

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOĞAL *Bacillus thuringiensis* SUŞLARININ *cyt* GEN
PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ VE KANSER
HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MÜJGAN KESİK OKTAY

OCAK 2013

MUĞLA

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOĞAL *Bacillus thuringiensis* SUŞLARININ *cyt* GEN
PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ VE KANSER
HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MÜJGAN KESİK OKTAY

OCAK 2013

MUĞLA

MUGLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

MÜJGAN KESİK OKTAY tarafından hazırlanan **DOĞAL *Bacillus thuringiensis* SUŞLARININ *cyt* GEN PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ VE KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI** başlıklı tezinin, 07/01/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği ile kabul edilmiştir.

TEZ SINAV JURİSİ

Prof. Dr. Hatice GÜNEŞ (Jüri Başkanı)

Biyoloji Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Yrd. Doç. Dr. Vatan TAŞKIN (Üye)

Biyoloji Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

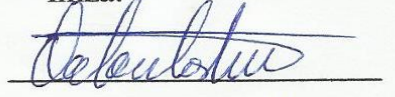
Yrd. Doç. Dr. Gamze BAŞBÜLBÜL ÖZDEMİR

Biyoloji Anabilim Dalı, Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın

İmza:



İmza:



İmza:



ANA BİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

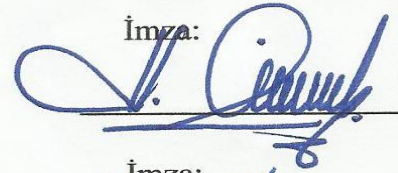
Prof. Dr. Hasan Sungur CİVELEK

Biyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

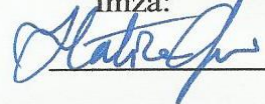
Prof. Dr. Hatice GÜNEŞ

Danışman, Biyoloji Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:



İmza:



Savunma Tarihi: 07/01/2013

Tez çalışmalarım sırasında elde ettiğim ve sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgelerin tarafımdan bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde edildiğini; akademik ve bilimsel etik kurallarına uygun olduğunu beyan ederim. Ayrıca, akademik ve bilimsel etik kuralları gereği bu tez çalışması sırasında elde edilmemiş başkalarına ait tüm orijinal bilgi ve sonuçlara atıf yapıldığını da beyan ederim.

Müjgan KESİK OKTAY

07/01/2013

ÖZET

DOĞAL *Bacillus thuringiensis* SUŞLARININ *cyt* GEN PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ VE KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Müjgan KESİK OKTAY

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hatice GÜNEŞ

Ocak 2013, 80 sayfa

Bacillus thuringiensis gram pozitif ve spor oluşturan fakültatif anaerob bir bakteri olup farklı suşları yaşamlarının farklı evrelerinde değişik toksinler üretirler. Bunlardan en önemlisi insektisidal kristal proteinlerdir (ICP). Entomopatojenik özelliği olan ICP'ler belirli böcek türlerine karşı spesifik insektisidal aktivite gösterirler. Buna karşın, çoğu kristal (Cry) proteinlerin insektisidal aktivitesinin olmaması yeni araştırmalara yol açmıştır. Böylece literatürde insan kanser hücrelerini hedef alan ancak sağlıklı hücrelere etki etmeyen ve parasporin olarak adlandırılan yeni parasporal protein sınıfı tanımlanmıştır. Özellikle insektisit etkisi olmayan ve hemolitik etkiden sorumlu Cyt (sitolitik) proteini içermeyen Bt suşlarında parasporin varlığı tespit edilmiştir.

İnsektisidal olmayan Bt suşlarının doğadaki geniş yayılımları nedeniyle yeni parasporinlerin bulunması olasılığı oldukça yüksektir. Dolayısıyla bu tez çalışmasının amacı, *cry* geni içeren ancak insektisidal etkisi olmayan ve *cyt* geni içermeyen bazı Bt izolatlarının beş farklı kanser hücre hattında (K-562, PC-3, DU-145, A-549, MCF-7) hücre çoğalması üzerindeki etkilerini araştırmaktır. Bu amaçla, önceki çalışmalarımızdan elde ettiğimiz ve Aydın ili incirlik alanlarından toplanan 101 adedi toprak ve 19 adedi meyve-yapraktan izole edilen toplam 120 Bt izolatı kullanılmıştır. Öncelikle 120 Bt izolatının *cyt1* ve *cyt2* gen içeriği PCR analizi ile araştırılmıştır. Referans suşu hariç izolatların hiçbirinin *cyt1* geni içermediği, toprak izolatlarının ise 19'unda *cyt2* geninin varlığı tespit edilmiştir. Parasporal proteinler protoksin olarak salgılandıklarından, Bt izolatlarından elde edilen parasporal proteini tripsin (1, 5, 10 mg/ml) veya proteinaz K (10 ve 350 µg/ml) enzimleriyle aktive edilmiştir. Aktiflenen parasporal proteinlerin kanser hücre hatlarının çoğalması üzerine etkileri MTT yöntemi ile belirlenmiştir. İzolatın çeşidine bağlı olarak bazı parasporal proteinlerin proteinaz K ile aktivasyonu bazı proteinlerin ise tripsin ile aktivasyonu hücre çoğalmasını engellemede daha etkili olmuştur. Bazı izolatlardan elde edilen parasporal toksinlerin hücre çoğalmasını arttırıcı etkileri gözlenirken, bazılarının hücre çoğalmasını azaltıcı etki gösterdiği bulunmuştur. Özellikle 1mg/ml tripsin ile muamele edilmiş 2T, 11T ve 10 µg/ml proteinaz K ile muamele edilmiş 11T parasporalproteinlerinin A549 hücre çoğalmasını kontrole göre sırasıyla; 1.7, 2.19 ve 1.78 kat azalttığı kaydedilmiştir. Ayrıca 10 µg/ml proteinaz K ile muamele edilmiş 3T parasporal proteininin CCC-221 hücre çoğalmasını kontrole göre 2.04 kat azalttığı tespit edilmiştir. DU-145 hücre hattına uygulanan en etkili protein kontrole

göre hücre çoğalmasını 1.86 kat azaltan 1mg/ml tripsin ile muamele edilmiş olan 22T parasporal proteinidir.

Sonuç olarak, kullanılan Bt izolatlarının hiçbirinin *cyt1* geni içermediği, sadece 19 Bt izolatının *cyt2* geni içerdiği; Bt izolatlarından 2T, 3T, 11T ve 22T'nin kristal proteinlerinin sırasıyla A-549, CCC-221 ve DU-145 hücre hatlarında hücre bölünmesini engelleyici etkileri olduğu bulunmuştur. İleride yapılacak olan çalışmalarda etkili bulunan izolatlara ait parasporal proteinlerin parasporin olup olmadığı belirlenip daha detaylı karakterizasyonları gerçekleştirilecektir.

Anahtar kelimeler: *Bacillus thuringiensis*, Parasporin, Anti-kanser Aktivite, *cyt* Genleri

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF *cyt* GENE PROFILES OF NATIVE *Bacillus thuringiensis* STRAINS AND INVESTIGATION OF THE EFFECTS ON CANCER CELLS

Müjgan KESİK OKTAY

Master of Science (M.Sc.)

Graduate School of Naturel and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Hatice GÜNEŞ

Ocak 2013, 80 pages

Bacillus thuringiensis is a gram positive and spore-forming facultative anaerob bacterium that produces different toxins at different stages of its life cycle. The most important one of these proteins is insecticidal crystal protein (ICP). Because of the entemopathogenic property of ICPs, they show spesific insecticidal activity aganist different types of insects. However the lack of insecticidal actvity in all of crystal proteins has led to new researches. Thus a new class of crystal protein called parasporin was emerged that effective on target human cancer cells but not healthy cells. Parasporin was detected especially in Bt strains which are lack of insecticidal activity and Cyt proteins responsible for hemolytic activity. Due to widely distribution of non-insecticidal Bt strains in naturel environments, presence of new parasporins is highly probable.

Therefore in this thesis, the effects of some Bt isolates that have crystal proteins but does not have insecticidal activity and Cyt protein on cell proliferation of five different cancer cell lines was investigated. For this purpose, a total of 120 isolates from 101 soil and 19 fruit-leaves isolated that we have obtained from previous studies and collected from the fig areas of province of Aydın were used. Firstly, *cyt1* and *cyt2* gene content of 120 isolates were investigated by PCR analysis. As a result, none of the Bt strains except for the referance strain does not contain *cyt* genes and the presence of *cyt2* gene have been identified in 19 isolates of soil. Protein extraction from Bt isolates including crystal proteins but not contain Cyt proteins were performed and then activated with proteinase K and trypsin enzymes. Effects on proliferation of cancer cells lines of activated crystal proteins were determined by MTT assay. Depending on the type of isolate, trypsin activation was more effective in preventing cell proliferation than proteinase K activation in some isolates. Unlike, in some isolates proteinase K was more effective than trypsin. It was observed that some crystal proteins were enhanced cell growth but on the contrary it was also found that some crystal proteins showed anti-proliferative effect on cell lines. Especially it was reported that trypsin (1mg/ml) treated crystal proteins 2T and 11T and proteinase K (10 µg/ml) treated 11T were decreased cell proliferation compared to the control respectively 1.7, 2.19 and 1.78 fold on A549 cell lines.

Also, it was obtained that 3T parasporal crystal protein treated with proteinase K (10 µg/ml) and 22T parasporal crystal protein treated with trypsin (1 mg/ml) had antiproliferative effect on cell proliferation compared to the control respectively on CCC-221 (2.04 fold) and DU-145 (1.86 fold) cell lines.

As a result, it was found that none of the Bt isolates used in this thesis contained *cyt1* gene, only 19 isolates contained *cyt2* gene. Among these Bt isolates, 2T , 3T, 11T and 22T crystal proteins were antiproliferative compared to the cancer cell lines. Works to be performed in the future the effective parasporal crystals are parasporins or not will be detected.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, Parasporin, Anti-cancer Activity, *cyt* Genes

ÖNSÖZ

Çalışmalarım boyunca değerli bilgi ve yardımlarını esirgemeyen, tecrübe ve eşsiz bilgilerinden yararlandığım danışman hocam sayın Prof. Dr. Hatice GÜNEŞ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında destek ve katkıları için Yrd. Doç. Dr. Bekir ÇÖL'e ve laboratuvar ekipmanlarının kullanımını sağlayan Yrd. Doç. Dr. Vatan TAŞKIN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmalarım boyunca yanımda olan, bilgi ve yardımlarını esirgemeyen değerli çalışma arkadaşlarım başta Burcu ŞAHİN ve Bahar TÜL olmak üzere tüm laboratuvar arkadaşlarıma ve manevi desteklerini her zaman hissettiğim arkadaşlarım Fatma, Meryem ve Selin'e teşekkür ederim.

Bu zorlu süreçte yanımda olan sevgili eşim Ali Oktay'a ve öğrenim hayatım süresince tüm kararlarımda yanımda olan babam Ercan KESİK, annem Cavide KESİK ile kardeşlerim Bircan, Elif ve Sultan'a sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
ÖNSÖZ	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç ve Kapsam.....	1
1.2. Kaynak Özetleri.....	3
1.2.1. <i>Bacillus thuringiensis</i> tarihçesi	3
1.2.2. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'in genel özellikleri	4
1.2.3. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'in morfolojik özellikleri.....	5
1.2.4. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'in ürettiği toksinler	6
1.2.5. İnsektisidal kristal proteinler	7
1.2.5.1. Etki mekanizması.....	7
1.2.5.2. Yapısal özellikleri.....	9
1.2.6. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'in ürettiği diğer toksinler	12
1.2.6.1. Vejetatif insektisidal proteinler (VIP)	12
1.2.6.2. Enterotoksinler	12
1.2.6.3. β -ekzotoksinler	14
1.2.7.1 Parasporinlerin keşfi.....	15
1.2.7.2 Parasporinlerin yapısı ve karakteristik özellikleri.....	15
1.2.7.3. Parasporinlerin antikanser aktivitesi.....	17
1.2.7.3. Parasporinlerin kanser hücrelerine etki mekanizması	19
2. MALZEME VE YÖNTEM	22
2.1. Malzeme	22
2.1.1. <i>Bacillus thuringiensis</i> suşları	22
2.1.2. Besiyerleri.....	22
2.1.3.3. Protein izolasyonunda kullanılan çözeltiler.....	24
2.1.3.4. Protein izolasyonunda kullanılan çözeltiler.....	24

2.1.3.5. Kullanılan hücre hatları.....	25
2.1.3.6. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan çözeltiler.....	25
2.2. Yöntem	26
2.2.1. DNA izolasyonu ve cyt gen profillerinin belirlenmesi	26
2.2.1.1. DNA izolasyonu.....	26
2.2.1.2 cyt gen profillerinin belirlenmesi	27
2.2.2. Parasporal inklüzyon proteinlerin hazırlanması ve aktivasyonu	27
2.2.2.1. Parasporal inklüzyon proteinlerin hazırlanması, solubilizasyonu	27
2.2.2.2. Bradford yöntemi	28
2.2.2.3. Solubilize edilmiş Parasporal kristal proteinlerin proteazlarla muamelesi	28
2.2.2. SDS- PAGE jel elektroforezi.....	29
2.2.3. Hücre hatları ve kültür koşulları	29
2.2.3.1. Hücre canlılığının belirlenmesi.....	30
2.2.3.2. Sitotoksikite deneyi	30
2.2.3.3. MTT deneyi	31
2.2.3.4. MTT deneylerinin değerlendirilmesi.....	31
3. BULGULAR VE İRDELEME.....	31
3.1. <i>Bacillus thuringiensis</i> Suşlarının cyt Gen İçeriklerinin Belirlenmesi	32
3.1.1. <i>Bacillus thuringiensis</i> izolatlarının cyt1 analizi.....	33
3.1.2. <i>Bacillus thuringiensis</i> izolatlarının cyt2 analizi.....	34
3.2. Proteolitik İşlemler ve Toksin Aktivasyonu.....	37
3.3. Aktive Edilmiş Parasporal Proteinlerin Hücre Çoğalması Üzerindeki Etkileri.....	38
3.5.1. Parasporal proteinlerin doz etkisinin araştırılması.....	46
3.5.2. Proteaz konsantrasyonunun proteininin aktivitesi üzerinde etkisi.....	53
3.5.3. Parasporal proteinlerin sitotoksik etkisinin inverted mikroskobu ile incelenmesi	53
4.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	64
KAYNAKLAR	69
EKLER	78
Ek A. Kullanılan Kimyasallar	77
ÖZGEÇMİŞ.....	80

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Dört parasporine ait sitotoksisite spektrumları.....	18
Çizelge 1.2. Parasporin çeşitleri ve karakteristik özellikleri.....	21
Çizelge 2.1. Universal primerler, dizileri ve PCR ürünü büyüklüğü.....	23
Çizelge 3.1. Kullanılan Bt izolatları ve kristal oluşumu.....	34
Çizelge 3.2. Parasporal proteinlerin hücre çoğalması üzerine etkileri.....	46
Çizelge 3.3. Farklı proteaz konsantrasyonları uygulanan parasporal proteinlerin hücre büyümesi üzerinde etkileri.....	59
Çizelge 3.4. Tez çalışmasında kullanılan tüm izolatların hücre büyümesi üzerinde etkisi.....	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. <i>Bacillus thuringiensis</i> transmisyon elektron mikroskobu görüntüsü.....	5
Şekil 1.2. Kristal proteinlerin etki mekanizması.....	9
Şekil 1.3. Cyt toksinlerin etki mekanizmaları; Por oluşturma modeli ve deterjan modeli.....	9
Şekil 1.4. Bt tarafından üretilen insektisit toksinlerin üç boyutlu yapısı.....	11
Şekil 1.5. Cry protoksinlerinin uzunlukları ve korunmuş bölgeleri.....	11
Şekil 1.6. PS1, PS2, PS3 ve PS4 parasporinlerinin akrabalıklarını gösteren dendogram.....	16
Şekil 3.1. Bazı izolatların plazmit DNA'larının agaroz jel görüntüsü.....	33
Şekil 3.2. Bazı izolatların <i>cyt1</i> gen içerikleri.....	33
Şekil 3.3. Bazı Bt izolatlarının <i>cyt2</i> gen içerikleri.....	34
Şekil 3.4. Saflaştırılan parasporal proteinlerden 13MY izolatına ait SDS-PAGE profili.....	38
Şekil 3.5. Parasporal proteinlerin Beas-2B hücre çoğalması üzerine etkisi.....	39
Şekil 3.6. Parasporal proteinlerin K-562 hücre hattı çoğalması üzerinde etkisi.....	40
Şekil 3.7. Parasporal proteinlerin CCC-221 hücre hattı çoğalması üzerine etkisi.....	41
Şekil 3.8. Parasporal proteinlerin PC-3 hücre hattı çoğalması üzerine etkisi.....	42
Şekil 3.9. Parasporal proteinlerin DU-145 hücre hattı çoğalması üzerine etkisi.....	43
Şekil 3.10. Parasporal proteinlerin A549 hücre hattı çoğalması üzerine etkisi.....	44
Şekil 3.11. Parasporal proteinlerin MCF-7 hücre hattı çoğalması üzerinde etkisi.....	45
Şekil 3.12. A-549 hücresi üzerinde PK 3T parasporal proteininin 1, 0.1, 0.01, 0.001mg/ml konsantrasyonlarının etkisi.....	47
Şekil 3.13. CCC-221 hücresi üzerinde PK 3T parasporal proteininin 1, 0.1, 0.01, 0.001mg/ml konsantrasyonlarının etkisi.....	48
Şekil 3.14. DU-145 hücresi üzerinde PK 11T parasporal proteininin 1, 0.1, 0.01, 0.001 mg/ml konsantrasyonlarının etkisi.....	49
Şekil 3.15. MCF-7 hücresi üzerinde PK 3T ve PK 23T parasporal proteinlerinin 1, 0.1, 0.01, 0.001mg/ml konsantrasyonlarının etkisi.....	50
Şekil 3.16. K562 hücresinde 26T ve 28T parasporal proteinlerinin 20, 10 ve 5 µl konsantrasyonlarının göre hücre çoğalması üzerinde etkisi.....	51
Şekil 3.17. 1ve 5 mg/ml tripsinle kesime uğratılan 19MY parasporal proteininin hücre hatları üzerindeki etkileri.....	54

Şekil 3.18. 1 ve 5 mg/ml tripsinle kesime uğratılan 20MY parasporal proteininin hücre hatları üzerindeki etkileri.....	55
Şekil 3.19. 48MY parasporal proteininin hücre hatları üzerindeki etkileri.....	57
Şekil 3.20. 6T parasporal proteininin hücre hatları üzerindeki etkileri.....	58
Şekil 3.21. Bazı parasporal proteinlerin A549 hücrelerine etkisi.....	63
Şekil 3.22. Bazı parasporal proteinlerin A549 hücrelerine etkisi.....	64

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
μ l	Mikrolitre
μ g	Mikrogram
g	RCF (relative centrifugal force)
kDa	Kilodalton
rpm	Dakikadaki devir sayısı
mg	Miligram
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CCC-221	Kolon kanseri hücre hattı
Cry	Kristal
Cyt	Sitolitik protein
cytK	Sitotoksin K
DMSO	Dimetil sülfoksit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
DU-145	Prostat kanseri hücre hattı
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
FBS	Fetal bovin serum
HBL	Hemolizin BL
ICP	İnsektisidal kristal protein
K-562	Kronik miyeloid lösemi hücre hattı
MCF-7	Meme kanseri hücre hattı
MTT	Thiazolyl blue tetrazolium bromide
NHE	Hemolitik olmayan enterotoksin
PC-3	Prostat kanseri hücre hattı
PCR	Polimeraz zincir reaksiyounu
PFT	Por oluşturan toksinler
PK	Proteinaz K
PMSF	Fenilmetilsülfonilflorid

PS	Parasporin
RPMI	Roswell Park Memorial Institue
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat- poliakrilamid jel elektroforezi
Sp	Tür
Subs.	Alttür
TAE	Tris borat EDTA
TE	Tirs EDTA
TEMED	Tetra metilen daimin
Tr	Tripsin
VİP	Vejetatif insektisidal protein

1. GİRİŞ

1.1. Amaç ve Kapsam

Bacillus thuringiensis gram pozitif, spor oluşturan ve mikrobiyal biyopestisit olarak kullanılan bir bakteridir. *Bacillus thuringiensis* kısaca Bt olarak isimlendirilmektedir. Sporulasyon sırasında bazı böcek larvalarına karşı toksik etki gösteren insektisidal kristal proteini üretir. Bu bakterinin toksinleri bazı zararlılara karşı oldukça etkili olmakla beraber insanlara, faydalı böceklerle ve diğer organizmalara toksik değildir. Bu yüzden Bt kimyasal insektisitlere alternatif olarak tercih edilmektedir. Bt bazlı biyopestisitler pek çok böcek türünün kontrolünde kullanıldığından bu bakterinin izolasyonu ve çeşitliliğinin analizi önemlidir. Bt suşlarının genetik çeşitliliği ve toksik potansiyeli bölgeden bölgeye değişiklik gösterdiğinden farklı ortamlardan bakteriler izole edilerek karakterizasyonu yapılmaktadır.

Tüm kristal proteinler insektisit değildir. Toprakta elde edilen ve insektisit aktivite göstermeyen Bt suşlarının oranının oldukça yüksek olması (%90), Cry proteinlerinin diğer biyolojik aktivitelerini araştırma gereksinimini ortaya çıkarmıştır. Bu kapsamda literatürde yapılan çalışmalar, Cry proteini üreten, insektisit aktivitesi olmayan ve Cyt proteini taşımayan Bt suşlarının insan kanser hücrelerini ve insan-patojenik protozoaları hedef alan proteinleri ürettiğini keşfetmiştir (Ohba M., 1996; Mizuki vd., 1999). Benzer şekilde, Mizuki ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2000), doğal Bt suşundan (A1190) molekül ağırlığı 81 kDa olan anti kanser Cry proteini elde edilmiştir. Parasporin olarak isimlendirilen bu yeni protein, ayırt edici şekilde kanser hücrelerini öldürme yeteneğine sahiptir. 81 kDa olan bu protein sınıflandırma tablosunda parasporin-1Aa1 (Cry31Aa1) olarak yer alır. Katayama vd. (2004) tarafından yapılan başka bir çalışmada, PS1'in 15 ve 56 kDa büyüklüklerinde iki fragmentin 1:1 oranında sıkı bir şekilde birleşmesiyle meydana gelen bir heterodimer olduğu belirlenmiştir. Itoh vd., (2004)'ün *Bacillus thuringiensis dakota* serotipine ait A1547 toprak izolatını kullanarak yaptıkları çalışmada, A1547 suşunun özellikle kolon ve akciğer kanser hücrelerini öldürücü etki gösterdiğini belirlemiştir.

Aynı zamanda toksin hedefe özgül etki göstererek bazı kanser hücrelerini öldürücü etki gösterirken normal hücreleri de etkilememektedir. Bu protein *Bacillus thuringiensis* toxin gen nomenclature tarafından parasporin-2Aa1 (Cry46Aa1) olarak isimlendirilmiştir. Yamashita vd., (2005) tarafından yapılan çalışmada doğal A1462 suşundan elde edilen, bazı insan kanser hücrelerine etki eden ve üç domainden oluşan bir Cry protein, ilk defa tanımlanmış ve parasporin-3Aa1 (Cry41Aa1) olarak isimlendirilmiştir. Saitoh vd. (2006)'nin yaptığı çalışmada *Bacillus thuringiensis* var *shandongensis* A1470 suşunun ürettiği insektisit parasporal proteinlerden bağımsız 27 kDa büyüklüğündeki yeni bir proteinin lösemik hücreleri öldürme yeteneğinde olduğunu belirlemiş ve bu protein parasporin-4Aa1 (Cry45Aa1) olarak isimlendirilmiştir. Nagamatsu vd. (2010)'da yapılan çalışmada lepidoptera ve diptera larvalarına karşı patojenik olmayan Bt M019 suşunun 84 kDa ağırlığında üç Cry proteinden (CP) oluşan bir parasporal protein ürettiği belirlenmiştir. Bu proteinlerden CP78A ve CP78B daha önce tanımlanmış olan parasporin-1 ile yüksek oranda aminoasit dizi benzerliği gösterdiğinden, bu proteinlerin parasporin-1'in yeni varyantları olduğu yapılan çalışmalar sonucu belirlenmiştir. CP84 olarak isimlendirilen protein ise diğer iki proteinle ve insektisidal toksin Cry2 ile çok düşük oranda aminoasit dizi benzerliği göstermektedir. CP84 proteini, CP78A ve CP78B proteinlerine benzer bir sitosidal aktivite gösterirken aminoasit dizilimlerinin farklılığından dolayı ayrı sınıflandırılmışlardır. Yeni bir protein olduğu belirlenen CP84, daha sonra parasporin-6Aa1 olarak adlandırılmıştır. Parasporin-5Aa1 ile ilgili çalışmalar devam etmektedir (Ekino ve Shin, 2009).

Günümüz teknolojisiyle birlikte kanser biyolojisinin daha iyi anlaşılması, kanserden korunmada ve tedavisinde kayda değer gelişmeler sağlamış olsa da gelişmiş ülkelerde kanser nedenli ölümler halen yüksek düzeylerde bulunmakta ve toplumdaki tüm ölümlerin % 25'ini oluşturmaktadır. Kanserle savaşta en etkili ilacı bulabilmek amacıyla çeşitli düzeylerde yapılan çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir. Hücre kültüründe yapılan deneyler, kanser araştırma çalışmalarının önemli bir yerini tutmaktadır. Kanser gibi çeşitli patolojik durumlarda, belirli bir maddenin ya da ham ekstrenin işlevlerini belirlemek amacıyla belli bir hücre hattından çoğaltılan hücrelerle çalışmalar yapılarak canlı ortamında (*in vivo*) elde edilecek sonuçlara ulaşılabilmektedir.

Literatürde yer alan bilgiler doğal Bt suşlarının insan kanser hücrelerini hedef alan ve büyümelerini engelleyen proteinler ürettiğini göstermektedir. Dolayısıyla, bu tez çalışmasının amacı önceki çalışmalarımızdan elde ettiğimiz doğal Bt suşlarının farklı insan kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik etkilerini araştırmaktır. Çalışmalar iki aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, önceki çalışmalarımızda oluşturduğumuz Bt koleksiyonumuzda bulunan 120 doğal Bt suşunun Cyt proteini içerip içermediği, *cyt1* ve *cyt2* primerleri kullanılarak gen düzeyinde PCR analizi ile araştırılmıştır. İkinci aşamada ise, *cyt* geni içermeyen (hemolitik aktivitesi olmayan), ve Cry proteini üreten suşlar seçilerek antikanser etkileri çeşitli kanser hücre hatları üzerinde incelenmiştir. Antikanser etkisi gösteren doğal Bt suşlarının belirlenmesi, antikanser etkisi daha farklı olan yeni proteinlerin veya parasporinlerin belirlenmesi için önemli kaynak sağlayacaktır.

1.2. Kaynak Özetleri

1.2.1. *Bacillus thuringiensis* tarihçesi

Bacillus thuringiensis ilk defa 1901 yılında Japon biyolog Shigetane Ishiwatari tarafından ani kolaps hastalığına yakalanmış ipek böceklerini araştırdığı sırada keşfedilmiştir. Bu hastalığa Bt'nin neden olduğu bulunmuş ve bakteri *Bacillus sotto* olarak adlandırılmıştır. Ancak bu keşif 1911 yılında Ernst Berliner tarafından tekrar ortaya çıkarılana kadar unutulmuştur. Berliner Almanya'nın Thuringia şehrinde Akdeniz un güvelerinin ölüm nedenini araştırırken bu bakteriyi yeniden keşfetmiş ve *Bacillus thuringiensis* olarak adlandırmıştır. Aslında bakteri Ishiwatari tarafından *Bacillus sotto* olarak isimlendirilmişti ancak Berliner'in keşfi ile bu isim geçersiz kılınmıştır. Berliner bakterinin kristal ürettiğini bulmuştu ancak işlevi henüz bilinmiyordu. 1920'lerde çiftçiler tarlalarına sprey olarak uyguladıklarını bildirene kadar popüler olarak kullanılmamaktaydı. 1938 yılında Fransa'da Sporin adıyla un güvelerine karşı mücadelede kullanılmak üzere çiftçilere satışına başlanmıştır. Fakat daha sonra spreyleyin yağmurla akması ve güneş ışınları altında degrades olması nedeniyle Bt ürünlerinin kullanımı kısıtlanmıştır. Ayrıca Lepidoptera larvaları hariç bir çok böcek çeşidinin Bt'ye karşı direnç kazandığı belirlenmiştir.

1956 yılında Hannay, Angus ve Fitz-James tarafından Bt'nin yapısındaki kristaller sayesinde etkinlik gösterdiği bulunmuştur. Kristallerin çalışılması Bt çalışmalarının odak noktası olmuştur. 1958 yılında bir Amerika'lı şirket tarafından ticari olarak ulaşılabilir hale gelmiştir. 1968 yılında da EPA tarafından ticari pestisid olarak kayıtlara geçirilmiştir. Bt kullanımı 1980'li yıllarda böceklerin sentetik insektisidlere karşı direnç kazandığının ve sentetik insektisidlerin çevreye zarar verdiğinin fark edilmesiyle artmaya başlamıştır. Bt'nin doğada kalmaması ve çözünmesi kullanımını daha da cazip hale getirmiştir. Bt'nin kristal protein kodlayan genleri moleküler biyolojinin imkanlarıyla mısır ve diğer bazı bitkilere transfer edilmiştir. İlk olarak 1995 yılında Bt'de bulunan kristal proteini kodlayan DNA mısır bitkisine aktarılmış ve EPA tarafından kayıtlara geçirilmiştir. Günümüzde ise birçok ülke tarafından patates, pamuk, mısır gibi genetiği değiştirilmiş tarımsal ürünler yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (<http://bacillusthuringiensis.pbworks.com/w/page/9916082/History>).

1.2.2. *Bacillus thuringiensis*'in genel özellikleri

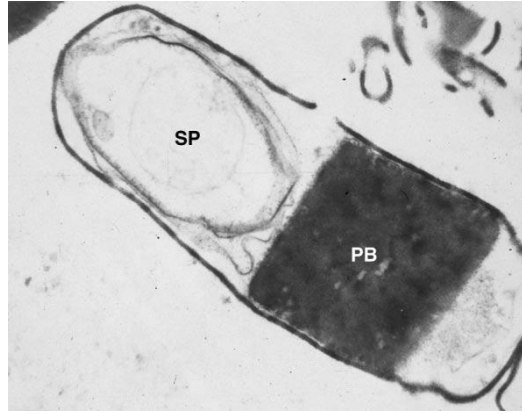
Bacillus thuringiensis Bacillaceae familyasına ait, gram (+), spor oluşturan fakültatif anaerob bir bakteridir. Büyüme grafiğinin durağan fazında insektisidal kristal proteinleri (ICP) üretirler ve entomopatojenik özellik gösterirler (Bernhard vd., 1997; Crickmore vd., 1998). Bu kristaller kristal (Cry) ve sitolitik (Cyt) proteinlerden oluşur. İnsektisidal kristal proteinler (ICP), delta-endotoksinler ya da Cry proteinler olarak da adlandırılır ve zararlı tarımsal böcek türlerine karşı yüksek oranda toksik etki gösterirler (Bravo vd., 1998). Bt topraktan, depolanmış ürünlerden, böcek habitatlarından, yaprak yüzeylerinden, iğne yapraklı ağaçlardan ve otlardan kolaylıkla izole edilebilen, doğal ortamlarda her yerde bulunabilen bir bakteridir (Bernhard vd., 1997; Ben-Dov vd., 1997; Ichimatsu vd., 2000). Bu habitatlar içerisinde en fazla toprakta bulunur (Dai vd., 1996; Li vd., 1990; Ohba vd., 2000).

