

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**FARKLI BİTKİ EKSPRESYON VEKTÖRLERİ TARAFINDAN ÜRETİLEN
DEGLİKOSİLE EDİLMİŞ PA83 ANTİJENİNİN EKSPRESYON
SEVİYELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Esmira MİRZALİYEVA

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

HAZİRAN 2020

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**

**FARKLI BİTKİ EKSPRESYON VEKTÖRLERİ TARAFINDAN ÜRETİLEN
DEGLİKOSİLE EDİLMİŞ PA83 ANTİJENİNİN EKSPRESYON
SEVİYELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Esmira MİRZALİYEVA

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

HAZİRAN 2020

ANTALYA

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

**FARKLI BİTKİ EKSPRESYON VEKTÖRLERİ TARAFINDAN ÜRETİLEN
DEGLİKOSİLE EDİLMİŞ PA83 ANTİJENİNİN EKSPRESYON
SEVİYELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Esmira MİRZALİYEVA

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez Tübitak tarafından 115S077 nolu proje ile desteklenmiştir.

HAZİRAN 2020

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI BİTKİ EKSPRESYON VEKTÖRLERİ TARAFINDAN ÜRETİLEN
DEGLİKOSİLE EDİLMİŞ PA83 ANTİJENİNİN EKSPRESYON
SEVİYELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Esmira MİRZALİYEVA
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez .../.../2020 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV (Danışman)
Prof. Dr. Nedim MUTLU
Doç. Dr. Muhammet TONGUÇ

ÖZET

FARKLI BİTKİ EKSPRESYON VEKTÖRLERİ TARAFINDAN ÜRETİLEN DEGLİKOSİLE EDİLMİŞ PA83 ANTİJENİNİN EKSPRESYON SEVİYELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI Esmira MİRZALİYEVA

Yüksek Lisans Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV

HAZİRAN 2020, 40 sayfa

Son yıllarda, rekombinant proteinler için üretim konakçıları olarak bitkiler seçilmektedir. Sebepler açıktır - bitkiler hayvan ve insan patojenleri içermez, N-bağlı glikosilasyon dahil olmak üzere ökaryotik tip posttranslasyonel modifikasyonlar sağlar ve protein üretimi için neredeyse sınırsız ölçeklenebilirlik sunar. *Bacillus anthracis*'in ölümcül bir biyolojik silah olarak başarılı bir şekilde kullanılması şarbona karşı daha etkili aşıların geliştirilmesinde araştırma ilgisini yeniden başlatmıştır. *B. anthracis*'in koruyucu antijeni (PA) şarbon toksininin önemli bir bileşenidir, ancak bir glikoprotein değildir. Bununla birlikte, dizisinin dokuz potansiyel glikosilasyon sahası vardır ve *Nicotiana benthamiana* bitkilerinde eksprese edildiğinde anormal şekilde glikosile olduğu gösterilmiştir. Son zamanlarda PA83 antijeninin glikozillenmemiş versiyonları, ya *in vivo* deglikolizasyon stratejisi (PNGase F veya Endo H temelli), (Mamedov vd. 2012; Mamedov vd. 2016; Mamedov vd. 2017) ya da mutasyon (6 tane N-glikolizasyon bölgesine yönlendirilmiş mutagenез), (Mamedov vd. 2016) yaklaşımı vasıtasıyla üretilmiştir. Bu çalışmada, PA83'ün (PA83-MQ2) yeni mutant formu (yedi N-glikosilasyon sahasının mutasyonu ile) hangisinin yüksek seviyede ekspresyon sağladığını belirlemek için iki bitki ekspresyon vektörü kullanılarak üretilmiştir. Üretilen PA83'ün deglikosile edilmiş antijenleri, IMAC afinite kolonu kromatografi yöntemi kullanılarak saflaştırıldı ve saflaştırılmış protein stabilite analizleri için değerlendirildi.

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

JÜRİ: Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV
Prof. Dr. Nedim MUTLU
Doç. Dr. Muhammet TONGUÇ

ABSTRACT

COMPARISON OF EXPRESSION LEVELS OF DEGLYCOSYLATED PA83 ANTIGEN PRODUCED BY DIFFERENT PLANT EXPRESSION VECTORS.

Esmira MİRZALİYEVA

MSc Thesis in Agricultural Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV

June 2020, 40 pages

In recent years, many groups are selecting plants as the production hosts for recombinant proteins. The reasons are obvious—plants are free of animal and human pathogens, provide eukaryotic type of posttranslational modifications, including N-linked glycosylation and offer virtually unlimited scalability for protein production.. The use of *Bacillus anthracis* as a lethal biological weapon has prompted renewed research interest for the development of safe and cost effective vaccines against anthrax in case of mass immunization. Protective antigen (PA) of *B. anthracis* is an important component of anthrax toxin. This protein is not a glycoprotein in its native host. However, its sequence has nine potential glycosylation sites and it has been shown to be aberrantly glycosylated when expressed in *Nicotiana benthamiana* plants. Recently, a non-glycosylated versions of PA83 antigen was produced by *in vivo* deglycosylation strategy (PNGase F or Endo H based) (Mamedov et al. 2012; Mamedov et al. 2016; Mamedov et al. 2017) or by site-directed mutagenesis-based approach, by mutation of six N-Glycosylations sites (Mamedov et al. 2016). In this study, new mutant form (by mutation of seven N-glycosylation sites) of PA83 (PA83-MQ2) was produced using two plant expression vectors to determine which one provide the high level expression. Deglycosylated antigens of PA83 were purified using the IMAC affinity column chromatography method and evaluated for purified protein stability analysis.

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

COMMITTEE: Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV
Prof. Dr. Nedim MUTLU
Assoc.Prof. Muhammet TONGUÇ

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında Şarbon hastalığında tedavi amaçlı kullanılabilecek farklı bitki ekspresyon vektörleri tarafından üretilen deglikosile edilmiş PA83 antijeninin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması çalışmaları yürütülmüştür. Öncelikle tez konumun belirlenmesi aşamasından itibaren, yönlendirmeleri, yardımları ve motivasyonu sayesinde tezimin sonuçlandırılmasında bana danışmanlık yapan saygıdeğer hocamız Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV'a teşekkürlerimi sunarım.

Deneyisel çalışmalarım boyunca teknik olarak yardımlarını esirgemeyen ve her zaman yanımda olan, desteklerini hiç esirgemeyen laboratuvardaki tüm arkadaşlarıma teşekkürü borç bilirim.

Uzun süreli çalışmalarım sırasında her zaman desteğini esirgemeyen aileme ve tüm dostlarıma sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
AKADEMİK BEYAN	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	3
2.1. Şarbon Hastalığı	3
2.2. Şarbon Hastalığının Çeşitleri: Kutanöz, Gastrointestinal ve İnhalasyon	4
2.2.1. Kutanöz Şarbon	4
2.2.2. İnhalasyon Şarbonu	5
2.2.3. Gastrointestinal Şarbon	5
2.3. <i>Bacillus Anthracis</i> Toksinlerinin Etki Mekanizması	5
2.4. Tedavi Yolları (Aşı Tedavisi).....	7
2.5. Bitki Ekspresyon (İfade) Sistemleri	9
2.6. Deglikasilasyon Stratejileri.....	15
3. MATERYAL VE METOT.....	14
3.1. MQ2 geninin PZR’u sonrası Saflaştırılması.....	15
3.2. LpI Plazmitinin ve MQ2 genin Kesimi	15
3.3. MQ2 geninin ve LpI Plazmitinin Agaroza Jelden Geri Kazanımı	15
3.4. Ligasyon	16
3.5. <i>E.coli</i> XL ₁ Blue kompetent hücrelerine ’’Heat Shock’’Transformasyon	16
3.6. Elektroporasyon Ve İnfiltrasyon	17
3.7. Yeşil Bitki Yapraklarından Protein Ekstraksiyonu	18
3.8. Western Blot ve SDS-PAGE Analizi	18
3.9. SDS-PAGE Analizi	19

3.10. HisTaq Etiketli Rekombinant MQ2 Proteinlerinin Saflaştırılması.....	21
3.11. Stabilite Analizleri.....	22
4. BULGULAR VE TARTIşMA	23
4.1. Genlerin Klonlanması.....	23
4.2. Western Blot ve SDS PAGE Analizi.....	24
4.3. Farklı Bitki Ekspresyon Vektörleri Tarafından Üretilen Rekombinant Histaq (His6) Etiketli MQ2 Proteinlerinin Saflaştırılması	26
4.4. Saflaştırılmış MQ2 Proteinlerinin Stabilite Sonrası SDS-PAGE ve Western Blot Analizi.....	27
5. SONUÇ.....	32
6. KAYNAKLAR.....	33
ÖZGEÇMİş.....	40

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Farklı bitki ekspresyon vektörleri tarafından üretilen deglikosile edilmiş PA83 antijeninin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak bulunduğunu belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

....../....../2020

Esmira MİRZALİYEVA

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

µg	: mikro gram
µl	: mikro litre
µm	: mikro metre
bp	: baz çifti
s	: saat
dk	: dakika
sn	: saniye
gr	: gram
°C	: santigrat
His	: Histidin
Hyp	: Hidroksiprolin
kb	: kilobaz
kDa	: kilo dalton
kg	: kilogram
l	: litre
ml	: mililitre
vd	: ve diğerleri

Kısaltmalar

LpI	: pEAQ
Asn	: Asparajin
EF	: Edema faktör
ER	: Endoplazmik retikulum
ET	: Edema toksin
LF	: Letal faktör
LT	: Letal toksin
PA	: Koruyucu antijen
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat-PoliAkrilamid Gel Elektroforez

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. a) Şarbon hastalığının çeşitleri ve <i>Bacillus Anthracis</i> ’in yaşam döngüsü.	
b) <i>Bacillus Anthracis</i> ’in taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü	3
Şekil 2.2. Salgılanan <i>Bacillus Anthracis</i> toksinlerinin etki mekanizması.	6
Şekil 2.3. a) N-bağlı Glikosilasyon; b) O-bağlı Glikosilasyon.	12
Şekil 2.4. N-bağlı glikanların çekirdeğinde bulunan PNGase F ve Endo H duyarlı bağlar.	13
Şekil 4.1. a) AgeI ve XhoI restriksiyon enzimleri ile kesilen pJET1.2- MQ2 plasmidinin agaroz jel görüntüsü; b) MQ2 geninin jelden gerikazanımı .	23
Şekil 4.2. a) AgeI ve XhoI enzimleri ile kesilen LpI-nin agaroz jel görüntüsü; b) AgeI ve XhoI enzimleri ile kesilen LpI-nin jelden geri kazanımının agaroz jel görüntüsü.....	24
Şekil 4.3. AgeI ve XhoI restriksiyon enzimler ile kesilen LpI -MQ2	24
Şekil 4.4. M:LP-PA83-MQ kontraktının farklı kolonilerinin infiltrasyon sonrası Western Blot görüntüsü	25
Şekil 4.5. Farklı bitki ekspresyon vektörleri tarafından üretilen glikolize ve deglikolize edilmiş PA83 antijeninin ekspresyon seviyelerinin Western Blot analiziyle karşılaştırılması	25
Şekil 4.6. Farklı bitki ekspresyon vektörleri tarafından üretilen deglikolize edilmiş PA83 antijeninin HisTag purifikasyonu sonrası SDS görüntüsü	26
Şekil 4.7. Saflaştırılmış MQ2 Proteinlerinin 37°C temperaturda 12, 24, 48, 72, 96 saat inkubasyon Sonrası Western Blot-Analizi görüntüsü.....	27
Şekil 4.8. Saflaştırılmış MQ2 Proteinlerinin 37°C temperaturda 12, 24, 48, 72, 96 saat inkubasyon Sonrası SDS PAGE analizi görüntüsü	27

Şekil 4.9. Saflaştırılmış LpI- MQ2 proteininin farklı derecelerde termal stabilite sonrası çöktürülerek yapılan SDS PAGE ve Western Blot analizi.....	28
Şekil 4.10. Saflaştırılmış pGR-MQ2 ve LpI- MQ2 proteinlerinin farklı derecelerde termal stabilite sonrası çöktürülerek yapılan Western Blot analizi.....	29
Şekil 4.11. Saflaştırılmış pGR-MQ2 ve LpI- MQ2 proteinlerinin farklı derecelerde termal stabilite sonrası çöktürülerek yapılan Western Blot analizi.....	29
Şekil 4.12. Saflaştırılmış pGR-MQ2 ve LpI- MQ2 proteinlerinin oda sıcaklığında 5 hafta inkubasyon sonrasında çöktürülmeden yapılan Western Blot analizi görüntüsü	30
Şekil 4.13. Saflaştırılmış pGR-MQ2 ve LpI- MQ2 proteinlerinin oda sıcaklığında 5 hafta inkubasyon sonrasında yapılan Western Blot görüntüsü	30
Şekil 4.14. Saflaştırılmış pGR-MQ2 ve LpI- MQ2 proteinlerinin +4°C-de 3 ay inkubasyon sonrasında çöktürülerek yapılan Western Blot görüntüsü	31
Şekil 4.15. Saflaştırılmış pGR-MQ2 ve LpI- MQ2 proteinlerinin oda sıcaklığında 5 hafta inkubasyon sonrasında çöktürülerek yapılan Western Blot analizi görüntüsü.....	31

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. MQ2 genininin PZR’nu içeriği.....	14
Çizelge 3.2. MQ2 genininin PZR’nun aşamaları.....	14
Çizelge 3.3. Restriksiyon enzimleri ile a) Plazmitin Kesimi; b) PZR ürünü kesim....	15
Çizelge 3.4. Ligasyon reaksiyonu bileşen ve miktarları.....	16
Çizelge 4.1. Saflaştırılmış pGR-MQ2 ve LpI- MQ2 proteinlerinin Western Blot analizleri sonrası stabilite değerlendirmesi.....	28

1. GİRİŞ

Memeliler ve insanlarda görülen ve tarih boyunca önemli bir hastalık olan şarbona *Bacillus anthracis* adı verilen ve spor oluşturan bir bakteri neden olur (Mock M vd. 2001; Boutiba-Ben Boubaker vd. 2001; Jedrzejas M vd. 2002). Şarbonun bilinen en eski tanımı, (M.Ö. 15. yüzyıl) Mısırlıların sığırlarını öldürdüğü bildirildiği Genesis Kitabı'nda bulunmaktadır (Hart CA vd. 2002). Daha sonraki Hindu, Yunan ve Roma literatüründe hayvanlarda ve insanlarda görünen bu hastalığın çok sayıda tanımı vardır (Dirckx JH 1981). 1600'lerde Avrupa'da büyük bir alanı kaplayan şarbon salgını meydana geldi ve hastalığa “siyah bane” denildi (Turnbull PC 2002). Avrupa'nın sanayileşmesiyle, özellikle ithal hayvan derilerinin ve yünlerinin işlendiği fabrikalarda bu tip şarbon salgınları sık sık ortaya çıkmaya başladı (Hugh-Jones M 1999). Hastalık çoğu gelişmekte olan ülkede hala enzootiktir ve diğer birçok ülkede nadiren de olsa görülüyor. (Hugh-Jones M 1999).

Şarbon dünya genelinde dağılımı olan zoonotik bir hastalıktır (Hugh-Jones M 1999; Brachman PS 2002; Mal'tseva AN 1990). Hastalığa neden olan bakterinin spor oluşturma yeteneği, organizmanın diğer bakterilerin çoğunu yok eden çevresel ve dezenfekte edici önlemlerden kurtulmasına izin verir. Otoburlar, doğal konaklar, toprak tüketerek enfekte olurlar ve insanlar, enfekte hayvanlarla ya da ürünleriyle temas ederek tesadüfen enfekte olurlar (Watson A vd. 1994). İnsan şarbonun en yaygın alanı, gelişmekte olan ülkelerdeki hayvancılık, yün, keçi derisi ve postların depolandığı ve işlendiği işletmeler gibi çalışan enzootik bölgelerdir (Turnbull PC 2002, Hugh-Jones M 1999). Batı Afrika dünyanın en çok etkilenen bölgesidir (Hugh-Jones M 1999; Davies JC 1982). Şarbon Afrika, Orta Amerika, İspanya, Yunanistan, Türkiye, Arnavutluk, Romanya, Orta Asya ve Orta Doğu'nun diğer bölgelerinde de önemli bir sorundur (Hugh-Jones M 1999; Cieslak TJ 1999; Kaya A, Tasyaran MA 2002; Bales ME 2001; Schmid G vd. 2002). 1979 ve 1985 yılları arasında Zimbabwe yaklaşık 10.000 vaka ile ve neredeyse tamamı kutanöz şarbon enfeksiyonu olan en büyük salgın bölgesiydi. Bunun da iç savaş ve veteriner halk sağlığı uygulamalarının kesintiye uğraması ile bağlantılı olduğu düşünülüyor. (Davies JC 1982, Davies JC 1983, Davies JC 1985). 1942 ve 1943'te Gruinard Adası'nda yapılan deneylerde, *Bacillus anthracis* sporları içeren küçük bombalar hazırlanarak bir portaldan askıya alındı ve adanın yüzeyinde yaygın kirlenme meydana getirerek patlatıldı. Gruinard testinin bir sonucu olarak, ada çok fazla kontamine oldu ve ziyaretçilere tamamen kapatıldı. Deney sonrası yıllar boyunca, adanın geri kalan hayvanlarında genetik değişimin belirgin belirtileri olduğu rapor edilmiştir (Aldhous P 1990; Manchee RJ vd. 1983; Manchee RJ 1982; Manchee RJ vd. 1981). Dünya geneline baktığımızda her yıl 20.000-100.000 şarbon vakası olduğu tahmin edilmektedir (Cieslak TJ 1999). Günümüzde gelişmekte olan ülkelere hala şarbon sorun olmaya devam ettiğinden, bu bölgelerden ithal edilen hayvansal ürünler risk oluşturmaya devam etmektedir. Ekonomik olarak gelişmiş ülkelere ise hayvan şarbonunun kontrol altına alındığı, sadece insanlar arasında ise nadiren de olsa vaka görülüyor.

11.09.2001 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde yaşanan biyoterörizm eylemleriyle beraber şarbon dünya genelinde yeniden dikkatleri üzerine çeken bir hastalık olmuştur. Şarbonun kaynağı ve ilk ortaya çıkış şekli henüz bilinmemektedir. Hakim olan düşünce bu hastalığın biyolojik bir silah olarak kullanıldığı ve laboratuvar

çalışmaları sonucu ortaya çıktı yönündedir. Şarbonun neden bir biyolojik silah olarak kullanıldığı düşünüldüğünde, daha ucuz bir silah olması, kaynağının bol olması ve hastalığına saklanabilen bir bakterinin yol açması olarak açıklanabilir.

Şarbonun güncel tedavisinde kullanılan yöntem antibiyotik tedavisidir. Birçok antibiyotik şarbona neden olan bakteriyi-*Bacillus anthracis* yok edebilir. Ama bakterilerin gün geçtikçe antibiyotiklere karşı dirençli hale gelmesi tedavide farklı yöntemlerin de geliştirilmesini gerektirmektedir. Bu hastalığın tedavisinde en etkili yöntemlerden biri de aşılama yoluyla bağışıklık kazandırılıp önlem alınmasıdır.

