



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



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**SERVİ POLENLERİNDE TANIMLANMIŞ
ALERJENİK PEKTAT LİYAZIN BİYOTEKNOLOJİK ÜRETİMİ**

Narmin MİRZAMAMMADLİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Emine Şeküre Nazlı ARDA**

Ağustos, 2021

İSTANBUL

Bu alışma, 13.08.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Emine Şeküre Nazlı ARDA (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Ayşegöl TOPAL SARIKAYA
Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Murat PEKMEZ
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FYL-2019-33555 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

Mirzamammadli N., Aghalarova N., Aksüt Y., Arda N. 2019, Biotechnological production of an allergenic of pectate lyase identified in cypress pollens, Turkish Journal of Biology, 43:(5 supp*), 111.

*Supplement: Abstract Proceedings of the 7th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey (MolBiyoKon19), Campus Suleyman Demirel Cultural Center – Istanbul, Turkey. 27-29 September 2019. Poster Presentation.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, her konuda bilgi ve desteğini almaktan çekinmediğim, beni yönlendiren, bilimsel bilgi birikimini ve zengin tecrübelerini benimle paylaşan değerli hocam **Prof. Dr. Nazlı ARDA**'ya tüm kalbimle teşekkürlerimi sunuyor, bana gösterdiği sevgi ve destek için minnettarlık duyuyorum.

Tez çalışmam boyunca fikirleri ile bana yol gösteren ve destek olan, başta **Prof. Dr. Suna BÜYÜKÖZTÜRK** ve **Prof. Dr. Aslı GELİNCİK** olmak üzere, tez çalışmam için iş birliği yaptığımız tüm araştırmacılara; aynı zamanda servi polenlerinin toplanmasında gösterdiği ilgi ve hassasiyet için **Dr. Öğr. Üyesi Nurgül KARLIOĞLU KILIÇ**'a teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca yardımları ve destekleri için sevgili hocalarım **Prof. Dr. Evren ÖNAY-UÇAR**, **Dr. Öğr. Üyesi Murat PEKMEZ** başta olmak üzere, diğer tüm hocalarıma ve yüksek lisans tezimin tüm gidişatında önemli rolü olan, her türlü desteğini esirgemeyen, beraber çalıştığım, doktora öğrencisi ağabeyim MSc **Yunus AKSÜT**'e, doktora öğrencisi MSc **Aslıhan ŞENGELİN**'e ve içinde yer almaktan büyük mutluluk duyduğum hocamın değerli öğrencileri-**Proteomik ekibine** tecrübelerini benimle paylaştıkları ve destekleri için teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca tüm desteğiyle yanımda olan değerli arkadaşlarım **Narmin AGHALAROVA** ve **Tuğrul SADIKOV**'a çok teşekkür ederim.

Son olarak tüm hayatım boyunca maddi-manevi yardımlarıyla beni hiç yalnız bırakmayan, eğitim hayatımda her daim yanımda olan ve motive eden başta babam olmakla **aileme** sonsuz teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

Ağustos 2021

Narmin MİRZAMAMMADLİ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ	x
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xi
ÖZET	xiv
SUMMARY	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	3
2.1. ALERJİ	3
2.2. ALERJİK REAKSİYON TİPLERİ	4
2.3. ALERJİDE RİSK FAKTÖRLERİ	8
2.4. POLEN ALERJİSİ	9
2.5. <i>Cupressus sempervirens</i>	11
2.6. PEKTAT LİYAZ (PL)	13
2.7. REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ	15
2.8. REKOMBİNANT ALERJENLER	17
3. MALZEME VE YÖNTEM	19
3.1. POLEN ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI	19
3.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN ORGANİZMA VE PLAZMİDLER	19
3.3. BESİYERLERİ	20
3.4. RNA İZOLASYONU	21
3.5. TERS TRANSKRİPSİYON POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-PZR)	22
3.5.1. cDNA sentezi	23
3.5.2. <i>Cup s 1</i> Geninin PZR ile Çoğaltılması ve Kontrolü	23
3.6. <i>Cup s 1</i> GENİNİN pQE-2 PLAZMİDİ İLE LİGASYONU VE REKOMBİNANT PLAZMİDİN KONTROLÜ	25
3.6.1. <i>Cup s 1</i> geninin ve pQE-2 Plazmidinin Restriksiyon Endonükleazları ile Kesimi	25

3.6.2. <i>Cup s 1</i> Geninin ve pQE-2 Plazmidinin Agaroz Jelden Geri Kazanımı ve Dizilenmesi	25
3.6.3. <i>Cup s 1</i> Geninin pQE-2 Plazmidi ile Ligasyonu	26
3.7. PLAZMİDİN <i>E. coli</i> 'DE ÇOĞALTILMASI.....	26
3.7.1. <i>E. coli</i> Hücrelerinin Transformasyona Yeterli Hale Getirilmesi	26
3.7.2. Transformasyon	27
3.7.3. Plazmid İzolasyonu	27
3.7.4. pQE-2 Plazmidinin ve Rekombinant Plazmidin Restriksiyon Endonükleazlarıyla Kesimi.....	28
3.7.5. Rekombinant Plazmid İçeren Transformant Hücrelerin Koloni PZR ile Belirlenmesi	28
3.8. AGARÖZ JEL ELEKTROFOREZİ	29
3.9. PROTEİN ANALİZLERİ	31
3.9.1. Protein İzolasyonu	31
3.9.2. Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	31
3.9.3. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	32
3.9.4. Gümüş Boyama Yöntemi	34
3.9.5. Western-Blot Analizi.....	35
3.9.6. Rekombinant Proteinin Saflaştırılması.....	37
4. BULGULAR.....	39
4.1. HAZIRLANAN POLEN ÖRNEĞİ.....	39
4.2. TOTAL RNA İZOLASYONU VE KONTROLÜ	39
4.3. TERS TRANSKRİPSİYON POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU	40
4.3.1. cDNA Sentezi	40
4.3.2. <i>Cup s 1</i> Geninin PZR ile Çoğaltımı ve Kontrolü	40
4.4. PZR ÜRÜNÜNÜN DİZİ VE HOMOLOJİ ANALİZ SONUÇLARI.....	41
4.5. <i>Cup s 1</i> GENİNİN pQE-2 PLAZMİDİNE LİGASYONU VE KOLONİ PZR İLE KONTROLÜ	42
4.6. REKOMBİNANT PLAZMİDİN RESTRİKSİYON ENZİMLERİ İLE KESİM SONUÇLARI	44
4.7. REKOMBİNANT PLAZMİDİN <i>E. coli</i> BL21 (DE3) İRKİNA TRANSFORMASYONUN KOLONİ PZR İLE KONTROLÜ	45
4.8. PROTEİN ANALİZ SONUÇLARI	46
4.8.1. Protein Konsantrasyonları	46
4.8.2. Elektroforetik Analiz Sonuçları.....	47
4.8.3. Western-Blot Analiz Sonuçları.....	48

5. TARTIşMA VE SONUÇ	50
KAYNAKLAR.....	53
ÖZGEÇMİş	63



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Tip I alerji i aşırı duyarlılık (anafilaktik reaksiyon) (Mills, 2010).	5
Şekil 2.2: Tip II alerjik reaksiyon: sitotoksik reaksiyon (Mills, 2010)	6
Şekil 2.3: Tip III alerjik reaksiyon: bağışıklık kompleks reaksiyonu (Mills, 2010).	7
Şekil 2.4: Tip IV alerjik reaksiyon: hücre aracılı (gecikmeli) aşırı duyarlılık (Mills, 2010).	8
Şekil 2.5: Polen Tanesinin Yapısı	10
Şekil 2.6: Bir Akdeniz servisinin (<i>Cupressus sempervirens</i> var. <i>sempervirens</i>) (a) Genel görünümü (Moricca ve diğ., 2018); (b) Dal ve kozalakları (Kavgacı, 2018-Ünal Akkemik tarafından fotoğraflanmıştır); (c) Bitki kısımlarını gösteren çizim (Joshi, 2021), 1- Dişi konili verimli dal; 2- Erkek konili verimli dal; 3- Yaprak dizilimini gösteren dal; 4- Tohum; 5- Mikrosporofil.	12
Şekil 2.7: Pektat liyazın katalizlediği reaksiyon (Solbak ve diğ., 2005).	14
Şekil 2.8: Plazmid vektörler aracılığıyla bir rekombinant DNA molekülünün oluşturulması (Rosenberg and Rosenberg, 2012).	16
Şekil 3.1: Çalışma için toplanmış <i>C. sempervirens</i> kurulları.	19
Şekil 3.2: pQE2 plazmidinin genetik haritası.	20
Şekil 3.3: Agaroz jel elektroforezinde markır olarak kullanılan (a) “100 bp” ve (b) “1 kb ladder” (GeneOn 304-005; 305-005).	30
Şekil 4.1: <i>Cupressus sempervirens</i> polenleri.	39
Şekil 4.2: <i>Cupressus sempervirens</i> poleninden izole edilen total RNA’nın kalitesini gösteren agaroz jel görüntüsü.	40
Şekil 4.3: a-b) Total RNA’lardan sentezlenen 2 farklı cDNA.	40
Şekil 4.4: PZR ürününün %1’lik agaroz jeldeki görüntüsü. a) Markır (GeneOn 305-005), b) Cup s 1 geninin PZR ürünü.	41
Şekil 4.5: <i>Cupressus sempervirens</i> poleninde bulunan <i>Cup s 1</i> geninin cDNA dizisi.	42
Şekil 4.6: <i>Cupressus sempervirens</i> poleninde bulunan <i>Cup s 1</i> genine karşılık gelen amino asit dizisi.	42

Şekil 4.7: <i>Cupressus sempervirens</i> Cup s 1 proteininin amino asit dizi bilgisinin BLAST analizi sonuçları.....	42
Şekil 4.8: PZR ürününün pQE-2 plazmidine ligasyonunu gösteren koloniler(1-3).....	43
Şekil 4.9: Koloni PZR ürünlerinin %1’lik agaroz jeldeki görüntüsü. a) Markır (GeneOn 304-005), b-g), Rastgele seçilen kolonilerin PZR sonuçları.	44
Şekil 4.10: Rekombinant plazmidin tekli ve çiftli restriksiyon enzimi kesim sonuçları. a) Markır (1kb, Gene-On 305-005), b) PZR ürünü, c) Ligasyon ürününün <i>PstI</i> restriksiyon endonükleazı ile tekli kesimi, d) Rekombinant plazmidin <i>PstI</i> ve <i>NotI</i> restriksiyon endonükleazları ile çiftli kesimi sonucunda oluşan bantlar.....	45
Şekil 4.11: <i>E.coli</i> transformantlarından yapılan koloni PZR sonucunda elde edilen DNA’nın %1’lik agaroz jeldeki görüntüsü. a) Markır (1kb, Gene-On 305-005), b-e) rastgele seçilen kolonilerin koloni PZR sonuçları.....	46
Şekil 4.12: Protein standart grafiği. Sığır serum albumin (“bovine serum albumin”, BSA) kullanılarak oluşturuldu ($R^2=0.996$).	47
Şekil 4.13: Gümüş boyama yöntemi ile boyanmış örnek jel görüntüsü. a) Markır (SeeBlue® Pre stained Protein Standard, Invitrogen LC5625), b) Negatif kontrol, c) İzole edilen total protein c)-d) Saflaştırma optimizasyonu sırasında elde edilmiş iki örnek.....	48
Şekil 4.14: Western-blot analizi. a) Markır (SeeBlue® Pre-stained Protein Standard, Invitrogen LC5625), b) Kontrol serum örneği, c) Hasta serum örneği.	49

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1: Tez çalışmasında kullanılan organizmalar ve özellikleri.	20
Tablo 3.2: LB besiyeri içeriği.	21
Tablo 3.3: LBA besiyeri içeriği.	21
Tablo 3.4: cDNA sentezi için kullanılan reaksiyon bileşenleri.	23
Tablo 3.5: cDNA sentezi için PZR koşulları.	23
Tablo 3.6: <i>Cup s 1</i> geninin PZR ile çoğaltımı için kullanılan reaksiyon bileşenleri.	24
Tablo 3.7: <i>Cup s 1</i> geninin PZR ile çoğaltımı için reaksiyon koşulları.	24
Tablo 3.8: RT-PZR'da kullanılan primerler (altı çizgili kısımlar restriksiyon enzim kesim noktalarını göstermektedir).	24
Tablo 3.9: <i>NotI</i> ve <i>PstI</i> restriksiyon endonükleazları ile çiftli kesim reaksiyonunun bileşenleri.	25
Tablo 3.10: Ligasyon işleminde kullanılan reaksiyon bileşenleri.	26
Tablo 3.11: Tekli kesim reaksiyon bileşenleri.	28
Tablo 3.12: Koloni PZR bileşenleri.	29
Tablo 3.13: Koloni PZR koşulları.	29
Tablo 3.14: 50x TAE tamponunun içeriği.	30
Tablo 3.15: 6x Yükleme tamponunun içeriği.	30
Tablo 3.16: Protein izolasyonu için hazırlanan tamponun içeriği.	31
Tablo 3.17: SDS-PAGE için hazırlanan çözeltiler.	33
Tablo 3.18: SDS-PAGE ayırma ve yükleme jeli içerikleri (8x10 cm ² boyutunda ve 1 mm kalınlığında bir jel için gerekli değerler).	34
Tablo 3.19: Gümüş boyama için kullanılan çözeltiler.	35

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
%	: Yüzde
~	: Yaklaşık olarak
α	: Alfa
β	: Beta
°C	: Derece Santigrat
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
μM	: Mikromolar
Atm	: Atmosfer
Fmol	: Femtomol
g	: Gram
kDa	: Kilodalton
L	: Litre
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
N	: Normal
nm	: Nanometre
rpm	: Dakikada devir sayısı (“Revolutions per minute”)
UV	: Ultraviyole
v	: Hacim (“Volume”)
V	: Volt
w	: Ağırlık (“Weight”)

Kısaltmalar	Açıklama
AIT	: Alerjene özgül immünoterapi (“Allergen immunotherapy”)
Amp	: Ampisilin
APS	: Amonyum persülfat
BCA	: Bişinkoninik asit
bç	: Baz çifti
BLAST	: Temel yerel hizalama arama aracı (“Basic local alignment search tool”)
BSA	: Sığır serum albumini (“Bovine serum albumin”)
cDNA	: Komplementer DNA
dH₂O	: Distile su
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleozid trifosfat
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
EtBr	: Etidyum bromür
HG	: Homogalakturnan
HP	: Hipersensitivite pnömonisi
IgA	: İmmüoglobulin A
IgE	: İmmüoglobulin E
IgG	: İmmüoglobulin G
IgM	: İmmüoglobulin M
IPTG	: İzopropiltiyo-β-D-galaktopiranosid
IUIS	: Uluslararası İmmünolojik Dernekler Birliği
LB	: Luria-Bertani sıvı besiyeri
LBA	: Luria-Bertani agarlı katı besiyeri
PCR	: “Polimerase chain reaction”
PL	: Pektat liyaz
PR proteinleri	: Patogenez ile ilgili proteinler
PVDF	: Polivinilidin diflorür
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik asit

RT-PZR	: Ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (“Reverse transcription polimerase chain reaction”)
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (“Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis”)
TAE	: Tris-asetat EDTA tamponu
TEMED	: Tetrametiletildiamin



ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SERVİ POLENLERİNDE TANIMLANMIŞ ALERJENİK PEKTAT LİYAZIN BİYOTEKNOLOJİK ÜRETİMİ

Narmin MİRZAMAMMADLI

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Emine Şeküre Nazlı ARDA

Polen alerjisi dünyada ve ülkemizde insan sağlığını olumsuz etkileyen, ekonomik kayıplara neden olan ciddi bir sağlık sorunudur. Alerjenik polenler çoğunlukla üst solunum yollarını ve gözleri etkilese de astım gibi daha ciddi hastalıkları tetikleyebilir. Bu nedenle polen alerjisinde erken teşhis ve etkin tedavi büyük önem taşır. Son yıllarda tüm alerjik hastalıklar gibi polen alerjisi de hava kirliliği, küresel ısınma, yoğun kentleşme gibi çevresel faktörler nedeniyle dramatik bir şekilde artmıştır. Alerjik rinit ve konjonktivit gibi polen alerjilerinin tanı ve tedavisinde kullanılacak spesifik ve standardize yeni ürünlere acilen ihtiyaç duyulmaktadır. Rekombinant alerjenler, polen alerjisinin tanı ve tedavisinde umut vaat etmektedir.

Ağaç polenleri çok sayıda alerjen protein içerir. Galakturonik asit içeren polisakkarit zincirlerini parçalayan bir enzim olan ve servi (*Cupressaceae*) polenlerinde bulunduğu bilinen pektat liyaz alerjen proteinlerden biridir.

Bu çalışmada, yerel servi (*Cupressus sempervirens*) poleninde bulunan pektat liyazın (Cup s 1) *Escherichia coli*'de rekombinant olarak üretimi ile daha sonraki çalışmalarda ve uygulamalarda kullanılacak bir ürün elde edilmesi amaçlanmıştır. Plazmid (pQE-2) üretimi için *E. coli* DH5α ırkı, rekombinant protein üretimi için ise, *E. coli* BL21 (DE3) ırkı kullanılmıştır. Servi polenlerinden izole edilen total RNA'dan PZR ile cDNA kütüphanesi oluşturulmuş ve kalıp olarak cDNA'nın kullanıldığı RT-PZR ile histidin etiketli *Cup s 1* geni amplifiye edilmiş ve

plazmidle ligasyonu sağlanmıştır. pQE-2 plazmidi ve rekombinant plazmid ısı şoku yöntemi ile *E.coli*'ye aktarılmış ve transformant hücreler koloni PZR ile seçilerek çoğaltılmıştır.

Transformant hücreler 1 mM IPTG (izopropiltiyo-β-D-galaktopiranozid) içeren besi ortamında oğaltılmış, ardından çöktürülmüş ve homojenize edilmiştir. Rekombinant protein nikel afinite kromatografisi ile saflaştırılmış ve jel elektroforeziyle analiz edilmiştir. Saf rekombinant proteinin alerjenitesi Western blot analiziyle doğrulanmıştır.

Sonuç olarak tanıda veya immünoterapide kullanılma potansiyeli olan alerjenik servi poleni pektat liyazının biyoteknolojik üretimi başarıyla gerçekleştirilmiştir.

Ağustos 2021, 80 sayfa.

Anahtar kelimeler: Polen, polen alerjisi, *Cupressus sempervirens*, servi, pektat liyaz, rekombinant alerjen.



SUMMARY

M.Sc. THESIS

BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF ALLERGENIC PECTATE LYASE IDENTIFIED IN CYPRESS POLLENS

Narmin MİRZAMAMMADLI

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. Emine Şeküre Nazlı ARDA

Pollen allergy is a serious health problem that has negative effects on people's health and causes economic losses in the world and in our country. Although allergenic pollens mostly affect the upper respiratory tract and eyes, they can trigger more serious diseases such as asthma. Thus early diagnosis and effective treatment are of great importance in pollen allergy. In recent years, pollen allergy, like all allergic diseases, has increased dramatically due to environmental factors such as air pollution, global warming, and intense urbanization. There is an urgent need for specific and standardized new products to be used in the diagnosis and treatment of pollen allergies, such as allergic rhinitis and conjunctivitis. Recombinant allergens show promise in the diagnosis and treatment of pollen allergy.

Tree pollens contain many allergen proteins. Pectate lyase, an enzyme that breaks down polysaccharide chains containing galacturonic acid, found in cypress (*Cupressaceae*) pollens, is one of the allergenic proteins.

In this study, obtaining a product that will be used in further studies and applications was aimed by recombinant production of the pectate lyase (Cup s 1) found in local cypress (*Cupressus sempervirens*) pollen in *Escherichia coli*. DH5 α strain was used for plasmid (pQE-2) production, and *E. coli* BL21 (DE3) strain was used for recombinant protein production. A cDNA library was created by PCR from total RNA isolated from cypress pollen, and histidine-

labeled *Cup s 1* gene was amplified and ligated with plasmid by RT-PCR using cDNA as a template. Transfer of pQE-2 plasmid and recombinant plasmid to *E.coli* was performed by heat shock method and transformant cells were grown following their selection by colony PCR.

Transformant cells were grown in a medium containing 1 mM IPTG (“isopropylthio-β-D-galactopyranoside”) followed by precipitated and homogenized. The recombinant protein was purified by nickel affinity chromatography and analyzed by gel electrophoresis. The allergenicity of the pure recombinant protein was confirmed by Western blot analysis.

As a result, biotechnological production of allergenic cypress pollen pectate lyase, which has the potential to be used in diagnosis or immunotherapy, has been successfully achieved.

August 2021, 80 pages.

Keywords: Pollen, pollen allergy, *Cupressus sempervirens*, cypress, pectate lyase, recombinant allergen.

1. GİRİŞ

Alerjik hastalıklar (örn. alerjik rinit, alerjik konjoktivit, alerjik astım, ürtiker, ilaç alerjisi, böcek alerjisi, arı alerjisi, gıda alerjisi vb.) son yıllarda büyük bir artışa geçmiştir. İkibinli yılların başında yetişkinlerin yaklaşık %20'sinin ve okul çocuklarının yaklaşık üçte birinin alerji hastası olduğu rapor edilmiştir (Behrendt ve Becker, 2001; Gonzalez-Buitrago ve diğ., 2007). Alerjik rinit Dünya nüfusunun %10-30'unu etkilemekte, çevredeki yabancı proteinlere duyarlılık (IgE antikor yanıtı) yer yer daha da yüksek oranlara (%40) çıkmaktadır (Pawankar ve diğ., 2013).

Halk arasında saman nezlesi olarak bilinen, uzmanlarca mevsimsel alerjik rinit olarak adlandırılan polen alerjisi ilk olarak 1819'da Londra'daki Guy's Hastanesinde Dr. John Bostock tarafından tanımlanmış, 20. yüzyılda milyonlarca kişi mevsimsel alerjik rinit ve alerjik astım tanısı almıştır (Smith ve diğ., 2014; Corren, 2017). Polen alerjisi, bazı bitki polenlerinin (özellikle ağaç, çalı ve çimen polenlerinin) ilkbahar, yaz ve sonbahar aylarında bazı kişilerde yol açtığı alerjik reaksiyonlar sonucunda gelişen, başta burun ve gözlerin mukoza zarlarını etkileyen, genellikle burun akıntısı, burun tıkanıklığı ve gözlerde kaşıntı ve sulanma, burunda, iç kulakta ve damakta kaşıntı gibi semptomlar ortaya koyan bir aşırı duyarlılık reaksiyonudur (Skoner, 2001; Sánchez-Borges ve Greenberger, 2016; AAFA, 2021).

