



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



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ALERJENİK BİTKİ LİPİT TRANSFER PROTEİNİNİN
BİYOTEKNOLOJİK ÜRETİMİ**

Narmin AGHALAROVA

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

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

Temmuz, 2020

İSTANBUL

Bu alışma, 2.07.2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

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

Prof. Dr. Ahmet Süha YALÇIN
Marmara Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Semian KARAER UZUNER
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

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

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FYL-2019-33524 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

Aghalarova N., Mirzamammadli N., Aksüt Y., Arda N. 2019, Biotechnological production of an allergenic lipid transfer protein from *Morus alba* pollen, *Turkish Journal of Biology*, 43:(5 supp*), 111.

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

ÖNSÖZ

Bilimin hayatımızdaki öneminin her zamankinden daha fazla olduğu bu dönemde, benim de bu alana katkıda bulunmamda uygun ortamı sunan, bilgisini daima benimle paylaşan ve desteğini hiç eksik etmeyen çok değerli danışman hocam **Prof. Dr. Nazlı ARDA**'ya tüm kalbimle teşekkür ederim.

Önceki çalışmalarıyla tez konuma ilham veren, başta **Prof. Dr. Suna BÜYÜKÖZTÜRK** ve **Prof. Dr. Aşlı GELİNCİK** olmak üzere, bu konuda işbirliği yaptığımız tüm araştırmacılara; ayrıca akdüt polenlerini toplama konusundaki desteklerinden ötürü **Dr. Öğr. Üyesi Nurgül KARLIOĞLU KILIÇ**'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tez dönemim boyunca yardımları ve destekleri için sevgili hocalarım **Doç. Dr. Evren ÖNAY-UÇAR**, **Yrd. Doç. Dr. Murat PEKMEZ** başta olmak üzere, diğer tüm hocalarıma ve bu tezin bitmesinde oldukça büyük payı olan, tüm bilgisini benimle paylaşan ve bu süre zarfında manevi desteğini her zaman hissettiğim **Yunus AKSÜT**'e ve içinde yer almaktan büyük mutluluk duyduğum **Proteomik ekibine** teşekkürlerimi sunarım.

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

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

Temmuz 2020

Narmin AGHALAROVA

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET	xiii
SUMMARY	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	4
2.1. ALERJİ	4
2.2. POLEN ALERJİSİ	8
2.3. AKDUT VE ALERJENİK ÖZELLİKLERİ	9
2.4. LİPİT TRANSFER PROTEİNLERİ	10
2.4.1. Alerjen nsLTP'ler	12
2.5. REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ	15
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	19
3.1. POLEN ÖRNEKLERİ	19
3.2. KULLANILAN ORGANİZMA VE PLAZMİD	19
3.3. BESİYERLERİ	20
3.4. RNA İZOLASYONU.....	21
3.5. TERS TRANSKRİPSİYON POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-PZR).....	22
3.5.1. cDNA Sentezi	22
3.5.2. <i>nsLTP</i> Geninin PZR ile Çoğaltılması ve Kontrolü	23
3.6. <i>nsLTP</i> GENİNİN pQE-2 PLAZMİDİ İLE LİGASYONU VE REKOMBİNANT PLAZMİDİN KONTROLÜ	25
3.6.1. <i>nsLTP</i> geninin ve pQE-2 Plazmidinin Restriksiyon Endonükleazlarıyla Kesimi	25
3.6.2. <i>nsLTP</i> Geninin ve pQE-2 Plazmidinin Agaroz Jelden Geri Kazanımı ve Dizilenmesi	25
3.6.3. <i>nsLTP</i> Geninin pQE-2 Plazmidi ile Ligasyonu	26

3.7. PLAZMİDİN <i>E. coli</i> 'DE ÇOĞALTILMASI.....	26
3.7.1. <i>E. coli</i> Hücrelerinin Yeterli Hale Getirilmesi.....	26
3.7.2. pQE-2 Plazmidinin ve Rekombinant Plazmidin <i>E.coli</i> 'ye Transformasyonu.....	26
3.7.3. Plazmid İzolasyonu	27
3.7.4. pQE-2 Plazmidinin ve Rekombinant Plazmidin Restriksiyon Endonükleazlarıyla Kesimi.....	27
3.7.5. Rekombinant Plazmid İçeren Transformant Hücrelerin Koloni PZR ile Belirlenmesi	28
3.8. AGAROZ JEL ELEKTROFOREZİ	29
3.9. PROTEİN ANALİZLERİ	30
3.9.1. Protein İzolasyonu.....	30
3.9.2. Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	31
3.9.3. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	31
3.9.4. Coomassie Boyama Yöntemi	33
3.9.5. Rekombinant Proteinin Saflaştırılması.....	34
3.9.6. Western-Blot Analizi.....	35
4. BULGULAR.....	37
4.1. HAZIRLANAN POLEN ÖRNEĞİ.....	37
4.2. TOTAL RNA İZOLASYONU VE KONTROLÜ	37
4.3. TERS TRANSKRİPSİYON POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU	38
4.3.1. cDNA Sentezi	38
4.3.2. <i>nsLTP</i> Geninin PZR ile Çoğaltımı ve Kontrolü	38
4.4. PZR ÜRÜNÜNÜN DİZİ VE HOMOLOJİ ANALİZ SONUÇLARI.....	39
4.5. <i>nsLTP</i> GENİNİN pQE-2 PLAZMİDİNE LİGASYONU VE KOLONİ PZR İLE KONTROLÜ	40
4.6..REKOMBİNANT PLAZMİDİN RESTRİKSİYON ENZİMLERİ İLE KESİM SONUÇLARI	41
4.7. REKOMBİNANT PLAZMİDİN <i>E. coli</i> BL21 (DE3) İRKINA TRANSFORMASYONU VE İZOLASYONU.....	42
4.8. PROTEİN ANALİZ SONUÇLARI	42
4.8.1. Protein Konsantrasyonları	42
4.8.2. Elektroforetik Analiz Sonuçları.....	43
4.8.3. Western-Blot Analiz Sonuçları.....	44
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	46
KAYNAKLAR.....	49
ÖZGEÇMİŞ	56

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: T _H -bağımlı antijenlerle B hücre aktivasyonu ve sonuçları (Alessandra ve diğ., 2002).....	5
Şekil 2.2: Tip I aşırı duyarlılıkta efektör mekanizmalar (Amin, 2012).	6
Şekil 2.3: Taramalı elektron mikroskobu ile görüntülenmiş çeşitli polenler (Dartmouth Elektron Mikroskopi Ünitesinde, William Crochot tarafından tarafından görüntülenmiştir.) (https://www.thoughtco.com/facts-about-pollen-373610).	8
Şekil 2.4: Stamenleri (erkek gamet) içeren çiçek tomurcuğu. a) Antere bağlı bükülmüş filamentler. b) Antezden sonra açılmış filamentler (Ölçek çizgisi= 4 mm) c) Patlamış anterden polenlerin dağılımı (Taylor ve diğ., 2006).....	10
Şekil 2.5: Bitki nsLTP'lerinin yapısal özellikleri. A ve B'de 8 adet sistein kalıntısı (birincil yapı) ve sistein kalıntıları arasındaki dört disülfid köprüsü (ikincil yapı) göstermiştir; siyah bağlantılar tip 1 ve tip 2 nsLTP'ler arasındaki ortak bağlantı modunu, kırmızı ve yeşil bağlantılar ise tip 1 ve tip 2 nsLTP'ler arasındaki farklı bağlantı modlarını gösterir (yüksek oranda korunan konumlardaki sistein kalıntıları 'C' ile, n sayıdaki diğer amino asit kalıntıları 'Xn' ile gösterilmiştir). C'de nsLTP 1'in, D'de nsLTP 2'nin üçüncül yapısı görülmektedir (Liu ve diğ., 2015).....	11
Şekil 2.6: Lipit transfer proteinleri arasında amino asit dizi benzerliği (%) (Ciardiello ve diğ., 2010).....	14
Şekil 2.7: Alerjenik LTP proteinlerinin çapraz reaktivite oranları (%). Koyu yeşil kutular, ispatlanmış IgE çapraz reaktivitesinin olduğunu; açık yeşil kutu, yüksek dizi benzerliğine göre IgE çapraz reaktivitesinin olabileceğini; turuncu kutular ise kanıtlanmış IgE çapraz reaktivitesinin olmadığını veya sınırlı olduğunu gösterir (Pablos ve diğ., 2016).....	14
Şekil 2.8: Rekombinant DNA teknolojisinin önemli aşamaları (Pham, 2018).	16
Şekil 2.9: Klonlama vektörü ve kritik bölgeleri.....	16
Şekil 3.1: pQE-2 plazmidinin genetik haritası. PT5- T5 promotörü, RBS- ribozom bağlama bölgesi, ATG- başlama kodonu, 6xHis- 6 Histidin etiketi, MCS- çoğul klonlama bölgesi.....	20

Şekil 3.2: Agaroz jel elektroforezinde markır olarak kullanılan “1 kb ladder” (GeneOn 305-005).	30
Şekil 4.1: <i>Morus alba</i> ’nın kurutulmuş polen örneği.	37
Şekil 4.2: <i>Morus alba</i> poleninden izole edilen total RNA.	37
Şekil 4.3: a-d) Total RNA’lardan sentezlenen 4 farklı cDNA.	38
Şekil 4.4: PZR ürününün %1’lik agaroz jeldeki görüntüsü. a) Markır (GeneOn 305-005), b) <i>nsLTP</i> geninin PZR ürünü.	38
Şekil 4.5: <i>Morus alba</i> poleninde bulunan <i>nsLTP</i> geninin cDNA dizisi.....	39
Şekil 4.6: <i>Morus alba</i> poleninde bulunan <i>nsLTP</i> genine karşılık gelen amino asit dizisi ..	39
Şekil 4.7: <i>Morus alba</i> <i>nsLTP</i> proteininin amino asit dizi bilgisinin BLAST analizi sonuçları.	39
Şekil 4.8: <i>E. coli DH5α</i> ırkına transformasyon sonrası 100 µg/mL ampisilin içeren LBA+Amp besiyerinde üreyen bakteri kolonileri.	40
Şekil 4.9: Koloni PZR ürünlerinin %1’lik agaroz jeldeki görüntüsü. a) Markır (GeneOn 305-005), b-d), Rastgele seçilen kolonilerin PZR sonuçları e) Pozitif kontrol ve f) Negatif kontrol.....	41
Şekil 4.10: Rekombinant plazmidin tekli ve çiftli RE kesim sonuçları. a) Markır (1kb, Gene-On 305-005), b) PCR ürünü, c) Ligasyon ürününün <i>PstI</i> restriksiyon endonükleazı ile tekli kesimi, d) Rekombinant plazmidin <i>PstI</i> ve <i>NdeI</i> restriksiyon endonükleazları ile çiftli kesimi.	41
Şekil 4.11: İzole edilen plazmidlerin agaroz jeldeki görüntüsü. a) Markır (1kb, Gene-On 305-005), b) Rastgele seçilen kolonilerden izole edilen pQE-2+ <i>nsLTP</i> plazmidi, c) Rekombinant plazmidin <i>PstI</i> restriksiyon enzimiyle kesimi d) Kesilmemiş pQE-2 plazmidi, e) pQE-2 plazmidinin tekli kesimi.....	42
Şekil 4.12: Protein standart grafiği. Sığır Serum Albumin (“Bovine Serum Albumin”, BSA) kullanılarak oluşturuldu ($R^2=0.996$).	43
Şekil 4.13: Coomassie boyama yöntemi ile boyanmış örnek jel görüntüsü. a) Markır (SeeBlue® Pre-stained Protein Standard, Invitrogen LC5625), b) Negatif kontrol, c) İzole edilen total protein ve d) Saflaştırılmış örnek.	44
Şekil 4.14: Western-blot analizi. a) Markır (SeeBlue® Pre-stained Protein Standard, Invitrogen LC5625), b-j) Hasta serum örnekleri, k) Kontrol serum örneği.	45

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Aşırı duyarlılık reaksiyonları için Coombs ve Gell sınıflandırması (Abbas ve diğ., 2012).....	4
Tablo 2.2: Farklı kaynaklardan gelen LTP1 alerjenleri (Finkina ve diğ., 2016).....	13
Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan <i>E. coli</i> ırklarının özellikleri.	19
Tablo 3.2: LB besiyeri içeriği.....	21
Tablo 3.3: LBA besiyeri içeriği.....	21
Tablo 3.4: cDNA sentezi için kullanılan reaksiyon bileşenleri.	23
Tablo 3.5: cDNA sentezi için PZR koşulları.	23
Tablo 3.6: <i>nsLTP</i> geninin PZR ile çoğaltımı için kullanılan reaksiyon bileşenleri.....	24
Tablo 3.7: <i>nsLTP</i> geninin PZR ile çoğaltımı için reaksiyon koşulları.	24
Tablo 3.8: RT-PZR’da kullanılan primerler (altı çizgili kısımlar restriksiyon enzim kesim noktalarını göstermektedir).....	24
Tablo 3.9: NdeI ve PstI restriksiyon endonükleazları ile çiftli kesim reaksiyonunun bileşenleri.	25
Tablo 3.10: Ligasyon işleminde kullanılan reaksiyon bileşenleri.	26
Tablo 3.11: Tekli kesim reaksiyon bileşenleri.....	28
Tablo 3.12: Koloni PZR bileşenleri.....	28
Tablo 3.13: Koloni PZR koşulları.	29
Tablo 3.14: 50x TAE tamponunun içeriği.	29
Tablo 3.15: 6x Yükleme tamponunun içeriği.....	30
Tablo 3.16: Protein izolasyonu için hazırlanan tamponun içeriği.	31
Tablo 3.17: SDS-PAGE için hazırlanan çözeltiler.	32
Tablo 3.18: SDS-PAGE ayırma ve yükleme jeli içerikleri (1 jel için gerekli değerler).....	33
Tablo 3.19: Saflaştırmada kullanılan çözeltiler ve içerikleri.....	34
Tablo 3.20: Elektrotansfer ve Western blotlama yöntemlerinde kullanılan çözeltiler ve içerikleri.....	35

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

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

Kısaltmalar	Açıklama
IgE	: İmmünoglobulin E
IgG	: İmmünoglobulin G
IgM	: İmmünoglobulin M
IgA	: İmmünoglobulin A
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
Amp	: Ampisilin
APS	: Amonyum persülfat
bç	: Baz çifti
BCA	: Bişinkoninik asit
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
BSA	: Sığır serum albumini (“Bovine Serum Albumin”)
cDNA	: Komplementer DNA
dH₂O	: Distile su
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleozid trifosfat
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
IPTG	: İzopropiltiyo-β-D-galaktopiranosid (“Isopropylthio-β-D-galactopyranoside”)
LB	: Luria-Bertani sıvı besiyeri
LBA	: Luria-Bertani agarlı katı besiyeri
LTP	: Lipit transfer proteini
<i>M.alba</i>	: <i>Morus alba</i>
Mb	: Megabaz
nsLTP	: Spesifik olmayan (“non-specific”) LTP
PVDF	: Polivinilidin diflorür
PCR	: “Polymerase chain reaction”
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik asit
RT-PCR	: “Reverse transcription polymerase chain reaction”
RT-PZR	: Ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (“Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis”)

TAE : Tris-asetat EDTA tamponu
UV : Ultraviyole



ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ALERJENİK BİTKİ LİPİT TRANSFER PROTEİNİNİN BİYOTEKNOLOJİK ÜRETİMİ

Narmin AGHALAROVA

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Emine Şeküre Nazlı ARDA

Alerji dünya çapında yaygın bir hastalıktır ve görülme sıklığı giderek artmaktadır. İmmün sistemi çeşitli şekillerde uyararak alerjik reaksiyonlara yol açan en önemli molekül grubu proteinlerdir. Alerjen proteinler çeşitli kaynaklardan gelmektedir. En iyi bilinen kaynaklardan biri aeroalerjen olan polenlerdir.

Polenlerdeki yaygın alerjenlerin tanımlanması ve biyoteknolojik yöntemlerle üretilmesi, alerjinin moleküler mekanizmasını aydınlatmaya yönelik temel bilim çalışmaları için önemli olduğu gibi, alerji tanı ve tedavisinde de gelişmelere yol açacağından güncel araştırma konuları içinde yer almaktadır.

Bitkilerdeki spesifik olmayan lipit transfer proteinlerinin (nsLTP'ler), özellikle Akdeniz ülkelerinde sıklıkla görülen polen ve gıda alerjilerine neden olduğu bilinmektedir. Polenlerde bulunan nsLTP'lerin alerjenik özellikleri bitki türüne, coğrafi bölgeye ve çevresel koşullara göre değişir. Alerjenitesinin yüksek olduğu bilinen *Morus alba* (akdut) polenindeki nsLTP üzerine bir çalışma bugüne kadar yapılmamıştır.

Bu çalışmanın temel amacı, gelecek çalışmalarda kullanmak üzere, *M. alba* polenindeki nsLTP'yi biyoteknolojik olarak üretmektir.

Çalışmanın ilk aşamasında, *M. alba* polenlerinden total RNA izolasyonu yapıldı ve daha sonra RT-PZR ile cDNA kütüphanesi oluşturuldu. cDNA kütüphanesindeki *nsLTP* geni uygun primerler kullanılarak PZR ile çoğaltıldı ve Sanger DNA dizileme yöntemi ile gen dizisi doğrulandı. *nsLTP* geni, uygun restriksiyon enzim kesim noktalarının dizilerini içeren primerler kullanılarak PZR ile çoğaltıldı. PZR ürünü 6xHis etiketi taşıyan pQE-2 vektörüne klonlandı ve ardından *Escherichia coli* BL21 (DE3) hücreleri bu vektörle transforme edildi. Transformant *E. coli* hücreleri koloni PZR yöntemi ile seçildi.

Çalışmanın ikinci aşamasında, rekombinant nsLTP proteinini bol miktarda üretmek için çalışma hacmi artırıldı ve transformant hücrelerdeki protein sentezi izopropiltiy-β-D-galaktopiranosid (IPTG) ile indüklendi. Hücre toplama ve parçalama işlemlerinin ardından izole edilen total proteinler, histidin etiketli nsLTP'nin saflaştırılması için immobilize metal afinite kromatografisi (IMAC) sistemine yüklendi. İmidazol ile elüe edilen rekombinant proteinin miktarı bişinkoninik asit (BCA) yöntemiyle belirlendi. nsLTP'yi izlemek ve IgE bağlama kapasitesini, *M. alba* polen alerjisi olan hastaların serumlarıyla Western blotlama yaparak test etmek için elektroforetik ayrımlar ve analizler yürütüldü.

Sonuç olarak doğal protein gibi alerjenik özelliklere sahip, yüksek miktarda, saf rekombinant nsLTP başarıyla üretildi.

Bu çalışmada elde edilmiş biyoteknolojik ürün, LTP'lerin alerji gelişimindeki rolünü daha iyi anlamak için yürütülecek ileri temel ve klinik çalışmalarda kullanılabilir. Ayrıca gelecekte, özgün alerji tanı ve tedavi stratejilerinin ve araçlarının bir parçası olabilir.

Temmuz 2020, 72 sayfa.

Anahtar kelimeler: Polen alerjisi, lipid transfer proteini, alerjenik protein, rekombinant alerjen, *Morus alba*.

