T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ

Nicotiana benthamiana BİTKİSİNDE *In vivo* ENDO H ile DEGLİKOZİLE EDİLMİŞ PA83'ün DİĞER PA83 FORMLARI ile KARŞILIKLI STABİLİTE ÇALIŞMALARI

Deniz SAY

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MAYIS 2020

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ

Nicotiana benthamiana BİTKİSİNDE *In vivo* ENDO H ile DEGLİKOZİLE EDİLMİŞ PA83'ün DİĞER PA83 FORMLARI ile KARŞILIKLI STABİLİTE ÇALIŞMALARI

Deniz SAY

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MAYIS 2020

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Nicotiana benthamiana BİTKİSİNDE *In vivo* ENDO H ile DEGLİKOZİLE EDİLMİŞ PA83'ün DİĞER PA83 FORMLARI ile KARŞILIKLI STABİLİTE ÇALIŞMALARI

Deniz SAY

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez Tübitak tarafından 115S077 nolu proje ile desteklenmiştir.

MAYIS 2020

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Nicotiana benthamiana BİTKİSİNDE *In vivo* ENDO H ile DEGLİKOZİLE EDİLMİŞ PA83'ün DİĞER PA83 FORMLARI ile KARŞILIKLI STABİLİTE ÇALIŞMALARI

Deniz SAY

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 14/07/2020 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV (Danışman)

Prof. Dr. Nedim MUTLU

Doç. Dr. Muhammet TONGUÇ

ÖZET

Nicotiana benthamiana BİTKİSİNDE *In vivo* ENDO H ile DEGLİKOZİLE EDİLMİŞ PA83'ün DİĞER PA83 FORMLARI ile KARŞILIKLI STABİLİTE ÇALIŞMALARI

Deniz SAY

Yüksek Lisans Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV

Mayıs 2020; 43 sayfa

Şarbon hastalığının etken organizması olan *Bacillus anthracis*, genellikle otçul hayvanların yaygın şekilde aşılanamadığı ülkelerde ortaya çıkmaktadır. Bu bakteri insanlara kutanöz, gastrointestinal veya sporlarının solunması ile ortaya çıkan inhalasyon formu ile bulaşabilmektedir. Bakterinin spor formu, sahip olduğu yüksek ölüm oranları ve uzun zamandır potansiyel bir biyolojik savaş ajanı olarak kabul edilmesiyle bilim adamlarını hızlı ve etkili bir şekilde koruyucu bağışıklık sağlayan, gelişmiş bir güvenlik profiline sahip, rekombinant aşılar geliştirmeye yöneltmiştir. Rekombinant protein ekspresyon sistemleri arasında yer alan bitkiler, diğer ekspresyon sistemlerine kıyasla düşük maliyetleri ve uygun güvenlik profilleri ile umut verici bir platformunu temsil etmektedir. Ancak *B. anthracis* PA'sı, ökaryotik sistemlerde ekspresyon sırasında anormal şekilde glikozile olabilen potansiyel N-bağlı glikozilasyon bölgeleri içermektedir. Daha önceki çalışmalar, glikozile edilmemiş bir pp-PA83 formunu, peptit-N-glikosidaz F (PNGase F) enzimi ile birlikte ekspresyonuna dayanan bir *In vivo* deglikozilasyon yaklaşımını *Nicotiana benthamiana'*da tasarlayarak üretmişlerdir (Mamedov vd. 2016). Laboratuvarımızda gerçekleştirilen çalışmaların sonraki aşamalarında başka bir deglikozile edici enzim olan Endo-β-N-asetilglukosaminidaz H (Endo H)'in, PNGase F enziminin katalizi sırasında meydana gelen deaminasyona sebebiyet vermeden proteini katalizlediği bulunmuştur (Mamedov vd. 2017). Bu tez çalışmasında Endo H tarafından bu şekilde *In vivo* olarak üretilen deglikozile PA83 proteini, PNGase F ile deglikozile edilen muadili ve proteinin glikozile formu saflaştırma deneylerinden sonra farklı zaman periyotlarında ve sıcaklıklarda uzun stabilite testlerine tabii tutulmuştur. Endo H ile deglikozile edilen PA83, uzun zaman dilimlerinde dahi diğer PA83 formlarından daha iyi bir stabilite gösterdiği kanıtlanmıştır. Elde edilen bu sonuçlar, bitki üretimli deglikozile PA83'ün şarbona karşı güvenli, etkili ve düşük maliyetli bir rekombinant alt ünite aşısı için iyi bir aday olabileceği göstermektedir.

ANAHTAR KELİMELER: *Bacillus anthracis,* Bitki Ekspresyon Sistemi, Deglikozilasyon, *Nicotiana benthamiana,* Rekombinant Alt Ünite Aşı, Şarbon

JÜRİ: Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV

Prof. Dr. Nedim MUTLU

Doç. Dr. Muhammet TONGUÇ

ABSTRACT

COMPARATIVE STABILITY STUDIES OF ENDO H *In vivo* DEGLYCOSYLATED PA83 WITH OTHER PA83 FORMS IN *Nicotiana benthamiana* PLANTS

Deniz SAY

Master's Degree Thesis, Agricultural Biotechnology Department

Supervisor: Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV

May 2020; 43 pages

Bacillus anthracis, the causative organism of anthrax, usually occurs in countries where herbivorous animals cannot be widely vaccinated. These bacteria can be transmitted to humans by cutaneous, gastrointestinal or inhalation form, which is caused by inhalation of spores. The spore form of the bacterium has led scientists to develop recombinant vaccines with an improved safety profile that quickly and effectively protects immunity, with its high mortality rates and acceptance as a potential biological warfar reagent for a long while. Plants among the recombinant protein expression systems represent a promising platform with low costs and appropriate safety profiles compared to other expression systems. However, *B. anthracis* PA contains potential N-linked glycosylation sites that can be abnormally glycosylated during expression in eukaryotic systems. Previous studies have produced a non-glycosylated form of plant produced PA83 by using an in vivo deglycosylation approach based on its co-expression with the peptide-N-glycosidase F (PNGase F) enzyme in *Nicotiana benthamiana* (Mamedov et al. 2016). Recently, for production of non-deglycosylated proteins another strategy, Endo H (Endo-β-N-acetylglucosaminidase) in vivo deglycosylation strategy was developed (Mamedov et al., 2017), which causes no amino acid change in the resulted proteins. In this thesis, the deep stability analysis of PA83 protein produced by Endo H in vivo degycosylation strategy was performed. Thus, deglycosylated PA83 proteins, produced by PNGase F or Endo H strategy were subjected to long stability tests at different time periods and temperatures after purification experiments. Endo H deglycosylated PA83 has been shown to show better stability than other forms of PA83, even over long periods of time. These results show that plant produce dPA83 can be a good candidate for safe, effective and low cost recombinant anthrax subunit vaccine development.

KEYWORDS: Anthrax, *Bacillus anthracis*, Deglycosylation, Plant Expression System, Recombinant Subunit Vaccine, *Nicotiana benthamiana*

COMMITTEE: Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV

Prof. Dr. Nedim MUTLU

Assoc. Prof. Dr. Muhammet TONGUÇ

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans eğitimim süresince bilgi ve iş tecrübelerini benimle paylaşarak eğitim ve öğretim hayatıma katkıda bulunan, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam sayın, Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV'a teşekkürlerimi sunarım.

Akdeniz Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü'nün Akademik Kadrosunda yer alan bütün saygı değer hocalarıma ve deneysel çalışmalarım boyunca teknik ve manevi olarak desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım Damla YÜKSEL ve İrem GÜRBÜZASLAN'a ayrıca MAMMEDOV Lab.'ın diğer bütün değerli üyelerine teşekkür ederim.

Bu güne kadar edindiğim eğitim ve öğretim hayatım boyunca her konuda maddi ve manevi destek sağlayan, beni cesaretlendiren, beni bugünlere getiren, sevgilerini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli aileme ve özellikle Annem'e sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

ÖZET i

ABSTRACT ii

ÖNSÖZ iii

AKADEMİK BEYAN vi

SİMGELER VE KISALTMALAR vii

ŞEKİLLER DİZİNİ ix

ÇİZELGELER DİZİNİ xi

1. GİRİŞ 1

2. KAYNAK TARAMASI 3

2.1. Şarbon Hastalığı 3

2.2. *Bacillus anthracis* Mekanizması 4

2.3. Tedavi Yolları ve Sınırlamaları 7

2.4. Rekombinant Protein Ekspresyon Sistemleri 8

2.5. Geçici Bitki Ekspresyon Sistemi 10

2.6. Deglikozilasyon Stratejisi 11

3. MATERYAL VE METOD 15

3.1. Deneylerde Kullanılacak Olan Çözeltiler ve Tamponlar 15

3.2. Deneylerde Kullanılacak Olan Besi Yerleri 22

3.3. *Bacillus anthracis* PA'nın Kodon Optimizasyonu ve Klonlanması 23

3.4. Glikozile ve Deglikozile PA83 Proteininin, *Nicotiana benthamiana* Bitkisindeki Geçici Ekpresyonu 23

3.5. Bitkiden Protein Ekstraksiyonu ve İmmuno Blot Analizi 24

3.6. His-tag Etiketli Glikozile ve Deglikozile pp-PA83 Proteinlerinin *N. Benthamiana*'dan Saflaştırılması 25

3.7. Stabilite Analizleri 26

3.7.1. Western Blot Analizi 26

3.7.2. Native Page Analizi 26

3.7.3. SDS-PAGE Analizleri 27

4. BULGULAR VE TARTIŞMA 28

4.1. Rekombinant PA83 varyantlarının üretilmesi 28

4.2. Rekombinant PA83 varyantlarının saflaştırılması 29

4.3. ppPA83 Protein Varyantlarının, pp-anti-PA83 Antikorları ile Reaktivite Analizi 29

4.4. Saflaştırılmış Rekombinant PA83 Varyantlarının Stabilite Analizleri 30

4.4.1. Stabilite Analizlerinin Western Blot Bulguları 31

4.4.2. Stabilite Analizlerinin Native Page Bulguları 32

4.4.3. Stabilite Analizlerinin SDS Page Bulguları 33

5. SONUÇLAR 39

6. KAYNAKLAR 41

ÖZGEÇMİŞ

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum " *Nicotiana benthamiana* Bitkisinde *In vivo* Endo H ile Deglikozile Edilmiş PA83'ün diğer PA83 Formları ile Karşılıklı Stabilite Çalışmaları " adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

…/…/2020

Deniz SAY

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C : derece santigrat

g : gram

L : Litre

µl : mikrolitre

µg : mikrogram

ml : mililitre

mM : milimolar

M : Molar

Kısaltmalar

Asn : Asparajin (C4H8N2O3)

Anti-PA83 : Koruyucu Antijene özgü Antikor

BSA Standart : Bovine Serum Albumin Protein Standartı

dk : dakika

dG-anti-PA83(E) : Endo H deglikozilasyon enzimi ile kesilen deglikozile anti-PA83

dG-anti-PA83(P) : PNGase F deglikozilasyon enzimi ile kesilen deglikozile anti-PA83

dPA83(E) : Endo H deglikozilasyon enzimi ile kesilen deglikozile PA

dPA83(P) : PNGase F deglikozilasyon enzimi ile kesilen deglikozile PA

EF : Ödem Faktörü

Endo H : Endo-β-N-asetilglukosaminidaz H

ETx : Ödem Toksini

GlcNAc : N-Asetil-D-glukozamin

gPA83 : glikozile Koruyucu Antijen

G-anti-PA83 : Koruyucu Antijene özgü üretilen glikozile Antikor

kb : kilobaz

kDa : kilodalton

LF : Öldürü Faktör

LeTx : Öldürücü Toksin

mAb : monoklonal Antikor

O.D. : Optik Dansite

PA : Koruyucu Antijen (83 kDa)

pH : Çözeltinin asitlik veya bazlık derecesi

PNGase F : Peptide-N-glycosidase F

pp-PA83 : Bitkide üretilmiş Koruyucu Antijen

rPA : rekombinant Koruyucu Antijen

s : saat

SDS Page : Sodyum Dodesil Sülfat-Poli Akrilamid Jel Elektroforezi

sn : saniye

TNA : Toksin Nötralizasyon Deneyi

V : Volt

Xg : Rölatif santrifüj kuvveti

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. *Bacillus anthracis'*in memeli hayvanlardaki yaşam döngüsü 3

Şekil 2.2. Şarbon Patofizyolojisi (Dixon vd. 1999) 4

Şekil 2.3. Şarbon bakterisinin (*Bacillus anthracis*) renkli taramalı elektron mikrografı (SEM) ve *B. anthracis*'in örnekleme çizimi 5

Şekil 2.4. *Bacillus anthracis* enfeksiyonunun patogenezi 6

Şekil 2.5. Bitkide geçici protein ekspresyonu sistemi 11

Şekil 2.6. Memeli, bitki, böcek ve mayalar da bulunan tipik N-glikan yapılarının gösterimi 12

Şekil 2.7. Endo H ve PNGase F deglikozilasyon enzimlerinin kesim bölgelerinin şematik gösterimi 13

Şekil 3.1. *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı ile gerçekleştirilen geçici bitki ekspresyonun infiltrasyon işlemi 23

Şekil 3.2. *Nicotiana benthamiana* bitkisinin görüntüsü 24

Şekil 3.3. *Nicotiana benthamiana* bitkisinin yaprak alt ayasına yapılan infiltrasyon işlemi 24

Şekil 4.1. *Nicotiana benthamiana* bitkisinde eksprese edilen glikozile PA83, Endo H ve PNGase F deglikozile edilmiş PA83 proteinlerinin Western Blot görüntüsü 28

Şekil 4.2. *Nicotiana benthamiana* bitkisinde üretilip, saflaştırılan glikozile ve deglikozile PA83 proteinlerinin SDS-PAGE analizi 29

Şekil 4.3. ppPA83 proteinlerinin özgül monoklonal antikoru (mAb) pp-anti-PA83 ile gerçekleştirilen Western Blot analizi görüntüsü 30

Şekil 4.4. Rekombinant PA83 varyantlarının stabilite testleri sonrası Western Blot analizi 31

Şekil 4.5. Rekombinant PA83 varyantlarının stabilite periyodlarının ardından yüksek hızda santrifüj sonrası oluşan süpernatantlarına uygulanan Native PAGE analizi görüntüsü 32

Şekil 4.6. Rekombinant PA83 varyantlarının belirli sıcaklıklarda 15 dk'lık inkübasyonu sonrası SDS Page analizi görüntüsü 33

Şekil 4.7. Rekombinant PA83 varyantlarının 37 °C'de, 12, 24, 48, 72 ve 96 saatlik periyotlardaki inkübasyonu sonrasında SDS Page analizi görüntüsü 34

Şekil 4.8. Rekombinant PA83 varyantlarının 37 °C'de, 2, 4, 6, 8 ve 10 günlük periyotlardaki inkübasyonu sonrasında SDS Page analizi görüntüsü 35

Şekil 4.9. Rekombinant PA83 varyantlarının 24 °C'de, 1, 2, 3, 4 ve 5 haftalık periyotlardaki inkübasyonu sonrasında SDS Page analizi görüntüsü 36

Şekil 4.10. Rekombinant PA83 varyantlarının 24 °C'de, 1, 3 ve 5 aylık periyotlardaki inkübasyonu sonrasında SDS Page analizi görüntüsü 37

Şekil 4.11. Rekombinant PA83 varyantlarının 4 °C'de, 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 aylık periyotlardaki inkübasyonu sonrasında SDS Page analizi görüntüsü 38

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Rekombinant farmasötik protein üretim sistemlerinin karşılaştırılması..... 9

Çizelge 3.1. %10'luk Poliakrilamid jelin hazırlanması 16

Çizelge 3.2. Nicotiana benthamiana bitkisinde geçici ekspresyon sistemi ile üretilip saflaştırılmış olan PA83 proteini ve varyantlarının SDS-Page analizi ile gerçekleştirilen stabilite çalışmalarına ait periyodik bilgiler..... 27

1. GİRİŞ

Şarbonun nedensel organizması olan *Bacillus anthracis* (*B. anthracis*), endemik alanların topraklarında yaygın olarak bulunan gram pozitif bir basildir. Şarbon, çoğunlukla evcil ve otçul hayvanlarla ilişkili olan zoonotik bir hastalıktır. Hastalık, hayvanların yaygın şekilde aşılanmasının uygulanamadığı ülkelerde düzenli olarak ortaya çıkmaktadır. Bu bakteri insanlara deri, gastrointestinal veya solunum yolları ile enfekte olabilmektedir (Dixon vd. 1999). Hastalığın en şiddetlisi, % 86-89 arasında en yüksek ölüm oranına sahip olan aerosol haline getirilmiş sporların solunması ile ortaya çıkan inhalasyon formudur (Brachman vd. 1960). Ayrıca toprakta, genellikle bu şekilde on yıllarca süre canlı kalabilen *B. anthracis*, endospor formunun patojenik yapısı ve spor oluşturma kabiliyeti nedeniyle, önemli biyolojik savaş ajanlarından biri olarak kabul edilmektedir (Atlas 2002).

B. anthracis bakterisi üç toksin proteini salgılamaktadır bunlar; ödem faktörü (EF), öldürücü faktör (LF) ve toksin oluşturmak için ikili kombinasyonlarda etki eden koruyucu antijen (PA)'dir. PA, bağlayıcı alanı olarak işlev görür ve LF ve EF sırasıyla ikili toksinleri, ödem toksini (ETx = PA+EF) ve öldürücü toksini (LeTx = PA + LF) oluşturmak için PA'nın ayrı ayrı aktif alanları gibi davranırlar (Singh vd. 1999). Hücre yüzeyine bağlandıktan sonra PA, proteolitik olarak proteaz enzimi Furin ile ayrılır ve bu bir 20-kDa protein fragmanının salınması ve ön gözenek oluşturmak için 63-kDa fragmanlarının heptamerizasyonu ile sonuçlanır. Heptamerize PA, LF veya EF'yi bağlar, sitoplazmaya ekzotoksin girişini kolaylaştırır ve hücre ölümüne yol açar (Mamedov vd. 2016; Molloy vd. 1992).

Günümüzde 1972'de hali hazırda kullanılan BioThrax1, ABD'deki tek ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından lisanslı insan şarbon aşısıdır. Aşı, bir adjuvan olarak alüminyum hidroksit jeline adsorbe edilen avirulent, kapsüllenmemiş bir *B. anthracis* suşunun mikroaerofilik kültürlerinin hücre içermeyen süzüntülerinden hazırlanan 83-kDa PA proteinini içerir. BioThrax'ın ana dezavantajları aşının, potansiyel olarak anafilaksi ve hatta ölüm gibi ciddi alerjik reaksiyonlara neden olabilecek diğer şarbon proteinlerini içerebilmesidir. Bu dezavantajlar, son yıllarda rekombinant canlı ve rekombinant alt ünite aşıları dâhil olmak üzere yeni nesil şarbon aşıları geliştirme çabalarının artmasına neden olmuştur (Friedlander vd. 1999; Schneeman ve Manchester 2009).

Heterolog ekspresyondaki ilerlemeler, alt birim rPA bazlı aşı adayları dâhil olmak üzere rekombinant proteinlerin üretimi için bitkilerin alternatif bir platform olarak kullanılmasına yönelik ilgiyi arttırmıştır. Bu sistemler; düşük maliyet, hızlı üretim, yüksek ölçeklenebilir, yüksek üretim kapasitesi ve memeli patojenlerini barındırmamaları sayesinde diğer ifade sistemlerine göre üstün yararlar sağlamaktadır.

Bitki hücreleri, memeli hücrelerinde bulunanlara büyük ölçüde benzeyen N-bağlı glikozilasyon da dâhil olmak üzere hedef proteinlerin ökaryotik post translasyonel modifikasyonlarını gerçekleştirirler. PA, altı potansiyel N-bağlı glikozilasyon bölgesi içermesine rağmen, kendi ana konakçısında glikozile edilmez. Bununla birlikte, *Nicotiana benthamiana* bitkilerinde eksprese edildiğinde, rPA glikozile edilir. Bunun bitki konağında edinilen N-bağlı glikozilasyonun bir sonucu olabileceği ve bu şekerlerin varlığının, güvenli ve etkili bir aşının stabilitesi ve potansiyeli üzerinde olumsuz bir etkisi olduğu savunulmuştur (Mamedov vd. 2016).