Başta küresel ısınma olmak üzere pek çok çevresel faktör polen alerjisini indüklemektedir (Haahtela ve diğ., 2013; Marselle ve diğ., 2019; D'Amato ve diğ., 2020). Polen alerjisi olan bireylerde bazı yiyeceklere karşı gıda alerjisi de gelişir ve bu alerji Avrupa'da en sık görülen gıda alerjisi haline gelmiştir (Bohle, 2007; D'Amato ve diğ., 2007; Stewart and Robinson, 2017).

Bugüne kadar, Dünya Sağlık Örgütü Alerjen Nomenklatürü'ne bitkisel kaynaklı (çimlerden, ağaçlardan ve yabani otlardan kaynaklanan) 483 alerjen kaydedilmiştir (WHO, 2021). Polenlerdeki alerjenlerin tanı ve tedavi açısından önemli olduğu bildirilmektedir (Pablos ve diğ., 2016). Bölgelere göre farklılık gösterebilmesine rağmen polen sezonu Ocak ayında servi (*Cupressus*), ardıç (*Juniperus*), mazı (*Thuja*) polenleri ile başlayıp Nisan ayında meşe (*Quercus*), huş ağacı (*Betula*), gürgen (*Carpinus*), kayın (*Fagus*), kestane (*Castanea*), fındık (*Corylus*), kızılâğaç (*Alnus*), Londra çınarı (*Platanus*), söğüt (*Salix*) ve kavak (*Populus*) polenleri ile devam eder. En fazla alerjik reaksiyona yol açan ağaçlar servi, kül ağacı

(*Fraxinus*), Londra çınarı ve huş ağacıdır. Alerjik hastalıklar bakımından en önemli servi türleri ise *Cupressus sempervirens* (Akdeniz servisi) ve *Cupressus arizonica* (mavi Arizona servisi)'dir (D'Amato ve diğ., 2007; Bıçakçı ve Tosunoğlu, 2019).

Alerji tanısında karşılaşılan en önemli sorunlardan biri bazı bireyler için spesifik alerjenin tam olarak belirlenememesidir. Bu belirsizlik özellikle polen kaynaklı alerjik rinit tanısında söz konusudur. Bunun nedeni tanı testlerinde kullanılan panellerin saf alerjen proteinlerden ziyade ekstrelerden oluşması, doğal kaynağının da testin yapıldığı değil üretildiği ülkedeki polenler olmasıdır. Daha başarılı ve güvenilir sonuçlar almak için tanının yerel kaynaklardan izole edilen saf alerjenlerle yapılması gerektiği öne sürülmektedir. Geliştirilmiş polen ekstraktlarının kullanımıyla hiposensitizasyonun giderek daha fazla reçete edildiği bildirilmiştir (Ford ve diğ., 1991). Spesifik alerjenin tam olarak belirlenememesi tedaviyi de güçleştirmektedir. Hastalığı ortadan kaldırmaya yönelik olarak uygulanan spesifik immünoterapi, bireyin alerjik yanıtını ortadan kaldırmaya çalışmak için, hastaya belli bir süre boyunca artan miktarda ham alerjen ekstraktlarının uygulanmasını içerir. Bu terapi, hastaların %30-%39'unda etkisizdir ve nadiren de olsa istenmeyen ve hatta bazen hayatı tehdit eden yan etkiler gösterebilir. İmmünoterapi enjeksiyonlarında tedavinin etkinliğini artırmak ve olumsuz yan etkileri azaltmak için ham alerjenlerin yerine, rekombinant DNA teknolojisi ile üretilmiş rekombinant alerjenlerin kullanılabileceği ileri sürülmektedir (Løwenstein ve Larsen, 2001; Jutel ve diğ., 2012).

Bu çalışma, Akdeniz servisi (*Cupressus sempervirens*)'nin polenlerinde bulunduğu bilinen alerjenik pektat liyaz proteininin *E.coli*'de rekombinant olarak üretimini amaçlamaktadır. Yerel polendeki alerjenik pektat liyazın rekombinant olarak bol miktarda üretilmesi, bu proteinin özelliklerini keşfetmek ve gelecekte tanı ve immünoterapi araçları olarak kullanmak için önemli bir adım oluşturmaktadır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. ALERJİ

Alerjik hastalıklara atfedilebilecek bazı semptomlar Antik çağlara kadar uzanan eski kaynaklarda karşımıza çıkmaktadır (Epöztürk ve Görkey, 2018). Bu kaynaklara göre Roma Julio-Claudian hanedanının üç üyesinin (Augustus, Claudius ve Britannicus) aile geçmişinde atopi olduğundan şüphelenilmektedir (Epöztürk ve Görkey 2018). "Alerji" kavramını ilk kez Avusturyalı çocuk doktoru Clemens Pirquet'in 1906'da at serumu veya çiçek aşısı enjeksiyonu yapılan hastaların genellikle ikinci enjeksiyonlara karşı daha şiddetli reaksiyon verdiklerini fark etmesinden sonra kullanmıştır (Ring, 1985). Pirquet bu fenomeni (alerji) antik Yunanca'da "diğer" anlamına gelen "ἄλλος-allos" ve "iş" anlamına gelen "εργον-ergon" sözlerini birleştirerek ifade etmiştir (Pirquet, 1906). Günümüzde de bağışıklık sisteminin herhangi bir maddeye karşı gösterdiği aşırı duyarlılık reaksiyonlarını içeren bir kavram olarak kullanılmaktadır. Alerjik hastalıklar modern toplumların önemli sağlık sorunları arasında yer almaktadır ve nüfusun yaklaşık %25'ini olumsuz etkilemektedir (Behrendt ve Becker, 2001; González-Buitrago ve diğ., 2007). Alerji, vücudun, normalde zararsız olan maddelere karşı gösterdiği anormal yanıt olarak tanımlanabilir. En yaygın alerjenlerden bazıları toz, böcekler, çeşitli gıdalar ve polenlerdir. Hava yoluyla vücuda giren polenlerin yol açtığı alerjiler polinozis olarak da bilinir. Coğrafi bölge, iklim ve çevre koşulları polenlerin yapıları, havadaki miktarları, histokimyasal özellikleri ve alerjenitelerindeki önemli faktörlerdendir (D'Amato ve diğ., 2007). Son 150 yılda çevre, beslenme, su kalitesi ve kişisel davranışlardaki değişiklikler alerjik hastalıkların özgülüğünün yanı sıra yaygınlık ve şiddetinde de baskın bir rol oynamıştır. Rüzgar ve fırtınalar da polenlerin alerjenik bileşenlerinin atmosfere salınmasına neden olabilir, polen mevsiminde alerjik rinit ve astımın tetikleyici faktörleri olarak görev yapar (D'Amato ve diğ., 2018) Hava kirleticileri ve çevresel faktörler, alerjen konsantrasyonunu ve astımın şiddetini etkileyen ana faktörlerdir (Brandt ve diğ., 2015; Cecchi ve diğ., 2018). Hava sıcaklığı ve CO₂'in artışı da doğrudan ve/veya dolaylı olarak polen üretimini ve dağılımını etkilemektedir (Smith ve diğ., 2013; Stinson ve diğ., 2016).

Polen, mukoza ile temas ettiğinde açığa çıkan suda çözünebilir proteinler içerir. Alerjik kişilerde, bağışıklık sistemi, aslında zararsız olan proteinlere tepki olarak IgE antikorları üretir. Bu antikorlar, vücudun mast hücreleri olarak bilinen savunma hücrelerine bağlanır ve daha sonra histamin gibi anti-enflamatuar maddeler salgılanır. Histamin ve diğer haberci maddeler başka salgı bezlerini uyararak ve sinirleri tahriş ederek kaşıntıya, hapşırmaya ve mukoza zarlarının şişmesine ve kızarmasına neden olan damar genişlemesine (vazodilatasyona) yol açar (Zuberbier, 2016).

2.2. ALERJİK REAKSİYON TİPLERİ

Alerjik reaksiyonlar Gell ve Coombs sınıflandırmasına göre 4 türe ayrılmıştır (Gell and Coombs, 1963):

Tip I alerjik reaksiyonlar (ani aşırı duyarlılık) IgE aracılıdır (Şekil 2.1). Antijen, doku mast hücrelerine ve kan bazofillerine bağlı olan IgE'ye bağlanır, önceden oluşturulmuş aracılardan (örn., histamin, proteazlar, kemotaktik faktörler) ve diğer aracılardan (örn., prostaglandinler, lökotrienler, trombosit aktive edici faktör, sitokinler) sentezini tetikler. Bu aracılar vazodilatasyona, artmış kılcal geçirgenliğe, mukus hipersekresyonuna, düz kas spazmına ve eozinofiller, tip 2 yardımcı T hücreleri (TH2'ler) ve diğer enflamatuar hücreler ile doku infiltrasyonuna neden olur. Tip I alerjik reaksiyonlar, antijene maruz kaldıktan sonra 1 saatten daha kısa sürede gelişir (Delves, 2020).



Şekil 2.1: Tip I alerjik reaksiyon; ani aşırı duyarlılık (anafilaktik reaksiyon) (Mills, 2010).

Tip I aşırı duyarlılık reaksiyonları, tüm atopik bozuklukların (örn., atopik dermatit, alerjik astım, rinit, konjonktivit) ve birçok alerjik bozukluğun (örn., anafilaksi, anjioödem, ürtiker, lateks ve bazı gıda alerjileri) temelini oluşturur. Atopi ve alerji terimleri genellikle birbirinin yerine kullanılır, ancak farklıdır:

Atopi, abartılı bir IgE aracılı bağışıklık tepkisi; tüm atopik bozukluklar tip I aşırı duyarlılık reaksiyonlarıdır. Alerji, mekanizmaya bakılmaksızın yabancı bir antijene abartılı bir bağışıklık tepkisidir.

Bu nedenle, tüm atopik bozukluklar alerji olarak kabul edilir, ancak birçok alerjik bozukluk [örn., HP (hipersensitivite pnömonisi)] atopik değildir. Alerjik bozukluklar insanlar arasında en sık görülen bozukluklardır.

Atopik bozukluklar en sık burun, gözler, deri ve akciğerleri etkiler. Bu bozukluklar arasında konjonktivit, ekstrinsik atopik dermatit (en yaygın egzama türü), immün aracılı ürtiker, immün aracılı anjiyoödem, akut lateks alerjisi, bazı alerjik akciğer bozuklukları bulunmaktadır (Delves, 2020).

Tip II sitotoksik reaksiyonda, antikor, kompleman aktivasyonu yoluyla hücre lizisini indüklemek için hücre zarına bağlı antijen ile doğrudan reaksiyona girer (Şekil 2.2). Bu antijenler, otoimmün reaksiyonlarda olduğu gibi içsel veya "öz" veya dışsal veya "kendinden olmayan" olabilir. Sitotoksik reaksiyonlara IgG ve IgM aracılık eder. Sitotoksik reaksiyon örnekleri, yenidoğanın Rh uyumsuzluğu, kan transfüzyon reaksiyonları ve pemphigus vulgaris ve büllöz pemfigoid gibi otoimmün deri hastalıkları, otoimmün hemolitik anemi ve Goodpasture sendromu (Mills, 2010), organ nakli hiperakut greft reddi, Coombs-pozitif hemolitik anemi, Hashimoto tiroidi bulunur (Delves, 2020).



Şekil 2.2: Tip II alerjik reaksiyon: sitotoksik reaksiyon (Mills, 2010).

Tip III aşırı duyarlılık, immün kompleks reaksiyonları olarak da bilinir ve IgG, IgM ve bazen IgA antikorlarını içerir (Şekil 2.3). Bu bağışıklık komplekslerinin birikmesi, polimorfonükleer lökositlerin (PMN'ler) kemotaksisine yol açan ve sonunda doku hasarına neden olan kompleman sistemi aktivasyonu ile sonuçlanır. Tip III bozuklukları arasında serum hastalığı, sistemik lupus eritematozus (SLE), romatoid artrit (RA), lökositoklastik vaskülit, kriyoglobulinemi, akut hipersensitivite pnömoniti ve çeşitli glomerülonefrit bulunur (Abbas ve diğ., 2021).

Tip III reaksiyonlar antijene maruz kaldıktan 4 ila 10 gün sonra gelişir ve antijene maruz kalma devam ederse kronikleşebilir.



Şekil 2.3: Tip III alerjik reaksiyon: bağışıklık kompleks reaksiyonu (Mills, 2010).

Tip IV alerjik reaksiyonlara (gecikmiş aşırı duyarlılık) T hücresi aracılık eder (Şekil 2.4).

Belirli bir antijenle temastan sonra hassaslaştırılmış T hücreleri, sürekli maruz kalma veya antijene yeniden maruz bırakma yoluyla aktive edilir; direkt toksik etkiler veya eozinofiller, monositler ve makrofajlar, nötrofiller veya doğal öldürücü hücreleri aktive eden sitokinlerin salınması yoluyla dokuya zarar verirler.

Tip IV alerjik reaksiyonları içeren hastalıklar arasında kontakt dermatit (örn., zehirli sarmaşığa karşı), subakut ve kronik aşırı duyarlılık pnömonisi, allogreft reddi, tüberküloza bağışıklık yanıtı ve birçok ilaç aşırı duyarlılığı bulunur (Delves, 2020).



Şekil 2.4: Tip IV alerjik reaksiyon: hücre aracılı (gecikmeli) aşırı duyarlılık (Mills, 2010).

2.3. ALERJİDE RİSK FAKTÖRLERİ

Alerjide bireye bağlı en önemli risk faktörleri kalıtım, cinsiyet, ırk ve yaş olup alerjenlere maruz kalma en etkili çevresel faktör olarak tanımlanmaktadır; çevre kirliliği, pasif içicilik ve solunum yolu enfeksiyonları da özellikle bronşiyal ataklar ile astım krizlerinin sayısını ve şiddetini arttırabilir (De Swert, 1999).

Alerjen polenlerin havadaki dağılımı esas olarak coğrafi bölgeye ve mevsime bağlıdır (Cecchi, 2013). Örneğin, Çin’de alerjik rinit ve astıma yol açan polenlerin başında *Artemisia* cinsine ait bitkilerin polenleri gelir (Tang ve diğ., 2015). Kuzey Çin’de sonbahar mevsiminde alerjik astımı en çok yabancı pelin otu (*Artemisia vulgaris*) ve Japon buğdayı (*Humulus japonicus*) polenleri indükler (Yin ve diğ., 2005).

Polenlerdeki alerjenlerin havaya salınımına neden olan en az üç çevresel faktör vardır: yüksek bağıl nem, şiddetli yağmur ve kirleticiler. Nemli havalarda, fizyolojik tozlaşma koşullarına benzer bir süreç yaşanır ve polen tanelerindeki alerjenler dışarıya salınır. Polenler yüksek nemli bir ortamda daha küçük polen partiküllerine ayrılarak alt solunum yollarına kolayca ulaşır ve astımı indükler (D’Amato ve diğ., 2017). Nadiren de olsa, polen taneleri fırtına gibi olumsuz hava şartlarına bağlı ozmotik şokun etkisiyle patlayabilir ve alerjen içeren partiküller havaya

saçılabilir. Bu nedenle, şiddetli yağışlar ve fırtınalar astım krizleri için önemli bir risk faktörü olarak öne sürülmüştür (Anto ve Sunyer, 1997; Suphioglu, 1998; D'Amato ve diğ., 2018). Nitekim Dünyada fırtınaya bağlı astım salgınları yaşanmıştır ve en şiddetlilerinden biri de 2016 yılında Melbourne'de (Avustralya) meydana gelmiştir (Andrew ve diğ., 2017). Fırtına-astım salgınları, fırtınaların başında, hastane acil servislerinde astım ziyaretlerinin hızlı bir şekilde artmasıyla karakterize edilir (D'Amato ve diğ., 2016).

İklim değişikliği (özellikle aşırı hava olayları, sıcaklık ve hava düzenlerinin değişimi), kentleşme, biyolojik çeşitlilik kaybı gibi birçok faktör, polen kaynaklı alerjik astımın morbiditesinde artışa katkıda bulunmaktadır (D'Amato ve diğ., 2016). Son 20 yılda hava sıcaklığı ile havadaki CO₂'in artışı doğrudan ve/veya dolaylı olarak bezelye polenlerinin üretimini ve dağılımını etkilemektedir (Smith ve diğ., 2013; Stinson ve diğ., 2016). Ozon ve NO₂ gibi havadaki gazların da mevsimsel alerjik riniti ve astımı tetiklediği bilinmektedir (D'Amato ve diğ., 2005). Hava kirliliği (kapalı alanlarda yemek ve temizlik ürünlerinin buharları, evcil hayvan tüyleri, küf sporları, sigara dumanı, toz akarları vb.; açık alanlarda egzoz gazları, endüstriyel atıklar, fosil yakıtlar ve yangınlara bağlı yoğun duman) astım şiddetini artıran çevresel faktörlerdendir (Takizawa, 2011; Brandt ve diğ., 2015; Cecchi ve diğ., 2018).

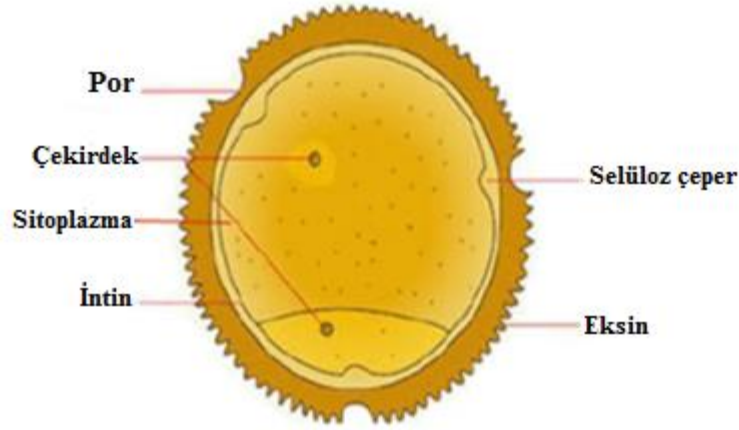
2.4. POLEN ALERJİSİ

Yukarıda da belirttiğimiz gibi polen alerjisi ilk kez 1819'da doktor John Bostock tarafından tanımlanmıştır (Bostock, 1819) ve şu ana kadar 150'den fazla polen alerjisinin otlardan, ağaçlardan ve yabani otlardan kaynaklanan alerjik bir süreçte önemli bir rol oynadığı kabul edilmektedir (Allergen Nomenclature, 2021).

Mevsimsel alerjik rinit, polen alerjisi veya saman nezlesi olarak da bilinen polinoz, polen bileşenlerine karşı duyarlılığın sonucudur. Polen alerjenleri, daha önce hassaslaşmış bireylerin hava yolu mukozası ve konjonktivası ile temas ettikten sonra klinik semptomlara yol açar. Charles Blackley, 1873'te hastalık etiyolojisini doğrulayan deri ve provokasyon testlerini tanıtarak polen ve pollinosis arasındaki ilişkiyi doğruladı (Knox, 1979). Polinozun önemli bir özelliği, semptomların genellikle yılın aynı zamanında (tozlaşma sırasında) yıllık periyotlar halinde ortaya çıkmasıdır. Örneğin, Güney Brezilya'da semptomlar genellikle Eylül ayında başlar ve Ekim ve Kasım aylarında kötüleşir, bazı durumlarda Aralık ve Ocak'a kadar sürer. Polen duyarlılığı olan bazı hastalarda, çoğunlukla evlerde bulunan alerjenlere bağlı olarak,

polen salma mevsiminden önce ve sonra alerji semptomları gözlenir (Vieira, 2003). Polen alerjenlerine duyarlılık, ev tozu akarı (*Dermatophagoides pteronyssinus*) alerjenleri, mantarlar ve hayvan ve hamamböceği epiteli gibi diğer çok yıllık alerjenlere karşı duyarlılıkla ilişkili olarak ortaya çıkabilir. Bu nedenle semptomlar sadece ilkbaharda veya polen mevsiminde değil yıl boyunca ortaya çıkabilir, fakat semptomlar ilkbaharda daha kötüdür (Taketomi ve diğ., 2006).

Polen tanesi çiçekli bitki yaşam döngüsünün bir parçasıdır ve çiçekli bitki erkek gametlerini barındıran özel bir yapıdır. Biyolojik işlevi dişi gametofiti dölemektir. Doğadaki polenler çeşitli şekillere (çoğunlukla bir kürenin varyasyonları) ve boyutlara (12 ila 300 mm çap) sahiptir. Dış duvar (ekzin) sporopoleninden oluşur. Ekzin, polenin fiziksel ve kimyasal gücü için önemlidir ve germ açıklığı boyunca polen tanesini kaplar. Ekzinden farklı olarak, iç duvar veya intin pürüzsüzdür ve polen tanesini şekillendirmede yapısal destek görevi yoktur. İntin, bitkisel ve germ çekirdekleri, nişasta taneleri ve indirgenmiş polisakkarit partikülleri dahil olmak üzere hücre içi organelleri içeren polen sitoplazmasını çevreler.



Şekil 2.5: Polen Tanesinin Yapısı (<https://www.meritnation.com/ask-answer/question/briefly-explain-the-structure-of-pollen-grains/sexual-reproduction-in-flowering-plants/12534869>).