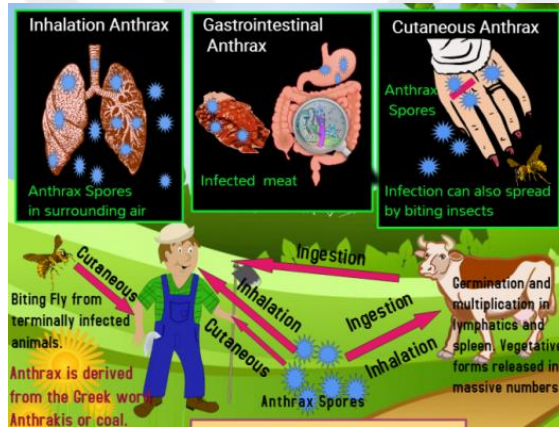
Bu çalışmada şarbona karşı, rekombinant protein üretilerek aşı geliştirilmesi hedeflenmektedir. Rekombinant proteinlerin geliştirilmesinde en önemli nokta işlevsel protein üretmektir. İşlevsel protein üretebilmek için birçok organizma konak olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada rekombinant proteinleri üretmek için bitki ekspresyon sisteminden yararlanılmıştır. Bitki bazlı transient ekspresyon sistemi, aşı antijenleri, ilaç maksatlı kullanılan proteinler, antikorlar ve endüstride kullanılan enzimler dahil olmakla birçok rekombinant proteinlerin üretimi doğrultusunda gelecek vaad eden güçlü teknolojidir. Bu sistemler, hızlı üretim zaman çizelgesi, düşük maliyetli, yüksek oranda ölçeklenebilir, yüksek üretim kapasitesi gibi diğer ifade sistemlerine göre üstün faydalar sunar ve memeli patojenlerini barındırmaz. Ek olarak, bitkiler N-bağlı glikozilasyon dahil olmak üzere ökaryotik post-translasyonel modifikasyonlara sahip olduklarından, teknik N-glikozilasyonun fonksiyonel aktiviteleri için kritik olduğu memeli proteinleri de dahil olmak üzere glikozile proteinlerin ekspresyonu için özellikle yararlı olabilir. Biz de projemiz kapsamında farklı bitki ekspresyon vektörleri tarafından üretilen deglikosile edilmiş PA83 antijeninin ekspresyon seviyelerini karşılaştırarak yeni Antraks aşısı adaylarını belirlemeyi hedefliyoruz.

Yaptığımız çalışmada, şarbona karşı aşı geliştirmede kullanılan PA83 proteinini deglikozillenmiş formda *N.benthamiana* bitkisinde üretebilmek için proteinlerin olası glikozilasyon bölgelerinden amino asit değişimi yapılarak tasarlanan genler kullanılmıştır. Mutant olarak tasarlanan genler sayesinde şarbon aşısı aday proteinlerinin deglikozile formda üretimi başarılı şekilde gerçekleştirilmiştir. Farklı bitki ekspresyon vektörleri tarafından üretilen deglikozile edilmiş PA83 antijeninin ekspresyon seviyeleri ve stabilite değerlendirmeleri yapılmıştır.

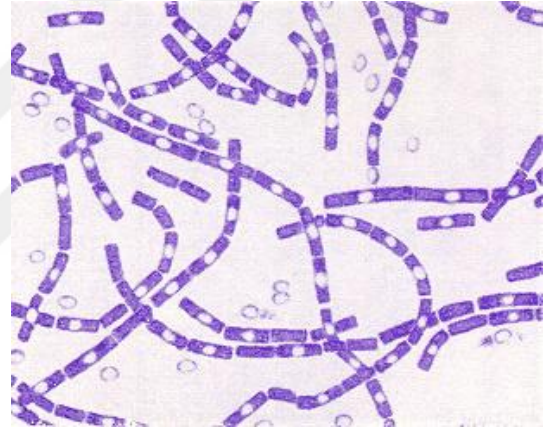
2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Şarbon Hastalığı

B.anthraxis, merkezi olarak yerleştirilmiş elipsoidal ile silindirik bir spora sahip zorunlu aerop, büyük, kare uçlu Gram-pozitif bir basildir. Hareketsiz, katalaz-pozitif, kan agarında hemolitik değildir ve gama-bakteriyofaj ile lizis gösterir. Hücreler bakteri kültürlerinde genellikle büyük, kalın tren vagonları veya bambu kamışı gibi art-artı dizilmiş gram-pozitif basillerin uzun zincirleri halinde görülür. Virülan formların zincirleri genellikle bir kapsül ile çevrilidir. Virülan olmayan formlar ise genellikle kapsüllü değildir. Sporülasyon toprakta ve kültür ortamında meydana gelir, ancak havaya maruz kalmadıkça canlı dokuda olmaz. *B. anthracis*, normal kan agarında 35° C'de 18 - 24 saat içinde iyi ürer. Tipik olarak koloniler opak, beyaz ila gri renkli, düz ve düzensiz, 4-5mm çapında, hafifçe dalgalı bir kenar boşluğuna sahiptir. İki güçlü ekzotoksin üretebilir. Bu iki ekzotoksin letal (öldürücü) faktör (LF) ve ödem faktörü (EF) olarak bilinir. Her iki toksin molekülünün de biyolojik olarak aktif olması için koruyucu antijen (PA) adı verilen üçüncü bir proteine ihtiyacı vardır.



(a)



(b)

Şekil 2.1. a) Şarbon hastalığının çeşitleri ve *Bacillus Anthracis*'in yaşam döngüsü. (Fotoğraf: Pathology Magazine-October 2017 Issue-Dr. Sampurna Roy) ; **b)** *Bacillus Anthracis* 'in taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü (Fotoğraf : https://www.diatek.com.tr/Makale-Yontem/MakaleYontem/Sarbon-Anthrax-Hastaligi_227.htm).

Neden bir biyolojik silah olarak kullanılır:

Şarbonun etyolojik ajanı olan *Bacillus anthracis*, yüksek ölümcüllüğü, üretim ve dağıtım kolaylığı nedeniyle çekici bir biyolojik silahtır (Guillemin J.1999; Inglesby TV vd. 2002). *B. anthracis* Gram-pozitif, fakültatif olarak aerobik, çubuk şeklinde 1-1,5µm genişliğinde ve 3-10µm uzunluğunda hareketsiz bir bakteridir. *B. anthracis*'in önemli bir özelliği dormant (uyku) sporları oluşturma yeteneğidir. Şarbon sporları tüm dünyada toprakta doğal olarak bulunur, onlarca yıl yaşayabilir ve ısı, kuraklık, ultraviyole ışık, gama ışınlaması ve birçok dezenfektan gibi olumsuz koşullara karşı oldukça dirençlidir. (Driks A vd. 2002). *Bacillus anthracis* sporları sıklıkla aerosol olarak kullanılmakta ve yüksek oranda hastalığa ve mortaliteye sebep olmaktadır. Şarbon sporları yaklaşık 1-2

µm çapındadır, bu da alveolar yüzey üzerinde birikme için idealdir (Dixon TC vd. 1999). Agresif antimikrobiyal tedavi ile bile sporların solunması neredeyse her zaman ölümcüldür (Friedlander AM vd. 2000). Bomba patlamasına dayanacak kadar sağlam ve aerosol haline gelecek kadar küçük olan *B. anthracis* sporları, füzeler, bombalar ve uçan uçaklardan aerosolizasyon yoluyla büyük popülasyonlara kolayca dağılırlar. Kokusuz, görünmez olan bu sporlarının aerosol salınımı, salınım noktasından çok geniş alana yayılabilir ve katastrofik yaşam kaybına neden olabilir.

2001'deki şarbon saldırısından önceki yüzyılda, ABD'de birkaç ölümcül şarbon saldırısı belgelenmiştir ancak en son 1976'da olmak üzere sadece 18 inhalasyon şarbonu vakası rapor edilmiştir. 1979'da şarbon sporları eski Sovyet şehri Sverdlovsk'ta bir askeri laboratuvarından yanlışlıkla serbest bırakıldı. ABD istihbarat kaynakları sayının 1000'e ulaşmış olabileceğini iddia etmesine rağmen, altmış dört kişinin öldüğü bildirilmişti. (Guillemin J.1999). ABD'de 11 Eylül 2001 yılında, terörist saldırısının hemen ardından değişik kurumlara gönderilen ve toz halinde şarbon sporları içeren mektuplar resmi olarak bilinen son bioterörizm olayıdır. *B. anthracis* sporlarının kasıtlı olarak postayla gönderilmesi yoluyla, ABD'de 10 teyit edilmiş inhalasyon şarbonu vakası ve 12 teyit edilmiş kutanöz şarbon vakası bildirilmiştir (Plotkin SA 2002). Bu meseleyle daha özensiz bir şekilde yansaılsaydı, bu saldırı çok daha fazla insanı öldürebilirdi. Örneğin, Senatör Daschle'a gönderilen mektubun 200 milyar ila 2 trilyon spora eşdeğer 2gr *B. anthracis* tozu içerdiği bildirilmiştir (Inglesby TV vd. 2002). İnsan LD50'sinin (enfekte kişilerin %50'sini öldürmek için yeterli doz) 2500-55000 inhale spor olduğu tahmin edilmektedir ve en az 1-3 spor enfeksiyona neden olmak için yeterli olabilir. Bu nedenle, düzgün dağıtılmış şarbon sporlarıyla dolu bir zarf birçok insanı öldürebilirdi.

2.2. Şarbon Hastalığının Çeşitleri: Kutanöz, Gastrointestinal ve İnhalasyon

Doğal olarak meydana gelen şarbon hastalığı, *B.anthraxis* ile enfekte olmuş hayvanlarla veya hayvansal ürünlerle temas sonrasında ortaya çıkmaktadır. Sporlarının vücuda girme yolları ile tanımlanan üç şarbon hastalığı formu vardır: kutanöz, gastrointestinal ve inhalasyon şarbonu.

2.2.1. Kutanöz Şarbon

Çoğu durumda, mesleki temas öyküsü söz konusudur ; ancak nadiren de olsa enfeksiyon daha önce şarbon ile enfekte olmuş karkaslarla beslenen ısırğan sinekler tarafından bulaştırılmış olabilir (North Dakota, 2000). Kuluçka süresi genellikle 1-12 gün arasında değişir. Vakaların çoğunda ilk olarak kollarda ve ellerde açıkta kalan cilt bölgeleri, ardından yüz ve boyun bölgesi tutulur (Caksen H vd. 2001; Oncul O vd. 2002). Hastalık tuttuğu bölge ile sınırlı kalabilir, ancak bazı hastalarda sistemik tutulumla bağlı semptomlar da görülür. Kutanöz şarbon, aşılama yerinde ortaya çıkan ağrısız, kaşıntılı bir papül ile erken bir aşamada başlar. Birkaç gün sonra papül bir veziküle ilerler, daha sonra siyah bir merkezi eskar ile oldukça karakteristik bir nekrotik ülsera aşınır. En önemli tanı özelliği lezyon çevresindeki ödem gelişimidir. Özellikle lezyon yüz, boyun veya üst göğüs bölgesindeyse, perilezyonal ödem geniş olabilir. Bunun daha ciddi formlarda, klinik bulgular arasında yüksek ateş, toksemi, bölgesel ağrılı adenomegali ve geniş ödem bulunur; iyileşme genellikle skar oluşumuyla sonuçlanır ve buna da rekonstrüktif cerrahi işlem gerekebilir (Oncul O. vd. 2002; Coban YK. vd. 2002). Antibiyotik tedavisi, lezyonun kendisinin doğal ilerlemesini değiştirmez; ama bununla birlikte, ödem ve sistemik semptomların gelişimini azaltacak veya engelleyecektir. Vaka ölüm oranı antibiyotik tedavisi olmadan %20'dir ve antibiyotik tedavisi ile %1'den azdır (Brook I 2002; Bartlett JG vd. 2002; Carucci JA vd. 2002).

2.2.2. İnhalasyon Şarbonu

İnhalasyon şarbonu şarbonun en ölümcül şeklidir. Çoğunlukla patojenik endosporların solunmasından kaynaklanır. Minimum bulaşıcı doz belirlenmemiştir, ancak ABD Savunma Bakanlığı insanlar için ölümcül dozun yaklaşık 8.000-10.000 spor olduğunu tahmin etmektedir. Hastalık iki fazlıdır; çok sayıda sporun solunmasından sonra, hastalar genellikle 'grip benzeri' bir hastalıktan, üst solunum yolu enfeksiyonunu düşündüren verimsiz bir öksürükten şikayet ederler. Sıklıkla primer fazdan belirgin bir iyileşmeden birkaç gün sonra, ani hızla ilerleyen solunum yetmezliği, akut dispne, dolaşımın bozulması, siyanoz, plevral efüzyon ve ateş belirtileri başlar. Hasta genellikle bu ikinci aşamanın başlamasından sonraki 24 saat içinde toksemi ve boğulma nedeniyle ölür. Uygun antibiyotikler dahil destekleyici bakıma rağmen mortalite oranı çok yüksektir (Swartz MN 2001; Plotkin SA vd. 1960; Henry L vd. 2001; Kuehnert MJ vd. 2003). Göğüs röntgenlerinde akciğer yerleşimli şarbon hastalarında mediastinal genişleme (% 70), pulmoner infiltratlar (% 70) veya plevral efüzyon (% 80) bulunurken, bu bulgular influenza benzeri hastalığı olan hastaların çoğunda yoktur (Krol CM vd. 2002; Earls JP 2002)

2.2.3. Gastrointestinal Şarbon

Gastrointestinal şarbon, gelişmiş ülkelerde oldukça nadir görülmekle birlikte, yüzde 25-60 arasında olduğu tahmin edilen son derece yüksek bir mortalite oranına sahiptir (Lakshmi N vd. 1992). Gastrointestinal şarbon, kontamine yiyecek veya içeceklerle *B. anthracis* sporlarının alımını takiben 1-7 günlük bir kuluçka döneminden sonra ortaya çıkabilir. Hastalığın orofaringeal ve bağırsak formu tanımlanmıştır. Dilin tabanında orofaringeal lezyonlar mevcuttur ve disfaji (ağrılı yutma), ateş ve bölgesel lenfadenopati görülebilir (Sirisanthana vd. 1984). Bağırsak formu şiddetli karın ağrısı, ateş, bulantı, kusma ve kanlı ishal ile kendini gösterir (Lakshmi N vd. 1992). Tedaviye yeterince erken başlanılmazsa, toksemi ve şok gelişir, bunu da ölüm izler (Mansour-Ghanaei F vd. 2002, Swartz MN vd. 2001).

2.3. *Bacillus Anthracis* Toksinlerinin Etki Mekanizması - PA, LF, EF

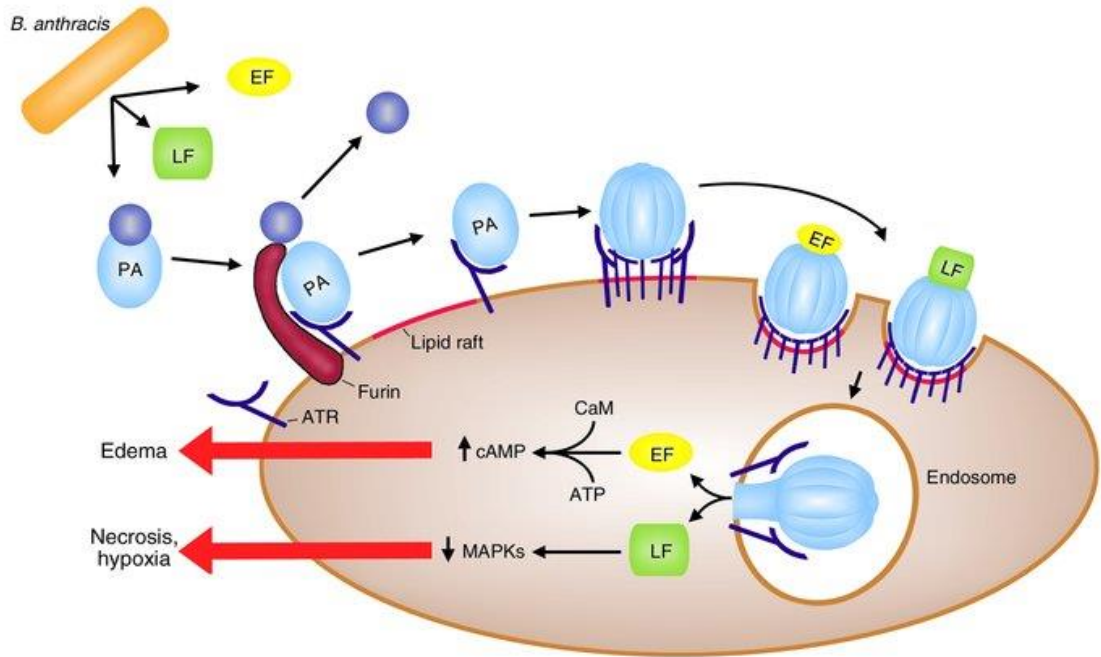
B. Anthracis'in virülan suşları iki plazmid içerir: pXO1(182 kb) ve pXO2 (96 kb) . PXO1 plazmidi, ekzotoksinin üç protein bileşeninin:koruyucu antijen (PA), ödem faktörü (EF) ve ölümcül faktör (LF) 'nin sentezinden sorumlu genleri taşır (Okinaka RT vd.1999). PXO2 plazmidi, kapsülün poli-D-glutamik asidini sentezlemek için gerekli genleri kodlar (Makino S vd. 1989).

Ekzotoksinin üç protein bileşeni ve poli-D glutamik asit kapsülü, *B. anthracis*'in başlıca virülans faktörleridir. Şarbon toksini, memeli hücrelerinin yüzeyinde toksik kompleksler oluşturmak için ikili veya üçlü kombinasyonlarda bir araya gelen üç toksik olmayan proteinden (PA, LF, EF) oluşur (Young JA vd. 2003). PA, üçlü kompleksin ana alt birimidir ve LF ve EF'nin toksik etkilerini gösterdikleri sitozole taşınmasını sağlar. LF, mitojenle aktive edilen protein kinaz kinazlara (MAPKK'lar, MEK'ler veya MKK'lar) spesifik çinkoya bağımlı bir metalloproteazdır (Bromberg-White J vd. 2010). EF, güçlü bir kalmodulin bağımlı adenilat siklazdır (Tang WJ vd. 2009). İkili kompleksler PA / LF ve PA / EF ayrıca ölümcül ve ödem toksinleri (LT ve ET) olarak da adlandırılır (Moayeri M vd. 2009). LT'nin genellikle ölümcül sonuçlara yol açan patolojik etkilere neden olduğu kabul edilmektedir (Hutt JA vd. 2014). Koruyucu antijen, kapsüllü ve kapsülsüz *B. Anthracis* suşlarına karşı korunmada anahtar rol

oynayan merkezi bir toksin bileşenidir. PA'ya özgü antikorlar LF ve EF'nin PA aracılı taşınmasını önleyebilir ve hem ölümcül hem de ödem toksinlerini nötralize edebilirler. Toksin nötralize edici aktiviteye sahip antikorlar üretebilen epitoplara çoğu PA üzerinde haritalanır (McComb RC vd. 2016; Nguyen ML vd. 2009; Thullier P vd. 2013).

Koruyucu antijen (PA), şarbon toksininin önemli bir bileşenidir, çünkü PA hücre zarından gözenek oluşturarak LF ve EF'nin hücre sitozolüne girmesini ve enzimatik aktivasyon yoluyla toksik etkilerini göstermesini sağlar.

PA, moleküler ağırlığı 83 kDa (PA83) olan 735 amino asitten oluşan bir proteindir. PA83 hücre reseptörlerine kılcal morfogenez protein-2 (CMG2) ve tümör endotel markırı-8 (TEM8) bağlandıktan sonra, yüzey furin benzeri proteazlarla proteolitik hidrolize uğrar, bu da PA63 (63 kDa) ve PA20 (20 kDa) olmak üzere iki proteinin oluşumuna yol açar. Reseptöre bağlı PA63, LF ve/veya EF'yi bağlayan oligomerler oluşturur. Daha sonra toksin kompleksi endositozlanır. Asidik endozomal pH altında, PA63 oligomeri bir dizi konformasyonel düzenlemeye tabi tutulur ve son olarak endosomal membranda toksik etkilerini gösterdikleri sitozol içine LF ve EF translokasyonunu mümkün kılan bir kanal oluşturur (Rainey GJ 2005; Bann JG 2012; . Jiang J vd. 2015).



Şekil 2.2. Salgılanan *Bacillus Anthracis* toksinlerinin etki mekanizması. (Fotoğraf: The Journal of Clinical Investigation. 2003; 112(5):656-658)

Son zamanlarda PA83'ün Furin'e benzer şekilde kalsiyum bağımlı bir serin proteazı olduğu ve TEM8 reseptörlerine bağlanmak için bu proteolitik aktiviteyi potansiyel olarak kullandığı iddia edilmiştir (Storm L vd. 2018). PA83'ün kristalografisi ile yapılan yapısal çalışmalarına göre, bu protein esas olarak anti-paralel β -sheet (tabakaları) halinde düzenlenmiştir ve dört domeini vardır (Petosa C vd. 1997). Domein I (N-terminal alanı, aa 1-258), iki kalsiyum iyonu bağlama merkezi, bir furin ile kesim

yeri ve LF / EF bağlanma yerleri içerir (Klimpel K vd. 1992; Cunningham K vd. 2002; Singh Y vd. 1992). Domein II (aa 259-487), zardan geçirgen gözenek oluşturmada önemli bir rol oynar. 2 β 2–2 β 3 döngüsü, hücre sitozolüne LF ve EF translokasyonu için gereklidir. Toksisite için kesinlikle gerekli olan furin ile kesimin aksine, 2 β 2–2 β 3 döngüsü (aa 313-315) içindeki kimotripsin bölgesindeki kesim, PA'nın EF ve LF'nin translokasyonunu bloke ederek proteini etkisiz hale getirir (Singh Y vd. 1992).

