyularının yüzeyinde hareketsizleştirilir ve önce hedef proteinle ve ardından bir enzimle etiketlenen başka bir hedef proteine özgü antikorla inkübe edilir. Yıkamadan sonra, mikrolakada iyi bağlanmış enzimin aktivitesi ölçülür. Hareketsizleştirilmiş antikor (turuncu) ve enzim etiketli antikor (yeşil), hedef proteinin farklı epitoplarını tanımalıdır (ABCAM).

✓ Rekabetçi Elisa

Bir hedef proteine özgü bir antikor, mikrolaka kuyularının yüzeyinde hareketsizleştirilir ve hedef protein ve bilinen miktarda enzim etiketli hedef protein içeren numunelerle inkübe edilir. Reaksiyondan sonra, mikrolakada iyi bağlanmış enzimin aktivitesi ölçülür. Numunedeki antijen seviyesi yüksek olduğunda, antikora bağlı enzim etiketli antijen seviyesi daha düşüktür ve renk daha açık olur. Tersine, düşük olduğunda, antikora bağlı enzim etiketli antijen seviyesi daha yüksek ve renk daha koyu olur (ABCAM).

Bu çalışmada, *in vivo* deglikozilasyon stratejisi kullanılarak glikanlarından ayrılmış olan dPA83(E) antijeninin antikorlara bağlanma afinitesinin diğer PA83 varyantlarına kıyasla daha yüksek olduğu ve ayrıca ticari anti-PA mAb'a kıyasla bitkide üretilen anti-dPA83(E) mAb antikoruna daha yüksek afinite gösterdiği sonucuna varılmıştır. Deneyler sonucunda kazanılan veriler doğrultusunda dPA83(E)'in şarbona karşı güvenli, etkili ve düşük maliyetli bir alt ünite aşısı için iyi bir aday olabileceği görülmektedir.

3.MATERYAL VE METOT

3.1.Kullanılan Organizmalar

Bir E.coli suşu olan XL1Blue daha önceden yapılan çalışmalar sırasında Akdeniz Üniversitesi, Gıda Güvenliği ve Tarımsal Araştırmalar Merkezi'nden temin edilmiştir.

Nicotiana benthamiana, Akdeniz Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji bölümü iklimlendirme odasında torf ve perlit karışımı (3:1 oranında) üzerinde yetiştirildi ve deneylerde 6-7 haftalık bitkiler kullanıldı.

3.2.Kodon Optimizasyonu

Laboratuvarımızın önceki çalışmalarında, PA83 proteinin, gen diziliminin kodon optimizasyonu yapılmış ve bitki ekspresyon vektörlerine klonlanıp, elektroporasyon yoluyla *Agrobacterium tumefaciens* suşuna eklenmiştir (Mamedov vd. 2017).

3.3.Kullanılan Besiyerleri, Tampon Çözeltiler ve Diğerleri

LB agarlı Besiyeri (50mg/ml Kanamisin)

- ✓ LB-Broth
- ✓ ddH₂O

40 g LB-Broth Agar tartıldı ve 1 litre otoklavlı ddH₂O içinde çözdürüldü ardından solüsyon 121°C, 1 atm basınçta, 30 dakika otoklavlandı. Otoklavlanan LB agar solüsyonu su banyosunda 50°C'ye soğutuldu ve 1 litre LB agar besiyerine 1 ml 50 mg/ml stock kanamisin içerisinde 1000ul antibiyotik eklendi. LB agar Besiyeri petrielerde 25 ml olacak şekilde döküldü ve +4°C'de saklandı.

Kanamisin stok (50mg/ml)

- ✓ Kanamisin
- ✓ ddH₂O

50mg/ml kanamisin stoğu için; 0,5 g kanamisinmonosülfat(cat n:) tartıldı ve 10 ml ddH₂O içerisinde çözdürüldü. Solüsyon 0.45um filtreden enjektör ile geçirildi, 500 µl olacak şekilde eppendorflara ayrıldı, -20°C de saklandı.

BBL Besiyeri (SYS)

- ✓ Soyhidrolizat
- ✓ Yeast extract
- ✓ NaCl
- ✓ ddH₂O

800 ml otoklavlı ddH₂O içerisine 10 g soyahidrolat, 5 gr maya özütü ve 5 g NaCl eklendi ardından manyetik karıştırıcıda çözdürüldü. Çözelti pH: 7.0 olacak şekilde KOH ile ayarlandı ve son hacim 1 L' ye tamamlandı. 121°C, 1 atm basınçta, 30 dakika otoklavlandı ve +4°C'de saklandı.

MMA Ortamı (10 mm MES, 10 mm MgCl₂)

- ✓ MES (2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid)
- ✓ MgCl₂
- ✓ ddH₂O

800 ml otoklavlı ddH₂O içerisine 1.952 g MES ve 2.03 g MgCl₂.6H₂O eklendi ardından manyetik karıştırıcıda çözdürüldü. Çözelti Ph: 5.8 olacak şekilde NaOH ile ayarlandı, son hacim 1 L' ye tamamlandı. 121°C, 1 atm basınçta, 30 dakika otoklavlandı ve +4°C'de saklandı.

Asetosiringon

- ✓ Asetosiringon
- ✓ Etanol (absolute)
- ✓ ddH₂O

Asetosiringon 100 mM stok olarak hazırlanır. 0,3924 g asetosiringon, 12 ml % 95 etanol ve 8 ml otoklavlı ddH₂O içinde çözüldü. Stok, 0.45 µm filtreden geçirildi ve 100 µl olacak şekilde -20°C'de saklandı.

90 % Gliserol

- ✓ 100% Gliserol
- ✓ ddH₂O

9 birim 100 % gliserol ve 1 birim otoklavlı ddH₂O karıştırıldı. Solüsyon 121°C, 1 atm basınçta, 30 dakika otoklavlandı.

1X Fosfat Tamponlu Salin (PBS)

- ✓ 1X PBS tablet
- ✓ ddH₂O

Hazırlanışında anlatıldığı gibi 1 adet PBS tablet 200 ml otoklavlı ddH₂O içerisinde çözdürüldü ve +4°C'de saklandı.

DIECA (sodyum dietilditiokarbamat)

- ✓ DIECA
- ✓ ddH₂O

1 M (dieca mw:225,31g/mol) olacak şekilde hesaplanarak hazırlandı. Bu çalışmada infiltre edilen yaprakların ekspresyon kontrolünde 2 mm, purifikasyon için kullanılacak olan biyomas için ise 1 mm DIECA kullanıldı.

5X Laemmli Tampon (5X SDS)

- ✓ Tris
- ✓ Gliserol
- ✓ SDS
- ✓ Bromophenol Blue
- ✓ B-mercaptoethanol

Laemmli buffer içerisinde ki merkaptotanol sayesinde proteinlerin denatüre olmasını sağlar. 7.5 ml β -merkaptotanol içerisine 3.333 g SDS, 9.375 ml 1M Tris, 11.9 ml gliserol, 660 μ l Bromofenol mavisi (% 0.01) eklenir ve çözündürülür. Çözelti pH: 6.8 olacak şekilde HCl ile ayarlandı. Dört birim protein örneği ve bir birim 5X Laemmli Tampon ile karıştırılarak kullanıldı.

% 40 Akrilamid / Bis-akrilamid Çözeltisi

- ✓ Akrilamid
- ✓ Bis-Akrilamid
- ✓ ddH₂O

194.8 g akrilamid 150 ml otoklavlı ddH₂O içinde çözündürüldü. Ardından 5.2 g bis-akrilamid çözeltiliye eklendi. Çözelti bir gece manyetik karıştırıcıda bırakıldı ve tamamen çözündürüldü. Akrilamid tamamen çözündüğünde çözeltinin hacmi arttı ve hacim 500 ml olacak şekilde tamamlandı. Akrilamid / bis-akrilamid solüsyonu ışık geçirmeyen bir erlen içerisinde + 4°C' de saklandı.

1,5 M Tris-HCl Çözeltisi

- ✓ Tris
- ✓ HCl
- ✓ ddH₂O

800 ml otoklavlanmış ddH₂O içinde 185 g Tris çözdürüldü. HCl ile pH: 8.8'e ayarlandı. Son hacim 1 L'ye tamamlandı.

0.5 M Tris-HCl Çözeltisi

- ✓ Tris
- ✓ HCl
- ✓ ddH₂O

800 ml otoklavlanmış ddH₂O içinde 60 g Tris çözdürüldü. HCl ile pH: 6.8' e ayarlandı. Son hacim 1 L'ye tamamlandı.

10 % SDS Tamponu

- ✓ SDS
- ✓ ddH₂O

90 ml otoklavlı ddH₂O içerisine 10gr SDS tozu eklendi ve gün boyunca manyetik karıştırıcıda çözmeye bırakıldı. Oda sıcaklığında saklandı.

Sülfat / % 10 Amonyum (APS)

- ✓ Ammonium per sulphate
- ✓ ddH₂O

10 ug APS tozu 90 µl otoklavlı ddH₂O içerisinde çözdürüldü ve her zaman günlük olarak hazırlandı.

5X TBS ve 1X TBS

- ✓ Tris
- ✓ NaCl
- ✓ HCl
- ✓ ddH₂O

5X TBS, 20 mM Tris (pH: 7.5) ve 150 mM NaCl içerir. 12.115 g Tris ve 43.88 g NaCl, 800 ml otoklavlanmış ddH₂O içinde çözülür. pH, HCl ile 7.5'e ayarlandı. Otoklavlı ddH₂O ile hacim 1 L'ye tamamlandı. 1X TBS, 5X TBS'i seyrelterek hazırlandı. 1 hacim 5X TBS ve 4 hacim otoklavlı ddH₂O ile karıştırıldı.

Çizelge 3.1. SDS-PAGE için 10% Poliakrilamid jel hazırlanması

Malzemeler	ALT JEL	ÜST JEL
Otoklavlı ddH ₂ O	9.7 ml	7.95 ml
40 % Akrilamid-Bisakrilamid Çözeltisi	5 ml	1.25 ml
1,5 M Tris-HCl	5 ml	-
0,5 M Tris-HCl	-	3.15 ml
10 % SDS	200 µl	125 µl
TEMED	10 µl	12.5 µl
10 % APS	100 µl	62.5 µl

Yürütme Tamponu

- ✓ Tris
- ✓ Glisin
- ✓ SDS
- ✓ ddH₂O

800 ml otoklavlı ddH₂O içerisine 3.03 g Tris ve 14.3 g Glisin eklendi ve manyetik karıştırıcıda çözdürüldü. Çözeltiye 10 ml 10% SDS solusyonu eklendi ve son hacim 1 L'ye tamamlandı.

Transfer Tamponu

- ✓ Tris
- ✓ Glisin
- ✓ SDS
- ✓ ddH₂O

800 ml otoklavlı ddH₂O içerisine 5.8 g Tris ve 2.93 g Glisin eklendi ve manyetik karıştırıcıda çözdürüldü. Çözeltiye 370 µl 10% SDS solusyonu eklendi ve son hacim 1 L'ye tamamlandı.

Blotlama Çözeltesi (I-blok)

- ✓ Blotting grade powder
- ✓ Tween-20
- ✓ 1X TBS

1 g blotting grade powder, 100 ml 1X TBS (1 µl Tween 20-1000 µl 1X TBS) içeren 100 µl Tween-20 içinde çözüldü.

Jel boyama solüsyonu (Coomassie Blue)

- ✓ Glacial asetik asit
- ✓ Metanol
- ✓ Coomassie mavisi
- ✓ ddH₂O

100 ml glacial asetik asit, 500 ml metanol ve 400 ml ddH₂O karıştırıldı. Karışıma 1 gr Coomassie mavisi eklendi ve manyetik karıştırıcıda çözdürüldü.

Destaining Solusyonu

- ✓ Metanol
- ✓ Asetik asit
- ✓ ddH₂O

200 metanol, 100 ml asetik asit ve 700 ml ddH₂O karıştırılır.

3.4. 6-7 Haftalık *Nicotiana benthamiana* Bitkilerine *A. Tumefaciens* Aracılığı ile PA83 Varyantlarının İnfiltrasyonu

Laboratuvarımızda önceden yapılan çalışmalarda, PA83, PA83-MQ2, Endo H ve PNGase F genleri, *Nicotiana benthamiana* bitkilerinde ekspresyon için tasarlanmış, optimize edilmiştir. Ardından *Agrobacterium tumefaciens*'e elektroporasyon ile aktarılmıştır.

Projede önceden yapılan çalışmalarda *E. coli* hücrelerinde çoğaltılan ve izolasyonu yapılan PA83 ve PA83-MQ2 genlerini içeren pGR plazmitine eklenen rekombinant proteini üretmesi için *A. tumefaciens* hücrelerine elektroporasyon metodu kullanılarak aktarılan varyantlar kullanıldı. Deglikozilasyon için *A. tumefaciens* hücrelerinde bulunan EndoH ve PNGaseF kullanıldı. Çalışmada kullanılacak olan genleri taşıyan *Agrobacterium* suşları; soya hidrolizatı, maya ekstraktı, NaCl ve kanamisin içeren BBL

ortamında 28°C'de gece boyunca büyütüldü ve ardından OD: 600'de absorbans değerleri ölçüldü.



Şekil 3.1. *Nicotiana benthamiana* bitkisine uygulanan agroinfiltrasyon işlemi

BBL ortamında yeterince gelişen *Agrobacterium* kültürleri 5000 g'de 5 dakika santrifüjlendi ve pelletleri induksiyon için 2 saat Asetosiringon (150 uM) içeren MES tamponun (10 mM MES, 10 mM MgCl₂) da yeniden oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı üzerinde inkübasyona bırakıldı.