Bt suşları farklı toksinler üretir. Bunlardan biri durağan fazda üretilen insektisidal kristal proteinlerdir (ICP) ve entomopatojenik özellik gösterirler (Bernhard vd., 1997; Crickmore vd., 1998). İnsektisidal kristal proteinleri üreten genlerin klonlama ve dizi analizi çalışmaları sonucunda, ICP genleri *cry* ve *cyt* genleri olmak üzere sınıflandırılmıştır (Bravo vd., 1998). Kristal proteinler δ -endotoksinler olarak da isimlendirilir. Bu toksinler yüksek oranda hedef özgüllüğü gösterir. İnsan, hayvan ve

diğer omurgalılarına karşı zararsızdır. Bu sayede tarım alanında zararlı böceklerle mücadelede insektisit olarak kullanılmaktadır (Bravo vd., 2005). Çeşitli alanlardan izole edilen Bt'ler, Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, Phthiraptera ve Acari gibi farklı böcek türlerine ve Nematelminthes, Platyhelminthes, Sarcomastigophora gibi bazı omurgasız türlerine karşı büyük oranda özgülük göstermektedir (Feitelson, 1992). Şimdiye kadar 500'den fazla farklı cry gen sekansı 67 grup içerisinde sınıflandırılmıştır (Crickmore vd., 2010).

Bt tarafından büyüme grafiğinin durağan fazında üretilen insektisidal kristal protein dışında vejetatif fazda üretilen vejetatif insektisidal proteinler (VIP)'de vardır. Ayrıca insektisidal proteinlerin dışında yüksek dozda memelilere karşı toksik etkiye sahip olan ekzotoksinler, hemolizinler ve enterotoksinler de Bt tarafından üretilen toksinlerdir (Glare ve O'Callaghan, 2000).

Bacillaceae familyası içerisinde Bt bir memeli patojeni olan *Bacillus anthracis* ve besin zehirlenmelerine neden olan *Bacillus cereus* ile genetik olarak yakınlık gösterir. Bu üç tür de topraktan izole edilebilir. Ancak Bt kristal üretebilme özelliğiyle bu bakterilerden ayrılır (Şekil 1.1) (Helgason vd., 2000).



Şekil 1.1. *Bacillus thuringiensis* transmisyon elektron mikroskobu görüntüsü. PB; protein, SP; spor (Maagd, 2001)

1.2.3. *Bacillus thuringiensis*'in morfolojik özellikleri

Bt petride hızlı bir şekilde yayılabilen beyaz, pütürlü koloniler üretir. Bt'nin elips şeklinde ve şişkin olmayan sporları hücrenin alt uç kısmında bulunur. Bt'yi diğer *Bacillus* türlerinden ayırmanın en kolay yolu faz kontrast mikroskobu altında kolayca görülebilen parasporal inklüzyon kristallerinin bulunmasıdır. Bt suşları arasında

kristal proteinlerin morfolojileri, büyüklükleri ve sayıları değişkenlik gösterebilir. Beş farklı kristal morfolojisi vardır; Cry1 proteinlerinde görülen bipiramidal kristaller, Cry2 proteinlerinde görülen kübik kristaller, Cry4 ve Cyt proteinlerinde görülen şekilsiz ve birleşik kristaller, Cry3 proteinlerinde görülen yassı kare şeklindeki kristaller ve Cry4d proteinlerinde görülen çubuk şekilli kristallerdir (Lopez-Meza ve Ibarra, 1996; Schnepf vd., 1998).

1.2.4. *Bacillus thuringiensis*'in ürettiği toksinler

Bt entomopatojenik özellikleri olan gram (+) bir bakteridir. Sporulasyon evresinde insektisidal kristal proteinleri üretir. Bu kristaller genellikle Kristal (Cry) ve sitolitik (Cyt) proteinleri olmak üzere bir veya daha fazla proteinden oluşur. Cry proteinler hedef organizma üzerinde kanıtlanabilir bir toksik etkiye sahiptir. Benzer şekilde Cyt proteinleri de Bt'den elde edilen sitolitik aktivite gösteren parasporal inklüzyon proteinleridir. Bu toksinler hedef organizmaya (böcek türleri) yüksek oranda spesifik; insan, bitki, hayvan ve diğer omurgalılara karşı zararsız ve doğada tamamen çözünebilen proteinlerdir. Bu sayede Bt tarım alanlarında zararlı böceklerin ve insanda hastalık yapan vektörlerin kontrolünde önemli bir alternatiftir (Bravo vd., 2005).

Tüm kristal proteinler insektisit değildir. Toprakta elde edilen ve insektisit aktivite göstermeyen Bt suşlarının oranının oldukça yüksek olması (%90), Cry proteinlerinin diğer biyolojik aktivitelerini araştırma gereksinimini ortaya çıkarmıştır. Bu kapsamda literatürde yapılan çalışmalar, Cry proteini üreten, insektisit aktivitesi olmayan ve Cyt proteini taşımayan Bt suşlarının insan kanser hücrelerini ve insan-patojenik protozoaları hedef alan proteinleri ürettiğini keşfetmiştir (Ohba M., 1986; Mizuki vd., 1999).

Bazı Bt suşları da aktif büyüme döngüsü sırasında ekstraselüler bileşikler üretir. Bu bileşikler vejetatif insektisidal proteinler, enterotoksinler, β -ekzotoksinler, fosfolipaz ve proteazlar olabilir. Ayrıca bazı Bt'ler antifungal aktiviteye sahip antibiyotikler de üretir (Stabb vd., 1994).

1.2.5. İnsektisidal kristal proteinler

Bt büyüme grafiğinin durağan fazında insektisidal kristal proteinleri (ICP) üretirler ve entomopatojenik özellik gösterirler (Bernhard vd., 1997; Crickmore vd., 1998). Kristal proteinler delta-endotoksinler olarak da adlandırılır. Kristal proteinler Cry ve Cyt proteinler olmak üzere iki sınıfa ayrılır.

Bt tarafından üretilen Cry ve Cyt toksinleri por oluşturan toksinler (PFT) olarak bilinen sınıfa aittir. PFT'ler konağın hücre membranından içeri girmek veya transloke olmak için konformasyonel değişiklikler geçiren suda çözünabilir proteinlerdir. PFT'ler iki grupta toplanır. Bunlardan birincisi; porlardan geçişi sağlayan ve α -heliks bölgeleri bulunan α -helikal toksinlerdir. İkincisi ise; β -tabakalı saç tokası yapısından meydana gelen β -barrellar ile membrana girişi sağlayan β -barrel toksinlerdir. Cry toksini birinci sınıfta yer alan por oluşturan toksinler sınıfına aittir. Cyt toksini ise ikinci sınıfta yer alan por oluşturan toksin çeşididir (Parker ve Feil, 2005). Genellikle PFT üreten bakterinin sentezlediği toksinler konak hücre membranında yer alan spesifik reseptörlerle etkileşir. Çoğu zaman PFT oligomerik yapının oluşmasını uyaran reseptör bağlanmasından sonra konak proteazları tarafından aktive edilir. Son olarak proteinin globul yapıya geçmesini uyaran pH azalması ile membrana giriş tetiklenir (Parker ve Feil, 2005).

1.2.5.1. Etki mekanizması

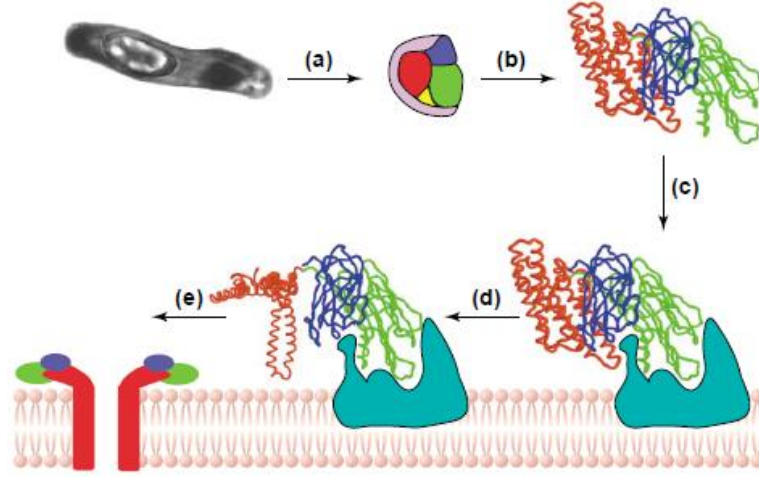
Bt kristal proteinleri hedef özgülüğü gösterir. Buna bağlı olarak her bir kristal protein bir veya birden daha fazla spesifik böcek türlerine etki eder. ICP'lerin bu spesifikliği etki mekanizmalarından kaynaklanır (Gill vd., 1992).

Bt insektisidal kristal proteinleri protoksin halinde taşır. Cry protein, duyarlı böcek tarafından alındıktan sonra böceğin orta barsağında alkali pH (10-12)'de çözünürler. Çözünen parasporal kristaller 130-135 kDa büyüklüğündeki protoksini meydana getirir. Bu proteinler daha sonra tripsin, kimotripsin gibi barsak proteazları tarafından N-terminallerinin uzaklaştırılmasıyla aktif hale getirilir ve böylece aktif toksin fragmentlerine dönüşür (Gill vd., 1992; Höfte ve Whiteley, 1989; Knowless, 1994). Aktiflenen toksinler böcek larvalarının orta barsak epitelinde yer alan spesifik reseptörlere bağlanır. Hücre membranında yer alan spesifik reseptörlere bağlanan

aktiflenmiş toksin membran iyon kanalları veya porlar oluşturur. Por oluşumu ozmotik şoka neden olur. Bunun sonucu olarak hücre membranı parçalanır ve buna bağlı olarak böcek beslenemez, ölür (Şekil 1.2) (Knowless, 1994).

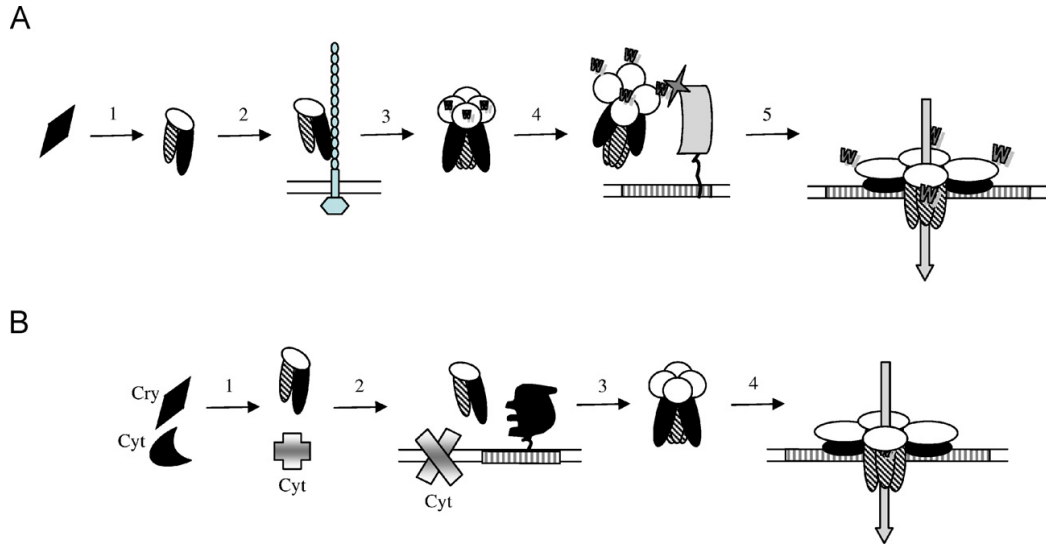
Cyt toksinleri β -barrel yapısında oligomerik transmembran por oluşturarak hücrelerin ölümüne neden olur (Promdonkoy ve Ellar, 2003). Cyt'lerde protoksin olarak sentezlenirler ve toksin N-terminal ve/veya C-terminallerin uzaklaştırılmasıyla aktif hale getirilir. Aktif Cry toksinleri larvanın mide hücrelerindeki spesifik reseptörlere bağlanırlar ve hücre membranına bağlanınca iyon kanalları veya porlar oluştururlar. Aktif Cyt toksinleri ise protein reseptörüne bağlanmadan direkt membrandaki lipidlerle etkileşime geçer. Bunu yaparken membrana girerek por oluşturur (Thomas ve Ellar, 1983; Li vd., 1996; Promdonkoy ve Ellar, 2003) ya da membrana deterjan benzeri etkileşimlerle zarar verir (Şekil 1.3A) (Butko, 2003).

Cyt1Aa1 (CytA) *Bacillus thuringiensis israelensis* parasporal inklüzyonlarında en fazla çalışılan 27 Kda'luk bir proteindir. Çok lamelli lipozomlar ve düzlemsel lipid bilayerler kullanılarak yapılan deneyler sonucu Cyt1A'nın sitolitik etkisinin toksin-lipid etkileşimleriyle gerçekleştiği kanıtlanmıştır. Cyt1A transmembran iyon kanalları ve/veya por oluşumuyla etkisini gösterdiği bilinirken toksin-membran etkileşiminin moleküler mekanizması tamamen bilinmemektedir (Butko vd., 2003). Cyt2 29 kDa'luk bir proteindir. Proteazlara karşı Cyt2, Cyt1'den daha dayanıklıdır. Cyt2 hedef membrana monomer gibi bağlanır ve membrana eklenir. Toksin molekülleri birbirlerine bağlandığında oligomerizasyon meydana gelir. Porlar da büyük oligomerlerden oluşur. Por oluşumu osmotik şoka neden olur. Ardından hücre membranı lizise uğrar, por oluşturmak için gerekli toksin miktarı kesin olarak bilinmemektedir (Şekil 1.3B) (Promdonkoy ve Ellar, 2003).



Şekil 1.2. Kristal proteinlerin etki mekanizması

a) Toksin böcek tarafından alındıktan sonra barsak özsuğunda çözünür. b) Protoksinler proteazlar tarafından aktif toksine dönüştürülür. c) Aktiflenen toksin epitelyum hücrelerin membranlarında bulunan reseptörlere bağlanır. d) Domain I de meydana gelen yapısal değışikler sonucu oluşan saç tokası yapısı sayesinde membrana giriş gerçekleşir. e) Membrana giren toksinler oligomerler yaparak porları oluşturur (Maagd vd., 2001)



Şekil 1.3. Cyt toksinlerin etki mekanizmaları; Por oluşturma modeli ve deterjan modeli

A) cry proteinlerin lepidoptera larvasında yer alan reseptör bölge ile etkileşerek etki göstermesi. B) cry ve cyt proteinlerin diptera larvasına toksik etki göstermesi. 1. cry ve cyt toksinleri aktiflenir. 2.

Cry protein membranda bulunan reseptöre bağlanır, cyt protein membrandan içeri girer. 3. Cry proteinlerinin oligomerizasyonu uyarılır. 4. Por oluşur (Bravo vd., 2007).

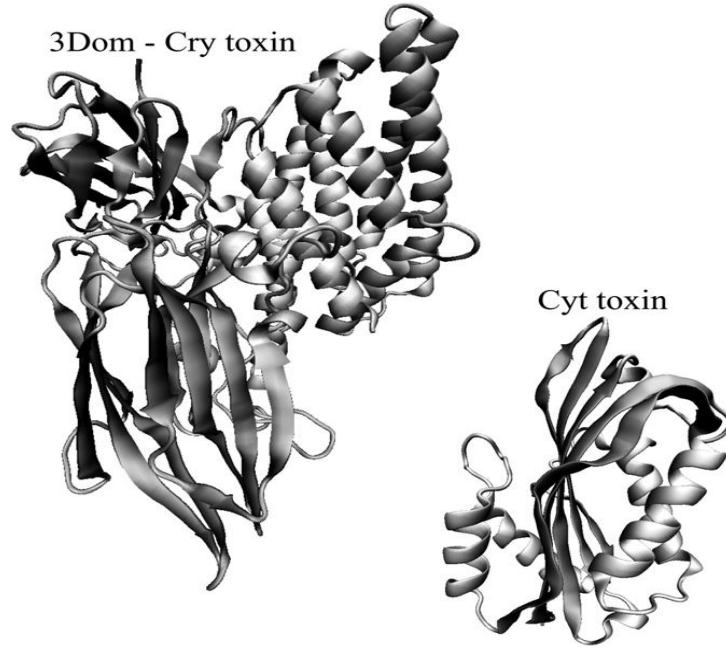
1.2.5.2. Yapısal özellikleri

Bt'in ürettiği parasporal kristal inklüzyonlar insektisidal kristal protein, δ -endotoksinler, cry toksinleri gibi birçok terminoloji ile ifade edilmektedir. Yukarıda

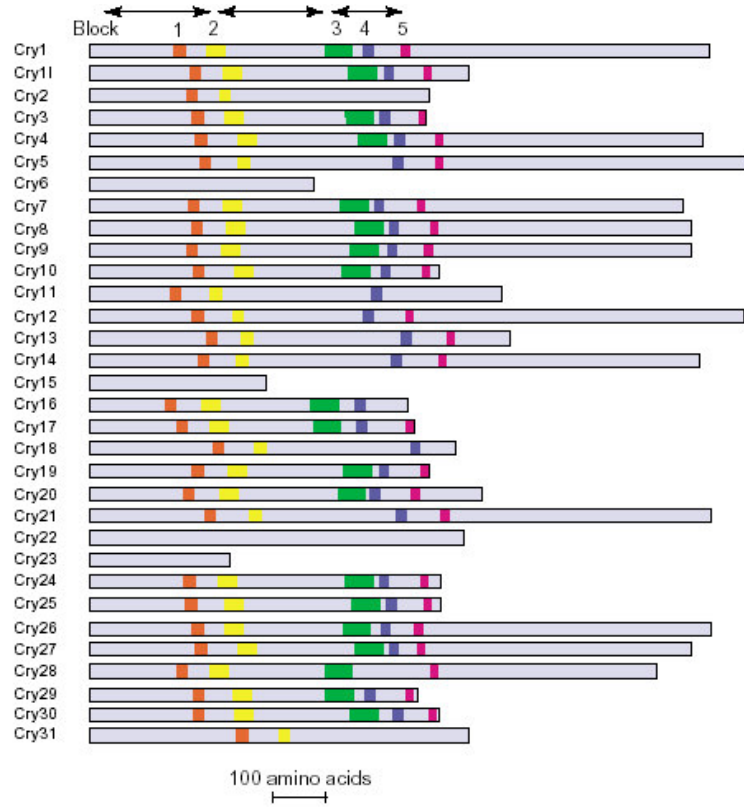
belirtildiği gibi bu toksinler Cry ve Cyt toksinler olmak üzere iki gruba ayrılır. Bu proteinler dizi benzerliği göstermezler fakat her ikisi de duyarlı böcek barsağında por oluşturup hücrenin parçalanmasına neden olmak üzere benzer etki gösterirler (Gill vd., 1987; Guerchicoff vd., 2001; Thomas ve Eller, 1983).

Kristal proteinlerin yapılarının Cry3A, Cry1Aa ve Cyt2A'nın X-Ray kristalografi çalışmaları yapılmıştır. Cyt2A'nın karmaşık bir β -tabakalı yapıyı saran α -heliks'ten oluşan iki dış tabakadan meydana gelen tek bir domainden oluştuğu belirlenmiştir. Cyt1A'nın da benzer bir yapıda olduğu düşünülmektedir. Cry3A ve Cry1Aa, Cyt1A'nın aksine üç domainden meydana gelmektedir. Domain I heliks-5'in diğer helikslerle kuşatıldığı yedi antiparalel α -heliks'ten meydana gelir. Domain II, β prizma kıvrımı denilen yapıyı oluşturan üç antiparalel β -sheet'ten meydana gelir. Bu konformasyon "greek key" olarak adlandırılır. Domain III ise β -sandviç modelini oluşturan iki ayrı β -sheet'ten meydana gelir ve "jelly roll" olarak isimlendirilir (Schnepf vd., 1998). Toksinin etki göstermesinde her domainin farklı bir etkisi vardır. Domain I membrana giriş ve por oluşumunda görevlidir. Domain II ve Domain III ise reseptör tanıma ve bağlanmadan sorumludur. Ayrıca Domain III por oluşumunda da etkilidir (Maagd vd., 1996).

Cry proteinler Bt'den elde edilen parasporal inklüzyonlar olup hedef organizma üzerinde toksik etki gösterir. Cyt proteinler de Bt'den elde edilen hemolitik aktiviteye sahip parasporal inklüzyonlardır. Bu toksinler yüksek oranda hedef özgülüğü gösterir. İnsan, hayvan ve omurgalılara karşı zararsızdır. Bu sayede Bt tarım alanında zararlı böceklerin kontrolünde önemli bir alternatiftir (Bravo vd., 2005). Bt Cry ve Cyt toksinleri por oluşturan toksinler (PFT) olarak adlandırılan bakteriyel toksin grubuna girerler (Parker ve Feil, 2005). Cry proteinleri Lepidoptera, Koleoptera, Himenoptera, Diptera böcek türlerine ve ayrıca Nematodlara karşı etkilidir. Cyt protein ise genellikle Diptera türlerine etki eden Bt suşlarında bulunur (Bravo vd., 2007).



Şekil 1.4. Bt tarafından üretilen insektisit toksinlerin üç boyutlu yapısı
Üç domainli cry protein (cry8Ea) ve cyt protein (cyt2Ba) (Bravo vd., 2011)



Şekil 1.5. Cry protoksinlerinin uzunlukları ve korunmuş bölgeleri (Maagd, 2001)

1.2.6. *Bacillus thuringiensis*'in ürettiği diğer toksinler

1.2.6.1. Vejetatif insektisidal proteinler (VIP)

İnsektisidal Bt toksinleri biyolojik kontrolde zararlı böceklerle karşı büyük oranda etki etmektedir. Bu amaçla yaklaşık 500 Bt endotoksini tanımlanmıştır (Crickmore vd., 2010). Ancak Bt'nin uzun yıllardır kullanılması ve Bt endotoksini taşıyan transgenik bitkilerin artması sonucu böceklerde direnç gelişmiştir (Bauer, 1995; Ferre ve Rie, 2002; Gould, 1998). Bu nedenle Bt endotoksinlerine benzer bir etki mekanizması göstermeyen alternatif insektisidal proteinler yeni nesil transgenik bitkilerde yüksek oranda tercih edilmektedir (Fang vd., 2007). Bt endotoksinlere ek olarak büyüme fazının vejetatif evresinde vejetatif insektisidal protein (VIP) denilen insektisidal proteini üretir (Fang vd., 2007). VIP toksinin keşfinden sonra Bt'ye ait iki temel VIP toksin grubu tanımlanmıştır. Birinci grup VIP toksin VIP1 ve VIP2 olmak üzere iki bileşenin bir araya gelip ikili toksin oluşturmasıyla meydana gelir (Warren, 1997). VIP1 ve VIP2 kombinasyonu tarımsal alanda önemli bir böcek zararlısı olan Lepidoptera sınıfına ait *Diabrotica virgifera*'ya karşı yüksek oranda insektisit etki gösterir. Ancak Lepidoptera sınıfına ait diğer böceklerle etki göstermez (Han vd., 1999). İkinci grup, VIP3 toksinlerinden meydana gelir, VIP1 ve VIP2 ile hiçbir dizi benzerliği göstermez. İlk tanımlanan VIP3 toksini olan *VIP3Aa1* pamuk ve mısır bitkilerinde bulunan Lepidoptera haşerelerine karşı yüksek oranda insektisittir (Estruch, 1996). *VIP3Aa1* geninin çıkarıldığı bir Bt suşunun insektisidal aktivitesinin önemli oranda azaldığı gözlenmiştir. Bu da VIP3'ün Bt suşunun tüm toksisitesine katkısı olabileceğini akla getirmektedir (Donovan, 2001). *VIP3Aa1* de böcek hücrelerinin membranlarında por oluşturarak barsak hücrelerinin patlamasına ve böceğin ölmesine neden olur (Lee vd., 2003; Yu vd., 1997). Ancak VIP3 toksininin insektisit olarak kullanımı ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır. VIP3 gen çeşitliliğinin zenginleştirilmesi VIP ailesinin etki spektrumunun geliştirilmesine katkı sağlayarak farklı böcek türlerinin kontrolünü kolaylaştıracaktır (Fang vd., 2007).

1.2.6.2. Enterotoksinler

Bt *Bacillus cereus* ile aynı grupta yer alan gram (+) spor oluşturan bir bakteridir. Filogenetik çalışmalar ve genom dizi analizleri *Bacillus thuringiensis* ve *Bacillus*

cereus 'un aynı tür grubuna ait olduğunu ortaya çıkarmıştır (Carlson vd., 1994). Hem *Bt* hem de *Bacillus cereus* toprakta, omurgalıların barsaklarında ve bitkilerde bulunur (Smith ve Couche, 1991; Jensen, 2003). Aralarındaki tek fark *Bt*'nin sporulasyon sırasında plazmitlerde taşınan genler tarafından kristal proteinleri üretmesidir. Bazı *Bacillus cereus* suşları besin zehirlenmelerine neden olan ajanlar olarak bilinmektedir (Kotiranta, 2000). Patojenik *Bacillus cereus* suşları biri etik sendrom diğeri diyareyal sendrom olmak üzere iki çeşit besine dayalı hastalığa neden olur (Beecher ve MacMillan, 1991). *Bacillus cereus* diyare semptomlarında, farklı üç bölgeden oluşan hemolizin BL (HBL) ve hemolitik olmayan (NHE) ile tek bileşenden oluşan sitotoksin K (cytK) enterotoksinleri birincil virulans faktörlerdir (Granum vd., 1999). HBL, hemolitik, dermonekrotik ve sitotoksik aktiviteleri olan, sırasıyla *hblA*, *hblD* ve *hblC* genleri tarafından kodlanan bağlanma bileşeni B ile *L1* ve *L2* olmak üzere iki litik elementten meydana gelir. Bu genler görevi henüz bilinmeyen *hblB* geni ile birlikte aynı operonda yer alırlar (Ryan vd., 1997). Diğer üç bölgeden oluşan enterotoksin NHE, hemolitik HBL gibi hemolitik değildir. Ancak üç bileşenli yapıları ve operon yapıları yüksek oranda benzerlik göstermektedir (Michelet vd., 2006). Üçüncü enterotoksin cytK sitotoksik, hemolitik ve nekrotik aktiviteye sahip tek bir proteindir. 34 kDa'luk protein ilk olarak üç insanın zehirlenerek ölmesine neden olan bir *B. cereus* suşundan izole edilmiştir. HBL ve NHE arasında bazı dizi benzerlikleri bulunurken, cytK ile diğer enterotoksinler arasında hiçbir aminoasit dizi benzerliği bulunmamaktadır (Lund vd., 2000). *Bacillus cereus* insanlar için potansiyel zararlı olarak düşünülürken, *Bt* çok az klinik özelliği olan yararlı bir organizma olarak bilinmektedir (Priest, 1993). Ancak varolan yöntemler zehirlenmelere neden olan *Bacillus cereus* basili ile *Bacillus thuringiensis* 'i ayırt edememektedir. Bu nedenle *Bacillus cereus* kaynaklı besin zehirlenmesi teşhisi konulan hastalıklara *Bt* de neden olmuş olabilir. Besinlerden ve ticari insektisidal ürünlerden izole edilen *Bt* ve bazı referans suşlar tarafından enterotoksin sentezlendiğine dair bulgular mevcuttur (Damgaard vd., 1996; Hansen ve Hendriksen, 2001). Ancak doğal *Bt* suşları tarafından üretilen *B. cereus* benzeri enterotoksinler hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır (Perani vd., 1998). Enterotoksin kodlayan genlerin konjugasyonla *Bacillus cereus* 'tan *Bt* 'e aktarıldığı düşünülmektedir (Carlson ve Kolsto, 1993).

1.2.6.3. β -ekzotoksinler

Bazı Bt suşları düşük moleküler ağırlıkta ve ısıya duyarlı nükleotid benzeri bir yapı gösteren β -ekzotoksin denilen toksini sentezler. β -ekzotoksin vejetatif büyüme sırasında sentezlenir. β -ekzotoksin bir ATP analogudur ve bu benzerlik β -ekzotoksini DNA bağımlı RNA polimeraz inhibitörü olmasına neden olur (Farkas vd., 1976; Sebesta ve Horska, 1970). Omurgalılara karşı toksik etki gösterir. Bu nedenle ticari olarak kullanılan Bt ürünlerinin β -ekzotoksin üretme yeteneğinde olmaması gerekmektedir (McClintock vd., 1995). Sivrisinek (*Musca domestica*) β -ekzotoksinin belirlenmesinde kullanılır. Ancak çok zaman alıcı olması, saf olmayan toksinlerde yanlış tahminler yapılabilmesi, tekrarlanabilirliğin az olması ve meşakkatli olduğundan dolayı, birçok laboratuvar örneklerin formülasyonlarında ve fermentasyonlarında β -ekzotoksin varlığını ve miktarını belirlemek için yüksek performans sıvı kromatografi (HPLC) yöntemlerini kullanmaktadır (Johnson ve Peterson, 1983). HPLC yöntemleri kullanılarak iki tip β -ekzotoksin belirlenmiştir (Levinson vd., 1990). Tip I β -ekzotoksin adenosin, glukoz ve allarik asitten meydana gelmektedir (Farkas vd., 1969). Bu toksini oluşturan yolağın diğer hücre metabolit yollarında olduğu gibi kromozomal lokuslar tarafından kontrol edildiği düşünülmektedir. Bununla birlikte tip I β -ekzotoksin üretimi için gerekli olan bir genin plazmitler tarafından kodlandığı belirlenmiştir. Ayrıca bu plazmit bir veya daha fazla δ -endotoksin genini taşıyabilmektedir (Espinasse vd., 2002; Levinson vd., 1990). Tip II β -ekzotoksin yapısı bilinmemekle birlikte bununla ilgili çalışmalar devam etmektedir (Hernandez vd., 2001).

1.2.7. İnsektisidal olmayan kristal proteinler-Parasporinler

Tüm kristal proteinler insektisit değildir. İnsektisit olmayan Bt'ler topraktan elde edilen doğal populasyonların % 90'ından fazladır. Bu da insektisit olmayan Bt'ler tarafından üretilen Cry proteinlerin biyolojik aktiviteleri olup olmadığı sorusunu akla getirmiştir. Bt Cry proteinlerinin kapsamlı olarak taranması ile 1996 yılında insektisit etkisinin dışında yeni bir biyolojik aktivite tanımlanmıştır. Bu da insan kanser hücrelerini ve insan-patojenik protozooları hedef alan proteinlerin keşfini sağlamıştır (Mizuki vd., 1999).