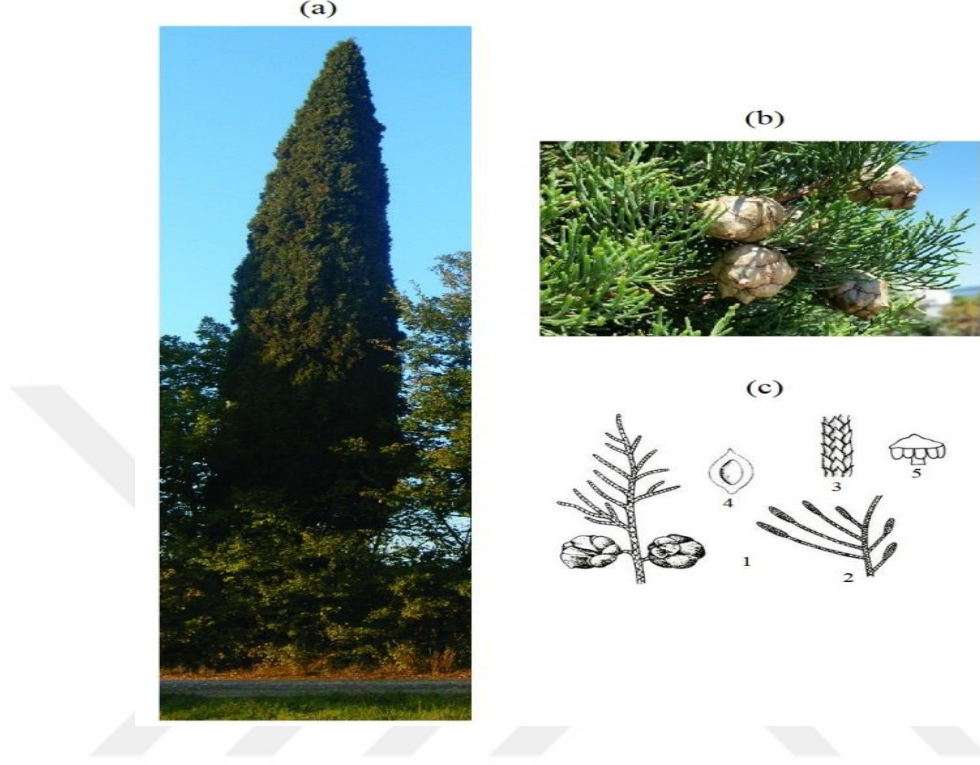
Kuru bir atmosferde polen yüzyıllarca stabil kalabilir. Anemofil polen (rüzgar aracılı tozlaşmanın gerçekleştiği) alerjenik öneme sahiptir. Genel olarak, bir polen tanesi 10 metre/saniye hızla 175 kilometre uzağa taşınabilir ve durgun havada yaklaşık 3.1 cm/saniye ortalama hızla çöker (Stanley ve Linskens, 1974).

Polen alerjenleri, çoğunlukla suda çözünebilen proteinler veya glikoproteinlerdir, bu da onları biyolojik olarak kolayca erişilebilir kılar ve saniyeler içinde bir IgE antikor aracılı alerjik reaksiyonu uyandırma yeteneğine sahiptir. Son yıllarda lipofilik alerjenler de tanımlanmıştır (Jappe ve diğ., 2019). Alerjenik partiküller, en az iki mekanizma ile sitoplazmadan atılır. İlk mekanizmada, polen tanesi izotonik bir ortamda mukoza ile doğrudan temas ettiğinde alerjenler hızla yayılır ve konjonktiva ve burun gibi erişilebilir mukoza yüzeylerinde ani alerjik semptomlara yol açar. İkinci mekanizmada, hipotonik bir ortam (yağmur suyu gibi) polen tanesinin hidrasyonuna neden olur. Dolayısıyla, küçülen polen tanesi alt solunum yollarına kolay ulaşan ve astımı indükleyen alerjen maddeleri dışarı atar (Suphioglu, 1998).

2.5. *Cupressus sempervirens*

Cupressus sempervirens (Akdeniz servisi) *Cupressaceae* (Servigiller) familyasında yer alan bir servi türüdür. *Cupressus* adı, Latince'den gelmektedir. *C. sempervirens*, Afrika'nın kuzeyi, Akdeniz'in doğusu, Asya'nın batısı ve Hazar Denizi'nin güneyinde yayılış gösterir (Hortus, 1976; Kavgacı, 2018). Konik taç ile 35-40 m boyunda bir süs ağacıdır. Her dem yeşil ağaç ve ağaççık halinde, yaprakları pul şeklinde odunsu bitkilerdir. Sürgünleri dört köşeli ya da yuvarlakça, ender olarak yassı görülür. Tohum konileri oval veya 10-14 pullu dikdörtgen, erkek koniler 3-5 mm uzunluğundadır (Vidakovic, 1991; Waisel ve Epstein, 2000). Türün *C.sempervirens* var. *sempervirens* (dalları tepeye doğru sütun şeklinde daralır) ve *C.sempervirens* var. *horizantolis* (dalları yanlara doğru açılır) isimli iki varyetesi vardır (Kavgacı, 2018). *Cupressaceae* familyasındaki ağaçlar Akdeniz bölgesinde geniş bir alanda yayılmıştır. Hızlı büyürler, su ihtiyaçları düşüktür. Ayrıca sebze ve meyve üretimi yapılan yerlerde bitkileri korumak için rüzgar kırıcı olarak kullanılırlar. Süs kentsel ve şehirlerarası plantasyonlar gibi diğer kullanımlar Akdeniz manzarasını şekillendirir. Başka hiçbir bitkinin çiçeklenmediği kış aylarında polenlerini çok yüksek miktarlarda salar; polen spektrumunun yaklaşık %70'ini (Guardia ve diğ., 2006) bu polenler oluşturur ve polinoza neden olur (D'Amato ve Liccardi, 1994; Papa ve diğ., 2001). Avrupa'da servi polenine karşı alerji geliştiği çok geç fark edilmiştir (Charpin ve diğ., 2005). Ancak 1950'lerin sonunda, Güney Fransa'da çalışan Fransız alerji uzmanları, tozlaşma mevsimi boyunca atmosfere salınan çok miktarda polen

tanenin neden yüksek hassasiyet ve alerjik semptomlarla ilişkili olduğunu anlamışlardır (Charpin ve diğ., 1957; Charpin ve diğ., 1955).



Şekil 2.6: Bir Akdeniz servisinin (*Cupressus sempervirens* var. *sempervirens*) (a) Genel görünümü (Moricca ve diğ., 2018); (b) Dal ve kozalakları (Kavgacı, 2018-Ünal Akkemik tarafından fotoğraflanmıştır); (c) Bitki kısımlarını gösteren çizim (Joshi, 2021), 1- Dişi konili verimli dal; 2- Erkek konili verimli dal; 3- Yaprak dizilimini gösteren dal; 4- Tohum; 5- Mikrosporofil.

Son yıllarda *Cupressaceae* familyası bitkileri, fiziksel bariyer veya süs motifleri olarak kullanılmaları nedeniyle güçlü bir coğrafi genişleme geçirmektedir. Bu nedenle *Cupressaceae* familyasındaki ağaç türlerinin polenleri dünyanın birçok bölgesinde polen alerjisinin önemli bir nedeni olmaya başlamıştır. Akdeniz ülkelerinde *Cupressaceae* polenlerinin prevalansı pollinoz vakalarının %30'una kadar ulaşabilmektedir (Bousquet ve diğ., 1984; Panzani ve diğ., 1986; Dubus ve diğ., 2000; Charpin ve diğ., 2013). *Cupressaceae* alerjisi olan hastalar, diğer polinozlardan farklı klinik özellikler gösterirler: baskın semptom, bazen konjonktivit ile ilişkili rinit iken, astım insidansı diğer polen alerjilerinden daha azdır; hastalar genellikle düşük spesifik IgE seviyelerine sahiptir ve diğer polinozlardan daha hafif semptomlar geliştirirler (Bousquet ve diğ., 1993; Di Felice ve diğ., 2001). *Cupressus sempervirens*'deki majör alerjen,

Cup a 1 ile yüksek bir homolojiyi paylaşan, saflaştırılmış (Monsalve ve diğ., 2003) ve klonlanmış (EBI erişim numarası AF7257491) Cup s 1 adlı 43 kDa'lık bir proteindir (Ford ve diğ., 1991).

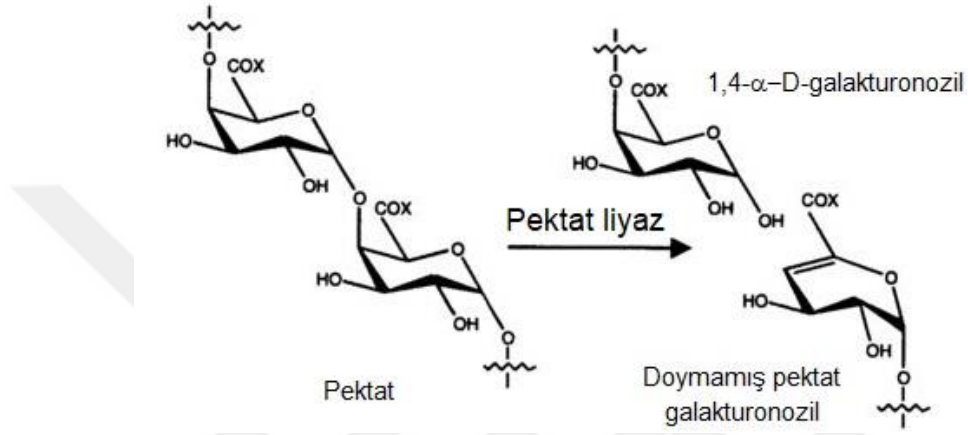
2.6. PEKTAT LİYAZ (PL)

Pektat liyaz alerjenleri, galakturonik asit içeren polisakkarit zincirlerini parçalayan ve polisakkarit liyazlar olarak adlandırılan bir enzim sınıfında yer alır. Genel olarak, polisakkarit liyazlar, alerjik pektat liyazların aile 1'de (PL1) kümelendiği 23 familyaya ayrılır. PL1 enzimleri tüm canlı gruplarında bulunabilir; ancak, çoğu liyaz mikrobiyal kökenlidir (www.cazy.org). Daha yüksek bitkilerde pektat liyazlar meyve olgunlaşmasında rol alırlar (Payasi ve Sanwal, 2003). Polende doku onarımında ve polen tüpü büyümesinde rolleri vardır (Wing ve diğ., 1989; Taniguchi ve diğ., 1995). Şimdiye kadar 11 bitki türü ve 2 mantarın poleninde alerjenik pektat liyaz tanımlanmış ve birçoğu alerjen adlandırma veri tabanında (www.allergen.org) listelenmiştir (Tablo 1).

Tablo 2.1: Pektat liyaz enziminin bulunduğu türler.

PEKTAT LİYAZIN BULUNDUĞU TÜRLER	ALERJEN ADI	MOLEKÜLER AĞIRLIKLARI
<i>Ambrosia artemisiifolia</i> (Kısa kanarya otu)	Amb a 1	38 kDa
<i>Artemisia vulgaris</i> (Misk otu)	Art v 6	44 kDa
<i>Chamaecyparis obtusa</i> (Japon servisi)	Cha o 1	47 kDa
<i>Cryptomeria japonica</i> (Japon sediri)	Cry j 1	41-45 kDa
<i>Cupressus arizonica</i> (Arizona servisi)	Cup a 1	43 kDa
<i>Cupressus sempervirens</i> (Servi)	Cup s 1	43 kDa
<i>Helianthus annuus</i> (Ayçiçeği)	Hel a 6	42 kDa
<i>Juniperus ashei</i> (Dağ sediri)	Jun a 1	43 kDa
<i>Juniperus virginiana</i> (Doğu kırmızı sedir)	Jun v 1	43 kDa
<i>Prunus dulcis</i> (Badem)	Pru du 10	60 kDa
<i>Penicillium citrinum</i> (Mantar)	Pen c 32	40 kDa

PL'ler, bitkiler ve genelde patojenik mikroorganizmalar tarafından üretilen pektin parçalayıcı enzimlerdir. PL'ler, pektat transeliminazlar olarak da bilinen alkalik pektinazlardır. 4,5-doymamış çift bağlı oligogalakturonatlar üreterek β -eliminasyon yoluyla galakturonosil kalıntıları arasındaki $\beta(1-4)$ bağlarını rastgele ayırırlar (Marín-Rodríguez ve diğ., 2003; Abbott ve diğ., 2010) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7: Pektat liyazın katalizlediği reaksiyon (Solbak ve diğ., 2005).

PL'ler ayrıca bitki hücre duvarını ve dokularını mantar hastalıklarında meydana gelene benzer bir şekilde yumuşatabilir ve parçalayabilir (Collmer ve Keen, 1986). PL'ler için ana substratın, α -1,4 bağlantılı galakturonik asit (GalpA) birimlerinden oluşan homogalakturonan (HG) olduğu düşünülmektedir (Tardy ve diğ., 1997).

PL benzeri diziler ilk olarak yüksek bitkilere ait polenlerde rapor edilmiştir (Wing ve diğ., 1989). PL aktivitesi ilk olarak *Erwinia carotovora* ve *Bacillus* sp.'de bulunmuştur (Starr ve Moran, 1962). PL proteinleri o zamandan beri saflaştırılmakta ve mikrobiyal organizmalarda karakterize edilmektedir (Dubey ve diğ., 2016). Bitki ekstraktlarındaki PL aktivitesinin ölçülmesi zor olmuştur (Besford ve Hobson, 1972). Aslında, PL'leri kodlayan genler, çok çeşitli bitki türlerinde bitki gelişiminin hemen hemen tüm aşamalarında ifade edilir, ancak bitki gelişimindeki rolleri hala tam olarak anlaşılamamıştır. *Erwinia* genusundaki bakterilerin PL'leri ile dizi benzerliğine sahip iki genin, olgun domates çiçekleri, anterler ve polenlerde de yüksek seviyelerde olduğu belirtilmiştir. O zamandan beri, polen, anterler ve pistillerde benzer birçok dizinin ifade edildiği gösterilmiştir (Kulikauskas ve McCormick, 1997) ve bir Japon sedir polen alerjeninin pozitif PL aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur (Taniguchi ve diğ., 1995). Polende

PL için önerilen fonksiyonlar arasında, polen tüpünün ortaya çıkmasını sağlamak için polen hücre duvarının ilk gevşemesi ve polen penetrasyonunu kolaylaştıracak tarzda verici doku hücre duvarının büyümesi ve parçalanması bulunmaktadır (Taniguchi ve diğ., 1995; Wu ve diğ., 1996).

Başlıca *Cupressaceae* alerjenleri Akdeniz servisinden (*Cupressus sempervirens*) Cup s 1 (Charpin ve diğ., 2005), Arizona servisinden (*Cupressus arizonica*) Cup a 1 (Aceituno ve diğ., 2000), Japon sedirinden (*Cryptomeria japonica*) Cry j 1 (Sone ve diğ., 1994), Dağ sedirinden (*Juniperus ashei*) Jun a 1 (Midoro-Horiuti ve diğ., 1999), pektat liyaz protein ailesinin üyeleridir.

2.7. REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ

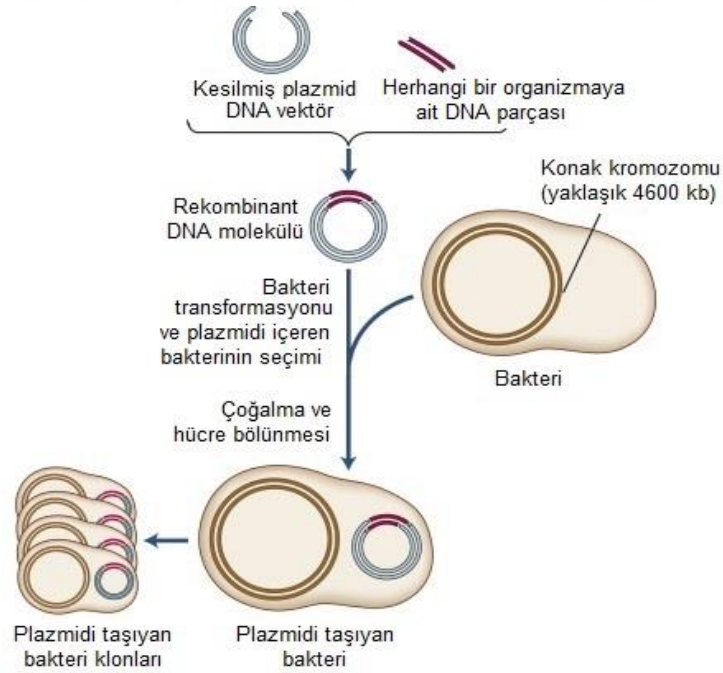
Genetiği değiştirilmiş organizmalar üretmek için rekombinant (r-)DNA teknolojisinin kullanımı, 1970'lerin başında, aynı *Escherichia coli* türünün bakterileri arasında öncü gen transferiyle başlamıştır (Cohen, 1973). Bu başarılı pilot deneylerin ardından, 1978'de Cohen ve arkadaşları, bir insülin sentez genini bir *E. coli* plazmidine aktarmayı başarmışlar ve ilk genetiği değiştirilmiş organizmayı (GDO) üretmeyi başarmışlardır (Beardmore ve Porter, 2003). Bu plazmidi taşıyan hücrelerde çoğalarak rekombinant molekülün birçok kopyasını yaratmıştır (Rogers, 2018). 1982'de bu protokol, ulusal ilaç düzenleyici otoritelerinden, özellikle ABD Gıda ve İlaç İdaresi'nden tam onay almış ve böylece, kan şekeri seviyelerini düzenleyen ve pankreastaki beta hücreleri tarafından doğal olarak yapılan bir hormon olan insan insülininin ekonomik olarak uygun kitlesel üretimini mümkün kılmıştır. Bu gelişme yeterli insülini üretemeyen veya glukozu metabolize edemeyen tip 1 ve tip 2 diyabetli hastalara uygun bir fiyatla ve kolayca insüline ulaşabilme kolaylığı sağlamıştır (Johnson, 1983). Boyer ve Cohen daha sonra rekombinant plazmidlerin üretimi için yeni yöntemler geliştirmişlerdir. 1976'da Boyer, Robert A. Swanson ile birlikte Boyer ve Cohen'in rekombinant DNA teknolojisini ticarileştiren Genentech şirketini kurmuştur (Rogers, 2018).

Rekombinant DNA teknolojisi, iki farklı türden DNA moleküllerinin bir araya getirilmesidir. Birleştirilerek yeniden oluşturulan (rekombinant) DNA molekülü, bilim, tıp, tarım ve endüstri için değerli olan yeni genetik kombinasyonlar üretmek için bir konak organizmaya yerleştirilir. Genetiğin odak noktası gendir, temel genetikçilerinin amacı genleri izole etmek, karakterize

etmek ve manipüle etmektir. Rekombinant DNA teknolojisi klonlama ve DNA dizilimi olmak üzere iki farklı teknolojiye dayanır.

Klonlama, ilgili belirli bir genin veya DNA dizisinin klonunu elde etmek için yapılır. Klonlamadan sonraki adım, o klonu geniş bir klon koleksiyonu (kütüphane) içinde yer alan diğer üyeleri arasında bulmak ve izole etmektir. Bir DNA segmenti klonlandıktan sonra nükleotid dizisi de belirlenebilir (Griffiths, 2020).

Prosedür, bir DNA fragmanının küçük bir DNA molekülüne (vektör) sokulması ve daha sonra bu molekülün bakteri gibi basit bir canlı hücre içinde çoğalmasına izin verilmesiyle gerçekleştirilir. En yaygın olarak kullanılan vektörler plazmidler (bakterilerde bulunan dairesel DNA molekülleri), virüsler ve maya hücreleridir. Plazmidler ana hücresel genomun bir parçası değildir, ancak konakçı hücreye ilaç direnci, çiftleşme yeteneği ve toksin üretimi gibi yararlı özellikler sağlayan genler taşıyabilirler. Deneysel olarak kolayca manipüle edilebilecek kadar küçüktürler ve ayrıca, onlara eklenmiş ekstra dizileri taşıyabilirler. Plazmid vektörlerle rekombinant DNA moleküllerinin oluşturulmasında izlenen deneysel süreç Şekil 2.8’de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.8: Plazmid vektörler aracılığıyla bir rekombinant DNA molekülünün oluşturulması (Rosenberg and Rosenberg, 2012).

2.8. REKOMBİNANT ALERJENLER

Rekombinant alerjenlerin tarihi, alerjen klonlama üzerine ilk yayınlarla başlamıştır. Ocak 1988'de, ev tozu akarı alerjeni Der p 1'i kodlayan cDNA dizisi Avustralya'da keşfedilmiş ve ilk tamamlanmış alerjen dizisi olarak dünya çapında yayınlanmıştır (Chua ve diğ., 1988). Antijen 5 olarak adlandırılan ve Dol m 5 olarak gösterilen beyaz yüzlü eşekarısı *Dolichovespula maculata*'nın ana alerjen dizisi, Şubat 1988'de New York'ta klonlanmış ve Fang ve meslektaşları tarafından yayınlanmıştır (Fang ve diğ., 1988). Bir sonraki yıl 1989'da ilk kez bir bitki alerjeninin - huş ağacı polen alerjeni Bet v 1'in cDNA'sının, Avusturya'da keşfi gerçekleştirilmiştir (Breiteneder ve diğ., 1989). Bu 3 alerjenin ortak noktası, *E. coli* bakterisindeki ifade edilmiş olmalarıdır ve ilk rekombinant alerjenler olarak kabul edilebilirler. Biyoteknolojik üretimi gerçekleştirilen ilk mantar alerjeni *Aspergillus fumigatus*'tan Asp f 1 (Arruda, 1990), ilk hayvan alerjeni evcil kediden Fel d 1, (Morgenstern, 1991) ve ilk bitkisel gıda alerjeni yer fıstığından Ara h 1 (Burks, 1995)'dir. Alerjenlerin kristal haldeki ve çözeltideki yapıları hakkındaki bilgilerin çoğu rekombinant alerjenlerden elde edilmiştir (Tschepp ve Breiteneder, 2017). Geleneksel alerjen özleri, doğal alerjen kaynaklarından hazırlanır ve buna bağlı olarak mevcut teknik araçlarla üstesinden gelinemeyecek kadar çok sayıda dezavantaja sahiptir (Benson ve diğ., 2000). Rekombinant alerjenler, doğal alerjenlerin özelliklerini tam olarak taklit eden moleküller olarak üretilir. Geleneksel alerji aşılı da alerjenlerin ve alerjenik olmayan materyallerin oldukça kaba karışımlarını temsil eden alerjen ekstraktlarından hazırlanmaktadır (Breiteneder, 1989). Tanımlanmış alerjenlerin rekombinant formda mevcudiyeti, alerjene özgü immünoterapiyi çeşitli yönlerden etkilemiştir. Rekombinant alerjenlerin geleneksel alerjen ekstraktlarına göre avantajları şöyledir (Cantillo ve Puerta, 2013):

- Avantajlı özellikleri geliştirmek için değiştirilebilen tanımlanmış fizikokimyasal ve immünolojik özelliklere sahip molekülleri temsil ederler.
- Miktarlar, kütle birimleri bazında kolayca kontrol edilebilir.
- Saf molekülleri temsil ederler.
- Aşılar, hastanın hassasiyet profiline uygun hale getirilebilir.
- Aşılar uluslararası kalite standartlarına sahiptir.
- Tedaviye yönelik mekanizmaları izlenebilir ve araştırılabilir.

