

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



***N. benthamiana* BİTKİSİNİN KURUTULMUŞ YAPRAKLARIN'da
BACİLLUS ANTHRACİS'İN KORUYUCU ANTİJENİ'nin (PA83)
DEGLİKOSİLE EDİLMİŞ ve MUTANT FORMUNUN STABİLİTE ve
FONKSİYON AKTİVİTE DEĞERLENDİRİLMESİ.**

Soner AKBURU

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MAYIS 2020

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



***N. benthamiana* BİTKİSİNİN KURUTULMUŞ YAPRAKLARIN'da
BACİLLUS ANTHRACİS'İN KORUYUCU ANTİJENİ'nin (PA83)
DEGLİKOSİLE EDİLMİŞ ve MUTANT FORMUNUN STABİLİTE ve
FONKSİYON AKTİVİTE DEĞERLENDİRİLMESİ.**

Soner AKBURU

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MAYIS 2020

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***N. benthamiana* BİTKİSİNİN KURUTULMUŞ YAPRAKLARIN'da
BACILLUS ANTHRACIS'İN KORUYUCU ANTİJENİ'nin (PA83)
DEGLİKOSİLE EDİLMİŞ ve MUTANT FORMUNUN STABİLİTE ve
FONKSİYON AKTİVİTE DEĞERLENDİRİLMESİ.**

Soner AKBURU
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez Tübitak tarafından 115S077 nolu proje ile desteklenmiştir.

MAYIS 2020

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***N. benthamiana* BİTKİSİNİN KURUTULMUŞ YAPRAKLARIN'da
BACİLLUS ANTHRACİS'İN KORUYUCU ANTİJENİ'nin (PA83)
DEGLİKOSİLE EDİLMİŞ ve MUTANT FORMUNUN STABİLİTE ve
FONKSİYON AKTİVİTE DEĞERLENDİRİLMESİ.**

Soner AKBURU

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

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

Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV (Danışman)

Prof. Dr. Nedim MUTLU

Doç. Dr. Muhammet TONGUÇ

ÖZET

***N. benthamiana* BİTKİSİNİN KURUTULMUŞ YAPRAKLARIN'da *BACILLUS ANTHRACIS*'İN KORUYUCU ANTİJENİ'nin (PA83) DEGLİKOSİLE EDİLMİŞ ve MUTANT FORMUNUN STABİLİTE ve FONKSİYON AKTİVİTE DEĞERLENDİRİLMESİ.**

Soner AKBURU

Yüksek Lisans Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV

Mayıs 2020; 34 sayfa

Şarbon, hem insanları hem de hayvanları etkileyen *Bacillus anthracis* bakterisinin kaynaklanan akut bir hastalıktır. *B. Anthracis* sporlarının üretimi ve salımı nispeten kolaydır. Gram pozitif bir bakteri olan *Bacillus anthracis*'den kaynaklanan bir zoonotik bir hastalıktır. Rekombinant protein üretimi için birçok farklı sistem vardır. Bunlardan bazıları maya, bitki, böcek, bakteri ve memeli hücre kültürleridir. Bitki ekspresyon sistemi diğer ekspresyon sistemlerine göre birçok avantaja sahiptir. Ökaryotik transkripsiyon sonrası modifikasyon mekanizmasına sahip oldukları için geçici gen ifadesi metodu kullanılır ve istenilen protein çok kısa bir sürede üretilmektedir. Bu yaklaşımdan yola çıkılarak PA koruyucu antijeninin deglikozile çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada *N. benthamiana* da deglikozile dPA83-E ve pGR-MQ₂ ile infiltre edilen kurutulmuş yapraklar kullanıldı. Ve elde edilen dPA83-E ve pGR-MQ₂ deglikozile edilmiş mutantının özelliklerini, *N. benthamiana* bitkilerinde eksprese kurutulmuş dPA83-E ve pGR-MQ₂ birçok yönde stabilizasyon ve karakterizasyon çalışmaların da kullanılma ihtimalleri üzerinde çalışılmıştır. Bu çalışmalar; in vivo deglikozile edilmiş PA83-E ve mutasyona uğramış versiyonlarının *N. benthamiana* bitkisinde yapılan çalışmada, kurutulmuş örneklerinin western blot ile ekspresyon kontrolü ve kurutulmuş yapraktan proteini çözündürme ve ezme yöntemiyle elde edilmesidir. Bu sonuçların SDS-PAGE ve WESTERN BLOT analizi yapılmıştır. Bu çalışmanın sonunda elde edilen bulgularla stabilizasyon değerlendirmesi, birçok yönde stabilizasyon ve karakterizasyon çalışmaların da kullanılma ihtimalleri üzerinde çalışılmıştır. Tüm sonuçlar incelendiğinde, kurutulmuş yapraklarda protein değerlerinin yaklaşık 1 yıldan fazla stabil kaldığı gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Geçici gen anlatımı, *Bacillus anthracis*, stabilite, aktivite değerlendirilmesi.

JÜRİ: Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV

Prof. Dr. Nedim MUTLU

Doç. Dr. Muhammet TONGUÇ

ABSTRACT

EVALUATION OF STABILITY AND FUNCTIONAL ACTIVITY OF DEGLYCOSYLATED and MUTANT FORMS OF PROTECTIVE ANTİGEN (PA83) OF BACİLLUS ANTHRACİS İN DRIED LEAVES of *Nicotiana benthamiana*.

Soner AKBURU

MSc Thesis in Agricultural Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV

May 2020; 34 pages

Anthrax is an acute disease caused by *Bacillus anthracis*, which affects both people and animals. The production and release of *B. Anthracis* spores is relatively easy. It is a zoonotic disease originating from *Bacillus anthracis*, a gram-positive bacterium. There are many different systems for recombinant protein production. Some of these are plant, insect, bacteria, yeast and mammalian cell cultures. The plant expression system has many advantages over other expression systems. The transient gene expression method is used because they have a modification mechanism after eukaryotic translation, and the desired protein can be produced in a very short time. Based on this approach, deglycosylation of PA protective antigen was performed. Dried leaves infiltrated with deglycosylated dPA83- -E and pGR-MQ2 in *N. benthamiana* were used in this studies. And the properties of obtained the dPA83- -E and pGR-MQ2 deglycosylated mutant, the possibilities of using stabilization and characterization studies in many directions in *N. benthamiana* plants were also studied. These studies are; the production of the in vivo deglycosylated PA83 and mutated versions in *N. benthamiana* plant, expression control of their dried samples by western blot and obtaining of dried leaf protein by dissolution and crushing method. SDS-PAGE and WESTERN BLOT analysis of these results were done. With the findings obtained at the end of this study, the evaluation of stabilization, the possibilities of using stabilization and characterization studies in many directions were also studied. When all results are examined, it has been shown that the protein values of dried leaves have been stable for approximately more than 1 year.

KEYWORDS: Transient gene expression, bacillus anthracis, stability, activity evaluation.

COMMITTEE: Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV

Prof. Dr. Nedim MUTLU

Doç. Dr. Muhammet TONGUÇ

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın yürütülmesi esnasında gerek bilgi ve tecrübesini gerek ise kıymetli katkılarını esirgemeyen danışman sayın hocam Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV'a teşekkürler ederim.

Yüksek Lisans eğitimimde bilgileri ile bana katkı sağlayan ve ufkumu açan Akdeniz Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü akademik kadrosuna ayrıca teşekkürlerimi sunmaktayım.

Laboratuvarda ki deneysel çalışmalarımda teknik bilgilerini benimle paylaşan ve manevi destekleri ile kendimi güçlü hissettiren laboratuvarımız öğrencilerinden değerli arkadaşlarım Deniz SAY, Rıfat ÜNGÖR ve Burcu GÜLEÇ'e ve Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü'nde öğrenciliğine devam eden arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Son olarak yaşamım boyunca gerekli donanıma sahip olmam için maddi ve manevi destekleri ile her zaman yanımda olan, insani değerlerin her türlü statü ve durumdan daha değerli olduğunu öğreten çok kıymetli aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
AKADEMİK BEYAN	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMA	3
2.1. Şarbon.....	3
2.2. Antraks Toksinlerinin Enfeksiyondaki Rollerini.....	4
2.3. <i>Bacillus anthracis</i> Antraks Patojeni	4
2.4. Şarbon Toksinlerin Etki Şekli	5
2.5. Aşı Geliştirme.....	5
2.6. Şarbon Tedavisi ve Önlenmesi.....	6
2.7. Bitkide Geçici Gen Anlatımı	7
3. MATERYAL VE METOT	9
3.1. Besiyerleri	9
3.2. Çözeltiler ve Tamponlar	10
3.3. <i>A. tumefaciens</i> Hücrelerine Transformasyon ve <i>N. benthamiana</i> Bitkisine İnfiltrasyon	13
3.4. Bitkiden Protein Ekstraksiyonu	14
3.5. SDS-PAGE ve Western Blot Analizi	14
3.6. Yaprakların Kurutulması	15
3.7. Stabilizasyon Değerlendirmesi	16
4. TARTIŞMA VE BULGULAR	17
4.1. <i>N. benthamiana</i> Bitkisinde pGR-MQ ₂ ve dPA83-E Proteinini Üretimi.....	17

4.2.	Kurutulmuş dPA83-E ve pGR-MQ ₂ Örneklerinin Western Blot Görüntüsü ...	18
4.3.	Farklı Sıcaklık Değerlerinin Kurutulmuş dPA83-E Üzerindeki Etkisi	18
4.4.	Kurutulmuş dPA83-E'nin ve Çözdürme Sonrası Oda Sıcaklığında Stabilizasyon Değerlendirilmesi.....	20
4.5.	Termal-Stabilizasyon Değerlendirme.....	21
4.6.	İki Farklı Tarihte Kurutulmuş dPA83-E Yapraklarda Farklı Çözücü Ortamlarda ve Ezme Yönteminde Sonuçların Değerlendirilmesi	22
4.7.	dPA83-E ve pGR-MQ ₂ Örnekleri Stabilizasyon Sonuçlarının SDS PAGE Değerlendirmesi	23
4.8.	MQ ₂ Stabilizasyon Western Blot Değerlendirmesi	24
4.9.	dPA83-E Oda Sıcaklığında Stabilizasyonu	25
4.10.	dPA83-E ve MQ ₂ Yaklaşık Toplam Proteinler	26
4.10.1.	MQ ₂ Toplam Protein.....	26
4.10.2.	dPA83-E Toplam Protein	27
4.11.	Benzer koşullarda, Farklı Nem Değerleri İle Kuru Yaprakların Değerlendirilmesi	29
5.	SONUÇ	31
6.	KAYNAKLAR	32
ÖZGEÇMİŞ		

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*N. benthamiana* bitkisinin kurutulmuş yaprakların ‘da *Bacillus anthracis*’in koruyucu antijeni’nin (PA83) deglikozile edilmiş ve mutant formunun Stabilizasyon ve fonksiyon aktivite değerlendirilmesi.” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

.../.../2020

Soner AKBURU

İmzası



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

g	: Gram
IÜ	: İnternasyonel (biyolojik) ünite
L	: Litre
M	: Molar
µl	: mikrolitre
ml	: mililitre
mM	: Milimolar
°C	: Santigrat derece

Kısaltmalar

dk	: dakika
O.D.	: Optik Dansite
s	: saat
sn	: saniye
kb	: kilobaz
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat-Poli Akrilamid Jel Elektroforezi
ER	: Endoplazmik Retikulum
TAE	: Tris-Asetat-EDTA
kDa	: kilodalton
TB	: Transmission Blocking
V	: Volt
Endo H	: Endoglikosidaz H
O.D.	: Optik Dansite
PTGS	: Transkripsiyon sonrası gen susturması

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil. 2.1. Antraks toksinlerinin enfeksiyondaki rolleri	4
Şekil. 2.4. Şarbon toksinlerin etki şekli.....	5
Şekil. 2.7.1. Bitkide geçici gen anlatımının ifadesi (Mardanova vd. 2017).....	8
Şekil. 2.7.2. İnfiltrasyon aşaması.....	8
Şekil. 4.1. pGR MQ ₂ ve PA83-E <i>N. benthamiana</i> ekstraksiyonu. Western blot görüntüsü.	17
Şekil. 4.2. Kurutulmuş dPA83-E ve pGR-MQ ₂ örneklerinin western blot görüntüsü .	18
Şekil. 4.3. Farklı sıcaklık değerlerinin kurutulmuş dPA83-E üzerindeki etkisi:	19
Şekil. 4.4. Kurutulmuş dPA83-E numunesinin çözündürme ve çözündürme sonrası oda sıcaklığında stabilizasyon değerlendirilmesi:	20
Şekil. 4.5. Termal- Stabilizasyon değerlendirmeleri.....	21
Şekil. 4.6. İki farklı tarihte kurutulmuş dPA83-E yapraklarda farklı çözücü ortamlarda ve ezme yönteminde sonuçların değerlendirilmesi;.....	22
Şekil 4.7. dPA83-E ve pGR-MQ ₂ Örnekleri stabilizasyon sonuçlarının SDS PAGE değerlendirmesi	23
Şekil. 4.8. MQ ₂ Stabilizasyon	24
Şekil. 4.9. dPA83-E Stabilizasyon	25
Şekil. 4.10.1. MQ ₂ toplam proteini hesaplamadaki kullanılan bant.....	27
Şekil. 4.10.2. dPA83-E toplam proteini hesaplamadaki kullanılan bant	28
Şekil. 4.11. Uygulama aşamaları.....	29

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge. 1. Farklı sıcaklık değerlerinin kurutulmuş dPA83-E üzerindeki etkisi	19
Çizelge. 2. dPA83-E Termal-Stabilizasyon	21
Çizelge. 3. İki farklı tarihte kurutulmuş dPA83-E yapraklarda farklı çözücü ortamlarda ve ezme yönteminde sonuçların değerlendirilmesi	23
Çizelge. 4. MQ ₂ Stabilizasyon	24
Çizelge. 5. MQ ₂ Stabilizasyon	25
Çizelge. 6. dPA83-E Stabilizasyon	26
Çizelge. 7. Benzer koşullarda, farklı nem değerleri ile kuru yaprakların değerlendirilmesi	29



1. GİRİŞ

Şarbon, evcilleştirilmiş ve vahşi doğadaki hayvanları bununla beraber insanları tehdit eden spor yoluyla bulaşan bir mikroorganizmadır. Özellikle de sığır, keçi ve koyunlarda yaygın olan ve aerobik mikroorganizma oluşturan Gram pozitif bir bakteri olan *Bacillus anthracis*'den kaynaklanan bir zoonotik bir hastalıktır. *B. anthracis* üç toksin proteini salgılar. Bunlar sırasıyla ödem faktörü (EF), öldürücü faktör (LF) ve iki AB-tipi toksin, ödem toksini ($ET = PA + EF$) ve öldürücü oluşturmak için ikili kombinasyonlarda etki eden koruyucu antijen (PA) toksin ($LeTx = PA + LF$). Hücre yüzeyine bağlandıktan sonra PA, furin ile proteolitik olarak yarılr, bu da bir 20-kDa protein fragmanının salınmasına ve bir ön gözenek oluşturmak için 63-kDa fragmanlarının heptamerizasyonuna yol açar (Molloy vd. 1992). Heptamerize PA, LF veya EF'yi bağlar ve ekotoksinin sitoplazmaya girişini kolaylaştırır ayrıca hücre ölümüne sebep olmaktadır. (Mamedov vd. 2016).

