

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞ VİRÜSÜ KELKİT SUŞU GC  
GLİKOPROTEİNİNİN ÖKARYOTİK EKSPRESYON SİSTEMİNDE  
ÜRETİLMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Filiz GÜNEY**

**Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

**Biyoteknoloji Tezli Yüksek Lisans Programı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet Ziya DOYMAZ**

**HAZİRAN 2019**

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞ VİRÜSÜ KELKİT SUŞU GC  
GLİKOPROTEİNİNİN ÖKARYOTİK EKSPRESYON SİSTEMİNDE  
ÜRETİLMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Filiz GÜNEY  
(160305010)**

**Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

**Biyoteknoloji Tezli Yüksek Programı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet Ziya DOYMAZ**

**HAZİRAN 2019**

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 160305010 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Filiz GÜNEY, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “Kırım Kongo Kanamalı Ateş Virüsü Kelkit Suşu Gc Glikoproteininin Ökaryotik Ekspresyon Sisteminde Üretilmesi” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

**Tez Danışmanı :** **Prof.Dr. Mehmet Ziya DOYMAZ** .....  
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

**Jüri Üyeleri :** **Doç. Dr. Fahri AKBAŞ** .....  
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

**Prof. Dr. Arif KAYGUSUZ** .....  
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

**Teslim Tarihi** : **26 Temmuz 2019**  
**Savunma Tarihi** : **26 Haziran 2019**



*Aileme,*

## ÖNSÖZ

Yüksek Lisans tez çalışmam sürecinde yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen ve çalışmamın her aşamasında maddi manevi desteği ile yanımda olan, her sorumu büyük bir sabır ve özveri ile yanıtlayan çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet Ziya DOYMAZ'a,

Tezimin her aşamasında fikir ve tecrübelerini benimle paylaşan laboratuvarında desteklerini hep hissettiğim çalışma arkadaşlarım Dr. Elif KARAASLAN, Msc. Merve YAZICI, Msc. Nesibe Selma ÇETİN ve Msc. Sevde HASANOĞLU'na Deneysel çalışmalarım sırasında ihtiyaç duyduğum her an özveri ile yanımda olan Dr. Beyza GÖNCÜ'ye,

Hayatım boyunca aldığım her kararda varlıklarını her an yanımda hissettiğim çok sevgili annem Canan GÜNEY, babam Yılmaz GÜNEY, kardeşlerim Sergen ve Eymen'e sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından 6.2017/28 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Haziran 2019

Filiz GÜNEY  
(Moleküler Biyolog)

## **BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Filiz GÜNEY

İmza

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖNSÖZ.....	iv
BEYAN.....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
KISALTMALAR .....	ix
TABLO LİSTESİ .....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
ÖZET.....	xi
SUMMARY .....	xiv
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER .....</b>	<b>4</b>
2.1 Kırım Kongo Kanamalı Ateşi .....	4
2.1.1 Tarihçe.....	6
2.1.2 Epidemiyoloji.....	6
2.1.3 Etken .....	8
2.1.4 Bulaş.....	8
2.1.5 Klinik Bulgular .....	10
2.1.6 Patogenez .....	11
2.1.7 Tanı .....	12
2.1.7.1 Moleküler yöntemler.....	13
2.1.7.2 Serolojik yöntemler.....	13
2.1.8 Tedavi ve korunma yolları .....	14
2.2 Kırım Kongo Kanamalı Ateş Virüsü.....	15
2.3 Kırım Kongo Kanamalı Ateş Virüsünün Proteinleri.....	20
2.3.1 S Segment: Np ve NSs .....	20
2.3.2 M Segment: Glikoproteinler .....	21
2.3.3 L Segment: RNA Bağımlı RNA Polimeraz .....	22
2.4 Virüs Benzeri Yapılar .....	22
2.5 <i>Pichia pastoris</i> .....	23
2.5.1 Ökaryotik Ekspresyon Sisteminin Avantajları.....	24
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>26</b>
3.1 Malzemeler.....	26
3.2 Cihazlar .....	27

3.3 Çalışma Materyali .....	28
3.4 Besiyerlerinin Hazırlanması .....	28
3.4.1 LB broth hazırlanması .....	29
3.4.2 Low salt LB hazırlanması .....	29
3.4.4 Zeosinli yeast extract peptone dextrose besiyeri hazırlanması .....	29
3.4.5 Zeosinli yeast extract peptone dextrose katı besiyeri hazırlanması .....	29
3.4.6 <i>Buffered glycerol-complex medium</i> hazırlanması .....	29
3.4.7 <i>Buffered methanol-complex medium</i> hazırlanması .....	29
3.5 Çözelti ve Solüsyonların Hazırlanması .....	30
3.6.Klonlama .....	34
3.6.1 Kompetent <i>Escherichia coli</i> Top 10 hazırlanması .....	34
3.6.2 Klonlama vektörüne transformasyon .....	34
3.6.3 Polimeraz zincir reaksiyonu .....	35
3.6.4 Agaroz jel elektroforezi .....	45
3.7 DNA izolasyonu .....	36
3.8 Etanol presipitasyonu .....	37
3.8.1 İzole edilen DNA konsantrasyon ve kalite tayini .....	37
3.9 Plazmit linearizasyonu .....	38
3.9.1 Linearizasyon ürünlerinin konsantre edilmesi .....	38
3.10 Transfomasyon .....	38
3.10.1 Ekspresyon vektörünün elektroporasyon için hazırlanması .....	39
3.10.2 Elektroporasyon .....	41
3.11 Ekspresyon .....	39
3.12 Pürifikasyon .....	39
3.13 SDS PAGE ile analiz .....	39
3.13.1 Örneklerin SDS PAGE için hazırlanması .....	40
3.13.2 Ekspresyon ürünlerinin elektroforezi .....	40
3.13.3 Poliakrilamid jelin <i>Coomassie blue</i> ile boyanması .....	40
3.14 Western Blot ile analiz .....	41
3.15 EIA( <i>Enzyme-linked immuno sorbent assay</i> ) .....	42
<b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....</b>	<b>44</b>
4.1 Klonlama Stratejisi .....	44
4.2 Plazmit İzolasyonu .....	46
4.3 Plazmit Linearizasyonu .....	47
4.4 Ekspresyon Vektörüne Transformasyon .....	47
4.5 Gc Geninin <i>P. pastoris</i> 'te eksprese edilmesi .....	48
4.6 Ekspresyon ürünlerinin pürifiye edilmesi .....	48
4.7 Pürifikasyon Sonrası SDS-Page ile analiz .....	48
4.8 <i>Pichia pastoris</i> 'te üretilen Gc'nin Western Blot ile analizi .....	49
4.9 <i>Pichia pastoris</i> 'te üretilen Gc'nin EIA ile analizi .....	51
<b>5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....</b>	<b>54</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>57</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>59</b>



## KISALTMALAR

<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>AOX1</b>	: Alkol oksidaz- 1
<b>BSL-4</b>	: Biosafety level-4
<b>dk</b>	: dakika
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>EIA</b>	: Enzim Immuno Assay
<b>ER</b>	: Endoplazmik retikulum
<b>GPC</b>	: Glikoprotein prekürsör
<b>g</b>	: gram
<b>IL-1</b>	: interlökin-1
<b>IL-6</b>	: interlökin-6
<b>kDA</b>	: Kilodalton
<b>KKKA</b>	: Kırım Kongo Kanamalı Ateşi
<b>KKKAV</b>	: Kırım Kongo Kanamalı Ateş Virüsü
<b>M</b>	: Molar
<b>mA</b>	: Miliamper
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>NP</b>	: Nükleoprotein
<b>ORF</b>	: Open Reading Frame
<b>PZR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>RdRp</b>	: RNA Dependent RNA Polymerase
<b>RNA</b>	: Ribonükleik asit
<b>TBE</b>	: Tris Borik Asit-Etilen DiaminTetra Asetat
<b>TNF α</b>	: Tumor Necrosis Factor α
<b>UV</b>	: Ultraviyole
<b>V</b>	: Volt
<b>VLP</b>	: Virus Like Particle
<b>ISG-15</b>	: Interferon stimulated gene-15
<b>YNB</b>	: Yeast Nitrogen Base

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 3.1 :</b> Klonlama aşamalarında kullanılan PZR bileşenleri.....	35
<b>Tablo 3.2 :</b> Klonlama aşamalarında kullanılan PZR koşulları .....	35
<b>Tablo 3.3 :</b> <i>SacI</i> ile plazmit linearizasyon koşulları .....	37
<b>Tablo 4.1 :</b> <i>E. coli</i> Top 10'e transforme edilen Gc plazmitlerinin konsantrasyonu ..	46
<b>Tablo 4.2 :</b> <i>P. pastoris</i> 'te 120 saat devam eden ekspresyonun OD <sub>600</sub> değerleri.....	48

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 2.1 : KKKAV'nin coğrafi dağılımı. ....	7
Şekil 2.2 : KKKAV'nin bulaş yolları . ....	8
Şekil 2.3 : KKKAV'nin klinik seyri. ....	10
Şekil 2.4 : KKKAV'nin genomik yapısı. ....	14
Şekil 2.5 : KKKAV'nin segmentleri ve kodlanan proteinler. ....	15
Şekil 2.6 : KKKAV transkripsiyon ve replikasyon döngüsü.....	16
Şekil 2.7 : KKKAV glikoprotein işlenmesi ve ürünleri. ....	17

# KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞ VİRÜSÜ KELKİT SUŞU GC GLİKOPROTEİNİN ÖKARYOTİK EKSPRESYON SİSTEMİNDE ÜRETİLMESİ

## ÖZET

Kırım Kongo Kanamalı Ateş Virüsü (KKKAV) keneler aracılığı ile taşınan bir virüs olup Afrika, Asya, Doğu Avrupa ve Orta Doğu'da etkili olan mortalite oranı %30'lara ulaşabilen bir kanamalı ateş etkenidir. KKKAV, *Bunyaviridae* ailesinin *Nairovirus* cinsine ait olan zarflı, tek sarmallı, negatif polariteli bir RNA virüsüdür. Kene ile taşınan virüsler arasında en geniş coğrafi yayılıma sahip olması ve *Dengue* virüsten sonra medikal anlamda en önemli ikinci arbovirüs olması sebebi ile dikkat çekmektedir. *Bunyaviridae* ailesinin diğer üyelerinde olduğu gibi KKKAV'de üç adet yapısal protein barındırmaktadır. Üç segmentli bu virüsün small (S) segmentinden nükleoprotein, large (L) segmentinden RNA-bağımlı-RNA polimeraz, medium (M) segmentinden ise Gn ve Gc olmak üzere iki adet yapısal glikoprotein kodlanmaktadır. M segment open reading frame (ORF)' inden 1684 aminoasit uzunluğunda bir poliprotein üretilir. Ardından SKI-1 ve SKI-1 like proteaz ile Pre-Gn ve Pre-Gc ve posttranslasyonel kesimler sonucunda 37 kDa boyutunda Gn ve 75 kDa boyutunda Gc glikoproteinleri oluşmaktadır. Hücre yüzey reseptörleri ile etkileşime geçmeleri, virüsün konak hücreye girişini sağlamaları ve nötralizan antikorlar için hedef olmaları sebebi ile viral glikoproteinler virüslerin yaşam döngüsünde önemlidir. KKKAV'de nükleokapsit proteininin immunolojik özellikleriyle ilgili çalışmalar literatürde nispeten bulunmasına rağmen, bu virüsün glikoproteinleri Gn ve Gc'ye yönelik çalışmalar yeni yeni ortaya konmaya başlanmıştır.

Bu çalışmada KKKAV glikoproteinini Gc'ye karşı humoral immün yanıtın araştırılması için fonksiyonel bir rekombinant protein üretmek hedeflenmiştir. Bu amaçla *Pichia pastoris*'te üretilip saflaştırılan Kelkit suşuna özgü Gc'nin otantik antijeniteye sahip olduğu, KKKAV enfeksiyonu geçirmiş insan serumlarıyla yapılan Western blot ve

EIA testleriyle gösterilmiştir. Gc'nin antijenitesi tavşan ile yapılan deneylerle de gösterilmiştir. Çalışmamızın sonuçları *P. pastoris*'in KKKAV glikoproteini Gc'yi üretmek için uygun bir model organizma olduğunu göstermiştir.

Ayrıca KKKAV glikoproteini Gc'ye özgü antikorların KKKAV infeksiyonu geçirmiş hasta serumlarında ve inaktif virüs ile infekte tavşan serumu içerisinde bulunduğu tespit edilmiştir. *P. pastoris*'te rekombinant olarak üretilen Gc ile diyagnostik ve bağışıklama alanlarında daha ileri düzey işlevsel çalışmalar gerekmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Kırım Kongo Kanamalı Ateş Virüsü; glikoprotein; maya; *Pichia pastoris*

## **PRODUCTION OF CRIMEAN CONGO HEMORRHAGIC FEVER VIRUS GLYCOPROTEIN GC IN EUKARYOTIC EXPRESSION SYSTEM**

### **SUMMARY**

Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus is an important tick borne pathogen causing haemorrhagic fever with case fatality rate of up to 30%. The disease is gaining a wider dissemination throughout Africa, Eastern Europe and the Middle East, Eurasia and Asia. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus is a negative-sense RNA virus of the genus *Nairovirus* of the *Bunyaviridae* family. The geographic range within CCHF virus is the most extensive among the tickborne viruses affecting human health and the second most widespread of all medically important arboviruses after dengue viruses. The three genome segments encode four structural proteins—the RNA-dependent RNA polymerase (L protein) is encoded by the large (L) segment, the glycoproteins (Gn and Gc; previously referred to as G1 and G2) are encoded by the medium (M) segment, and the nucleocapsid protein (N) is encoded by the small (S) segment. Crimean Congo Hemorrhagic Fever Virus genome M segment encodes an unusually large (in comparison to members of other genera) polyprotein (1,684 amino acids in length) containing the two major structural glycoproteins, Gn and Gc, that are posttranslationally processed from precursors PreGn and PreGc by SKI-1 and SKI-1-like proteases, respectively. As the only virally encoded membrane proteins, Gn and Gc must interact with cell surface receptors, mediate the entry of virus into cells, and serve as targets for neutralizing antibodies. Although studies on the immunological properties of nucleocapsid protein in CCHFV have been found in the literature, studies on the glycoproteins Gc and Gn of this virus have yet to be scrutinized. In this study, we aimed to produce functional recombinant protein to be investigated humoral immune response against CCHFV Gc. For this purpose, GC from Kelkit strain produced and purified in *Pichia pastoris* and was tested in EIA and Western blot assays with CCHFV-infected human sera. In the studies, the authentic antigenicity of Gc was demonstrated in

humans and rabbits. Studies have shown that *P. pastoris* is a suitable model organism to produce CCHFV glycoprotein Gc.

Further studies conducted on the diagnostics and immunology of CCHFV with Gc produced in *P. pastoris* warranted.

**Keywords:** Crimean Congo Hemorrhagic Fever Virus; glycoprotein; yeast; *Pichia pastoris*



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) Orta Doğu, Asya, Afrika ve Güneydoğu Avrupa başta olmak üzere bir çok ülkede görülen viral bir infeksiyondur. Hastalık; miyalji, yüksek ateş, hemoraji, şok ve ölüm gibi hafiften şiddetliye çeşitli semptomlar ile seyredebilir. KKKA etkeni Kırım Kongo Kanamalı Ateş Virüsü (KKKAV) doğada iksodid keneler aracılığı ile taşınmasının yanısıra medikal anlamda önemli bir arbovirüs olması ve keneler aracılığı ile taşınan virüsler arasında en geniş coğrafi yayılıma sahip olması sebebi ile dikkat çekmektedir. Hastalığın mortalite oranı çeşitli faktörlere bağlı olarak % 5- 30 arasında değişmektedir [1, 2]. KKKAV'nin bazı hayvanlarda asemptomatik infeksiyonlara neden olurken yalnızca insana patojen olduğu bilinmektedir [3]. Virüs ile infekte kene ısırığı, infekte hayvan veya insanların vücut sıvıları ile direkt temas başlıca bulaş yolları arasındadır. KKKAV infeksiyonları etkili bir aşı ve tedavi yolunun bulunmaması sebebi ile önem arz etmektedir. KKKAV'nin insana patojen olmasından dolayı biyogüvenlik seviyesi 4 (BSL-4) laboratuvarlarda çalışmayı gerektirmektedir [4]. Bu durum virüs ile ilgili aşı ve tedavi çalışmalarını sınırlandırmaktadır. Ancak son yıllarda KKKAV patogenezinde önemli gelişmeler kaydedilmiştir [1]. Bir çok kene cinsinin KKKAV taşıyıcısı olduğu bilinse de *Hyalomma* cinsi, özellikle *Hyalomma marginatum* türü kenelerin temel taşıyıcı vektörler olduğu bilinmektedir [1]. Göçmen kuşların hareketliliği ve virüs ile infekte bireylerin yer değiştirmesi nedeni ile birbirlerine yakın coğrafi alanlarda farklı özelliklere sahip virüsler bulunabiliyorken birbirinden çok uzak coğrafi bölgelerde yakından ilişkili virüsler izole edilmiştir. KKKAV infeksiyonlarında iklim koşullarının ılımanlaşması, tarım alanlarının bilinçsiz ve yanlış kullanılması, tahrip edilmiş bitki örtüsü ve azalan yağışların etkili olduğu bilinmektedir. Özellikle ılık geçen kışların ardından vaka sayısının arttığı kaydedilmiştir [5]. KKKA için inkübasyon süresi virüsün konağı infekte etme şekline göre değişkenlik göstermektedir. Bu inkübasyon süresinin ardından hastalık spesifik olmayan semptomlar ile ortaya çıkar [1]. KKKAV'nin doğadaki temel rezervuarı bazı



omurgalılar ve kenelerdir. Buna bağılı olarak viral yaşam döngüsü kene-omurgalı-kene arasındaki enzootik bir döngüde tamamlanır [6]. Keneler gelişimsel süreçlerinde ihtiyaç duydukları besinleri karşılamak için omurgalı kanına ihtiyaç duyarlar. Bu durum infeksiyonun en temel nedenlerinden biridir [7]. Hastalığa dair risk grubunun büyük bir çoğunluğunu tarım veya hayvancılıkla uğraşan kişiler, çiftçiler ve ılıman iklim bölgelerinde çalışan sağlık personeli oluşturmaktadır [5]. Mortalite oranının yüksek olması sebebi ile hastanın doğru yönlendirilmesi ve bulaş ihtimalinin önüne geçilmesi için hastalığın erken evrelerinde hızlı ve doğru bir teşhis koymak oldukça önemlidir. Virüs izolasyonu, tanı için kesin sonuç vermektedir fakat zaman alıcı bir proses olmasının yanı sıra özel koşullar gerektirdiğinden tanıda yaygın olarak moleküler ve serolojik yöntemler kullanılmaktadır [8]. Günümüzde KKKAV için FDA onaylı spesifik bir antiviral tedavi yoktur. Hastalığı önlemenin en temel yolu virüse maruziyetin önüne geçmek veya en aza indirmektir [9].

KKKAV *Bunyaviridae* ailesinin Nairovirus cinsine ait zarflı, tek sarmallı, negatif polariteli bir RNA virüsüdür [6]. Negatif polariteli RNA genomu büyük (L), orta (M) ve küçük (S) olmak üzere 3 segmentten oluşmaktadır. M segmentten Gn ve Gc glikoproteinleri kodlanmaktadır. [1] KKKAV'nin hücreye giriş mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak hücre yüzey reseptörleri ile etkileşime geçmeleri, virüsün konak hücreye girişini sağlamaları, nötralizan antikorlar için hedef olmaları viral membran proteini olarak Gn ve Gc'nin en temel görevleri arasındadır [10].

Metiltropik maya *Pichia pastoris* rekombinant protein üretimi için moleküler biyolojide kullanılan standart vektörlerden biridir [11]. Memeli, insekt ve maya temelli ökaryotik ekspresyon sistemlerinin içerisinde hem bir mikroorganizma olması sonucu kolay manipüle edilebilmesi, üretim ve çoğaltılmasının ucuz ve hızlı olması, memeli ve insekt sistemlerine göre daha az kompleks olmasının yanı sıra doğru şekilde katlanmış ve işlenmiş proteinler elde edilmesini sağladığından rekombinant protein üretimi için maya temelli ekspresyon sistemi kullanılmıştır.

Viral proteinlerin virüsten bağımsız bir şekilde incelenmesi hem KKKAV gibi BSL-4 laboratuvar gerektiren bir virüsün biyolojisinin anlaşılması hem de incelenen proteinlerin immünojenik ve biyolojik karakteristiklerinin belirlenmesi için oldukça önemlidir. KKKAV'nin yapısal proteinleri içerisinde en yoğun ilgi ile çalışılan protein nükleoprotein iken glikoproteinler ile ilgili çalışmalar oldukça az

sayıdadır. Virüsün yaşam döngüsünde, infeksiyon sürecinde, konak hücre seçiminde, virüse karşı oluşan immün yanıtın şekillenmesinde önemli rolleri olabileceği düşünülen glikoproteinlerin araştırılması virüs patogenezindeki rollerinin anlaşılmasına yardımcı olacaktır.