Domein III (aa 488-595) PA'nın oligomerizasyonunda ve elde edilen oligomerin stabilizasyonunda rol oynar (Mogridge J vd. 2001; Mourez M vd. 2003). Domein IV (aa 596-735), CMG2 ve TEM8 hücre reseptörlerini tanımaya ve bunlara bağlanmayı sağlar (Little SF vd. 1991; Rosovitz MJ 2003; Chen KH 2016).

LF, mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPKK) 1 ve 2'yi keserek MAPK sinyal transdüksiyon yolağını inhibe eden 85 kDa'lık metalloproteazdır (Duesbery vd. 1998). LT, makrofajlardan sitokinlerin salınmasını stimüle eder, aktive olmuş makrofajların apoptozunu indükler, dendritik hücre işlevini bozar, hipoksiyi indükler ve insan endotelial hücrelerinin apoptozuna neden olur (Kirby 2004).

LF ayrıca dört alana sahiptir (Pannifer AD vd. 2001). Domein-1 EF ile yüksek homolojiye sahip, PA oligomerine bağlanmayı kolaylaştıran ve bu sekansın diğer proteinlere füzyonu, PA yoluyla sitozole taşınmasına izin verir (Arora N vd. 1993). Domein-4, çinko bağlayıcı bir katalitik alan (Klimpel KR vd. 1994) içerir ve Domein- 2 ve 3, substrata bağlanma için önemlidir.

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

EF, saniyede ortalama 2000 kadar ATP molekülünü cAMP'ye dönüştürür (Leppla SH vd. 1982; Leppla SH vd. 1984). Kalsiyuma bağlı kalmodulin, EF ile etkileşir ve toksinin katalitik bölgesini oluşturmak ve stabilize etmek için konformasyonel bir değişikliğe neden olur. Toksinin yüksek seviyelerde cAMP indüksiyonu, protein kinaz-A (PKA) ve sinyal hücrelerini, birçok hücrel fonksiyonu düzenleyen cAMP (Epac) tarafından aktive edilen değişim proteininin aktivasyonu ile sonuçlanır.

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

2.4. Tedavi Yolları (Aşı Tedavisi)

Şarbon hastalığı gibi bulaşıcı hastalıkların önlenmesinde aşı önemli bir araçtır. Bu nedenle, güncel, etkili ve güvenli şarbon aşılarının geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Aşı şarbona karşı en güvenilir profilaksidir. Mevcut tüm insan şarbon aşıları, baskın veya tek bileşen olarak PA'ya sahiptir. Mevcut lisanslı aşılar, adsorbe edilmiş ABD bazlı şarbon aşısı (AVA) ve İngiliz aşıları, alüminyum adjuvanına adsorbe edilen *B. anthracis*'in kapsülsüz, toksigenik suşlarının kültür filtratlarından türetilmiştir

(Friedlander AM vd. 2002; Wang JY vd. 2005). Filtrat, PA içeren hücresel ürünlerin karışımından oluşmaktadır ve adjuvant olarak işlev gören alüminyum hidroksid üzerine adsorbe olmuştur (Turnbull 2000).

Her ne kadar bu aşılarda çeşitli hayvan modellerinde ve insanlarda koruyucu olduğu kanıtlanmışsa bile (Ivins BE vd. 1998; Fellows PF vd. 2001; Pittman PR 2001) her parti için aşı bileşenlerinin karakterizasyonu, reaktogenite, bağışıklama programının uzunluğu, uygulama yolu ile ilgili sorunlar endişe konusu olmaya devam etmektedir (Wang JY vd. 2005). Böylece, yeni nesil aşılarda alt birim aşılarda geliştirilmesine odaklanmıştır. Alt birim aşılarda, patojen içermeyen, daha güvenli ve en az reaktogenik olarak kabul edilmektedir (Levine MM vd. 2004). PA, şarbon toksininin en immünojenik bileşeni olduğu için kullanımdaki veya geliştirme aşamasındaki hemen-hemen tüm şarbon aşılarda birincil immünojen olarak PA'ya dayanır.

Çalışmalar, PA'nın 'Etki Alanı'nın [PA (dIV)] (PA'nın 596–735 aa) olduğunu göstermiştir. PA'nın reseptöre bağlanma elemanı olan [PA (dIV)], bölgesinde baskın koruyucu epitopların mevcudluğu ve bunun da toksin ve spor bariyerine karşı tam koruma sağlamak için yeterli olduğu düşünülmektedir. (Flick-Smith HC vd. 2002; Santelli E vd. 2004).

İki lisanslı alt birimi PA bazlı olan aşı - ABD'de adsorbe edilen şarbon aşısı (AVA, BioThrax™) ve Birleşik Krallık'ta çöktürülmüş şarbon aşısı (AVP) - 40 yıldan uzun bir süredir insanları aşılama için kullanılmıştır. Her iki aşı için, sıvı kültürlerde zayıflatılmış (pXO1+ / pXO2-) *B. Anthracis* suşları V770-NP1-R (AVA) ve Sterne 34F2 (AVP) üretilir, daha sonra aşı için temel olan hücre içermeyen bir süzöntü (filtrat) elde edilir. AVA'da ve AVP'de, *B. anthracis*'in koruyucu antijeni büyük bir immünojen görevi görür (Chitlaru T vd. 2011; Kaur M vd. 2013). Teknolojik sorunlar nedeniyle, her iki aşı kaçınılmaz olarak olumsuz reaksiyonlara neden olabilecek bazı LF ve EF izleri içerir.

AVA az miktarda PA, LF ve EF içerir. AVA ile indüklenen LF ve EF antikorlarının şarbon toksininin nötralizasyonunu etkilemediği gösterilmiştir (Taft SC vd. 2008; Dumas EK vd. 2017; Dumas EK, Garman L vd. 2017).

AVA'nın aksine AVP, 7.9 µg/mL konsantrasyonunda PA, 1.9 µg/mL konsantrasyonunda LF ve saptanabilir miktarlarda EF içerir. AVP'nin yol açtığı EF antikorlarının şarbon toksin nötralizasyonu üzerinde de etkisi yoktur (Dumas EK vd. 2017). Ancak anti-LF IgG, AVP grubunda LT nötralizasyon cevabına bağımsız ve ek bir katkı sağlar (Dumas EK, Garman L 2017). Aşılar arasındaki diğer farklılıklar arasında alüminyum potasyum sülfat (AVP) ile çökelmeye karşı alüminyum hidroksit jeline (AVA) adsorpsiyon ve farklı koruyucuların kullanımı yer alır (Biothrax. U.S. Food and Drug Administration; Aug 5, 2016; Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency; Sep 23, 2016). Her iki aşı da bağışıklığı korumak için yıllık takviye gerektirir (WHO 2019). LF ve EF'nin bu izleri lokal ağrı ve ödem gibi aşı yan etkilerine ve iltihaplanmaya, grip benzeri semptomlara, halsizlik, döküntü, artralji (eklem ağrısı) ve baş ağrısı gibi nispeten yüksek oranlarda lokal ve sistemik reaksiyonlara katkıda bulunabilir. (Geier, D. A vd. 2002; Sever, J. L vd. 2002). Bu nedenle, temiz, güvenli ve etkili bir aşı olmasını sağlayabilen etkili bir ekspresyon sistemi gereklidir.

Günümüzde, PA ifadesinin farklı stratejilerinin yanı sıra yeni bağışıklık tepkisini ve stabilitesini arttırmak için gerekli olan rPA ve adjuvanlara dayanan aşı formülasyonları geliştirilmektedir.

2.5. Bitki Ekspresyon (İfade) Sistemleri

Bu zamana kadar geliştirilmiş ve farklı terapötik rekombinant protein çeşitlerini elde etmek için yaygın olarak kullanılan ekspresyon sistemleri, maya, bakteriyel, memeli ve böcek lian kökenli hücre kültürlerini içerir (Rogan ve Babiuk, 2005).

Bakteri sistemi rekombinant protein ekspresyonunda etkili ve ucuzdur ve şu anda en sık kullanılanıdır. Bununla yanaşı, bakterilerde ökaryotik protein elde edilmesinin ciddi sınırlamaları mevcut. Spesifik olarak, bakteriler stabiliteyi, yarılanma ömrünü, biyolojik aktifliği, rekombinant proteinlerin proteaz direncini ve çözünürlüğü önemli ölçüde etkileyen N-glikosilasyon ve fosforilasyon gibi translasyon sonrası olan modifikasyonları yapamazlar.

Maya, düşük maliyet ve ölçeklenebilirlik nedeniyle rekombinant proteinlerin üretimi için mükemmel bir ökaryotik konaktır. Ayrıca, mayalar memeli virüslerini barındırmadıkları ve insanlar için zararlı toksinler üretmediği için bu üretim sistemi güvenlidir. Bununla yanaşı, mayalarda üretilen O- ve N- bağlı oligosakkarit yapıları, memelilerdeki benzer yapılarla kıyasla belirgin derecede farklıdır ve mayalardaki önemli özellik olan hipermannosilasyon, proteinlerin uygun katlanmasını yani, fonksiyonel aktivitesini kayda değer ölçüde etkiler.

Memeli hücre kültürü günümüzde de bir fosforilasyon, glikosilasyon ve γ -karboksilasyon gibi memeli tipi posttranslasyonel modifikasyonlara ihtiyaç duyan bazı rekombinant proteinlerin ekspresyonu için uygun platformdur (bazı kompleks yapıları büyük molekülü proteinler). Bu sistem en maksimum seviyede ürün uygunluğu sunar, ancak bu sistemin ölçeklendirilmesi zordur ve oldukça pahalıdır.

Bu nedenle: çözünür, translasyon sonrası modifiye edilmiş (gerektiğinde) ve doğru şekilde katlanmış proteinleri temin etme kabiliyeti yüksek olan ekspresyon sistemleri devamlı geliştirilmektedir (Houdebine vd. 2000; Gasdaska vd. 2003; Rasala vd. 2010).

Diğer rekombinant protein ekspresyon sistemleri ile kıyaslamada bitkilerin çeşitli avantajları mevcut; Bu sistemler, seri üretim zaman çizelgesi, yüksek oranda ölçeklenebilir, minimum maliyetli girdi, yüksek istehsal kapasitesi gibi diğer ifade sistemlerine göre üstün faydalar sunar ve memeli patojenlerini barındırmaz. Ayrıca, bitkilerde N-bağlı glikosilasyon dahil, ökaryotik posttranslasyonel modifikasyonlar olduğu için memeli proteinleri dahil olmak üzere glikosile proteinlerin ekspresyonu için özellikle yararlı olabilir.

Memeli glikoproteinleri, transgenik bitkilerde eksprese edildiklerinde etkili bir şekilde glikozillenir. Hem memeli, hem de bitki hücrelerinde glikan işlenen mekanizmalar endoplazmik retikulumda (yüksek mannoz) ve Golgi aparatında (kompleks glikan) bulunmasına rağmen, bitkiler biyofarmasötiklerin insan tipi glikozilasyonunu mükemmel şekilde gerçekleştiremez. Bu, bitki ve memeli N-glikanlar arasındaki bazı yapısal farklılıklar nedeniyle oluşur; yani bitki kompleksi N-glikanlar, insanların kompleks glikanlarında bulunmayan β 1,2-ksiloz ve α 1,3-fukoz tortuları içerirken, memelilerde bulunan β 1,4-galaktoza bağlı sialik asiti içermezler. Son zamanlarda, bitkilerde eksprese edilen N-glikozilasyonun ve N-bağlı biyofarmasötiklerin glikanlarının insanlaştırılması yönünde birçok çaba gösterilmiştir (Frey vd. 2009; Saint-Jore Dupas vd. 2007; Strasser vd. 2009; Vézina vd. 2009; Matsuo ve Matsumura, 2010).

Bugüne kadar, bitkilerde aşı antijenleri de dahil olmak üzere rekombinant proteinler üretmek için şu stratejiler kullanılmıştır: nükleer transformasyon (Hood EE

vd. 1999), kloroplast transformasyonu (Kumar S vd. 2004) ve bitki RNA viral vektörleri ile enfeksiyon (Yusibov V vd. 2006).

Heterolog proteinler, geçici olarak transforme veya stabil olarak transforme (transplastomik veya transgenik) edilmiş bitkilerde üretilebilirler (Shamloul vd. 2014). Transgenik yolda hedef gen, bitkilerin nükleer genomuna veya kloroplast genomuna dahil edilir, geçici yolda ise genetik olarak tasarlanmış bitki virüsleri bitkiye sokulur ve rekombinant protein bitki konakçı genomuna önceden entegre edilmeden eksprese edilir.

Bir transgenik bitki hattının oluşturulması ve bu bitkilerden bir proteinin üretilmesi, kayda değer miktarda maliyet ve zaman gerektirir. Nükleer transformasyonda hedef proteinler genellikle düşük ekspresyon seviyeleri gösterir ve uzun üretim sürelerine tabidir. bu proteinlerin saflaştırılmasının zorluğundan kaynaklanan yüksek maliyetlere yol açar (Edelbaum vd. 1992; Kusnadi 1997). Kloroplast transformasyonu yüksek düzeyde hedef ekspresyonu verirken (Kumar S vd. 2004), az sayıda bitki türüyle sınırlıdır ve transkripsiyon sonrası modifikasyon için sınırlı potansiyele sahiptir (örn. Glikosilasyon yok) ve ayrıca uzun üretim sürelerine tabidir.

Stabil olarak transforme edilmiş bitkilerin oluşumuna, geçici gen anlatımı hızlı bir alternatif sağlamış olur. (Kapila vd. 1997). Bu tip bitki biyofabrikalarının avantajları bitki dokusu ağırlığı başına genellikle daha yüksek protein verimi sağlaması, düşük maliyet ve manipülasyonun kolaylığıdır.

Kloroplast transformasyonunda olduğu gibi, tasarlanmış bitki virüsleri de yüksek seviyelerde rekombinant protein ekspresyonuna izin verir (Yusibov V vd. 2006). Bitki virüsleri, kısa üretim süreleri, hızlı yığın kapasitesi ve peptitlerin viral kaplama proteinine (CP) birleşme potansiyeline sahiptirler. Böylece üretimi kolaylaştırır ve immünojenliği artırır (Yusibov V vd. 2002). Bununla birlikte, bitki viral ekspresyon vektörünün potansiyel instabilitesi bir endişe kaynağıdır ve hedeflerin aralığını sınırlayabilir.

En iyi gelişmiş ekspresyon sistemi, binary (ikili) plazmidler ve bitki virüslerinin bileşenlerini birleştiren sistemdir. Bu sistem de, "launch vektörleri"nin (agroinfiltrasyon yoluyla teslim edilen) kullanılmasına dayanır (Shamloul 2014). Bitkilerin moleküler genetik modifikasyonu *A. tumefaciens*'in tanımlanmış bir DNA segmentini (T-DNA) bitkilerin çekirdeğine aktara bilmesinden yararlanarak (Gelvin 2003), genellikle ikili vektör sistemleri kullanılarak gerçekleştirilir. Bu bahsi geçen vektörler 2 bileşenden oluşur. İlk bileşen olarak *Agrobacterium* ikili plazmid-pBI121 ve ikinci bileşen olarak ise bitki virüsü ekspresyon vektörü (Shivprasad S vd. 1999) geliştirilmiştir (Konstantin Musyichuk vd. 2007). Stabil transgenik bitkilerin (Gelvin SB vd. 2000) üretilmesi için standart araçlar olan *Agrobacterium* ikili plazmidleri, *Agrobacterium tumefaciens*'in tümör uyarıcı plazmidine dayanır.

Birinci bileşen, T-DNA içeren bir kasettir, bu da bitki hücrelerine aktarılabilecek olan T-DNA'dır. İkinci bileşen ise, bakteriler için seçilebilir markör genlerini ve isteğe bağlı olarak plazmid mobilizasyon fonksiyonlarını, hem *A. tumefaciens*, hem de *E. Coli* için plazmid replikasyon fonksiyonlarını kodlayan genleri taşıyan vektör omurgasıdır (Komarova 2010; Komori vd. 2007; Lee ve Gelvin 2008).

İfade edilecek hedef diziler, düzenleyici elemanlarla birlikte ikili plazmidin sol sınırı (LB) ve sağ sınırı (RB) arasına dahil edilir. *Agrobacterium* bitki dokusuna sokulması üzerine, LB ve RB arasındaki sekansa ait çoklu tek sarmallı DNA (ssDNA) kopyaları üretilir ve salınır.

''Launch vector''un yapımında kullanılan viral vektör, tütün mozaik virüsüne (TMV) dayanmaktadır. TMV viral vektör olarak en çok çalışılan bitki virüsüdür ve bitkilerdeki yabancı proteinlerin ekspresyonu için en yaygın olarak bu virüs kullanılmaktadır (Okada Y vd. 1999). TMV'nin tek sarmallı pozitif RNA genomu viral replikazı, hücreden hücreye hareket proteinini ve viral RNA'yı kapsülleyen ve tüm bitki boyunca viral yayılmaya aracılık eden CP(viral coat protein)'yi kodlar. Bu metotta CP sekansı, eksprese edilecek hedef gen sekansı ile değiştirilmiştir. CP'nin yokluğunda, sonuçta meydana gelen viral vektör, CP içeren vektörlerden daha az rekombinasyona maruz kalan ve çevrede etkili bir şekilde yayılamayan ve hayatta kalamayan çıplak kendi kendini kopyalayan bir RNA'dır.

''Launch vector'' bitkilere agroinfiltrasyon yoluyla verilirken, bu sırada bakteriler ise bitki dokularının hücreler arası boşluklarına, enjeksiyon veya vakum infiltrasyonu yoluyla yapay olarak verilir. Bu rekombinant viral mRNA'ların translasyonu tipik olarak bir haftadan kısa bir sürede bitki dokusu kg'ı başına 100mg miktarında hedef protein birikmesine neden olur.

2.6. Deglikasilasyon Stratejileri

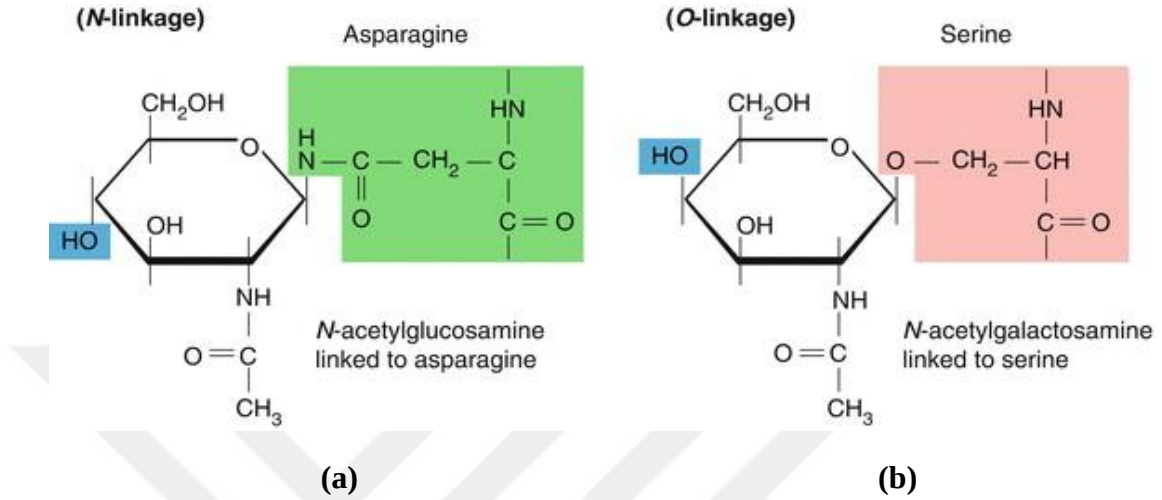
Son yıllarda terapötik proteinlerinin immünojenikliğini, farmakokinetiğini ve farmakodinamiğini etkilemek için proteinlerin moleküler yapısını değiştiren yaklaşımlar uygulanmaktadır (Kontermann 2012). Bu yaklaşımlar, protein sekansı içinde seçilen amino asitlerin eklenmesi, silinmesi veya değiştirilmesini, azaltılmış amino asit sekansı ile kesilmiş proteinlerin sentezini, glikozilasyon veya deglikozilasyonu ve polimerlerle kovalent bağı içerir (Veronese ve Caliceti 2006). İkinci yaklaşım, çeşitli protein terapötiklere, PEGilasyon adı verilen bir işlemde çeşitli zincir uzunluklarındaki monometoksi polietilen glikol (PEG) moleküllerinin bağlanması işlemidir. Yüksek polimerik kütlenin terapötik proteinlere konjugasyonu, genellikle proteinin bağışıklık sistemi tarafından tanınmasını önlemenin yanı sıra glomerüler filtrasyon veya proteolitik enzimler yoluyla eliminasyonunu azaltmayı ve böylece endojen proteinlerin çoğunlukla nispeten kısa eliminasyon yarı ömrünü uzatmayı amaçlamaktadır.