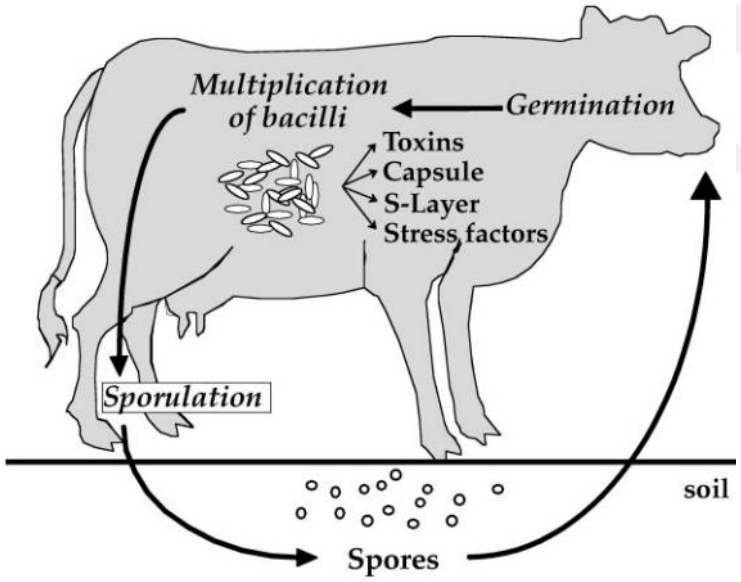
Son yapılan çalışmalarla *Flavobacterium meningosepticum* bakterinde bulunan deglikozilasyon enzimi peptid-N-glikosidaz F (PNGase F)'yi hedef protein ile birlikte eksprese ederek proteinlerin bitkide ki enzimatik deglikozilasyon stratejisi geliştirilmiştir (Mamedov vd. 2012). PNGase F tarafından *In vivo* hedef proteinlerin enzimatik deglikozilasyonunun, bitkilerde deglikozile proteinlerin üretimi için güçlü bir strateji olma potansiyeline sahip olduğunu gösterilmiştir. Glikozile edilen pp-PA83'ten farklı olarak, bitkide üretilen deglikozile PA83 (pp-dPA83), doğal prokaryotik form ile karşılaştırılabilir seviyelerde biyolojik olarak aktif ve daha stabil olduğu anlaşılmıştır (Mamedov vd. 2016). Ancak, PNGase F ile birlikte ekspresyon ile üretilen deglikozile formdaki proteinler, glikozile edilmiş emsallerine göre üstün fonksiyonel özellikler göstermiş olsalar da, oksidasyon, deamidasyon, izomerizasyon ve hidroliz dâhil olmak üzere amino asitlerin spontan modifikasyonu, rekombinant protein antijenlerinin kararsızlığına neden olabilmektedir. PNGase F (*In vivo* veya *in vitro* deglikozilasyon), glikozilasyon bölgesinde (NXS/T) glikozile edilen proteinde Asparajinin aspartata doyması nedeniyle bir amino asit değişikliğine neden olmaktadır (Reissner ve Aswad 2003). Bu dönüşüm ile sonuçlanan Asparajin kalıntılarının deamidasyonu, proteinlerin depolanması sırasında gerçekleşen en yaygın çeviri sonrası modifikasyondur (Mamedov vd. 2012; Reissner ve Aswad 2003). Bir başka deglikozile edici enzim olan Endo-β-N-asetilglukosaminidaz H, iki N-asetil-D-glukozamin (GlcNAc) kalıntısı arasındaki β-1, 4-glikosidik bağının deamidasyona uğramadan aspargine bağlı tek bir GlcNAc kalıntısı bırakarak kırılmasını katalizler. Çalışmalar da, *N. benthamiana* bitkilerinde *In vivo* deglikozile edilmiş proteinlerin, ilgilenilen bir hedef protein ile geçici olarak bakteriyel Endo H ile eksprese edilerek üretilmesi için bir yöntem geliştirilmiştir (Mamedov vd. 2017).

Bu yeni jenerasyon rPA aşıları, mevcut lisanslı şarbon aşısından daha az dozla güçlü bağışıklık tepkileri ve daha az yan etki ortaya çıkarmaktadır. Uygulanan deneyler sonrası denenen rPA adaylarının birçoğunun preklinik çalışmalarda etkili olduğu görülmüştür. Çalışılan sonuçlar, bitkinin rekombinant Endo H'nin *In vivo* ve *in vitro* olarak tamamen aktif olduğunu göstermiştir ve Endo H tarafından *In vivo* hedef proteinlerin enzimatik deglikozilasyonunun, glikozile ve PNGase F ile deglikozile edilmiş muadilinden daha fazla stabil olduğu kanıtlanmıştır (Mamedov vd. 2017). Bu sayede aşının saklanma süresinde artış meydana gelerek, aşının maliyetinin önemli ölçüde azalacağı ve bitkide üretilen Endo H ile deglikozile edilen PA83 proteininin, gelecekte şarbona karşı yüksek potansiyelli bir aşı adayı olacağı öngörülmektedir.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Şarbon Hastalığı

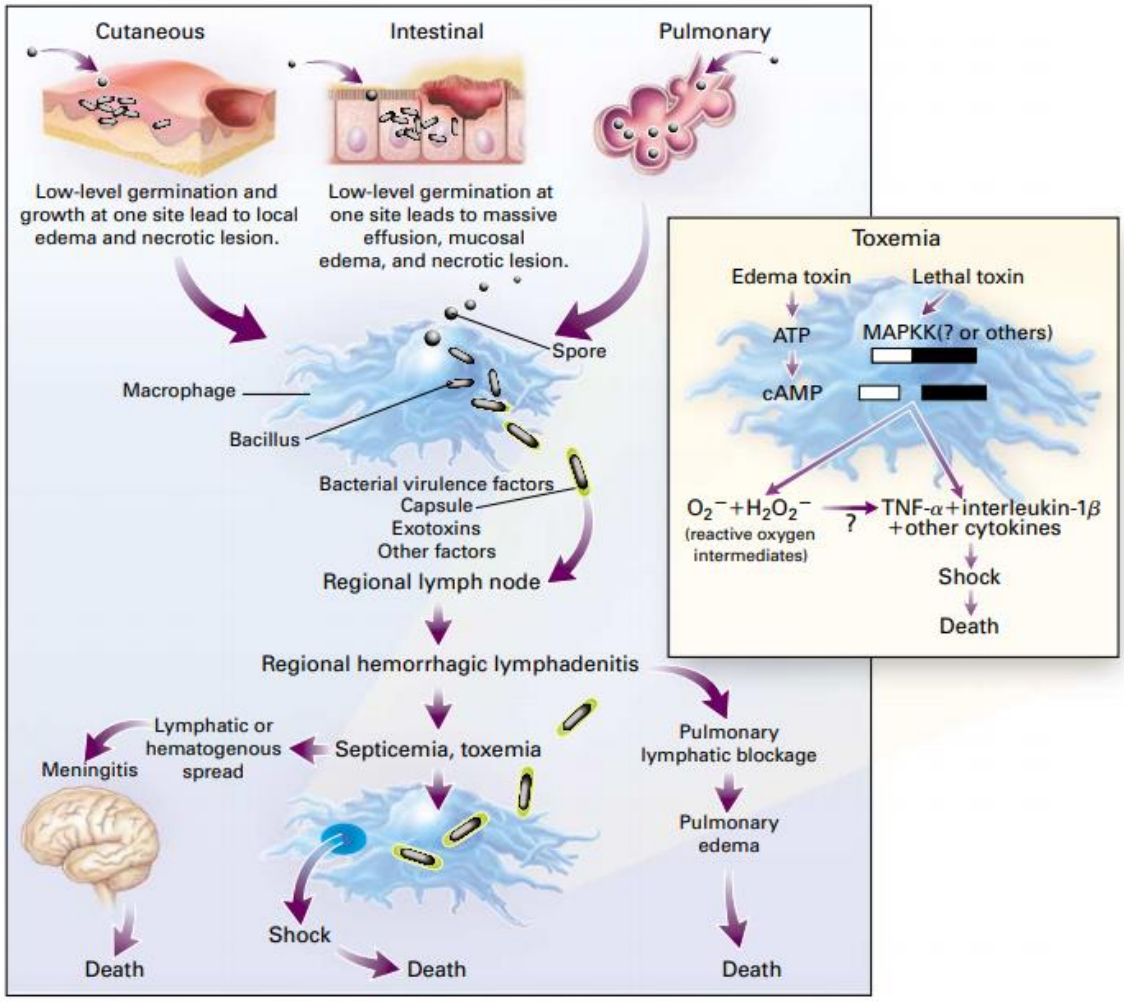
Şarbon, öncelikle otobur memelileri etkileyen fakat aynı zamanda insanlar ve bazen de kuşlar da dâhil olmak üzere diğer canlılarda da görülebilen akut bir hastalıktır. Şarbon *(ing. Anthrax)* kelimesi, hastalığın insan kutanöz formundaki karakteristik yara kabuğuna atıfta bulunan kömür veya karbon anlamına gelen Yunanca Anthrakos kelimesinden türetilmiştir. Şarbon, *Bacillus anthracis*'in neden olduğu bakteriyel bir hastalıktır. Diğer spor oluşturucu bakterilerle uyumlu olarak, koşullar basillerin büyümesine ve çoğalmasına elverişli olmadığında, sporlar oluştururlar ve spor formları, olumsuz çevresel koşullara karşı oldukça dirençlidir. *B. anthracis* sporülasyonu, serbest oksijen varlığını gerektirir; enfekte olmuş konağın anaerobik ortamı içinde organizma bitkisel formdadır. Enfekte konakçı içinde sporlar, vejetatif formları üretmek için çimlenir ve sonunda konakçıyı öldürür (Turnbull 2002). Şarbon'dan ölen bir hayvanın kanı, mililitrede 109'dan fazla bitkisel formda bakteri içerebilir. Karkas bozulurken bakteriler, yerel çevreyi kirleten ve uzun süre yaşayabilecek şekilde yüksek derecede bulaşıcı endosporları oluştururlar. Sporlar bağışık olmayan bir hayvanın vücuduna girdiğinde, çimlenerek enfeksiyona ve sonucunda ölüme neden olur, böylece bulaşıcı döngüyü tamamlar (Collier ve Young 2003).



Şekil 2.1. *Bacillus anthracis*'in memeli hayvanlardaki yaşam döngüsü (Mock ve Fouet 2001)

Geçmişte, insan meslek ve maruziyet ile arasındaki ilişkiyi yansıtacak şekilde ayrılan endüstriyel form; kemiklerin, postların, yün ve diğer hayvansal ürünlerin işlenmesinde çalışan kişilerde ortaya çıkması ve endüstriyel olmayan form; çiftçiler, kasaplar ve veteriner hekimlerdeki oluşumuna değinirken hastalığın iki tanıma bölünmesi epidemiyolojik olarak elverişliydi. Günümüzde ise, hastalığın edinildiği yola göre, deri lezyonu kutanöz, gastrointestinal ve özellikle havadaki şarbon sporlarının solunumundan kaynaklanan inhalasyon formu ile üçe ayrılır (Turnbull 2002).

İnhalasyon formu, hastalığın en ölümcül şeklidir ve zamanında teşhis edilmesi zordur. İnhalasyon yoluyla maruz kalma, kasıtlı bir serbest bırakılma durumunda çok sayıda kişiyi etkileme potansiyeline sahiptir. Teneffüs ettikten sonra sporlar alveoler makrofajlar tarafından alınır ve mediastinal lenf nodlarına nakledilir. Bu işlem sırasında, kan dolaşımına giren ve sonuçta sepsise neden olan bitkisel basiller oluşturmak için çimlenirler ve antibiyotik tedavisine rağmen aniden ve hızla solunum yetmezliği ve şoka doğru ilerleyen solunum sıkıntısı takip eder ve sonucu ölümle sonuçlanabilir (Schneemann ve Manchester 2009).

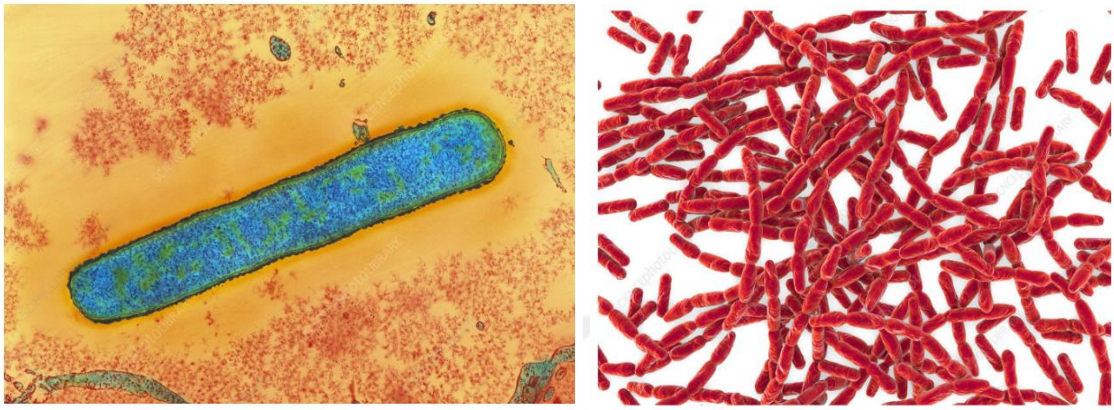


Şekil 2.2. Şarbon Patofizyolojisi (Dixon vd. 1999)

2.2. *Bacillus anthracis* Mekanizması

Bacillus anthracis; gram-pozitif, hareketsiz, aerobik, fakültatif olarak anaerobik, spor oluşturabilen bir bakteridir. Antraks zoonotik bir hastalıktır, ancak enfekte hayvanlara veya hayvan dokusuna maruz kaldıktan sonra insanlarda da ortaya çıkabilir. *B. anthracis*'in neden olduğu üç hastalık formundan inhalasyon, sporların solunması nedeniyle oluşan ve hastalığın yaklaşık %86-89'luk en yüksek ölüm oranlarına sahip olan formudur. Eski Sovyetler Birliği'nde yer alan Sverdlovsk'da 1979 yılında bir askeri mikrobiyoloji ünitesinde *B. anthracis* sporlarının dağılması sonucu temasta bulunan

kişilerin %86'sı 4 günden kısa bir sürede ölmüştür (Goldenberg vd. 2002). 2001 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde *B. anthracis* sporlarıyla kontamine edilmiş postalar, bazı ofislere ve senatörlere gönderilmiş, kendisine mektup gönderilenlerden 5 kişi ölmüş ve 17 kişi hastaneye kaldırılmıştır. Patojenin bu şekilde kolayca gizlenebilen, taşınabilen ve serbest bırakılabilen endosporlar oluşturma kabiliyeti nedeniyle biyolojik saldırılarda silah olarak kullanım potansiyelini arttırmaktadır. (Chichester vd. 2013).

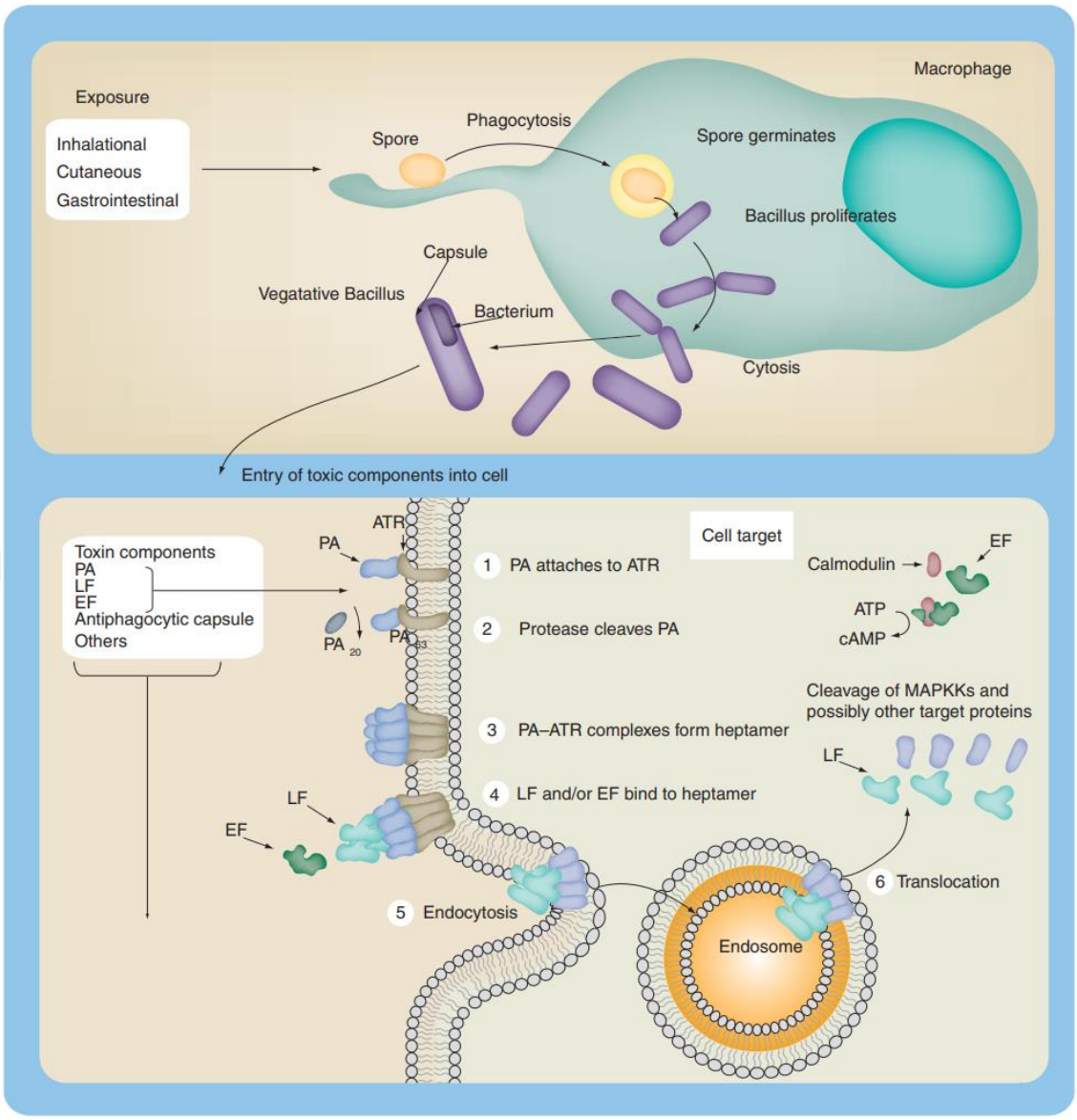


(a) **(b)**

Şekil 2.3. a) Şarbon bakterisinin (*Bacillus anthracis*) renkli taramalı elektron mikrografı (SEM) (Dowsett) ; **b)** *B. anthracis*'in örnekleme çizimi (Harris)

B. anthracis sporları teneffüs edildiğinde, alveolar alanlarda biriktirilir ve lokal makrofajlar tarafından atıl parçacıklar olarak yutulur. Sporlar daha sonra enfekte makrofajlar tarafından mediastinal ve peribronşial lenf düğümlerine taşınır ve burada bitkisel formda basillere çimlenir. Basiller makrofajlardan kaçar, lenfatik sistem içinde engelsiz hücre dışı çoğalmaya başlar ve bölgesel hemorajik lenfadenite neden olur. Daha sonra basiller kan dolaşımına yayılır ve hızlı bir replikasyona devam ederek kanda mililitre başına 109 organizmaya ulaşabilmektedir. Tüm bu süre boyunca, basiller konakçıyı zehirleyen yüksek seviyelerde ekzotoksin salgılar. Halsizlik, yorgunluk ve öksürük gibi ilk belirtiler influenza ve diğer yaygın üst solunum yolu enfeksiyonlarının semptomlarına benzerlik gösterir bu da erken spesifik tanıyı zorlaştırır. 2 ila 5 gün sonra ateş, titreme, yanak ve boynun subkutan ödemi, mediasten ve plevral efüzyonların genişlemesi ve hemorajik menenjit gibi ani bir akut semptomlar ortaya çıkar ve ölüm genellikle solunum yetmezliği nedeniyle 24 saat içinde görülür (Wang ve Roehrl 2005).

Bacillus anthracis, ölümcül etkisini iki ana virülans faktörüne borçludur: bir toksin ve antifagositik poli γ-D-glutamik asit kapsülü. 1950'lerde yapılan çalışmalarda bulunan toksinin üç alt proteinden oluştuğu ortaya konulmuştur: koruyucu antijen (PA; 83 kDa), ölümcül faktör (LF; 90 kDa) ve ödem faktörü (EF; 89 kDa). Bireysel olarak, üçünün hiçbiri toksik değildir, ancak ikili kombinasyonlarda etki eden koruyucu antijen (PA), ödem faktörü ile birleşerek ödem toksini (ETx = PA + EF) ve ölümcül faktör ile birleşerek de ölümcül toksin (LeTx = PA + LF) meydana getirmektedir (Mamedov 2016; Schneemann ve Manchester 2009).