Bu çalışmada KKKAV glikoproteinini Gc'nin ökaryotik ekspresyon sisteminde rekombinant olarak üretilmesi hedeflenmiştir. Prokaryotik ekspresyon sistemlerinde elde edilen proteinlerin inklüzyon cisimleri içinde agrege olmaları, bu proteinlerin çözünebilir formlarına dönüştürülmelerindeki zorluklar ve protein glikozilasyonunun olmaması sebebi ile KKKAV glikoproteinini Gc'nin rekombinant olarak üretilmesi için ökaryotik ekspresyon sistemi tercih edilmiştir.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Kırım Kongo Kanamalı Ateşi

Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) Afrika, Asya, Doğu Avrupa ve Orta Doğu başta olmak üzere dünyada yaklaşık 30 ülkede görülen ölümcül bir viral enfeksiyondur [2]. Hastalığa neden olan Kırım Kongo Kanamalı Ateş Virüsü (KKAV) *Hyalomma spp* cinsi keneler aracılığı ile taşınan bir virüs olup keneler ve omurgalılar arasındaki enzootik bir döngüde bulunur [12]. Ülkemizde ilk kez 2002 yılının ilkbahar ve yaz aylarında Tokat, Sivas, Çorum, Amasya, Yozgat, Gümüşhane, Bayburt, Erzurum, Erzincan ve çevresi olmak üzere İç ve Doğu Anadolu Bölgelerinin kuzeyi ile Karadeniz Bölgesinin güney kesimlerini kapsayan geniş bir coğrafi alanda kene teması öyküsü olan, ateş ve kanama ile seyreden bir salgın dikkati çekmiş, 2003 yılında da hastalığın KKKA olduğu anlaşılmıştır. Daha sonra Kastamonu, Bartın, Ankara, Çankırı, Bolu, Balıkesir gibi illerde de vakaların ortaya çıkmasıyla hastalığın görüldüğü alan daha da genişlemiştir. Hastalık her yıl mayıs-eylül ayları arasında görülmekte ve temmuz ayında pik yapmaktadır [6]. Bunun yanı sıra kırsal kesimlerde özellikle ilkbahar ve yaz aylarında hastalık prevalansının arttığı bilinmektedir [13]. Kırım Kongo Kanamalı Ateş Virüsü Keneler aracılığı ile taşınan virüsler arasında en geniş coğrafi dağılıma sahip olması ve dengue virüsten sonra medikal anlamda en önemli ikinci arbovirüs olması sebebi ile dikkat çekmektedir [2]. *Bunyaviridae* ailesinin *Nairovirus* cinsine ait olan bu virüs mortalite oranı yüksek bir kanamalı ateş etkenidir. Önemli bir patojen olması, vektörün ekolojik karmaşıklığı, insandan insana bulaşma yolları ve terapötik yaklaşımlar KKAV enfeksiyonuna ilgiyi arttırmaktadır [14]. Ancak insana patojen olması sebebi ile biyogüvenlik seviyesi 4 olan laboratuvarlarda çalışmayı gerektirdiğinden virüs ile ilgili çalışmalar nispeten daha yavaş ilerlemekte ve geliştirilecek tanı, tedavi ve korunma yöntemlerinin keşfini geciktirmektedir. KKKA için sonuçların tutarsız olması sebebi ile immünoterapi tartışmalıdır ve hastalığa özgül antiviral tedavi henüz

geliştirilememiştir [4]. Ancak son yıllarda KKKAV replikasyonunda ve patogenezinde önemli gelişmeler kaydedilmiştir [1].

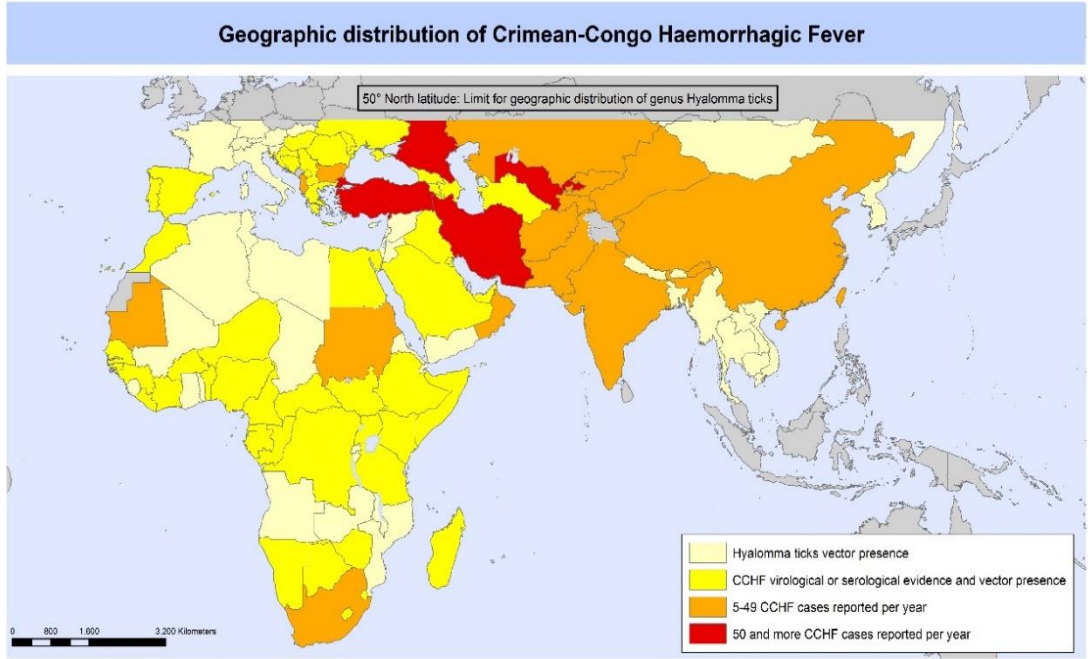
### 2.1.1 Tarihçe

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi ilk kez 12. yüzyılda Tacikistan'da hemorajik bir ateş olarak tanımlandı [2]. Bu tanımlamada hemorajik ateşin yanı sıra halsizlik, idrarda kan, kusma ve karın boşluğunda ağrı gibi spesifik olmayan semptomların varlığı da belirlenmiştir [1]. Modern çağda Kırım Kanamalı Ateşi 1944-1945 yıllarında Kırım'da II. Dünya Savaşı sırasında köylülere yardım eden 200 Sovyet askeri personelin ölmesi sonucu ilk kez klinik vaka olarak kaydedilmiştir [12, 15]. Gerçekleşen bu salgının viral kökenli ve bölgede bulunan keneler ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür [16]. Ardından diğer salgınlar Rusya, Sovyet Sosyalist Cumhuriyetler Birliği (SSCB), İran, Bulgaristan, Pakistan, Senegal, Kosova, Türkiye, Yunanistan, ve Kenya'da ortaya çıkmıştır [12]. Hastalığa neden olan eklem bacaklıların sert, küçük kene benzeri canlılar ile benzerliği dikkat çekmiş ve bu canlıların parazit olarak yaşadıkları gözlemlenmiştir [2]. Kırım Kanamalı ateşine neden olan virüs *Hyalomma marginatum* cinsi kenelerden ve virüsle enfekte hastalardan izole edilmiştir [17]. 1967'de virüs yeni doğan beyaz farelerin kan ve dokularından izole edilmiştir. Kırım hemorajik ateşinden sorumlu bu virüsün 1956 yılında Belçika kongosundaki ateşli bir hastadan izole edilen virüsten antijenik olarak ayırt edilemediği ortaya konmuştur [18]. 1970 yılına kadar Avrasya Kırım hemorajik ateş suşları ile Asya ve Afrika Kongo virüs suşları elektron mikroskopisi, fizikokimyasal ve serolojik testler ile incelendi. Bu inceleme sonucunda Kongo virüsü ile aralarında bulunan ortak antijenik yapı sebebi ile bu virüs Kırım Kongo Hemorajik Ateş Virüsü olarak adlandırılmıştır [12]. O yıllardan günümüze kadar Orta Asya, Afrika ve Doğu Avrupa'da çeşitli salgınlar meydana gelmiştir.

### 2.1.2 Epidemiyoloji

KKKA ilk kez 1944-1945 yıllarında Nazi istilasından sonra Kırım'da köylülere yardım eden 200 Sovyet askeri personelin enfekte olduğu salgında klinik bir vaka olarak kaydedilmiştir [14]. KKKA 1970'den önce Sovyetler Birliği, Özbekistan, Kazakistan, Tacikistan, Bulgaristan, Kongo Demokratik Cumhuriyeti ve Uganda'da görülmüştür. Günümüzde ise Afrika, Asya, Orta Doğu ve Doğu Avrupa'da görülen bir viral enfeksiyondur (Şekil 2.1). KKKAV kene ile taşınan virüsler arasında en

geniş coğrafi dağılıma sahiptir ve insan sağlığını önemli ölçüde etkilemektedir. Bu nedenle medikal anlamda dengue virüsten sonra en önemli ikinci arbovirüs olarak bilinmektedir [2]. Aynı coğrafi alanlarda farklı özelliklere sahip virüsler bulunabilirken, birbirinden çok uzak coğrafi bölgelerde yakından ilişkili virüsler izole edilmiştir. Bu durumun nedeni göçmen kuşların hareketliliği ve enfekte bireylerin yer değiştirmesidir [5]. KKKAV çoğunlukla doğadaki etkinliğini kene-omurgalı-kene döngüsü içerisinde farkedilmeden sürdürmektedir [14]. KKKAV sığır ve keçiler de dahil olmak üzere çok sayıda yerli ve yabani omurgalı hayvandan izole edilmiştir [19]. Keneler doğada yaklaşık 900 türü bulunan artropodlardır. *Argasidae* (Yumuşak keneler) ve *Ixodidae* (sert keneler) olmak üzere iki büyük aileye ayrılmışlardır. *Ixodid* keneler larva, su perisi ve yetişkin olmak üzere üç evrede gelişirken *argasit* kenelerin larva ve yetişkin evrelerine ek gelişim evreleri vardır [20]. Keneler gelişim evreleri sırasında ihtiyaç duydukları tüm besinleri omurgalı kanı ile beslenerek sağlarlar. Bu ihtiyaçlarını doğada bulunan çeşitli omurgalıların kanı ile sağlayan keneler enfekte bir omurgalının kanı ile beslendiklerinde bunu bir sonraki konağa aktararak virüsün horizontal yayılımına neden olurlar [5]. *Dermacentor*, *Boophilus*, *Amblyomma*, *Rhipicephalus* ve *Haemaphysalis* cinsi kenelerin KKKAV taşıyıcısı olduğu bilinse de *Ixodidae* ailesi *Hyalomma* cinsi keneler (özellikle *Hyalomma marginatum* türü) en temel taşıyıcı vektörlerdir. Yumuşak kenelerin (*Argasidae* familyası) vektörel yetenekleri üzerine yapılan çalışmalar viremik konaktan beslenirken virüs ile enfekte olmalarına rağmen konağı enfekte edemediklerini göstermiştir. Kene kaynaklı diğer hastalıklardan olan ensefalit ve Lyme insidansının sosyal habitatlar, konakçının durumu, ekonomik algalanmalardan etkilendiği düşünülmektedir. Tüm bunların yanı sıra KKKAV infeksiyonlarında Akdeniz bölgesindeki ana vektör olan *Hyalomma marginatum* için viral transmisyon üzerinde iklimin de etkili olduğu bilinmektedir.



Özellikle iklimin ılımanlaşması, tarım alanlarının yanlış kullanılması, bozulmuş bitki örtüsü ve azalan yağışlar, infekte göçmen kuşların ılıman iklim bölgelerindeki hareketliliği KKKAV infeksiyonlarının artmasına neden olmaktadır [8]. Özellikle ılık geçen kışların ardından vaka sayısı artmaktadır [5].

### 2.1.3 Etken

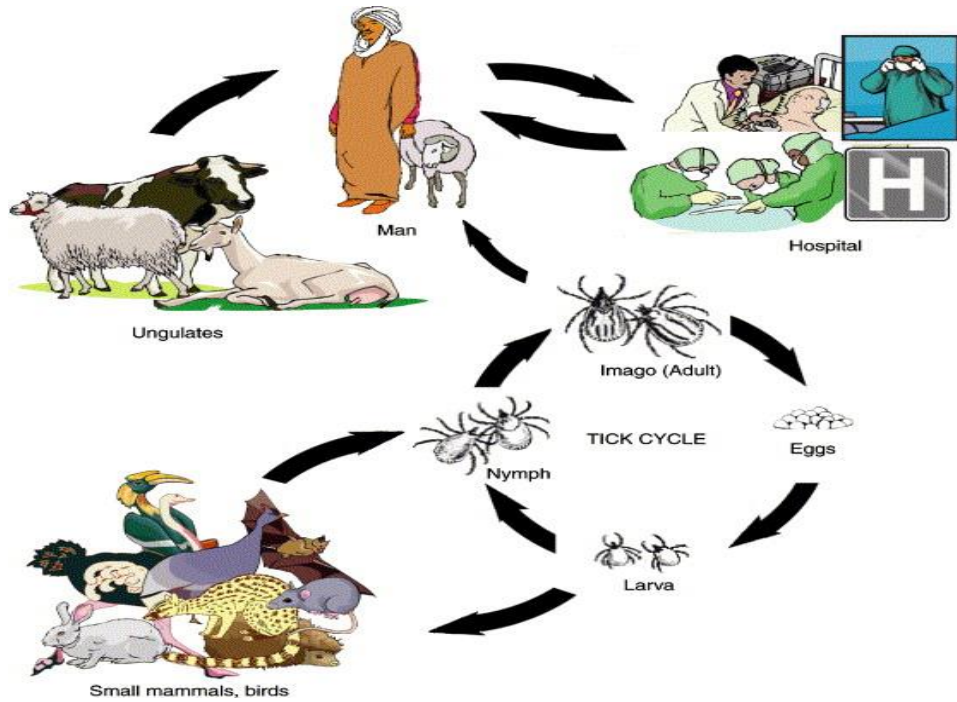
KKKA etkeni KKKAV *Bunyaviridae* ailesinin *Nairovirüs* cinsine dahil zarflı, tek sarmallı, negatif polariteli bir RNA virüsüdür. *Bunyaviridae* ailesinde KKKAV'nin dahil olduğu *Nairovirüs* cinsi dışında *Orthobunyavirus*, *Hantavirus*, *Phlebovirus* ve *Tospovirus*'lar da bulunmaktadır [21]. KKKAV için yapılan filogenetik analiz çalışmaları sonucu çeşitli coğrafi bölgelerde sekiz farklı genotip tanımlanmıştır.

Türkiye'den izole edilen suş ile Kosova ve Güneybatı Rusya'dan izole edilen suşun benzer filogenetik özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir [6]. KKKA için hastalığın inkübasyon süresi virüsün konağı enfekte etme şekline göre değişkenlik göstermekle birlikte bu inkübasyon süresinin ardından KKKA infeksiyonu yüksek ateş, halsizlik, miyalji ve diare eşliğinde kusma gibi spesifik olmayan semptomlar ile ortaya çıkmaktadır [1]. Infeksiyon temel olarak hematopoietik sistem, kas sistemi, endotel

ve retikuloendotelial sistemi etkilemekle birlikte lökopeni, trombositopeni, cilt ve mukozalara ait kanamalar ve karaciğer enzimlerinde yükselmeye neden olur [6].

### 2.1.3 Bulaş

KKKA etkeni virüsün temel rezervuarı doğada yaşayan tavşan, domuz, fare gibi omurgalılar ve kenelerdir. Virüsün yaşam döngüsü kene-omurgalı-kene arasındaki enzootik döngüde gerçekleşir [6]. KKKAV insanda şiddetli hemorajik ateşle birlikte çeşitli semptomların gelişmesine neden olur. Hastalık etkeninin bulaşması için en temel yol infekte kenenin gelişim evreleri sırasında ihtiyaç duydukları besinleri karşılamak için bir omurgalı konağın kanına ihtiyaç duyması sonucu ısırmasıdır [5]. Virüs vertikal veya horizontal olarak yayılım gösterebilir [5]. Keneler gelişimsel süreçlerinde larvadan nymphe, nympheden erişkinliğe geçerken ihtiyaç duydukları besinleri karşılamak için omurgalı canlıların kanını kullanırlar. İnfekte kenelerin besin ihtiyaçlarını karşılamak için bir konağı kullanmaları sonrasında infekte olmayan bir kenenin yine aynı konağı kullanması ile virüsün infekte bir keneden horizontal yayılımı sağlanmış olur. İnfekte bir kenenin virüsü bir sonraki konağa aktarabilmesi için tükürük bezleri ve üreme organları gibi virüs titresinin yüksek olduğu bölgelere aktarılması gerekmektedir (Şekil 2.2) [7].



Şekil 2.2. KKKAV'nin bulaş yolları [22] .

Virüs ile enfekte bir kenenin ihtiyaç duyduğu besinleri karşılamak üzere kan emdiği sırada virüsü konağa aktarması, viremik hayvan veya insanların kan ve vücut sıvıları ile direkt temas, enfekte kenenin çıplak deri yüzeyinde ezilmesi, akut evre sırasında virüs ile enfekte hasta ile direkt temas hastalığın başlıca bulaşma nedenleri arasındadır [23]. Hastalığa dair risk grubunun büyük bir çoğunluğunu tarım ve/veya hayvancılıkla uğraşan kişiler, çiftçiler, enfekte hayvanların kan veya vücut sıvıları ile temas eden mezbaha işçileri oluşturmaktadır. Literatürde hastalıktan en çok etkilenen ikinci grubun ise ılıman iklim bölgelerinde bulunan hastanelerde çalışan sağlık personeli olduğu kaydedilmiştir [5].

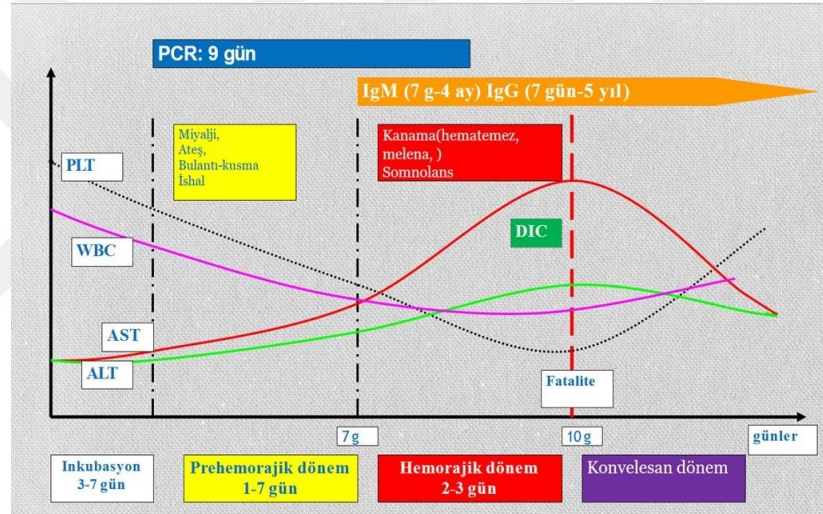
#### **2.1.4 Klinik bulgular**

İnsan, KKKAV virüsü ile infeksiyonun ardından hastalığın tezahür ettiği bilinen tek konaktır. Bir çok hayvanda seropozitivite bildirilmiş olsa da hastalığa dönüşüm söz konusu değildir [24]. KKKAV ile enfekte bireylerin tamamında hastalık oluşmamakla birlikte, hastalığın geliştiği kişilerde infeksiyon ağır hemorajilerle birlikte seyreder ve %5-30 arasında mortalite ile sonuçlanır [1]. KKKAV'nın klinik seyrinin inkübasyon, prehemorajik, hemorajik ve konvelesans şeklinde 4 aşamada ilerlediği kaydedilmiştir (Şekil 2.3). Ancak bu fazların süreleri ve bunlarla ilişkili semptomlar değişkenlik gösterebilir. Genel olarak bir kene ısırığının ardından inkübasyon süresi 1-3 gün kadar kısa olabilir, ancak maruz kalma yolu da dahil olmak üzere bir kaç faktöre bağlı olarak değişkenlik göstermektedir [19]. Nozokomiyal infeksiyonların ölüm oranları kene ısırması sonucu gelişen infeksiyonların ölüm oranlarına göre oldukça yüksektir. Bu durumun nedeni kesin olarak bilinmemekle birlikte viral dozla ilişkili olabilir. KKKAV için kuluçka süresi bir ila dokuz gün arasında değişmektedir. Hastalar başlangıçta tipik olarak bir haftadan az süren spesifik olmayan bir prognoz sergilerler. Belirtiler tipik olarak yüksek ateş, baş ağrısı, titreme, baş dönmesi, halsizlik, fotofobi, eklem ağrıları, miyalji, bulantı, karın ağrısı ve nadiren diaredir [25]. Ateş genellikle çok yüksektir (39-41 °C) ve 5-12 gün boyunca sürekli olarak yükselebilir. Her zaman olmamakla birlikte bradikardi ve düşük tansiyon gibi kardiyovasküler değişiklikler de görülebilir [19]. Erken belirtiler tipik olarak ateş, hipotansiyon konjunktivit, deride kızarmalar ve deri döküntüleri şeklindedir. Daha sonra hastalarda peteşi, konjonktival kanamalar, damar içi pıhtılaşma ve dolaşım şoku görülebilir. Ölüm genellikle semptomların başlamasından bir ila iki hafta sonra hemorajik diyatez, şok ve multiorgan sistem



yetmezliği sonucu gerekleŒir. Hastalık ocuklarda daha hafif seyretmektedir [26]. Laboratuvar anomalileri genellikle lökopeni, trombositopeni ve karaciğer enzimlerinde yükselme Œeklinde ortaya çıkmaktadır. Erken evrelerde anemi görülmez ancak hastalığın seyri sırasında geliŒebilir. Aynı zamanda eŒitli pıhtılaŒma anormallikleri de geliŒebilir [14].