Son zamanlarda, rekombinant proteinlerin üretimi için memeli hücreleri ve maya, böcek, bitkileri içeren çeşitli ökaryotik ekspresyon sistemleri kullanılmaktadır. Potansiyel N-glikosilasyon bölgelerine sahip proteinler, bu sistemlerde ifade edildiğinde etkili bir şekilde glikosile edilir. Bununla birlikte, ökaryotik ekspresyon sistemlerinin glikosilasyon kabiliyeti bazı proteinler için arzu edilmeyebilir. Doğal konakta N-bağlı glikanlar taşımayan hedef proteinler, potansiyel N-bağlı glikosilasyon sahaları içeriyorsa, ökaryotik ekspresyon sistemlerinde anormal şekilde glikosile edilebilirler, bu nedenle potansiyel olarak biyolojik aktiviteyi bozabilirler. (Mamedov ve Yusibov 2013). Son yıllardaki biyoteknolojik ilerlemeler, bitkilerin rekombinant protein üretimi için alternatif bir yöntem olarak kullanılmasına olan alakayı arttırdı.

Bitkiler, basit, yüksek oranda ölçeklenebilir, uygun maliyetli üretim, barındırılan herhangi bir memeli patojeninin bulunmaması nedeniyle nispi ürün güvenliği ve ökaryotik post-translasyonel modifikasyon (PTM) makinelerinin varlığı dahil olmak üzere diğer rekombinant protein ekspresyon sistemleri ile karşılaştırıldığında ayrıca katkıları mevcuttur. (Mett vd. 2008; Yusibov vd. 2010). N-bağlı glikosilasyon, rekombinant alt birim aşılar ve heterolog ekspresyon sistemlerinde üretilen terapötik proteinler içermek üzere birçok proteinin doğru katlanması, Stabilizasyon ve biyolojik aktivitesi için kritik olan bir post-translasyonel modifikasyondur (Gomord Vd. 2010). Bununla birlikte, bazı ökaryotik ve bakteriyel proteinler, doğal konakçıda N-glikan içermez, fakat bu proteinler heterolog ökaryotik ekspresyon sistemlerinde eksprese edildiğinde anormal şekilde glikosile edilen çoklu potansiyel glikosilasyon bölgeleri içerebilir, epitopların yanlış katlanması veya engellenmesi nedeniyle düşük işlevsellik ve immünojenisiteye yol açabilir. Bununla birlikte, bazı ökaryotik ve bakteriyel proteinler, doğal konakçıda N-glikan içermez, ancak bu proteinler heterolog ökaryotik ekspresyon sistemlerinde eksprese edildiğinde anormal şekilde glikosile edilen çoklu potansiyel glikosilasyon bölgeleri içerebilir (Mamedov ve Yusibov 2013).

Ek olarak, integrins ve cadherins dahil olmak üzere hücre yüzeyi reseptörlerinin anormal N-glikosilasyonu, kanser ilerlemesi ve metastazındaki değişikliklerle ilişkili gibi görünmektedir, (Guo vd. 2002; Isaji vd. 2004). Bu proteinlerin davranışında önemli değişiklikler olduğunu gösterir. Aslında, karbonhidratların eklenmesi bir proteinin fiziko-kimyasal özelliklerini güçlü bir şekilde etkiler, ve bu nedenle, protein in vivo kullanıldığında bir güvenlik riski oluşturabilen spesifik aktivite, ligand-reseptör

etkileşimleri ve immünojenisite benzeri asıl biyolojik özelliklerini farklılaştırabilir. Bu noktada, ökaryotik ekspresyon sistemlerinin glikosilata kabiliyeti, N-bağlı glikosilasyon gerektirmeyen hedefler için arzu edilmeyebilir.

Anormal N-glikosilasyonun birçok terapötik uygulama için problem oluşturduğu gösterilmiştir. Glikan bulunmayan hedef proteinlerin eldesi için *in vivo* enzimatik deglikosilasyon stratejisi, bitkilerde glikosile edilmemiş proteinlerin üretimi için güçlü bir stratejisine gelme olasılığına sahiptir. Yapılan bir çok öncü çalışmada *in vivo* deglikosilasyon ile üretilen proteinlerin özelliklerinin (aktivite ve immünojenite, vb.) *in vitro* deglikozile edilmiş eşlerinden ayrıca farklı olduğunu belirtilmiştir. Diğer yandan bu stratejiyle üretilmiş olan antijen proteinlerinin ayrıca kararlı olduğu ve kuvvetli bir antikor uyarımı sağladığı belirlenmiştir (Mammedov vd. 2017).

Bu değerlendirmeler sonucunda kurutulan infiltre yapraklarla yapılan sonuçlarla yaş yapraklardan alınan sonuçların kıyaslanması ve yapılan çalışmanın ne tür avantaj ve dezavantajlara sahip oldu anlatılmaya çalışılmıştır. Bu çalışmada kullanılan PA koruyucu antijeni genleri daha önceki yapılmış olan sonuçları bu çalışmada elde edilen sonuçlarla elde edilebilmesi hedeflenmiştir. Bu doğrultu da elde edilen rekombinant proteinlerin işlevselliği ele alınmıştır.

2. KAYNAK TARAMA

2.1. Şarbon

Şarbon, hem insanları hem de hayvanları etkileyen *Bacillus anthracis* bakterisinden kaynaklanan akut bir hastalıktır. *B. anthracis* sporlarının üretimi ve salımı nispeten kolaydır ve bu nedenle, ABD'de spor içeren zarf saldırılarının 2001 olayları ile kanıtlandığı gibi biyo-teröristler tarafından kullanılabilir. *B. anthracis*, toksin proteinleri için yapısal genleri ve kapsül oluşumu için biyosentetik genleri taşıyan iki plazmit, pXO1 ve pXO2 barındırır. *B. anthracis* üç toksin proteini salgılar. Bunlar sırasıyla EF (ödem faktörü, bir kalmodulin bağımlı adenilat siklaz), öldürücü faktör (LF, bir metaloproteaz) ve iki AB-tipi toksin, ödem toksini (ET = PA + EF) ve öldürücü olmak için ikili kombinasyonlarda tesir eden koruyucu antijen (PA) toksin (LeTx = PA + LF). Hücre yüzeyine bağlanma sürecinde sonra PA, furin ile proteolitik olarak yarılr, bu da bir 20-kDa protein fragmanının salınmasına ve bir ön gözenek oluşturmak için 63-kDa fragmanlarının heptamerizasyonuna yol açar (Molloy vd. 1992). Heptamerize PA, LF veya EF'yi bağlar ve ekotoksinin sitoplazmaya geçmesini kolaylaştırır ve hücre ölümüne neden olur (Mamedov vd. 2016). Genellikle *B. anthracis* sporlarının solunmasından veya yutulmasından kaynaklanan sistemik şarbon yüksek ölüm oranına sahiptir.

İlk şarbon hayvan aşısı 1881'de Pasteur tarafından geliştirilmiş olmasına rağmen, insan aşıları 20. yüzyılın ortalarına kadar ortaya çıkmadı. Mevcut aşılar etkili koruma sağlamasına rağmen, çeşitli problemlerden muzdariptirler: standardizasyon eksikliği, nispeten yüksek üretim masrafı, tekrarlanan dozlama gereksinimi ve ilgili geçici yan etkiler (Baillie, L. 2001).

Bazı şarbon aşısı çalışmaları elde edilen sonuçlar beklentileri karşılamakla beraber farklı problemlere alerji ve benzeri etkilere neden olmaktadır. Ek olarak, aşı sadece sınırlı koruma sağlar ve koruyucu bağışıklık elde etmek için uzun süreli bir uygulama gerektirir.

Topraktaki *B. anthracis* sporlarının yoğunluğu ortalama yıllık sıcaklık, yıllık yağış, yükseklik, bitki örtüsü miktarı, toprak nem içeriği ve toprak pH'ından etkilenir (Blackburn J.K vd. 2007). Bazı çalışmalar, *B. anthracis*'in yerli bakterilere karşı zayıf rekabet ettiğini göstermektedir, ancak şarbon sporlarının toprakta yaşayan amipler tarafından ve bitki rizosferi bağlamında çimlenme ve çoğalması rapor edilmiştir (Saile E. ve Koehler T.M. 2006).

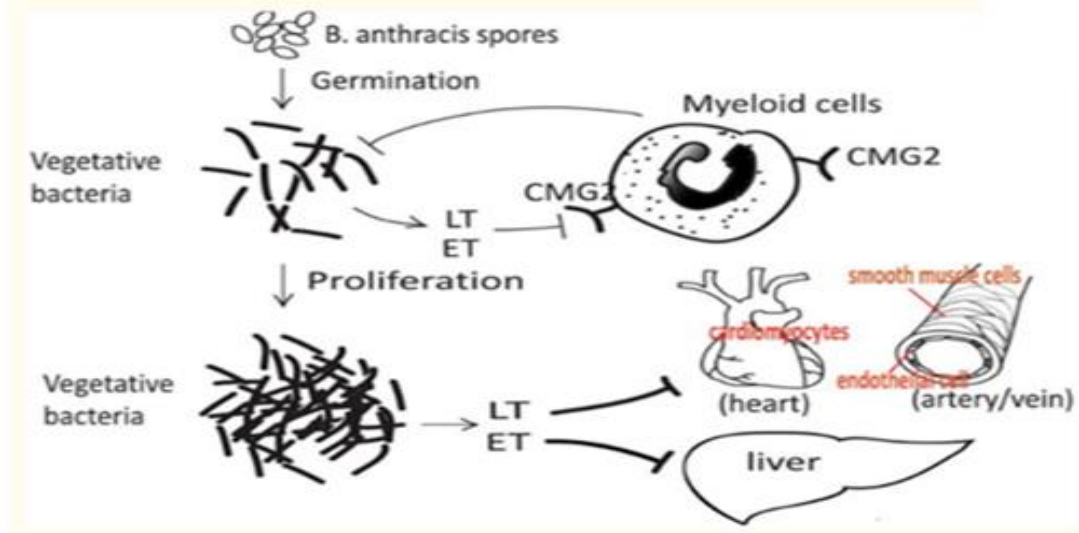
Çevresel ve iklimsel faktörlerin şarbonun ekolojisi üzerinde büyük etkisi vardır (Blackburn J.K vd. 2007). Şarbon vakalarında yağış ve sıcaklık gibi iklimsel faktörler önemli bir rol oynamaktadır (Hampson K vd. 2011).

Bununla birlikte, tek bir ekosistemde bile farklı salgınlara zamanlaması ve ilişkili ölümlerin zamanlamasındaki büyük farklılıklar nedeniyle şarbon oluşumunu ve epidemiyolojisini anlamak kolay değildir (Hugh-Jones M.E 2002).

2.2. Antraks Toksinlerinin Enfeksiyondaki Roller

Çeşitli yollardan bir konakçıya girdikten sonra, *B. anthracis* sporları yerel olarak çimlenebilir veya yerel lenf düğümlerine taşınabilir ve orada çimlenebilir.

Vejetatif bakteriler daha sonra öldürücü toksin salgırlarlar. (LT = PA + LF) ve ödem toksini (ET = PA + EF), miyeloid hücrelerin (nötrofiller ve makrofajlar gibi) miyeloid hücrelerinin temizleyici işlevlerini yok etmek için CMG2 reseptörlerine bağlanma yoluyla etki eder.



Şekil. 2.1. Antraks toksinlerinin enfeksiyondaki rolleri

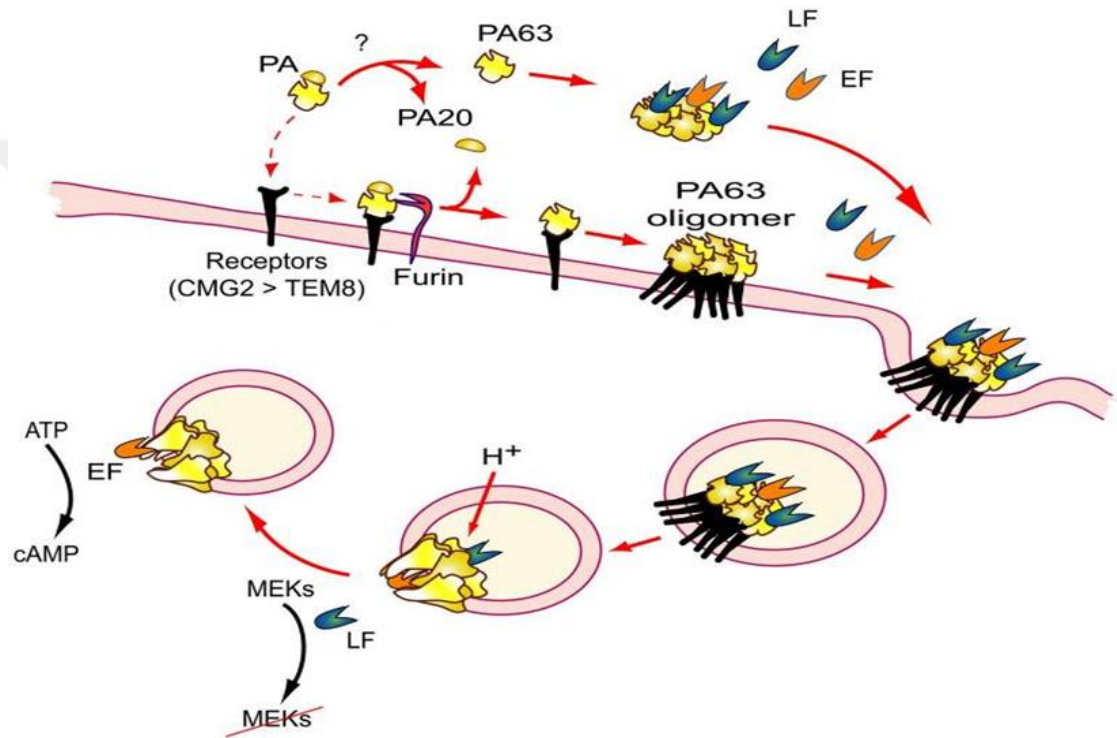
Bu, genişleyen vejetatif bakteri popülasyonunun, nötrofillerin ve makrofajların güçlü anti-bakteriyel fonksiyonlarından kaçmasına izin verir. Geç aşamalarda, sistemik bir enfeksiyonun yayılması ve oluşumunu takiben, *B. anthracis*, kanda yüksek sayılarla çoğalarak, konukçu ölümüne neden olmak için yeterli miktarda LT ve ET üretir. LT, kardiyovasküler sistemi, özellikle kardiomyositleri ve vasküler düz kas hücrelerini hedef alarak konakçı öldürücülüğe neden olurken, ET, çoğunlukla hepatositleri hedef alarak öldürücüdür (Liu vd. 2014).