Çizelge 3.2. PA83 varyantlarının infiltrasyonu için *A. tumefaciens* kombinasyonları

	gPA83 9:1	PA83-MQ2 9:1	dPA83(E) 8:1:1	dPA83(P) 8:1:1
pGR-PA83	0.9	-	0.8	0.8
pGR-PA83- MQ2	-	0.9	-	-
TL-Mix	0.1	0.1	0.1	0.1
pGR-EndoH	-	-	0.1	-
pGR-PNGaseF	-	-	-	0.1

3.5. Western Blot ile Ekspresyon Analizi

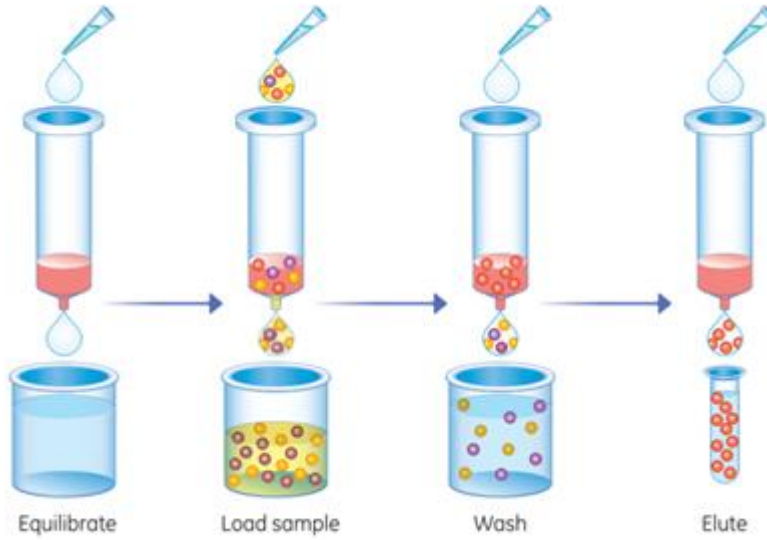
İnfiltrasyonu yapılan biyomastan 5dpi sonra homojen bir örnek alındı ve kalan yaprak kütlesi kullanılana kadar -80°C'de saklandı. Numune, 3 katı hacimde ekstraksiyon tamponunda (1X PBS, 2 mM DIECA) ekstrakte edildi. Örnek 20.000xg, 5dk, +4°C'de santrifüj edilerek supernatant, pelletten ayrıldı. Ekspresyon analizi için 4V supernatant ve 1V Laemmli Tamponu karıştırıldı. Hazırlanan örnekler su banyosunda 100°C'de 5dk kaynatıldı ve 10% poliakrilamid jele yükleme yapıldı. 100 Volt 15 dakika – 200 Volt 45 dakika yürütüldü. Daha sonra proteinler, transfer tamponu ile poliviniliden florür membran üzerine 100 Volt da 1 saat transfer edildi. Membran, 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda 1% I-blok bloke edildi. 10µl primer antikör (anti-6XHis monoklonal antikör Cat. no. 652502) 10ml 1% I-blok hazırlanarak, 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edildi. 1 saat sonra I-blok ile 3 kere 5'er dakika yıkama yapıldı. Yıkamalardan sonra temizlenen membran sekonder antikör ile (Anti-Mouse IgG 3 µl + 10 ml I-blok) 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda bırakıldı. İnkübasyonu tamamlanan 3 kere 5'er dakika I-blok ile 1 kere 1X TBS ile yıkandı. Membran sonolarak SuperSignal West Pico Stable Peroxide (2,5 ml) ve Luminol/ Enhancer (2,5 ml) solüsyonları (SuperSignal West Pico, Thermo Fisher Scientific Grand Island, NY) ile 5 dakika karanlıkta inkübe edildi. Membran GeneGnome XRQ Chemiluminescence görüntüleme sistemi (Syngene Corp, ABD) kullanılarak görüntüsü alındı.

3.6. Ni-NTA Afinite Kromatografisi (IMAC)

Nicotiana benthamiana'da PA83 proteini varyantlarının üretimi için, bitkiler pGR-gPA83, pGR-dPA83+Endo H, pGR-dPA83+PNGase F ve pGR-PA83-MQ2 ile infiltre edilmiş ve 5 dpi'de hasat edilmiştir. Bitki tarafından üretilen rekombinant proteinler, HisPur™ Ni-NTA reçinesi (Kat. No. 88221, Thermo Fisher) kullanılarak immobilize metal iyon afinite kromatografisi (IMAC) ile saflaştırılmıştır.

Bağlanma tamponu, 20 mM sodyum fosfat, 300 mM sodyum klorür, 10 mM imidazol, pH 7.4 olarak hazırlanmıştır. Ekstraksiyon tamponu için, bağlama tamponuna 1 mM Sodyum dietilditiokarbamat trihidrat (DIECA, Kat No: 20624-25-3, Sigma) ilave edilmiştir. Yıkama tamponu, 20 mM sodyum fosfat, 300 mM sodyum klorür, 25 mM imidazol olarak hazırlanmıştır; pH 7.4. Elüsyon tamponu, 20 mM sodyum fosfat, 300 mM sodyum klorür, 250 mM imidazol içerir; pH 7.4. Saflaştırma için, PA83 varyantları ile infiltre edilmiş yirmişer gram donmuş bitki yaprağı, 3 kat hacimde bitki ağırlığına sahip özütleme tamponunda öğütülmüştür ve ekstrakt, 20 dakika süreyle 4 ° C'de 13.000 g'de santrifüjlenmiştir. Süpernatant, 10 kolon hacmi bağlama tamponu ile dengelenmiş 1 ml HisPur™ Ni-NTA reçinesi ile tek kullanımlık bir polipropilen kolon (Pierce) üzerine yüklendi. Sütun, baseline'a ulaşana kadar 10-15 kolon hacmi (CV) yıkama tamponu ile yıkanmıştır.

Proteinler 10 CV elüsyon tamponu ile elüt edilmiştir. Elüsyon fraksiyonları 0,5 ml / eppendorf olarak toplanmış ve yıkanan fraksiyonlardaki protein konsantrasyonları Biodrop ile ölçülmüştür. Konsantrasyona göre, birleştirilmiş fraksiyonlar konsantre edilmiştir ve 10K MWCO Millipore yoğunlaştırıcı ile PBS'ye karşı tampon değiştirilmiştir (Kat No: UFC801096, Merck) Konsantre protein, kullanılana kadar – 80°C'de saklanmıştır.



Şekil 3.2. Polihistidin etiketli proteinleri saflaştırmak için şematik çalışma akışı (Sigmaaldrich)

Sodyum Fosfat Tamponu (20 mm, pH 7.4)

- ✓ Sodyum dibasic
- ✓ Sodyum monobasic
- ✓ NaCl
- ✓ NaOH
- ✓ ddH₂O

1M için: 28.38 g Na₂HPO₄(Sodyum dibasic) 100 ml otoklavlı ddH₂O içerisinde çözdürülür. 1M için: 13.8 g NaH₂PO₄(Sodyum monobasic) 100 ml otoklavlı ddH₂O içerisinde çözdürüldü.

15.48 ml 1M Na₂HPO₄, 4.52 ml 1M NaH₂PO₄ ve 17.59 g NaCl 800 ml otoklavlı ddH₂O içerisinde çözdürüldü ve NaOH ile pH 7.4' e ayarlandı.

100 mm Stok İmidazol

- ✓ Sodyum Fosfat Tamponu
- ✓ İmidazol

0.34 g İmidazol hassas terazide tartıldı ve 50 ml 20 mm sodyum fosfat tamponunda çözdürüldü ve +4°C'de saklandı.

10 mm Imidazol, Bağlanma tampon

- ✓ Sodyum Fosfat Tamponu
- ✓ Imidazol

10 kolon hacmi olacak şekilde taze olarak hazırlandı. 1 ml 100 mM imidazol ve 9 ml 20 mM sodyum fosfat tamponu karıştırıldı(1 ml Ni-NTA rezin için 10 ml bağlama tampon gereklidir).

10 mm Imidazol, Ekstraksiyon Tamponu

- ✓ Sodyum Fosfat Tamponu
- ✓ Imidazol

Ekstraksiyon tamponu ekstrakte edilecek olan biyomas'ın 3 katı hacminde (örneğin 20 gr yaprak örneği için 60 ml ekstraksiyon tamponu) hazırlandı. 6 ml 100 mM imidazol ve 54 ml 20 mM sodyum fosfat tamponu karıştırıldı. Tampon içerisine 1 mM olacak şekilde taze hazırlanmış 1M dietilditiokarbamat (DIECA) eklenip vortex yapıldı.

25 mm Imidazol, Yıkama Tamponu

- ✓ Sodyum Fosfat Tamponu
- ✓ Imidazol

12.5 ml 100 mM imidazol stok çözeltisi, 37.5 ml 20 mM Sodyum fosfat tamponu karıştırıldı. Kullanılana kadar +4°C'de saklandı. Kolon yıkanırken flow through biodrop(model vs) da ölçüldü ve konsantrasyon 0.01 olana kadar yıkanmaya devam edildi.

250 mM Imidazol, Elüsyon Tamponu

- ✓ Sodyum Fosfat Tamponu
- ✓ Imidazol

0,851 g imidazol hassas terazide tartıldı ve 50 ml 20 mM sodyum fosfat tamponunda çözdürüldü, kullanılana kadar +4°C'de saklandı. Elüsyonlar 10 kolon hacmi kadar toplandı.

3.7. SDS-page ile Rekombinant Protein Miktar Analizi

Pürifiye edilen proteinlerin miktarlarının analizi için SDS-page Elektroforezi kullanılmıştır. Pürifiye edilen rekombinant proteinlerden bir miktar örnek ayrıldı(genelde 20 µl kadar). Analiz için 4V rekombinant protein ve 1V Laemmli Tamponu karıştırıldı. Hazırlanan örnekler su banyosunda 100°C'de 5dk kaynatıldı ve 10% poliakrilamid jele yükleme yapıldı. 100 Volt 15 dakika – 200 Volt 45 dakika yürütüldü. Elektroforeden çıkarılan jelin üst kısmı ayrıldı ve atıldı. Alt jel önce ddH₂O'ya çıkarıldı ardından oda sıcaklığında 1 saat çalkalayıcıda jel boyama solüsyonu(coomassie blue) ile

boyandı. Daha sonra jelin boyadan arınması için 10 dakika aralarla boya uzaklaştırma solüsyonu(200 ml metanol, 100 ml asetik asit ve 700 ml ddH₂O) ile yıkaması yapıldı. Jelin gereksiz bölgeleri boyadan arındırıldı ve belirginleşen bantların görüntüsü alındı.

3.8.Enzime Bağlı İmmünosorbent Testi Analizi ve Tamponları

Enzime bağlı immünosorbent testi olarak da bilinen ELISA, antikor tabanlı bir doğrulama prosedürüdür. Sıvı bir numunedeki bir antijeni tespit etmek ve ölçmek için enzimatik renk değişikliğine dayanır. Bu deney, antikorların PA83'ün çeşitli varyantlarına bağlanma afinitesini belirlemek için kullanıldı.

Antijeni, bikarbonat / karbonat kaplama tamponu kullanarak uygun konsantrasyonlarda seyreltildi. Bir PVC mikrotitre plakasının kuyuları, plakanın üst oyuklarına 100µl antijen seyreltmesi pipetleyerek antijenle kaplandı. Plaka parafilmle kaplandı ve gece boyunca 4°C'de inkübe edildi.

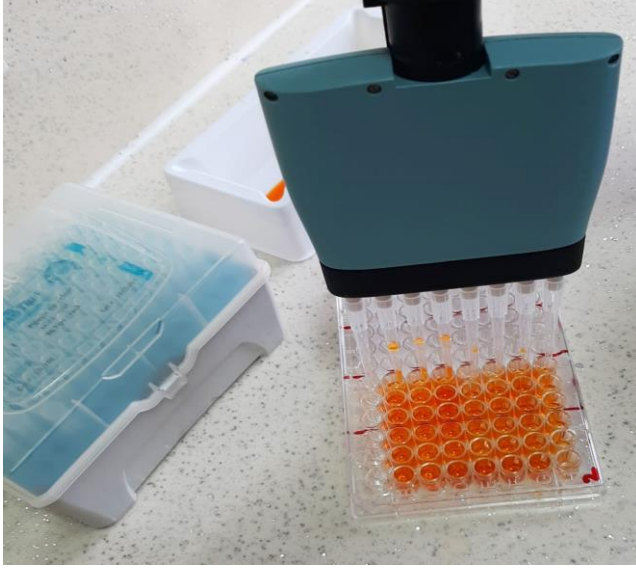
Termal stabilite için hazırlanan antijenler; 1000ng/100µl konsantrasyonda bikarbonat / karbonat kaplama tamponu kullanılarak seyreltildi. Ardından su banyosunda initial, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ve 90°C'de inkübe edildi ve PVC mikrotitre plakası kaplandı.

Ertesi sabah plaka 3 tekrar 5'er dakika yıkama tamponu(PBS-T) ile yıkandı. Ardından oyuk başına 200µl olacak şekilde bloklama tamponu ile kaplandı ve oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakıldı.

Plaka 1XPBS ile seyreltmeleri yapılarak oyuk başına 100µl olacak şekilde uygun primer antikor(ticari ya da bitkide üretilen anti-PA mAb) ile kaplandı ve oda sıcaklığında 1 saat süreyle inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon ardından plaka 4 tekrar 5'er dakika yıkama tamponu(PBS-T) ile yıkandı. Plaka I-Block ile seyreltmeleri yapılarak oyuk başına 100µl olacak şekilde optimal konsantrasyonda(2.0 ug/ml) sekonder antikor(anti-Human IgG ya da anti-Goat IgG) ile kaplandı ve oda sıcaklığında 1 saat süreyle inkübasyona bırakıldı.

Plaka 4 tekrar 5'er dakika yıkama tamponu(PBS-T) ile yıkandı. Plakaya 200µl/oyuk OPD-Substrat solüsyonu eklendi ve 30dk, oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi. Ardından plaka 450nm dalga boyunda okundu.