Memeli hücrelerinin terapötik proteinler için üretim platformu olarak kullanılmasının ana nedeni, bu hücrelerde sentezlenen proteinlerin translasyon sonrası modifikasyonunun (PTM) insandakine en çok benzemesidir. Önemli bir PTM, iki sistein kısmı arasında disülfid bağlarının oluşmasıdır. Disülfid bağları, bir proteinin üçüncül yapısını stabilize etmek için çok önemlidir. *E. coli* bir proteinde disülfid bağları yapamaz ve zaten bu nedenle *E. coli* pazarlanan terapötik proteinlerin çoğunu üretmek için çok uygun değildir.

Terapötik proteinlerin bir başka önemli PTM'si glikosilasyondur. Monoklonal antikorlar dahil olmak üzere pazarlanan tüm terapötik proteinlerin yaklaşık %70'i glikosile olmaktadır. Glikosilasyon, oligosakkaritlerin asparajinin yan zincirindeki (N-bağlı) azot atomunda veya serin / treoninin (O-bağlı) yan zincirindeki oksijen atomuna kovalent bağlanmasıdır. Asparajin glikosilasyonu sadece bu tortu Asn-X-Ser veya Asn-X-Thr'nin bir parçası olduğunda gerçekleşir (X prolin dışında herhangi bir tortu olabilir). Tüm potansiyel bölgeler glikosile değildir. Hangi bölgelerin glikosile dönüştüğü protein yapısına ve proteinin eksprese edildiği hücre tipine de bağlıdır.

Glikosilasyon, türler arasında, bir tür içindeki farklı hücre tipleri arasında ve hatta hücre kültürü tarafından üretilen terapötik proteinlerin grupları arasında farklılık gösterir. N-glikosilasyon, tüm ökaryotlarda (*E. coli* dışında, bazı bakterilerde de bulunur) (Nothaft ve Szymanski 2010) endoplazmatik retikulum ve Golgi sisteminin lümeninde gerçekleşir. Tüm N-oligosakkaritler, üç mannoz ve iki N-asetilglukozamin

(GlcNAc) tortusu içeren ortak bir pentasakkarit çekirdeğine sahiptir. Bu çekirdeğe ek şekerler eklenir. Bu olgunlaşma reaksiyonları Golgi sisteminde gerçekleşir ve ekspresyon konakçıları arasında farklılık gösterir. Mayada, olgun glikoproteinler mannoz açısından zengindir, ancak memeli hücrelerinde çok daha karmaşık oligosakkarit yapıları mümkündür. O-glikosilasyon ise sadece Golgi sisteminde gerçekleşir.



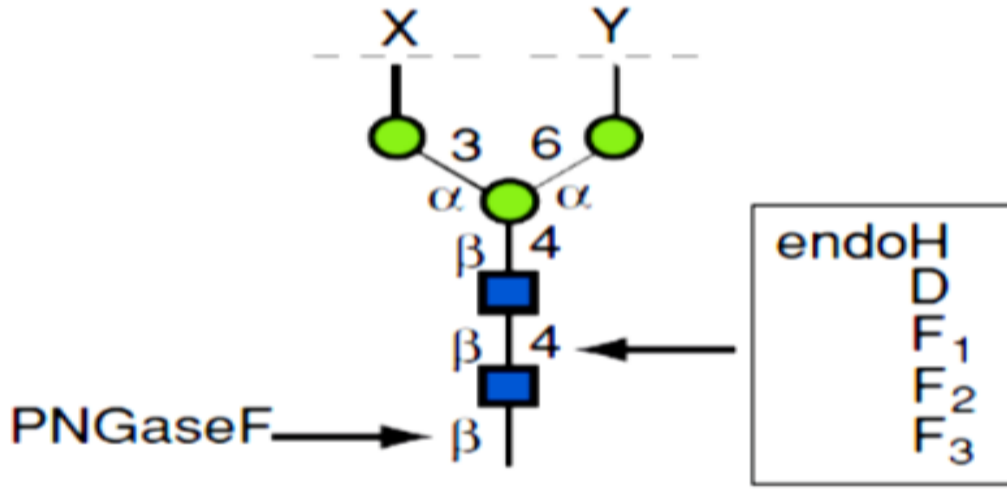
Şekil 2.3. a) N-bağlı Glikosilasyon; b) O-bağlı Glikosilasyon. (Fotoğraf: <https://www.quora.com/What-is-the-difference-between-N-linked-and-O-linked-glycosylation>)

Protein bazlı aşılarda verimi güvenliğini artırmak, üretimi kolaylaştırmak için, protein antijenleri günümüzde sıklıkla rekombinant olarak üretilmektedir. Yani yüksek ekspresyon seviyeli ve güvenli olan konakçı hücreler tarafından ifade edilmektedir.

PA'nın şarbon toksini eylemindeki önemli rolü nedeniyle, güçlü bir toksin nötrleştirici yanıtı indükleyebilen alüminyum adjuvanına adsorbe edilmiş, saflaştırılmış bir rekombinant PA (rPA) formundan oluşan yeni şarbon aşısı geliştirme çabaları devam etmektedir. Bununla birlikte, bu tür aşısı geliştirme girişimleri, saklanma sırasında aşının stabilitesinin olmaması nedeniyle engellenmiştir (L.W. Baillie vd. 2009). Amino asitlerin izomerizasyon, deamidasyon, hidroliz ve oksidasyon gibi kendiliğinden modifikasyonu, rekombinant protein antijenlerinin instabilitesine katkıda bulunabilir (A. Verma vd. 2013).

Aşı adaylarının potansiyelini ve stabilitesini arttırmak için, Mammedov vd. tarafından PA83'ün deglikosile formları, PA'nın N-glikozidaz F bakteriyel peptit (Mammedov vd. 2016) veya Endo-H ile birlikte ekspresyonuna esaslanan bir in vivo deglikosilasyon yaklaşımı istifade edilerek tasarlanmıştır. Daha ileri araştırmalarda *N. benthamiana* bitkilerinde N-asetilglukosaminidaz (Mammedov vd. 2012; 2017) tarafından bitkide, glikosilasyona uğramadan hedef proteinlerin üretilmesi için bir strateji geliştirildi. Bu strateji geçici gen anlatımı aracılığıyla ilgili hedef gen ile bakteriyel deglikosilasyon enzimleri olan PNGase F (Mammedov vd. 2012) veya Endo-H enzimlerinin birlikte ekspresyonu temeline dayanmaktadır (Mammedov vd. 2017). PNGase F (Peptide: N-glycosidase F) 34.8kDa-lık bir enzimdir, gram (-) bakteri olan *Flavobacterium meningosepticum* tarafından salgılanır. Asparajin ve N-bağlı glikoproteinlerdeki kompleks, hibrit ve yüksek mannozlu oligosakkaritlerin en içteki N-

Asetil-D-glukozamin (GlcNAc) kalıntıları arasındaki bağı keser (Mammedov vd. 2012). PNGase F, aspartat ve asparajinin deamidasyonundan kaynaklanan deglikosillenmiş proteinin glikosilasyon bölgesinde (N-X-S / T) bir amino asit değişmesine sebep olur. Endoglikozidaz-H (Endo-H) ise, kompleks olmayan hibrid ve yüksek mannozlu glikanlar üzerindeki glikan zincirine etkili diğer bir enzimdir. Bu enzim de glikan zincirinin çekirdek bölgesinde yerleşen GlcNAc- GlcNAc kalıntısı arasındaki N-bağlı glikanları ayırır (Mammedov vd. 2017).



Şekil 2.4. N-bağlı glikanların çekirdeğinde bulunan Endo H ve PNGase F duyarlı bağlar. PNGase F, N-bağlı glikanların çekirdeğinde bulunan bir glikoamidaz olarak, Asn ve GlcNAc arasındaki bağları keser, şeker zincirinin tümünü serbest bırakır ve Asparajin'i Aspartata dönüştürür. Endoglikosidazlar (F, D ve H), çekirdek bölgedeki iki GlcNAc kalıntısı arasında olan bağı keserken, bir GlcNAc proteine bağlı kalmaya devam etmektedir. (Gomord vd. 2010).

Bitkilerde glikozile edilmemiş hedef proteinlerin üretimi için *in vivo* enzimatik deglikozilasyon prosesi, bitkilerdeki glikozile olmamış proteinlerin üretimi için önemli stratejik ehemiyete malikdir. Daha önceki çalışmalara baktığımızda bu çalışmaların sonucu *in vitro* deglikozilasyonla elde edilen proteinlerin özelliklerinin (immünojenite, aktivite vb.) *in vivo* deglikozile olunmuş eşlerinden farklı olduğunu göstermiştir. İlaveten, bu yolla elde edilmiş olan antijen proteinler daha stabildir ve güçlü bir antikor uyarımını sağlıyor (Mammedov vd. 2017).

3. MATERYAL VE METOT

Bitkide üretilen koruyucu antijenin (pp-PA83) 9 tane olası N-bağlı glikolizasyon bölgesi vardır ve bu bölgelerde asparajin-X-serin/treonin motifinde asparajin glikosillenmektedir. Yapılan bir çalışmada glikolizasyon profillemeye göre 9 tane olası glikolizasyon bölgesinden 6 tanesinin (Asn-275, 357, 417, 505, 599, 693) glikozillendiği belirlenmiştir (Chichester vd. 2013). Şarbona karşı aşı geliştirme konusunda bilinen PA83 proteinini deglikosillenmiş formda üretebilmek için yukarıda bahsi geçen çalışmada glikolizasyon profillemeye bilgisi baz alınarak, N39Q, N275Q, N357Q, N417Q, N505Q, N599Q ve N693Q şeklinde 7 tane amino asit değişimiyle mutasyon yapılarak MQ2 geni tasarlanmıştır (Mamedov vd. 2017). İlavenen *N. benthamiana* bitkisinde proteini doğru şekilde üretebilmek için MQ2'ya ait optimize edilen gen bölgeleri N-terminal bütün patogeneziyle ilişkili protein 1a sinyali dizisi (PR-1a: MGFVLFSQLPSFLLVSTLLLFLVISHSCRA, protein sekresyonu süresince kesilip çıkarılmaktadır), C-terminal çoklu histidin affinite protein saflaştırma etiketi (His₆) ve yine C-terminal ER'a tutunma sinyali olan KDEL dizisi içerecek şekilde tasarlanmıştır. Bu çalışmada kullanılan genler Integrated DNA Technologies (IDT Ames, Iowa, ABD) şirketince sentezlenmiştir.

Çizelge 3.1. MQ2 genininin PZR'nin içeriği

Bileşen	Miktar(µl)
DNAaz içermeyen su	45µl
5X Q5 Reaction Buffer	20µl
MQ2-2F1(10mM)	5µl
MQ2-2R1(10mM)	5µl
Kalıp DNA	2µl
Q5 DNA Polimerase	1µl
Toplam	100µl

Çizelge 3.2. MQ2 genininin PZR'nin aşamaları

Aşama	Sıcaklık °C	Süre	Döngü sayısı
Başlangıç denatürasyon	98	30sn	1
Denatürasyon	98	10sn	
Bağlama	46	30sn	35
Uzama	72	84sn	
Son uzama	72	2dk	1

3.1. MQ2 geninin PZR'u sonrası Saflaştırılması

PZR sonucu alınan ürün, Monarch plasmid purification kiti kullanılarak saflaştırıldı ve %1'lik agaroz jelde 110V-da 45dk. yürütüldü.

3.2. LpI Plazmitinin ve MQ2 genin Kesimi

PZR sonucu alınan ürün (MQ2 geni) ve AgeI ve XhoI restriksiyon bölgelerini barındıran LpI plazmidinin kesimi aynı enzimlerin kullanılmasıyla uygulandı.

Çizelge 3.3. Restriksiyon enzimleri ile a) Plazmitin Kesimi; b) PZR ürünü kesimi

(a)		(b)	
Bileşen	Miktar (μl)	Bileşen	Miktar(μl)
35μl	LpI	5μl	DNA
2,5μl	AgeI	0,5μl	AgeI
2,5μl	XhoI	0,5μl	XhoI
5μl	1.1 Buffer	1μl	1.1 Buffer
10μl	DNAaz içermeyen su	3μl	DNAaz içermeyen su

3.3. MQ2 geninin ve LpI Plazmitinin Agaroz Jelden Geri Kazanımı

Daha önce restriksiyon enzimleri ile kesilen 45 μl MQ2 geni ve 60 μl LpI plazmidi uygun olarak 9 μl ve 12 μl 6X örnek yükleme boyası (ThermoScientific 6X, Katalog No: R0611) ile boyanarak ve jelden geri kazanım için hazırlanmış 90ml %1'lik agaroz jele yüklenildi. Jelin hazırlanması için: 0,9gr toz halinde agaroz 90ml 1XTAE bufferi içerisinde agarozun tamamen çözünmesi için ortalama 5-6 dk. mikrodalga fırında tutuldu. Jeli fırından aldığımızda şeffaf solusyon halinde ise agaroz istenilen kıvamına gelmiştir. Oda sıcaklığında soğumaya bırakılan agaroz el yakmayan sıcaklığa geldiğinde 1,8μl Etidyum Bromid (EtBr) eklenerek karıştırıldı. Ardından çözelti daha önceden hazırlanmış olan agaroz jel yürüme tankına dikkatlice döküldü. Jeli dökerken kabarcık oluşmamasına özen göstererek donmaya bırakıldı. Donmuş jele önce 1 kb DNA Ladder daha sonra belirli aralıklarla geri kazanılması istenilen örnekler yüklendi. Örnekler 80V-da 90 dk yürütüldü. UV ışınları altında belirli bp uzunluğunda (MQ2-2331bp, LpI-10000bp) bantlar bistürü aracılığı ile kesilerek 15ml'lik steril falkona alındı. Daha sonra geri kazanım işlemi için "Zymoclean Gel DNA Recovery Kit"i (Katalog No: D4007) uygulandı. Recovery örneklerinin doğrulanması için yeniden %1'lik jel döküldü ve 110 V-da 45 dk. yürütüldü. Sonrasında örnekler -20°C'e kaldırıldı.

- ❖ **%1'lik agaroz jel:** 0,6gr agaroz tartılıp behere konuldu ve üzerine 60ml 1x TAE buffer eklendi. Agaroz tamamen çözünene kadar yaklaşık olarak 1-2dk mikrodalga fırında bekletildi. Çözeltinin sıcaklığı düştükten sonra 1,2μL Etidyum Bromid (EtBr) eklendi. Karışım önceden hazır hale getirilmiş yatay elektroforez tankına kabarcık kalmadan döküldü ve uygun tarak yerleştirildi. Jelin katılaşması beklendi.

- ❖ **50xTAE tampon çözeltisi hazırlanması:** 242 gr Tris otoklavlanmış 700ml ddH₂O içerisinde çözüldü. Karışıma 100ml 0,5 M EDTA (pH : 8) ve 57,1ml Glasiyal asetik asit eklenerek çözdürüldü. pH 8,5-8,6 olacak şekilde ayarlandıktan sonra son hacim otoklavlanmış ddH₂O ile 1000ml'e tamamlandı.
- ❖ **1xTAE tampon çözeltisinin hazırlanması:** 20ml 50xTAE tampon çözeltisinden alınarak total hacim 1000ml olacak şekilde ddH₂O ile ayarlandı.

3.4. Ligasyon

Ligasyon reaksiyonu 1µl LP1 vektörü, 2µl MQ2 geni, 1µl 10x Ligasyon tamponu, 5µl DNAaz/RNAaz içermeyen su ve 1µl T₄ Quic ligase (NEB ABD) karışımı 16°C sıcaklıkta bir gece bekleterek (overnight) gerçekleştirildi.

Çizelge 3.4. Ligasyon reaksiyonu bileşen ve miktarları

Bileşen	Miktar (µl)
1µl	Lpl (cut)
2µl	DNA(MQ2 cut)
1µl	Ligase Buffer
5µl	DNAaz içermeyen su

3.5. *E.coli* XL₁Blue kompetent hücrelerine "Heat Shock" Transformasyon

Ligasyon reaksiyonu sonucu elde edilen plazmid ısı şoku yöntemi uygulanarak, *E.coli* XL₁Blue kompetent hücrelerine aktarıldı. Bu metoda göre ligasyon ürünü *E.coli* XL₁Blue kompetent hücrelerinin üzerine eklendi ve buzda 5dk inkube edildi. Sonrasında karışım 42°C-de su banyosunda 50 sn bekletildi ve hemen sonra buza aktarıldı ve 5dk buzda bekletildi. Örnek üzerine 400µl LB besiyeri eklendi ve 37°C-de 1 saat inkube edildi. Sonuçta elde edilen kültürden 2000xg-de 3dk santrifüj edildi ve çökmesi sağlandı. Daha sonra süpernatandan 100µl alınıp LB+ kanamisin (50µg/ml) içerikli plakaya konsantre olamayacak şekilde steril öze kullanarak yayıldı. Geriye kalan 300µl LB-nın 200µl-si uzaklaştırıldı, 100µl LB ile çökmüş durumda olan hücreler tekrar pipetaj edildi. Çözdürülmüş hücreler daha konsantre şekilde LB+ kanamisin (50µg/ml) içerikli plakaya steril öze kullanarak yayıldı ve 37°C-de overnight inkubasyona bırakıldı. Ortalama 24 saat sonra platelerde parlak koloniler gözlemlendi. Daha sonra uygun koloniler seçildi ve 5ml LB+kanamisin (50µg/ml) içerikli sıvı besiyerine geçirilerek 37°C-de 225rpm de overnight inkubasyona bırakıldı. Plazmidlerin izolasyonu Zippy Plasmid Miniprep Kitiyle (Zymo Research,ABD) üreticisinin tavsiyesine uygun olarak izole edildi.

- ❖ **LB-Broth:** 25 gr LB-Broth 1000ml saf su içerisinde çözüldü. 121°C'de 30dk otoklavlandı.

3.6. Elektroporasyon Ve İnfiltrasyon

E. coli kompetan hücrelerinde çoğaltılan ve daha sonra izole edilen MQ2 genini taşıyan LpI plazmiti yeşil bitki yapraklarında rekombinant LP-MQ2 proteinlerini üretebilmesi için *A. tumefaciens*'e transforme edildi. Bu işlem, elektroporasyon yönteminden faydalanarak gerçekleştirildi. Steril kabinde 0,5µl plazmid (CN3-191ng/µl) alıp, -80°C-de stok halinde tutulan 100µl *A. tumefaciens* AGL1psoup kompetan hücreleri ile pipet yardımıyla karıştırıldı. Plazmid ve kompetan hücre karışımı daha önceden buza konulmuş küvete dikkatlice alındı ardından küvet cihaza yerleştirilerek elektrik şokuna maruz bırakıldı (cihazın program ayarı>User protocol→ Enter →Agro→ 1→cuvet→4→1→pulse). Elektrik şokunun hemen ardından önceden hazır ettiğimiz 1ml SOC mediumu eklenerek pipetaj yapıldı.Sonra karışımın tamamının 2ml'lik polipropilen eppendorfa transfer edilmesine özen gösterildi. İçerisinde hücreler olan polipropilen eppendorf ağzı parafımlenerek 28°C'lik orbital çakalamalı inkubatörde 2 saat boyunca 225 rpm'de inkubasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi bitdikten sonra polipropilen eppendorf inkubatörden alındı ve hücreler steril öze kullanarak LB+ kanamisin (50µg/ml) içerikli petriye yayıldı ve 28°C'lik inkubatörde bırakıldı. 3 gün sonra petriden uygun koloniler alınıp BBL+ kanamisin (50µg/ml) içerikli sıvı besiyer ortamında 1 gece 28°C'de inkubasyona bırakıldı.