400'den fazla protein veya nükleotid alerjen dizisi farklı veritabanlarında mevcuttur. Alerjenler, biyomedikal araştırmalarda en çok çalışılan protein ailelerinden birini oluşturur. Rekombinant alerjenlerin alerji teşhisi ve tedavisi için yeni ürünlere dahil edilmesi kaçınılmazdır (Jutel ve diğ., 2012). Rekombinant alerjen bazlı aşılar, yabancı veya istenmeyen bileşenler içermez. oğru rekombinant alerjen, bulaşıcı materyalleri içerme riski olmadan düşük maliyetle *Escherichia coli* veya böcek hücrelerinde büyük miktarlarda eksprese edilebilir (Burks ve diğ., 1999). Alüminyum hidroksit adsorbe edilmiş rekombinant alerjenlerle aşılama, klinik semptomlarda önemli bir iyileşmeye, alerjene özgü IgG1 ve IgG4 serum seviyelerinde bir artışa ve polen mevsimi boyunca IgE tepkisinin azalmasına yol açmıştır (Fang ve diğ., 1988) Rekombinant alerjenlerle immünoterapi, gelecek yılların inovatif yaklaşımlarından biri olacaktır (Zhernov ve diğ., 2019).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. POLEN ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI

Akdeniz servisi (*C. Sempervirens* var. *Sempervirens*) kurulları Şubat-Mart 2019'da İstanbul Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Botanigi Anabilim Dalında görevli uzman araştırmacılar yardımıyla İ.Ü Orman Fakültesi'nin bahçesinden steril eldivenler kullanılarak kağıt zarflara toplandı. Polenlerin ayrılması için kurullar 2-3 gün süreyle kurutma kağıdı üzerinde bekletildi ve eleklerden geçirilerek polenlerin ayrılması sağlandı. Polenler flakonlarda biriktirilip RNA izolasyonu için kullanılabilecek kadar derin dondurucuda (-80°C) saklandı. Toplanan örneğe ait fotoğraf Şekil 3.1'de verildi.



Şekil 3.1: Çalışma için toplanmış *C. sempervirens* kurulları.

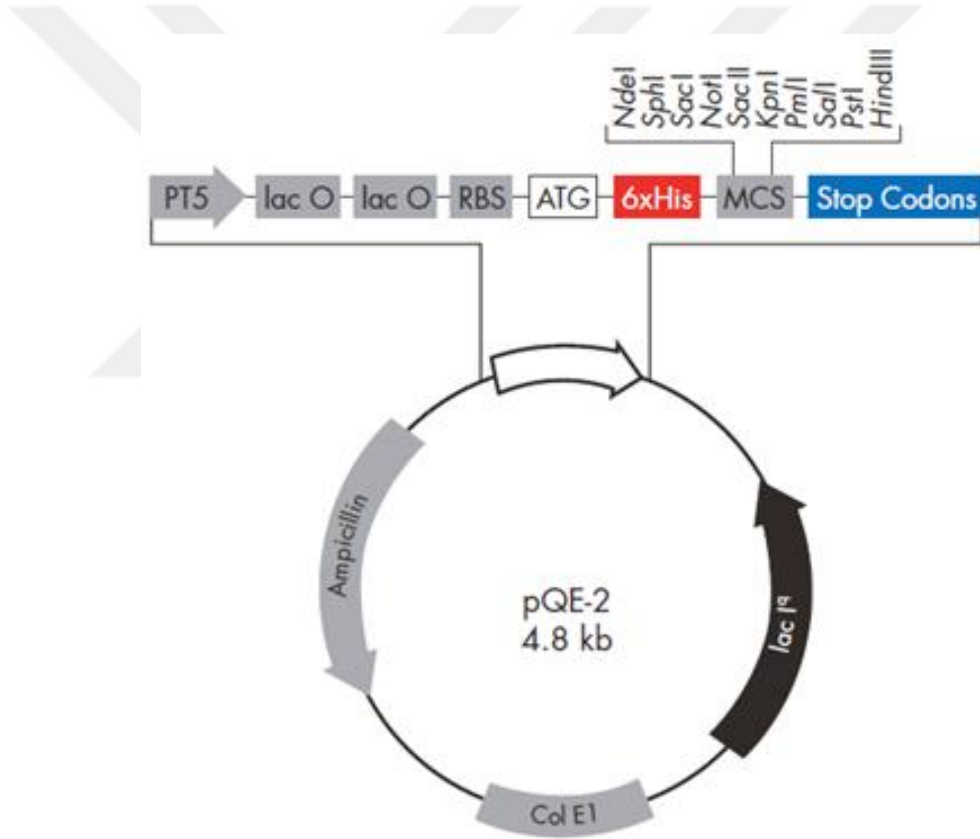
3.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN ORGANİZMA VE PLAZMİDLER

Çalışmada vektör olarak kullanılan plazmidin (pQE-2) çoğaltımı ve bol miktarda elde edilmesi için, *recA1* ve *endA1* mutasyonlarına sahip *E. coli* DH5 α ırkı kullanıldı. Rekombinant protein üretimi için ise, hücrelerde eksprese edilen heterolog proteinlerin yıkımını azaltan, *ompT* ve *lon* proteazlarından yoksun *E. coli* BL21 (DE3) ırkı kullanıldı. Her iki ırk da İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü kültür koleksiyonundan temin edildi. Bakteri ırklarına ait bilgiler Tablo 3.1'de özetlendi.

Tablo 3.1: Tez çalışmasında kullanılan organizmalar ve özellikleri.

İrklar	Özellikleri
<i>E. coli</i> DH5 α	F/endA1hsdR17(r-kmk+)supE44thi-1recA1gyrA(nalr)relA1 Δ (lacZYA-arg FU169deoR[ϕ 80 dLac Δ (LacZ)M15]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] Δ hsdS λ DE3 = λ sBamHI ϕ Δ EcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δ nin5

Genetik haritası Şekil 3.2’de verilen pQE-2 plazmidi, T5 promotörüne sahip olup 6xHistidin etiketi taşımaktadır.

**Şekil 3.2:** pQE2 plazmidinin genetik haritası.

3.3 BESİYERLERİ

E. coli hücrelerinin üretimi ilk kez 1950'lerde Giuseppe Bertani'nin bakteri lizojenisi üzerine yaptığı araştırmada kullandığı Luria-Bertani sıvı besiyeri (LB) ve Luria-Bertani agarlı katı

besiyeri (LBA) ile gerçekleştirildi (Bertani, 1952). Tablo 3.2 ve Tablo 3.3'te gösterilen bileşenler, sırayla, distile suda (dH₂O) çözündürüldükten sonra 1N NaOH kullanılarak besiyerinin pH değeri 7.2'ye ayarlandı. pH ayarı yapıldıktan sonra LBA besiyeri için karışıma agar eklendi ve besiyerleri otoklavlanarak steril hale getirildi. Sterilizasyon işlemi, otoklavda (Nüve OT 012 Masa Üstü Buharlı Sterilizatör), 121°C'de, 1.2 atmosfer basınçta, 15 dk tutularak gerçekleştirildi. Sterilizasyondan sonra besi ortamlarına, filtreden (0.22 µm, Millipore Millex-GS) geçirilerek steril hale getirilen ampisilinden (Sigma-Aldrich A9393) son konsantrasyonu 100 mg/L olacak şekilde eklendi.

Tablo 3.2: LB besiyeri içeriği.

İçerik	Miktar
Trypton (Biomatik, A8566)	2 g
Maya Ekstresi ("Yeast Extract") (Becton Dickinson, 212750)	1 g
NaCl (Merck, 106404)	2 g
dH ₂ O	200 mL'ye tamamlandı.

Tablo 3.3: LBA besiyeri içeriği.

İçerik	Miktar
Trypton (Biomatik, A8566)	2 g
Maya Ekstresi ("Yeast Extract") (Becton Dickinson, 212750)	1 g
NaCl (Merck, 106404)	2 g
Agar (Becton Dickinson, 214010)	3 g
dH ₂ O	200 mL'ye tamamlandı.

3.4. RNA İZOLASYONU

Polen tanelerinden RNA izolasyonu "Total RNA Purification Kit (GeneMark TR01-150)" ile, firmanın önerdiği şekilde yapıldı. Bu işlem sırasında RNaz kontaminasyonunu engellemek için 121°C'de, 1.2 atmosfer basınçta, 30 dk otoklavlanarak steril hale getirilmiş mikrotüpler ve pipet uçları kullanıldı.

Öncelikle, *C. sempervirens* polenleri sıvı azot yardımıyla ve steril soğuk havan kullanılarak toz haline getirildi. Kit içeriğinde bulunan lizis solüsyonuna (“Lysis Solution”) son konsantrasyonu 10 µL/mL olacak şekilde β-merkaptotanol (AppliChem, A1108) eklendi. Polen örnekleri üzerine 100 mg örnek başına 1 mL olacak şekilde lizis solüsyonu eklenerek homojenizasyon işlemi gerçekleştirildi. Homojenat “Filtration Column” tüpüne aktarıldı ve 14000 rpm’de 2 dk santrifüjlendi (Sigma 3-30K). Santrifüjlemenin ardından tüpte altta kalan sıvıya 1 mL %70’lik etanol eklendi ve karışım “RNA Spin Column with Collection Tube” içine alınarak 14000 rpm’de 1 dk santrifüjlendi. Kolondan geçen sıvı atıldı ve kolon üzerine kit içeriğindeki RNA yıkama solüsyonu I’den (“Wash Solution I”) 500 µL eklendi ve 14000 rpm’de 1 dk santrifüjlendi. Kolondan geçen sıvı atıldı ve üzerine farklı bir tüpte karıştırılan 80 µL DNaz I inkübasyon tamponu (DNase I Incubation Buffer”) ile 2 µL DNaz I karışımı nazikçe pipetaj yapılarak eklendi ve 15 dk oda sıcaklığında bekletildi. Kolon üzerine tekrar 500 µL RNA yıkama solüsyonu I eklenerek, 14000 rpm’de 1 dk santrifüj yapıldı. Sonra kolon farklı bir toplama tüpüne alındı ve üzerine 600 µL RNA yıkama solüsyonu II (“Wash Solution II”) eklendi. 14000 rpm’de 1 dakika santrifüj yapıldıktan sonra bu basamak ikinci kez tekrarlandı. Kolon 14000 rpm’de 3 dk santrifüj edilerek yıkama solüsyonundaki etanol uzaklaştırıldı ve temiz bir mikrotüpe yerleştirilerek üzerine 30 µL nükleazsız su (“Nuclease Free Water”) eklendi ve 1 dk oda sıcaklığında bekletildi. 14000 rpm’de 1 dk santrifüjlemeden sonra filtreli kolon atıldı. Mikrotüp içindeki RNA karışımı, Nanodrop (NanoDrop™ 2000/2000c, Thermo Scientific™) ile miktarı belirlendikten ve elektroforetik analizi yapıldıktan sonra kullanılıncaya kadar -80 °C’de saklandı. Total RNA’ların bütünlüğünün kontrolü için %1’lik agaroz jel ile uygulanan elektroforez yöntemi kullanıldı (Topal-Sarıkaya, 2018).

3.5. TERS TRANSKRİPSİYON POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-PZR)

Ters (“reverse”) transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR), RNA moleküllerinin ters transkriptaz ile tamamlayıcı DNA (“complementary DNA”, cDNA) dizilerine dönüştürülmesi, ardından yeni sentezlenen cDNA’nın standart PZR prosedürleri ile çoğaltılması işlemidir (Arı, 2018). Ters transkriptaz, kalıp olarak RNA’yı kullanarak DNA sentezini katalizleyen bir RNA-bağımlı DNA polimerazdır.

3.5.1. cDNA sentezi

Öncelikle, polen örneğinden elde edilen total RNA'dan, ticari bir kit ("High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit", Applied Biosystems™, 4368814) yardımıyla cDNA kütüphanesi oluşturuldu. Total RNA son konsantrasyonu 500 ng/μL olacak şekilde kullanıldı. PZR cihazında (Bio-Rad T100) gerçekleştirilen cDNA sentezi için kit içeriğinde yer alan "RT Random Primer"ler ve kimyasallar (Tablo 3.4) kullanıldı ve PZR koşulları (Tablo 3.5) uygun şekilde ayarlandı. PZR ürünü (cDNA), %0.8'lik agaroz jelde, elektroforetik yöntemle analiz edildi.

Tablo 3.4: cDNA sentezi için kullanılan reaksiyon bileşenleri.

Bileşenler	Hacim (μL)
RT* Tamponu	2
dNTP	0.8
RT Random Primerleri	2
MultiScribe™ Ters Transkriptaz	1
RNA	0.2
dH ₂ O	14

*RT: Ters ('reverse') transkripsiyon

Tablo 3.5: cDNA sentezi için PZR koşulları.

	Sıcaklık	Süre
1.Basamak	25°C	10 dk
2.Basamak	37°C	120 dk
3.Basamak	85°C	5 dk

3.5.2. Cup s 1 Geninin PZR ile Çoğaltılması ve Kontrolü

Total RNA'dan sentezlenen cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak RT-PZR'nin ikinci aşaması gerçekleştirildi. Bunun için ticari bir kit olan "Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific, MAN0012393)" kiti kullanıldı. Reaksiyon ortamı ve koşulları, üretici firmanın önerdiği şekilde hazırlanarak işlem başlatıldı. Reaksiyon bileşenleri Tablo 3.6'da, reaksiyon koşulları Tablo 3.7'de, RT-PZR'de kullanılan primerler [ileri ("forward", F) primer,

geri (“reverse”, R) primer] ise Tablo 3.8’de verildi. PZR ürünlerinin elektroforetik analizi %0.8’lik agaroz jel kullanılarak yapıldı.

Tablo 3.6: *Cup s 1* geninin PZR ile çoğaltımı için kullanılan reaksiyon bileşenleri.

Reaksiyon Bileşenleri	Hacim (µL)
5x PCR Buffer	4
dNTP Mix	2
Primer F	1
Primer R	1
Pfu DNA Polymerase	0.2
cDNA	1
dH ₂ O	10.8

Tablo 3.7: *Cup s 1* geninin PZR ile çoğaltımı için reaksiyon koşulları.

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Başlangıç Denatürasyon	98°C	30 sn	1
Denatürasyon	98°C	10 sn	35
Primerlerin Bağlanması	62°C	30 sn	
Uzama	72°C	30 sn	
Son Uzama	72°C	5 dk	1

Tablo 3.8: RT-PZR’da kullanılan primerler (altı çizgili kısımlar restriksiyon enzim kesim noktalarını göstermektedir).

Primerin Kısa Gösterimi	GC oranları (%)	Tm (°C)	Primerin Dizisi
F	53	64	5' -AAAAAAGCGGCCGCAATGGATTCCCCATGC- 3'
R	50	64	5' -ATCGGGATCTGCAGTTATGCTACAACCTCCTGC-3'

3.6. *Cup s 1* GENİNİN pQE-2 PLAZMİDİ İLE LİGASYONU VE REKOMBİNANT PLAZMİDİN KONTROLÜ

3.6.1. *Cup s 1* geninin ve pQE-2 Plazmidinin Restriksiyon Endonükleazları ile Kesimi

Yapılan RT-PZR sonucunda *Cup s 1* geninin 5' ve 3' uçlarında *NotI* ve *PstI* endonükleaz kesim noktaları oluşturuldu. Klonlama bölgesinde *NotI* ve *PstI* restriksiyon endonükleazları (RE) için kesim noktaları bulunduran pQE-2 plazmidinin ve amplifiye edilmiş ürünün *NotI* ve *PstI* RE'leri ile 37°C'de 1 saat çiftli kesimi yapıldı. Çiftli kesim reaksiyon bileşenleri Tablo 3.9'da verildi.

Tablo 3.9: *NotI* ve *PstI* restriksiyon endonükleazları ile çiftli kesim reaksiyonunun bileşenleri.

Reaksiyon Bileşenleri	Hacim (µL)
Anza™ 10x Buffer	2
PZR ürünü/ pQE-2	1
<i>NotI</i>	1
<i>PstI</i>	1
dH ₂ O	15

Çiftli kesimi yapılan plazmid ve PZR ürününün elektroforetik analizi %0.8'lik agaroz jelde yapıldı.

3.6.2. *Cup s 1* Geninin ve pQE-2 Plazmidinin Agaroz Jelden Geri Kazanımı ve Dizilenmesi

Çiftli kesimi yapılan *Cup s 1* geninin ve pQE-2 plazmidinin agaroz jelden geri kazanımı, ticari bir kit olan "PureLink® Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, K210012)" ile yapıldı. Kesim ürünlerinin istenen boyuttaki bantları bir bistüri yardımı ile jelden kesildi ve mikrotüplere aktarıldı. Ağırlıkları belirlenen jel parçalarının üzerine, ağırlığının 3 katı olacak şekilde "Gel Solubilization Buffer" koyuldu ve 50°C'ye ayarlanmış ısıtıcı blokta (Wisd, HP-48P) 3 dk ara ile vorteks yapılarak 10 dk bekletildi. Bu karışım filtreli kolonlara ("Quick Gel Extraction Columns") yüklendi ve 12000 rpm'de 1 dk santrifüjlendi. Daha sonra kolonların üzerine 500

μL “Wash Buffer” solüsyonu eklenerek tekrar 12000 rpm’de 1 dk santrifüjleme yapıldı. Kolonların altında kalan sıvılar atıldı ve kolonlar 14000 rpm’de 5 dk santrifüjlenerek etanol uzaklaştırıldı. Kolonlar yeni mikrotüplere alındı ve üstlerine 20 μL distile su eklendi. 1 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 12000 rpm’de 1 dk santrifüjlendi. Mikrotüplerin altında kalan sıvılardaki kesim ürünleri ligasyon işlemine kadar -20°C ’de saklandı. Agaroz jelden geri kazanılan ürünler DNA dizileme analizleri için Medsantek (İstanbul, Türkiye) firmasına gönderildi.

3.6.3. Cup s 1 Geninin pQE-2 Plazmidi ile Ligasyonu

PstI ve *NotI* RE’leri ile çiftli kesim yapılarak yapışkan uçlara sahip hale getirilen PZR ürünü ile pQE-2 plazmidinin ligasyon işlemi, ticari bir kit (“T4 DNA Ligase”, Invitrogen 15224017) ile yapıldı. Tablo 3.10’da reaksiyon bileşenleri verilen ligasyon işlemi 24°C ’de, 4 saat süreyle gerçekleştirildi. Bu işlemin ardından plazmidleri çoğaltmak amacıyla *E. coli* DH5 α ’ya transformasyon işlemi uygulandı.

Tablo 3.10: Ligasyon işleminde kullanılan reaksiyon bileşenleri.

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
“5x Ligase Reaction Buffer”	3 μL
Plazmid	30 fmol
PZR ürünü	90 fmol
“T4 DNA Ligase”	1 U
dH ₂ O	Son Hacim 15 μL olacak şekilde eklendi.

3.7. PLAZMİDİN *E. coli*’DE ÇOĞALTILMASI

3.7.1. *E. coli* Hücrelerinin Transformasyona Yeterli Hale Getirilmesi

Yeterli (kompetent) hücre oluşturmak için -80°C ’de, 1:1 (v/v) gliserol stoğunda saklanan *E. coli* DH5 α hücrelerinden 500 μL alınarak 5 mL LB besiyerine ekildi ve 180 rpm’de 37°C ’de bir gece boyunca üretildi. Rekombinant proteinin üretimi için yapılan transformasyonda kullanılacak hücre süspansiyonunu hazırlamak için ise *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerinden

alınarak LB besiyerine aynı şekilde ekim yapıldı. Kültürlerden 500 µL alınarak 50 mL' lik LB besiyerine ekim yapıldı ve hücreler 37°C'de 180 rpm'de $OD_{600} = 0.3-0.4$ oluncaya kadar üretildi. Kültürler 10 dk buzda bekletildi. Hücreler 4°C'de 14000 rpm'de 4 dk santrifüjlendi. Oluşan pelletin üzerine soğuk 10 mL 0.1 M $CaCl_2$ eklendi ve buzda 30 dk bekletildi. Ardından 4°C'de 14000 rpm'de 4 dk santrifüjleme işlemi yapıldı ve pellet üzerine 2 mL 0.1 M $CaCl_2$ eklenerek süspanse edilen hücreler transformasyon işlemi için hazır hale getirildi.

3.7.2. Transformasyon

Kullanılan pQE-2 plazmidi ile *Cup s 1* genini taşıyan rekombinant formu, *E. coli* DH5α ve BL21 hücrelerine aktararak çoğaltıldı. Transformasyon ısı şoku yöntemi ile gerçekleştirildi. Her bir mikrotüpe 100 µL hücre süspansiyonu ve plazmid örnekleri (plazmidin 2 µL'si veya rekombinant plazmidin tamamı) eklendi. Ayrıca transformasyonun kontrolü için ayrı bir tüpe de plazmid içermeyen hücre süspansiyonu koyuldu. Örnekler 30 dk buzda bekletildi. 90 saniye 42°C'de ısı şoku uygulandıktan sonra örnekler tekrar 5 dk buz üzerine alındı. Tüplere 700 µL LB besiyeri eklendi ve plazmidin sahip olduğu ampisilin direnç geninin (*amp^R*) ekspresyonu için hücreler 1 saat 37°C'de çalkalamalı etüvde inkübe edildi. Daha sonra hücre süspanسیونlarından 100'er µL alınarak, 100 µg/mL ampisilin içeren LBA besiyerine cam baget yardımıyla ekim yapıldı ve gece boyu 37°C'lik etüvde inkübe edildi. Ertesi gün üreme durumları değerlendirildi ve ampisilinli besiyerinde üreyen kolonilerin rekombinant plazmidi taşıdığı kabul edildi.