Şekil 3.3. Analizde kullanılan PVC mikrotitre plakası

Kaplama Tamponu (15 mm NaCO₃, 35 mm NaHCO₃)

- ✓ NaCO₃
- ✓ NaHCO₃
- ✓ ddH₂O

0.15 g NaCO₃(Sodyum karbonat) ve 0.29 g NaHCO₃(Sodyum bikarbonat) 100 ml otoklavlı ddH₂O içerisinde manyetik karıştırıcıda çözdürülmüştür.

Yıkama Tamponu (PBS-T)

- ✓ 1X PBS tablet
- ✓ Tween-20
- ✓ ddH₂O

200 ml 1X PBS içerisine 0.1% Tween-20 eklenmiştir.

Bloklama Solüsyonu

- ✓ Blotting grade powder
- ✓ 1X PBS tablet
- ✓ Tween-20
- ✓ ddH₂O

200 ml 1X PBS içerisine 0.1% Tween-20, 1% blotting grade powder eklenmiştir ve manyetik karıştırıcıda çözdürülmüştür.

Primer Antikor

- ✓ Bitkide üretilen dG-anti-PA83(E) monoclonal antikor
- ✓ Ticari anti-PA monoklonal antikor

10 ml 1X PBS içerisine yeterince primer antikor eklenmiştir.

Sekonder Antikor

- ✓ HRP - Anti-Human IgG secondary antibody
- ✓ HRP - Anti-Keçi IgG secondary antibody
- ✓ Bloklama solusyonu

Sekonder antikor 1:2500 olacak şekilde I-Blok içerisinde hazırlanmıştır.

Fosfat-Sitrat Tamponu

- ✓ Dibasic sodyumfosfat
- ✓ Sitrik asit
- ✓ ddH₂O

0.2 M dibasic sodyumfosfat tamponu için 2.83 g Na₂HPO₄ 100 ml otoklavlı ddH₂O da çözdürülmüştür. 0.1 M sitrik asit için 2.10 g C₆H₈O₇ 100 ml otoklavlı ddH₂O içerisinde çözdürülmüştür. 25.7 ml Na₂HPO₄ ve 24.3 ml C₆H₈O₇ karıştırılmış ve ph 5.0'a ayarlanmıştır.

OPD Substrat Solüsyonu(o-fenilendiamin dihidroklorür)

- ✓ Sodyum perborat tablet
- ✓ Fosfat-sitrat tamponu
- ✓ ddH₂O

20 mg sodyum perborat tableti (Katalog Numarası P4922) 50 ml fosfat-sitrat tamponunda çözdürülmüştür. Kullanılmadan kullanımın hemen öncesinde 0.05 M olacak şekilde 30% hidrojenperoksit eklenmiştir. Sodyum perborat tableti içeriğindeki HRP(yaban turbu peroksidazı) sayesinde 490 nm'de tespit edilebilen sarı-turuncu bir renk verir.

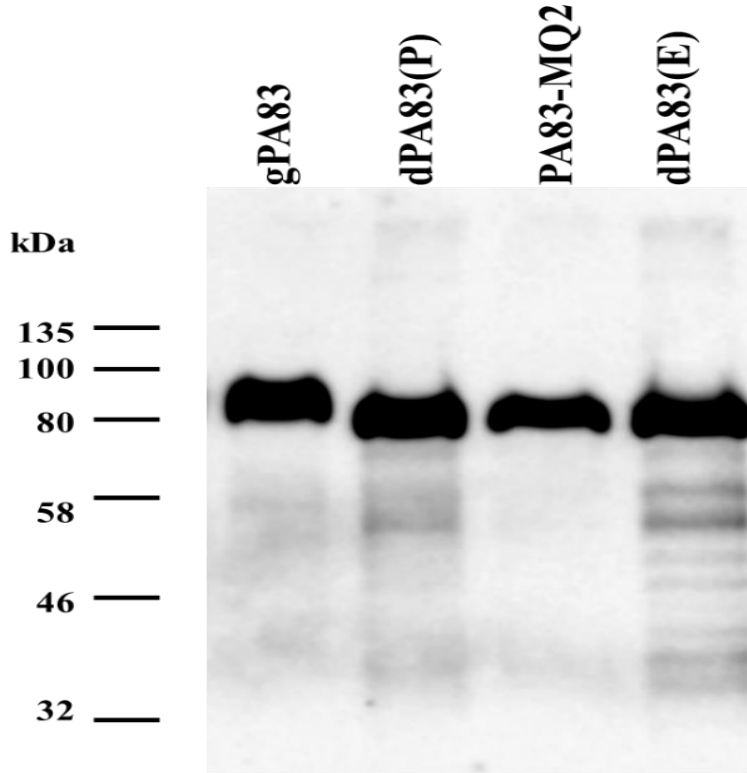
3.9.Verilerin İstatistiksel Analizi

Çalışmada elde edilen deneysel sonuçlar bilgisayar ortamına aktarılarak, IBM SPSS Statistics 23 paket programında %95 güven aralığında Varyans Analizi (ANOVA) ile test edilmiştir. Deneysel sonuçlardan elde edilen gözlem değerlerine Ronald Aylmer Fisher tarafından geliştirilen Varyans Analizi (Analysis Of Variance-ANOVA) uygulanarak elde edilen verilerin istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı belirlenebilmektedir (Şenoğlu ve Acıtaş 2010). Varyans Analizi (ANOVA), örneklenen popülasyonların normal olarak dağıldığı varsayımı altında iki veya daha fazla grup arasındaki ortalamaların eşit olduğu hipotezini test etmek için kullanılabilen genel bir tekniktir (Eymen, 2007). Deneyler sonucunda elde edilen niceliksel verilerin karşılaştırılmasında veriler normal dağılım gösterdiği için, ikiden fazla gruplar arası karşılaştırmalarda Tek Yönlü Varyans Analizi (One Way Anova) kullanılmıştır. Elde edilen bulgular %95 güven aralığında ve %5 ($p<0.05$) anlamlılık düzeyinde değerlendirilmiştir. Ayrıca araştırmada iki antikorun (ticari anti-PA mAb ve bitkide üretilen anti-dPA83(E) mAb); 4 farklı antijen (gPA83, dPA83(E), dPA83(P) ve PA83-MQ2) ile farklı konsantrasyonlara göre anlamlı bir farklılık gösterip göstermediğini belirleyebilmek için bağımsız örneklem için Independent Sample T Testi yapılmıştır. Independent Sample T Testi normal dağılan verilerde birbirinden bağımsız iki grup arasında aritmetik ortalama durumlarına göre anlamlı bir farklılığın olup olmadığını ortaya koyan bir test türüdür (Eymen, 2007).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. PA83 varyantlarının Western Blot ile Ekspresyon Analizi

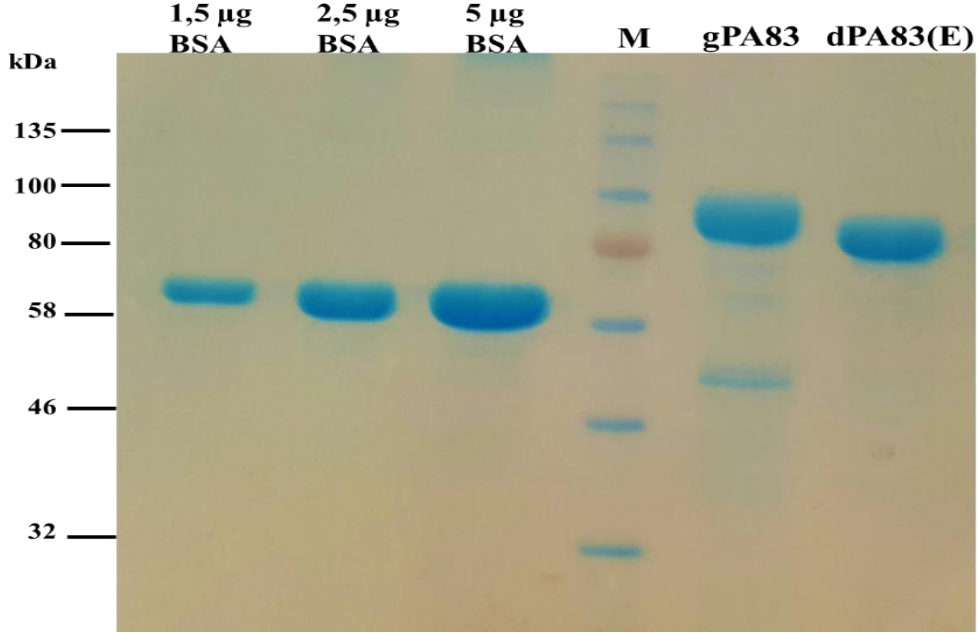
Daha önceden laboratuvarımızda yapılmış olan çalışmalarda polihistidin etiketli deglikozile PA83+Endo H, glikozile PA83 ve mutasyona uğramış PA83 (PA83M-D) *Agrobacterium tumefaciens* plazmidine eklenmiştir. Materyal ve metod bölümünde anlatıldığı gibi pgr-dPA83+Endo H, pgr-dPA83+PNGase F, PA83M-D ve pgr-gPA83 enjektör kullanılarak *Nicotiana benthamiana* bitkisine infiltrasyonu yapıldı. 24°C, %60 nem ve 18 saat ışıklı 6 saat ışısız olacak şekilde iklimlendirme odasında yetiştirildi. Agroinfiltrasyondan 5 gün sonra (5dpi) bitkiler hasat edildi ve materyal metod bölümünde anlatıldığı gibi manuel olarak ekstrakte edildi. Ekstrakte örnekler santrifüj sonrası supernatant ile laemmlı buffer doğru oranlarda karıştırıldı. Poliakrilamid jele yüklenen örnekler yürütüldü ve blotlamanın ardından moleküllerin marker sayesinde doğru yerde olduğu belirlendi.



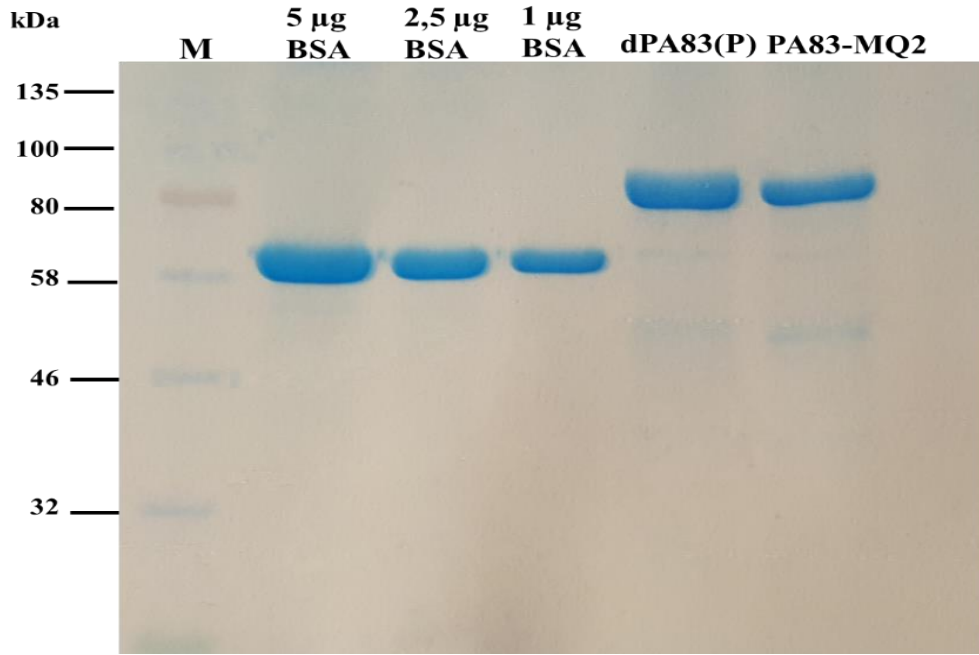
Şekil 4.1. *Nicotiana benthamiana* da üretilen rekombinant PA83 varyantlarının ekspresyon analizi; 1. gPA83: glikozile PA83; 2. dPA83(E): Endo H ile deglikozile edilmiş PA83; 3. PA83-MQ2; 4. dPA83(P): PNGase F ile deglikozile edilmiş PA83

4.2. PA83 Varyantlarının Saflaştırılması ve SDS-Page Analizi

Polihistidin etiketli PA83 varyantlarının ekspresyon analizi için immunoblot analizi yapıldı. Yüksek rekombinant protein ekspresi analiz edilen PA83 varyantlarının biomassları materyal ve metod da anlatıldığı şekilde immobilize metal iyon afinite kromatografisi(IMAC) ile manuel olarak purifiye edildi. Saf rekombinant protein miktarını belirlemek için SDS-page analizi yapıldı. Analiz neticesinde PA83 varyantları içerisinde en yüksek ekspresyonun ve en saf proteinin deglikozile PA83 olduğu sonucuna varıldı.



