

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



*N. benthamiana*'da *P. falciparum* PFS48/45 R0.10C VARYANTLARININ  
TASARLANMASI, ÜRETİMİ ve KARAKTERİZASYONU

Kader ÇİÇEK

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

MAYIS 2018

ANTALYA

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



*N. benthamiana*'da *P. falciparum* PFS48/45 R0.10C VARYANTLARININ  
TASARLANMASI, ÜRETİMİ ve KARAKTERİZASYONU

Kader ÇİÇEK

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

MAYIS 2018

ANTALYA

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

***N. benthamiana*'da *P. falciparum* PFS48/45 R0.10C VARYANTLARININ  
TASARLANMASI, ÜRETİMİ ve KARAKTERİZASYONU**

**Kader ÇİÇEK  
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Bu tez Tübitak tarafından 114Z258 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**MAYIS 2018**

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

*N. benthamiana*'da *P. falciparum* PFS48/45 R0.10C VARYANTLARININ  
TASARLANMASI, ÜRETİMİ ve KARAKTERİZASYONU

Kader ÇİÇEK  
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 02/07/2018... tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV (Danışman)

Prof. Dr. Yaşar KARAKURT

Dr. Öğr. Üyesi Ersin AKINCI

## ÖZET

### *N. benthamiana*'da *P. falciparum* PFS48/45 R0.10C VARYANTLARININ TASARLANMASI, ÜRETİMİ ve KARAKTERİZASYONU

Kader ÇİÇEK

Yüksek Lisans Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV

Mayıs 2018; 52 sayfa

Günümüzde sıtmaya karşı birçok aşı geliştirilme aşamasında olmasına rağmen yeterli derecede koruma sağlayan etkili bir aşı henüz bulunmamaktadır. Doğal Pfs48/45 proteini N-bağlı glikan taşımamaktadır, fakat bitki ekspresyon sistemleri de dahil olmak üzere herhangi bir ökaryotik sistemde anlatımı yapıldığında anormal şekilde glikosilasyona uğrayan yedi potansiyel N-bağlı glikosilasyon bölgesi içermektedir. Anormal glikosilasyon problemini çözmek için geçici gen anlatımı yöntemi aracılığıyla *N. benthamiana* da ilgili hedef gen ile bakteriyel deglikosilasyon enzimleri olan PNGase F (Mamedov vd. 2012; Mamedov vd. 2013; Mamedov vd. 2016) veya Endo H enzimlerinin (Mamedov vd. 2017) birlikte ekspresyonu stratejisi geliştirildi. Bu çalışmada, geçici gen anlatımı yöntemi ile *N. benthamiana* bitkisinde Pfs48/45 proteininin 10C domaininin farklı versiyonları (glikosillenmiş ve deglikosillenmiş) başarılı bir şekilde üretildi. Üretilen 10C varyantları saflaştırıldı ve karakterize edildi. Pfs48/45-10C varyantlarının MRA-26 antikoru (iletim bloklama antikoru olarak bilinen bir konformasyonel spesifik antikor) kullanılarak gerçekleştirilen western blot analizleri, indirgenmemiş anormal şekilde glikosilasyona uğramış Pfs48/45-10C proteininin MR-26 antikoru tarafından çok az ya da hiç tanınmadığını; bitkide PNGase F veya Endo H *in vivo* olarak üretilen indirgenmemiş deglikosile Pfs48/45-10C proteininin antikoru tarafından güçlü bir şekilde tanındığını göstermiştir. Bu sonuçlar bitkide Endo H veya PNGase F aracılığıyla *in vivo* deglikosilasyona uğramış Pfs48/45-10C proteinlerinin doğru katlandığını ve Pfs48/45-10C proteinlerinin doğal Pfs48/45 proteini üzerinde bulunan epitoplara içerdiğini desteklemektedir. Elde edilen sonuçlar, bitkide üretilmiş Endo H *in vivo* deglikosillenmiş Pfs48/45 ve Pfs48/45-10C antijenlerinin Pfs48/45 tabanlı iletim bloklama sıtma aşısının geliştirilmesi için potansiyele sahip olduğunu desteklemektedir.

**ANAHTAR KELİMELELER:** Geçici gen anlatımı, Deglikosilasyon, Pfs48/45, Sıtma, Sıtma aşı adayı

**JÜRİ:** Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV

Prof. Dr. Yaşar KARAKURT

Dr. Öğr. Üyesi Ersin AKINCI

## ABSTRACT

### DESIGN, PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF PFS48 / 45 R0.10C VARIANTS *P. falciparum*'s in *N. benthamiana*

Kader CICEK

MSc Thesis in Agricultural Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV

May 2018, 52 pages

Although many efforts have been made toward developing malaria vaccines, however, no vaccine is currently available that provides a satisfactory level of protection against malaria. The native Pfs48/45 protein does not carry N-linked glycans but contains seven potential N-linked glycosylation sites which can be aberrantly glycosylated during expression in any eukaryotic system including plant expression systems. To solve the aberrant glycosylation problem, a strategy was developed by co-expression of the bacterial deglycosylation enzymes, PNGase F (Mamedov et al. 2012; Mamedov et al. 2013; Mamedov et al. 2016) or Endo H enzymes (Mamedov et al. 2017) with target proteins of interest in *N. benthamiana* plant by transient expression technology. In this study, we successfully produced different versions (glycosylated and deglycosylated) of the 10C domain of the Pfs48/45 protein in *Nicotiana benthamiana* plant by transient expression. Plant produced 10C-variants were purified and characterized. It should be noted that 10C domain of the Pfs48/45 protein is one of the most important candidates for the development of the transmission blocking vaccine (TB). Western blot analysis of Pfs48/45-10C variants using MRA-26 antibody (a conformational specific MRA-26 antibody, known as TB antibody), showed that MRA-26 antibody did not recognize or weakly recognize the aberrantly glycosylated Pfs48/45-10C in non-reduced samples, but strongly recognized plant produced Endo H and PNGase F *in vivo* deglycosylated Pfs48/45-10C proteins in non-reduced samples. These results suggest correct folding of plant produced, *in vivo* Endo H or PNGase F deglycosylated Pfs48/45-10C proteins, and also suggest that Pfs48/45-10C proteins contain epitopes present on native Pfs48/45. Taken together, our results collectively support that plant produced Endo H *in vivo* deglycosylated Pfs48/45 and Pfs48/45-10C antigens have a potential for the development of a Pfs48/45-based TB malaria vaccine.

**KEYWORDS:** Deglycosylation, Malaria, Malaria vaccine candidate, Pfs48/45, Transient gene expression.

**COMMITTEE:** Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV

Prof. Dr. Yaşar KARAKURT

Dr. Öğr. Üyesi Ersin AKINCI

## ÖNSÖZ

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan her zaman destek olan ve tezimin hazırlanması sırasında beni cesaretlendiren danışman hocam Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu projemde, hibridoma hücre kültürü deneylerimde çok büyük yardımı olan Dr. Öğr. Üyesi Ersin AKINCI'ya teşekkür ederim. Ayrıca bilgileriyle eğitim hayatımda büyük katkıları olan Akdeniz Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü'nün tüm öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Deneyisel çalışmalarım boyunca teknik olarak yardımlarını esirgemeyen bunun yanında her konuda manevi destek sağlayan laboratuvarımızın çok değerli öğrencileri Burcu GÜLEÇ, Hemra KHOZEİNİ, İlahı MUSAYEVA, Rabia AKÇORA ve Rıfat ÜNGÖR'e ve Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü'nün diğer çok değerli öğrencilerine teşekkür ederim.

Her konuda manevi destek sağlayan ve tezimin hazırlanması sırasında beni cesaretlendiren değerli arkadaşlarım Ayşegül CANDAN, Baran KAPAN, Nazife TOLAY ve Yasemin KUŞ'a teşekkür ederim.

Son olarak beni bugünlere getiren, desteklerini ve sevgilerini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
ÖN SÖZ .....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
AKADEMİK BEYAN .....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xi
1. GİRİŞ .....	1
2. KAYNAK TARAMASI .....	3
2.1. Sıtma Hastalığı .....	3
2.2. Sıtma Vektörü ve Yaşam Döngüsü .....	4
2.3. Sınıflandırma .....	5
2.3.1. <i>Plasmodium ovale</i> .....	6
2.3.2. <i>Plasmodium malariae</i> .....	6
2.3.3. <i>Plasmodium knowlesi</i> .....	6
2.3.4. <i>Plasmodium vivax</i> .....	6
2.3.5. <i>Plasmodium falciparum</i> .....	6
2.4. Sıtma Kontrol ve Eliminasyon Çalışmaları.....	7
2.4.1. Vektör Kontrol Çalışmaları .....	7
2.4.2. Kimyasal Korunma ve Engelleme .....	8
2.4.3. Aşılama .....	8
2.4.3.1. Pre-eritrositik aşılar .....	10
2.4.3.2. Eritrositik aşılar .....	11
2.4.3.3. İletim bloklama aşıları.....	11
2.4.3.3.1. Pfs48/45-10C.....	12
2.5. Deglikosilasyon Stratejisi .....	13
2.6. Bitkide Geçici Gen Anlatımı .....	15
3. MATERYAL VE METOD .....	18



3.1. Organizma ve Plazmidler .....	18
3.2. Besiyerleri .....	18
3.3. Çözeltiler ve Tamponlar .....	19
3.4. Primer Tasarımı .....	26
3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu .....	26
3.6. PZR Ürününün Saflaştırılması .....	28
3.7. PZR Ürünü ve Plazmitin Kesimi.....	28
3.8. PZR Ürünü ve Plazmitin Agaroz Jelden Geri Kazanımı ve Saflaştırılması.....	29
3.9. Ligasyon Reaksiyonu .....	29
3.10. <i>E. coli</i> XLIBLue Kompetan Hücre Hazırlanması.....	30
3.11. <i>E. coli</i> Hücrelerine Transformasyon ve Plazmid İzolasyonu.....	30
3.12. <i>A. tumefaciens</i> AGLI psoup Kompetan Hücre Hazırlanması.....	31
3.13. <i>A. tumefaciens</i> Hücrelerine Transformasyon ve <i>N. Benthamiana</i> Bitkisine İnfiltrasyon .....	31
3.14. Bitkiden Protein Ekstraksiyonu .....	32
3.15. SDS-PAGE ve Western Blot Analizi .....	32
3.16. 6XHis Etiketli Pfs48/45-10C proteininin glikosillenmiş ve glikosillenmemiş formlarının pürifikasyonu.....	33
3.17. Flag Etiketli Pfs48/45-10C proteininin glikosillenmiş ve glikosillenmemiş formlarının pürifikasyonu.....	33
3.18. Saflaştırılmış Proteinlerinin Glikan Saptama Analizleri .....	34
3.19. Pfs48/45 e Karşı Oluşturulmuş Fare Monoklonal Antikorları ile Pfs48/45-10C Varyantlarının Western Blot Analizi.....	34
3.20. Saflaştırılmış Pfs48/45-10C varyantlarının Stabilizasyon Testi.....	34
4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	35
4.1. 10C-W Geninin Klonlanması.....	35
4.2. Rekombinant Pfs48/45-10C Varyantlarının Üretilmesi .....	37
4.3. Rekombinant Pfs48/45-10C Varyantlarının Saflaştırılması.....	39
4.4. Saflaştırılmış Pfs48/45-10C Varyantlarının Glikan Saptama Analizi.....	41
4.5. Pfs48/45'e Karşı Oluşturulmuş Fare Monoklonal Antikorları ile Pfs48/45-10C Varyantlarının Western Blot Analizi.....	41

4.6. Saflaştırılmış Pfs48/45-10C ve Varyantlarının Stabilizasyon Testi.....	42
5. SONUÇ .....	44
6. KAYNAKLAR .....	46
ÖZGEÇMİş	

## AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*N. benthamiana*’da *P. falciparum* Pfs48/45 R0.10C Varyantlarının Tasarlanması, Üretimi ve Karakterizasyonu” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

...../...../.....

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

g	: gram
°C	: derece santigrat
L	: Litre
µl	: mikrolitre
ml	: mililitre
mM	: milimolar
M	: molar

### Kısaltmalar

CSP	: Circumsporozoite Protein
dk	: dakika
Endo H	: Endoglikosidaz H
ER	: Endoplazmik Retikulum
GlcNAc	: N-Asetil-D-glukozamin
kb	: kilobaz
kDa	: kilodalton
O.D.	: Optik Dansite
PNGase F	: Peptide: N-glycosidase F
PTGS	: Transkripsiyon sonrası gen susturulması

PZR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu  
s : saat  
SDS-PAGE : Sodyum Dodesil Sülfat-Poli Akrilamid Jel Elektroforezi  
sn : saniye  
TAE : Tris-Asetat-EDTA  
TB : Transmission Blocking  
V : Volt

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Plasmodium falciparum</i> 'un yaşam döngüsü.....	4
Şekil 2.2. Pfs48/45 proteininin bulaşmayı bloke edici epitoplarının gösterimi.....	12
Şekil 2.3. Bir N-bağlı ve O-bağlı glikoprotein .....	13
Şekil 2.4. N-bağlı glikanların çekirdeğinde bulunan PNGase F ve Endo H duyarlı bağlar	15
Şekil 2.5. Bitkide geçici gen anlatımının gösterimi.....	17
Şekil 4.1. <i>10C-W-His</i> ve <i>10C-W-Flag</i> genlerinin PZR aracılığıyla çoğaltılması.....	35
Şekil 4.2. Jelden geri kazanım ürünleri.....	36
Şekil 4.3. LpI-10C-W-His plazmitini içerdiği düşünülen olası kolonilerden pürifiye edilen ve doğrulama amaçlı kesimi yapılan plazmitler.....	36
Şekil 4.4. LpI-10C-W-Flag plazmitini içerdiği düşünülen olası kolonilerden pürifiye edilen ve doğrulama amaçlı kesimi yapılan plazmitler.....	37
Şekil 4.5. PNAGase F infiltrasyon oranlarının optimizasyonu .....	38
Şekil 4.6. Endo H infiltrasyon oranlarının optimizasyonu .....	38
Şekil 4.7. Optimize edilmiş oranlar kullanılarak yapılan biyokütle western blot analizi. ...	39
Şekil 4.8. Saflaştırılmış His6 etiketli Pfs48/45-10C varyantlarının SDS-PAGE analizi.....	40
Şekil 4.9. Saflaştırılmış flag etiketli 10C-W varyantlarının SDS-PAGE analizi.....	40
Şekil 4.10. Saflaştırılmış Pfs48/45-10C varyantlarının glikan saptama analizi .....	41
Şekil 4.11. Native-PAGE de kullanılan örneklerin SDS-PAGE ve western blot analizi ....	42
Şekil 4.12. Pfs48/45-10C varyantlarının stabilizasyon testi.....	43

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 2.1.</b> İnsanda parazitlenen <i>Plasmodium</i> türlerinin sınıflandırılması .....	5
<b>Çizelge 3.1.</b> PZR da kullanılan primerler .....	26
<b>Çizelge 3.2.</b> Histidin etiketi içeren genin PZR bileşen ve miktarları.....	26
<b>Çizelge 3.3.</b> Histidin etiketi içeren genin PZR döngüsü.....	27
<b>Çizelge 3.4.</b> Flag etiketi içeren genin PZR bileşen ve miktarları .....	27
<b>Çizelge 3.5.</b> Flag etiketi içeren genin PZR döngüsü.....	28
<b>Çizelge 3.6.</b> PZR ürünü kesimi bileşen ve miktarları. ....	28
<b>Çizelge 3.7.</b> Plazmid kesimi bileşen ve miktarları.....	29
<b>Çizelge 3.8.</b> Ligasyon reaksiyonu miktar ve bileşenleri .....	30

## 1.GİRİŞ

Sıtma günümüzde dahi dünya çapında 216 milyon vaka ve 445.000 sıtmadan kaynaklı ölüm ile küresel bir sağlık sorunu olarak görülmektedir. Sıtma Anofel cinsi sivrisinekler aracılığıyla insana taşınan en yaygın parazitik bir hastalıktır (Rossati vd. 2016). Sıtma vakalarının %85'i ve sıtma ölümlerinin %90'ı Afrika'nın sahra-altı bölgesinde özellikle de 5 yaş altı çocuklarda meydana gelir. Beş *Plasmodium* türü insandaki bütün sıtma enfeksiyonlarından sorumludur. Sıtma vakalarının çoğuna *Plasmodium falciparum* ve *Plasmodium vivax* neden olmakla birlikte *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* ve 2004'den beri Güneydoğu Asya'da maymun sıtma etkeni olarak bilinen *Plasmodium knowlesi* türleri de sıtmaya neden olabilmektedir. Ölümlerin neredeyse tamamı *Plasmodium falciparum* sıtması nedeniyle gerçekleşmektedir (White vd. 2013).

Önceki yıllarla karşılaştırıldığında sıtma vakalarının görülme sıklığı ve ölüm oranlarında bir azalma olduğu göze çarpmasına rağmen sıtma Afrika'nın sahra-altı bölgesinde özellikle de çocuklarda önemli bir ölüm nedeni olmaya devam etmektedir. İnsektisitlere dirençli sivrisineklerin ortaya çıkması ve anti-malaryal ilaçlara karşı parazit direncindeki artış etkili bir aşı geliştirme ihtiyacını pekiştirmiştir (Chaturvedi 2016; Carter 2000). Her ne kadar sıtma etkeni organizmanın ve onun yaşam döngüsünün karmaşıklığı aşı geliştirilme çalışmaları önünde bir engel olsa da günümüzde bu engeller aşılarak organizmanın farklı yaşam evrelerini hedefleyen aşilar geliştirilmektedir. Morbidite ve mortaliteyi düşüren ve ideal olarak iletimi azaltan aşı geliştirilmesi sıtma kontrol stratejisinin vazgeçilmez bir parçası olarak görülmektedir (Wipasa ve Riley 2007).

Plasmodiumların çeşitli evrelerine karşı aşı geliştirilmesinin yanı sıra, başka bir yaklaşım da parazitin seksüel evresi sırasında immüniteyi indüklemektir. Bu amaçla parazitin seksüel üremesini bloke eden aşilar geliştirilmekte ve bu aşilara iletimi bloke edici (transmission-blocking) aşilar denilmektedir. Bu tip bir aşı, aşılanmış bireylerde hastalığı veya enfeksiyonu önlemez, ancak aşılanmış bireylerden kan emen sivrisinekler aracılığıyla hastalığın daha fazla yayılmasını önler (Dubovsky ve Malkin 2008).

Pfs48/45, yapıya bağlı epitoplara sergileyen ve sıtmanın bulaşmayı bloke edici (transmission-blocking) immünitesi için önemli bir hedef olan *Plasmodium* ssp. özgül protein ailesinin bir üyesidir (Outchkourov 2007). Pfs48/45 gametositler tarafından ifade edilen bulaşmayı bloke edici (transmission-blocking) hedef proteinlerindedir ve parazit makrogametlerinin hücre yüzeylerinde bulunur. Pfs48/45 parazitin döllelenmesinde anahtar rol oynar ve anti-Pfs48/45 monoklonal antikoları parazitin döllelenmesini engeller (Outchkourov 2008). Pfs48/45 çoklu disülfür bağları ile sistein bakımından zengin domainlerden oluşur. Bunlar bulaşmayı bloke edici aktivitesi olan birçok monoklonal antikor tarafından tanınan farklı yapısal B hücre epitoplara oluştururlar (Draper vd. 2015). C-terminal modülü anti-epitop I tarafından tanınan 6 sistein motifi içerir; orta modül anti-epitop IIb ve anti-epitop III tarafından tanınan 4 sistein motifi içerir; N-terminal modülü anti-epitop V tarafından tanınan 6 sistein motifi içerir (Outchkourov 2007).



Önceki çalışmalarda özellikle epitop I' in güçlü bulaşmayı bloke edici aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Roefen vd. 2001). Ayrıca Pfs48/45'in doğal konformasyonunun yeniden oluşturulması ile ilgili zorlukların üstesinden gelmek için bulaşmayı bloke edici 3 epitopu içeren Pfs48/45-10C proteini potansiyel aşı adayı olarak anılmaktadır (Draper vd. 2015).

Protein altbirim aşularının geliştirilmesindeki en önemli nokta aşı adayı proteinin uygun B hücre epitoplarını içermesi ve T hücre reseptörleri tarafından tanınmasıdır (Calderón vd. 2013). Bu da rekombinant proteinin translasyon sonrası doğru katlanma modifikasyonlarını göstererek üretilmesiyle mümkündür. N-bağlı glikosilasyon bir translasyon sonrası modifikasyondur ve heterolog ekspresyon sistemlerinde üretilmiş terapötik proteinler ve aşı adayı proteinler olmak üzere birçok proteinin doğru bir şekilde katlanması, stabilitesi ve biyolojik etkinliği için önemli bir modifikasyondur (Gomord vd. 2000).