3.7.3. Plazmid İzolasyonu

Plazmid izolasyonu için ticari bir kit ("Plasmid Miniprep Plus Purification Kit", GeneMark, DP01-Plus-300) kullanıldı. Öncelikle transformasyon işlemi sonucunda seçici besiyerinde üreyen kolonilerden rastgele alınarak 100 µg/mL ampisilin içeren 5 mL LB besiyerine ekim yapıldı ve hücreler çalkalamalı etüvde 180 rpm'de, 37°C'de gece boyu üretildi. Ertesi gün hücreler 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Hücrelerin üzerine kitte bulunan 200 µL "Solution I" eklendi ve vorteks yapıldı. Daha sonra 200 µL "Solution II" ilave edilerek tüpler 10 kez ters düz edildi ve 200 µL "Solution III" eklendi ve tüpler tekrar 10 kez ters düz edildikten sonra 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Tüpte oluşan üst faz kit içeriğindeki filtreli kolonlara aktarıldı ve 14000 g'de 1 dk santrifüjlendi. Alt sıvı atıldı, kolonların üzerine 500 µL "Endotoxin Removal Wash Solution" eklendi. Bu şekilde 2 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 14000 rpm'de 1 dk santrifüjlendi. Ardından kolonlara 700 µL "Wash

Solution” eklenip, 14000 rpm’de 1 dk santrifüjlendi ve bu basamak 2 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Daha sonra 14000 rpm’de 5 dk santrifüjlenerek etanolün tamamen uzaklaşması sağlandı. Filtreli kolonlar ayrı bir mikrotüpe alındı ve kolonlara 20 µL ‘Nuclease Free Water’ eklenerek 1-2 dk oda sıcaklığında bekletildi ve sonra 14000 rpm’de 1 dk santrifüjlendi. Kolondan geçen sıvıda bulunan saf veya rekombinant plazmid kullanılabilecek -20°C’de saklandı.

3.7.4. pQE-2 Plazmidinin ve Rekombinant Plazmidin Restriksiyon Endonükleazlarıyla Kesimi

pQE-2 plazmidinin ve rekombinant plazmidin kontrolünü yapmak için önce 37°C’de 1 saat *PstI* RE ile tekli kesimi ve elektroforetik analizi gerçekleştirildi. Tekli kesim bileşenleri Tablo 3.11’de verildi.

Tablo 3.11: Tekli kesim reaksiyon bileşenleri.

Reaksiyon Bileşenleri	Hacim (µL)
Anza™ 10x Tamponu	2
pQE -2/ Rekombinant Plazmid	1
PstI	2
dH ₂ O	15

3.7.5. Rekombinant Plazmid İçeren Transformant Hücrelerin Koloni PZR ile Belirlenmesi

Ampisilin içeren LBA besiyerinde üreyen kolonilerdeki plazmidlerde *Cup s 1* geninin varlığını anlamak için bu kolonilerden her petri için en az 10 tanesine koloni PZR yapıldı. Öncelikle, steril kürdan yardımıyla kolonilerden rastgele hücre alınarak 10 µL distile su içerisinde süspanse edildi. Bu hücre süspanسیونlarından 1 µL alınıp koloni PZR’de kalıp olarak kullanıldı. Koloni PZR “Phusion High-Fidelity DNA Polymerase” (Thermo Fisher F530XL) ile gerçekleştirildi. Tablo 3.12’de verilen bileşenler 0.2 mL’lik PZR tüplerinde karıştırıldı. Reaksiyon koşulları Tablo 3.13’te verildi.

Tablo 3.12: Koloni PZR bileşenleri.

Reaksiyon Bileşenleri	Hacim (µL)
10x PZR Tamponu	2
dNTP Mix	1.6
MgCl ₂	1
Primer F	1
Primer R	1
Pfu DNA Polimeraz	0.4
Kalıp	1
dH ₂ O	12
TOPLAM HACİM	→ 20

Tablo 3.13: Koloni PZR koşulları.

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	94	2 dk.	1
Denatürasyon	94	30 sn.	35
Bağlanma	62	45 sn.	
Uzama	72	1 dk.	
Son Uzama	72	5 dk.	1

3.8. AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ

Bu tez çalışmasında RNA ve DNA örneklerinin, sırasıyla %1'lik ve %0.8'lik agaroz jelde kontrolü yapıldı. %0.8'lik agaroz jel hazırlamak için 50x Tris-asetat EDTA (etilendiamintetraasetik asit) tamponu (TAE), 1x olacak şekilde sulandırıldı. 0.32 g agaroz (Sigma-Aldrich, Tip II, A9918) 40 mL 1x TAE tamponu ile karıştırıldı ve 2 dk mikrodalga fırında çözündürüldü. Agaroz çözeltisi oda sıcaklığına geldikten sonra üzerine etidyum bromür (EtBr, Sigma-Aldrich E1510) solüsyonundan jelde 0.5 µg/mL olacak şekilde eklendi. Bu karışım, kuyucuk oluşturması için tarak takılarak hazır hale getirilmiş “Sub-Cell® GT Agarose Gel Electrophoresis Systems (Bio-Rad, 170-4406)” yatay elektroforez sisteminin kasetine döküldü. Polimerizasyonun sağlanması için 30 dk bekletildi, sonra tarak çıkarılarak kaset elektroforez tankına düzgün bir şekilde yerleştirildi. Elektroforez tankı 1x TAE tamponu ile dolduruldu. Nükleik asit örneklerinden 5 µL alınıp 1 µL 6x yükleme tamponu ile karıştırılarak jele yüklendi. Bant boyutlarının analizi için markır olarak “100 bp” ve/veya “1 kb ladder” (sırasıyla GeneOn 304-005 ve GeneOn 305-005) (Şekil 3.3) kullanıldı. Elektroforez sabit

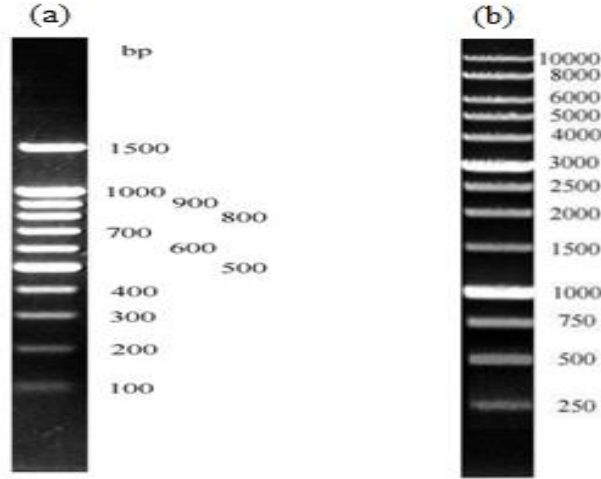
voltajda (70 V) 1 saat sürdürüldü ve işlem sonunsa jel UV altında görüntülendi. 50x TAE tamponunun içeriği Tablo 3.14’de, 6x yükleme tamponunun içeriği ise Tablo 3.15’de verildi.

Tablo 3.14: 50x TAE tamponunun içeriği.

Tampon Bileşenleri	
Trizma-Baz (Sigma-Aldrich, T1503),	242 g
EDTA (Invitrogen, 15576)	14.61 g
Glasiyel asetik asit (Sigma-Aldrich, 537020)	57.1 mL
dH ₂ O ile son hacim 1 L’ye tamamlandı.	

Tablo 3.15: 6x Yükleme tamponunun içeriği.

Tampon Bileşenleri	
Trizma-Baz (10 mM)	6 mg
EDTA (60 mM)	876 mg
Bromo-fenol mavisi (%0.3 (w/v) stok, Merck 108122)	600 µL
Gliserol (%60 v/v, Sigma-Aldrich G5516)	30 mL
dH ₂ O ile son hacim 50 mL’ye tamamlandı.	



Şekil 3.3: Agaroz jel elektroforezinde markır olarak kullanılan (a) “100 bp” ve (b) “1 kb ladder” (GeneOn 304-005; 305-005).

3.9. PROTEİN ANALİZLERİ

3.9.1. Protein İzolasyonu

Protein izolasyonu için *Cup s 1* genini içeren (rekombinat) ve içermeyen pQE-2 plazmidini taşıyan kolonilerden örnek alınarak 100 µg/mL ampisilin içeren LB besiyerine ekildi ve 180 rpm'de, 37°C'de gece boyu çalkalayıcı etüve bırakıldı. Sonra bu kültürlerden yeni LB besiyerlerine aktarım yapılarak yaklaşık 3 saat boyunca OD₆₀₀=0.6-0.8 oluncaya dek yeniden çalkalamalı etüve yerleştirildi. Son olarak üzerine son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde IPTG ("isopropylthio-β-D-galactopyranoside") eklenerek 220 rpm'de 37°C'da çalkalamalı etüve 3-4 saat boyunca bırakıldı. Ardından hücreleri çöktürmek için kültürler 5000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Çöktürülmüş hücrelerden protein izolasyonu için öncelikle Tablo 3.16'da gösterildiği gibi hazırlanmış tampon 1 mM PMSF (fenilmetilsulfonil florid) ile 1:5 (v/v) hacminde olacak şekilde karıştırıldı ve bu karışımdan 600 µL alınarak pelletin üzerine eklendi. Sonra hücreler öncelikle 2 dk sıvı azotta ve hemen ardından 3 dk 42°C'de bekletildi ve bu işlem 5 kez tekrarlanarak parçalama tamamlandı. Parçalanmış hücreler 20 000 rpm'de 20 dk santrifüjlendi. Elde edilen süpernatant yeni tüplere aktarıldı ve bir sonraki işleme kadar -20°C'de saklandı.

Tablo 3.16: Protein izolasyonu için hazırlanan tamponun içeriği.

Tampon Bileşenleri	Konsantrasyonları
Tris-HCl	50 mM
NaCl	0.5 M
İmidazol	20 mM

3.9.2. Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

İzole edilen proteinlerin konsantrasyonu Smith ve diğ. (1985) tarafından önerilen bişinkoninik asit (BCA) yöntemi ile yapıldı. BCA testi iki reaksiyondan oluşur: İlk olarak, proteinlerdeki peptit bağları, kit içeriğinde bulunan bakır (II) sülfatta Cu²⁺ iyonlarını Cu⁺'ya (sıcaklığa bağlı reaksiyon) indirger. İndirgenmiş Cu²⁺ miktarı, çözeltide mevcut olan protein miktarı ile orantılıdır. Daha sonra bişinkoninik asit molekülü her Cu⁺ iyonu ile 562 nm dalga boyunda ışığı

güçlü bir şekilde emen mor renkli bir kompleks oluşturur. Bu yöntem için “SMART™ BCA Protein Assay Kit, iNtRON Biotechnology” ticari kiti kullanıldı. Öncelikle kitte bulunan BSA (“Bovine Serum Albumin”, Sığır Serum Albümini) protein standardı distile su ile uygun oranlarda (25, 125, 250, 500, 1000, 1500 ve 2000 µg/mL) seyreltildi. Protein konsantrasyonu belirlenecek olan örnekler ve kör örnek (“blank”) 5 kat dH₂O ile seyreltildi. Kit içeriğinde bulunan reaktif A ve reaktif B solüsyonları 50:1 (v:v) oranında karıştırıldı ve 200’er µL olmakla 96 kuyucuklu mikrolaka kuyucuklarına konuldu ve üzerlerine seyreltilmiş örneklerden ve kör örnekten 25’er µL eklendi. Örnekler ve standartlar 2 tekrarlı olarak değerlendirildi. Belirteç ile örneklerin iyice karışması için mikrolaka 1 dk çalkalayıcıda (Heidolph Unimax 1010) bırakıldı. Etüvde (Thermo Scientific, Heracell™ 240) 37°C’de 30 dk bekletildi. Daha sonra mikrolaka okuyucu (EON, BioTek Instruments Inc.) ile 562 nm dalga boyundaki absorbansı ölçüldü. BSA standartlarına ait absorbans ve konsantrasyon değerleri ile oluşturulan grafik kullanılarak protein konsantrasyonları hesaplandı.

3.9.3. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

İzole edilen ve konsantrasyonu belirlenen proteinler denatüre jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile “Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad)” elektroforez sisteminde ayrıştırıldı. İşlemden önce taraklar (1.0 mm), camlar (“1.0 mm spacer plates” ve “short plates”) ve contalar %70’lik etanol ile temizlendi. Jelin hazırlanmasında kullanılan çözeltiler Tablo 3.17’de ve hazırlanan jellerin içeriği Tablo 3.18’de verildi.

Tablo 3.17: SDS-PAGE için hazırlanan çözeltiler.

Çözeltiler	Bileşenler
%30 Akrilamid Stok Solüsyonu	Akrilamid (Sigma-Aldrich A3553) 30 g Bis-Akrilamid (Sigma-Aldrich M2022)..... 0.8 g dH ₂ O ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı.
1.875 M Tris-HCl Tamponu (pH 8.8)	Trizma-Baz (Sigma-Aldrich T1503) 45.43 g 3N HCl ile pH 8.8'e ayarlandı. dH ₂ O ile son hacim 200 mL'ye tamamlandı.
0.6 M Tris-HCl Tamponu (pH 6.8)	Trizma-Baz 14.54 g 3N HCl ile pH 6.8'e ayarlandı. dH ₂ O ile son hacim 200 mL olacak şekilde tamamlandı.
10% Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	SDS (AppliChem A2263) 10 g dH ₂ O ile son hacim 100 mL olacak şekilde çözündürüldü.
10 % Amonyum Persülfat (APS)	APS (AppliChem A2941)..... 0.1 g dH ₂ O ile son hacim 1 mL'ye tamamlandı.
1x Yürütme Tamponu	Trizma-Baz..... 3.03 g Glisin (AppliChem A1067)14.4 g SDS..... 1 g dH ₂ O ile son hacim 1 L'ye tamamlandı.
2X Örnek Yürütme Tamponu	0.6 M Tris-HCl Tamponu (pH 6.8)..... 5 mL SDS..... 0.5 g Sukroz (Sigma-Aldrich S0389).....14.54 g β-Merkaptoetanol (AppliChem A1108)..... 0.25 mL Bromo-fenol mavisi (0.5 % (w/v) stock, Merck 108122)..... 5 mL dH ₂ O ile son hacim 50 mL'ye tamamlandı.

Tablo 3.18: SDS-PAGE ayırma ve yükleme jeli içerikleri (8x10 cm² boyutunda ve 1 mm kalınlığında bir jel için gerekli değerler).

Jel İçerikleri	Ayırma jeli (10% Akrilamid)	Yükleme Jeli (5% Akrilamid)
Tris-HCl (1.875 M, pH:8.8)	1 mL	-
Tris-HCl (0.6 M, pH:6.8)	-	250 µL
dH ₂ O	2.262 mL	1.875 mL
%30 Akrilamid çözeltisi	1.662 mL	337.5 µL
%10 Sodium Dodesil Sulfate (SDS)	50 µL	25 µL
%10 Amonyum Persülfat (APS)	25 µL	12.5 µL
TEMED	1.75 µL	3.5 µL

%10'luk ayırma jelinin hazırlanması için uygun miktarlarda Tris-HCl (pH 8.8), distile su, SDS, akrilamid çözeltisi ve APS karıştırıldı, karışımdan çözünmüş oksijenin uzaklaştırılması için birkaç dakika ultrasonik su banyosunda beklettikten sonra TEMED (Fluka 87689) eklendi ve pipetaj yapıldı. Sonrasında karışım jel kasetinin iki camı arasına döküldü. Üst kısmının düz olması ve oksijenin polimerizasyonu engellememesi için jelin üst yüzeyi 1 mL dH₂O ile kapatıldı. Ayırma jeli polimerize olduktan sonra jelin üzerindeki dH₂O uzaklaştırıldı. Üzerine %5'lik yükleme jeli döküldü, tarak yerleştirildi. Üst jelin polimerizasyonu tamamlandıktan sonra tarak çıkartıldı ve jel kaseti 1x yürütme tamponu ile belli çizgiye kadar doldurulmuş elektroforez tankına yerleştirildi. Yüklenecek örnekler 1:1 (v:v) hacminde 2x örnek yükleme tamponu ile karıştırıldı ve 95°C'da 5 dk kaynatıldı. Örnekler her bir kuyucukta 30 µg protein olacak şekilde hesaplanarak jele yüklendi. Ayrıca bantlarının moleküler ağırlıklarını belirlemek için en az bir cebe "protein ladder" SeeBlue® Pre-stained Protein Standard (Invitrogen LC5625) uygulandı. Elektroforez 200 V'da yaklaşık 40 dk gerçekleştirildi.

3.9.4. Gümüş Boyama Yöntemi

Elektroforez işlemi sonrasında jeldeki proteinler gümüş boyama yöntemi kullanılarak görünür hale getirildi. Stok çözeltilerin hacmi, 5 adet büyük (20 x 20 cm boyutunda ve 1.5 mm kalınlığında) jelin boyanmasına yetecek şekilde ayarlandı. Protein örnekleri bulunan jel alkole ve aside dayanıklı plastik kaptaki 200 mL formaldehitli sabitleyici çözelti içinde 20 dk çalkalıyıcıda bırakıldı. Ardından sabitleyici döküldü ve jeller saf su ile iki kez 10'ar dakika

çalkalandı. Sonra 200 mL 0.2 g/L sodyum tiyosulfat çözeltisinde 1-2 dakika çalkalanma yapıldı ve bu çözelti dökülerek yeniden saf su ile iki kez 40'ar saniye yıkandı. Son yıkama bittikten sonra 200 mL %0.1 gümüş nitrat çözeltisinde, düşük hızda, 20 dk çalkalandı. Gümüş nitrat çözeltisi uzaklaştırılarak jeller saf su ile yıkandı ve ardından 3-5 dk 200 mL taze hazırlanmış tiyosülfatlı görüntü oluşturma çözeltisinde kahverengi bantlar oluşana dek hafif çalkalandı. Bantlar görünür hale geldikten hemen sonra reaksiyonu durdurmak için jelin bulunduğu kaba 10 mL 2.3 M sitrik asit çözeltisi eklendi (Arda ve diğ., 2018). Gümüş boyama yönteminde kullanılan çözeltiler Tablo 3.19'da verildi.

Tablo 3.19: Gümüş boyama için kullanılan çözeltiler.

Çözeltiler	Bileşenler
Formaldehitli sabitleyici	Metanol..... 400 mL %37 Formaldehit..... 0.5 mL dH ₂ O ile son hacim 1L'ye tamamlandı.
Sodyum tiyosulfat çözeltisi	Na ₂ S ₂ O ₅ 0.2 g dH ₂ O ile son hacim 1L'ye tamamlandı.
Gümüş nitrat çözeltisi.	AgNO ₃1g dH ₂ O ile son hacim 1L'ye tamamlandı.
Tiyosülfat görüntü oluşturma çözeltisi	Na ₂ CO ₃30 g Sodyum tiyosülfat çözeltisi (0.2g/L)..... 8.77 mL dH ₂ O ile son hacim 1 L'ye tamamlandı.
Sitrik asit çözeltisi	Sitrik asit çözeltisi..... 22.1g dH ₂ O ile son hacim 50mL'ye tamamlandı.

3.9.5. Western-Blot Analizi

Saflaştırılan ve izole edilen proteinler %15 poliakrilamid içeren jelde ayrıştırıldı (bkz. 3.9.3) ve elektroblot yöntemiyle polivinilidin diflorür (PVDF) membrana aktarıldı. Elektrotransfer ve Western blotlama yöntemlerinde kullanılan tüm tamponlar ve içerikleri Tablo 3.20'de verildi.

Tablo 3.20: Elektrottransfer ve Western blotlama yöntemlerinde kullanılan çözeltiler ve içerikleri.

Çözeltiler	Bileşenler
1x Transfer Tamponu	Trizma -Baz 3.03 g
	Glisin 14.4 g
	dH ₂ O ile son hacim 1 L'ye tamamlandı.
%5'lik Bloklama Tamponu	Süt tozu (Fluka 70166) 45.43 g
	1x yıkama tamponu ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı.
Yıkama Tamponu (TBST)	Trizma-Baz (20 mM, pH 7.5)..... 14.54 g
	NaCl (150 mM) (Merck 106400) 8.77 g
	Tween-20 (%0.1) 1mL
	dH ₂ O ile son hacim 1 L'ye tamamlandı.

Elektrottransfer işlemi için yarı kuru (“semi-dry”) transfer düzeneği (Bio-Rad, Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell) kullanıldı. Öncesinde, PVDF membran (0.22 µm, “West-lott™ PVDF Transfer membrane”, iNtRON Biotechnology ITM-P3032) rehidrasyon için 30 saniye kadar metanolde bekletildi ve ardından 1x transfer tamponu ile ıslatıldı. Transfer tamponunda ıslatılmış “transfer packs” birkaç kat olacak şekilde cihaza yerleştirildi ve üzerinde kabarcık kalmaması için hafifçe bastırılarak çubukla üzerinden geçildi. Ardından kuru kalmamasına dikkat edilerek membran yerleştirildi ve membran üzerine jel koyuldu; bu sırada da hiçbir hava kabarcığının oluşmamasına dikkat edildi. Daha sonra üzerine transfer tamponu ile ıslatılmış “transfer packs” yerleştirildi ve sistemin kapağı kapatıldı. 0.25 A, 18 V elektrik akımı uygulanarak 30 dk süreyle transfer işlemi gerçekleştirildi.

Membran üzerinde nonspesifik bağlanmaları en aza indirmek için transfer işleminin hemen ardından membran %5'lik bloklama tamponu [%0,1 (v/v) Tween-20 içeren TBST [(“Tris-buffered saline with Tween-20”), %5 (w/v) süt tozu] içinde oda sıcaklığında membran 2 saat inkübe edildi. Rekombinant proteinin IgE bağlama kapasitesini göstermek için bloklama tamponu içinde 1:4 (v:v) oranında hazırlanan hasta veya kontrol (sağlıklı) serumu (Taş, 2018) kullanıldı. Bu birincil antikorlar ile membran +4°C'de 1 gece çalkalayıcıda inkübe edildi. Sonra membran TBST tamponu ile 5'er dakika 5 kez düşük devirde çalkalanarak yıkandı. Hasta serumu ile işlem gören membranlar bloklama tamponu içinde 1:1000 (v:v) oranında hazırlanmış fare anti-insan IgE (Fc)-HRP (SouthernBiotech) ikincil antikorunda 1 saat çalkalayıcıya bırakıldı. Sonra membran tekrar yıkama solüsyonu ile aynı şekilde yıkandı.

Spesifik antijen-antikor etkileşiminin görüntülenmesi için “ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham RPN2133)” görüntüleme kiti kullanıldı ve firmanın önerilerine göre kit içeriğindeki bulunan A ve B reaktifi 1:1 (v:v) oranında karıştırılarak hazır hale getirildi. Karanlık odada, kırmızı ışık altında membran üzerine bu karışım eklenerek 5 dk bekletildi. Membran, hava kabarcığı kalmayacak şekilde iki asetat kağıdı arasına konularak “ChemiDoc MP (Bio-Rad)” cihazında ImageLab 5.2.1 yazılımı kullanılarak görüntülendi.