Şekil 2.4. *Bacillus anthracis* enfeksiyonunun patogenezi B. *anthracis*'in bilinen başlıca virülans faktörleri ekzotoksinleri içerir: ödem toksini (PA ve EF), ölümcül toksin (PA ve LF) ve antifagositik kapsül. Şarbon toksinlerinin patojenitesinde yer alan moleküllerin bağışıklık fonksiyonunu engellediği, hücre içi sinyal yollarını kesintiye uğrattığı ve pro-enflamatuar aracıların kitlesel olarak serbest bırakılmasına neden olan hücre hedeflerini parçaladığı görülmektedir. ATP: Adenozin trifosfat; ATR: Şarbon toksin reseptörü; cAMP: Siklik adenozin monofosfat; EF: Ödem faktörü; LF: Ölümcül faktör; MAPKK: Mitojenle aktifleştirilen protein kinaz kinaz; PA: Koruyucu antijen; rPA: Rekombinant PA (Keitel 2006)

Koruyucu Antijen (PA) hücre yüzeyine bağlandıktan sonra, hücresel proteaz Furin enzimi ile proteolitik olarak kesilir ve bu da 20-kDa boyutunda bir protein fragmanının salınmasına ve arda kalan 63-kDa boyutunda ki fragmanının heptamerizasyonuna ve bir ön gözenek oluşumuna neden olur. PA20 yavaş yavaş PA63'ten ayrılır ve çevre ortama difüze olur ve PA63 reseptöre bağlı kalır. Reseptöre bağlı PA63 daha sonra kendiliğinden halka şeklinde, heptamerik oligomerler oluşturmak üzere birleşir. Burada heptamer, bir ön gözenek oluşturur ve hem ödem faktörünün hem de letal faktörün membran boyunca sitozole translokasyonu bu geçiş ile sağlanır. LF, bağışıklık hücrelerinin patojenlere yanıt verdiği sinyal yollarının tıkanmasına yol açan birçok mitojenle aktifleştirilmiş protein

kinaz kinazları ayıran çinko proteazdır. EF ise, fizyolojik olarak yüksek düzeyde cAMP üreten, kalmodulin bağımlı bir adenilat siklazdır. Bu, hücre içi sinyal yollarında bozulmaya, makrofajlar tarafından fagositoza müdahale ve sonuçta ödem ile birlikte waterhomeostazın bozulmasına yol açar (Milne vd. 1994).

2.3. Tedavi Yolları ve Sınırlamaları

Teorik olarak Şarbon tedavi yaklaşımlarının birkaç yolu vardır; (i) sporların ortadan kaldırılması, (ii) hastalığın sistemik bir aşamaya gelmeden önce bitkisel basilleri öldürmek için antibiyotik tedavisi, (iii) Şarbon toksinine karşı konjonktif antitoksin tedavisi ve (iv) hastalık gelişimini tamamen önlemek için etkili bir aşılama. Antibiyotik ve antitoksin tedavisi hastalığın ilk aşamalarında etkili bir yöntemdir ancak bakterilerin vücut içinde üremesi devam ederse hastalığı durdurmak için yeterli olmayacaktır. Şarbon hastalığında tam iyileşme, enfeksiyonu önleyen veya enfeksiyonu erken aşamada durduran etkili profilaktik bir aşı ile sağlanmaktadır (Duesbery ve Vvee Woude 1999; Dixon vd. 1999).

Şu anda, 1972'de lisanslanan Şarbon Aşı Adsorbe [BioThrax®] (AVA olarak da bilinir), ABD'deki tek ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından lisanslanan insan şarbon aşısıdır. Aşı, ana bileşeni, bir adjuvan olarak alüminyum hidroksit jeline adsorbe edilen EF ve LF dâhil olmak üzere diğer bakteriyel bileşenlerin eser miktarlarıyla koruyucu antijen proteini içeren bir *B. anthracis* kültür süpernatanından türetilir. Çok sayıda çalışma, PA' ya karşı bir antikor yanıtının koruma sağlamak için yeterli olduğunu doğrulamıştır (Friedlander vd. 1999). Fakat AVA aşısının büyük bir dezavantajı, sınırlı bir koruma sağlaması ve koruyucu bağışıklık elde etmek için uzun süreli bir uygulama gerektirmesidir. 18 aylık bir süre boyunca altı enjeksiyonun, bağışıklığı korumak için tavsiye edilen yıllık güçlendiricilerle koruma sağlamak için gerekli olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, aşının, anafilaksi ve hatta ölüm gibi ciddi alerjik reaksiyonlara neden olabilecek LF ve EF dâhil olmak üzere başka Şarbon proteinleri de içermesi diğer bir dezavantajıdır (Schneemann ve Manchester 2009; Mamedov 2016). Bu nedenler araştırmacıları, daha hızlı bir şekilde koruyucu bağışıklık elde etmek için daha az doz gerektiren ve geliştirilmiş bir güvenlik profiline sahip, *B. anthracis*'in başlıca virülans faktörü olan koruyucu antijene (PA) dayalı rekombinant alt birim aşıların geliştirilmesine yönelik kapsamlı araştırma çabaları yönlendirilmiştir.

Halihazırda lisanslı aşıların çoğu öldürülmüş veya canlı zayıflatılmış patojenlere dayanmakla birlikte, spesifik antijenlere veya toksinlere dayanan rekombinant alt birim aşılar güvenlik, etkinlik ve ölçeklenebilirliklerinden dolayı tercih edilen alternatifler haline gelmektedir. rPA bazlı aşıların hayvanlarda yüksek anti-PA toksin nötralize edici antikor (TNA) tepkilerini indüklediği ve tavşanları ve insan olmayan primatları öldürücü *B. anthracis* tehdidine karşı koruduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, bazı çalışmalarda koruma 6-12 ay içinde çarpıcı bir şekilde azalmıştır, bu da daha güçlü, daha sağlam uzun süreli bağışıklık uyabilecek aşı formülasyonlarına ihtiyaç olduğunu göstermektedir (Ivins vd. 1998; Little vd. 2006). Günümüze kadar geliştirilen ve çeşitli terapötik rekombinant proteinlerin üretilmesi için yaygın olarak kullanılan ekspresyon sistemleri, bakteri, maya, böcek ve memeli kökenli hücre kültürlerini içermektedir (Rogan ve Babiuk 2005).

2.4. Rekombinant Protein Ekspresyon Sistemleri

Aşı çalışmalarında üretimi hedeflenen proteinlerin doğal kaynaklarından çıkarılması zor ve pahalı olabilmektedir. Ayrıca, doğal kaynaklarından saflaştırılan farmasötik proteinlerin kullanılması kontaminasyon riski oluşturmaktadır. Bu nedenle, proteinlerin büyük ölçekli üretimine izin veren basit, güvenli ve ucuz bir sistem arzu edilmektedir (Ma vd. 2003). Rekombinant DNA teknolojisi, konakçı sistemlerde heterolog rekombinant proteinlerin üretimini mümkün kılmıştır.

Bakteri sistemleri, rekombinant protein ekspresyonunda ucuz ve etkilidir ve şu anda en çok kullanılan sistemdir. İlk çalışmaların çoğu prokaryot konakçılarda, özellikle *Escherichia coli*'de, rekombinant terapötik proteinlerin ekspresyonuna yönelik olmuştur. Prokaryotların bir üretim sistemi olarak avantajları, genetik olarak manipüle edilme kolaylığı, hızlı büyümeleri ve rekombinant proteinlerin yüksek ekspresyon seviyeleri ve büyük ölçekli bir fermantasyon olanağıdır (Gomord ve Faye 2004). En gelişmiş aşı adayları ise, *Escherichia coli*'de eksprese edilen ve saflaştırılan rekombinant PA'ya (rPA) dayanmaktadır (Williamson vd. 2005). Yanı sıra, bakterilerde ökaryotik proteinlerin üretimi ciddi sınırlamalara sahiptir. Spesifik olarak, bakteriler biyolojik aktiviteyi, stabiliteyi, çözünürlüğü, yarı ömrü ve rekombinant proteinlerin proteaz direncini önemli ölçüde etkileyen sinyal peptit klevajı, propeptid işleme, protein katlanması, disülfit bağı oluşumu fosforilasyon ve N-bağlı glikozilasyon gibi translasyon sonrası modifikasyonları (PTM) gerçekleştiremezler. Sonuç olarak, mikrobiyel ekspresyon sistemleri genel olarak insülin, interferon veya insan büyüme hormonu gibi nispeten basit terapötik proteinlerin ekspresyonu için kullanılmaktadır, bunlar biyolojik olarak aktif olmak için katlanma veya kapsamlı posttranslasyonel işlem gerektirmez. Prokaryotların terapötik proteinlerin üretimindeki sınırlamaları nedeniyle, biyoteknoloji endüstrisi çabalarını memeli hücre kültürleri, maya, mantarlar, böcek hücreleri ve transgenik hayvanlar gibi ökaryotik konakçılara yöneltmiştir (Gomord ve Faye 2004).

Bir başka ekspresyon sistemi olan Maya, diğer ekspresyon sistemlerine göre ana avantajları, hem bir mikroorganizma hem de bir ökaryotik olması ile ilgilidir. *E. coli* 'den farklı olarak, maya heterolog proteinler için gelişmiş protein katlama yolları sağlar ve maya sinyal dizileri kullanıldığında, maya doğru katlanmış ve işlenmiş proteinleri salgılayabilir. Memeli ekspresyon sistemlerinden farklı olarak, maya basit büyüme ortamında hızla büyütülebilir. Klinik ve endüstriyel olarak önemli proteinlerin ekspresyonu için, endüstriyel ölçekte fermantasyon teknolojisi yaygın olarak kullanıldığı için maya çekici bir seçenektir (Verma vd. 1998). Bununla birlikte, mayalarda üretilen N- ve O-bağlı oligosakkarit yapıları memeli hücrelerinde bulunanlardan önemli ölçüde farklıdır ve mayada yaygın bir özellik olan hipermannosilasyon, uygun protein katlanmasını ve sonucunda fonksiyonel aktivitesini önemli ölçüde etkilemektedir (Yusibov ve Mamedov 2010).

Çizelge 2.1. Rekombinant farmasötik protein üretim sistemlerinin karşılaştırılması. Esinlenilerek hazırlanmıştır (Ma vd. 2003)

Ekspresyon Sistemleri	Bakteri Ekspresyon Sistemi	Maya Ekspresyon Sistemi	Memeli Hücre Kültürü	Hayvan Ekspresyon Sistemi	Bitki Hücre Kültürü	Geçici Bitki Ekspresyon Sistemi
Toplam Maliyet	Düşük	Orta	Yüksek	Yüksek	Orta	Çok Düşük
Üretim Zaman Ölçeği	Kısa	Orta	Uzun	Çok Uzun	Orta	Kısa
Üretim Kapasitesi	Yüksek	Yüksek	Çok Düşük	Düşük	Orta	Çok Yüksek
Ürün Kalitesi	Düşük	Orta	Çok Yüksek	Çok Yüksek	Yüksek	Yüksek
Glikozilasyon	Yok	Hatalı	Var	Var	Küçük Farklılıklar	Küçük Farklılıklar
Kontaminasyon Riski	Endotoksin	Düşük Risk	Virüsler, prionlar ve onkogenik DNA	Virüsler, prionlar ve onkogenik DNA	Düşük Risk	Düşük Risk
Depolama Maliyeti	Orta	Orta	Pahalı	Pahalı	Orta	Ucuz

Bir bakulovirüs ile enfekte olmuş böcek hücresi konakçı sistemi ise, kültivasyon kolaylığı, yüksek seviyeli hedef ekspresyon kapasitesi ve kompleks memeli proteinleri için uygun translasyon sonrası protein modifikasyon makinelerine sahip olmak gibi diğer ekspresyon sistemlerine kıyasla önemli avantajlar sunar. Bakulovirüsler, sadece omurgasızları, genellikle böcekleri enfekte eden büyük bir dairesel çift sarmallı DNA virüs grubuna aittir. Genomları 80 kb. İle 200 kb. arasında değişmektedir (Verma vd. 1998). Böcek hücre sisteminin dezavantajları arasında yüksek mannoz tipi glikozilasyon ve fukoz, galaktoz ve terminal sialik asit içeren kompleks oligosakkaritlerin bulunmaması bulunur (Rai ve Padh 2001).

Memeli hücre kültürleri ise, glikozilasyon, fosforilasyon ve gamma-karboksilasyon gibi memeli tipi bazı kompleks yapılı büyük molekül proteinlerin ve posttranslasyonel modifikasyonlar gerektiren rekombinant proteinlerin ekspresyonu için ideal bir platform olarak kabul edilmektedir. Bu sistem en yüksek düzeyde ürün uygunluğu sunar; ancak, bu sistem oldukça pahalıdır ve ölçeklendirilmesi zordur (Yusibov ve Mamedov 2010). Böylece, çözünür, çeviri sonrası gerektiğinde değiştirilmiş ve doğru katlanmış proteinleri sağlama kapasitesi yüksek olan ifade sistemleri sürekli olarak geliştirilmektedir. Toplamda, mevcut prokaryotik ve ökaryotik ekspresyon sistemleri üzerindeki biyokimyasal, teknik ve ekonomik sınırlamalar, karmaşık terapötik proteinlere yönelik artan klinik talep ve biyoreaktör kapasitesinin eksikliği, heterolog

proteinlerin üretimi için yeni ekspresyon sistemlerinin geliştirilmesine büyük ilgi göstermiştir. Son on yılda bitkiler, terapötik proteinler için mevcut üretim sistemlerine uygun bir alternatif olarak ortaya çıkmıştır (Gomord ve Faye 2004).

Bitkiler diğer rekombinant protein ekspresyon sistemlerine kıyasla çeşitli avantajlar sunar; bunlar arasında ökaryotik posttranslasyonel modifikasyon makinelerinin bulunması, imalat için basit düşük maliyet artışı ve barındırılan memeli patojenlerinin olmaması nedeniyle insanlarda veya hayvanlarda bitki kaynaklı ürünlerin kullanım güvenliği bulunmaktadır. Ayrıca, bitkilerde üretilen proteinler, bakterilerden veya memeli hücre kültüründen preparatları kontamine edebilecek toksinlerden arındırılmıştır.

2.5. Geçici Bitki Ekspresyon Sistemi

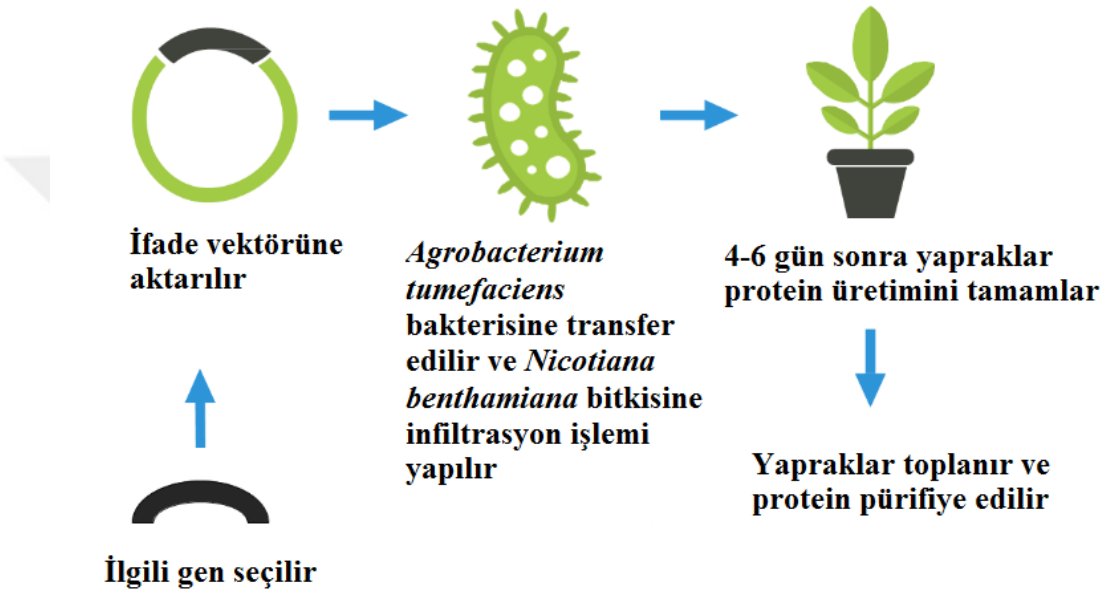
İnsanlar, bitkileri binlerce yıl boyunca genişleyen güvenilir ve sınırsız bir kaynak olarak bulmuşlardır. Bitkiler halen gıda, inşaat, giyim, ilaç ve son zamanlarda moleküler tarım (PMF) için kullandığımız çok yönlü, sürdürülebilir bir hammadde kaynağıdır. Bitki moleküler biyolojisindeki ilerlemeler ve son zamanlarda viral bazlı ekspresyon vektörlerinin keşfi ve ilerlemesi, bitki bazlı ekspresyon sistemlerini rekombinant proteinlerin üretimi için umut verici bir teknoloji haline getirmiştir. Bu durum bitkilerin, rekombinant proteinlerin üretimi için biyofabrikalar olabileceğini ve büyük ölçekli üretimleri yapabileceğini göstermiştir. Yapılan çalışmalar bitkilerin, örneğin insan serum proteinleri ve büyüme düzenleyicileri, antikorlar, aşılar, hormonlar, sitokinler, enzimler ve antikorlar gibi terapötik aktiviteye sahip karmaşık işlevsel memeli proteinlerini üretme yeteneğine sahip olduğu kanıtlanmıştır. Biyoilaçlar için artan talebe karşılık, yüksek maliyet ve mevcut üretim sistemlerindeki eksiklikler ile birleştiğinde hastaların tedaviye yönelik beklemeleri gerekmektedir. Bu nedenle aktif araştırma ve geliştirmelerle transgenik bitkiler, PMF alanında yeni nesil biyoreaktörler olarak karşımıza çıkmaktadır (Ergül 2019).

Bitkiler diğer rekombinant protein ekspresyon sistemlerine kıyasla çeşitli avantajlar sunar; bunlar arasında ökaryotik posttranslasyonel modifikasyon makinelerinin bulunması bitki bazlı sistemleri bakteri gibi prokaryotik sistemlerin önüne geçirir, çünkü monoklonal antikorlar (mAb)' da dahil olmak üzere çok sayıda farmasötik rekombinant protein, daha karmaşık bir yapıya sahiptir ve kapsamlı posttranslasyonel modifikasyonlar veya montaj gerektirir. Yanı sıra imalat için basit düşük maliyet artışı ve memeli patojenlerini barındırmamaları nedeniyle insanlarda veya hayvanlarda bitki kaynaklı ürünlerin kullanım güvenliği bulunmaktadır. İlk bitki kaynaklı rekombinant protein olan insan serum albümini, 1990 yılında transgenik tütünde üretilmiştir (Sijmons vd. 1990). O zamandan beri, bitkiler çeşitli diğer terapötik proteinleri, kan bileşenlerini, sitokinleri, hormonları, büyüme faktörlerini, aşıları ve antikorları ifade etmek için kullanılmıştır. Gelişmeler akabinde 2006 yılında geliştirilen, kümes hayvanlarında Newcastle hastalığına karşı ilk bitki ekspresyonu ile elde edilen aşının ABD Veteriner Biyoloji Merkezi federal onayıyla sonuçlanmıştır (Yusibov ve Mamedov 2010).

Bitkilerde rekombinant proteinleri eksprese etmek için kulanılan iki ana yaklaşım bulunmaktadır. Birincisi, hedef proteini kodlayan DNA'nın bir ekspresyon kasetine klonlandığı ve nükleer veya kloroplast genomlarına sokulduğu stabil bir transgenik çizginin geliştirilmesidir. Bunu yaparken, yabancı DNA, sonraki nesiller boyunca kalıtsal hale gelir ve diğer ifade sistemlerininkinden çok daha fazla gelişmiş ölçeklenebilirliğe

izin verir. Bununla birlikte stabil transgenik bitki hatlarının üretilmesi, birkaç aydan bir yıla kadar sürebilen hat seçilmesi ve onaylanması işlemleri zaman verimliliği açısından yöntemin dezavantajıdır.

Bitkilerde rekombinant proteini ifade etmenin ikinci yöntemi geçici ekspresyon yoludur. Bu yöntem de, ilgilenilen geni barındıran virüs türevi vektörler, *A. tumefaciens* yoluyla, Agro İnfiltrasyon adı verilen bir işlemle tam gelişmiş bitkilere iletilir. Bitki genomuna entegre olmak yerine, verilen gen yapısı kısa bir inkübasyon süresinden sonra toplanıp izole edilebilen istenen proteinin geçici üretimine izin vermektedir (Leuzinger 2013).