28°C'lik orbital çakalamalı inkubatöre overnight bırakılan hücrelerin ertesi gün OD değerleri ölçüldü. Optik Dansite değerinin ≥ 1 olması gerekir. OD değerlerinin not edilmesi daha sonra ilave edilecek olan MMA besiyeri ve uygun olarak 100mM Asetosyringene (AS) stok çözeltisinin miktarı için önemlidir.BBL besiyeri ortamında çoğaltılmış hücrelerin bir kısmı stok için ayrıldı ve %90'lık gliserolla 1:1 nispetinde karıştırılarak hazırlandı.Hazırlanmış karışım 1ml olacak şekilde eppendorflara bölündü ve -80°C-ye kaldırıldı. BBL besiyeri ortamında çoğaltılmış hücrelerin geriye kalan kısmı +4°C 5500Xg'de 6dk. santrifüjlendi.Süpernatant döküldükten sonra pellet MMA besiyeri ve uygun olarak 100mM Asetosyringene (AS) stok çözeltisinin olduğu ortamda 2 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıcı yardımıyla çözündürüldü. İnkübasyon süresi bitdikten sonra deglikosillenmiş MQ2 proteinlerinin üretimi için hazırladığım konstraktlar tek kullanımlık şırınga aracılığıyla yeşil bitki yapraklarına infiltre edildi.

- ❖ **SYS mediumun hazırlanması:** 10gr soyhidroizat, 5gr yeast extract ve 5gr NaCl 800ml steril double distille suda çözündürüldü. pH 7,0 olacak şekilde 1M NAOH ve ya KOH ile dengelendi ve total hacim 1000ml olacak şekilde ddH₂O ile ayarlandı. 121°C'de 30dk otoklavlandı.
- ❖ **MMA mediumun hazırlanması:** 1,952gr MES ve 10ml 1M MgCl₂ 800ml otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözüldü. pH 1M KOH veya NAOH ile 5,8'e ayarlandıktan sonra son hacim otoklavlanmış ddH₂O ile 1000mL'e tamamlandı. 121°C'de 30dk otoklavlandı.
- ❖ **SOC mediumun hazırlanması:** 20gr bactotripton, 5gr bacto yeast extract, 2ml 5M NaCl, 2,5ml 1M KCl, 10ml 1M MgCl₂, 10ml 1M MgSO₄ 800ml otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözüldükten sonra son hacim 1000ml'e

tamamlanarak 121°C’de 30dk otoklavlandı. Karışımın sterilizasyonundan sonra sıcaklığının 50-55°C’ye kadar düşmesinin ardından steril kabin altında 20ml 1M glukoz eklendi ve soğuduğunda daha sonra kullanılması için +4°C’ye kaldırıldı.

- ❖ **Asetosyringene (AS) 100mM stok çözeltisinin hazırlanması:** 0,3924 gr Asetosyringene, 12ml % 95’lik etanolda çözündürüldü ve ilaveten 8ml bidistile su eklenerek son hacim 20ml’e tamamlandı. 1L MMA için 150µl Asetosyringene gereklidir.

3.7. Yeşil Bitki Yapraklarından Protein Ekstraksiyonu

LpI-MQ2 ve pGR-MQ2 konstraktlarının yeşil bitki yapraklarına şırınga yardımıyla infiltrasyonundan 5 gün geçtikten sonra (dpi) infiltre edilmiş yapraklar toplandı. Gerekli proteinlerin üretildiği düşünülen infiltre yapraklardan 1gr alındı (punch) ve bunun üç katı kadar Ekstraksiyon solusyonu ile havan ve havaneli kullanarak homojen hale getirildi. Elde edilen karışımdan 2ml’lik polipropilen eppendorflara pipet yardımıyla alınarak 20000Xg’de 5dk. santrifüjlendi. Supernatant yeni polipropilen eppendorfa geçirildi. Süpernatantdan proteinlerin üretilip-üretilemediğini denetlemek için daha sonra yapılacak olan Western blot örnekleri hazırlandı. Bunun için 4:1 oranda, yani süpernatantdan 40µl, örnek yükleme tamponundan da 10µl (5xSDS) olacak şekilde karıştırıldı. Örnekler -20°C’de muhafaza edildi.

- ❖ **Ekstraksiyon solusyonu :** Ekstraksiyonu yapılacak yaprak ağırlığının 3 katı kadar 10mM PBS tablet çözeltisinin içerisine 1mM olacak şekilde DIECA ayarlanır.
- ❖ **1xPBS tablet çözeltisinin hazırlanması:** 1 tablet PBS 200ml otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözüldü.

3.8. Western Blot ve SDS-PAGE Analizi

Western Blot analizi yapmak için %10’luk akrilamid jel hazırlandı. Daha önceden denature edilmiş örnekler akrilamid jele, marker (color prestained protein standard cat. No. P7712 S New England Biolabs) bitkide üretilen saflaştırılmış glikosile PA83 standart proteini ve örnekler ardışıklığı ile yüklendi ve 1xRunning buffer içerisinde 100 V’da 15 dk, ve 200 V’da 45 dk. yürütüldü. Yürütme sonlandırıldıktan sonra önce jelin üst kısmı olan stacking jel uzaklaştırıldı. Daha sonra jeldeki proteinlerin %90 metanolla membrana aktiveleştirilmiş polivinilidin florid membrana transferi için sandwich modeli hazırlandı ve örnekler Transfer buffer içerisinde 100 V’da 1 saat boyunca yürütüldü. Transfer işleminin ardından Transfer bufferin uzaklaştırılması için membran 5 dk %1’lik I-Block içeren 1xTBS’le yıkandı. Yıkamadan sonra membran 1saat %1’lik I-Block içeren 1xTBS içerisinde çalkalayıcı üzerinde 1 saat bekletildi. Bu işlem sayesinde istenmeyen bağlanmalar engellenmiş olacak. Daha sonra membran 1 saat boyunca primer antikorda bekletilme işlevi gerçekleştirildi. (Histidin etiketli

proteinlerin analizi için anti-6XHis monoklonal antikor Cat. no. 652502, Commercial anti-PA83 ve Plant produced anti-PA83 antikorları kullanılmıştır).

Bir saatin sonunda membranı primer antikordan yıkamak için 3 kere 5'er dk. I-Block çözeltisi içinde çalkalandı. Daha sonra membrana 1 saat boyunca seconder antikorda (Histidin etiketli proteinlerin analizi için anti-6XHis monoklonal antikor için uygun olarak-goat anti-mouse IgG H&L (Cat.No.ab98790, Abcam, ABD), Commercial anti-PA83 için uygun olarak-anti-goat HPR, Plant produced anti-PA83 için,anti-human IgG antikorları kullanılmıştır)) bekletilme işlevi gerçekleştirildi. Bu işlemden sonra membran 2kere 5'er dk. I-Block çözeltisi ve daha sonra 1X TBS ile çalkalandı.En son aşamada membran her birinden 2,5 ml olmakla SuperSignal West Pico Stable Peroxide ve Luminol/ Enhancer (SuperSignal West Pico, Thermo Fisher Scientific Grand Island, NY) western blotting reagent'leri ile muamele edildi.Her iki solusyon aynı anda membran üzerine dökülerek 5dk çalkalayıcı üzerinde bekletildi. Membran üzerindeki protein bantlarının görüntüsü GeneGnome XRQ Chemiluminescence sistemi (Syngene Corp, ABD) uygulanarak görüntülendi.

3.9. SDS-PAGE Analizi

SDS-PAGE analizinde de Western Blot analizi yapmak için kullanılan %10'luk akrilamid jel hazırlandı. Daha önceden denature edilmiş örnekler akrilamid jele,marker(color prestained protein standart cat. No. P7712 S New England Biolabs) bitkide üretilen saflaştırılmış glikosile PA83 standart proteini ve örnekler ardışıklığı ile yüklendi ve 1xRunning buffer ortamında 100 V'da 15 dk, ve 200 V'da 45 dk. yürütüldü. Yürütme sonlandırıldıktan sonra önce jelin üst kısmı olan stacking jel uzaklaştırıldı.1xRunning bufferdan arındırmak için jel dH₂O ile çalkalayıcı üzerinde 5dk. yıkandı. İşlem tamamlandıktan sonra dH₂O dökülerek jelin tamamını kapatacak kadar boyama yaparak ayrılan proteinlerin görülebilirliğini sağlayan jel boyama solusyonu (Coomassie staining) konuldu.Jel çalkalayıcı üzerinde 1 saat boyamaya bırakıldı. Bu işlemin ardından jel boyama solusyonunu uzaklaştırmak için 3 kere 15'er dk. aralıklarla jel boya yıkama solusyonu (destaining) kullanılarak boya uzaklaştırıldı. Protein bantları gözle görülebilir sekile geldiğinde jel görüntülendi.

- ❖ **1xRunning Tamponu:** 3,03gr Tris, 14,3gr glisin, 10ml %10 SDS alınarak son hacim 1000ml olacak şekilde otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözöldü.
- ❖ **1xTransfer Tamponu:** 5,8gr Tris, 2,93gr glisin, 370µL alınarak son hacim 1000ml olacak şekilde otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözöldü.
- ❖ **5xTBS hazırlanması:** 12,115gr Tris, 43,88gr NaCl 800ml olacak şekilde otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözöldü. pH 7,5 olacak şekilde HCl ile ayarlama yapıldı ve total hacim 1000ml olacak şekilde ddH₂O ile ayarlandı.
- ❖ **1xTBS hazırlanması:** 200ml 5xTBS alındı ve total hacim 1000ml olacak şekilde ddH₂O ile ayarlandı.
- ❖ **%10'luk SDS:** 10gr toz halinde SDS ve 90ml steril ddH₂O ile üzeri tamamlanarak karıştırıcı üzerinde çözöndüröldü.

- ❖ **%10'luk APS:** 60mg APS tartıldı ve son hacim 600µl olacak şekilde otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözüldü.
- ❖ **1,5 M Tris-HCl:** 92,5gr Tris tartıldı ve 400ml steril ddH₂O ile çözüldürüldü. Solusyonun pH'ı 8,8 olması için 10N HCl kullanıldı. Total hacim 500ml olacak şekilde ddH₂O ile ayarlandı.
- ❖ **0,5 M Tris-HCl:** 30gr Tris tartıldı ve 400ml steril ddH₂O ile çözüldürüldü. Solusyonun pH'ı 6,8 olması için 10N HCl kullanıldı sonra total hacim 500ml olacak şekilde ddH₂O ile ayarlandı.
- ❖ **0,5M EDTA hazırlanması:** 14,612gr EDTA 80ml otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözüldü. Solusyonun pH'ı 8'e ve sonra total hacim 100ml olacak şekilde ddH₂O ile ayarlandı
- ❖ **1M Tris çözeltisinin hazırlanması:** 100mL steril ddH₂O'da 12,114gr Tris çözüldürüldü.
- ❖ **%10'luk Resolving jel (dört jel için):** 9,7ml otoklavlanmış ddH₂O, 5ml %40 Akrilamit-Bis solüsyonu, 5ml 1,5M Tris-HCl, 200µL %10 SDS, 10µL TEMED ve 100µL %10'luk APS eklenerek hazırlandı.
- ❖ **%10'luk Stacking jel (dört jel için):** 7,95ml otoklavlanmış ddH₂O, 1,25ml %40 Akrilamit-Bis solüsyonu, 3,15ml 1,5M Tris-HCl, 125µL %10 SDS, 12,5µL TEMED ve 62,5µL %10'luk APS eklenerek hazırlandı.
- ❖ **Primer Antikor (Western Blot 1:500):** 10µL antikor alındı ve 10ml %1'lik I-Block içerikli 1xTBS içerisinde çözüldürüldü.
- ❖ **Seconder Antikor (Western Blot 1:4000):** 2,5µL seconder antikor alındı ve 10ml %1'lik I-Block içerikli 1xTBS içerisinde çözüldürüldü.
- ❖ **%1'lik I-Block:** 1gr I-block tartıldı total hacim 100ml olacak şekilde 1xTBS 'de şeffaf solusyon haline gelene kadar karıştırıldı.
- ❖ **%0.01 Bromofenol mavi çözeltisinin hazırlanması:** 100mg Bromofenol tartıldı ve 20mL otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözdürüldü.
- ❖ **SDS/Western Jel Yükleme Solüsyonu (5x)-Laemli Buffer'ın hazırlanması:** 50mL falkon içerisine 7,5mL %25'lik 2-merkaptoetanol kondu. Üzerine 100 mg/20mL Bromofenol mavi stok çözeltisinden 660µL ilave edilip karıştırıldı. Karışıma 11,9mL Gliserol, 1M Tris çözeltisinden 9,375mL ve 3,333mL SDS ilave edilerek pH=6.8'e HCl ile ayarlandı. Daha sonra karışım 1mL olacak şekilde tüplere aliquout edilir. Tüpler kullanılmak üzere -20°C'de saklandı. Protein örnekleri jele yüklenmeden önce hacminin 1/4'i kadar (5x) Laemli Buffer eklenip kaynatılır.

- ❖ **SDS jel boyama çözeltisinin (Coomassie staining) hazırlanması:** 100ml Asetik asit, 500ml metanol ve 1gr Coomassie Blue R250 son hacim 1000mL olacak şekilde otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözöldü.
- ❖ **SDS jel boya uzaklaştırma çözeltisinin (destaining) hazırlanması:** 200ml metanol ve 100ml Asetik asit son hacim 1000mL olacak şekilde otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözöldü.

3.10. HisTaq Etiketli Rekombinant MQ2 Proteinlerinin Saflaştırılması

LpI-MQ2 geninin His etiketli rekombinant proteinlerinin saflaştırılması için,immobilize metal afinite kromatografisi (IMAC) kullanılarak *N. Benthiana* bitkisinin yeşil yapraklarından pürifiye edildi. Genlerinin pürifikasyonu için her bir örnekden 25gr yaprak alarak havan ve havaneli yardımıyla yaprak ağırlığının 3 katı olacak şekilde 75ml Extraction buffer (20Mm Phosphate,300mM NaCl,10mM Imidazole 1Mm DIECA) içinde öğütölerek öz suyu çıkartıldı. Elde edilen posalı sıvı gazlı bezden geçirilerek posa kısmı ayrıştırıldı, alta geçen süzüntü ise +4°C'de 20000Xg'de 30dk. santrifüjlendi. Süpernatant 0.45µm'lik filtreden enjektör yardımıyla geçirildi.Posalardan ayrıştırılmış 75ml süpernatant daha önceden kolona aktarılmış ve rezin miktarının 10 katı kadar Binding bufferle (20Mm Phosphate,300mM NaCl,10mM Imidazole 1Mm DIECA) yıkanmış olan 2ml HisPur™ Ni-NTA rezinden geçirildi.Daha sonra istenmeyen diğer yeşil bitki proteinlerinin rezinden ayrılması için kolon rezin miktarının 10 katı kadar Wash buffer (20Mm Phosphate, 300mM NaCl, 25mM Imidazole 1Mm DIECA) ile yıkandı. Yıkama işlemi bitdikden sonra HisTaq etiketli rekombinant MQ2 proteinlerinin fraksiyonlar şeklinde arıştırılabilmesi için Elution buffer (20Mm Phosphate, 300mM NaCl, 250 mM Imidazole 1Mm DIECA) kolondan geçirilerek örnekler fraksiyonlar halinde düşük bağlanma riskli polipropilen eppendorflara toplandı. Toplanan fraksiyonların konsantrasyonunu BioDrop-la ölçtükten sonra, yüksek konsantrasyonlu fraksiyonlar tek tüpte birleştirilerek Millipore 10K concentrator yardımıyla konsantre edildi. Konsantre edilen örnekler eppendorflara alıquotlandı ve -80°C dolapta muhafaza edildi. Daha sonra saflaştırılmış proteinin saflık derecesini kontrol etmek amacıyla proteinler SDS-PAGE metodu ile analiz edildi.

- ❖ **250mM NaH₂PO₄:** 6,8995gr NaH₂PO₄xH₂O tartıldı ve 250ml otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözöldü.
- ❖ **250mM Na₂HPO₄:** 8,8725gr Na₂HPO₄ tartıldı ve 250ml otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözöldü.
- ❖ **Sodyum fosfat tamponu (protein pürifikasyonu için, 20mM):** 15,48ml 1M Na₂HPO₄ ve 4,52ml 1M NaH₂PO₄ 800ml otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözöldü ve üzerine 17,53gr NaCl ilave edilip tamamen çözödürölünceye kadar karıştırıldı. pH 7,4'e ve total hacim otoklavlı ddH₂O ile 1000ml'e ayarlandı.

- ❖ **100mM imidazol stok çözeltisinin hazırlanması:** 0,3404gr imidazol tartıldı ve 50ml 50 mM Sodium Fofat (PBS) içerisinde çözöldü.
- ❖ **10mM Binding Buffer:** 5ml 100mM imidazol stok çözeltisinden alındı ve üzerine 45ml 50 mM Sodium Fofat (PBS) ilave edilip karıştırıldı.
- ❖ **25mM Wash Buffer:** 12,5ml 100mM imidazol stok çözeltisinden alındı ve üzerine 37,5ml 50mM Sodium Fofat (PBS) ilave edilip karıştırıldı.
- ❖ **250mM Elution Buffer:** 0,851gr imidazol tartıldı ve üzerine 50ml 50mM Sodium Fofat (PBS) içerisinde çözöldü.
- ❖ **Extraction Buffer:** Protein pürifikasyonu için, 20mM Sodyum fosfat tamponu içerisinde 1Mm DIECA çözöldü .

3.11. Stabillite Analizleri

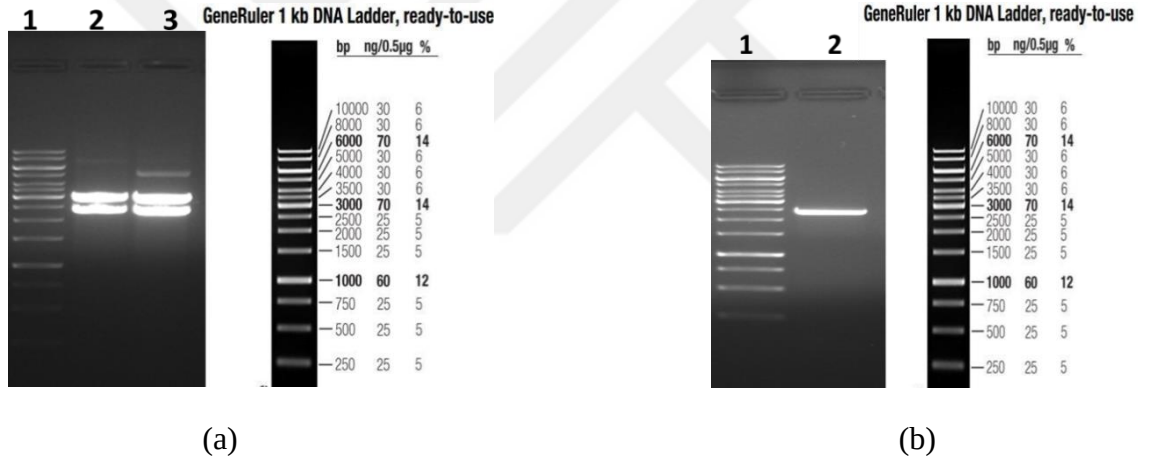
Farklı bitki ekspresyon vektörleri tarafından üretilen deglikolize (dPGR-PA83-MQ2, dLP-PA83-MQ2) edilmiş PA83 antijenlerinin zaman ve temperaturdan asılı olarak stabillite analizleri için proteinler 1mg/ml olacak şekilde düşük bağlanma riskli polipropilen eppendorflara bölüntölendi. Proteinler 37°C-de 12, 24, 48, 72, 96 saat, oda sıcaklığında 5 hafta ve su banyosunda 15dk. inkubasyon süresiyle 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C sıcaklıkta tutulacak şekilde tasarlandı. Her inkubasyondan sonra proteinlere 5xSDS karıştırılmadan -80°C kaldırıldı. Zamanı biten örnekler -80den çıkarılarak her birinden 8µl ayrıldı, üzerine 2µl 5xSDS kondu ve 100°C-de 5dk kaynatıldı. Oda sıcaklığına gelmiş örnekler 1500xg-de 30 san. santrifüj edildikten sonra %10 akrilamid jelle yüklendi ve Western Blot analizi yapıldı.