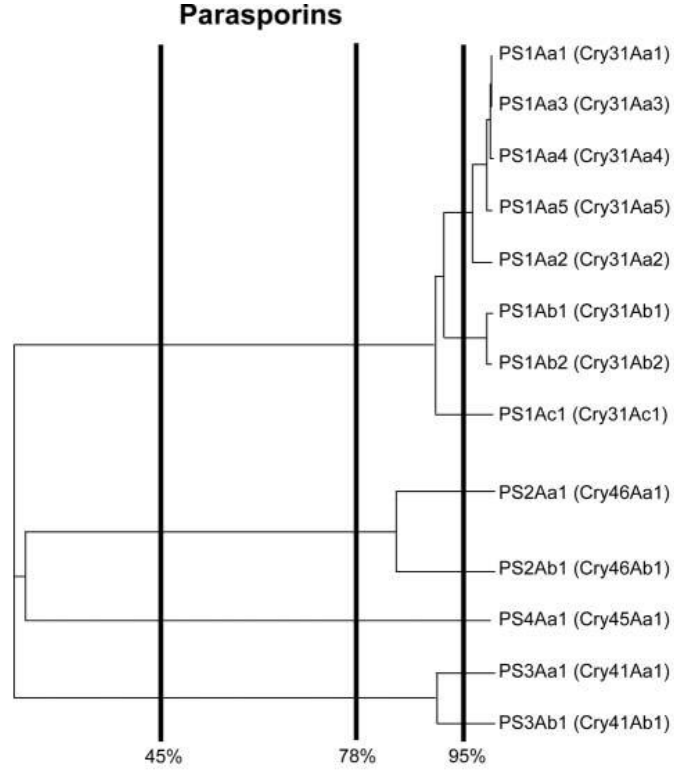
1.2.7.1 Parasporinlerin keşfi

Mizuki ve arkadaşları parasporal inklüzyonların hemolitik olmayan ancak insan kanser hücrelerine karşı sitosidal etki gösteren Bt izolatlarının kapsamlı taramasını yapan ilk ekiptir. Tarama testlerinde 1744 Bt suşu kullanılmıştır. İlk olarak koyun eritrositleriyle gerçekleştirilen testlerde 60 suşa ait parasporal inklüzyonların güçlü hemolitik etki gösterdiği görülmüştür. Geriye kalan hemolitik olmayan 1684 suşun MOLT-4 hücrelerine karşı sitosidal etkisine bakılmıştır. Bu şekilde 42 pozitif suş seçilmiştir. Bu parasporal proteinler insektisit ve hemolitik etki göstermezler. Son olarak 3 suş parasporal proteinlerin antikanser aktivitelerinin karakterizasyonu için seçilmiştir. Bu üç suşa ait parasporal proteinler MOLT-4, HeLa ve A549 hücrelerine uygulandığında farklı toksisite ve değişken aktivite oranları ile birlikte güçlü sitosidal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca A1462 ve A1190 suşları lösemik ve normal T hücrelerini ayırt edebilme yeteneğinde oldukları ve lösemik olanlara etki ettikleri görülmüştür (Mizuki vd., 1999).

2000 yılında Mizuki ve arkadaşları A1190 suşundan 81 kDa anti kanser Cry proteini elde etti. Bu da yeni bir protein kategorisini parasporini, ortaya çıkardı. Parasporin ayırt edici şekilde kanser hücrelerini öldürme yeteneğinde olan bakteriyel parasporal proteindir (Mizuki vd., 2000). 81 kDa protein sınıflandırma tablosunda parasporin-1Aa (PS1Aa) olarak yer alır. Daha sonraki çalışmalar ile PS2, PS3, PS4, PS5 ve PS6 belirlenmiştir.

1.2.7.2 Parasporinlerin yapısı ve karakteristik özellikleri

Toplam 13 parasporin (PS) 11 Bt suşundan elde edilmiştir. Bunlardan sekiz tanesi PS1, ikisi PS2, ikisi PS3 ve bir tanesi de PS4'tür. Şekil 1.6'da bu proteinleri gösteren dendogram verilmiştir. Dört parasporin ailesi arasında genetik benzerlik çok azdır. Çizelge 1.2'de PS proteinlerinin genel özellikleri gösterilmektedir (Ohba vd., 2009).



Şekil 1.6. PS1, PS2, PS3 ve PS4 parasporinlerinin akrabalıklarını gösteren dendrogram (Ohba vd., 2009)

Cry31Aa1'e karşılık gelen PS1Aa1 81.045 Da ağırlığında 723 aminoasit rezudisine denk gelen bir polipeptittir. Gen 2169 bp uzunluğundadır. Bu protein Cry proteinlerinde bulunan 5 korunmuş bölge içeren üç domainli yapıya sahiptir. Ancak PS1Aa1 ile Cry ve Cyt proteinler arasında çok az benzerlik görülmüştür. Yapılan çalışmalarda PS1Aa1'in yalnızca proteaz ile muamele edildiğinde kanser hücrelerini öldürücü etki gösterdiği belirtilmiştir (Mizuki vd., 2000). Proteaz ile aktivasyon Cry proteinlerinde de vardır. PS1Aa1'in proteaz ile muamele edilmesiyle 15 ve 56 kDa'luk polipeptitlerden oluşan heterodimer protein oluşur. Bu heterodimer protein kanser hücrelerine karşı aktiftir ve 81 kDa'luk proteinin N terminalinin işlenmesiyle ortaya çıkar. HeLa, MolT-4, HL60 kanser hücrelerine karşı güçlü sitotoksik etki göstermiştir.

Cry46Aa1'e karşılık gelen PS2Aa1 338 aminoasit rezudisinden meydana gelen ve tahmini moleküler ağırlığı 37,446 Da olan bir polipeptittir. 1014 bp uzunluğundadır. Bu protein üç domainli yapı göstermez ve insektisit Cry proteinlerinde korunmuş bölgeleri de içermez. Yalnızca Cry15Aa ile düşük oranda dizi benzerliği gösterir. 37 kDa'luk proteinin işlenmesi sonucu meydana gelen 30 kDa'luk protein kanser

hücreleri üzerinde sitotoksik aktivite gösterir. Proteaz ile işlenme N ve C terminallerin her ikisinde de gerçekleşir (Ito vd., 2004).

Cry41Aa1'e karşılık gelen PS3Aa1 insektisit Cry proteinlerde bulunan 5 korunmuş bölgeyi de içeren tipik üç domainli yapı gösterir. 825 aminoasit rezudisinden oluşur ve tahmini moleküler ağırlığı 93,689 Da'dur. İnsektisidal Cry proteinlerle çok az benzerlik gösterir. PS3Aa1'in C terminalinin *Clostridium botulinum* hemagglutinin HA-33 ile benzerlik göstermesi şaşırtıcıdır (Tsuzuki vd., 1990). 81 kDa'luk protein N ve C terminallerinden proteaz işlenmesi ile 64 kDa'luk toksik proteine dönüşür (Yamashita vd., 2005). HepG2 ve HL60 kanser tiplerine karşı etkilidir.

Cry45Aa1'e karşılık gelen PS4Aa1 275 aminoasit rezudisinden meydana gelir ve tahmini moleküler ağırlığı 30,078 Da'dur. Gen 828 bp uzunluğundadır. PS1Aa1 ve PS3Aa1'i de içeren Cry proteinlerin çoğunda korunmuş 5 bölgeyi bulundurmaz. Üç domainli yapı göstermez. Diğer Cry ve Cyt proteinlerle çok düşük (<30%) benzerlik gösterir (Ohba vd., 2009). Özellikle kolon, uterus ve kan kanseri hücrelerine karşı etkilidir.

Nagamatsu vd. (2010)'da yapılan çalışmada lepidoptera ve diptera larvalarına karşı patojenik olmayan Bt M019 suşunun 84 kDa ağırlığında üç Cry proteinden (CP) oluşan bir parasporal protein ürettiği belirlenmiştir. Bu proteinlerden CP78A ve CP78B daha önce tanımlanmış olan parasporin-1 ile yüksek oranda aminoasit dizi benzerliği gösterdiğinden, bu proteinlerin parasporin-1'in yeni varyantları olduğu yapılan çalışmalar sonucu belirlenmiştir. CP84 olarak isimlendirilen protein ise diğer iki proteinle ve insektisidal toksin Cry2 ile çok düşük oranda aminoasit dizi benzerliği göstermektedir. CP84 proteini, CP78A ve CP78B proteinlerine benzer bir sitosidal aktivite gösterirken aminoasit dizilimlerinin farklılığından dolayı ayrı sınıflandırılmışlardır. Yeni bir protein olduğu belirlenen CP84, daha sonra parasporin-6Aa1 olarak adlandırılmıştır. Parasporin-5Aa1 ile ilgili çalışmalar devam etmektedir (Ekino ve Shin, 2009).

1.2.7.3. Parasporinlerin antikanser aktivitesi

PS proteinler eritrositlere karşı hemolitik aktivite ve *in vivo* insektisidal aktivite göstermezler. Dört PS protein de ayrıcalıklı olarak sadece kanser hücrelerine karşı aktivite gösterir. Örneğin, böcek kültürlerine *in vitro* sitotoksitelerinin belirlenmesi

amacıyla PS1Aa1, sivrisinek (*Aedes albopictus*)’tan elde edilen NIAS-AeA1-2 ve ipek böceği (*Bombx mori*)’den elde edilen BM-N hücre hatlarına uygulanmıştır. Deney sonucunda böcek hücre hatlarının PS1Aa1’e duyarlı olmadığı belirlenmiştir (Ito vd., 2004). Buna ilave olarak, altın balığı (*Carassius auratus*) GF-Scale hücre hattı kullanılarak yapılan bir başka çalışmada PS1Aa1, PS2Aa1 ve PS3Aa1 proteinlerinin kaba özütleri kullanılmış ve goldfish hücrelerinin PS proteinlere duyarlı olmadığı görülmüştür (Mizuki vd., 1999). Dört PS proteinin 13 farklı insan hücre hattına, tümörlü dokuz hücre hattına, kanserli olmayan dört hücre hattına ve insana ait olmayan beş hücre hattına etkileri çizelge 1.1’de gösterilmektedir. Bulgular sonucunda dört PS proteinin aktivite oranlarının ve antikanser sitotoksosite spektrumlarının farklı olduğu görülmüştür. Düşük ağırlıklı parasporinler PS2Aa1 ve PS4Aa1 daha geniş sitotoksosite spektrumuna sahiptir. PS2Aa1 üç lösemik T hücre hattına da (Jurkat, MOLT-4ve HL60) sitotoksik etki gösterir. Tipik üç domainli Cry protein yapısında bulunan PS3Aa1, HL60 ve HepG2 hücrelerine karşı sitotoksosite gösterir. Bu nedenle PS3Aa1 parasporinler arasında etki spektrumu en az olandır. HeLa, TCS ve Jurkat kanser hücre hatları PS1Aa1, PS2Aa1 veya PS3Aa1proteinlerinden yalnızca birine karşı duyarlıdır (Çizelge 1.1) (Ito vd., 2004; Yamashita vd., .2005; .Katayama vd., 2005; Okumura vd., 2005; Kitada vd., 2006; Heiss vd., 1997).

Çizelge 1.1. Dört parasporine ait sitotoksosite spektrumları

Hücre hattı	Orijin	Sitotoksosite			
		PS1Aa1	PS2Aa1	PS3Aa1	PS4Aa1
İnsan					
HeLa	Uterin servikal kanser	+++	-	-	-
Sawano	Endometriyal adenokarsinoma	-	++++	-	+++
TCS	Uterin servikal kanser	- ^b	-	-	+++
UtSMC	Normal uterin düz kas	-	++	-	-
MOLT-4	Akut lenfoblastik lösemi	++	++++	-	+++
HL-60	Promiyelolitik lösemi	+++	++++	++	+++
Jurkat	T-hücre lösemi	-	++++	-	-
T-cell	Normal T lenfosit	-	+++	-	-
HepG-2	Hepatoselular karsinoma	++	++++	++	++
HC	Normal hepatosit	-	-	-	-
A549	Akciğer adenokarsinoma	-	+++	-	-

Çizelge 1.1. Dört parasporine ait sitotoksosite spektrumları^(devam)

MRC5	Normal fetal akciğer	-	+	-	-
Caco-2	Kolon kanseri	-	+	-	+++
Maymun					
Vero	Böbrek (Yeşil Afrika maymunu)	-	NT	-	-
Cos-7	Böbrek (Yeşil Afrika maymunu), SV-40 transforme	-	NT	-	-
Kemirgen					
PC12	Feokromositoma (rat)	NT	NT	NT	++
N1H3T3	Embriyo (fare)	-	NT	-	-
CHO	Ovaryum (Çin hamster)	NT	NT	NT	-

Sitotoksosite oranları oldukça yüksek (++++), yüksek (+++), orta (++) , düşük (+), çok düşük/etkisiz (-), NT: test edilmedi, ^bMizuki vd. yayınlanmamış sonuç olarak gösterilmiştir. (Katayama vd., 2005; Ito vd., 2004., Kitada vd., 2006., Yamashita vd., 2005; Okumura vd., 2005)

1.2.7.3. Parasporinlerin kanser hücrelerine etki mekanizması

Parasporin-1Aa1: PS4Aa1, PS3Aa1 ve PS2Aa1 ile yapılan çalışmalarda duyarlı kanser hücrelerinde sitopatinin 1 saat içerisinde gerçekleştiği görülmüştür (Ito vd., 2004; Yamashita vd., 2005; Okumura vd., 2005). Fakat PS1Aa1 de, 8-10 saat sonrasında sitopati görülmüştür (Mizuki vd., 2000). PS proteinlerin yapısal ve genetik olarak farklı olmaları bu bilgilerle birleştirildiği zaman PS1Aa1'in etki mekanizmasının diğer PS proteinlerden farklı olduğu düşünülmektedir (Ohba vd. 2009). Bununla birlikte PS1Aa1'in insektisidal Cry proteinlerin aksine membranda por oluşumuna neden olmadığı iki bulgu ile kanıtlanmıştır. Bunlardan birincisi; PS1Aa1 uygulanan HeLa hücrelerinde propidyum iyodid penetrasyonu ve laktat hidrojenaz salınımı meydana gelmemesidir. İkincisi ise toksin uygulanan hücrelerin membran potansiyellerinde değişiklik olmamasıdır. PS1Aa1 uygulanan HeLa hücrelerinde DNA sentezinde ve hücre protein seviyesinde önemli bir düşüş gözlenmiştir. En önemlisi ise PS1Aa1 uygulandıktan 1-3 dk sonra gerçekleşen hücre içi Ca^{++} konsantrasyonundaki hızlı artıştır (Katayama vd., 2007). Bununla birlikte trimerik G-protein inhibitörü olan suramin, Ca^{++} 'in hücre içine alınımını ve PS1Aa1'in sitosidal aktivitesini baskılamaktadır. PS1Aa1'in HeLa hücrelerinde apoptozisi uyardığına dair güçlü bulgular vardır. İlk olarak PS1Aa1'in sitosidal aktivitesi sentetik kaspaz inhibitörleri ile baskılanmaktadır. İkinci olarak da PS1Aa1,

Hela hücrelerinde pro-kaspaz-3 ve poli (ADP-riboz) polimeraz gibi apoptozis ile ilgili proteinlerin degradasyonuna neden olmaktadır (Ohba vd., 2009).

Parasporin-2Aa1: PS2Aa1, PS1Aa1'in aksine duyarlı hücrelerin plazma membran geçirgenliğini artırır. Hücre dışı propidyum iyodid sitoplazmaya girerken, sitoplazmik laktat hidrojenazın çoğu toksin uygulanan HepG2 hücrelerinden dışarı sızar. Ayrıca PS2Aa1 mitokondri ve endoplazmik retikulum membranlarında por oluşturmaz. PS2Aa1'in sitotoksik aktivitesinin başlangıç basamağı toksinin duyarlı hücrelerin plazma membranlarının lipid tabakasında yer alan henüz tanımlanmayan reseptör proteine tutunmasıdır. Ardından plazma membranlarında oligomerler (<200 kDa) oluşturarak por oluşumuna neden olur ve hücre parçalanır. Oligomerizasyon membran proteinleri, çift katlı lipid tabaka ve kolesterol varlığında meydana gelir (Ohba vd., 2009). PS2Aa1 ve membranda oligomerizasyonla por oluşturarak hücreleri öldürme mekanizmasına sahip *Clostridium perfringens* epsilon toksini ile arasında önemli bir homoloji bulunmaktadır (Pepit vd., 1997).

Parasporin-3Aa1: PS3Aa1'in kanser hücrelerine etki mekanizması hakkında çok fazla bilgi bulunmamaktadır. PS3Aa1 tipik üç domainli bir Cry proteindir ve insektisidal Cry proteinlere de konformasyonel olarak benzelik göstermektedir. Bu benzerlikten dolayı PS3Aa1'in de insektisidal Cry proteinler gibi kanser hücrelerinin plazma membranlarında por oluşturdukları düşünülmektedir. Bu görüş PS3Aa1'in uygulandığı hedef hücrelerin membran geçirgenliklerinin artması ile desteklenmiştir (Yamashita vd., 2005).

Parasporin-4Aa1: Daha önce bahsedildiği gibi PS4 birçok yönden diğer parasporinlerden farklıdır. Bundan dolayı etki mekanizmasının da diğer PS proteinlerden farklı olduğu düşünülmektedir. PS4Aa1'in etki mekanizmasının anlaşılabilmesi için yeterli bilgi henüz bulunmamaktadır.

Parasporinler kanser hücrelerine karşı ayrıcalıklı sitosidal aktivitesi sayesinde antikanser ajanı olarak medikal kullanıma adaydır. Hastalara doğrudan uygulanması istenmeyen immünolojik cevaplara neden olabilir. Bu problemi çözmek için kanser hücrelerinde parasporine özgül hücre reseptörlerinin tanımlaması gerekmektedir. Bu sayede reseptörleri hedef alan 'magic bullet' ilaçlar yaratılabilir. Parasporal inklüzyonlar *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Clostridium* gibi birçok aerobik

anaerobik tür tarafından üretilmektedir. Dolayısıyla, önümüzdeki yıllarda yapılacak olan çalışmalar Bt'e ait olmayan yeni antikanser proteinlerin keşfini amaçlamaktadır.

Çizelge 1.2. Parasporin çeşitleri ve karakteristik özellikleri (Ohba vd., 2009)

	Parasporin-1	Parasporin-2	Parasporin-3	Parasporin-4
İsimlendirme	Cry31Aa1	Cry46Aa1	Cry41Aa1	Cry45Aa1
Gen uzunluğu (bp)	2169	1014	2475	828
3 domainli yapı	Gösterir	Göstermez	Gösterir	Göstermez
Proteaz ile aktivasyon	Var	Var	Var	Var
İşlenme şekli	N-terminal	N ve C-terminal	N ve C-terminal	C-terminal
Öncül (kDa)	81	37	88	34
Aktif form (kDa)	15+56	30	64	27
Etki mekanizması	Apoptozosi uyardığı düşünülmektedir	Por oluşumu	Por oluşumu	-

2. MALZEME VE YÖNTEM

2.1. Malzeme

2.1.1. *Bacillus thuringiensis* suşları

Tez çalışmasında çeşitli ortamlardan ve örneklerden (toprak, meyve, yaprak, depo tozları) izole edilmiş olan Bt suşları kullanılmıştır. Bu izolatlar 108T178 no'lu Tübitak projesi kapsamında Aydın ili ve çevresindeki incir bahçeleri ve incir depolarından toplanmıştır. Çalışmada kullanılan Bt referans suşu *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Bacillus thuringiensis Genetik Stok Center (Ohio, USA)'dan elde edilmiştir.

2.1.2. Besiyerleri

LB Broth (1L): 1L distile su içerisinde 10 g tripton, 5 g yeast extract, 10 g NaCl, 0.01 g mangan sülfat çözünür ve pH 6.8'e ayarlanır.

LB Agar (1L): 1L distile su içerisinde 10 g tripton, 5 g yeast extract, 10 g NaCl, 15 g agar agar çözünür ve pH 7.5'e ayarlanır.

Nütrient Broth (1L): 1L distile su içerisinde 13 g nütrient broth çözünür.

Nütrient agar (1L): 1L distile su içerisinde 13 g nütrient broth, 15 g agar agar çözünür.

2.1.3. Tampon ve Çözeltiler

2.1.3.1. DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler

% 25 süzkroz içeren lizozim solusyonu: İlk olarak 25 g süzkroz 100 ml 1X tris-EDTA tamponunda çözülerek stok % 25'lik süzkroz çözeltisi hazırlanır. Lizozim deney

esnasında taze olarak 30 mg/ml olmak üzere % 25'lik süktroz cözeltisinde cözölerek hazırlanır.

SDS solusyonu: 1L cözeltide % 3 SDS ve 0.2 N NaOH bulunmalıdır. 30 g SDS ve 8 g NaOH tartılarak bir miktar distile suda cözöldükten sonra son hacim 1 L'ye tamamlanır.

3M Sodyum asetat cözeltisi: 1 L distile su içerisinde 246.09 g sodyum asetat cözünür. pH 4.8'e ayarlanır.

Fenol: Kloroform (1:1) solusyonu: 1:1 oranında fenol ve kloroform karıştırılarak hazırlanır.

1XTris- EDTA buffer: 10 mM tris ve 1mM EDTA eklenerek hazırlanır.

TER: 1 ml 1XTE içerisinde 0.1 mg RNaz cözölür.

0.5 mg/ml EtBr içeren 7.5 M'lık amonyum asetat cözeltisi: Bir miktar distile su içerisinde 7.5 M (578.1 g) amonyum asetat cözünür. Cözelti steril edildikten sonra 500 mg EtBr eklenir ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlanır.

2.1.3.2. PCR da kullanılan tampon ve cözeltiler

PCR reaksiyonları 50 µl'lik reaksiyon karışımlarında gerçekleştirilmiştir. Her amplifikasyon için 5 µl DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı 50 µl'lik PCR reaksiyon karışımında; 10X reaksiyon buffer'dan 5 µl, 10 mM deoksinükleotid trifosfat (dNTP) karışımından 1 µl, ileri (forward) ve geri (reverse) primerlerin her birinden 10 µM'lık stoktan 1 µl, 25mM MgCl₂'den 3 µl , 5 U/µl taq DNA polimeraz'dan 0,5 µl ve 34 µl steril distile su bulunmaktadır.

Çizelge 2.1. Universal primerler, dizileri ve pcr ürünü büyüklüğü (İberra vd., 2003)

Kullanılan Primerler	Nükleotit Dizisi (5'-3')	PCR ürünü büyüklüğü (bp)
cyt1F	F: 5'-CCCCAATCAACAGCAAGGGTTATT-3'	477- 480
cyt 1R	R:5'-TGCAAACAGGACATTGTATGTGTAATT-3'	
cyt2F	F: 5'-ATTACAAATTGACAAATGGTATTCC-3'	355- 356
cyt2R	R: 5'-TTTCAACATCCACAGTAATTTCAAATGC-3'	

2.1.3.3. Protein izolasyonunda kullanılan çözeltiler

% 0,85'lik NaCl: 0.85 g NaCl 100 ml distile suda çözünür.

0.5 M NaCl: 29.25 g NaCl 1L distile suda çözünür.

1XTE: 10 mM tris ve 1mM EDTA eklenerek hazırlanır.

Fenilmetilsülfonilflorid (PMSF): 0.02 M stok çözelti (3.5 mg/ml) izopropanolde hazırlanarak -20 °C de saklanır.

0.1M NaOH: 0.5 M (20 g) 1L içerisinde çözülerek stok halinde hazırlanır.

Bradford Reagent: 50 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 ml etanol içerisinde çözünür. 100 ml H₃PO₄ ve 500 ml dH₂O eklenir. Filtreden geçirilerek dH₂O ile 1L'ye tamamlanır.

2.1.3.4. Protein izolasyonunda kullanılan çözeltiler

Monomer solusyonu: 30 g akrilamid, 0.8 g bisakrilamid 100 ml olacak şekilde distile suda çözünür. 0.22 µm'lik filtreden geçirilir.

4X Running jel tamponu(1.5 M Tris-Cl pH 8.8): 18.15 g Tris 75 ml distile suda çözünür. pH HCl ile 8.8'e ayarlanır ve distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

4X stacking jel tamponu (0.5 M Tris-Cl pH 6.8): 6 g Tris 80 ml distile suda çözünür. pH HCl ile 6.8'e ayarlanır ve distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

% 10'luk SDS: 10 g SDS 100 ml distile su içerisinde çözünür.

% 10'luk amonyum persülfat (APS): 0.1 g amonyum persülfat 1 ml distile suda çözünür. Kullanımdan hemen önce hazırlanır.

TEMED (tetra metil etilen diamin): Ticari olarak satın alınır ve +4 °C de saklanır.

Tank tamponu (g/L): 3.02 g Tris, 14.41 g glisin, 1g SDS dH₂O'da çözünerek 1 L'ye tamamlanır.

% 5'lik asetik asit çözeltisi: 5 ml asetik asit dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanır.

Jel boyası: 0.25 g Coomassie Brilliant R-250, 45 ml metanol, 45 ml dH₂O, 10 ml glasiyal asetik asit kullanılarak hacim 100 ml'ye tamamlanır.

Destaining çözeltisi: 10 ml asetik asit, 25 ml metanol, 65 ml dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanır.

SDS-PAGE yükleme tamponu: 0.75 M süktroz , 0.15 M Tris- Cl pH 8.8, 3.75 mM EDTA, % 0.075 bromofenolblue, % 2.5 SDS, 7.4 mM DTT

2.1.3.5. Kullanılan hücre hatları

Bu çalışmada, 6 farklı kanser hücre hattı ve bir normal hücre hattı kullanılmıştır; DU-145 (prostat kanseri), PC-3 (prostat kanseri), A-549 (akciğer kanseri), CCC-221 (kolon kanseri), MCF-7 (meme kanseri), K-562 (kronik miyeloid lösemi hücre hattı) ve BEAS-2B (sağlıklı epitel hücresi). Hücre hatları Doç. Dr. Yusuf Baran'dan (İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü) temin edilmiştir. Hücreler besi ortamında, 37°C'de %5 CO₂, %95 hava içeren nemlendirilmiş inkübatörde kültüre alınmışlardır.

2.1.3.6. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan çözeltiler

PBS (Phosphate buffered saline) : 0.34 g KH₂PO₄, 1.58 g K₂HPO₄, 8g NaCl son hacim 1 L olacak şekilde dH₂O'da çözünür ve pH 7.4'e ayarlanır.

% 1'lik Trypan blue: % 1'lik stok halinde hazırlamak için 100 ml dH₂O'ya 1 g trypan blue eklenerek çözünür. Hazırlanan çözelti 0.22 µm por çapında filtrelerle sterilize edilir.

Fetal Bovin serum (FBS): İlk kullanımdan önce 56 °C'de 1 saat ısı inaktivasyonu yapılır. Daha sonrasında -20 °C'de saklanır.

Penisilin-streptomisin antibiyotik: 10,000 µg/ml stok halindedir. Kullanılan antibiyotik konsantrasyonu 100 µg/ml olacak şekilde stoktan eklenir.

RPMI 1640- Medyum: Ticari olarak satın alınır ve +4 °C'de saklanır.

Trypsin % 0.25 w/v: Ticari olarak satın alınır ve -20 °C'de saklanır.

MTT [3-4,5- dimetil- 2 –tiazolil)- 2,5- difenil- 2H tetrazolium bromid]: PBS içerisinde çözünerek 5 mg/ml hazırlanır. 0.22 µm por çapında filtreden geçirilerek sterilize edilir.

Dimetil sülfoksit (DMSO): Ticari olarak satın alınır ve oda sıcaklığında saklanır.

2.2. Yöntem

2.2.1. DNA izolasyonu ve cyt gen profillerinin belirlenmesi

2.2.1.1. DNA izolasyonu

Kaynatılarak DNA hazırlanması: Bakteriyel kültürler nutrient agarda, 37 °C de bir gece büyütülür. Bir öze dolusu hücre steril distile suya karıştırılır. Elde edilen karışım -80 °C de 20 dakika dondurulur. Ardından kaynayan suda 10 dakika bekletilir. Daha sonra oluşan lizat 10000 rpm de 10 saniye santrifüj edilir. Pellet uzaklaştırılır. Elde edilen süpernatantdan 15 µl PCR analizlerinde DNA kalıbı olarak kullanılır. (Hansen ve Hendriksen, 2001)

Fenol ekstraksiyonu ve etanol çöktürmesiyle plazmit DNA hazırlanması: Bakteriyel kültürler nutrient agarda, 37 °C de bir gece büyütülür. Daha sonra hücreler toplanır ve 1 ml steril suda çözünür. Bakteri pelletlerini elde etmek için örnekler 7000 rpm de 10 dakika santrifüj edilir. Ardından süpernatant uzaklaştırılır ve pellet 200 µl lizozim solusyonunda çözüldükten sonra 37 °C 15 dakika inkübe edilir. Liziz işlemi tamamlandıktan sonra 400 µl alkalın SDS solusyonu eklenerek oda sıcaklığında 7 dakika inkübe edilir. Bu adımdan sonra 300 µl soğuk 3M sodyum asetat (pH 4.8) eklenir. Solusyon hızlıca karıştırılır ve 4°C de 8000 rpm de 20 dakika santrifüjlenir. Süpernatant yeni bir ependorf tüpe alınır ve üzerine 650 µl izopropanol eklenerek iyice karıştırılır. 4°C de 8000 rpm de 20 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant uzaklaştırılır ve pellet 320 µl distile su içerisinde karıştırılır. Solüsyon içerisine 0.5 mg/ml etidium bromid içeren 200 µl 7.5 M amonyum asetat eklenerek karıştırılır. Daha sonra 350 µl fenol/kloroform solusyonu eklenir, iyice vortekslenir ve oda sıcaklığında 10000 rpm de 10 dakika santrifüjlenir. Sulu faz yeni bir ependorf tüpe aktarılır. DNA 1 ml etanol eklenerek çöktürülür ve 4 °C de 8000 rpm de 20 dakika santrifüjlenir. Daha sonra pellet oda sıcaklığında 500 µl % 70'lik etanol ile yıkanır ve 10000 rpm de 5 dakika santrifüjlenir. Pellet oda sıcaklığında kurutulur ve 40 µl TER (TE, pH 7.8 ve RNaz) solusyonu içerisinde çözülür ve 37 °C de 60 dakika inkübe edilir. Son olarak plazmit DNA'sı 90 V da iki saat elektroforez edilerek bir jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenir. Plazmit DNA'sından yaklaşık 500 ng DNA PCR analizinde kalıp DNA olarak kullanılır (O'Sullivan and Haenhammer, 1993).

2.2.1.2 *cyt* gen profillerinin belirlenmesi

Kullanılan izolatların *cyt* gen içerikleri polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile belirlenmiştir. Kristal protein içeren tüm izolatların *cyt1* ve *cyt2* gen içeriklerinin taranması iki çift evrensel primer kullanılarak yapılmıştır (İberra et al. 2003). PCR reaksiyonları 50 µl'lik reaksiyon karışımlarında gerçekleştirilmiştir. Her amplifikasyon için 5 µl DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı 50 µl'lik PCR reaksiyon karışımında; 10X reaksiyon buffer'dan 5 µl, 10 mM deoksिनुकлеотид trifosfat (dNTP) karışımından 1 µl, ileri (forward) ve geri (reverse) primerlerin her birinden 10 µM'lık stoktan 1 µl, 25mM MgCl₂'den 3 µl, 5 U/µl taq DNA polimeraz'dan 0,5 µl ve 34 µl steril distile su bulunmaktadır. Amplifikasyonlar Advanced Primus 96 termal döngü cihazında gerçekleştirilmiştir. *cyt* genleri için ilk basamakta 95 °C de 2 dakika ön denaturasyonun ardından 95 °C de 1 dakika denaturasyon, *cyt1* için 52 °C, *cyt2* için 50 °C de 1 dakika primer bağlanması (annealing) ve 72 °C de 1 dakika uzama (extention) uygulanmıştır. *cyt* gen fragmentlerinin çoğaltılması için bu aşamalar 35 döngüde gerçekleştirilmiştir. Son olarak 72 °C de 5 dakika zincirler uzamaya bırakılmıştır. Elde edilen PCR ürünlerinden 10 µl, etidium bromid içeren % 1'lik agaroz jelde elektroforez edilmiştir. Bir jel dökümantasyon sistemi (Vilber Lourmat) kullanılarak görüntülenmiştir. Moleküler marker olarak fermentas 1 kb DNA Ladder kullanılmıştır.