Hastalığa yenik dŒmeyen bireylerde iyileŒme dönemi hastalığın baŒlangıcından yaklaŒık 15-20 gün sonra baŒlar. Bu dönemde uzun süreli halsizlik, dŒk nabız, polinri, terleme, baŒ ağrısı, baŒ dönmesi, mide bulantısı, görme yetisinde azalma,iŒitme ve hafıza kaybı görülebilir. Bu problemler bir yıldan uzun srmemekle birlikte nadiren kalıcıdır [12, 19].



Œekil 2.3. KKKAV'nin klinik seyri [2].

### 2.1.5 Patogenez

Sporadik olarak ortaya çıkması, klinik patoloji olanaklarının sınırlı olduğu bölgelerde görülmesi, geliŒmekte olan ülkelerde hastalıktan ölen insanlara tam otopsi yapılamaması sebebi ile moleküler düzeyde oldukça karmaŒık olan KKKA'nın patogenezini tam olarak aydınlatılamamıŒtır. KKKA üzerinde yapılan alıŒmaları etkileyen en önemli faktörlerden biri de gerekli olan biyogüvenlik 4 seviyesindeki (BSL-4) laboratuvarların yetersizliğidir. Bu gibi nedenlerle KKKA ile ilgili elde edilen sınırlı patogenezi bilgisine kan değerlerindeki deđiŒkenlikler ve karaciğer biopsi sonuçları değerlendirilerek ulaŒılmıŒtır. KKKA patogenezine dair en kapsamlı alıŒma Güney Afrika'da 1981-1987 yılları arasında tanı konulmuŒ 50 hasta üzerinde

yapılmıştır. Çalışmaya konu olan 50 hastanın 15'i ölmüştür. Mortaliteye katkısı bulunan etkenler arasında beyin kanaması, şiddetli anemi, şiddetli dehidrasyon, uzun süreli diare ile ilişkili şok, miyokard enfarktüsü, akciğer ödemi ve plevral efüzyon olduğu kaydedilmiştir [27]. Mikrovasküler instabilite ve bozulmuş hemostaz KKKAV infeksiyonunun ayırt edici özelliğidir. İnokülasyondan sonra koruyucu bariyeri aşan virüs önce dentritik hücrelere geçer. Ardından bölgesel lenf düğümlerine göç eder. Lenf düğümlerinden sonra karaciğer ve dalağa ulaşması ile geniş bir doku ve organ yelpazesine yayılır. Lenfositler her ne kadar infeksiyondan uzak kalsa da hastalık seyri boyunca önemli ölçüde tahrip olurlar. KKKAV trombositlere ve endotel hücrelerine doğrudan zarar vererek immünolojik ve enflamuar yolaklardan kaynaklanan hemorajik diateze neden olur. Bu değişikliklerin makrofajlardan sitokin, kemokin ve diğer proinflammatuar mediatörlerin salınması sonucu meydana geldiği bilinmektedir. Enfekte olmuş hücrelerin nekrozu veya dolaylı olarak immün hücrelerin apoptozu ile doku hasarı meydana gelir [14]. Türkiye'de yapılan bir çalışmada incelenen 14 KKKAV hastanın yedisinde reaktif hemofagositoz tespit edilmiş, bu da hemofagositozun KKKAV infeksiyonunda gözlenen sitopenide rol oynayabileceğini göstermiştir. İnterferon gama, tümör nekroz faktör  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ), interlökin-1 (IL-1) veya interlökin-6 (IL-6) KKKAV gibi sitokin seviyeleri hastalığın şiddetine göre farklılık göstermektedir [2]. İnterlökin-10 (IL-10), IL-1, IL-6 ve TNF  $\alpha$  hastalığın seyrinde kilit rol oynamaktadır. Yapılan in vitro çalışmalar KKKAV'nin dentritik hücrelerde ve makrofajlarda çoğaldığını TNF  $\alpha$ , IL-6 ve IL-8 salgılanmasına neden olduğunu göstermiştir [8].

### **2.1.6 Tanı**

Mortalite oranının yüksek olması nedeni ile hastanın doğru yönlendirilmesi, bulaş ihtimalinin önüne geçilmesi için hastalığın ilk günlerinde hızlı ve doğru bir laboratuvar teşhisi konulması gerekmektedir. Ayrıca erken tanı hastalığın seyri sırasında nozokomiyal infeksiyonların gelişmesini engellemek için oldukça önemlidir. Virüs izolasyonu tanı için kesin sonuç vermektedir. Ancak hastalığın erken evrelerinde zaman alıcı bir proses olması ve örneklerin taşınması için özel koşullar gerektirmesi nedeni ile tercih edilmemektedir. Bunun yerine KKKAV tanısı için yaygın olarak moleküler yöntemler kullanılmaktadır [8, 14].

### **2.1.6.1 Moleküler yöntemler**

Klinik vakalarda KKKA'nin hızlı tanısı için serum örneğinden revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile viral RNA tespit edilmektedir. Ancak laboratuvar kontaminasyonu sebebi ile yanlış pozitif sonuçlar elde edilebileceği ihtimali göz önünde bulundurulmalıdır. RT-PCR bir kaç saat içinde bir numunedeki viral yükün belirlenmesini sağlayan hassas bir yöntemdir. Bu amaçla geliştirilmiş ticari kitler bulunmaktadır [5, 8, 14].

### **2.1.6.2 Serolojik yöntemler**

Hastalığın 5. Gününden itibaren kullanılan yöntemlerdir. KKKA'nın şiddetli seyrettiği hastalarda antikor yanıtı gecikir. Bu nedenle enzyeme-linked immunosorbent assay (EIA) ile KKKAV'ye karşı özgül IgG ve IgM antikorları tespit edilir [24]. EIA antikor tespiti için %900'dan fazla duyarlılığa sahiptir. KKKAV'ye karşı üretilen IgM antikor seviyesi serokonvensiyel veya ardarda alınan iki kan örneği arasında 4 kattan fazla artış gösterdiğinde bu durum infeksiyonun kanıtı olarak kabul edilir [28, 29]. Genellikle IgG ve IgM antikorları semptomların başlangıcından itibaren dört ila beş gün sonra tespit edilir. IgM hastalığın ardından dört ay içinde kaybolur ancak IgG antikorları birkaç yıl boyunca varlığını sürdürür [30]. KKKAV nükleoproteini insanlarda erken, güçlü ve uzun süreli immün yanıtı neden olur. Bu nedenle doğal veya rekombinant yollarla elde edilen nükleoprotein serolojik testlerde antijen olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla geliştirilmiş ticari EIA kitleri bulunmaktadır [8].

Hastalığın ortalama 8. gününden itibaren KKKAV'ye karşı üretilen IgG ve IgM özgül antikorları ortaya çıkmaktadır. Hastalığın seyri devam ederken antikor seviyesi artmaktadır. Ancak mortalitenin erken dönemde gelişebildiği durumlar göz önünde bulundurulduğunda antikor seviyeleri hastalığın ilk günlerinde tanı koyulması için yeterli değildir.

### 2.1.7 Tedavi ve korunma yolları

KKKAV için tedavi seçenekleri oldukça sınırlıdır. Bu amaçla KKKAV enfeksiyonundan iyileşerek kurtulan bir hastaya ait plazma immünoterapi için başka hastalara transfer edilmiştir. İmmün plazma alan şiddetli KKKAV'li 7 hasta iyileşse de bu deney kesin olarak kanıtlanamamıştır [31]. Günümüzde KKKAV için FDA onaylı spesifik bir antiviral tedavi yoktur. Ancak antiviral ilaç ribavirin KKKAV enfeksiyonunun özellikle erken safhalarında viral replikasyonu bloke etmesi sebebi ile bir tedavi seçeneği olarak kaydedilmiştir. Terapötik önlemlerin etkinliği hastalığın seyri ile yakından ilişkilidir. Ribavirin hastanın virüse maruz kaldığı, viral replikasyonun gerçekleşeceği erken evrede etkili bir ajan olabilir. Ancak ribavirinin bu evre dışında kullanılması etkin bir tedavi yöntemi değildir [9].

Hastalığı önlemenin en temel yolu virüse maruziyeti engellemek veya en aza indirmektir. Dietiltoluamid (DEET) gibi böcek kovucuların cilde uygulanması ve endemik bölgelerde özel giysilerin kullanılması kene ısırığına karşı bir miktar koruma sağlayabilir [19]. Bunyavirüsler infekte konağın kan veya vücut sıvılarına doğrudan temas yolu ile oldukça bulaşıcıdır. Şüpheli bir KKKAV vakası en kısa sürede sağlık personeline bildirilmelidir [14]. İlgili sağlık personelinin maske, eldiven, önlük gibi temel koruyucu materyalleri kullanarak enfeksiyon etkeni ile doğrudan teması engellenmektedir. Doğu Avrupa, Bulgaristan ve Eski Sovyetler Birliğinin bazı bölgelerinde yeni doğan fare beyninde pasajlanıp saflaştırıldıktan sonra formalinle inaktive edilen virüs temelli bir aşı kullanılmıştır. Ancak daha sonra bu aşı kabul görmemiştir ve günümüzde hala aşı çalışmaları devam etmektedir [32].

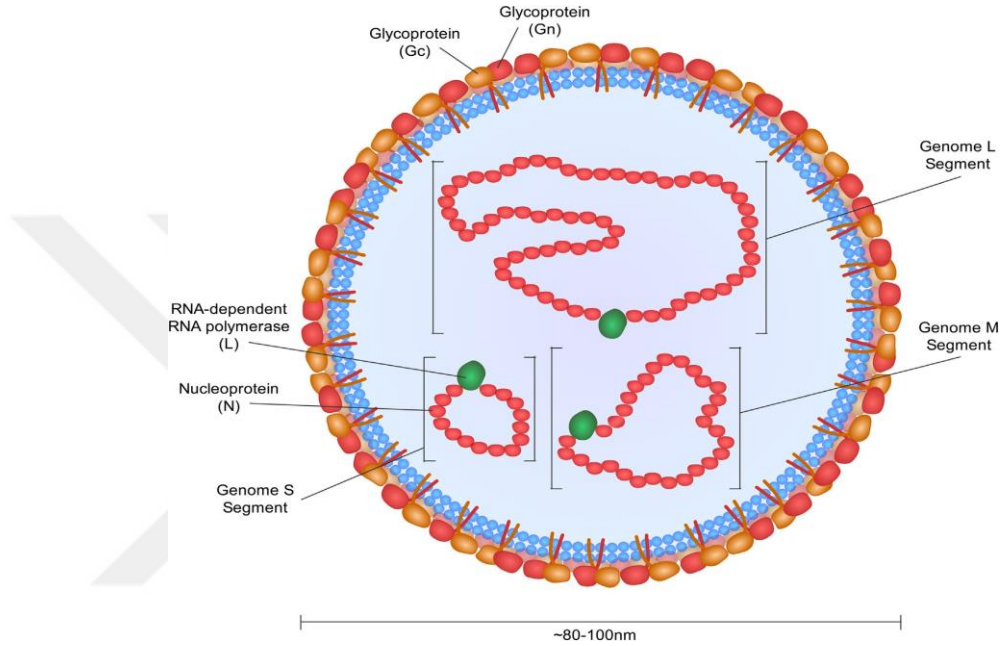
KKKAV'nin oldukça patojenik doğası bir biyoterörizm veya biyosavaş ajanı olarak kullanılabilir olma ihtimalini ortaya koymuştur. Kişiden kişiye bulaşması, yüksek mortalite oranı, aerosol ile bulaşının mümkün olması BSL-4 laboratuvarlarda çalışmayı gerektirmektedir [19].

### 2.2 Kırım Kongo Kanamalı Ateş Virüsü

Kırım Kongo Kanamalı Ateş Virüsü 5 cins ve 350'den fazla türü içeren *Bunyaviridae* ailesinin *Nairovirus* cinsine dahil olan bir virüsdür [33]. Üç segmentli, negatif polariteli, tek iplikli RNA virüsüdür. Bu virüsün yayılımı ve taşınması kene aracılı iletim ile karakterizedir [1, 34]. Nairovirüsler *Bunyaviridae* ailesinin diğer

üyeleri gibi elektron mikroskobu altında yaklaşık 100 nm çapında küresel görülen zarflı virüslerdir [35].

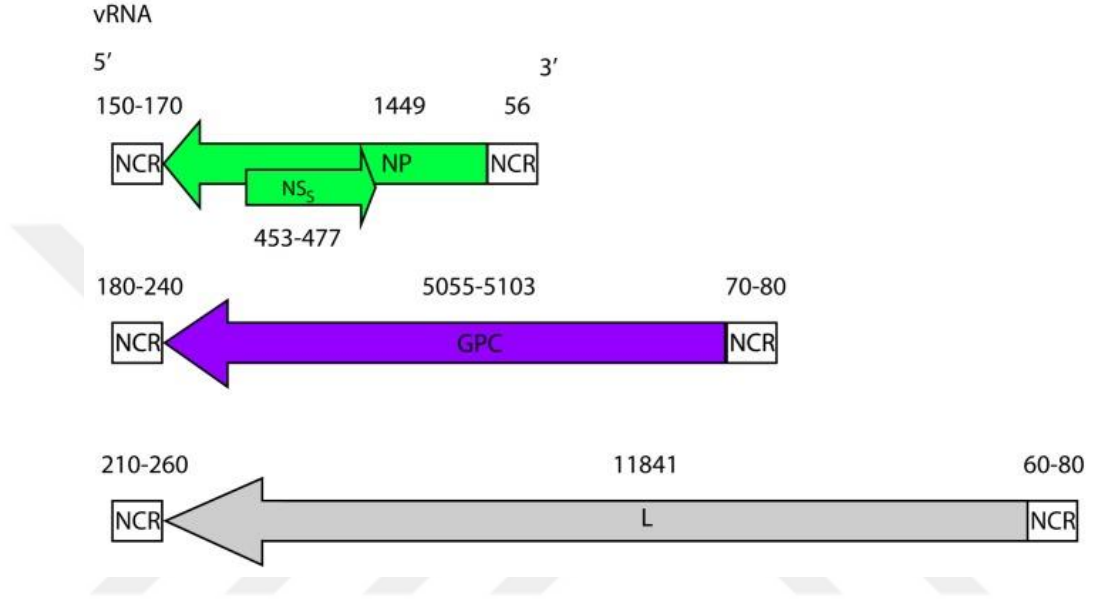
Bunyavirüslerde olduğu gibi negatif polariteli RNA genomu üç segmentten oluşur. Bunlar; büyük segment (L-12.1 kb), orta segment (M-5.4 kb) ve küçük segment (S-1.6 kb)'dir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: KKKAV'nin genomik yapısı [5].

Bu segmentler açık okuma çerçevesi (ORF) barındırır ve çeşitli yapısal proteinleri üretirler. *Bunyaviridae* ailesinin diğer üyeleri ile karşılaştırıldığında özellikle M ve L segmentlerinin diğer üyelere kıyasla oldukça büyük olduğu bilinmektedir.[1] L segmentten RNA- bağımlı RNA polimeraz (RdRp), M segmentten glikoproteinler Gn ve Gc, S segmentten nükleoprotein olmak üzere yapısal proteinler üretilir. Üç segmentin de 5' ve 3' bölgelerinde kodanmayan bölgeler (non-coding region- NCR) bulunur. NCR'lerde dokuz terminal nükleotit dizisi Nairovirüsler arasında korunur ve viral promotor bölgeleri olarak görev yaparlar. Bununla birlikte NCR'ler *Bunyavirus* genomlarının dairesel görünümüne katkıda bulunurlar. Ayrıca viral genomun replikasyonu ve transkripsiyonunda da görevlidirler [1, 36-38]. KKKAV genomunun nükleoprotein ile sarmalanması ile S, M ve L ribonükleokapsitleri (RNP) oluşur [39].

Yakın bir zamana kadar her üç segmentin farklı birer proteini kodladığı düşünülüyordu. Ancak *Bunyaviridae* ailesinin diğer bir çok üyesinde olduğu gibi KKKAV’ de de S segmentten nükleoproteine zıt yönde ambisens okuma sonucu NSs proteini ve M segmentten post translasyonel modifikasyonlar sonucu NSm proteini ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.5).

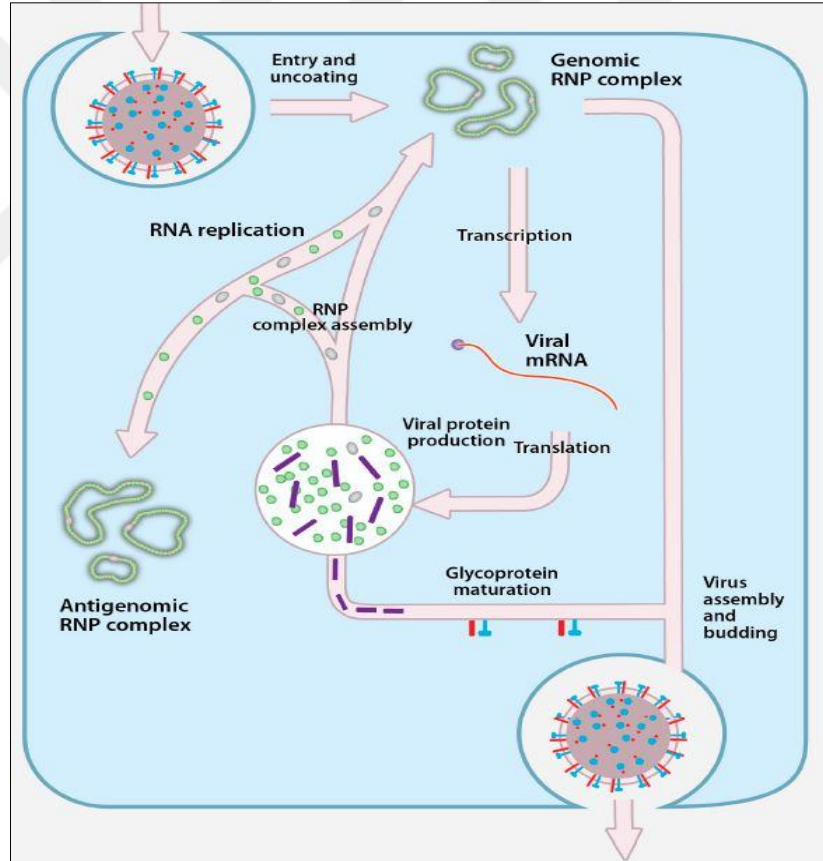


Şekil 2.5 : KKKAV'nin segmentleri ve kodlanan proteinler [1].