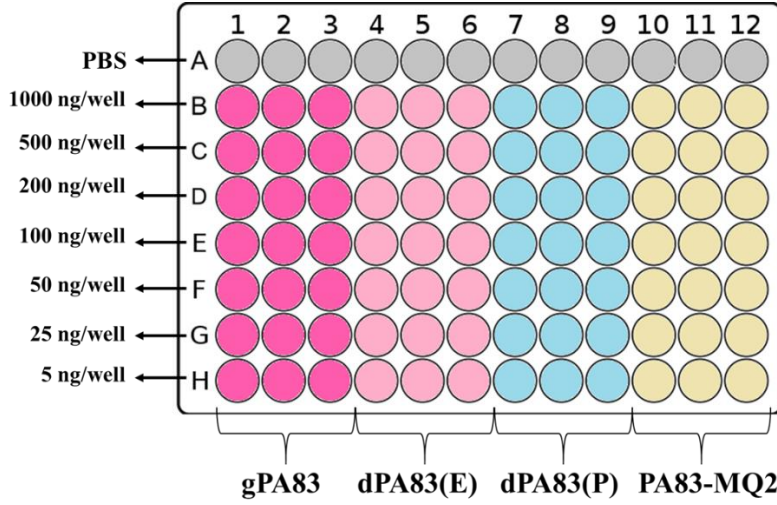
Şekil 4.2. IMAC ile saflaştırılan rekombinant PA83 varyantlarının SDS-Page Analizi; 1. 1,5ug BSA standart; 2. 2,5ug BSA standart; 3. 5ug BSA standart; 4. Prestained Protein Marker(Cat. No. P7712 S New England Biolabs); 5. gPA83 (glikozile PA83); 6. dPA83(E) (Endo H ile deglikozile edilmiş PA83)



Şekil 4.3. IMAC ile saflaştırılan rekombinant PA83 varyantlarının SDS-Page Analizi; 1. Prestained Protein Marker (Cat. No. P7712 S New England Biolabs); 2. 5ug BSA standart; 3. 2,5ug BSA standart; 4. 1ug BSA standart; 5. dPA83(P) (PNGase F ile deglikozile edilmiş PA83) ; 6. PA83-MQ2

4.3. PA83 varyantlarının ELISA Analizleri

4.3.1. Ticari anti-PA mAb ile PA83 antijen varyantlarının ELISA analizleri

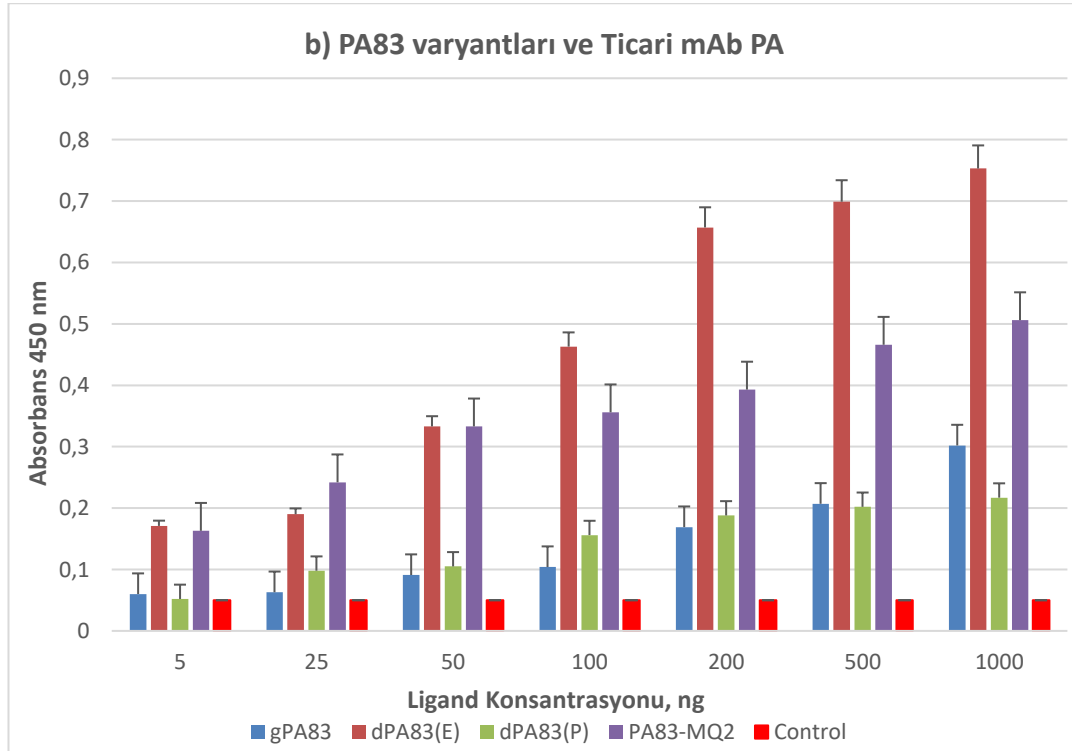
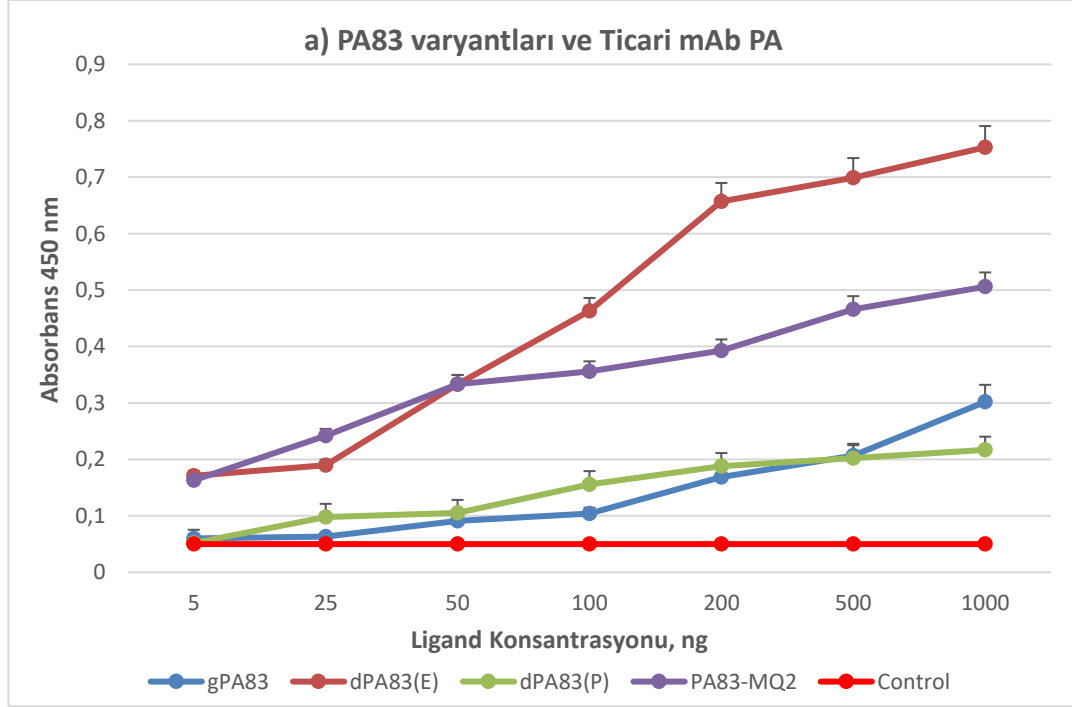


Şekil 4.4. 96 oyuklu ELISA plakasındaki proteinlerin yükleme şeması; Bitki tarafından üretilen antijen varyantları (gPA83: glikozile PA83, dPA83(E): Endo H ile deglikozile edilmiş PA83, dPA83(P): PNGase F ile deglikozile edilmiş PA83 ve PA83+MQ2), ticari bir anti-PA ve bitki de üretilen anti-dPA83(E) mAb kullanıldı

Saflaştırılan rekombinant proteinler; gPA83, dPA83(E), dPA83(P), PA83-MQ2 ve ticari bir anti-PA mAb arasındaki bağlanma afinitesini değerlendirmek için , enzim bağlı immünosorbent tahlili (ELISA) plakaları, saflaştırılmış PA83 varyantlarının farklı konsantrasyonları(1000, 500, 200, 100, 50, 25, 5 ng/well) ile kaplandı. Plaka bir gece boyunca +4 °C de inkübasyona bırakıldı.

Plakalar daha sonra PBS-Tween20 ile yıkandı ve bloklama tamponu ile 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Birincil antikor (ticari mAb anti-PA), 2.0 ug/mL konsantrasyonunda ilave edildi ve plakalar, oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. Plakalar, PBS-T ile yıkandı ve HRP'ye (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) konjuge edilmiş ikincil bir anti-keçi IgG antikorunu ilave edildi ve 1 saat süreyle inkübe edildi. Bir ELISA substratı (o- Fenilendiamin dihidroklorür) ilave edildi ve plakalar, referans olarak 450nm optik yoğunlukta(OD) okundu.

Çizelge 4.1. (a,b) PA83 varyantlarının ticari bir anti-PA mAb ile karşılaştırmalı afinite çalışmaları; Deney her varyant için üç tekrar şeklinde düzenlemiş, OD değerlerinin ortalamaları alınmış ve standart hata hesaplanmıştır (n=3). Grafikler EXCEL ile düzenlenmiştir; a)Çizgi grafiği; b)Sütun grafiği

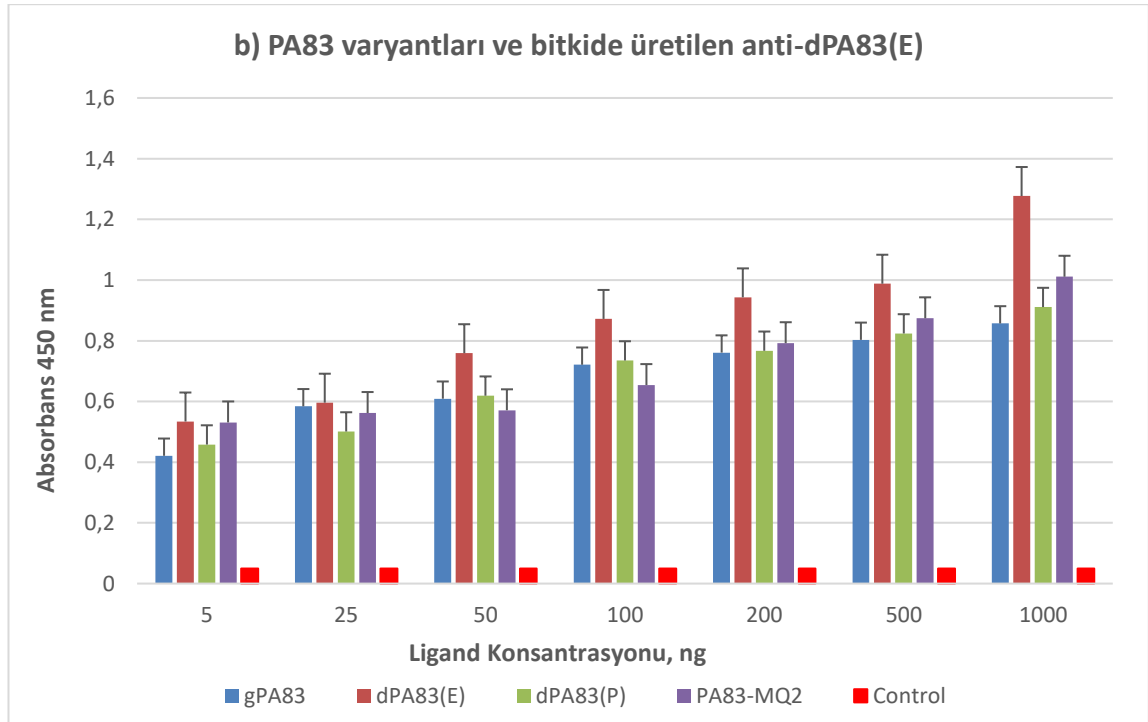
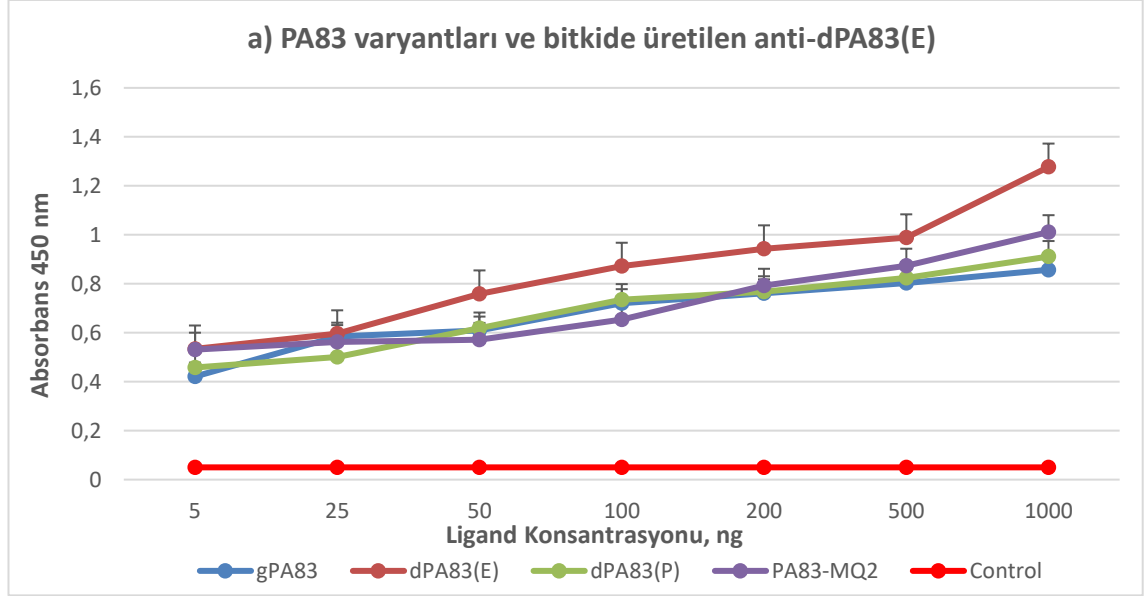


4.3.2. Bitkide üretilen anti-dPA83(E) mAb ile PA83 Antijen Varyantlarının Elisa Analizleri

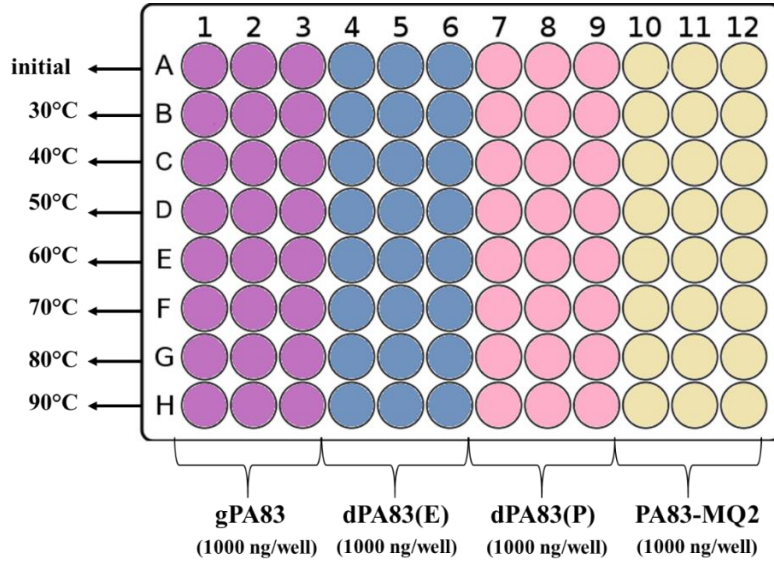
Saflaştırılan rekombinant proteinler; gPA83, dPA83(E), dPA83(P), PA83-MQ2 ve bitkide üretilen bir anti-PA83+Endo H mAb arasındaki bağlanma afinitesini değerlendirmek için, enzim bağlı immünosorbent tahlili (ELISA) plakaları, saflaştırılmış PA83 varyantlarının farklı konsantrasyonları(1000, 500, 200, 100, 50, 25, 5 ng/well) ile kaplandı. Plaka bir gece boyunca +4 °C de inkübasyona bırakıldı.