2.2.2. Parasporal inklüzyon proteinlerin hazırlanması ve aktivasyonu

2.2.2.1 *Parasporal inklüzyon proteinlerin hazırlanması, solubilizasyonu*

cyt geni içermeyen izolatlardan kristal protein eldesi için BT izolatları, 500 ml'lik erlenlerde 100 ml NB besiyerinde 30°C'de 150 rpm'de 3-5 gün büyütülmüştür. Spor-kristal karışımı +4°C de, 10,000 g de 10 dk santrifüjlenmiştir. Elde edilen pellet %0,85'lik (30 ml) NaCl ile 2 defa yıkanmıştır. +4°C'de, 10,000 g de 10 dk santrifüjleme ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. İkinci yıkama sonrası elde edilen pellet 0,5 M (30 ml) NaCl'de çözündürülerek +4°C'de, 10,000 g de 10 dk santrifüjlenmiştir. Elde edilen pellet (30 ml) soğuk 1XTE ile çözülmüştür. Son konsantrasyon 0,5 mM olacak şekilde PMSF eklenmiştir. +4 °C'de, 10,000 g de 10 dk santrifüjlenmiştir. Pellet 2-5 ml distile su ile çözülmüştür.

Solubilizasyon için son konsantrasyon 0,1 M olacak şekilde NaOH eklenmiştir. Solubilizasyonun gerçekleşmesi için 37 °C’de sıcak su banyosunda 30 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası son konsantrasyon 1 mM olacak şekilde PMSF eklenmiştir. +4 °C’de, 10,000 g de 10 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası kristal protein içeren supernatant ayrılmıştır. Protein konsantrasyonu belirlendikten sonra -20 °C de muhafaza edilmiştir.

2.2.2.2 Bradford yöntemi

Protein konsantrasyonu Bradford yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Konsantrasyonu 0, 5, 10, 15, 20, 40 µl olan standart BSA (1 mg/ml) çözeltisi içerisine 2’şer ml olacak şekilde boya eklenerek 595 nm’de absorbansı ölçülmüştür. Bu değerlere göre standart eğri grafiği hazırlanmıştır. İzolatların protein örneklerinde ise 10 µl protein üzerine 2 ml olacak şekilde bradford boyası ilave edilip karıştırıldıktan sonra yarım saat beklenmiş ve 595 nm’de absorbansı ölçülmüştür. Konsantrasyonu bilinmeyen örneklerin konsantrasyonu, konsantrasyonu bilinen BSA örneklerinin verdiği absorbans değerleriyle karşılaştırılarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlarla hücre kültürü çalışmalarında kullanılacak protein miktarı belirlenmiş ve SDS- PAGE çalışmalarında gerekli miktarda proteinin jelde yürütülmesi sağlanmıştır.

2.2.2.3. Solubilize edilmiş Parasporal kristal proteinlerin proteazlarla muamelesi

Yukarıda belirtildiği gibi saflaştırılan ve solubilize edilen parasporal proteinlerin konsantrasyonları Bradford yöntemi ile belirlendikten sonra parasporal proteinlerin son konsantrasyonları 1 mg/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Solubilize proteinler (son konsantrasyon 1 mg/ml) proteinaz K (son konsantrasyon 10 µg/ml ve 350 µg/ml) ve tripsin (son konsantrasyon 1 mg/ml, 5mg/ml, 10 mg/ml) ile muamele edilmiştir. Proteolitik kesimin gerçekleşmesi için 37 °C’de 30 dakika inkübe edildikten sonra proteolitik işlemi durdurmak için 1 mM PMSF eklenmiştir. Örnekler 0,45 µm çapında membran filtrelerden geçirildikten sonra hücre kültürü çalışmalarında ve SDS- PAGE çalışmalarında kullanılmıştır.

2.2.2. SDS- PAGE jel elektroforezi

SDS- PAGE elektroforezi % 10'luk ayırma jeli ve yükleme jeli kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ayırma jeli; 6.6 ml monomer solusyonu (% 30'luk), 5 ml 4X Running jel tamponu, 0.2 ml % 10'luk SDS, 8,06 ml distile su, 100 µl % 10'luk APS ve 7 µl Temed eklenerek hazırlanmıştır. Bir erlen içerisinde hazırlanan jel karıştırıldıktan sonra pastör pipetiyle iki cam arasından dökülmüştür. Üzerine yüzeyin düz olması için % 50'lik bütanol ilave edilmiştir. Jel polimerizasyonu gerçekleştikten sonra bütanol distile su ile temizlenerek uzaklaştırılmış ve yükleme jelinin hazırlığına geçilmiştir. Yükleme jeli; 1.33 ml monomer solusyonu (% 30'luk), 2.5 ml 4X yükleme jel tamponu, 0.1 ml % 10'luk SDS, 6 ml distile su, 50 µl % 10'luk APS ve 5 µl Temed eklenerek hazırlanmıştır. Bu karışım ayırma jelinin üzerine dökülüp hızlıca taraklar yerleştirilmiş ve polimerize olması için beklenmiştir. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra jel tablasıyla elektroforez tankına yerleştirilip, tank için hazırlanan tampon ilave edildikten sonra taraklar çıkarılmıştır. Kristal protein karşımının yaklaşık 10 µl'si eşit miktardaki SDS- PAGE yükleme tamponuyla karıştırılıp 10 dakika kaynatılmıştır. Protein örnekleri kuyucuklara yüklenip 150 V'da yaklaşık 2 saat yürütülmüştür. Elektroforez işleminden sonra % 5 asetik asit çözeltisi ile 15 dakika tespit işlemi yapılmıştır. Tespit işleminden sonra jeller boya çözeltisi içerisine alınıp, 1 gece orbital çalkalayıcıda bekletilmiştir. Boyama işleminin ardından jel zeminindeki boyanın giderilmesi için destaining solusyonu kullanılmıştır. Son olarak jel transilluminatörde beyaz ışık altında görüntülenmiştir.

2.2.3. Hücre hatları ve kültür koşulları

Bu çalışmada, 6 farklı kanser hücre hattı ve bir normal hücre hattı kullanılmıştır; DU-145 (prostat kanseri), PC-3 (prostat kanseri), A-549 (akciğer kanseri), CCC-221 (kolon kanseri), MCF-7 (meme kanseri), K-562 (kronik myeloid lösemi hücre hattı) ve BEAS-2B (sağlıklı epitel hücresi). Tüm hücreler % 10 fetal bovin serum ve 100 µg/ml penisilin/streptomisin içeren RPMI 1640 besi ortamında kültüre alınmıştır. Hücreler besi ortamında, 37°C'de, %5 CO₂, %95 hava içeren nemlendirilmiş inkübatörde kültüre alınmışlardır.

2.2.3.1. Hücre canlılığının belirlenmesi

Hücre kültür kaplarına (flask) ekimleri yapılan yapışkan (adherent) hücre hatları DU-145, PC-3, A-549, CCC-221, MCF-7 ve BEAS-2B hücreleri flask yüzeyini % 85 oranında kapladıktan sonra tripsinizasyon işlemine maruz bırakılmışlardır. Bu amaçla flask içerisindeki besi ortamı boşaltılıp, flask yüzeyi PBS tamponu ile hafif çalkalayıp dökülerek iki defa yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Flask yüzeyinde tutunmuş halde bulunan hücreleri kaldırmak amacıyla tripsin eklenerek tüm yüzeye yayılmış ve 2-5 dakika 37°C'de %5 CO₂'li ve % 98 nemli inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası flask yüzeyinden ayrılan hücrelerin üzerine besi ortamı eklenip çözündürülerek falkon tüplere alınmıştır. Adherent olmayan K-562 hücre hattı flask yüzeyine tutunmayıp besi ortamı içerisinde hareket halinde bulunduğundan dolayı tripsinizasyon işlemine tabi tutulmamış, doğrudan falkon tüpe alınarak hücrelerin toplanması için santrifüjlenmiştir. Tüm hücre hatları 20- 25 °C'de 800 rpm'de 6 dakika santrifüjlendikten sonra elde edilen pellet PBS ile iki defa yıkanmıştır. 20- 25 °C'de 800 rpm'de 6 dakika santrifüjlendikten sonra pellet besi ortamı içerisinde çözündürülerek tekrar süspansiyon haline getirilmiştir. 50 µl hücre süspansiyonu, 50 µl *trypan blue* solüsyonuyla karıştırılıp, canlı ve ölü hücreler ışık mikroskobu altında hemositometre yardımıyla sayılmıştır. Ölü hücreler, hücre zarında meydana gelen hasardan dolayı mavi boyayı hücre içine alıp mavi görüntülenmiştir. Hücre canlılığı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Canlı Hücre Yüzdesi} = \left[\frac{\text{canlı hücrelerin sayısı}}{\text{toplam hücre sayısı (canlı+ ölü)}} \right] \times 100$$

2.2.3.2. Sitotoksite deneyi

Hücreler 2×10⁴ hücre /kuyu olacak şekilde, 96-kuyulu hücre kültürü kaplarında her kuyuya ilgili hücre hattına ait 90 µl hücre süspansiyonu eklenerek 16- 20 saat 37°C'de, %5 CO₂'li ve %98 nemli inkübatörde inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon sonrası aktif ve filtreden geçirilmiş haldeki parasporal kristal protein örneği 10 µl olarak her bir kuyuya eklenmiştir ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası sitopatik etki inverted mikroskobu altında incelenmiştir. Sitotoksik aktivite miktarı MTT deneyi ile belirlenmiştir.

2.2.3.3. MTT deneyi

Test edilen *Bt* suşlarının hücre aktivasyonuna veya diğer bir deyişle hücre bölünmesine yol açıp açmadığı MTT yöntemi ile incelenmiştir. Bu yöntem, sarı renkli suda çözünebilir substratın [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid] metabolik olarak aktif hücrelerin mitokondriyal enzimleri tarafından suda çözünmeyen mor renkli formazan kristallerine dönüşmesine dayanmaktadır. 24 saatlik inkübasyon sonrası 96 kuyulu hücre kültürü kaplarında bulunan besi ortamı boşaltılarak yerine 100 µl yeni besi ortamı eklenmiştir. Adherent olmayan K-562 hücrelerinin bulunduğu hücre kültürü kapları bu hücrelerin toplanması için 20- 25 °C’de, 800 rpm’de, 6 dakik santifüjlendikten sonra eski besi ortamı boşaltılarak yeni besi ortamı eklenmiştir. Ardından MTT stok solüsyonu (5mg/ml) her bir kuyuya 1:10 oranında eklenmiştir. 4 saat 37°C’de, %5 CO₂’li ve %98 nemli inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında 100µl DMSO eklenmiş ve 150 rpm’lik orbital çalkalayıcıda 5 dakika karışması sağlanmıştır. Optik densite (absorbans) 540nm’de (690nm referans dalga boyu) mikro plaka okuyucu (ELİSA reader) ile belirlenmiştir.

2.2.3.4. MTT deneylerinin değerlendirilmesi

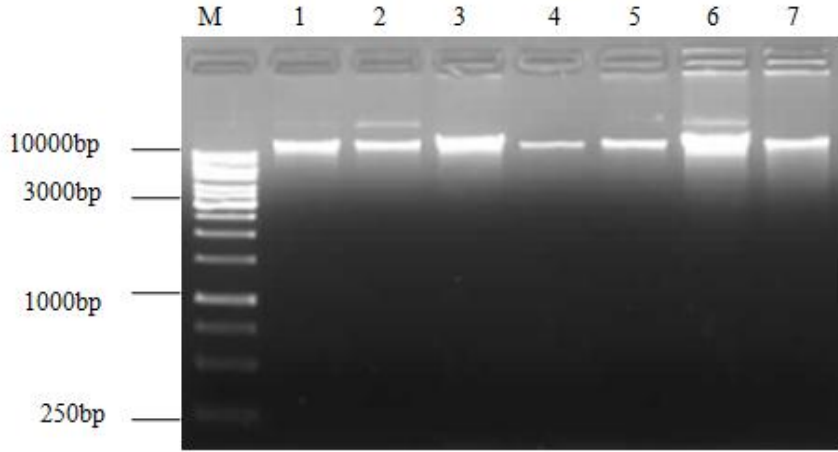
Sitotoksosite deneylerinde, uygulamalar arasında karşılaştırma yapılmadan önce, normalite ve varyans homojenitesini belirlemek için her bir kanser hattı için ayrı ayrı sırasıyla, Shapiro-Wilk ve Bartlett testleri uygulanmıştır. Veri setlerinin parametrik bir teste uygun olduğu belirlendikten sonra, uygulamalar arasındaki farklılık tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ile sınanmıştır. Uygulamalar arası farklılık bulunduğu durumlarda, çoklu karşılaştırmalar için Tukey HSD (Tukey’s honestly significant difference test) ve Dunnett testleri kullanılmıştır. Yapılan tüm istatistiksel analizlerde %95 güven aralığı kullanılmış ve önem değerleri $P = 0.05$ anlamlılık derecesinde belirlenmiştir. Analizlerin gerçekleştirilmesinde Statistica 7 programı kullanılmıştır.

3. BULGULAR VE İRDELEME

3.1. *Bacillus thuringiensis* Suşlarının *cyt* Gen İçeriklerinin Belirlenmesi

Tez çalışmasında koleksiyonumuzda bulunan 120 Bt izolatu kullanılmıştır. Bu izolatlar 108T178 no'lu TÜBİTAK projesi kapsamında Aydın ili ve buraya bağlı dokuz ilçede bulunan incir bahçeleri ve incir depolarından toplanan ve *cry* gen içeriği bakımından karakterize edilen izolatlardır. Bu izolatların 101'i toprak, 19'u ise meyve-yapraktan elde edilen izolatlardır (Çizelge 3.1'de kullanılan izolatların listesi ve bu tez çalışmasında belirlenen *cyt* gen içerikleri verilmiştir).

Pek çok Bt plazmit denen ve büyüklüğü 2-200 kb arasında değişen ekstrakromozomal elementler içerirler. Literatürde, bazı *cry* genlerinin kromozomlarda taşındığı bilinmesine rağmen, çoğunlukla plazmitler üzerinde taşındığı kaydedilmiştir. Benzer şekilde *cyt* genlerinin de plazmitler üzerinde taşındığı bilinmektedir (Schnepf vd., 1998). Dolayısıyla, bu çalışmada kullanılan tüm izolatların plazmit izolasyonları yapılarak *cyt* genlerinin PCR analizinde kalıp DNA olarak kullanılmıştır Şekil 3.1'de de bazı izolatlardan elde edilen plazmit profilleri gösterilmektedir. İzolatların çoğunda önceki çalışmalarda da gösterildiği gibi yaklaşık 15 kb büyüklüğünde koyu bir DNA bandı elde edilmiştir (Apaydın vd., 2005). Buna ek olarak bazı izolatların ilave plazmit bantları içerdiği görülmüştür (Şekil 3.1, sütun 2 ve sütun 6).

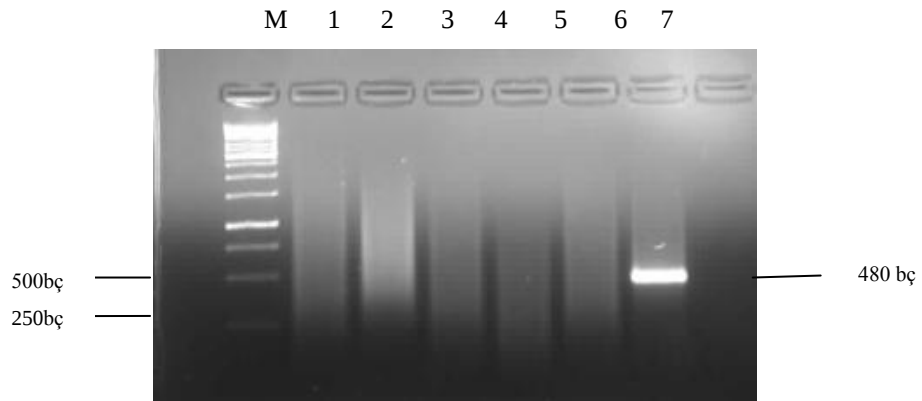


Şekil 3.1. Bazı izolatların plazmit DNA'larının agaroz jel görüntüsü
M: Marker; 1. sütun: 29T, 2. sütun:30T, 3. sütun:31T, 4. sütun:32T, 5. sütun:36T, 6. sütun:3T, 7. sütun:33T

Bu çalışmada kullanılan Bt izolatlarının *cyt* gen içerikleri evrensel *cyt1* ve *cyt2* primerleri (Çizelge2.1) kullanılarak PCR analizi ile belirlenmiştir.

3.1.1. *Bacillus thuringiensis* izolatlarının *cyt1* analizi

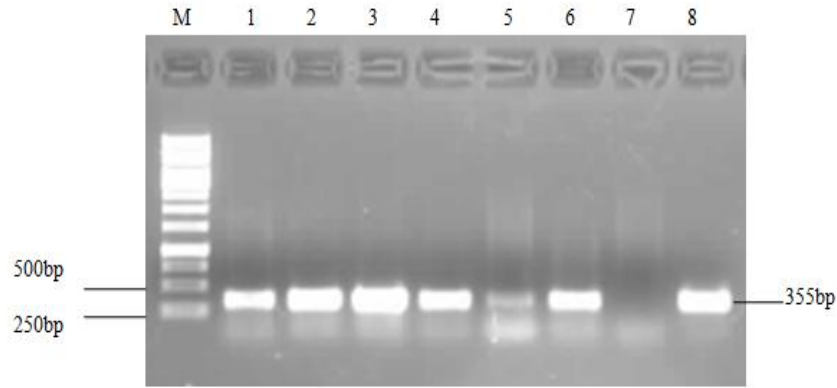
cyt1 gen analizi yapıldığında Bt izolatlarının hiçbirinde *cyt1* geni belirlenememiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*'in 477-480 bp büyüklüğünde beklenen uzunlukta DNA bandı içerdiği görülmüştür (Şekil3.2, sütun 6). Ancak pozitif kontrol dışında diğer izolatlarda *cyt1* genine ait DNA bandı görülmemiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Bazı izolatların *cyt1* gen içerikleri
M: Marker, 1. sütun: 32T, 2. sütun: 33T, 3. sütun: 36T, 4. sütun:71T, 5. sütun: 72T, 6. sütun: Pozitif kontrol (*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*), 7. sütun: Negatif kontrol

3.1.2. *Bacillus thuringiensis* izolatlarının *cyt2* analizi

cyt2 gen analizi yapıldığında Bt izolatlarının 19'unda *cyt2* geni belirlenmiştir. PCR ürünleri % 1'lik agaroz jelde yürütüldüğünde 355-356 bp büyüklüğünde beklenen DNA bantları görülmüştür (Şekil 3.3). Aynı sonuçlar pozitif kontrol olarak kullanılan *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*'de de görülmüştür.



Şekil 3.3. Bazı Bt izolatlarının *cyt2* gen içerikleri

M: Marker, 1. sütun: 29T, 2. sütun:30T, 3. sütun:32T, 4. sütun: 31T, 5. sütun:36T, 6. sütun: 33T, 7. sütun: 3T, 8. sütun: PK (*Bacillus thuringiensis* var *israelensis*)

Bu çalışmada kullanılan Bt izolatlarının *cyt* içerikleri ve aynı izolatların önceki çalışmalarda belirlenen *cry* gen içerikleri çizelge 3.1'de verilmiştir. Böylece Cry protein içeren *cyt* genlerini içermeyen izolatların seçimi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan Bt izolatları ve kristal oluşumu

İzolat No	<i>cry</i> gen içeriği	<i>cyt</i> gen içeriği	İzolat No	<i>cry</i> gen içeriği	<i>cyt</i> gen içeriği	İzolat No	<i>cry</i> gen içeriği	<i>cyt</i> gen içeriği
1T	<i>cry1</i>		36T	<i>cry1</i> , <i>cry2</i>	<i>cyt2</i>	72T	<i>cry1</i>	
2T	<i>cry1</i>		37T			73T	<i>cry1</i>	
3T	<i>cry3</i>		38T	<i>cry1</i> , <i>cry2</i>	<i>cyt2</i>	74T	<i>cry1</i> , <i>cry2</i>	
4T	<i>cry1</i> , <i>cry2</i> , <i>cry3</i> , <i>cry9</i>	<i>cyt2</i>	39T		<i>cyt2</i>	75T		
5T	<i>cry1</i> , <i>cry2</i>	<i>cyt2</i>	40T	<i>cry1</i> , <i>cry9</i>		77T		
6T	<i>cry1</i> , <i>cry2</i> , <i>cry9</i>		41T	<i>cry1</i>		79T		
7T	<i>cry1</i>		42T		<i>cyt2</i>	80T		
8T	<i>cry1</i> , <i>cry2</i>	<i>cyt2</i>	43T			81T		
9T	<i>cry1</i> , <i>cry2</i>	<i>cyt2</i>	44T	<i>cry1</i> , <i>cry2</i>		106T	<i>cry1</i> , <i>cry2</i> , <i>cry3</i>	

Çizelge 3.1. Kullanılan Bt izolatları ve kristal oluşumu^(devamı)

İzolat No	cry gen içeriği	cyt gen içeriği	İzolat No	cry gen içeriği	cyt gen içeriği	İzolat No	cry gen içeriği	cyt gen içeriği
10T	<i>cry1, cry2, cry9</i>		45T			107T	<i>cry1, cry2, cry3</i>	
11T	<i>cry1, cry2</i>		46T	<i>cry1, cry2, cry4</i>		108T	<i>cry1, cry2</i>	
12T	<i>cry1</i>		47T	<i>cry1</i>		109T	<i>cry1, cry2</i>	
13T	<i>cry1, cry2</i>		48T	<i>cry1, cry9</i>	<i>cyt2</i>	111T	<i>cry1</i>	
14T			49T	<i>cry3</i>		113T	<i>cry1</i>	
15T		<i>cyt2</i>	50T	<i>cry1</i>		114T		
16T		<i>cyt2</i>	51T			115T	<i>cry1, cry2</i>	
17T			52T	<i>cry1</i>		116T		
18T	<i>cry1</i>		53T			117T	<i>cry2</i>	
19T	<i>cry1, cry2</i>	<i>cyt2</i>	54T	<i>cry1, cry9</i>		118T		
20T	<i>cry1, cry2</i>		55T	<i>cry1</i>		119T	<i>cry1, cry2</i>	
21T	<i>cry1</i>		56T			120T	<i>cry1, cry4</i>	
22T			57T			124T		
23T	<i>cry1, cry2, cry3</i>		58T			138T	<i>cry1</i>	
24T	<i>cry1, cry2</i>	<i>cyt2</i>	59T			139T	<i>cry1</i>	
25T		<i>cyt2</i>	60T	<i>cry1</i>		140T	<i>cry1</i>	
26T	<i>cry1</i>		61T	<i>cry1, cry2</i>		141T	<i>cry1</i>	
28T			63T	<i>cry1</i>		142T		
29T	<i>cry2</i>	<i>cyt2</i>	64T	<i>cry1</i>		143T		
30T		<i>cyt2</i>	65T	<i>cry1</i>		144T		
31T		<i>cyt2</i>	66T	<i>cry1</i>		145T	<i>cry1, cry3</i>	
32T		<i>cyt2</i>	67T	<i>cry1</i>		146T		
33T	<i>cry1, cry2, cry9</i>	<i>cyt2</i>	68T			153T	<i>cry1, cry2, cry3</i>	
34T	<i>cry1, cry2</i>		69T	<i>cry1, cry2, cry3, cry4</i>		169T	<i>cry3</i>	
35T			70T			1MY	<i>cry1</i>	
2MY	<i>cry1</i>		3MY	<i>cry1</i>		4MY	<i>cry1</i>	
5MY	<i>cry1</i>		6MY	<i>cry1</i>		7MY	<i>cry1</i>	
9MY	<i>cry1</i>		10MY	<i>cry1</i>		12MY	<i>cry1</i>	
13MY	<i>cry1, cry2</i>		19MY	<i>cry1, cry2</i>		20MY	<i>cry1, cry2</i>	
42MY	<i>cry1, cry2</i>		43MY	<i>cry1, cry2</i>		44MY	<i>cry1, cry2</i>	

Çizelge 3.1. Kullanılan Bt izolatları ve kristal oluşumu^(devamı)

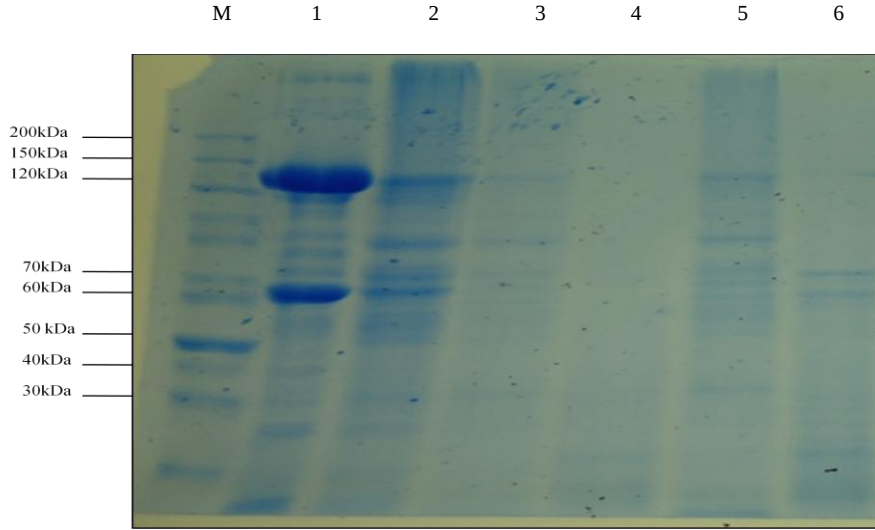
İzolat No	<i>cry</i> gen içeriği	<i>cyt</i> gen içeriği	İzolat No	<i>cry</i> gen içeriği	<i>cyt</i> gen içeriği	İzolat No	<i>cry</i> gen içeriği	<i>cyt</i> gen içeriği
45MY	<i>cry1</i> , <i>cry2</i>		48MY	<i>cry1</i> , <i>cry3</i> , <i>cry4</i>		51MY	<i>cry1</i> , <i>cry2</i>	
Bt var <i>israelensis</i>	<i>cry4A</i> , <i>cry4B</i> , <i>cry11A</i>	<i>cyt1</i> , <i>cyt2</i>						

Yapılan bu çalışmada *cyt1* geni için tüm izolatlarda negatif sonuç elde edilirken, izolatların yaklaşık % 15'i *cyt2* geni içermektedir (çizelge 3.1). Literatürde yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar bulunmaktadır. Örneğin, Bravo vd. (1998) tarafından Meksika Bt koleksiyonunun *cry* gen içeriklerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada, 496 suş *cry* ve *cyt* gen içerikleri bakımından taranmıştır. PCR analizleri sonucunda en sık rastlanan genin % 49.5 (246 suş) bulunma oranı ile *cry1* olduğu belirlenmiştir. İkinci sıklıkta bulunan gen ise % 21.7 bulunma oranı ile *cry3*'tür. Farklı *cyt* primerleri (gral-cyt) kullanılarak gerçekleştirilen PCR analizleri sonucunda tüm izolatların % 7,9'unda, yani yalnızca 38 suшта *cry11* ve *cyt* genleri birlikte bulunmuştur. Bu suşların bazılarının *Culex quinquefasciatus* larvalarına karşı toksik olduğu belirlenmiştir. Buna ilave olarak, Arrieta vd. (2004) tarafından Costa Rica kahve agroekosistemlerinden izole edilen 105 Bt suşu kullanılarak gerçekleştirilen PCR analizleri sonucunda; 82 suşun *cry2*, 45 suşun *cry1*, 29 suşun *cry3*- *cry7*, yalnızca bir suşun *cry11* içerdiği belirlenirken *cyt*, *cry5*, *cry12* ve *cry14* genlerine ait hiçbir PCR ürünü elde edilememiştir. Wu vd. (2008) Çin topraklarından elde edilen Bt izolatlarının *cyt* gen içerikleri ve biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla yaptıkları çalışmalarda 143 doğal suşun % 6,9'un da yani 9 suшта *cyt* genlerine rastlanılmıştır. Bu dokuz izolatın 7'si *cyt1* ve *cyt2* genlerini birlikte bulundururken, diğer iki suştan biri *cyt1* diğeri *cyt2* genini içermektedir. Ayrıca *cyt* geni içeren izolatlardan dördü *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*'e aittir. Aboussaid vd. (2011) tarafından Morocco argan topraklarından izole edilen Bt suşlarının karakterizasyonu ve insektisidal aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada 58 doğal suş *cry* ve *cyt* gen içerikleri bakımından taranmıştır. PCR analizleri sonucunda *cry7/8*'in % 25,53 oranında en sık, *cry9A*'nın % 14,89, *cry11*'in % 8,51 ve *cry4*'ün % 4,25 görüldüğü belirlenirken, *cyt* genleri %2,12 olmak üzere en az sıklıkta bulunan genler olarak belirlenmiştir.

3.2. Proteolitik İşlemler ve Toksin Aktivasyonu

Kristal proteinler pro-proteinler olup aktif hale gelebilmeleri için çeşitli enzimlerle etkileşimleri gerekmektedir (Hofmann vd., 1988). Literatürdeki çalışmalarda, δ -endotoksinlerin duyarlı böceklerin barsaklarında alkali koşullarda proteolitik kesimler sonucunda aktive edildikleri gösterilmiştir (Gill vd., 1992; Knowless, 1994). Benzer şekilde insektisit olmayan kristal proteinlerin de aktive edilmesi için proteazlara ihtiyaç olduğu belirlenmiştir. Bazı insektisidal olmayan kristal proteinlerin kanserli hücreleri öldürme yeteneğinde olduğunun kanıtlandığı Mizuki ve arkadaşları (1999) tarafından yapılan çalışmada kristal proteinlerin aktive edilmesi amacıyla proteinaz K (son konsantrasyon 10 μ g/ml) kullanılmıştır. Bununla birlikte, alkali ortamda çözülen öncül proteinlerin tripsin, kimotripsin ve proteinaz K gibi proteazlarla kesime uğratıldıktan sonra aktive edildikleri ve hücre hatlarına uygulandıkları çalışmalar da literatürde mevcuttur (Mizuki vd., 2000).

Dolayısıyla bu çalışmada Bt izolatları arasında *cyt1* ve *cyt2* geni içermeyen, daha önceki çalışmada (TÜBİTAK 107T178 no'lu proje) incir zararlılarına karşı biyoaktivite göstermeyen izolatlardan elde edilen Cry toksinleri proteinaz K ve tripsin gibi proteazlarla muamele edildi. Çeşitli izolatlara ait saflaştırılan parasporal proteinler alkali ortamda çözüldükten sonra, proteinaz K veya tripsin olmak üzere iki farklı proteaz ile muamele edilmiştir. Son konsantrasyonu 1mg/ml olan sekiz farklı solubilize edilmiş parasporal protein son konsantrasyonu 1mg/ml olan tripsin veya 10 μ g/ml olan proteinaz K'ya maruz bırakılmıştır. Bu şekilde aktif hale getirilen parasporal kristal proteinlerin üzerindeki etkileri incelenmiştir. Tez çalışması içerisinde proteinaz K ile muamele edilmiş parasporal proteinler kısaca PK, tripsin ile muamele edilmiş parasporal proteinler ise kısaca Tr ile gösterilmiştir.