Pfs48/45 kompleks bir membran proteindir ve 7 adet olası N-bağlı glikosilasyon bölgesi içermesine rağmen *Plasmodium* parazitleri N-bağlı glikosilasyon mekanizmasına sahip değildir. *Plasmodium* proteinlerinin birçoğu diğer ökaryotik ekspresyon sistemleri içerisinde ifade edilmeleri durumunda glikosilasyona uğrayacak ve bu da proteinlerin doğru katlanmasını engelleyerek epitopların maskelenmesine neden olacaktır (Milek vd. 1998). Bu zorluğun üstesinden gelmek için *in vivo* deglikosilasyon stratejisi geliştirilmiştir. Bu strateji istenilen hedef protein ile deglikosilasyondan sorumlu olan enzimin aynı organizmada birlikte ekspresyonu temeline dayanmaktadır. Geliştirilen bu strateji ile bitkiler gibi glikosilasyon mekanizmasına sahip olan ökaryotik ekspresyon sistemlerinde istenilen proteinler glikosilasyona uğramadan üretilebileceklerdir (Mammedov vd. 2012; 2017).

## 2. KAYNAK TARAMASI

### 2.1. Sıtma Hastalığı

Dünya tarihinde salgın hastalıklar, tarım yapmaya başlayan toplulukların, toprağı sürmesi ve sığır, koyun sürülerini ehlileştirmesiyle daha önce bilinmeyen birçok yeni mikroplarla ortaya çıkmıştı. Sıtmanın yaygınlık kazanması, insanların doğaya egemen olma mücadelesi ile beraber gerçekleşti. Artan nüfusun ihtiyaçlarını karşılamak için daha fazla yiyecek elde etme isteğı, ormanları tarım arazisine dönüştürme girişimlerini artırdı ve bu durum özellikle Afrika'da uygun iklim koşullarının da etkisiyle sıtmanın kitleler üzerinde kısa sürede yayılmasına neden oldu. Tatlı patates ve diğer nişastalıları yetiştirmek amacıyla yağmur ormanlarını yok etmeye başlayan Afrikalı çiftçiler, kes ve yak teknikleri ile anofellerin hızla üreyeceği, içleri su dolu, güneşin ısıttığı çamurlu gölleri ortaya çıkmasına zemin hazırladılar. Modern tıbbın kurucusu Hipokrat sıtmayı günlük, güneşli ve 72 saatte bir gelen ateş nöbetleri ile tanımladı. Bataklik ve durgun, kirli suları içen insanların karınlarının dışarı fırlayacağını ve dalaklarının büyüyeceğini bildirdi. Grek İmparatoru Büyük İskender de sıtmaya yenik düştü ve sıtma parazitleri, Roma İmparatorluğunda da etkisini gösterdi (Andrew 2007).

Tarih öncesi çağlardan bu yana sıtma varlığını devam ettirmektedir. Afrika'da milyonlarca yıllık sivrisinek fosillerin bulunması sıtmanın buradan köken aldığını ve insan göçleriyle beraber dünyaya yayıldığını göstermektedir (Unat vd. 1995; Unat 1999) Sıtmanın bataklikten veya bataklik etrafındaki kötü havadan kaynaklandığı düşünülerek bu hastalığa İtalyanca kökenli "mal" (kötü) ve "aria" (hava) sözcüklerinin birleşiminden meydana gelen "malaria" ismi verilmiştir (Tuğluoğlu 2008; Ouattara ve Laurens 2015). Türkçede bu hastalık için kullanılan sıtma adının ise "ısıtmak"tan geldiğı düşünölmektedir (Akdur 2006). Fransız Doktor Charles Laveran, 1880 yılında Cezayir'de yaptığı çalışmalarla sıtma hastalığına mikroorganizmaların neden olduğunu keşfetti ve daha sonra bu keşfi sayesinde Nobel ödölünü kazandı. Bu mikroorganizmaların insana bir tür sivrisineğin ısırması ile geçtiğini İngiliz hekim Patrick Manson açığa çıkardı. İtalyan hekim Gioavanni ve arkadaşları, anofel cinsi sivrisineklerin sıtmayı ilettiklerini buldular (Tuğluoğlu 2008).

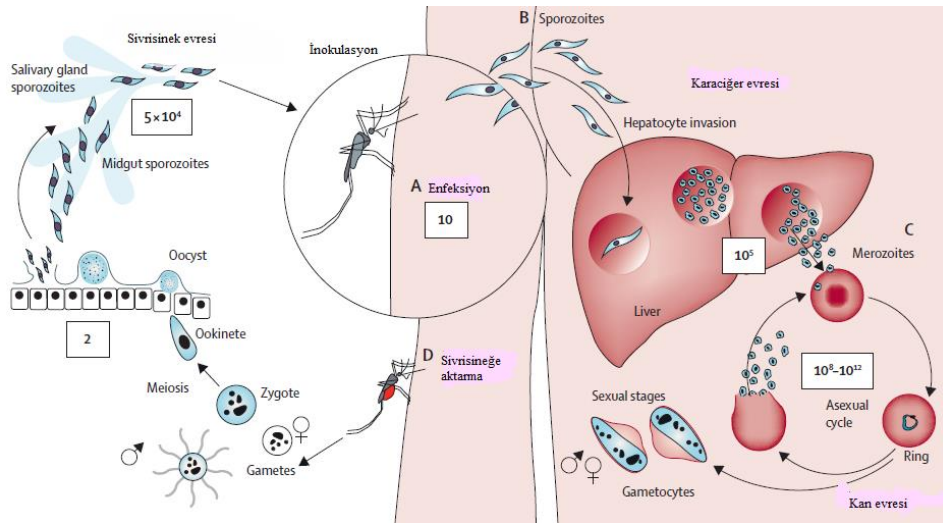
1971'de Çinli bilim insanları tarafından izole edilen ve günümüzde halen sıtma tedavisinde kullanılan artemisin, MÖ 200'lü yıllardan beri Çin'de ateşli hastalıklara karşı kullanılmış olan 'Qinghao' bitkisinin etken maddesidir (Tuğluoğlu 2008). Sıtmaya karşı kınakına ağacından elde edilen kinin kullanılıyordu fakat mücadele için kinin yetersizdi.

Sıtma sağaltımında ise 1820 sonrası tek ilaç Chincona ağacından elde edilen kinin olmuştur. Almanya'da Bayer Laboratuvarlarında 1834 yılında sentetik 4-aminokinolin geliştirilerek Klorokin adıyla piyasaya çıkmıştır Chincona ledgerina ağacından kinin maddesini elde etme oranı, 1865 yılında %4 oranından %8-12'ye çıkarılmıştır. 1944' de kinin sentez edilmiş, 1945'de Primakin ve Proguanil, 1948'de Primetamin ve 1964'de ise Sülfadiazin geliştirilmiştir (Özbilgin 2010).

Dünyanın büyük bir kısmında görülmekte olan sıtma, insanlık tarihi boyunca birçok medeniyetin sona ermesine neden olmuştur. Ülkemiz coğrafyasında da eski medeniyetlerden günümüze kadar sıtma her zaman önemli bir hastalık olarak varlığını sürdürmüştür. Cumhuriyet kurulmadan önceki zamanlara ait net veriler mevcut olmadığından vaka sayıları tam olarak bilinmemektedir. Cumhuriyet'ten sonra ise yoğun mücadele programlarına rağmen 1929-44, 1976-86 ve 1993-98 yılları arasında üç büyük sıtma salgını gözlenmiştir (Uyar 2015).

## 2.2. Sıtma Vektörü ve Yaşam Döngüsü

Sıtma vektörü *Anopheles* cinsi sivrisineklerdir. Sıtma, *Plasmodium* tarafından enfekte edilmiş *Anopheles* cinsi sivrisinekler aracılığıyla popülasyonda yayılır. *Anopheles* vektörünün 465 türü tanımlanmıştır ve yaklaşık olarak 70 türü insana *Plasmodium* spp. taşıma yeteneğine sahipken 41'i sıtma iletim yeteneğine sahip dominant vektör olarak kabul edilir (Rossati vd. 2016).



**Şekil 2.1.** *Plasmodium falciparum*'un anofel cinsi sivrisinek ve insan vücudundaki yaşam döngüsü (White vd. 2013)

Şekil 2.1.'de anlatıldığı üzere *Plasmodium falciparum*'un yaşam evresi, sıtma vektörü dışı anofelin tükürük bezlerinde bulunan hareketli sporozoitlerin dermis içerisine inoküle edilmesiyle başlar (A). Kana geçen sporozoitler kan akışı yardımıyla karaciğer parankim (hepatosit) hücrelerine giderek hepatositleri istila ederler(B) ve en az 5 günlük süre boyunca 30-40.000 yavru üretirler. Bu sporozoitler ve karaciğer evresinde bulunan sporozoitler pre-eritrositik parazitler olarak adlandırılırlar ve bu sürece de pre-eritrositik dönem denir. Sporozoit hücre yüzey proteini olan circumsporozoite protein (CSP), sporozoitlerin karaciğer parankim hücrelerine girmesinde önemli bir rol oynar. Sporozoitlerin yüzeylerinde bulunan CSP, immundominant bir antijen olup, bütün *Plasmodium* türleri tarafından prehepatik sporozoit döneminde oluşturulur ve yapısı hepsinde birbirine benzer. Karaciğer parankim hücreleri, CSP'yi tanıyarak sporozoitleri içlerine alırlar (Potocnjak 1980).

Yaklaşık bir hafta sonra karaciğer şizoidleri patlayarak aseksüel siklusu başlatan ve kırmızı kan hücrelerini istila eden merozoitlerin binlercesini kan dolaşımına salar (C). Sporozoitlerin bir kısmı ise karaciğer parankim hücrelerinde latent bir şekilde yaşamaya devam ederler. Enfekte olmuş hepatosit patladığı ve venöz dolaşıma merozoitleri bıraktığında, her merozoit potansiyel olarak bir kırmızı kan hücresini istila eder ve daha sonra 48-72 saat içinde 8-24 merozoit üretmek için çoğalır. Hastalık, dolaşımdaki toplam aseksüel parazit sayısı kabaca 100 milyona ulaştığında başlar. Enfekte eritrosit patladığında ateş, baş ağrısı, titreme ve halsizlik gibi klinik semptomlar ortaya çıkar. Semptomların şiddeti, parazit sayısı ile ilişkilidir (Mackintosh vd. 2004). Eritrosit patlaması sonucu bırakılan merozoitler her biri muhtemelen eritrosit parazit gelişimi aşaması olarak bilinen döngüyü devam ettirmek için yeni bir eritrosit istila edecektir. Bu döneme eritrositik dönem denir. Eritrosit içine giren merozoitin şekli değişir ve halka-yüzük şeklini alır. Buna genç trofozoit denir. Bu evrim döneminde parazitin halka şeklinde görülmesi, parazitin boyanma özelliğine dayanır. Bu dönemde, parazitin yapısının da boyalarla boyanmayan büyük bir vakuol, bu vakuölü çevreleyen az miktarda sitoplazma ve halka şeklindeki ince sitoplazmanın incelendiği tarafta da çekirdek bulunur. Bu görünüm taşlı bir yüzüğe benzer. Boyalı preparatlarda sitoplazma mavi, çekirdek ise parlak kırmızı renkte boyanır.

Bazı parazitler seksüel formlara (gametosit) dönüşürler. Gametositler anofel sivrisineklerinin beslenmesi aracılığıyla alınır (D) ve sivrisinek bağırsağında bir ookinite ve daha sonra ookist oluşturarak cinsel yolla çoğalırlar. Ookist, bir sonraki kan dolaşımına inokülasyonu hazırlamak için tükürük bezlerine göç eden sporozoitleri serbest bırakmak için patlar. Tüm döngü yaklaşık 1 ay sürebilir (White vd. 2013).

### 2.3. Sınıflandırma

**Çizelge 2.1.** İnsanda parazitlenen *Plasmodium* türlerinin sınıflandırılması (Özbilgin 2010)

<b>Alem</b>	: Animalia
<b>Süperfilum</b>	: Protozoa
<b>Filum</b>	: Apicomplexa
<b>Sınıf</b>	: Sporozoea
<b>Takım</b>	: Eucoccidiida
<b>Aile</b>	: Plasmodiidae
<b>Cins</b>	: <i>Plasmodium</i>
<b>Türler</b>	: <i>P. vivax</i> , <i>P. falciparum</i> , <i>P. ovale</i> , <i>P. malariae</i> , <i>P. knowlesi</i>

### 2.3.1. *Plasmodium ovale*

İnsan, *Plasmodium ovale*'nin doğal kaynağıdır. Geçmişte *P. ovale* enfeksiyonu geçirmiş kişilerde, enfeksiyonun tekrarlanması engellenemez fakat ateş ve parazitemi düzeylerinde düşüş olur. Ayrıca diğer *Plasmodium* spp. ile enfeksiyon geçirmiş olmak da enfeksiyonu önlemez; ateş ve parazit sayısında düşüş olur (Rossati vd. 2016).

### 2.3.2. *Plasmodium malariae*

Sivrisinek ve primat konağında yaşam evresini tamamlar. Sıtma endemik bölgelerinin tamamında gözlemlenir (Rossati vd. 2016).

### 2.3.3. *Plasmodium knowlesi*

Orman makat maymunlarını enfekte eder. Şu an Kuzey doğu Asya'da insan sıtmasının önemli bir nedenidir. Neden olduğu enfeksiyon 1965 yılında gözlemlenmesine rağmen 2004 yılında tanımlanmıştır (Singh vd. 2004).

### 2.3.4. *Plasmodium vivax*

*P. vivax* sıtma vakalarının %8'den sorumlu iken Afrika kıtasının dışına çıktığında bu oran %47'i bulur. *P. vivax*, *P. falciparum* ile karşılaştırıldığında çevresel sıcaklığın geniş aralıklarına daha toleranslı olduğu gözlemlendi. Yapılan filogenetik analizlere göre Asya makatlarından bir konak aracılığıyla geçiş yaparak insan paraziti olmuştur. Asya, Avrupa, Orta ve Güney Amerika ve Afrika burnunun endemik alanlarında *P. vivax* sıtması büyük ölçüde vakalara neden olur. *P. vivax*'in kontrolü ve eliminasyonu *P. falciparum*'dan daha zordur çünkü; birincil enfeksiyonun çözümünden sonra tekrarlanma eğilimi vardır. Ayrıca nükseden *P. vivax* suşunun oranında önemli coğrafi varyasyonlar vardır. *Plasmodium vivax* ülkemizde sıtmaya neden olan *Plasmodium* türüdür (Uyar 2015; Rossati vd. 2016).

### 2.3.5. *Plasmodium falciparum*

*Plasmodium falciparum* türü ilk olarak William H. Welch tarafından 1897 yılında tanımlanmıştır. *P. falciparum* Sıtma etkenleri arasında dünyada en sık karşılaşılan ve en ağır klinik tabloyu oluşturan türdür. Genellikle tropikal ve subtropikal bölgelerde görülen *P. falciparum*, dört tür arasında morbidite-mortalitesi en yüksek olanıdır (Uyar 2015).

*P. falciparum* ve *P. vivax* enfeksiyonların çoğundan sorumlu olan ve birçok insanın enfekte olmasından sorumlu olan türlerdir. Aşı geliştirme alanında, *P. falciparum*'a *P. vivax*'dan çok daha fazla ilgi gösterilmiştir. Bunun nedeni *P. falciparum*'un daha ölümcül olması ve dünya çapında sıtma ölümlerinin %95'inden sorumlu olmasıdır. Ayrıca *P. falciparum*, klorokin ve diğer antimalaryal ilaçlara ilk direnç gösteren insan sıtma parazitidir (Jones ve Hoffman 1994). 85 ülke *P. falciparum* sıtması için endemik olarak sınıflandırılır. *P. vivax* da olduğu gibi geniş sıcaklık aralıklarına toleranslı değildir, min. sıcaklık aralıkları 16-21 °C'dir (Rossati vd. 2016).

## 2.4. Sıtma Kontrol ve Eliminasyon Çalışmaları

*Plasmodium* spp. enfeksiyonlarının önlenmesi farklı araçlar kullanılarak başarılabilir. Sıtma kontrol ve eliminasyon çalışmaları genel olarak; vektör kontrol çalışmaları, aşılar ve kimyasal korunma ve engellemedir.

### 2.4.1. Vektör Kontrol Çalışmaları

Sivrisineklerin yok edilmesi sıtmanın ortadan kaldırılması için bir seçenek olarak görülmektedir. Vektör kontrol yaklaşımları; etkinlik, maliyet ve çevre üzerindeki etkilerinin derecesi açısından farklılık göstermektedir. İnsektisit uygulanmış yatak filelerinin kullanımı güçlü bir etkiye sahiptir.

Vektör kontrol yaklaşımları:

- Yaygın insektisit kullanımı (DTT),
- Larvasitlerin kullanımı,
- Bataklık ve diğer yetiştirme alanlarının imha edilmesi,
- Ev içi rezidüel insektisit püskürtme (Konutlarda, duvarlarda, perdelerde veya diğer yüzeylerde kalıcı böcek ilacının kullanımı.),
- İnsektisit ile muamele edilmiş yatak ağlarının kullanımı,
- Endektositlerin kullanımı da önerilmektedir. Bu ilaçları örneğin İvermektini alan bireylerden beslenen sivrisineklerin ömrü kısalmış veya ölümler (Phillips vd. 2017; Ouédraogo vd. 2015).

2000-2015 yılları arasında, Afrika'da uzun süreli insektisit muamele edilmiş yatak filelerinin kullanımı ve ev içi rezidüel püskürtme sıtma vakalarının üçte ikisinin önlenmesinden sorumludur (Chanda vd. 2014; Bhatt vd. 2015).

CRISPR-Cas9 gen düzenleme teknolojisindeki ilerlemelerle beslenen genetik yaklaşımlar, böcek kontrol stratejileri için heyecan verici bir gelişme alanını temsil etmektedir. Günümüzde 2 ana yaklaşım vardır; sivrisineklerin herhangi bir dölünün steril olacağı şekilde modifiye edilmesi olan popülasyon baskılama ve sivrisineklerin yavrularının *Plasmodium* spp.'ye dirençli olacak şekilde modifiye edilmesi olan nüfus değişimi (Burt 2014; Phillips vd. 2017). Popülasyon baskılamanın ilk yaklaşımı, steril erkek böceklerin salınmasını içerir (Oliva vd. 2014). Dölleri öldüren dominant letal geni taşıyan erkek böceğin salınması stratejisi gelecek için düşünülmektedir (Bourtzis 2016; Black vd. 2011).

Başka bir yaklaşım da *Wolbachia* spp. (Birçok böcekte doğal olarak kolonize olabilen parazit) ile enfekte olmuş *Aedes aegypti* sivrisineklerinin (Dang humması, sarı humma ve Zika virüsünün vektörü) Dang virüsünü ev sahibi insana iletmediği bulgusundan esinlenmiştir (Bull ve Turelli 2013).

Yukarıdaki yaklaşımların her biri çok umut verici olmasına rağmen, hâlâ çok erken bir aşamadır ve çevresel belirsizlikler engeller sunmaktadır (Phillips vd. 2017).

### 2.4.2. Kimyasal Korunma ve Engelleme

Kimyasal korunma; turist, askeri personel ve acil epidemik riski taşıyan popülasyonların endemitesi yüksek olan bölgelere giriş yapması durumunda geçici olarak koruma sağlayan ilaçların kullanımınıdır. Kimyasal korunma büyük popülasyonlara etkinliği kanıtlanmış ilaçların düzenli olarak tedavi dozlarının verilmesi esasına dayanır. Şu anda kimyasal korunma için 3 altın standart vardır:

- Günlük olarak alınan atovaquone–proguanil,
- Günlük olarak alınan doxycycline,
- Haftalık olarak alınan mefloquine.

İlk WHO global sıtma eradikasyon programı klorokin bazlı tedavilere ek olarak DDT kullanımını ile geniş ölçekte insektisit kampanyasını içeriyordu (Phillips vd. 2017). Bu strateji *P. falciparum*'a karşı oldukça etkiliydi. Sivrisineklerin insektisitlere karşı direnç geliştirmesi ve DDT kullanımının maliyet ve çevresel endişelerden ötürü azalması sıtmanın eliminasyonunu yavaşlatmıştır. Sıtma ilişkili ölümlerin sayısında kayda değer düşüşe neden olan artemisin temelli kombine terapiler dünya çapında kullanılmıştır. Fakat ilaç direnci bu programı da geriletmiştir.

*P. vivax*, *P. ovale* ve *P. malaria*'nın oluşturduğu sıtma genellikle klorokin ile standart bir tedavi gerektirir. Artemisin temelli kombine terapiye geçilmeden önce çoğu ülkede sıtma kontrolünde kaydedilen ilerleme klorokin ve primetamin- sulfadiyazin dirençli *P. falciparum* suşlarının ve daha yakın zamanda diğer dirençli *Pasmodium* spp.'lerinin dünya çapında ortaya çıkmasıyla tersine döndü.

### 2.4.3. Aşılama

Sıtma kontrolü için küresel çabalara rağmen, hastalık önemli bir halk sağlığı tehdidi olmaya devam etmektedir. Etkin bir aşı başarılı bir sıtma eliminasyonu için önemli bir kamu sağlığı aracı olmasına rağmen henüz sıtmaya karşı lisanslı bir aşı yoktur. Etkili bir aşı geliştirilmesi; anti-malaryal bağışıklığın zayıf anlaşılması, korunma bağışıklığının eksikliği ve sıtma parazitlerinin genetik çeşitliliğinden dolayı zordur (Ouattara ve Laurens 2015). Sıtmaya karşı bağışıklık yanıtının tüm bileşenleri; karaciğer evresi sırasında hücresel, kan evresi sürecinde humoral bağışıklık rol aldığı halde yalnızca kısmi bir koruma sağlanan bir hastalıktır ve bu da etkili bir aşı geliştirmede zorluklara neden olur (Phillips vd. 2017).