2.3. *Bacillus anthracis* Antraks Patojeni

Genellikle *B. anthracis* sporlarının solunmasından veya yutulmasından kaynaklanan sistemik şarbon yüksek ölüm oranına sahiptir. *B. anthracis* sporları solunduğunda alveoler makrofajlar ve dendritik hücreler organizmayı proksimal lenf düğümlerine taşır. Spor çimlenmesini takiben vejetatif hücreler, anti-fagositik kapsülü ve antraks toksin proteinlerini, sistemik hastalığın başlaması için kritik olan virülans faktörlerini üretir (Fouet 2009; Liu 2014). İnsanlarda bakteriyemi, 1-6 günlük asemptomatik bir inkübasyon süresinden sonra başlar. Bakteriyein başlamasından sonra, hastalar 1-2 gün süren akut bir hastalık evresinden 1-5 gün önce grip benzeri semptomlar yaşayabilirler. Sonuçta ölüm, solunum yetmezliği, sepsis ve şoktan kaynaklanır (Jernigan vd. 2002; Meselson vd. 1994).

2.4. Şarbon Toksinlerin Etki Şekli

B. anthracis tarafından salgılanmasının ardından, antraks toksin bileşenleri çeşitli dokularda hızla dağılır. Hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanmanın ardından, PA, furin veya furin benzeri proteazlar ile ayrılır, C-terminal fragmanı PA63 (kesikli oklar) elde edilir, bu daha sonra kendiliğinden LF ve EF'yi bağlama yeteneğini kazandıran oligomerler oluşturur. PA ayrıca tanımlanamayan proteazlar ile dolaşımında işlenebilir ve elde edilen PA63, PA63 oligomer-reseptör kompleksini oluşturmak üzere toksin reseptörleri CMG2 ve TEM8'e bağlanmadan önce LF ve EF'i oligomerize edebilir ve bağlayabilir.



Şekil. 2.4. Şarbon toksinlerin etki şekli

CMG2 in vivo ana toksin reseptörüdür, TEM8 ise antraks toksin patogenezinde küçük bir rol oynar. Toksin kompleksi daha sonra reseptör aracılı endositoz yoluyla içselleştirilir. Endozomların içine girdikten sonra, toksin kompleksi, membran içinde PA63 oligomer kanalının oluşumunu indükleyen ve LF ve EF'in sitozol etkilerini sitotoksik etkilerini sergilemelerine izin veren asidik bir ortama rastlar (Liu vd. 2014).

2.5. Aşı Geliştirme

Aşılama 200 yıldan uzun bir süredir uygulansa da, enfeksiyöz hastalıklara karşı bir önleyici tedavi olan prensibi değişmedi. Hastalığa neden olan ajanların moleküler biyolojisini ve patolojisini ve rekombinant DNA araç ve tekniklerini anlamadaki gelişmeler, rekombinant protein de dahil olmak üzere yeni genetik olarak tasarlanmış aşılarda geliştirilmesi için yeni fırsatlar yaratmıştır. Alt birim ve DNA bazlı aşılarda. Mevcut

lisanslı aşıların birçoğu öldürülmüş veya canlı zayıflatılmış patojenlere dayanmasına rağmen, spesifik antijenlere veya toksinleri baz alan alt birim aşılar güvenlik, etkinlik ve ölçeklenebilirliklerinden dolayı tercih edilen alternatifler olmaktadır. Maya veya böcek hücresi ekspresyon sisteminde üretilen rekombinant antijen bazlı aşıların son örnekleri İnsan kullanımı için onaylanmış olan Hepatit B virüsüne ya da İnsan papilloma virüsüne (HPV) karşı aşılardır (Lowy ve Schiller, 2006). Alt birim aşı geliştirmede genomik yaklaşımların kullanımının artması, birkaç yeni aşı adayının belirlenmesini kolaylaştırmıştır. Bu da, doğru katlanmış, güvenli ve patojene özgü bağışıklık sağlayan çok çeşitli hedeflerin hızlı bir şekilde üretilmesine izin veren ifade sistemleri gerektirir.

Son biyoteknolojik gelişmeleri takiben, bitkilerin rekombinant proteinlerin üretimi için alternatif bir ekspresyon sistemi olarak kullanılmasına olan ilgiyi tetiklemiştir. Mevcut ilk bitki kaynaklı rekombinant protein eldesi insan serum albümini, transgenik tütünde üretimi 1990 yılında başarıldı (Sijmons vd. 1990). Günümüze kadar, bitkiler birçok diğer terapötik proteinleri ayrıca sitokinleri, hormonları, büyüme faktörlerini, kan bileşenlerini yine aşıları ve antikorları ifade etmekte başarıyla kullanılmaktadır. Bu, 2006 yılında Dow AgroSciences LLC (Indianapolis, IN) tarafından geliştirilen kümes hayvanlarında Newcastle hastalığına tedavi ve koruyucu ilk bitki yapımı aşının izniyle (ABD Veteriner Biyoloji Merkezi Merkezi) sonuçlandı. (Yusibov ve Mamedov 2010)

2.6. Şarbon Tedavisi ve Önlenmesi

B. anthracis birçok antibiyotiğe duyarlıdır. Bunlardan bir kısmı, siprofloksasin, doksisisiklin, eritromisin, vankomisin ve penisilin ve benzeri antibiyotiğe hassastır (Artenstein vd. 2012). Bununla birlikte, hastalığın hızlı seyri nedeniyle, yoğun antibiyotik ve destekleyici tedavilerde bile, inhalasyonel şarbon için ölüm oranları hala yüksektir. Bu muhtemelen antraks toksinlerinin devam eden etkilerinden kaynaklanmaktadır (Abrami vd. 2013). Bu nedenle, sağ kalımı artırmak için anti-toksin tedavilerine ihtiyaç duyulmaktadır.

BioThrax verilen gönüllülerin plazmasından izole edilen immün globülinin (antraks aşı absorbe, AVA), doğal olarak elde edilen inhalasyon antraksli bir hastanın sağ kalımını arttırdığı belirtilmiştir (Walsh vd. 2007). 2012 yılında FDA, inhalasyonel antraks tedavisi için PA'ya karşı öncü insan monoklonal antikoru olan Abthrax'ı (Raxibacumab) kabul edildi. (Mazumdar. 2009). Abthrax PA etki alanı 4'e bağlanır ve reseptörlerine toksin bağlanmasını engeller. Son zamanlarda, insan CMG2 ve insan IgG Fc fragmanının (CMG2-Fc) hücre dışı alanının bir füzyonunun PA nötrleştirilmesinde ve tavşanların *B. anthracis* enfeksiyonundan korunmasında etkili olduğu gösterilmiştir (Wycoff vd. 2011). CMG2-Fc'nin potansiyel bir avantajı, bireysel nötrleştirici anti-PA monoklonal antikorlarından kaçan PA varyantlarına sahip kasıtlı olarak tasarlanmış *B. anthracis* suşlarının CMG2-Fc'nin inhibisyonuna maruz kalmasıdır. LF'nin küçük moleküllü inhibitörleri de aktif gelişme altındadır (Moayeri vd. 2013). İnsanlarda hepatit

B tedavisi için kullanılan bir ATP analogu olan Adefovir dipivoksilin, in vitro ve bazı in vivo modellerde etkili bir EF inhibitörü olduğu bulundu. LF ve EF'nin bu küçük molekül inhibitörlerinin belirgin bir avantajı, hedef hücrelerin sitozolüne zaten girmiş olan toksinlere karşı etkili olmalarıdır. Aktif bağışıklama, şarbon öncesi maruz kalma önlenmesinde çok önemlidir. BioThrax bugüne kadar maruz kalma öncesi kullanım için mevcut olan tek FDA lisanslı antraks toksin bazlı aşıdır. BioThrax ayrıca maruz kalma sonrası önleyici tedavi için kullanışlıdır. Bu nedenle, *B. anthracis* sporlarına maruz kaldığı bilinen veya şüphelenilen kişilerin tedavisi için, ABD Hastalık Kontrol Merkezleri, 60 günlük oral antibiyotik tedavisinin 3 dozlu bir BioThrax aşısı ile kombinasyonunu önermektedir. BioThrax, ana bileşen olarak PA ile birlikte avirulent, kapsüllenmemiş bir *B. anthracis* suşunun kültür filtratlarından üretilen, tam olarak tanımlanmamış bir aşıdır. Daha tanımlanmış ve rekombinant PA bazlı şarbon aşıları günümüzde aktif olarak geliştirilmeye çalışılmaktadır. (Liu vd. 2014).

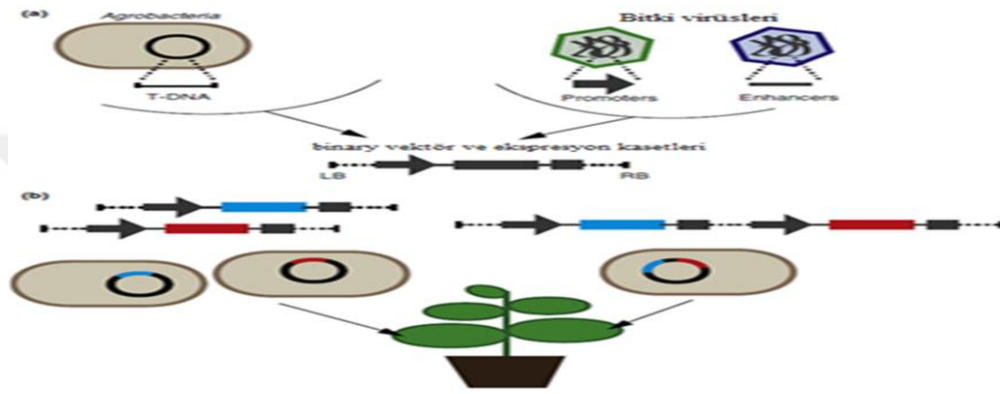
2.7. Bitkide Geçici Gen Anlatımı

Bitkide geçici gen ifadesi yönteminin kazanımlarına bakıldığında uygulamanın kolaylığı, zaman tasarrufu, ekonomik kazanç ve protein üretiminde bitkiden alınan yüksek verimdir (Kapila vd. 1997). Bitkiler de geçici protein üretiminde bitki dokularına gönderilen vektörler, rekombinant bitki viral vektörleri ya da bakteriyel binary vektörlerdir. Geçici gen ifadesinde ki en gelişmiş kullanım ise agro-infiltrasyon metodu ile bitkiye gönderilen, binary vektörlerle bitki virüslerinin bileşenlerini birleştiren “launch vektörleri” dir (Shamloul 2014).

Bitkiye gen aktarımında çoğunluk olarak binary vektörler kullanılsa da *Agrobacterium tumefaciens*'in bir DNA segmenti olan T-DNA vektörü bitki çekirdeğine aktarılmaktadır (Gelvin 2003). Bitki geçici gen ifadesi sisteminde kullanılan vektörler de kendini kopyalayabilen virüslerden yararlanılır. Bu amaçla kullanılan virüslerden bazıları: Potato X virus (PVX), Tobacco mosaic virus (TMV), Tobacco etch virus (TEV), Cowpea mosaic virus (CPMV). Ayrıca bu vektörler *Agrobacterium* ile bitkiye infiltrasyon esnasında bitki hücrelerine aktarılabilmek için T-DNA'nın içersine yerleştirilebilirler. Günümüzde rekombinant proteinlerin üretimi amacıyla farklı ekspresyon sistemleri bulunmaktadır. Bunları bitki, böcek, bakteri, maya ve memeli hücre kültürleridir. Bitki ekspresyon sistemi diğer ekspresyon sistemlerine kıyasla olumlu birçok etkili avantajları bulunmaktadır. Üretimde düşük maliyetli olmasına ek olarak ökaryotik translasyon sonrası modifikasyon mekanizmasına sahip oldukları için geçici gen ifadesi metodu kullanılır buna ek olarak istenilen protein çok kısa bir sürede üretilmektedir (Mett vd. 2008; Yusibov ve Mamedov 2010; Yusibov vd. 2016). Bu yöntem bakteri ve memeli hücre kültürlerinden bulaşacak kontaminasyon riski çok az bulunmaktadır. Memelilere ait olan patojenleri de içermemektedirler.

Heterolog proteinler bitkilere geçici olarak transforme edilerek kısa bir zaman içerisinde çoklu olarak üretilmektedirler (Shamloul vd. 2014). Tüm bu yapılan

araştırmalar ve uygulamalara rağmen bitkide üretilen proteinlerin verimleri bazı faktörler tarafından olumlu ve olumsuz olarak etkilenmektedir. Bunlardan bazıları vektörün boyutu, ifade verimliliği, gen susturulması gibi durumlardır. Agro-infiltrate edilen bitkide transkripsiyon sonrası gen susturulması (PTGS) rekonbinant proteinin verimini azımsanmayacak derecede etkiler. Transkripsiyon sonrası gen susturulmasını azaltmak için gen susturma bastırıcıları kullanılmalıdır. Birçok çalışmada kullanılan bir tanesi de, Tomato bushy stunt virus (TBSV) elde edilen p19 proteinidir (Peyret ve Lomonossoff 2015; Mardanova vd. 2017).



şekil. 2.7.1. Bitkide geçici gen anlatımının ifadesi (Mardanova vd. 2017)



şekil. 2.7.2. İnfiltre aşaması

3. MATERYAL VE METOT

N. benthamiana bitkisi, Akdeniz Üniversitesi serasından alınarak, bitki besleme odalarında, kontrollü şartlarda, belirli oranlarda ki torf ve perlit (3:1 oranında) karışımı içerisinde deneylerde kullanılmak üzere yetiştirildi. Deneylerde 6-7 haftalık gelişim sürecinde ki bitkilerden yararlanıldı.

Modifiye edilen pEAQ vektörü, p19 dahil susturma üzerine etki eden bastırıcıları ve çoklu ekspresyon kasetlerinin anlatımını sağlar. Ayrıca genleri kesim enzimi bazlı klonlama ve GATEWAY ile bitkiye doğrudan aktarabilir.

3.1. Besiyerleri

SYS (BBL) besiyeri

▪ Soyhidrolizat	10 g
▪ Yeast extract	5 g
▪ NaCl	5 g
▪ Distile su	1000 ml

Besiyeri kimyasalları hassas terazi ile ölçülüp steril bir şişede distile su içerisinde çözdürüldü. pH:7.0 olacak şekilde ayarlandı ve 121°C'de 30 dakika otoklavlandı.

LB-Broth besiyeri

▪ Distile su	1000 ml
▪ LB-Broth	25 g

Besiyeri kimyasalları hassas terazi ile ölçülüp steril bir şişede distile su içerisinde çözdürüldü. pH:7.0 olacak şekilde ayarlandı ve 121°C'de 30 dakika otoklavlanarak kullanılabilir hale getirildi.

MMA besiyeri

▪ Distile su	1000 ml
▪ MgCl ₂	10 ml
▪ MES	1,952 g

Besiyeri kimyasalları hassas terazi ile ölçülüp steril bir şişede distile su içerisinde çözdürüldü. pH: 5.8'e olacak şekilde ayarlandı ve 121 °C'de 30 dakika otoklavlandı. Steril hale getirildi. 1L MMA besiyerine kullanımdan önce 150 µl Asetosyringene ilave edildi.