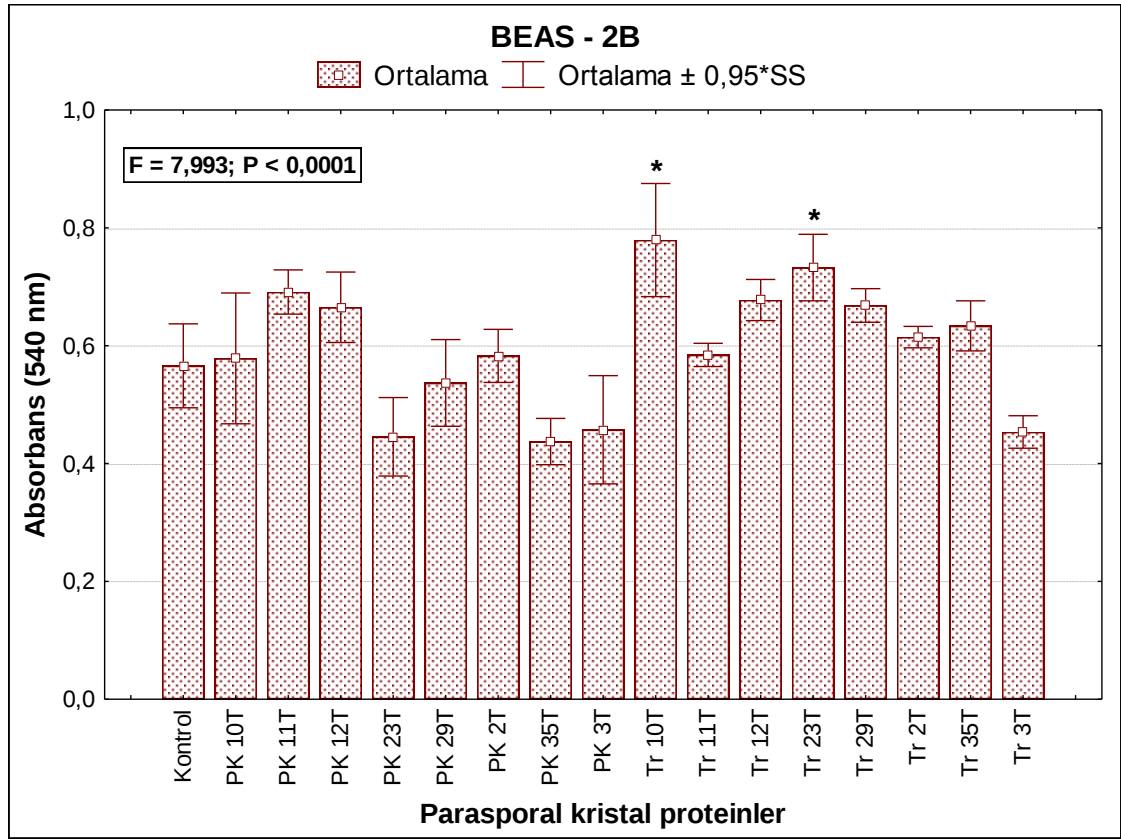
Şekil 3.4. Saflaştırılan parasporal kristal proteinlerden 13MY izolatına ait SDS-PAGE profili.

1. sütun: Alkalide çözülmemiş, 2. sütun: Alkalide çözülmüş, 3. sütun: Alkalide çözülmüş tripsin uygulanmış 4. sütun: Alkalide çözülmüş proteinaz K uygulanmış, 5. sütun: Alkalide çözülmüş tripsin uygulanmış, filtre edilmiş, 6. sütun: Alkalide çözülmüş proteinaz K uygulanmış, filtre edilmiş

3.3. Aktive Edilmiş Parasporal Proteinlerin Hücre Çoğalması Üzerindeki Etkileri

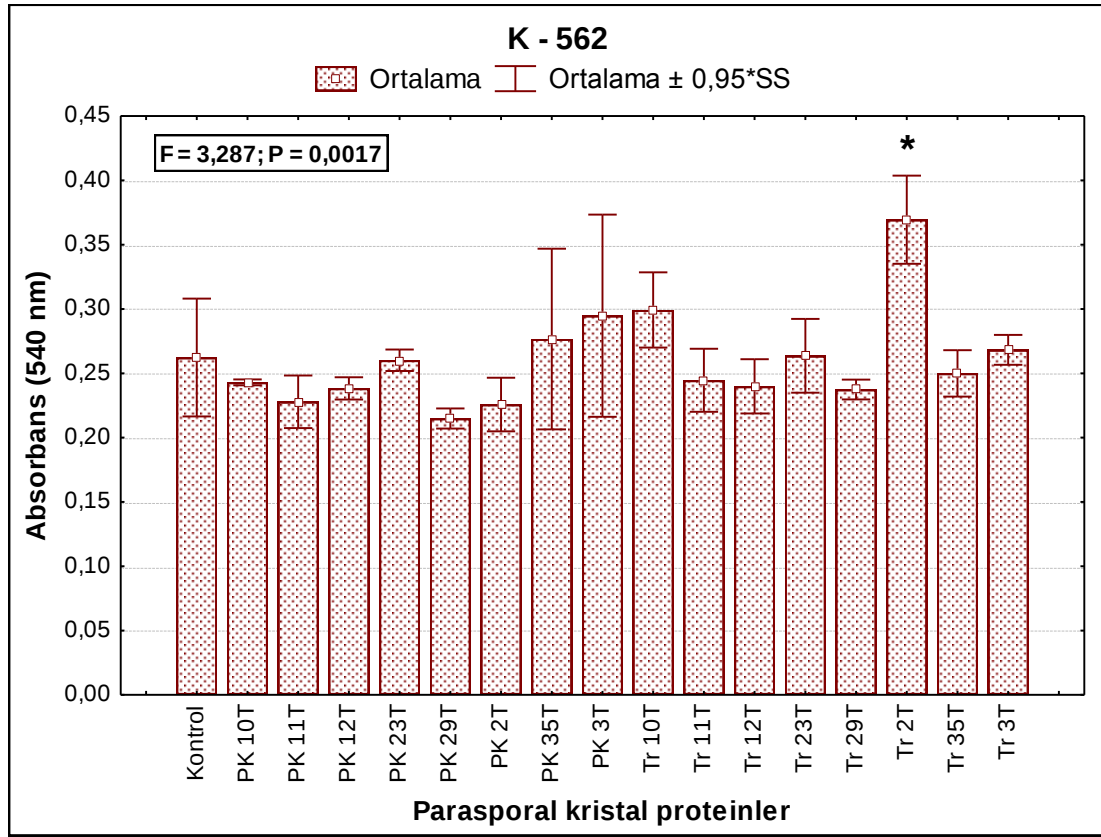
Proteinaz K veya tripsin uygulanan proteinlerin hücre çoğalması üzerindeki etkileri altı farklı kanser hücre hattı ve bir normal epitelyum hücre hattı üzerinde incelenmiştir. Bu amaçla 96 kuyucuklu mikropalakalar kullanılmıştır. Her kuyucuğa 2×10^4 hücre içeren, 90µl hücre süspansiyonu eklenmiş ve 37°C’de, 16 saat, CO₂’li inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra her kuyucuğa proteaz ile aktive edilmiş inklüzyon proteinlerinden 10µl (yaklaşık 12µg) eklenmiş ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası inklüzyon proteinlerin hücre çoğalmasına etki edip etmediği MTT kullanılarak belirlenmiştir. MTT deneyleri sonucunda oluşan absorbans değerleri mikro plaka okuyucusu (ELİSA reader) ile 540 nm de elde edilmiştir.

Proteinaz K veya tripsin ile muamele edilen bazı parasporal kristal proteinlerin sağlıklı epitelyum hücre hattı olan Beas-2B üzerindeki etkileri incelendiğinde uygulamalar arasında istatistiksel olarak fark bulunduğu görülmüştür. Tripsin ile muamele edilmiş 23T ve 10T BEAS-2B hücre hattının çoğalmasını kontrole göre anlamlı bir şekilde arttırdığı görülmüştür (Şekil 3.5).



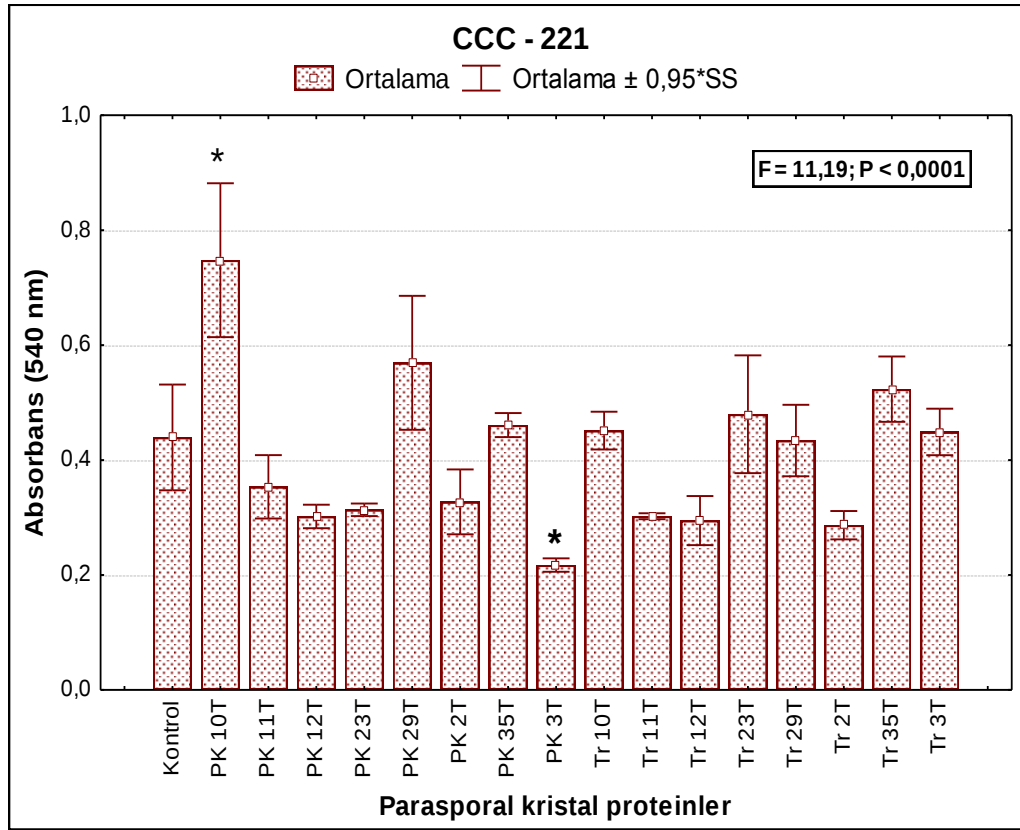
Şekil 3.5. Paraspore kristal proteinlerin Beas-2B hücre çoğalması üzerine etkisi
Paraspore proteinler tripsin (1 mg/ml) ve proteinaz K (10µg/ml) ile aktive edilmiştir. Veriler üç tekrarlı olarak yapılan deneyin ortalama değeridir.

K562 (kronik miyeloid lösemi) hücre hattı üzerine uygulanan proteinaz K ve tripsin ile muamele edilmiş paraspore kristal proteinleri K-562 hücre hattına uygulandığında uygulamalar arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmuştur. Tripsin ile muamele edilmiş 23T paraspore proteini hücre çoğalmasını anlamlı olarak arttırmıştır. Bunun dışında uygulanan diğer paraspore proteinler hücre çoğalmasını artışı ve azalışını kontrole göre anlamlı olarak değiştirmemiştir (Şekil 3.6). Okumura vd. (2005) tarafından gerçekleştirilen *Bacillus thuringiensis* A1470 suşundan parasporin-4'ün tanımlandığı çalışmada proteinaz K (50µg/ml) ile aktive edilen proparasporinin CACO-2, sawano, MOLT-4, TCS ve HL60 hücrelerine karşı hücre çoğalmasını azaltıcı etki gösterirken, K-562, Jurkat, NIH3T3, normal T, HeLa, UtSMC, HC, A549, MRC-5, Vero, COS-7 ve CHO hücrelerine etki etmediği belirlenmiştir. Hücrelerin spesifikliği ve toksine duyarlı ya da dirençli hücrelerin karakteristik özellikleri bilinmemesine rağmen, tümör dokularından alınan hücrelerin normal dokulardan alınanlara göre proteine daha duyarlı olduğu bilinmektedir (Okumura vd., 2005).



Şekil 3.6. Parasporal kristal proteinlerin K-562 hücre hattı çoğalması üzerinde etkisi
Parasporal proteinler tripsin (1 mg/ml) ve proteinaz K (10µg/ml) ile aktive edilmiştir. Veriler üç tekrarlı olarak yapılan deneyin ortalama değeridir.

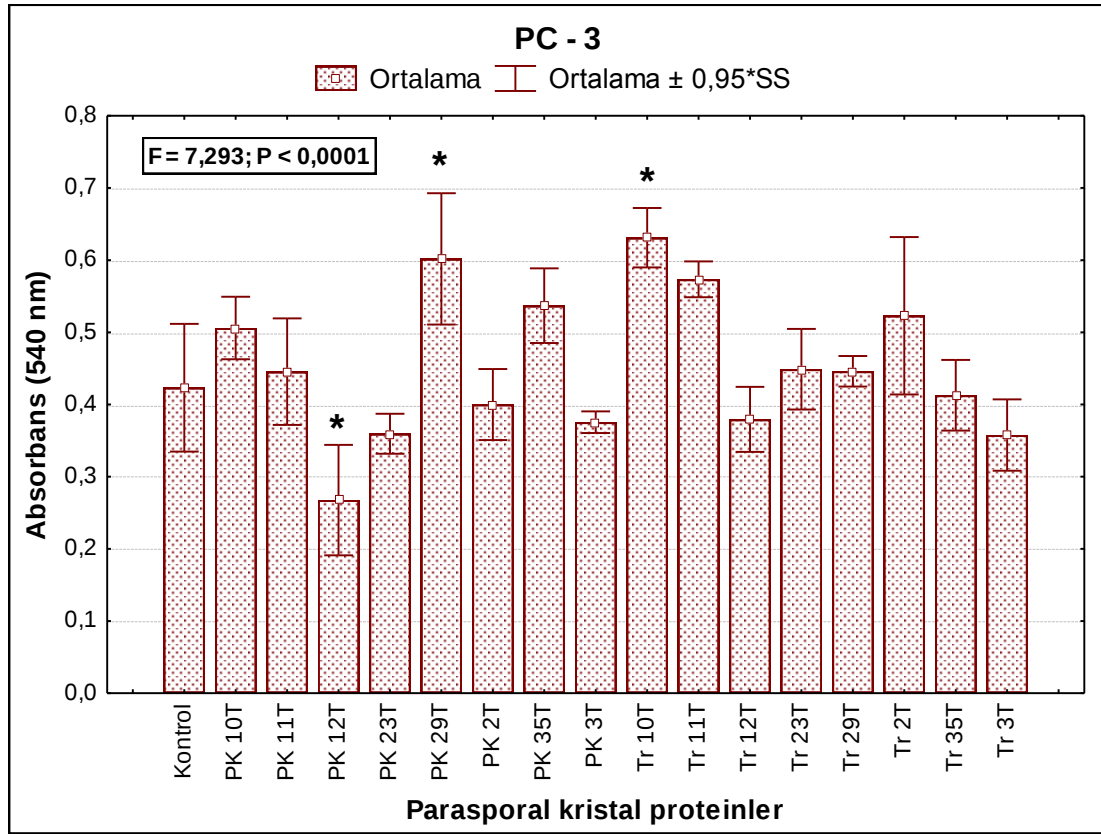
CCC-221 (kolon kanseri) hücre hattı üzerine uygulanan tripsin ve proteinaz K ile muamele edilmiş parasporal protein uygulamaları arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmuştur. CCC-221 hücre çoğalmasında, proteinaz K ile muamele edilmiş 3T parasporal protein uygulandığında görülen azalış ve proteinaz K ile muamele edilmiş 10T uygulandığında görülen artış kontrole kıyasla anlamlıdır (Şekil 3.7). Literatürde Katayama vd. (2005) tarafından yapılan insan kanser hücrelerine etki eden seçici bir protein olan parasporin-1'in, farklı bir kolon kanseri hücre hattı olan Caco-2 (50 µg/ml tripsin ile kesime uğratılmış) hücre büyümesini azaltıcı yönde etki göstermediği belirlenmiştir. Buna ek olarak Nagamatsu vd. (2010) *Bacillus thuringiensis* M019 suşundan elde edilen toksinlerden CP84'ün toksik aktivitesinin araştırılmasında kullanılan kanserli hücre hatlarından biri de Caco-2 hücreleridir. Çalışmalar sonucunda toksin proteinin kolon kanseri hücre hattı olan Caco-2'ye karşı çok düşük oranda etkili olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında, Okumura vd. (2005), parasporin 4'ün Caco-2 hücrelerine karşı yüksek oranda hücre çoğalmasını azaltıcı yönde etki ettiğini göstermişlerdir.



Şekil 3.7. Parasporal proteinlerin CCC-221 hücre hattı çoğalması üzerine etkisi

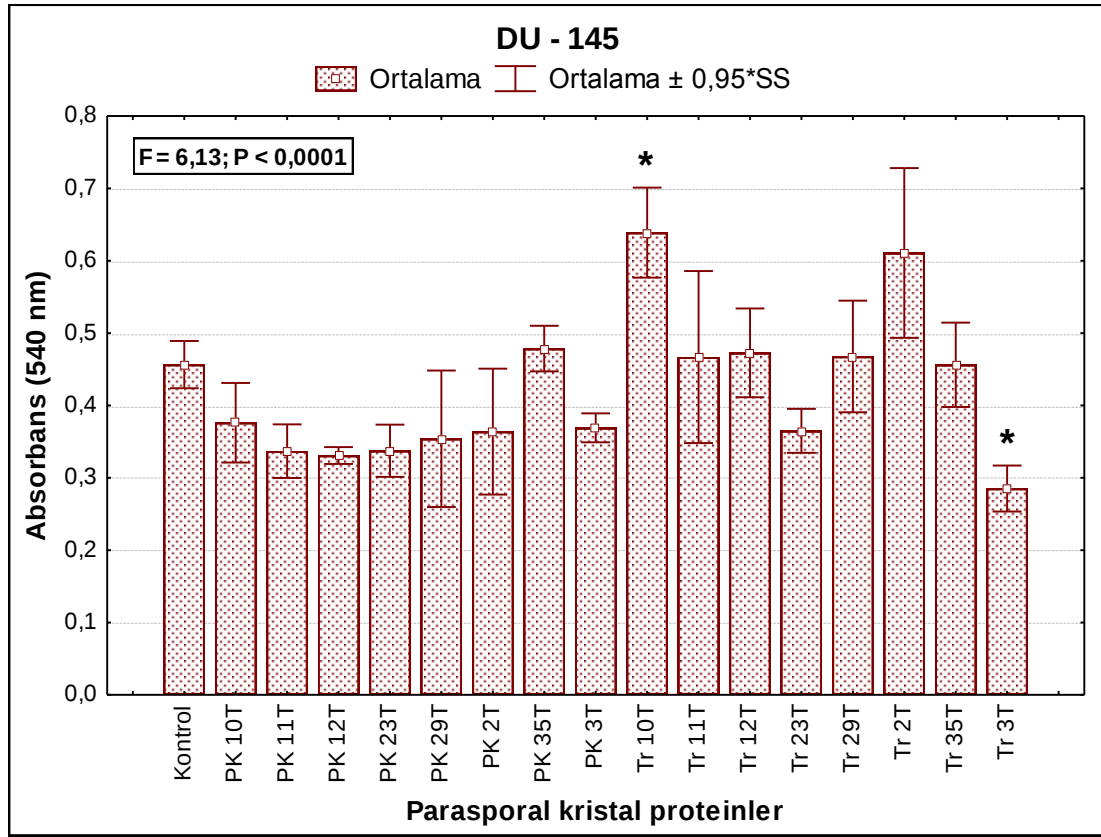
Parasporal proteinler tripsin (1 mg/ml) ve proteinaz K (10µg/ml) ile aktive edilmiştir. Veriler üç tekrarlı olarak yapılan deneyin ortalama değeridir.

PC-3 (prostat kanseri) hücreleri üzerine uygulanan tripsin ve proteinaz K ile muamele edilmiş parasporal kristal proteinlerin etkileri arasında istatistiksel bir fark bulunmuştur. Proteinaz K ile muamele edilmiş 12T parasporal proteini PC-3 hücrelerinin çoğalmasını kontrole göre anlamlı olarak azaltmıştır. Ayrıca proteinaz K ile muamele edilmiş 29T ve tripsin ile muamele edilmiş 10T PC-3 hücrelerinin çoğalmasını kontrole göre anlamlı şekilde arttırmıştır (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Parasporal kristal proteinlerin PC-3 hücre hattı çoğalması üzerine etkisi
Parasporal proteinlerin tripsin (1 mg/ml) ve proteinaz K (10µg/ml) ile aktive edilmiştir. Veriler üç tekrarlı olarak yapılan deneyin ortalama değeridir.

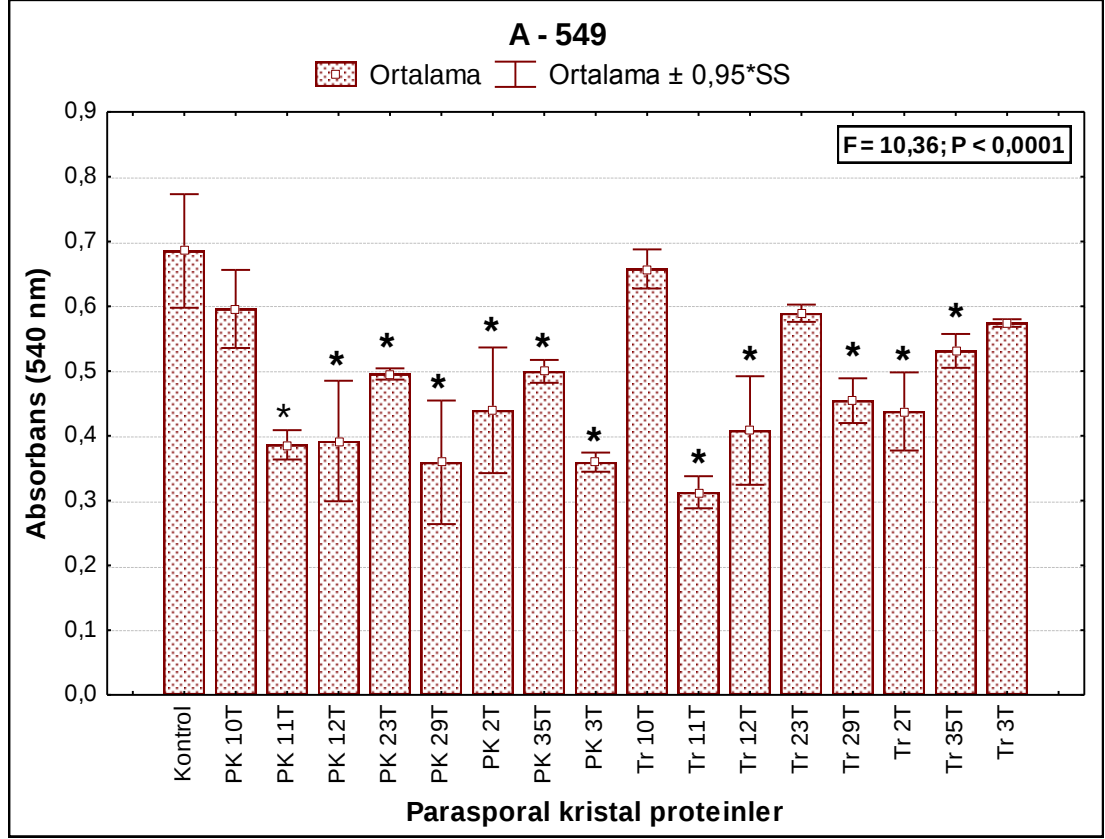
Proteinaz K ve tripsin ile muamele edilen parasporal proteinler DU-145 (prostat kanseri) hücrelerine uygulandığında, tüm parasporal kristal protein uygulamaları arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmuştur. DU-145 hücrelerine tripsin ile muamele edilmiş 3T uygulandığında hücre çoğalmasında görülen azalış ve tripsin ile muamele edilmiş 10T uygulandığında hücre çoğalmsında görülen artış kontrole göre anlamlıdır (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Parasporal kristal proteinlerin DU-145 hücre hattı çoğalması üzerine etkisi
Parasporal proteinler tripsin (1 mg/ml) ve proteinaz K (10µg/ml) ile aktive edilmiştir. Veriler üç tekrarlı olarak yapılan deneyin ortalama değeridir.

Proteinaz K ve tripsin ile muamele edilmiş parasporal proteinler A-549 (akciğer kanseri) hücreleri üzerine uygulandığında, parasporal protein uygulamaları arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmuştur. A-549 (akciğer kanseri) hücre hattı üzerine uygulanan parasporal proteinlerin çoğunun değişik seviyelerde hücre çoğalmasını engellediği tespit edilmiştir. Proteinaz K ile muamele edilmiş 11T, 12T, 23T, 29T, 2T, 35T ve 3T ; tripsin ile muamele edilmiş 11T, 12T, 29T, 2T, 35T parasporal proteinleri A-549 hücrelerinin çoğalmasını kontrole göre anlamlı olarak azaltmıştır. Hücreler üzerine uygulanan diğer proteinler ise hücre çoğalmasını kontrole göre anlamlı bir şekilde değiştirmemiştir (Şekil 3.10). Ito vd. (2004) parasporin-2'nin keşfedildiği çalışmada *Bacillus thuringiensis* A1547 suşundan elde edilen inklüzyon proteininin bazı hücre hatlarına toksik etki gösterirken; A549, HeLa, TCS, MRC-5 ve HC hücrelerinin ise toksin proteine karşı dirençli olduğu belirlenmiştir. Katayama vd. (2005) tarafından yapılan parasporin-1'in saflaştırılması ve karakterizasyonunu kapsayan çalışmada protein (50µg/ml ile muamele edilmiş tripsin) HeLa, MOLT-4 ve HL60 hücrelerinde hücre çoğalmasını yüksek oranda azaltıcı etki gösterirken;

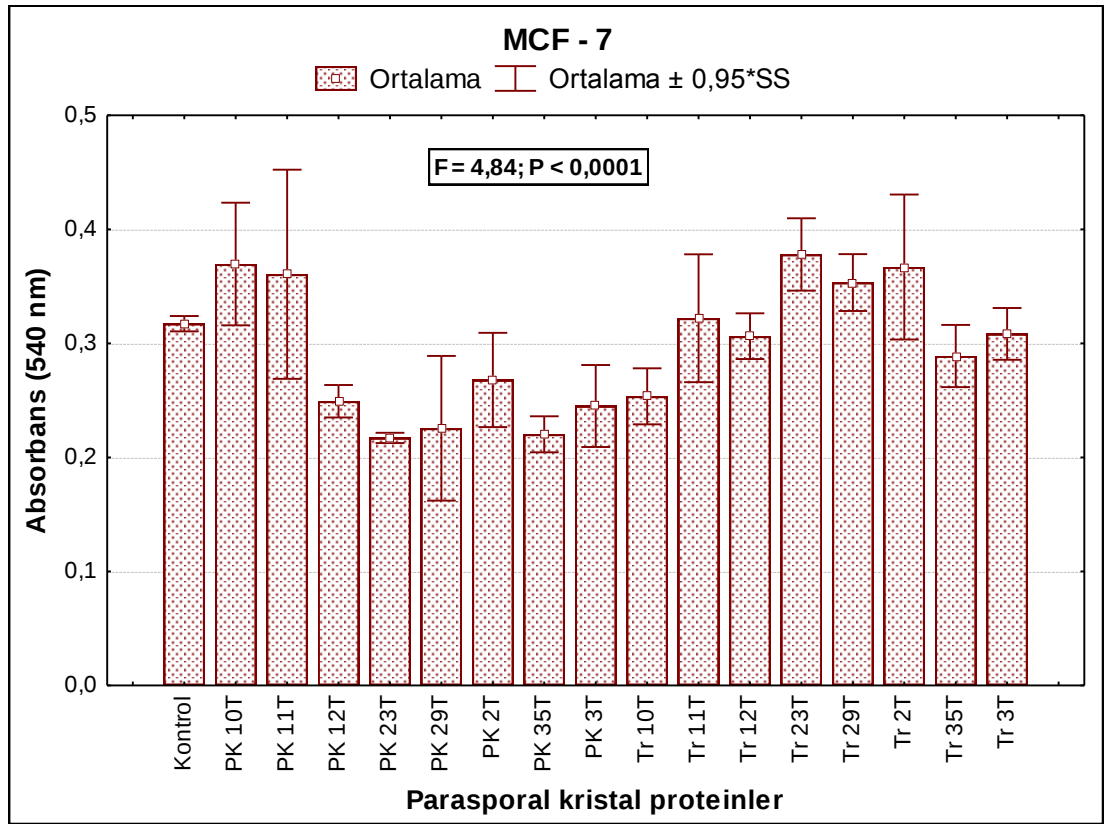
UtSMC, HC, MRC-5, periferel kan h  releri ve A-549 h  relerine kar   toksik etki göstermemiştir. Bu nedenle diğer bakteriyel toksinlerde olduğu gibi parasporin-1'in de toksisitesinin hedef duyarlı h  relerde bulunan spesifik bir reseptör aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir. Dolayısıyla, bu çalışmada A549 üzerinde etkili olan 11T ve 3T parasporal proteinlerinin parasporin-1 olmadığı söylenebilir.



Şekil 3.10. Parasporal kristal proteinlerin A549 h  re hattı   o  lması üzerine etkisi
Parasporal proteinler tripsin (1 mg/ml) ve proteinaz K (10  g/ml) ile aktive edilmiştir. Veriler üç tekrarlı olarak yapılan deneyin ortalama değeridir.

MCF-7 (meme kanseri) h  re hattı üzerine uygulanan proteinaz K ve tripsin ile muamele edilen parasporal proteinlerin h  re   o  lması üzerindeki etkilerine bakıldığında ise uygulamalar arasında istatistiksel olarak fark bulunmuştur. Ancak bu farklılık uygulanan parasporal proteinlerin farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Dunnett testi sonrası uygulamalar arasında kontrole göre anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir (  ekil 3.11). Wong vd. (2010) tarafından Bt 18 toksininin bağlanma özelliklerinin incelendiği çalışmada; toksin kullanılan lösemik h  relerle karşı yüksek oranda sitotoksik etki gösterirken, meme kanseri h  re hattı olan MCF-7'ye karşı etki etmemiştir. Yapılan   alı  mada Bt 18 toksininin lösemik kanser h  relerine karşı yüksek oranda bağlanma afinitesi gösterdiği ayrılma katsayıları hesaplanarak

belirlenmiştir. MCF-7 hücrelerinin inhibitör konsantrasyonu elde edilemediğinden ayrılma katsayısıda belirlenememiştir. Bu durum lösemik kanser hücreleri ile meme kanseri hücre tiplerinin farklılığı ile açıklanabilir. Lösemik hücrelerde Bt 18 toksini için spesifik bağlanma bölgeleri bulunurken, tamamen farklı bir hücre grubundan oluşan MCF-7 toksin için bağlanma bölgesi bulundurmaz. Bu nedenle Bt 18 toksininin MCF-7 hücrelerine etki etmemesi toksinin hücrelere olan düşük afinitesi ile açıklanabilir. Buna karşın, bu tez çalışmasında kullanılan parasporal kristal proteinler hücre çoğalmasını engelleme konusunda K-562 hücrelerine kıyasla MCF-7 hücrelerinde daha etkili olduğu görülmüştür (Çizelge 3.2).



Şekil 3.11. Parasporal kristal proteinlerin MCF-7 hücre hattı çoğalması üzerinde etkisi
Parasporal proteinler tripsin (1 mg/ml) ve proteinaz K (10µg/ml) ile aktive edilmiştir. Veriler üç tekrarlı olarak yapılan deneyin ortalama değeridir.