Aşılar, hastalığın yok edilmesinde harikadır fakat etkili bir sıtma aşısı, etkili bir aşı geliştirilebilen bakteri ve virüslerden farklı olarak zordur. Protista patojenleri yüzlerce hücre yüzey protein varyantları kodlama gibi oldukça yüksek etkili immün kaçınma stratejileri geliştiren büyük genom mikroorganizmaları olduğu için zorlayıcıdır. Bununla birlikte, antijenleri ve geliştirilmiş adjuvanları üretmek için geliştirilmiş biyoteknolojik cephanelikler bu sorunun üstesinden gelmeye yardımcı olacaklardır (Phillips vd. 2017).

Bu başarılar, aşıların, bulaşıcı hastalıkların kontrolü, önlenmesi ve ortadan kaldırılması için en uygun maliyetli tek müdahale olarak kabul edilmesidir. Bununla birlikte, sıtma parazitlerden kaynaklanır ve parazitler, biyolojileri açısından, aşıları olan virüs ve bakterilerden çok daha karmaşıktır. Örneğin, genomları virüs ve bakterilerden (*P. falciparum*>5400 gen) çok daha büyüktür ve virüs ve bakterilerin sahip olmadığı yaşam döngülerinin birçok aşamasına sahiptir.

Bu farklı aşamalar, parazitlerin konakçı hücrelerin içinde veya dışında olup olmadığına ve birçok durumda antijenik olarak farklı olmasına bağlı olarak bağışıklık sisteminin farklı kolları tarafından saldırıya uğramış olmalıdır. Örneğin sivrisinekler tarafından enjekte edilen sporozoitlere karşı koruyucu antikorlar, tüm hastalığa neden olan aseksüel eritrositik aşamaları tanımaz. Bu nedenle bir sporozoit, aşının neden olduğu koruyucu antikorlardan kurtulursa bir hafta sonra 10.000-40.000 merozoit karaciğerinden kaçacaktır. Her biri farklı bir eritrosit istila edebilir ve bu eritrositik evre parazitlerinin hiçbir sporozoit yüzeyindeki ana antijen olan circumsporozoite proteini (CSP) antikorları tarafından tanınmaz. Bu karmaşıklık, parazitler için virüsler ve bakterilerden daha fazla bir aşı geliştirmeyi zorlaştırır. Gerçekte, herhangi bir insan parazit enfeksiyonunun önlenmesi için piyasada herhangi bir aşı yoktur (Hoffman 2015).

Yüksek bulaşmalı malaryalı bölgelerde yaşayan yetişkinlerin kısmi koruyucu bağışıklık kazanması aşı geliştirilmesinin olası olduğunu göstermektedir (Phillips vd. 2017). Tüm yıl boyunca sıtma iletiminin olduğu bölgelerde yaşayan yetişkinler ve 5 yaşından büyük çocuklarda parazite tekrarlayan şekilde maruz kalmalarından dolayı kısmen koruyucu bağışıklık geliştirirler. Altı aydan büyük çocuklar özellikle daha hassastır. Çünkü anneden gelen antikorları kaybederler ve koruyucu bağışıklık geliştirmeye henüz sahip değillerdir. *P. vivax*'a karşı daha hızlı bağışıklık kazandırıldığına dair kanıtlar vardır (Mueller vd. 2013). Düşük koruyucu bağışıklığa sahip bireyler *P. falciparum*'a karşı özellikle de şiddetli sıtmalara karşı savunmasızdırlar. Sıtma hastalığının şiddeti koruyucu bağışıklığın seviyesi ile alakalıdır ve koruyucu bağışıklık, semptomların şiddetini ve şiddetli sıtma riskini düşürmeye yardımcı olur (Dobbs ve Dent 2016; Fowkes vd. 2016; Teo vd. 2016).

Anti-malaryal bağışıklığın tam olarak anlaşılammış olması aşı gelişimini engellemeye devam etmektedir. Endemik bölgelerde antimalaryal bağışıklık uzun periyotlarda gelişir ancak yetersizdir. Çoğu sıtma deneyimli kişiler bile sıtma enfeksiyonuna karşı hassastır ancak klinik hastalıklara duyarlı değildir. Enfeksiyon süresince parazitemi kontrol etmek için hem humoral hem hücre aracılı immün yanıt; antikor üretimi, sitokin salınımı, düzenleyici ve efektör T hücresi uyarımı, nötrofil ve monosit aktivasyonunu başlatır (Iriemenam vd. 2009 a, b; McCall vd. 2010). Diğer aşı ile engellenebilir hastalıklarda olduğu gibi tek bir bağışıklık testinden elde edilen sonuçlar korumanın eşik değerini sergilemez (Ouattara ve Laurens 2015).

Şu anki aşı geliştirme çalışmaları parazitin yaşam döngüsünün farklı evrelerindeki çoklu antijen kullanımı üzerine odaklanmıştır. Gelecekteki çalışmaların insanlardaki bağışıklık yanıtının doğasına ve özellikle de T hücre yanıtının azalmasına neden olan faktörlere



odaklanacağı düşünülmektedir. Sıtma aşuları parazit gelişim evrelerine dayanarak 3 gruba ayrılabilir:

- Pre-eritrositik evre aşuları
- Eritrositik evre aşuları
- İletim bloklama aşuları (Transmission Blocking, TB) ve gebelikle ilişkili sıtmaya karşı aşular da dahil olmak üzere “diğer aşular” (Ouattara ve Laurens 2015).

#### 2.4.3.1. Pre-eritrositik aşular

Etkili bir immün yanıt, *P. falciparum* sporozoitlerinin deriden karaciğere yolculuğunu engellemek için hızlı bir şekilde etki etmelidir. Hem humoral yanıt hem T-hücre yanıtı, pre-eritrositik aşının amacı olan hepatosit invazyonunu engellemek için gereklidir.

Işınlanmış sporozoitler ve doğal enfeksiyon gibi karmaşık antijenlerin sağladığı bağışıklık ile meydana gelen antijenlerin saflaştırılıp çoğaltılarak kullanılması çok zor olmaktadır. En iyi sonuçlar sporozoitlerin yüzeyindeki en bol antijen olan circumsporozoite proteini (CSP) kullanılarak elde edilmiştir. Bu proteinin, hepatositlerin sporozoitler tarafından işgalini inhibe eden antikoları uyardığı ve enfekte olmuş karaciğer hücrelerini öldürerek T hücre yanıtını indüklediği bilinmektedir. Önde gelen pre-eritrositik aşı adayı RTS,S’dir (Phillips vd. 2017; Ouattara ve Laurens 2015). RTS,S tescilli bir adjuvan ve hepatit B virüs yüzey antijeni ile kombine edilmiş *P. falciparum* circumsporozoite proteini parçalarını içeren bir rekombinant proteindir. RTS,S’in immünogenetisi, daha önce anlatımı yapılmış rekombinant circumsporozoite antijeninden daha iyi olduğu bulundu ve geliştirilen RTS,S aşısı farklı adjuvanlarla karıştırılarak gönüllü yetişkin bireyleri aşulamak için kullanıldı (Rappuoli ve Aderem 2011).

RTS,S’in aşulamayı takiben ilk faz 3 klinik denemesinde, doz 3’den sonraki 18 ay boyunca çocuklarda klinik sıtmaya karşı etkinlik genel olarak %46 idi. Fakat zamanla aşının etkinliği düşmeye başladı. Aşının etkinliğinin artırılma çabaları devam etmektedir. Bu çabalardan biri diğer antijenlerle RTS,S aşısının kombine edilmesidir (Agnandji vd. 2014; Heppner vd. 2005). Ayrıca Zamanla etkinliğinin düştüğünün gözlemlenmesiyle beraber RTS,S aşısının uzun süreli koruma sağlayamadığı fakat düşük endemik alanlarda sıtma iletimini engellemek için kimyasal koruyucularla beraber kullanılabilceği fikri ortaya çıktı (Gosling ve Seidlein 2016).

Gelişmedeki diğer pre-eritrositik aşı stratejileri çoklu epitop trombospondin ile ilişkili adezyon proteini (ME-TRAP) ve tüm organizma sporozoit stratejilerini içerir. ME-TRAP, *P. falciparum* karaciğer evresi CD4, CD8 T hücre epitoplarını ve B hücresi ile kaynaşmasını kapsar (Ouattara ve Laurens 2015). Bu aşı Kenya’da faz 2b çalışmalarında koruma sağlayamadı (Ewer vd. 2013) fakat diğer varyantlar hala geliştirilmektedir (Seder vd. 2013).

Radyasyon ile zayıflatılmış tüm organizma sporozoit aşısının en yüksek dozunu alan Kuzey Amerikalı 6 gönüllüde %100 etkinlik gözlemlendi (Sabchareon vd. 1991). Fakat bu aşı şu an için intra-venöz olarak uygulandığı için bu aşının kütle uygulamasının pratik olmayacağı

düşünölmekte ve teslim etmenin alternatif uygulamalarına yönelik çalışmalar devam etmektedir (Ouattara ve Laurens 2015).

#### 2.4.3.2. Eritrositik aşılar

Sıtmanın klinik bulguları parazitin kan evresi enfeksiyonundan kaynaklanır. Bu nedenle kan evresi aşıları enfeksiyonu önlemeden hastalık ve ölüme engel olmaya yöneliktir. Eritrositik evre süresince immün koruma nötralize edici antikorlar aracılığıyla gerçekteşir (Sabchareon vd. 1991; Cohen vd. 1961). Enfekte kırmızı kan hücrelerinin ve merozoitlerin yüzeyinde ifade edilen antijenler eritrositik sıtma aşısı adayları olarak kabul edilir. Merozoit yüzey proteinleri 1, 2, 3 (MSP1, MSP2, MSP3), serin-tekrar antijeni, eritrosit bağlama antijeni, RESA (ring-infected erythrocyte surfce antijen), GLURP (glutamate rich protein) ve AMA1 (apical membrane antijen 1) eritrositik sıtma aşısı adaylarındandır (Ouattara ve Laurens 2015).

Papua Yeni Gine'de MSP1, MSP2 ve RESA proteinlerinin bir karışımı olan B aşısı kombinasyonu kullanılarak gerçekteştirilen bir aşi denemesi sonucunda aşi tipi olmayan parazitik enfeksiyonların insidansında bir artış olduğu gözlemlendi (Genton vd. 2002). Sıtma endemik bölgelerde, sıtma parazitinin çoklu allellerinin çoklu antijenlerine karşı tekrarlanan enfeksiyonları takiben koruyucu immün yanıt zaman içinde kazanılır. Bu, bağışıklık tepkisinin enfekte eden suşun genetik dizisine özđu olabileceğini düşündürmektedir. Bu spesifik bağışıklık cevabından dolayı aşi antijeninden farklı olan genetik dizili parazit sıtma hastalığına neden olabilir.

Son yıllarda sadece 4 kan evresi antijeni faz 2 aşi denemelerinde test edilmiştir. Test edilen AMA1, MSP1, MSP3 ve GLURP antijen temelli aşıların hiçbirinin klinik sıtmaya karşı etkili olmadığı gözlemlendi (Ouattara ve Laurens 2015).

#### 2.4.3.3. İletim bloklama aşıları

Pre-eritrositik ve eritrositik aşi adayları eğer tamamen etkin ise, eşeysiz kan evresi parazitlerinin oluşumunu önleyerek veya ortadan kaldırarak konakçıdağı hastalığı önleyecektir. Bir diğer yaklaşım olan parazitin özellikle sivrisinek orta bağırsağında bulunan parazitin cinsel evrelerine karşı bağışıklık kazandırmaktır. Sivrisineğin kandan beslenmesiyle sivrisineğe geçecek olan antikor cinsel üremeyi engelleyecektir. Bu tür aşılara iletim bloke edici aşılar denir ve diğer evre aşılarında olduğu gibi aşılanmış bireylere hastalıktan korunma sunmaz. Bu yaklaşım aşılanmış bireye herhangi bir fayda sağlamazken, topluluğa fayda sağlar (Phillips vd. 2017). Toplumda yeterli sayıda insan böyle bir aşi ile aşılanmış olursa bulaşma döngüsü kırılacak ve herkes enfeksiyona karşı korunabilecektir (Wu vd. 2015).

Başarılı bir iletim bloke edici aşi, parazitin gametositlerine ve/veya ookinet cinsel evrelerine karşı nötralize edici antikor tepkilerini indükleyerek döllenme ve üremeyi engellemelidir (Matuschewski ve Mueller 2007). Etkin iletim bloklama immünitesinin tanımlanmış hedefleri, gametositlerin/gametlerin, zigotların ve ookinetlerin yüzeyinde ifade edilen

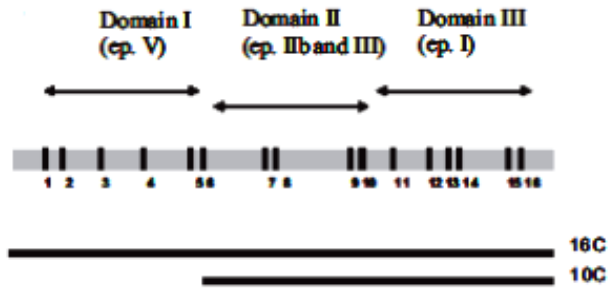
proteinlerdir. Daha spesifik olarak, Pfs25, Pfs28, Pfs48 / 45 ve Pfs230'un, bir kan yemeği sırasında *P. falciparum* gametleriyle birlikte sivrisinek vektörü tarafından yutulduğunda önemli iletim bloklayıcı aktivitesi olan antikoru indüklediği gösterilmiştir ayrıca *Plasmodium vivax*'taki ortolog Pvs25 proteini de aşı adayı olarak çalışılmaktadır (Jones vd. 2013; Sauerwein ve Bousema 2015).

İletim bloke edici aşılarda etkinlik testi, insan kanı veya insanlar üzerinde doğrudan anofel sivrisineklerinin beslenmesi esasına dayanan membrane-feeding assay testi aracılığıyla yapılır (Ouattara ve Laurens 2015).

#### 2.4.3.3.1. Pfs48/45-10C

Pfs48/45, yapıya bağlı epitoplara sergileyen ve sıtmanın iletimini bloke edici (transmission-blocking) immünitesi için önemli bir hedef olan *Plasmodium falciparum* özgül protein ailesinin bir üyesidir (Outchkourov vd. 2007). Pfs48/45, parazitin cinsel farklılaşması esnasında gametositlerde anlatımı yapılan ve erkek gamet doğurganlığında önemli bir rol oynayan proteindir (Dijk vd. 2001). Pfs48/45 parazitin döllemesinde anahtar rol oynar ve anti-Pfs48/45 monoklonal antikoru parazitin döllemesini engeller (Outchkourov vd. 2008). Pfs48/45 çoklu disülfür bağları ile sistein bakımından zengin domainlerden oluşur. Bunlar iletimi bloke edici aktivitesi olan birçok monoklonal antikor tarafından tanınan farklı yapısal B hücre epitoplara oluştururlar (Draper vd. 2015).

Şekil 2.2.'de belirtildiği üzere C-terminal modülü anti-epitop I tarafından tanınan 6 sistein motifi içerir; orta modül anti-epitop II ve anti-epitop III tarafından tanınan 4 sistein motifi içerir; N-terminal modülü anti-epitop V tarafından tanınan 6 sistein motifi içerir (Outchkourov vd. 2007).



**Şekil 2.2.** Pfs48/45 proteininin bulaşmayı bloke edici epitoplara gösterimi (Outchkourov vd. 2007)

Fonksiyonel bir konformasyonda, tam uzunlukta rekombinant Pfs48/45 üretme çabaları büyük ölçüde başarısızlıkla sonuçlandı için çalışmalar bu proteinin domainlerini üretmeye yönelmiştir (Chowdhury 2009). Önceki çalışmalarda özellikle epitop I' in güçlü bulaşmayı bloke edici aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Roeffen vd. 2001). Ayrıca Pfs48/45'in doğal konformasyonunun yeniden oluşturulması ile ilgili zorlukların üstesinden gelmek için

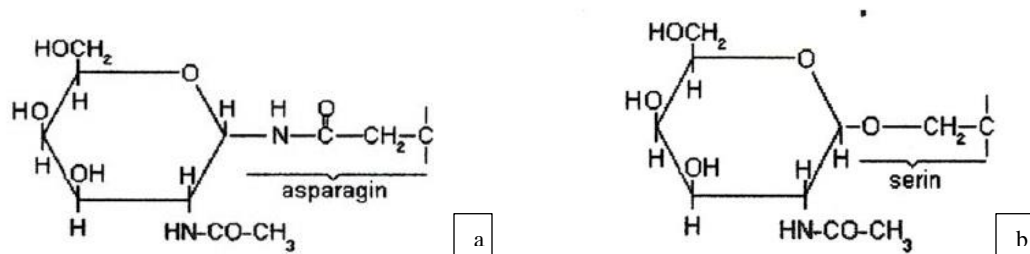
bulaşmayı bloke edici 3 epitopu içeren Pfs48/45 10C domaini potansiyel aşı adayı olarak anılmaktadır (Draper vd. 2015). Pfs48/45-10C fragmenti, iletim engelleme antikorlarını yüksek titrasyonlarda oluşturma, proteazlara karşı direnç gösterme ve konformasyon açısından en yüksek stabiliteyi göstermesi açısından umut veren bir aşı antijen adaydır (Outchkourov vd. 2008).

Ayrıca 10C fragmentinin diğer yaşam evrelerinde parazit tarafından oluşturulan antijenler ile füzyonu sonucu kimerik füzyon aşı aday proteinleri üretilmektedir. Örneğin; GMZ2'.10C, parazitin hem bulaşma hem de aseksüel yaşam döngüsü aşamalarını hedefleyen çok aşamalı bir sıtma aşısı için potansiyel bir adaydır. GMZ2'.10C önemli sıtma parazit antijenlerinin epitoplarını birleştirir: glutamat bakımından zengin protein (GLURP), merozoit yüzey proteini 3 (MSP3) ve yüksek disülfid bağlı Pfs48 / 45-10C (Mistarz vd. 2017).

## 2.5. Deglikosilasyon Stratejisi

Birçok proteinin fonksiyonel özellik kazanabilmesi için post-translasyonel modifikasyonlara tabi tutulması gerekmektedir. Çok çeşitli posttranslasyonel modifikasyon tipi mevcut olmasına rağmen glikosilasyon ökaryotlarda ikinci sıklıkta meydana gelen posttranslasyonel modifikasyondur. Glikosilasyon, bir oligosakarit yan zincirinin bir proteine kovalent olarak bağlanmasıdır. Beş ayrı tipte şeker-peptid bağı tanımlanmıştır fakat en yaygın gerçekleşen N-bağlı ve O-bağlı glikosilasyondur (Blom vd. 2004).

N-bağlı glikosilasyon asparajin (Asn) amino asitinin amino (NH<sub>2</sub>) grubu ile belirli bir karbonhidrat grubu arasında meydana gelir. Asn-Xaa-Ser motifi (Xaa prolin dışındaki herhangi bir amino asit) glikosilasyon için konsensus sekansı olarak kabul edilmektedir. N-bağlı glikosilasyon oligosakkaril transferaz adı verilen enzimler tarafından ER'da gerçekleştirilir (Braakman ve Bulleid 2011; Roth vd. 2010; Schwarz ve Aebi 2011). O-bağlı glikosilasyon serin veya treonin amino asitinin hidroksil grubuna (OH) karbonhidrat eklenmesiyle meydana gelmektedir. Genellikle golgide gerçekleşir. O-bağlı glikosilasyonda kullanılan oligosakkarit zincirleri N-bağlı glikosilasyondaki ile karşılaştırıldığında genellikle daha kısa ve daha basit yapıya sahiptir (Krueger ve Srivastava 2006; Reinders ve Sickmann 2007; Walsh vd. 2005).



**Şekil 2.3. a)** Bir N-bağlı glikoprotein (N asetil glikosaminin asparajine bağlanması); **b)** Bir O-bağlı glikoprotein (N asetil glikosaminin serine bağlanması) (Gomord vd. 2010)

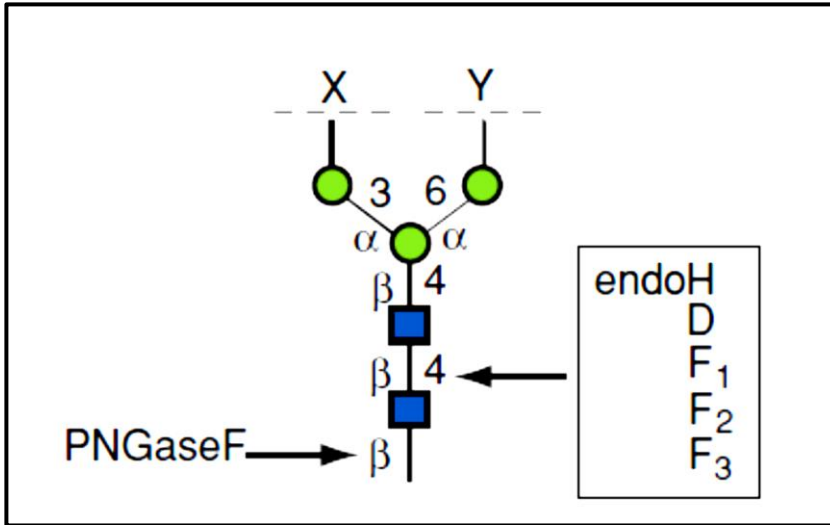
Glikosilasyon proteinlerin katlanıp üç boyutlu yapısını kazanması, proteinlerin gerekli hücre içi hedeflerine taşınması ve hücrelerin birbirleri ile etkileşimlerinde rol alır. Glikosilasyon, proteinlerde en yaygın görülen posttranslasyonel modifikasyondur ve proteinin antijenik özelliğine katkıda bulunur. Çoğu farmasötik proteinler, biyolojik aktiviteyi göstermek için çoklu eş zamanlı veya translasyon sonrası modifikasyon gerektiren kompleks proteinlerdir. Veri tabanına göre, ökaryotlardaki proteinlerin yarısından fazlası ve onaylanmış biyofarmasötiklerin üçte biri, glikoproteinlerdir (Gomord vd. 2010).