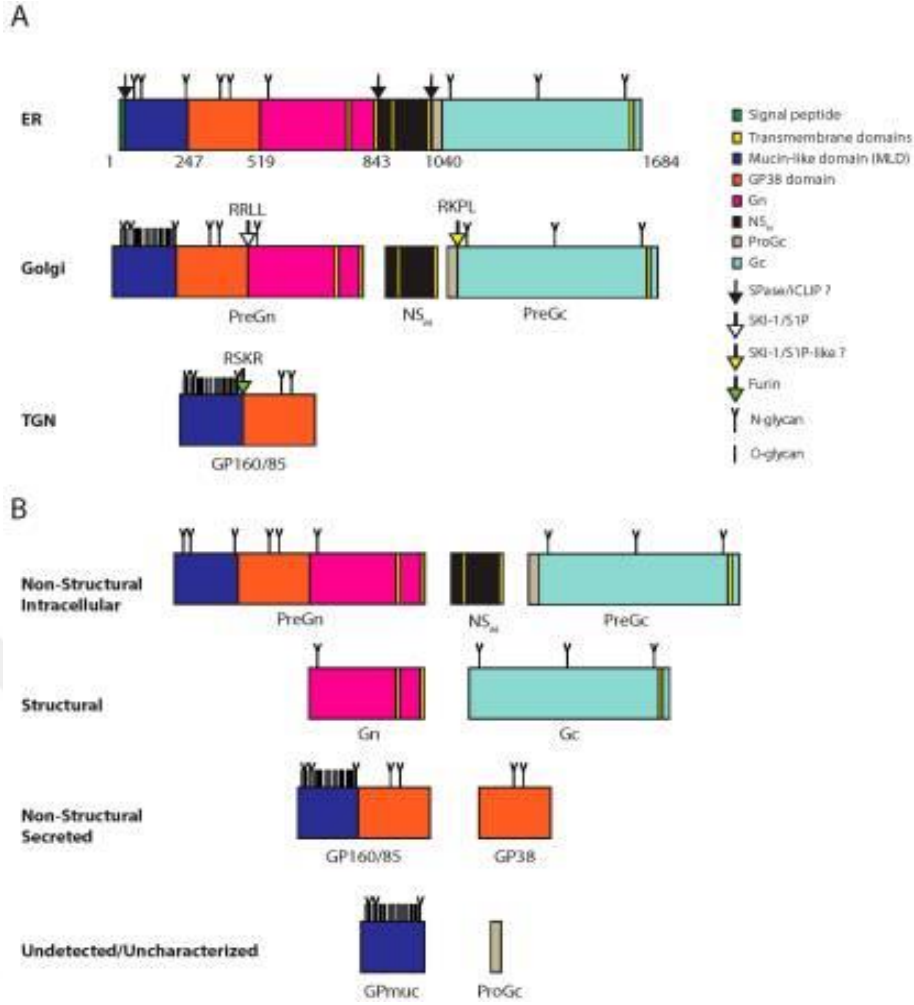
KKKAV'nin hücreye giriş mekanizması tam olarak aydınlatılamamakla birlikte glikoprotein Gc'yi hedef alan monoklonal antikorların virüsü nötralize ettiği çalışmalar Gc'nin hücresele reseptörlere bağlanmadan sorumlu olabileceğini düşündürmektedir [40]. Virüs hücre yüzeyine tutunduktan sonra klترین aracılı endositoz yolu ile hücreye girişı gerçekleşir. Klترین aracılı endositoz için klترین ve klترین adaptör protein-2 kompleksi gerekmektedir. KKKAV'nin hücreye girişı aynı zamanda kolesterol ve düşük pH'a bağılıdır [41, 42]. Endositozu takiben KKKAV partikülleri erken endozomlara taşınır [43]. Hücreye giriş ve füzyonun ardından genomik RNP'ler sitozole salınır ve enkapside edilmiş viral mRNA'dan L proteini sentezlenmesi için kalıp olarak kullanılır. Genomik RNP'lerin replikasyonu minimal olarak L proteini ve NP'yi gerektirmektedir [37]. Viral mRNA'lar NP ve L proteinine dönüştürülürken glikoprotein öncüsü (GPC) endoplazmik retikulum (ER) ile ilişkili ribozomlar tarafından çevrilmiş gibi görünmektedir. Yeni sentezlenen NP

ve L proteininin bir kısmı antijenomik RNA (cRNA) içeren bir RNP oluşturarak genomik RNA'yı kopyalamak için kullanılır. GPC'nin ER ve golgide işlenme ve olgunlaşma basamaklarından geçmesinin ardından Gn ve Gc ortaya çıkar.

RNP replikasyonunu takiben viral proteinin işlenmesi ve ardından olgunlaşması gerçekleşir. KKKAV için GPC olgunlaşması oldukça karmaşıktır ve diğer bunyavirüslerdeki glikoprotein işlenmesi ile çok az benzerlik gösterir Şekil 2.6 [44]. GPC'nin olgunlaşması sonucu Gn ve Gc yapısal glikoproteinleri ile birlikte yapısal olmayan proteinler GP160, GP85, GP38 ve M proteini (NSm) oluşmaktadır (Şekil 2.7) [44-46]. Nairovirüsler yapısal olmayan glikoproteinleri kodladığı bilinen tek bunyavirüslerdir [1].



Şekil 2.6 : KKKAV transkripsiyon ve replikasyon döngüsü [1].



**Şekil 2.7 : KKKAV glikoprotein işlenmesi ve ürünleri [1].**

GPC, N glikolizasyonun meydana geldiği ER’de sentezlenir. Glikoprotein setinin oluşması için GPC glikozile edilir. GPC sentezini sekresyon yoluna iten bir N-terminal sinyal peptidi içerir. Endoplazmik retikuluma translokasyon üzerine sinyal peptidi çıkarılır. GPC, N- glikosile edilir, katlanır, disülfit köprüleri oluşur. Prekürsör proteinin transmembran domainleri ER membranını 5 kez kaplar. GPC, tamamen çevrilmeden önce Gn öncülü (preGn), NS<sub>m</sub> ve Gc öncülü (preGc) olarak olarak ayrılır. Bu basamağın sinyal peptidazlar ve intramembran klevaj proteazlarını (iCLPIs) gerektirdiği düşünülmektedir. Sinyal peptidaz ve/veya intramembran klevaj proteazları (iCLPIs) GPC’yi transmembran domain 2 ve 4’e yakın bölgelerden ayırır [45, 46]. PreGn ve preGc golgi kompleksine taşınır. [47] PreGn golgi kompleksine taşınırken preGc ER’den çıkmak için preGn’ye ihtiyaç duyar [10].



GPC'nin olgunlaşmasını tamamlamak için preGn'nin Gn'ye preGc'nin Gc'ye dönüşmesi gerekmektedir. PreGc'nin Gc'ye dönüşümü subtilisin kexin isozyme-1/site-1 protease (SKI-1/S1P) adı verilen bir proteaz ile gerçekleşir. Pre-Gn'in SKI-1/S1P ile ayrılması ise ER'de veya cis-Golgi çıkışında meydana gelir. PreGn için proteaz ile ayrılması sonucu yapısal olmayan GP160 ve GP85 proteinleri oluşur.

## **2.3 Kırım Kongo Kanamalı Ateş Virüsü'nün Proteinleri**

### **2.3.1 S Segment: NP ve NSs**

S segmentten kodlanan NP viral proteinler arasında en fazla miktarda bulunan protein olması sebebi ile dikkat çekmektedir. Virüs yapısı ve biyolojisinin anlaşılmasında kilit rol oynar. Yaklaşık 54 kDA moleküler ağırlığa sahip olduğu bilinmektedir [48]. NP'nin birincil işlevi, RNP'leri oluşturmak için vRNA ve cRNA'yı çevrelemektir. RNP oluşumundaki rolü ile ilişkili olarak NP'nin L proteininin N ve C terminal bölgeleri ile etkileşime girdiği ve transfekte edilmiş hücrelerde L proteini ile ortak lokalizasyon gösterdiği belirlenmiştir [37, 49, 50]. KKKAV ile enfekte olmuş hücrelerde NP, perinükleer bölgeye aktin filamentine bağlı bir şekilde lokalize edilir [50]. NP'nin kristal yapısının incelendiği çalışmalarda sap ve baş kısmı olmak üzere iki majör domaine sahip olduğu belirlenmiştir [51]. Oligomerizasyonun NP fonksiyonunu düzenlediği bilinmektedir. Bunun yanı sıra RNA yokluğunda NP'nin sadece monomer olarak bulunduğu bilinmektedir. Tek başına NP RNA'yı zayıf bir şekilde bağlarken NP oligomerlerinin RNA'yı etkili şekilde bağlamada etkili olabileceği düşünülmüştür [52, 53]. NP'nin immünojenitesi oldukça yüksektir ve B ve T hücrelerinin temel hedefidir [1].

Transfekte edilmiş hücrelerde yakın zamanda ifade edilen KKKAV yapısal olmayan proteini NSs mitokondriye lokalize olur ve mitokondriyal membran potansiyelini bozarak apoptozu tetikler. Yapısal olmayan bu protein virüs tarafından kodlanır ancak virüs yapısına katılmaz [1, 54].

### 2.3.2 M Segment: Glikoproteinler

M segmentten yaklaşık 225 kDa boyutunda poliprotein prekürsörü kodlanmaktadır. Bu prekürsör ER membranında sinyal peptidazlarla kesime uğrar ve ortaya 140 Kda Pre-Gn ve 85 Kda Pre-Gc çıkar. PreGn ve PreGc'nin subtilisin kexine isoenzyme-1 / site-1- protease (SKI-1/S1P) ile kesilmeleri sonucu 37 kDa Gn ve 75 kDa Gc oluşmaktadır [45]. M segmentten kodlanan glikoproteinler Gn ve Gc'nin hücreye giriş ve füzyona aracılık ettiği düşünülmektedir. Bu glikoproteinlerin işlevleri diğer bunyavirüs glikoproteinlerinden farklılık göstermektedir. Gn'nin C terminalinde RNA ile etkileşime girebilen, matriks proteini ile benzer işlevler gösterebilen ve RNA'yı in vitro bağlayan bir zinc-finger domain bulunmaktadır [55]. KKKAV glikoproteinlerinin işlenmesi ve hücreye girişin yanı sıra nötralizasyon ve korumada etkili olabilecekleri düşünülmektedir. Golgiye taşınmanın Gn'de bulunan sinyal sekansı ile gerçekleştiği ve Gn-Gc etkileşiminin Gc'nin golgi cisimciğine taşınmasında etkili olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar Gn'in tek başına veya Gc ile birlikte golgi cisimciğinde lokalize olduğunu gösterirken Gc'nin yalnızca Gn varlığında golgiye transport edildiğini ortaya koymuştur. Bununla birlikte virüsün nötralizasyonu Gc spesifik antikolarla gerçekleşmektedir [10]. KKKAV glikoproteinleri ortalama olarak 78-80 sistein kalıntısı içerir; bu durum çok sayıda disülfid bağının ve karmaşık bir ikincil yapının varlığını göstermektedir. Pre-Gn amino terminalında yüksek oranda serin, treonin ve prolin kalıntıları içeren oldukça değişken bir bölgeye sahiptir. Bu bölgenin ağır bir şekilde glikozile edildiği ve bu nedenle diğer viral glikoproteinlerden özellikle Ebola virüsü glikoproteininde mevcut olan müsün benzeri bir bölgeye benzerliği dikkat çekmektedir. Ebola glikoproteinindeki müsün benzeri bu bölgenin hücreye giriş ve bağışıklıkta önemli rol oynadığı gösterilmiştir [56]. KKKAV yapısal glikoproteinleri Gn ve Gc hücre yüzey reseptörleri ile etkileşime girerek virüsün hücreye girmesine aracılık etmeleri, virüs nötralizasyonunun bu glikoproteinlere yönelik antikolarla gerçekleşmesi, nötralize edici antikoların pasif transferi ile akut enfeksiyonlu bireylerde kısmen koruma sağlanması sebebi ile yeni çalışmalara konu olmaktadır. Bu nedenle bu glikoproteinlerin yapı ve fonksiyonları karakterize edilmeye çalışılmaktadır. KKKAV tropizmi ve patogenezinin tam olarak aydınlatılması aşı geliştirme çalışmaları için de büyük önem taşımaktadır [10].

### 2.3.3 L Segment: RNA bağımlı RNA polimeraz

Nairovirüsler *Bunyaviridae* ailesinin diğer üyelerine kıyasla oldukça büyük bir L segment bulundurlar. Tüm bunyavirüslerde L segmentten tek ürün olarak RdRp kodlanmaktadır. RdRp Nairovirüs L proteininin yalnızca üçte birini oluşturmaktadır. RdRp C- terminal bölgesinin fonksiyonu henüz bilinmemekle birlikte, nairovirüslerin L segment N-terminal bölgesinde bazı ek sekanslar bulunmaktadır. Over tümörü (OTU) sistein proteazı bu ek sekanslardan biridir [49, 57]. KKKAV OTU domaini L proteininin en kapsamlı çalışılan bölgesidir. OTU domaini proteolitik aktivite ile RdRp'nin serbestleşmesinde görevlidir. Ayrıca peptit bağlarının übikitinasyonu ile konak hücrelerini bağlamasının ardından deübikitinasyon ile bu bağların kesilmesinde görevlidir. Ayrıca OTU domaini interferon stimulated gene-15 ( ISG 15) gibi übikütin benzeri proteinlerin yaptığı peptit bağlarını da kesebilmektedir. KKKAV OTU domaininin übikitinasyon veya ISG 15'in dekonjugasyonu yolu ile doğal immün yanıtı baskıladığı düşünülmektedir [58, 59].

mRNA transkripsiyonunda ve viral genomun replikasyonunda rol alan L proteinin sahip olduğu bir diğer fonksiyon ise endonükleaz aktivitesidir. Bu endonükleaz aktivitesi ile vRNA'ların 5' uçları daha yaygın olarak trifosfat grubunu kullanan diğer bir çok RNA virüsünün aksine monofosforile edilir. Çok sayıda RNA virüsünde bu trifosfat uçlar retinoik asitle indüklenebilir gen 1 (retinoic acid-inducible gene 1 – RIG-I)'in hedefidir ve hücrede antiviral cevabın başlamasını tetikler. KKKAV L proteininin bu endonükleaz aktivitesi RIG-I tarafından tanınmayı engelleyerek bağışık yanıtı kaçmayı sağlayabileceği düşünülmektedir [1].

### 2.4. Virüs Benzeri Yapılar

Minigenom sistemindeki bazı sınırlamaların üstesinden gelmek için 'Virüs benzeri yapılar- Virus like particle (VLP)' teknolojisi geliştirilmiştir. Bir VLP; viral proteinlerin tamamını içermektedir ancak hedef hüceye girdikten sonra viral proteinleri eksprese edememektedir. VLP'lerin bulaşıcı olma özelliği göz ardı edilir ve bu sayede biyogüvenlik seviyesi yüksek laboratuvarlara gereksinim duyulmadan virüslerin immün sistemi uyarıcı özelliklerinin incelenmesine olanak tanır [1]. Tek bir proteinden bir araya gelen VLP'lerin insanlarda virüs çalışmaları için güvenli ve etkili yapılar olduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir [60]. VLP'ler yüksek derecede tekrarlayan ve B hücre reseptörlerine etkili bir şekilde çapraz bağlanan

makromoleküler yapılardır [61]. Antijen sunan hücreler ile etkileşim kurarak hem doğal hem de adaptif immün yanıtları uyarabilirler [62]. VLP'lerin bu karakteristik özellikleri adjuvan olma özelliklerini ortaya koymaktadır. VLP temelli aşı geliştirme çalışmaları; üretilen rekombinant VLP'lerin hayvanlarda koruyucu özelliğın gösterilmesi (klinik öncesi çalışmalar), insanlarda klinik çalışmalar ve aşı etkinliğinin onaylanması adımlarını takiben gerçekleşmektedir. İlk onaylı VLP temelli aşı Hepatit B virüsüne (HBV) karşı geliştirilmiştir. Ardından insan papilloma virüsü (HPV) ve Hepatit E virüsüne (HEV) karşı geliştirilmiş VLP temelli aşılardan bulunmaktadır. Zarflı veya zarfsız olarak sınıflandırılan VLP'lerin çeşitliliği onları işlevsel olarak çok yönlü hale getirmektedir. HPV VLP aşısı gibi basit bir VLP hem prokaryotik hem de ökaryotik ekspresyon sisteminde üretilebilir. Bazı durumlarda basit VLP'lerin kapsit proteinleri homojen VLP oluşturmak için hücre dışı ortamda bir araya getirilebilir. Bunun dışında zarfsız çoklu kapsit proteinleri VLP'leri üretmek daha karmaşık ve zordur. Bu kompleks VLP'ler genellikle maya gibi yüksek ökaryotik konaklarda üretilebilirler [63]. KKKAV virüsü için VLP'ler NP, GPC ve L proteinini kodlayan üç yardımcı plazmidin bir minigenom plazmid ile birlikte eksprese edilmesi ile üretilir. Bu da enkapside haldeki minigenom RNA'nın VLP'lere dahil edilmesine neden olur. VLP'ler hedef hücelere girebilir ve NP ile L proteinini varlığında RNP'ler replikasyon ve transkripsiyon için kalıp işlevi görürler. Günümüzde KKKAV için iki farklı VLP sistemi geliştirilmiştir [36]. Birincisi transkripsiyonel olarak etkin VLP'ler (tc-VLP) hücreye girişı incelemek için Renilla rapörtör aktivitesini belirlemek üzere NP ve L proteinini eksprese eden hedef hücelere ile inkübe edilir. İkinci sistemde ise transkripsiyon ve hücreye girişe uygun VLP (tec-VLP)'ler; L proteini ve GPC'nin kodon optimize sekansı VLP üretmek için bir NanoLuc rapörtörü kullanılarak üretilir. Elde edilen tec-VLP'ler L proteini ve NP eksprese etmeye ihtiyaç duymadan hedef hücreye girebilir [38].

## **2.5 *Pichia pastoris***

Günümüzde metiltropik maya *Pichia pastoris* rekombinant protein üretimi için moleküler biyolojide kullanılan standart vektörlerden biridir [11]. Özellikle fermentör kullanılarak yapılan büyük ölçekli rekombinant protein üretim çalışmalarında *P. pastoris*'in etkinliği ortaya koyulmuştur. Günümüzde çok sayıda

protein *P. pastoris*'te üretilmektedir. Yaklaşık 50 yıl önce Koichi Ogata tarafından keşfedilen *P. pastoris*; karbon ve enerji kaynağı olarak metan gazından ucuz bir şekilde sentezlenebilen metanolü kullanmaktadır [64]. *Pichia* ve *candida* olarak iki farklı cinsi bulunan mayalardan *Pichia*'ya ait 30 alt tür bulunmaktadır ve *P. pastoris* bu türlerden biridir. Özellikle yeni suşların ve vektörlerin geliştirilmesi, geliştirilen bu suşların biyolojisinin anlaşılması ile *P. pastoris*'in ticari değeri ve araştırma laboratuvarları için önemi her geçen gün artmaktadır [11]. *P. pastoris*'in özellikle heterolog genlerin üretimi için oldukça başarılı bir sistem haline gelmesindeki en önemli faktörlerden bazıları; istenilen genlerin kontrollü bir şekilde ekspresyonu için alkol oksidaz I (AOX 1) promotorü bulundurmaları ve *P. pastoris*'in moleküler genetik manipülasyonu için gerekli tüm tekniklerin en iyi karakterize edilmiş model organizmalardan biri olan *Saccharomyces cerevisiae* ile benzerlik taşımasıdır [11]. *P.pastoris*'te protein ekspresyonu için; promotor seçimi, hücre içi veya hücre dışına sekresyona uygun vektör seçimi gibi bazı noktalara özellikle dikkat edilmesi gerekmektedir [65].

### 2.5.1 Ökaryotik ekspresyon sisteminin avantajları

Ökaryotik ekspresyon vektörü olarak mayaların diğer ekspresyon sistemlerine göre ana avantajlarından biri kullanımı ve kültürü kolay olan bir mikroorganizma olma özelliği taşımalarının yanı sıra ökaryotik olmalarıdır. Ayrıca proteolitik işleme, katlama, disülfid bağ oluşumu ve glikosilasyon gibi daha yüksek ökaryotik hücreler tarafından gerçekleştirilen bir çok translasyonel modifikasyon yeteneğine sahiptirler. Çeşitli maya sinyal dizileri kullanıldığında doğru katlanmış ve işlenmiş proteinler üretilir. Böylelikle bakteriyel ekspresyon sisteminde üretilmeyen bir çok protein biyolojik olarak aktif moleküller olarak *P. pastoris*'te üretilir. Ayrıca böcek ve memeli doku kültürü ekspresyon sistemleri gibi daha yüksek ökaryotlardan türetilmiş ekspresyon sistemlerine göre hızlı, basit, ucuz oldukları ve daha yüksek ekspresyon seviyelerine ulaştıkları kabul edilmektedir [11].

Memeli ekspresyon sistemlerinden farklı olarak maya basit büyüme ortamında hızla büyüebilir. Klinik ve endüstriyel açıdan önemli proteinlerin fermentasyon teknolojisi veya diğer yollarla ekspresyonu için yaygın olarak kullanılan ekspresyon vektörleri olarak öne çıkmaktadırlar [66, 67]. *E. coli*'de üretildiklerinde çözünmeyen inklüzyon cisimcikleri şeklinde görülen bazı proteinler, mayada eksprese edildiklerinde sıklıkla çözünürler [68]. Bununla birlikte *E.coli*'de karşılaşılan bir

diğer problem heterolog proteinlerin yapısının bozulmasıdır. Bu durum mayanın ekspresyon vektörü olarak kullanıldığı durumlarda genellikle azalmıştır [69].