Plakalar daha sonra PBS-Tween20 ile yıkandı ve bloklama tamponu ile 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Birincil antikor (ticari mAb anti-PA), 2.0 ug/mL konsantrasyonunda ilave edildi ve plakalar, oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. Plakalar, PBS-T ile yıkandı ve HRP'ye (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) konjuge edilmiş ikincil bir anti-keçi IgG antikorunu ilave edildi ve 1 saat süreyle inkübe edildi. Bir ELISA substratı (o- Fenilendiamin dihidroklorür) ilave edildi ve plakalar, referans olarak 450nm optik yoğunlukta(OD) okundu.

Çizelge 4.2. PA83 varyantlarının bitkide üretilen bir anti-dPA(E) mAb ile karşılaştırmalı afinite çalışmaları; Deney her varyant için üç tekrar şeklinde düzenlenmiş, OD değerlerinin ortalamaları alınmış ve standart hata hesaplanmıştır. Grafikler EXCEL ile düzenlenmiştir; a)Çizgi grafiği; b)Sütun grafiği (n=3)



4.3.2. Bitkide üretilen PA83 antijen varyantlarının termal stabilite örneklerinin Elisa analizleri



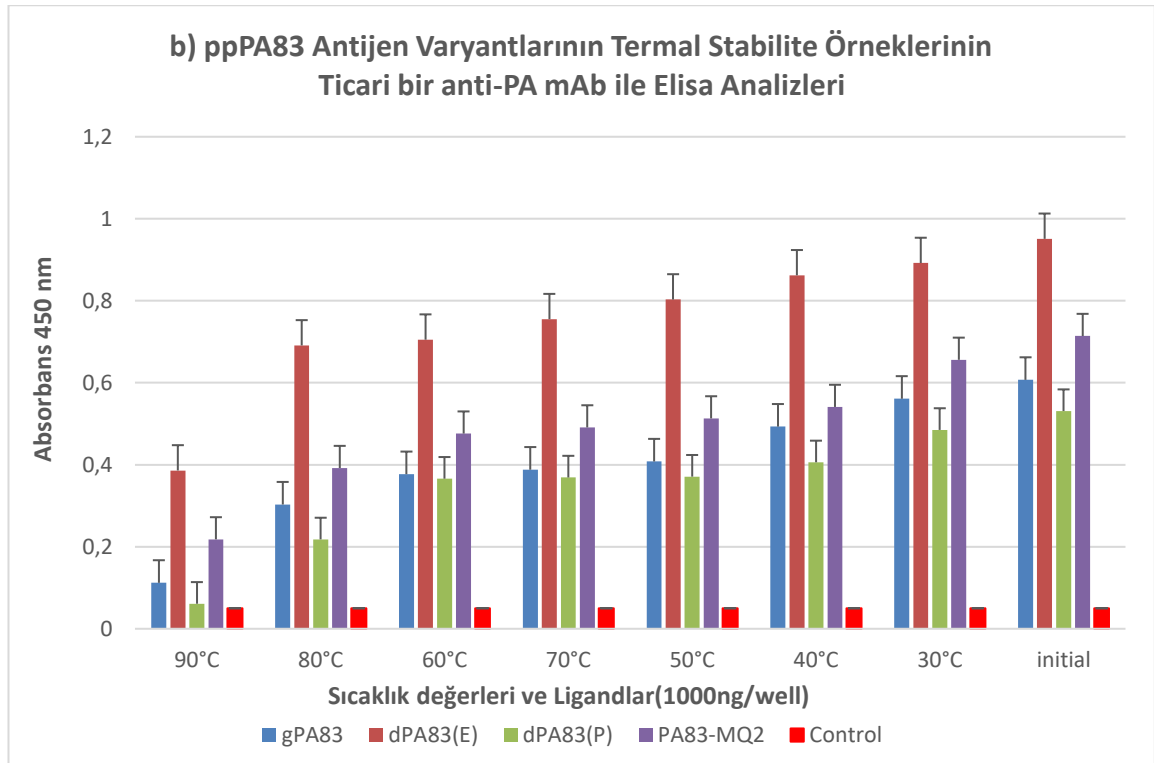
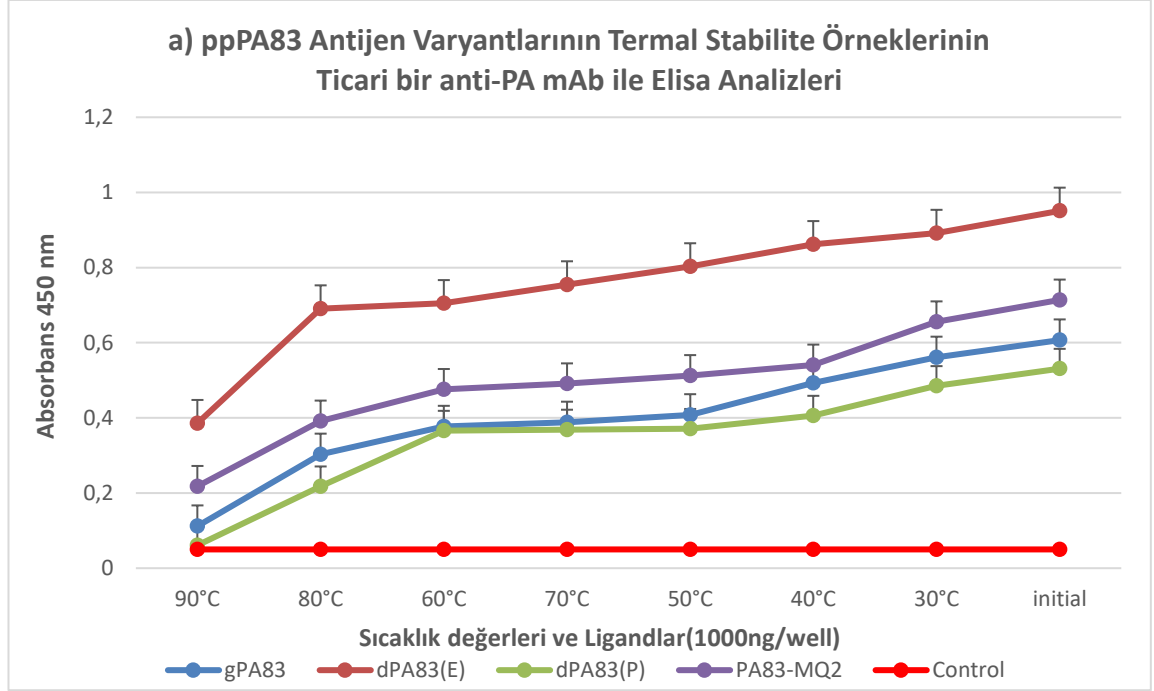
Şekil 4.5. 96 oyuklu ELISA plakasındaki proteinlerin yükleme şeması (Termal) Bitki tarafından üretilen ve farklı sıcaklıklarda inkübe edilen 1000ng/well antijen varyantları (gPA83: glikozile PA83, dPA83(E): Endo H ile deglikozile edilmiş PA83, dPA83(P): PNGase F ile deglikozile edilmiş PA83 ve PA83+MQ2), ticari bir anti-PA ve bitkide üretilen anti-dPA83(E) mAb kullanıldı

4.3.3. Ticari anti-PA mAb ile PA83 antijen varyantlarının termal ELISA analizleri

Saflaştırılan rekombinant proteinlerin; gPA83, dPA83(E), dPA83(P), PA83-MQ2 termo-stabilitesinin belirlenmesi ve ticari bir anti-PA mAb arasındaki bağlanma afinitesini değerlendirmek amacıyla, saflaştırılmış PA83 varyantlarının konsantrasyonu 1000ng/well olacak şekilde ayarlandı. Rekombinant proteinler initial, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ve 90°C'de su banyosunda 15 dakika olacak şekilde inkübasyona bırakıldı. İnkübe edilen proteinler 1000xg, 5dk, +4 °C'de santrifüj edildi ve supernatant ayrı bir eppendorfa alındı. Enzim bağlı immünosorbent tahlili (ELISA) plakaları proteinlerle kaplandı ve bir gece boyunca +4 °C de inkübasyona bırakıldı.

Plakalar daha sonra PBS-Tween20 ile yıkandı ve bloklama tamponu ile 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Birincil antikor (ticari mAb anti-PA), 2.0 ug/mL konsantrasyonunda ilave edildi ve plakalar, oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. Plakalar, PBS-T ile yıkandı ve HRP'ye (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) konjuge edilmiş ikincil bir anti-keçi IgG antikoruna ilave edildi ve 1 saat süreyle inkübe edildi. Bir ELISA substratı (o-Fenilendiamin dihidroklorür) ilave edildi ve plakalar, referans olarak 450nm optik yoğunlukta(OD) okundu.

Çizelge 4.3. (a,b) Farklı sıcaklıklarda inkübe edilen PA83 varyantlarının ticari bir anti-PA mAb ile karşılaştırmalı afinite çalışmaları; Deney her varyant için üç tekrar şeklinde düzenlenmiş, OD değerlerinin ortalamaları alınmış ve standart hata hesaplanmıştır (n=3). Grafikler EXCEL ile düzenlenmiştir; a)Çizgi grafiği; b)Sütun grafiği

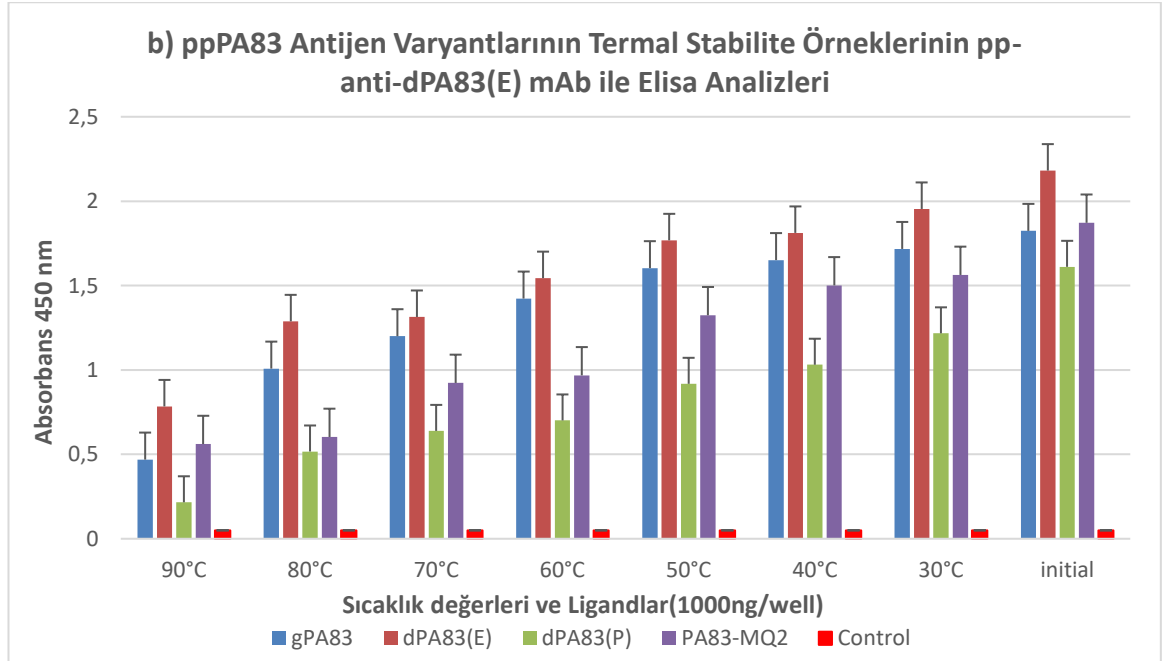
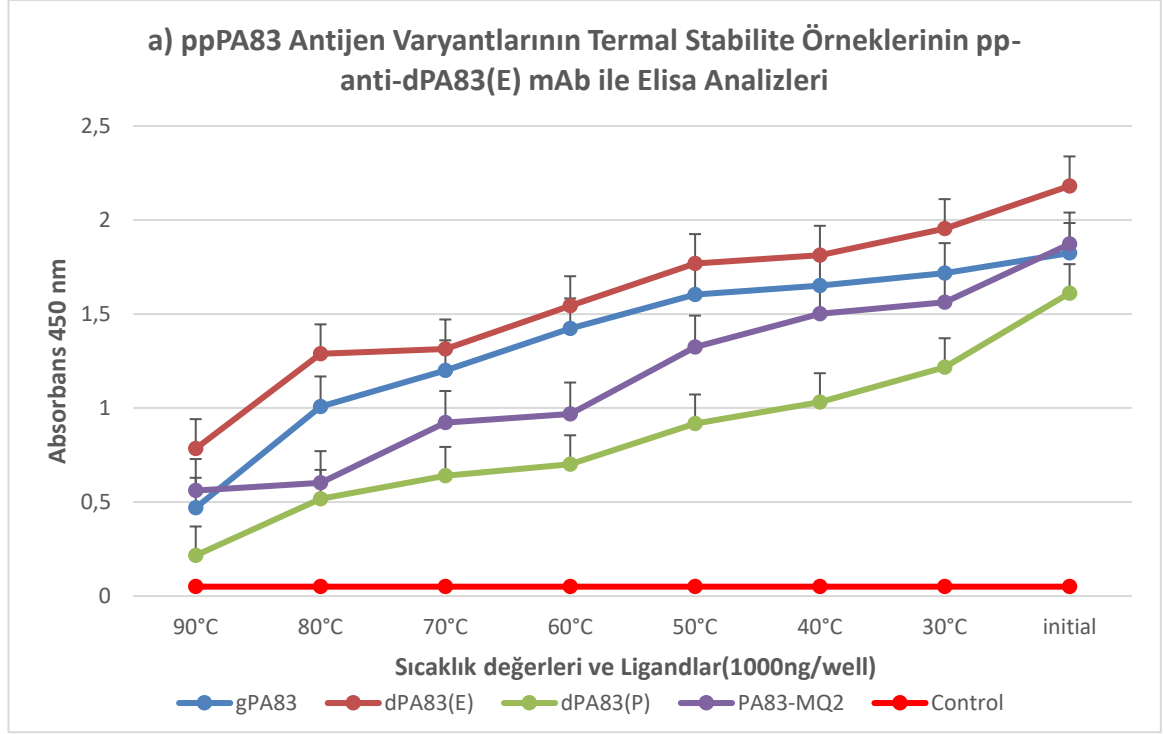