N-bağlı glikosilasyon, heterolog ekspresyon sistemlerinde üretilmiş rekombinant terapötik proteinler ve alt birim aşılımları da içeren birçok proteinin doğru katlanması, stabilitesi ve fizyolojik aktivitesi için gereklidir (Wujek vd. 2004; Gomord vd. 2010). Bakteriyel proteinlerin yanısıra bazı ökaryotik proteinler doğal konakçıda N-glikanlar içermeyebilir fakat bu proteinler, ökaryotik ekspresyon sistemlerinde anlatımı yapıldığında potansiyel olarak bozulmuş fonksiyonel aktiviteye neden olan anormal glikosillenmeye uğrayacak çoklu potansiyel glikosilasyon bölgesi içerebilir. Örneğin, *Plasmodium falciparum*'un Pfs48/45, Pfs25 ve Pfs230 proteini, insan faktör 13 proteininin A zinciri N-bağlı glikanlar taşımaz ve *Bacillus anthracis* koruyucu proteini (protective antigen) bir glikoprotein değildir. Fakat bu proteinler potansiyel N-bağlı glikosilasyon bölgesi içerirler ve bu proteinlerin maya, memeli veya bitki sistemlerinde ekspresyonları sırasında bu bölgeler istenmeyen anormal glikosilasyona uğrayabilir.

Karbonhidratların bağlanması, bir proteinin fiziko-kimyasal özelliklerini güçlü bir şekilde etkiler. Bu nedenle spesifik aktivite, ligand-reseptör etkileşimi ve immünojenite gibi temel biyolojik özelliklerini değiştirebilir. Örneğin, sıtma aşısı adayı olan ve 7 olası N-glikosilasyon bölgesi içeren Pfs48/45 proteininin maya sisteminde (*Pichia pastoris*) anlatımı yapıldığında; protein TB aktivite göstermez ve farede TB antikorlarını uyarmaz. Ayrıca *Nicotiana benthamiana* bitkisinde anlatımı yapılmış olan Pfs48/45 proteininin TB aktivitesi düşüktür. Bu düşük TB aktivitesi, glikosilasyondan dolayı proteinin önemli epitoplarının maskelenmesi veya doğru olmayan katlanma ile bağlantılı olabilir. Çünkü, Pfs48/45 proteini 7 olası N-bağlı glikosilasyon bölgesine sahiptir ve herhangi bir ökaryotik konakçıda anlatımı yapıldığında bu bölgeler anormal glikosillenmeye uğrayacaktır. Bu yüzden glikosillenmemiş formda rekombinant proteinlerin üretilmesi için strateji geliştirmek çok önemlidir (Guo vd. 2002; Partridge vd. 2004; Bushkin vd. 2010; Mammedov vd. 2012).

Mammedov vd. (2012; 2017) tarafından bitkide, glikosilasyona uğramadan hedef proteinlerin üretilmesi için bir strateji geliştirildi. Bu strateji geçici gen anlatımı aracılığıyla ilgili hedef gen ile bakteriyel deglikosilasyon enzimleri olan PNGase F (Mammedov vd. 2012) veya Endo H enzimlerinin birlikte ekspresyonu temeline dayanmaktadır (Mammedov vd. 2017). PNGase F (Peptide: N-glycosidase F), N-bağlantılı glikoproteinlerdeki yüksek mannozlu, hibrit ve kompleks oligosakkaritlerin en içteki N-Asetil-D-glukozamin (GlcNAc) ve asparagin kalıntıları arasındaki bağı kesen, gram negatif bakteri olan *Flavobacterium meningosepticum* tarafından salgılanan 34.8 kDa'lık bir enzimdir (Mammedov vd. 2012). PNGase F, asparajin ile aspartatın deamidasyonundan dolayı deglikosile edilmiş proteinin glikosilasyon bölgesinde (N-X-S / T) bir amino asit değişikliğine neden olur. Bir diğer enzim olan Endoglikosidaz H (Endo H), yüksek mannozlu ve hibrid, ancak kompleks olmayan

glikanlar üzerindeki glikan zincirinin çekirdek bölgesindeki iki GlcNAc kalıntı arasındaki N-bağlı glikanları ayırır (Mammedov vd. 2017).



**Şekil 2.4.** N-bağlı glikanların çekirdeğinde bulunan PNGase F ve Endo H duyarlı bağlar. PNGase F, GlcNAc ve Asn arasındaki bağı kesen, tüm şeker zincirini serbest bırakan ve Asn'i Asp'e dönüştüren bir glikoamidazdır. Endoglikosidazlar (H, D ve Fs), çekirdek bölgesindeki iki GlcNAc kalıntısı arasındaki bağı keser fakat bir GlcNAc proteine hala bağlı kalır (Gomord vd. 2010)

Glikan içermeyen hedef proteinlerin üretimi için *in vivo* enzimatik deglikosilasyon stratejisi, bitkilerde glikosile edilmemiş proteinlerin üretimi için güçlü bir strateji haline gelme potansiyeline sahiptir. Daha önceki çalışmalar *in vivo* deglikosilasyon ile üretilen proteinlerin özelliklerinin (aktivite, immünojenite, vb.) *in vitro* deglikosile edilmiş eşlerinden farklı olduğunu kanıtlamıştır. Ayrıca bu strateji ile üretilmiş olan antijen proteinlerinin daha stabil olduğu ve güçlü bir antikor uyarımını sağladığı gözlemlenmiştir (Mammedov vd. 2017).

## 2.6. Bitkide Geçici Gen Anlatımı

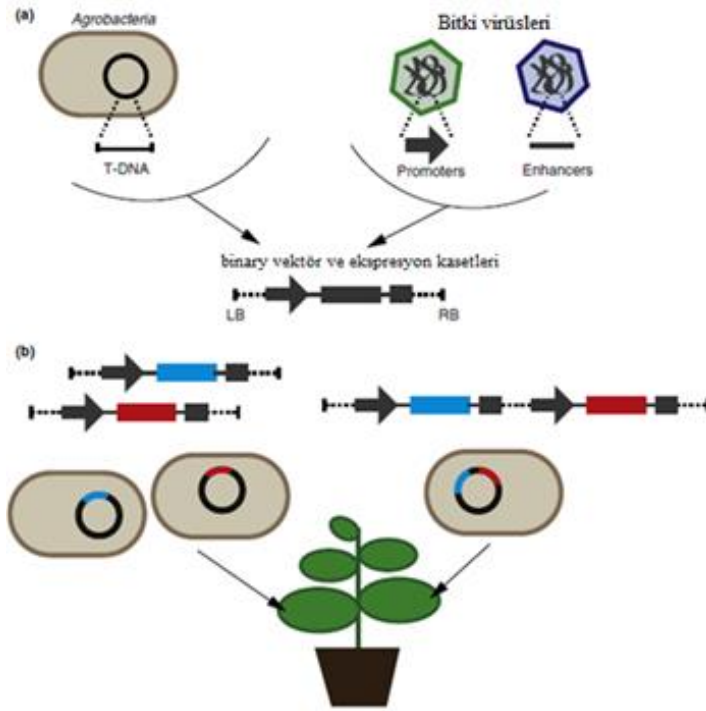
Son yıllarda heterolog proteinlerin bitki temelli aşırı ekspresyonu çok ilgi ve gelişme göstermiştir. Rekombinant proteinlerin üretimi için bitki, bakteri, maya, böcek ve memeli hücre kültürü gibi birçok ekspresyon sistemi geliştirilmiş ve kullanılmaktadır. Bitki ekspresyon sisteminin diğer ekspresyon sistemleri ile karşılaştırıldığında, ökaryotik translasyon sonrası modifikasyon mekanizmalarına sahip olması ve geçici gen ifadesi sayesinde hedef proteini yapraklarında 1 haftadan kısa bir sürede yüksek miktarda üretebilmesi gibi önemli avantajları mevcuttur. Bitki ekspresyon sistemlerinin kolay ölçeklenebilirliği, üretimin daha ekonomik olması ve insan patojenlerini barındırmaması nedeniyle daha güvenilir olması diğer avantajlarıdır (Scholthof ve Scholthof 1996; Mett vd. 2008; Yusibov ve Mamedov 2010; Yusibov vd. 2016). Heterolog proteinler, stabil olarak transforme (transgenik veya transplastomik) veya geçici olarak transforme edilmiş bitkilerde üretilebilir (Shamloul vd. 2014). Bir transgenik bitki hattının yaratılması ve sonuç olarak, bu

bitkilerden bir proteinin üretilmesi, önemli ölçüde zaman ve maliyet gerektirir. Transgenik bitkiler tarafından hedef proteinlerin ekspresyon seviyesi genellikle düşüktür ve bu da onların saflaştırılmasının zorluğuna bağlı olarak yüksek bir ürün maliyetine yol açar (Edelbaum vd. 1992; Kusanadi 1997). Geçici gen anlatımı, stabil olarak transforme edilmiş bitkilerin oluşumuna hızlı bir alternatif sağlar (Kapila vd. 1997). Böyle bitki biyofabrikalarının avantajları manipülasyonun kolaylığı, hız, düşük maliyet ve bitki dokusu ağırlığı başına genellikle daha yüksek protein verimi sağlamasıdır.

Geçici protein üretimi bakteriyel binary vektörlerinin veya rekombinant bitki viral vektörlerinin bitki dokularına sunulmasıyla elde edilir. En gelişmiş geçici ifade sistemi, bitki virüsleri ve binary plazmidlerin bileşenlerini birleştiren ve agroinfiltrasyon yoluyla teslim edilen "launch vektörleri" nin kullanılmasına dayanır (Shamloul 2014). Bitkilerin moleküler genetik modifikasyonu *Agrobacterium tumefaciens*'in tanımlanmış bir DNA segmentini (T-DNA) bitki çekirdeğine aktarma kabiliyetinden yararlanarak (Gelvin 2003), çoğunlukla binary vektör sistemleri kullanılarak gerçekleştirilir. Bu vektörler iki bölümden oluşur. Birinci bileşen, bitki hücrelerine aktarılacak olan T-DNA'yı içeren kasettir; ikinci bileşen hem *E. coli* hem de *A. tumefaciens* için plazmid replikasyon fonksiyonlarını, bakteriler için seçilebilir markör genleri ve isteğe bağlı olarak plazmid mobilizasyon fonksiyonlarını kodlayan genleri taşıyan vektör omurgasıdır (Komarova 2010; Komori vd. 2007; Lee ve Gelvin 2008).

Bitkilerde anlatım için vektör sistemlerinin oluşturulmasında kendi kendini kopyalayan virüslerde bulunan dizilerden yararlanır. Kendi kendine çoğalan viral vektörlerin temeli olarak birkaç farklı bitki virüsü kullanılmıştır: Tobacco mosaic virus (TMV), Potato X virus (PVX), Cowpea mosaic virus (CPMV), Tobacco etch virus (TEV). Bu tür vektörler, *Agrobacterium* süspansiyonları ile yaprak dokusunun infiltrasyonu sırasında vektörün bitki hücrelerine aktarılması için bir araç temin eden bir ikili plazmidin T-DNA kısmı içine yerleştirilebilir.

Viral ekspresyon sistemleri kullanılarak bitkilerde üretilen proteinlerin verimini etkileyen birçok faktör vardır: Promoter aktivitesi, gen susturulması, anlatım verimliliği, vektör boyutu vb. Transkripsiyon sonrası gen susturulması (PTGS), agroinfiltrate edilmiş yapraklarda rekombinant proteinlerin düşük seviyeli ifadesinin nedenlerinden biridir. PTGS'yi azaltmak için Tomato bushy stunt virus (TBSV) gelen P19 proteini gibi gen susturma bastırıcılarının kullanımı, verim üzerinde büyük bir etkiye sahiptir (Peyret ve Lomonossoff 2015; Mardanova vd. 2017). Farklı bitki türlerinin bitki binary vektörleri ile agroinfiltrasyonu sonucu üretilen protein stabil olarak transforme edilmiş bitkininkine kıyasla 5-20 kat daha fazladır. Geçici bitki bazlı gen anlatımı hem ticari hem de akademik ilgi alanlarındaki proteinlerin üretimi için özellikle cazip bir seçenek haline gelmektedir (Sainsbury ve Lomonossoff 2008).



Şekil 2.5. Bitkide geçici gen anlatımının gösterimi (Mardanova vd. 2017)



### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Organizma ve Plazmitler

*E. coli* XL1Blue, Prof. Dr. Mehmet İnan tarafından sağlandı (Gıda Mühendisliği, Akdeniz Üniversitesi).

*A. tumefaciens* AGL1-psoup, Profesör Sophien Kamoun tarafından sağlandı (The Sainsbury Laboratory, Norwich, İngiltere).

*N. benthamiana*, Akdeniz Üniversitesi serasında torf ve perlit karışımı (3:1 oranında) üzerinde yetiştirildi ve deneylerde 6-7 haftalık bitkiler kullanıldı.

Modifiye edilmiş pEAQ vektörü, susturmanın bastırıcısı olan P19 dahil olmak üzere çoklu ekspresyon kasetlerinin birlikte anlatımına ve genlerin hem kesim enzimi bazlı klonlama hem de GATEWAY rekombinasyon ile doğrudan sokulmasına izin verir.

#### 3.2. Besiyerleri

##### LB-Broth besiyeri

- LB-Broth 25 g
- Distile su 1000 ml

Bileşenler bir araya getirilerek distile suda çözdürüldü. pH:7.0'a ayarlandı ve 121°C'de 30 dakika otoklavlanarak steril edildi.

##### SYS (BBL) besiyeri

- Sohidrolizat 10 g
- Yeast extract 5 g
- NaCl 5 g
- Distile su 1000 ml

Bileşenler bir araya getirilerek distile suda çözdürüldü. pH:7.0'a ayarlandı ve 121°C'de 30 dakika otoklavlanarak steril edildi.

##### SOC besiyeri

- Bactotripton 20 g
- Bacto yeast extract 5 g

- NaCl 5M 2 ml
- KCl 1M 2,5 ml
- MgCl<sub>2</sub> 1M 10 ml
- MgSO<sub>4</sub> 10 ml
- Distile su 1000 ml

Bileşenler bir araya getirilerek distile suda çözdürüldü ve 121 °C’de 30 dakika otoklavlanarak steril edildi. Besiyeri otoklavdan çıkarıldıktan sonra sıcaklığın 50°C’ye gelmesi beklendi ve daha sonra steril kabin altında 20 ml 1M glukoz eklendi.

#### **MMA besiyeri**

- MES 1,952 g
- MgCl<sub>2</sub> 10 ml
- Distile su 1000 ml

Bileşenler bir araya getirilerek distile suda çözdürüldü. pH: 5.8’e ayarlandı ve 121°C’de 30 dakika otoklavlanarak steril edildi. 1L MMA besiyerine kullanmadan önce 150µl Asetosyringene eklenmelidir.

#### **Asetosyringene (AS, 100 mM) stok çözeltisi**

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

1L MMA besiyerine 150µl Asetosyringene eklenmelidir.

### **3.3. Çözeltiler ve Tamponlar**

#### **Agaroz Jel Elektroforezi**

##### **TAE Tamponu (50X)**

- Tris-base 242 g
- Glasiyal asetik asit 57.1 ml

- EDTA (0.5 M, pH 8.0) 100 ml
- Distile su 1000 ml

**EDTA (0,5 M, pH: 8.0, 100 ml)**

- EDTA 14,612 g
- Distile su 100 ml

**Agaroz Jel (%1'lik)**

- 0,6 g agaroz tartıldı ve üzerine 60 ml 1XTAE tampondan eklendi. Agarozun çözünmesi için yaklaşık olarak 2 dakika mikrodalga fırında bekletildi. Agaroz tamamen eridikten ve sıcaklığı elle tutulabilir sıcaklığa geldikten sonra 1,2 µl Etidyum Bromid (EtBr) eklendi ve hafif bir şekilde karıştırıldı. Karışım önceden hazır hale getirilmiş ve uygun tarak yerleştirilmiş olan elektroforez tankına kabarcık oluşturmadan döküldü. Jelin donması beklendi.

**Kompetan Hücre Hazırlanması****1 M CaCl<sub>2</sub>**

- CaCl<sub>2</sub> 1,47 g
- Distile su 10 ml

**0,1 M CaCl<sub>2</sub>**

- 1 M CaCl<sub>2</sub> 1 ml
- Distile su 9 ml

**%50 Gliserol Solüsyonu**

- Gliserol 50 g
- Distile su 50 ml

Hassas terazi üzerinde 50 g sıvı gliserol tartıldı ve 50 ml distile su ile karıştırıldı. Karışım 121 °C'de 30 dakika otoklavlanarak steril edildi.

**0.1M CaCl<sub>2</sub> /%15 gliserol**

- 1 M CaCl<sub>2</sub> 1 ml

- %50 gliserol 3 ml
- Distile su 6 ml

**SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE)****Tris HCl (1.5 M, pH: 8.8)**

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

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

**Tris HCl (0.5 M, pH: 6.8)**

- Tris-base 30 g
- Distile su 250 ml

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

**Yürütme Tamponu (1X)**

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

**Örnek yükleme tamponu (5X, Laemli Buffer)**

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

pH: 6,8'e HCl ile ayarlandı ve distile su ile hacim 40 ml'e tamamlandı.. -20 °C'de muhafaza edildi.

#### **Jel boyama çözeltilisi (Coomassie staining)**

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

#### **Boya uzaklaştırma çözeltilisi (Destaining)**

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

#### **APS Solüsyonu (%10)**

- 60 mg APS, 600 µl distile su içerisinde çözdürüldü (Taze olarak hazırlanır.).

#### **SDS Solüsyonu (%10)**

- 10 g SDS 90 ml distile su içerisinde çözdürüldü.

#### **Jellerin hazırlanması (%10, 4 jel için)**

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

Stacking jel döküldükten sonra yüzeyin pürüzsüz olması ve oksijen ile etkileşimin engellenmesi için jellerin yüzeyine 500 µl izopropanol alkol dikkatli bir şekilde gezdirildi.

### Western Blotting

#### Transfer Tamponu (1X)

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

#### TBS (5X)

- Tris-base 12,115 g
- NaCl 42,88 g
- Distile su 1000 ml

Bileşenler distile su içerisinde çözdürüldü ve pH: 7,5' a ayarlandı.

#### I-Block

- 0,5 g I-block 100 ml 1XTBS içerisinde manyetik karıştırıcı üzerinde tamamen çözüne kadar karıştırıldı.

#### Birincil antikor (primary antibody, 1:1000)

- 10 µl antikor, 10 ml I-block içerisinde çözdürüldü.

#### İkincil antikor (secondary antibody, 1:2500)

- 4 µl antikor, 10 ml I-block içerisinde çözdürüldü.

### Protein Pürifikasyonu

#### 1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(H<sub>2</sub>O) 13,8 g
- Distile su 100 ml

**1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>**

- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 28,38 g
- Distile su 200 ml

**Sodyum fosfat tamponu (20mM)**

- 1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 15,48 ml
- 1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4,52 ml
- NaCl 17,53 g
- Distile su 800 ml

Bileşenler karıştırıldı ve pH:7.0'a ayarlandıktan sonra hacim 1000 ml'ye tamamlandı.

**100 mM imidazol stok çözeltisi**

- İmidazol 0,34g
- Sodyum fosfat tamponu 50 ml

Bileşenler karıştırıldı ve +4°C'de muhafaza edildi.

**10 mM Bağlayıcı Tampon (Equilibration Buffer, His-tag)**

- 100 mM imidazol stok çözeltisi 5ml
- Sodyum fosfat tamponu 45 ml

**Ekstraksiyon Tamponu (His-tag)**

- Yeterli miktarda 10 mM Dengeleyici Tampon içerisine 1mM olacak şekilde DIECA tartılır ve karıştırılır.

**25 mM Yıkama Tamponu (Wash Buffer, His-tag)**

- 100 mM imidazol stok çözeltisi 12,5 ml
- Sodyum fosfat tamponu 37,5 ml

**250 mM Elüsyon Tamponu (Elution Buffer, His-tag)**

- İmidazol 0,851 g

- Sodyum fosfat tamponu 50 ml

**1X PBS tablet çözeltisi**

- 1 tablet PBS (137 mM NaCl, 2 mM KCl, 10 mM fosfat buffer) 100 ml distile su içerisinde çözdürüldü.