SOC besiyeri

▪ Distile su	1000 ml
--------------	---------

▪ MgCl ₂ 1M	10 ml
▪ MgSO ₄	10 ml
▪ Bactotripton	20 g
▪ Bacto yeast extract	5 g
▪ NaCl 5M	2 ml
▪ KCl 1M	2,5 ml

Besiyeri kimyasalları hassas terazi ile ölçölüp steril bir şişede distile su içerisinde çözdürüldü ve 121 °C’de 30 dakika otoklavlanarak steril hale getirildi. besiyeri otoklavdan alınarak sıcaklığının 50°C’ye kadar düşürüldü ve steril edilen kabin içinde 20 ml 1 M glukoz ilave edildi.

Asetosyringene (AS, 100 mM) stok çözeltisi

▪ Etanol (% 95)	12 ml
▪ Distile su	8 ml
▪ Asetosyringene	0,3924 g

3.2. Çözeltiler ve Tamponlar

Agaroz Jel Elektroforezi

EDTA (0,5 M, Ph: 8.0, 100 ml)

▪ EDTA	14,612 g
▪ Distile su	100 ml

Hassas terazide tartılan 40 g sıvı gliserol ile 40 ml distile su (1:1 oranında) homojen şekilde çözdürüldü. Karışım 121 °C’de 30 dakika otoklavlandı.

TAE Tamponu (50X)

▪ Distile su	1000 ml
▪ Tris-base	242 g
▪ EDTA (0.5 M, pH 8.0)	100 ml
▪ Glasiyal asetik asit	57.1 ml

% 50 Gliserol solüsyonu

▪ Gliserol	50 g
▪ Distile su	50 ml

hassas terazi üzerinde 50 g sıvı gliserol tartıldı ve 50 ml distile su ile karıştırıldı. karışım 121 °C’de 30 dakika otoklavlanarak steril edildi.

0.1M CaCl₂ / % 15 gliserol

▪ Distile su	6 ml
▪ 1 M CaCl ₂	1 ml
▪ % 50 gliserol	3 ml

SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE)**Örnek yükleme tamponu (5X, Laemli Buffer)**

▪ Glycerol	11,9 ml
▪ Tris-HCl (1 M)	9,375 ml
▪ Bromofenol mavi stok çözeltisi (100 mg/20 ml)	660 µl
▪ SDS	3,33 g
▪ 2-merkaptoetanol (%25)	7,5 ml

pH, HCL ile 6,8'e indirildi ve ddH₂O ile hacim 40 ml'e getirildi. Uzun süreli kullanım için -20 °C'de dolapta bekletildi.

Tris HCl (0.5 M, pH: 6.8)

▪ Tris-base	30 g
▪ Distile su	250 ml

pH ayarlaması HCl ile 6.8'e ayarlandı ve distile su ile 500 ml'e tamamlandı.

Tris HCl (1.5 M, pH: 8.8)

▪ Distile su	250 ml
▪ Tris-base	92,5 g

pH, ayarlaması HCl ile 8.8'e ayarlandı ve distile su ile 500 ml'e tamamlandı.

Yürütme Tamponu (1X)

▪ Distile su	990 ml
▪ Glycine	14,3 g
▪ Tris-base	3,03 g
▪ SDS (% 10)	10 ml

Jel boyama çözeltisi (Coomassie staining)

▪ Coomassie Blue R-250	1 g
▪ Distile su	400 ml
▪ Glacial acetic acid	100 ml
▪ Metanol	500 ml

▪ **Boya uzaklaştırma çözeltisi (Destaining)**

▪ Distile su	700 ml
▪ Methanol	200 ml
▪ Glacial acetic acid	100 ml

SDS Solüsyonu (%10)

- Hassas terazide tartılan 10 g SDS, 90 ml ddH₂O içerisinde çözündürüldü.

APS Solüsyonu (%10)

- Hassas terazide tartılan 60 mg APS, 600 µl içerisinde çözündürüldü (Her kullanım için taze hazırlandı).

Jellerin hazırlanması 4 adet jel için (% 10)

	Stacking jel	Resolving jel
▪ Distile su	7,95 ml	9,7 ml
▪ % 40 Akrilamit-Biss solüsyon	1,25 ml	5 ml
▪ 1,5 M Tris-HCl	-	5 ml
▪ 0,5 M Tris-HCl	3,15 ml	-
▪ % 10 SDS	125 µl	200 µl
▪ % 10 APS	62,5 µl	100 µl
▪ TEMED	12,5 µl	10 µl

Stacking jelin hava ile temas eden üst fazını oksijenle etkileşime girmemesi ve yüzeyin pürüzsüz donması için pipet aracılığıyla üzerine 500 µl izopropanol ilave edildi ve oda sıcaklığında donmaya bırakıldı.

Western Blotting

Transfer Tamponu hazırlama (1X)

▪ Distile su	1000 ml
▪ Tris-base	5,8 g
▪ Glisin	2,93 g
▪ SDS (%10)	370 µl

Kimyasalları hassas terazi ile ölçülüp steril bir şişede distile su içerisinde çözündürüldü

TBS (5X)

▪ Distile su	1000 ml
▪ NaCl	42,88 g

- Tris-base 12,115 g

Hassas terazide tartılan kimyasallar tartılarak ddH₂O içerisinde çözdürüldü ve pH ayarlanması 7,5 olarak yapıldı.

I-Block

- 1 g I-block hassas terazide ölçülerek 100 ml 1X TBS'de yaklaşık 45 dk. manyetik karıştırıcıda çözdürüldü.

Birincil antikor (primary antibody, 1:1000)

- 10 µl birincil antikor, 10 ml I-block'da hazırlandı.

İkincil antikor (secondary antibody, 1:2500)

- 2,5 µl ikincil antikor, 10 ml I-block'da hazırlandı.

1X PBS hazır tablet çözelti

- Hazır 1 adet tablet PBS (10 mM fosfat buffer, 2 mM KCl, 137 mM NaCl) 100 ml ddH₂O'da çözündürüldü.

3.3. *A. tumefaciens* Hücrelerine Transformasyon ve *N. benthamiana* Bitkisine İnfiltrasyon

E. coli hücrelerinde çoğaltılan ve izolasyonu yapılan genleri içeren plazmiti istenen proteini üretmesi için *A. tumefaciens* hücrelerine elektroporasyon metodu kullanılarak aktarıldı. Önceden hazırlanarak -80°C'de muhafaza edilen 100 µl'lik *A. tumefaciens* AGL1psoup kompetan hücrelerine 1 µl plazmid ilave edilerek karıştırıldı. Karışım pipet yardımıyla elektroporasyon kuvvetinin tam merkezine aktarıldı ve elektrik şoku uygulandı. Elektroporasyon sonrası hücrelerin üzerine 1ml SOC besiyeri eklenerek pipetaj yapıldı ve örnekler mikro santrifüj tüpe alındı. Hücreler inkübasyon için 28 °C'lik çalkalamalı inkübatörde 2 saat 225 rpm'de bekletildi. İnkübasyon süresi dolan örnekler 2000 xg 'de 3 dk. santrifüjlendi. Daha sonra 50 µg/ml kanamisin içeren LB plaklara öze ile yayma yapıldı ve 28°C'lik inkübatörde üç gece bekletildi. İnkübasyon süresi bitiminde oluşan koloniler seçilerek 50 µg/ml kanamisin bulunan BBL sıvı besiyerine ekildi. Örnekler 28 °C'lik çalkalamalı inkübatörde yaklaşık bir gece gelişim için bekletildi. Bekleme süresi dolan örneklerin spektrofotometre cihazı ile optik yoğunluğu ölçüldü (O.D. $\geq$ 1) ve değerleri kayıt edildi.

- MQ₂ için optik yoğunluğu: 2,62

- dPA83-E için optik yoğunluğu: 2,75

Örneklerin belirli bir miktarı stok için % 90'lık gliserol çözeltisi ile 1:1 oranında olacak şekilde eklendi mikro santrifüj tüplerine 1ml civarında paylaştırılarak -80°C'de dolapta muhafaza edildi. Örneklerin geri kalan kısmı +4°C 5000 xg 'de 5 dk. santrifüjlendi. Hücreler pellet kısmında olduğu için süpernatant atıldı. Pellet Asetosyringene içeren MMA besiyerinde optik yoğunluğu:1 olacak şekilde çözündürüldü. Son olarak hücreler manyetik karıştırıcı üzerinde 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından MQ₂ ve dPA83-E genini içeren hücre solüsyonu optik yoğunluğu:1 olacak şekilde ayarlandı ve glikosilasyonu engelleyecek olan Endo H geni içeren hücre solüsyonu ile çeşitli oranlarda karıştırılarak bitkiye 9:1 birlikte enjekte edildi. Enjektör yardımıyla bitkiye infiltre edildi.

3.4. Bitkiden Protein Ekstraksiyonu

Enjektör ile bitkinin yapraklarına infiltre edilen örnekler 5 gün sonra (dpi, day post infiltration) toplandı. İnfiltre edilen yaprakları üst üste getirilerek 0,75 g olacak şekilde parça alındı ve üzerine yaprak ağırlığının üç katı 1X PBS tamponu ilave edilerek havan içerisinde havaneli kullanılarak ezildi. Pipet ile yaklaşık olarak 1ml homojenattan alınıp 1,5 ml'lik mikro santrifüj tüpüne aktarıldı. Daha sonra 20000 xg 'de 5 dk. santrifüjlendi. süpernatanttan analizler için 40 µl örnek alındı ve üzerine örnek yükleme tamponundan 10 µl ilave edildi. Geriye kalan süpernatant ayrı bir tüpe alınarak -20°C'de muhafaza edildi.

3.5. SDS-PAGE ve Western Blot

SDS-PAGE yapmak için jellerin hazırlanması kısmında anlatıldığı gibi % 10'luk bir jel hazırlandı. Numuneler jele yüklenmeden ilk olarak 100 °C'de 5 dk. Su banyosunda bekletildi. Bekletilen numuneler mini bir santrifüj yapıldı. Ortalama 10 sn. ve daha sonra 100 V'da 13-15 dk. hemen ardından 200 V'da 45 dk. olacak şekilde bir programda yürütüldü. Yürütme aşaması tamamlandıktan hemen sonra stacking jelin üst kısmı uzaklaştırıldı. Amaç jelde gereksiz bantların oluşmasını önlemek için kesilip atıldı. jel steril bir kaba alındı ve yürütme tamponuyla etkileşim olmaması için karıştırıcıda yaklaşık 5 dk ddH₂O ile bekletildi. Bekletilme aşamasından sonra ddH₂O dökülerek jelin üzeri kaplayacak biçimde jel boyama çözeltisi ilave edildi ve boyamanın gerçekleşmesi için yaklaşık 45-55 dk (Bazen boyanın tazeliğine göre bu süre değişebilir.) karıştırıcı üzerinde bekletildi. Boyama aşamasında hemen sonra jelin boyadan temizlenmesi için 3 x (15-20) dk'luk aralıklarla jel boya uzaklaştırma solüsyonu ile yıkaması (bekletme) yapıldı. Jelindeki bantlar gözle görünür hale geldiği zaman görüntüsü alındı. Ne kadar steril koşullarda çalışır ve SDS-PAGE aşamaları gerçekleşirse o kadar sağlıklı bantlar alma olasılığı artmaktadır.

Western blot yapmak için jellerin hazırlanması kısmında anlatıldığı gibi % 10'luk bir jel hazırlandı. Numuneler jele yüklenmeden ilk olarak 100 °C'de 5 dk. Su banyosunda bekletildi. Bekletilen numuneler mini bir santrifüj yapıldı. Ortalama 10 sn. ve daha sonra

100 V'da 13-15 dk. hemen ardından 200 V'da 45 dk. olacak şekilde bir programda yürütüldü. Yürütme aşaması tamamlandıktan hemen sonra stacking jelin üst kısmı uzaklaştırıldı. Amaç membranda gereksiz bantların oluşmasını önlemek için kesilip atıldı. jel steril bir kaba alındı.

Jelde yürütülen protein bantlarını membrana aktarabilmek için jel sandwich modeli şeklinde; membran ve jel yüzeyleri birbirine temas edecek şekilde yerleştirildi. Her iki taraf yani dış kısımlarına filtre kâğıtları gelecek şekilde yerleştirildi. Tekrardan dış yüzeylerine sünger iki tarafada yerleştirildi ve western blot kaseti tanka yerleştirilerek transfer tamponu ilave edildi (Kullanılan tanktaki belli bölgeye kadar transfer tamponla dolduruldu). Bu aşamada proteinler ısıdan etkilenmemesi için buz torbası veya paketi kullanıldı. Daha sonra 100 V da 1 saat yürütüldü. Yürütme aşamasından sonra membran karıştırıcı da temiz bir kap içerisinde % 0,5'lik I-Block solüsyonunda yaklaşık 1 saat veya daha fazla bekletilebilir. İstenmeyen bantlar engellenmiş olacaktır. Bloklama işlemi aşamasından sonra membrana 1 saat birincil antikor da bekletildi. (Histidin etiketli proteinlerin analizi için anti-6XHis monoklonal antikor Cat. no. 652502). Bu aşamadan hemen sonra membrandaki antikor gereksiz olan proteine bağlanmayan kısımları uzaklaştırmak için 3 X 5 dk. olacak şekilde I-Block solüsyonu içinde bekletildi (yıkama). Yıkamalar yapıldıktan hemen sonra membranı 1 saat süreyle ikincil antikorda bekletildi. Bu uygulamadan hemen sonra membran yine 3 X 5 dk. tekrarlanarak I-Block içinde ve sonra membran 5 dk. 1X TBS da bekletildi. en son aşama olarak membranın üzerine görüntüleme ışımı oluşabilmesi için SuperSignal West Pico Stable Peroxide (2,5 ml) ve Luminol/ Enhancer (2,5 ml) solüsyonları (SuperSignal West Pico, Thermo Fisher Scientific Grand Island, NY) eklenerek 5 dk bekletildi. Görüntü aşamasında Membran GeneGnome XRQ Chemiluminescence görüntüleme sistemi (Syngene Corp, ABD) kullanılmıştır.

Yapılan çalışmada kullanılan yöntemlerde ve bir çok aşama dikkatli ve steril olarak gerçekleşmek zorundadır. Eğer membran uzun süre üstündeki sıvılardan mahrum bırakılırsa membran bir sonraki aşamada sağlıklı sonuç vermeyebilir.

3.6. Yaprakların Kurutulması

İnfiltrasyon sonrası 5 dpi toplanan dPA83-E örneklerinin western blot analizi sonucunda oda sıcaklığında yaklaşık 18-22 °C kurutulmaya bırakılmıştır. Ortalama değerleri alınarak kurutma sonucunda yaklaşık yaş ağırlığın % 8-13 arasında kaldığı tespit edilmiştir. Ortalama ağırlık kaybının % 80 i kurutulmaya bırakıldıktan 96 saat içerisinde kaybetmeye başlamıştır. Yaş yapraklardan belli dönem aralıklarında gramajları alınan örnekler % 0,05 triton X-100 ile ezilerek nem ve aktivite değerleri western blot değerlendirilmiştir. Deneyin doğruluğu ve yöntemlerin faydalığı için belli gramajlarda farklı zamanda kurutulmuş infiltrat yapraklarda değerlendirilmiştir. Kurutulan örnekler yaklaşık olarak 21 günde tamamen toz haline getirilmiştir. Bu işlem steril bir havan ve havaneli aracılığıyla yapılmıştır. Toz haline getirilen örnekler homojen bir dağılım

sergileyene kadar işlem devam etmiştir. Toz haldeki örnekler tartılıp ağırlıkları kayıt altına alınmıştır. Temiz bir 50 ml steril bir falkona koyularak oda sıcaklığın da muhafaza edilmiştir bu işlemlerin tamamı hem dPA83-E hem de pGR-MQ₂ için ayrı ayrı tekrarlanmıştır. Toz haldeki örnekler belli aralıklarla western blot analizleri yapılarak aktiflikleri kontrol edilmiştir. Bu işlem sırasında TRİTON X-100 ezme ve 1X PBS ile çözündürme işlemleri yapılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Bu analizler ortamın sıcaklık etkisi, çözücü yoğunluğu, ezme ve çözündürme farklı kimyalarla etkileşim, suyla çözünme değerlerinin de hesaplanması ile değerlendirilmiştir.