4.3.4. Bitkide üretilen anti-dPA83(E) mAb ile PA83 antijen varyantlarının termal ELISA analizleri

Saflaştırılan rekombinant proteinlerin; gPA83, dPA83(E), dPA83(P), PA83-MQ2 termo-stabilitesinin belirlenmesi ve ticari bir anti-PA mAb arasındaki bağlanma afinitesini değerlendirmek amacıyla , saflaştırılmış PA83 varyantlarının konsantrasyonu 1000ng/well olacak şekilde ayarlandı. Rekombinant proteinler initial,30,40,50,60,70,80 ve 90°C'de su banyosunda 15 dakika olacak şekilde inkübasyona bırakıldı. İnkübe edilen proteinler 1000xg, 5dk, +4 °C'de santrifüj edildi ve supernatant ayrı bir eppendorfa alındı. Enzim bağlı immünosorbent tahlili (ELISA) plakaları proteinlerle kaplandı ve bir gece boyunca +4 °C de inkübasyona bırakıldı.

Plakalar daha sonra PBS-Tween20 ile yıkandı ve bloklama tamponu ile 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Birincil antikor (Bitkide üretilen anti-dPA83(E) mAb), 2.0 ug/mL konsantrasyonunda ilave edildi ve plakalar, oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. Plakalar, PBS-T ile yıkandı ve HRP'ye (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) konjuge edilmiş ikincil bir anti-keçi IgG antikoruna ilave edildi ve 1 saat süreyle inkübe edildi. Bir ELISA substratı (o- Fenilendiamin dihidroklorür) ilave edildi ve plakalar, referans olarak 450nm optik yoğunlukta(OD) okundu.

Çizelge 4.4. (a,b) Farklı sıcaklıklarda inkübe edilen PA83 varyantlarının Bitkide üretilen anti-dPA83(E) mAb ile karşılaştırmalı afinite çalışmaları; Deney her varyant için üç tekrar(n=3) şeklinde düzenlenmiş, OD değerlerinin ortalamaları alınmış ve standart hata hesaplanmıştır. Grafikler EXCEL ile düzenlenmiştir; a)Çizgi grafiği; b)Sütun grafiği



4.4. İstatistiksel Analizler

Deneysel sonuçlar bilgisayar ortamına aktarılarak, IBM SPSS Statistics 23 paket programında %95 güven aralığında varyans analizi (ANOVA) ile test edilmiştir. Elde edilen bulgular çoklu karşılaştırma Duncan testi ile %95 güven aralığında %5 ($p < 0.05$) anlamlılık düzeyinde değerlendirilmiştir. Ayrıca araştırmada iki antikoru(ticari anti-PA mAb ve bitkide üretilen anti-dPA83(E) mAb); 4 farklı antijen(gPA83, dPA83(E), dPA83(P) ve PA83-MQ2) ile farklı konsantrasyonlara göre anlamlı bir farklılık gösterip göstermediğini belirleyebilmek adına bağımsız örneklem için Independent Sample T Testi yapılmıştır.

4.4.1. Ticari anti-PA mAb ile gPA83, dPA83(E), dPA83(P) ve PA83-MQ2 Antijenlerinin Konsantrasyon Değişkenleri Arasında Anova Analizi

Anova analizi sonuçlarına göre antijenlerin konsantrasyonlar üzerindeki etkisi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu gözlenmiştir ($p < 0.05$). Duncan çoklu test sonuçları Çizelge 4.5’de verilmiştir. Test sonuçları incelendiğinde ise, gPA83 antijeni için 5, 25 ve 50ng, 50 ve 100ng, 100 ve 200ng; 200ng ve 500ng ve 500ng ve 1000ng konsantrasyonu aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p > 0.05$). 100ng konsantrasyonu 5ng ve 25ng, ile anlamlı ($p < 0.05$), 50ng konsantrasyonu ile arasında anlamsız ($p > 0.05$) bir fark görülmektedir. 200ng konsantrasyonu 5 ng, 25ng ve 50ng konsantrasyonları arasında anlamlı bir fark olduğu ($p < 0.05$) ancak 100ng ile arasında anlamlı fark olmadığı ($p > 0.05$) görülmüştür. 500ng konsantrasyonu 5 ng, 25ng, 50ng ve 100ng konsantrasyonları ile arasında anlamlı bir fark olduğu ($p < 0.05$) ancak 200ng konsantrasyonu ile aralarında anlamsız bir fark olmadığı($p > 0.05$) gözlenmiştir. 1000ng konsantrasyonu 500ng konsantrasyonu ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir($p > 0.05$).

Duncan çoklu test sonuçlarına göre dPA83 (E) antijeni 50ng konsantrasyonu 5 ng konsantrasyonları arasında anlamlı bir fark olduğu ($p < 0.05$) ancak 25ng konsantrasyonu ile arasında anlamlı bir fark olmadığı ($p > 0.05$) görülmüştür. 100ng konsantrasyonu 5 ng ve 25ng, ile anlamlı ($p < 0.05$), 50ng ve 200ng konsantrasyonu ile arasında anlamsız bir fark görülmektedir ($p > 0.05$). 200ng konsantrasyonu 5 ng ve 25ng konsantrasyonu ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu ($p < 0.05$) ancak 50ng ve 100ng konsantrasyonları arasında anlamlı fark olmadığı görülmüştür ($p > 0.05$). 500ng konsantrasyonu 5 ng, 25ng ve 50ng konsantrasyonları ile arasında anlamlı bir fark olduğu ($p < 0.05$) ancak 100ng ve 200ng konsantrasyonu ile aralarında anlamlı bir fark olmadığı ($p > 0.05$) gözlenmiştir. 1000ng konsantrasyonu 5ng, 25ng, 50ng ve 100ng konsantrasyonu ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu ($p < 0.05$) ancak 200ng ve 500ng konsantrasyonları ile arasında anlamlı bir fark olmadığı ($p > 0.05$) tespit edilmiştir.

dPA83P antijeni için test sonuçları incelendiğinde 50ng ve 5 ng konsantrasyonları arasında anlamlı bir fark olduğu ($p < 0.05$) ancak 25ng konsantrasyonu ile arasında anlamlı bir fark olmadığı ($p > 0.05$) görülmüştür. 500ng konsantrasyonu 5 ng, 25ng ve 50ng ile anlamlı ($p < 0.05$), 100ng ve 200ng konsantrasyonu ile arasında anlamsız ($p > 0.05$) bir fark görülmektedir. 1000ng konsantrasyonun, tüm diğer konsantrasyonlar ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

Duncan çoklu test sonuçlarına göre PA83-MQ2 antijeni için 50ng ve 5 ng konsantrasyonları arasında anlamlı bir fark olduğu ($p<0.05$) ancak 25ng konsantrasyonu ile arasında anlamlı bir fark olmadığı ($p>0.05$) görülmüştür. 100ng konsantrasyonu 5 ng ile 25ng konsantrasyonu arasında anlamlı ($p<0.05$) ancak 50ng konsantrasyonu ile arasında anlamsız ($p>0.05$) bir fark görülmüştür. 500ng konsantrasyonu 5 ng ve 25ng ve 50ng ile anlamlı ($p<0.05$), 100ng ve 200ng konsantrasyonu ile arasında anlamsız ($p>0.05$) bir fark görülmektedir. 1000ng konsantrasyonu 500ng konsantrasyon ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) bir fark bulunamamış ancak 5 ng, 25ng, 50ng, 100ng ve 200ng konsantrasyonlar ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) bir fark olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Çizelge 4.5. Ticari anti-PA mAb ile gPA83, dPA83(E), dPA83(P) ve PA83-MQ2 Antijenlerinin Konsantrasyon Değişkenleri arasındaki Anova Analiz Sonuçları

Konsantrasyon	N	ANTİJENLER																							
		gPA83					dPA83E					dPA83(P)					PA83MQ2								
		Subset for alpha = 0.05					Subset for alpha = 0.05					Subset for alpha = 0.05					Subset for alpha = 0.05								
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
5ng	3	0,06					0,15								0,04						0,12				
25ng	3	0,08					0,23	0,23							0,08	0,08					0,17	0,17			
50ng	3	0,13	0,13					0,36	0,36							0,113						0,26	0,26		
100ng	3		0,17	0,17							0,42	0,42						0,19					0,31	0,31	
200ng	3			0,21	0,21					0,50	0,50	0,50	0,50					0,20					0,35	0,35	
500ng	3				0,26	0,26					0,56	0,56	0,56					0,21						0,40	0,40
1000ng	3					0,32							0,66							0,26					0,50
Sig.		0,05	0,21	0,32	0,16	0,10	0,33	0,11	0,09	0,10	0,06	0,08	0,15	0,31	1,00	0,29	0,10	0,13	0,15	0,06	0,29	0,10	0,13	0,15	0,06

Sabit konsantrasyonlarda antijenler arasındaki istatistiksel farklar incelenmiş olup Anova sonuçları Çizelge 4.6'da verilmiştir. Yapılan Anova analizi sonuçlarına göre sabit konsantrasyonda antijenlerin etkisi arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). 5 ng, 25ng ve 50ng konsantrasyonlarında dPA83(P) ve gPA83 antijenleri ile PA83-MQ2 ve dPA83E antijenleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p > 0.05$). Ancak dPA83(P) ve PA83-MQ2 ve dPA83(E) ve gPA83 ile PA83-MQ2 ve dPA83(E) antijenleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). 100ng konsantrasyonda en yüksek değer dPA83(E) antijeninden elde edilirken, bunu sırasıyla PA83-MQ2, dPA83P ve gPA83 takip etmiştir. dPA83(P) ve gPA83 antijenleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulunurken ($p > 0.05$), diğer antijenler arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). 200ng konsantrasyonda en yüksek değer dPA83 (E) antijeninden elde edilirken ($p < 0.05$), diğer antijenler arasındaki fark bunu istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p > 0.05$). 500ng konsantrasyonda en yüksek değer dPA83(E) antijeninden elde edilirken ($p < 0.05$), dPA83(P) ile gPA83 ve gPA83 ile PA83-MQ2 antijenleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p > 0.05$). 1000ng konsantrasyonda en yüksek değer dPA83E antijeninden elde edilirken, bunu sırasıyla PA83-MQ2, gPA83 ve dPA83(P) antijenleri takip etmiştir. dPA83(P) ve gPA83 antijenleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulunurken ($p > 0.05$), diğer antijenler arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$).

Çizelge 4.6. Sabit Konsantrasyonlarda gPA83, dPA83(E), dPA83(P) ve PA83-MQ2 Antijenlerinin arasındaki Anova Analiz Sonuçları

Örnek	N	25 ng		100 ng		
		Subset for alpha = 0.05		Subset for alpha = 0.05		
		1	2	1	2	3
gPA83	3	0,08		0,17		
dPA83(P)	3	0,08		0,19		
PA83-MQ2	3		0,17		0,31	
dPA83(E)	3		0,23			0,42
Sig.		0,88	0,11	0,73	1,00	1,00

Örnek	N	5 ng		50 ng			200 ng		500 ng			1000 ng		
		Subset for alpha = 0.05		Subset for alpha = 0.05			Subset for alpha = 0.05		Subset for alpha = 0.05			Subset for alpha = 0.05		
		1	2	1	2	3	1	2	1	2	3	1	2	3
dPA83(P)	3	0,04		0,11			0,21		0,21			0,26		
gPA83	3	0,06		0,13			0,21		0,26	0,26		0,32		
PA83-MQ2	3		0,117		0,26		0,35			0,40			0,50	
dPA83(E)	3		0,15			0,36		0,50			0,56			0,66
Sig.		0,50	0,14	0,63	1,00	1,00	0,06	1,00	0,49	0,07	1,00	0,44	1,00	1,00

4.4.2. Bitkide üretilen anti-dPA83(E) mAb ile gPA83, dPA83(E), dPA83(P) ve PA83-MQ2 antijenlerinin konsantrasyon değişkenleri arasında Anova analizi

Bitkide Üretilen anti-dPA83(E) ile gPA83, dPA83(E), dPA83(P) ve PA83-MQ2 antijenlerinin konsantrasyonları incelendiğinde, konsantrasyonlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu gözlenmiştir ($p < 0.05$).