SUMMARY

M.Sc. THESIS

BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF AN ALLERGENIC LIPID TRANSFER PROTEIN

Narmin AGHALAROVA

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. Emine Şeküre Nazlı ARDA

Allergy is a widespread disease worldwide, and its incidence gradually increases. The most important group of molecules leading allergic reactions by exciting the immune system diversely are proteins. Allergen proteins arise from various sources. One of the most well-known sources are aeroallergen pollens.

Identification and biotechnological production of common allergens in pollens are not only important for basic science studies intending to enlighten molecular mechanism of allergy, but also take part in current research topics, since they lead to developments in allergy diagnosis and treatment.

Non-specific lipid transfer proteins (LTPs) in plants are known to cause pollen and food allergies, that are common in especially Mediterranean countries. Allergenic properties of nsLTPs in pollen vary according to plant species, geographic region and environmental conditions. No study has been conducted up to date on the nsLTP in *Morus alba* (white mulberry) pollen known to have high allergenicity.

The main purpose of current study is the biotechnological production of nsLTP in *M. alba* pollen for further use.

In the first step of the study, total RNA was isolated from *M. alba* pollens and a cDNA library was constructed using RT-PCR. The *nsLTP* gene in cDNA library was amplified with appropriate primers by PCR from this cDNA library and the accuracy of the gene sequence was confirmed by Sanger DNA sequencing method. The *nsLTP* gene was amplified by PCR with primers containing sequences of proper restriction enzyme breakpoints. PCR product was cloned into the pQE-2 vector carrying 6xHis tag, followed by *E. coli* BL21 (DE3) cells were transformed with this vector. Transformant *E. coli* cells were selected by the colony PCR method.

In the second step of the study, working volume was increased and protein synthesis in transformant cells was induced with isopropylthio- β -D-galactopyranoside (IPTG) to produce high amount of recombinant nsLTP protein. Total proteins isolated after the cell collection and disruption were loaded onto the immobilized metal affinity chromatography (IMAC) system for the purification of his tagged nsLTP. Amount of recombinant protein eluted with imidazol was detected with bicinchoninic acid (BCA) method. Electrophoretic separations and analyses were carried out in order to trail nsLTP, and to test its IgE binding capacity by Western blotting with the sera of patients allergic to *M. alba*.

As a result, high amount of pure recombinant nsLTP having allergenic properties like natural protein was successfully produced.

Biotechnological product obtained in this study can be used further basic and clinical studies for a better understanding the role of LTPs in allergy progression. Besides, it can be a part of specific diagnosis and treatment strategies and tools in the future.

July 2020, 72 pages.

Keywords: Polen allergy, lipid transfer protein, allergenic protein, recombinant allergen, *Morus alba*.

1. GİRİŞ

Alerji; solunduğunda, yutulduğunda, dokunulduğunda veya enjekte edildiğinde karakteristik semptomlara neden olan spesifik bir maddeye karşı aşırı duyarlılıktır. İmmün sistemi uyararak alerjik reaksiyonlara neden olan maddelere “alerjen” denir. Alerjenler, genel olarak polenlerde, toz akarlarında, hayvanların deri döküntülerinde, böceklerin venomlarında ve dışkılarında, küflerde, yiyeceklerde ve bazı ilaçlarda bulunabilen ve IgE antikor tepkisi ortaya çıkarabilen proteinler, glikoproteinler, lipoproteinler veya proteine konjüge kimyasallar veya bunların karışımından oluşur (Hamilton, 2019).

Polen alerjenleri, sanayileşmiş ülkelerde nüfusun %30 kadarını etkileyen tip I alerjilerin ana nedenlerinden biridir. Polen yayılımı büyük ölçüde floraya bağlıdır. İklim değişiklikleri de, polen mevsimlerinin süresini ve yoğunluğunu etkiler ve kirlilikle birlikte solunum alerjisi ve astım vakalarının artmasına katkıda bulunabilir (Pablos ve diğ., 2016). Özellikle yoğun yapışmanın olduğu büyük şehirlerde ve çevre kirliliğinin arttığı bölgelerde alerjenik polen çeşidi sayısı fazlalaşmakta, yeni alerjen moleküller ortaya çıkmaktadır (D’Amato ve diğ., 2007; Gilles ve diğ., 2018).

Moraceae (dutgiller) ailesinin bir üyesi olan *Morus alba* L. (akdut) dünya genelinde yetiştirilmekte olan, tıbbi özelliklere sahip, çok fonksiyonlu bir bitkidir. Dut ağacının farklı bölümleri besleyici özelliklerinin yanı sıra içerdikleri fitokimyasallar ve taşıdıkları farmakolojik özellikler nedeniyle halk arasında veya yem, gıda, kozmetik ve ilaç sektöründe geniş çapta kullanılmaktadır (Chan ve diğ., 2016). Geniş bir yayılım gösteren *M. alba* polenleri ile, İspanya ve Hindistan’da yapılan klinik çalışmalar, polen-yayma döneminde (Nisan-Mayıs) önemli bir aeroalerjen kaynağı olduğunu ortaya koymuştur (Sneller ve diğ., 1993; Subiza ve diğ., 1995, Singh ve Kumar, 2003). Akdut polenlerinin astım, alerjik rinit ve alerjik konjonktivit gibi alerjik hastalıkları, ayrıca temas yoluyla ürtiker hastalığını tetiklediği rapor edilmiştir (Navarro ve diğ., 1997). Ülkemizde yapılan bir çalışmada da, *M. alba* polenindeki bazı proteinlerin bir grup alerji hastasından alınan kan örneklerindeki IgE ile şiddetli reaksiyon verdiği gösterilmiştir. Bunlardan bir tanesinin metil transferaz olduğu bulunmuş (Çetereisi ve diğ., 2019) olmakla birlikte diğerleri hala tanımlanmamıştır. Karadut (*Morus nigra*)’da yapılan bir çalışmada Mor n 3 olarak adlandırılan lipit transfer proteini izole edilmiş ve alerjenik

aktivitesi ortaya konulmuştur (Ciardiello ve diğ., 2010). Ayrıca, Pakistan’da yapılan bir araştırmada kağıt dutu, diğer adıyla Acem dutunda (*Morus papyrifera*) 10-kDa molekül ağırlığında alerjenik bir protein rapor edilmiş, molekül ağırlığına göre bunun da bir tür LTP olduğu ileri sürülmüştür (Micheal ve diğ., 2013).

Bitkisel kaynaklı spesifik olmayan lipit transfer proteininin (nsLTP), özellikle Akdeniz ülkelerinde sıklıkla görülen gıda ve polen alerjilerine neden olduğu bilinmektedir (Scheurer ve diğ., 2004; Asero ve diğ., 2001, Asero ve Pravettoni, 2013). Akdeniz meyvelerine alerjisi olan yetişkin hastaların üzerinde *Rosaceae* meyvelerinden elde edilen nsLTP'lerle yapılan klinik bir çalışmada, bu proteinlerin IgE’nin aracılık ettiği alerjik reaksiyonlarda rol oynadıkları ve beklenmedik bir yapısal özelliğe sahip oldukları ortaya çıkmıştır (Salcedo ve diğ., 2007). Dört adet korunmuş disülfid köprüsü ile stabilize edilen dört α -heliksli yapıya sahip nsLTP'ler, proteaz ve termal işlemlere oldukça dirençlidir. Diğer alerjenlere kıyasla nsLTP’lerin daha şiddetli ve sistemik reaksiyonlara neden olmasının altında bu stabilitenin yattığı ileri sürülmektedir (Scheurer ve diğ., 2004; Asero ve diğ., 2001).

Alerjik hastalıkların görülme sıklığı giderek artmaktadır. Alerjenlerin tanımlanması, izolasyonu, biyokimyasal ve immünolojik karakterizasyonu bu moleküllerin IgE antikor üretimini nasıl indüklediğini ve böylece alerjik reaksiyonları nasıl tetiklediğini anlamak için çok önemlidir. Ayrıca saflaştırılmış alerjenler (doğal veya rekombinant), teşhis araçlarını standartlaştırmak ve geliştirmek, immünoterapi protokollerini rasyonel hale getirmek için de iyi bir çözüm yoludur (Valenta, 2002).

Alerjik hastalıkların tanı ve tedavisinde kullanılabilecek ürünler arasında rekombinant alerjenler de yer almaktadır. Bugüne kadar *Escherichia coli* ve *Pichia pastoris*'te başarılı bir şekilde üretilmiş birçok LTP vardır (Bogdanov ve diğ., 2015; Dubiela ve diğ., 2019). Prokaryotik bir model organizma olan *E.coli*, mikrobiyoloji ve biyoteknoloji alanlarında özellikle rekombinant DNA çalışmalarında konak organizma olarak yaygın kullanıma sahiptir (Al-Hejin ve diğ., 2019; Xie ve diğ., 2019). Doğal moleküle benzeyen rekombinant alerjenler, aynı kaynaktan gelen diğer alerjenlerden arındırılmış olma avantajına sahip olmalarının yanı sıra, yüksek miktarlarıyla geniş çaplı araştırmaların yapılabilmesine elverişlidirler. Spesifik IgE’lerin serumdaki düzeyini belirlemede saflaştırılmış rekombinant alerjenlerin kullanımı doksanlı yıllardan beri araştırılmaktadır. Çok çeşitli alerjen moleküller içinde sadece bazı diziler veya bölgeler (epitoplar) immünogenisite ve alerjenisiteden sorumlu olduğundan,

Valenta ve diğ. (1999) “rekombinant alerjen-temelli komponent-çözümlü diagnostik (CRD) ve immünoterapi (CRIT) yaklaşımlarını önermişlerdir. Bu yaklaşımlar günümüzde de geçerliğini korumakta ve son yıllarda önemi giderek artan alerji aşılarda da etkinliğin ve güvenliğin rekombinant alerjenlerle artılabileceği ön görülmektedir (Jutel ve diğ., 2012).

Bu tez çalışmasının amacı, *M. alba*’nın nsLTP proteinini *E.coli*’de rekombinant olarak üreterek saf bir şekilde elde etmek ve IgE bağlama kapasitesini değerlendirmek; böylece ileri araştırmalarda ve günümüzde oldukça problemlili olan alerji tanı ve tedavisinde kullanılabilecek yeni bir biyoteknolojik ürün ortaya koymaktır.

Çalışmanın ilk aşamasında *M. alba* poleninden total RNA izolasyonu yapıldı ve ardından total RNA’dan cDNA kütüphanesi oluşturuldu. Hedef gen, bu cDNA kütüphanesi kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltıldı. Lipit transfer proteininin tam gen dizisini belirlemek için PZR ürününün nükleotid dizilemesi yapıldı.

İkinci aşama, nsLTP geninin ve 6xHis etiketli pQE-2 plazmid vektörünün uygun restriksiyon enzimleriyle kesimi ve genin vektöre ligasyonu işlemlerini kapsamaktadır. Daha sonra *E.coli* hücreleri ligasyon ürünü ile transformasyona uğratıldı. Seçici besiyerinde çoğaltılarak tespit edilen transforme koloniler, koloni PZR ile doğrulandı.

Üçüncü aşamada, transforme koloniler büyük hacimli sıvı besiyerinde üretildi. Bu hücrelerden izole edilen proteinler immobilize metal afinite kromatografisi (IMAC) sistemine uygulanarak histidin etiketli rekombinant protein saflaştırıldı. Saflığı SDS-PAGE ile doğrulanan rekombinant nsLTP’nin IgE bağlama kapasitesi, *M. alba* polen alerjisi olan hastaların serumları ile gerçekleştirilen Western işaretleme (“immunoblotting”) tekniğiyle değerlendirildi.

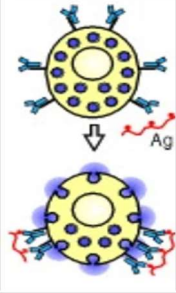
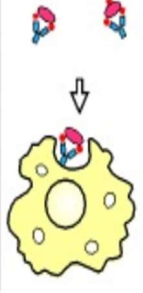
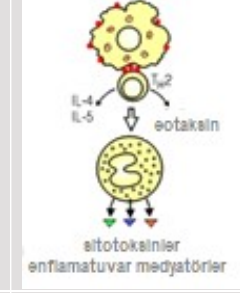
Yapılan bu çalışma ile *M. alba* poleninde bulunan nsLTP ilk kez rekombinant olarak üretilmiştir. Sabit kalitede, saf olarak ve yüksek miktarda üretilen rekombinant nsLTP ile daha ileri temel araştırmalar ve geniş hasta gruplarında klinik çalışmalar yapmak mümkündür. Ayrıca bu biyoteknolojik ürün, gelecekte yeni alerji tanı ve tedavi yaklaşımlarının ve araçlarının önemli bir parçası olabilir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. ALERJİ

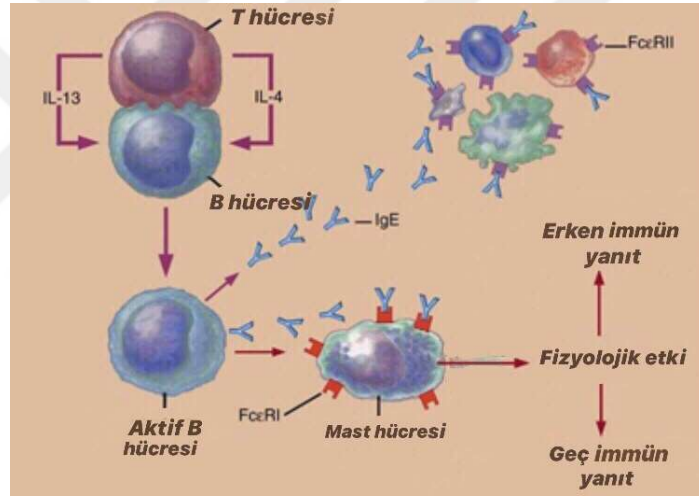
Dünya Alerji Örgütü (WAO, “World Allergy Organization”) ve Avrupa Alerji ve Klinik İmmünoloji Birliği (EAACI, “European Academy of Allergy and Clinical Immunology”) tarafından önerilen güncel bilimsel terminolojide alerji, spesifik immünolojik mekanizmalar tarafından başlatılan bir aşırı duyarlılık (hipersensitivite) reaksiyonu olarak tanımlanmaktadır (Johansson ve diğ., 2004). Aşırı duyarlılığa yol açan antijenler olarak tanımlanan alerjenlerin (Johansson ve diğ., 2004) en yaygın kaynakları polenler, lateks, böcekler, ev hayvanları, küfler, yiyecekler ve ilaçlardır (<https://www.aafa.org/types-of-allergies/>). Alerji antikor-aracılı veya hücre-aracılı şekilde gelişebilir. Coombs ve Gell (1963) tarafından yapılan sınıflandırmaya göre alerjiler patofizyolojik özellikleri farklı 4 tipte incelenir: Tip I, anafilaktik (IgE aracılı) aşırı duyarlılık reaksiyonu; Tip II, sitotoksik aşırı duyarlılık reaksiyonu; Tip III, immün kompleks tipi aşırı duyarlılık reaksiyonu; Tip IV, hücrel (gecikmiş) aşırı duyarlılık reaksiyonu (Tablo 2.1) (Abbas ve diğ., 2012) .

Tablo 2.1: Aşırı duyarlılık reaksiyonları için Coombs ve Gell sınıflandırması (Abbas ve diğ., 2012).

Özellik	Tip-I (anafilaktik)	Tip-II (sitotoksik)	Tip- III (immün kompleks)	Tip-IV (hücrel tip)
Aktarım şekli	Antikor	Antikor	Antikor	T-hücreleri
İmmün reaktant	IgE	IgM, IgG	IgM, IgG	Th1, Th2
				
Cevap süresi	15-30 dk	Dakikalar-saatler	3-8 saat	48-72 saat
Örnek	Alerjik astım, saman nezlesi	Hemolitik transfüzyon reaksiyonları, yenidoğanların hemolitik has.	Lupus, poliarterites nodas	Kontakt dermatit, tüberkülin reaksiyonu

Astımın nedeni ve kalıcılığı ile ilişkili ana faktörlerden biri olarak kabul edilen alerji, hafif semptomlarla seyredebileceği gibi potansiyel olarak yaşamı tehdit edici boyuta da ulaşabilir (Diaz ve diğ., 2002). Antikorların aracılık ettiği Tip I – III humoral reaksiyonlar olarak da adlandırılır. Humoral tipte olanlar günümüzde geçerliliğini korumakla birlikte, hücre aracılı olan Tip IV için alt sınıflar önerilmiştir (Rajan, 2003; Hamm, 2016).

Bir alerjenin vücuda girmesiyle bağışıklık sistemi, IgE antikorları üretmeye başlar. IgM taşıyan B hücrelerinde ağır zincir değişiminden sonra IgE salgılanması için B-hücre aktivasyonu, yardımcı T hücrelerine (“T helper”, T_h) bağımlı (T_h -bağımlı) veya bu hücrelerden bağımsız (T_h -bağımsız) olarak iki şekilde gerçekleşir (Durmaz, 2013).



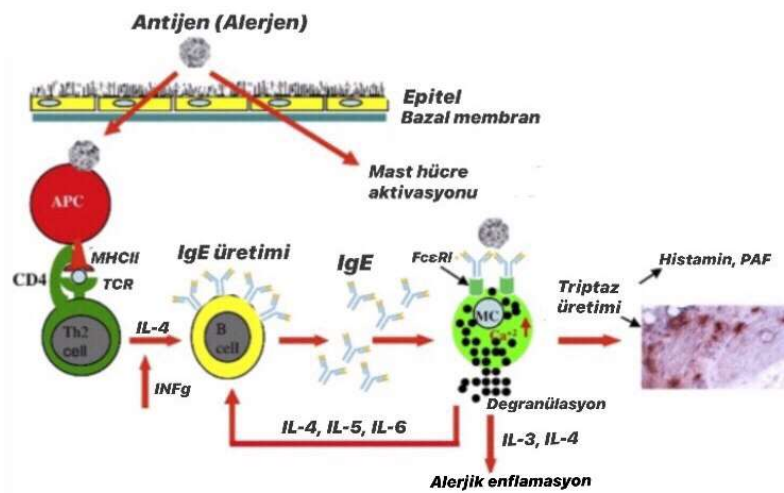
Şekil 2.1: T_h -bağımlı antijenlerle B hücre aktivasyonu ve sonuçları (Alessandra ve diğ., 2002).

Şekil 2.1’de gösterildiği üzere, T_h -bağımlı antijenlerle B hücre aktivasyonunda, öncelikle antijenin T_h hücre tarafından tanınması ve antijene özgü B hücresinin aktive edilmesine gerekir. IgM ve IgD ekprese eden B hücreleri ağır zincir izotip (sınıf) değişimi yaparak IgG, IgA ve IgE üreten hücrelere dönüşür. Bu sayede, farklı mikroorganizmalara veya alerjenlere karşı en iyi immün yanıtı gerçekleştiren farklı antikorlar üretilir. IL-4 ve IL-13, IgE değişimini sağlayan önemli faktörlerdir. Mevcut gözlemler, IL-4 ve IL-13’ün alerjik hastalıkların gelişiminde önemli faktörler olabileceğini düşündürmektedir (Defrance ve diğ., 1994). IL-4, IL-5 ve IL-6,

aktifleştirilmiş B hücrelerinin çoğalmasını ve farklılaşmasını uyarır. Bununla birlikte, eozinofillerin büyümesini ve farklılaşmasını uyarmada IL-5 de çok önemlidir (Amin, 2012).