### 3.GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 Malzemeler

CCHFV\_GC\_Kelkit 06\_pPICZαA (Genscript), SOC besiyeri (Sigma-Aldrich), Zeosin (Invivogen), Tripton (Sigma-Aldrich), Sodyum Klorür (Sigma-Aldrich), Maya Ekstraktı (Merck), *Yeast Nitrogen Base* (BioShop), *LB Broth* (Sigma-Aldrich) Lityum Asetat (Sigma-Aldrich), D- Sorbitol (BioShop), Pepton (Biomatik), D- Glukoz (BioShop), Tripton (Sigma-Aldrich), Borik Asit (BioShop), Sodyum Dodesil Sülfat (Sigma-Aldrich), *Skim Milk Powder* (Sigma-Aldrich), Etilendiamin tetraasetik asit (Sigma-Aldrich), Gliserol (Sigma-Aldrich), Sodyum Klorid (Sigma-Aldrich), Metanol (Tekkim), Etanol (Tekkim), D-Biotin (BioShop), Agarose (Sigma-Aldrich), Kalsiyum Klorid (BioShop), Akrlamid (Sigma-Aldrich), MetilenBis-Akrlamid (Sigma-Aldrich), Asetik Asit (VWR Chemicals), Potasyum Dihidrojen Fosfat (Sigma-Aldrich), Tris baz (Sigma-Aldrich), Glisin (BioShop), Tetrametiletilendiamin (Sigma Aldrich), Tween 20 (Biomatik), Tris Aminometan Hidroklorid (Multicell), Tris (BioShop), *1 Kb DNA Ladder (Bioline)*, *Gel Loading Buffer (Sigma-Aldrich)*, *Brillant Blue R (Sigma-Aldrich)*, Etidyum Bromür (Sigma-Aldrich), Fosfat Tuz Tamponu (PBS) (VWR), Sodyum Asetat (BioShop), Sodyum Hidroksit (Merck), Hidroklorik Asit (Sigma-Aldrich), İzopropanol (Sigma-Aldrich), *Amonyum persulfate (Sigma-Aldrich)*, Kalsiyum Karbonat (Sigma-Aldrich), Kalsiyum Bikarbonat (Sigma-Aldrich), TMB EIA Substrat (abcam), *Sac I (BioLabs)*, *Dream Taq DNA Polimeraz (Thermo Fisher Scientific)*, *DTT 1,4-Dithiothreitol (Sigma Aldrich)*, *GangNam-Stain Prestained Protein Ladder (Intron Biotechnology)*, DNA Spin plazmit DNA izolasyon kiti (Intron Biotechnology), *DNA Clean and Concentrator Kit (Zymo Research)*, Elektroporasyon Küveti (BIO-RAD) , Polietersülfon (PES) Membran (GVS), Immulon 2 HB 96 Kuyulu Plaka (Thermo Fisher Scientific), Nitroselüloz membran (BioRad)

### 3.2 Cihazlar

**Laminar hava akışlı steril kabin (Thermo Fisher Scientific)** Bakteri ve ökaryotik mikroorganizmaya transformasyondan sonra kullanılan katı besiyerleri ve ökaryotik ekspresyon sisteminde protein üretimi için gerekli besiyerlerinin hazırlanması için kullanıldı.

**Su Banyosu (Witeg)** Transformasyon için gerekli ısı değişimlerini sağlamak amacı ile kullanıldı.

**Buz Makinesi (Scotsman)** Transformasyon için gerekli ısı değişimlerini sağlamak amacı ile kullanıldı.

**Elektroporatör (BioRad)** *Escherichia coli* Top10'e transforme edilen plazmitlerin ökaryotik ekspresyon vektörü *Pichia pastoris*'e aktarılması için kullanıldı.

**PCR Cihazı (BioRad)** Transforme edilen plazmitlerin spesifik primerler kullanılarak doğrulanması için kullanıldı.

**Yatay Elektroforez Jel Sistemi (BioRad)** PCR sonrası elde edilen ürünlerin agaroz jelde görüntülenmesi için kullanıldı.

**Multitron Standard Incubation Shaker (Infors HT)** Viral glikoprotein ekspresyonu için gerekli koşulları sağlamak amacı ile kullanıldı.

**Santrifüj** Ekspresyon sonucunda üretilen proteini kültür ortamından uzaklaştırmak için kullanıldı.

**Nanodrop Spektrofotometre (Thermo Scientific)** İzole edilen DNA ve üretilen protein konsantrasyonunu tayin etmek için kullanıldı

**30°C ve 37°C İnkübatör** Transformasyon için gerekli koşulları sağlamak amacı ile kullanıldı.

**Dikey Elektroforez Jel Sistemi (BioRad)** *Pichia pastoris*'te üretilen viral glikoproteini protein seviyesinde analiz etmek için kullanıldı.

**Western Blot Transfer Sistemi (BioRad)** *Pichia pastoris*'te üretilen viral glikoprotein membranaya transfer edilmesinde kullanıldı.

**Kemilüminesans Görüntüleme Sistemi (Fusion Solo S)** Üretilen rekombinant proteinin Western blot ile analizi için kullanılmıştır.



**Mikroplaka Yıkayıcı (Thermo Scientific)** üretilen glikoproteininin EIA test ile analizi için kullanıldı.

**Mikroplaka Okuyucu (BioRad)** EIA verilerinin nicel olarak ifade edilmesi için kullanıldı.

### **3.3 Çalışma Materyali**

Bu çalışmada KKKAV Kelkit Suşu glikoproteinini Gc'ye ait optimize sekans ve ökaryotik ekspresyon vektörü *Pichia pastoris* KM71 suşu kullanılmıştır. Tez kapsamında yapılan deneylerin tamamı Bezmialem Vakıf Üniversitesi Beykoz Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji Enstitüsü Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

### **3.4 Besiyerlerinin Hazırlanması**

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü Kelkit Suşu glikoproteinini Gc'ye ait sekans sırası ile klonlama vektörü *E. coli* Top 10'e ve ekspresyon vektörü *Pichia pastoris*'e transforme edilmiştir. Pozitif transformantların seçimi zeosinli besiyeri kullanılarak yapılmıştır.

#### **3.4.1 LB Broth hazırlanması**

35 g *LB broth* tartılarak 1 l su içerisinde çözdürüldü. Hazırlanan besiyeri otoklavlanarak steril edildi.

#### **3.4.2 Low Salt LB Broth hazırlanması**

10 g tripton, 5 g maya ekstraktı, 5 g sodyum klorür uygun bir şişeye alındı ve 1 l su içerisinde çözdürüldü. 1 N sodyum hidroksit kullanılarak pH 7.5'e ayarlandı. Hazırlanan besiyeri otoklavlanarak steril hale getirildi.

#### **3.4.3 Low Low salt LB katı besiyeri hazırlanması**

10 g tripton, 5 g maya ekstraktı, 5 g sodyum klorür, 15 g agar tartılarak uygun bir şişeye alındı. 1 N sodyum hidroksit kullanılarak pH 7.5'e ayarlandı.. Otoklavlanarak steril hale getirilen besiyeri 55°C'ye kadar soğutudu ve son konsantrasyon 25µg/ml olacak şekilde zeosin eklendi. Petrilere dökülen katı besiyeri kullanıma hazır hale getirildi.

#### **3.4.4 Zeosinli *Yeast extract peptone dextrose* besiyeri hazırlanması**

10 gram maya ekstraktı, 20 gram pepton, 20 gr dekstroz tartılarak uygun bir şişeye alındı ve 1 litre su içerisinde çözdürüldü. Hazırlanan besiyeri otoklavlanarak steril hale getirildi. Soğutulan besiyerine son konsantrasyon 100µg/ml olacak şekilde 1 ml zeosin eklendi.

#### **3.4.5 Zeosinli *yeast extract peptone dextrose* katı besiyeri hazırlanması**

10 gram maya ekstraktı, 20 gram pepton, 20 gr dekstroz, 20 gr agar tartılarak uygun bir şişeye alındı ve 1 litre su içerisinde çözdürüldü. Hazırlanan besiyeri otoklavlanarak steril edildi. 55 °C'ye kadar soğutulan besiyerine son konsantrasyon 100µg/ml olacak şekilde 1 ml zeosin eklendi. Petrilere dökülen besiyeri hazır hale getirildi.

#### **3.4.6 *Buffered glycerol-complex medium* hazırlanması**

10 gr maya ekstraktı ve 20 gr pepton uygun bir şişeye alınarak 700 ml su içerisinde çözdürüldü. Hazırlanan besiyeri otoklavlanarak steril hale getirildi. 13,4 gr *Yeast nitrogen base (YNB)* 100 ml su içerisinde çözdürüldü ve filtreden geçirilerek steril edildi. 20 mg biotin 100 ml su içerisinde çözdürüldü ve filtreden geçirilerek steril edildi. 10 ml gliserol 90 ml su ile karıştırıldı ve filtreden geçirilerek steril edildi. 1 M Potasyum fosfat çözeltisi hazırlandı ve potasyum hidroksit (KOH) kullanılarak pH 6'ya ayarlandı. Otoklavlanarak steril hale getirilen 700 ml besiyeri, 100 ml 1 M Potasyum fosfat çözeltisi, 100 ml YNB çözeltisi, 100 ml gliserol çözeltisi ve 2 ml biotin çözeltisi laminar hava akışlı kabin içerisinde birleştirilerek 1 litre *buffered glycerol complex medium (BMGY)* hazır hale getirildi.

#### **3.4.7 *Buffered methanol-complex medium* hazırlanması**

10 g maya ekstraktı ve 20 g pepton uygun bir şişeye alınarak 700 ml su içerisinde çözdürüldü. Hazırlanan besiyeri otoklavlanarak steril hale getirildi. 13,4 gram *Yeast nitrogen base* 100 ml su içerisinde çözdürüldü ve filtreden geçirilerek steril edildi. 20 mg biotin 100 ml su içerisinde çözdürüldü ve filtreden geçirilerek steril edildi. BMGY farklı olarak 10 ml metanol 90 ml su ile karıştırıldı ve filtreden geçirilerek steril edildi. 1 M Potasyum fosfat çözeltisi hazırlandı ve potasyum hidroksit kullanılarak pH 6'ya ayarlandı. Otoklavlanarak steril hale getirilen 700 ml besiyeri, 100 ml 1 M Potasyum fosfat çözeltisi, 100 ml YNB çözeltisi, 100 ml gliserol

çözeltisi ve 2 ml biotin çözeltisi laminar hava akışlı kabin içerisinde birleştirilerek 1 litre *buffered glycerol complex medium (BMGY)* hazır hale getirildi.

### **3.5 Çözelti ve Solüsyonların Hazırlanması**

#### **1 M Potasyum fosfat çözeltisi**

132 ml 1 M  $K_2HPO_4$  ve 868 ml 1 M  $KH_2PO_4$  çözeltisi karıştırıldıktan sonra potasyum hidroksit (KOH) kullanılarak pH 6'ya ayarlanmıştır. Hazırlanan çözelti otoklavlanarak steril edilmiştir.

#### **0.1 M Kalsiyum klorid ( $CaCl_2$ ) çözeltisi**

1.109 gr  $CaCl_2$  tartılarak 100 ml ddH<sub>2</sub>O içerisinde çözdürüldükten sonra laminar hava akışlı kabin içerisinde filtreden geçirilerek steril edilmiştir.

#### **0.1 M $CaCl_2$ + %15 Gliserol çözeltisi**

1.109 gr  $CaCl_2$  tartılarak 100 ml ddH<sub>2</sub>O içerisinde çözdürüldükten sonra 15 ml gliserol eklenmiştir. Hazırlanan çözeltisi vorteklenerek homojen hale getirilmiş ardından laminar hava akışlı kabin içerisinde filtreden geçirilerek steril edilmiştir.

#### **3 M Sodyum asetat çözeltisi**

24.610 gr sodyum asetat tartılarak 100 ml ddH<sub>2</sub>O içerisinde çözdürüldükten sonra pH:4.7'ye ayarlanmıştır.

#### **100 mM Lityum asetat çözeltisi**

0.659 g lityum asetat tartılarak 100 ml ddH<sub>2</sub>O içerisinde çözdürüldükten sonra filtreden geçirilerek steril edilmiştir.

#### **1M 1,4-Dithiothreitol (DTT) çözeltisi**

15.4 g DTT tartılarak 100 ml ddH<sub>2</sub>O içerisinde çözdürüldükten sonra filtreden geçirilerek steril edilmiştir.

#### **1 M sorbitol çözeltisi**

18.217 gr sorbitol tartılarak 100 ml ddH<sub>2</sub>O içerisinde çözdürüldükten sonra filtreden geçirilerek steril edilmiştir.

### **1X Fosfat tuz tamponu**

8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 0.24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> uygun bir şişede bir araya getirildikten sonra hacim ddH<sub>2</sub>O ile 1 litreye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti manyetik karıştırıcı yardımı ile homojen olana dek karıştırılmıştır. Hazırlanan çözeltinin pH'ı 7.4'e ayarlandıktan sonra otoklavlanarak steril edilmiştir.

### **10 X tris-borik asit-etilen diamin tetra asetat çözeltisi**

121.1 g tris baz, 61.8 g borik asit ve 7.4 g EDTA tartılarak uygun bir şişeye alınmıştır. Üzerine 500 ml ddH<sub>2</sub>O eklendikten sonra manyetik karıştırıcı yardımı ile çözdürülerek 10X TrisBorik Asit-Etilen Diamin Tetra Asetat (TBE) hazırlanmıştır.

### **%1 agaroz jel hazırlanması**

Hazırlanan 10X TBE tamponu 1X'e düşürülmüştür. 1 g agaroz tartılıp bir erlene alınmış ve 1X TBE ile hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır. 2,5 dakika boyunca ısıtılıp kaynatılan çözeltiye 1 µl EtBr ilave edilerek hazırlanan jel yatağına dökülmüştür. Dökülen çözeltiye yükleme kuyucuklarını oluşturmak için tarak yerleştirilerek donmaya bırakılmıştır. Donmuş jelden tarak dikkatlice çıkarılarak jel 1X TBE içeren yükleme tankına yerleştirilmiştir.

### **Acrylamide/Bisacrylamide çözeltisi**

29.2 gr acrylamide ve 0.8 gr N'N'- bis-methylene-acrylamide tartılarak manyetik karıştırıcı yardımı ile 100 ml ddH<sub>2</sub>O içerisinde çözdürülmüştür.

### **%10 SDS çözeltisi**

10 gr SDS 90 ml deionize su içerisinde manyetik karıştırıcı yardımı ile çözdürülmüştür.

### **1.5 M Tris-HCl çözeltisi**

18.15 g Tris base 100 ml deionize su içerisinde çözdürülmüş ve 6 N HCl kullanılarak pH 8.8'e ayarlanmıştır.

### **0.5 M Tris-HCl çözeltisi**

6 g Tris base 60 ml deionize su içerisinde çözdürülmüş ve 6 N HCl kullanılarak pH 6.8'e ayarlanmıştır.

### **SDS Sample Buffer**

- 3.55 ml deionize su
- 1.25 ml 0.5 M Tris HCl pH:6.8
- 2.5 ml gliserol
- 2 ml %10 SDS
- 0.2 ml %0.5 Bromophenol Blue

Toplam hacim 9.5 ml olacak şekilde bir araya getirilmiş ve vortekslenerek karıştırılmıştır.

### **10X Electrode (running ) buffer**

30.3 g Tris base, 144 g glisin, 10 g SDS tartılarak manyetik karıştırıcı yardımı ile 1 L deionize su içerisinde çözdürülmüştür.

### **10% APS çözeltisi**

100 mg ammonium persulfate 1 ml dH<sub>2</sub>O içerisinde vortekslenerek çözdürülmüştür.

### **Poliakrilamid jel formülasyonu**

Ekspresyon ürünlerinin analizi için konsantrasyonu %15 resolving, %10 stacking olacak şekilde SDS PAGE jel hazırlanmıştır.

Resolving için; 2.4 ml deionize su

5.0 ml acrylamide/bis

2.5 ml 1.5 M Tris HCl

0.1 ml 10% SDS

50 µl 10% APS

5 µl TEMED

Bir falkon tüpte bir araya getirilmiş ve her bir jel kasedi için 5 ml olacak şekilde dökülerek izopropanol eklendikten sonra donması beklenmiştir.

Stacking için; 4.1 ml deionize su  
3.3 ml acrylamide/bis  
2.5 ml 0.5 M Tris Hcl  
0.1 ml 10% SDS  
50 µl 10% APS  
10 µl TEMED

Bir falkon tüpte bir araya getirilmiş ve donan resolving üzerine dökülmüştür. Uygun taraklar yerleştirilerek donması beklenmiştir.

#### **Coomassie Blue hazırlanması**

500 ml ddH<sub>2</sub>O, 400 ml metanol, 100 ml asetik asit ve 1 gr Brilliant Blue R manyetik karıştırıcı yardımı ile homojen olacak şekilde karıştırılmıştır.

#### **Dekolorizasyon çözeltisi**

500 ml ddH<sub>2</sub>O, 400 ml metanol ve 100 ml asetik asit uygun bir şişede bir araya getirilerek karıştırılmıştır.

#### ***Transfer Buffer***

2.9 g Tris baz, 144 g glisin ve 20 ml metanol manyetik karıştırıcı yardımı ile 1 litre ddH<sub>2</sub>O içerisinde çözdürülmüştür.

#### ***TBST***

10 ml 1 M Tris-Cl, 9 g NaCl ve 2 ml Tween 20 manyetik karıştırıcı yardımı ile 1 litre ddH<sub>2</sub>O içerisinde çözdürülmüştür.

#### ***Skim milk çözeltisi***

2.5 g skim milk powder 50 ml TBST içerisinde manyetik karıştırıcı yardımı ile çözdürülerek %5 skim milk çözeltisi hazırlanmıştır.

#### **Fosfat tuz tamponu/tween20 (PBST)**

8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 500 µl Tween 20 uygun bir şişede bir araya getirildikten sonra hacim steril ddH<sub>2</sub>O ile 1 litreye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti manyetik karıştırıcı yardımı ile homojen olana dek karıştırılmıştır.

### Coating buffer (Kaplama Solüsyonu)

1465 mg NaHCO<sub>3</sub> ve 795 mg Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 500 ml ddH<sub>2</sub>O su içerisinde çözdürüldükten sonra pH'ın 9.6 olduğu kontrol edilmiştir.

### 3.6 Klonlama

#### 3.6.1 Kompetent *Escherichia coli* Top10 hazırlanması

- 5 ml LB sıvı besiyeri içerisinde bir koloni *E. coli* Top 10 inoküle edilerek 37 °C 200 rpm'de gece boyunca inkübe edilmiştir.
- İnkübasyonun ardından 100 ml LB sıvı besiyeri içerisinde gece boyunca inkübe edilen kültürden 1 ml alınarak inoküle edilmiştir.
- Hazırlanan kültür 37 °C 200 rpm'de 5 saat inkübe edilmiştir.
- İnkübasyonun ardından kültür buz içerisinde 10 dakika bekletilmiştir.
- 6.000 rpm'de 3 dk santrifüjlendikten sonra supernatant dikkatlice peletten uzaklaştırılmıştır.
- Pelet 10 ml soğuk 0.1 M CaCl<sub>2</sub> çözeltisi içerisinde resüspende edildikten sonra 20 dk buz içerisinde inkübe edilmiştir.
- 6.000 rpm'de 3 dk santrifüjlendikten sonra supernatant dikkatlice peletten uzaklaştırılmıştır.
- Pelet 5 ml soğuk 0.1 M CaCl<sub>2</sub> + %15 gliserol çözeltisi içerisinde resüspende edilerek kompetent *E.coli* Top 10 transformasyonda kullanılmak üzere hazır hale getirilmiştir.

#### 3.6.2 Klonlama vektörüne transformasyon

Genscript firmasından pPICZα A plazmidi içerisinde gelen Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü Kelkit Suşu glikoproteini GC'ye ait sekans ; 'CCHFV\_GC\_Kelkit 06\_pPICZα' kalsiyum klorid (CaCl<sub>2</sub>) ile kompetent hale getirilen *Escherichia coli* Top10'e transforme edilmiştir.

- Bu amaçla plazmitler kompetent hücreler ile bir araya getirildikten sonra 15 dakika buz içerisinde inkübe edilmiştir.
- 42°C'de 2 dk inkübasyonun ardından plazmit ve kompetent hücreler 5 dk buz içerisinde inkübe edilmiştir.

- 250 µl *SOC medium* eklendikten sonra 200 rpm 37°C'de 1 saat boyunca inkübe edilen hücre plazmit bileşimi süre sonunda zeosinli *Low Salt LB* katı besiyerlerine ekilerek 37 ° C'de bir gece inkübe edilmiştir.

### 3.6.3 Polimeraz zincir reaksiyonu

Zeosinli besiyeri kullanılarak seleksiyonu yapılan transformantların bir kısmı öze yardımı ile 50 µl su içerisine alınmıştır. 95°C'de 5 dk kaynatıldıktan sonra polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) için template olarak kullanılmak üzere hazır hale getirilmiştir. Gerekli tüm materyaller tabloda belirtilen miktarlarda bir araya getirilerek reaksiyon başlatılmıştır.