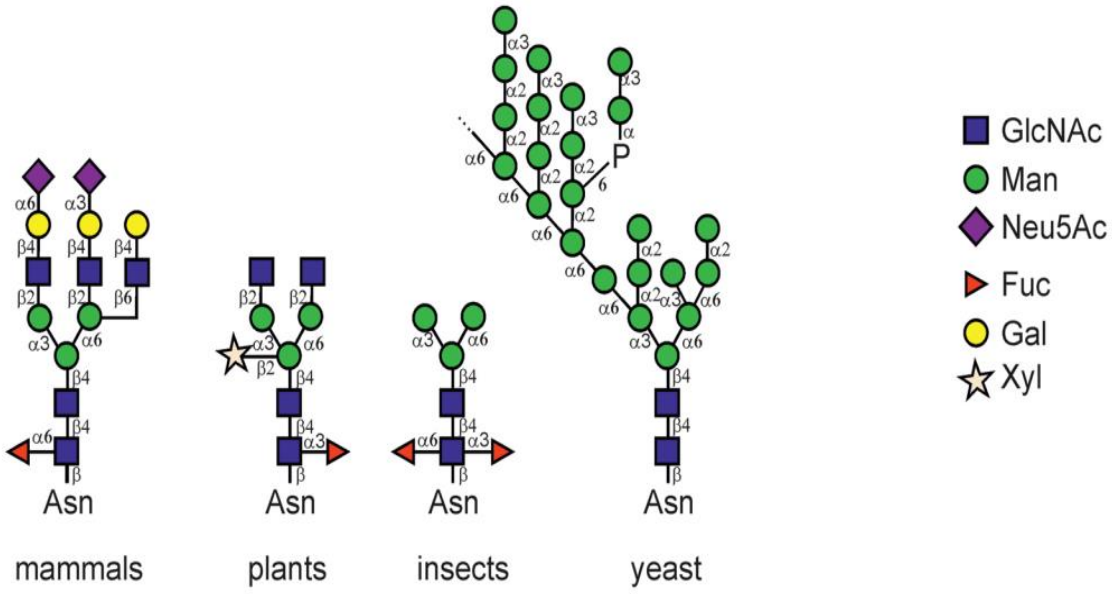
Şekil 2.5. Bitkide geçici protein ekspresyonu sistemi. Esinlenilerek hazırlanmıştır

Geçici gen ekspresyonun da, bitkiler agro infiltrasyondan yaklaşık 1 hafta sonra toplanmaya hazır olacağından, daha fazla toplam protein birikimi avantajı ve protein üretiminin iyileştirilme süresi sunar. Geçici gen ekspresyonu, zaman verimliliği, yüksek hedef protein ekspresyonu seviyesi, hedef birikiminin tekdüzeliği ve tutarlılığı, ölçeklenebilirlik ve içerilen tesis üretimi nedeniyle daha az çevresel endişe gibi istikrarlı transformasyona kıyasla bir takım avantajlara sahiptir. (Yusibov ve Mamedov 2010).

2.6. Deglikozilasyon Stratejisi

Polipeptit zincirleri, sentezlendikten sonra, çekirdek, sitozol, endoplazmik retikulum ve golgi aparatı dâhil olmak üzere farklı hücresel bölmelerde birçok farklı post-translasyonel işleme tabi tutulur. Bu işlemler, katlanma sırasında veya sonrasında meydana gelir ve amino terminalden bir veya daha fazla amino asidin çıkarılması, proteolitik bölünme veya belirli amino asit tortularına asetil, fosforil, glikozil, metil veya diğer grupların ilave edilmesini içeren enzimatik işlemeyi içerir. Bu modifikasyonlar, etkilenen proteinlere çeşitli yapısal ve fonksiyonel özellikler verir.

Glikozilasyon, polipeptit zincirine bir oligosakarit yan zincirinin kovalent olarak bağlanmasıdır. Farklı tiplerde meydana gelen glikozilasyon mekanizmaları arasında en yaygın gerçekleşen N-bağlı ve O-bağlı glikozilasyondur (Blom vd. 2004). N-bağlı glikozilasyon, rekombinant alt birim aşılar ve heterolog ekspresyon sistemlerinde üretilen terapötik proteinler dâhil olmak üzere birçok proteinin doğru katlanması, stabilitesini koruması ve biyolojik aktivitesi için kritik olan translasyon sonrası bir modifikasyondur.



Şekil 2.6. Memeli, bitki, böcek ve mayalar da bulunan tipik N-glikan yapılarının gösterimi (Strasser 2016)

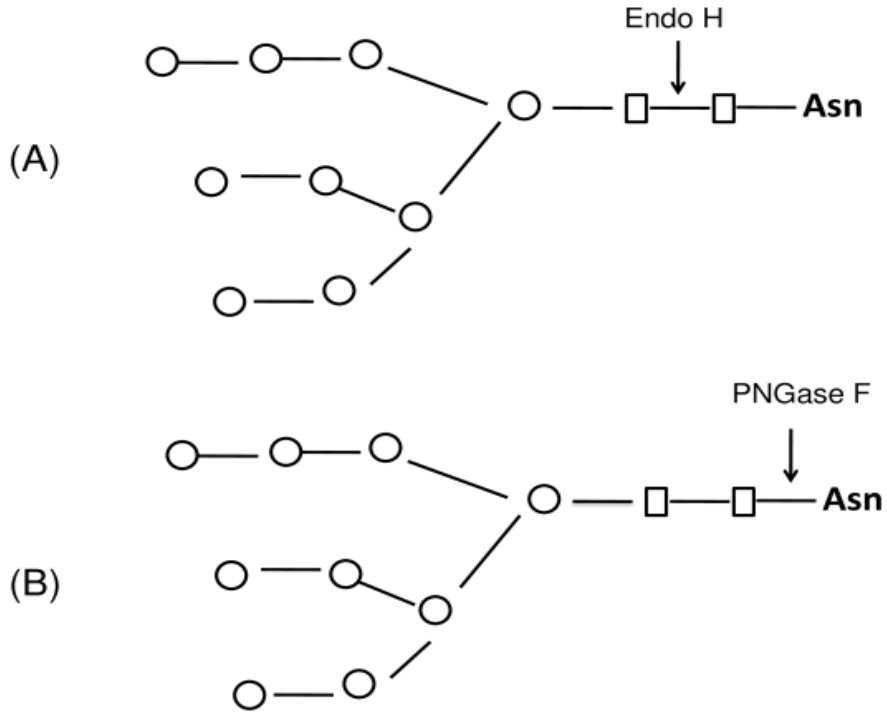
Bazı ökaryotiklerin yanı sıra bakteriyel proteinler, doğal konakçıda N-glikan içermeyebilir, ancak proteinleri, potansiyel olarak bozulmuş fonksiyonel aktiviteye yol açtığında anormal şekilde glikozile edilen çoklu potansiyel glikozilasyon bölgeleri içerir. Bununla birlikte, bitkiler ayrıca N-bağlı glikozilasyon gerektirmeyen proteinleri de N-bağlı glikozile rekombinant proteinler şekilde üretebilir (Gomord vd. 2009). Bu çalışma da üretilmesi esas alınan *B. anthracis'* in koruyu antijeni bir glikoprotein değildir, ancak altı potansiyel glikozilasyon alanına sahiptir ve *N. Benthamiana'*da eksprese edildiğinde glikozillenir.

Karbonhidratların bağlanması bir proteinin fizikokimyasal özelliklerini güçlü bir şekilde etkiler, bu nedenle spesifik aktivite, ligand-reseptör etkileşimleri ve immünojeniklik gibi temel biyolojik özelliklerini değiştirebilir ve *In vivo* kullanıldığında bir güvenlik riski oluşturabilir (Mamedov vd. 2012). Bu nedenle, belirli aşı adaylarının ve antikorlar dâhil terapötik proteinlerin geliştirilmiş fonksiyonel aktivitesi ve immünojenisitesi için, *N. benthamiana* bitkilerinde geçici ekspresyon kullanılarak proteinlerin glikozile edilmemiş formlarının üretilmesi için bir strateji geliştirilmesi önemlidir. Uzun süren çalışmaların ardından bitki konakçısında elde edilen N-glikozilasyonun bir sonucu oluşabilecek şekerlerin mevcudiyetinin, güvenli ve etkili bir aşının istenen iki özelliği olan rPA'nın stabilitesi ve gücü üzerinde olumsuz bir etkisi olduğunu varsayılmıştır.

Çalışmalar sonucu *Flavobacterium meningosepticum*'dan bakteriyel peptit-N-glikosidaz F'yi (PNGase F) hedef proteinle birlikte eksprese ederek proteinlerin bitkideki enzimatik deglikozilasyon stratejisi geliştirilmiştir (Mamedov vd. 2012; Mamedov vd. 2013). PNGase F, Gram-negatif bir bakteri *Flavobacterium meningosepticum* tarafından salgılanan 34.8-kDa'lık bir enzimdir (Rayon vd. 1998).

Çalışmalar, hedef proteinlerin enzimatik deglikozilasyonunun, bir bitki ekspresyon sistemine bakteriyel deglikozilasyon enzimi PNGase F ile *In vivo* olarak başarılabileceğini ve glikan olmayan bir ortamda terapötik hedef proteinlerin üretimi için güçlü bir strateji haline gelme potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca, bitki tarafından üretilen deglikozile PA83'ün, yine bitki tarafından üretilen glikozile PA83 formu ile karşılaştırıldığında, immünize edilmiş farelerde daha yüksek seviyelerde toksin nötrleştirici antikor titreleri sağladığı bulunmuştur (Mamedov vd. 2016).

PNGase F ile birlikte ekspresyon yoluyla üretilen deglikozile proteinler, glikozile muadillerine kıyasla üstün fonksiyonel özellikler göstermiş olsalar da, PNGase F (*In vivo* veya *in vitro* deglikozilasyonu) glikozilasyon alanındaki (N-X-S/T) deglikozilatlanmış proteinde Asparajinin aspartata deamidasyonu nedeniyle bir amino asit değişikliğine neden olmaktadır (Mamedov 2012; Hagglund 2004).



Şekil 2.7. Endo H ve PNGase F deglikozilasyon enzimlerinin kesim bölgelerinin şematik gösterimi A; Endo H, oligosakkaritin diasetilkitobiyoz çekirdeğindeki iki GlcNAc tortusu arasında ki bağı keserek aspargine de bağlı kalan bir GlcNAc molekülü oluşturur. **B;** Peptid -N-Glikosidaz F (PNGase F), GlcNAc ve Asn arasındaki bağı keserek Asparajinin aspartata dönüşümünü gerçekleştiren bir glikoamidazdır (Mamedov vd. 2017)

Başka bir deglikozile edici enzim olan Endo-β-N-asetilglukosaminidaz H (EC 3.2.1.96, Endo H), iki N-Asetil-D-glukozamin (GlcNAc) kalıntısı arasındaki β-1,4-glikozidik bağın bölünmesini, eşzamanlı deamidasyon olmaksızın aspargine bağlı tek bir GlcNAc kalıntısı bırakarak katalize eder (Mamedov vd. 2017). Bu enzim hem yüksek mannoz hem de hibrit N-bağlı glikanları ayırır, ancak karmaşık N-bağlı glikanları asparagin bağlı glikoproteinlerden ayırmaz. Monomerik polipeptit olarak *Streptomyces plicatus* kültüründen izole edilen Endo H'nin molekül ağırlığı yaklaşık 27 kDa'dır (Tarentino ve Maley 1974). Bir dizi çalışma Endo H'nin glikoprotein fonksiyonlarını ve yapılarını incelemek ve glikoproteinlerin N-bağlı glikanlarının sayısını tahmin etmek için yaygın olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Freeze ve Kranz 2010).

Endo H tarafından bu şekilde *In vivo* olarak üretilen deglikozile PA83 molekülünün, önceki çalışmalar da ve bu tez için yapılan deneysel çalışmalarda da glikozile PA83'den ve PNGase F ile deglikozile edilmiş muadilinden daha iyi bir stabilite gösterdiği kanıtlanmıştır. Bu avantajlar pp-dPA83'ün şarbona karşı güvenli, etkili ve düşük maliyetli bir alt ünite aşısı için iyi bir aday olabileceğini öngörmektedir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Deneylerde Kullanılacak Olan Çözeltiler ve Tamponlar

DIECA

- ✓ DIECA (Sodium Diethyldithiocarbamate Trihydrate)
- ✓ Otoklavlanmış ddH_2O

Çözelti içerisindeki istenilen milimolara göre hesaplanarak tartılan DIECA gerekli otoklavlanmış ddH_2O içerisinde vortexlenerek çözdürüldü.

1X Tablet PBS

- ✓ Tablet PBS
- ✓ Otoklavlanmış ddH_2O

1 adet hazır tablet PBS (137 mM NaCl, 2 mM KCl, 10 mM Phosphate buffer) 200 ml otoklavlanmış ddH_2O içerisinde çözdürülerek hazırlandı.

5X TBS Çözeltisi (20 mM Tris, 150 mM NaCl)

- ✓ Tris
- ✓ NaCl
- ✓ Otoklavlanmış ddH_2O

800 ml otoklavlanmış ddH_2O içerisine 12,115 gr Tris, 43,88 g NaCl eklendi ve çözdürüldü. Bufferın pH'ı HCL ile pH: 7,5 olacak şekilde ayarlandı ve son hacim otoklavlanmış ddH_2O ile 1L'ye tamamlandı.

1X TBS Çözeltisi

- ✓ 5X TBS
- ✓ Otoklavlanmış ddH_2O

800 ml otoklavlanmış ddH_2O içerisine 200 ml 5X TBS eklenerek 1 L 1X TBS hazırlandı.

I-Block

Western-Blot

- ✓ I-Block
- ✓ 1X TBS
- ✓ Tween 20

1 gr I-Block tartıldı ve 100 µL Tween 20 ile birlikte 100 ml 1X TBS Buffer içerisinde manyetik karıştırıcı üzerinde yaklaşık 2 saat boyunca tamamen çözününceye kadar karıştırılarak hazırlandı.

Native-Page

- ✓ I-Block
- ✓ 1X TBS

1 gr I-Block tartıldı ve 100 ml 1X TBS Buffer içerisinde manyetik karıştırıcı üzerinde yaklaşık 3 saat boyunca tamamen çözününceye kadar karıştırıldı.

Analizlerde Kullanılan Jellerin Hazırlanması

Çizelge 3.1. %10'luk Poliakrilamid jelin hazırlanması

	Üst (Stacking) jel (4 jel)	Alt (Resolving) jel (4 jel)
Otoklavlanmış ddH_2O	7,95 ml	9,7 ml
%40 Acrylamide/Bis-acrylamide	1,25 ml	5 ml
1,5 Molar Tris-HCl	-	5 ml
0,5 Molar Tris-HCl	3,15 ml	-
%10 SDS	125 µl	200 µl
TEMED	12,5µl	10 µl
%10 APS	62,5 µl	100 µl

Üst jel, jel camlarının arasına döküldükten sonra dış ortam ile temasının engellenmesi için jelin üzerine izopropanol eklenildi. Üst jel donduktan sonra alkol jelin üzerinden tamamen uzaklaştırıldı ve Resolving jel döküldü, jel tarağı takıldı ve donması beklenildi.

1X Yürütme Tamponu

Western-Blot

- ✓ Tris
- ✓ Glisin
- ✓ %10'luk SDS
- ✓ Otoklavlanmış ddH2O

3,03 gr Tris ve 14,3 gr glisin tartılarak 990 ml otoklavlanmış ddH_2O içerisinde manyetik karıştırıcı üzerinde çözdürüldü ve üzerinde 10 ml %10'luk SDS eklenilerek son hacim 1 L olacak şekilde hazırlandı.

Native-Page

- ✓ Tris
- ✓ Glisin
- ✓ Otoklavlanmış ddH2O

3,03 gr Tris ve 14,3 gr glisin tartılarak 1 L otoklavlanmış ddH_2O içerisinde manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak hazırlandı.

1X Transfer Tamponu

Western-Blot

- ✓ Tris
- ✓ Glisin
- ✓ %10'luk SDS
- ✓ Otoklavlanmış ddH2O

5,8 gr Tris ve 2,93 gr glisin tartılarak 1 L otoklavlanmış ddH_2O içerisinde manyetik karıştırıcıda çözdürüldü ve üzerinde 370 µL %10'luk SDS eklenilerek hazırlandı.

Native-Page

- ✓ Tris
- ✓ Glisin
- ✓ Otoklavlanmış ddH2O

5,8 gr Tris ve 2,93 gr glisin tartılarak 1 L otoklavlanmış ddH_2O içerisinde manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak hazırlandı.

%10'luk SDS

- ✓ SDS (Sodyum Dodesil Sülfat)
- ✓ Otoklavlanmış ddH_2O

25 gr Sodyum dodesil sülfat (SDS) tartılarak üzerine 225 ml otoklavlanmış ddH_2O eklenerek tamamen çözünmesi için yaklaşık 1 gece manyetik karıştırıcı üzerinde bırakılarak hazırlandı.

%10'luk APS

- ✓ Ammonium Persulfate
- ✓ Otoklavlanmış ddH_2O

Ependorfun içerisine 50 mg APS tartıldı ve üzerine 450 µl otoklavlanmış ddH_2O ilave edilerek vortex yardımı ile çözdürüldü.

1,5 Molar Tris-HCl (pH: 8,8)

- ✓ Tris
- ✓ Otoklavlanmış ddH_2O

400 ml otoklavlanmış ddH_2O içerisine 92,5 g Tris tartıldı ve çözdürüldü. pH, 6N HCl ile 8,8'e ayarlandıktan sonra son hacim otoklavlanmış ddH_2O ile 500 ml'e tamamlandı.

0,5 Molar Tris-HCl (pH: 6,8)

- ✓ Tris
- ✓ Otoklavlanmış ddH_2O

400 ml otoklavlanmış ddH_2O içerisine 30 g Tris tartıldı ve çözdürüldü. pH, 6N HCl ile 6,8'e ayarlandıktan sonra son hacim otoklavlanmış ddH_2O ile 500 ml'e tamamlandı.

Acrylamide/Bis-acrylamide %40'lık (100 ml)

- ✓ Acrylamide
- ✓ Bis-acrylamide
- ✓ Otoklavlanmış ddH_2O

30 ml otoklavlanmış ddH_2O içerine 38,96 gr Acrylamide tartıldı ve yaklaşık 2 saat boyunca manyetik karıştırıcı yardımı ile çözdürüldü. 1,04 gr Bis-acrylamide tartıldı ve karıştırıcı üzerindeki solüsyona eklenildi. 1 gece karışması beklenildi ve karışımın yeni hacmi falkon yardımı ile ölçülerek son hacim otoklavlanmış ddH_2O ile 100 ml'e tamamlanıldı. Hazırlanan solüsyon ışık görmeyecek şekilde +4 °C muhafaza edildi.

%0.01'lik Bromophenol Blue

- ✓ Bromophenol Blue
- ✓ Otoklavlanmış ddH_2O

100 mg Bromophenol Blue tartıldı ve 20 ml otoklavlanmış ddH_2O içerisinde çözdürüldü.

1Molar Tris

- ✓ Tris
- ✓ Otoklavlanmış ddH_2O

12.114 gr Tris tartıldı ve 100 ml Otoklavlanmış ddH_2O içerisinde çözdürüldü.

5X SDS Laemli Buffer

Reducing Örnekler için;

- ✓ SDS
- ✓ 1 M Tris
- ✓ Glycerol
- ✓ Bromophenol Blue
- ✓ 2-Merkaptoetanol

50 ml'lik beher içerisine 3.333 gr SDS tartıldı. Üzerine 9.375 ml 1M Tris ilave edilip karıştırıldı. Karışıma 11.9 ml %100'lük Gliserol, 660 µl %0.01'lik Bromophenol blue ve 7.5 ml %25'lik 2-merkaptoetanol çözeltilerinden ilave edildi. Çözelti pH'ı 6.8'e HCl ile ayarlandı ve 1ml olacak şekilde ependorflara aliquout edilerek -20°C'de muhafaza edildi.

Native Page Örnekler için;

- ✓ 1 M Tris
- ✓ Glycerol
- ✓ Bromophenol Blue
- ✓ Otoklavlanmış ddH2O

15 ml lik falkon içerisine 9.375 ml 1M Tris, 11.9 ml %100'lük Gliserol, 660 µl %0.01'lik Bromophenol blue ve 7.5 ml otoklavlanmış ddH2O ilave edildi. pH: 6.8'e HCl ile ayarlandı. Daha sonra karışım 1ml olacak şekilde ependorf tüplere aliquout edildi. Tüpler -20°C'de muhafaza edildi.

Destaining Buffer

- ✓ Asetik Asit
- ✓ Methanol
- ✓ Otoklavlanmış ddH_2O

100 ml Asetik asit, 200 ml Methanol ve 700 ml otoklavlanmış ddH_2O mezür yardımı ile ölçüldü ve karıştırıldı.

Staining Buffer

- ✓ Asetik Asit
- ✓ Methanol
- ✓ Coomasssie Blue
- ✓ Otoklavlanmış ddH_2O

500 ml Methanol, 400 ml otoklavlanmış ddH_2O ve 100 ml Asetik asit mezür yardımı ile ölçüldü. İçerisine 1 gr Coomassie Blue tartıldı ve karıştırıldı.