Not: Stabilizasyon çalışmaların tamamı yapraklar kurutulduktan ve toz haline getirildikten sonra yapılmıştır. dPA83-E 07.01.2019 tarihli ve pGR-MQ₂, 07.01.19 tarihli tozlardan ve şekil. 4.6 daki çalışmada kullanılan toz haldeki örnek 07.01.2019 dPA83-E'dir. Sadece 4.1'deki deneyde yaş yaprak kullanılmıştır. Diğer deneylerde toz halde örnekler kullanılmıştır.

3.7. Stabilizasyon Değerlendirmesi

dPA83-E ve pgr-MQ₂, eppendorf tüplerine alikotlandı ve 37 ° C'de veya oda sıcaklığında 22-26 ° C'de belli saat inkübe edildi. İnkübasyondan hemen öncesinde ve sonrasında numuneler SDS yükleme boyası ile karıştırıldı. Numuneler, SDS-PAGE veya western blot ile analize kadar -20 ° C'de dondurulmuş olarak saklandı.

Örneklerin hazırlanması; Daha önceden kurutulmuş 5,65 gram 07.01.2019 tarihli dPA83-E örnekten steril bir eppendorfa 0,05 mg tartılıp üzerine 650 µl 1X PBS eklenip yaklaşık 3-5 dakika vorteks yapıldı, daha sonra +4 derecede yaklaşık 30 dakika bekletildi. Tekrardan birkaç dakika vorteks yapıldı. Örnek 10 000 xg de 7.30 dakika 4 ° C santrifüj yapıldı. Üstteki süpernatant kısmı yeni bir tüpe alındı ve deney için örnek hazırlandı.

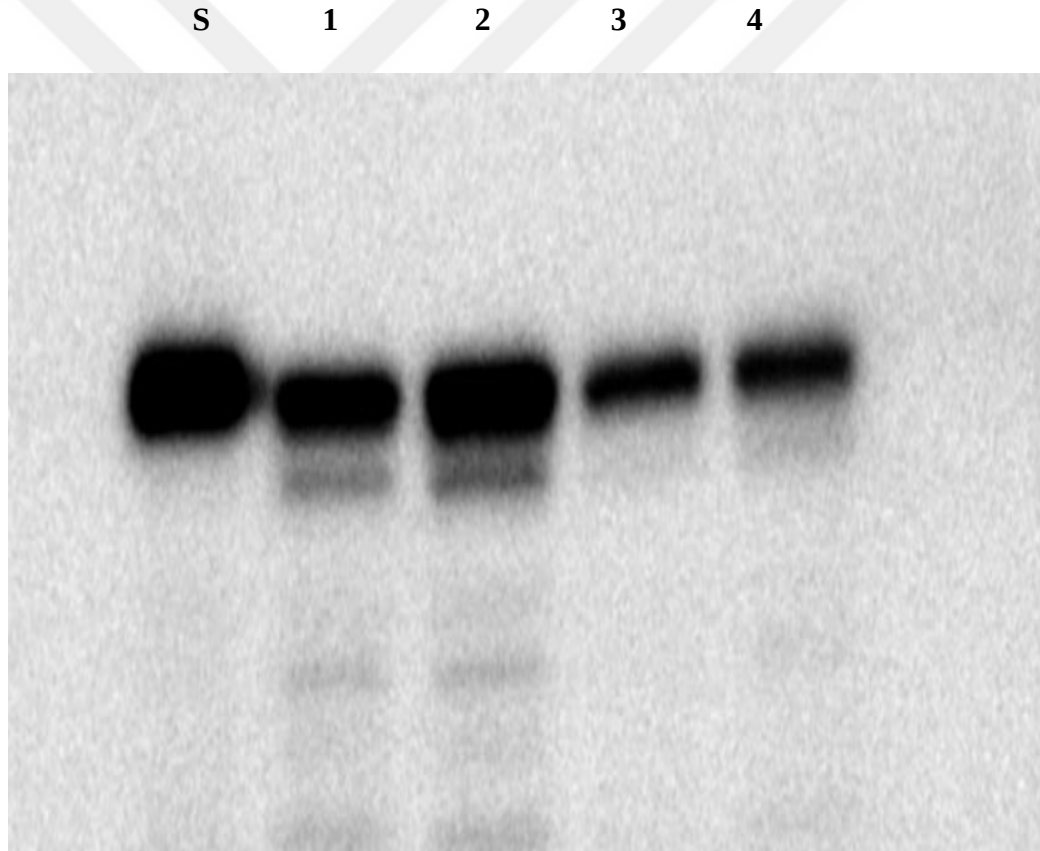
4. TARTIŞMA VE BULGULAR

4.1. *N. benthamiana* Bitkisinde pGR-MQ₂ ve dPA83-E Proteini Üretimi

Glikosile edilmiş pp-PA83'ün, in vivo deglikozile edilmiş pp-PA83 proteininin (pp-dPA83) ve mutasyona uğramış PA83 (PA83M-D) versiyonları, protein üretimini sağlamak amacıyla materyal-metot kısmında anlatıldığı gibi manuel olarak enjektör yardımıyla bitkiye infiltre edildi.

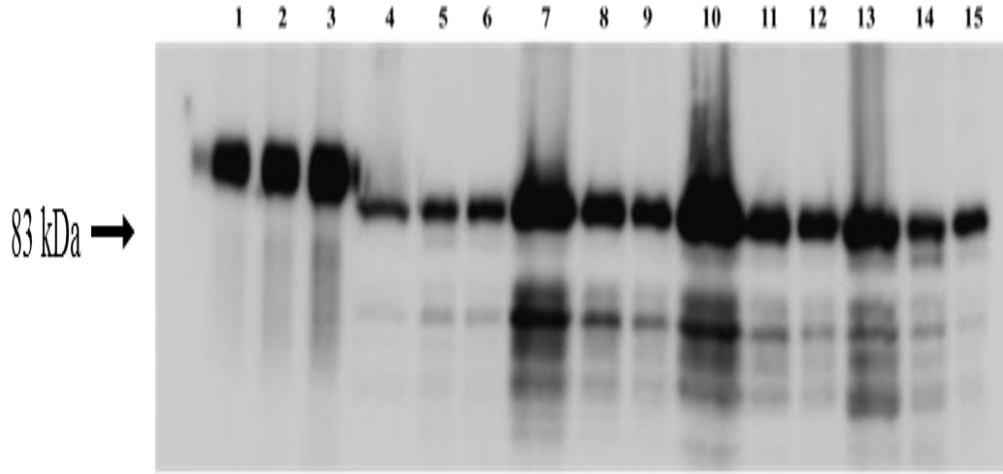
İnfiltrate edilmiş olan bitkiler, kontrollü şartlarda bitki büyütme odasında gözetim altında büyütüldü.

Bitki yaprakları infiltrasyondan beş gün sonra toplanarak ezme yöntemiyle ekstraksiyon yapıldı. Oluşan numunelerden protein üretimi başarılı olup olmadığını gözlemlemek için western blot yapılmıştır.



Şekil. 4.1. pGR MQ₂ ve PA83-E *N. benthamiana* ekstraksiyonu western blot görüntüsü. MQ₂ ve pGR dPA83-E Bitki yaprakları infiltrasyondan beş gün sonra toplanarak ekstrakte edildi Western blot görüntüsü. S. Standart 1,2. dPA83-E 3,4. pGR MQ₂ Bitki yaprakları infiltrasyondan beş gün sonra toplanarak ekstrakte edildi. Örneklerde protein üretiminin olup olmadığını gözlemlemek amacıyla western blot analizi yapıldı. İnfiltrasyon sonrası yapılan western blot çalışmasında elde edilen bantlar kullanılabilir düzeyde proteine sahip olduğu gözlemlenmiştir.

4.2. Kurutulmuş dPA83-E ve pGR-MQ₂ Örneklerinin Western Blot Görüntüsü



Şekil. 4.2. Kurutulmuş dPA83-E ve pGR-MQ₂ örneklerinin western blot görüntüsü

1: APA standart 25 ng. **2:** APA standart 50 ng. **3:** APA standart 100 ng. **4:** dPA83-E non süpernatant dilute **5:** dPA83-E süpernatant 1/5 1X SDS **6:** dPA83-E süpernatant 1/10 1X SDS **7:** dPA83-E pellet non-dilute 5X SDS **8:** dPA83-E pellet 1/5 1X SDS **9:** dPA83-E pellet 1/10 1X SDS **10:** PGR-MQ₂ pellet non-dilute 5X SDS **11:** PGR-MQ₂ pellet 1/5 1X SDS **12:** PGR-MQ₂ pellet 1/10 1X SDS **13:** PGR-MQ₂ süpernatant non-dilute 5X SDS **14:** PGR-MQ₂ süpernatant 1/5 1X SDS. **15:** PGR-MQ₂ süpernatant 1/10 1X SDS.

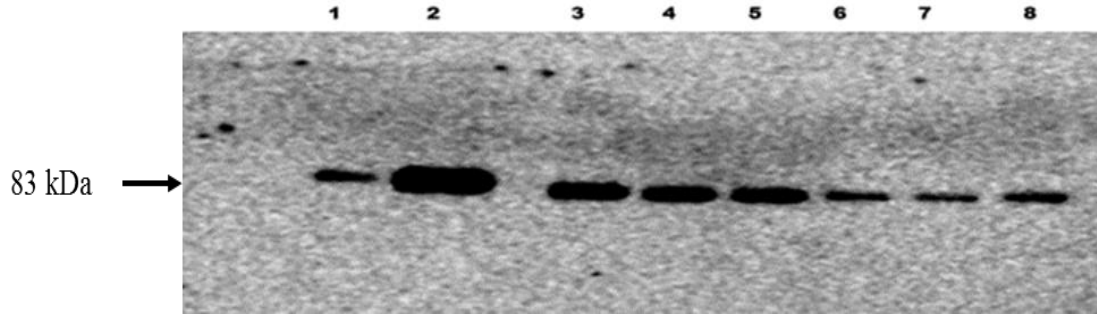
Örneklerin hazırlanması; Kurutulmuş 0,100 mg. dPA83-E ve pGR-MQ₂ numuneleri kontrol amaçlı TRİTON X-100 ile ezilerek 13 000 xg de 5 dakika +4 °C santrifüj edildi. Sonra Süpernatant yeni bir tüpe alınarak pellet kısmı 1,5X SDS ile 5 dakika 100 °C kaynatıldı. Sonra 10 000 xg de 5 dakika santrifüj yapıldı. süpernatant kısmı (pelletdeki kalıntıyı ng olarak hesaplamak için) western blot için kuyucuklara belli seyretmeler yapılarak 10 µl yüklendi.

İnfiltrasyon sonrası yapılan western blot çalışmasında elde edilen bantlar kullanılabilir düzeyde protein ekspresyonunun olduğu gözlemlenmiş ve bu yaprakların materyal ve metotta anlatıldığı gibi kurutulmuş yapraklardaki protein seviyesi beklenti doğrultusunda gerçekleşmiştir.

4.3. Farklı Sıcaklık Değerlerinin Kurutulmuş dPA83-E Üzerindeki Etkisi

PA83'ün varyantının kararlılık değerlendirmesi glikosile edilmiş pp-PA83'ün, in vivo deglikozile edilmiş pp-PA83 proteininin (pp-dPA83) versiyonunun 37 ° C'de ve oda sıcaklığında inkübasyondan sonra yapılan western blot uygulamasında önceki yıllardaki çalışmalarla yakın sonuçlar alındı.

Western blot ile yapılan analizi pp-dPA83-E sadece 37 ° C'de yaklaşık olarak 3 kat oranında stabilite azalma gösterdi ama oda sıcaklığında inkübasyondan sonra stabil görünüyordu.



Şekil. 4.3. Farklı sıcaklık değerlerinin kurutulmuş dPA83-E üzerindeki etkisi:
 1: dPA83-E STANDART 10 ng, 2: dPA83-E STANDART 100 ng, 3: Oda sıcaklığı 30 dakika 4: Oda sıcaklığı 1 saat 5: Oda sıcaklığı 2 saat dPA83-E 6: 37 °C dPA83-E 30 dakika 7: 37 °C 1 saat, dPA83-E 8: 37 °C 2 saat dPA83-E

Örneklerin hazırlanması; Daha önceden kurutulmuş 5,65 gram 07.01.2019 tarihli dPA83-E örnekten steril bir eppendorfa 0,05 mg tartılıp üzerine 650 µl 1X PBS eklenip yaklaşık 3-5 dakika vorteks yapıldı, daha sonra +4 derecede yaklaşık 30 dakika bekletildi. Tekrardan birkaç dakika vorteks yapıldı. Örnek 10 000 xg de 7.30 dakika 4 °C santrifüj yapıldı. Üstteki süpernatant kısmı yeni bir tüpe alındı ve deney için örnek hazırlandı. Numune üç farklı eppendorf tüp içerisine 50 µl konuldu hem oda sıcaklığı yaklaşık 18-22 °C hem de 37 °C için toplam altı adet numune hazırlanmıştır. Numuneler 30 dakika, 1 saat, 2 saat, olmak üzere her iki sıcaklık da denenmiştir.

Çizelge. 1. Farklı sıcaklık değerlerinin kurutulmuş dPA83-E üzerindeki etkisi

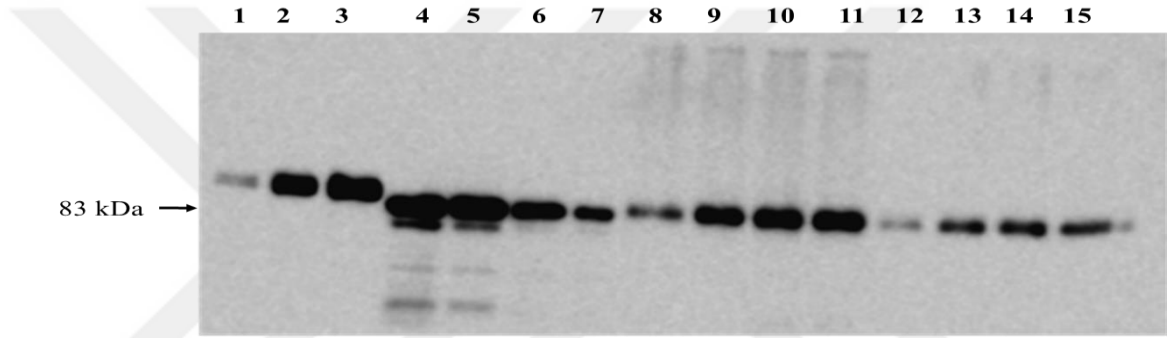
	piksel *1000	ng
2	31,13	100,00
3	15,42	49,54
4	13,10	42,09
5	12,58	40,42
6	4,18	13,42
7	1,69	5,42
8	5,05	16,23

ImageJ ij152-win-java8 programı kullanılarak hesaplamalar yapıldı.