**Bağlayıcı Tampon (Equilibration Buffer, flag-tag)**

- NaCl (0,5 M) 2,922 g
- 1XPBS 100 ml

**Yüksek Tuzlu Yıkama Tamponu (High Salt Wash Buffer, flag-tag)**

- NaCl (2 M) 11,688 g
- Tris (50 mM) 0,606 g
- Distile su 70 ml

pH:8.0'a ayarlandıktan sonra son hacim distile su ile 100 ml' e tamamlanır.

**Elüsyon Tamponu (Elution Buffer, flag-tag)**

- NaCl (150 mM) 0,438 g
- Tris (200 mM) 0,751 g
- Distile su 40 ml

pH:2.2'ye ayarlandıktan sonra son hacim distile su ile 50 ml' e tamamlanır.

**Nötralizasyon Tamponu (Neutralization Buffer, flag-tag)**

- Tris (2 M) 12,114 g
- Distile su 30 ml

pH:8.0'a ayarlandıktan sonra son hacim distile su ile 50 ml' e tamamlandı.

- Pürifikasyondan önce belirli miktarda elüsyon tamponu üzerine nötralizasyon tamponu yavaş bir şekilde pH:7.0 olana kadar ölçülerek döküldü ve pH:7.0 olduğu değerdeki miktarlar belirlendi.



### 3.4. Primer Tasarımı

PZR da kalıp DNA olarak kullanılacak olan Pfs48/45 geni GENEART AG tarafından, N-terminalinde PR-1a sinyal dizisi; C-terminalinde KDEL dizisi (ER tutma dizisi) ve FLAG veya His-tag etiketi içerecek şekilde sentezlendi. Sentezlenen genin N. benthamiana bitkisinde anlatımının yapılması için kodon optimizasyonu yapıldı ve IDT şirketi tarafından sentezlenmiş gene özel primer üretimi gerçekleştirildi.

**Çizelge 3.1.** PZR da kullanılan primerler

Gen adı	Primer adı	PZR ürün boyutu
Pfs48/45-10C-His tag	Lp10CF1	~1kb
Pfs48/45-10C-His tag	Lp10CR1	~1kb
Pfs48/45-10C-Flag tag	Lp10CF1	~1kb
Pfs48/45-10C-Flag tag	Lp10CR3	~1kb

### 3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

**Çizelge 3.2.** Histidin etiketi içeren genin PZR bileşen ve miktarları

Bileşen	Miktarı (µl)
DNAaz içermeyen su	22,5
5X Phusion HF Buffer	10
Enhancer	10
dNTPs	1
Lp10CF1 (10 µM)	2,5
Lp10CR1 (10 µM)	2,5
Kalıp DNA	1
Phusion DNA polymerase	0,5
Toplam	50

**Çizelge 3.3.** Histidin etiketi içeren genin PZR döngüsü

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	98	30sn	1
Denatürasyon	98	10sn	
Bağlanma	49	20sn	35
Uzama	72	30sn	
Son Uzama	72	5dk	1

**Çizelge 3.4.** Flag etiketi içeren genin PZR bileşen ve miktarları

Bileşen	Miktarı (µl)
DNAaz içermeyen su	22,5
5X Phusion HF Buffer	10
Enhancer	10
dNTPs	1
Lp10CF1 (10 µM)	2,5
Lp10CR3 (10 µM)	2,5
Kalıp DNA	1
Phusion DNA polymerase	0,5
Toplam	50

**Çizelge 3.5.** Flag etiketi içeren genin PZR döngüsü

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	98	30sn	1
Denatürasyon	98	10sn	
Bağlanma	47,7	20sn	35
Uzama	72	30sn	
Son Uzama	72	5dk	1

PZR ürününün doğrulanması için %1'lik agaroz jel döküldü ve PZR ürünü 110 V da 30 dk. yürütüldü.

### 3.6. PZR Ürününün Saflaştırılması

Elde edilen PZR ürünü, Zymo Research DNA Clean and Concentrator kiti kullanılarak üretici firmanın protokolüne uygun olarak saflaştırıldı ve %1'lik agaroz jelde 110 V da 30 dk. yürütüldü.

### 3.7. PZR Ürünü ve Plazmitin Kesimi

AgeI ve XhoI restriksiyon endonükleaz kesim bölgelerini içeren primerler ile PZR yardımıyla çoğaltılan hedef gen ve aynı kesim bölgelerini içeren modifiye edilmiş pEAQ vektörünün kesimi gerçekleştirildi.

**Çizelge 3.6.** PZR ürünü kesimi bileşen ve miktarları

Bileşen	Miktar (µl)
PZR ürünü (Pfs48/45-10C)	37
AgeI	2,5
XhoI	5
1.1 Buffer (BioLabs)	5
DNAaz içermeyen su	0,5
Toplam	50

**Çizelge 3.7.** Plazmid kesimi bileşen ve miktarları

Bileşen	Miktar (µl)
Plazmid	20
AgeI	2,5
XhoI	5
1.1 Buffer (BioLabs)	5
DNAaz içermeyen su	17,5
Toplam	50

Çizelge 3.7.'de belirtilen bileşenler miktarlarına göre karıştırıldı ve kesimin gerçekleşmesi için 37°C'lik inkübatörde 1 saat için inkübe edildi.

### 3.8. PZR Ürünü ve Plazmitin Agaroz Jelden Geri Kazanımı ve Saflaştırılması

Kesilmiş olan gen ve plazmid uygun miktarda 6X örnek yükleme tamponu (Thermo Scientific 6X, Katalog No: R0611) ile karıştırıldı ve geri kazanım için hazırlanmış büyük kuyucuklu %1'lik jele yüklendi. Jel için: 1,2 g agaroz tartıldı ve üzerine 120 ml 1XTAE tampondan eklendi. Agarozun çözünmesi için yaklaşık olarak 5 dakika mikrodalga fırında bekletildi. Agaroz tamamen eridikten ve sıcaklığı elle tutulabilir sıcaklığa geldikten sonra 2,4 µl Etidyum Bromid (EtBr) eklendi ve hafif bir şekilde karıştırıldı. Karışım önceden hazır hale getirilmiş ve uygun tarak yerleştirilmiş olan elektroforez tankına kabarcık oluşturmadan döküldü. Jelin donması beklendi ve ardından örnekler jele yüklendi. Ayrıca yüklenen örneklerin boyutlarının belirlenmesi amacıyla jele GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific) da yüklendi. Örnekler 100 V da 45 dakika yürütüldü.

UV altında istenen boyuta sahip bantlar jelden bistürü yardımıyla kesilerek 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı. Jelden geri kazanım "Zymoclean Gel DNA Recovery Kit" (Katalog No: D4007) kullanılarak üreticinin önerdiği protokole uygun olarak gerçekleştirildi. Jelden geri kazanılan örneklerin doğrulanması amacıyla %1'lik jel döküldü ve örnekler yüklendikten sonra 110 V da 30 dk. yürütüldü. Daha sonra doğrulanan örnekler -20°C'de saklandı.

### 3.9. Ligasyon Reaksiyonu

**Çizelge 3.8.** Ligasyon reaksiyonu miktar ve bileşenleri

Bileşen	Miktar (µl)
Plazmid	1
10C-W	2
2X Quick Ligase Buffer	10
Quick T4 Ligase	1
DNAaz içermeyen su	7
Toplam	21

Çizelge 3.8.'de belirtilen bileşenler 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpünde karıştırıldıktan sonra düşük hızda santrifüjlendi ve reaksiyonun gerçekleşmesi için oda sıcaklığında 5 dk. inkübe edildi. Karışım transformasyon hemen gerçekleştirilecekse buz üzerinde, daha sonra gerçekleştirilecekse  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

### 3.10. *E. coli* XL1Blue Kompetan Hücre Hazırlanması

100 µl *E. coli* XLI Blue hücreleri 10 ml LB besiyerine ekildi ve  $37^{\circ}\text{C}$ 'lik çalkalamalı inkübatörde 1 gece inkübe edildi. Sonraki gün O.D. ölçüldü (O.D.:4.12). Hücre solüsyonundan 412 µl alınarak 100 ml LB besiyerine ekim yapıldı ve  $37^{\circ}\text{C}$ 'lik çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Hücre solüsyonunun belirli aralıklarla O.D.'si ölçüldü ve yeterli hücre yoğunluğuna ulaşıldığında hücreler inkübasyon alındı. Hücreler 50 ml'lik santrifüj tüpüne alınarak 10 dk. buzda inkübe edildi. Aynı zamanda 1 M ve 0,1 M  $\text{CaCl}_2$  hazırlandı ve buza kondu. Hücreler inkübasyonun ardından  $+4^{\circ}\text{C}$  6000 rpm'de 3 dk. santrifüjlendi ve üst faz atıldı. Pelet üzerine soğuk 0,1 M  $\text{CaCl}_2$  eklenerek hücreler çözdürüldü ve buz üzerinde 20 dk. inkübasyona bırakıldı. Bu esnada 0,1 M  $\text{CaCl}_2$ /15 gliserol solüsyonu (1 ml 1 M  $\text{CaCl}_2$ , 3 ml %50 gliserol, 6 ml distile su) hazırlanarak buza kondu. İnkübasyonun ardından hücreler  $+4^{\circ}\text{C}$  6000 rpm'de 3 dk. santrifüjlendi ve üst faz atıldı. Pelet 5 ml soğuk 0,1 M  $\text{CaCl}_2$ /15 gliserol solüsyonu içinde çözdürüldü ve 1,5 ml'lik tüplere 100 µl olacak şekilde paylaştırılarak  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

### 3.11. *E. coli* Hücrelerine Transformasyon ve Plazmid İzolasyonu

Ligasyon ürünü *E. coli* hücrelerine ısı şoku yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Ligasyon ürünü üzerine daha önce hazırlanmış,  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de tutulan 100 µl *E. coli* XL1Blue hücreleri eklendi. Karışım pipetaj yapılarak karıştırıldıktan sonra buz üzerinde 30 dk. inkübe edildi.

İnkübasyondan sonra karışım 42°C'lik su banyosunda 50 saniye tutuldu ve hemen buz üzerine alınarak 5 dk. inkübe edildi. Karışım üzerine 400 µl LB besiyeri eklenerek, çalkalamalı inkübatörde 37°C 225 rpm'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücreler 2000Xg'de 3 dk. santrifüjlendi. Çökmüş olan hücreler 100 µl süpernatant ile çözdürüldükten sonra 50µg/ml kanamisin içeren LBA petriye öze yardımıyla yayma işlemi yapıldı ve 37°C'lik inkübatörde bir gece inkübe edildi. Yaklaşık 18 saat sonra petrilere koloni gözlemlendi. Koloniler 50 µg/ml kanamisin içeren 5 ml LB besiyerine ekildi ve 37°C'de 225 rpm'de bir gece inkübe edildi.

Plazmidler, *E. coli* XL1Blue hücrelerinden Zippy Plasmid Miniprep Kiti (Zymo Reseach, ABD) kullanılarak üreticinin tavsiye ettiği protokole uygun olarak izole edildi ve sonraki kullanımlar için -20°C'de saklandı.

### 3.12. *A. tumefaciens* AGLI psoup Kompetan Hücre Hazırlanması

*A. tumefaciens* AGLI psoup hücreleri 5 µg/ml tetrasiklin içeren 20 ml LB içerisine ekildi ve 28°C'lik çalkalamalı inkübatörde gece boyu 225 rpm'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası O.D. ölçüldü (2,507) ve hücreler 50 ml'lik santrifüj tüplerine alınarak buz üzerinde 5 dk. inkübe edildi. Hücreler +4°C 3000Xg'de 5 dk. santrifüjlendi ve üst faz atıldı. Pelet üzerine 20 ml %10'luk gliserol eklenerek çözdürüldükten sonra +4°C 3000Xg'de 5 dk. santrifüjlendi ve üst faz atıldı. Pelet üzerine 2,5 ml %10'luk gliserol eklenerek çözdürüldü ve 1,5 ml'lik tüplere 100 µl olacak şekilde paylaştırılarak -80°C'de saklandı.

### 3.13. *A. tumefaciens* Hücrelerine Transformasyon ve *N. Benthamiana* Bitkisine İnfiltrasyon

*E. coli* hücrelerinde çoğaltılan ve izolasyonu yapılan 10C-W genini içeren LpI plazmiti istenen proteini üretmesi için *A. tumefaciens* hücrelerine aktarıldı. Plazmid, elektroporasyon yöntemi kullanılarak *A. tumefaciens* hücrelerine aktarıldı. Daha önce hazırlanmış, -80°C'de tutulan 100 µl *A. tumefaciens* AGLIpsoup kompetan hücreleri üzerine 1 µl plazmid eklendi ve pipetaj yapılarak karıştırıldı. Karışım elektroporasyon küvetine alınarak elektrik şoku uygulandı. Şokun ardından hemen hücrelerin üzerine 1ml SOC besiyeri eklendi ve pipet yardımıyla karıştırılarak 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı. Hücreler 28°C'lik çalkalamalı inkübatörde 2 saat 225 rpm'de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücreler 2000xg'de 3 dk. santrifüjlendikten sonra 50µg/ml kanamisin içeren LBA petriye öze yardımıyla yayma işlemi yapıldı ve 28°C'lik inkübatörde üç gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrası oluşan kolonilerden seçilerek 50µg/ml kanamisin içeren BBL besiyerine ekim yapıldı. Hücreler 28°C'lik çalkalamalı inkübatörde bir gece için inkübe edildi.

İnkübasyon sonrası çoğalmış olan hücrelerin optik dansitesi ölçüldü (O.D.  $\geq$  1) ve değerler not edildi. Hücre solüsyonunun bir kısmı stok yapılması amacıyla %90'lık gliserol çözeltisi ile 1:1 oranında karıştırılarak 1ml olarak tüplere paylaştırıldı ve kullanıma kadar -80°C'de saklandı. Hücre solüsyonunun geri kalanı +4°C 5000Xg'de 5 dk. santrifüjlendi. Süpernatant atılarak çökmüş olan hücreler asetosyringene ilave edilmiş MMA besiyerinde O.D.:1 olacak

şekilde sulandırılarak çözdürüldü. Daha sonra hücreler manyetik karıştırıcı üzerinde oda sıcaklığında 2 saat boyunca inkübe edildi.

İnkübasyonun ardından glikosillenmiş protein üretimi için 10C-W genini içeren hücre solüsyonu O.D.:1 olacak şekilde şırınga yardımıyla bitkiye infiltre edildi. Glikosillenmemiş protein üretimi için hedef geni içeren hücre solüsyonu ve glikosilasyonu engelleyecek olan proteinin anlatımını sağlayacak geni içeren hücre solüsyonu ile çeşitli oranlarda karıştırılarak bitkiye birlikte enjekte edildi. 10C-W ve Endo H 9:1 oranında; 10C-W ve PNGase F 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5 oranında karıştırılarak bitkiye infiltre edildi.

### 3.14. Bitkiden Protein Ekstraksiyonu

Hücre solüsyonlarının bitkiye infiltre edilmesinden 5 gün sonra (dpi, day post infiltration) infiltre edilmiş yapraklar toplandı. Yapraklardan 1g alındı ve yaprak ağırlığının üç katı kadar 1XPBS tamponu ile havan ve havaneli yardımıyla ezildi. 1ml homojenat 1,5ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alınarak 20000Xg'de 5 dk. santrifüjlendi. Üst faz yeni bir tüpe aktarıldıktan sonra, analizler için süpernatantdan 40 µl, örnek yükleme tamponundan 10 µl alınarak karıştırıldı. Daha sonra kullanım için -20°C'de saklandı.

### 3.15. SDS-PAGE ve Western Blot Analizi

SDS-PAGE analizi için %10'luk jel döküldü. Örnekler 100°C 5 dk. su banyosunda kaynatıldıktan sonra jele yüklendi ve 100 V 13 dk./200 V 45 dk. olacak şekilde yürütüldü. Yürütme işleminin ardından stacking jel kesilip atıldı ve 5 dk. için tamponu uzaklaştırmak amacıyla distile su içerisinde karıştırıcı üzerine kondu. Distile su uzaklaştırıldıktan sonra jelin yüzeyini kapatacak kadar jel boyama çözeltisi eklendi ve 1 saat karıştırıcıda tutuldu. Süre sonunda boyanın uzaklaştırılması amacıyla 15 dk. aralıklarla boya jelden uzaklaştırılana kadar jel boya uzaklaştırma solüsyonu ile yıkandı. Boya jelden tamamen uzaklaştırıldıktan sonra jelin görüntüsü alındı.

Western Blot analizi için SDS-PAGE de olduğu gibi %10'luk jel döküldü. Örnekler 100°C 5 dk. su banyosunda kaynatıldıktan sonra jele yüklendi ve yürütme tamponu ile 100 V 13 dk./200 V 45 dk. olacak şekilde yürütüldü. Yürütme işleminin ardından stacking jel kesilip atıldı. Jelde bulunan bantların membrana geçmesi amacıyla jel ve membran sandwich kaseti oluşturuldu ve transfer tamponu ile 100 V da 1 saat işlem gerçekleştirildi. Blotlama işleminin ardından membran %0,5'lik I-Block solüsyonunda 1 saat karıştırıcı üzerinde inkübe edilerek istenmeyen bantların bloklanması sağlandı. 1 saat sonrasında membran birincil antikor ile 1 saat için muamele edildi (Histidin etiketli proteinler için anti-6XHis monoklonal antikor Cat. no. 652502, BioLegend; flag etiketli proteinler için). Ardından membran 3X5 dk. I-Block solüsyonu ile yıkandı. Yıkamaların ardından membran 1 saat için ikincil antikor ile muamele edildi. Daha sonra membran 3X5 dk. I-Block 1X5 dk. 1X TBS ile yıkandı. Membran son olarak SuperSignal West Pico Stable Peroxide (2,5 ml) ve Luminol/ Enhancer (2,5 ml) solüsyonları (SuperSignal West Pico, Thermo Fisher Scientific Grand Island, NY) ile muamele edildi. Membran GeneGnome XRQ Chemiluminescence görüntüleme sistemi (Syngene Corp, ABD) kullanılarak görüntüsü alındı.

### 3.16. 6XHis Etiketli Pfs48/45-10C' nun glikosillenmiş ve glikosillenmemiş formlarının pürifikasyonu

10C-W (His etiketli)'nun glikosillenmiş ve glikosillenmemiş formu, HisPur Ni-NTA (Thermo) yerçekimi akış (gravity-flow) kolon kromatografisi kullanılarak *N. benthamiana* yapraklarından pürifiye edildi. Pfs48/45-10C'nun pürifikasyonu için 25 g dondurulmuş yaprak havan ve havaneli kullanılarak 75 ml ekstraksiyon tamponu (1XPBS/10mM İmidazole, 1mM DIECA pH 7.4) içinde öğütüldü. Posa gazlı bezden geçirilerek süzüldü ve süzüntü +4 derece, 20000Xg de 30 dakika santrifüjlendi. Süpernatant 0.45 µm'lik filtreli şırınga ile süzüldü. HisPur Ni-NTA (Thermo) yerçekimi akış kolonu (HisPur Ni-NTA rezin, Thermo) üreticinin talimatlarına uygun bir şekilde hazırlandı. Kolon rezin miktarının 2 katı bağlayıcı tampon (1XPBS/10mM İmidazole, pH 7.4) ile yıkandı. 75 ml süpernatant, bağlayıcı tampon ile dengelenmiş 2 ml rezin içeren kolondan geçirildi. Kolon rezinin, 10 katı kadar yıkama tamponu (1XPBS/25mM İmidazole, pH: 7.4) ile yıkandı. Yıkamadan sonra, rezine bağlı proteinlerin alımı için elüsyon tamponu (1XPBS/250 mM İmidazole, pH: 7.4) kolondan geçirildi ve fraksiyonlar tüplere toplandı. Ayrıştırılmış fraksiyonlar SDS-PAGE ile analiz edildi; birleştirilip Amicon Ultra 0.5 ml santrifüj filtreleri kullanılarak konsantre edildi. Konsantre edilen örnekler -80°C de kullanılabilece kadar muhafaza edildi. Saflaştırılmış örneklerin SDS-PAGE analizi yapıldı.

### 3.17. Flag Etiketli Pfs48/45-10C' nun glikosillenmiş ve glikosillenmemiş formlarının pürifikasyonu

10C-W (Flag etiketli)'nun glikosillenmiş ve glikosillenmemiş formlarının pürifikasyonu, anti-Flag (DYKDDDDK) etiketli afinity rezin kullanılarak gerçekleştirildi. 10C-W (Flag etiketli) *N. benthamiana* yapraklarından anti-FLAG antibody (BioLegend) kolon kromatografisi kullanılarak pürifiye edildi. 10 g dondurulmuş yaprak 30 ml ekstraksiyon tampon (1xPBS/0.5M NaCl, 1 mM DIECA) içinde havan ve havaneli kullanılarak öğütüldü. Posa, gazlı bezden geçirilerek süzüldü ve süzüntü +4 derece, 20000Xg de 30 dakika santrifüjlendi. Süpernatant 0.45 µm'lik filtreli şırınga ile süzüldü. Anti-Flag afinity jel kolonu (Anti-FLAG Afinity jel, BioLegend) üreticinin talimatlarına uygun bir şekilde hazırlandı. Kolon rezin miktarının 10 katı bağlayıcı tampon ile yıkandı. 34 mililitre süpernatant, bağlayıcı tampon ile dengelenmiş 0.75 ml rezin içeren kolondan geçirildi. Kolon rezinin 10 katı kadar bağlayıcı tampon ile yıkandı. Yıkamadan sonra, rezine bağlı proteinlerin ayrışması için; Elüsyon tamponu (200 mM Glycine/150mM NaCl Ph: 2.2) kolondan geçirilerek, nötralizasyon için 2M Tris solüsyonu içeren tüplere toplandı. Elüsyon tamamlandıktan sonra kolon, yüksek tuz oranlı yıkama tamponu (50 mM Tris/2M NaCl pH: 8.0) ile yıkandı. Ayrıştırılmış fraksiyonlar SDS-PAGE ile analiz edildi; birleştirilip Amicon Ultra 0.5 ml santrifüj filtreleri kullanılarak konsantre edildi. Konsantre edilen örnekler -80°C de kullanılabilece kadar muhafaza edildi.