**Tablo 3.1:** Klonlama aşamalarında kullanılan PZR bileşenleri.

	Miktar
<i>10 X PCR Buffer</i>	5 µl
25 mM mgCl <sub>2</sub>	1 µl
dNTP	0,5 µl
Primer çifti	2 µl
Template DNA	1 µl
<i>Taq</i> DNA polimeraz	0.5 µl
dH <sub>2</sub> O	40 µl
<b>Toplam Hacim</b>	50 µl

**Tablo 3.2:** Klonlama aşamalarında kullanılan PZR koşulları.

Aşama	Döngü	Faz	Süre	Sıcaklık
1	1	Başlangıç denatürasyonu	5 dk	95°C
2	35	Denatürasyon	1 dk	95°C
3	35	Bağlanma	1 dk	55°C
4	35	Uzama	1 dk	72°C
5	1	Son uzama	10 dk	72°C

### 3.6.4 Agaroz jel elektroforezi

#### PZR ürünlerinin agaroz jele yüklenmesi

Reaksiyon sonrasında elde edilen üründen 10 µl alınarak 2 µl 6X jel yükleme boyası ile karıştırılmış ve ardından hazırlanan %1 agaroz jele



yüklenmiştir. 100 Volt (V) 500 Amper (A) 'de 30 dk boyunca elektroforez edilmiştir.

### 3.7 DNA İzolasyonu

Kırım Kongo Kanamalı Ateş Virüsü Kelkit Suşu glikoproteini GC'ye ait sekans *E. coli* Top10'e transforme edildikten sonra ilgili primerler kullanılarak PZR ile doğrulanmıştır. Transformasyon ürünleri 20 ml Zeosinli lenox besiyeri içerisinde 37°C 200 rpm 'de gece boyunca inkübe edilmiştir. Yaklaşık 16 saat sonra DNA Spin plazmit DNA izolasyon kiti (*Intron Biotechnology*) kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır.

### 3.8 Etanol Presipitasyonu

*E. coli* Top 10'e transforme edildikten sonra izole edilen plazmit linearize edilmeden önce etanol presipitasyon metodu ile konsantre edilmiştir.

- Bu amaçla izole edilen 50 µl plazmit; 5 µl 3 M sodyum asetat ve 250 µl etanol ile karıştırılarak -80 °C'de 1 saat boyunca inkübe edilmiştir.
- İnkübasyonun ardından 4°C 14000 rpm'de 30 dk santrifüjlenmiştir. Supernatant dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra pelet filtre kağıdı üzerinde 15 dk kurumaya bırakılmıştır.
- Kurutulan pelet üzerine 500 µl soğuk %70 etanol çözeltisi eklenmiştir. 14000 rpm'de 5 dk santrifüjün ardından supernatant dikkatlice uzaklaştırılmıştır.
- Pelet filtre kağıdı üzerinde iyice kurutulduktan sonra 20 µl TE çözeltisi içerisinde resüspende edilmiştir.

#### 3.8.1 İzole edilen DNA'ların konsantrasyon ve kalitesinin tayini

İzole edilen DNA'ların konsantrasyon ve saflığını belirlemek için nanodrop spektrofotometre kullanılarak 260 nm ve 280 nm dalga boylarında ölçüm yapılmıştır.

### 3.9 Plazmit Linearizasyonu

Rekombinant plazmit CCHFV\_GC\_Kelkit\_06\_pPICza *SacI* enzimi kullanılarak linearize edilmiştir.

**Tablo 3.3:** *Sac I* ile linearizasyon.

	Miktar
<i>SacI</i> FD Buffer	5 µl
<i>Sac I</i>	1 µl
DNA	10 µl
dH <sub>2</sub> O	34 µl
<b>Toplam Hacim</b>	<b>50 µl</b>

37°C’de bir gece boyunca gerçekleştirilen reaksiyon sonrasında tüpler 80°C’de 20 dk tutularak enzimin inaktivasyonu gerçekleştirilmiştir.

Enzimin aktivitesini göstermek için 1 µl linearize plazmit 9 µl fosfat tuz tamponu (PBS) ile karıştırılmıştır. Ardından 10 µl örnek 2 µl jel yükleme boyası ile karıştırılarak %1 agaroz jele yüklenmiştir.

#### 3.9.1 Linearizasyon ürünlerinin konsantre edilmesi

*SacI* enzimi ile gerçekleştirilen reaksiyonun ardından transformasyonda kullanılmak üzere linearize plazmit reaksiyon tüpündeki diğer bileşenlerden arındırıldı. Bunun için *DNA Clean and Concentrator Kit* üreticinin talimatlarına uygun olarak kullanılmıştır. Bu kit yardımı ile temizlenen linearize DNA 1µg/ µl olacak şekilde konsantre edilmiştir.

### 3.10 Transformasyon

#### 3.10.1 Ekspresyon vektörünün elektroporasyon için hazırlanması

- Linearize edilen plazmidi transforme etmek üzere kompetent *Pichia pastoris* KM71 hazırlanmıştır.

- Bunun için YPDS katı besiyerine ekim yapılmıştır. 30°C’de 2 gün inkübe edildikten sonra petriden seçilen bir koloni 50 ml falkon tüp içerisindeki 5 ml YPD’ye inoküle edilmiştir.
- Kültür gece boyunca 30°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 500 ml YPD içerisine gece boyunca inkübe edilen kültürden 100 µl alınarak inoküle edilmiştir.
- 500 ml kültür 30°C’de gece boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 1/10 dilüsyon için OD<sub>600</sub>’de ölçüm yapılmıştır ve okuma değeri 3 iken inkübasyon sonlandırılmıştır.
- Büyümei durdurmak için kültür flaskı buz içerisinde 15 dk inkübe edilmiştir. Ardından 4°C 5000g’de 5 dk santrifüjlenmiştir.
- Santrifüjden sonra pelet ve supernatant dikkatlice ayrılıp supernatant atılmıştır.
- Peletlerin buzda inkübasyonunun ardından 10 ml steril su eklenmiş ve vortekslenmiştir. 1 ml 10X Tris-EDTA ve 2 ml 100 mM lityum asetat eklenmiştir.
- Eklenen solüsyonlar içinde resüspense edilen pelet 30°C 85 rpm’de 45 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 500 µl 1M 1,4-Dithiothreitol (DTT) eklenmiş ve 15 dk buzda inkübe edilmiştir.
- Hacim steril su ile 50 ml’ye tamamlandıktan sonra 4°C 4000g’de 5 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüjün ardından supernatant dikkatlice atılmıştır.
- Pelet 10 ml steril su içerisinde resüspende edildikten sonra hacim steril su ile 50 ml’ye tamamlanmıştır.
- 4°C 4000g’de 5 dk santrifüjlendikten sonra supernatant dikkatlice atılmış pelet 5 ml 1 M sorbitol içerisinde resüspende edilmiştir.
- Son kez 4°C 4000 g’de 5 dk santrifüjlendikten sonra supernatant dikkatlice atılmış pelet 1 ml 1 M Sorbitol içerisinde resüspende edilmiştir.
- 40 µl aliquotlanan kompetent *P. pastoris* hemen kullanılmak üzere hazır hale getirildi.

### 3.10.2 Elektroporasyon

Elektroporasyon için 40 µl kompetent *P. pastoris* ve yaklaşık 10 µg linearize plazmit 0,2 cm elektroporasyon kütetinde bir araya getirilmiştir. Buz içerisinde 5 dk inkübasyonun ardından kütet elektroporatör cihazının ilgili haznesine yerleştirilmiştir.

Elektroporasyon kütetindeki örnek ependorfa alınarak 1 ml 1M sorbitol eklenmiştir. 30°C de 2 saat inkübasyonun ardından 100 µg/ ml zeosin içeren YPDS katı besiyerlerine ekim yapılmıştır. 30°C’de yaklaşık 4 gün inkübasyonun ardından pozitif transformantların seleksiyonu zeosin aracılığı ile yapılmıştır. Bu seleksiyon basamağı ard arda üç kez tekrarlanmıştır. Üçüncü tekrardan sonra ilgili primerler kullanılarak PZR ile sekansların doğru oryantasyonda olup olmadığı belirlenmiştir.

PZR ile doğru oryantasyonda olduğu doğrulanan pozitif transformantlar ekspresyon için kullanılmak üzere %50 gliserollü YPD içerisinde stoklanmıştır.

### 3.11 Ekspresyon

KKKKAV Kelkit 06’ suşu glikoproteini GC’yi ökaryotik ekspresyon vektörü *P. pastoris*’te üretmek hedeflenmiştir. Bu amaçla; seleksiyonu yapılan transformantlardan saf koloni izole etmek için zeosinli YPDS besiyerlerine pasaj alınmıştır.

- 30°C’de 2 gün inkübasyonun ardından elde edilen saf koloni 100 ml BMGY içerisine alınmış ve 30°C 200 rpm’de gece boyunca inkübe edilmiştir.
- OD<sub>600</sub> = 10’ a ulaştığında kültür 5000 rpm’de 5 dk santrifüjlenmiştir.
- Pelet ve supernatant birbirinden ayrıldıktan sonra supernatant dikkatlice atılmıştır.
- Pelet 100 ml BMGY içerisinde resüspende edilmiştir.
- Bu resüpsansiyon işlemi 0. saat kabul edilerek her 24 saatte bir son konsantrasyon %1 olacak şekilde %100 metanol ile indüklemeye işlemi yapılmıştır.

- Her 24 saatte bir kültürden 1 ml örnek ependorf içerisine alınarak 13000 rpm’de santrifüjlenmiştir.
- 120. saatin sonunda 5000 rpm’de 5 dk santrifüjlenerek ekspresyon ürünü pelet ve supernatant birbirinden ayrılmıştır.

### **3.12 Pürifikasyon**

Ekspresyondan sonra santrifüjlenerek peletten ayrılan supernatant 5000 rpm’de 5 dakika ön santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Ardından ayrı bir tüpe alınan supernatant ependorflara dağıtılarak 18000 rpm’de gece boyunca santrifüjlenmiştir. Santrifüj işleminden sonra supernatant ayrı bir tüpte toplanmış, pelet 500 µl fosfat tuz tamponu (PBS) içinde resüspende edilmiştir.

### **3.13 SDS Page ile Analiz**

KKKAV glikoprotein C ökaryotik ekspresyon vektörü KM71 *Pichia pastoris*’te üretildiğini göstermek ve molekül ağırlığını analiz etmek için SDS-PAGE yapılmıştır.

#### **3.13.1 Örneklerin SDS PAGE için hazırlanması**

PBS içerisinde resüspende edilen ekspresyon ürününü analiz etmek için 10 µl örnek 20 µl sample buffer ile karıştırılmıştır. Ardından 95°C’de 15 dk kaynatılarak analiz için hazır hale getirilmiştir. Örnekler moleküler ağırlığı belirlemek için *GangNam-Stain Prestained Protein Ladder* ile birlikte hazırlanan poliakrilamid jele yüklenmiştir.

#### **3.13.2 Ekspresyon ürünlerinin elektroforezi**

Hazırlanan örnekler jele yüklendikten sonra 1X *Electrode (running ) buffer* içerisinde ; 50 V 20 dk ardından 200 V 50 dk elektroforez edilmiştir.

#### **3.13.3 Poliakrilamid jelin coomassie blue ile boyanması**

Poliakrilamid jeli boyama işlemi için hazırlanan coomassie blue solüsyonu içerisine jel yüzeyini kaplayacak şekilde alınmıştır. 70°C’de 1 dakika boyunca ısıtılan

poliakrilamid jel 40 rpm'de 15 dk çalkalanarak oda sıcaklığında boyama işlemi yapılmıştır.

Dekolorizasyon işlemi için ; coomassie ile boyanan poliakrilamid jel dekolorizasyon çözeltisi içerisinde alınmıştır ve 70 °C'de 1 k ısıtılmıştır. Dekolorizasyon çözeltisi içerisindeki 30 dk inkübasyonun ardından white light transluminator yardımı ile görüntüleme işlemi yapılmıştır.

### **3.14 Western Blot İle Analiz**

Proteinler SDS-PAGE ile ayrıştırıldıktan sonra nitroselülöz membrana transfer edilmiştir.

#### **Serum dilüsyonlarının hazırlanması**

Pozitif-negatif insan ve tavşan serumları skim milk çözeltisi içerisinde hazırlanmıştır.

- SDS PAGE ile analiz protokolüne göre hazırlanan örnekler 95°C'de 15 dakika kaynatılarak denatüre edilmiştir.
- Poliakrilamid jele yüklenerek 50 V 20 dk ardından 200 V 50 dk elektroforez edilmiştir.
- Elektroforez sonrasında jel dH<sub>2</sub>O ile hafifçe çalkalanarak 5 dk inkübe edilmiştir.
- Jel transfer buffer içerisinde 5 dk hafifçe sallanarak inkübe edilmiştir.
- Transfer kasedi transfer buffer ile ıslatılmıştır.
- Transfer kasedine sırası ile filtre kağıdı membran jel filtre kağıdı yerleştirilmiş ve tüm katmanların transfer buffer ile ıslanması sağlanmıştır.
- 25 V'da 7 dk boyunca gerçekleştirilen transfer işlemi sonrasında membran dH<sub>2</sub>O içerisinde 5 dk inkübe edilmiştir.
- Membran TBST içerisinde hafifçe sallanarak 5 dk inkübe edilmiştir.
- Ardından taze hazırlanmış %5 skim milk çözeltisi içerisinde oda sıcaklığında hafifçe sallanarak 2 saat bloklanmıştır.
- Bloklama solüsyonunun temizlemek için membran TBST ile 5 dk yıkanmıştır.

- Membran pozitif insan, negatif insan, pozitif tavşan, negatif tavşan serumları ile hazırlanan primer antikorlar ile gece 4°C 'de hafifçe çalkalanarak inkübe edilmiştir.
- Gece boyunca inkübasyonun ardından membran 5 kez 5 dk TBST ile yıkanmıştır.
- Membran %5 skim milk içerisinde hazırlanan sekonder antikor ile 1 saat boyunca inkübe edilmiştir.
- TBST ile 5 kez 5 dk yıkanan membran Western blot görüntüleme kiti içerisindeki solüsyonlar ile inkübe edildikten sonra görüntülenmiştir.

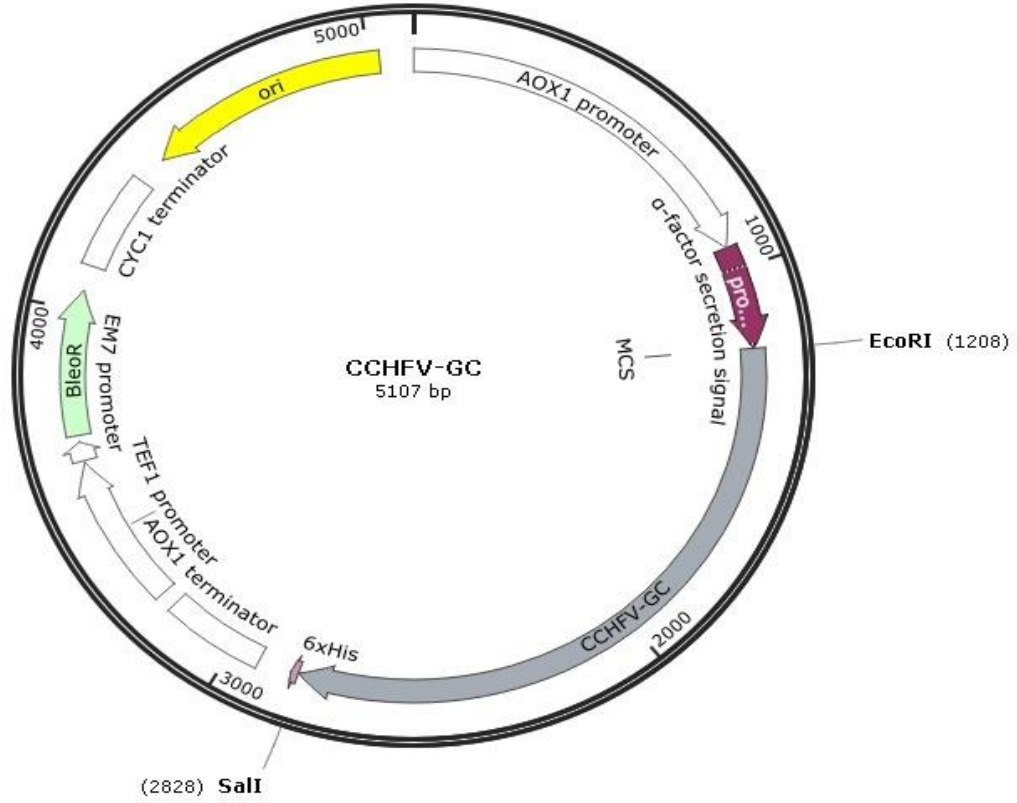
### 3.15 EIA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

- 96 kuyulu plakanın her bir kuyusuna son konsantrasyonu 0.01 µg olacak şekilde 100 µl kaplama solüsyonu içerisinde hazırlanmış antijen dağıtılmıştır.
- Plaka bir gece +4°C'de inkübe edilmiştir.
- İnkübasyonun ardından plakadaki tüm kuyular 200 µl PBST ile bir kez yıkanmıştır.
- Plakadaki tüm kuyular 200 µl PBST içerisinde hazırlanmış %5 skim milk çözeltisi ile 2 saat inkübe edilmiştir.
- İnkübasyonun ardından bloklama solüsyonu aspire edilmiştir.
- Primer serum dilüsyonları %5 skim milk çözeltisi içerisinde 1:100 dilüsyonda hazırlanarak her kuyuya 100'er µl olacak şekilde eklenmiştir.
- 96 kuyulu plaka 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir.
- İnkübasyonun ardından tüm kuyular 200 µl PBST ile 3 kez yıkanmıştır.
- Sekonder antikor dilüsyonları %5 skim milk çözeltisi içerisinde 1:500 dilüsyonda hazırlanarak her kuyuya 100'er µl olacak şekilde dağıtılmıştır.
- 37°C'de bir saat inkübasyonun ardından tüm kuyular 200 µl PBST ile 3 kez yıkanmıştır.
- Tüm kuyulara 100 µl TMB solüsyonu eklenmiş ve oda sıcaklığında karanlık ortamda 20 dakika inkübe edilmiştir.
- İnkübasyonun ardından tüm kuyulara 100 µl 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eklenerek 450 nm'de optik dansite ölçülmüştür.

## 4.BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1 Klonlama Stratejisi

Klonlama için aşağıda sekansı verilen, optimizasyonu yapılmış KKKAV Kelkit '06 suşu glikoproteini Gc geni (1626 bç) pPICZ $\alpha$  A vektörü içinde ve liyofilize halde (100  $\mu$ g) ticari olarak elde edilmiştir (Genscript, USA).



Şekil 4.1 : KKKAV glikoproteini Gc genini taşıyan pPICZ $\alpha$ A plazmit haritası.