T_h -bağımsız B hücre aktivasyonunda ise öncelikle, 600-1700 Å genişliğinde olan BCR'nin ("B Cell Reseptor") antijen bağlayan kısmı ile antijenin epitopu arasında nonkovalent bağ oluşur. En az iki BCR'ye antijen bağlanması sonucunda, sitoplazmik kısımlarında sinyal transdüksiyonu için gerekli olan, tirozince zengin ITAM ("immunoreceptor tyrosine-based activation motifs") motifleri bulunan CD79a ve CD79b molekülleri tarafından aktivasyon sinyalleri gönderilir (Durmaz, 2013).

Tip I alerjide IgE'nin öncelikle mast hücreleri ve diğer hematopoetik hücreler üzerinde eksprese edilen FcεRI, CD23 (FcεRII) ve diğer reseptörlere bağlanarak alerji gelişim sürecine aracılık ettiği düşünülmektedir (Burton ve Oettgen, 2011). Alerjene özgü IgE, mast hücrelerinin ve bazofillerin yüzeyindeki yüksek afiniteli reseptör FcεRI'e ve ayrıca artan miktarda alerjen alımına olanak sağlayan antijen sunan hücrelere (APC; "antigen-presenting cell") bağlanmaktadır. Alerjene yeniden maruz kalındığında reseptöre bağlı IgE'ler alerjenlerle çapraz bağlanır, bu da tip I aşırı duyarlılık reaksiyonlarının gelişmesine neden olan histamin, platelet aktive edici faktör (PAF), enzimler, sitokinler, lipid mediatörler gibi moleküllerin aktivasyonu ve salınması ile sonuçlanır (Şekil 2.2) (Amin, 2012; Josephs ve diğ., 2014).



Şekil 2.2: Tip I aşırı duyarlılıkta efektör mekanizmalar (Amin, 2012).

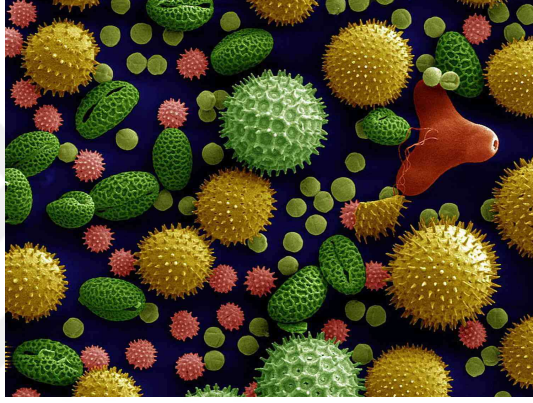
Alerji vücuttaki hemen hemen tüm organları etkiler. Alerjik rinit en yaygın belirti olsa da alt solunum yolu, konjonktiva (göz ile gözkapaklarını birleştiren zar), deri ve mide-barsak kanalı sıklıkla alerjik hastalıktan etkilenir. Alerjinin olabildiğince erken ve doğru tanısı, hastalığın tedavisi için çok önemlidir. Klinik tanıda, hastalık öyküsünün yanısıra, çeşitli *in vivo* testler (deri prick testi, deri altı testi, yama testi, bronşial, nazal ve konjonktival provokasyon testleri, gıda testi) ve *in vitro* testler (nazal smir testi; serumda alerjene özgü IgE konsantrasyonunun ELISA, RAST, CAP-RAST gibi tekniklerle belirlenmesi) uygulanır. Deri prick (çizik) testinde, önkolda steril bir lancet ile oluşturulan çizik üzerine çok az miktarda standardize alerjen solüsyonu uygulanır ve alerjik reaksiyon sonucu oluşan izler (kızarıklık ve kabarıklık) klinisyen tarafından izlenir. Test sırasında pozitif kontrol olarak histamin ve negatif kontrol olarak alerjen solüsyonun hazırlandığı çözücü kullanılır. Negatif kontrolün izinden 2 mm daha büyük olan izler pozitif sonuç olarak değerlendirilir (Rusznak ve Davies, 1998).

Alerjik hastalıklardan sorumlu alerjenlerin doğru teşhisi, alerjenden kaçınma ve immünoterapi gibi alerjene özgü terapiler için terapötik fırsatlar sunar. Alerjene özgü immünoterapi, zaman içinde klinik ve immünolojik tolerans elde etmek için bir hastaya artan dozlarda alerjen verilmesini içerir. Son yıllarda aeroalerjenler için dilaltı immünoterapisi (“SLIT-sublingual/swallow immunotherapy”) gibi yaklaşımlar geliştirilmektedir. Bu tedavi şeklinin özellikle çocuk hastalar için daha kabul edilebilir bir tedavi haline gelmesi beklenmektedir (Douglass ve O’Hehir, 2006).

Alerjik hastalıklar dünya çapında popülasyonu etkileyen önemli sağlık sorunlarından biridir. Dünya Alerji Örgütü (WAO)’ne göre, tüm popülasyonun alerji prevalansı %10-40 arasında değişmektedir (Pawankar ve diğ., 2013). EAACI’nın (European Academy of Allergy and Clinical Immunology) 2016 yılında yaptığı çalıştayda, kronik alerjik hastalığı olan 150 milyondan fazla Avrupalı bulunduğu bildirilmiş ve 2025 yılına kadar tüm Avrupa nüfusunun yarısının alerjiden etkileneceği öngörülmüştür (EAACI, 2016). Bu hastalık, popülasyonu yüksek oranda etkileyerek bireylerin yaşam kalitesini düşürmekte ve oluşturduğu iş gücü kaybı ile de maddi kayıplara yol açmaktadır. Alerjik hastalıkların daha iyi tedavileri edilebilmesi için yeni teknolojileri kullanarak hızlı ve doğru tanı yöntemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır (Johansson ve diğ., 2001; Puc, 2003).

2.2. POLEN ALERJİSİ

Tohumlu bitkilerin erkek üreme birimleri olan, çok farklı şekil ve renklerde küçük (çapı 5-300 μm) tanecikler şeklinde havaya dağılan polenler (Şekil 2.3) dış ortamdaki en önemli aeroalerjenlerdir (Taketomi ve diğ., 2006; Smith ve diğ., 2014). Havadaki polenler alerjenik moleküller içerirler ve solunum yoluyla burunda, bronşlarda veya gözlerde birikerek alerjik rinit (bahar alerjisi/saman nezlesi), alerjik astım ve konjonktivite neden olurlar (Cresti ve Linskens, 2000).



Şekil 2.3: Taramalı elektron mikroskobu ile görüntülenmiş çeşitli polenler (Dartmouth Elektron Mikroskopi Ünitesinde, William Crochot tarafından görüntülenmiştir.) (<https://www.thoughtco.com/facts-about-pollen-373610>).

Polen alerjisi (polinozis), ilk kez 1819'da Londra'da John Bostock tarafından tanımlanmıştır (Bostock, 1819). Yirminci yüzyılda milyonlarca kişiye alerjik rinit ve alerjik astım tanısı koyulmuştur (Smith ve diğ., 2014). Şimdiye kadar yapılan çalışmalar ile 150'den fazla polen alerjeninin, çim, ağaç ve yabani otlardan kaynaklanan alerjik süreçlerde önemli rol oynadığı bilinmektedir (Pablos ve diğ., 2016).

En önemli alerjen kaynakları çayır, ağaç ve yabani ot polenleridir. Polenlerin atmosferde bulunuşu mevsime, iklime ve coğrafi bölgeye göre değişir; ağaç polenleri ilkbaharın erken döneminde, çayır (ot) polenleri yaz başında ve yabani ot polenleri ise yaz ortasından sonbahara kadar atmosferde bulunarak alerji semptomlarına yol açmaktadır (Bıçakçı ve diğ., 2009).

Polenlerde bulunan en önemli alerjenler proteinler veya peptidlerdir, ancak polisakkaritler, glikoproteinler ve lipoproteinler de alerjik reaksiyonlara neden olabilirler (Smith ve diğ., 2014). Alerjenik proteinler, genellikle, polen protoplastının içine yerleşmiş olup, rehidrasyon işlemi sırasında kolayca salınmaktadır. Huş poleni alerjenleri olan Bet v 1 ve Bet v 2 için gösterildiği gibi, polenin susuz durumunda, alerjenler polen sitoplazmasında, çoğunlukla ribozom bakımından zengin alanlara yakın bir yerde bulunurlar. Rehidrasyondan sonra, birkaç dakika içinde salınarak tüm polen yüzeyini kaplarlar (Asam ve diğ., 2015).

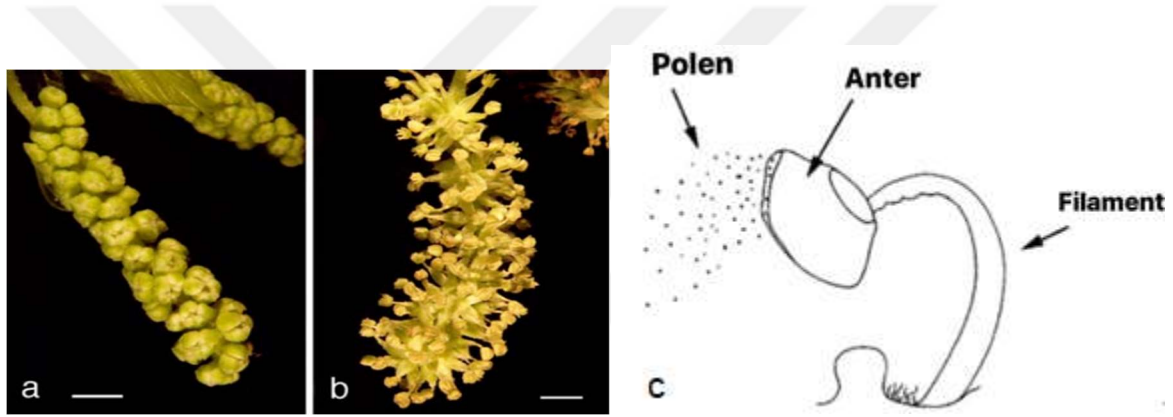
Hava kirliliği polen tanelerinin üzerinde kontaminasyona ve şekil değişikliklerine yol açabilir (Emberlin, 1998; Chehregani ve diğ., 2004). Hava kirliliğinin fazla olduğu bölgelerde bazı polenlerin kimyasal içeriklerinin ve alerjenitesinin değiştiği bildirilmiştir (Ghanati ve Majd, 1995; Majd ve Kiabi, 1997). Yapılan çalışmalarda havadaki kirlenici moleküllerin polenlerde bulunan proteinlerin kırılmasına veya polenlerin yeni proteinler sentezlemesine neden olabilecekleri rapor edilmiştir (Chakraborty ve diğ., 1996; Majd ve diğ., 2004). Bu yüzden polenlerin alerjenik kompozisyonunu tahmin etmek kolay değildir (Cresti ve Linskens, 2000; D'Amato ve diğ., 2007).

Genel olarak, polen alerjenleri mevsimsel alerjik rinit ve astım için önemli bir risk faktörü olarak kabul edilir. Bazı çalışmalar, alerjik rinitli hastaların %50'den fazlasının polen alerjenlerine duyarlı olduğunu göstermiştir (Bousquet ve diğ., 2008).

2.3. AKDUT VE ALERJENİK ÖZELLİKLERİ

Akdut (*Morus alba* L.), *Moraceae* (Dutgiller) familyasının *Morus* cinsine ait bir ağaç türüdür. Başta Asya olmak üzere Dünyanın ılıman iklim bölgelerinde yetişen yaklaşık 100 *Morus* türü arasında en yaygın olanlardan biridir (Pınar ve diğ., 2018). Dut türlerinin yaprakları başta ipekböceği yetiştiriciliği olmak üzere hayvancılıkta, meyveleri gıda sektöründe, gövde ve ince dalları ahşap el sanatlarında kullanılır; ayrıca dut ağaçları sulama gereksinimlerinin az olması nedeniyle peyzaj uygulamalarında yer alır (Sanchez, 2002). Yaprakları ve meyveleri biyoaktif moleküller bakımından zengin olduğundan son yıllarda tıbbi amaçla kullanımlarına ilişkin araştırmaların sayısı da giderek artmaktadır (Rodrigues ve diğ., 2019). Akdut ekstrelerinin de antikanser, anti-enflamatuvar, anti-obezite, anti-mikrobiyal, antidiabetik etkileri rapor edilmiştir (Grajek ve diğ., 2015).

Bununla birlikte, akdud polenin (Şekil 2.4) alerjik astım, alerjik rinit ve alerjik konjonktivit gibi hastalıkları veya temas yoluyla ürtiker hastalığını tetiklediği rapor edilmiştir (Sneller ve diğ., 1993; Subiza ve diğ., 1995; Navarro ve diğ., 1997; Singh ve Kumar, 2003; Ciardiello ve diğ., 2010). Ayrıca, akdud meyvesinde, bir hastadaki IgE antikorlarıyla reaksiyon veren 10- ve 18-kDa'luk alerjenler rapor edilmiş ve bunların *Betula* poleni ile de çapraz reaksiyona girdiği gösterilmiştir (Navarro ve diğ., 1997). İstanbul'da yürütölmüş multidisipliner bir çalışmada akdud polenin güçlü bir alerjen kaynağı olduğu klinik testlerle ortaya koyulmuş, serum IgE ile reaksiyon veren proteinlerden birinin metil transferaz olduğu proteomik analizlerle belirlenmiş (Çetereisi ve diğ., 2019) ve bu protein rekombinant DNA teknolojisiyle üretilmiştir (Aksüt, 2017).



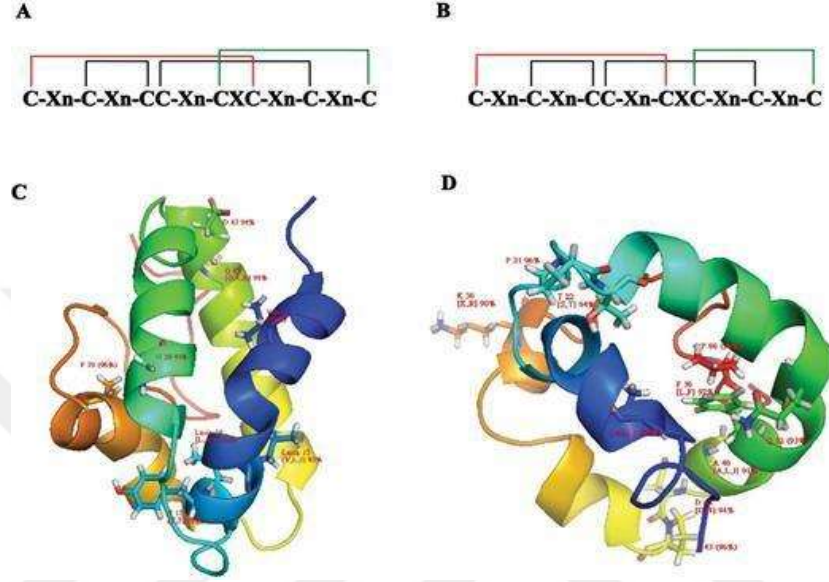
Şekil 2.4: Stamenleri (erkek gamet) içeren çiçek tomurcuğı. a) Antere bağılı bükölmüş filamentler. b) Antezden sonra açılmış filamentler (Ölçek çizgisi= 4 mm) c) Patlamış anterden polenlerin dağılımı (Taylor ve diğ., 2006).

2.4. LİPİT TRANSFER PROTEİNLERİ

Lipit transfer proteinleri (LTP'ler), lipitleri bağlayan ve transfer eden, fonksiyonel olarak önemli bitki proteinleridir. Bu proteinler, başlangıçta fosfolipit değişim proteinleri, daha sonra fosfolipit transfer proteinleri olarak adlandırılmıştır (Kader, 1996). Bu proteinlerin sadece fosfolipitleri değil, diğeri hidrofobik molekülleri de ligand olarak bağladıkları anlaşıldıktan sonra, spesifik olmayan ("non-specific") lipit transfer proteinleri (nsLTP'ler) olarak anılmaya başlanmışlardır (Finkina ve diğ., 2016).

nsLTP'ler, C-Xn-C-Xn-CC-Xn-CXC-Xn-C-Xn-C genel formunda sekiz sistein motifi (8CM) tarafından oluşturulan, dört korunmuş disülfid köprüsü ile stabilize edilen dört α -heliks yapısına sahiptirler (Şekil 2.5). Disülfid köprüleri, nsLTP'nin, ısı ve denatüre edici maddelerin yıkıcı

etkisine dirençli, çok kompakt bir yapıya katlanmasını sağlar (Liu ve diğ., 2015). nsLTP alt sınıf molekülleri olan nsLTP 1 ve nsLTP 2, dört disülfid köprüsünün stabilize ettiği ortak bir yapıya sahip olsalar da, bu iki molekülde amino asit dizisi tamamen korunmuş değildir, genel olarak yaklaşık %30 gibi düşük bir dizi benzerliği vardır (Yeats ve Rose, 2008).



Şekil 2.5: Bitki nsLTP'lerinin yapısal özellikleri. A ve B'de 8 adet sistein kalıntısı (birincil yapı) ve sistein kalıntıları arasındaki dört disülfid köprüsü (ikincil yapı) göstermiştir; siyah bağlantılar tip 1 ve tip 2 nsLTP'ler arasındaki ortak bağlantı modunu, kırmızı ve yeşil bağlantılar ise tip 1 ve tip 2 nsLTP'ler arasındaki farklı bağlantı modlarını gösterir (yüksek oranda korunan konumlardaki sistein kalıntıları 'C' ile, n sayıdaki diğer amino asit kalıntıları 'Xn' ile gösterilmiştir). C'de nsLTP 1'in, D'de nsLTP 2'nin üçüncül yapısı görülmektedir (Liu ve diğ., 2015).

nsLTP'lerin uzaysal yapılarındaki ortak özellik, ligand bağlama bölgesini barındıran hidrofobik bir boşluğa sahip olmalarıdır. Tersiyer katlanmanın spesifik özelliklerine bağlı olarak, lipid bağlama özelliği, farklı nsLTP üyeleri arasında değişmektedir. Bazı nsLTP'lerin oldukça spesifik ligandları varken, diğerleri çok çeşitli lipidleri bağlar ve aktarırlar. Bazı nsLTP'ler bir veya iki lipid molekülünü bağlayabilirken, bazıları serbest lipidleri bağlayamaz (Finkina ve diğ., 2016).

Son dönemlerde bitkinin doğuştan gelen bağışıklık sisteminin moleküler faktörleri arasında geniş bir biyolojik aktivite spektrumu sergileyen nsLTP'ler daha da ilgi çekici hale gelmiştir. Özellikle Akdeniz ülkelerindeki alerji hastalarının, bazı gıdalardan ve polenlerden gelen nsLTP'lere karşı duyarlılığının çok yaygın ve yüksek olması, alerjenik nsLTP spektrumunun

tanımlanmasının ve türler arasındaki çapraz reaktivite derecelerinin belirlenmesinin klinikte çok önemli olduğunu göstermektedir (Finkina ve diğ., 2016).