Saflaştırılmış örneklerin SDS-PAGE analizi yapıldı.



### 3.18. Saflaştırılmış Proteinlerinin Glikan Saptama Analizleri

Saflaştırılmış Pfs48/45-10C varyantlarının glikan saptama analizi Pro-Q Emerald 300 glikoprotein boyama kiti kullanılarak yapıldı. Saflaştırılmış proteinler 10%’luk SDS-PAGE’de yürütüldükten sonra jel Pro-Q Emerald 300 glikoprotein boyama kiti ile üretici tarafından belirtilen protokole uygun olarak gerçekleştirildi.

### 3.19. Pfs48/45’e Karşı Oluşturulmuş Fare Monoklonal Antikorları ile Pfs48/45-10C Varyantlarının Western Blot Analizi

Bitkide üretilen malaria antijenlerinin Pfs48/45 karşıtı fare monoklonal antikorlarıyla karşı reaktivitesini test etmek için, indirgenmiş ve irdirgenmemiş örnekler Native-PAGE de yürütüldü. Öncelikle SDS içermeyen %10’luk jel döküldü. Ayrıca SDS içermeyen yürütme tamponu ve transfer tamponu hazırlandı. İndirgenmiş örnekler önceki çalışmalarda kullanılan örnek yükleme tamponu ile karıştırılıp, 100°C de 5 dk. kaynatılırken; indirgenmemiş örnekler için SDS ve merkaptotanol içermeyen örnek yükleme tamponu kullanıldı ve örnekler kaynatılmadı. Jelin yürütme aşaması 125 V/150 dk., transfer aşaması ise 100 V/60 dk. olarak gerçekleştirildi. PVDF membrana transfer edilmiş proteinler, birincil antikor olarak mAb IIC5-B10 antikor (mAb) ile 2 saat muamele edilmiştir. mAb IIC5-B10 antikor, Pfs48/45 e özgül uyarlanmış bir monoklonal antikordur (mAb). anti-Pfs48/45 mAb salgılayan MRA-316 fare hibridoma hücreleri BEI resources, Manassas, VA, USA ‘dan hibe olarak teslim alınmıştır. Deneyin geri kalanı daha önce açıklanmış olan western blot analizinde olduğu gibi yapılmış ve sonuçlar analiz edilmiştir.

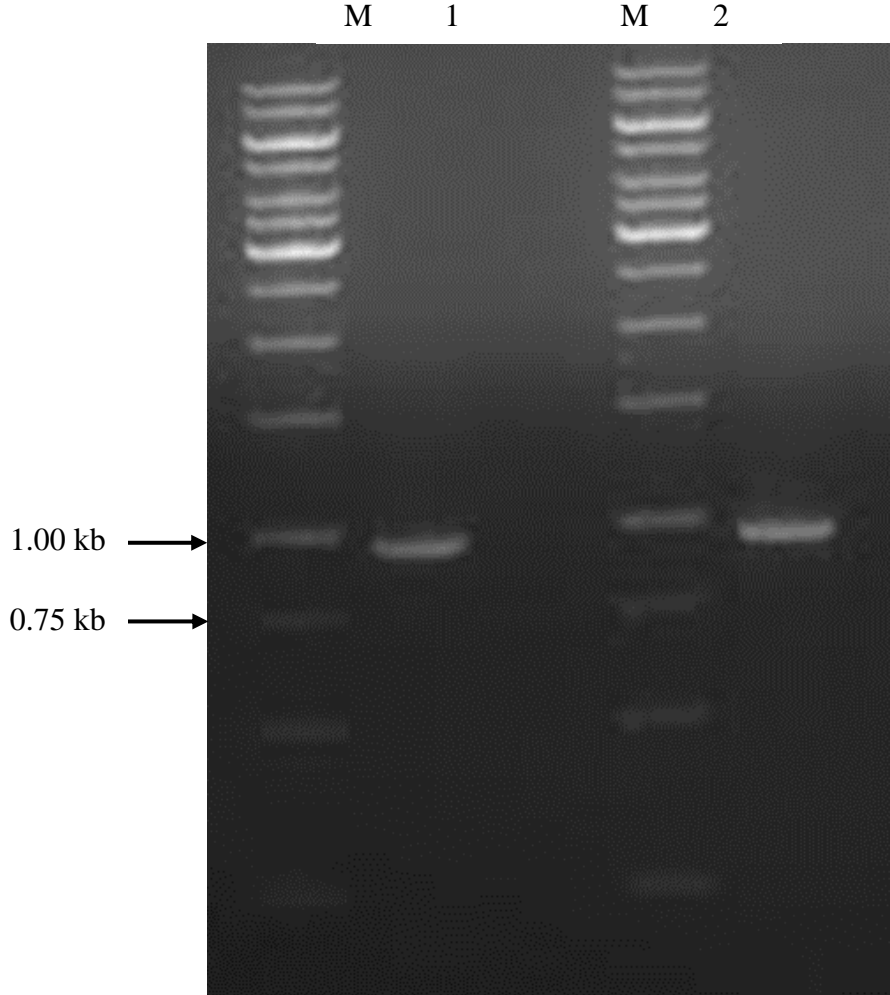
### 3.20. Saflaştırılmış Pfs48/45-10C varyantlarının Stabilizasyon Testi

Saflaştırılmış proteinler, belirli bir konsantrasyonda olacak şekilde mikrosantrifüj tüplerine koyuldu. Tüpler, +4°C’de 1 saat, 37°C’de 1, 4, 8, 16 ve 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sürelerinden ardından proteinler ile örnek yükleme tamponu uygun miktarlarda karıştırıldı ve örnekler kaynatıldı. Tüpler düşük devirde 15 saniye santrifüjlendikten sonra %10’luk jele yüklendi ve SDS-PAGE analizi devam ettirildi.

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

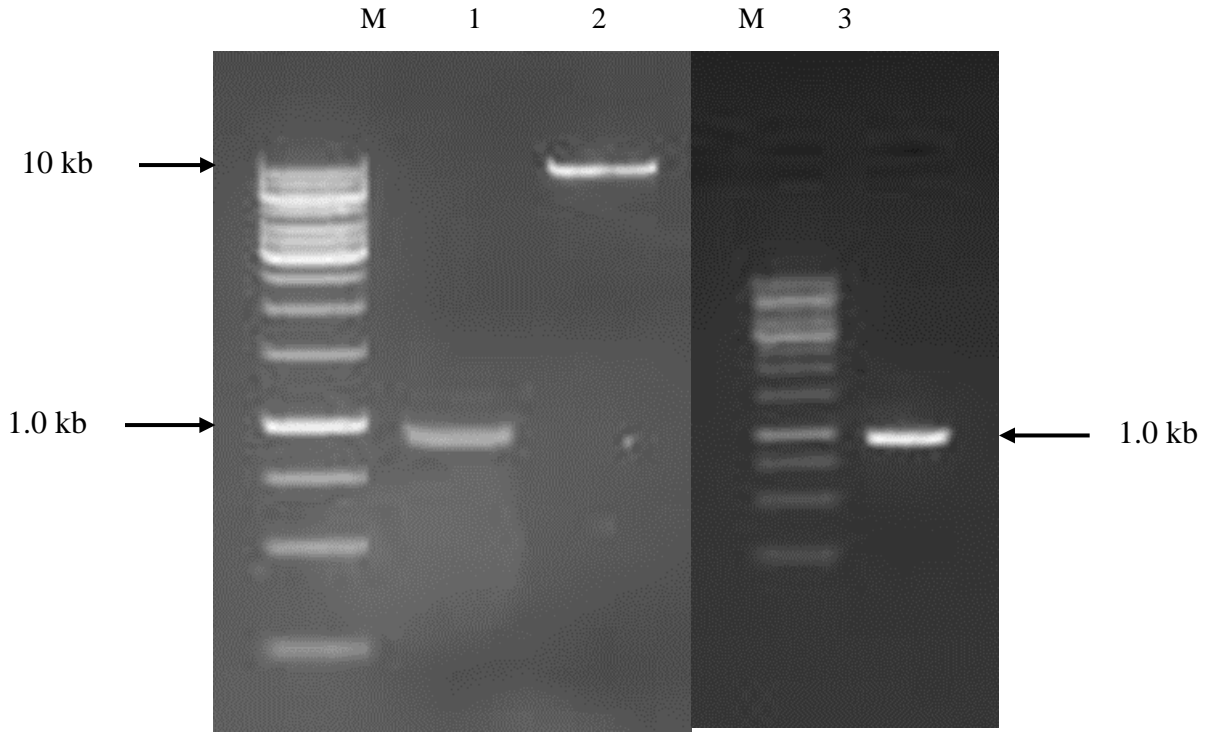
### 4.1. 10C-W Geninin Klonlanması

GENEART AG tarafından sentezlenmiş olan Pfs48/45 geni kalıp DNA olarak kullanılarak PZR aracılığıyla *10C-W* geninin amplifikasyonu yapıldı (amino asit 159±401, GenBank erişim numarası EU366251).

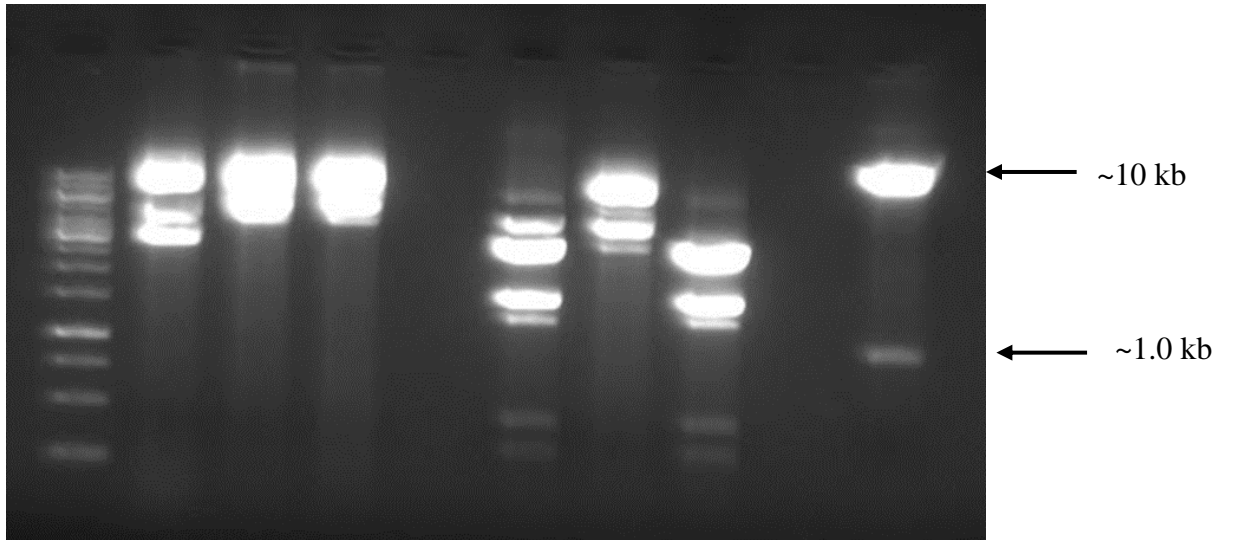


**Şekil 4.1. 1:** 10C-W-His6 **2:** 10C-W-Flag genlerinin PZR aracılığıyla çoğaltılması **M:** Gene Ruler 1kb DNA Ladder

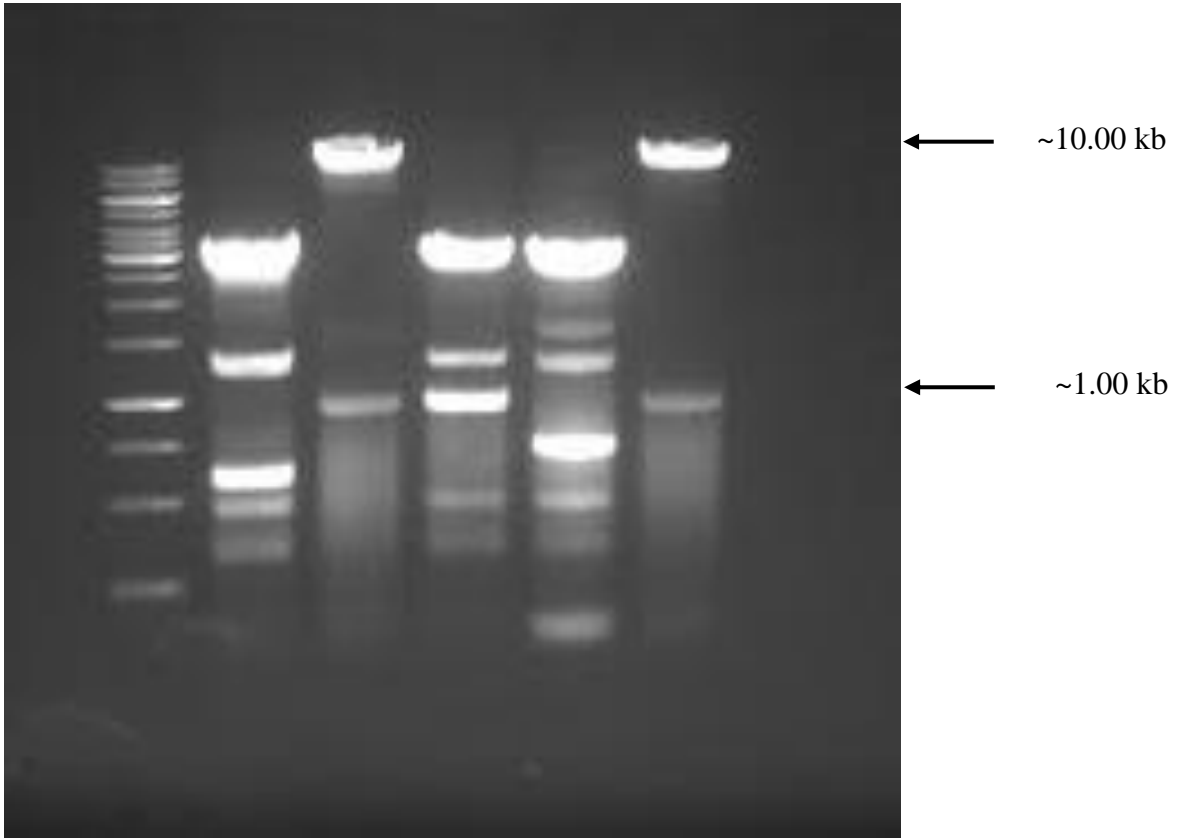
PZR ürünü ve LpI plazmiti uygun kesim enzimleriyle kesildi ve jelden geri kazanıldı. 10C-W geninin LpI plazmiti ile ligasyonu gerçekleştirildi ve ısı şoku yöntemi ile *E. coli* XLI Blue kompetan hücrelerine aktarıldı. Varsayılan kolonilerden plazmid izolasyonu yapıldı ve restriksiyon enzim kesimi aracılığıyla doğrulandı.



**Şekil 4.2.** Jelden geri kazanım ürünleri. **1:** 10C-W-Flag **2:** LpI plazmidi **3:** 10C-W-His6 **M:** Gene Ruler 1kb DNA Ladder



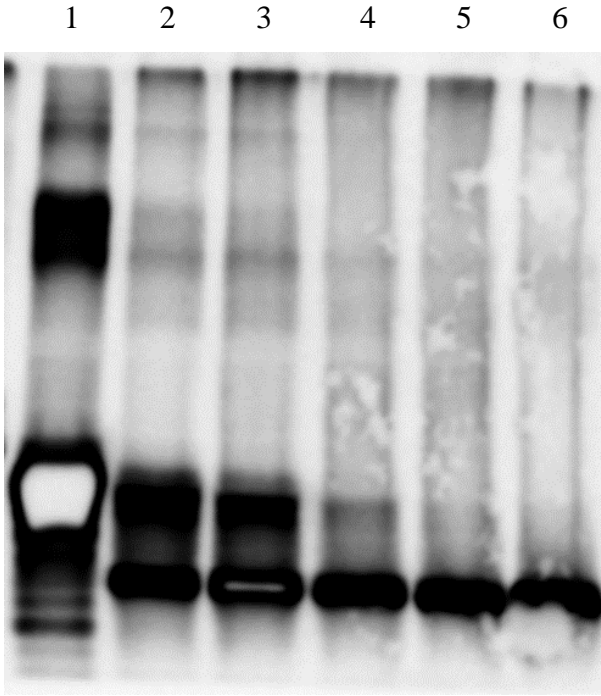
**Şekil 4.3.** LpI-10C-W-His6 plazmitini içerdiği düşünülen olası kolonilerden pürifiye edilen ve doğrulama amaçlı kesimi yapılan plazmitler



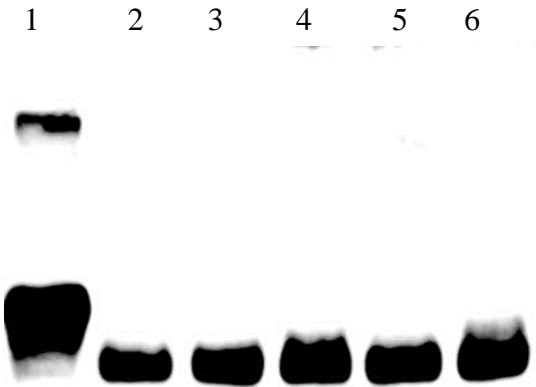
**Şekil 4.4.** LpI-10C-W-Flag plazmitini içerdiği düşünülen olası kolonilerden pürifiye edilen ve doğrulama amaçlı kesimi yapılan plazmitler

#### 4.2. Rekombinant Pfs48/45-10C Varyantlarının Üretilmesi

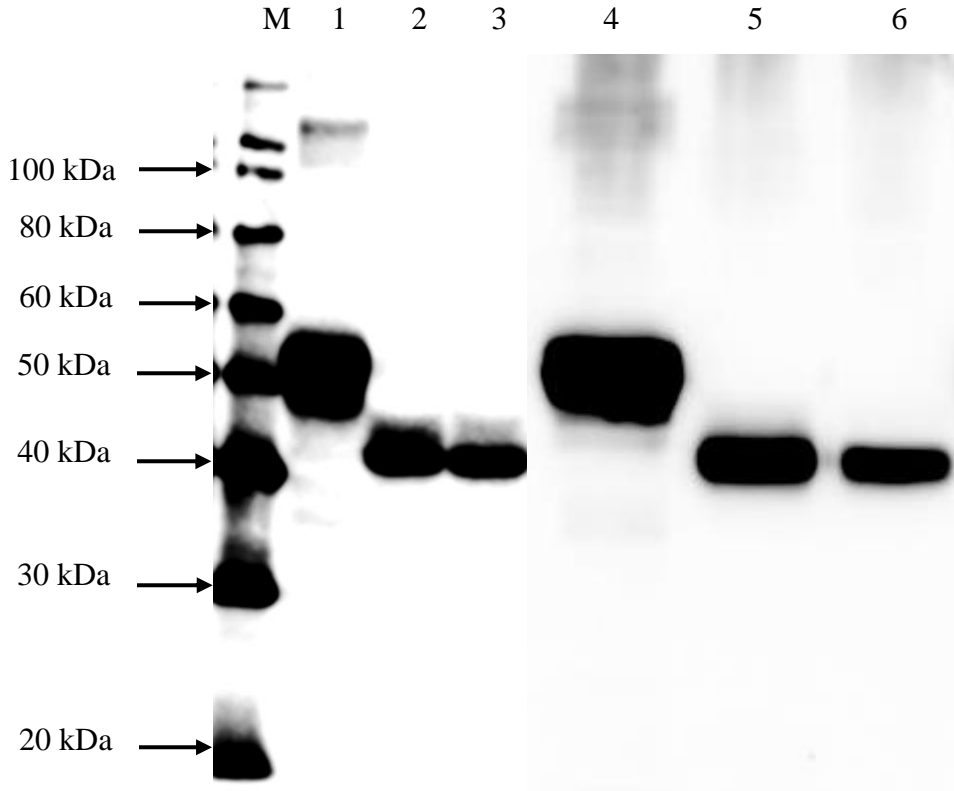
LpI-10C-W plazmitleri *E. coli* XLI Blue hücrelerinde çoğaltıldı ve doğrulanması amacıyla restriksiyon enzimleri ile kesildi. Elde edilen doğru plazmitler *A. tumefaciens* AGL1-psoup kompetan hücrelerine elektroporasyon yöntemi ile aktarıldı ve plazmiti içeren *A. tumefaciens* hücreleri, protein üretimi amacıyla materyal-metotta anlatıldığı üzere bitkiye infiltre edildi. Pfs48/45-10C proteininin glikosillenmemiş varyantının oluşturulması için Pfs48/45-10C proteini farklı oranlarda Endo H ve PNGase F ile birlikte anlatımı yapıldı ve glikosillenmeyi engelleyen en iyi oran ile çalışmaya devam edildi. İnfiltrate edilmiş yapraklar, infitrazyondan beş gün sonra toplanarak daha önce açıklandığı üzere ekstrakte edildi. Elde edilen örneklerden protein üretiminin doğrulanması amacıyla western blot analizi yapıldı. Analiz sonrası istenen boyutlarda bantlar elde edildi böylece istenen rekombinant proteinin üretilmiş olduğu doğrulandı.