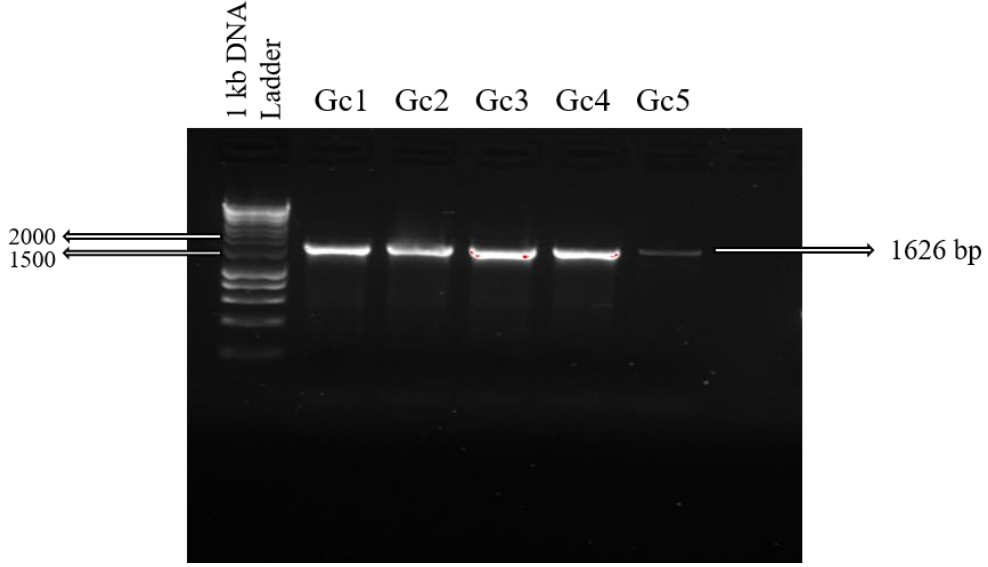


#### Optimize Sekans:

GAATTCGAAGAGGATTTGACTAACTTTTGTTCATCAAGAATGTCAAGTACTGAACTGAG  
TGTTTGTGTCCATACGAGGCTTTGGTTTTGAGAAAGCCTTTGTTCTTGGATTCTATCGTTA  
AGGGTATGAAGAAGTGTGAACTCTACTTCTTTGGAACTTCTTTGTCTATTGAGGCTCC  
TTGGGGTGCTATTAACGTTCAATCTACTTTTAAACCTACTGTTTCTACTGCTAACATTGCT  
TTGCTTGGTCCCTCTGTTGTTACCGTGGTAACAAGATTTTGGTTACTGGTAGATCCGAAT  
CTATTATGAAATTGGAAGAGAGAACTGGTGTCTTGGGATTTGGGTGTTGAAGATGCTT  
CTGAGTCTAAGTTGTTGACTGTTTCTATCATGGATTTGTCTCAAATGTACTCTCCAGTTTT  
CGAGTATTTGCTGGAGATAGACAAGTTGAAGAGTGGCCAAAGGCTACTTGTACTGGAG  
ATTGTCCTGAAAGATGTGGTTGTACTTCTTCTACTTGTTTGCATAAAGAGTGGTCCCATTC  
CAGAACTGGAGATGTAATCCTACTTGGTGTGGGGTGTGGTACTGGTTGTAATTGTTG  
TGGTGTGATGTTAAGGATTTGTTTACTGATCACATGTTTCGTTAAGTGGAAAGTTGAATA  
CATCAAGACTGAGGCTATCGTTTGTGTTGCTTTGACTTCTCAAGAAAGACAATGTTCTTTG  
ATTGAGGCTGGTACTAGATTCAACTTGGGTCCAGTACTATTACTTTGTCTGAACCTAGA  
AACATTCAACAAAAGTTGCCACCTGAGATCATCACTTTGCATCCAAAGATCGAAGAGGG  
TTTCTTTGATTGATGCACGTTCAAAGGTTTGTCTGCTTCTACTGTTTGTAAATTGCAAT  
CTTGTACTCATGGTATTCCAGGAGATTTGCAAGTTTATCACATTGGTAAGTTGTTGAAGG  
GAGATAGAGTTAACGGTCAATTTGATCCACAAGATCGAATCTCATTCAACACTTCTTGG  
TGTCTTGGGATGGTTGTGATTGGATTACTATTGTAACATGGGAGATTGGCCATCTTGTAC  
TTAACTGGTGTACTCAACATAATCACGCTGCTTTCGTTAACTTGTGTAACATCGAACT  
GATTACACTAAGACTTTCCATTTCCACTCTAAAAGAGTTACTGCTCATGGAGATACTCCA  
CAATTGGATTTGAAGGCTAGACCTACTTACGGTGTGGTGGTATTACTGTTTTGGTTGAA  
GTTGCTGATATGGAGTTGCACACTAAGAAAGTTGAAATTTCTGGTTTGAAGTTCGCTTCTT  
TGGCTTGTACTGGTTGTTATGCTTGTCTTCTGGTATTTCTTGTAAAGGTTAGAATCCATGTT  
GATGAACCAGATGAGTTGACTGTTACGTTAAATCTTCTGATCCTGATGTTGTTGCTGCTT  
CTACTTCTTTGATGGCTAGAAAATTGGAATTTGGTACTGATTCTACTTTAAGGCTTTCTC  
TGCTATGCCTAAAACCTTCTTTGTGTTTCTACATCGTTGAAAGAGAGTACTGTAAGTCTTGT  
TCTGAAGATGATACTCAAAGTGTGTTGATACTAGATTGGAGCAAGTTCGAC

#### 4.1.1 Klonlama vektörüne transformasyon

KKKAV Kelkit' 06 suşu Gc glikoproteininin ökaryotik ekspresyon sistemi için optimize edilmiş sekansı pPICZ $\alpha$  ekspresyon vektörü içerisinde alınmış ve optimize sekans *E.coli* Top 10'e transforme edilmiştir. Pozitif transformantlar zeosin kullanılarak seçilmiştir. İlgili primerler kullanılarak yapılan PZR ile sekansların doğru oryantasyonda olduğu Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil

Şekil 4.2: *E. coli* Top 10'e transforme edilen Gc'nin koloni PZR sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü.

#### 4.2 Plazmit İzolasyonu

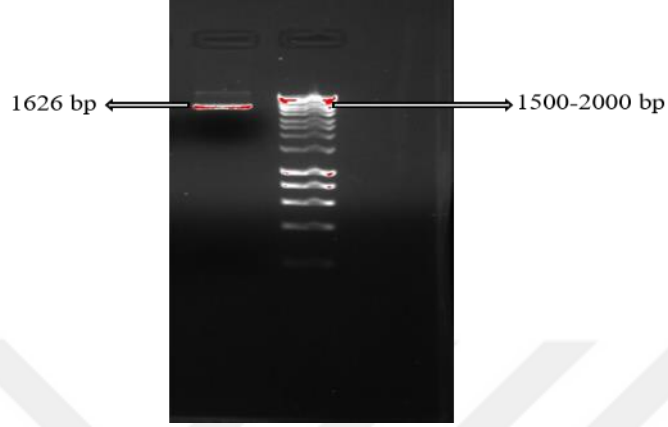
*E. coli* Top 10'e transformasyonun ardından linearize edilmek üzere plazmit izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen plazmitlere ilişkin saflık ve konsantrasyon değerleri Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1: *E. coli* Top10'e transforme edilen Gc plazmitlerinin saflık ve konsantrasyon değerleri.

Çalışma Materyali	260-280 Oranı	Konsantrasyon
Gc1	1,92	1,462 ng/µl
Gc2	1,87	1,574 ng/µl
Gc3	1,79	963,2 ng/µl
Gc4	1,87	637,7 ng/µl
Gc5	1,93	653,2 ng/µl

### 4.3 Plazmit Linearizasyonu

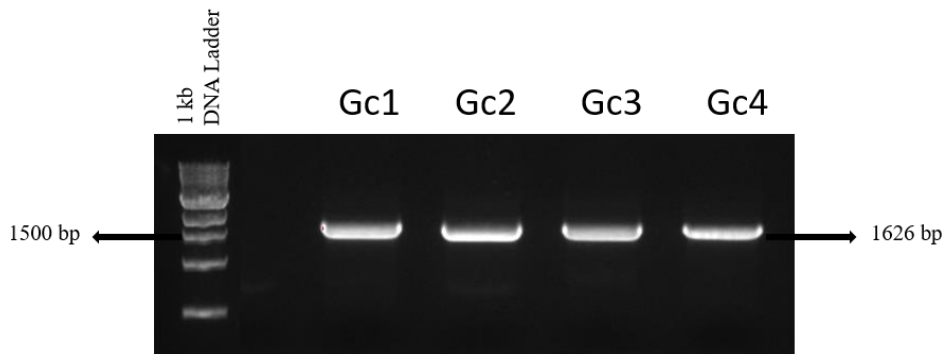
*E. coli* Top 10'e transformasyonun ardından izole edilen plazmit ekspresyon vektörü *P. pastoris*'e transforme edilmek üzere *SacI* enzimi kullanılarak linearize edilmiştir. Linearize plazmidin jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.3'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3 : *SacI* ile linearize edilen Gc'nin agaroz jel elektroforez görüntüsü.

### 4.4 Ekspresyon Vektörüne Transformasyon

*SacI* enzimi kullanılarak linearize edilen plazmit elektroporasyon metodu ile *Pichia pastoris* KM71'e aktarılmıştır. Transformasyon sonrası pozitif transformantların seleksiyonu zeosin kullanılarak yapılmıştır. İlgili primerler kullanılarak yapılan PZR ile sekansların doğru oryantasyonda olduğu şekil 4.4'de gösterilmiştir.



Şekil 4.4 : *Pichia pastoris* KM71'e transforme edilen GC'nin koloni PZR sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü.

#### 4.5 Glikoprotein Gc Geninin *Pichia pastoris*'te Eksprese Edilmesi

Linearize edilmesinin ardından *P. pastoris*'e transforme edilen Gc geni ilgili primerler kullanılarak koloni PZR ile doğrulanmış ve ardından uygun besiyeri içerisinde 120 saat eksprese edilmiştir. Başlangıç anından itibaren her 24 saatte bir spektrofotometre prensibi ile optik dansite (OD<sub>600</sub>) ölçülmüş ve kaydedilmiştir. 0. saatten itibaren OD<sub>600</sub> değerleri tablo 4.2'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.2:** *P. pastoris* 'te 120 saat devam eden ekspresyona ait OD<sub>600</sub> değerleri.

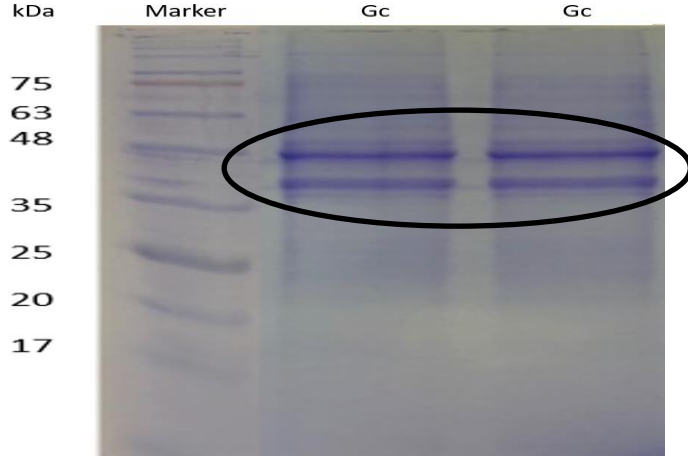
Saat	OD <sub>600</sub> Değeri
0'	10
24'	17
48'	33
72'	38
96'	42
120'	44

#### 4.6 Ekspresyon Ürünlerinin Pürifiye Edilmesi

Gc geninin *P. pastoris* içerisinde ekspresyonunun ardından 120. saatin sonunda pelet ve supernatant santrifüjlenerek birbirinden ayrılmıştır. Supernatant pürifiye edilmek üzere ependorflara dağıtılarak 18 saat yüksek devirde santrifüjlenmiştir. Santrifüj işleminin ardından supernatant dikkatlice uzaklaştırılırken peletler SDS-PAGE ile analiz edilmiştir.

#### 4.7 Pürifikasyon Sonrası SDS-PAGE ile Analiz

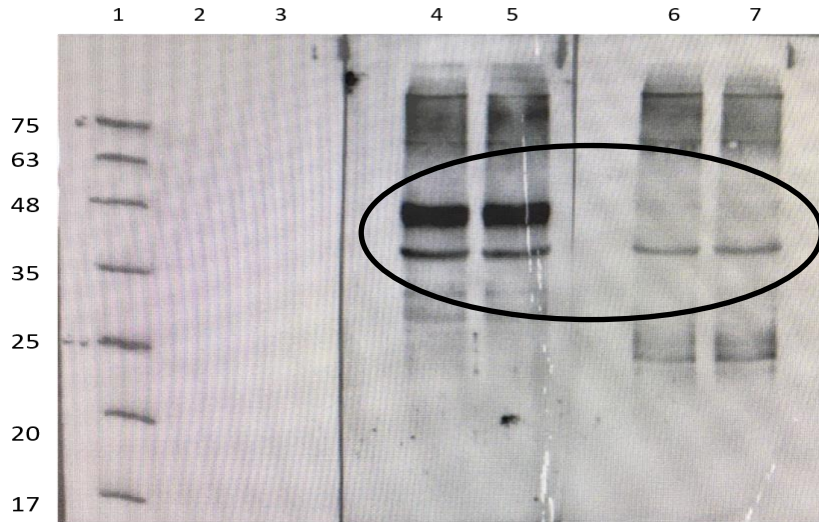
Yüksek devirde bir gece santrifüjlenerek pürifiye edilen ekspresyon ürününün 95°C'de denature edilmesinin ardından SDS-PAGE ile analizi yapılmıştır. Coomassie blue ile boyanan SDS-PAGE jel görüntüsü Şekil 4.4' de gösterilmiştir.



**Şekil 4.5:** *Pichia pastoris* KM71’de üretilen GC’nin SDS-PAGE ile analizi.

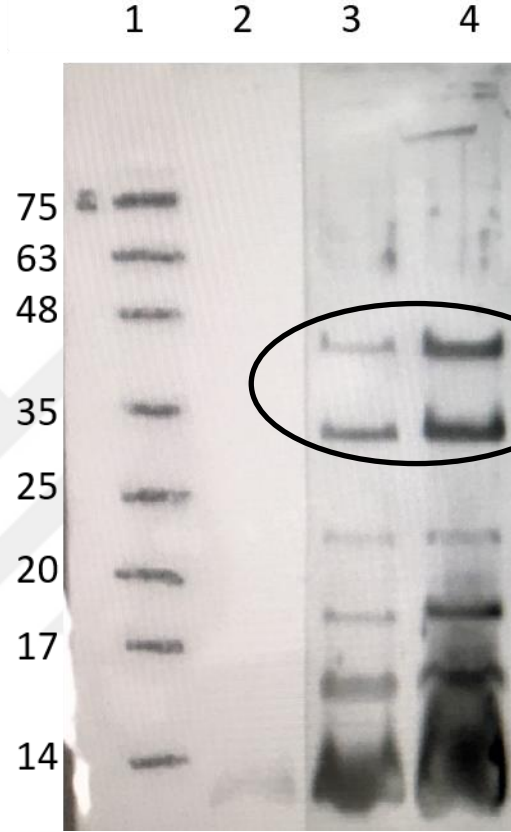
#### 4.8 *P. pastoris*’te Eksprese Edilen Gc’nin Western Blot ile Analizi

Yüksek devirde santrifüjlenerek pürifiye edilen ekspresyon ürünü 95°C’de denature edilmiştir. Ardından aynı dilüsyonda hazırlanan antikor pozitif hasta serumu ve negatif hasta serumunun yanısıra His-tag antikorunu kullanılarak Western Blot ile analiz edilmiştir. Pozitif hasta serumu, negatif hasta serumu ve His-tag antikorunu kullanılarak yapılan Western blot Şekil 4.6’da gösterilmiştir.



**Şekil 4.6:** *Pichia pastoris* KM71’de üretilen Gc’nin KKKAV ile infekte hasta serumu ve His-tag antikorunu kullanılarak Western Blot ile analizi. 1:Marker, 2-3: KKKAV negatif insan serumu, 4-5: KKKAV antikorunu pozitif insan serumu, 6-7 His-tag antikorunu ile inkübe edilmiştir.

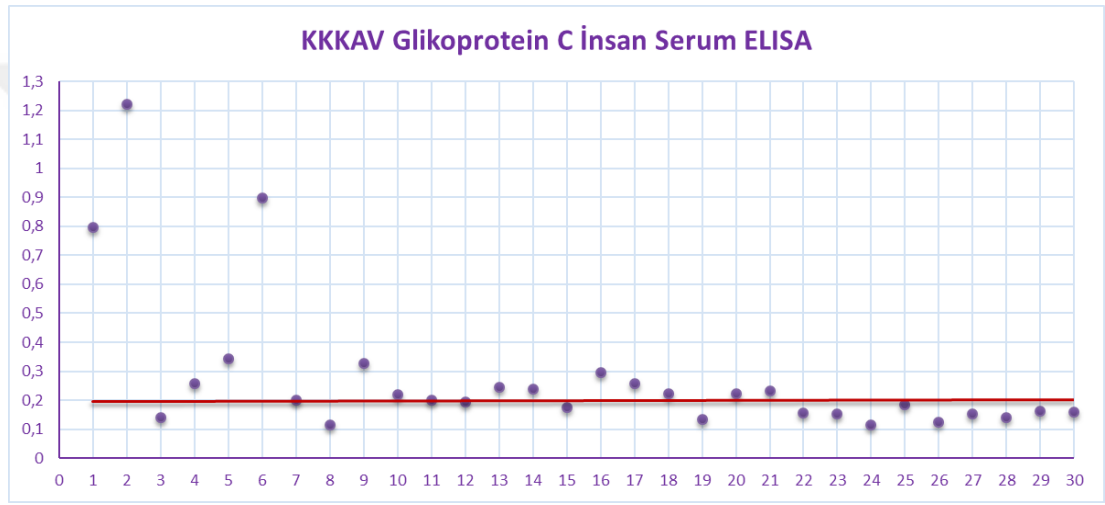
İnsan serumu ve His-tag antikoru kullanılarak yapılan Western blot'ın yanı sıra *P. pastoris* KM71'de üretilen Gc glikoproteini KKKAV ile immunize tavşan serumu ve negatif tavşan serumu kullanılarak analiz edilmiştir. Negatif ve pozitif tavşan serumu kullanılarak yapılan Western blot şekil 4.7'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.7 :** *Pichia pastoris* KM71'de üretilen Gc'nin negatif tavşan serumu ve KKKAV ile infekte tavşan serumu kullanılarak Western Blot ile analizi. 1:Marker, 2: negatif tavşan serumu, 3-4: KKKAV ile immunize tavşan serumu ile inkübe edilmiştir.

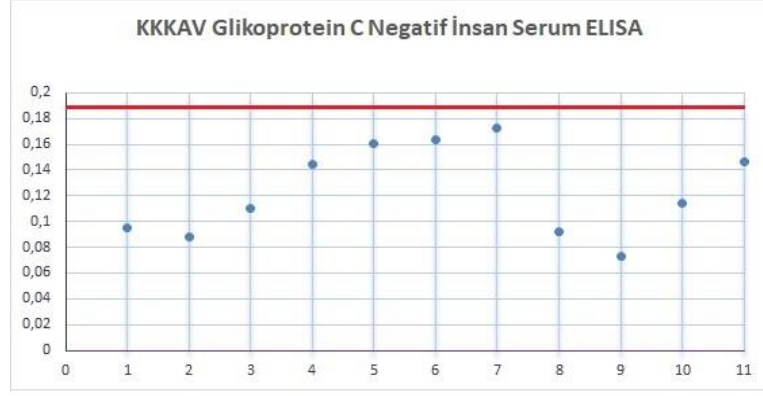
#### 4.9 Gc'nin Enzyme Immunosorbent Assay (EIA) Test ile Analizi

IgG yönünden pozitif olduğu bilinen toplam 30 örnek EIA ile test edilmiştir. Pozitif test sonuçlarının değerlendirilmesinde negatif örneklerde elde edilen ortalama optik dansiteye, 2x standart sapma (SD) eklenmesi ile elde edilen dansite pozitiflik sınırı olarak kabul edilmiştir. Buna göre ortalama OD 0.123, SD:0.035 ve pozitiflik sınırı (cut off) OD+2SD olan 0.193 olarak tespit edilmiştir. Şekil 4.7'de pozitif olduğu bilinen örneklerin %56'sının pozitif olduğu Gc tabanlı EIA ile gösterilmiştir.



**Şekil 4.8 :** Gc'ye karşı serumdaki IgG seviyelerinin KKKKAV antikor pozitif hasta serumlarında belirlenmesi.

IgG yönünden negatif olduğu belirlenen toplam 11 örnek EIA ile test edilmiştir. Şekil 4.8'de negatif olduğu bilinen örneklerin %100'ünün negatif olduğu Gc tabanlı EIA ile gösterilmiştir.



**Şekil 4.9 :** Gc'ye karşı serumdaki IgG'nin KKKAV antikorunu negatif hasta serumlarında belirlenmesi.

İnaktif virüs ile immünize tavşan serumu kullanılarak Gc kaplı plakalarda EIA yapılmıştır. Şekil 4.10'da EIA test sonucuna göre rekombinant Gc'nin KKKAV ile immünize tavşan serumu ile reaksiyon verdiği gösterilmiştir.