Çalışmada elde edilen sonuçlarda sıcaklık etkisinin stabilizasyon değerlerinde negatif yönde etkilediği dPA83-E proteini için anlaşılmıştır.

4.4. Kurutulmuş dPA83-E'nin ve Çözdürme Sonrası Oda Sıcaklığında Stabilizasyon Değerlendirilmesi

Örneklerin hazırlanması; Protein standartları olarak APA – E kullanıldı. Kontrol amaçlı dPA83-E ve pGR-MQ2 kullanıldı. Bitkide üretilen kurutulmuş dPA83-E numunesi 4 farklı steril eppendorfa 0,100 mg tartılarak üzerine 1 ml 1X PBS eklendi 30 dakika, 1 saat, 2 saat, 5 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı (11. 10. 9. 8. Numaralı örnekler). 07.01 2019 tarihli kurutulmuş dPA83-E numuneden 0,100 mg tartılarak üzerine 1 ml 1X PBS eklendi ve oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Sonra 13 000 xg de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant kısmında 4 farklı steril eppendorfa 50 µl alınarak 1 saat, 2 saat, 3 saat ve 5 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı (15. 14. 13. 12. Numaralı örnekler). Bütün numunelerden 40 µl alınarak üzerine 10 µl 5X SDS eklenip 100 °C 5 dakika kaynatılarak western blot için 10 µl kuyucuklara yüklendi.



Şekil. 4.4. Kurutulmuş dPA83-E numunesinin çözündürme ve çözündürme sonrası oda sıcaklığında stabilizasyon değerlendirilmesi:

1: Standart APA 25 ng 2: Standart APA 50 ng 3: Standart APA 100 ng 4: İnfiltrasyon kontrol dPA83-E 5: İnfiltrasyon kontrol dPA83-E 6: İnfiltrasyon kontrol MQ₂ 7: İnfiltrasyon kontrol MQ₂ 8: dPA83-E 100 mg + 1 ml 1X PBS 5 saat 9: dPA83-E 100 mg + 1 ml 1X PBS 2 saat 10: dPA83-E 100 mg + 1ml 1X PBS 1 saat 11: dPA83-E 100 mg + 1ml 1X PBS 30 dakika 12: dPA83-E 50 µl 5 saat 13: dPA83-E 50 µl 3 saat 14: dPA83-E 50 µl 2 saat 15: dPA83-E 50 µl 1 saat

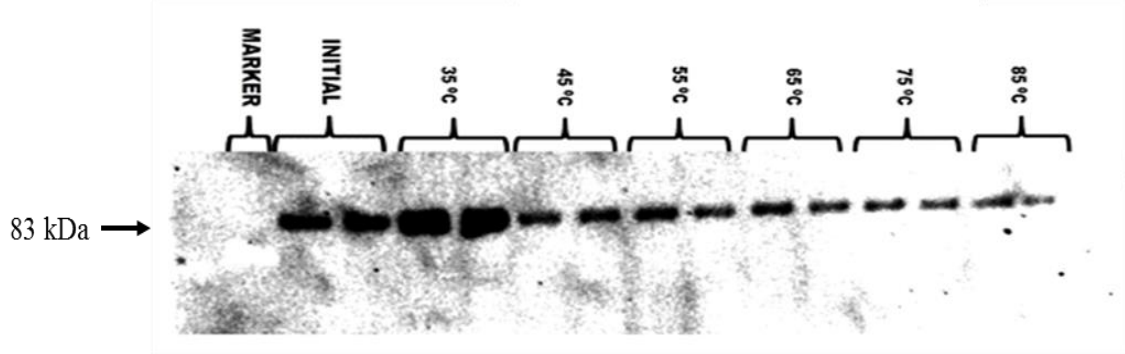
Yapılan bu çalışma sonucunda kurutulmuş örneklerin stabilizasyon sonuçlarında normal saflaştırma koşullarında olduğu gibi stabilizasyon değerleri istenilen yönde oluşmakta olup ayrıca süzöntü kısmın süpernatant kısmı da aynı sonuçlara paralellik göstermektedir.

Sonuçlar değerlendirilirken zamana bağlı olarak toplam nano gram cinsinden kayıplar benzer sonuçlara işaret etmektedir. Kurutulmuş *N. benthamiana* yapraklarındaki dPA83-E ile saf proteinle yapılan stabilizasyon sonuçlarıyla kıyaslamalarda olumlu ve stabil sonuçlar vermektedir.

Bu çalışmada belirtildiği gibi sonuçlar Mamedov vd. 'nin 2016. yılındaki yapmış olduğu çalışma referans alınmıştır.

4.5. Termal-Stabilizasyon Değerlendirme

15 dakika boyunca farklı sıcaklıklarda deglikozile proteinler inkübe edildi ve daha sonra proteinler western blot yapıldı. Bekleme süresi aralarında örnekler -20 de bekletildi.



Şekil. 4.5. Termal- Stabilizasyon değerlendirmeleri dPA83-E in vivo deglikozile proteinin 07.01.2019 tarihli kurutulmuş yaprak numunelerinde başlangıç, 35 °C, 45 °C, 55 °C, 65 °C, 75 °C, 85 °C'de termal-stabilizasyon çalışmasının Western Blot görüntüsü.

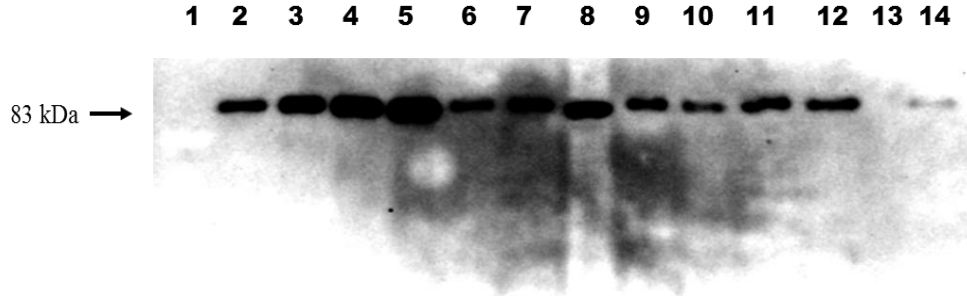
Çizelge. 2. dPA83-E Termal-Stabilizasyon

° C	ng
Başlangıç	15,7
Başlangıç	15,67
35	23,97
35	22,95
45	7,26
45	7,89
55	8,71
55	4,92
65	6,62
65	3,51
75	3,14
75	2,15
85	3,07
85	0,33

Bu çalışmada kullanılan örnek miktarı 150 µl olup üzerine 60 µl 1X PBS eklenmiştir. Toplam hacim 210 µl olup 7 farklı steril eppendorfa 30 µl ayrılmış ve yukarda belirtilen sıcaklıklara etiketlendirildi ve termal stabilizasyon çalışması yapılmıştır. Örnekler ikişer tekrar yüklenmiştir.

Örnekler yaklaşık olarak 55-65 derece arasında yarılanma ömrü göstermiştir.

4.6. İki Farklı Tarihte Kurutulmuş dPA83-E Yapraklarda Farklı Çözücü Ortamlarda ve Ezme Yönteminde Sonuçların Değerlendirilmesi



Şekil. 4.6. İki farklı tarihte kurutulmuş dPA83-E yapraklarda farklı çözücü ortamlarda ve ezme yönteminde sonuçların değerlendirilmesi;

1: Marker, 2: dPA83-E STANDART 10 ng, 3: dPA83-E STANDART 25 ng 4: dPA83-E STANDART 50 ng, 5: dPA83-E STANDART 100 ng 6: Triton-X100 07.01.2019 dPA83-E, 7: Triton-X100 19.06.2019 dPA83-E, 8: Kontrol, 9: ddH₂O 07.01.2019 dPA83-E, 10: ddH₂O 19.06.2019 dPA83-E 11: 1X PBS 07.01.2019 dPA83-E, 12: 1X PBS 19.06.2019 dPA83-E, 13: Boş, 14: Kontrol

Örneklerin hazırlanması: 07.01.2019 dPA83-E, ve 19.06.2019 dPA83-E, numunelerinden 0,05 mg tartıldı havan da 650 µl 0,05 % 0,05 triton X100 ile ezildi oluşan numune steril bir eppendorfa alındı bu işlem her iki örnek içinde ayrı ayrı yapılmıştır. Daha sonra numune 30 dakika buz üzerinde bekletildi ve sonra 10 000 xg de 7.30 dakika +4 °C’de santrifüj edildi. Süpernatant kısmı alınıp deneyde kullanılmak üzere 20 µl 1X PBS üzerine 20 µl numune üzerine 10 µl 5X SDS laemmlı buffer eklenip 100 °C 5 dakika kaynatıldı ve western kuyucuklarına 10 µl yüklendi. Daha önceden kurutulmuş dPA83-E örnekten steril bir eppendorfa 0,05 mg tartılıp üzerine 650 µl 1X PBS eklenip yaklaşık 3-5 dakika vorteks yapıldı, daha sonra +4 derecede yaklaşık 30 dakika bekletildi. Tekrardan birkaç dakika vorteks yapıldı. Örnek 10 000xg de 7.30 dakika +4 °C ’de santrifüj yapıldı. Üstteki süpernatant kısmı yeni bir tüpe alındı. Daha önceden kurutulmuş dPA83-E örnekten steril bir eppendorfa 0,05 mg tartılıp üzerine 650 µl ddH₂O eklenip yaklaşık 3-5 dakika vorteks yapıldı, daha sonra +4 derecede yaklaşık 30 dakika bekletildi. Tekrardan birkaç dakika vorteks yapıldı. Örnek 10 000 xg de +4 °C’de 7.30 dakika santrifüj yapıldı. Üstteki süpernatant kısmı yeni bir tüpe alındı. Örnekler Western blot için hazırlandı.

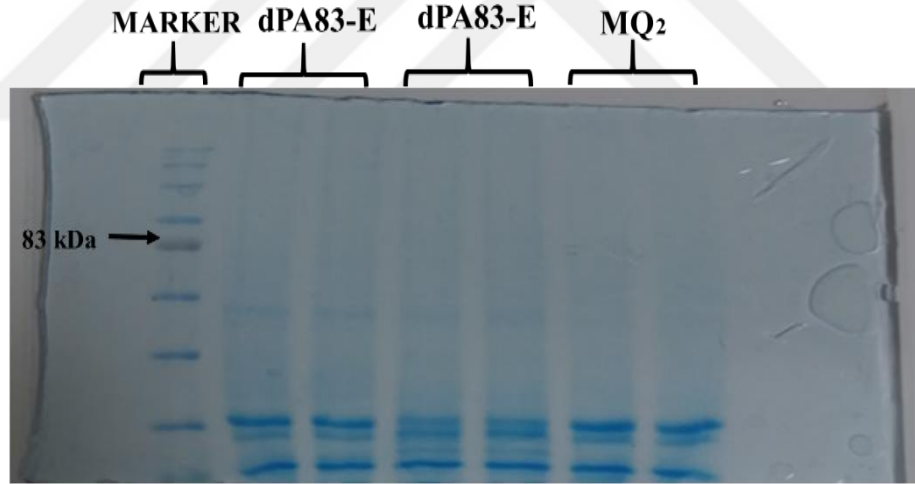
Kurutulan *N. benthamiana* yaprağındaki dPA83-E kurutulmasıyla yapraktaki protein değerinin nasıl etkilendiği; TRİTON X-100 ile sonuçlarında aktif olduğu ve 1X PBS çalışmasında da aktifliği bir kez daha göstermektedir. Ayrıca *N. benthamiana* bitkisi üzerinde kurutulmuş PA koruyucu antijeni dPA83-E doğal çözücü olarak su ortamında yüksek oranda çözünürlüğü olduğu net bir şekilde gösterilmektedir. Bu çalışmada kullandığımız dPA83-E nin iki farklı infiltrasyon ürünüde kurutulmuş bir nevi kontrol olması amacıyla yapılmıştır.

Çizelge. 3. İki farklı tarihte kurutulmuş dPA83-E yapraklarda farklı çözücü ortamlarda ve ezme yönteminde sonuçların değerlendirilmesi

	TRİTON X-100	ddH ₂ O	1X PBS
dPA83-E 07.01.2019	26,26		
dPA83-E 07.01.2019		14,38	
dPA83-E 07.01.2019			14,6
dPA83-E 19.06.2019	45,72		
dPA83-E 19.06.2019		10,02	
dPA83-E 19.06.2019			12,29
Nano gram			

TRİTON X-100 ile yapılan çalışma % 50 örnek % 50 1X PBS olarak seyreltilmiştir. Amaçlanan bantlarda kaymalar ve taşmaları önlemek için, ddH₂O ve 1X PBS çalışmasında örneklerde her hangi bir seyretme yapılmamıştır.

4.7. dPA83-E ve pGR-MQ₂ Örnekleri Stabilizasyon Sonuçlarının SDS PAGE Değerlendirmesi



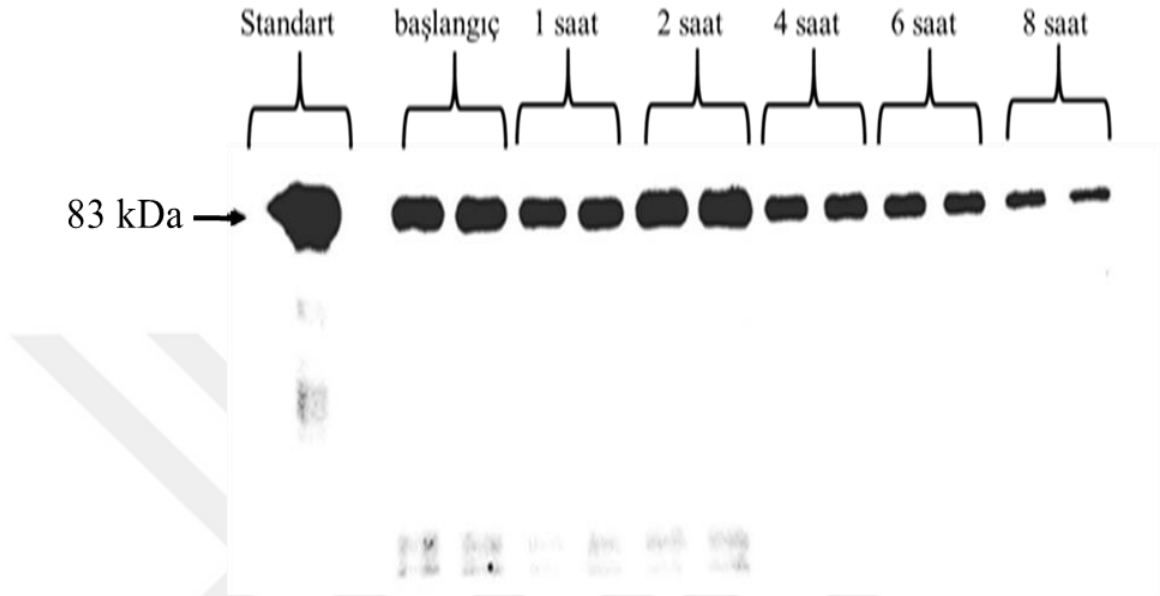
Şekil 4.7. dPA83-E ve pGR-MQ₂ Örnekleri stabilizasyon sonuçlarının SDS PAGE değerlendirmesi dPA83-E numunesinde iki tekrar olarak markerdan sonra başlangıç ve bir saatlik stabilizasyon örnekleri 10 µl yüklenmiştir. pGR-MQ₂ numunesinden iki tekrar olarak başlangıç örneği 10 µl yüklenmiştir.

dPA83-E ve pGR-MQ₂ *N. benthamiana* bitkisi üzerinde kurutulmuş olarak çözdürme yöntemiyle yapılan stabilizasyon değerlerinden elde edilen sonuçların SDS PAGE değerlendirmesi için çözünme miktarı protein konsantrasyonu yetersiz kalmıştır.