**Şekil 4.5.** PNA Gase F infiltrasyon oranlarının optimizasyonu **1:** Pfs48/45-10C (OD:1.0) **2:** Pfs48/45-10C (OD:0.9)+PNGase F (OD:0.1) **3:** Pfs48/45-10C (OD:0.8)+ PNGase F (OD:0.2) **4:** Pfs48/45-10C (OD:0.7)+ PNGase F (OD:0.3) **5:** Pfs48/45-10C (OD:0.6)+ PNGase F (OD:0.4) **6:** Pfs48/45-10C (OD:0.5)+ PNGase F (OD:0.5)



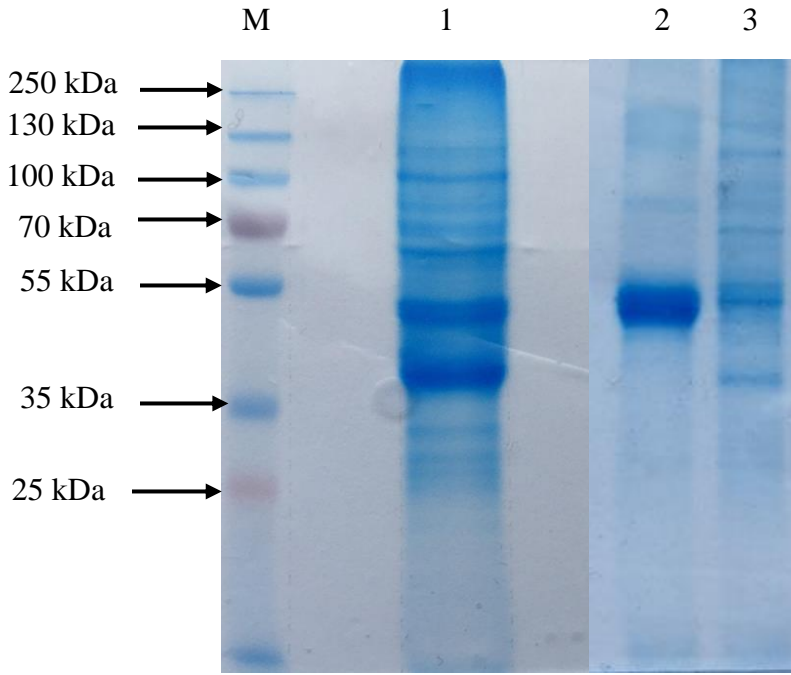
**Şekil 4.6.** Endo H infiltrasyon oranlarının optimizasyonu **1:** Pfs48/45-10C (OD:1.0) **2:** Pfs48/45-10C (OD:0.9)+Endo H (OD:0.1) **3:** Pfs48/45-10C (OD:0.8)+Endo H (OD:0.2) **4:** Pfs48/45-10C (OD:0.7)+Endo H (OD:0.3) **5:** Pfs48/45-10C (OD:0.6)+Endo H (OD:0.4) **6:** Pfs48/45-10C (OD:0.5)+Endo H (OD:0.5)



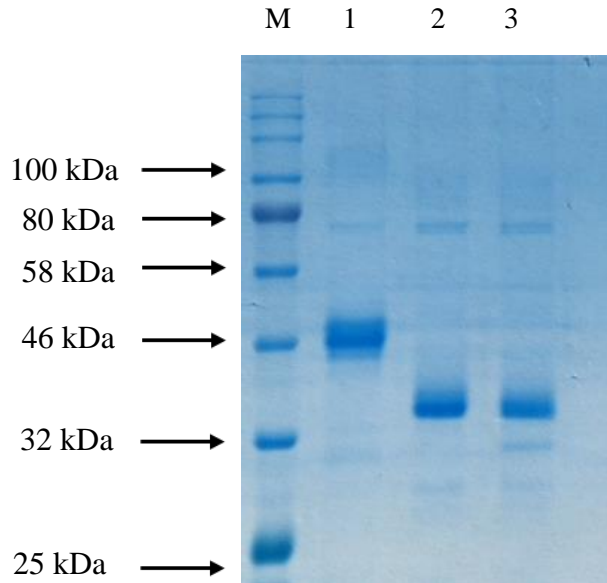
**Şekil 4.7.** Optimize edilmiş oranlar kullanılarak yapılan biyokütle western blot analizi **1:** Pfs48/45-10C-His (OD:1.0) **2:** Pfs48/45-10C-His (OD:0.9)+Endo H (OD:0.1) **3:** Pfs48/45-10C-His (OD:0.6)+ PNGase F (OD:0.4) **4:** Pfs48/45-10C-Flag (OD:1.0) **5:** Pfs48/45-10C-Flag (OD:0.9)+Endo H (OD:0.1) **6:** Pfs48/45-10C-Flag (OD:0.6)+ PNGase F (OD:0.4) **M:** MagicMark™ XP Western Protein Standard (Catalog number: LC5602, ThermoFisher Scientific)

### 4.3. Rekombinant Pfs48/45-10C Varyantlarının Saflaştırılması

Histidin ve Flag etiketli rekombinant Pfs48/45-10C varyantlarının saflaştırılması materyal ve metotta anlatıldığı üzere yapılmıştır. Histidin etiketli Pfs48/45-10C varyantlarının saflaştırılması sonucu yapılan analizlerde glikosillenmiş Pfs48/45-10C proteini yeterli saflıkta elde ediliyorken; glikosillenmemiş Pfs48/45-10C proteinin yeterli saflıkta üretilmediği gözlemlendi. Flag etiketli Pfs48/45-10C varyantlarının saflaştırılması sonucu proteinlerin yeterli saflıkta elde edildiği gözlemlendi. Histidin etiketli proteinlerin saflığının yeterli olmasından dolayı çalışmanın devamında flag etiketli proteinler kullanılmıştır.



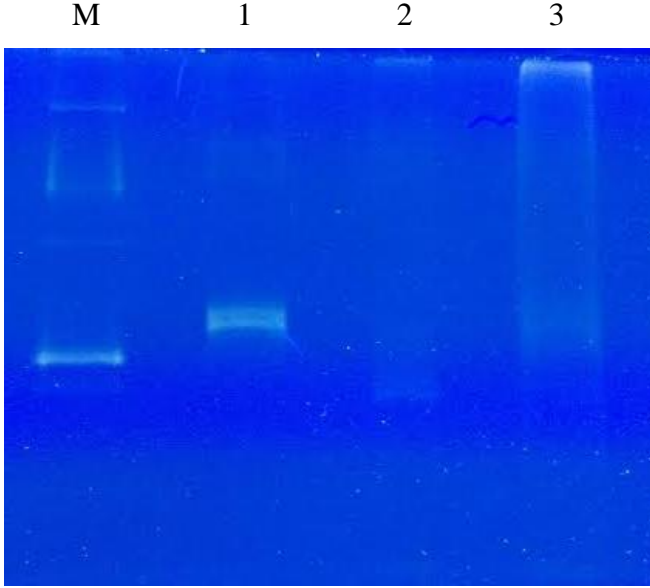
**Şekil 4.8.** Saflaştırılmış histidin etiketli Pfs48/45-10C varyantlarının SDS-PAGE analizi **1:** d10C-W (Endo H): Endo H *in vivo* deglikosile 10C-W **2:** 10C-W: *in vivo* glikosile **3:** d10C-W (PNGase F): PNGase F *in vivo* deglikosile 10C-W **M:** Color prestained protein standard (cat. no. P7712 S New England Biolabs)



**Şekil 4.9.** Saflaştırılmış flag etiketli 10C-W varyantlarının SDS-PAGE analizi **1:** 10C-W: *in vivo* glikosile **2:** d10C-W (Endo H): Endo H *in vivo* deglikosile 10C-W **3:** d10C-W (PNGase F): PNGase F *in vivo* deglikosile 10C-W **M:** Color prestained protein standard (cat. no. P7712 S New England Biolabs)

#### 4.4. Saflaştırılmış Pfs48/45-10C Varyantlarının Glikan Saptama Analizi

Saflaştırılmış proteinler 10%'luk SDS-PAGE'de yürütüldükten sonra jel Pro-Q Emerald 300 glikoprotein boyama kiti ile üretici tarafından belirtilen protokole uygun olarak gerçekleştirildi. Analiz sonrası beklendiği gibi glikosile 10C-W proteininde ışına meydana gelirken deglikosile formunda ışına çok az veya yok denecek kadar az gerçekleşti. Böylece istenilen Pfs48/45 varyantlarının doğru bir şekilde üretildiği kanıtlanmış oldu.

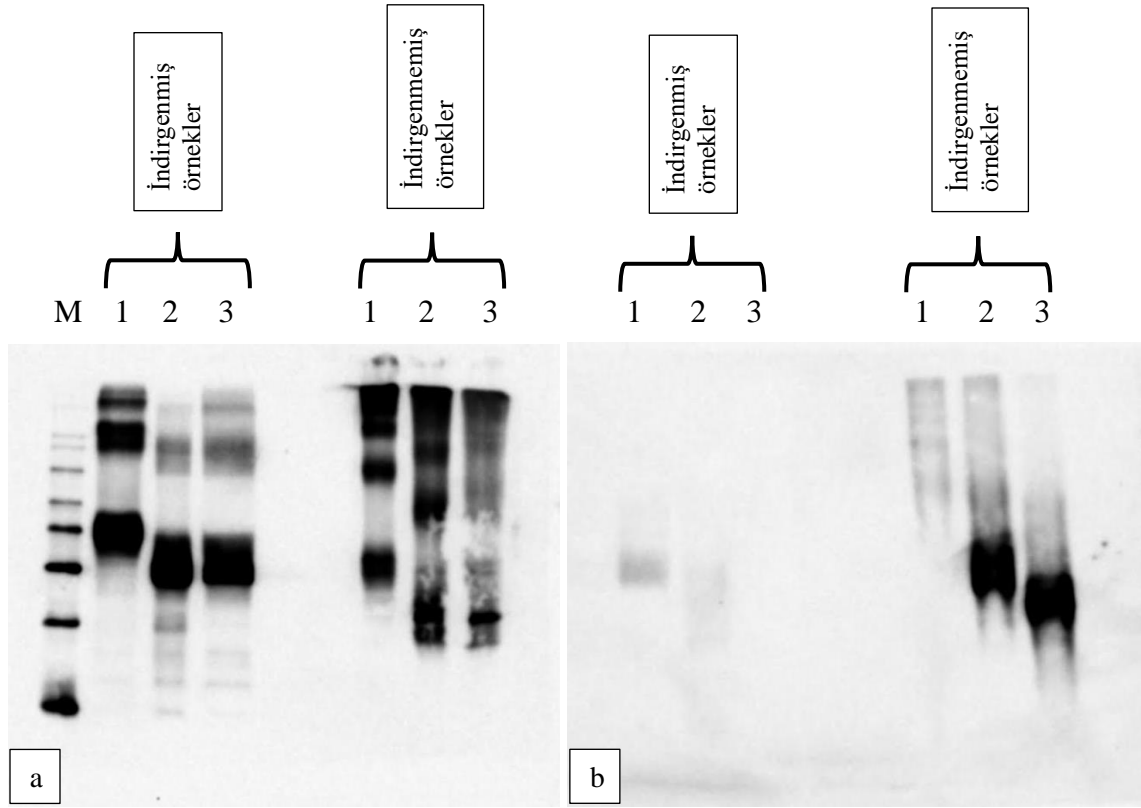


**Şekil 4.10.** Saflaştırılmış Pfs48/45-10C varyantlarının glikan saptama analizi **1:** Glikosile 10C-W **2:** Deglikosile 10C-W (Endo H) **3:** Deglikosile 10C-W (PNGase F) **M:** CandyCane™

#### 4.5. Pfs48/45'e Karşı Oluşturulmuş Fare Monoklonal Antikorları ile Pfs48/45-10C Varyantlarının Western Blot Analizi

Bitkide üretilen Pfs48/45-10C antijeninin, Pfs48/45 karşıtı fare monoklonal antikorlarıyla karşı reaktivitesini test etmek için, indirgenmiş ve indirgenmemiş örnekler Native-PAGE de yürütüldü, PVDF membrana transfer edildi ve membrandaki proteinler Pfs48/45'e özgül uyarlanmış monoklonal antikor (mAb) ile muamele edildi. Analiz sonucunda proteinlerin deglikosile formlarının glikosile formlarına kıyasla daha fazla karşı reaktivite gösterdiği gözlemlendi. Pfs48/45 e özgül uyarlanmış monoklonal antikorların, Pfs48/45-10C *in vivo* deglikosile varyantlarınca tanınmış olması, *in vivo* deglikosile formlarının doğru katlandığını göstermektedir.

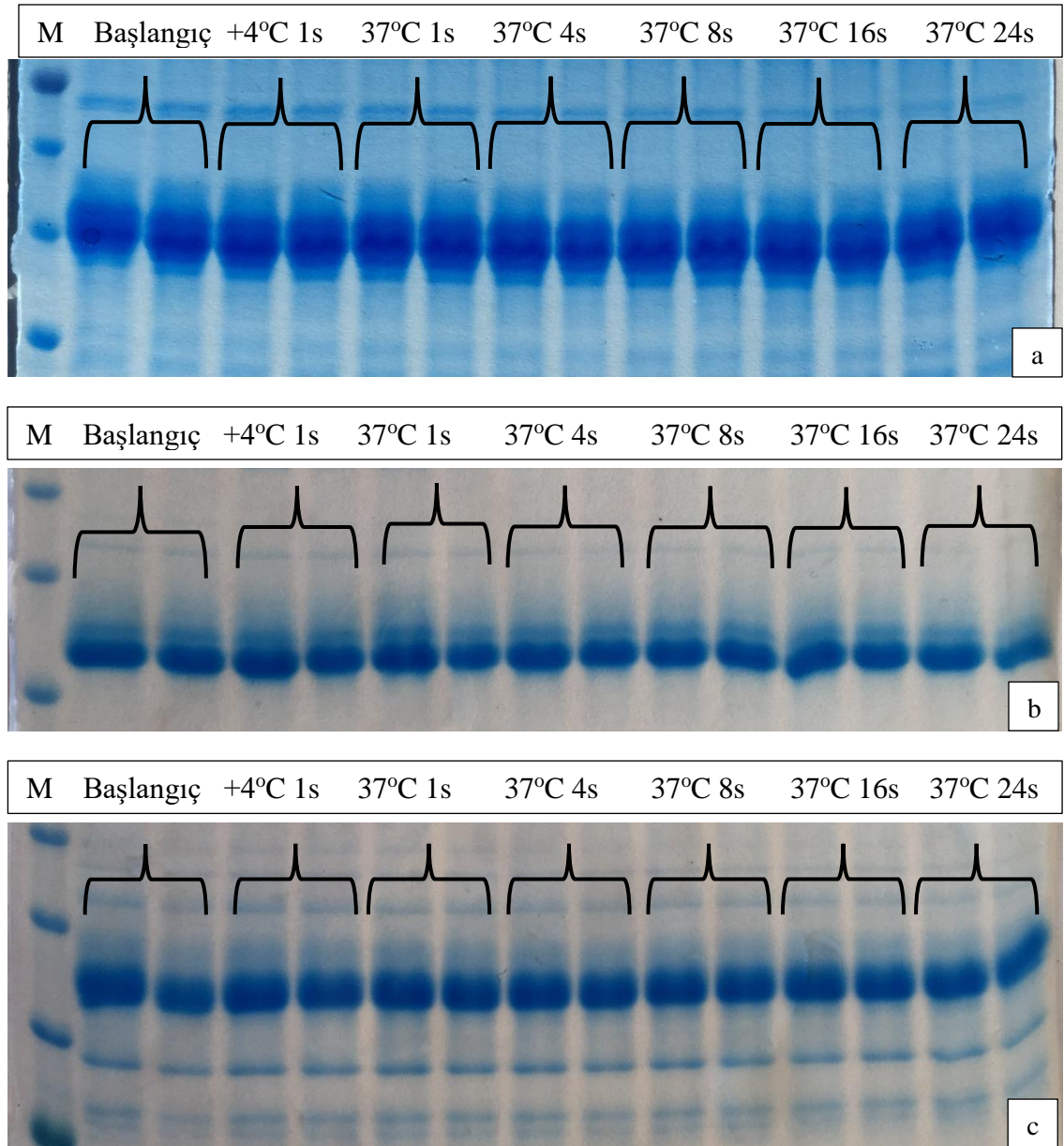




**Şekil 4.11.** a) Native-PAGE de kullanılan örneklerin SDS-PAGE analizi; b) Pfs48/45-10C varyantlarının Pfs48/45 karşıtı monoklonal antikorlar ile western blot analizi **1:** glikosile 10C-W **2:** d10C-W (Endo H) **3:** d10C-W (PNGase F) **M:** MagicMark™ XP Western Protein Standard (Catalog number: LC5602, ThermoFisher Scientific)

#### 4.6. Saflaştırılmış Pfs48/45-10C ve Varyantlarının Stabilizasyon Testi

Saflaştırılmış örneklerin stabilizasyon testi daha önce açıklandığı gibi yapılmıştır. Analiz sonucunda Pfs48/45-10C varyantlarının yarı ömrünün oldukça uzun olduğu; aşılama durumunda vücut içinde stabilitesini koruyacağı sonucuna varılmıştır.



**Şekil 4.12.** Safılaştırılmış Pfs48/45-10C varyantlarının stabilizasyon deneyi sonrası SDS-PAGE analizi **a)** glikosile 10C-W; **b)** d10C-W (Endo H); **c)** d10C-W (PNGase F)

## 5. SONUÇ

Günümüzde sıtmaya karşı birçok aşı geliştirilme aşamasında olmasına rağmen yeterli derecede koruma sağlayan etkili bir aşı henüz bulunmamaktadır. Bu çalışmada bulaşmayı bloke edici aşı geliştirilmesindeki en önemli adaylardan biri olan Pfs48/45 proteininin 10C domaininin parazitte olduğu gibi glikosilasyona uğramadan doğru bir şekilde katlanmış ve bitkide geçici anlatımı yapılarak üretilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda ilgili genin klonlanması, *N. benthamiana* bitkisinde proteinin üretilmesi ve üretilen proteinlerin işlevselliği gösterilmiş ve kanıtlanmıştır.

Rekombinant proteinlerin üretimi için bitki, bakteri, maya, böcek ve memeli hücre kültürü gibi birçok ekspresyon sistemi geliştirilmiş ve kullanılmaktadır. Son zamanlarda bitkilerde geçici gen anlatımı, proteinlerin üretilmesi için alternatif bir sistem olarak karşımıza çıkmaktadır. Bitki ekspresyon sisteminin diğer ekspresyon sistemleri ile karşılaştırıldığında, ökaryotik translasyon sonrası modifikasyon mekanizmalarına sahip olması ve geçici gen ifadesi sayesinde hedef proteini yapraklarında bir haftadan kısa bir sürede yüksek miktarda üretebilmesi gibi önemli avantajları mevcuttur. Bitki ekspresyon sistemlerinin kolay ölçeklenebilirliği, üretimin daha ekonomik olması ve insan patojenlerini barındırmaması nedeniyle daha güvenilir olması diğer avantajlarıdır.

Protein bazlı alt birim aşı adaylarının geliştirilmesinde dikkat edilmesi gereken en önemli nokta translasyon sonrası modifikasyonların uygun ve doğru bir şekilde meydana gelerek rekombinant proteinin üretilmesidir. Pfs48/45, sistein amino asidi bakımından zengin bir membran proteindir. Pfs48/45 dahil sisteince zengin proteinlerin translasyon sonrası doğru katlanma modifikasyonlarını göstermesi, disülfid köprülerinin doğru pozisyonda oluşmasına bağlıdır. Pfs48/45 proteini ayrıca 7 adet olası N-bağlı glikosilasyon bölgesi içermesine rağmen N-bağlı glikosilasyon mekanizmasına sahip değildir. Pfs48/45 proteininin diğer ekspresyon sistemlerinde üretilmesi durumunda protein glikosilasyona uğratılarak doğru bir şekilde katlanması engellenecektir.