Duncan çoklu test sonuçları Çizelge 4.7’de verilmiştir. Duncan çoklu test sonuçları incelendiğinde, gPA83 antijeni için 5 ng; 25ng ile 50ng ; 100ng,200ng ile 500ng ve 200ng, 500ng ile 1000ng konsantrasyonu aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p > 0.05$). 200ng ve 500ng konsantrasyonları 5 ng, 25ng ile 50ng konsantrasyonları ile anlamlı ($p < 0.05$) olduğu gözlenmiştir. 1000ng konsantrasyonunun 5 ng, 25ng, 50ng ile 100ng konsantrasyonları ile anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p < 0.05$).

dPA83 (E) antijeninin test sonuçları incelendiğinde, 5 ng, 25ng ile 50ng; 100ng ile 200ng; 200ng ile 500ng ve 1000ng konsantrasyonu aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p > 0.05$). 200ng konsantrasyonu 5 ng, 25ng ve 50ng ile anlamlı ($p < 0.05$), 100ng konsantrasyonu ile aralarında anlamsız ($p > 0.05$) bir fark görülmektedir. 500ng konsantrasyonu 5 ng, 25ng, 50ng ve 100ng ile anlamlı ($p < 0.05$), 200ng konsantrasyonu ile aralarında anlamsız ($p > 0.05$) bir fark görülmektedir. 1000ng konsantrasyonu 5 ng, 25ng, 50ng,100ng, 200ng ve 500ng konsantrasyonu ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu ($p < 0.05$) tespit edilmiştir.

Duncan çoklu test sonuçlarına göre dPA83(P) antijeni için 500ng konsantrasyonu 5ng, 25ng,50ng ile anlamlı ($p < 0.05$), 100ng ve 200ng konsantrasyonu ile arasında anlamsız($p > 0.05$) bir fark görülmektedir. 1000ng konsantrasyonu 500ng konsantrasyonu ile anlamsız ($p > 0.05$) diğer konsantrasyonlar ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

Duncan çoklu test sonuçlarına göre PA83-MQ2 antijeni için 100ng ile 5 ng ve 25ng konsantrasyonları ile aralarında anlamlı bir fark olduğu ($p < 0.05$) ancak 50ng konsantrasyonu ile arasında anlamlı bir fark olmadığı ($p > 0.05$) görülmüştür. 200ng, 500ng ve 1000ng konsantrasyonları 5 ng, 25ng, 50ng ve 100ng konsantrasyon ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) bir fark olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.7. Bitkide Üretilen anti-dPA83(E) mAb ile gPA83, dPA83(E), dPA83(P) ve PA83-MQ2 Antijenlerinin Farklı Konsantrasyonlarda Anova Analiz Sonuçları

Konsantrasyon	N	ANTIJENLER																							
		gPA83					dPA83€					dPA83(P)					PA83-MQ2								
		Subset for alpha = 0.05					Subset for alpha = 0.05					Subset for alpha = 0.05					Subset for alpha = 0.05								
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5								
5ng	3	0,33				0,57								0,39					0,49						
25ng	3	0,59				0,62									0,48				0,52						
50ng	3	0,62				0,72										0,63			0,58	0,58					
100ng	3			0,76					0,94								0,74			0,62					
200ng	3			0,83	0,83				1,07	1,07							0,76			0,74					
500ng	3			0,85	0,85				1,18								0,80	0,80					0,86		
1000ng	3				0,89							1,47						0,86						1,07	
Sig.		1,00	0,65	0,15	0,27	0,15	0,15	0,26	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,19	0,18	0,05	0,33	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

pp-PA83 MAB normal antikor ile sabit konsantrasyonlarda antijenler arasındaki istatistiksel farklar incelenmiş olup Anova sonuçları Çizelge 4.8'de verilmiştir. Yapılan Anova analizi sonuçlarına göre sabit konsantrasyonda antijenlerin aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

5ng konsantrasyonda PA83-MQ2 ile gPA83 ve dPA83(P) antijenleri aralarında ve dPA83(E) antijeni ile PA83-MQ2 antijeni arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$). 25ng konsantrasyonunda dPA83(P) ve PA83-MQ2 antijenleri ile gPA83 ve dPA83(E) antijenleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$). 50ng konsantrasyonlarında PA83-MQ2, dPA83(P) ve gPA83 antijenleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$). Ancak PA83-MQ2, dPA83(P) ve gPA83 ile dPA83(E) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir ($p<0.05$). 100ng konsantrasyonda dPA83(E) antijeni ile gPA83, PA83-MQ2 ve dPA83(P) antijenleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$) ancak dPA83(P) ile gPA83 antijenleri aralarında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$). 200ng ve 500ng konsantrasyonlarında en yüksek değer dPA83(E) antijeninden elde edilirken ($p<0.05$), diğer antijenler aralarındaki farkın ise istatistiksel olarak anlamsız olduğu tespit edilmiştir ($p>0.05$). 1000ng konsantrasyonda en yüksek değer dPA83(E) antijeninden elde edilirken, bunu sırasıyla PA83-MQ2, gPA83 ve dPA83(P) antijenleri takip etmiştir. dPA83(P) ve gPA83 antijenleri ile PA83-MQ2 ile dPA83(P) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulunurken ($p>0.05$), PA83-MQ2 ile dPA83(P) antijeni ve dPA83(E) antijeni ile diğer antijenler arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

Çizelge 4.8. Bitkide Üretilen anti-dPA83(E) mAb ile gPA83, dPA83(E), dPA83(P) ve PA83-MQ2 Antijenlerinin Sabit Konsantrasyonlarda Anova Analiz Sonuçları

5 ng				25 ng				50 ng			
Duncan ^a				Duncan ^a				Duncan ^a			
Örnek	N	Subset for alpha = 0.05		Örnek	N	Subset for alpha = 0.05		Örnek	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2			1	2			1	2
gPA83	3	0,33		dPA83(P)	3	0,48		PA83-MQ2	3	0,58	
dPA83(P)	3	0,39		PA83-MQ2	3	0,52		gPA83	3	0,62	
PA83-MQ2	3	0,49	0,49	gPA83	3		0,59	dPA83(P)	3	0,63	
dPA83(E)	3		0,57	dPA83(E)	3		0,62	dPA83(E)	3		0,72
Sig.		0,05	0,22	Sig.		0,25	0,43	Sig.		0,14	1,00

100 ng				200 ng				
Duncan ^a				Duncan ^a				
Örnek	N	Subset for alpha = 0.05			Örnek	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2	3			1	2
PA83-MQ2	3	0,62			3	0,74		
dPA83(P)	3		0,74		3	0,76		
gPA83	3		0,76		3	0,83		
dPA83(E)	3			0,94	3		1,07	
Sig.		1,00	0,61	1,00	Sig.		0,20	1,00

500 ng				1000 ng				
Duncan ^a				Duncan ^a				
Örnek	N	Subset for alpha = 0.05		Örnek	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2			1	2	3
dPA83(P)	3	0,80		dPA83(P)	3	0,86		
gPA83	3	0,85		gPA83	3	0,89	0,89	
PA83-MQ2	3	0,86		PA83-MQ2	3		1,07	
dPA83(E)	3		1,18	dPA83(E)	3			1,47
Sig.		0,51	1,00	Sig.		0,71	0,08	1,00

4.4.3. Ticari anti-PA mAb ve bitkide üretilen anti-dPA83(E) mAb göre konsantrasyonlar ile antijenler(gPA83, dPA83(E), dPA83(P) ve PA83-MQ2) arasındaki farkın ortaya konulması için independent sample T testi

Araştırmada iki antikorun; 4 farklı antijen ile farklı konsantrasyonlara göre anlamlı bir farklılık gösterip göstermediğini belirleyebilmek adına bağımsız örneklem için İndepend ent SampleT Testi yapılmıştır. Bu teste göre öncelikle Levene testine bakılır. Levene testine göre $P>0.05$ dağılımın varyanslarının homojen (benzer ya da eşit) olduğu ve $p<0.05$ ise homojen olmadığı anlaşılmaktadır. Daha sonra T testi sonuçlarına bakılarak istatistik olarak anlamlılık durumları ortaya konulmuştur. Çizelge 4.9’da bu testten elde edilen sonuçlar görülmektedir.

İki farklı antikorun(ticari ve bitkide üretilen) gPA83 antijeninin konsantrasyonlarının karşılaştırılması yapıldığında; Levene testi sonucuna göre sadece 5 ng konsantrasyonunun gPA83 antijenine göre dağılım varyanslarının homojen olmadığı ($F= 12,803$ $p< 0,05$) ve istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmediği saptanmıştır. Diğer tüm konsantrasyonlarda dağılım varyanslarının homojen olduğu($p>0.05$) görülmüş ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur($p<0.05$). İki farklı antikorun(ticari ve bitkide üretilen) dPA83(E), dPA83(P) ve PA83-MQ2 antijenler ile konsantrasyonlarının karşılaştırılması incelendiğinde, söz konusu antijenlerin tüm konsantrasyonlar ile aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ve homojen olduğu saptanmıştır ($p<0.05$).

Çizelge 4.9. Ticari anti-PA mAb ve Bitki de Üretilen anti-dPA83(E) mAb aynı antijenler üzerindeki etkisi İnpedent Sample T Test Sonuçları

Group Statistics					
Konsantrasyon	Örnek	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
5 ng	gPA83	3	0,331	0,129	0,074
	gPA83ticari	3	0,058	0,006	0,003
25 ng	gPA83	3	0,592	0,009	0,005
	gPA83ticari	3	0,077	0,012	0,007
50 ng	gPA83	3	0,617	0,018	0,010
	gPA83ticari	3	0,131	0,042	0,024
100 ng	gPA83	3	0,761	0,036	0,021
	gPA83ticari	3	0,174	0,063	0,036
200 ng	gPA83	3	0,825	0,073	0,042
	gPA83ticari	3	0,208	0,040	0,023
500 ng	gPA83	3	0,847	0,069	0,040
	gPA83ticari	3	0,257	0,056	0,033
1000 ng	gPA83	3	0,89	0,038	0,022
	gPA83ticari	3	0,315	0,028	0,016

Group Statistics					
Konsantrasyon	Örnek	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
5 ng	dPA83(E)	3	0,574	0,035	0,020
	dPA83(E)ticari	3	0,152	0,030	0,018
25 ng	dPA83(E)	3	0,617	0,018	0,011
	dPA83(E)ticari	3	0,228	0,033	0,019
50 ng	dPA83(E)	3	0,717	0,053	0,031
	dPA83(E)ticari	3	0,357	0,042	0,024
100 ng	dPA83(E)	3	0,940	0,060	0,034
	dPA83(E)ticari	3	0,421	0,042	0,024
200 ng	dPA83(E)	3	1,074	0,116	0,067
	dPA83(E)ticari	3	0,502	0,138	0,080
500 ng	dPA83(E)	3	1,179	0,171	0,099
	dPA83(E)ticari	3	0,557	0,124	0,072
1000 ng	dPA83(E)	3	1,467	0,178	0,103
	dPA83(E)ticari	3	0,664	0,137	0,079

Çizelge 4.9. Ticari anti-PA mAb ve Bitki de Üretilen anti-dPA83(E) mAb aynı antijenler üzerindeki etkisi İnpedent Sample T Test Sonuçları (Devamı)**Group Statistics**

Konsantrasyon	Örnek	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
5 ng	dPA83(P)	3	0,39	0,075	0,04
	dPA83(P)ticari	3	0,04	0,008	0,01
25 ng	dPA83(P)	3	0,48	0,060	0,04
	dPA83(P)ticari	3	0,08	0,015	0,01
50 ng	dPA83(P)	3	0,63	0,055	0,03
	dPA83(P)ticari	3	0,11	0,010	0,01
100 ng	dPA83(P)	3	0,74	0,014	0,01
	dPA83(P)ticari	3	0,19	0,031	0,02
200 ng	dPA83(P)	3	0,76	0,014	0,01
	dPA83(P)ticari	3	0,21	0,015	0,01
500 ng	dPA83(P)	3	0,80	0,029	0,02
	dPA83(P)ticari	3	0,21	0,009	0,01
1000 ng	dPA83(P)	3	0,86	0,048	0,03
	dPA83(P)ticari	3	0,26	0,053	0,03

Group Statistics

Konsantrasyon	Örnek	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
5 ng	PA83-MQ2	3	0,49	0,048	0,03
	PA83-MQ2ticari	3	0,12	0,042	0,02
25 ng	PA83-MQ2	3	0,52	0,037	0,02
	PA83-MQ2ticari	3	0,17	0,063	0,04
50 ng	PA83-MQ2	3	0,58	0,014	0,01
	PA83-MQ2ticari	3	0,26	0,063	0,04
100 ng	PA83-MQ2	3	0,62	0,030	0,02
	PA83-MQ2ticari	3	0,31	0,037	0,02
200 ng	PA83-MQ2	3	0,74	0,048	0,03
	PA83-MQ2ticari	3	0,35	0,053	0,03
500 ng	PA83-MQ2	3	0,86	0,022	0,01
	PA83-MQ2ticari	3	0,40	0,081	0,05
1000 ng	PA83-MQ2	3	1,07	0,101	0,06
	PA83-MQ2ticari	3	0,50	0,080	0,05

5. SONUÇLAR

Bacillus anthracis'in neden olduğu şarbon, dayanıklı sporları yüzünden biyoterörizm için kaynak, bir arada olduğumuz ve tükettiğimiz hayvanlardan bulaşma nedeniyle de insanlar için büyük tehdit oluşturmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda güvenli, etkili ve düşük maliyetli bir şarbon aşısı elde edilememiştir. Şarbon tedavisinde kullanılan FDA onaylı aşı Bioanthrax(AVA) koruyucu antijen PA yanında ödem faktörü EF ve letal faktör LF içermesi nedeniyle yeterince güvenli değildir.

Memeli hücre kültürleri terapötik proteinler, enzimler ve antikor üretimi için ana platformdur. Ancak sınırlı ölçeklenebilirlik yüksek maliyet ve kirlilik riski nedeniyle artan dünya nüfusunun aşı ihtiyacını karşılayabilecek bir materyal değildir. Bitkiler memeliler gibi ökaryot canlılardır, buna artı olarak memelilerle ortak hastalıkları taşımazlar. Ayrıca bitkiler sağlam, ölçeklenebilir, düşük maliyetli ve güvenli olduğu için en umut verici terapötik protein üretim platformlarından.