Aynı örneklerin western blot sonuçlarında ideal bantlar alınmıştır. SDS PAGE yapılışı materyal ve metot kısmında anlatıldığı gibi yapılmıştır.

4.8. MQ₂ Stabilizasyon Western Blot Değerlendirmesi

Oda sıcaklığında deney; başlangıç, 1 saat, 2 saat, 4 saat, 6 saat, 8 saat olmak üzere örnekler 40 µl halinde hazırlandı. Süresi biten örnekler üzerine 10 µl 5X SDS konularak -20 ye kaldırıldı. Sonra western blot yapıldı.



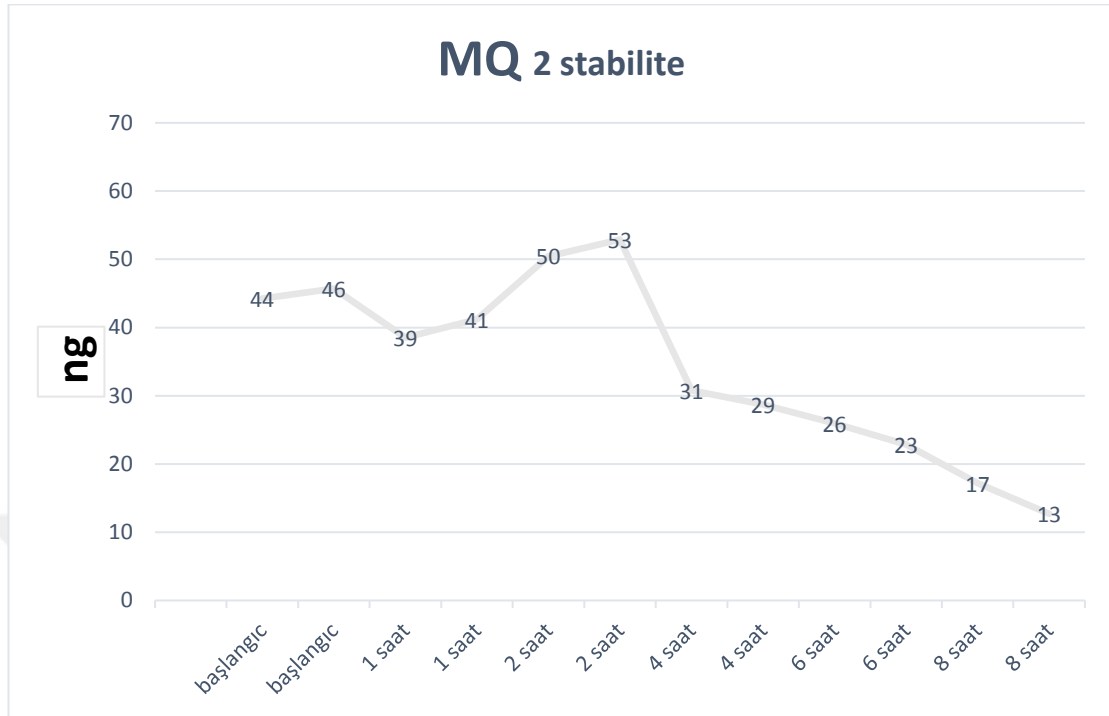
Şekil. 4.8. MQ₂ Stabilizasyon. Oda sıcaklığında başlangıç, 1 saat, 2 saat, 4 saat, 6 saat, 8 saat olmak üzere örnekler 40 µl halinde hazırlandı. Süresi biten örnekler üzerine 10 µl 5X SDS konularak -20 ye kaldırıldı. Sonra western blot yapıldı.

Western blot materyal ve metotta (3.5.) anlatıldığı gibi yapıldı.

Çizelge. 4. MQ₂ Stabilizasyon

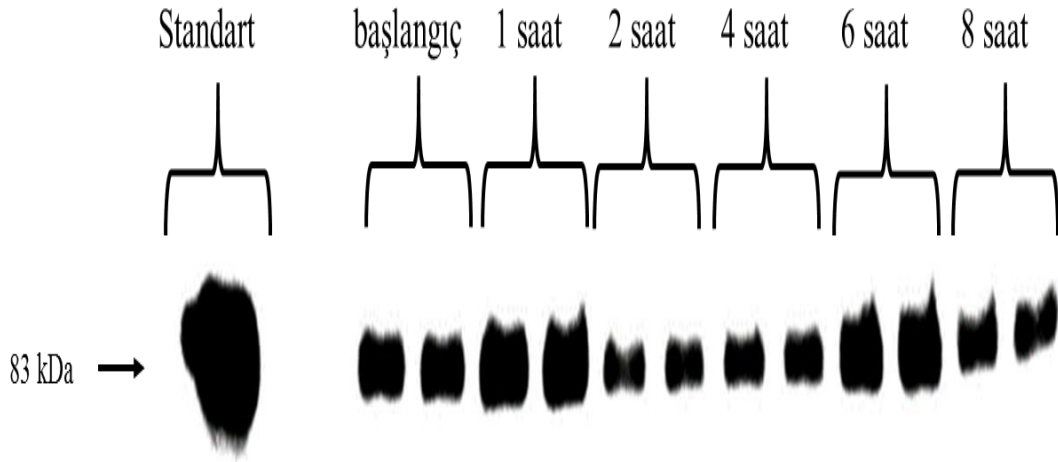
Zaman	Piksel	ng
Standart 100 ng	53197,19	100
Başlangıç	23547,44	44
Başlangıç	24313,99	46
1 Saat	20503,73	39
1 Saat	21913,39	41
2 Saat	26837,94	50
2 Saat	28134,48	53
4 Saat	16377,71	31
4 Saat	15289,71	29
6 Saat	13801,88	26
6 Saat	12151,52	23
8 Saat	9132,28	17
8 Saat	6753,25	13

Kurutulmuş pGR-MQ₂ yarı ömrü yaklaşık olarak 6,13 saat bulunmuştur.

Çizelge. 5. MQ₂ Stabilizasyon

Kurutulmuş pGR-MQ₂ Oda sıcaklığında başlangıç, 1 saat, 2 saat, 4 saat, 6saat, 8 saat olmak üzere. İstenilen yarılanma süresi gerçekleşmiştir.

4.9. dPA83-E Oda Sıcaklığında Stabilizasyonu

**Şekil. 4.9.** dPA83-E Stabilizasyon

Oda sıcaklığında başlangıç, 1 saat, 2 saat, 4 saat, 6saat, 8 saat olmak üzere örnekler 40 µl halinde hazırlandı. Süresi biten örnekler üzerine 10 µl 5X SDS konularak -20 ye kaldırıldı. Sonra western blot yapıldı.

Western blot materyal ve metotta (3.5.) anlatıldığı gibi yapıldı.

Çizelge. 6. dPA83-E Stabilizasyon

Zaman	piksel	ng
Standart 100 ng	53394	100
Başlangıç	14951	28
Başlangıç	15134	28,34
1 saat	20680	38,73
1 saat	20669	38,71
2 saat	10360	19,4
2 saat	9240	17,3
4 saat	10352	19,39
4 saat	10858	20,34
6 saat	18300	34,27
6 saat	20124	37,69
8 saat	13077	24,49
8 saat	10995	20,59

Yapılan çalışmada dPA83-E oda sıcaklığında yapılan başlangıç, 1 saat, 2 saat, 4 saat, 6 saat, 8 saat olmak üzere deneme yapılmıştır. Sonuç olarak dPA83-E oda sıcaklığında daha uzun sürelerde çalışmaların yapılması gerekmektedir.

4.10. dPA83-E ve MQ₂ Yaklaşık Toplam Proteinler

dPA83-E pGR-MQ₂ örnekleri *N. benthamiana* bitkisi üzerinde kurutulmuş PA koruyucu antijeni mutantlarının çözdürme yöntemiyle oluşan değerlerinden elde edilen sonuçların, Gerçek toplam kurutulmuş yaprak ve ortalama 1 kg'da elde edilmesi olasılıkları değerlendirilmiştir.

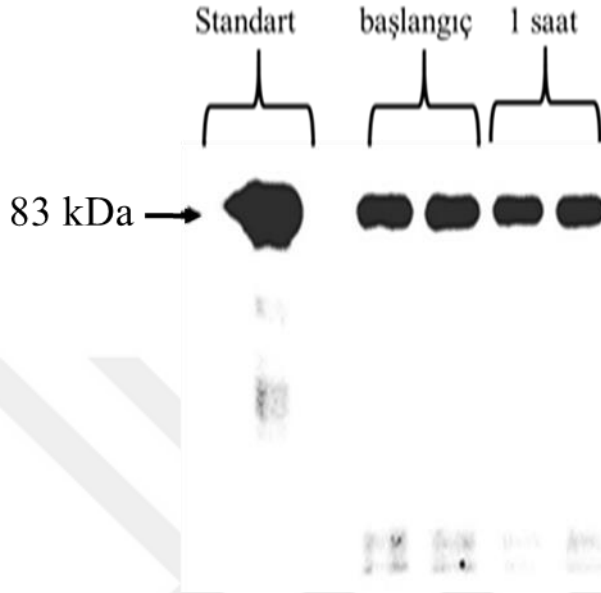
4.10.1. MQ₂ Toplam Protein

Daha önceden pGR-MQ₂ örnekleri *N. benthamiana* bitkisi üzerinde kurutulmuş PA mutantının çözdürme yöntemiyle oluşan değerlerinden yola çıkılarak elde edilen sonuçların total kurutulmuş yaprak ve ortalama 1 kg'da elde edilmesi olasılıkları değerlendirilmiştir.

Değerlendirme stabilizasyon örneklerinde kullanılan bantlarından başlangıç bandı referans olarak kabul edildi ve uygulanan matematiksel işlemler ifade edilmiştir. Örneklerin değerlendirilmesi imagej ij5 programında değerlendirildi. Program da daha önceki oda sıcaklığın da kullanılan western blot sonuçları kullanıldı.

Elde edilen piksel değerleri standart bandımızla oluşan değer referans kabul edildi diğer veriler bu sonuca göre yorumlandı. Sonuç olarak, başlangıç örneğin referans olarak kabul edildi başlangıçta 44 ng protein tespit edildi.

Hesaplama 8 µl de 44 ng protein varsa 1 µl de 5,5 ng dir. Örnek hazırlanırken 0,100 gram MQ₂ toz haldeki örneğin üzerine 900 µl 1X PBS eklendi; 5,5 x 900 : 4950 ng total protein vardır. Toplam kurutulmuş yaprak 6,020 gram toz halde oda eşittir; 6020 mg'dır.



Şekil. 4.10.1. MQ₂ toplam proteini hesaplamadaki kullanılan bant Western blot kuyusuna 8 µl örnek ve üzerine 2 µl 5XSDS eklendi ve toplam 10 µl örnek yüklendi oluşan bantta 44 ng protein hesaplandı.

100 mg da 4950 ng ise 6020 mg de 297990 ng MQ₂ vardır. 6 gram 0,3 mg dir.

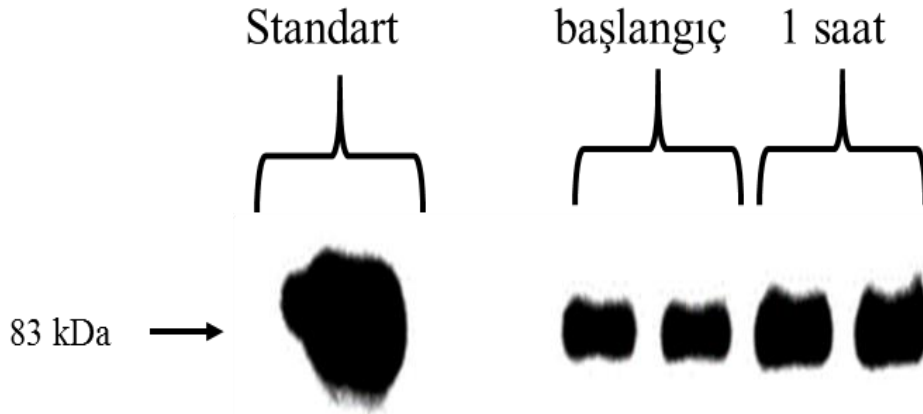
- 1 gram da 0,05 mg pGR-MQ₂ protein
- 6 gram da 0,3 mg pGR-MQ₂ protein
- 1 kg da 50 mg pGR-MQ₂ protein (Eğer 1 kg yapılsaydı).

4.10.2. dPA83-E Toplam Protein

Daha önceden dPA83-E örnekleri *N. benthamiana* bitkisi üzerinde kurutulmuş dPA83-E çözdürme yöntemiyle oluşan değerlerinden yola çıkılarak elde edilen sonuçların total kurutulmuş yaprak ve ortalama 1 kg'da elde edilmesi olasılıkları değerlendirilmiştir.

Bu doğrultuda yapılan stabilizasyon örneklerinde kullanılan bantlarından başlangıç bandı referans olarak kabul edildi ve uygulanan matematiksel işlemler aşağıda ifade edilmiştir.

Örneklerin değerlendirilmesi imagej ij5 programında değerlendirildi. Başlangıç örneğini referans olarak kabul edildi başlangıçta 28 ng protein tespit edildi. Yapılan stabilizasyon örneklerinde ve uygulanan matematiksel işlemler ifade edilmiştir.



Şekil. 4.10.2. dPA83-E toplam proteini hesaplamadaki kullanılan bant
Kurutulmuş dPA83-E çözündürme yöntemiyle oluşan süzüntüden protein hesaplayabilmek için başlangıç bandı referans olarak kullanılmıştır.

Western blot kuyusuna 8 µl örnek ve üzerine 2 µl 5XSDS eklendi ve toplam 10 µl örnek yüklendi oluşan bantta 28 ng protein hesaplandı hesaplama 8 µl de 28 ng protein varsa 1 µl de 3,5 ng dir. Örnek hazırlanırken 0,06 gram dPA83-E (07.01.2019) toz haldeki örneğin üzerine 540 µl 1X PBS eklendi; 3,5 x 540 : 1890 ng total protein vardır. Toplam kuruttuğum yaprak 5,650 gram toz hâlde oda eşittir; 5650 mg

60 mg da 1890 ng ise 5650 mg de 177975 ng dir. dPA83-E vardır; 0,177 mg dir.