Örneklerin kalan kısmı (16µl) 10000xg-de 5-7dk. santrifüj edildi. Her bir örnek eppendorfun dibine çöken pelletten arındırıldı (8µl). Daha sonra her örneke 2µl 5XSDS konuldu, 100°C su banyosunda 5dk kaynatıldı. Oda sıcaklığına gelmiş örnekler 1500xg-de 30 san santrifüj edildikten sonra %10-luk akrilamid jelle yüklendi ve Western Blot analizi yapıldı. Western Blot analizi sonuçları başlangıç protein bantlarına göre diğer protein bantları denk gelecek şekilde GeneTools yazılımını kullanan Syngene jel görüntölleme ile hesaplandı.

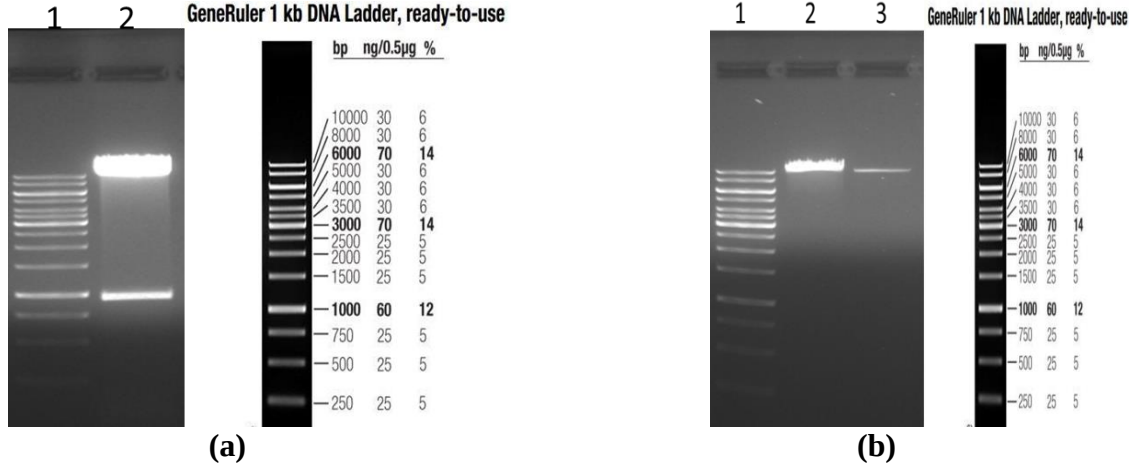
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Genlerin Klonlanması

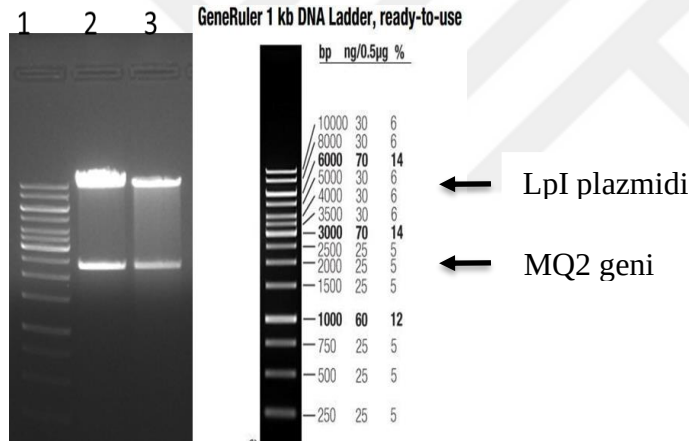
PA83 geni belirli bölgelerde amino asit değişikliği yapılarak mutant hale getirilen MQ2 geni ticari olarak satın alındı. Daha sonra MQ2 genin PZR'ü kullanılarak çoğaltılması sağlandı. Kodlama bölgesinin uçları küt olduğundan gen küt uçlu pJET1.2 vektörüne klonlandıktan sonra AgeI ve XhoI restriksiyon enzimleri ile kesilerek yapışkan kesim bölgesi içeren vektör şeklinde dizayn edildi. Enzim kesimi ve jelden geri kazanım işlemleri materyal ve metot'da belirtilen şekilde uygulandı. Daha sonra MQ2 geni modifiye edilmiş LpI vektörüne klonlandı ve ekspresyon suşu XL1BLUE'a transforme edildi, ardından kanamisin içeren LB Agar plate'e yayma yöntemiyle ekildi. Yaklaşık 24 saatlik inkübasyondan sonra uygun koloniler seçildi ve kanamisin içeren LB sıvı besiyerine inokule edildi. Bir gün sonra çoğalmış olan bakterilerden Monarch Plasmid Miniprep Kitiyle üreticisinin talimat ve tavsiyelerine uyarak plazmid izolasyonu yapıldı. Agaroz jele yükleme yapılarak gerçek koloniler seçildi.



Şekil 4.1. a) AgeI ve XhoI restriksiyon enzimleri ile kesilen pJET1.2- MQ2 plasmidinin agaroz jel görüntüsü. 1.1kB DNA Ladder 2.AgeI ve XhoI enzimleriyle kesilen pJET1.2 -MQ2 3. AgeI ve XhoI enzimleri ile kesilen pJET1.2-MQ2; **b)** MQ2 geninin jelden gerikazanımı .1. 1kB DNA Ladder 2. Jelden gerikazanılan MQ2(E1)



Şekil 4.2. a) AgeI ve XhoI enzimleri ile kesilen LpI-nin agaroz jel görüntüsü. 1.1kB DNA Ladder 2.AgeI ve XhoI enzimleri ile kesilen LpI; **b)** AgeI ve XhoI enzimleri ile kesilen LpI-nin jelden geri kazanımının agaroz jel görüntüsü 1.1kB DNA Ladder 2. Jelden geri kazanılan LpI(E1) 3. Jelden geri kazanılan LpI(E2)

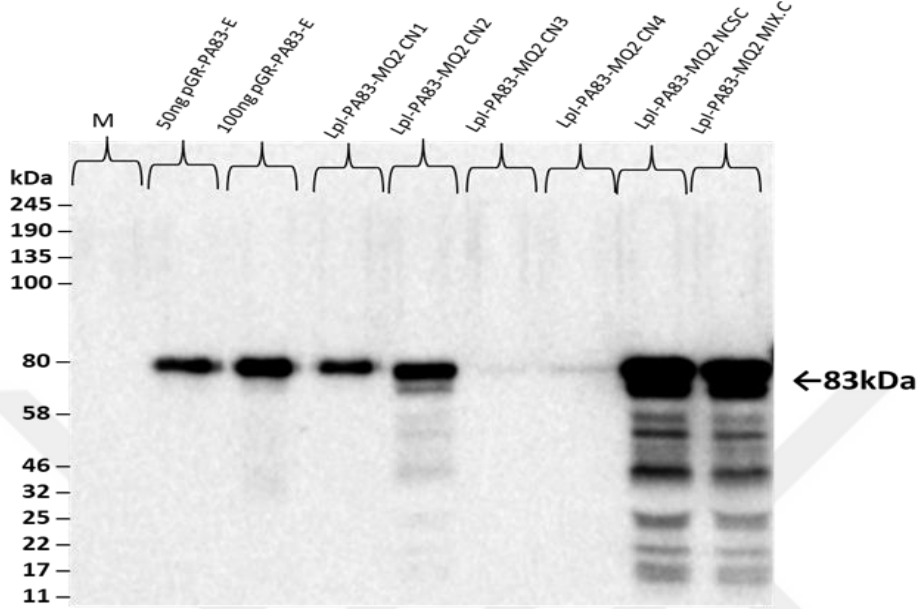


Şekil 4.3. AgeI ve XhoI restriksiyon enzimleri ile kesilen LpI -MQ2 : 1. 1kB DNA Ladder 2. AgeI ve XhoI enzimleri ile kesilen LpI -MQ2 (CN1) 3. AgeI ve XhoI enzimleri ile kesilen LpI -MQ2 (CN2)

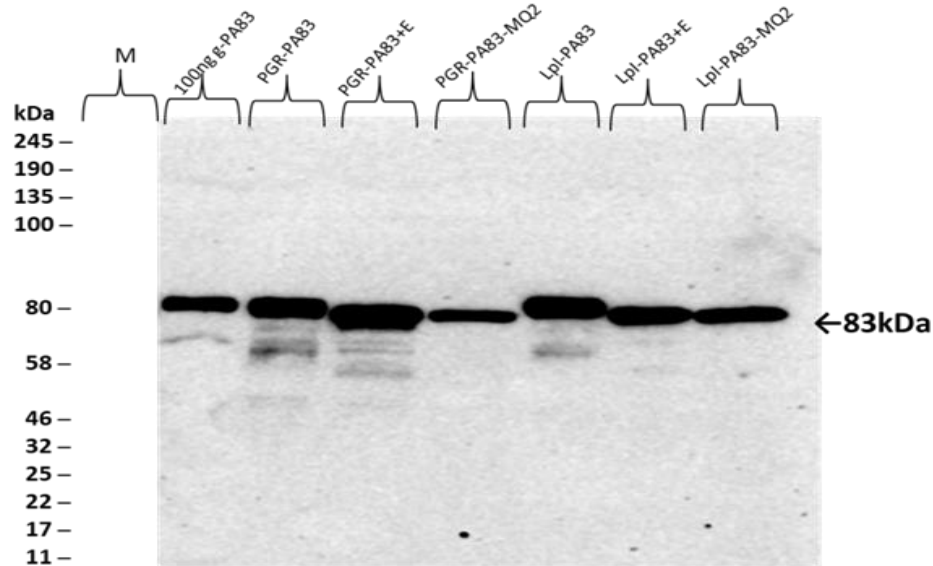
4.2. Western Blot ve SDS PAGE Analizi

LpI-MQ2 plazmiti *E. coli* XLI Blue hücreleri tarafından çoğaltıldı, daha sonra AgeI ve XhoI tarafından kesilerek doğrulanması sağlandı. Sonuçlar doğrultusunda LpI-MQ2 plazmiti elektroporasyon yöntemi ile *A.tumefaciens* AGL1-psoup kompetan hücrelerine transformasyon gerçekleştirildi. İnfiltrasyon aşamasında recombinant deglikosile protein üretimi için plasmid deneylerde gösterildiği gibi 6-7 haftalık *N. benthamiana* bitkisine şırınga yardımı ile infiltre edildi. Yeşil bitki yaprakları, 5 gün sonra (dpi) toplanarak protein ekstraksiyonu yapıldı. Materyal ve metot'da belirtildiği gibi Western

blot yapmakta maksat ekstraksiyonu yapılan proteinin üretilip üretilmediğini kontrol etmektir. Yapılan analiz sonuçları 83 kDa boyutlarındaki protein bantının *in vivo* üretilmiş deglikosile MQ2 proteininin olduğunu gösteriyor.



Şekil 4.4. M:LP-PA83-MQ konstraktının farklı kolonilerinin infiltrasyon sonrası Western Blot görüntüsü M: Marker (moleküler ağırlık belirteçleri)

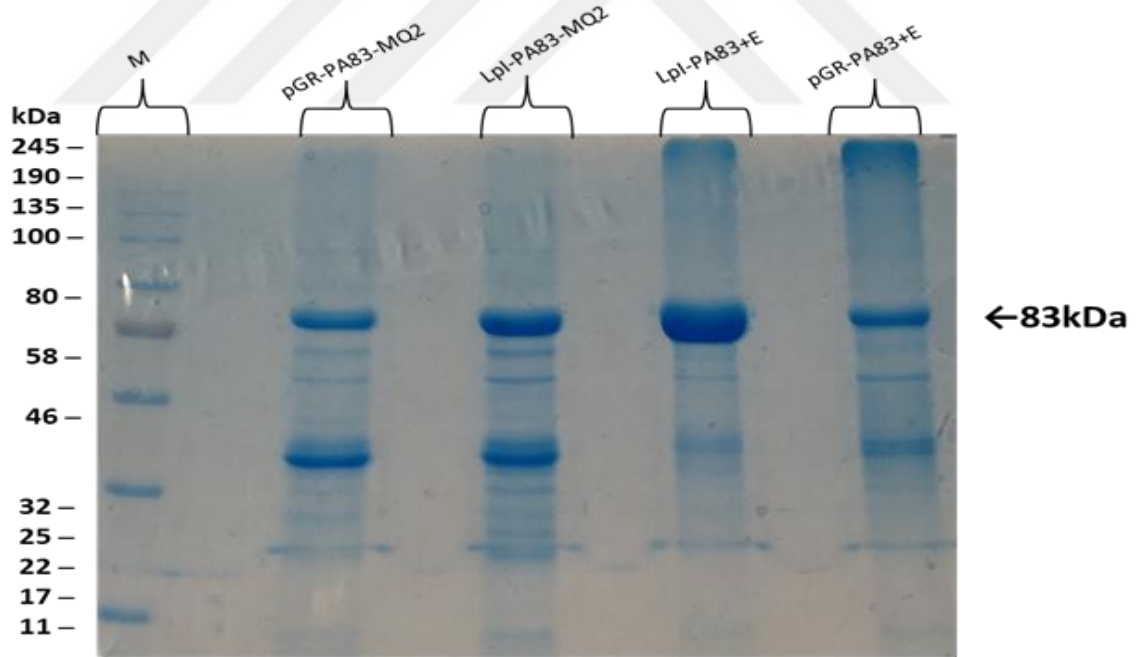


Şekil 4.5. Farklı bitki ekspresyon vektörleri tarafından üretilen glikolize ve deglikolize edilmiş PA83 antijeninin ekspresyon seviyelerinin Western Blot analiziyle karşılaştırılması: M: Marker (moleküler ağırlık belirteçleri)

Şekil 4.5’de görüldüğü üzere LpI-MQ2 ve pGR-MQ2 'nin ekspresyon seviyeleri, proteinlerin Western Blot sonuçlarının GeneTools Yazılımı kullanılarak Syngene jel görüntüleme sistemi ile hesaplandı. *N. benthamiana* bitkisinde LpI-MQ2 ve pGR-MQ2 'nin ekspresyon seviyeleri Western Blot analiziyle, ham protein ekstraktlarının bitkide üretilen saflaştırılmış glikosile PA83 standart proteini ile birlikte yürütülerek tahmin edildi. LpI-MQ2 'nin ekspresyon seviyesi 96mg/kg, pGR-MQ2 'nin ekspresyon seviyesi ise yaklaşık 75mg/kg taze yaprak biyokütlesidir.

4.3. Farklı Bitki Ekspresyon Vektörleri Tarafından Üretilen Rekombinant Histaq (His6) Etiketli MQ2 Proteinlerinin Saflaştırılması

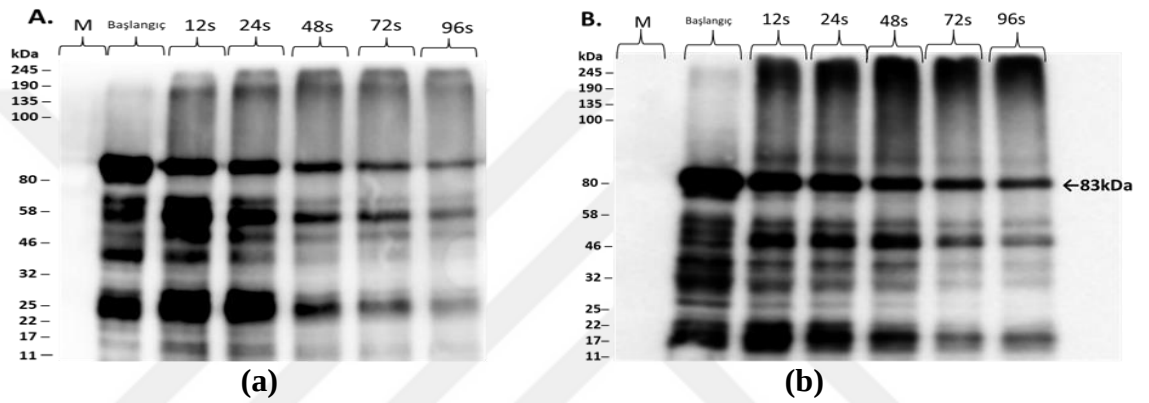
Rekombinant histidin etiketli LpI-MQ2 ve pGR-MQ2 proteinlerinin saflaştırılması materyal ve metot’da anlatıldığı gibi yapıldı. *N. benthamiana* bitkisinde rekombinant olarak başarıyla üretimi gerçekleştirilen LpI-MQ2 ve pGR-MQ2 proteinleri yeterli saflıkta üretildiği gözlemlendi. Ayrıca bu proteinlerin saflaştırma sonrası SDS-PAGE analizi sonuçlarında proteinleri dışında bitkilerde genellikle yoğun olarak bulunan kendi proteini olan Rubisco da gözlenmiştir. Lakin Western Blot analizi yapılarak proteinlerimizin, spesifik antikörler aracılığıyla doğru bir şekilde üretildiği kanıtlanmıştır.



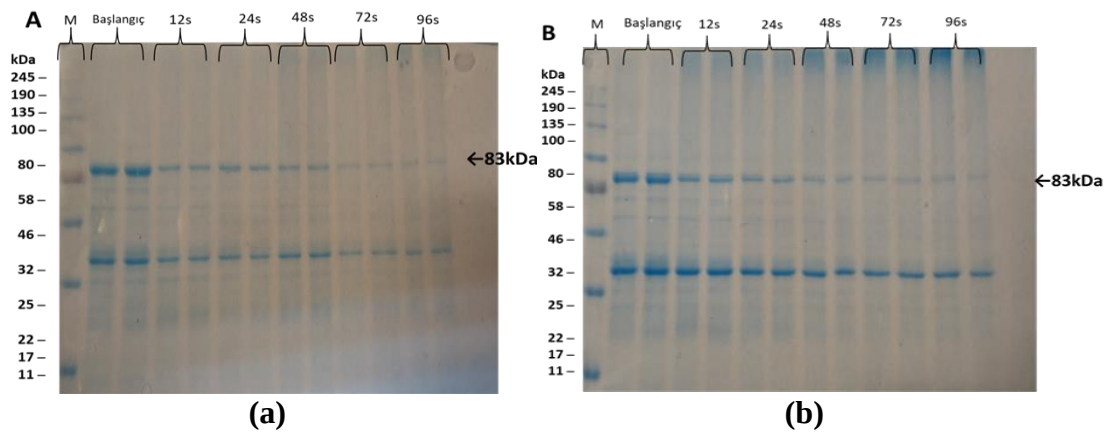
Şekil 4.6. Farklı bitki ekspresyon vektörleri tarafından üretilen deglikolize edilmiş PA83 antijeninin HisTag purifikasyonu sonrası SDS görüntüsü M: Marker (moleküler ağırlık belirteçleri) Örnekler jele PGR- PA83-MQ2; LP- PA83-MQ2; LP-PA83+E ve PGR-PA83+E sırasıyla yüklenmiştir.

4.4. Saflaştırılmış MQ2 Proteinlerinin Stabilite Sonrası SDS-PAGE ve Western Blot-Analizi

Stabilite analizleri materyal ve metot’da açıklandığı gibi yapılmış olup SDS-PAGE ve Western Blot analizi sonuçları aşağıdaki şekillerde ayrıntılı gösterilmiştir. Her iki protein için de, materyal ve metot’da açıklandığı gibi 37°C de 12, 24, 48, 72, 96 saat, oda sıcaklığında 5 hafta, oda sıcaklığında 1, 3, 5 ay ve su banyosunda 15 dakika inkubasyon süresiyle 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C sıcaklıklarda tutularak proteinlerin farklı antikorlarla yapılmış Western Blot stabilite analiz neticeleri değerlendirilmiştir.