Acetosyringone (AS) 100 mM Stock

- ✓ Acetosyringone
- ✓ Ethanol
- ✓ Otoklavlanmış ddH_2O

0,3924 gr Acetosyringone tartıldı ve 12 ml %95'lik ethanol ile çözdürüldü üzerine 8 ml otoklavlanmış ddH_2O eklenildi ve son hacim 20 ml'e tamamlanıldı.

Kanamycin (50 mg/ml)

- ✓ Kanamycin
- ✓ 0.45 µm Filter
- ✓ Otoklavlanmış ddH_2O

0,5 gr Kanamycin tartıldı ve 10 ml otoklavlanmış ddH_2O içerisine eklenildi vortex yardımı ile çözdürüldü. 0.45 µm Filter'dan geçirildikten sonra 500 µl olacak şekilde aliquout edilerek -20 °C'de muhafaza edildi.

%90'lık Glycerol Solüsyonu

- ✓ Glycerol (%100'lük)
- ✓ Otoklavlanmış ddH_2O

90 ml %100'lük Glycerol alındı, üzerine 10 ml otoklavlanmış ddH_2O eklenildi ve 121°C'de 30dk otoklavlandı.

Sodium Phosphate Monobasic

- ✓ NaH_2PO_4 (MW NaH_2PO_4: 137,99 gr/mol)
- ✓ Otoklavlanmış ddH_2O

1 M 100 ml Monobasic için 13,8 gr NaH_2PO_4 tartıldı ve 100 ml otoklavlanmış ddH_2O içerisinde çözdürüldü.

Sodium Phosphate Dibasic

- ✓ Na_2HPO_4 (MW Na_2HPO_4: 141,96 gr/mol)
- ✓ Otoklavlanmış ddH_2O

1 M 200 ml Dibasic için 28,38 gr Na_2HPO_4 tartıldı ve 200 ml otoklavlanmış ddH_2O içerisinde çözdürüldü.

Purification Buffer (20 mM Phosphate, 300 mM NaCl)

- ✓ 1 M NaH_2PO_4
- ✓ 1 M Na_2HPO_4
- ✓ NaCl
- ✓ Otoklavlanmış ddH_2O

800 ml otoklavlanmış ddH_2O içerisine 4,52 ml 1 M NaH_2PO_4 ve 15,48 ml 1 M Na_2HPO_4 tartıldı ve eklenildi. Üzerine 17,55 gr NaCl tartıldı ve pH, NaOH ile 7,42 olacak şekilde ayarlanıldı. pH'ı ayarlandıktan sonra 200 ml daha otoklavlanmış ddH_2O eklenerek 1 L'ye tamamlanıldı.

İmidazole Stock 100 mM

- ✓ İmidazole
- ✓ Pürification Buffer

50 ml İmidazole Stock solüsyonu için 0,3404 gr imidazole tartılır ve 50 ml Pürification Buffer içerisinde vortex yardımı ile çözdürüldü.

Binding Buffer (Equilibration) 10 mM

- ✓ 100 mM İmidazole Stock
- ✓ Pürification Buffer

5 ml 100 mM İmidazole Stock solüsyonundan alındı ve 45 ml Purification Buffer ile karıştırıldı.

Extraction Buffer (10 mM Binding, 1 mM DIECA)

- ✓ Binding Buffer
- ✓ DIECA

Yeteri miktarda Binding Buffer içerisinde 1 mM DIECA olacak şekilde hazırlanıldı.

Wash Buffer 25 mM

- ✓ 100 mM İmidazole Stock
- ✓ Pürification Buffer

12,5 ml 100 mM İmidazole Stock solüsyonundan alındı ve 37,5 ml Purification Buffer ile karıştırıldı.

Elution Buffer 250 mM

- ✓ İmidazole
- ✓ Pürification Buffer

0,851 gr İmidazole tartıldı ve 50 ml Purification Buffer içerisinde vortex yardımı çözdürüldü.

3.2. Deneylerde Kullanılacak Olan Besi Yerleri

BBL Medium (SYS medium)

- ✓ Soy Hydrolysate
- ✓ Yeast Extract
- ✓ NaCl
- ✓ Otoklavlanmış ddH_2O

10 gr Soy Hydrolysate, 5 gr yeast extract ve 5 gr NaCl 800 ml otoklavlanmış ddH_2O içerisinde çözdürüldü. pH, 1M KOH 7.0'a ayarlandıktan sonra 200 ml otoklavlanmış ddH_2O ile 1 L'ye tamamlanıldı. 121°C'de 30dk otoklavlandı ve +4°C'de muhafaza edildi.

MMA Medium (10 mM MES, 10 mM $MgCl_2$)

- ✓ MES
- ✓ MgCl2
- ✓ Otoklavlanmış ddH_2O

1,952 g MES ve 0,95 gr $MgCl_2$ (veya 2,03 gr $MgCl_2$ $6H_2O$) tartıldı 800 ml otoklavlanmış ddH_2O içerisinde çözdürüldü. pH NaOH ile 5,8'e ayarlandıktan sonra 200 ml otoklavlanmış ddH_2O ile 1 L'ye tamamlanıldı. 121°C'de 30dk otoklavlandı ve +4°C'de muhafaza edildi.

LB-Agar

- ✓ LB-Broth with Agar
- ✓ Kanamycin
- ✓ Otoklavlanmış ddH_2O

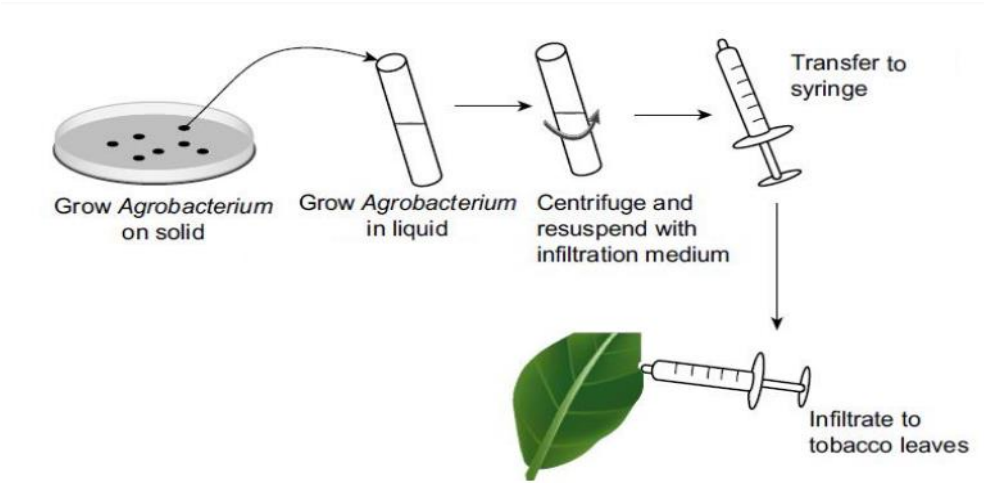
40 gr LB-Broth with Agar tartılarak 1 L otoklavlanmış ddH_2O içerisinde çözdürüldü ve 121°C'de 30dk otoklavlandı. Çözelti otoklavdan çıkarıldıktan sonra 1 saat boyunca su banyosunda 50°C'de bekletildi ve içerisine 1 ml kanamycin eklenildi. 25 ml olacak şekilde petrilere hava kabarcığı olmayacak şekilde döküldü ve donması beklenildi.

3.3. *Bacillus anthracis* PA'nın kodon optimizasyonu ve klonlanması

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

3.4. Glikozile ve Deglikozile PA83 Proteininin, *Nicotiana benthamiana* Bitkisindeki Geçici Ekpresyonu

Laboratuvarımız da daha önceden sinyal peptidi ve His-tag etiketiyle dizayn edilip tranforme edilen ve PGR-APA, PGR-PNGaseF, PGR-APA-EndoH genlerini içeren *A. tumefaciens* suşlarının, 50µg/ml kanamisin içeren LB-Agar öze yardımı ile petriye çizme işlemi yapıldı. Petriler 28°C'lik inkübatörde üç gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrası oluşan kolonilerden seçilerek, BBL besi yeri (10 g / L soya hidrolizatı, 5 g / L maya özütü, 5 g / L NaCl ve 50 mg / L kanamisin) içerisin de gece boyunca 28 ° C'de büyütüldü.



Şekil 3.1. *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı ile gerçekleştirilen geçici bitki ekspresyonun infiltrasyon işlemi (Smith 2012)

Ertesi gün bakteri solüsyonları, spektrofotometre ile OD. 600 nm'de absorbanları ölçüldü. Solüsyonların absorbans değerlerinin ≥ 1 olmasına dikkat edildi. O.D. değerleri kaydedilen solüsyonlar, santrifüjde 5000xg'de 5 dakika +4 ° C'de çöktürülüp, pelletleri 150 µm Acetosyringone içeren MMA medium içerisinde çözdürüldü ve iki saat boyunca oda sıcaklığın da manyetik karıştırıcıda inkübasyona bırakıldı.



Şekil 3.2. *Nicotiana benthamiana* bitkisinin görüntüsü



Şekil 3.3. *N. benthamiana* bitkisinin yaprak alt ayasına yapılan infiltrasyon işlemi

Deglikozile PA83 için PGR-APA, PGR-EndoH/PGR-PNGaseF ve tümör baskılayıcı gen içeren bakteri solüsyonu 8:1:1 oranlarında, glikozile PA83 için ise PGR-APA, tümör baskılayıcı ile 9:1 oranında olacak şekilde karıştırılarak infiltrasyon için hazır hale getirildi. İnfiltrasyon işlemi, 6-7 haftalık olan *Nicotiana benthamiana* bitkisine yapraklarının alt yüzeyinden şırınga ile yaprak yüzeyinde boşluk kalmayacak şekilde enjekte edilerek yapıldı. Özel iklimlendirme odasında yetiştirilen bitkilerin infiltrasyon sonrası besin ihtiyaçları ve nem, sıcaklık değerleri düzenli olarak takip edildi. Yaprak dokuları, infiltrasyon tarihinden beş gün sonra toplandı ve şeffaf örnek poşetleri içerisin de, analizleri yapılana kadar -80°C'ye kaldırıldı.

3.5. Bitkiden Protein Ekstraksiyonu ve İmmuno Blot Analizi

Hücre solüsyonlarının *Nicotiana benthamiana* bitkisine infiltrasyon işleminden 5 gün sonra (dpi, day post infiltration) infiltre bitki yaprakları toplandı. Ekspresyon analizi için ~ 1 gr yaprak dokusu, yaprak ağırlığının üç hacim katı kadar extraction tamponu (1XPBS, 2mM DIECA) ile havan ve havaneli yardımı ile buz üzerinde ezildi. Total protein 20000 xg'de 5 dakika +4 ° C'de çöktürüldü ve süpernatant kısmı yeni bir ependorf tüpüne alındı. Western Blot analizi için, süpernatant 4:1 oranında 5X Laemli buffer ile karıştırıldı ve 100 ° C'de su banyosunda 5 dakika kaynatıldı.

Sıcaklıkları oda ısısına gelen örnekler, analiz için önceden hazırlanan %10'luk poliakrilamid jeline yüklendi. Jel, öncelikle yürütme tamponu içerisinde 45 dakika yürütüldü ve daha sonra, bir saat boyunca transfer tamponu içerisinde Polivinilidin Fluorid membrana blotlandı. Transfer sonrası membran yatay çalkalayıcıya alındı ve %1'lik bloklama (I-Block) tamponu ile bir saat muamele edildi. Sonrasın da ise primer anti-His Tag antikoru ile bir saat işaretlendi ve ardından bloklama tamponu ile 3x5 dk yıkandı. Membrana ikincil antikor olarak anti-mouse horseradish peroxidase (HRP) konjuge sekonder antikor ile muamele edildi. Sekonder antikordan sonra membran tekrar 3x5 dk bloklama tamponu ile yıkandı. Son aşama olarak proteinlerin ışıma görüntüsü için membran, SuperSignal West Pico Stable Peroxide ve Luminol/ Enhancer solüsyonları (SuperSignal West Pico, Thermo Fisher Scientific Grand Island, NY) ile muamele edildi ve GeneGnome XRQ Chemiluminescence görüntüleme sistemi (Syngene Corp, ABD) kullanılarak görüntülendi.

3.6. His-tag etiketli Glikozile ve Deglikozile pp-PA83 proteinlerinin *N. Benthamiana*'dan saflaştırılması

Laboratuvarımızda daha önceki çalışmalarımızda ppPA83 (bitki üretimli PA83)'ün glikozile ve deglikozile edilmiş varyantlarının saflaştırılması için saflaştırma prosedürü geliştirilmiştir (Mamedov vd. 2017) bu tez çalışması için de aynı prosedür kullanılmaktadır. Protein Saflaştırma yöntemi için, immobilize metal afinite kromatografisi (IMAC) kullanıldı.

İnfiltrasyondan beş gün sonra toplanan ve -80 ° C' ye kaldırılan yaprak örnekleri, yaprak ağırlığının üç hacim katı kadar extraction tamponu (20 mM Fosfat, 300 mM NaCL, 10 Mm İmidazol, 1mM DIECA) içerisinde havan ve havaneli yardımı ile buz üzerinde ezildi. Hidrofil gazlı bez yardımı ile total ekstraksiyon 50 ml'lik falkonlara alındı. Falkonların içerisine alınan süzüntü 12000 xg'de 20 dakika +4 ° C'de santrifüjlendi ve temizlenen süpernatant başka bir falkona aktarıldı. Süpernatantın geçireleceği kolona daha önceden HisPur^{TM} Ni-NTA Resin eklendi ve resinin hacimce iki katı kadar Bağlayıcı tampon (20 mM Fosfat, 300 mM NaCL, 10 Mm İmidazol) ile resin yıkanarak hazır hale getirildi. Santrifüj sonrası alınan bütün süpernatant kolondan geçirildi. İstenmeyen protein bağlanmalarını engellemek için kolon içerisindeki resin, tüm süpernatant geçirildikten sonra resin hacminin on katı kadar Yıkama tamponu (20 mM Fosfat, 300 mM NaCL, 25 Mm İmidazol) ile yıkandı. Yıkama işlemi sırasında kolondan akan süzüntü düzenli olarak BioDrop ile ölçülerek resinin temizlendiğinden, istenmeyen proteinlerin yıkandığından emin olundu. Resine bağlanan Histag etiketli proteinleri elüt edebilmek için, resinin hacimce on katı kadar Elüsyon tamponu (20 mM Fosfat, 300 mM NaCL, 250 Mm İmidazol) kolondan geçirildi ve elütler ependorflara 0.5 ml olacak şekilde toplandı, etiketlendi ve buz içerisin de muhafaza edildi. Fraksiyonların içerisinde ki total protein miktarı, BioDrop ile ölçüldü ve kaydedildi.

Proteinlerin konsantrasyon aşaması için BioDrop ölçümlerinin hemen sonrasın da elüt edilen proteinler Millipore (10K MWCO) konsantratörü ile 8500 xg'de +4 °C'de santrifüjlenerek istenilen son nihai hacme indirildi. Konsantre edilen protein içerisinde bulunduğu tampon 1XPBS ile değiştirilerek tampon içerisinde ki imidazole uzaklaştırıldı. Son konsantrasyonu ölçülen saf proteinden SDS analizi için örnek ayrıldı ve geri kalan protein aliquatlanarak -80 ° C'ye kaldırıldı.

3.7. Stabilite Analizleri

3.7.1. Western Blot Analizi

Western Blot analizi için stabilite numuneleri, her on beş dakikalık bir periyotta su banyosundaki sıcaklık seviyeleri arttırılarak tasarlandı. Her sıcaklık periyodu için örnekler 15 dakika inkübasyonda bırakıldı. Her inkübasyondan sonra numuneler, 4:1 oranında 5X SDS yükleme boyası ile karıştırıldı ve 100 ° C'de su banyosunda 5 dakika kaynatıldı. Hazırlanan örnekler 1000 xg'de 10-15 saniye santrifüjlendi. Örnekler analiz için önceden hazırlanan %10'luk bir poliakrilamid jel üzerine yüklendi. Jel, esas olarak running tamponda 100 V 13 dk./200 V 45 dk süreyle çalıştırıldı. Proteinler daha sonra transfer tamponu içinde 100 V da bir saat süreyle Polivinilidin Florür membranına aktarıldı. Aktarımdan sonra, membran yatay bir çalkalayıcı üzerinde % 1 bloke edici tampon (I-Block) ile muamele edildi. Daha sonra, bir saat boyunca birincil anti-His Tag antikoru ile etiketlendi. Fazla primeri uzaklaştırmak için membran 5 dk bloke edici tampon ile 3 kez yıkandı ve ikincil olarak anti-mouse horseradish peroxidase (HRP) konjuge sekonder antikor ile bir saat muamele edildi. Membran sekonder antikorla etiketlendikten sonra tekrar 5 er dk boyunca 3 kez bloklama tamponu ile yıkandı. Elde edilen membranın sinyal üretimi, kemilüminesan substratları olan SuperSignal West Pico Stable Peroxide ve Luminol/ Enhancer solüsyonları (SuperSignal West Pico, Thermo Fisher Scientific Grand Island, NY) kullanılarak gerçekleştirildi. GeneGnome XRQ Chemiluminescence görüntüleme sistemi (Syngene Corp, ABD) kullanılarak görüntülendi.

3.7.2. Native Page Analizi

Native Page analizi için örnekler, doğal konformasyonlarının bozulmaması için non reduced koşullar ile hazırlandı. Stabiliteye tabii tutulan örnekler, her on beş dakikalık bir periyotta su banyosundaki sıcaklık seviyeleri arttırılarak tasarlandı. Her inkübasyondan sonra örnekler 13000 xg'de 5 dakika santrifüjlendi ve santrifüj sonrası tüplerde pellet gözlemlendi. Süpernatant dan belirli bir miktar 4:1 oranında Loading buffer yükleme boyası ile karıştırıldı. Örnekler analiz için %10'luk Native Page için hazırlanan içerisinde SDS bulunmayan poliakrilamid jel üzerine yüklendi. Jel, ilk olarak Native Page-Running Tamponda 125 V 150 dk süreyle çalıştırıldı. Kullanılacak Polivinilidin Florür membran 30 sn methanol sonrasında 60 sn 1X PBS buffer ile muamele edildi. Proteinler daha sonra Native Page-Transfer Tamponu içerisinde 100 V 60 dk süreyle bu membrana aktarıldı. Aktarımdan sonra, membran yatay bir çalkalayıcı üzerinde % 1 bloke edici tampon ile muamele edildi. Daha sonra, bir saat boyunca laboratuvarımızda üretilip saflaştırılmış olan pp-Anti-PA83 antikoru ile etiketlendi. Fazla primeri uzaklaştırmak için membran 5 dk bloke edici tampon ile 3 kez yıkandı ve ikincil olarak Anti-human HRP-konjuge sekonder antikoru ile tespit edildi. Membran son olarak SuperSignal West Pico Stable Peroxide ve Luminol/ Enhancer solüsyonları (SuperSignal West Pico, Thermo Fisher Scientific Grand Island, NY) ile muamele edildi ve GeneGnome XRQ Chemiluminescence görüntüleme sistemi (Syngene Corp, ABD) kullanılarak görüntülendi.

3.7.3. SDS-PAGE Analizleri

Zamana ve sıcaklığa bağlı stabilite analizleri için, *Nicotiana benthamiana* bitkisinde eksprese edilip, saflaştırılan PA83 proteinlerinin glikozile ve deglikozile varyantları, 1.0 mg / ml'ye seyreltildi ve düşük bağlayıcı polipropilen eppendorf tüplerine aliquatlandı. Proteinler, stabilite çizelgesinde belirtilen zaman dilimlerinde ve belirli koşullar temel alınarak ayarlanan sıcaklık seviyelerin de inkübasyona bırakılacak şekilde dizayn edildi. Her inkübasyon sonrası, numuneler SDS yükleme boyasıyla 5X SDS Laemli Buffer ile 4:1 oranında karıştırıldı ve numuneler daha sonra SDS-PAGE analizi için kullanılana kadar -80 ° C'de saklandı. Periyotları biten stabilite örnekleri -80 ° C'den çıkarılıp 100 ° C'de 5 dakika kaynatıldı, 1000 xg'de 10-15 saniye santrifüjlendi ve oda ısısına gelen örnekler sırayla %10'luk akrilamid jele yüklendi. Jel yürütme tamponu içerisinde 100 V 13 dk./200 V 45 dk süreyle yürütüldü ve sonrasın da coomassie brilliant blue boyası içeren Staining tamponu ile yaklaşık bir saat boyunca boyandı. Fazla boyanın jel den uzaklaştırılması ve protein bantlarının görünürlüğü netleşene kadar Destaining tamponu içerisin de yıkandıktan sonra görüntülendi.