Memelilerde kullanılacak olan aşı adayı, rekombinant proteinlerin prokaryot hücrelerde biyoreaktörlerde üretilmesi beraberinde yanlış katlanmış proteinleri getirebilir. Öte yandan bitkiler, diğer rekombinant protein ekspresyon sistemlerine kıyasla ökaryotik post-translasyonel modifikasyon (PTM) makinesine sahiptirler ve doğru katlanmış stabil, biyolojik olarak aktif rekombinant proteinlerin üretimi için ideal organizmalardır.

Başlangıç organizması prokaryot olan PA83, bir glikoprotein değildir. Ayrıca bitki bazlı ekspresyon sistemlerinde, N-bağlı glikozilasyondan geçerek üretilen proteinler, orijinde farklı bir glikan yapısına sahiptir. Bitki kaynaklı glikoproteinler, α -1,3-fukoz ve β -1,2-ksiloz kalıntısı içerir, ancak insanlar-1,4-galaktoz ve sialik asit kalıntısı içerir. Bu çalışmada hedef proteinin Endoglikozidaz H ile N-asetilglukozamin kesilerek, Peptid N-glikosidaz F GlcNAc ve asparajin kalıntıları arasından bağlantı kesilerek ve deglikozile mutant protein PA83-MQ2 üretilerek başlangıç organizmasında ki gibi deglikozile PA83 bitki geçici ekspresyon sistemi kullanılarak başarıyla üretilmiştir.

Uygun ve doğru bir şekilde post-translasyonel modifikasyonlar geliştirerek rekombinant proteinin üretimi, protein bazlı alt birim aşuların geliştirilmesi için en önemli noktadır. Yürütülen tez çalışması kapsamında agroinfiltrasyon kullanılarak *Nicotiana benthamiana* bitkilerinde kısa sürede (5dpi) yüksek saflıkta, biyolojik olarak aktif ve yüksek afiniteli proteinler üretilmiştir.

N-bağlı glikozilasyon mekanizmasının ve in vivo deglikozilasyon stratejisinin antijen-antikor afinitesi üzerindeki etkisini test etmek için; anti-mAb-pp-dPA83(E) ve ticari anti-mAb-PA83 kullanılmıştır. Bu tez çalışması doğrultusunda yapılan enzim bağlı immünosorbent deneyleri sonucunda laboratuvarımızda bitkide in vivo deglikozilasyon stratejisi ile üretilen anti-mAb-PA83 antikorunun ticari olarak üretilen mAb-PA83'e kıyasla PA83 varyantı rekombinant proteinlere daha yüksek afinite gösterdiği kanıtlanmış oldu. Ayrıca PA83 varyantlarından pp-dPA83(E) antijeninin deneyde kullanılan her iki antikorada diğer PA83 varyantlarına kıyasla daha yüksek afinite gösterdiği görüldü. 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90°C yapılan termo-Elisa deneyleri sonucunda PA83 varyantı

dPA83(E) antijeninin stabilitesini diğer antijenlere kıyasla daha iyi koruyarak antikörlere karşı afinitesini kaybetmediği gözlemlenmiştir.

Çalışmada yapılan istatistiksel analizlere (ANOVA) göre antijen konsantrasyonları sabit tutulup antijenler arasındaki fark incelendiğinde istatistiksel olarak en yüksek değerlerin dPA83E antijeninden elde edildiği görülmektedir ($p < 0.05$). Bu kapsamda, dPA83E antijeninin etkinliğinin diğer antijenlere kıyasla daha yüksek olduğu sonucuna varılabilir. Ayrıca ticari anti-PA mAb ve bitki de üretilen anti-dPA83(E) mAb aynı antijenler üzerindeki etkisi inpedent sample T test sonuçları incelendiğinde bitki de üretilen anti-dPA83(E) afinitesinin daha yüksek olduğu görülmektedir ($p < 0.05$).

Özetle laboratuvarımızda daha önceden yapılan ve tez çalışmam doğrultusunda elde edilen verilere göre PA83 varyantlarından bitki geçici ekspresyon sistemi kullanılarak *Nicotiana benthamiana* da in vivo deqlikozilasyon stratejisi ile üretilen dPA83(E) antijenin alt birim rekombinant protein aşı adayı olarak kullanılmasının uygun olduğunu göstermiştir.

Bu çalışma bitki geçici ekspresyon sistemi kullanılarak *Nicotiana benthamiana* da in vivo deqlikozilasyon stratejisi ile üretilen antijenler, antikörlar ve rekombinant enzimlerin güçlü bir altbirim rekombinant aşı adayı olduğunu göstermiş ve aynı zamanda literatüre büyük ölçüde katkılar sağlamıştır.

6. KAYNAKLAR

ABCAM, (global research support - Leading recombinant reagents)

Anna K.Hulla, Carolyn J.Criscuolo, Vadim Mett, Herman Groen, Wilma Steeman, Hans Westra, Gail Chapman, Bart Legutki, Les Baillie, Vidadi Yusibova, Human-derived, plant-produced monoclonal antibody for the treatment of anthrax, *Vaccine* Volume 23, Issues 17–18, 18 March 2005, Pages 2082-2086

Baillie L, Read TD. *Bacillus anthracis*: a bug with attitude. *Curr Opin Microbiol* 2001;4:78–81.

Blom, N., Sicheritz-Pontén, T., Gupta, R., Gammeltoft, S., Brunak, S. 2004. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*,4, 1633–1649.

Bosch, D. and Schots A. 2010. Plant glycans: friend or foe in vaccine development, *Expert Review of Vaccines*, 9(8):835-42

CDC, Centers for disease control and prevention, Anthrax

D. B. LacyR., J. Collier, Structure and Function of Anthrax Toxin, *Part of the Current Topics in Microbiology and Immunology book series* (volume 271)

Dixon, T.C., Meselson, M., Guillemin, J., Hanna, P.C.N. 1999. Anthrax. *England Journal of Medicine*, Sep 9; 341(11):815-826.

Du, J., Rietman, H., Vleeshouwers, V.G. 2014. Agroinfiltration and PVX agroinfection in potato and *Nicotiana benthamiana*, *Journal of Visualized Experiments*. 2014;(83):e50971.

Eymen, E. (2007). SPSS 15.0 Veri Analizi Yöntemleri. *SPSS Kullanma Kılavuzu U. Erman Eymen İstatistik Merkezi Yayın No: (1)*

FBI, History, Amerithrax or Anthrax Investigation, 2001. (<https://www.fbi.gov/history/famous-cases/amerithrax-or-anthrax-investigation>)

Fellows P.F., Linscott M.K., Ivins B.E., Pitt M.L., Rossi C.A., Gibbs P.H., Friedlander A.M. Efficacy of a human anthrax vaccine in guinea pigs, rabbits, and rhesus macaques against challenge by *Bacillus anthracis* isolates of diverse geographical origin. *Vaccine*. 2001;19:3241–3247. doi: 10.1016/S0264-410X(01)00021-4

Gelvin, 2003Mett, V., Farrance, C.E., Green, B.J., Yusibov, V. 2008. Plants as biofactories, *Biologicals*, 36(6):354-8

Gomord, V. And Faye, L. 2004. Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 7:171–181.

Gomord, V., Fitchette, A.C., Bouaouiche, L.M., Dupas, C.S., Plasson, C., Michaud, D., Faye, L., 2010. Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production, *Plant Biotechnology Journal*, 8:564–587

Henry C. Baggett, No Evidence of a Mild Form of Inhalational *Bacillus anthracis* Infection During a Bioterrorism-Related Inhalational Anthrax Outbreak in Washington, D.C., in 2001, Oxford Academic, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 41, Issue 7, 1 October 2005, Pages 991–997

- Ndyabahinduka DG, Chu IH, Abdou AH, Gaifuba JK, Human gastrointestinal anthrax epidemic. *Ann Ist Super Sanita*. 1984; 20 (2-3): 205-8.
- James J Sejvar, Fred C Tenover, David S Stephens, Management of anthrax meningitis, 2005 May;5(5):287-95. doi: 10.1016/S1473-3099(05)70113-4.
- Jefferds MD, Laserson K, Fry AM, et al. Adherence to antimicrobial inhalational anthrax prophylaxis among postal workers, Washington, DC, 2001. *Emerg Infect Dis*. 2002;8(10):1138–1144.
- Julia Y Wang 1 and Michael H Roehrl 2, Anthrax vaccine design: strategies to achieve comprehensive protection against spore, bacillus, and toxin. *Medical Immunology* 2005, 4:4 doi:10.1186/1476-9433-4-4
- Karaçalı S. Glikobiyoloji Güncel Moleküler Biyoloji. *Turk J Vet Anim Sci* 2003; 27: 489-495.
- Krenek, P., Samajova, O., Luptovciak, I., Doskocilova, A., Komis, G., Samaj, J. Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: principles, methods and applications. *Biotechnology Advances*. 2015;33:1024-1042.
- Kuo SR, Willingham MC, Bour SH, Andreas EA, Park SK, Jackson C, Duesbery NS, Leppla SH, Tang WJ, Frankel AE. Anthrax toxin-induced shock in rats is associated with pulmonary edema and hemorrhage. *Microb Pathog* 44: 467–472, 2008.
- Leuzinger, K., Dent, M., Hurtado1, J., Stahnke, J., Lai1, H. , Zhou, X., Chen, Q. 2013. Efficient Agroinfiltration of Plants for High-level Transient Expression of Recombinant Proteins. *Journal of Visualized Experiments*, (77), e50521, doi:10.3791/50521
- Lincoln RE, et al. Successful treatment of rhesus monkeys for septicemic anthrax. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1964;4:759–763.
- Mamedov, T., Ghosh, A., Jones, R.M., Mett, V., Farrance, C.E., et al. 2012. Production of non-glycosylated recombinant proteins in *Nicotiana benthamiana* plants by co-expressing bacterial PNGase F. *Plant Biotechnology Journal*, pp. 773–782.
- Mamedov, T., and Yusibov V. 2013. In vivo deglycosylation of recombinant proteins in plants by co-expression with bacterial PNGase F. *Bioengineered*, 4(5), 338–342.
- Mamedov, T, Chichester, JA, Jones, RM, Ghosh, A, Coffin, MV, Herschbach, K, et al. 2016. Production of functionally active and 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*, 21; 11(4): e0153956.
- 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*, 12, e0183589.
- Marcus H, Danieli R, Epstein E, Velan B, Shafferman A, Reuveny S. Contribution of immunological memory to protective immunity conferred by a *Bacillus anthracis* protective antigen-based vaccine. *Infect Immun* 2004;72(6):3471–7

- Mett, V., Chichester, J.A, Stewart, M.L., Musiychuk, K., Bi, H., Reifsnnyder, C.J., Hull, A.K., Albrecht, M.T., Goldman, S., Baillie, L.W., Yusibov, V. 2011. A non-glycosylated, plant-produced human monoclonal antibody against anthrax protective antigen protects mice and non-human primates from *B. anthracis* spore challenge, *Human Vaccines*,7:183-190
- M E Hugh-Jones 1, V de Vos, Anthrax and wildlife, *World organization for animal health*, 2002 Aug;21(2):359-83.
- 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 Chemist*, Vol. 267, No. 23, pp, 16396-16402,1992.
- MS Moayeri, GR Zendehbudi, Effects of elastic property of the wall on flow characteristics through arterial stenoses, *Journal of Biomechanics*, Volume 36, Issue 4, April 2003, Pages 525-535
- Norkunas, K., Harding, R., Dale, J. et al. 2018. Improving agroinfiltration-based transient gene expression in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Methods* 14, 71
- Pitt MLM, Little SF, Ivins BE, Fellows P, Barth J, Hewetson J, et al. In vitro correlate of immunity in a rabbit model of inhalational anthrax. *Vaccine* 2001;19:4768–73.
- Per Hägglund 1, Jakob Bunkenborg, Felix Elortza, Ole Nørregaard Jensen, Peter Roepstorff, A new strategy for identification of N-glycosylated proteins and unambiguous assignment of their glycosylation sites using HILIC enrichment and partial deglycosylation, May-Jun 2004;3(3):556-66. doi: 10.1021/pr034112b.
- Schneemann, A. and Manchester, M. 2009. Anti-toxin antibodies in prophylaxis and treatment of inhalation anthrax. *Future Microbiology*, Vol. 4: 35–43.
- Şenoğlu B, Acıtaş Ş. 2010. İstatistiksel Deney Tasarımı: Sabit Etkili Modeller. *Nobel yayın Dağıtım*, Sf 51-62, 1. Basım. ISBN: 978-605-395-394-4.
- Timothy D Read et. al., The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria, *Nature*. 2003 May 1; 423 (6935): 81-6. doi: 10.1038 / nature01586.
- Van Ness G, Stein CD. Soils of the United States favorable for anthrax. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1956;128(1):7–12. Epub 1956/01/01. pmid:13278269.
- Yusibov, V.M. and Mamedov, T.G. 2010. Plants as an Alternative System for Expression of Vaccine Antigens. *Proceedings of ANAS (Biological Sciences)*

ÖZGEÇMİŞ

İrem Gürbüzaslan

irem.gurbuzaslan@gmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2018-2021	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Antalya
Lisans 2013-2017	Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Isparta
Lise 2009-2010 2010-2013	İstanbul Haydarpaşa Teknik Okulları İstanbul Hatice Bayraktar Anadolu Lisesi

PROJELER

Bursiyer (Tübitak 1001 Projesi) 2018-Devam Ediyor	Şarbona Karşı Aşı Adayı Olarak Kullanılabilir Koruyucu Antijen (Pa)'nın Bitkide Üretilmiş Deglikozile Formunun Üretilmesi, Karakterizasyonu Ve Klinik Öncesi Değerlendirilmesi
--	--