Araştırmacılara göre nsLTP'ler, sahip oldukları üç ana özellik nedeniyle önem taşımaktadır. İlki, bitki nsLTP'lerinin lipitleri bağlama ve transfer etme kabiliyetidir. İkinci özellik, bitkinin doğuştan gelen bağışıklığının bileşeni, yani savunma proteinleri olmalarıdır. Üçüncüsü ise, klinik olarak en önemli bitki alerjen sınıflarından birini oluşturmasıdır (Finkina ve diğ., 2016).

nsLTP'lerin proteolitik sindirime karşı dirençli olmalarının yanı sıra, IgE bağlama kapasitelerinde önemli bir kayıp olmadan ısı işlemlere (100-120°C'ye kadar) karşı koyduğu gösterilmiştir (Brenna ve diğ., 2000). Bu iki özellik nedeniyle de, bira, şarap, meyve suları ve reçeller gibi işlenmiş bitki türevli ürünlerde aktif nsLTP alerjenlerinin bulunabileceği bildirilmiştir (García-Casado ve diğ., 2001).

2.4.1. Alerjen nsLTP'ler

nsLTP'ler hem meyve, hem de polenlerde, IgE'nin aracılık ettiği reaksiyonlarda yer alan bir pan-alerjen ailesi olarak, insan sağlığına etkisi ile son yıllarda ilgi odağı haline gelmiştir. Farklı yönleri ile ilgili yayınlanmış 700'den fazla makaleden yaklaşık %30'u, nsLTP'lerin alerjenik özelliklerine odaklanmaktadır (Salminen ve diğ., 2016).

nsLTP'lerin disülfid bağları ile stabilize edilmiş yapısı, sindirim enzimleriyle parçalanmaya karşı yüksek direnç gösterir ve proteinlerin doğal immünojenik formda insan bağırsağına ulaşmasını sağlar ve duyarlılığa neden olur (Palacin ve diğ., 2009). LTP'lerin, çeşitli işlenmiş gıdalardaki (meyve suları, reçeller, bira, şarap, vb.) alerjenik kapasitesi, kimyasal ve enzimatik degradasyona direçlerinin yanı sıra, termal denatürasyona da duyarlı olmayan, oldukça kararlı bu yapılarıyla açıklanmaktadır (Salcedo ve diğ., 2004). Değişik bitkisel kaynaklardan gelen LTP1 alerjenleri Tablo 2.2'de gösterilmiştir.

Tablo 2.2: Farklı kaynaklardan gelen LTP1 alerjenleri (Finkina ve diğ., 2016).

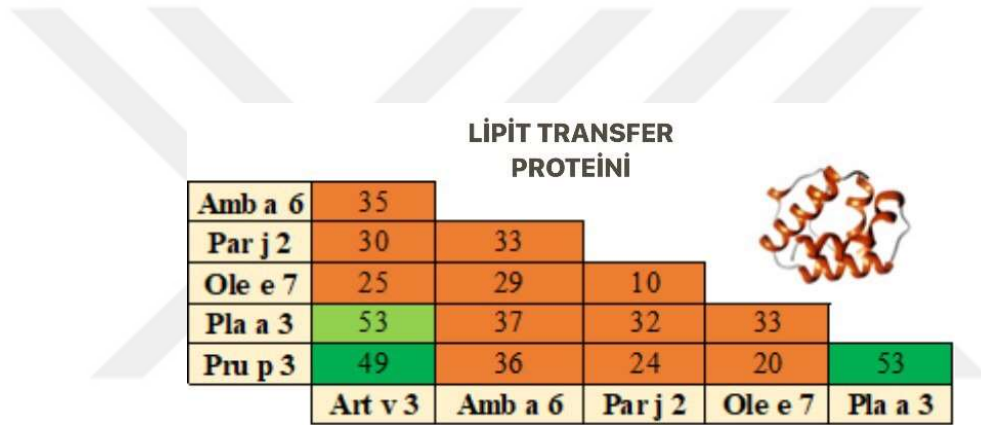
Meyveler	LTP1 alerjeni	Sebzeler	LTP1 alerjeni
<i>Prunus persica</i> (şeftali)	Pru p 3	<i>Asparagus officinalis</i> (kuşkonmaz)	Aspa o 1
<i>Prunus avium</i> (kiraz)	Pru av 3	<i>Lactuca sativa</i> (marul)	Lec s 1
<i>Malus domestica</i> (elma)	Mal d 3	<i>Brassica oleracea</i> (lahana)	Bra o 3
<i>Prunus domestica</i> (erik)	Pru d 3	<i>Lycopersicon esculentum</i> (domates)	Lyc e 3
<i>Citrus sinensis</i> (portakal)	Cit s 3	<i>Apium graveolens</i> (kereviz)	Api g 2
<i>Fragaria ananassa</i> (çilek)	Fra a 3	Tahıllar	LTP1 alerjeni
<i>Corylus avellana</i> (fındık)	Cor a 8	<i>Zea mays</i> (mısır)	Zea m 14
<i>Juglans regia</i> (ceviz)	Jug r 3	<i>Oryza sativa</i> (pirinç)	Ory s 14
<i>Castanea sativa</i> (kestane)	Cas s 8	<i>Triticum aestivum</i> (buğday)	Tri 14
		<i>Phaseolus vulgaris</i> (fasulye)	Pha v 3

Farklı kaynaklardan gelen nsLTP'ler arasında Şekil 2.6'da gösterildiği gibi belli oranlarda amino asit dizi benzerliği görülmüştür.

Alerjenler, çapraz reaktif alerjenler olarak da tanımlanabilir. Bir hastanın, sadece primer sensitize edici alerjene karşı değil, aynı zamanda önemli sekans homolojisi ve dolayısıyla, ortak epitoplar nedeniyle diğer bir alerjene karşı da IgE üretebileceği anlamına gelmektedir. Bu durum filogenetik olarak ilişkili türlerin alerjenleri ile ortaya çıkabildiği gibi, filogenetik olarak birbirine benzemeyen türlerden gelen alerjenler arasında da belirgin olabilir (Şekil 2.7). Bu alerjenler, pan-alerjenler olarak bilinir (Stewart ve Robinson, 2017).

Accession numbers	Allergen	Mor n 3	Fra a 3	Cit s 3	Rub i 3	Pru d 3	Pru p 3	Pru av 3	Mal d 3	Vit v 1	Pru du 8	Pru ar 3	Pyr c 3	Cor a 8	Art v 3	Par j 2
P85894	Mor n 3	100	75	73	72	70	70	70	70	69	68	68	64	62	61	30
Q4PLU0	Fra a 3		100	64	82	73	70	68	73	68	67	69	68	59	56	32
Q8L5S8	Cit s 3			100	64	63	68	62	70	59	64	69	61	59	56	29
Q0Z8V0	Rub i 3				100	74	69	70	75	61	67	68	71	61	54	31
P82534	Pru d 3					100	88	87	82	60	91	91	77	59	51	30
Q5RZZ3	Pru p 3						100	87	79	61	97	91	75	56	52	26
Q9M5X8	Pru av 3							100	83	63	89	85	79	59	53	26
Q5J026	Mal d 3								100	60	79	86	85	61	50	26
Q850K5	Vit v 1									100	60	58	63	53	56	34
B6CQU2	Pru du 8										100	89	78	62	52	25
P81651	Pru ar 3											100	78	60	52	30
Q9M5X6	Pyr c 3												100	56	56	25
Q9ATH2	Cor a 8													100	57	26
P0C088	Art v 3														100	32
P55958	Par j 2															100

Şekil 2.6: Lipit transfer proteinleri arasında amino asit dizi benzerliği (%) (Ciardiello ve diğ., 2010).



Şekil 2.7: Alerjenik LTP proteinlerinin çapraz reaktivite oranları (%). Koyu yeşil kutular, ispatlanmış IgE çapraz reaktivitesinin olduğunu; açık yeşil kutu, yüksek dizi benzerliğine göre IgE çapraz reaktivitesinin olabileceğini; turuncu kutular ise kanıtlanmış IgE çapraz reaktivitesinin olmadığını veya sınırlı olduğunu gösterir (Pablos ve diğ., 2016).

Literatürde *Morus* cinsine ait farklı türlerde nsLTP'nin alerjenik özelliğini gösteren birçok çalışma mevcuttur. *Morus nigra*'dan Mor n 3 lipit transfer proteini izole edilmiş ve alerjenik aktivitesi ortaya konulmuştur (Ciardiello ve diğ., 2010). Ayrıca, Pakistan'da yapılan bir araştırmada *Morus papyrifera*'da 10-kDa molekül ağırlığında alerjenik bir protein rapor edilmiştir. Molekül ağırlığı göz önünde bulundurularak onun da bir tür LTP olduğu düşünülmektedir (Micheal ve diğ., 2013). *M. alba* meyvesinde ise, bir hastadaki IgE antikorlarıyla reaksiyon veren, 10- ve 18- kDa'luk alerjenler rapor edilmiştir (Navarro ve diğ., 1997). Polen ve yapraklarda bulunduğu bildirilen bu alerjenlerin kimlikleri henüz belli değildir. *M. alba* polenin solunum yolu alerjilerine ve kronik ürtiker vakalarına neden olduğu gösterilmiştir (Ciardiello ve diğ., 2010). *M. alba* polenin güçlü alerjen kaynağı olduğu belirtilmiş olsa da, bu türde sadece bir alerjen tanımlanmıştır (Çetereisi ve diğ., 2019).

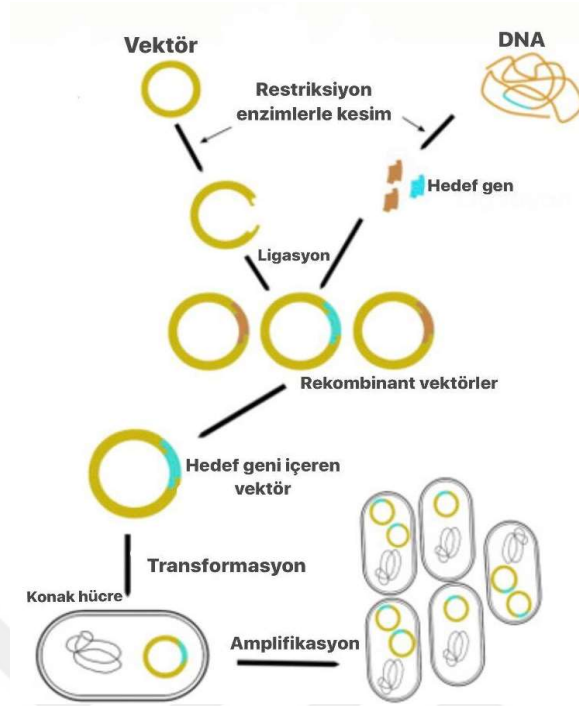
2.5. REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ

Rekombinant DNA teknolojisi, modern biyoteknoloji çağını başlatmıştır. İlk rekombinant DNA (rDNA) molekülleri, 1973 yılında, Stanford Üniversitesi ve California San Francisco Üniversitesi'nden Paul Berg, Herbert Boyer, Annie Chang ve Stanley Cohen tarafından üretilmiştir (Khan ve diğ., 2016). Paul Berg, nükleik asitlerin biyokimyası konusunda yaptığı çalışmalar ve özellikle ilk kez ortaya koyduğu rekombinant DNA ile, 1980 yılında Kimya dalında Nobel ödülü almıştır (<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1980/berg/facts/>).

Rekombinant DNA teknolojisi sayesinde, sağlık sorunlarının çözümü için kullanılabilecek önemli proteinler farklı (mikro)organizmalarda (özellikle bakterilerde) güvenli, hızlı ve ekonomik bir şekilde bol miktarda üretilmektedir. Bu teknolojinin çok disiplinli uygulamalarla sağlığın iyileştirilmesi, gıda kaynaklarının geliştirilmesi ve olumsuz çevresel koşullara direnç kazandırılması gibi farklı yönlerden yarar sağlama potansiyeli vardır (Khan ve diğ., 2016).

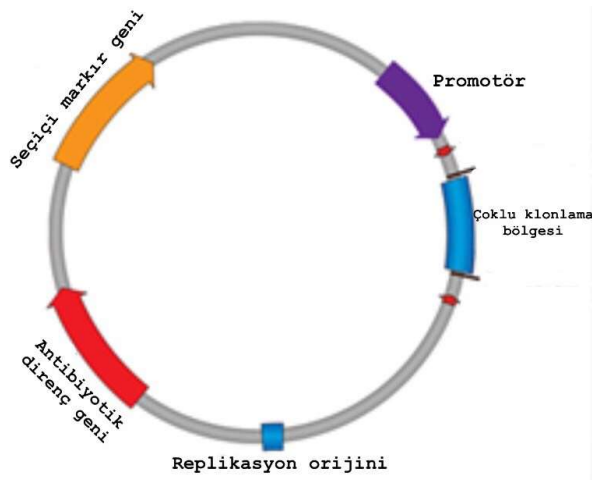
Organizmanın genomundaki manipülasyon, bir veya birkaç yeni genin ve düzenleyici elementin veya endojen genlerin eklenmesi şeklinde gerçekleştirilmektedir. Bu işlem için, genellikle, taşıyıcı bir DNA parçası olan vektörler kullanılmaktadır. Spesifik hedef DNA dizisini vektörle birleştirmek için DNA ligaz enzimi kullanılır ve oluşan rekombinat vektör uygun transformasyon yöntemleri ile hücreye aktarılır (Tschepp ve Breiteneder, 2017).

Bu teknoloji temelde beş aşama içerir: (1) istenen DNA'yı restriksiyon enzimleriyle kesme, (2) gen kopyalarını PCR ile çoğaltma, (3) genleri vektörlere yerleştirme, (4) vektörleri konak organizmaya aktarma, (5) rekombinant genlerin ürünlerini elde etme. Rekombinant DNA teknolojinin basamakları Şekil 2.8'de özetlenmiştir.



Şekil 2.8: Rekombinant DNA teknolojisinin önemli aşamaları (Pham, 2018).

Vektörler, rekombinant DNA teknolojisinin önemli parçaları olup amaca göre değişken olabilen kritik bölgeler içerirler (Şekil 2.9). Bugüne kadar çeşitli tiplerde vektörler geliştirilmiştir. En yaygın şekilde kullanılan *E. coli* plazmid vektörleri ve bakteriyofaj λ vektörleridir (Lodish ve diğ., 2000).



Şekil 2.9: Klonlama vektörü ve kritik bölgeleri.

Prokaryotik bir model organizma olan, moleküler karakterizasyonu çok iyi yapılmış *E. coli*, rekombinant protein üretimi için en çok kullanılan mikroorganizmadır (Cornelis, 2000). *E. coli*; iyi bilinen genetik özellikleri, genetik manipülasyon kolaylığı, çeşitli plazmid vektörlerinin ve tasarlanmış konakçı suşların mevcudiyeti, hızlı büyüme hızı, rekombinat ürünün yüksek ekspresyon düzeyi ve düşük üretim maliyeti gibi nedenlerle heterolog proteinlerin üretimi için tercih edilen bir sistemdir (Rodriguez ve diğ., 2014). *E. coli*'de rekombinant proteinlerin üretimine uygun çeşitli ekspresyon sistemleri mevcuttur (Goeddel ve diğ., 1979).

E. coli'de heterolog proteinlerin ekspresyonunu sağlayan güçlü veya zayıf promotörlere sahip plazmidler bulunmaktadır. *E. coli* ekspresyon vektörlerinde yaygın olarak kullanılan promotörlerden bazıları, T7 bakterisinden türetilmiş T7 promotörü, *E.coli lac* promotörü, geliştirilmiş modifiye edilmiş *lacUV5* versiyonu, *trp* ve *lac* promotörlerinin kombinasyonundan üretilen *Tac* promotörleridir. Bir promotörün gücü, RNA polimerazın promotör afinitesi ile düzenlenen transkripsiyon başlatma sıklığı ile yönetilir. T7 promotörü *E. coli lac* promotörüne kıyasla çok güçlüdür. Ancak büyük ölçekli rekombinant protein üretimi sırasında, biyolojik olarak aktif rekombinant proteinlerin veriminde düşüşe neden olan çözünmeyen agregat birikimine yol açabilir. Bu gibi durumlarda, T7 promotörü yerine zayıf bir promotör içeren ekspresyon vektörü kullanılarak protein çözünürlüğünün artırılması önerilir (Samuelson, 2011).

Günümüzde rekombinant DNA teknolojisi, gen yapısı, fonksiyonu, ekspresyonu ve düzenlenme mekanizmalarının aydınlatılması amacıyla tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bu teknoloji sayesinde üretilen rekombinant proteinler gıda, tarım, eczacılık ve kimya sektörün ilgisini çekmektedir. Rekombinant alerjen üretimi de araştırmacıların ilgi odağındadır.

İlk defa 1988 yılında, rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak beyaz yüzlü eşek arısı (*Dolichovespula maculata*) alerjeni (Dol m 5), kayın ağacı (*Betula verrucosa*) poleni alerjeni (Bet v 1) ve ev tozu akarı (*Dermatophagoides pteronyssinus*) alerjeni (Der p 1) üretilmiştir ve yapılan alerji testleri ile bu rekombinant alerjenlerin doğal alerjenlerle benzer alerjenik özellikte olduğu gösterilmiştir (Fang ve diğ., 1988; Breiteneder ve diğ., 1988; Chua ve diğ., 1988). Günümüzde, yüzlerce alerjen bakteri, maya, böcek virüsü ve bitki gibi çeşitli sistemlerde klonlanmış ve ifade edilmiştir (Cromwell ve diğ., 2011).

Doğal alerjen ekstraktları alerjen içeriği bakımından genellikle büyük varyasyon gösterir ve önemli alerjenlerden yoksun olabilir; ya da diğer kaynaklardan gelen alerjenlerle kontamine olma ihtimali vardır. Buna karşılık genetik mühendisliği teknikleriyle, yabani tip alerjenlerden IgE reaktivitesi düşürülmüş "hipoalerjenler" üretilebilir, böylece alerjene özgü immünoterapide istenmeyen alerjik reaksiyonların tetiklenme riski azaltılabilir. Rekombinant DNA teknolojisi, biyolojik aktiviteye sahip, iyi karakterize edilmiş ve kontamine olmamış aşı bileşenlerinin de üretimine izin vermektedir (Tschepp ve Breiteneder, 2017). Rekombinant alerjen türevleri ile yapılan ilk immünoterapi denemesi, rBet v 1 ve bir rBet v 1 trimerinin rekombinant fragmanları ile gerçekleştirilmiştir. Bu tedavinin sonucunda, alerjene özgü bloke edici IgG antikorlarının uyarılması, IgE üretiminin azalması ve IgE aracılı ani yan etkileri ortadan kaldırması gözlemlenmiştir (Niederberger ve diğ., 2004).

Rekombinant alerjenler sayesinde alerjik hastalıklarla ilgili temel bilgilerin artırılması, tanı ve tedaviye ilişkin yeni yaklaşımların geliştirilmesi mümkün olabilecektir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. POLEN ÖRNEKLERİ

Bu tez çalışması için, 2019 yılında Nisan-Mayıs aylarını kapsayan dönemde İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi'nin bahçesinden steril eldivenlerle *M. alba* polenleri toplandı. Polenler, erkek çiçeklerin kurullarının ayrılması için birkaç gün, gölgede kurutma kağıdı üzerinde bekletildi. Kurutulan ve polen eleme cihazından geçirilen polenler steril falkonlarda biriktirildi ve kullanılıncaya kadar -80°C'de saklandı.