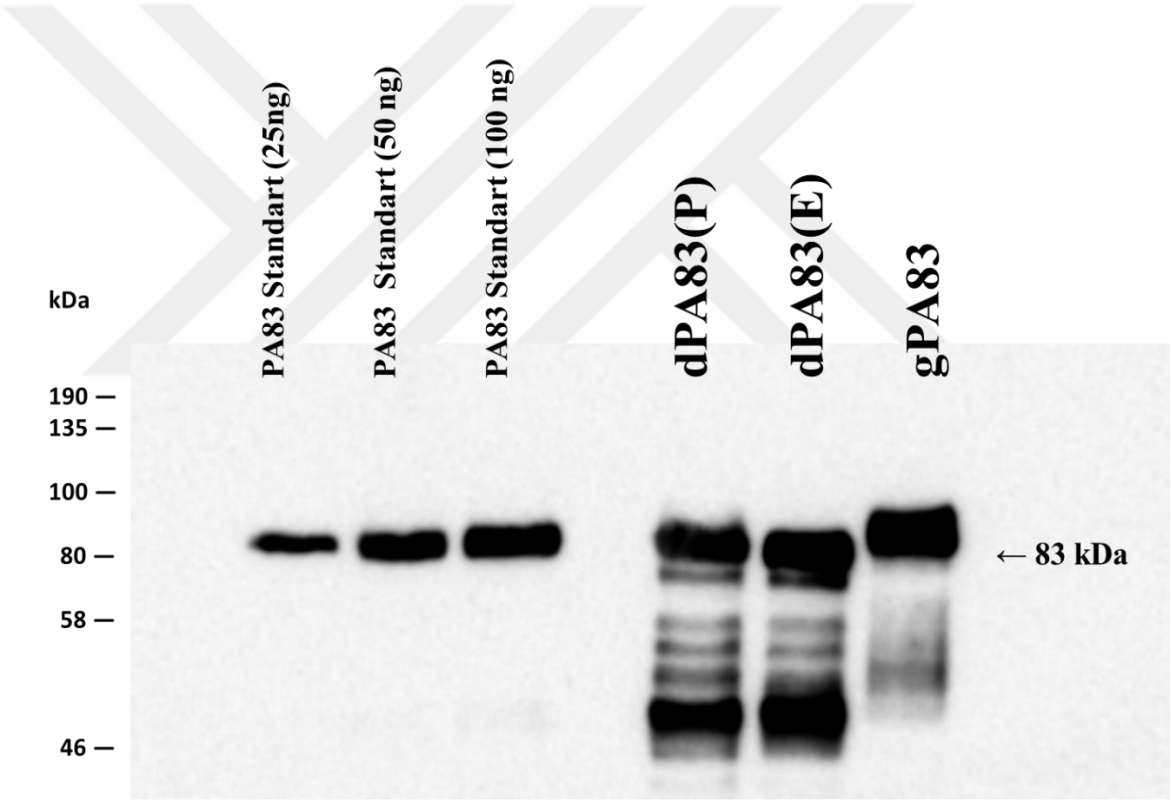
Çizelge 3.2. *Nicotiana benthamiana* bitkisinde geçici ekspresyon sistemi ile üretilip saflaştırılmış olan PA83 proteini ve varyantlarının SDS-Page analizi ile gerçekleştirilen stabilite çalışmalarına ait periyodik bilgiler

Sıcaklık	**Zaman Periyotları**							
37 °C	Başlangıç	12 saat	24 saat	48 saat	72 saat	96 saat		
37 °C	Başlangıç	2 gün	4 gün	6 gün	8 gün	10 gün		
24 °C	Başlangıç	1 hafta	2 hafta	3 hafta	4 hafta	5 hafta		
24 °C	Başlangıç	1 ay		2 ay		3 ay		
4 °C	Başlangıç	1 ay	2 ay	3 ay	4 ay	5 ay	6 ay	
Başlangıç	30 °C	40 °C	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C	90 °C	15 dakika

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Rekombinant PA83 Varyantlarının Üretilmesi

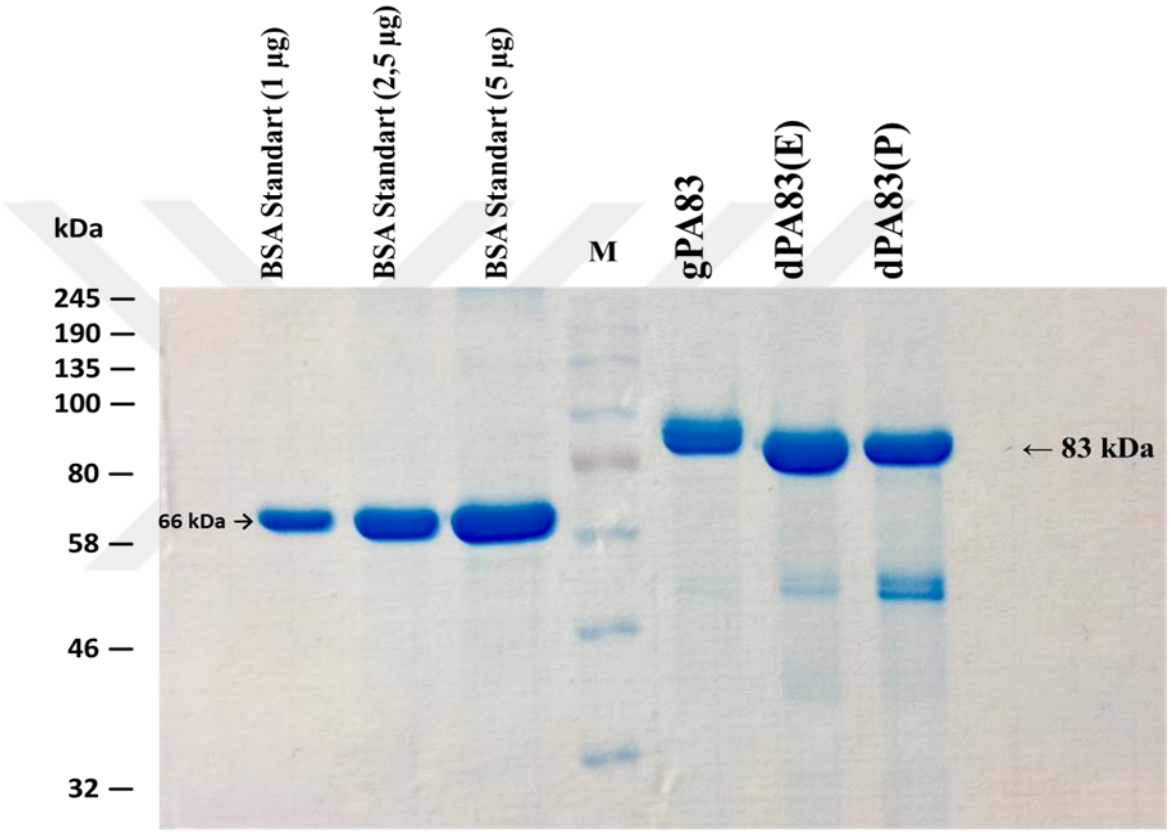
İstenilen gen bölgesinin bulunduğu plazmidi içeren *A. tumefaciens* hücreleri, protein üretimi amacıyla materyal-metotta anlatıldığı üzere *Nicotiana benthamiana* bitkisine infiltrasyon işlemi yapıldı. PA83 proteininin deglikozile varyantının oluşturulması için PA83 proteini farklı oranlarda Endo H ve PNGase F ile birlikte koekspresyonu yapıldı. İnfiltre edilmiş yapraklar, infitrasyondan beş gün sonra toplanarak materyal metotta tarif edildiği üzere ekstrakte edildi. Ekstraksiyon sonrası elde edilen örneklerden protein üretiminin doğruluğu Western Blot analizi ile gerçekleştirildi. Analiz sonrası protein bantlarının membran üzerinde istenen kDa boyutunda olduğu gözlemlendi böylece istenen rekombinant proteinin *Nicotiana benthamiana* bitkisinde geçici ekspresyon yöntemi ile üretilmiş olduğu doğrulandı.



Şekil 4.1. *Nicotiana benthamiana* bitkisinde eksprese edilen glikozile PA83, Endo H ve PNGase F deglikozile edilmiş PA83 proteinlerinin Western Blot görüntüsü. gPA83: glikozile edilmiş PA83; dPA83(E): Endo H ile deglikozile edilmiş PA83; dPA83(P): PNGase F ile deglikozile PA83

4.2. Rekombinant PA83 Varyantlarının Saflaştırılması

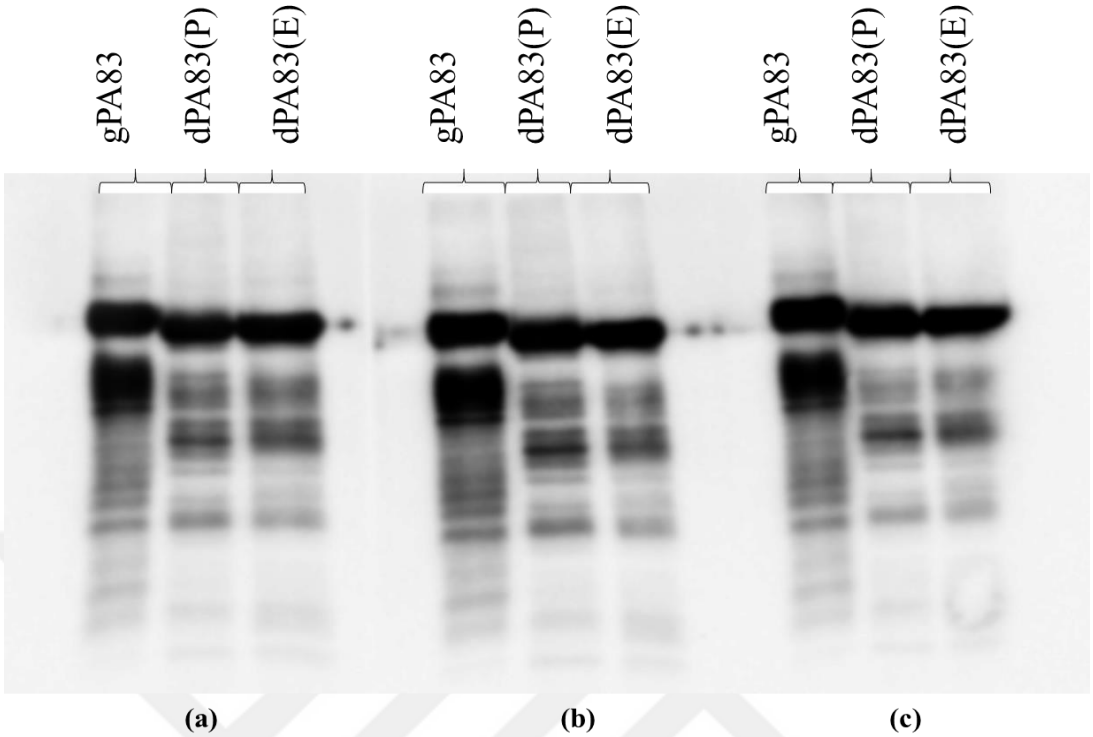
Histidin etiketli rekombinant PA83 varyantlarının bitki yapraklarından saflaştırılması materyal-metotta anlatıldığı prosedür izlenilerek gerçekleştirildi. Histidin etiketli PA83 varyantlarının saflaştırılma analizinin sonucu yapılan SDS-Page analizlerin de her proteinin yeterli derece de olması gereken boyutlarda elde edildiği gözlemlenerek doğrulandı. Endo-H ile deglikozile edilen PA83 formunda saflık derecesi, glikozile PA83 ve PNGase F ile deglikozile edilen muadili ile karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.2. *Nicotiana benthamiana* bitkisinde üretilip, saflaştırılan glikozile ve deglikozile PA83 proteinlerinin SDS-PAGE analizi. BSA Standart: Bovine Serum Albumin Proteini; gPA83: glikozile edilmiş PA83; dPA83(E): Endo H ile deglikozile edilmiş PA83; dPA83(P): PNGase F ile deglikozile PA83; M: Color prestained protein standard (Cat. No. P7712 S New England Biolabs)

4.3. ppPA83 Protein Varyantlarının, pp-anti-PA83 Antikorları ile Reaktivite Analizi

Bitki ekspresyon sistemi ile üretilip saflaştırılan PA83 varyantlarının, yine bitki ekspresyon sistemi kullanılarak üretilen anti-PA83 antikorları ile materyal-metotta tarif edilen Western Blot analizi ile karşılaştırmalı İmmuno analizi yapıldı. Poliakrilamid jel üzerinde yürütülen ppPA83 proteinleri daha sonra PVDF membrana transfer edildi ve membrandaki proteinler PA83'e özgül uyarlanmış pp-anti-PA83 monoklonal antikor (mAb) ile muamele edildi. Analiz sonucunda proteinlerin hem glikozile hem de deglikozile formlarının pp-anti-PA83 ile reaktivite gösterdiği gözlemlendi.

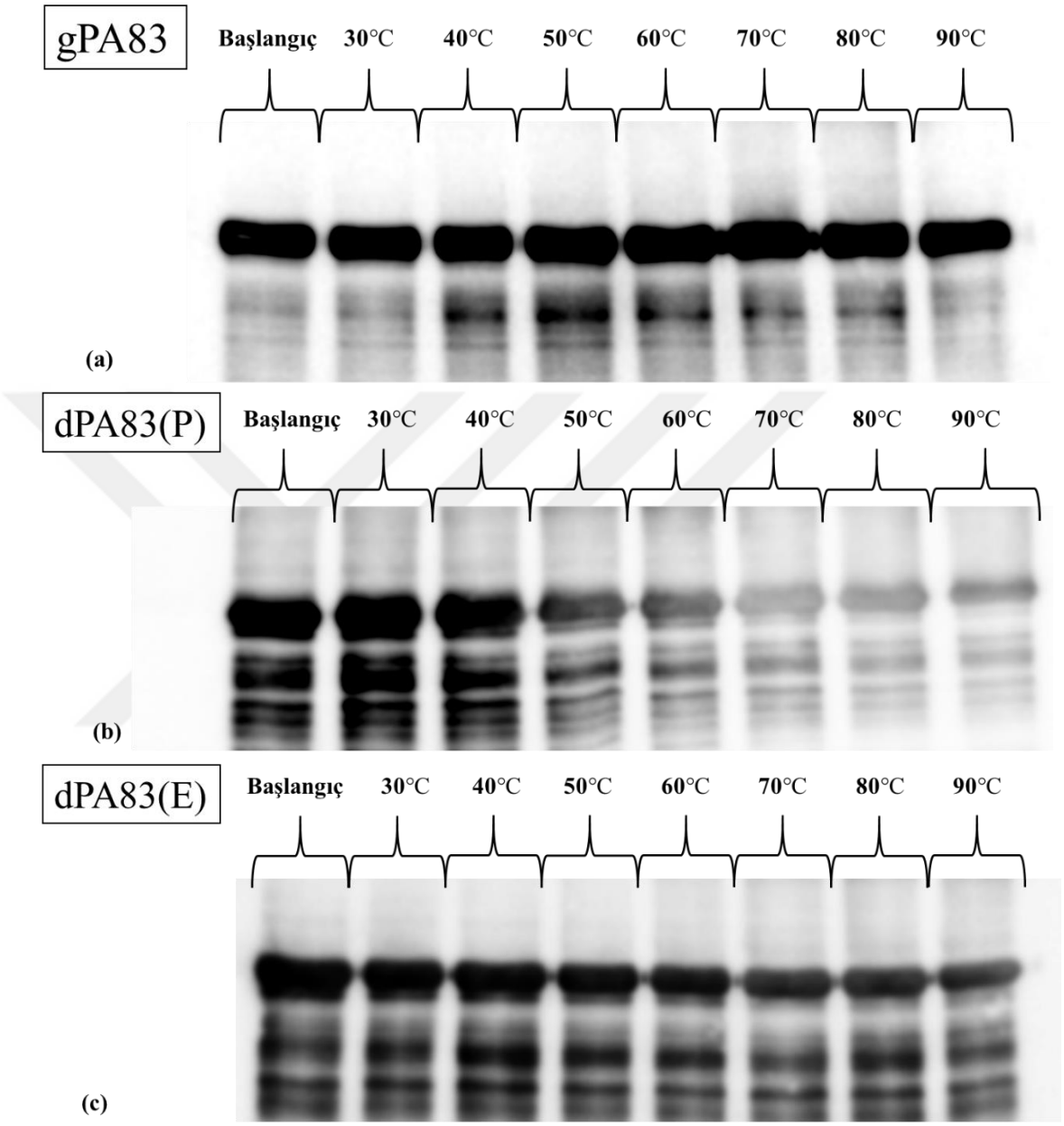


Şekil 4.3. ppPA83 proteinlerinin özgül monoklonal antikoru (mAb) pp-anti-PA83 ile gerçekleştirilen Western Blot analizi görüntüsü. Membran üzerinde bulunan ppPA83 proteinleri jel kuyulara 100 ng olacak şekilde; gPA83, dPA83(P), dPA83(E) sırasıyla yüklendi ve yürütüldü. Transfer sonrası membran primer olarak pp anti-PA83 (5µg/10ml) antikorları ile işaretlendi. **a)** Primer Antikor; G-anti-PA83 **b)** Primer Antikor; dG-anti-PA83(P) **c)** Primer Antikor; dG-anti-PA83(E)

4.4. Saflaştırılmış Rekombinant PA83 Varyantlarının Stabilite Analizleri

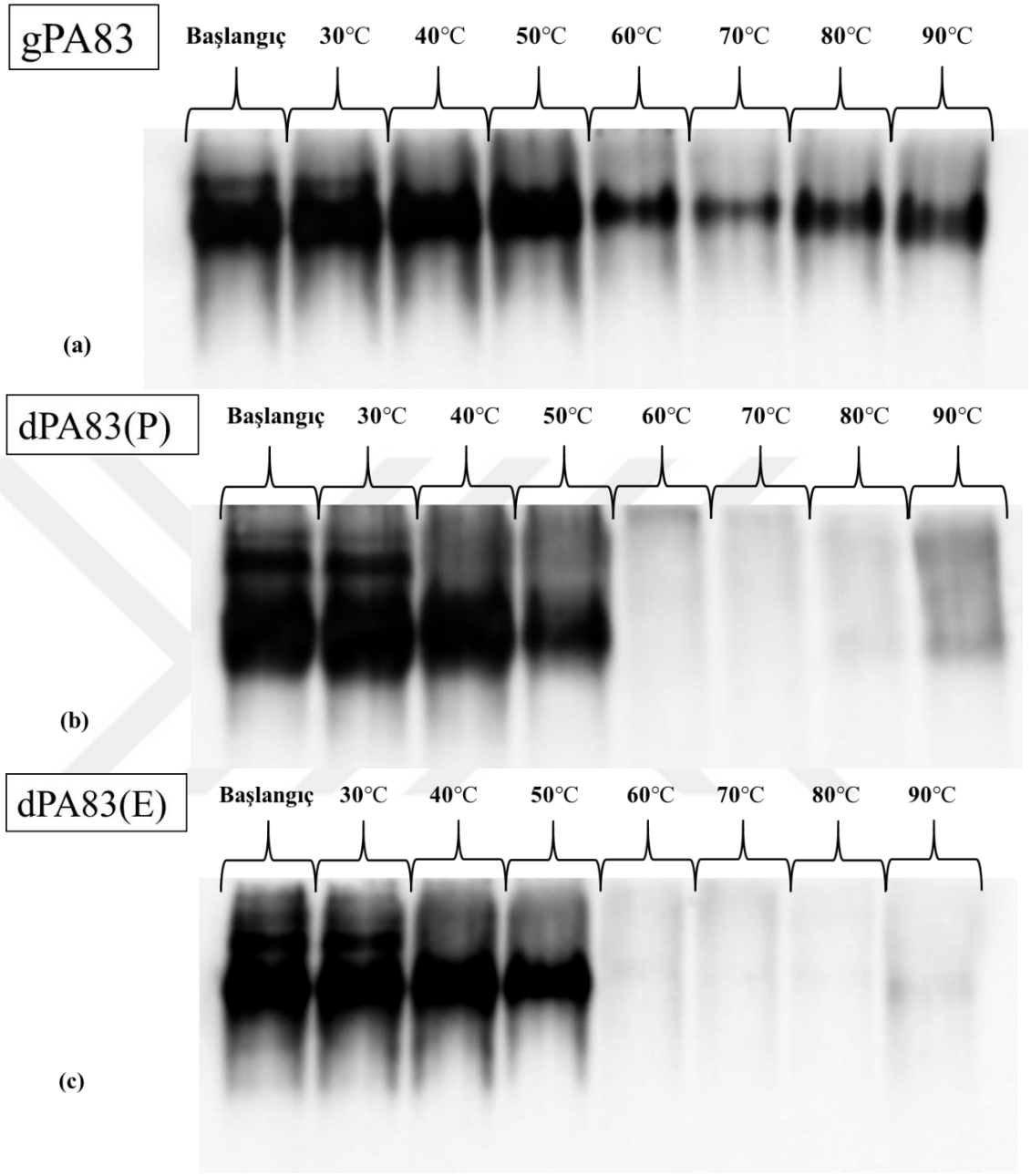
Saflaştırılmış örneklerin stabilite analizleri materyal ve metod bölümünde tarif edildiği gibi Western Blot, Native Page ve SDS-Page analizleri kullanılarak gerçekleştirildi. Teste tabii tutulan proteinler saflaştırma sonrası içeriklerine hiçbir katkı kimyasal eklemeden saf halde kullanıldı. Stabilite sıcaklıkları kademeli artış gösteren sıcaklık periyotlarına ek olarak insan vücut sıcaklığı olarak 37 °C, oda sıcaklığı 24°C ve soğutucu sıcaklığı +4 °C periyotları da düşünülerek tasarlandı. Testlerin sonucunda ppPA83 proteinlerinin stabilite periyotlarının ardından halen özgül uyarlanmış monoklonal antikor (mAb) ile muamele edildiğinde reaktivite gösterdiği SDS Page analizlerinde ise protein bantlarının varlığının devam ettiği gözlemlendi. Şekillerden görebileceğimiz gibi, Endo H ile deglikozile edilen PA83 proteini, glikozile PA83'e kıyasla ve ayrıca PNGase F ile degikozile edilen muadili ile karşılaştırıldığında daha iyi bir stabilite gösterdiği kanıtlanmıştır.