Tüm bu etkiler bir tablo üzerinde belirtilecek olursa;

Çizelge 3.2. Parasporal kristal proteinlerin hücre çoğalması üzerine etkileri

İzolatlar	BEAS-2B	K-562	CCC-221	PC-3	DU-145	A-549	MCF-7
Tr 2T	+1.08	+1.38	-1.53	+1.23	+1.35	-1.7	+1.16
PK 2T	+1.03	-1.18	-1.34	-1.07	-1.25	-1.58	-1.19
Tr 11T	+1.03	-1.08	-1.43	+1.35	+1.02	-2.19	+1.03
PK 11T	+1.23	-1.18	-1.22	+1.04	-1.36	-1.78	+1.16
Tr 12T	+1.26	-1.13	-1.48	-1.13	+1.04	-1.70	-1.03
PK12T	+1.17	-1.13	-1.43	-1.6	-1.36	-1.74	-1.29
Tr 29T	+1.17	-1.13	1	+1.04	+1.02	-1.51	+1.12
PK 29T	+1.01	-1.23	+1.3	+1.42	-1.28	-1.94	-1.40
Tr 3T	-1.24	1	-1.04	-1.20	-1.50	-1.19	-1.03
PK 3T	+1.07	+1.11	-2.04	-1.13	-1.25	-1.94	-1.29
Tr 10T	+1.41	+1.11	-1.04	+1.50	+1.33	-1.04	-1.24
PK 10T	+1.01	-1.08	+1.72	+1.19	-1.21	+1.15	+1.16
Tr 23T	+1.17	1	-1.02	+1.04	-1.25	+1.17	+1.19
PK 23T	-1.27	1	-1.38	-1.2	-1.36	-1.38	-1.47
Tr 35T	+1.12	-1.08	+1.20	-1.02	1	-1.28	-1.10
PK 35T	-1.3	+1.03	+1.04	+1.28	-1.04	-1.37	-1.40

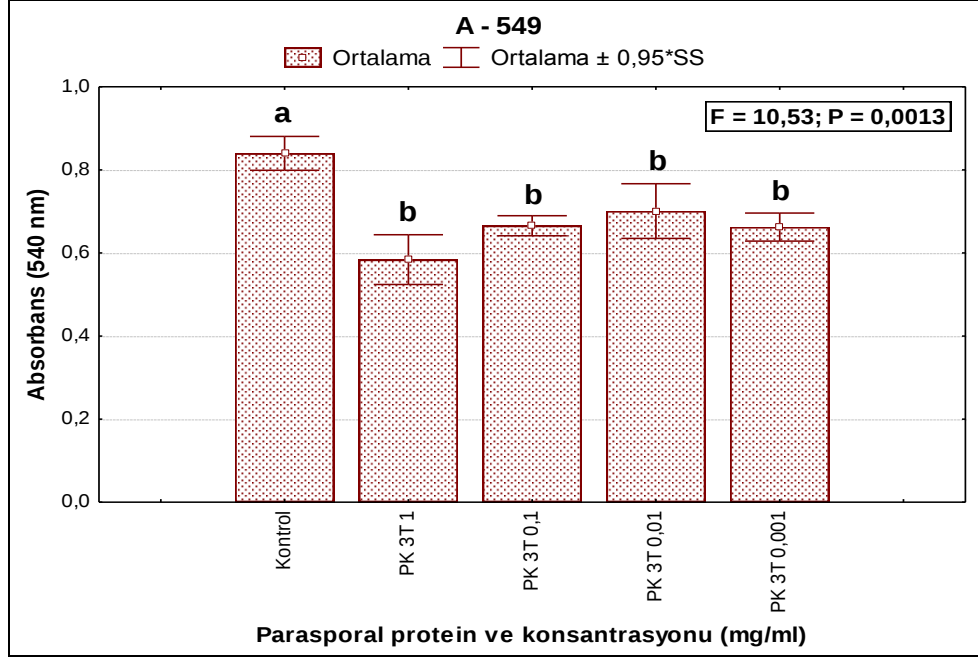
Rakamlar hücre çoğalması değerlerinin kontrole oranını göstermektedir. (-): hücre çoğalmasının azalması; (+): Hücre çoğalmasının artması

3.5.1. Parasporal proteinlerin doz etkisinin araştırılması

Proteinaz K veya tripsin ile aktive edilen parasporal proteinlerden özellikle hücre çoğalmasını azaltıcı etki gösteren toksinlerin yedi farklı hücre hattında doz denemeleri yapılmıştır. Doz denemeleri için toksinler 1mg/ml, 0, 1mg/ml, 0,01mg/ml ve 0,001mg/ml (son konsantrasyon) olmak üzere dört farklı konsantrasyonda hazırlanarak bir önceki deneyde belirlenen ilgili parasporal proteine duyarlı hücre hatlarına uygulanmıştır.

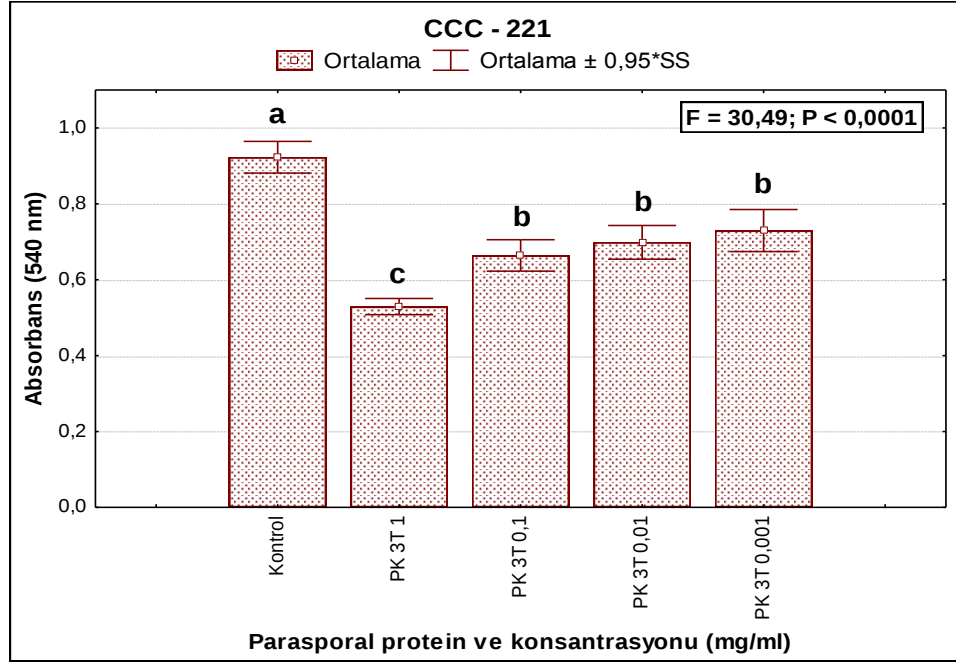
Daha önceki çalışmada A-549 hücre çoğalmasında azalmaya neden olan proteinaz K uygulanmış 3T parasporal proteinleri dört farklı konsantrasyonda A-549 hücrelerine uygulanmıştır. Proteinaz K uygulanmış 3T parasporal proteinleri A-549 hücrelerine uygulandığında uygulanan konsantrasyonlar arasında istatistiksel fark bulunmuştur.

Uygulanan proteinler kontrole göre absorbansı düşürmüş ve dolayısıyla A-549 hücrelerinin çoğalmasında azaltmıştır. Hücreler üzerine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki proteinaz K uygulanmış 3T parasporal proteinleri kendi aralarında karşılaştırıldığında ise aralarında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 3.12).



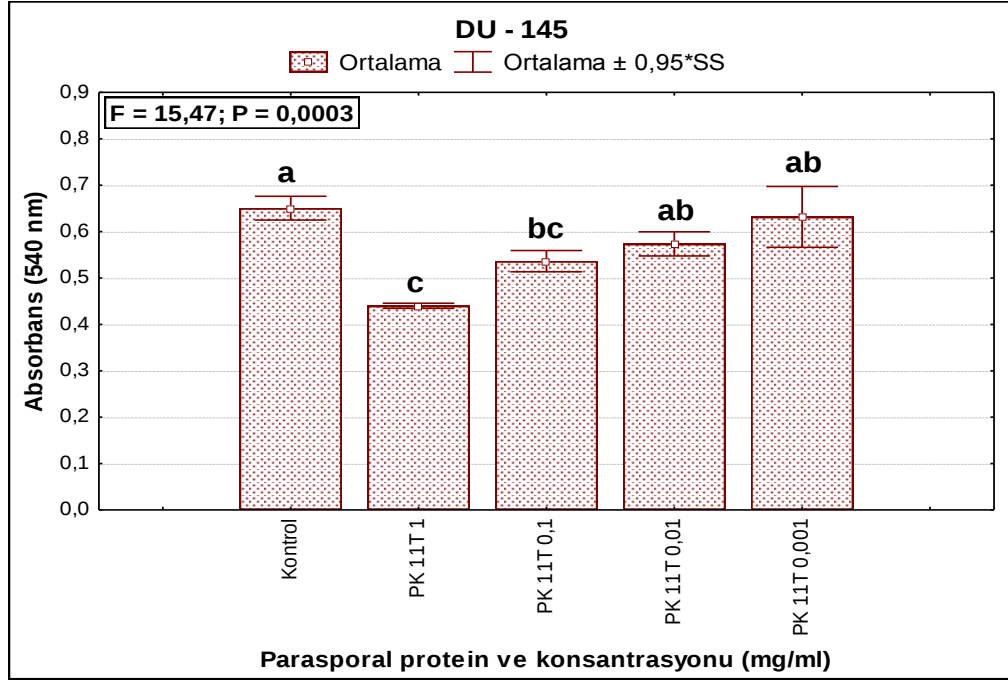
Şekil 3.12. A-549 hücresi üzerinde PK 3T parasporal proteininin 1, 0.1, 0.01, 0.001 mg/ml konsantrasyonlarının etkisi. Proteinaz K 10 µg/ml olarak parasporal proteine uygulanmıştır. Veriler üç tekrarlı olarak yapılan deneyin ortalama değeridir.

CCC-221 hücre yoğunluğunda azalmaya neden olduğu bilinen proteinaz K ile muamele edilmiş 3T parasporal proteinleri dört farklı konsantrasyonda hücreler üzerine uygulanmıştır. CCC-221 hücrelerine uygulanan dört farklı konsantrasyondaki proteinaz K ile muamele edilmiş 3T parasporal proteinler arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmuştur. Hücreler üzerine uygulanan parasporal proteinin farklı konsantrasyonları kontrole göre hücre çoğalmasını azaltmıştır. Parasporal proteinin farklı konsantrasyonları kendi arasında karşılaştırıldığında ise 0.1, 0.01 ve 0.001 mg/ml konsantrasyonlarının CCC-221 hücrelerinin çoğalmasını azaltıcı etkilerinin arasında anlamlı bir fark yok iken, 1 mg/ml konsantrasyonundaki proteinaz K ile muamele edilmiş 3T parasporal proteini diğerlerine göre daha etkili bulunmuştur (Şekil 3.13).



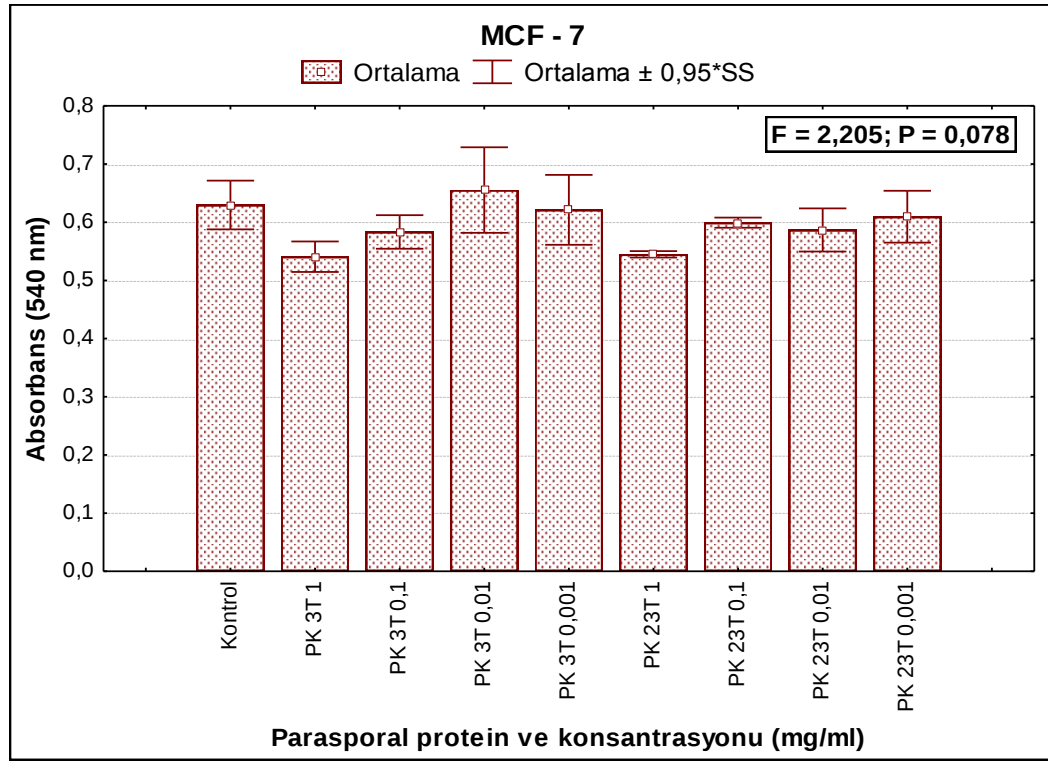
Şekil 3.13. CCC-221 hücresi üzerinde PK 3T proteininin 1, 0.1, 0.01, 0.001mg/ml konsantrasyonlarının etkisi. Proteinaz K 10 µg/ml olarak parasporal proteinlere uygulanmıştır. Veriler üç tekrarlı olarak yapılan deneyin ortalama değeridir.

DU-145 hücre çoğalmasında azalmaya neden olduğu bilinen proteinaz K ile muamele edilmiş 11T proteinin dört farklı konsantrasyonu hücrelere uygulanmıştır. DU-145 hücre hattına uygulanan proteinaz K ile muamele edilmiş 11T parasporal proteininin uygulanan farklı konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak bir fark saptanmıştır. Uygulanan farklı konsantrasyondaki 3T parasporal proteinlerinden 1 ve 0.1 mg/ml' lik iki konsantrasyon hücre çoğalmasını kontrole göre anlamlı olarak düşürmüştü, diğer iki konsantrasyon arasında kontrole göre anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 3.14).



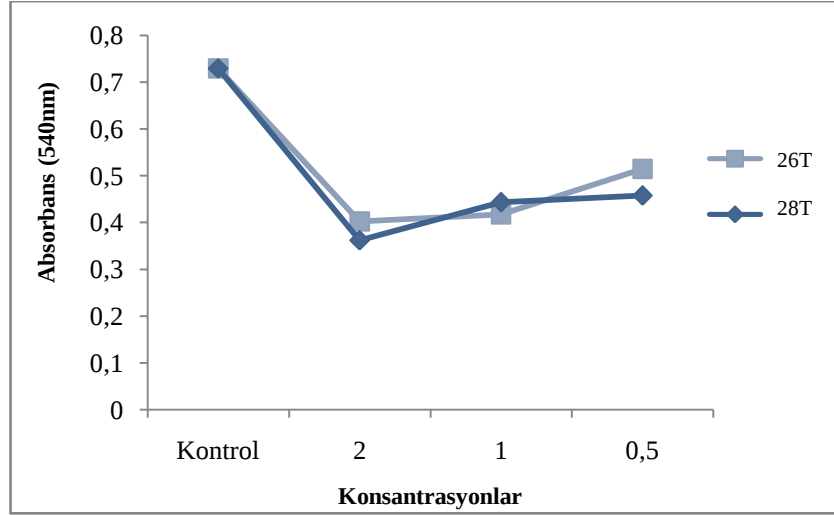
Şekil 3.14. DU-145 hücresi üzerinde PK 11T parasporal proteininin 1, 0.1, 0.01, 0.001 mg/ml konsantrasyonlarının etkisi. Proteinaz K 10 µg/ml olarak parasporal proteine uygulanmıştır. Veriler üç tekrarlı olarak yapılan deneyin ortalama değeridir.

MCF-7 hücreleri üzerine çok düşük oranda etki ettiği bilinen proteinaz K ile muamele edilmiş 3T ve 23T proteinlerinin dört farklı konsantrasyonu hücrelere uygulanmıştır hücreler üzerine uygulanan dört konsantrasyon arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Yani, uygulanan paraporl proteinlerin dozları değiştirilse de MCF-7 hücre hattının çoğalmasına etki etmedikleri görülmüştür (Şekil 3.15).



Şekil 3.15. MCF-7 hücresi üzerinde PK 3T ve PK 23T parasporeal proteinlerinin 1, 0.1, 0.01, 0.001mg/ml konsantrasyonlarının etkisi. Proteinaz K 10 µg/ml olarak parasporeal proteinlere uygulanmıştır. Veriler üç tekrarlı olarak yapılan deneyin ortalama değeridir.

Bunlara ilaveten, K562 üzerinde etkili olduğu görülen son konsantrasyonu 1mg/ml olan tripsin ile muamele edilen 26T ve 28T parasporeal proteinlerinin daha yüksek ve düşük konsantrasyonlarda etkinliğinin belirlenmesi için doz denemeleri yapılmıştır. Bunun için parasporeal kristal proteinler 2, 1 ve 0.5 mg/ml (son konsantrasyon) olmak üzere üç farklı konsantrasyonda ayarlanmış ve son konsantrasyonu 1mg/ml olan tripsin ile aktiflendikten sonra K562 hücrelerine uygulanmıştır (Şekil 3.16).



Şekil 3.16. K562 hücresinde 26T ve 28T parasporal proteinlerinin 2, 1 ve 0, 5 mg/ml olmak üzere üç farklı konsantrasyona göre hücre çoğalması üzerinde etkisi. Parasporal proteinler son konsantrasyonu 1 mg/ml olan tripsin ile kesime uğratılmıştır. Veriler iki tekrarlı olarak yapılan deneyin ortalama değeridir.

Söz konusu toksinler değişik konsantrasyonlarda K562 hücrelerine uygulandığında en önemli değişiklik 28T toksininde gerçekleşmiş, 2 mg/ml olarak K562 hücrelerine uygulandığında diğer konsantrasyonlara göre daha etkili olmuş ve hücre çoğalmasını kontrole göre 2 kat azaltmıştır (Şekil 3.16). Hücre çoğalması üzerine 1 ve 0.5 mg/ml konsantrasyonları ise 2mg/ml'ye göre daha az oranda (kontrole göre sırasıyla; 1.63 ve 1.6 kat) hücre bölünmesini azaltmıştır. 26T parasporal proteininin 2, 1 ve 0.5 mg/ml'lik konsantrasyonları kontrole göre sırasıyla 1.8, 1.75 ve 1.41 kat olmak üzere hücre çoğalmasında azalmaya neden olmuştur (Şekil 3.16).

Yukarıdaki verilerden de anlaşıldığı gibi, toksinlerin aktifleştirilmesinde kullanılan her iki proteaz da benzer sonuçlar vermiştir. Şöyle ki; bazı toksinlerin proteinaz K ile daha etkili sonuçlar verdiği görülürken, bazılarının da tripsin ile muamele edildiğinde daha etkili olduğu saptanmıştır. Bu durum tripsin ve proteinaz K'nın peptid zinciri üzerinde etkileştiği bölgelerin farklı olmasından ve etki spektrumundan kaynaklı olabilir. Tripsin peptidlerin lizin ve arjinin aminoasitlerinin karboksil ucunu tanıyarak kesime uğratar. Tripsinin birçok substratın ester ve amid bağlarını hidroliz ettiği bilinmektedir. Proteinaz K ise, alfa amino gruplarıyla bloke edilmiş alifatik ve aromatik aminoasitlerin karboksil ucunu tanıyarak kesime uğratar. Proteinaz K geniş spektrumlu aktivitesi nedeniyle tercih edilen bir proteazdır. Dolayısıyla, tez çalışmasında kullanılan izolatlardan elde edilen parasporal proteinlerin aminoasit

dizilimi bilinmediğinden bazılarının tripsin, bazılarının da proteinaz K ile muamele edilmesi sonucunda etkili sonuçlar alınmıştır.

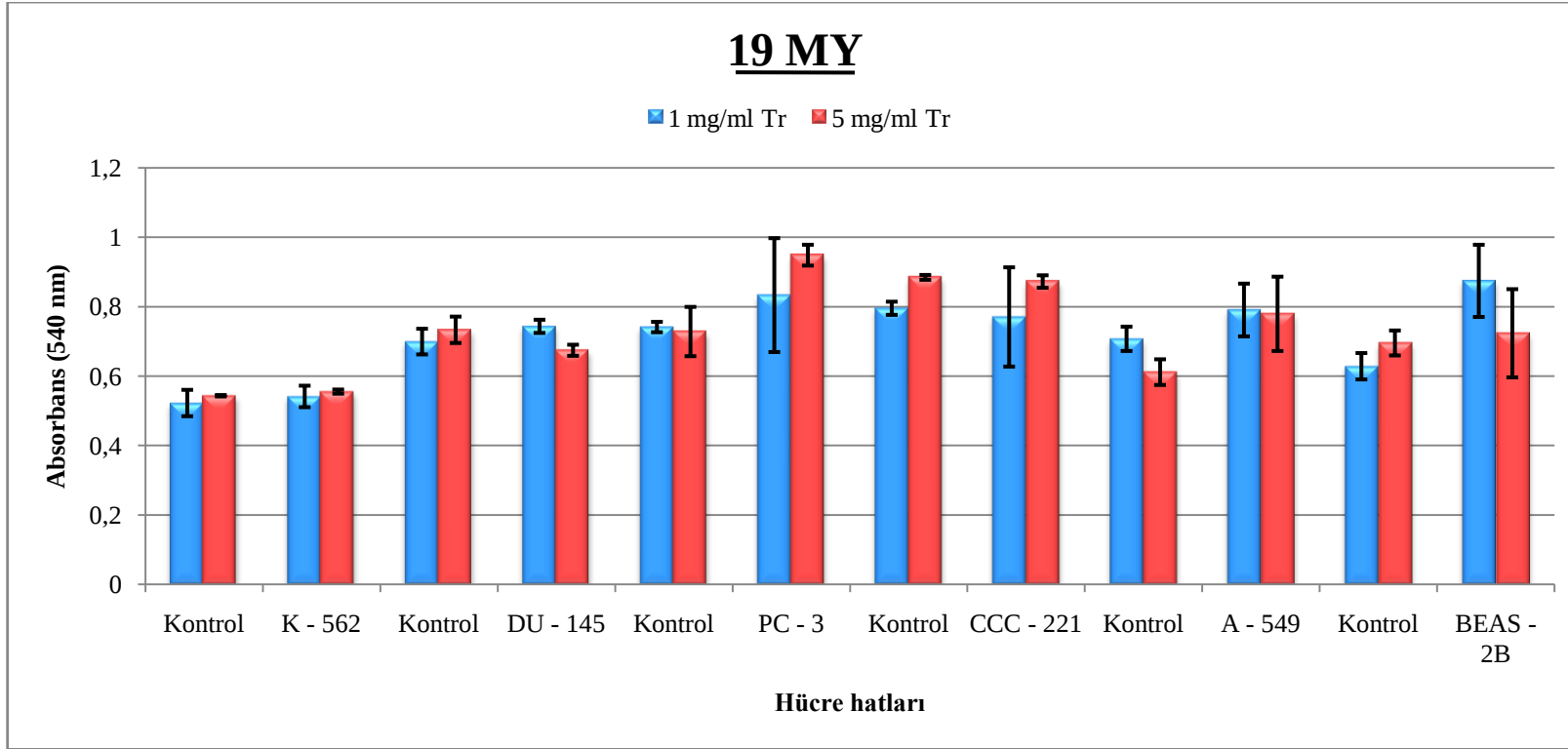
Literatürde Parasporin-1 olarak yerini alan parasporinin keşfedildiği çalışmada, proproteinin 81 kDa büyüklüğünde tek bir bileşenden meydana geldiği bulunmuştur. Alkali ortamda çözülen 81 kDa'luk protein kanser hücre hatlarına uygulandığında hiçbir etki göstermemiştir. 81 kDa'luk öncül protein insektisidal proteinlerde olduğu gibi proteazlarla kesime uğratıldığında farklı büyüklüklerde protein bantları vermiş ve lösemik T hücrelerine karşı toksik etki göstermiştir. Proproteinin aktive edilmesi için tripsin (0.03, 0.3, 3, 30 mg/ml), kimotripsin (0.03, 0.3, 3, 30 mg/ml) ve proteinaz K (0.0003, 0.03, 0.03, 0.3 mg/ml) olmak üzere üç proteazın 4 farklı konsantrasyonu ile ayrı ayrı kesime uğratıldığında tripsin ve proteinaz K'nın benzer protein profili verdiği ve kanserli hücelere sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Ancak en iyi sonuç 300 µg/ml tripsin uygulandığında elde edilmiştir. Öncül protein kimotripsin ile muamele edildiğinde tripsin ve proteinaz K'nın aksine farklı bir protein profili görülmüş ve sitotoksik etki göstermemiştir (Mizuki vd., 2000). Bt A1547 suşundan elde edilen hedefe spesifik olarak bazı kolon ve akciğer kanseri hücrelerine etki eden toksin protein, parasporin-2'nin belirlendiği çalışmada; öncül proteinin aktive edilmesi için proteinaz K (10µg/ml) kullanılmıştır. Birçok çalışmada proteaz çeşitlerinden proteinaz K kullanılmış olmakla birlikte, 10 µg/ml, 50µg/ml, 60µg/ml ve 100 µg/ml gibi farklı konsantrasyonları tercih edilmiştir.

Jung vd. (2007) tarafından gerçekleştirilen parasporin-1Aa2 (Cry31Aa2)'nin keşfedildiği çalışmada dört farklı konsantrasyonda (10, 1, 0.1 ve 0.001 mg/ml) tripsin ve kimotripsin ile üç farklı konsantrasyonda (100, 10 ve 1µg/ml) proteinaz K ile ayrı ayrı muamele edilen parasporal protein kimotripsin ve proteinaz K ile muamele edildiğinde sitotoksik aktivite göstermemiştir. Tripsin ile muamele edilen parasporal protein ise çalışmada kullanılan serviks kanser hücreleri HeLa ve TCS, lösemik T hücreleri HL-60 ve Jurkat ile hepatosit kanser hücreleri HepG2 hücrelerine karşı oldukça toksik etki gösterirken, normal T hücreleri, normal hepatosit hücreleri HC, normal embriyonik akciğer fibroblast hücreleri MRC-5, kolon kanser hücresi Caco-2, akciğer kanser hücresi A-549 ve maymundan izole edilen sağlıklı ve kanserli hücelere karşı sitotoksik etki göstermediği belirlenmiştir (Jung vd., 2007). Katayama vd. (2005) parasporin-1'in saflaştırılması ve karakterizasyonu ile ilgili yaptıkları çalışmada proparasporin-1'in aktivasyonu için

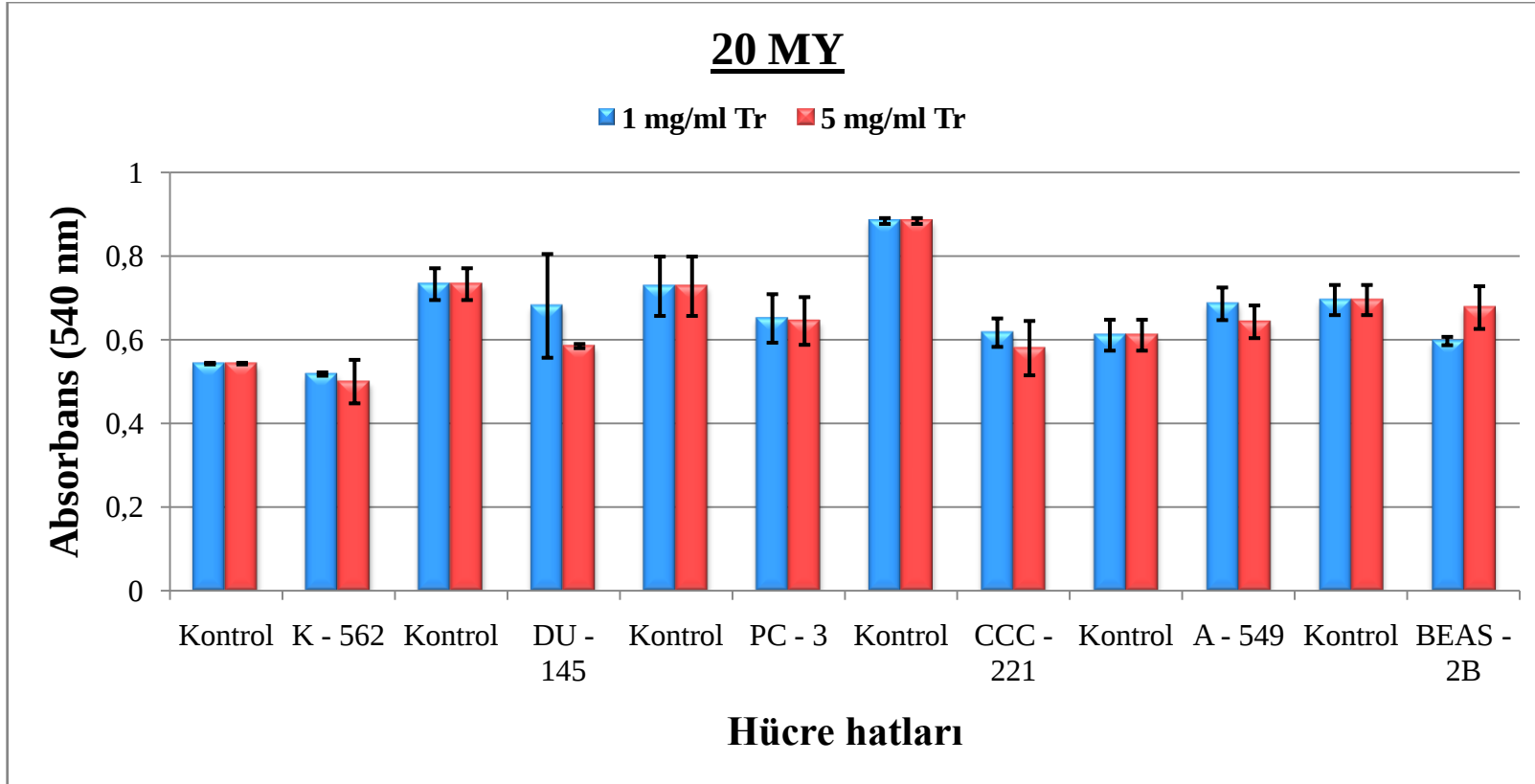
alkali ortamda çözüldükten sonra, değişik konsantrasyonlarda proteinaz K (0-1 mg/ml) ve tripsin (0-1 mg/ml) uygulanmıştır. Bunun sonucunda 50 µg/ml ve üstündeki tripsin konsantrasyonlarının hücreler üzerinde en yüksek sitotoksik etkiyi gösterdiği belirlenmiştir. Proteinaz K'nın geniş substrat spesifikliğinden dolayı proparasporin-1'in daha fazla kesime uğramasına ve sitotoksitesini kaybetmesine neden olduğu düşünülmektedir. Parasporin-1'in sitotoksik mekanizmasının araştırıldığı Katayama vd. (2007) tarafından yapılan çalışmada da yine tripsin kullanılmıştır. Nagamatsu vd. (2010)'da yapılan çalışmada M019 suşundan yeni bir parasporin olan parasporin-6 elde edilmiştir ve bu çalışmada 0.2 mg/ml tripsin pro-parasporinlerin aktivasyonu için kullanılmıştır. Malezya'dan elde edilmiş olan Bt18 izolatının ürettiği 68 kDa büyüklüğündeki parasporal proteinin 1 mg/ml tripsin aktivasyonundan sonra insan ve sıçan eritrositlerine karşı hemolitik olmayan, özellikle lösemik hücrelere teröpatik ve diagnostik etkiler gösterdiği belirlenmiştir (Krishnan vd., 2010).