Şekil 4.7. Saflaştırılmış MQ2 Proteinlerinin 37°C temperaturda 12, 24, 48, 72, 96 saat inkubasyon Sonrası Western Blot-Analizi : **a)** A-Saflaştırılmış pGR- MQ2 proteini; **b)** Saflaştırılmış LpI- MQ2 proteini; M: Marker (moleküler ağırlık belirteçleri)

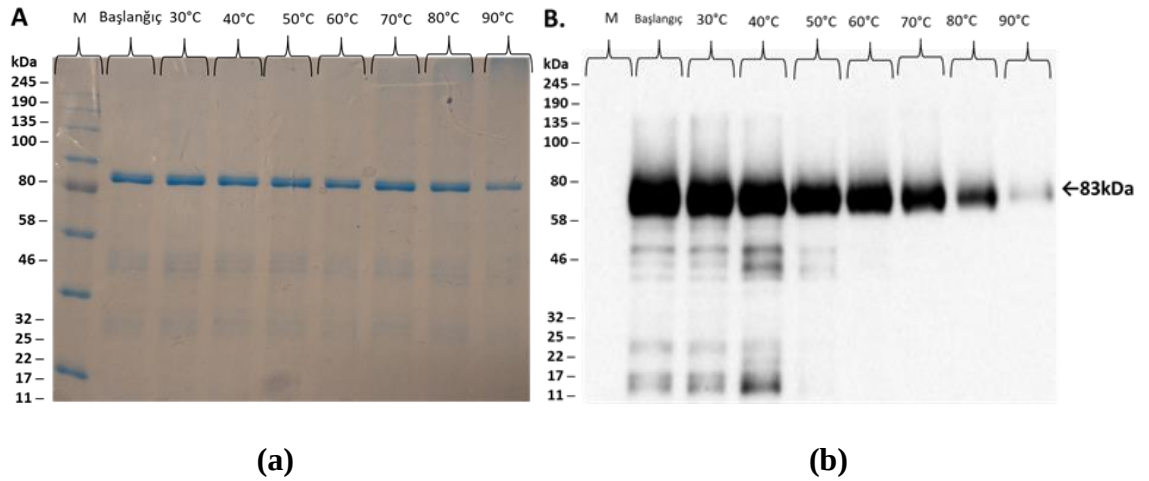


Şekil 4.8. Saflaştırılmış MQ2 Proteinlerinin 37°C temperaturda 12,24,48,72,96 saat inkubasyon Sonrası SDS PAGE analizi: **a)** Saflaştırılmış pGR- MQ2 proteini; **b)** Saflaştırılmış LpI- MQ2 proteini; M: Marker (moleküler ağırlık belirteçleri)

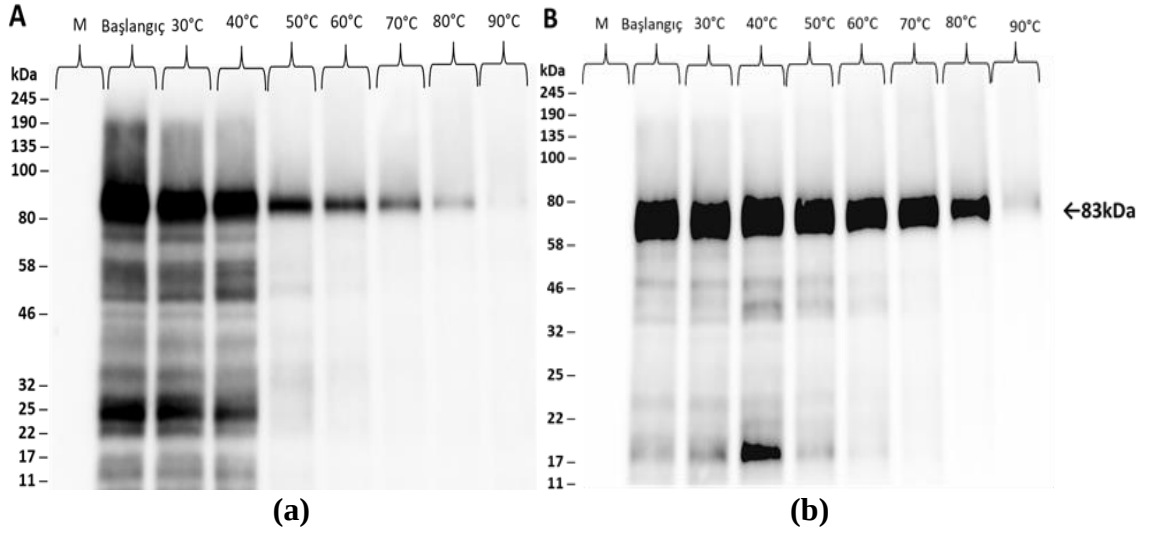
Saflaştırılmış MQ2 proteinlerinin 37°C’de 12, 24, 48, 72, 96 saat bekletildikten sonra yapılan Western Blot analiz sonuçlarından sonra alınan görüntüler GeneTools programı yardımıyla başlangıç proteine 100 değeri verilerek diğer proteinlere denk gelen değerler hesaplandı. Bu sonuca göre; pGR-MQ2 proteinin yarı ömrü 13,68 saat, LpI- MQ2 proteinin yarı ömrü ise 14,64 saat olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.1. Saflaştırılmış pGR-MQ2 ve LpI- MQ2 proteinlerinin Western Blot analizleri sonrası stabilite değerlendirmesi.

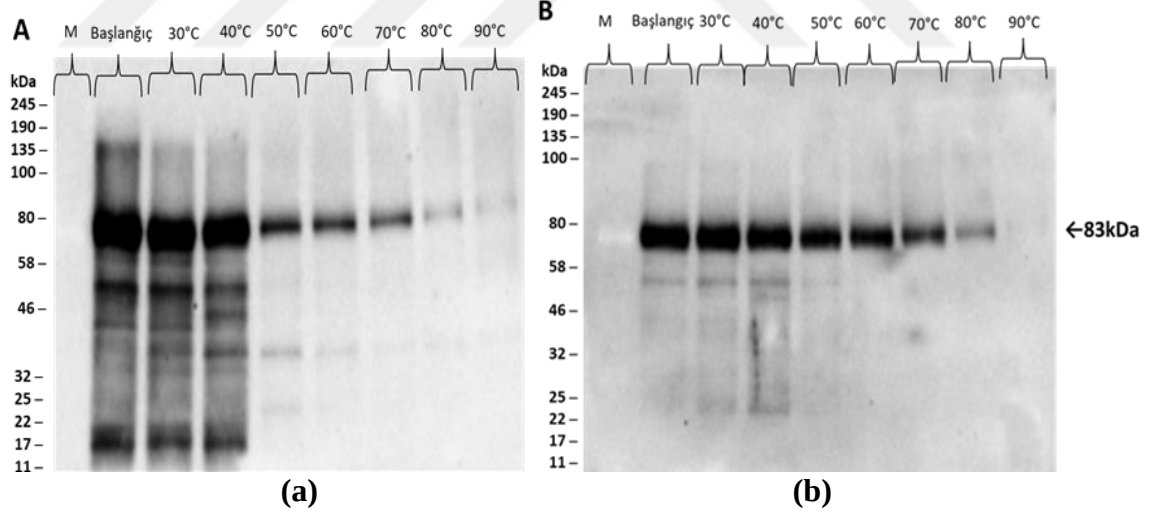
	Başlangıç	37 °C 12 saat	37 °C 24 saat	37 °C 48 saat	37 °C 72 saat	37 °C 96 saat
LP-MQ2 Saflaştırılmış Protein	100,00%	61,00%	44,00%	33,00%	28,00%	15,62%
Parçalanmış protein miktarı (%)						
	0,00%	38,68%	55,82%	66,89%	71,96%	83,28%
LP-MQ2 Yarılma Ömrü	14,64 saat					
pGR-MQ2 Saflaştırılmış Protein	100,00%	57,85%	38,64%	30,18%	17,82%	13,49%
Parçalanmış protein miktarı (%)						
	0,00%	42,15%	61,36%	69,82%	82,18%	86,51%
pGR-MQ2 Yarılma Ömrü	13,68 saat					



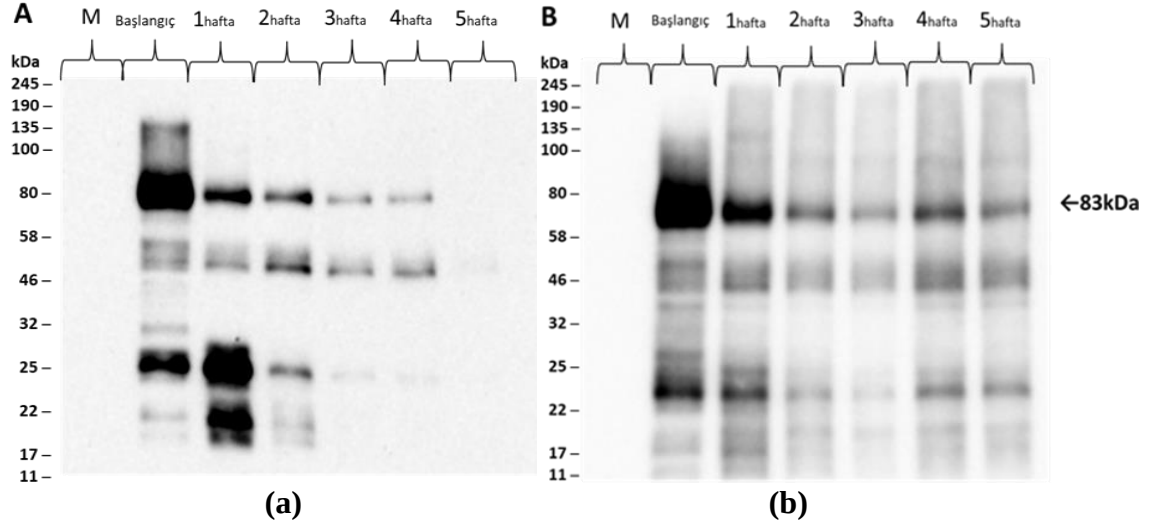
Şekil 4.9. Saflaştırılmış LpI- MQ2 proteininin 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C-de termal stabilite sonrası çöktürülerek yapılan SDS PAGE ve Western Blot analizi: **a)** SDS PAGE analizi; **b)** Western Blot analizi. (Histidin etiketli proteinlerin analizi için anti-6XHis monoklonal antikor Cat. no. 652502;seconder olarak anti-mouse HRP konjuge antikor kullanılmıştır) ; M: Marker (moleküler ağırlık belirteçleri)



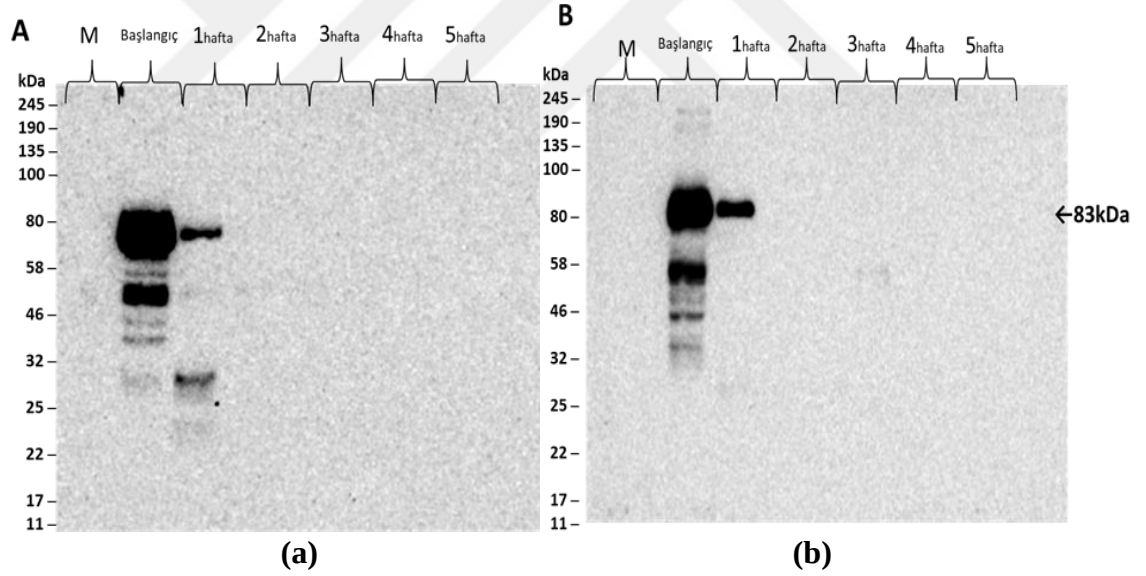
Şekil 4.10. Saflaştırılmış pGR-MQ2 ve LpI- MQ2 proteinlerinin 30°C, 40°C, 50°C, 60°C ,70°C, 80°C, 90°C-de termal stabilite sonrası çöktürülerek yapılan Western Blot analizi: **a)** Saflaştırılmış pGR-MQ2 proteini; **b)** Saflaştırılmış LpI- MQ2 proteini (Histidin etiketli proteinlerin analizi için primer: pp- anti-gPA83 antikoru, seconder: anti-human HRP konjuge antikoru kullanılmıştır). M: Marker (moleküler ağırlık belirteçleri)



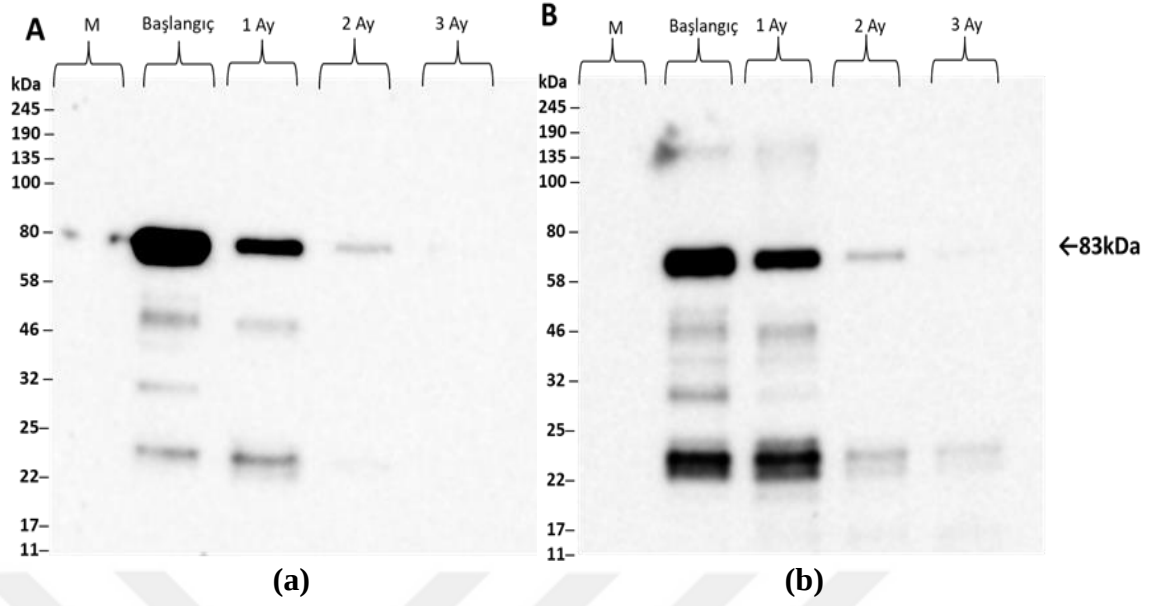
Şekil 4.11. Saflaştırılmış pGR-MQ2 ve LpI- MQ2 proteinlerinin 30°C, 40°C, 50°C, 60°C ,70°C, 80°C, 90°C -de termal stabilite sonrası çöktürülerek yapılan Western Blot analizi: **a)** Saflaştırılmış pGR-MQ2 proteini; **b)** Saflaştırılmış LpI- MQ2 proteini (Histidin etiketli proteinlerin analizi için primer: commercial anti-PA83 antikoru, seconder: anti-goat HRP antikoru kullanılmıştır). M: Marker (moleküler ağırlık belirteçleri)



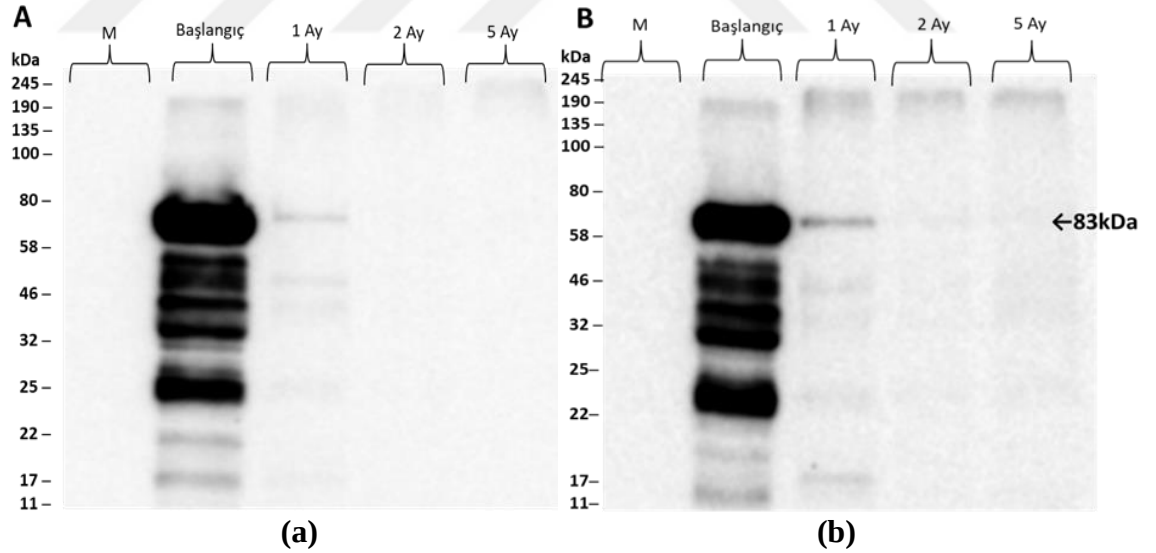
Şekil 4.12. Saflaştırılmış pGR-MQ2 ve LpI- MQ2 proteinlerinin oda sıcaklığında 5 hafta inkubasyon sonrasında çöktürülmeden yapılan Western Blot analizi görüntüsü: **a)** Saflaştırılmış pGR-MQ2 proteini; **b)** Saflaştırılmış LpI- MQ2 proteini . M: Marker (moleküler ağırlık belirteçleri)



Şekil 4.13. Saflaştırılmış pGR-MQ2 ve LpI- MQ2 proteinlerinin oda sıcaklığında 5 hafta inkubasyon sonrasında çöktürülerek yapılan Western Blot analizi görüntüsü: **a)** Saflaştırılmış pGR-MQ2 proteini; **b)** Saflaştırılmış LpI- MQ2 proteini . M: Marker (moleküler ağırlık belirteçleri)



Şekil 4.14. Saflaştırılmış pGR-MQ2 ve LpI-MQ2 proteinlerinin +4°C-de 3 ay inkubasyon sonrasında çöktürülerek yapılan Western Blot analizi görüntüsü: **a)** Saflaştırılmış pGR-MQ2 proteini; **b)** Saflaştırılmış LpI-MQ2 proteini. M: Marker (moleküler ağırlık belirteçleri)



Şekil 4.15. Saflaştırılmış pGR-MQ2 ve LpI-MQ2 proteinlerinin oda sıcaklığında 5 ay inkubasyon sonrasında çöktürülerek yapılan Western Blot analizi görüntüsü: **a)** Saflaştırılmış pGR-MQ2 proteini; **b)** Saflaştırılmış LpI-MQ2 proteini. M: Marker (moleküler ağırlık belirteçleri)

5. SONUÇ

Şarbon, en tehlikeli biyo-terör ajanlarından biri olduğundan Şarbonun önlenmesi için yeni güvenli ve etkili aşılara çok ihtiyaç vardır. Şarbon hastalığına karşı aşı geliştirme kapsamında yapılan bu çalışmada strateji olarak, bilinen en önemli molekül olan PA83'ün glikolizasyon bölgelerinden amino asit değişimleri yaparak mutasyona uğratarak farklı bitki ekspresyon vektörleri tarafından üretilen deglikosile edilmiş PA83 antijeninin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması üzerine kurulmuştur. Bu kapsamda üretilen proteinleri kodlayan genlerin farklı bitki ekspresyon vektörlerine klonlanması, *N. benthamiana* bitkisine aktarılması, bitkide protein üretiminin sağlanması, üretilmiş proteinlerin ekspresyon seviyelerinin ve stabilite değerlerinin karşılaştırılması deney sonuçlarında da gösterildiği gibi başarıyla yapılmıştır.