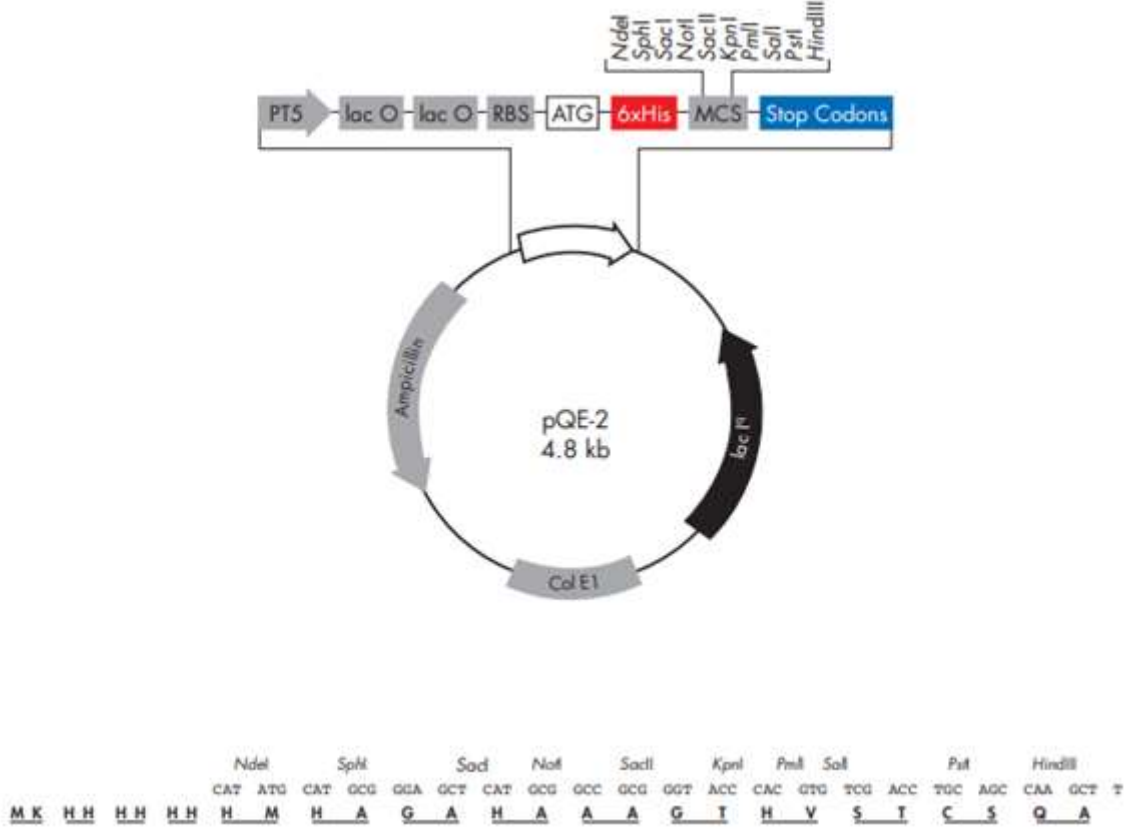
3.2. KULLANILAN ORGANİZMA VE PLAZMİD

Çalışmada vektör olarak kullanılan plazmidin (pQE-2) çoğaltımı için, bol miktarda ve sağlam plazmid elde edilmesini sağlayan, *recA1* ve *endA1* mutasyonlarına sahip *E. coli DH5α* ırkı kullanıldı. Rekombinant protein üretimi için ise, hücrelerde eksprese edilen heterolog proteinlerin yıkımını azaltan, *ompT* ve *lon* proteazlarından yoksun *E. coli BL21* (DE3) ırkı kullanıldı (Tablo 3.1). Her iki ırk da İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü kültür koleksiyonundan temin edildi.

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan *E. coli* ırklarının özellikleri.

İrklar	Özellikleri
<i>E. coli</i> DH5α	F/endA1 hsdR17(r-kmk+)supE44thi-1 recA1 gyrA(nalr)relA1Δ(lacZYA-arg FU169deoR[ø80 dLacΔ(LacZ)M15]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHIo ΔEcoRI-B int:: (lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5

Genetik haritası Şekil 3.2'de verilen pQE-2 plazmidi, T5 promotörüne sahip olup 6x Histidin etiketi taşımaktadır.



Şekil 3.1: pQE-2 plazmidinin genetik haritası. PT5- T5 promotörü, RBS- ribozom bağlama bölgesi, ATG- başlama kodonu, 6xHis- 6 Histidin etiketi, MCS- çoğul klonlama bölgesi.

3.3. BESİYERLERİ

E. coli üretimi Luria-Bertani sıvı besiyeri (LB) ve Luria-Bertani agarlı katı besiyeri (LBA) kullanılarak gerçekleştirildi. Tablo 3.2 ve Tablo 3.3’de gösterilen bileşenler, sırayla, distile suda çözündürüldükten sonra 1N NaOH kullanılarak besiyerinin pH değeri 7.2’ye ayarlandı. pH ayarı yapıldıktan sonra LBA besiyeri için karışıma agar eklendi ve besiyerleri otoklavlanarak steril hale getirildi. Sterilizasyon işlemi, otoklavda (Nüve OT 012 Masa Üstü Buharlı Sterilizatör), 121°C’de, 1.2 atmosfer basınçta, 15 dk tutularak gerçekleştirildi. Sterilizasyondan sonra besi ortamlarına, filtreden (0.22 µm, Millipore Millex-GS) geçirilerek steril hale getirilen ampisilinden [50 mg/mL stok olacak şekilde hazırlandı, Sigma-Aldrich A9393] son konsantrasyonu 100 mg/L olacak şekilde eklendi.

Tablo 3.2: LB besiyeri içeriği.

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

Tablo 3.3: LBA besiyeri içeriği.

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

3.4. RNA İZOLASYONU

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

Öncelikle, *M. alba* polenleri sıvı azot yardımıyla ve steril soğuk havan kullanılarak toz haline getirildi. Kit içeriğinde bulunan lizis solüsyonuna ("Lysis Solution") son konsantrasyonu 10 µL/mL olacak şekilde β-merkaptöetanol (AppliChem, A1108) eklendi. Polen örnekleri üzerine 100 mg örnek başına 1 mL olacak şekilde lizis solüsyonu eklenerek homojenizasyon işlemi gerçekleştirildi. Homojenat "Filtration Column" tüpüne aktarıldı ve 14000 rpm'de 2 dk santrifüjlendi (Sigma 3-30K). Santrifüj sonrası tüpte altta kalan sıvıya 1 mL %70'lik etanol eklendi ve karışım "RNA Spin Column with Collection Tube" içine alınarak 14000 rpm'de 1

dk santrifüjlendi. Kolondan geçen sıvı atıldı ve kolon üzerine kit içeriğindeki RNA yıkama solüsyonu I'den ("Wash Solution I") 500 μ L eklendi ve 14000 rpm'de 1 dk santrifüjlendi. Kolondan geçen sıvı atıldı ve üzerine farklı bir tüpte 80 μ L DNaz I inkübasyon tamponu (DNase I Incubation Buffer") ile 2 μ L DNaz I karıştırılıp nazikçe pipetaj yapılarak hazırlanan DNaz solüsyonu eklendi ve 15 dk oda sıcaklığında bekletildi. Kolon üzerine tekrar 500 μ L RNA yıkama solüsyonu I ekleyerek, 14000 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldı. Sonra kolon farklı bir toplama tüpüne alındı ve üzerine 600 μ L RNA yıkama solüsyonu II ("Wash Solution II") eklendi. 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldıktan sonra bu basamak ikinci kez tekrarlandı. Kolon 14000 rpm'de 3 dk santrifüj edilerek yıkama solüsyonundaki etanol uzaklaştırıldı ve temiz bir mikrotüpe yerleştirilerek üzerine 30 μ L "Nuclease Free Water" eklendi ve 1 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 14000 rpm'de 1 dk santrifüjlemeden sonra filtreli kolon atıldı. Mikrotüp içindeki RNA karışımı, Nanodrop (NanoDrop™ 2000/2000c, Thermo Scientific™) ile miktarı belirlendikten ve elektroforetik analizi yapıldıktan sonra kullanılıncaya kadar -80 °C'de saklandı. Total RNA'ların bütünlüğünün kontrolü için %1'lik agaroz jel kullanıldı.

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

Ters ("reverse") transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR), RNA moleküllerinin ters transkriptaz ile tamamlayıcı DNA ("complementary DNA", cDNA) dizilerine dönüştürülmesi, ardından yeni sentezlenen cDNA'nın standart PZR prosedürleri ile çoğaltılması işlemidir (Arı, 2012). Ters transkriptaz, kalıp olarak RNA'yı kullanarak DNA sentezini katalizleyen bir RNA-bağımlı DNA polimerazdır.

3.5.1. cDNA Sentezi

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

Tablo 3.4: cDNA sentezi için kullanılan reaksiyon bileşenleri.

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

Tablo 3.5: cDNA sentezi için PZR koşulları.

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

3.5.2. *nsLTP* Geninin PZR ile Çoğaltılması ve Kontrolü

Total RNA'dan sentezlenen cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak RT-PZR'nin ikinci kısmı gerçekleştirildi. Bunun için ticari bir kit olan “Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific, MAN0012393)” kiti kullanıldı. Reaksiyon ortamı ve koşulları, üretici firmanın önerdiği şekilde hazırlanarak işlem başlatıldı. Reaksiyon bileşenleri Tablo 3.6'da, reaksiyon koşulları Tablo 3.7'de, RT-PZR'de kullanılan primerler [ileri (“forward”, F) primer, geri (“reverse”, R) primer] ise Tablo 3.8'de verildi. PZR ürünlerinin elektroforetik analizi %0.8'lik agaroz jel kullanılarak yapıldı.

Tablo 3.6: *nsLTP* geninin PZR ile çoğaltımı için kullanılan reaksiyon bileşenleri.

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

Tablo 3.7: *nsLTP* geninin PZR ile çoğaltımı için reaksiyon koşulları.

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

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

Primerin Kısa Gösterimi	GC oranları (%)	T _m (°C)	Primerin Dizisi
F	50	61	5' – GGGTCC <u>CATATG</u> ATGGCAAGCTTTTGG C- 3'
R	48	58	5' – ATCTG <u>CAGTCA</u> CTTGATGCTGTTGC -3'

3.6. *NSLTP* GENİNİN PQE-2 PLAZMİDİ İLE LİGASYONU VE REKOMBİNANT PLAZMİDİN KONTROLÜ

3.6.1. *nsLTP* geninin ve pQE-2 Plazmidinin Restriksiyon Endonükleazlarıyla Kesimi

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

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

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

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

3.6.2. *nsLTP* Geninin ve pQE-2 Plazmidinin Agaroz Jelden Geri Kazanımı ve Dizilenmesi

Çiftli kesimi yapılan *nsLTP* geninin ve pQE-2 plazmidinin agaroz jelden geri kazanımı, ticari bir kit olan "PureLink® Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, K210012)" ile yapıldı. Kesim ürünlerinin istenen boyuttaki bantları bir bistüri yardımı ile jelden kesildi ve mikrotüplere aktarıldı. Ağırlıkları belirlenen jel parçalarının üzerine, ağırlığının 3 katı olacak şekilde "Gel Solubilization Buffer" koyuldu ve 50°C'ye ayarlanmış ısıtıcı blokta (Wisd, HP-48P) 3 dk ara ile vorteks yapılarak 10 dk bekletildi. Bu karışım filtreli kolonlara ("Quick Gel Extraction Columns") yüklendi ve 12000 rpm'de 1 dk santrifüjlendi. Daha sonra kolonların üzerine 500 µL "Wash Buffer" solüsyonu ekleyerek tekrar 12000 rpm'de 1 dk santrifüjleme yapıldı. Kolonların altında kalan sıvılar atıldı ve kolonlar 14000 rpm'de 5 dk santrifüjlenerek etanol uzaklaştırıldı. Kolonlar yeni mikrotüplere alındı ve üstlerine 20 µL distile su eklendi. 1 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 12000 rpm'de 1 dk santrifüjlendi. Mikrotüplerin altında kalan sıvılardaki kesim ürünleri ligasyon işlemine kadar -20°C'de saklandı. Agaroz jelden geri

kazanılan ürünler DNA dizileme analizleri için Medsantek (İstanbul, Türkiye) firmasına gönderildi.

3.6.3. *nsLTP* Geninin pQE-2 Plazmidini ile Ligasyonu

*Pst*I ve *Nde*I RE'leri ile çiftli kesim yapılarak yapışkan uçlara sahip hale getirilen PZR ürünü ile pQE-2 plazmidinin ligasyon işlemi, ticari bir kit ("T4 DNA Ligase", Invitrogen 15224017) ile yapıldı. Tablo 3.10'da reaksiyon bileşenleri verilen ligasyon işlemi 24°C'de, 4 saat süreyle gerçekleştirildi. Bu işlemin ardından plazmidleri çoğaltmak amacıyla *E. coli DH5α*'ya transformasyon işlemi uygulandı.

Tablo 3.10: Ligasyon işleminde kullanılan reaksiyon bileşenleri.

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

3.7. PLAZMİDİN *E. COLI*'DE ÇOĞALTILMASI

3.7.1. *E. coli* Hücrelerinin Yeterli Hale Getirilmesi

Yeterli (kompetent) hücre oluşturmak için -80 °C'de, 1:1 (v/v) gliserol stoğunda saklanan *E. coli DH5α* hücrelerinden 500 µL alınarak 5 mL LB besiyerine ekildi ve 180 rpm'de 37°C'de bir gece boyunca üretildi. Rekombinant proteinin üretimi için yapılan transformasyonda kullanılacak hücre süspansiyonunu hazırlamak için ise *E. coli BL21* (DE3) hücrelerinden alınarak LB besiyerine aynı şekilde ekim yapıldı. Kültürlerden 500 µL alınarak 50 mL' lik LB besiyerine ekim yapıldı ve 37°C'de 180 rpm'de OD₆₀₀ = 0.3-0.4 oluncaya kadar üretildi. Kültürler 10 dk buzda bekletildi. Hücreler 4°C'de 14000 rpm'de 4 dk santrifüjlendi. Oluşan pelletin üzerine soğuk 10 mL 0.1 M CaCl₂ eklendi ve buzda 30 dk bekletildi. 4°C'de 14000 rpm'de 4 dk santrifüjleme işleminden sonra, pellet üzerine 2 mL 0.1 M CaCl₂ eklenerek hücreler süspansiyon edildi ve transformasyon işlemi için hazır hale getirildi.

3.7.2. pQE-2 Plazmidinin ve Rekombinant Plazmidin *E.coli*'ye Transformasyonu

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

3.7.3. Plazmid İzolasyonu

Plazmid izolasyonu için ticari bir kit ("Plasmid Miniprep Plus Purification Kit", GeneMark, DP01-Plus-300) kullanıldı. Öncelikle transformasyon işlemi sonucunda seçici besiyerinde üreyen kolonilerden rastgele alınarak 100 µg/mL ampicilin içeren 5 mL LB besiyerine ekim yapıldı ve hücreler çalkalamalı etüvde 180 rpm'de, 37°C'de gece boyu üretilti. Ertesi gün hücreler 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Hücrelerin üzerine kitte bulunan 200 µL "Solution I" eklendi ve vorteks yapıldı. Daha sonra 200 µL "Solution II" ilave edilerek tüpler 10 kez ters düz edildi ve 200 µL "Solution III" eklendi ve tüpler tekrar 10 kez ters düz edildikten sonra 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Tüpte oluşan üst faz kit içeriğindeki filtreli kolonlara aktarıldı ve 14000 g'de 1 dk santrifüjlendi. Alt sıvı atıldı, kolonların üzerine 500 µL "Endotoxin Removal Wash Solution" eklendi. Bu şekilde 2 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 14000 rpm'de 1 dk santrifüjlendi. Ardından kolonlara 700 µL "Wash Solution" eklenip, 14000 rpm'de 1 dk santrifüjlendi ve bu basamak 2 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Daha sonra 14000 rpm'de 5 dk santrifüjlenerek etanolün tamamen uzaklaşması sağlandı. Filtreli kolonlar ayrı bir mikrotüpe alındı ve kolonlara 20 µL 'Nuclease Free Water' eklenerek 1-2 dk oda sıcaklığında bekletildi ve sonra 14000 rpm'de 1 dk santrifüjlendi. Kolondan geçen sıvıda bulunan saf veya rekombinant plazmid kullanılabilecek şekilde -20°C'de saklandı.

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

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

Tablo 3.11: Tekli kesim reaksiyon bileşenleri.

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

3.7.5. Rekombinant Plazmid İçeren Transformant Hücrelerin Koloni PZR ile Belirlenmesi

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

Tablo 3.12: Koloni PZR bileşenleri.

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

Tablo 3.13: Koloni PZR koşulları.

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

3.8. AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ

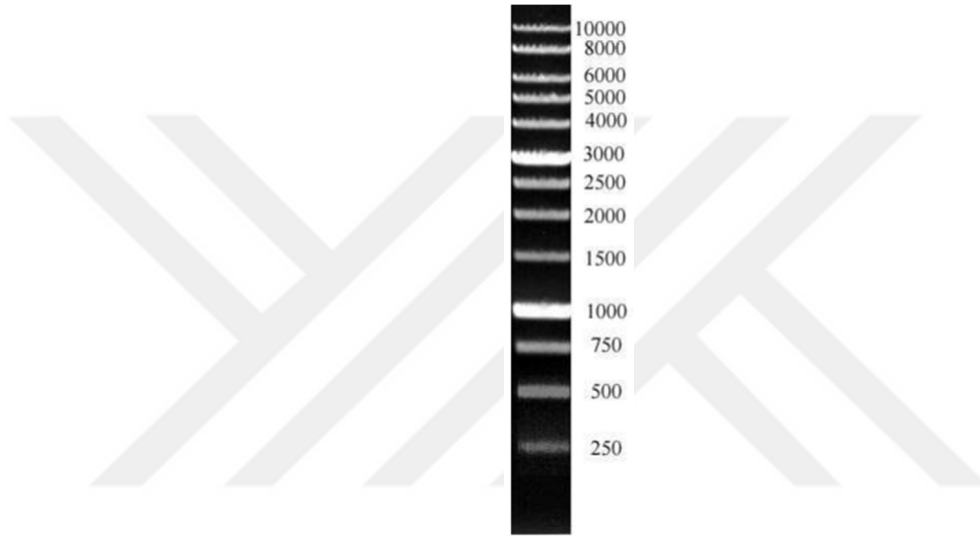
Bu tez çalışmasında RNA ve DNA örneklerinin, sırasıyla %1'lik ve %0.8'lik agaroz jelde kontrolü yapıldı. %0.8'lik agaroz jeli hazırlamak için 50X Tris-asetat EDTA (etilendiamintetraasetik asit) tamponu (TAE), 1X olacak şekilde sulandırıldı. 0.32 g agaroz (Sigma-Aldrich, Tip II, A9918) 40 mL 1X TAE tamponu ile karıştırıldı ve 2 dk mikrodalga fırında çözündürüldü. Agaroz çözeltisi oda sıcaklığına getirildi. Üzerine etidyum bromür (EtBr, Sigma-Aldrich E1510) solüsyonundan jelde 0.5 µg/mL EtBr olacak şekilde eklendi. Bu karışım, kuyucuk oluşturması için tarak takılarak hazır hale getirilmiş “Sub-Cell® GT Agarose Gel Electrophoresis Systems (Bio-Rad, 170-4406)” yatay elektroforez sisteminin kasetine döküldü. Polimerizasyonun sağlanması için 30 dk bekletildi, sonra tarak çıkarılarak kaset elektroforez tankına düzgün bir şekilde yerleştirildi. Elektroforez tankı 1X TAE tamponu ile dolduruldu. Nükleik asit örneklerinden 5 µL alınıp 1 µL 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak jele yüklendi. Bant boyutlarının analizi için markır olarak “1 kb ladder” (GeneOn 305-005) (Şekil 3.3) kullanıldı. Elektroforez sabit voltajda (70 V) 1 saat sürdürüldü ve işlem sonunsa jel UV altında görüntülendi. 50x TAE tamponunun içeriği Tablo 3.14’de, 6X yükleme tamponunun içeriği ise Tablo 3.15’de verildi.