3.5.2. Proteaz konsantrasyonunun proteininin aktivitesi üzerinde etkisi

Literatürde farklı konsantrasyonlardaki proteazların proprotein aktivasyonunu farklı şekilde etkilediğine dair bilgilerin bulunması nedeniyle çalışmamızda, proteaz konsantrasyonunun proteininin aktivitesi üzerinde etkisi olup olmadığının belirlenmesi amacıyla 1 mg/ml ve 5 mg/ml (uygulanan tripsinin son konsantrasyonları) olmak üzere farklı iki konsantrasyonda tripsin enzimi 1mg/ml yoğunluğundaki parasporal proteinlere uygulanmıştır. Diğer bir deyişle, farklı konsantrasyonlardaki tripsin ile muamele edilmiş toksinlerin hücre çoğalması üzerine etkileri aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir.



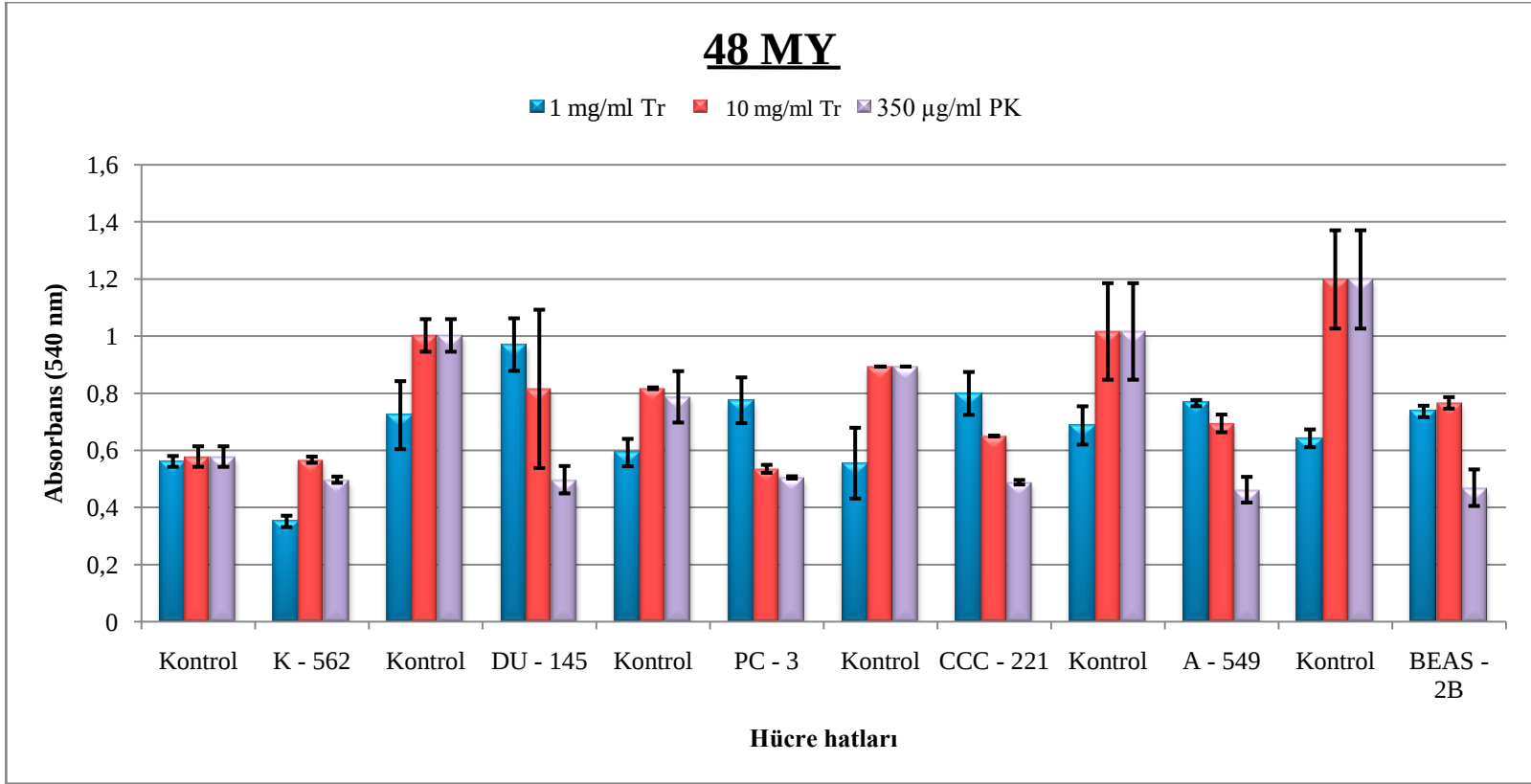
Şekil 3.17. 1ve 5 mg/ml tripsinle kesime uğratılan 19MY parasporal proteininin hücre hatları üzerindeki etkileri.
Veriler iki tekrarlı olarak yapılan deneyin ortalama değeridir.



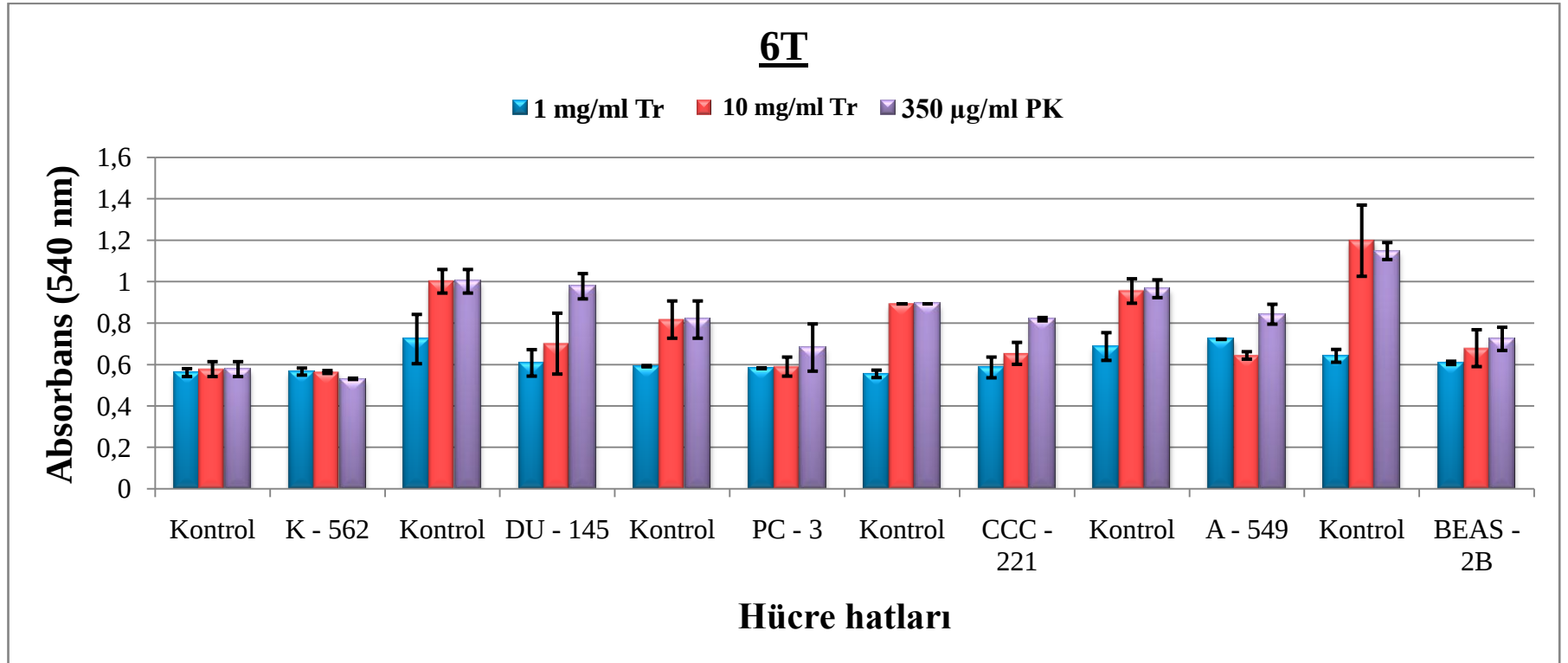
Şekil 3.18. 1ve 5 mg/ml tripsinle kesime uğratılan 20MY parasporal proteininin hücre hatları üzerindeki etkileri
Veriler iki tekrarlı olarak yapılan deneyin ortalama değeridir.

Kontrole kıyasla 19MY parasporal proteinlerinin farklı tripsin konsantrasyonları (1 mg/ml ve 5 mg/ml) ile aktive edildikten sonra, hücre hatlarının çoğalmasını genellikle ya hiç değıştirmediği ya da arttırıcı etki gösterdiğiği belirlenmiştir (Şekil 3.17, 3.18). 20MY parasporal proteini ise DU-145, PC-3 ve CCC-221 hücrelerinin çoğalmasını azaltıcı etki gösterirken; tripsin ile muamele edilmiş olan 20MY parasporal proteini 5mg/ml konsantrasyonunda, 1mg/ml uygulamasına göre daha etkili bulunmuştur.

Tripsin ve proteinaz K konsantrasyonu arttırılarak tekrar hücrelere denenmiştir. Tripsin 10 mg/ml, proteinaz K 350 µg/ml olarak denenmiştir.



Şekil 3.19. 48MY parasporal proteininin hücre hatları üzerindeki etkileri
Toksin 1mg/ml tripsin, 10 mg/ml tripsin ve 350 µg/ml proteinaz K ile kesime uğratılmıştır. Veriler iki tekrarlı olarak yapılan deneyin ortalama değeridir.



Şekil 3.20. 6T parasporal proteininin hücre hatları üzerindeki etkileri

Toksin 1 mg/ml tripsin, 10 mg/ml tripsin ve 350 µg/ml proteinaz K ile kesime uğratılmıştır. Veriler iki tekrarlı olarak yapılan deneyin ortalama değeridir.

Arttırılan enzim konsantrasyonları (10 mg/ml tripsin ve 350 µg/ml proteinaz K) 6T ve 48MY parasporal proteinlerinde tüm hücrelerde hücre çoğalmasını engelleyici etki göstermiştir. Ancak sağlıklı epitelyum hücrelerinin de (Beas- 2B) hücre çoğalmasını engelleyici etki göstermiştir (Şekil 3.19, 3.20, 3.21, 3.22). Arttırılan enzim konsantrasyonunun beş farklı kanser hücre hattı (K-562, CCC-221, PC-3, DU-145 ve A-549) ve bir sağlıklı hücre hattı (Beas-2B) üzerindeki etkisi aşağıda verilen tabloda gösterilmiştir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Farklı proteaz konsantrasyonları uygulanan parasporal proteinlerin hücre büyümesi üzerinde etkileri

İzolatlar	BEAS-2B	K-562	CCC-221	PC-3	DU-145	A-549
72T 1mg/ml Tr	+1,22	+1,11	+1,07	+1,72	+1,58	+1,15
72T 5mg/ml Tr	+1,25	+1,01	+1,01	+1,36	+1,61	+1,08
116T 1mg/ml Tr	+1,34	+1,13	+1,32	+1,63	+1,81	+1,32
116T 5mg/ml Tr	+1,21	1	+1,23	+1,38	+1,47	+1,16
48 MY 1 mg/ml	+1,14	-1,6	+1,43	+1,3	+1,34	+1,11
48MY 10mg/ml Tr	-1,56	-1,01	-1,39	-1,52	-1,23	-1,46
48MY 350ug/ml PK	-2,58	-1,16	-1,8	-1,62	-2,04	-2,19
6T 1mg/ml Tr	-1,06	1	+1,05	-1,01	-1,2	+1,05
6T 10mg/ml Tr	-1,77	-1,01	-1,36	-1,39	-1,42	-1,46
6T 350ug/ml PK	-1,65	-1,07	-1,09	-1,19	-1,03	-1,21
21T 1mg/ml Tr	+1,09	-1,01	+1,05	+1,01	-1,2	+1,09
21T 10mg/ml Tr	-1,05	-1,01	-1,09	-1,06	-1,17	-1,38
21T 350ug/ml PK	-1,16	-1,05	+1,05	+1,11	+1,58	-1,21

Rakamlar hücre çoğalması değerlerinin kontrole oranını göstermektedir. (-): hücre çoğalmasının azalması; (+): Hücre çoğalmasının artması

Tez çalışmaları boyunca kullanılan ve grafikleri tez içerisinde yer almayan diğer izolatlar a ait parasporal proteinlerin hücre hatlarına uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 3.4’ de belirtilmiştir.

Çizelge 3.4. Tez çalışmasında kullanılan tüm izolatların hücre büyümesi üzerinde etkisi.

İzolatlar	BEAS-2B	K-562	CCC-221	PC-3	DU-145	A-549
1MY 1mg/ml Tr	+1,01	+1,03	-1,07	+1,12	-1,16	-1,02
2MY 1mg/ml Tr	1	+1,59	-1,25	+1,01	-1,04	+1,08
3MY 1mg/ml Tr	+1,05	+1,03	+1,17	+1,18	+1,94	-1,02
5MY 1mg/ml Tr	-1,01	-1,07	-1,1	+1,73	+1,01	+1,11
6MY 1mg/ml Tr	+1,13	-1,09	-1,12	1	+1,21	-1,2

Çizelge 3.4. Tez çalışmasında kullanılan tüm izolatların hücre büyümesi üzerinde etkisi^(devam)

İzolatlar	BEAS-2B	K-562	CCC-221	PC-3	DU-145	A-549
7MY 1mg/ml Tr	+1,15	-1,01	-1,14	-1,12	+1,07	+1,05
10MY 1mg/ml Tr	1,07	-1,11	-1,37	-1,14	-1,13	-1,22
13MY 1mg/ml Tr	+1,29	-1,21	+1,43	+1,81	+1,08	+1,13
19MY 1mg/ml Tr	+1,38	+1,03	-1,03	+1,12	+1,05	+1,11
20MY 1mg/ml Tr	-1,16	-1,03	-1,41	-1,12	-1,07	+1,13
43MY 1mg/ml Tr	-1,06	-1,21	+1,34	+1,84	+1,41	+1,05
44MY 1mg/ml Tr	+1,09	-1,07	+1,34	+2,05	+1,79	+1,05
45MY 1mg/ml Tr	-1,01	-1,93	+1,41	+1,37	+1,47	-1,07
48MY 1mg/ml Tr	+1,14	-1,6	+1,43	+1,3	+1,34	+1,11
6T 1mg/ml Tr	-1,06	1	+1,05	-1,01	-1,2	+1,05
7T 1mg/ml Tr	-1,1	+1,03	-1,05	-1,07	1	+1,1
13T 1mg/ml Tr	-1,18	+1,01	+1,03	-1,07	-1,16	+1,27
21T 1mg/ml Tr	+1,09	-1,01	+1,05	+1,01	-1,2	+1,09
22T 1mg/ml Tr	+1,12	+1,01	+1,72	+1,47	+1,86	+1,33
26T 1mg/ml Tr	+1,43	-1,3	+1,45	+1,49	+1,63	+1,6
28T 1mg/ml Tr	+1,07	-1,43	+1,07	+2,03	+1,79	+1,35
72T 1mg/ml Tr	+1,22	+1,11	+1,07	+1,72	+1,58	+1,15
73T 1mg/ml Tr	+1,09	+1,11	+1,11	+1,45	+1,5	+1,31
106T 1mg/ml Tr	+1,01	-1,01	-1,16	-1,04	-1,13	+1,01
16T 1mg/ml Tr	+1,34	+1,13	+1,32	+1,63	+1,81	+1,32
153T 1mg/ml Tr	+1,19	+1,07	+1,1	+1,28	+1,42	+1,01
81T 1mg/ml Tr	+1,16	-1,06	-1,27	+1,16	-1,21	+1,12
1MY 10µg/ml PK	+1,01	+1,04	-1,16	+1,03	-1,14	-1,04
2MY 10µg/ml PK	+1,16	-1,1	-1,25	+1,3	+1,1	+1,15
3MY 10µg/ml PK	+1,11	-1,06	-1,47	+1,06	1	-1,1
5MY 10µg/ml PK	+1,08	-1,01	-1,21	-1,01	-1,14	-1,08
6MY 10µg/ml PK	+1,06	-1,04	-1,27	-1,01	+1,01	-1,24
7MY 10µg/ml PK	+1,1	-1,18	-1,23	+1,08	-1,07	+1,15
10MY 10µg/ml PK	+1,16	+1,03	+1,03	+1,23	-1,01	+1,16
13MY 10µg/ml PK	+1,03	1	-1,02	-1,1	-1,22	+1,06
42MY 10µg/ml PK	+1,11	+1,06	+1,07	+1,23	+1,01	+1,1
34T 10µg/ml PK	+1,09	+1,03	+1,01	-1,1	-1,07	-1,04
43T 10µg/ml PK	+1,11	+1,08	+1,1	+1,14	+1,43	+1,22
54T 10µg/ml PK	-1,03	+1,01	-1,12	-1,16	-1,22	+1,01
58T 10µg/ml PK	+1,27	+1,05	-1,16	-1,08	+1,04	+1,29
59T 10µg/ml PK	+1,18	+1,28	1	+1,03	-1,07	-1,01
73T 10µg/ml PK	+1,5	+1,64	+1,25	+1,27	+1,48	+1,8
106T 10µg/ml PK	-1,16	+1,08	+1,07	-1,03	-1,24	-1,13

Çizelge 3.4. Tez çalışmasında kullanılan tüm izolatların hücre büyümesi üzerinde etkisi^(devam)

İzolatlar	BEAS-2B	K-562	CCC-221	PC-3	DU-145	A-549
153T 10µg/ml PK	+1,06	+1,25	+1,01	+1,05	-1,09	-1,09
1T 350µg/ml PK	+1,18	+1,05	+1,01	+1,1	-1,06	-1,09
2T 350µg/ml PK	+1,35	-1,14	+1,02	+1,03	-1,17	+1,01
7T 350µg/ml PK	1	+1,11	-1,28	-1,32	-1,08	-1,25
12T 350µg/ml PK	-1,62	+1,14	-1,38	-1,25	-1,24	-1,3
13T 350µg/ml PK	+1,66	+1,03	1	1	+1,11	-1,04
14T 350µg/ml PK	+1,19	+1,28	+1,25	+1,02	+1,17	+1,31
20T 350µg/ml PK	+1,32	+1,01	+1,32	+1,18	-1,01	+1,17
22T 350µg/ml PK	-1,14	+1,05	-1,19	-1,14	-1,65	-1,09
26T 350µg/ml PK	-1,24	-1,16	-1,29	-1,26	-1,81	-1,23
28T 350µg/ml PK	-1,21	-1,78	-1,24	-1,29	-1,81	-1,07
37T 350µg/ml PK	+1,71	-1,09	-1,04	+1,23	1	+1,02
41T 350µg/ml PK	+1,03	-1,07	-1,2	+1,05	1	-1,08
61T 350µg/ml PK	+1,69	+1,42	+1,14	+1,29	+1,28	-1,04
4MY 350µg/ml PK	1	-1,05	-1,23	-1,19	-1,19	-1,15
9MY 350µg/ml PK	+1,6	+1,58	+1,01	+1,29	+1,58	-1,06
13MY 350µg/ml PK	-1,03	-1,05	-1,23	-1,3	-1,26	-1,15
42MY 350µg/ml PK	1	+1,36	-1,3	-1,28	-1,14	-1,1
43MY 350µg/ml PK	-1,21	+1,15	-1,46	-1,41	-1,58	-1,18
44MY 350µg/ml PK	1	+1,29	-1,13	-1,28	-1,24	1
51MY 350µg/ml PK	+1,09	+1,11	-1,01	-1,13	-1,12	+1,07

Rakamlar hücre çoğalması değerlerinin kontrole oranını göstermektedir. (-): hücre çoğalmasının azalması; (+): Hücre çoğalmasının artması

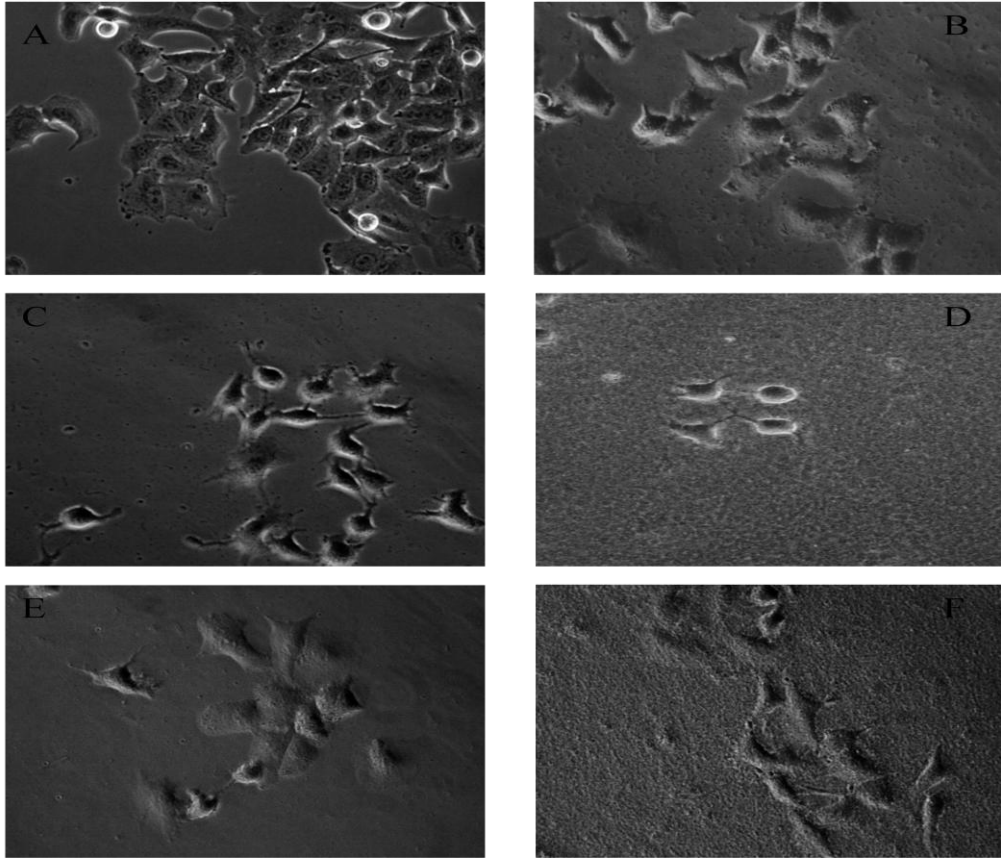
Hücre hatları üzerine uygulanan parasporal kristal proteinlerin etkisi hücre çoğalmasının kontrole oranı ile değerlendirilmiştir. Literatürde yapılan çalışmalarda da benzer şekilde uygulamalar mevcuttur. Ito vd. (2004) tarafından yapılan çalışmada; Bt A1547 suşuna ait parasporal proteini kodlayan gen, klonlama çalışmaları ile *E. coli*' ye aktarılmış ve toksin protein rekombinant olarak elde edilmiştir. Rekombinant toksin protein 10 µg/ml konsantrasyonunda HepG2 hücrelerine uygulanmış ve hücre çoğalmasını kontrole göre 5 kat azalttığı görülmüştür. Bu tez çalışması kapsamında kullanılan parasporal proteinlerden etkili olan proteinaz K ile muamele edilmiş 3T A-549 hücre çoğalmasını kontrole göre 2.19 kat azaltmıştır. Bu çalışmada Bt suşundan elde edilen kristal karışımı hücreler üzerine uygulanmıştır. Dolayısıyla, hücrelerin çoğalması üzerine etkisi rekombinant üretilen paraporal proteine oranla daha düşüktür. Benzer şekilde Mizuki

vd. (2000) tarafından yapılan çalışmada Bt 84-HS-1-11suşuna ait ve rekombinant olarak elde edilen parasporal kristal proteinlerin MOLT-4 hücrelerine etkilerine bakılmıştır. MOLT-4 hücreleriüzerinde EC₅₀ değerlerine bakıldığında; doğal suştan elde edilen kristal proteinin EC₅₀ değeri 36.6 µg/ml iken, rekombinant kristal proteinin 16.4 µg/ml olduğu görülmüştür. Diğer bir deyişle, rekombinant kristal proteinin doğal proteinden 2 kat daha etkili olduğu bulunmuştur.

3.5.3. Parasporal proteinlerin sitotoksik etkisinin inverted mikroskobu ile incelenmesi

Yapılan çalışmalar sonucunda kanser hücre hatları üzerinde hücre çoğalmasını azaltan parasporal proteinlerin etkisi bir inverted mikroskop kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla hücre hatları 2x10⁴ konsantrasyonda 24 kuyulu hücre kültürü kaplarında 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresince hücrelerin flask yüzeyine yapışması sağlanmıştır. 24 saat sonunda hücre hatları inverted mikroskop (40x) altında incelenmiştir. Daha sonra, ilgili parasporal proteinler hücrelerin üzerine eklenmiş ve 24 saat inkübasyonun ardından parasporal proteinlerin kanser hücre hatları üzerindeki etkisi inverted mikroskop ile incelenmiştir.

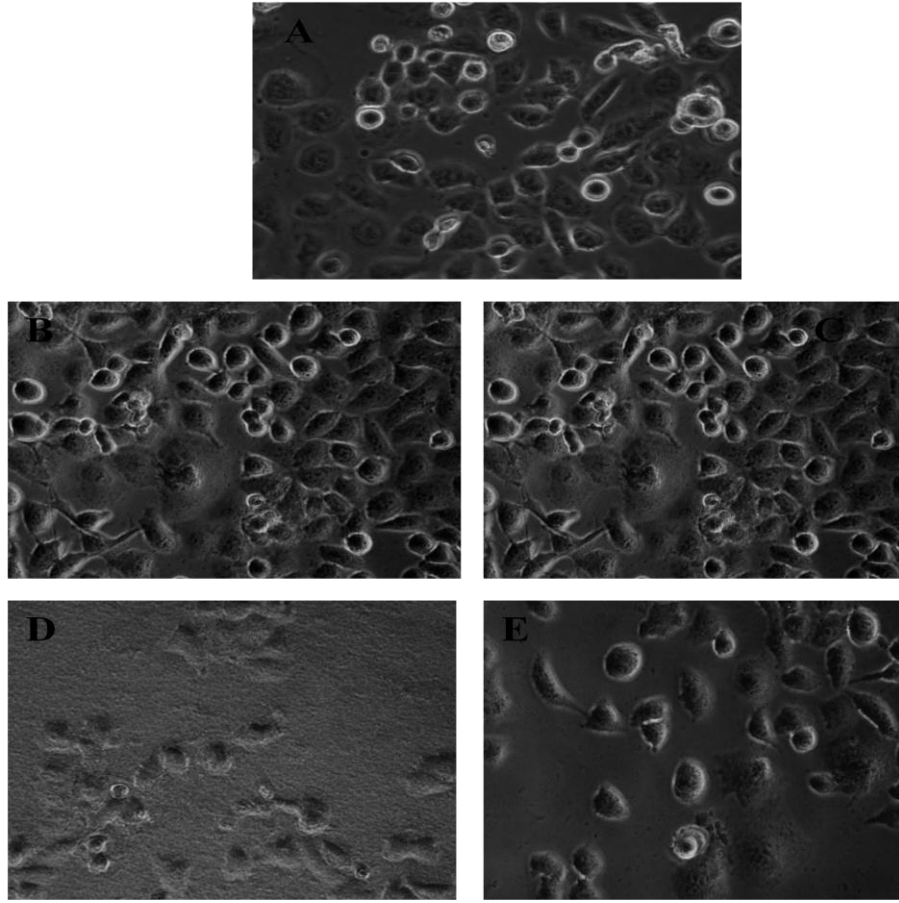
A-549 hücre hattı üzerinde hücre çoğalmasını azaltıcı yönde etki gösterdiği bilinen 10 µg/ml PK ile muamele edilmiş 3T, 11T ve 1 mg/ml Tr ile muamele edilmiş 11T parasporal proteinlerinin etkisi inverted mikroskop (40x) ile incelenmiştir. Cyt proteini içerdiğinden dolayı hemolitik olduğu bilinen *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* kontrol olarak kullanılmış ve hücre çoğalmasını azalttığı mikroskop altında yapılan incelemelerle de gösterilmiştir (Şekil 3.21 E ve F). Ayrıca her iki proteazla benzer sonuçlar verdiği görülmüştür. İncelemeler sonucunda 3T parasporal proteininin A-549 hücrelerinin çoğalmasını azalttığı ve hücrelerin balon şeklini aldığı ve çekirdeklerinin kaybolduğu görülmüştür (Şekil 3.21 A). Tripsin ve proteinaz K ile ayrı ayrı muamele edilmiş 11T parasporal proteininin iki formunun da benzer etki göstererek A-549 hücrelerinin çoğalmasını azalttığı ve hücrelerin balonlaşmasına neden olduğu görülmüştür (Şekil 3.21 A ve B). *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*’de ise sitopati; hücrelerin balonlaşması ile değil, şiddetli hücre lizisleri ile karakterize edilir (Şekil 3.21 E ve F).



Şekil 3.21. Bazı parasporal proteinlerin A549 hücrelerine etkisi

A: Toksin uygulanmamış, B: 3T (10 µg/ml PK), C: 11T (10 µg/ml PK), D: 11T (1 mg/ml Tr), E: Bt israelensis (10 µg/ml PK), F: Bt israelensis (1 mg/ml Tr), Görüntüler inverted mikroskobu ile 40x objektifle çekilmiştir.

DU-145 hücre hattı üzerinde etkili olduğu bilinen 22T (350 µg/ml PK ile muamele edilmiş) ve 3T (1mg/ml Tr ile muamele edilmiş) parasporal proteinlerinin hücreler üzerine etkisi inverted mikroskop altında (40x) incelenmiştir. Kontrol olarak *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* kontrol olarak kullanılmış ve hücre çoğalmasını şiddetli hücre lizisleri ile azalttığı mikroskop altında yapılan incelemelerle de gösterilmiştir (Şekil 3.22 D ve E). 22T ve 3T parasporal proteinlerinin DU-145 hücrelerinin çoğalmasını azalttıklarını ve hücrelerin balonlaşıp patlamalarına neden oldukları düşünülmektedir (Şekil 3.22B ve C)



Şekil 3.22. Bazı parasporal proteinlerin DU-145 hücrelerine etkisi

A: Toksin uygulanmamış, B: 3T (1 mg/ml Tr), C: 22T (350 µg/ml PK), D: Bt israelensis (10 µg/ml PK), E: Bt israelensis (1 mg/ml Tr), Görüntüler inverted mikroskobu ile 40x objektifle çekilmiştir.

İnverted mikroskobu kullanılarak gerçekleştirilen incelemeler sonucunda etkili kanser hücre hatlarına karşı hücre çoğalmasını azaltıcı yönde etki gösteren parasporal proteinlerin genellikle hücrelerin şişerek patlamasına yol açtığı ve dolayısıyla hücrelerin ölümüne neden olduğu düşünülmektedir.