4.4.1. Stabilite Analizlerinin Western Blot Bulguları



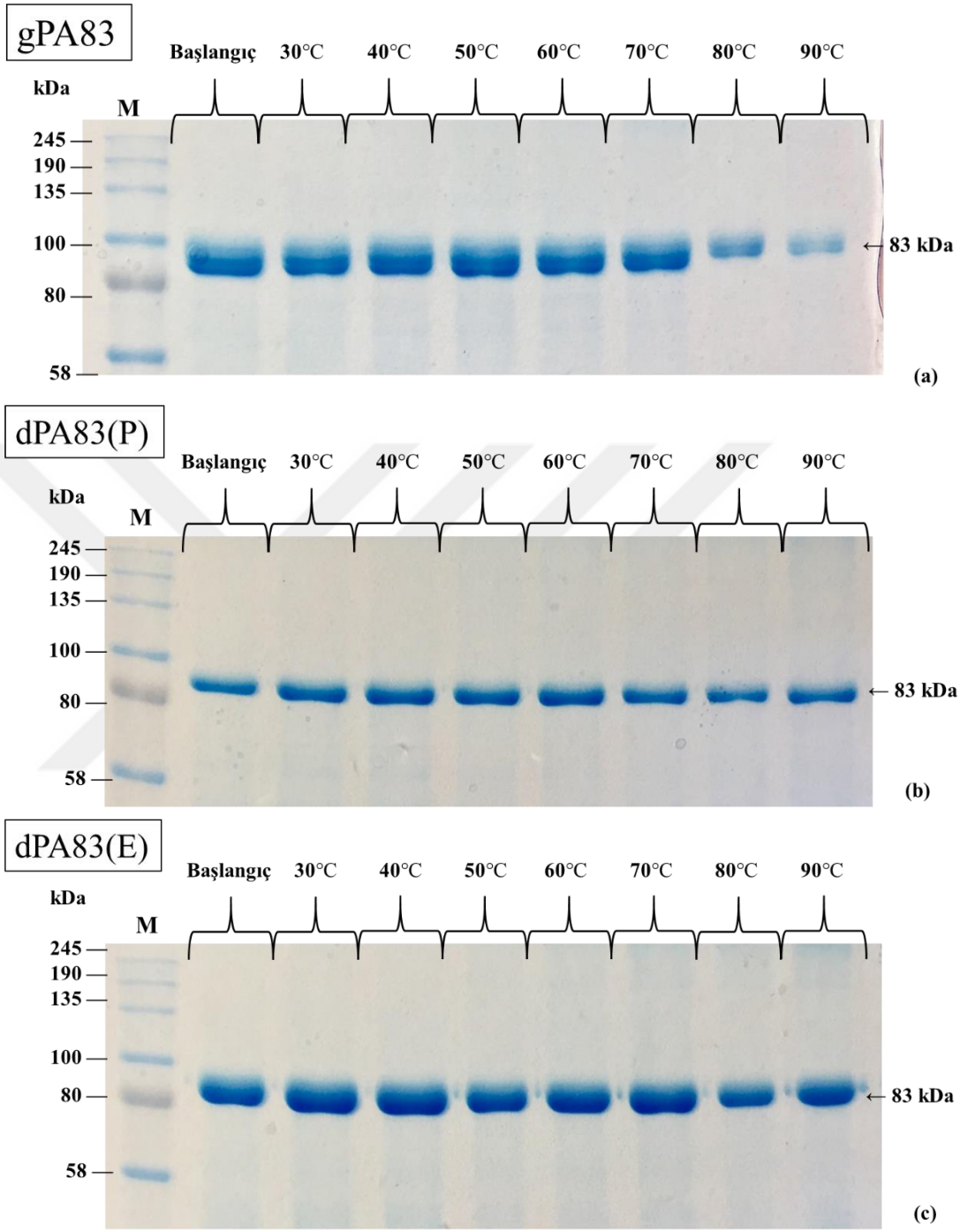
Şekil 4.4. Rekombinant PA83 varyantlarının stabilite testleri sonrası Western Blot analizi **a)** gPA83: glikozile edilmiş PA83; **b)** dPA83(P): PNGase F ile deglikozile PA83; **c)** dPA83(E) Endo H ile deglikozile edilmiş PA83

4.4.2. Stabilite Analizlerinin Native PAGE Bulguları

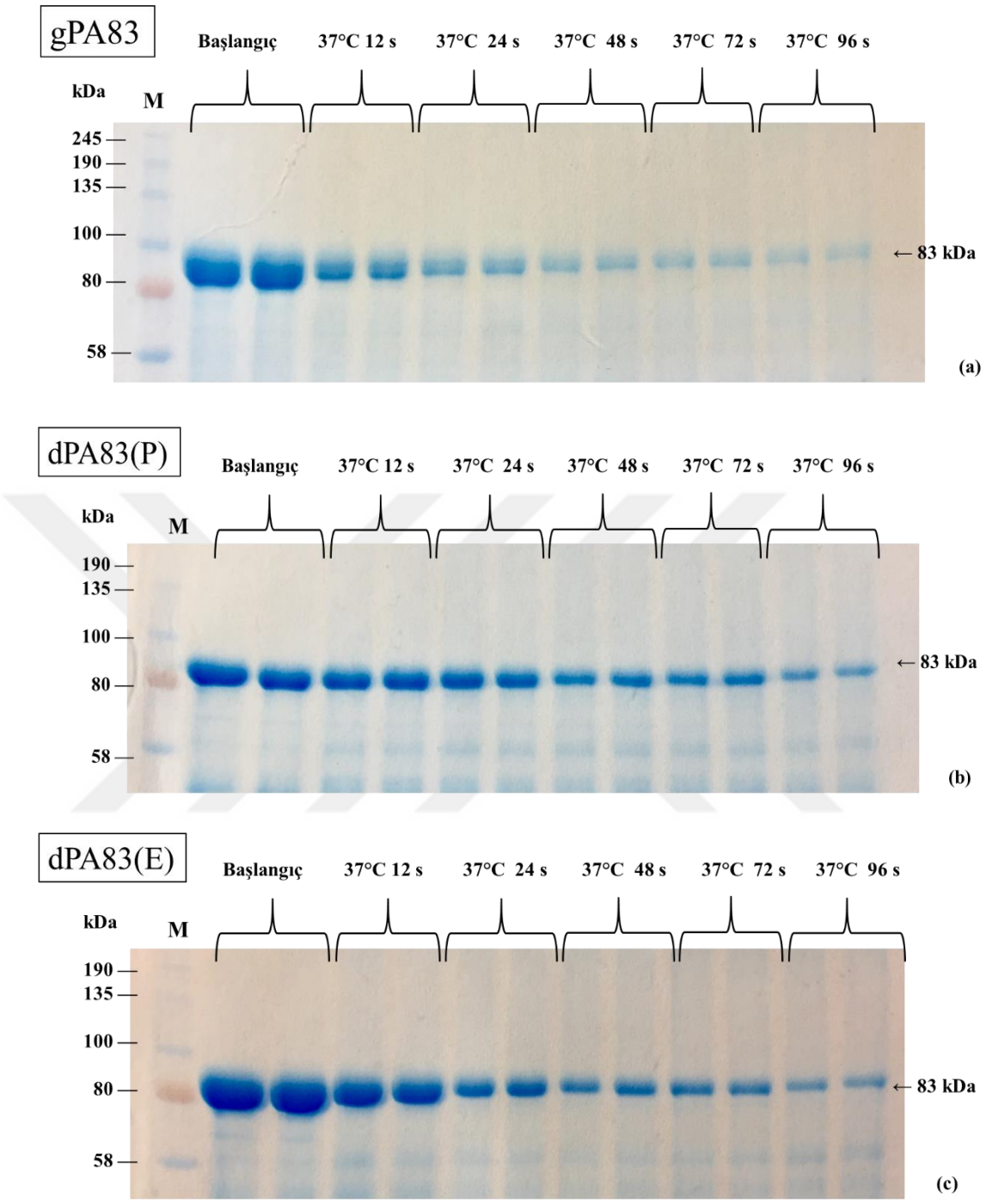


Şekil 4.5. Rekombinant PA83 varyantlarının stabilite periyodlarının ardından yüksek hızda santrifüj sonrası oluşan süpernatantlarına uygulanan Native PAGE analizi görüntüsü. **a)** gPA83: glikozile edilmiş PA83; **b)** dPA83(P): PNGase F ile deglikozile PA83; **c)** dPA83(E) Endo H ile deglikozile edilmiş PA83

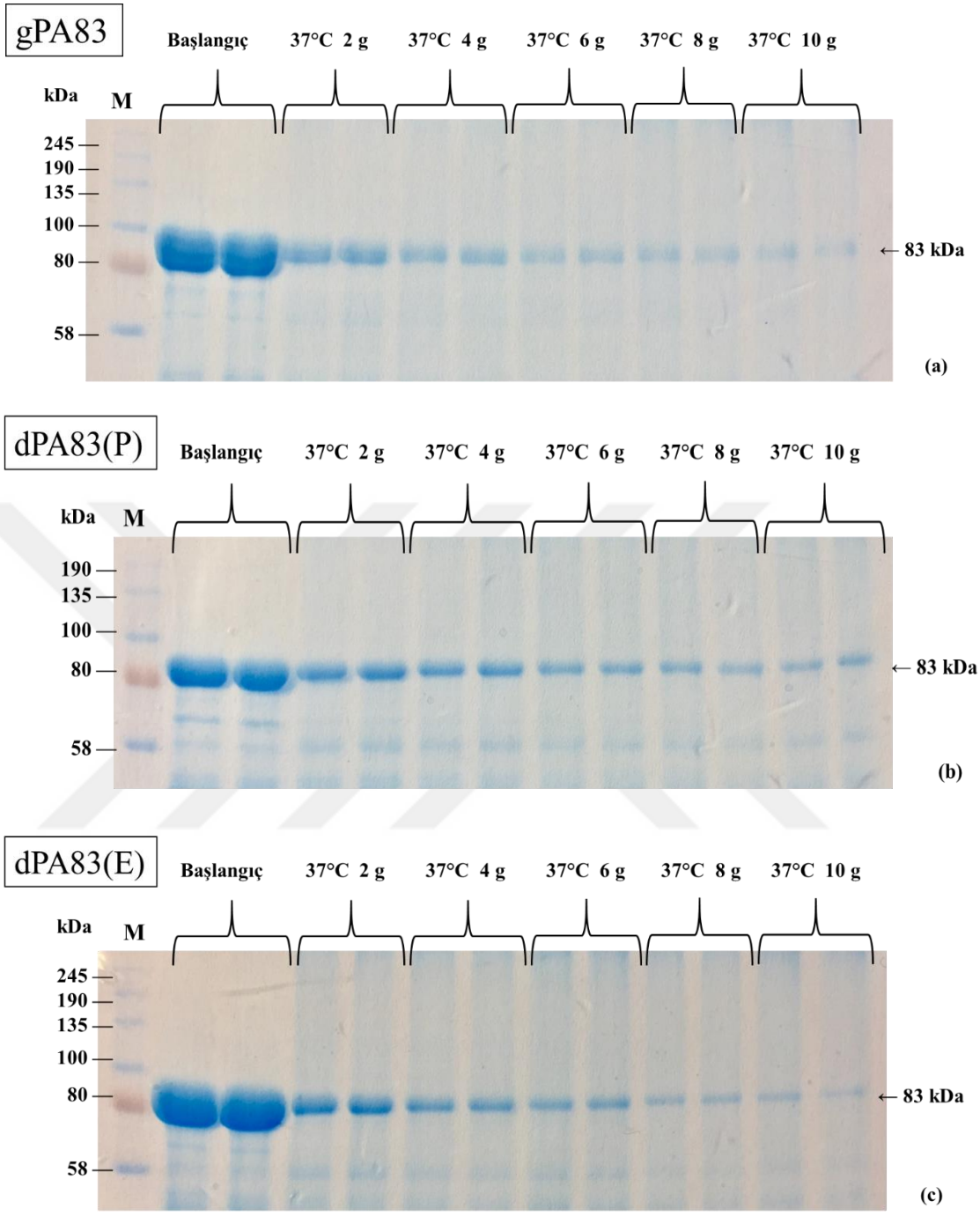
4.4.3. Stabilite Analizlerinin SDS PAGE Bulguları



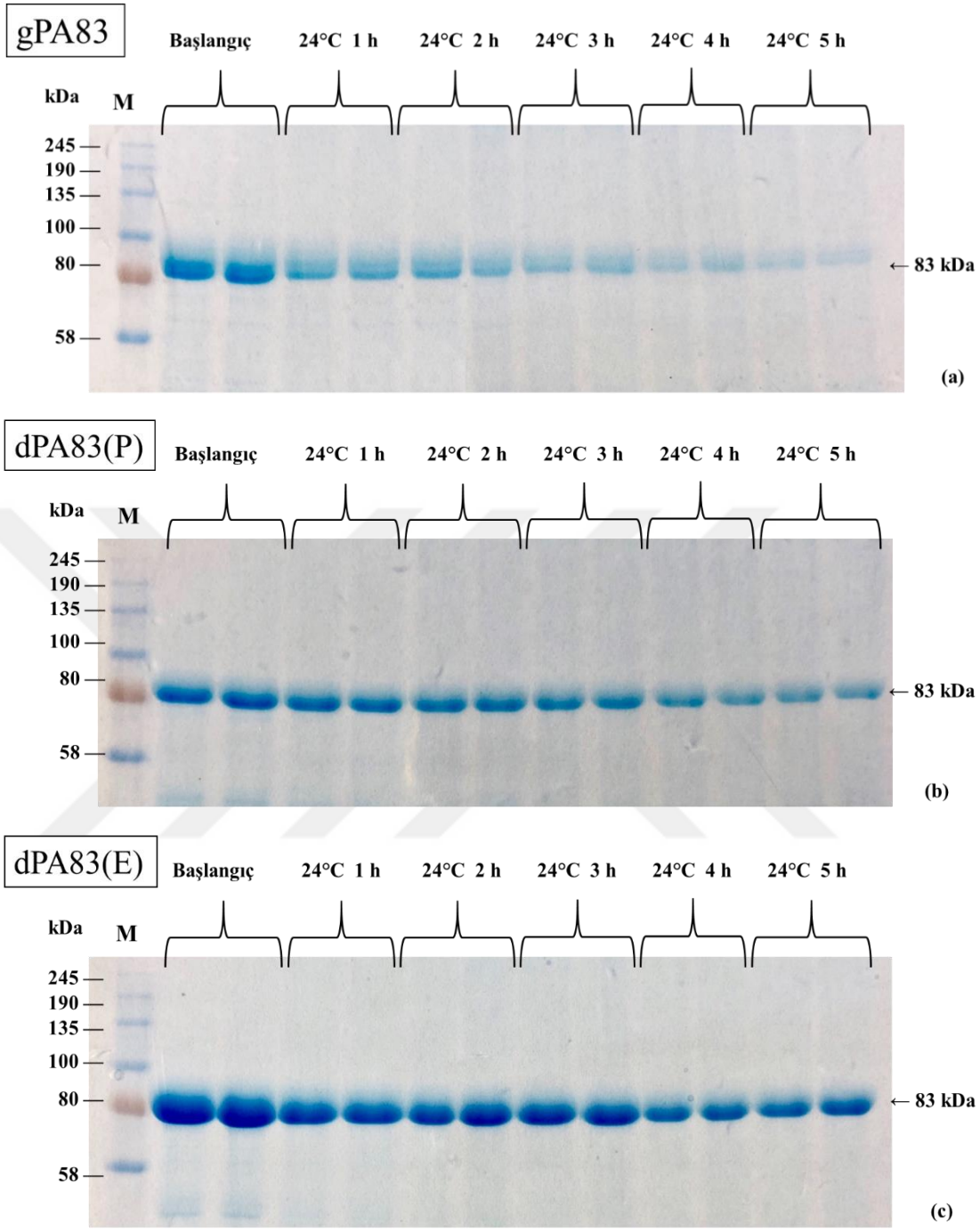
Şekil 4.6. Rekombinant PA83 varyantlarının belirli sıcaklıklarda 15 dk'lık inkübasyonu sonrası SDS Page analizi görüntüsü. **a)** gPA83: glikozile edilmiş PA83; **b)** dPA83(P): PNGase F ile deglikozile PA83; **c)** dPA83(E) Endo H ile deglikozile edilmiş PA83; M: Color prestained protein standart (Cat. No. P7712 S New England Biolabs)



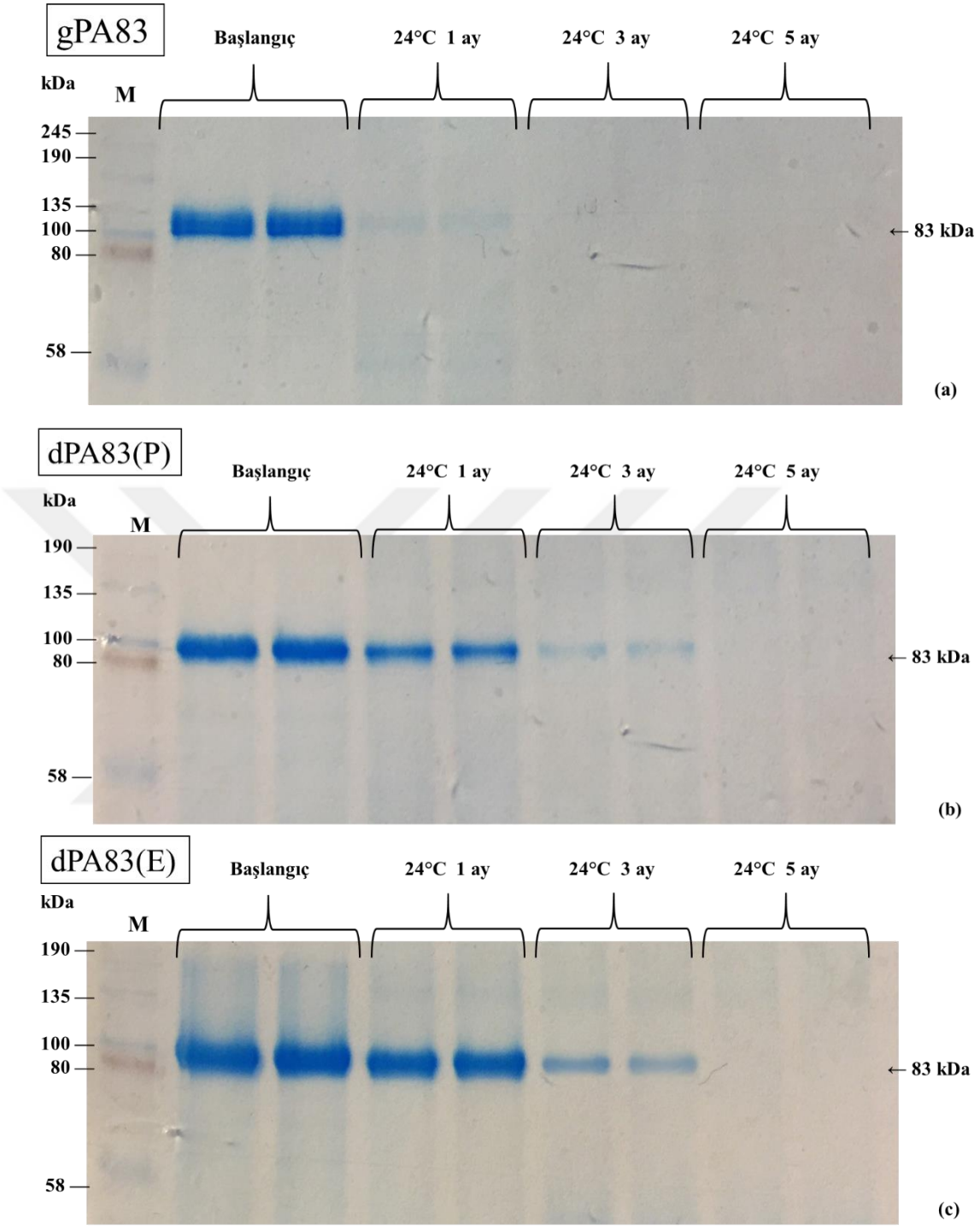
Şekil 4.7. Rekombinant PA83 varyantlarının 37 °C'de, 12, 24, 48, 72 ve 96 saatlik periyotlardaki inkübasyonu sonrasında SDS Page analizi görüntüsü. **a)** gPA83: glikozile edilmiş PA83; **b)** dPA83(P): PNGase F ile deglikozile PA83; **c)** dPA83(E) Endo H ile deglikozile edilmiş PA83; M: Color prestained protein standart (Cat. No. P7712 S New England Biolabs)