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

Bitki ekspresyon sisteminde deglikolize olarak üretilen proteinlerin canlı vücudunda kan dolaşımında yarılanma ömrünün belirlenmesi amacıyla insan vücudunda olduğu gibi proteinler 37°C'de tutulmuş ve proteinin ne kadar zamanda ne kadarının parçalandığı yüzde olarak gösterilip, yarılanma ömrü hesaplanmıştır. Bu hesaplamaları en doğru şekilde yapabilmek için Western blot analizleri yapıldı ve analiz sonrası GeneTools programı kullanılarak hata payı en aza indirgenmeye çalışıldı. Hem ekspresyon seviyeleri hem de stabilite sonuçları materyal ve metot'da bahsedildiği gibi spesifik bir deney olan Western blot analizi ile karşılaştırıldığında; MQ2 geninin pGR vektöründe ekspresyon seviyesinin LpI vektörüne nispeten daha az olduğu görülmektedir. Western blot sonucuna göre LpI-MQ2 proteininin yarılanma ömrünün pGR-MQ2 proteininden daha fazla olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda her iki proteinin +4 °C, oda sıcaklığı ve termal stabilite deney sonuçlarına göre; LpI-MQ2 proteininin pGR-MQ2 proteininden nispeten daha fazla dayanıklı olduğu tespit edilmiştir.

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

6. KAYNAKLAR

- Aldhous P: Biological warfare. Gruinard Island handed back. , 1990; 344: 801
- Anthrax Vaccine (Alum precipitated sterile filtrate) Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency; Sep 23, 2016. Mhra.gov.uk. Product insert.
- Arora N, Leppla SH. 1993. Residues 1–254 of anthrax toxin lethal factor are sufficient to cause cellular uptake of fused polypeptides. *J. Biol. Chem.* 268:3334–41
- Bales ME, Dannenberg AL, Brachman PS, Kaufmann AF, Klatsky PC, Ashford DA: Epidemiologic response to anthrax outbreaks: field investigations, 1950-2001. *Emerg Infect Dis*, 2002; 8: 1163-74
- Bann JG, Anthrax toxin protective antigen--insights into molecular switching from prepore to pore. *Protein Sci.* 2012;21(1):1–12.
- Bartlett JG, Inglesby TV, Borio L: Management of anthrax. *Clin Dis*, 2002; 35: 851-8
- Biothrax. U.S. Food and Drug Administration; Aug 5, 2016. Fda.Gov. Product insert.
- Boutiba-Ben Boubaker I, Ben Redjeb S: [*Bacillus anthracis*: causative agent of anthrax]. *Tunis Med*, 2001; 79: 642-6
- Brachman PS: Bioterrorism: an update with a focus on anthrax. *J Epidemiol*, 2002; 155: 981-7
- Bromberg-White J, Lee CS, Duesbery N. Consequences and utility of the zinc-dependent metalloprotease activity of anthrax lethal toxin. *Toxins (Basel)*. 2010;2(5):1038–1053.
- Brook I: The prophylaxis and treatment of anthrax. *Int Antimicrob Agents*, 2002; 20: 320-5
- Caksen H, Arabaci F, Abuhandan M, Tuncer O, Cesur Y: Cutaneous anthrax in eastern Turkey. *Cutis*, 2001; 67: 488-92
- Carucci JA, McGovern TW, Norton SA et al: Cutaneous anthrax management algorithm. *J Am Acad Dermatol*, 2002; 47: 766-9
- Chen KH, Liu S, Leysath CE, et al. Anthrax Toxin Protective Antigen Variants That Selectively Utilize either the CMG2 or TEM8 Receptors for Cellular Uptake and Tumor Targeting. *J Biol Chem.* 2016;291(42):22021–22029.
- Chen PY, Wang CK, Soong SC, To KY. Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. *Mol Breed* 2003;11:287–293.
- Chitlaru T, Altboum Z, Reuveny S. et al. Progress and novel strategies in vaccine development and treatment of anthrax. *Immunological Reviews* 2011;239: 221–236.
- Cieslak TJ, Eitzen EM, Jr. Clinical and epidemiologic principles of anthrax. *Emerg Infect Dis*, 1999; 5: 552-5
- Coban YK, Balik O, Boran C: Cutaneous anthrax of the hand and its reconstruction with a reverse-flow radial forearm flap. *Ann Plast Surg*, 2002; 49: 109-11

- Cunningham K, Lacy DB, Mogridge J, et al. Mapping the lethal factor and edema factor binding sites on oligomeric anthrax protective antigen. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(10):7049–7053.
- Davies JC: A major epidemic of anthrax in Zimbabwe. *Cent Afr J Med*, 1982; 28: 291-8
- Davies JC: A major epidemic of anthrax in Zimbabwe. Part II. *Cent Afr J Med*, 1983; 29: 8-12
- Davies JC: A major epidemic of anthrax in Zimbabwe. The experience the Beatrice Road Infectious Diseases Hospital, Harare. *Afr J Med*, 1985; 31: 176-80
- Dirckx JH: Virgil on anthrax. *Am J Dermatopathol*, 1981; 3: 191-5
- Dixon TC, Meselson M, Guillemin J, Hanna PC. Anthrax. *N Engl J Med*. 1999;341:815–26. doi: 10.1056/NEJM199909093411107.
- Doganay M, Bakir M, Dokmetas I: A case of cutaneous anthrax with toxæmic shock. *Br J Dermatol*, 1987; 117: 659-62
- Driks A. Overview: Development in bacteria: spore formation in *Bacillus subtilis*. *Cell Mol Life Sci*. 2002;59:389–91. doi: 10.1007/s00018-002-8430-x.
- Dumas EK, Garman L, Cuthbertson H, et al. Lethal factor antibodies contribute to lethal toxin neutralization in recipients of anthrax vaccine precipitated. *Vaccine*. 2017;35(26):3416- 3422.
- Dumas EK, Gross T, Larabee J, et al. Anthrax Vaccine Precipitated Induces Edema Toxin-Neutralizing, Edema Factor-Specific Antibodies in Human Recipients. *Clin Vaccine Immunol*. 2017;24(11):e00165–17.
- Earls JP, Cerva D, Jr, Berman E et al: Inhalational anthrax after bioterrorism exposure: spectrum of imaging findings in two surviving patients. *Radiology*, 2002; 222: 305-12
- Fellows PF, Linscott MK, Ivins BE, Pitt ML, Rossi CA, Gibbs PH, et al. 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;19:3241–7
- Flick-Smith HC, Walker NJ, Gibson P, Bullifent H, Hayward S, Miller J, et al. A recombinant carboxy-terminal domain of the protective antigen of *Bacillus anthracis* protects mice against anthrax infection. *Infect Immun* 2002;70:1653–6.
- Friedlander AM, Welkos SL, Ivins BE. Anthrax vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002;271:33–60
- Friedlander AM. Anthrax: clinical features, pathogenesis, and potential biological warfare threat. *Curr Clin Top Infect Dis*. 2000;20:335–49.
- Geier, D. A., and R. M. Geier. 2002. Anthrax vaccination and joint related adverse reactions in light of biological warfare scenarios. *Clin. Exp. Rheumatol*. 20:217-220.
- Gelvin SB. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 2000;51:223–256.

- Guillemin J. Anthrax: the investigation of a deadly outbreak. Berkeley: University of California Press; 1999.
- Hart CA, Beeching NJ: A spotlight on anthrax. *Clin Dermatol*, 2002; 20: 365-75
- Henry L: Inhalational anthrax: threat, clinical presentation, and treatment. *J Am Acad Nurse Pract*, 2001; 13: 164-8; quiz 169-70
- Hood EE, Jilka JM. Plant-based production of xenogenic proteins. *Curr Opin Biotechnol* 1999;10:382–386.
- Hugh-Jones M: 1996-97 Global Anthrax Report. *J Appl Microbiol*, 1999; 87: 189-91
- Human anthrax associated with an epizootic among livestock – North Dakota, 2000. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2001; 50: 677-80
- Hutt JA, Lovchik JA, Drysdale M, et al. Lethal factor, but not edema factor, is required to cause fatal anthrax in cynomolgus macaques after pulmonary spore challenge. *Am J Pathol*. 2014; 184(12):3205-3216.
- Inglesby TV, O'Toole T, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, Friedlander AM, Gerberding J, Hauer J, Hughes J, et al. Anthrax as a biological weapon, 2002: updated recommendations for management. *Jama*. 2002;287:2236–52. doi: 10.1001/jama.287.17.2236.
- Ivins BE, Pitt ML, Fellows PF, Farchaus JW, Benner GE, Waag DM, et al. Comparative efficacy of experimental anthrax vaccine candidates against inhalation anthrax in rhesus macaques. *Vaccine* 1998;16:1141–8
- Jedrzejak M: Three-dimensional structure and molecular mechanism novel enzymes of spore-forming bacteria. *Med Sci Monit* ; 8: RA183-90
- Jiang J, Pentelute BL, Collier RJ, et al. Atomic structure of anthrax PA pore elucidates toxin translocation. *Nature*. 2015;521(7553):545–549.
- Kaur M, Singh S, Bhatnagar R. Anthrax vaccines: present status and future prospects. *Expert Rev Vaccines*. 2013;12(8):955–970.
- Kaya A, Tasyaran MA, Erol S, Ozkurt Z, Ozkan B: Anthrax in adults and children: a review of 132 cases in Turkey. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2002; 21: 258-61
- Khajehdehi P: Toxemic shock, hematuria, hypokalemia, and hypoproteinemia in a case of cutaneous anthrax. *Mt Sinai J Med*, 2001; 68: 213-5
- Klimpel K, Molloy S, Thomas G, et al. Anthrax toxin protective antigen is activated by a cell-surface protease with the sequence specificity and catalytic properties of furin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89(21):10277–10281.
- Klimpel KR, Arora N, Leppla SH. 1994. Anthrax toxin lethal factor contains a zinc metalloprotease consensus sequence which is required for lethal toxin activity. *Mol. Microbiol*. 13:1093–100
- Konstantin Musiyshuk, Natalie Stephenson, Hong Bi, Christine E. Farrance, Goran Orozovic, Maria Brodelius, Peter Brodelius, April Horsey, Natalia Ugulava, Abdel-Moneim Shamloul, Vadim Mett, Shailaja Rabindran, Stephen J. Streatfield, and Vidadi Yusibov launch vector for the production of vaccine

- antigens in plants. *Influenza Other Respir Viruses*. 2007 Jan; 1(1): 19–25. Published online 2007 Jan 19. doi: 10.1111/j.1750-2659.2006.00005.x
- Krol CM, Uszynski M, Dillon EH et al: Dynamic CT features of inhalational anthrax infection. *AJR Am J Roentgenol*, 2002; 178: 1063-6
- Kuehnert MJ, Doyle TJ, Hill HA et al: Clinical features that discriminate inhalational anthrax from other acute respiratory illnesses. *Clin Infect Dis*, 2003; 36: 328-36
- Kumar S, Daniell H. Engineering the chloroplast genome for hyperexpression of human therapeutic proteins and vaccine antigens. *Methods Mol Biol* 2004;267:365–383
- Lakshmi N, Kumar AG: An epidemic of human anthrax – a study. *Indian J Pathol Microbiol*, 1992; 35: 1-4
- Leppla SH. 1982. Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentrations of eukaryotic cells. *PNAS* 79:3162–66
- Leppla SH. 1984. *Bacillus anthracis* calmodulin-dependent adenylate cyclase: chemical and enzymatic properties and interactions with eucaryotic cells. *Adv. Cycl. Nucleotide Protein Phosphorylation Res.* 17:189–98
- Levine MM, Sztein MB. Vaccine development strategies for improving immunization: the role of modern immunology. *Nat Immunol* 2004;5:460–4.
- Little SF, Lowe JR. Location of receptor-binding region of protective antigen from *Bacillus anthracis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991;180(2):531–537.
- Makino S, Uchida I, Terakado N, et al. Molecular characterization and protein analysis of the cap region, which is essential for encapsulation in *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol.* 1989;171:722–730.
- Mal'tseva AN: [The epidemiology and prevention of anthrax]. *Feldsher Akush*, 1990; 55: 10-4
- Mamedov T, Chichester JA, Jones RM, et al. 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*. 2016;11(4):e0153956.
- Mamedov T, Cicek K, Gulec B, Ungor R, Hasanova G. In vivo production of nonglycosylated recombinant proteins in *Nicotiana benthamiana* plants by co-expression with Endo β -N-acetylglucosaminidase H (Endo H) of *Streptomyces plicatus*. *PLoS One*. 2017. 21;12(8):e0183589
- Mammedov, T., Ghosh, A., Jones, R., Mett, V., Farrance, C., Musiychuk, K., Horsey, A. ve Yusibov, V. 2012. Production of non-glycosylated recombinant proteins in *Nicotiana benthamiana* plants by co-expressing bacterial PNGase F. *Plant Biotechnology Journal*, 10, 773–782.
- Manchee RJ, Broster MG, Anderson IS, Henstridge RM, Melling J: Decontamination of *Bacillus anthracis* on Gruinard Island? *Nature*, 1983; 303: 239-40
- Manchee RJ, Broster MG, Henstridge RM, Stagg AJ, Melling J: Anthrax island. *Nature*, 1982; 296: 598

- Manchee RJ, Broster MG, Melling J, Henstridge RM, Stagg AJ: *anthracis* on Gruinard Island. *Nature*, 1981; 294: 254-5
- Mansour-Ghanaei F, Zareh S, Salimi A: GI anthrax: report of one confirmed with autopsy. *Med Sci Monit*, 2002; 8: CS73-6
- McComb RC, Martchenko M. Neutralizing antibody and functional mapping of *Bacillus anthracis* protective antigen—The first step toward a rationally designed anthrax vaccine. *Vaccine*. 2016;34(1):13–19.
- Moayeri M, Leppla SH. Cellular and Systemic Effects of Anthrax Lethal Toxin and Edema Toxin. *Mol Aspects Med*. 2009;30(6):439–455.
- Mock M, Fouet A: Anthrax. *Annu Rev Microbiol*, 2001; 55: 647-71
- Mourez M, Yan M, Lacy DB, et al. Mapping dominant-negative mutations of anthrax protective antigen by scanning mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(24):13803– 13808.
- Nguyen ML, Terzyan S, Ballard JD, et al. The Major Neutralizing Antibody Responses to Recombinant Anthrax Lethal and Edema Factors Are Directed to Non-Cross-Reactive Epitopes. *Infection and Immunity*. 2009;77 (11):4714–4723.
- Okada Y. Historical overview of research on the tobacco mosaic virus genome: genome organization, infectivity and gene manipulation. *Philos Trans R Soc Lond B, Biol Sci* 1999;354:569–582.
- Okinaka RT, Cloud K, Hampton O, et al. Sequence and organization of pXO1, the large *Bacillus anthracis* plasmid harboring the anthrax toxin genes. *J Bacteriol*.1999;181(20):6509– 6515.
- Oncul O, Ozsoy MF, Gul HC, et al: Cutaneous anthrax in Turkey: a review of 32 cases. *Scand J Infect Dis*, 2002; 34: 413-6
- Pannifer AD, Wong TY, Schwarzenbacher R, Renatus M, Petosa C, et al. 2001. Crystal structure of the anthrax lethal factor. *Nature* 414:229–33
- Petosa C, Collier RJ, Klimpel K, et al. Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen. *Nature*. 1997;385(6619):833–838.
- Pittman PR, Gibbs PH, Cannon TL, Friedlander AM. Anthrax vaccine: short-term safety experience in humans. *Vaccine* 2001;20:972–8.
- Plotkin SA, Brachman PS, Utell M, Bumford FH, Atchison MM. An epidemic of inhalation anthrax, the first in the twentieth century: I. Clinical features. 1960. *Am J Med*. 2002;112:4–12. doi: 10.1016/S0002-9343(01)01050-6. discussion 2–3.
- Plotkin SA, Brachman PS, Utell M, et al: An epidemic of inhalation anthrax, the first in the twentieth century: I. Clinical features. 1960. *Am J Med*, 2002; 112: 4-12; discussion 2-3
- Rainey GJ, Wigelsworth DJ, Ryan PL, et al. Receptor-specific requirements for anthrax toxin delivery into cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(37):13278–13283.
- Rosovitz MJ, Schuck P, Varughese M, et al. Alanine-scanning mutations in domain 4 of anthrax toxin protective antigen reveal residues important for binding to the

- cellular receptor and to a neutralizing monoclonal antibody. *J Biol Chem.* 2003;278(33):30936–30944.
- Santelli E, Bankston LA, Leppla SH, Liddington RC. Crystal structure of a complex between anthrax toxin and its host cell receptor. *Nature* 2004;430:905–8.
- Schmid G, Kaufmann A: Anthrax in Europe: its epidemiology, clinical characteristics, and role in bioterrorism. *Clin Microbiol Infect*, 2002; 8: 479-88
- Sever, J. L., A. I. Brenner, A. D. Gale, J. M. Lyle, L. H. Moulton et al. 2002. Safety of anthrax vaccine: a review by the Anthrax Vaccine Expert Committee (AVEC) of adverse events reported to the Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS). *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.* 11:189-202.
- Shivprasad S, Pogue GP, Lewandowski DJ, *et al.* Heterologous sequences greatly affect foreign gene expression in tobacco mosaic virus-based vectors. *Virology* 1999;255:312–323.
- Singh Y, Klimpel K, Arora N, et al. The chymotrypsin-sensitive site, Ffd315, in anthrax toxin protective antigen is required for translocation of lethal factor. *J Biol Chem.* 1994;269(46):29039–29046. 38. Mogridge J, Mourez M, Collier RJ. Involvement of domain 3 in oligomerization by the protective antigen moiety of anthrax toxin. *J Bacteriol.* 2001;183(6):2111–2116.
- Sirisanthana T, Navachareon N, Tharavichitkul P, Sirisanthana V, Brown AE: Outbreak of oral-oropharyngeal anthrax: an unusual manifestation of human infection with *Bacillus anthracis*. *Am J Trop Med Hyg*, 1984; 33: 144-50
- Storm L, Bikker FJ, Nazmi K, et al. Anthrax protective antigen is a calcium-dependent serine protease. *Virulence.* 2018;9(1):1085–1091.
- Swartz MN: Recognition and management of anthrax – an update. *N Engl J Med*, 2001; 345: 1621-6
- Taft SC, Weiss AA. Neutralizing activity of vaccine-induced antibodies to two *Bacillus anthracis* toxin components, lethal factor and edema factor. *Clin Vaccine Immunol.* 2008;15(1):71–75.
- Tang WJ, Guo Q. The Adenylyl Cyclase Activity of Anthrax Edema Factor. *Mol Aspects Med.* 2009;30(6):423–430.
- Thullier P, Avril A, Mathieu J, et al. Mapping the Epitopes of a Neutralizing Antibody Fragment Directed against the Lethal Factor of *Bacillus anthracis* and Cross-Reacting with the Homologous Edema Factor. *PLoS One.* 2013;8(5):e65855.
- Turnbull PC: Introduction: anthrax history, disease and ecology. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2002; 271: 1-19
- Wang JY, Roehrl MH. Anthrax vaccine design: strategies to achieve comprehensive protection against spore, bacillus, and toxin. *Med Immunol* 2005;4:4.
- Watson A, Keir D: Information on which to base assessments of risk from environments contaminated with anthrax spores. *Epidemiol* , 1994; 113: 479-90
- WHO. Information sheet observed rate of vaccine reactions anthrax vaccines to humans. 2012. [cited 2019 Apr 25]:[4 p.]. Available from:

https://www.who.int/vaccine_safety/initiative/tools/Anthrax_Vaccine_rates_information_sheet.pdf

Young JA, Collier RJ. Anthrax Toxin. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2003;19:45–70.

Yusibov V, Hooper DC, Spitsin SV, *et al.* Expression in plants and immunogenicity of plant virus-based experimental rabies vaccine. *Vaccine* 2002;20:3155–3164.

Yusibov V, Rabindran S, Commandeur U, Twyman RM, Fischer R. The potential of plant virus vectors for vaccine production. *Drugs R D* 2006;7:203–217.



ÖZGEÇMİŞ

Esmira MİRZALİYEVA
m.esmira19@gmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	
2016-2020	Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü - ANTALYA
2011-2013	Bakü Devlet Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü - BAKÜ
Lisans	
2007-2011	Bakü Devlet Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü - BAKÜ