3.9.6. Rekombinant Proteinin Saflaştırılması

Histidin etiketli rekombinant *Cup s 1* proteininin saflaştırılması, bu proteinlerin nikelli kolona (MCLAB, NINTA-100) bağlanarak etiketsiz proteinlerden ayrılması prensibine dayanmaktadır. Öncelikle, nikelli kolon protein örnekleri ile muamele edildi ve ardından farklı imidazol konsantrasyonlarında hazırlanan solüsyonlarla yıkamalar yapıldı. Saflaştırma süresince kullanılan solüsyonlar Tablo 3.21’de gösterildi.

Tablo 3.21: Saflaştırmada kullanılan çözeltiler ve içerikleri.

Çözeltiler	Bileşenler
5x A Stok Solüsyonu	Soyum fosfat, monobasik (200 mM)..... 1.38 g NaCl (5M)..... 14.645 g dH ₂ O ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı.
5x B Stok Solüsyonu	Sodyum Fosfat, dibasik (200 mM)..... 1.42 g NaCl (5M)..... 14.645 g dH ₂ O ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı.
5x Saflaştırma Solüsyonu	Sodyum Fosfat, monobasik (250 mM)..... 3.5 g NaCl (2.5 M)..... 14.6 g dH ₂ O ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı.
3 M İmidazol	İmidazol (3 M)..... 10.3 g 5x A Stok Solüsyonu 8.77 mL 5x B Stok Solüsyonu 1.23 mL pH 6.0'a ayarlandı. dH ₂ O ile son hacim 50 mL'ye tamamlandı.
Yıkama Solüsyonu I	5x Saflaştırma Solüsyonu 6 mL İmidazol (3 M)..... 100 µL pH 8.0'a ayarlandı. dH ₂ O ile son hacim 30 mL'ye tamamlandı.
Yıkama Solüsyonu II	5x Saflaştırma Solüsyonu 10 mL İmidazol (3 M)..... 335 µL pH 8.0'a ayarlandı. dH ₂ O ile son hacim 50 mL'ye tamamlandı.
Elüsyon Tamponu	5x Saflaştırma Solüsyonu 3 mL İmidazol (3 M)..... 1.25 mL pH 8.0'a ayarlandı. dH ₂ O ile son hacim 15 mL'ye tamamlandı.

Saflaştırılmış protein örneğin konsantrasyonu BCA Protein Assay Kit (iNtRON Biotechnology) ile konsantrasyonu belirlendi (bkz.3.9.2).

4. BULGULAR

4.1. HAZIRLANAN POLEN ÖRNEĞİ

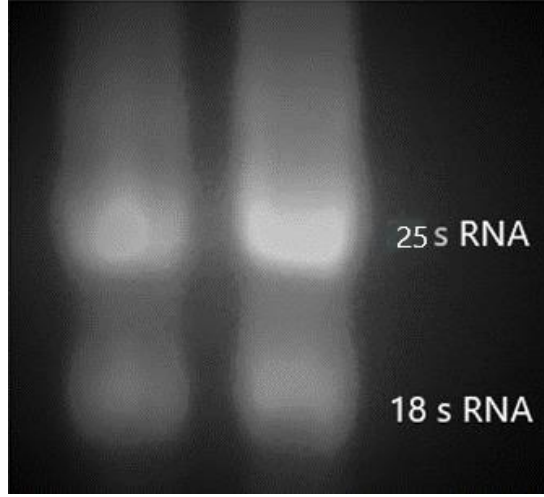
Bu tez çalışması için, 2019 yılında Şubat-Mart aylarında İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi'nin bahçesinden *Cupressus sempervirens* polenleri steril eldivenlerle toplandıktan sonra kurutularak polen eleme cihazından geçirildi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: *Cupressus sempervirens* polenleri.

4.2. TOTAL RNA İZOLASYONU VE KONTROLÜ

Tez çalışmasında ilk olarak *Cupressus sempervirens* polenlerinden total RNA izolasyonu yapıldı ve total RNA konsantrasyonu hesaplandı. Total RNA konsantrasyonunun ortalama 131.1 ng/ μ L olduğu tespit edildi. Total RNA agaroz jel elektroforezinde yürütülerek kalitesinin göstergesi olan 18S rRNA ve 25S rRNA'lar görüntülendi (Şkil.4.2) ve A260/A280 değerinin 1.8-2 aralığında olduğu belirlendi.

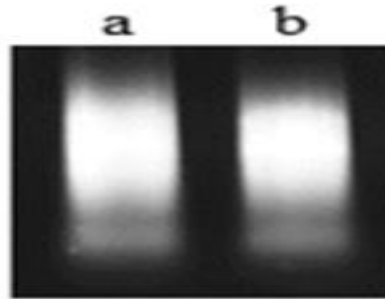


Şekil 4.2: *Cupressus sempervirens* poleninden izole edilen total RNA'nın kalitesini gösteren agaroz jel görüntüsü.

4.3. TERS TRANSKRİPSİYON POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

4.3.1. cDNA Sentezi

Elde edilen total RNA'lardan uygun primerler kullanılarak cDNA sentezi yapıldı ve %1'lik agaroz jel elektroforezinde analiz edildi (Şekil 4.3). Analiz sonucunda bol miktarda cDNA elde edildiği anlaşıldı.

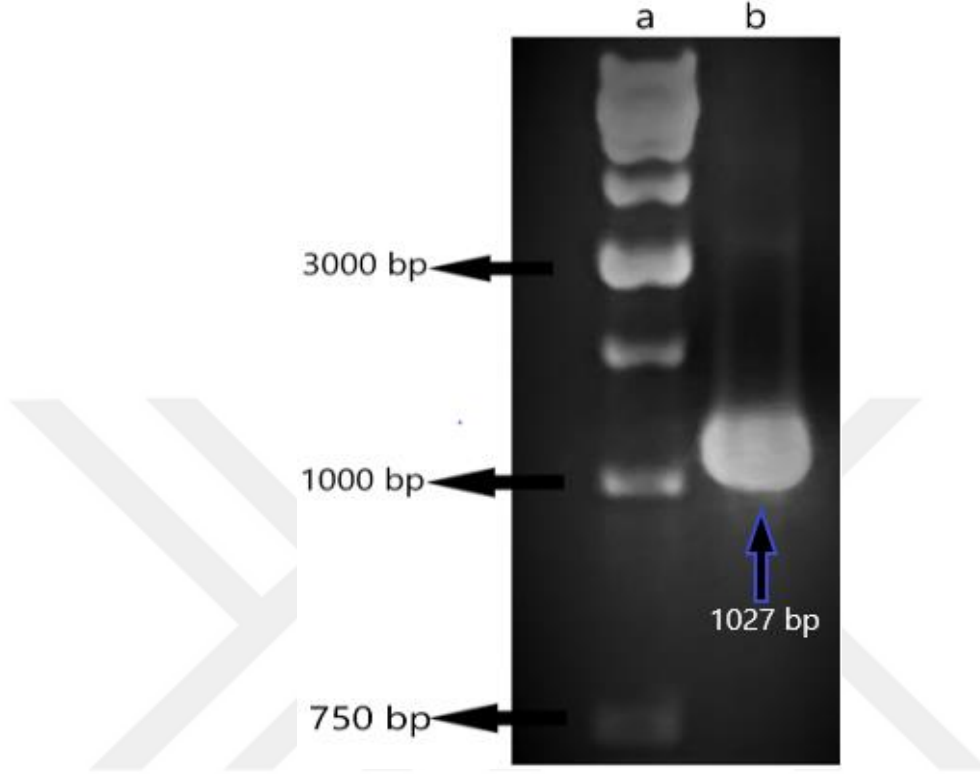


Şekil 4.3: a-b) Total RNA'lardan sentezlenen 2 farklı cDNA.

4.3.2. *Cup s 1* Geninin PZR ile Çoğaltımı ve Kontrolü

Cup s 1 gen dizisini tanımlamak ve çoğaltmak amacıyla F ve R primerler ile ters-transkriptaz PZR (RT-PZR) yapıldı. Sonra PZR ürünü %1'lik agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi ve

analizler sonrası *Cup s 1* geninin cDNA'sının 1027 bç olduğu belirlendi. PZR ürününün analiz sonucu Şekil 4.4'te gösterildi.



Şekil 4.4: PZR ürününün %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü. a) Markır (GeneOn 305-005), b) *Cup s 1* geninin PZR ürünü.

4.4. PZR ÜRÜNÜNÜN DİZİ VE HOMOLOJİ ANALİZ SONUÇLARI

PZR ürünü olan *Cup s 1* gen (1027 bç) dizisi ticari bir firma (MedSanTek) tarafından çift yönlü okuma ile belirlendi. Dizileme sonucu Şekil 4.5'te verildi. Dizileme sonucuna karşılık gelen amino asit dizisi (Şekil 4.6) belirlendi ve amino asit dizi bilgisi karşılaştırılması (BLAST analizi) sonuçlarına göre protein veri bankasında (Expasy) bulunan biyoinformatik veriler Şekil 4.7'de verildi. Elde edilen sonuca göre *Cupressus sempervirens*'in *Cup s 1* proteini *Cupressaceae* ailesinde amino asit dizisi bilinen türler ile %98-99 benzerlik gösterdi.

```

ATGGATTCCCATGCTTAATATCAGATCGTTGTGTTCCCTTTGTGCATTGTATCTTGTTATTCTGATAA
TCCCATAGACAGCTGCTGGAGAGGAGATTGGAAGTGGGATCAAAACAGAATGAAGCTCGCAGACTGTGCTGTGG
GATTTGGAAGTTCCACTATGGGAGGCAAAGGAGGAGATATTTACACCGTCACAAGCGCAGAAGATAATCCTGTGA
ATCCTACACCAGGAACCTTTGCGCTATGGAGCAACAAGAGAAAAAGCACTTTGGATAATTTTCTCTCAGAATATGA
ATATAAAGCTCAAGATGCCTTTGTATGTTGCTGGTCATAAGACTATTGACGGCAGAGGAGCAGATGTTTCATCTTG
GCAATGGCGGTCTTTGTCTGTTTATGAGGAAAGTGAGCCATGTTATTCTCCATGGTTTGCATATACACGGTTGTA
ATACGAGTGTTTTGGGGGATGTTTTGGTAAGTGAGTCCATTGGTGTGGAGCCTGTTTCATGCCAGGATGGGGACG
CCATTACTATGCGCAATGTTACAAATGCTTGGATTGATCATAATTCTCTCTCCGATTGTTCTGATGGTCTTATCG
ATGTTACGCTTTCTTCCACTGGAATTACTATCTCCAACAATCACTTCTTCAACCATCATAAAGTGATGTTGTTAG
GACATGATGATACATATGATGATGACAAATCTATGAAAGTGACCGTGGCATTCAATCAATTTGGACCTAATGCTG
GACAACGAATGCCAAGGGCAGATATGGACTTGTACATGTTGCAACAATAATTATGATCAATGGAATATATATG
CTATTGGTGGGAGTTCAAATCCAACCATTAAGTGAAGGGAATAGTTTCACTGCCCCAAATGAGAATTACAAGA
AGGAAGTAACAAAGCGTATTGGGTGTGAATCAACATCAGCTTGTGCAAACTGGGTGTGGAGATCTACACGAGATG
CTTTTTCTAATGGAGCTTATTTGTATCATCGGGGAAAACCTGAAGAGACCAATATATACAATAGTAATGAAGCTT
TCAAAGTTGAGAATGGGAATTTAGCTCCTCAATAAGCTAAGAGAGGTGGAGTCCTGTCT

```

Şekil 4.5: *Cupressus sempervirens* poleninde bulunan *Cup s 1* geninin cDNA dizisi.

```

1 atggattccc catgcttaat agcagtcctt gtgttcctt gtgcaattgt atcttggtat
61 tctgataatc ccatagacag ctgctggaga ggagattcga actgggatca aaacagaatg
121 aagctcgag actgtgctgt gggatttggg agttccacta tgggaggcaa aggaggagat
181 attacaccg tcacaagcgc agaagataat cctgtgaatc ctacaccagg aactttgcgc

```

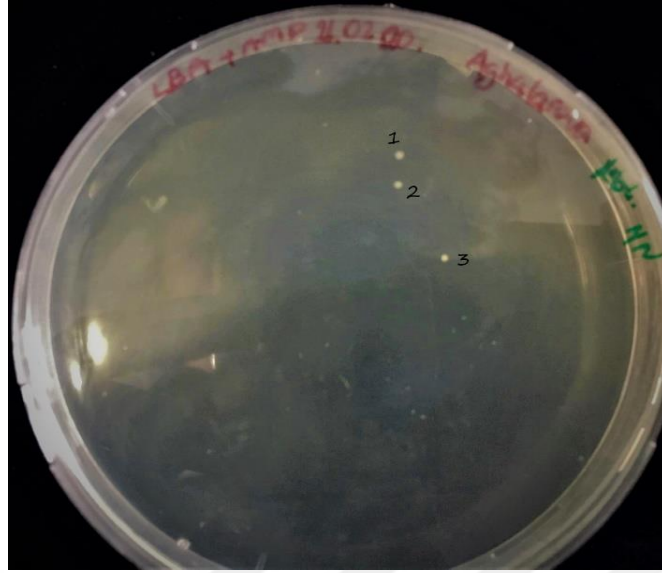
Şekil 4.6: *Cupressus sempervirens* poleninde bulunan *Cup s 1* genine karşılık gelen amino asit dizisi.

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Cupressus sempervirens clone.16 Cup.s.1 pollen allergen precursor (CUPS1) mRNA, complete cds	Cupressus sempervirens	1943	1943	98%	0.0	99.08%	1104	AF257493.1
☒	Cupressus sempervirens clone.15 Cup.s.1 pollen allergen precursor (CUPS1) mRNA, complete cds	Cupressus sempervirens	1943	1943	98%	0.0	99.08%	1104	AF257492.1

Şekil 4.7: *Cupressus sempervirens* Cup s 1 proteininin amino asit dizi bilgisinin BLAST analizi sonuçları.

4.5. *Cup s 1* GENİNİN pQE-2 PLAZMİDİNE LİGASYONU VE KOLONİ PZR İLE KONTROLÜ

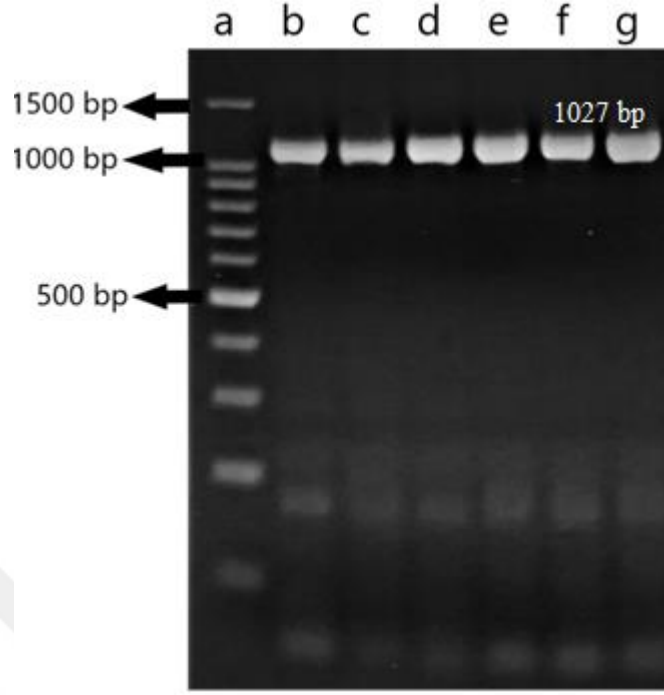
“Bölüm 3.6.1.”de anlatıldığı gibi, *NotI* ve *PstI* restriksiyon endonükleazları ile PZR ürünü ve pQE-2 plazmidi kesime uğratarak yapışkan uçlar oluşturuldu ve jelden geri kazanım yapıldı. PZR ürününün pQE-2 plazmidine ligasyonu gerçekleştirildikten (Şekil 4.8) sonra *E. coli* DH5α ırkına transformasyon işlemi yapıldı. Ardından LBA+Amp besiyerinde kolonilerin oluşması ampisilin direnç geni içermeyen *E. coli* DH5α hücrelerinin plazmidi aldığını ve transformasyonun gerçekleştiğini gösterdi.



Şekil 4.8: PZR ürününün pQE-2 plazmidine ligasyonunu gösteren koloniler(1-3).

Transformasyon verimliliğinin belirlenmesi için, toplamda 10 farklı petriden rekombinant plazmid içeren *E. coli* DH5 α kolonilerinden rastgele seçilip koloni PZR yapıldı. Alınan 8/10 pozitif sonuca göre transformasyon verimliliği ortalama %80 olarak belirlendi.

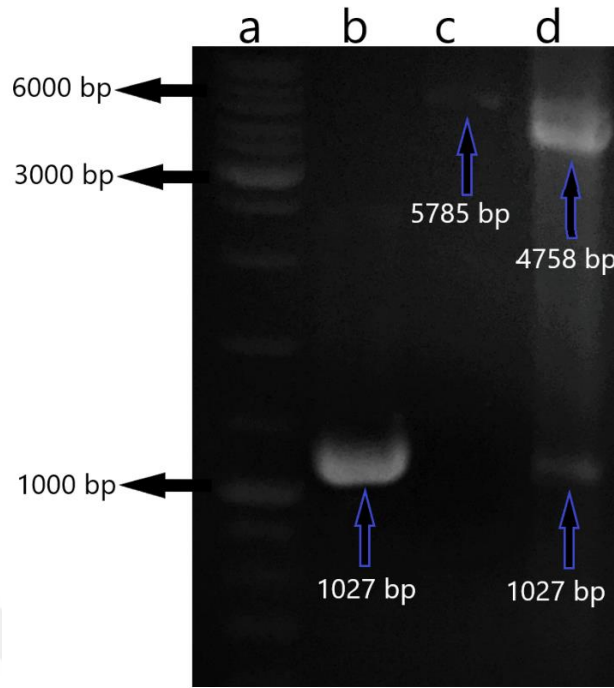
Rastgele seçilen transformant kolonilerden negatif ve pozitif kontrolle beraber “Bölüm 3.7.5.’de anlatıldığı gibi koloni PZR yapıldı ve sonuçları Şekil 4.9’da gösterildi. Oluşan bandın *Cup s 1* geninin boyutuna (1027 bp) denk geldiği görüldü.



Şekil 4.9: Koloni PZR ürünlerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü. a) Markır (GeneOn 304-005), b-g), Rastgele seçilen kolonilerin PZR sonuçları.

4.6. REKOMBİNANT PLAZMİDİN RESTRİKSİYON ENZİMLERİ İLE KESİM SONUÇLARI

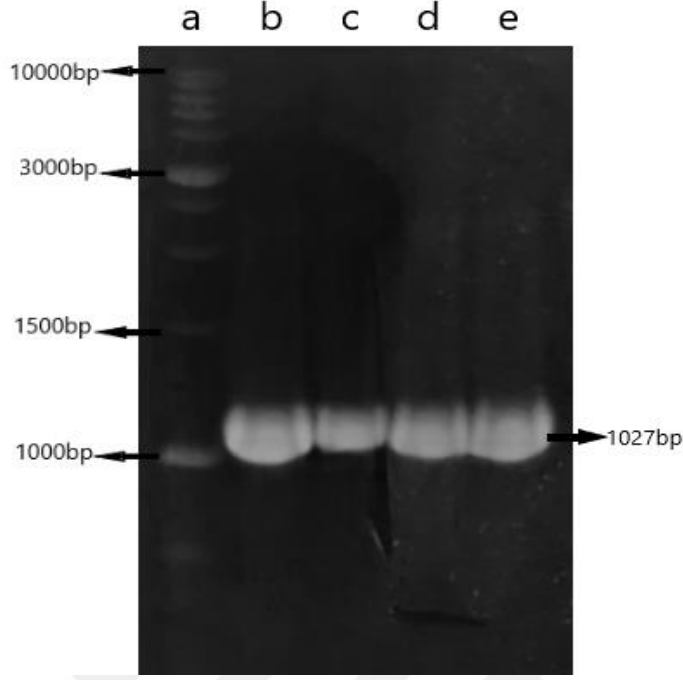
Agaroz jelde istenen bant görüntüsünü oluşturan, dolayısıyla transformasyonun gerçekleştiği bu koloniler seçilerek, Amp içeren LB seçici besiyerine ekilerek gece boyu 37°C'de 180 rpm'de üretildi ve bu hücrelerden plazmid izolasyonu yapıldı. Ligasyon ürünlerinin boyutlarını kontrol etmek için *PstI* ve *NotI* restriksiyon enzimleri ile tekli ve çiftli kesimleri gerçekleştirildi ve agaroz jelde analizi yapıldı. Tekli kesim sonucunda, rekombinant plazmid boyutunun 5785 bç, rekombinant plazmidin çiftli kesiminde ise 4758 bç'lik pQE-2 plazmidi ve 1027 bç'lik *Cup s 1* geni olmak üzere 2 bant görüldü (Şekil 4.10).



Şekil 4.10: Rekombinant plazmidin tekli ve çiftli restriksiyon enzimi kesim sonuçları. a) Markır (1kb, Gene-On 305-005), b) PZR ürünü, c) Ligasyon ürününün *PstI* restriksiyon endonükleazı ile tekli kesimi, d) Rekombinant plazmidin *PstI* ve *NotI* restriksiyon endonükleazları ile çiftli kesimi sonucunda oluşan bantlar.

4.7. REKOMBİNANT PLAZMİDİN *E. coli* BL21 (DE3) İRKİNA TRANSFORMASYONUN KOLONİ PZR İLE KONTROLÜ

Rekombinant plazmidin (pQE-2+*Cup s 1*) transformasyonu “Bölüm 3.7.2’de” anlatıldığı gibi gerçekleştirildi ve transformant hücreler LBA+Amp besiyerine ekildi. Oluşan kolonilerden rastgele seçim yapıldı ve bu kolonilerden “Bölüm 3.7.5’te” anlatıldığı gibi F1 ve R1 primerleri ile koloni PZR yapıldı. Agaroz jele yüklenen PZR ürününün *Cup s 1* geninin boyutu olan 1027 bp’ye denk geldiği görüldü (Şekil 4.11).