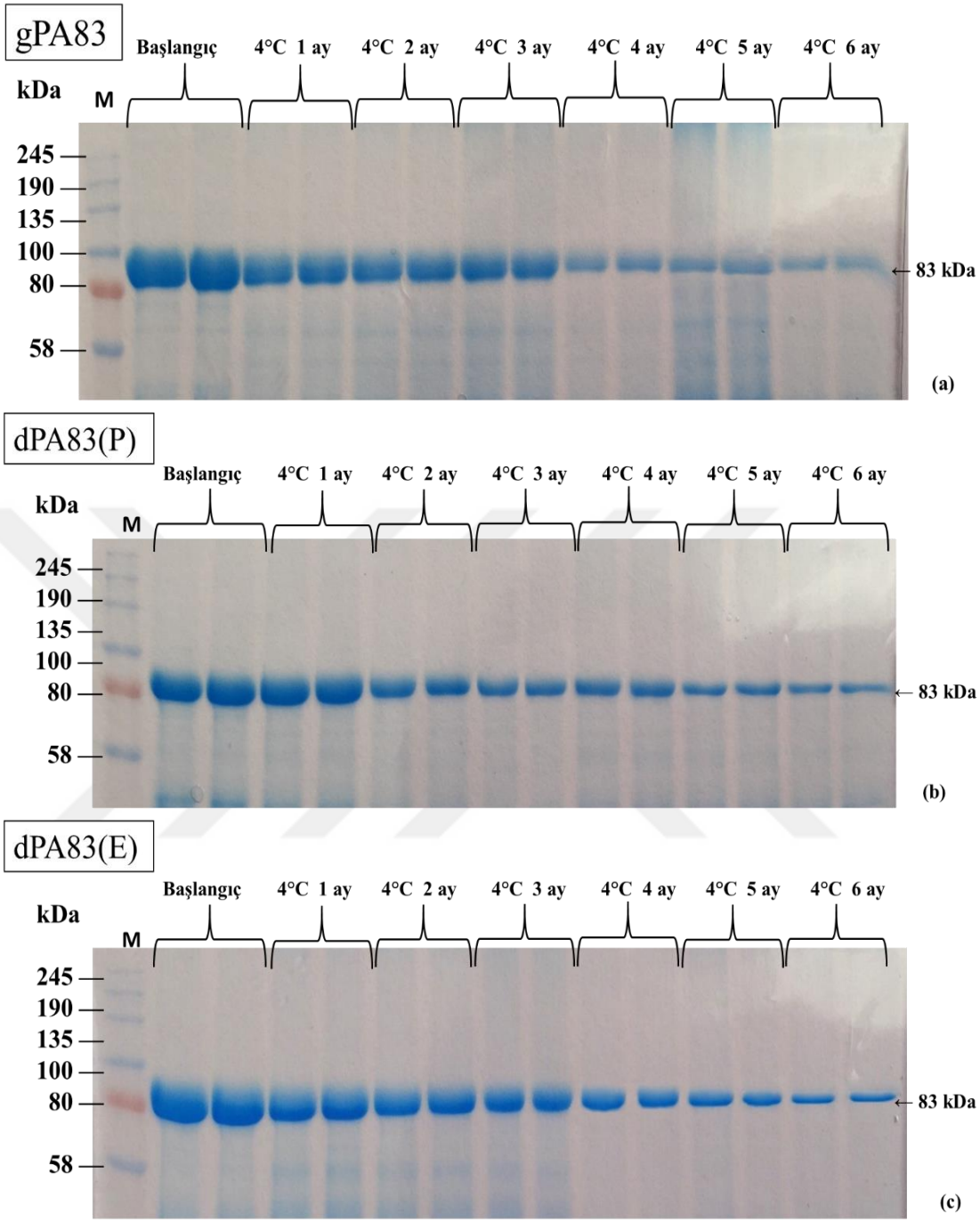
Şekil 4.8. Rekombinant PA83 varyantlarının 37 °C'de, 2, 4, 6, 8 ve 10 günlük periyotlardaki inkübasyonu sonrasında SDS Page analizi görüntüsü. **a)** gPA83: glikozile edilmiş PA83; **b)** dPA83(P): PNGase F ile deglikozile PA83; **c)** dPA83(E) Endo H ile deglikozile edilmiş PA83; M: Color prestained protein standart (Cat. No. P7712 S New England Biolabs)



Şekil 4.9. Rekombinant PA83 varyantlarının 24 °C'de, 1, 2, 3, 4 ve 5 haftalık periyotlardaki inkübasyonu sonrasında SDS Page analizi görüntüsü. **a)** gPA83: glikozile edilmiş PA83; **b)** dPA83(P): PNGase F ile deglikozile PA83; **c)** dPA83(E) Endo H ile deglikozile edilmiş PA83; M: Color prestained protein standart (Cat. No. P7712 S New England Biolabs)



Şekil 4.10. Rekombinant PA83 varyantlarının 24 °C'de, 1, 3 ve 5 aylık periyotlardaki inkübasyonu sonrasında SDS Page analizi görüntüsü. **a)** gPA83: glikozile edilmiş PA83; **b)** dPA83(P): PNGase F ile deglikozile PA83; **c)** dPA83(E) Endo H ile deglikozile edilmiş PA83; M: Color prestained protein standart (Cat. No. P7712 S New England Biolabs)



Şekil 4.11. Rekombinant PA83 varyantlarının 4 °C'de, 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 aylık periyotlardaki inkübasyonu sonrasında SDS Page analizi görüntüsü. **a)** gPA83: glikozile edilmiş PA83; **b)** dPA83(P): PNGase F ile deglikozile PA83; **c)** dPA83(E) Endo H ile deglikozile edilmiş PA83; M: Color prestained protein standart (Cat. No. P7712 S New England Biolabs)

5. SONUÇLAR

Günümüze kadar gelen Şarbon'a karşı hedeflenen aşı çalışmaların da, birçok aşının geliştirilme aşamasında olmasının yanı sıra yeterli ve etkili derecede yüksek immün koruma sağlayabilen bir aşı henüz bulunmamaktadır. Bu çalışmada geçici bitki ekspresyon sistemi kullanılarak, Şarbon'un nedensel organizması olan *Bacillus anthracis* bakterisinin koruyucu antijen proteininin doğru bir şekilde katlanmış ve aktif haliyle *Nicotiana benthamiana* bitkisinde üretimi hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda ilgili proteinin *N. benthamiana* bitkisinde eksprese edilmesi ve saflaştırılmasının ardında elde edilen aşı adayı proteinin aktifliği gösterilmiş ve kanıtlanmıştır.

Terapötik proteinlerin üretimi için günümüzde bakteri, maya, böcek ve memeli hücre kültürü gibi birçok ekspresyon sistemi kullanılmaktadır. Heterolog ekspresyondaki ilerlemeler, alt birim rekombinant aşı adayları dâhil olmak üzere proteinlerin üretimi için bitkilerin alternatif bir platform olarak kullanılmasına yönelik ilgiyi arttırmıştır. Bu sistemler; düşük maliyet, hızlı üretim, yüksek üretim kapasitesi, yüksek ölçeklenebilir ve memeli patojenlerini barındırmamaları sayesinde diğer ifade sistemlerine göre üstün yararlar sağlamıştır.

Protein bazlı alt birim aşı adaylarının geliştirilmesinde dikkat edilmesi gereken en önemli husus translasyon sonrası modifikasyonların uygun ve doğru bir şekilde meydana gelerek rekombinant proteinlerin üretilmesidir. Bitki hücreleri, memeli hücrelerinde bulunanlara büyük ölçüde benzeyen N-bağlı glikozilasyon da dâhil olmak üzere hedef proteinlerin ökaryotik post translasyonel modifikasyonlarını gerçekleştirirler. rPA, altı potansiyel N-bağlı glikozilasyon bölgesi içermesine rağmen, kendi ana konakçısında glikozile edilmez. Bununla birlikte, ökaryotik sistemlere sahip olan *Nicotiana benthamiana* bitkilerinde eksprese edildiğinde, rPA glikozile edilir. Bunun bitki konağında edinilen N-bağlı glikozilasyonun bir sonucu olabileceği ve bu şekerlerin varlığının, güvenli ve etkili bir aşının stabilitesi ve potansiyeli üzerinde olumsuz bir etkisi olduğu düşünülmüştür.

Bu çalışmada hedef proteininin istenmeyen glikozilasyon sorunu, bakteriyel PNGase F ve Endo H deglikozilasyon enzimleri ile bitkide geçici olarak koekspresyonu yapılarak *In vivo* olarak *N. benthamiana* bitkilerinde deglikozile proteinlerin üretilmesi için bir hedef yöntem kullanılmıştır. PA83 proteininin bitkide deglikozile ve doğru şekilde katlanmış olarak üretimi başarıya ulaşmıştır.

Sonuçlarımız *N. benthamiana* bitkilerinin, hedef proteinlerin Endo H ile birlikte ekspresyonu ile en yüksek seviyeye ulaştığında görünür bir semptom gelişimi olmadan 5 günün sonunda sağlıklı kaldığını ve Endo H ile deglikozile edilmiş PA83 molekülünün PNGase F deglikozile edilmiş muadilinden daha iyi stabilite gösterdiğini kanıtlamıştır. Rekombinant PA83 proteinlerinin yarı ömrünün oldukça uzun olduğu; aşılama durumunda vücut içerisinde, saklama koşullarında soğuk zincir şartlarında ve oda ısısında stabilitesini koruduğu sonucuna varılmıştır.

Bu ve önceki laboratuvar çalışmalarımız toplu olarak hedef proteinlerin *In vivo* enzimatik deglikozilasyonunun bitkilerde glikozile edilmemiş proteinlerin üretimi için güçlü bir strateji olma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Özellikle, *In vivo* glikozilasyon ile üretilen proteinlerin aktivitesi, immünojenisitesi, vb. özellikleri *in vitro* deglikozile edilmiş muadillerinden farklıdır.

Özetle veriler birlikte ele alındığında, proteinin Endo H ile koekspresyonu stratejisinin, şarbona karşı aşı, terapötik proteinler, antikorlar ve rekombinant enzimler de dahil olmak üzere önemli aşı antijenleri üretmek için önemli bir olanak sağladığını desteklemektedir. Bu çalışma aynı zamanda endüstriyel enzimlerin, bakteri kaynaklı enzimlerin, biyoenerjiyi arttırmak için ökaryotik ekspresyon sisteminde ve biyoyakıt veriminin yanı sıra, özellikle doğal katkı maddeleri üreterek gıda kalitesini arttırmak için de önemli olabileceğini göstermiştir.

6. KAYNAKLAR

Atlas, R.M. 2002. BIOTERRORISM: From Threat to Reality. *The Annual Review of Microbiology*, 56:167–185.

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

Brachman, P.S., Plotkin, S.A., Bumford, F.H., Atchison, M.M. 1960. An epidemic of inhalation anthrax: the first in the twentieth century. II. Epidemiology. *The American Journal of Gastroenterology*, Vol. 72: 6-23.

Chichester, J.A., Manceva, S.D., Rhee, A., Coffin, M.V., Musiychuk, K., Mett, V., et al. 2013. A plant-produced protective antigen vaccine confers protection in rabbits against a lethal aerosolized challenge with *Bacillus anthracis* Ames spores. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 9:3, 544–552.

Collier, R.J and Young, J.A.T. 2003. Anthrax Toxin. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, Vol. 19:45-70.

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

Dowsett, A. Science Photo Library. Health Protection Agency. https://www.sciencephoto.com/ [Son erişim tarihi: 10.05.2020].

Duesbery, N.S. and Vande, Woude G.F. 1999. Anthrax toxins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55:1599-609.

Ergül, A. 2019. Bitkilerde Fonksiyonel Genombilim. https://slideplayer.biz.tr/slide/14491149/ [Son erişim tarihi: 31.05.2020].

Freeze, H.H. and Kranz, C. 2010. Endoglycosidase and glycoamidase release of N-linked glycans. *Current Protocols in Immunology*, 8.15.1-8.15.26.

Friedlander, A.M., Pittman, P.R., Parker, G.W. 1999. Anthrax vaccine: evidence for safety and efficacy against inhalational anthrax. *JAMA*, December 8, Vol 282: 2104–2106.

Goldenberg, A., Shmueli, G., Caruana, R.A., Fienberg, S.E. 2002. Early statistical detection of anthrax outbreaks by tracking over-the-counter medication sales. *Proceedings of the National Academy of Science*, 99: 5237-40.

Gomord, V., Fitchette, A.C., Menu-Bouaouiche, L., Saint-Jore-Dupas, C., Plasson, C., Michaud, D., Faye, L. 2009. Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production. *Plant Biotechnology Journal*, 8:564-87.

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

Hagglund, P., Bunkenborg, J., Elortza, F., Jensen, O.N., Roepstorff, P. 2004. A new strategy for identification of N-glycosylated proteins and unambiguous assignment of their glycosylation sites using HILIC enrichment and partial deglycosylation. *Journal of Proteome Research*, 3:556–66.

Harris, R. Science Photo Library. https://www.sciencephoto.com/ [Son erişim tarihi: 10.05.2020].

Ivins, B.E., Pitt, M.L.M., Fellows, P.F., Farchaus, J.W., Benner, G.E., Waag, D.M., vd. 1998. Comparative efficacy of experimental anthrax vaccine candidates against inhalation anthrax in rhesus macaques. *Vaccine*, Vol. 16, No. 11/12, pp. 1141-1148.

Jones, R.M., Burke, M., Dubose, D., Chichester, J.A., Manceva, S., Horsey, A., Streatfield, S.J, Breit, J., Yusibov, V. 2017 Stability and pre-formulation development of a plant-produced anthrax vaccine candidate. *Elsevier Vaccine* Volume 35, Issue 41, pp 5463-5470.

Keitel, W.A. 2006. Recombinant protective antigen 102 (rPA102): profile of a second-generation anthrax vaccine. *Future Drugs*, Expert Rev. Vaccines 5(4): 417–430.

Leuzinger, K., Dent, M., Hurtado1, J., Stahnke, J., Lai1, H. , Zhou, X., Chen, Q. 2013. Efficient Agroinfiltration of Plants for High-level Transient Expression of Recombinant Proteins. *Journal of Visualized Experiments*, (77), e50521, doi:10.3791/50521

Little, S.F., Ivins, B.E., Webster, W.M., Fellows, P.F., Pitt, M.L.M., Norris, S.L.W., Andrews, G.P. 2006. Duration of protection of rabbits after vaccination with *Bacillus anthracis* recombinant protective antigen vaccine. *Vaccine*, 24: 2530–2536.

Ma, J.K-C., Drake, P.M.W., Christou, P. 2003. The Production of Recombinant Pharmaceutical Proteins in Plants. *Nature*, october, volume 4 pp. 794-805.

Mamedov, T., Ghosh, A., Jones, R.M., Mett, V., Farrance, C.E., et al. 2012. Production of non-glycosylated recombinant proteins in *Nicotiana benthamiana* plants by co-expressing bacterial PNGase F. *Plant Biotechnology Journal*, pp. 773–782.

Mamedov, T., and Yusibov V. 2013. *In vivo* deglycosylation of recombinant proteins in plants by co-expression with bacterial PNGase F. *Bioengineered*, 4(5), 338–342.

Mamedov, T, Chichester, JA, Jones, RM, Ghosh, A, Coffin, MV, Herschbach, K, et al. 2016. Production of functionally active and immunogenic non-glycosylated protective antigen from *Bacillus anthracis* in *Nicotiana benthamiana* by co-expression with peptide-N-glycosidase F (PNGase F) of Flavobacterium meningosepticum. *PLoS One*, 21; 11(4): e0153956.

Mamedov, T., Cicek, K., Gulec, B., Ungor, R., Hasanova, G. 2017. *In vivo* production of non-glycosylated recombinant proteins in *Nicotiana benthamiana* plants by co-expression with Endo-β-N acetylglucosaminidase H (Endo H) of Streptomyces plicatus. *PLoS One*, 12, e0183589.

Milne, J.C., Furlong, D., Hanna, P.C., Joseph, S.W., and Collier, R.J. 1994. Anthrax Protective Antigen Forms Oligomers during Intoxication of Mammalian Cell. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 269, No. 32, Issue of August 12, pp. 20607-20612.

Mock, M. and Fouet, A. 2001. ANTHRAX. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 55:647–71.

Molloy, S.S., Bresnahan, P.A., Leppla, S.H., Klimpel, K.R., Thomas, G. 1992. Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen. *The Journal of Bıologıcal Chemıst*, Vol. 267, No. 23, pp, 16396-16402,1992.

Rai, M. and Padh, H. 2001. Expression systems for production of heterologous proteins. *Current Science*, Vol. 80 No. 9 pp: 1121-1128.

Rayon, C., Lerouge, P., Faye, L. 1998. The protein N-glycosylation in plants. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 49, No. 326, pp. 1463–1472.

Reissner, K.J. and Aswad, D.W. 2003. Deamidation and isoaspartate formation in proteins: unwanted alterations or surreptitious signals? *Cellular and Molecular Life Sciences*, pp. 1281–1295.

Rogan, D. and Babiuk, L.A. 2005. Novel vaccines from biotechnology. *Revue scientifique et technique*, 24 (1), 159-174.

Schneemann, A. and Manchester, M. 2009. Anti-toxin antibodies in prophylaxis and treatment of inhalation anthrax. Future Microbiology, Vol. 4: 35–43.

Sijmons, P.C., Dekker, B.M., Schrammeijer, B., Verwoerd, T.C., van den Elzen, P.J., Hoekema, A. 1990. Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. *Nature Biotechnology*, 8: 217-221.

Singh, Y., Klimpel, K.R., Goel, S., Swain, P.K., Leppla, S.H. 1999. Oligomerization of Anthrax Toxin Protective Antigen and Binding of Lethal Factor during Endocytic Uptake into Mammalian Cells. *Infectıon and Immunıty,* Apr; 67(4):1853-1859.

Smith R. H. 2012. Plant tissue culture Techniques and experiments. Third edition. Harcourt B. J., Publishers. *Academic press*, inc, San Diego.

Strasser, R. 2016. Plant protein glycosylation. *Glycobiology*, vol. 26, no. 9, 926–939.

Tarentino, A.L. and Maley, F. 1974. Purification and properties of an endo-beta-N-acetylglucosaminidase from Streptomyces griseus. *Journal of Proteome Research*, 249(3):811–817.

Turnbull, P.C.B. 2002. Introduction: Anthrax History, Disease and Ecology. In: Koehler T. M. (Ed.) Anthrax © Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp.1-19.

Verma, R., Boletia E., Georgea A.J.T. 1998. Antibody engineering: Comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. *Journal of Immunological Methods* 216, 165-181.

Wang, J.Y. and Roehrl, M.H. 2005. Anthrax vaccine design: strategies to achieve comprehensive protection against spore, bacillus, and toxin. *Medical Immunology*, 4:4 doi:10.1186/1476-9433-4-4.

Williamson, E.D., Hodgson, I., Walker, N.J., Topping, A.W., Duchars M.G., Mott J.M., vd. 2005. Immunogenicity of recombinant protective antigen and efficacy against aerosol challenge with anthrax. *Infectıon and Immunıty*, Vol.73 No.9 p. 5978–5987.

Yusibov, V.M. and Mamedov, T.G. 2010. Plants as an Alternative System for Expression of Vaccine Antigens. *Proceedings of ANAS (Biological Sciences*), 65(5-6): 195-200.

ÖZGEÇMİŞ

Deniz SAY

denizsy13@gmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2018-2020	Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Antalya
Lisans 2013-2017	Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Nevşehir
Lise 2010-2013 2009-2010	 Adana Seyhan Rotary Anadolu Lisesi Antalya Levent Aydın Anadolu Lisesi

PROJELER

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