Bir proteinin doğru katlanmasında rol oynayan uygun translasyon sonrası modifikasyonların gerekliliğinden dolayı, bulaşmayı bloke edici aktivite gösteren rekombinant Pfs48/45 ve varyantlarının üretilmesini amaçlayan çalışmalar ne yazık ki henüz başarıya ulaşamamıştır. Bu çalışmada Pfs48/45-10C proteininin bitkide deglikosile ve doğru şekilde katlanmış olarak üretimi başarıya ulaşmıştır. Pfs48/45-10C proteininin istenmeyen glikosilasyon sorunu bakteriyel PNGase F ve Endo H enzimlerinin bitkide ilgili protein ile birlikte geçici anlatımının yapılmasıyla aşılmış ve sonuç olarak hedef protein *in vivo* glikosilasyona uğramadan üretilmiştir.

Bitkide geçici gen anlatımı yöntemi ile üretilmiş olan *in vivo* deglikosile Pfs48/45-10C antijeninin, Pfs48/45 karşıtı fare monoklonal antikolarıyla karşı reaktivitesinin test edilmiş ve sonucunda proteinlerin deglikosile formlarının glikosile formlarına kıyasla daha fazla karşı reaktivite gösterdiği gözlenmiştir. Pfs48/45'e özgü uyarlanmış monoklonal antikoların, Pfs48/45-10C *in vivo* deglikosile varyantlarınca tanınmış olması, *in vivo* deglikosile formlarının doğru katlandığını akıllara getirmektedir.

Bu çalışmada kullanılan yöntemler ile Pfs48/45-10C proteinin doğru bir şekilde katlanmış olarak üretilebileceği kanıtlanmıştır ve bu çalışmada uygulanan *in vivo* deglikosilasyon yaklaşımları aşı antijenlerinin, terapötik proteinlerinin, antikorların ve endüstriyel enzimlerin üretilmesi için farklı bir yaklaşım sunar.

## 6. KAYNAKLAR

- Agnandji, S.T. vd. 2014. Efficacy and safety of the RTS,S/ AS01 malaria vaccine during 18 months after vaccination: a phase 3 randomized, controlled trial in children and young infants at 11 African sites. *PLoS Med*, 11:e1001685.
- Akdur, R. 2006. Sıtma ve Sıtma Salgınları Tarihi. *Bilim Tarihi Araştırmaları*. 2:43-54.
- Andrew, N. 2007. Mahşerin Dördüncü Atlısı, Salgın ve Bulaşıcı Hastalıklar Tarihi, İletişim Yayınları, İstanbul, 28-47.
- Anonymous 1: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2017/report/en/> [Son erişim tarihi: 12.05.2018]
- Bejon, P. vd. 2007. Extended follow-up following a phase 2b randomized trial of the candidate malaria vaccines FP9 METRAP and MVA ME-TRAP among children in Kenya. *PLoS One*, 2:e707.
- Bhatt, S. vd. 2015 The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature*, 526: 207–211.
- Black, W.C., Alpey, L. ve James, A.A. 2011. Why RIDL is not SIT. *Trends Parasitol*. 27: 362–370.
- Blom, N. vd. 2004. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*, 4; 1633-1649.
- Bourtzis, K., Lees, R.S., Hendrichs, J. ve Vreysen, M.J. 2016. More than one rabbit out of the hat: radiation, transgenic and symbiont-based approaches for sustainable management of mosquito and tsetse fly populations. *Acta Trop*. 157: 115–130.
- Braakman, I. ve Bulleid, N.J. 2011. Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem*, 8, 71-99.
- Bull, J.J. ve Turelli, M. 2013. *Wolbachia* versus dengue: evolutionary forecasts. *Evol. Med. Public Health*, 2013: 197–207.
- Bushkin, G.G., Ratner, D.M., Cui, J., Banerjee, S., Duraisingh, M.T., Jennings, C.V., Dvorin, J.D., Gubbels, M.J., Robertson, S.D., Steffen, M., O’Keefe, B.R., Robbins, P.W. ve Samuelson, J. 2010. Suggestive evidence for Darwinian Selection against asparagine-linked glycans of *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii*. *Eukaryot. Cell*, 9, 228–241.
- Burt, A. 2014. Heritable strategies for controlling insect vectors of disease. *Phil. Trans. R. Soc. B* 369, 20130432.
- Calderón, A. vd. 2013, Hindawi, A History of the Development of Brucella Vaccines. Moyle, P.M. ve Toth, I., 2013, Modern Subunit Vaccines: Development, Components, *ChemMedChem*, 8, 360 – 376.
- Carter, R., Mendis, KN., Miller, L. ve Saul, A. 2000. Malaria transmission-blocking vaccine-how can their development be supported? *Nature Med*, 6: 241-244.

- Chanda, E., Remijo, C.D., Pasquale, H., Baba, S.P. ve Lako, R.L. 2014. Scale-up of a programme for malaria vector control using long-lasting insecticide-treated nets: lessons from South Sudan. *Bull. World Health Organ*, 92: 290–296.
- Chaturvedi, N., Bharti, K.P., Tiwari, A. ve Singh, N. 2016. Strategies & recent development of transmission-blocking vaccines against *Plasmodium falciparum*. *Indian J Med Res*. 143, 696-711.
- Chowdhury, D.R., Angov, E., Kariuki, T. ve Kumar, N. 2009. A Potent Malaria Transmission Blocking Vaccine Based on Codon Harmonized Full Length Pfs48/45 Expressed in *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 4:7, e6352.
- Cohen, S., McGregor, I.A. ve Carrington, S. 1961. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature*, 192:733–7.
- Dijk, M.R. vd. 2001. A central role for P48/45 in malaria parasite male gamete fertility. *Cell*, 104:153–64.
- Dobbs, K.R. ve Dent, A.E. 2016. *Plasmodium* malaria and antimalarial antibodies in the first year of life. *Parasitology*, 143: 129–138.
- Draper, JS. vd. 2015. Recent advances in recombinant protein-based malaria vaccines. *ELSEVIER*.
- Dubovsky, F. ve Malkin, E. 2008. Malaria vaccines In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA (eds). *Vaccines. Elsevier Inc. China*, 1267-1274.
- Edelbaum, O. vd. 1992. Expression of active human interferon- $\beta$  in transgenic plants. *J. Interferon Res*, 12; 449–453.
- Ewer, K.J. vd. 2013. Protective CD8+ T-cell immunity to human malaria induced by chimpanzee adenovirus-MVA immunisation. *Nat Commun*, 4:2836.
- Fowkes, F.J., Boeuf, P. ve Beeson, J.G. 2016. Immunity to malaria in an era of declining malaria transmission. *Parasitology*, 143: 139–153.
- Frank, J., Kaulfuß-Soboll, H., Rips, S., Koiwa, H. ve von Schaewen, A. 2008. Comparative analyses of Arabidopsis complex glycan1 mutants and genetic interaction with staurosporin and temperature sensitive 3a. *Plant Physiol*. 148, 1354–1367.
- Gelvin, S.B. 2003. Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 16–37.
- Genton, B. vd. 2002. A recombinant blood-stage malaria vaccine reduces *Plasmodium falciparum* density and exerts selective pressure on parasite populations in a phase 1–2b trial in Papua New Guinea. *J Infect Dis*, 185:820–7.
- Gomord, V., Fitchette, A.C., Bouaouiche, L.M., Dupas, C.S., Plasson, C., Michaud, D. ve Faye, L. 2010. Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production. *Plant Biotechnology Journal*, 8, 564–587.
- Gosling, R. ve Seidlein, L. 2016. The future of the RTS, S/AS01 malaria vaccine: an alternative development plan. *PLoS Med*, 13; e1001994.

- Guo, H.B., Lee, I., Kamar, M., Akiyama, S.K. ve Pierce, M. 2002. Aberrant N-glycosylation of beta1 integrin causes reduced alpha5beta1 integrin clustering and stimulates cell migration. *Cancer Res.* 62, 6837–6845.
- Heppner, D.G. vd. 2005. Towards an RTS,S based, multi-stage, multi-antigen vaccine against falciparum malaria: progress at the Walter Reed Army Institute of Research. *Vaccine*, 23:2243–50.
- Hoffman, S.L., Vekemans, J, Richie, T.L. ve Duffy, P.E. 2015. The March Toward Malaria Vaccines. *Am J Prev Med*, 49(6S4): 319–333.
- Iriemenam, N.C. vd. 2009. Antibody responses to a panel of *Plasmodium falciparum* malaria blood-stage antigens in relation to clinical disease outcome in Sudan. *Vaccine*, 27: 62–71.
- Iriemenam, N.C. vd. 2009. Cytokine profiles and antibody responses to *Plasmodium falciparum* malaria infection in individuals living in Ibadan, southwest Nigeria. *Afr Health Sci*, 9:66–74.
- Jones, T.R. ve Hoffman, S.L. 1994. Malaria Vaccine Development. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, 7:3, 303-310.
- Jones, R.M. vd. 2013. A Plant-Produced Pfs25 VLP Malaria Vaccine Candidate Induces Persistent Transmission Blocking Antibodies against *Plasmodium falciparum* in Immunized Mice. *PLoS ONE*, 8(11): e79538
- Kapila, J., De Rycke, R., Montagu, M. ve Angenon, G. 1997. An Agrobacterium-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Sci*, 122, 101–108.
- Komarova, T.V., Baschieri, S., Donini, M., Marusic, C., Benvenuto, E. ve Dorokhov, Y.L. 2010. Transient expression systems for plant-derived biopharmaceuticals. *Expert Review of Vaccines*, 9:8, 859-876.
- Komori, T. vd. 2007. Current status of binary vectors and superbinary vectors. *Plant Physiol*, 145, 1155–1160.
- Krueger, K.E. ve Srivastava, S. 2006. Posttranslational protein modifications: current implications for cancer detection, prevention, and therapeutics. *Mol Cell Proteomics*, 5, 1799-1810.
- Kusnadi, A.R., Nikolov, Z.L., ve Howard, J.A. 1997. Production of recombinant proteins in transgenic plants: practical considerations. *Biotechnol. Bioeng*, 56:5, 473–484.
- Lee, L.Y. ve Gelvin, S.B. 2008. T-DNA binary vectors and systems. *Plant Physiol*. 146, 325–332.
- Mackintosh, C.L., Beeson, J.G. ve Marsh, K. 2004 Clinical features and pathogenesis of severe malaria. *Trends Parasitol*, 20:597–603.
- Mammedov, T., Ghosh, A., Jones, R., Mett, V., Farrance, C., Musiychuk, K., Horsey, A. ve Yusibov, V. 2012. Production of non-glycosylated recombinant proteins in *Nicotiana*

- benthamiana* plants by co-expressing bacterial PNGase F. *Plant Biotechnology Journal*, 10, 773–782.
- Mamedov, T., Cicek, K., Gulec, B., Ungor, R. ve Hasanova, G. 2017. *In vivo* production of non-glycosylated recombinant proteins in *Nicotiana benthamiana* plants by co-expression with Endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase H (Endo H) of *Streptomyces plicatus*. *PLoS ONE*, 12(8): e0183589.
- Mamedov, Tarlan, Jessica A. Chichester, R. Mark Jones, Ananya Ghosh, Megan V. Coffin, Kristina Herschbach, Alexey I. Prokhnevsky, Stephen J. Streatfield ve Vidadi Yusibov. 2016. “Production of Functionally Active and Immunogenic Non-Glycosylated Protective Antigen from Bacillus Anthracis in Nicotiana Benthamiana by Co-Expression with Peptide-N-Glycosidase F (PNGase F) of Flavobacterium Meningosepticum.” *PLoS ONE* 11 (4): 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153956>.
- Mamedov, T. and Vidadi, Y. 2013. “*In Vivo* Deglycosylation of Recombinant Proteins in Plants by Co-Expression with Bacterial PNGase F.” *Bioengineered* 4 (5): 338–42. <https://doi.org/10.4161/bioe.23449>.
- Mardanov, E.S., Blokhina, E.A., Tsybalova, L.M., Peyret, H., Lomonossoff, G.P. ve Ravin, N.V. 2017. Efficient Transient Expression of Recombinant Proteins in Plants by the Novel pEff Vector Based on the Genome of Potato Virus X. *Front. Plant Sci*, 8:247.
- Matuschewski, K. ve Mueller, A.K. 2007. Vaccines against malaria—an update. *FEBS J*, 274:4680–7.
- McCall, M.B. vd. 2010. Memory-like IFN-gamma response by NK cells following malaria infection reveals the crucial role of T cells in NK cell activation by *P. falciparum*. *Eur J Immunol*, 40:3472–7.
- Mett, V., Farrance, C.E., Green, B.J. ve Yusibov, V. 2008. Plants as biofactories. *Biologicals*, 36:354-8.
- Milek, RL., DeVries, AA., Roeffen, WF., Stunnenberg, H., Rottier, PJ. ve Konings, RN. 1998. *Plasmodium falciparum*: heterologous synthesis of the transmission-blocking vaccine candidate Pfs48/45 in recombinant vaccinia virus-infected cells. *Exp Parasitol*, 90:165- 74.
- Mistarz, U.H. 2017. Expression, Purification and Characterization of GMZ2'.10C, a Complex Disulphide-Bonded Fusion Protein Vaccine Candidate against the Asexual and Sexual Life-Stages of the Malaria-Causing *Plasmodium falciparum* Parasite. *Springer*, DOI 10.1007/s11095-017-2208-1.
- Mueller, I. vd. 2013. Natural acquisition of immunity to *Plasmodium vivax*: epidemiological observations and potential targets. *Adv. Parasitol*, 81: 77–131.
- Oliva, C.F. vd. 2014. Current status and future challenges for controlling malaria with the sterile insect technique: technical and social perspectives. *Acta Trop.* 132, 130–139.
- Ouattara, A. ve Laurens, M.B. 2015. Vaccines Against Malaria. *VACCINE*, 60(6):930–936.



- Outchkourov, N. vd. 2007. Epitope Analysis of the Malaria Surface Antigen Pfs48/45 Identifies a Subdomain That Elicits Transmission Blocking Antibodies. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 282;23, 17148–17156.
- Outchkourov, N. vd. 2008. Correctly folded Pfs48/45 protein of *Plasmodium falciparum* elicits malaria transmission-blocking immunity in mice. *PNAS*, 105;11, 4301–4305.
- Ouédraogo, A. L. vd. 2015 Efficacy and safety of the mosquitocidal drug ivermectin to prevent malaria transmission after treatment: a double-blind, randomized, clinical trial. *Clin. Infect. Dis.*, 357–365.
- Özbilgin, A., Topluoglu, S., Es, S., İşlek, E., Mollahaliloglu, S. ve Erkoç Y. 2010. Sağlıkta dönüşüm programı kapsamında sıtmayla savaş programının detaylı analiz ve değerlendirme çalışması. T.C. Sağlık Bakanlığı Analiz Raporu 2-40, Ankara.
- Partridge, E.A., Le Roy, C., Di Guglielmo, G.M., Pawling, J., Cheung, P., Granovsky, M., Nabi, I.R., Wrana, J.L. ve Dennis, J.W. 2004. Regulation of cytokine receptors by Golgi N-glycan processing and endocytosis. *Science*, 306, 120–124.
- Peyret, H. ve Lomonosoff, G. P. 2015. When plant virology met Agrobacterium: the rise of the deconstructed clones. *Plant Biotechnol. J.*, 13: 1121–1135.
- Phillips, M.A., M.A., Burrows, J.N., Manyando, C., Huijsduijnen, R.H., Voorhis, W.C. ve Wells, T.N.C. 2017. Malaria. *NATURE REVIEWS*, 17050:3.
- Potocnjak, P., Yoshida, N., Nussenzweig, R.S. ve Nussenzweig V. 1980. Monovalent fragments (Fab) of monoclonal antibodies to a sporozoite surface antigen (Pb44) protect mice against malarial infection. *J Exp Med*, 151:1504–13.
- Rappuoli, R.R. ve Aderem, A. 2011. A 2020 vision for vaccines against HIV, tuberculosis and malaria. *NATURE*, 473: 463-469.
- Reinders, J. ve Sickmann, A. 2007. Modificomics: posttranslational modifications beyond protein phosphorylation and glycosylation. *Biomol Eng*, 24, 169-177.
- Roeffen, W., Teelen, K., As, J., Vegte-Bolmer, M., Eling, W., ve Sauerwein, R. 2001 *Exp. Parasitol*, 97, 45-49.
- Rossati, A., Bargiacchi, O., Kroumova, V., Zaramella, M., Caputo, A. ve Garavelli, P.L. 2016. Climate, environment and transmission of malaria. *Le Infezioni in Medicina*, 2: 93-104.
- Roth, J., Zuber, C., Park, S., Jang, I., Lee, Y., Kysela, K.G., Le Fourn, V., Santimaria, R., Guhl, B. ve Cho, J.W. 2010. Protein N-glycosylation, protein folding, and protein quality control. *Mol Cells*, 30, 497-506.
- Sabchareon, A. vd. 1991 Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg*, 45:297–308.
- Sainsbury, F. ve Lomonosoff, G.P. 2008. Extremely High-Level and Rapid Transient Protein Production in Plants without the Use of Viral Replication. *Plant Physiology*, 148: 1212–1218.

- Sauerwein, R.W. ve Bousema, T. 2015. Transmission blocking malaria vaccines: Assays and candidates in clinical development. *Vaccine*, 33: 7476–7482.
- Scholthof, H.B. ve Scholthof, K.G. 1996. Plant virus gene vectors for transient expression of foreign protein in plants. *Annu. Rev. of Phytopathol*, 34:299–323.
- Schwarz, F. ve Aebi, M., 2011. Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation. *Curr Opin Struct Biol*, 21, 576-582.
- Seder, R.A. vd. 2013, Protection against malaria by intravenous immunization with a nonreplicating sporozoite vaccine. *Science*, 341:1359–65.
- Shamloul, M., Trusa1, J., Mett V. ve Yusibov, V. 2014. Optimization and Utilization of *Agrobacterium*-mediated Transient Protein Production in *Nicotiana*. *J. Vis. Exp.* (86), e51204, doi:10.3791/51204.
- Singh, B. vd. 2004. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet*, 363, 1017-1024.
- Teo, A., Feng, G., Brown, G.V., Beeson, J.G. ve Rogerson, S.J. 2016. Functional antibodies and protection against blood-stage malaria. *Trends Parasitol.* 32: 887–898.
- Tuğluoğlu, F. 2008. Türkiye’de Sıtma Mücadelesi (1924-1950). *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 32 (4): 351-359.
- Unat, E.K., Yücel, A., Altaş, K. ve Samastı, M. 1995. Sıtma. *Tıp Parazitolojisi*, s: 623 – 664.
- Unat, E.K. 1999. Sıtmanın Tarihi. *Sıtma*, No: 16, s.1-7.
- Uyar, Y. 2015. Sıtma aşısında alternatif kombinasyon: *Plasmodium falciparum* cırcumsporozoite protein ve MF59. Doktora tezi, Erciyes Üniversitesi, Kayseri, 80 s.
- Yusibov, V. ve Mamedov, G. 2010. Plants as an Alternative System for Expression of Vaccine Antigens. *Proc ANAS (Biol Sci)*, 65:195–200.
- Yusibov, V., Kushnir, N. ve Streatfield, S.J. 2016. Antibody Production in Plants and Green Algae. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 67:19.1–19.33.
- Walsh, C.T., Garneau-Tsodikova, S. ve Gatto, G.J. 2005. Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew Chem Int Ed Engl*, 44, 7342-7372.
- White, N.J., Pukrittayakamee, S., Hien, T.T., Faiz, M.A., Mokuolu, O.A. ve Dondorp, A.M. 2013. Malaria. *Seminar*, 383: 723–35.
- Wipasa, J. ve Riley, E.M. 2007. The immunological challenges of malaria vaccine development. *Vaccines & antibodies*, 10.1517/14712598.7.12.1841.
- Wu, Y., Sinden, R.E., Churcher, T.S., Tsuboi, T. ve Yusibov, V. 2015. Development of Malaria Transmission-Blocking Vaccines: From Concept to Product. *Advances in Parasitology*, 89: 109-152.

Wujek, P., Kida, E., Walus, M., Wisniewski, K.E. ve Golabek, A.A. 2004. N-glycosylation is crucial for folding, trafficking, and stability of human tripeptidyl-peptidase I. *J. Biol. Chem.* 279, 12827–12839.

## ÖZGEÇMİŞ

**Kader ÇİÇEK**  
[kdercicek@gmail.com](mailto:kdercicek@gmail.com)



## EĞİTİM

---

**2015-2018 Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi**

Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü

**2011-2015 İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi**

Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

**2005-2009 İstanbul/Büyükçekmece Esenyurt Lisesi**

## PROJELER

---

**2014 – 2015** “*Schizosaccharomyces pombe*' de *ght5* Geninin Knock-Out Tekniği ile Delesyonu Çalışmaları” (lisans bitirme projesi)

**2015-2018** “Pfs48/45 Aşı Adaylarının Deglikosile Biçimlerinin Dizaynı, Üretimi ve Karakterizasyonu” (TÜBİTAK Projesi)

**2015-2018** “*N. benthamiana*' da *P. falciparum* Pfs48/45 R0.10C Varyantlarının Tasarlanması, Üretimi ve Karakterizasyonu” (yüksek lisans projesi)

## YAYINLAR

---

Mamedov, T., Cicek, K., Gulec, B., Ungor, R. and Hasanova, G., 2017. *In vivo* production of non-glycosylated recombinant proteins in *Nicotiana benthamiana* plants by co-expression with Endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase H (Endo H) of *Streptomyces plicatus*. *PLoS ONE*. 12(8): e0183589.

---