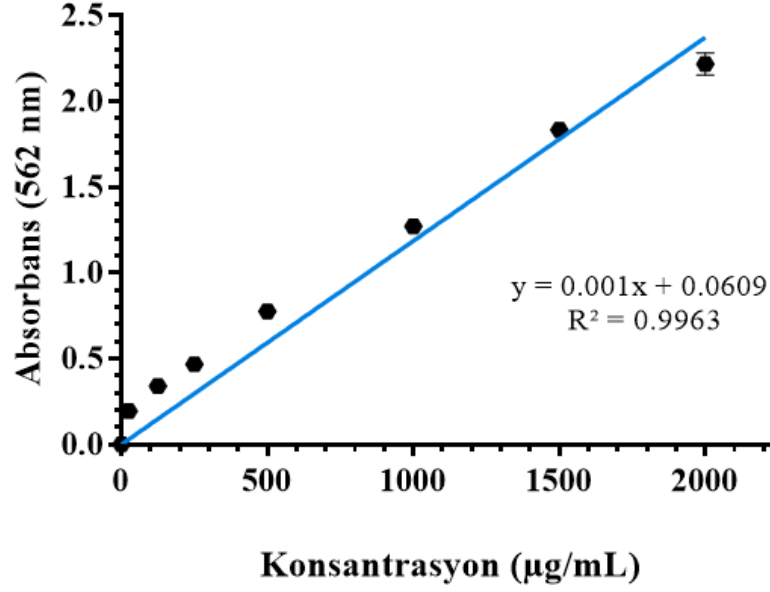


Şekil 4.11: *E.coli* transformantlarından yapılan koloni PZR sonucunda elde edilen DNA'nın %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü. a) Markır (1kb, Gene-On 305-005), b-e) rastgele seçilen kolonilerin koloni PZR sonuçları.

4.8. PROTEİN ANALİZ SONUÇLARI

4.8.1. Protein Konsantrasyonları

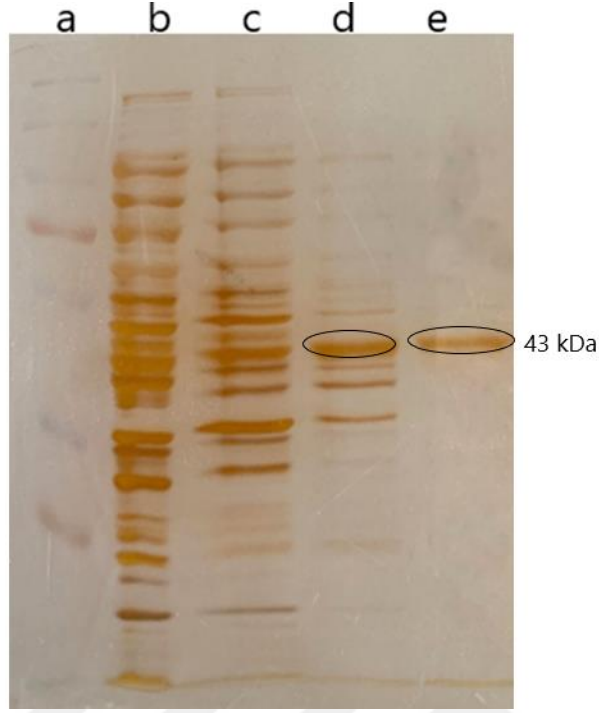
pQE-2+*Cup s 1* aktarılmış *E.coli* BL21 kolonilerinden protein izolasyonu sonucu elde edilen protein örneklerinin konsantrasyon tayini için ticari bir kit (SMARTTM BCA Protein Assay Kit, iNtRON Biotechnology) kullanılarak BCA yöntemi uygulandı. Kite bulunan BSA stoğundan 25, 125, 250, 500, 1000, 1500 ve 2000 µg/mL konsantrasyonlarında standartlar hazırlanarak BCA analizi için standart bir grafik elde edildi. Örneklerin protein konsantrasyonları elde edilen lineer grafik ve doğru denkleminde (Şekil 4.12) yararlanarak belirlendi. Çalışma boyu elde edilen protein örneklerinin konsantrasyonlarının 700-1500 µg/mL aralığında olduğu tespit edildi.



Şekil 4.12: Protein standart grafiği. Sığır serum albumin (“bovine serum albumin”, BSA) kullanılarak oluşturuldu ($R^2=0.996$).

4.8.2. Elektroforetik Analiz Sonuçları

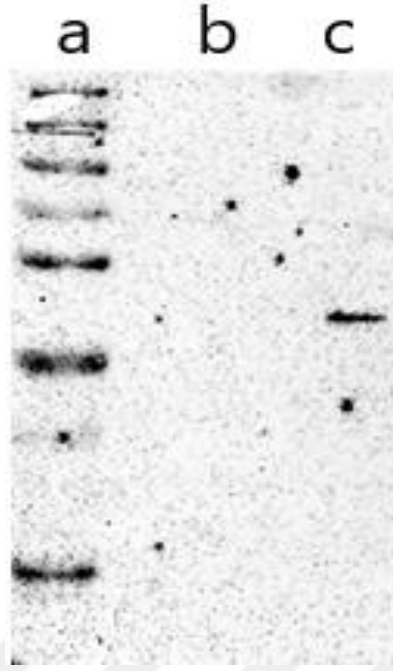
Protein analizi için örnekler örnek yükleme tamponu ile 1:1 (v:v) oranında karıştırılarak her bir kuyucukta 30 µg protein olacak şekilde jele yüklendi ve 200 V sabit voltajda ayrıştırıldı. Jel üzerindeki proteinler Gümüş boyama yöntemi ile görünür hale getirildi. Boyama sonucunda oluşan bantlar ChemiDoc MP (Bio-Rad) sistemiyle görüntülendi. Hem bakteriden izole edilen total proteinde, hem de saflaştırılmış 2 farklı örnekte *Cup s 1*’e karşılık gelen ~43 kDa’luk tek bant gözlemlendi (Şekil 4.13). Saflaştırma işleminin optimizasyonu sırasında elde edilen iki kolon çıktısından (d ve e) birinin (d) kısmen saf olduğu, diğerinin (e) ise yüksek saflıkta olduğu anlaşıldı.



Şekil 4.13: Gümüş boyama yöntemi ile boyanmış örnek jel görüntüsü. a) Markır (SeeBlue® Pre stained Protein Standard, Invitrogen LC5625), b) Negatif kontrol, c) İzole edilen total protein c)-d) Saflaştırma optimizasyonu sırasında elde edilmiş iki örnek.

4.8.3. Western-Blot Analiz Sonuçları

SDS-PAGE’de ayrıştırılan saf rekombinant *Cup s 1* PVDF membrana aktarıldıktan sonra hasta ve kontrol (*Cupressus sempervirens* alerjisi olmadığı bilinen sağlıklı bireylerin) serumları (Taş, 2019) ile işleme sokuldu. Western-Blot analizi sonucu olarak kemilüminesans görüntüler Şekil 4.14’de verildi. Rekombinant ürünün test edilen hastaya ait serum örnekleri ile reaksiyona girdiği gözlenirken negatif kontrolde ise herhangi bir bant gözlenmedi.



Şekil 4.14: Western-blot analizi. a) Markır (SeeBlue® Pre-stained Protein Standard, Invitrogen LC5625), b) Kontrol serum örneği, c) Hasta serum örneği.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Alerjik reaksiyonlar en yaygın immünolojik hastalıklardır ve gelişmiş ülkelerde 15 yaş üstü insanlar arasında en yaygın ve hızlı büyüyen kronik sağlık sorunlarından birini temsil etmektedir. Alerjik hastalıklar ve astım, Avrupa nüfusunun %25'inden fazlasını etkilemekte ve çok yüksek sosyo-ekonomik yüke neden olmaktadır (Bousquet ve diğ., 2018). Egzama, saman nezlesi, astım ve belirli gıdalara, ilaçlara veya diğer maddelere karşı gelişen ve potansiyel olarak yaşamı tehdit eden alerjiler, son 10 yıldır endişe verici bir şekilde yaygınlaşmaktadır. Dünya Alerji Örgütü'nün 2011-2012 tarihli alerji hakkındaki Beyaz Kitabı, dünya nüfusunun yaklaşık %30-40'ının bir veya daha fazla alerjik durumdan etkilendiğini belirtmektedir (East, 2011). Daha sıcak bir iklim, daha uzun bir polen mevsimi anlamına gelmektedir. Böylece sadece 15 yılda, Kuzey Amerika'nın bazı bölgelerinde yaygın bir alerjenin polen mevsimi 27 güne kadar uzamaktadır (Ziska ve diğ., 2011). Günümüzde iklim değişikliğinin de alerjide önemli bir rol oynadığı ve alerjisi olan kişileri olumsuz etkilediği anlaşılmıştır (D'Amato ve diğ., 2020).

Alerjik rinit, dünya çapında 400 milyondan fazla insanı etkileyen küresel bir sağlık sorunudur (Bousquet ve diğ., 2018). Çeşitli bitkilerden elde edilen polenler, mevsimsel alerjik rinit ve konjonktivitın başlıca nedenleridir ve astıma katkıda bulunabilir. Semptomatik tedavideki gelişmelere rağmen, birçok hasta polinozu yaşamaya devam etmektedir. (Ramirez ve diğ., 1984; Panzani ve diğ., 1986; Midoro-Horiuti ve diğ., 1992). 2018'de AB'de yetişkinlerin %7,7'sine ve çocukların ise %7,2'sine saman nezlesi teşhisi koyulmuştur (Summary Health Statistics: National Health Interview Survey, 2018).

Polen tanelerinin dayanıklı yapısı nedeniyle polen proteinlerinin neden olduğu alerjeniteyi önlemek zordur. Alerjene özgü immünoterapi (AIT), 100 yılı aşkın bir süredir polen alerjilerini hafifletmek için klinik olarak kullanılmaktadır, ancak etkinliği, verimliliği, güvenliği ve özgüllüğünü iyileştirmeye yönelik araştırmalar aktif bir araştırma alanı olmaya devam etmektedir. Tip I alerjinin semptomları farmakolojik tedavi ile kontrol edilebilirken, AIT, tek nedensel terapötik yaklaşımı temsil eder (Durham ve Till, 1998). İmmünoterapi, alerjene özgü yanıtızsızlık durumunu indüklemek için artan alerjen dozlarının uygulanmasına dayanır. Tanısal ve terapötik uygulamalar için birçok tanımlanmış rekombinant alerjen üretilmiş olmasına rağmen (Valenta ve Kraft, 1995), mevcut alerji tanı ve immünoterapisi hala doğal alerjen ekstraktlarıyla yapılmaktadır. Bu ekstraktlar alerjen kaynaklarından (örneğin bitki poleni, akarlar, küfler) hazırlanır ve bu nedenle alerjenik ve alerjenik

olmayan bileşenlerin karışımından oluşur. Bu nedenle bu tür ekstrelerin alerjen içerikleri, alerjene özel antikor problemleri ile standardize değildir (VanRee, 1994). Önceleri, alerjen ekstrelerinin standardizasyonu için alerjik hastalardan serum IgE veya alerjene özgü poliklonal tavşan antiserumları kullanılırken, daha sonraları bu amaç için tanımlanmış, epitop spesifitesine sahip monoklonal antikorlar kullanılmaya başlanmıştır. Alerjene özgü monoklonal antikorlar, ekstrelerdeki veya ortamdaki bireysel alerjenlerin saptanması için değerli araçları temsil eder (Chapman, 1990).

AIT'nin başlıca avantajları, tedavinin nispeten ucuz olması, yüksek kaliteli alerjenlerle yapıldığında oldukça etkili olması, tedavi 2 yıldan uzun süredir uygulanmışsa tedavi etkilerinin kesildikten sonra uzun sürmesi ve AIT'nin progresyonu önleyen hastalık modifiye edici etkilerinin olmasıdır (Incorvaia ve diğ., 2018; Brüggenjürgen ve Reinhold, 2018).

30 yıldan fazla bir süre önce, alerjenlerin ilk moleküler yapıları aydınlatılmış ve tanımlanmış rekombinant alerjenler kullanıma sunulmuştur (Zhernov ve diğ., 2019).

Cupressaceae familyasında alerjik hastalıklara yol açan en önemli cinsler *Cupressus* ve *Thuja*'dır. *Cupressaceae* familyasındaki türlerde polen proteinlerinin çoğunun PL protein ailesinde yer aldığı bilinmektedir ve 2004 yılına kadar varsayılan tek alerjen Cup s 1 olarak tanımlanmıştır (European Congress Allergology, Paris, Fransa, 7-11 Haziran 2003). Saflaştırılmış Cup s 1, 750 U/mg protein spesifik aktiviteye sahip fonksiyonel bir pektat liyaz enzimidir (Arilla ve diğ., 2004). Togawa ve arkadaşları 2006'da yaptıkları bir çalışmada düşük bir protein ekspresyonu seviyesine rağmen, PR 5 proteinleri ile çapraz reaktivite ve homolojiye sahip İtalyan Servi poleni alerjeni Cup s 3'ü tanımlamışlardır (Togawa ve diğ., 2006). Cup s 1 (bir pektat liyaz) ve Cup s 3 (patogenez ile ilgili bir grup 5 proteini), resmi olarak IUIS'deki sınıflandırmada yer almaktadır (www.allergen.org).

2018'de Türkiye'de yapılan bir çalışmada kısmi saflaştırma sonuçları tüm polen türlerinde majör alerjen protein bandı 43 kDa olarak tanımlanmış ve enzimatik aktivitelerini ölçülerek en yüksek PL aktivitesinin *J. oxycedrus*'ta bulunduğunu gösterilmiştir. Buna karşılık, en düşük PL aktivitesi *C. arizonica* poleninde belirlenmiştir (Şahin ve diğ., 2018). Bu tez çalışması, *C. sempervirens* polenindeki alerjenleri tespit etmek için daha önce yürütülen bir çalışmanın (Taş, 2018) devamı niteliğindedir. *C. sempervirens* poleninde bulunan proteinlerden 40-45 kDa (muhtemelen 43 kDa) olan bazı proteinlerin alerjen olabileceği rapor edilmiştir (Taş, 2018).

Mevcut literatür göz önünde bulundurularak, bu tez çalışmasında *C. sempervirens* polenindeki alerjenik bir protein olduğu bilinen Cup s 1'in *E.coli*'de klonlanması ve rekombinant üretimi gerçekleştirilmiştir. Klonlama rekombinant proteinlerin üretimi, büyüme hızı, uygun maliyeti, rekombinant proteinlerin yüksek verimi nedeniyle (Al-Hejin ve diğ., 2019) *E. coli*'de gerçekleştirilmiştir.

Taş (2018) bu çalışmada Akdeniz servisi ekstresi uygulanmış 5 hasta serumunun spesifik IgE antikorlarının ~20-68 kDa arasında molekül ağırlığına sahip toplam 8 polen proteinine bağlandığını göstermiştir. Aynı serum örnekleri kullanılarak yapılan immünoablottlama deneyleri, saflaştırılmış rekombinant Cup s 1'in IgE bağlama kapasitesini ortaya koymuştur. Bu sonuç Cup s 1'in *C. sempervirens* polenindeki alerjenlerden biri olduğunun kanıtıdır.

Sonuç olarak, bu çalışma ile Akdeniz servisi polenlerinde bulunan Cup s 1 Türkiye'de ilk kez rekombinant olarak üretilmiştir. Tanı ya da tedavide kullanılma potansiyeline sahip olan alerjik *C. sempervirens*'in Cup s 1 proteinini saf şekilde elde edilmiştir. Rekombinant DNA teknolojisi sayesinde elde edilen sabit ve yüksek protein miktarı Cup s 1'e karşı alerjisi olan hasta gruplarının tanı ve tedavisinde yeni çözümler sunabilir. Bunun yanı sıra bu tez çalışmasında elde edilen bilgiler, diğer alerji çalışmalarında ve epitop haritalandırılmasında kullanılabilecek bir kaynak potansiyelindedir.

KAYNAKLAR

- AAFA, 2021, Asthma and Allergy Foundation of America, <https://www.aaafa.org/pollen-allergy>, [Ziyaret tarihi: 20 Temmuz 2021].
- Abbas, M., Moussa, M. and Akel, H., 2020, Type I Hypersensitivity Reaction, In StatPearls, StatPearls Publishing.
- Abbott, D.W., Gilbert, H.J. and Boraston, A.B., 2010, The active site of oligogalacturonate lyase provides unique insights into cytoplasmic oligogalacturonate beta-elimination, *The Journal of Biological Chemistry*, 285(50), 39029-38.
- Aceituno, E., Del Pozo, V., Mínguez, A., Arrieta, I., Cortegano, I., Cárđaba, B., B., Gallardo, S., Rojo, M., Palomino, P. and Lahoz, C., 2000, Molecular cloning of major allergen from *Cupressus arizonica* pollen: Cup a 1, *Clinical and experimental allergy*, 30(12), 1750–1758.
- Al-Hejin, A.M., Bora, R.S. and Ahmed, M.M.M., 2019, *Plasmids for Optimizing Expression of Recombinant Proteins in E. coli*, Plasmid, In: Gull, M., (ed.), Chapter 3, IntechOpen, London, UNITED KINGDOM
- Allergen Nomenclature, 2021, The WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee, <https://www.allergen.org>, [Ziyaret tarihi: 20 Temmuz 2021].
- Andrew, E., Nehme, Z., Bernard, S., Abramson, M.J., Newbiggin, E., Piper, B., Dunlop, J., Holman, P. and Smith, K., 2017, Stormy weather: a retrospective analysis of demand for emergency medical services during epidemic thunderstorm asthma, *BMJ*, 359, j5636.
- Antó, J.M. and Sunyer, J., 1997, Thunderstorms: a risk factor for asthma attacks, *Thorax*, 52(8), 669–670.
- Arda, N., Önay-Uçar, E. ve Ertan, H., 2018, *Tek Boyutlu Protein Elektroforezi ve Protein Saptama Yöntemleri*, Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, In: Temizkan, G. ve Arda, N. (ed.), Bölüm 28, Nobel Tıp Kitabevleri, Türkiye, ISBN: 9786053353621.
- Arı, Ş., 2018, *DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması*, Temel ve İleri Moleküler Biyoloji Yöntemleri Genomik ve Proteomik Analizler, In: Temizkan, G. ve Arda, N. (ed.), Bölüm 16, Nobel Tıp Kitabevleri, Türkiye, ISBN: 9786053353621.
- Arilla, M.C., Ibarrola, I., Martínez, A. and Asturias, J.A., 2004, Quantification assay for the major allergen of *Cupressus sempervirens* pollen, Cup s 1, by sandwich ELISA, *Allergologia et immunopathologia*, 32(6), 319–325.
- Arruda, L.K., Platts-Mills, T.A., Fox, J.W., and Chapman, M.D., 1990, *Aspergillus fumigatus* allergen I, a major IgE-binding protein, is a member of the mitogillin family of cytotoxins, *The Journal of experimental medicine*, 172(5), 1529–1532.
- Bailey, L.H. and Bailey, E.Z., 1976, *Hortus Third: A Concise Dictionary of Plants Cultivated in the United States and Canada*, MacMillan Publishing Company, New York, USA.

- Beardmore, J.A. and Porter, J.S., 2003, Genetically modified organisms and aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO Fisheries Circular, Rome, Italy: FAO publications, 1–35.
- Behrendt, H. and Becker, W.M., 2001, Localization, release and bioavailability of pollen allergens: the influence of environmental factors, *Current opinion in immunology*, 13(6), 709–715.
- Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Rapp, B.A. and Wheeler, D.L., 2000, GenBank, *Nucleic Acids Research*, 28: 15-18.
- Bertani, G., 1952, Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*, *J. Bacteriology*, 62, 293-300.
- Besford, R.T. and Hobson, G.E., 1972, Pectic enzymes associated with the softening of tomato fruit, *Phytochemistry*, 11(7), 2201-2205.
- Bıçakçı, A. and Tosunoğlu. A., 2019, Allergenic Pollens in Turkey, *Asthma Allergy Immunology*, 17, 7-24.
- Bohle, B., 2007, The impact of pollen-related food allergens on pollen allergy, *Allergy*, 62(1), 3–10.
- Bostock, J., 1819, Case of a Periodical Affection of the Eyes and Chest, *Medico-chirurgical transactions*, 10(1), 161–165.
- Bousquet, J., Akdis, C.A., Grattan, C., Eigenmann, P.A., Hoffmann-Sommergruber, K., Agache, I. and Jutel, M., 2019, Highlights and recent developments in airway diseases in EAACI journals, *Allergy*, 74(12), 2329–2341.
- Bousquet, J., Cour, P., Guerin, B. and Michel, F.B., 1984, Allergy in the Mediterranean area. I. Pollen counts and pollinosis of Montpellier, *Clinical allergy*, 14(3), 249–258.
- Bousquet, J., Knani, J., Hejjaoui, A., Ferrando, R., Cour, P., Dhivert, H. and Michel, F.B. 1993, Heterogeneity of atopy I. Clinical and immunologic characteristics of patients allergic to cypress pollen, *Allergy*, 48(3), 183–188.
- Brandt, E.B., Myers, J.M., Ryan, P.H. and Hershey, G.K., 2015 Air pollution and allergic diseases, *Current opinion in pediatrics*, 27(6), 724–735.
- Breiteneder, H., Pettenburger, K., Bito, A., Valenta, R., Kraft, D., Rumpold, H., Scheiner, O. and Breitenbach, M. 1989, The gene coding for the major birch pollen allergen Betv1, is highly homologous to a pea disease resistance response gene, *The EMBO journal*, 8(7), 1935–1938.
- Brüggenjürgen, B. and Reinhold, T., 2018, Cost-effectiveness of grass pollen subcutaneous immunotherapy (SCIT) compared to sublingual immunotherapy (SLIT) and symptomatic treatment in Austria, Spain, and Switzerland, *Journal of medical economics*, 21(4), 374–381.