Tablo 3.14: 50x TAE tamponunun içeriği.

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

Tablo 3.15: 6x Yükleme tamponunun içeriği.

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

**Şekil 3.2:** Agaroz jel elektroforezinde markır olarak kullanılan “1 kb ladder” (GeneOn 305-005).

3.9. PROTEİN ANALİZLERİ

3.9.1. Protein İzolasyonu

nsLTP proteininin spektrofotometrik ve elektroforetik analizini yapmak için biri transformant diğeri kontrol grubu olmak üzere 2 farklı hücre grubundan protein izolasyonu yapıldı. Öncelikle, *nsLTP* genini içeren (rekombinat) ve içermeyen pQE-2 plazmidini taşıyan kolonilerden örnek alınarak 100 µg/mL ampisilin içeren LB besiyerine ekildi ve çalkalamalı etüvde 180 rpm’de, 37°C’de gece boyu üretildi. Bu kültürler taze besiyerine aktarılacak şekilde yaklaşık 3 saat boyunca OD₆₀₀=0.6-0.8 oluncaya dek üretildi. Üzerine son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde IPTG (“isopropylthio-β-D-galactopyranoside”) eklenerek 3-4 saat boyunca 220 rpm’de 37°C’da çalkalamalı etüve bırakıldı. Daha sonra 5000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü. Tablo 3.16’da gösterildiği gibi hazırlanmış tampon öncelikle 1:5

(v/v) hacminde olacak şekilde 1 mM PMSF (fenilmetilsulfonil florid) ile karıştırıldı ve karışımdan 600 µL alınarak çöktürülmüş hücrelerin üzerine eklendi. Ardından hücreler öncelikle sıvı azotta 2 dk ve 42°C’de 3 dk bekletilerek ve bu işlem 5 kez tekrarlanarak parçalama tamamlandı. Parçalanmış hücreler 20 000 rpm’de 40 dk santrifüjlendi ve süpernatant yeni tüplere alınarak bir sonraki işleme kadar -20°C’de saklandı.

Tablo 3.16: Protein izolasyonu için hazırlanan tamponun içeriği.

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

3.9.2. Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

İzole edilen proteinlerin konsantrasyonu Smith ve diğ. (1985) tarafından önerilen bişinkoninik asit (BCA) yöntemi ile yapıldı. BCA testi iki reaksiyondan oluşur: İlk olarak, proteinlerdeki peptit bağları, kit içeriğinde bulunan bakır (II) sülfatta Cu^{2+} iyonlarını Cu^+ ’ya (sıcaklığa bağlı reaksiyon) indirger. İndirgenmiş Cu^{2+} miktarı, çözeltide mevcut olan protein miktarı ile orantılıdır. Daha sonra bişinkoninik asit molekülü her Cu^+ iyonu ile 562 nm dalga boyunda ışığı güçlü bir şekilde emen mor renkli bir kompleks oluşturur. Bu yöntem için “SMART™ BCA Protein Assay Kit, iNtRON Biotechnology” ticari kiti kullanıldı. Öncelikle kitte bulunan BSA (“Bovine Serum Albumin”, Sığır Serum Albümini) protein standardı distile su ile uygun oranlarda seyreltildi (25, 125, 250, 500, 1000, 1500 ve 2000 µg/mL). Protein konsantrasyonu belirlenecek olan örnekler ve kör örnek (“blank”) 5 kat dH₂O ile seyreltildi. Kit içeriğinde bulunan reaktif A ve reaktif B solüsyonları 50:1 (v:v) oranında karıştırıldı ve 200’er µL olmakla 96 kuyucuklu mikrolaka kuyucuklarına konuldu ve üzerlerine seyreltilmiş örneklerden ve kör örnekten 25’er µL eklendi. Örnekler ve standartlar 2 tekrarlı olarak değerlendirildi. Belirteç ile örneklerin iyice karışması için mikrolaka 1 dk çalkalayıcıda (Heidolph Unimax 1010) bırakıldı. 37°C’de, 30 dk etüvde (Thermo Scientific, Heracell™ 240) bekletildi. Daha sonra mikrolaka okuyucu (EON, BioTek Instruments Inc.) ile 562 nm dalga boyundaki absorbansı ölçüldü. BSA standartlarına ait absorbans ve konsantrasyon değerleri ile oluşturulan grafik kullanılarak protein konsantrasyonları hesaplandı.

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

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

Tablo 3.17: SDS-PAGE için hazırlanan çözeltiler.

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

Tablo 3.18: SDS-PAGE ayırma ve yükleme jeli içerikleri (1 jel için gerekli değerler).

Jel İçerikleri	Ayırma jeli (15% Akrilamid)	Yükleme Jeli (5% Akrilamid)
Tris-HCl (1.875 M, pH:8.8)	1 mL	-
Tris-HCl (0.6 M, pH:6.8)	-	250 µL
dH ₂ O	1.431 mL	1.875 mL
%30 Akrilamid çözeltisi	2.493 mL	337.5 µL
%10 Sodium Dodesil Sulfate (SDS)	50 µL	25 µL
%10 Amonyum Persülfat (APS)	25 µL	12.5 µL
TEMED	1.75 µL	3.5 µL

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

3.9.4. Coomassie Boyama Yöntemi

Coomassie boyama yöntemi kullanılarak elektroforez işlemi sonrasında jeldeki protein bantları görünür hale getirildi. Çözelti 50:10:40 hacminde hazırlanan MeOH:AcOH:dH₂O karışımında %0.05 (w/v) Coomassie parlak mavisi ("Coomassie brilliant blue" R-250, Merck 112553) olacak şekilde yapıldı.

Jel üzerine boyama çözeltisi ilave edildi ve oda sıcaklığında 2 saat çalkalandı. Daha sonra fazla boyayı uzaklaştırmak için "destaining" (5:7:88 hacim oranlarında MeOH:AcOH:dH₂O) çözeltisi kullanıldı ve jel boyadan tamamen arınıncaya dek belli aralıklarla çözelti değiştirilerek

çalkalayıcıda bekletildi. Jelde oluşmuş bantlar ChemiDoc MP (Bio-Rad) görüntüleme sistemi, ImageLab 5.2.1 yazılımı kullanılarak görüntülendi.

3.9.5. Rekombinant Proteinin Saflaştırılması

Histidin etiketli rekombinant nsLTP proteininin saflaştırılması, bu proteinlerin nikelli kolona (MCLAB, NINTA-100) bağlanarak etiketsiz proteinlerden ayrılması prensibine dayanmaktadır. Öncelikle, nikelli kolon protein örnekleri ile muamele edildi ve ardından farklı imidazol konsantrasyonlarında hazırlanan solüsyonlarla yıkamalar yapıldı. Saflaştırma süresince kullanılan solüsyonlar Tablo 3.19’de gösterildi.

Tablo 3.19: Saflaştırmada kullanılan çözeltiler ve içerikleri.

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

Saflaştırılmış protein örneği proteomik analizlerde kullanılan protein çözeltilerinin konsantrasyonunu saptamak için BCA Protein Assay Kit (Pierce, Thermo Scientific) ile konsantrasyonu belirlendi.

3.9.6. Western-Blot Analizi

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

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

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

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

Membran üzerinde nonspesifik bağlanmaları en aza indirmek için transfer işleminin hemen ardından hazırlanan %5’lik bloklama tamponu [%0,1 (v/v) Tween-20 içeren TBST [(“Tris-buffered saline with Tween-20”), %5 (w/v) süt tozu] içinde oda sıcaklığında membran 2 saat inkübe edildi. Bloklama tamponu içinde 1:4 (v:v) oranında hazırlanan hasta ve kontrol (sağlıklı) serumları (Çetereisi ve diğ., 2019) ile IgE bağlama kapasitesini göstermek için kullanıldı. Bu birincil antikorlar ile membran +4°C’da 1 gece çalkalayıcıda inkübe edildi. Sonra membran TBST tamponu ile 5’er dakika 5 kez düşük devirde çalkalanarak yıkandı. Hasta serum ile işlem

gören membranlar bloklama tamponu içinde 1:1000 (v:v) oranında hazırlanmış fare anti-insan IgE (Fc)-HRP (SouthernBiotech) ikincil antikorunda 1 saat çalkalayıcıya bırakıldı. Sonra membran tekrar yıkama solüsyonu ile aynı şekilde yıkandı.

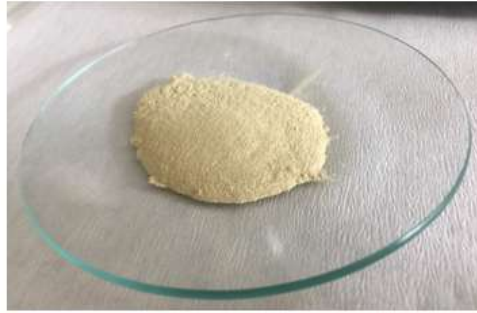
Spesifik protein bantlarının görüntülenmesi için “ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham RPN2133)” görüntüleme kiti kullanıldı ve firmanın önerilerine göre kit içeriğindeki bulunan A ve B reaktifi 1:1 (v:v) oranında karıştırılarak hazır hale getirildi. Karanlık odada, kırmızı ışık altında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



4. BULGULAR

4.1. HAZIRLANAN POLEN ÖRNEĞİ

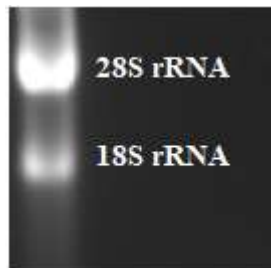
Bu tez çalışması için, 2019 yılında Nisan-Mayıs aylarını kapsayan dönemde İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi'nin bahçesinden steril eldivenlerle toplanan *M. alba* polenleri kurutulduktan sonra polen eleme cihazından geçirildi. Elde edilen polen örneği Şekil 4.1'de verildi.



Şekil 4.1: *Morus alba*'nın kurutulmuş polen örneği.

4.2. TOTAL RNA İZOLASYONU VE KONTROLÜ

Bu tez çalışmasında ilk olarak *M. alba* poleninden total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen RNA'ların konsantrasyon ve saflıklarının kontrolü yapılarak elde edilen verilerle total RNA konsantrasyonu hesaplandı. Total RNA konsantrasyonunun ortalama 5122 ng/μL olduğu tespit edildi. İzole edilen total RNA'nın A260/A280 değerinin 1.8-2 aralığında olduğu belirlendi. Örnek, agaroz jel elektroforezinde yürütüldü (Şekil 4.2).

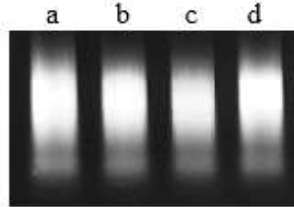


Şekil 4.2: *Morus alba* poleninden izole edilen total RNA.

4.3. TERS TRANSKRİPSİYON POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

4.3.1. cDNA Sentezi

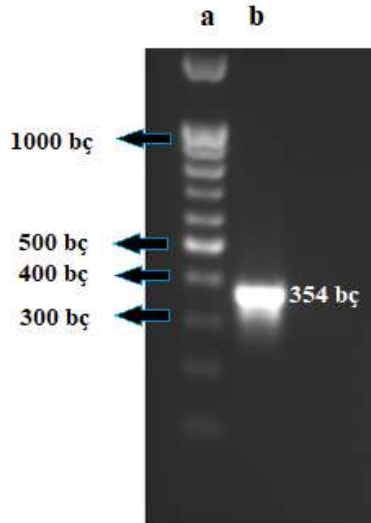
Yapılan total RNA izolasyonunun ardından cDNA sentezi yapıldı ve örnek %1'lik agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: a-d) Total RNA'lardan sentezlenen 4 farklı cDNA.

4.3.2. *nsLTP* Geninin PZR ile Çoğaltımı ve Kontrolü

Genin dizisini tanımlamak ve çoğaltmak için F ve R primerleri ile ters-transkriptaz PZR (RT-PZR) yapıldı. Daha sonra PZR ürünü %1'lik agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi. Yapılan biyoinformatik analizler sonrası *nsLTP* geninin cDNA'sının 354 bp olduğu tespit edildi. PZR ürününün elektroforetik analiz sonucunda oluşturduğu tek bant Şekil 4.4'te gösterildi.



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

4.4. PZR ÜRÜNÜNÜN DİZİ VE HOMOLOJİ ANALİZ SONUÇLARI

PZR ürünü olan *nsLTP* gen (354 bç) dizisinin belirlenmesi için çift yönlü okuma ile dizileme işlemi ticari bir firmaya (MedSanTek) yaptırıldı. 354 bç'lik gen dizisinin dizileme sonucu Şekil 4.5'te verildi. Dizileme sonucuna göre amino asit dizisi (Şekil 4.6) belirlendi ve amino asit dizi bilgisi karşılaştırılması (BLAST analizi) sonuçlarına göre protein veri bankasında (Expasy) bulunan biyoinformatik veriler Şekil 4.7'de verildi. Elde edilen sonuca göre *M. alba*'nın nsLTP proteini *Morus* ailesinde amino asit dizisi bilinen türler ile %90'dan fazla benzerlik gösterdi.

ATGGCAAGCTTTTGGCTCTCAAGCTCCGCTGCGTGGTGTTAATGTGCAT	50
GATGGTTGGTGACCGTTAGCCCACTACCTCTCTCGTGACGAGTGGCGA	100
CTACCATGGTGCCGAGTTAACTTACCTAAGAACCGGCAGCACAATTCCG	150
TCGGGGTGCTGCAATGGACTCAGGGGCCTAAACACGGCGGCAGCCACCAC	200
GACAGACCGCCAGACAGTCTGTGATGCTTGATTAGTGCTGCTAATAATC	250
TGCCAGGACTTAACCCTAATCTTGCTCTCGCCTCCCGGCTACTTGTGGA	300
CTTTCTCTTCTTACAAGTTTAGCACCTCAACCACTGCAACAGCATCAA	350
GTGA	354

Şekil 4.5: *Morus alba* poleninde bulunan *nsLTP* geninin cDNA dizisi.

MASFLALKLRCVVLMMVMGAPLAHYLSRGRVATTMVPSLTYLRTGSTIP	50
SGCCNGLRGLNTAAATTTDRQTVCRCLISAANNLPLNPNLASRLPATCG	100
LSLPYKFSTSTNCNSIK	117

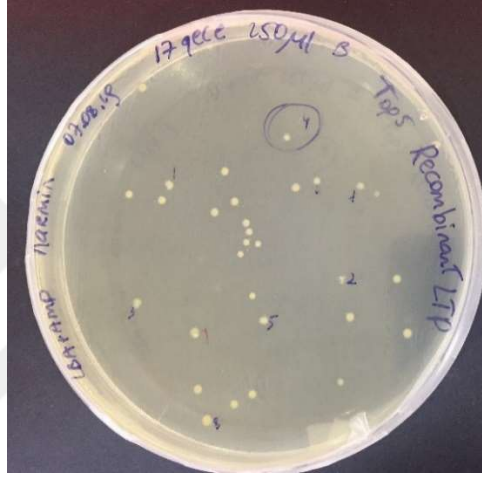
Şekil 4.6: *Morus alba* poleninde bulunan *nsLTP* genine karşılık gelen amino asit dizisi.

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
✓	Morus alba cultivar Heyebai chromosome 12	514	514	97%	1e-141	93.62%	CP050235.1
✓	PREDICTED: Morus notabilis non-specific lipid-transfer protein 1 (LOC21389529), mRNA	505	505	100%	7e-139	92.39%	XM_024174284.1

Şekil 4.7: *Morus alba* nsLTP proteininin amino asit dizi bilgisinin BLAST analizi sonuçları.

4.5. *NSLTP* GENİNİN PQE-2 PLAZMİDİNE LİGASYONU VE KOLONİ PZR İLE KONTROLÜ

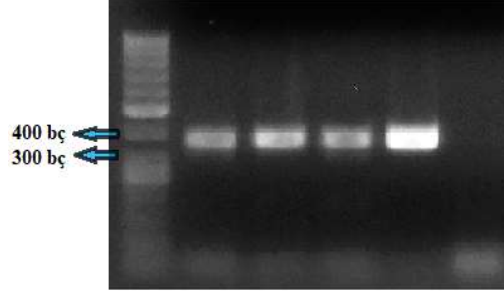
“Bölüm 3.6.1.”de anlatıldığı üzere, oluşturulan PZR ürünü ve pQE-2 plazmidi *NdeI* ve *PstI* restriksiyon endonükleazları ile kesime uğratarak yapışkan uçlar oluşturuldu ve jelden geri kazanım yapıldı. Devamında ligasyon gerçekleştirildi ve *E. coli DH5α* ırkına transformasyon işlemi yapıldı. Ampisilin direnç geni bulunmayan *E. coli DH5α* hücrelerinin plazmidi alması ile LBA+Amp besiyerinde koloni oluşturması transformasyonun gerçekleştiğini gösterdi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: *E. coli DH5α* ırkına transformasyon sonrası 100 µg/mL ampisilin içeren LBA+Amp besiyerinde üreyen bakteri kolonileri.

Transformasyon verimliliğinin belirlenmesi için, toplamda 10 farklı petriye ekilen rekombinant plazmit içeren *E. coli DH5α* kolonilerinden her bir petriden rastgele 10 adet koloni seçilip koloni PZR yapıldı. Sonucunda yaklaşık 8/10 pozitif sonuç elde edildi. Transformasyon verimliliği ortalama %80 olarak belirlendi.

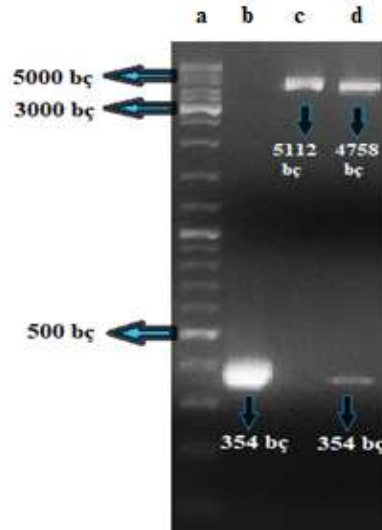
Petrilerde üreyen transformant kolonilerden rastgele seçilerek, negatif ve pozitif kontrolle beraber “Bölüm 3.7.5.”de anlatıldığı gibi koloni PZR yapıldı. Koloni PZR sonuçları Şekil 4.9’da gösterildi. Oluşan bandın *nsLTP* geninin boyutuna (354 bp) denk geldiği görüldü.