- 1 gram da 0,032 mg dPA83-E protein
- 5,65 gram da 0,177 mg dPA83-E protein
- 1 kg da 32 mg dPA83-E protein vardır. (Eğer 1 kg yapılsaydı).

Yapılan bu çalışmada *N. benthamiana* bitkisi üzerinde kurutulmuş dPA83-E çözündürme yöntemiyle oluşan değerlerinden yola çıkılarak elde edilen sonuçların total kurutulmuş yaprak ve ortalama 1 kg'da elde edilmesi olasılıkları değerlendirilmiştir.

Bu doğrultuda yapılan stabilizasyon örneklerinde kullanılan bantlarından başlangıç bandı referans olarak kabul edildi. Uygulanan matematiksel işlemler ifade edilmiştir. Örneklerin değerlendirilmesi imagej ij5 programında değerlendirildi. Programda referans değer olarak 100 ng standart bant referans alınmıştır.

Olası yapılacak yüksek miktartlı çözündürmelerde elde edilmesi gereken miktarların hangi doğrultuda oluşacağı hesaplanmış olmakta ve saflaştırma yapılmadan kullanılabilecek değerleri belirlenmiştir.

Bu çalışma çözünen ve çözücünün ortamına bağlı olarak değişebilir. Ayrıca kullanılan toz haldeki kurutulmuş yaprak miktarı her hangi bir değerde olabilir. Bu deneyde küçük miktarlar da 0,6-0,1 mg gibi değerler sonuç için yeterli olmuştur.

4.11. Benzer koşullarda, Farklı Nem Değerleri İle Kuru Yaprakların Değerlendirilmesi

Çizelge. 7. Benzer Koşullarda, Farklı Nem Değerleri İle Kuru Yaprakların Değerlendirilmesi

11.3.2020	16.3.2020	19.3.2020	27.3.2020	Toz	Net kuru
net yaş ağırlık	1. tartım	2. tartım	3. tartım	Ağırlık	Nem Oranı
10,02	1,18	-	-	1,05	12
10,02	0,955	0,8602	0,8806	-	-
9,5	0,9153	0,8534	0,8771	-	
10	1,025	-	-	0,9	10
10,02	0,9573	0,8859	9030	-	0
Gram	Gram	Gram	Gram		

Yapılan çalışmada elde edilen toz maddenin en ideal nem değerlerinde hangi aralıkta olduğunu anlamak için yukardaki çizelge oluşturulmuştur. Ortalama olarak nem değeri yaklaşık %10 civarı iken toz daha homojen bir yapıya kavuşmaktadır.



Şekil. 4.11. Uygulama aşamaları

N. benthamiana bitkisi üzerinde kurutulmuş dPA83-E kuru madde ağırlık ve ortalama nem değerlerinin kurutulan dPA83-E üzerindeki etkisini anlamak. Bu çalışmada yorumlamak için yukarıda tabloda oluşan değerlerinden yola çıkılarak elde edilen sonuçların toplam kurutulmuş yaprak ve kurutulan dPA83-E protein ifadesi oranı veya yüzdesini değerlendirilmesi için ve daha sonraki çalışmalarda kullanma amaçlı yapılmıştır.

Oda sıcaklığında yaklaşık olarak 22-26 derecede bekletme süresi uzatılmış olsa da ortalama ağırlığında herhangi büyük bir değer oluşmadığı gözlemlendi. Bununla beraber ortalama nem değerleri % 9-12 arasında oluşmaktadır. Yaptığımız deneyler

sonucunda kurutma işleminin oransal olarak, oda sıcaklığında 96 saat civarı nem kaybının fazla olduğu değerlendirildi.



5. SONUÇ

Şarbona karşı etkili ve koruyucu, uzun ömürlü bir aşı stratejisi geliştirilmesi hedeflenerek PA antijeninin bitki ekspresyon sistemlerin de üretilmesi bitkiler, memeli patojenlerini barındırmadıkları için ekonomik ve ölçeklenebilirlik avantajları kullanım için dikkate değerdir. Ek olarak, bitki hücreleri, memeli hücrelerinde bulunanlara yüksek oranda benzer olan N-bağlı glikosilasyon içermek üzere hedef proteinlerin ökaryotik post-translasyonel modifikasyonlarını oluşturur ve rekombinant protein üretimi için avantajlıdır.

Bu çalışmada bir takım uygulamaların kullanılmakta olan saflaştırmadan farklı olarak; kurutulmuş yapraklardan elde edilen süzüntülerle değerlendirmeler yapılmıştır.

Bu çalışmada kullanılan karakterizasyon ve stabilizasyon değerlendirmelerini proteini saflaştırmadan ve derin dondurucu da muhafaza etmeden yapılan çalışmaların sonuçları daha önceki yıllarda yapılmış ve devam etmekte olan saflaştırılmış PA83 mutantlarıyla kıyaslandı. Ve diğer birçok farklı aşamalara farklı bir bakış açısıyla yaklaştığımız bu çalışmada elde ettiğimiz değerlerin birçok çalışmaya referans nitelikte sonuçları olmuştur. Bunlardan bazıları bitki bazlı ürettiğimiz rekombinant protein dPA83-E'nin yüksek oranda su gibi canlı için hayati öneme sahip bir çözücünde çözünmüş olması. Farklı sıcaklık değerlerindeki sonuçların yüksek oranda saflaştırılan proteinle aynı özellikler sergilemesi, ayrıca saflaştırmadan PA83'nin mutandı pGR-MQ2 da yarılanma süresi beklentinin üzerinde bir sonuç vermiştir.

Ayrıca süzüntü olarak kullandığımız örneklerin stabilizasyon uygulamalarında beklenen değerler de sonuçlar vermesi, termal-stabilizasyon çalışmamızda yüksek oranda kararlılık sergilemesi ve daha önceki saflaştırılmış protein sonuçlarına benzer nitelikte sonuçlar vermesi, uzun süre ve oda sıcaklığında kurutulmuş yaprakların toz hale getirilerek bekletilmesinde aktivite kaybı yaşamaması gibi sonuçlar elde edilmiştir. Tüm sonuçlar incelendiğinde, kurutulmuş yapraklarda protein değerlerinin yaklaşık 1 yıldan fazla stabil kaldığı gösterilmiştir.

Kullanılan yöntemin saflaştırmaya alternatif olabilirliği aşamasında hayvan deneyleri ve klinik çalışmalarla desteklenerek daha net sonuçların ve değerlendirmelerin yapılabilmesi için hayati önem taşımaktadır.

Yapılan çalışmanın birçok yönden yararlılığı olabilir; infiltre haldeki yaprakların kurutularak daha uzun süre herhangi bir soğuk hava deposu veya derin dondurucu ihtiyacının olmaması, farklı amaçlarla taşınabilirliği, mesafeler arası taşımak gibi. Yapılabilecek deneylerde zaman ve maddi kazanç sağlamasının yanında geliştirilebilirlik konusunda çok fazla avantajlara sahiptir.

6. KAYNAKLAR

- Abrami, L. vd. 2013. Hijacking multivesicular bodies enables long-term and exosome-mediated longdistance action of anthrax toxin. *Celrep*, 5:986-96.
- Artenstein, A.W ve Opal, S.M. 2012. Novel approaches to the treatment of systemic anthrax. *Clin Infect Dis*, 54:1148–61.
- Baillie, L. 2001. The development of new vaccines against *Bacillus anthracis*. *J Appl Microbiol*. 91:609–13.
- Blackburn, J.K., McNyset, K.M., Curtis, A., Hugh-Jones M.E. 2007. Modeling the geographic distribution of *Bacillus anthracis*, the causative agent of anthrax disease, for the contiguous United States using predictive ecological [corrected] niche modeling. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 77:1103–1110.
- Fouet, A. 2009 Dec. The surface of *Bacillus anthracis*. *Mol Aspects Med*, 30:374–85.
- Gelvin, S.B. 2003. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 16–37.
- Gomord, V., Fitchette, A.C., Bouaouiche, L.M., Dupas, C.S., Plasson, C., Michaud, D. ve Faye, L. 2010. Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production. *Plant Biotechnology Journal*, 8, 564–587.
- Guo, H.B., Lee, I., Kamar, M., Akiyama, S.K. ve Pierce, M. 2002. Aberrant N-glycosylation of beta1 integrin causes reduced alpha5beta1 integrin clustering and stimulates cell migration. *Cancer Res.* 62, 6837–6845.
- Hampson, K., Lembo, T., Bessell P., Auty H., Packer, C., Halliday J., Beesley, C.A., Fyumagwa, R., Hoare, R., Ernest, E, et al. 2011. Predictability of anthrax infection in the Serengeti, Tanzania. *J Appl Ecol.* 48:1333–1344.
- Hugh-Jones, ME., de Vos V. 2002. Anthrax and wildlife. *Rev Sci Tech.* ;21:359–383.
- Isaji, T., Gu J., Nishiuchi, R., Zhao, Y., Takahashi, M., Miyoshi, E, et al. 2004. Introduction of bisecting GlcNAc into integrin alpha5beta1 reduces ligand binding and down-regulates cell adhesion and cell migration. *J Biol Chem*, 279:19747–54.
- Jernigan, D.B., Raghunathan, P.L., Bell, B.P, Brechner, R., Bresnitz, E.A, Butler, J.C, Cetron, M., Cohen, M., Doyle, T., Fischer, M., Greene, C., Griffith, K.S., Guarner, J., Hadler, J.L., Hayslett, J.A., Meyer, R., Petersen, L.R., Phillips, M., Pinner, R., Popovic, T., Quinn, C.P., Reefhuis, J., Reissman, D., Rosenstein, N., Schuchat, A., Shieh, W.J., Siegal, L., Swerdlow, D.L., Tenover, F.C., Traeger, M., Ward, J.W., Weisfuse, I., Wiersma, S., Yeskey, K., Zaki, S., Ashford, D.A., Perkins, B.A., Ostroff, S., Hughes, J., Fleming, D., Koplan, J.P., Gerberding, J.L., National Anthrax Epidemiologic Investigation Team. 2002 Investigation of bioterrorism-related anthrax, United States, 2001: epidemiologic findings. *Emerg Infect Dis* 8:1019–1028

- Kapila, J., De Rycke, R., Montagu, M. ve Angenon, G. 1997. An Agrobacterium-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Sci*, 122, 101–108.
- Wycoff, K., Belle, A., Deppe, D., Schaefer, L., Maclean, J.M., Haase, S., Trilling A.K., Liu, S., Leppla, S.H., Geren, I.N., Pawlik, J., Peterson, J.W., 2011. Recombinant anthrax toxin receptor-Fc fusion proteins produced in plants protect rabbits against inhalational anthrax. *Antimicrob Agents Chemother*, 55:132–139.
- Lowy, D.R., ve Schiller J.T. 2006. Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J. Clin. Invest*, 116: 1167- 1173.
- Mamedov, T. and Vidadi, Y. 2013. “In Vivo Deglycosylation of Recombinant Proteins in Plants by Co-Expression with Bacterial PNGase F.” *Bioengineered* 4 (5): 338–42. <https://doi.org/10.4161/bioe.23449>.
- Mamedov, T., Cicek, K., Gulec, B., Ungor, R. ve Hasanova, G. 2017. In vivo production of non-glycosylated recombinant proteins in *Nicotiana benthamiana* plants by co-expression with Endo- β -N-acetylglucosaminidase H (Endo H) of *Streptomyces plicatus*. *PLoS ONE*, 12(8): e0183589.
- Mamedov, T., Jessica A., Chichester, R., Mark J., Ananya Ghosh, Megan V. Coffin, Kristina Herschbach, Alexey I. Prokhnevsky, Stephen J. Streatfield ve Vidadi Yusibov. 2016. “Production of Functionally Active and Immunogenic Non-Glycosylated Protective Antigen from Bacillus Anthracis in Nicotiana Benthamiana by Co-Expression with Peptide-N-Glycosidase F (PNGase F) of Flavobacterium Meningosepticum.” *PLoS ONE* 11 (4): 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153956>.
- Mardanov, E.S., Blokhina, E.A., Tsybalova, L.M., Peyret, H., Lomonossoff, G.P. ve Ravin, N.V. 2017. Efficient Transient Expression of Recombinant Proteins in Plants by the Novel pEff Vector Based on the Genome of Potato Virus X. *Front. Plant Sci*, 8:247.
- Mazumdar, S. 2009. Raxibacumab. *mAbs.*; 1:531–538.
- Meselson, M., Guillemin J., Hugh-Jones M., Langmuir A., Popova I., Shelokov A., Yampolskaya O. 1994. The Sverdlovsk anthrax outbreak of 1979. *Science* 266:1202–1208.
- Mett, V., Farrance, C.E., Green, B.J. ve Yusibov, V. 2008. Plants as biofactories. *Biologicals*, 36:354-8.
- Moayeri, M., Crown, D., Jiao, G.S., Kim, S., Johnson, A., Leysath, C., Leppla, S.H. 2013. Small-molecule inhibitors of lethal factor protease activity protect against anthrax infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy.*; 57:4139–4145.
- Molloy, S.S., Bresnahan, P.A., Leppla, S.H, Klimpel, K.R., Thomas, G. 1992. Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen. *J Biol Chem* 267: 16396–16402.

- Peyret, H. ve Lomonossoff, G. P. 2015. When plant virology met *Agrobacterium*: the rise of the deconstructed clones. *Plant Biotechnol. J.*, 13: 1121–1135.
- Shamloul, M., Trusa, J., Mett V. ve Yusibov, V. 2014. Optimization and Utilization of *Agrobacterium*-mediated Transient Protein Production in *Nicotiana*. *J. Vis. Exp.* (86), e51204, 10.3791-51204.
- Saile, E. ve Koehler TM. 2006. *Bacillus anthracis* multiplication, persistence, and genetic exchange in the rhizosphere of grass plants. *Appl Environ Microbiol* 72:3168–3174
- Liu, S., Moayeri, M., Leppla, S.H. 2014. Microbial Pathogenesis Section, Laboratory of Parasitic Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland Anthrax lethal and edema toxins in anthrax pathogenesis *Trends Microbiol.*; 22: 317–325.
- Sijmons, P.C., Dekker, B.M., Schrammeijer, B., Verwoerd, T.C., van den Elzen P.J., Hoekema, A. 1990. Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. *Nat. Biotechnol.* 8: 217-221.
- Walsh JJ, et al. A case of naturally acquired inhalation anthrax: clinical care and analyses of antiprotective antigen immunoglobulin G and lethal factor. *Clin Infect Dis.* 2007; 44:968–971.
- Yusibov, V. ve Mamedov, G. 2010. Plants as an Alternative System for Expression of Vaccine Antigens. *Proc ANAS (Biol Sci)*, 65:195–200.
- Yusibov, V., Kushnir, N. ve Streatfield, S.J. 2016. Antibody Production in Plants and Green Algae. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 67:19.1–19.33.

ÖZGEÇMİŞ

SONER AKBURU
snrakbr@gmail.com.tr



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2017-2020	Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Antalya
Lisans 2013-2017	Aydın adnan menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Aydın

PROJELER

2018 – 2020:

(TÜBİTAK projesi)

YAYINLAR