- Burks, A.W., Cockrell, G., Stanley, J.S., Helm, R.M. and Bannon, G.A., 1995, Recombinant peanut allergen Ara h I expression and IgE binding in patients with peanut hypersensitivity, *The Journal of clinical investigation*, 96(4), 1715–1721
- Burks, A.W., King, N. and Bannon, G.A., 1999, Modification of a major peanut allergen leads to loss of IgE binding, *International archives of allergy and immunology*, 118(2-4), 313–314.
- Cantillo, J. and Puerta, A., 2012, *From Molecular Cloning to Vaccine Development for Allergic Diseases*, An Integrated View of the Molecular Recognition and Toxinology, In: Radis-Baptista, G., (ed.), Chapter 11, IntechOpen, London, UNITED KINGDOM
- Cecchi, L., 2013, From pollen count to pollen potency: the molecular era of aerobiology, *The European respiratory journal*, 42(4), 898–900.
- Cecchi, L., D'Amato, G., and Annesi-Maesano, I., 2018, External exposome and allergic respiratory and skin diseases, *The Journal of allergy and clinical immunology*, 141(3), 846–857.
- Chapman, M.D., Smith, A.M., Vailes, L.D., Arruda, L.K., Dhanaraj, V. and Pomés, A., 2000, Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic disease, *The Journal of allergy and clinical immunology*, 106(3), 409–418.
- Charpin, D., Calleja, M., Lahoz, C., Pichot, C. and Waisel, Y., 2005, Allergy to cypress pollen, *Allergy*, 60(3), 293–301.
- Charpin, D., Calleja, M., Pichot, C., Penel, V., Hugues, B. and Poncet, P., 2013, Cypress pollen allergy, *Revue des maladies respiratoires*, 30(10), 868–878.
- Charpin, J., Aubert, J., Charpin, H. and Giraud-Michel, O., 1957, Respiratory allergy to pollen in Provence, *Biologie medicale*, 46(6), 617–631.
- Charpin, J., Aubert, J., Zafiropoulo, A. and Giraud-Michel, O., 1955, Etiology of pollinic respiratory disorders in Provence, *Journal francais de medecine et chirurgie thoraciques*, 9(4), 408–411.
- Chua, K.Y., Stewart, G.A., Thomas, W.R., Simpson, R.J., Dilworth, R.J., Plozza, T.M. and Turner, K.J., 1988, Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Der p 1. Homology with cysteine proteases, *The Journal of experimental medicine*, 167(1), 175–182.
- Cohen, S.N., Chang, A.C., Boyer, H. W. and Helling, R.B., 1973, Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(11), 3240–3244.
- Collmer, A. and Keen, N.T., 1986, The role of pectic enzymes in plant pathogenesis, *Annual Review of Phytopathology*, 24, 383–409.
- Corren, J., 2017, *Allergic Rhinitis and Conjunctivitis*, Middleton's Allergy Essentials, In: O'Hehir, R.E., Holgate, S.T. and Sheikh, A., (eds.), Chapter 11, Elsevier, 205–224.

- D'Amato, G. and Liccardi G., 1994, Pollen related allergy in the European Mediterranean area, *Clinical and Experimental Allergy*, 24: 210-219.
- D'Amato, G., Cecchi L., Bonini S., Nunes C., Annesi-Maesano I., Behrendt H., Liccardi G., Popov T. and Van Cauwenberge P., 2007, Allergenic pollen and pollen allergy in Europe, *Allergy*, 62: 976-990.
- D'Amato, G., Annesi Maesano, I., Molino, A., Vitale, C. and D'Amato, M., 2017, Thunderstorm-related asthma attacks, *The Journal of allergy and clinical immunology*, 139(6), 1786–1787.
- D'Amato, G., Annesi-Maesano, I., Vaghi, A., Cecchi, L. and D'Amato, M., 2018, How Do Storms Affect Asthma?, *Current allergy and asthma reports*, 18(4), 24.
- D'Amato, G., Chong-Neto, H.J., Monge Ortega, O.P., Vitale, C., Ansotegui, I., Rosario, N., Haahtela, T., Galan, C., Pawankar, R., Murrieta-Aguttes, M., Cecchi, L., Bergmann, C., Ridolo, E., Ramon, G., Gonzalez Diaz, S., D'Amato, M. and Annesi-Maesano, I., 2020, The effects of climate change on respiratory allergy and asthma induced by pollen and mold allergens, *Allergy*, 75(9), 2219–2228.
- D'Amato, G., Vitale, C., Lanza, M., Molino, A. and D'Amato, M., 2016, Climate change, air pollution, and allergic respiratory diseases: an update, *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 16(5), 434–440.
- Delves P.J., 2020, Overview of Allergic and Atopic Disorders, <https://www.msmanuals.com/professional/immunology-allergic-disorders/allergic,-autoimmune,-and-other-hypersensitivity-disorders/overview-of-allergic-and-atopic-disorders>, [Ziyaret tarihi: 6 Ağustos 2021].
- Di Felice, G., Barletta, B., Tinghino, R. and Pini, C., 2001, Cupressaceae pollinosis: Identification, purification and cloning of relevant allergens. *International archives of allergy and immunology*, 125(4), 280–289.
- Dubey, A.K., Yadav, S., Kumar, M. and Anand, G., 2016, Molecular biology of microbial pectate lyase: A review, *British Biotechnology Journal*, 13(1), 1-26.
- Dubus, J.C., Melluso, J.P., Bodiou, A.C. and Stremler-Lebel, N., 2000, Allergy to cypress pollen, *Allergy*, 55, 418-419.
- Durham, S.R. and Till, S.J., 1988, Immunologic changes associated with allergen immunotherapy, *The Journal of allergy and clinical immunology*, 102(2), 157–164.
- East, R., 2011, Allergies, *Nature*, 479, S1.
- Epöztürk, K. and Görkey, Ş., 2018, Were Allergic Diseases Prevalent in Antiquity, *Asthma Allergy Immunol*, 17:1-6.
- Erdem, N., 2007, Apollon ve Cyparissus (Ağlayan servi), <https://www.agacler.net>, [Ziyaret tarihi: 6 Ağustos 2021].

- Fang, K.S., Vitale, M., Fehlner, P. and King, T.P., 1988, cDNA cloning and primary structure of a white-face hornet venom allergen, antigen 5. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(3), 895–899.
- Ford, S.A., Baldo, B.A., Panzani, R. and Bass, D., 1991, Cypress (*Cupressus sempervirens*) pollen allergens: identification by protein blotting and improved detection of specific IgE antibodies, *International archives of allergy and applied immunology*, 95(2-3), 178–183.
- Gell, P.G.H. and Coombs, R.R.A., 1963, *The classification of allergic reactions underlying disease*, In: Clinical Aspects of Immunology, In: Coombs, R.R.A. and Gell, P.G.H., (eds), Blackwell Science.
- González-Buitrago, J.M., Ferreira, L., Isidoro-García, M., Sanz, C., Lorente, F. and Dávila, I. 2007, Proteomic approaches for identifying new allergens and diagnosing allergic diseases, *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 385(1-2), 21–27.
- Guardia, C., Alba, F., de Linares, C., Nieto-Lugilde, D. and Lopez Caballero, J., 2006, Aerobiological and allergenic analysis of Cupressaceae pollen in Granada (Southern Spain), *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 16(1), 24–33.
- Haahetla, T., Holgate, S., Pawankar, R., Akdis, C.A., Benjaponpitak, S., Caraballo, L., Demain, J., Portnoy, J. and von Hertzen, L., 2013, WAO Special Committee on Climate Change and Biodiversity; The biodiversity hypothesis and allergic disease: world allergy organization position statement, *The World Allergy Organization Journal*, 6(1), 3.
- Incorvaia, C., Gritti, B.L. and Ridolo, E., 2018, The economic advantage of allergen immunotherapy over drug treatment in respiratory allergy, *Journal of medical economics*, 21(6), 553–555.
- Jappe, U., Schwager, C., Schromm, A.B., González Roldán, N., Stein, K., Heine, H. and Duda, K.A., 2019, Lipophilic Allergens, Different Modes of Allergen-Lipid Interaction and Their Impact on Asthma and Allergy, *Frontiers in immunology*, 10, 122.
- Johnson, I.S., 1983, Human insulin from recombinant DNA technology, *Science (New York, N.Y.)*, 219(4585), 632–637.
- Jutel, M., Solarewicz-Madejek, K. and Smolinska, S., 2012, Recombinant allergens: the present and the future. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 8(10), 1534–1543.
- Kavgacı, A., 2018, *Cupressus L. (Serviler)*, Türkiye'nin Doğal-Egzotik Ağaç ve Çalıkları, In: Akkemik Ü. (Ed.), Orman Genel Müdürlüğü Yayınları, Ankara, ISBN: 978-605-9550-14-7.
- Knox, R.B., 1979, *Pollen and allergy*, Edward Arnold Limited, London, ISBN: 0713127368.
- Kulikauskas, R. and McCormick, S., 1997, Identification of the tobacco and Arabidopsis homologues of the pollen-expressed LAT59 gene of tomato, *Plant molecular biology*, 34(5), 809–814.

- Løwenstein, H. and Larsen, J.N., 2001, Recombinant allergens/allergen standardization, *Current allergy and asthma reports*, 1(5), 474–479.
- Marín-Rodríguez, M.C., Smith, D.L., Manning, K., Orchard, J. and Seymour, G.B., 2003, Pectate lyase gene expression and enzyme activity in ripening banana fruit. *Plant Molecular Biology*, 51, 851-857.
- Marselle, M., Stadler, J., Korn, H., Irvine, K. and Bonn, A., 2019, *Biodiversity and Health in the Face of Climate Change*, Springer Nature, Switzerland, ISBN: 978-3-030-02317-1.
- Midoro-Horiuti, T., Goldblum, R.M., Kurosky, A., Goetz, D.W. and Brooks, E.G., 1999, Isolation and characterization of the mountain cedar (*Juniperus ashei*) pollen major allergen, Jun a 1, *The Journal of allergy and clinical immunology*, 104(3 Pt 1), 608–612.
- Mills, M.P., 2010, Immunological and Inflammatory Aspects of Periodontal Disease. <https://www.dentalcare.com/en-us/professional-education/ce-courses/ce1/types-of-hyper-sensitivity-reactions>, [Ziyaret tarihi: 3 Ağustos 2021].
- Monsalve, R., Barber, D., Panzani-Villalba, M. and Rodriguez, R., 2003, Purification and characterization of Cup s 1, major allergen of *Cupressus sempervirens* pollen, *Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology*, 58, 91-92.
- More sneezing in a warmer world, 2011, *Nature*, <https://doi.org/10.1038/471008a>. [Ziyaret tarihi: 6 Ağustos 2021].
- Morgenstern, J.P., Griffith, I.J., Brauer, A.W., Rogers, B.L., Bond, J.F., Chapman, M.D., and Kuo, M.C., 1991, Amino acid sequence of Fel dI, the major allergen of the domestic cat: protein sequence analysis and cDNA cloning, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(21), 9690–9694.
- Pablos, I., Wildner, S., Asam, C., Wallner, M. and Gadermaier, G., 2016, Pollen Allergens for Molecular Diagnosis, *Current allergy and asthma reports*, 16(4), 31.
- Panzani, R., Centanni, G. and Brunel, M. 1986, Increase of respiratory allergy to the pollens of cypresses in the south of France, *Annals of allergy*, 56(6), 460–463.
- Papa, G., Romano, A., Quarantino, D., Di Fonso, M., Viola, M., Artesani, C.M. and Venuti, A., 2001, Prevalence of sensitization to *Cupressus sempervirens*: a 4-year retrospective study, *Science of The Total Environment*, 270(1-3), 83–87.
- Pawankar, R., Holgate, S.T., Canonica, G.W., Lockey, R.F. and Blaiss, M.S., 2013, *WAO White Book on Allergy 2013 Update*, World Allergy Organization, ABD, ISBN-13: 978-0-615-92918-7.
- Payasi, A. and Sanwal, G.G., 2003, Pectate lyase activity during ripening of banana fruit. *Phytochemistry*, 63(3), 243-248.

- Pichler, U., Hauser, M., Wolf, M., Bernardi, M.L., Gadermaier, G., Weiss, R., Ebner, C., Yokoi, H., Takai, T., Didierlaurent, A., Rafaiani, C., Briza, P., Mari, A., Behrendt, H., Wallner, M. and Ferreira, F. 2015, Pectate lyase pollen allergens: sensitization profiles and cross-reactivity pattern, *PloS one*, 10(5), e0120038.
- Ramirez, D.A., 1984, The natural history of mountain cedar pollinosis, *The Journal of allergy and clinical immunology*, 73(1 Pt 1), 88–93.
- Ring, J., 1985, Erstbeschreibung einer "atopischen Familienanamnese" im Julisch-Claudischen Kaiserhaus: Augustus, Claudius, Britannicus [1st description of an "atopic family anamnesis" in the Julio-Claudian imperial house: Augustus, Claudius, Britannicus]. *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete*, 36(8), 470–471.
- Rogers, K., 2018, Invention of recombinant DNA technology, <https://www.britannica.com/science/recombinant-DNA-technology/additional-info#history>. [Ziyaret tarihi: 6 Ağustos 2021].
- Rosenberg, L.E., Rosenberg, D.D., 2012, - *Structure of Genes, Chromosomes, and Genomes*, Human Genes and Genomes, In: Rosenberg, L.E., Rosenberg, D.D. (eds.), Chapter 6, Academic Press, 75-96.
- Şahin, A.A., Aslım, B., Tan, S., Alan, Ş., Pınar N.M., 2018, Differences in structure, allergenic protein content and pectate lyase enzyme activity of some Cupressaceae pollen, *Turkish Journal of Biochemistry*, 43(4), 435–446.
- Sánchez-Borges, M., Greenberger, P., 2016, Pollen allergies: Adapting to a changing climate, *World Allergy Week*, 4-10 April 2016, World Allergy Organization (WAO).
- Sheikh, A. and Strachan, D.P., 2004, The hygiene theory: fact or fiction?, *Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery*, 12(3), 232–236.
- Skoner, D.P., 2001, Allergic rhinitis: definition, epidemiology, pathophysiology, detection, and diagnosis. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 108(1 Suppl), S2–S8.
- Smith M., Berger, S., Behrendt, H., and Bergmann K., 2014, *Pollen and Pollinosis*, History of Allergy, In: Bergmann, K.C., Ring, J., (eds), Karger, Basel, 228–233.
- Smith, M., Cecchi, L., Skjøth, C.A., Karrer, G. and Šikoparija, B., 2013, Common ragweed: a threat to environmental health in Europe, *Environment international*, 61, 115–126.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C., 1985, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Analytical biochemistry*, 150(1), 76–85.
- Solbak, A., Richardson, T., McCann, R., Kline, K., Bartnek, F., Tomlinson, G., Tan, X., Parra-Gessert, L., Frey, G., Podar, M., Luginbuehl, P., Gray, K., Mathur, E., Robertson, D., Burk, M., Hazlewood, G., Short, J. and Kerovuo, J., 2005, Discovery of pectin-degrading enzymes and directed evolution of a novel pectate lyase for processing cotton fabric, *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 9431-9438.

- Sone, T., Komiyama, N., Shimizu, K., Kusakabe, T., Morikubo, K. and Kino, K., 1994, Cloning and sequencing of cDNA coding for Cry j I, a major allergen of Japanese cedar pollen, *Biochemical and biophysical research communications*, 199(2), 619–625.
- Stanley, R.G. and Linskens, H.F., 1974, *Pollen: biology - biochemistry - management*. Springer-Verlag, Berlin, ISBN: 978-3-642-65907-2.
- Starr, M.P. and Moran, F., 1962, Eliminative split of pectic substances by phytopathogenic soft-rot bacteria, *Science*, 16, 135(3507), 920-921.
- Stewart, G.A., Robinson, C., 2017, *Indoor and Outdoor Allergens and Pollutants*, Middleton Allergy Essentials, In: O' Hehir, R.E., Holgate, S.T. and Sheikh, A., Chapter 4, Elsevier, 73-116, ISBN 9780323375795.
- Stinson, K.A., Albertine, J.M., Hancock, L.M., Seidler, T.G. and Rogers C.A., 2016, Northern ragweed ecotypes flower earlier and longer in response to elevated CO₂: what are you sneezing at?, *Oecologia*, 182(2), 587–594.
- Summary Health Statistics Tables for U.S. Adults: National Health Interview Survey, 2018, Tables A-2b, A-2c, https://ftp.cdc.gov/pub/Health_Statistics/NCHS/NHIS/SHS/2018_SHS_Table_A-2.pdf, [Ziyaret tarihi: 6 Ağustos 2021].
- Suphioglu, C., 1998, Thunderstorm asthma due to grass pollen. *International archives of allergy and immunology*, 116(4), 253–260.
- Taketomi, E.A., Sopelete, M.C., de Sousa Moreira, P.F. and de Assis Machado Vieira, F., 2006, Pollen allergic disease: pollens and its major allergens, *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 72(4), 562-567.
- Takizawa, H., 2011, Impact of air pollution on allergic diseases, *The Korean Journal of Internal Medicine*, 26(3), 262–273.
- Tang, R., Sun, J.L., Yin, J., Li, Z., 2015, Artemisia allergy research in China. *BioMed research international*, 2015, 179426.
- Taniguchi Y., Ono A., Sawatani M., Nanba M., Kohno K., Usui M., Kurimoto M. and Matuhasi T., 1995, Cry j I, a major allergen of Japanese cedar pollen, has a pectate lyase enzyme activity, *Allergy*, 50, 90-93.
- Tardy F., Nasser W., Robert-Baudouy J. and Hugouvieux-Cotte-Pattat N., 1997, Comparative analysis of the five major *Erwinia chrysanthemi* pectate lyases: enzyme characteristics and potential inhibitors, *Journal of Bacteriology*, 179, 2503-2511.
- Taş, Ş., 2018, *İstanbul'daki Akdeniz Servisi (Cupressus sempervirens L.) ve Sabin Ardıcı (Juniperus sabina L.) Polenlerinin Alerjenik Proteinleri*, Yüksek lisans, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

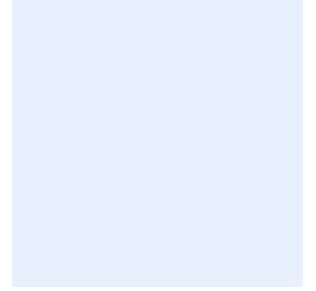
- Togawa, A., Panzani, R.C., Garza, M.A., Kishikawa, R., Goldblum, R.M. and Midoro-Horiuti, T., 2006, Identification of italian cypress (*Cupressus sempervirens*) pollen allergen Cup s 3 using homology and cross-reactivity, *Annals of allergy, asthma & immunology*, 97(3), 336–342.
- Topal-Sarıkaya, A., 2018, *Total RNA ve mRNA İzolasyonu*, Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, In: Temizkan, G. ve Arda, N. (eds.), Bölüm 8, Nobel Tıp Kitabevleri, Türkiye, ISBN: 9786053353621.
- Tscheppe, A. and Breiteneder, H., 2017, Recombinant Allergens in Structural Biology, Diagnosis, and Immunotherapy, *International archives of allergy and immunology*, 172(4), 187–202.
- Valenta, R. and Kraft, D., 1995, Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic diseases, *Current opinion in immunology*, 7(6), 751–756.
- van Ree, R., 1994, Value of monoclonal antibody-based assays: advantages and drawbacks, *Arbeiten aus dem Paul-Ehrlich-Institut (Bundesamt für Sera und Impfstoffe) zu Frankfurt a.M.*, 87, 127–139.
- Vidakovic, M., 1991, *Morphology and Variation*, Grafičko Zavod Hrvatske, Zagreb Yugoslavia, ISBN: 9788639902797.
- Vieira, F.M., 2003, Novas práticas agropastoris estão influenciando a relação meio ambiente/polinose no sul do Brasil?, *Revista brasileira de alergologia e imunopatologia* 26(1), 37-38.
- Waisel, Y. and Epstein, V., 2000, How to reduce air pollution by *Cupressus* pollen?, *Allergie et immunologie*, 32(3), 141–142.
- WHO 2021, ALLERGEN NOMENCLATURE, World Health Organization and International Union of Immunological Societies (WHO/IUIS) Allergen Nomenclature Sub-Committee, <http://www.allergen.org/treeview.php>, [Ziyaret tarihi: 26 Temmuz 2021].
- Wing, R.A., Yamaguchi, J., Larabell, S.K., Ursin, V.M. and McCormick, S., 1989, Molecular and genetic characterization of two pollen-expressed genes that have sequence similarity to pectate lyases of the plant pathogen *Erwinia*, *Plant Molecular Biology* 14, 17-28.
- Wu, Y., Qiu, X., Du, S. and Erickson, L., 1996, PO149, a new member of pollen pectate lyase-like gene family from alfalfa, *Plant molecular biology*, 32(6), 1037–1042.
- Yin, J., Yue, F.M., Wang, L.L., He, H.J., Xu, T., Li, H., Wen, L.P., Sun, J.L., Gu, J.Q., Han, S.M., Zhang, H.Y. and Ye, S.T., 2006, Natural course from rhinitis to asthma in the patients with autumnal pollinosis: a clinical study of 1096 patients, *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 86(23), 1628-1632.
- Zhernov, Y., Curin M., Khaitov M., Karaulov A. and Valenta, R., 2019, Recombinant allergens for immunotherapy: state of the art. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 19(4), 402–414.

- Ziska, L., Knowlton, K., Rogers, C., Dalan, D., Tierney, N., Elder, M., Filley, W., Shropshire, J., Ford, L., Hedberg, C., Fleetwood, P., Hovanky, K., Kavanaugh, T., Fulford, G., Vrtis, R., Patz, J., Portnoy, J., Coates, F., Bielory, L. and Frenz, D., 2011, Recent warming by latitude associated with increased length of ragweed pollen season in central North America, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 4248- 4251.
- Zuberbier, T., 2016, Pollen Allergy, <https://www.ecarf.org/en/information-portal/allergies-overview/pollen-allergy/>. [Ziyaret tarihi: 3 ağustos 2021].



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Narmin Mirzamammadli
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	
Uyruğu	☐ T.C. ☒ Diğer: Azerbaycan
Telefon	
E-Posta Adresi	
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Bakü Devlet Üniversitesi
Fakülte	Biyolji
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik

Makale ve Bildiriler	
Mirzamammadli N., Aghalarova N., Aksüt Y., Arda N. 2019, Biotechnological production of an allergenic of pectate lyase identified in Cypress Pollens, Turkish Journal of Biology, 43:(5 supp*), 111. *Supplement: Abstract Proceedings of the 7th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey (MolBiyoKon19), Campus Suleyman Demirel Cultural Center – Istanbul, Turkey. 27-29 September 2019. Poster Presentation.	