Şekil 4.9: Koloni PZR ürünlerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü. a) Markır (GeneOn 305-005), b-d), Rastgele seçilen kolonilerin PZR sonuçları e) Pozitif kontrol ve f) Negatif kontrol.

4.6. REKOMBİNANT PLAZMİDİN RESTRİKSİYON ENZİMLERİ İLE KESİM SONUÇLARI

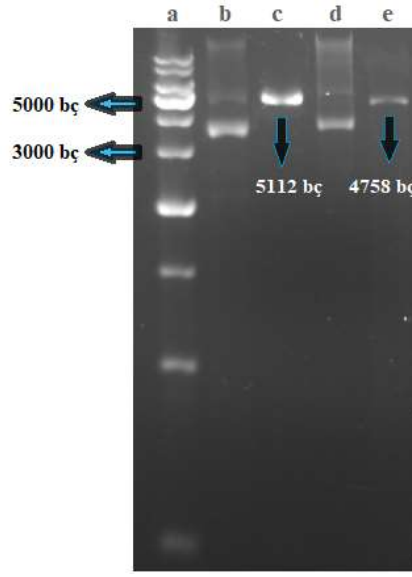
Agaroz jelde istenen bant görüntüsünü oluşturan bu koloniler seçilerek, LB seçici (Amp içeren) besiyerinde gece boyu 37°C'de 180 rpm'de üretildi ve bu hücrelerden plazmid izolasyonu yapıldı. Elde edilen ligasyon ürünlerinin boyutlarını kontrol etmek amacıyla restriksiyon enzimleri ile tekli ve çiftli kesimleri gerçekleştirildi. Agaroz jelde tekli kesim sonucunda pQE-2 plazmidinin lineer boyutunun 4758 bç, rekombinant plazmid boyutunun ise 5112 bç olduğu gözlemlendi. Rekombinant plazmidin çiftli kesiminde ise 4758 bç'lik pQE-2 plazmidi ve 354 bç'lik *nsLTP* geni olmak üzere 2 bant görüldü (Şekil 4.10).



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

4.7. REKOMBİNANT PLAZMİDİN *E. COLİ BL21 (DE3)* İRKİNA TRANSFORMASYONU VE İZOLASYONU

Rekombinant plazmidin (pQE-2+*ltp*) transformasyonu “Bölüm 3.7.2.”de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Daha sonra transformant hücreler LBA+Amp besiyerine ekildi. Ardından PZR ile doğruluğu belirlenen plazmidlerin “Bölüm 3.7.3.”de anlatıldığı gibi izolasyonu gerçekleştirildi ve boyutu agaroz jelde analiz edildi. Karşılaştırma için, rekombinant pQE-2 plazmidinin, saf pQE-2 plazmidi ile beraber agaroz jel görüntüsü Şekil 4.11’de verildi.

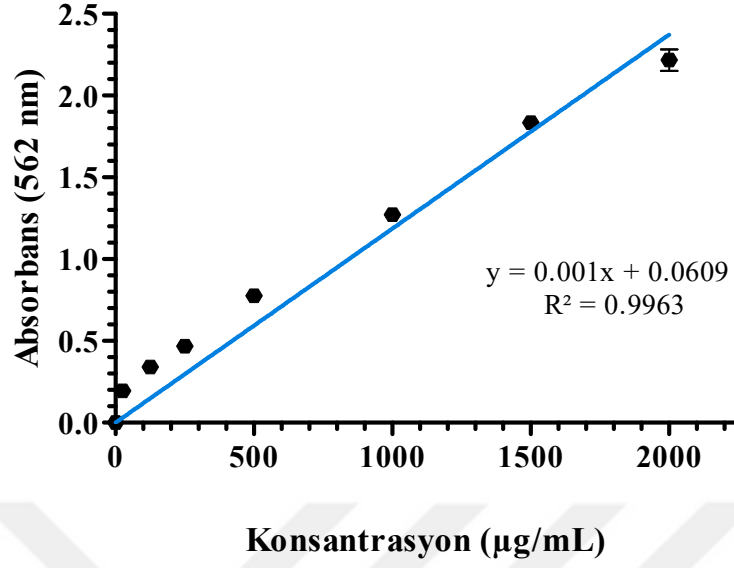


Şekil 4.11: İzole edilen plazmidlerin agaroz jeldeki görüntüsü. a) Markır (1kb, Gene-On 305-005), b) Rastgele seçilen kolonilerden izole edilen pQE-2+*nsLTP* plazmidi, c) Rekombinant plazmidin PstI restriksiyon enzimiyle kesimi d) Kesilmemiş pQE-2 plazmidi, e) pQE-2 plazmidinin tekli kesimi.

4.8. PROTEİN ANALİZ SONUÇLARI

4.8.1. Protein Konsantrasyonları

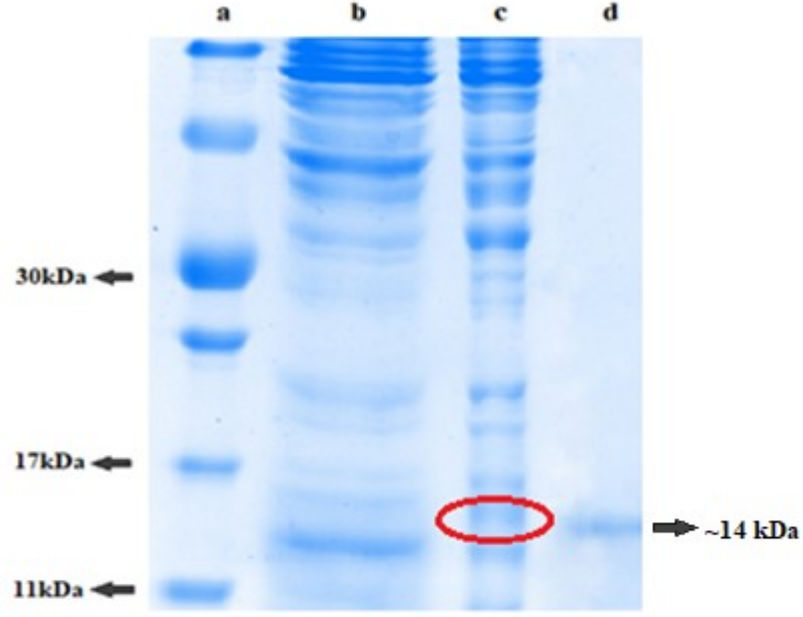
pQE-2+*nsLTP* aktarılmış *E.coli BL21* kolonilerinden protein izolasyonu yapıldı. Protein konsantrasyon tayini için ticari bir kit (SMARTTM BCA Protein Assay Kit, iNtRON Biotechnology) kullanılarak BCA yöntemi yapıldı. Kit içeriğindeki BSA stoğundan 25, 125, 250, 500, 1000, 1500 ve 2000 µg/mL konsantrasyonlarında standartlar hazırlandı ve BCA analizi ile standart bir grafik elde edildi. Elde edilen lineer grafik ve doğru denklemi (Şekil 4.12) kullanılarak tüm örneklerin protein konsantrasyonları belirlendi. Çalışma süresince protein konsantrasyonlarının 700-1500 µg/mL aralığında olduğu tespit edildi.



Şekil 4.12: Protein standart grafiği. Sığır Serum Albumin (“Bovine Serum Albumin”, BSA) kullanılarak oluşturuldu ($R^2=0.996$).

4.8.2. Elektroforetik Analiz Sonuçları

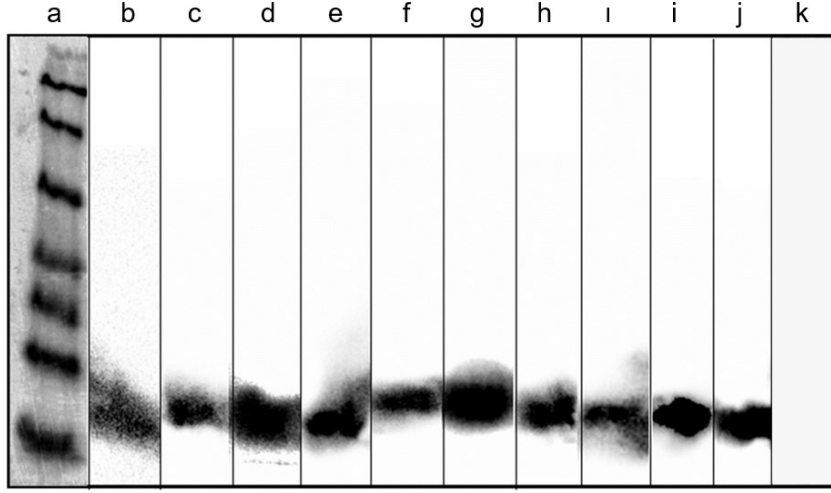
Protein konsantrasyonları belirlendikten sonra örnek yükleme tamponu ile 1:1 (v:v) oranında karıştırılan örnekler, her bir kuyucukta 30 µg protein olacak şekilde jele yüklendi ve 200 V sabit voltajda ayrıştırıldı. Jel üzerindeki proteinler Coomassie boyama yöntemi ile görünür hale getirildi. Boyama sonucunda oluşan bantlar ChemiDoc MP (Bio-Rad) sistemiyle görüntülendi. Saflaştırılmış örnekte nsLTP’ye karşılık gelen ~14 kDa’luk tek bant gözlemlendi (Şekil 4.13).



Şekil 4.13: Coomassie boyama yöntemi ile boyanmış örnek jel görüntüsü. a) Markır (SeeBlue® Pre-stained Protein Standard, Invitrogen LC5625), b) Negatif kontrol, c) İzole edilen total protein ve d) Saflaştırılmış örnek.

4.8.3. Western-Blot Analiz Sonuçları

Rekombinant proteinin IgE bağlama kapasitesi Western-Blot yöntemi ile belirlendi. Saf rekombinant protein PVDF membrana aktarıldıktan sonra hasta ve kontrol (*M. alba* alerjisi olmadığı bilinen sağlıklı bireylerin) serumları (Çetereisi ve diğ., 2019) ile işleme sokuldu. Western-Blot analizi sonucu olarak kemilüminesans görüntüler Şekil 4.14’de verildi. Rekombinant ürünün test edilen 10 hastaya ait serum örnekleriyle reaksiyona girdiği gözlemlendi. Negatif kontrolde ise herhangi bir bant gözlenmedi.



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

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Geçtiğimiz yüzyılda, alerjik hastalıklar oldukça nadir görülen bir durumda iken, son yıllarda ciddi bir sağlık sorununa dönüşmüştür (Mansouritorghabeh ve diğ., 2019). Alerji bugün Dünya popülasyonunun % 25'inden daha fazlasını etkilemektedir. Dünyada 400 milyon insanın alerjik rinitten ve 300 milyon insanın astımdan muzdarip olduğu bilinmektedir (Pawankar ve diğ., 2009). Avrupa içinde ise genel popülasyonda polen alerjisi prevalansının % 40 olduğu tahmin edilmektedir (D'Amato ve diğ., 2007).

Alerjik hastalıklar, sağlık sorunlarının yanı sıra, ekonomik kayıplara da yol açmaktadır. Bu olumsuzlukları azaltmak için gelişmiş alerji tanı yöntemlerine ve daha etkili tedavilere gereksinim vardır (Johansson ve diğ., 2001). Alerjenlerin tanımlanması, izolasyonu, biyokimyasal ve immünolojik karakterizasyonu, bu moleküllerin IgE antikor üretimini nasıl indüklediğini ve böylece alerjik reaksiyonları nasıl tetiklediğini anlamak için çok önemlidir. Bu açıdan saflaştırılmış alerjenler (doğal veya rekombinant), teşhis araçlarını standartlaştırmak ve geliştirmek, ayrıca immünoterapi protokollerini rasyonel hale getirmek için iyi bir çözüm yoludur (Valenta, 2002).

Polen alerjenleri, hem alerjik rinit, hem de astım için önemli bir risk faktörü olarak kabul edilir (Asam ve diğ., 2015). Polenlerin içeriğinde bulunan suda çözünebilir protein ya da glikoproteinlerin alerjiye neden olan ana moleküllerdir (Puc, 2003). Atmosferde bulunuşu mevsime, iklime ve coğrafi bölgeye göre değişen polenlerin içerdiği proteinler hava kirliliğinin etkisiyle değişikliğe uğrayarak alerjiye yol açabilirler (Emberlin, 1998; Chehregani ve diğ., 2004). İklim değişikliğinin yarattığı etkilerden dolayı da gelecekte insanları polen alerjisinin ne kadar etkileyebileceğine dair nicel bir değerlendirme yoktur (Lake ve diğ., 2017). Bu nedenlerle belli bir bölgeye özgü alerjenik polenlerin ve taşıdıkları moleküllerin tanımlanması ve bol miktarda elde edilmesi bu sağlık sorununa çözüm bulmak için gelecekte daha da büyük önem kazanacaktır.

Doğal kaynaklardan alınan geleneksel alerjen ekstraktları ile çalışmak, tanı ve tedavide kullanılan tekniklerde birçok dezavantaja sahiptir. Bunların önüne geçmek için rekombinant alerjenler üretmek iyi bir çözüm yoludur (Valenta ve Nideberger, 2007). Ekstraktları kullanan geleneksel alerji testlerinin aksine, moleküle dayalı teşhis, hastaya özgü duyarlılık profillerini ortaya çıkaran birçok alerjenik molekülün aynı anda test edilmesini sağlar. Rekombinant DNA

teknolojileri, iyi karakterize edilmiş ve kontamine olmayan aşı bileşenlerini üretmek için de kullanılmaktadır (Tscheppe ve Breiteneder, 2017).

Daha önce yapılan çalışmalara göre, dut ağaçları, ısı direnci ve kuraklıkta hayatta kalma kabiliyetleri nedeniyle yaygın bir yayılım göstermektedir. Ayrıca, bol miktarda polen ürettikleri, polenlerinin ve meyvelerinin alerjik hastalıklara yol açtığı iyi bilinmektedir (Papia ve diğ., 2020).

Akdeniz’de alerjik hastalarda, bazı gıdalardan ve polenlerden gelen spesifik olmayan LTP’lerin yüksek prevalansa sahip olduğu gösterilmiştir. nsLTP’lere duyarlılık, coğrafi farklılıklara bağlı olarak değişmektedir (Dubiela ve diğ., 2019).

Morus cinsinin birkaç farklı türünde spesifik olmayan lipit transfer proteininin alerjenik etkisi görülmüştür (Navarro ve diğ., 1997; Ciardiello ve diğ., 2010; Micheal ve diğ., 2013). *M. nigra*’da yapılan bir çalışmada Mor n 3 olarak adlandırılan lipit transfer proteini izole edilmiş ve alerjenik aktivitesi ortaya konulmuştur (Ciardiello ve diğ., 2010). Pakistan’da yapılan bir araştırmada ise, *M. papyrifera*’da 10-kDa moleküler ağırlığında alerjenik proteini rapor edilmiştir ve moleküler ağırlığı göz önünde bulundurularak onun da bir tür LTP olduğu düşünülmektedir (Micheal ve diğ., 2013).

Bu tez çalışması, *M. alba* polenindeki alerjenleri tespit etmek için daha önce çalışma grubumuz tarafından yürütülen bir çalışmanın (Çetereisi ve diğ., 2019) devamı niteliğindedir. *M. alba* poleninde bulunan proteinlerden 75-85 kDa ve ≤ 30 kDa (muhtemelen 15-16 kDa) olan bazı proteinlerin alerjen olabileceği rapor edilmiştir (Çetereisi ve diğ., 2019). Mevcut literatür göz önünde bulundurularak, bu tez çalışmasında alerjenik bir protein olduğu bilinen nsLTP’nin *M. alba* poleninde araştırılması, *E.coli*’de klonlanması ve rekombinant üretimi gerçekleştirilmiştir. *E. coli*, büyüme hızı, maliyet etkinliği, rekombinant proteinlerin yüksek verimi ve kolay ölçeklendirme işlemi nedeniyle rekombinant proteinlerin üretimi için en çok tercih edilen organizma olduğu için (Al-Hejin ve diğ., 2019) klonlama *E. coli*’de gerçekleştirilmiştir.

Farklı kaynaklardan gelen nsLTP’ler arasında yüksek oranda amino asit dizi benzerliği vardır. nsLTP’lerin, alerjenik kapasitesi, kimyasal, enzimatik degradasyona ve termal denatürasyona pratik olarak oldukça kararlı olan yapılarıyla açıklanmaktadır (Salcedo ve diğ., 2004). Elde ettiğimiz sonuçlara göre *M. alba*’nın nsLTP geni *Morus* ailesinde cDNA dizisi bilinen türler ile % 90’dan fazla benzerlik göstermiştir.

Çeterisi ve ark. (2019) *M. alba* polen ekstraktları ile yaptıkları çalışmada 11 hasta serumundaki IgE'yi bağlama kapasitesinin ≤ 30 kDa proteinlerde de olduğunu göstermiştir. Aynı serum örnekleri kullanılarak yapılan immüno-blotlama deneyleri, saflaştırılmış rekombinant nsLTP'nin IgE bağlama kapasitesini ortaya koymuştur. Bu sonuç nsLTP'nin *M. alba* polenindeki alerjenlerden biri olduğunun kanıtıdır.

Sonuç olarak, bu çalışma ile akdüt poleninde bulunan nsLTP ilk kez rekombinant olarak üretilmiştir. Tanı ya da tedavide kullanılma potansiyeline sahip olan alerjik *M. alba*'nın nsLTP proteini saf şekilde elde edilmiştir. Rekombinant DNA teknolojisi tekniklerinin sunduğu sabit kalite ve yüksek miktarda protein üretimi sayesinde nsLTP'ye karşı alerjisi olan geniş çapta hasta gruplarına tanı ve tedavide yeni çözümler geliştirmek mümkün olabilir. Ayrıca, bu tez çalışmasında üretilen bilgiler, diğer alerji çalışmalarında ve epitop haritalandırmasında da kullanılabilecek bir kaynak potansiyelindedir.

KAYNAKLAR

- Abbas, A., Lichtman, A.H., Pillai, S., 2012, Hypersensitivity, In: Abbas A., Lichtman A.H., Pillai S. (eds.), *Basic Immunology*, Chapter 11, Fourth Edition, Elsevier, Philadelphia, USA, 207-224.
- Aksüt, Y., 2017, Polen Alerjeni Metiyonin Sentazın Biyoteknolojik Üretimi Üzerine Çalışmalar, Yüksek Lisans (MSc), İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Alessandra, B. Pernis, Paul B. Rothman, 2002, JAK-STAT signaling in asthma, *The Journal of Clinical Investigation*, 109(10), 1279-1283.
- Al-Hejin, A. M., Bora, R. S. M., Ahmed, M, M., 2019, Plasmids for Optimizing Expression of Recombinant Proteins in *E.coli*, In: Gull M. (ed.), *Plasmid*, IntechOpen, London, UK, ISBN: 978-1-83880-238-7.
- Amin, K., 2012, The role of mast cells in allergic inflammation, *Respiratory Medicine*, 106(1), 9-14.
- Arı, Ş., 2012, DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması, Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, In: Temizkan G., Arda N. (eds.), Bölüm 5, Nobel Tıp Kitabevleri, Türkiye, ISBN: 978-975-420-583-1, 114.
- Asam, C., Hofer, H., Wolf, M., Aglas, L., Wallner, M., 2015, Tree pollen allergens-an update from a molecular perspective, *Allergy*, 70(10), 1201–1211.
- Asero, R. and Pravettoni, V., 2013, Anaphylaxis to plant-foods and pollen allergens in patients with lipid transfer protein syndrome, *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 13(4), 379-385.
- Asero, R., Mistrello, G., Roncarolo, D. ve diğ., 2001, Lipid transfer protein: a pan-allergen in plant-derived foods that is highly resistant to pepsin digestion, *International Archives of Allergy and Immunology*, 124(1-3), 67–69.
- Bıçakçı, A., Altunoğlu, M.K., Bilişik, A., Çelenk, S., Canitez, Y., Malyer, H., Sapan, N., 2009, Türkiye'nin atmosferik polenleri, *Asthma Allergy Immunology*, 7, 11-17.
- Bogdanov, I.V., Finkina, E.I., Balandin, S.V., Melnikova, D.N., Stukacheva, E.A., Ovchinnikova, T.V., 2015, Structural and functional characterization of recombinant isoforms of the lentil lipid transfer protein, *Acta Naturae*, 7(3), 65-73.
- Bostock, 1819, Case of a periodical affection of the eyes and chest, *Medico-chirurgical transactions*, 10(1), 161-165.
- Bousquet, J., Khaltaev, N., Cruz, A.A., Denburg, J., Fokkens, W.J., Togias, A. ve diğ., 2008, Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA) in collaboration with the World Health Organization, GA2LEN and AllerGen, *Allergy*, 63(86), 8–160.