4.SONUÇ VE ÖNERİLER

Bt gram (+), fakültatif anaerob ve spor oluşturan bir bakteridir. Sporulasyon sırasında insektisidal kristal proteinleri (ICP)'leri oluşturur. İnsektisidal kristal proteinler hedefe spesifik olarak etki ederek yalnızca belirli böcek türlerine etki gösterirken; insan, hayvan ve diğer omurgalılara karşı toksik etki göstermemektedir. Bundan dolayı tarımsal zararlılarda mücadelede uzun yıllardır kullanılmaktadır. İnsektisidal kristal proteinler Cry (kristal) ve Cyt (sitolitik) proteinlerinden oluşmaktadırlar. Bt doğada geniş bir dağılıma sahip olup; insektisidal olmayan Bt suşlarının insektisit olanlara göre daha yaygın bulunduğu bilinmektedir. Buradan yola çıkılarak Bt'nin insektisit aktivitesinin dışında yeni özellikler aranmış ve çalışmalar sonucunda yeni bir protein sınıfı olan parasporin ortaya çıkarılmıştır. Parasporinler, insektisidal olmayan Bt izolatlarından elde edilen, sitolitik özellikte olduğu için Cyt proteinlerini içermeyen ve ayrıcalıklı olarak kanser hücrelerine hedefe spesifik olarak etki eden insektisidal olmayan kristal proteinlerdir.

İnsektisidal olmayan Bt'ler doğada geniş bir dağılım gösterdiğinden dolayı yeni parasporinlerin bulunabilme olanağı yüksektir. Bu amaçla tez çalışmamızda koleksiyonumuzda bulunan Aydın ve çevresindeki incir alanlarından toplanmış olan 101'i toprak, 19'u meyve-yapraktan izole edilmiş olan toplam 120 izolat kullanılmış ve antikanser aktiviteleri incelenmiştir. Parasporal proteinler içerisinde hemolitik aktivitesinden dolayı tüm hücrelerde sitolitik etkiye neden olan *cyt* proteinlerinin bulunmaması gerekmektedir. Bu nedenle çalışmamızın ilk basamağında izolatların plazmit DNA'larının izolasyonunun ardından, *cyt1* ve *cyt2* olmak üzere iki primer kullanılarak PCR analizleri ile *cyt* geni içermeyen izolatlar belirlenmiştir. 101 toprak izolatının 19'u *cyt2* geni içerdiği belirlenirken, meyve-yaprak izolatlarında *cyt* genine rastlanılmamıştır. Başka bir deyişle tüm izolatların % 15.8'i *cyt2* geni taşıırken, izolatların hiçbirinde *cyt1* geni saptanmamıştır. Çalışmanın daha sonraki aşamalarında *cyt* geni içeren izolatlar kullanılmamıştır.

Bir sonraki aşamada ise insektisidal olmayan kristal proteinler de insektisidal olanlar gibi alkali koşullarda ve proteazlarla kesime uğradıktan sonra aktif hale geldikleri

için parasporal protein ekstraksiyonundan sonra bu basamaklar gerçekleştirilmiştir. Tripsin (son konsantrasyon 1, 5, 10 mg/ml) ve proteinaz K (son konsantrasyon 10 ve 350 µg/ml) aktivasyon işleminde farklı konsantrasyonlarda kullanılmıştır. Aktiflenen parasporal proteinler K562 (kronik miyeloid lösemi), CCC-221 (kolon kanseri), PC-3 (prostat kanseri), DU-145 (prostat kanseri), A549 (akciğer kanseri) ve MCF-7 (meme kanseri) olmak üzere altı farklı kanser hücre hattına ve bir sağlıklı epitelyum hücreye (BEAS-2B) uygulanmıştır.

Bu tez çalışması kapsamında amacımız elimizde bulunan tüm izolatların antikanser aktivitesini taramak olduğundan dolayı rastgele seçilen izolatlara ait parasporal proteinler hücre hatları üzerine uygulanmıştır. Çalışmalar sırasında cry gen içerip cyt geni içermeyen izolatlar kullanılmıştır. Bu izolatlardan elde edilen parasporal proteinler tripsin ve/veya proteinaz K ile çözüldükten sonra hücrelere uygulanmış ve etkilerine bakılmıştır.

Deneyler sonucunda her iki enzim aktivasyonunda parasporal proteinlerin hücre çoğalmasında benzer sonuçlar verdiği; ancak bazı durumlarda izolat tipine ve kullanılan hücre hattına bağlı olarak her iki enzimden birinin daha etkili olduğu gösterilmiştir. Örneğin 1mg/ml Tr ile muamele edilen 10T izolatına ait parasporal protein BEAS-2B hücre çoğalmasını kontrole göre anlamlı olarak arttırırken; 10µg/ml proteinaz K uygulanan 10T parasporal proteini ise BEAS-2B hücre çoğalmasını kontrole göre anlamlı olarak etki etmemiştir.

Ayrıca proteinaz K'nın artan konsantrasyonlarının (350µg/ml) genellikle hücre çoğalmasını azalttığı ancak bununla birlikte sağlıklı epitelyum hücrelerinde de çoğalmasını azalttığı kaydedilmiştir. 48MY, 6T ve 21T parasporal proteinleri 350 µg/ml proteinaz K ile aktive edildiğinde BEAS-2B hücre çoğalmasını kontrole göre sırasıyla; 2.58, 1.65 ve 1.16 kat azaltmıştır. Tripsin de 10 mg/ml olarak proteinlere uygulandığında benzer şekilde tüm hücrelerin çoğalmasını azaltıcı yönde etki göstermiştir (Çizelge 3.3). Tripsinin 1 ve 5 mg/ml'lik diğer iki konsantrasyonu birbirlerine benzer etkiler göstermişlerdir (Çizelge 3.3).

Hücre hatlarına uygulanan parasporal proteinlerin hücre tipine bağlı olarak hücre çoğalmasını arttırdığı, azalttığı ya da etki etmediği görülmüştür. Genellikle yüksek proteinaz K (350µg/ml) ve tripsin (10mg/ml) konsantrasyonunda aktive edilen parasporal proteinler BEAS-2B hücre çoğalmasının azalmasına neden olmuştur.

Bunun aksine 1 ve 5 mg/ml tripsin ile 10µg/ml proteinaz K uygulandığında BEAS-2B hücre çoğalmasının genellikle arttığı belirlenmiştir.

K-562 hücre çoğalmasını en fazla azaltan 350 µg/ml proteinaz K ile muamele edilmiş 28T parasporal proteini olup hücre çoğalmasını kontrole göre 1.78 kat azaltmıştır. K-562 literatürdeki çalışmalarda genellikle etkili bulunmamıştır.

CCC-221 hücrelerinin çoğalmasını en fazla azaltan 10µg/ml proteinaz K ile aktive edilmiş 3T parasporal proteini hücre çoğalmasını kontrole göre 2.04 kat azaltmıştır. Literatürde kolon kanseri hücre hattı olarak genellikle CACO-2 kullanılmış ve bazı parasporal proteinlerin bu hücre hattına üzerine etkili olduğu bildirilmiştir.

DU-145 hücre hattına uygulanan en etkili protein kontrole göre hücre çoğalmasını 1.86 kat azaltan 1mg/ml tripsin ile muamele edilmiş olan 22T parasporal proteindir. Prostat kanseri hücreleri olan PC-3 ve DU-145 hücrelerine önemli derecede etki eden bir parasporal protein belirlenememiştir. Literatürde yer alan çalışmalarda prostat kanseri hücreleri ile ilgili uygulamalar bulunmamaktadır.

Akciğer kanseri hücre hattı olan A549 genellikle parasporal proteinlerin en fazla etki gösterdiği hücre hattı olmuştur. Hücre çoğalmasını en fazla azaltan protein 1 mg/ml tripsin ile çözülmüş olan 11T parasporal proteini olup kontrole göre hücre çoğalmasını 2.19 kat azaltmıştır. Meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 üzerine sekiz proteinin 10µg/ml proteinaz K ve 1 mg/ml tripsin konsantrasyonları ayrı ayrı denenmiş ve belirgin bir sonuç elde edilemediği için çalışmaların devamında kullanılmamıştır. Bu hücre hattı literatürde yapılan çalışmalarda da etkili bulunmamıştır.

A549 ve DU-145 hücrelerin çoğalmasını azaltan 3T, 11T ve 22T parasporal proteinlerinin hücreler üzerindeki etkisi inverted mikroskop ile incelenmiştir. İncelemeler sonucunda *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*'in Cyt protein içermesinden dolayı tüm hücrelerde aynı etkiyi göstererek ölmelerine neden olmuştur. Hem proteinaz K hem de tripsin ile muamele edildiğinde benzer sonuçlar gözlenmiştir. İncelenen diğer parasporal proteinlerinde ilgili kanser hücreleri üzerinde hücrelerin balonlaşarak, patlamasına ve dolayısıyla ölmelerine neden olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak, bazı parasporal proteinlerin kanser hücre hatlarının çoğalmasını azaltması yönündeki etkilerinin hücre tipine göre farklılık gösterdiği ve bu etkinin

kontrole göre 1.0 ile 2.19 kat arasında değiştiği tespit edilmiştir. Bu bağlamda en etkili parasporal protein üreten Bt suşunun 3T, 22T ve 11T olduğu ve CCC-221, DU-145 ve A-549 hücre hatları üzerinde hücre çoğalmasını sırasıyla 2.04, 1.86 ve 2.19 kat azalttığı bulunmuştur. Buna karşın, bazı Bt suşlarından elde edilen parasporal proteinlerin ise bazı hücre hatlarında hücre çoğalmasını arttırıcı yönde etkiler sağladığı görölmüştür. Ayrıca, parasporal proteinlerin aktivasyonu konusunda tripsine kıyasla proteinaz K'nın daha etkili olduğu kaydedilmiştir. Ancak proteinaz K'nın etkili olduğu konsantrasyonlarda sağlıklı epitelyum hücresi olan Beas-2B hücrelerinin çoğalmasında azalma meydana geldiği görölmüştür.

Gelecek çalışmalarda, kanser hücre çoğalmasını azaltıcı etki gösteren parasporal proteinlerin “anti-kanser” ilaç adayları arasına girebilmesi için detaylı biyokimyasal karakterizasyonlarına ve hücre çoğalmasını nasıl azalttığını belirleyen etki mekanizmalarının arştırılmasına ihtiyaç vardır. Belirli hücre hatlarında etkili olan parasporal proteinlerin bağlanma reseptörlerinin belirlenmesi, reseptörü hedef alan anti-kanser ilaçların dizaynında önemli katkı sağlayacaktır. Özellikle, parasporal proteinlerin hastalar üzerine doğrudan uygulanması bazı immünolojik reaksiyonlara neden olabileceğinden, bağlanma reseptörlerinin belirlenmesi ayrıcalıklı bir önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Aboussaid, H., Vidal-Quist, J.C., Oufdou, K., El Messoussi, S., Castanera, P., Gonzalez-Cabrera, J. (2011) Occurrence characterization and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from argan fields in Morocco, *Environ technol*, 12: 1383-1391.
- Apaydın, Ö., Yenidünya, A.F., Harsa, S., Güneş., H. (2005) Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from different grain habitats in Turkey, *World J Microbiol Biotechnol*, 21: 285-292.
- Arrieta, G., Hernandez, A., Espinoza, A. M. (2004) Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from coffee plantations infested with the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*, *Rev Biol Trop*, 52 (3): 757-764.
- Bauer, L.S. (1995) Resistance: a threat to the insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*, *Florida entomol*, 78: 414- 443.
- Beecher, D.J., MacMillan, J.D. (1991) Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*, *Infect Immun*, 59: 1778- 1784.
- Ben- Dov, E., Zaritsky, A., Dahan, E., Barak, Z., Sinal, R., Manasherob, R., Khamraev, A., Troitskaya, E., Dubitsky, A., Berezina, N., Margalith, Y. (1997) Extended screening by PCR for seven cry-group genes from field collected strains of *Bacillus thuringiensis*, *Appl Environ Microbiol*, 63: 4883-4890.
- Bernhard, K., Jarrett, P., Meadows, M., Butt, J., Ellis, D.J., Roberts, G.M., Pauli, S., Rodgers, P., Burges, H.D. (1997) natural isolates of *bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization, and activity against insect pests, *J Invertebr Pathol*, 70 (1): 59-68.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem*, 72: 248-254.
- Bravo, A., Gill, S.S, Soberon, M. (2005) *Bacillus thuringiensis* mechanism and use in: comprehensive molecular insect science, 175-206, *Elsevier BV*.

- Bravo, A., Gill, S.S., Soberon, M. (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control, *Toxicon*, 49: 423-435.
- Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S.S., Soberón, M. (2011) *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide, *Insect Biochem Mol Biol*, 41 (7): 423- 431.
- Bravo, A., Sarabia, S., Lopez, L., Ontiveros, H., Abarca, C., Ortiz, A., Ortiz, M., Lina, L., Villalobos, F.J., Peña, G., Nuñez- Valdez, M., Soberón, M., Quintero, R. (1998) Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection, *Appl Environ Microbiol*, 64: 4965- 4972.
- Butko, P. (2003) Cytolytic toxin Cyt1A and Its mechanism of membrane damage: data and hypotheses, *Appl Environ Microbiol*, 69 (5): 2415-2422.
- Carlson, C.R., Caugant, D.A., Kolstø, A.B. (1994) Genotypic diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains, *Appl Environ Microbiol*, 60: 1719- 1725.
- Carlson, C.R. and Kolstø, A.B. (1993) A complete physical map of *Bacillus thuringiensis* chromosome, *J Bacteriol*, 175: 1053-1060
- Crickmore, N., Zeigler, D. R., Schnepf, E., Van-Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Bravo, A., Dean, DH. (2010) *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature, http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/
- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Dean, DH. (1998) Revision of nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins, *Microbiol Mol Biol Rev*, 62: 807-813.
- Dai, S., Gao, M., Li, X., Li, R. (1996) Distribution of *Bacillus thuringiensis* in soils of north and south of China, *Acta Microbiol*, 36: 295- 302.
- Damgaard, P. H., Larsen, H. D., Hansen, B. M., Bresciani, J., Jorgensen, K. (1996) Enterotoxin producing strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from food, *Lett Appl Microbiol*, 23: 146-150.
- Donovan, W.P., Donovan, J.C., Engleman, J.T. (2001) Gene knockout demonstrates that *vip3A* contributes to the pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* toward *Agrotis ipsilon* and *Spodoptera exigua*, *J. Invertebr. Pathol*, 78: 45- 51.

- Espinasse, S., Gohar, M., Chaufaux, J., Buisson, C., Perchat, S., Sanchis, V. (2002a) Correspondance of high levels of β -exotoxin I and presence of cryIB in *Bacillus thuringiensis*, *Appl. Environ. Microbiol*, 68: 4182-4186.
- Espinasse, S., Gohar, M., Lereclus, D., Sanchis, V. (2002b) An ABC transporter from *Bacillus thuringiensis* is essential for β -exotoxin I production, *J. Bacteriol*, 184: 5848-5854.
- Estruch, J.J., Warren, G.W., Mullins, M.A., Nye, G.J., Craig, J.A., Koziel, M.G. (1996) Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against Lepidopteran insects, *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 5389-5394.
- Fang, J., Xu, X., Wang, P., Zhao, J., Shelton, A., Cheng, J., Feng, M., Shen, Z. (2007) Characterization of chimeric *Bacillus thuringiensis* Vip3 toxins, *Appl Environ Microbiol*, 73 (3): 956-961.
- Farkas, J., Sebesta, K., Horska, K., Samek, Z., Dolejs, L., Sorm, F. (1976) Structure of thuringiensin, the thermostable exotoxin from *Bacillus thuringiensis*, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 42: 909-929.
- Farkas, J., Sebesta, K., Horska, K., Samek, Z., Dolejs, L., Sorm, F. (1969) The structure of the exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *Gelechia*, *Collect. Czech. Chem. Commun*, 34: 1118-1120.
- Feitelson, J.S., Payne, J., Kim, L. (1992) *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond, *Nat Biotechnol*, 10: 271- 275.
- Ferre, J. ve Van Rie, J. (2002) Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*, *Annu Rev Entomol*, 47: 501- 533.
- Gill, S.S., Sing G.J.P., Hornung J.M. (1987) Cell membrane activation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* cytolytic toxins, *Infect Immun*, 55: 1300-1308.
- Gill, S.S., Cowles, E.A., Pietranto, P.V. (1992) The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins, *Annu Rev Entomol*, 37: 615-636.
- Glare, T.R., O' Callaghan, M. (2000) *Bacillus thuringiensis*: Biology, ecology and safety. Chichester, New York, 350s.

- Glazer, A.N., Nikaido, H. (1995) Microbial insecticides, 209-229, *Microbial Biotechnology Fundamentals of Applied Microbiology*, W.H. Freeman and Company, New York, 554s.
- Gould, F. (1998) Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology, *Annu Rev Entomol*, 47: 501-533.
- Granum, P.E., O'Sullivan, K., Lund, T. (1999) The sequence of the non-hemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*, *FEMS Microbiol Lett*, 177: 225-229.
- Guerchicoff, A., Delécluse, A., Rubinstein, C.P. (2001) The *Bacillus thuringiensis* cyt genes for the hemolytic endotoxins constitute a gene family, *Appl Environ Microbiol*, 67: 1090-1096
- Han, S., Craig, J.A., Putnam, C.D., Carozzi, N.B., Tainer, J.A. (1999) Evolutionary mechanism from structures of and ADP-ribosylating toxin and NAD complex, *Nat Struct Biol*, 6: 932-936.
- Hansen, B.M., Hendriksen, N.B. (2001) Detection of enterotoxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis, *Appl Environ Microbiol*, 67: 185-189.
- Heiss, P., Bernatz, C., Bruchelt, G., Senekowitsch-Schmidtke, R. (1997) Cytotoxic effect of immunoconjugate composed of glucose-oxidase coupled to an anti-ganglioside (G_{D2}) antibody on spheroids, *Anticancer Res*, 17: 3177-3178.
- Helgason, E., Økstad, O.A., Caugant, D.A., Johansen, H.A., Fouet, A., Mock, M., Hegna, I., Kolstø, A.B. (2000) *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*- one species on the basis of genetic events, *Appl Environ Microbiol*, 66: 2627-2630.
- Hernandez, C.S., Ferre, J., Larget-Thiery, I. (2001) Update on the detection of β -exotoxin in *Bacillus thuringiensis* strains by HPLC analysis, *J Appl Microbiol*, 90: 643-647.
- Hill, K.K., Ticknor, L.O., Okinaka, R.T., Asay, M., Blair, H., Bliss, K.A., Laker, M., Pardington, P.E., Richardson, A.P. vd. (2004) Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* isolates, *Appl Environ Microbiol*, 70: 1068-1080.

- Hofmann, C., Lüthy, P., Pliska, V. (1988) Binding of the delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush border membrane vesicles of cabbage butterfly (*Pieris brassicae*), *Eur. J. Biochem*, 173: 85-91.
- Höfte, H., Whiteley H. R. (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*, *Microbiol Rev*, 53: 242–255.
- Ichimatsu, T., Mizuki, E., Nishimura, K., Akao, T., Saitoh, H., Higuchi, K., Ohba, M. (2000) Occurrence of *Bacillus thuringiensis* in fresh water of Japan, *Curr Microbiol*, 40: 212- 217.
- Ito, A., Sasaguri, Y., Kitada, S., Kusaka, Y., Kuwano, K., Masutomi, K., Mizuki, E., Akao, T., Ohba, M. (2004) A *Bacillus thuringiensis* crystal protein with selective cytotoxic action to human cells, *J Biol Chem*, 279: 21282- 21286.
- Jensen, G.B., Hansen, B.M., Eilenberg, J., Mahillon, J. (2003) The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives, *Environ Microbiol*, 5: 631- 640.
- Johnson, D.E., Peterson, R.E. (1983) Limitations of HPLC for the detection of β -exotoxin in culture filtrates of *Bacillus thuringiensis*, *Eur J Appl Microbiol Biotechnol*, 17: 231-234.
- Jung, Y.C., Mizuki, E., Akao, T., Cote, J.C. (2007) Isolation and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* strain expressing a novel crystal protein with cytotoxic activity against human cancer cells, *J Appl microbiol*, 103: 65-79.
- Katayama, H., Kusaka, Y., Yokota, H., Akao, T., Kojima, M., Nakamura, O., Mekada, E., Mizuki, E. (2007) Parasporin-1 a novel cytotoxic protein from *Bacillus thuringiensis*, induces Ca^{++} influx and a sustained elevation of the cytoplasmic Ca^{++} concentration in toxin- sensitive cells, *J Biol Chem*, 282: 7742- 7752.
- Katayama, H., Yokota, H., Akao, T., Nakamura, O., Ohba, M., Mekada, E., Mizuki, E. (2005) Parasporin-1 a novel cytotoxic protein to human cells from non-insecticidal parasporal inclusions of *Bacillus thuringiensis*, *J Biochem*, 137: 17-25.
- Kitada, S., Abe, Y., Shimada, H., Kusaka, Y., Matsuo, Y., Katayama, H., Okumura, S., Akao, T., Mizuki, E., Kuge, O., Sasaguri, Y., Ohba, M., Ito, A. (2006) Cytotoxic actions of parasporin-2 an antitumor crystal toxin from *Bacillus thuringiensis*, *J Biol Chem*, 281: 26350- 26360.

- Klimowicz, A. K., Benson, T.A., Handelsman, J. (2010) A quadruple- enterotoxin-deficient mutant of *Bacillus thuringiensis* remains insecticidal, *Microbiology*, 156: 3575- 3583.
- Knowless, B.H. (1994) Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal delta-endotoxins, *Adv Insect Physiol*, 24: 27-308.
- Kotiranta, A., Lounatmaa, K., Haapasalo, M. (2000) Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections, *Microbes Infect*, 2: 189- 198.
- Krishnan , K., Ker, J.E.A., Mohammed, S.M., Nadarajah, V.D. (2010) Identification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a binding protein for a 68 kDa *Bacillus thuringiensis* parasporal protein cytotoxic against leukemic cells, *J Biomed Sci*, 17: 86.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227: 680-685.
- Lee, M.K., Walters, F.S., Hart, H., Palekar, N., Chen, J.-S. (2003) The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein vip3A differs from that of Cry1Ab δ - endotoxin, *Appl Environ Microbiol*, 67: 5328-5330.
- Levinson, B.L., Kaysan, K.J., Chiu, S.S., Currier, T.C., Gonzalez Jr, J.M. (1990) Identification of β -exotoxin production plasmids encoding β -exotoxin and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high performance liquid chromatography, *J Bacteriol*, 172: 3172-3179.
- Li, R., Dai, S., Li, X., Luo, C., Sheng, Z., Sun, M. (1990) Survey of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* from soils of four provinces of China and their principle biological properties, *Acta Microbiol*, 30: 380- 388.
- Lopez-Meza, J.E., Ibarra, J.E. (1996) Characterization of a novel strain of *Bacillus thuringiensis*, *Appl Environ Microbiol*, 62: 1306-1310.
- Lund, T., De Buyser, M-L., Granum, P.E. (2000) A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that cause necrotic enteritis, *Mol Microbiol*, 38: 254-261.
- Maagd, R., Van Der Klei, H., Bakker, P.L., Stiekema, W.J., Bosch, D. (1996) Different domains of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins can bind to insect midgut membrane proteins on ligand blots, *Appl Environ Microbiol*, 62:2753-2757.

- Maagd, Ruud A., Bravo, A., Crickmore, N. (2001) How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world, *Trends Genet*, 4 (17): 193-199.
- McClintock, J., Schaffer, C.R., Sjoblad, R.D. (1995) A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis* based pesticides, *Pestic Sci*, 45: 95-105.
- Michelet, N., Granum, P.E., Mahillon, J. (2006) *Bacillus cereus* enterotoxins bi- and tri-component cytolytins and other haemolysins, 779-790, *The comprehensive source book of bacterial toxins*, Academic Press, London.
- Mizuki, E., Ohba, M., Akao, T., Yamashita, S., Saitoh, H., Park, Y.S. (1999) Unique activity associated with non- insecticidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions: *in vitro* cell- killing action on human cancer cells, *J Appl Microbiol*, 86: 477-486.
- Mizuki, E., Park, Y.S., Saitoh, H., Yamashita, S., Akao, T., Higuchi, K., Ohba, M. (2000) Parasporin a human leukemic cell- recognizing parasporal protein of *Bacillus thuringiensis*, *Clin Diagn Lab Immunol*, 7: 624- 634.
- Nagamatsu, Y., Okamura, S., Saitou, H., Akao, Y., Mizuki, E. (2010). Tree Cry toxins in two types from *Bacillus thuringiensis* strain M019 preferentially kill human hepatocyte cancer and uterus cervix cancer cells, *Biosci Biotechnol Biochem*, 74 (3): 494- 498.
- O'Sullivan, D.J. ve Klaenhammer, T.R. (1993) Rapid mini-prep. isolation of highquality plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* sp., *Appl Environ Microbiol*, 59: 2730-2733.
- Ohba, M. ve Aizawai, K., (1986) Distribution of *Bacillus thuringiensis* in soils of Japan, *J Invertebr Pathol*, 47: 277-282.
- Ohba, M., Mizuki, E., Uemori, A. (2009) Parasporin, a new group of anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*, *Anticancer Res*, 29: 427- 434.
- Ohba, M., Wasano, N., Mizuki, E. (2000) *Bacillus thuringiensis* soil populations naturally occurring in the Ryukus a subtropic region of Japan, *Microbiol Res*, 155: 17- 22.

- Okumura, S., Saitoh, H., Ishikawa, T., Wasano, N., Yamashita, S., Kusumoto, K., Akao, T., Mizuki, E., Ohba, M., Inouye, K. (2005) Identification of a novel cytotoxic protein Cry45Aa from *Bacillus thuringiensis* A1470 and its selective cytotoxic activity against various mammalian cell lines, *J Agric Food Chem*, 53: 6313- 6318.
- Parker, M.W., Feil, S.C. (2005) Pore Forming Protein Toxins from Structure to Function. *Progr Biophys Mol Biol*, 88: 91-142.
- Pepit, L., Gibert, M., Gillet, D., Laurent-Winter, C., Bouquet, P., Popoff, M.R. (1997) *Clostridium perfringens* epsilon-toxin acts on MDCK cells by forming a large membrane complex, *J Bacteriol*, 179: 6480- 6487.
- Perani, M., Bishop, A. H., Vaid, A. (1998) Prevalance of β -endotoxin in natural isolates of *Bacillus thuringiensis*, *FEMS Microbiol Lett*, 160: 55-60.
- Priest, F.G. (1993) Systematics and ecology of *Bacillus*, 3-16, Hoch J.A., Losick, R., *Bacillus subtilis and other gram positive bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular genetics*, ASM Press, Washington.
- Promdonkoy, B., Ellar, D.J. (2003) Investigation of the Pore Forming Mechanism of a Cytolytic δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*, *Biochem J*, 374: 255-259.
- Ryan, P.A., Macmilan, J.D., Zilinskas, B.A. (1997) Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L₁ and L₂ component of hemolysin BL from *Bacillus cereus*, *J Bacteriol*, 179: 2551-2556.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van-Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., Dean, D.H. (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins, *Microbiol Mol Biol R*, 62: 775-806
- Sebesta, K., Horska, K. (1970) Mechanism of inhibition of DNA-dependent RNA polymerase by exotoxin of *Bacillus thuringiensis*, *Biochem Biophys Acta*, 209: 357-376.
- Smith, R.A., Couche, G.A. (1991) The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants, *Appl Environ Microbiol*, 57: 311-315.
- Stabb, E.V., Jacobson, L.M., Handelsman, J. (1994) Zwittermycin A-producing strains of *B. cereus* from diverse soils, *Appl Environ Microbiol*, 60: 4404-4412.

- Thomas, W.E., Ellar, D.J. (1983) Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* insecticidal δ -endotoxin, *FEBS Let*, 154: 362-368
- Tsuzuki, K., Kimura, K., Fujii, N., Yokosawa, N., Indoh, T., Murakami, T., Oguma, K. (1990) Cloning and complete nucleotide sequence of the gene for the main component of hemagglutinin produced by *Clostridium botulinum* type C, *Infect Immun*, 58: 253173- 3177.
- Warren, G.W. (1997) Vegetative insectisidal proteins: novel proteins for control of pests, 109- 121, Carozzi, N.B. ve Koziel, M.G. (editörler), *Advances in insect control: the role of transgenic plants*, Taylor & Francis London, United Kingdom.
- Wong, R.S.Y., Mohamed, S.M., Nadarajah, V.D., Tengku, I.A.T. (2010) Characterization of the binding properties of *Bacillus thuringiensis* 18 toxin on leukaemic cells, *J Exp Clin Canc Res*, 29: 86.
- Wu, Y., Gao, M., Dai, S., Yi, D., Fan, H. (2008) Investigation of the cyt gene in *Bacillus thuringiensis* and the biological activities of Bt isolates from the soil of China, *Biol control*, 47: 335-339.
- Yamashita, S., Katayama, H., Saitoh, H., Akao, T., Park, Y.S., Mizuki, E., Ohba, M., Ito, A. (2005) Typical three domain Cry proteins of *Bacillus thuringiensis* strain A1462 exhibit cytotoxic activity on limited human cancer cells, *J Biochem*, 138: 663- 672.
- Yu, C.G., Mullins, M.A., Warren, G.W., Koziel, M.G., Estruch, J.J. (1997) The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects, *Appl Environ Microbiol*, 63: 532- 536.

<http://bacillusthuringiensis.pbworks.com/w/page/9916082/History>

Ek A. Kullanılan Kimyasallar

3-4,5- dimetil- 2- tiazolil (MTT)	Applichem
Agar agar	Merck
Agaroz	Sigma
Akrilamid	Sigma
Amonyum asetat	Applichem
Amonyum per sülfat (APS)	Applichem
Bakteriyolojik pepton	Oxoid
Bisakrilamid	Applichem
Borik asit	Applichem
Coomassie brilliant blue G-250	Applichem
D (+)-Sukroz	Applichem
Dimetil sülfoksid (DMSO)	Applichem
di-Sodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4)	Applichem
dNTP Set	Fermentas
EDTA	Applichem
Etanol	Applichem
Ethidium Bromide	Applichem
Fenilmetilsülfonilflorid (PMSF)	Sigma
Fenol	Applichem
Fetal bovin serum (FBS)	Biochrom
Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder	Fermentas
Gliserol	Applichem
Isoamilalkol	Applichem
Isopropanol	Merck
İmmersiyon yağı	Applichem
Kloroform	Merck
Lizozim	Applichem
Magnezyum klorid heksahidrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	Applichem
Maya ekstraktı	Merck
Nutrient broth	Merck

Penisilin-streptomisin antibiyotik	Biochrom
Proteinaz K	Applichem
Sodyum asetat	Sigma
Sodyum di-Hidrojen fosfat (NaH_2PO_4)	Merck
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Applichem
Sodyum hidroksid (NaOH)	Merck
Sodyum klorid (NaCl)	Applichem
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Fermentas
Tetra metil etilen diamin (TEMED)	Applichem
Tripsin	Applichem
Tripsin %0,25 w/v	Biochrom
Tripton	Applichem
Trizma Base	Sigma
Trypan blue	Sigma

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad Soyad :Müjgan KESİK OKTAY

Uyruk : T.C.

Doğum Yeri ve Tarihi: 18/12/1986

Medeni Hali :Evli

Telefon : 0 506 388 8485

E-posta : mujgank@mu.edu.tr

Eğitim

Alınan Derece	Aldığı Kurum/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lise	İskenderun Demir-Çelik Anadolu Lisesi	2004
Lisans	Gaziantep Üniversitesi	2009
Yüksek Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2013

İş Tecrübesi

Yıl	Yer	Pozisyon/görev
2010-	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	Arş. Görevlisi

Yabancı Dil

Dil (İngilizce)	Başlangıç	Orta	İleri
Yazma		X	
Konuşma		X	
Anlama			X
Okuma			X