- Breiteneder, H., Hassfeld, W., Pettenburger, K., Jarolim, E., Breitenbach, M., Rumpold H., ve diğ., 1988, Isolation and characterization of messenger RNA from male inflorescences and pollen of the white birch (*Betula verrucosa*), *International Archives of Allergy and Immunology*, 87(1), 19-24.
- Brenna, O., Pompei, C., Ortolani, C., Pravettoni, V., Farioli, L., Pastorello, E.A., 2000, Technological processes to decrease the allergenicity of peach juice and nectar, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 493–497.
- Burton, O.T. and Oettgen, H.C., 2011, Beyond immediate hypersensitivity: evolving roles for IgE antibodies in immune homeostasis and allergic diseases, *Immunological Reviews*, 242(1), 128-143.
- Chakraborty, P., Gupta-Bhattacharya, S., Chanda, S., 1996, Comparative aerobiology, allergenicity and biochemistry of three palm pollen grains in Calcutta, India, *Journal Aerobiologia*, 12(1), 47-50.
- Chan, E.W., Lye, P.Y., Wong, S.K., 2016, Phytochemistry, pharmacology, and clinical trials of *Morus alba*, *Chinese Journal of Natural Medicines*, 14(1), 17-30.
- Chehregani, A.H., Majd, A., Moin, M., Gholami, M., Shariatzadeh, S.H., Mohsenzade, F., 2004, Effect of air pollution on some cytogenetic characteristics, structure, viability and proteins of *Zinnia elegans* pollen grains, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7(1), 118–122.
- Chua, K.Y., Stewart, G.A., Thomas, W.R., Simpson, R.J., Dilworth, R.J., Plozza, T.M. ve diğ., 1988, Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen Der p I, *Journal of Experimental Medicine*, 167, 175-182.
- Ciardiello, M.A., Palazz, P., Bernardi, M.L., Carratore, V., Giangrieco, I., Longo, V., Melis, M., Tamburrin, M., Zennaro, D., Mari, A., Colombo, P., 2010, Biochemical, immunological and clinical characterization of a cross-reactive nonspecific lipid transfer protein 1 from mulberry, *Allergy*, 65(5), 597-605.
- Cornelis, P., 2000, Expressing genes in different *Escherichia coli* compartments, *Current Opinion in Biotechnology*, 11(5), 450-454.
- Cresti, M. ve Linskens, H., 2000, Pollen-allergy as an ecological phenomenon: A review, *Plant Biosystems*, 134(3), 341-352.
- Crochot, W., 2020, *Pollen Comes in Many Colors*, <https://www.thoughtco.com/facts-about-pollen-373610>, [Ziyaret tarihi: 15 Haziran 2020].
- Cromwell, O., Häfner, M.D.D., Nandy, A., 2011, Recombinant allergens for specific immunotherapy, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(4), 865-872.
- Çetereisi, D., Karlioglu, N., Gelincik, A., ve diğ. 2019, Proteomic identification of allergenic proteins of *Morus alba* L., *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, 37(4), 205-211.

- D'Amato, G. L., Cecchi, S., Bonini, C., Nunes, I., Annesi-Maesano, H., Behrendt, G., Liccardi, T., Popov, P., Cauwenberge, V., 2007, Allergenic pollen and pollen allergy in Europe, *Allergy*, 62(9), 976–990.
- Defrance, T., Carayon, P., Gis le Billian, Guillemot, J.-C., Minty, A., Caput, D., Ferrara, P., 1994, Interleukin 13 is a B cell stimulating factor, *Journal of Experimental Medicine* 179(1), 135–143.
- Douglass, J.A., O'Hehir, R.E., 2006, Diagnosis, treatment and prevention of allergic disease: the basics, *The Medical Journal of Australia (MJA) Practice Essentials-Allergy*, 185(4), 228–233.
- Dubiela, P., Rebecca, D.C., Cantini, F., Borowski, T., Aina, R., Radauer, C., Bublin, M., Hoffmann-Sommergruber, K., Alessandri, S., 2019, Impact of lipid binding on the tertiary structure and allergenic potential of Jug r 3, the non-specific lipid transfer protein from walnut, *Scientific Reports*, 9, 2007.
- Durmaz, E. Ö., 2013, B hücre aktivasyonu ve antikor üretimi, *Turkderm*, 47(1), 24–27.
- EAACI, 2016, European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress, 11–15 June 2016, Vienna, Austria.
- Emberlin, J., 1998, The effect of air pollution on allergic pollen, *European Respiratory Review*, 53, 164–167.
- Fang, K.S.Y., Vitale, M., Fehlnner, P., King, T.P., 1988, cDNA cloning and primary structure of a white face hornet venom, allergen 5, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(3), 895–899.
- Finkina, E.I., Melnikova, D.N., Bogdanov, I.V., Ovchinnikova, T.V., 2016, Lipid transfer proteins as components of the plant innate immune system: structure, functions, and applications, *Acta Naturae*, 8(2), 47–61.
- Garcia-Casado, G., Jesus, F.C., Rodriguez, J., Salcedo, G., 2001, Isolation and characterization of barley lipid transfer protein and protein Z as beer allergens, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 108(4), 647–649.
- Coombs, R.R.A. and Gell, P.G.H. 1963, *The Classification of Allergic Reactions Underlying Disease*, Clinical Aspects of Immunology, In: Gell P.G.H., Coombs R.R.A. (eds.), Chapter 13, Oxford: Blackwell Scientific Publications, 317–337.
- Ghanati, F. ve Majd, A., 1995, The effect of air pollution on the allergenicity of *Pinus eldarica* pollen, *Grains*, 34, 208–221.
- Gilles, S., Akdis, C., Lauener, R., Grendelmeier, P.S., Bieber, T., Schappi, G., Hoffmann, C.T., 2018, The role of environmental factors in allergy: a critical reappraisal, *Experimental Dermatology*, 27, 1193–1200.

- Goeddel, D.V., Kleid, D.G., Bolivar, F., Heyneker, H.L., Yansura, D.G., Crea, R., Hirose, T., Kraszewski, A., Itakura, K., Riggs, A.D., 1979, Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(1), 106-110.
- Grajek, K., Wawro, A., Kokocha, D., 2015, Bioactivity of *Morus alba* L. extracts – An overview, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(8), 3110-3122.
- Hamilton-Robert, G., 2019, Clinical Immunology, 5th, Elsevier, ISBN:978-0-7020-6896-6.
- Hamm, R.L., 2016, Drug allergy: delayed cutaneous hypersensitivity reactions to drugs, *EMJ Allergy Immunology*. 1(1), 92-101.
- Diaz, S.N.G., Cruz, A.A. ve diğ., 2002, Allergic rhinitis and ashtma: 2 illnesses. The same disease, *Revista Alergia Mexico*, 49(1), 20-24.
- Johansson, S.G., Hourihane, J.O., Bousquet, J., Bruijnzeel-Koomen, C., Dreborg, S., Haahtela, T., Kowalski, M.L., Mygind, N., Ring, J., van Cauwenberge, P., van Hage-Hamsten, M., Wüthrich, B., 2001, A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force, *Allergy*, 56(9), 813-824.
- Johansson, S.G.O., Bieber, T., Dahl, R., Friedmann, P.S., Lanier, B.Q., Lockey, R.F., Motala, C., Martell, J.A.O., Platts-Mills, T.A.E., Ring, J., Thien, F., van Cauwenberge, P., Williams, H.C., 2004, Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113 (5), 832-836.
- Josephs, D.H., Spicer, J.F., Karagiannis, P., Gould, H.J., Karagiannis, S.N., 2014, IgE immunotherapy: a novel concept with promise for the treatment of cancer., *MAbs*, 6(1), 54–72.
- Jutel, M., Solarewicz-Madejek, K., Smolinska, S., 2012, Recombinant allergens, *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 8(10), 1534–1543.
- Kader, J.C., 1996, Lipid-transfer proteins in plants, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47, 627-654.
- Khan, S., Ullah, M.W., Siddique, R., Nabi, G., Manan, S., Yousaf, M., Hou, H., 2016, Role of recombinant DNA technology to improve life, *International Journal of Genomics*, 2405954, 14.
- Lake, I.R., Jones, N.R., Agnew, M., Goodess, C.M., Giorgi, F., Hamaoui-Laguel, L., Semenov, M.A., Solomon, F., Storkey, J., Vautard, R., Epstein, M.M. 2017, Climate change and future pollen allergy in Europe, *Environmental Health Perspectives*, 125(3), 385–391.
- Liu, F., Zhang, X., Lu, C., Zeng, X., Li, Y., Fu, D., Wu, G., 2015, Non-specific lipid transfer proteins in plants: presenting new advances and an integrated functional analysis, *Journal of Experimental Botany*, 66(19), 5663–5681.

- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J., 2000, *Molecular Cell Biology*, 4th, W.H. Freeman, New York, ISBN-10: 0-7167-3136-3.
- Majd, A. and Kiabi, S., 1997, The effect of Tehran's polluted atmosphere on ultrastructural changes and allergenicity of *Cupressus arizonica* pollen grains, *Aerobiology*, 13, 407-417.
- Majd, A., Chehregani, A., Moin, M., Gholami, M., Kohno, S., Nabe, T., Shariatzade, M.A., 2004, The effects of air pollution on structures, proteins and allergenicity of pollen grains, *Aerobiologia*, 20, 111-118.
- Mansouritorghabeh, H., Jabbari-Azad, F., Sankian, M., Varasteh, A., Farid-Hosseini, R., 2019, The most common allergenic tree pollen grains in the Middle East: a narrative review, *Iranian Journal of Medical Sciences*, 44(2), 87-98.
- Micheal, S., Wangorsch, A., Wolfheimer, S., Foetisch, K., Minhas, K., Scheurer, S., Ahmed, A., 2013, Immunoglobulin E reactivity and allergenic potency of *Morus papyrifera* (paper mulberry) pollen, *The Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 23(3), 168-175.
- Navarro, A.M., Orta, J.C., Sánchez, M.C., Delgado, J., Barber, D., Lombardero, M., 1997, Primary sensitization to *Morus alba*, *Allergy*, 52(11), 1144-1145.
- Niederberger, V., Horak, F., Vrtala, S., Spitzauer, S., Krauth, M.T., Valent, P., Reisinger, J., Pelzmann, M., Hayek, B., Kronqvist, M., Gafvelin, G., Grönlund, H., Purohit, A., Suck, R., Fiebig, H., Cromwell, O., Pauli, G., van Hage-Hamsten, M., Valenta, R., 2004, Vaccination with genetically engineered allergens prevents progression of allergic disease, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 101(2), 14677-14682.
- Pablos, I., Wildner, S., Asam, C., Wallner, M., Gadermaier, G., 2016, Pollen allergens for molecular diagnosis, *Current Allergy and Asthma Reports*, 16(4), 31.
- Palacin, A., Varela, J., Quirce, S., Del Pozo, V., Tordesillas, L., Barranco, P., Fernandez-Nieto, M., Sastre, J., Diaz-Perales, A., Salcedo, G., 2009, Recombinant lipid transfer protein Tri a 14: a novel heat and proteolytic resistant tool for the diagnosis of baker's asthma, *Clinical & Experimental Allergy*, 39(8), 1267-1276.
- Papia, F., Incorvaia, C., Genovese, L., Gangemi, S., Minciullo, P.L., 2020, Allergic reactions to genus *Morus* plants: a review, *Clinical and Molecular Allergy*, 18(1).
- Pawankar, R., Bunnag, C., Chen, Y., Fukuda, T., You-Young, K., Lan Thi Tuyet Le, Le Thi Thu Huong, Robyn E O'Hehir, Ohta, K., Vichyanond, P., Wang, D.Y., Zhong, N., Khaltayev, N., Bousquet, J., 2009, Allergic rhinitis and its impact on asthma update (ARIA 2008) - Western and Asian-Pacific perspective, *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, 27, 237-243.
- Pawankar, R., Canonica, G.W., Holgate, S.T., Lockey, R.F., Blaiss, M., 2013, *The WAO White Book on Allergy: update 2013*, ISBN-10: 0616929168 (digital).

- Pham, P.V., 2018, *Medical Biotechnology: Techniques and Applications*, Omics Technologies and Bio-Engineering, In: Barh D., Azevedo V. (eds.), Chapter 19, Elsevier, United Kingdom, 449–469.
- Pinar, H., Çöçen, E., Yaman, M., Uzun, A., Saritepe, Y., 2018, Türk çekirdekli beyaz dutlarının (*Morus alba* L.) fenolojik ve pomolojik özellikleri, *Bahçe*, 47(2), 6–12.
- Puc, M., 2003, Characterisation of pollen allergens, *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 10 (2), 143-149.
- Rajan, T.V., 2003, The Gell–Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation, *TRENDS in Immunology*, 24(7), 376-379.
- Rodrigues, E.L., Marcelino, G., Torres Silva, G., Silva Figueiredo, P., Garcez, W.S., Corsino, J., Guimarães, R.C.A., Freitas, K.C., 2019, Nutraceutical and medicinal potential of the *Morus* species in metabolic dysfunctions, *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), 301.
- Rodriguez, V., Asenjo, J.A., Andrews, B.A., 2014, Design and implementation of a high yield production system for recombinant expression of peptides, *Microbial Cell Factories*, 13(1), 65.
- Rusznak, C., Davies, R.J., 1998, ABC of allergies: diagnosing allergy, *British Medical Journal (BMJ)*, 316, 686-689.
- Salcedo, G., Sánchez-Monge, R., Barber, D., Díaz-Perales, A., 2007, Plant non-specific lipid transfer proteins: an interface between plant defence and human allergy, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1771(6), 781-791.
- Salcedo, G., Sanchez-Monge, R., Diaz-Perales, A., Garcia-Casado, G., Barber, D., 2004, Plant non-specific lipid transfer proteins as food and pollen allergens, *Clinical & Experimental Allergy*, 34(9), 1336-1341.
- Salminen, T.A., Blomqvist, K., Edqvist, J., 2016, Lipid transfer proteins: classification, nomenclature, structure and function, *Planta*, 244(5), 971–997.
- Samuelson, J.C., 2011, Recent developments in difficult protein expression: a guide to *E.coli* strains, promoters, and relevant host mutations, *Methods in Molecular Biology*, 705, 195–209.
- Sanchez, M. D., 2002, World distribution and utilization of mulberry and its potential for animal feeding, In: Animal Production and Health Paper No. 147. FAO, Rome. 1-8 p.
- Scheurer, S., Lauer, I., Foetisch, K. ve diğ., 2004, Strong allergenicity of Pru av 3, the lipid transfer protein from cherry, is related to high stability against thermal processing and digestion, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114(4), 900–907.
- Singh, A.B., Kumar, P., 2003, Aeroallergens in clinical practice of allergy in India. An overview, *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 10(2), 131-136.

- Smith, M., Berger, U., Behrendt, H., Bergmann, K.C., 2014, Pollen and Pollinosis, In: Bergmann K.C. and Ring J. (eds.), *History of Allergy, Chemical Immunology and Allergy*, 100, 228–233.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76-85.
- Sneller, M.R., Hayes, H.D., Pinnaas, J.L., 1993, Pollen changes during five decades of urbanization in Tucson, Arizona, *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 71(6), 519-524.
- Stewart, G.A., Robinson, C., 2017, *Indoor and Outdoor Allergens and Pollutants*, Middleton's Allergy Essentials, In: O'Hehir R.E., Holgate S.T., Sheikh A. (eds.), Chapter 4, Elsevier, China, 73–116.
- Subiza, J., Jerez, M., Jimenez, J.A., Narganes, M.J., Cabrera, M., Varela, S., Subiza, E., 1995, Allergenic pollen pollinosis in Madrid, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 96(1), 15-23.
- Taketomi, E.A., Sopelete, M.C., de Sousa Moreira, P.F., de Assis Machado Vieira, F., 2006, Pollen allergic disease: pollens and its major allergens, *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 72(4), 562-567.
- Taylor, P.E., Card, G., House, J., Dickinson, M.H., Flagan, R. C., 2006, High-speed pollen release in the white mulberry tree, *Morus alba* L, *Sexual Plant Reproduction*, 19(1), 19-24.
- Tscheppe, A., Breiteneder, H., 2017, Recombinant allergens in structural biology, diagnosis, and immunotherapy, *International Archives of Allergy and Immunology*, 172(4), 187–202.
- Valenta, R., 2002, The future of antigen-specific immunotherapy of allergy, *Nature Reviews Immunology*, 2(6), 446-453.
- Valenta, R., Lidholm, J., Niederberger, V., Hayek, B., Kraft, D., Grönlund, H., 1999, The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT), *Clinical and Experimental Allergy*, 29(7):896-904.
- Valenta, R., Niederberger, V., 2007, Recombinant allergens for immunotherapy, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 119(4), 8268-8230.
- Xie, J., Guan, K., Yin, J., 2019, Advances in the clinical and mechanism research of pollen induced seasonal allergic asthma, *American Journal of Clinical and Experimental Immunology*, 8(1), 1–8.
- Yeats, T.H., Rose, J.K.C., 2008, The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs), *Protein Science*, 17(2), 191–198.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Narmin AGHALAROVA
Doğum Yeri	Bakü
Doğum Tarihi	24.11.1994
Uyruğu	☐ T.C. ☒ Diğer:
Telefon	05050921494
E-Posta Adresi	n.aghalarova@gmail.com
Web Adresi	-



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Baku State University
Fakülte	Biology
Bölümü	Biology
Mezuniyet Yılı	14.06.2016

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

Makale ve Bildiriler	
Aghalarova N., Mirzamammadli N., Aksüt Y., Arda N. 2019, Biotechnological production of an allergenic lipid transfer protein from <i>Morus alba</i> pollen, <i>Turkish Journal of Biology</i> , 43:(5 supp*), 111.	
*Supplement: Abstract Proceedings of the 7th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey (MolBiyoKon19), Campus Suleyman Demirel Cultural Center – Istanbul, Turkey. 27-29 September 2019. Poster Presentation.	