**Şekil 4.10 :** Rekombinant Gc kaplı plakada inaktif virüs ile infekte tavşan serumu test edilmiştir.

KKKAV keneler aracılığı ile taşınan ve mortalite oranı %30'lara ulaşabilen bir kanamalı ateş etkenidir. (1) 3 segmentli bu virüsün M segmentinden Gn ve Gc olmak üzere iki yapısal glikoprotein kodlanmaktadır. (2) Viral glikoproteinler Gn ve Gc virus partikülü üzerinde bulunmaktadır. Hücre yüzey reseptörleri ile etileşime geçmeleri, virüsün konak hücreye girişini sağlamaları, nötralizan antikorlar için hedef olmaları birer viral membrane protein olarak Gn ve Gc'nin en temel görevleri arasındadır. Hem Gn hem de Gc tip I integral transmembran ( TM ) proteinleridir ve



glikozilasyon ile modifiye edilir. [47, 70] Çok sayıda disülfid bağı ve karmaşık bir sekonder yapı oluşturan KKKAV glikoproteinlerinde 78-80 sistein kalıntısı vardır. KKKAV yapısal glikoproteinlerinin immün sistem için önemli olan nötralizan antikörlerin üretilmesini sağladığı gösterilmiştir. [40] KKKAV infeksiyonlarının endemik olarak görüldüğü bölgelerde KKKAV'ye karşı güvenli bir aşı geliştirilmesi gerekmektedir. Halk sağlığı üzerindeki potansiyel tehdidine rağmen KKKAV'ye karşı geliştirilmiş lisanslı bir aşı veya özel bir tedavi bulunmamaktadır. [70] Yüksek patojenite ve bulaşıcılık düzeyi KKKAV ile yapılacak çalışmalarda BSL-4 seviyesinde laboratuvarlar gerektirmektedir. Ancak virüsün tamamı yerine bazı viral proteinler ile çalışma stratejileri ile ve rekombinant antijen üretimini kolaylaştıran biyoinformatik araçlar ve DNA klonlama stratejilerindeki son gelişmeler ile virüse karşı mücadelede kazanımlar umulmaktadır. [70] Humoral immün yanıt KKKAV ile infekte olan hastaların iyileşmesi için önemli olduğu bazı çalışmalarda ön sürülmüştür. Bu hipotez KKKAV infeksiyonu geçirip iyileşen insana ait serumun akut KKKAV ile infekte olmuş hastalara pasif transferi ile bir miktar koruma sağlaması ile desteklenmiştir. Kubar ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada KKKA hastalarına hiperimmün globulin verilmesi 15 hastadan 13'ünde (%86) iyileşme ile sonuçlanmıştır. Hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda özellikle Gn'e karşı üretilen monoklonal antikörlerin hayvanları öldürücü KKKAV infeksiyonundan koruyabildiği gösterilmiştir. Tüm bu sonuçlar KKKAV glikoproteinlerini klinik uygulamalar için ilgi çekici kılmakta ve aşı adayları olma potansiyeli taşıdıklarını göstermektedir. KKKAV infeksiyonları için rekombinant ekspresyon sistemine dayanan tek aşı adayları modifiye edilmiş Ankara aşısı (MVA)'dır ve infeksiyona karşı koruma sağlarken antijen olarak KKKAV glikoproteinini kullanmaktadır. Prokaryotik sistemlerde eksprese edilen glikoproteinler bakteride beklenildiği gibi glikozile etme ve uygun şekilde katlama yetenekleri düşük olması sebebi ile istenilen formda üretilmemektedir. Bu nedenle *S. cerevisiae* ve *P. pastoris* gibi ökaryotik ekspresyon vektörleri alternatif olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmada KKKAV glikoproteinini Gc'yi üretmek için uygun bir vektör olması sebebi ile *P. pastoris* tercih edilmiştir. Çeşitli rekombinant genlerin *P. pastoris*'te başarılı bir şekilde eksprese edilmesi yol gösterici olmuştur. [71] *P. pastoris*'te protein üretimi nükleotid dizisi, kodon kullanımı, AT içeriği, ikincil yapı, gen kopya sayısı, ekspresyon kasedinin kromozomal entegrasyon bölgesi, sekresyon sinyalinin

özellikleri, endojen proteaz aktivitesi, ve kültür koşulları gibi fizyolojik ve genetik faktörlerden etkilenmektedir. [72] Bu çalışmada plazmide  $\alpha$  faktör sinyal sekansı eklenerek rekombinant proteinin salgılanması hedeflenmiştir. Beş gün süren ekspresyon sonrasında 50 ml kültürden yaklaşık 14 mg protein elde edilmiştir. Üretilen bu proteinin doğru konformasyonda olup olmadığı SDS-PAGE ve Western Blot ile analiz edilmiştir. Ayrıca üretilen Gc'nin yakalayıcı antijen olarak kullanıldığı EIA testlerinde; KKKAV ile infekte hasta serumlarında bu protein karşı antikor yanıtın araştırılması hedeflenmiştir. Çalışmada KKKAV Gc'ye karşı humoral immün yanıt oluşumu insan ve tavşan serumu kullanılarak araştırılmış ve Gc'ye özgü antikorlar tespit edilmiştir.



## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

KKKAV nükleoproteininin immünolojik özellikleri ile ilgili çalışmalar literatürde nispeten bulunmasına rağmen viral glikoproteinler Gn ve Gc'ye yönelik çalışmalar henüz tam olarak ortaya konmamıştır. Bu nedenle viral glikoprotein Gc'nin rekombinant olarak üretilmesi hedeflenmiştir. Ekspresyon vektörü olarak kullanılan *P. pastoris* rekombinant protein üretimi için önemli bir konaktır. Protein üretim platformu olarak maya ve mantarlarda ortak olan yüksek mannoz tipi N-glikozilasyonla terapötik glikoproteinler için daha fazla gelişme engellenmiştir. Bu tür N- glikanların protein işlenmesini karmaşık hale getirebildiği veya glikoprotein dolaşımından hızlı bir şekilde ayrılmasına neden olabileceği bildirilmiştir. Son yıllarda, insan N- glikozilasyon yolağını taklit etmek için *P. pastoris* vektör olarak tercih edilmiştir. Çünkü bu terapötik vektörün özellikle glikoproteinlerin uygun glikoformlarını üretmek ve yapı-fonksiyon ilişkilerini daha iyi anlamak için faydalı olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada KKKAV Kelkit' 06 suşu Gc glikoproteininin ökaryotik ekspresyon sistemi için optimize edilmiş sekansı pPICZ $\alpha$ A plazmidi içerisinde ilk olarak *E. coli* Top 10'e transforme edilmiştir. Zeosin kullanılarak seleksiyonu yapılan pozitif transformantlardan plazmit izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen plazmit *SacI* ile linearize edilmiştir. Linearize plazmit elektroporasyon metodu ile *P. pastoris* KM71'e transforme edilmiştir. KKKAV glikoproteini Gc *P. pastoris* KM71'de üretilmiştir. Üretilen rekombinant protein yüksek devirde santrifüjlenerek ön saflaştırma işlemi yapılmıştır. Üretilen rekombinant proteinin  $\alpha$  faktör sekresyon sinyalinin etkisi ile supernatanta salgılandığı tespit edilmiştir. Protein seviyesindeki ilk analiz SDS-PAGE ile yapılmış ve doğal boyutlarda Gc üretimi tespit edilmiştir.

Daha sonra KKKAV infeksiyonu geçirmiş buna bağlı olarak KKKAV antikoru pozitif insan serumu ve inaktif KKKAV ile immünize tavşan serumları kullanılarak proteinin antijenitesi test edilmiştir. Rekombinant Gc'nin katı faz antijeni olarak kullanıldığı EIA test ile KKKAV infeksiyonu geçirmiş ve ticari yöntemlerle serumlarında antiviral antikorlar tespit edilmiş insan serumları üzerinde test

edilmiştir. Bu testler soucunda IgG EIA'nın %56 duyarlılığa sahip olduğu gösterilmiştir.

Sonuç olarak çalışmamızda KKKAV glikoproteini Gc'nin üretilip saflaştırılmasında kullanılan *P.pastoris*'in KKKAV Gc için uygun bir açıklama vektörü olduğu gösterilmiştir. Ayrıca glikoprotein Gc'ye spesifik antikorların KKKAV infeksiyonu geçirmiş insan serumlarında bulunduğu gösterilmiştir. Elde edilen rekombinant proteinin daha ileri diyagnostik ve immünolojik çalışmalara imkan sağlama potansiyeline sahiptir. Rekombinant yollarla üretilen bu protein kullanılarak tasarlanacak gelecek çalışmalarda bu proteinin virus patogenezeine katkıları araştırılabilecektir.

## KAYNAKLAR

- [1] Zivcec, M., ve ark., *Molecular Insights into Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus*. Viruses, 2016. 8(4): p. 106.
- [2] Ergönül, Ö., *Crimean-Congo haemorrhagic fever*. The Lancet infectious diseases, 2006. 6(4): p. 203-214.
- [3] Akıncı, E., ve ark., *Pathogenesis of Crimean-Congo hemorrhagic fever*. 2013. 13(7): p. 429-437.
- [4] Tignor, G.H. ve C.A. Hanham, *Ribavirin efficacy in an in vivo model of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHF) infection*. Antiviral research, 1993. 22(4): p. 309-325.
- [5] Bente, D.A., ve ark., *Crimean-Congo hemorrhagic fever: history, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity*. 2013. 100(1): p. 159-189.
- [6] Bodur, H.J.U.S.D.K.-g.-h.w.d.o.t.t.d.k.-g.k.y.h.b.-d.-y.p., *Kırım-Kongo kanamalı ateşi ve DAS yönetimi*. 5. 2007.
- [7] Gargili, A., ve ark., *The role of ticks in the maintenance and transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: A review of published field and laboratory studies*. 2017. 144: p. 93-119.
- [8] Papa, A., ve ark., *Recent advances in research on Crimean-Congo hemorrhagic fever*. 2015. 64: p. 137-143.
- [9] Fisgin, N.T., ve ark., *The role of ribavirin in the therapy of Crimean-Congo hemorrhagic fever: early use is promising*. 2009. 28(8): p. 929-933.
- [10] Bertolotti-Ciarlet, A., ve ark., *Cellular localization and antigenic characterization of crimean-congo hemorrhagic fever virus glycoproteins*. J Virol, 2005. 79(10): p. 6152-61.
- [11] Cregg, J.M., ve ark., *Recombinant protein expression in Pichia pastoris*. 2000. 16(1): p. 23-52.
- [12] Hoogstraal, H., *The epidemiology of tick-borne Crimean-Congo hemorrhagic fever in Asia, Europe, and Africa*. Journal of medical entomology, 1979. 15(4): p. 307-417.

- [13] Engin, A., ve ark., *Toll-like receptor 8 and 9 polymorphisms in Crimean-Congo hemorrhagic fever*. *Microbes and infection*, 2010. 12(12-13): p. 1071-1078.
- [14] Ergonul, O., *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: new outbreaks, new discoveries*. *Curr Opin Virol*, 2012. 2(2): p. 215-20.
- [15] WATTS, D.M., ve ark., *Bunyaviral fevers: Rift Valley fever and Crimean-Congo hemorrhagic fever*, in *Tropical Infectious Diseases*. 2006, Elsevier. p. 756-761.
- [16] Casals, J.J.P.o.t.S.f.E.B. ve **Medicine**, *Antigenic similarity between the virus causing Crimean hemorrhagic fever and Congo virus*. 1969. 131(1): p. 233-236.
- [17] Elaldi, N.J.K.D., *Kırım-Kongo hemorajik ateşi epidemiyolojisi*. 2004. 17: p. 151-155.
- [18] Simpson, D., ve ark., *Congo virus: a hitherto undescribed virus occurring in Africa. Part 1. Human isolations-clinical notes*. 1967. 44(2): p. 87-92.
- [19] Whitehouse, C.A.J.A.r., *Crimean–Congo hemorrhagic fever*. 2004. 64(3): p. 145-160.
- [20] Gargili, A., ve ark., *The role of ticks in the maintenance and transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: A review of published field and laboratory studies*. *Antiviral Res*, 2017. 144: p. 93-119.
- [21] Briese, T., C.H. Calisher, ve S.J.V. Higgs, *Viruses of the family Bunyaviridae: are all available isolates reassortants?* 2013. 446(1-2): p. 207-216.
- [22] Samreen A., A.L.e.a., *Infectious Diseases Journal of Pakistan*, 2012. 21: p. 435-42.
- [23] Ergonul, O., ve ark., *Pregnancy and Crimean-Congo haemorrhagic fever*. 2010. 16(6): p. 647-650.
- [24] Ergonul, O., *Clinical and pathologic features of Crimean-Congo hemorrhagic fever*, in *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever*. 2007, Springer. p. 207-220.
- [25] Bray, M., *Comparative pathogenesis of Crimean-Congo hemorrhagic fever and Ebola hemorrhagic fever*, in *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever*. 2007, Springer. p. 221-231.
- [26] Tezer, H., ve ark., *Crimean-Congo hemorrhagic fever in children*. 2010. 48(3): p. 184-186.

- [27] **Swanepoel, R., ve ark.**, *The clinical pathology of Crimean-Congo hemorrhagic fever*. 1989. 11(Supplement\_4): p. S794-S800.
- [28] **Dimitrov, D.**, *Antibodies to CCHFV for prophylaxis and treatment*, in *Crimean–Congo Hemorrhagic Fever: A Global Perspective*. 2007, Springer Dordrecht, NL. p. 261-269.
- [29] **Kubar, A., ve ark.**, *Prompt administration of Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) virus hyperimmunoglobulin in patients diagnosed with CCHF and viral load monitorization by reverse transcriptase-PCR*. 2011. 64(5): p. 439-443.
- [30] **Zeller, H.**, *Laboratory diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever*, in *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever*. 2007, Springer. p. 233-243.
- [31] **Vassilenko, S., ve ark.**, *Specific intravenous immunoglobulin for Crimean-Congo haemorrhagic fever*. 1990. 335(8692): p. 791-792.
- [32] **Vasilenko, S.** *Results of the investigation on etiology, epidemiology features and specific prophylactic of Crimean hemorrhagic fever (CHF) in Bulgaria [abstract 9]*. in *International Congress of Tropical Medicine and Malaria, Athens*. 1973.
- [33] **Adams, M., ve ark.**, *Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2014)*. 2014. 159(10): p. 2831-2841.
- [34] **Hewlett, M.J., R.F. Pettersson, ve D.J.J.o.v. Baltimore**, *Circular forms of Uukuniemi virion RNA: an electron microscopic study*. 1977. 21(3): p. 1085-1093.
- [35] **Lasecka, L. ve M.D.J.A.o.v. Baron**, *The molecular biology of nairoviruses, an emerging group of tick-borne arboviruses*. 2014. 159(6): p. 1249-1265.
- [36] **Devignot, S., ve ark.**, *A virus-like particle system identifies the endonuclease domain of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus*. 2015. 89(11): p. 5957-5967.
- [37] **Bergeron, É., ve ark.**, *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus-encoded ovarian tumor protease activity is dispensable for virus RNA polymerase function*. 2010. 84(1): p. 216-226.
- [38] **Zivcec, M., ve ark.**, *Assessment of inhibitors of pathogenic Crimean-Congo hemorrhagic fever virus strains using virus-like particles*. 2015. 9(12): p. e0004259.
- [39] **Donets, M.A., ve ark.**, *Physicochemical characteristics, morphology and morphogenesis of virions of the causative agent of Crimean hemorrhagic fever*. 1977. 8(5): p. 294-308.

- [40] Bertolotti-Ciarlet, A., ve ark., *Cellular localization and antigenic characterization of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus glycoproteins*. 2005. 79(10): p. 6152-6161.
- [41] Simon, M., C. Johansson, ve A.J.J.o.G.V. Mirazimi, *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus entry and replication is clathrin-, pH-and cholesterol-dependent*. 2009. 90(1): p. 210-215.
- [42] Garrison, A.R., ve ark., *Crimean–Congo hemorrhagic fever virus utilizes a clathrin-and early endosome-dependent entry pathway*. 2013. 444(1-2): p. 45-54.
- [43] Shtanko, O., ve ark., *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus entry into host cells occurs through the multivesicular body and requires ESCRT regulators*. 2014. 10(9): p. e1004390.
- [44] Sanchez, A.J., M.J. Vincent, ve S.T.J.J.o.v. Nichol, *Characterization of the glycoproteins of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus*. 2002. 76(14): p. 7263-7275.
- [45] Sanchez, A.J., ve ark., *Crimean-congo hemorrhagic fever virus glycoprotein precursor is cleaved by Furin-like and SKI-1 proteases to generate a novel 38-kilodalton glycoprotein*. J Virol, 2006. 80(1): p. 514-25.
- [46] Altamura, L.A., ve ark., *Identification of a novel C-terminal cleavage of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus PreGN that leads to generation of an NSM protein*. 2007. 81(12): p. 6632-6642.
- [47] Bergeron, E., M.J. Vincent, ve S.T. Nichol, *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus glycoprotein processing by the endoprotease SKI-1/SIP is critical for virus infectivity*. Journal of Virology, 2007. 81(23): p. 13271-13276.
- [48] Wang, Y., ve ark., *Structure of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus nucleoprotein: superhelical homo-oligomers and the role of caspase-3 cleavage*. 2012. 86(22): p. 12294-12303.
- [49] Macleod, J.M.L., ve ark., *Mapping of the interaction domains of the Crimean–Congo hemorrhagic fever virus nucleocapsid protein*. 2015. 96(Pt 3): p. 524.
- [50] Connolly-Andersen, A.-M., K.-E. Magnusson, ve A.J.J.o.v. Mirazimi, *Basolateral entry and release of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in polarized MDCK-1 cells*. 2007. 81(5): p. 2158-2164.
- [51] Zhao, T., ve ark., *Functional recombinant human Legumain protein expression in Pichia pastoris to enable screening for Legumain small molecule inhibitors*. Protein Expr Purif, 2018. 150: p. 12-16.



- [52] Wang, W., ve ark., *Structural and functional diversity of nairovirus-encoded nucleoproteins*. 2015. 89(23): p. 11740-11749.
- [53] Guo, Y., ve ark., *Crimean–Congo hemorrhagic fever virus nucleoprotein reveals endonuclease activity in bunyaviruses*. 2012. 109(13): p. 5046-5051.
- [54] Barnwal, B., ve ark., *The non-structural protein of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus disrupts the mitochondrial membrane potential and induces apoptosis*. 2016. 291(2): p. 582-592.
- [55] Estrada, D.F. ve R.N.J.J.o.B.C. De Guzman, *Structural characterization of the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus Gn tail provides insight into virus assembly*. 2011. 286(24): p. 21678-21686.
- [56] Simmons, G., ve ark., *Ebola virus glycoproteins induce global surface protein down-modulation and loss of cell adherence*. 2002. 76(5): p. 2518-2528.
- [57] Honig, J.E., J.C. Osborne, ve S.T.J.V. Nichol, *Crimean–Congo hemorrhagic fever virus genome L RNA segment and encoded protein*. 2004. 321(1): p. 29-35.
- [58] Frias-Staheli, N., ve ark., *Ovarian tumor domain-containing viral proteases evade ubiquitin-and ISG15-dependent innate immune responses*. 2007. 2(6): p. 404-416.
- [59] James, T.W., ve ark., *Structural basis for the removal of ubiquitin and interferon-stimulated gene 15 by a viral ovarian tumor domain-containing protease*. 2011. 108(6): p. 2222-2227.
- [60] Lua, L.H.L., ve ark., *Bioengineering Virus-Like Particles as Vaccines*. Biotechnology and Bioengineering, 2014. 111(3): p. 425-440.
- [61] Bachmann, M.F., ve ark., *The influence of antigen organization on B cell responsiveness*. 1993. 262(5138): p. 1448-1451.
- [62] Keller, S.A., ve ark., *Cutting edge: limited specialization of dendritic cell subsets for MHC class II-associated presentation of viral particles*. 2010. 184(1): p. 26-29.
- [63] Li, H.-Y., ve ark., *Virus-like particles for enterovirus 71 produced from *Saccharomyces cerevisiae* potently elicits protective immune responses in mice*. 2013. 31(32): p. 3281-3287.
- [64] Ogata, K., ve ark., *A yeast capable of utilizing methanol*. 1969. 33(10): p. 1519-1520.

- [65] **Ahmad, M., ve ark.,** *Protein expression in Pichia pastoris: recent achievements and perspectives for heterologous protein production.* Appl Microbiol Biotechnol, 2014. 98(12): p. 5301-17.
- [66] **Wood, C.R., ve ark.,** *The synthesis and in vivo assembly of functional antibodies in yeast.* 1985. 314(6010): p. 446.
- [67] **Horwitz, A.H., ve ark.,** *Secretion of functional antibody and Fab fragment from yeast cells.* 1988. 85(22): p. 8678-8682.
- [68] **Ridder, R., ve ark.,** *Generation of rabbit monoclonal antibody fragments from a combinatorial phage display library and their production in the yeast Pichia pastoris.* 1995. 13(3): p. 255.
- [69] **Verma, R., E. Boleti, ve A.J. George,** *Antibody engineering: comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems.* J Immunol Methods, 1998. 216(1-2): p. 165-81.
- [70] **Rahpeyma, M., ve ark.,** *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Gn Bioinformatic Analysis and Construction of a Recombinant Bacmid in Order to Express Gn by Baculovirus Expression System.* Jundishapur J Microbiol, 2015. 8(11): p. e25502.
- [71] **Akcapinar, G.B., O. Gul, ve U. Sezerman,** *Effect of codon optimization on the expression of Trichoderma reesei endoglucanase 1 in Pichia pastoris.* Biotechnol Prog, 2011. 27(5): p. 1257-63.
- [72] **Teng, D., ve ark.,** *Multiple copies of the target gene enhances plectasin secretion in Pichia pastoris X-33.* 2015. 50(4): p. 553-560.

## ÖZGEÇMİŞ

**Ad-Soyad** : Filiz GÜNEY  
**Doğum Tarihi ve Yeri** : 07.06.1992 / SAMSUN  
**E-posta** : figuney@bezmialem.edu.tr

### ÖĞRENİM DURUMU

- **Lisans** : 2015, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik

### MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- Ekim 2016- Kasım 2017 tarihleri arasında TÜBİTAK destekli ‘Kırım Kongo Kanamalı Ateş Virüsüne Özgü Serolojik Tanı Sistemlerinin Gelistirilmesi’ adlı projede bursiyer olarak görev aldı.
- Kasım 2017 tarihinden itibaren Bezmialem Vakıf Üniversitesi Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji Enstitüsünde teknisyen olarak görev almaktadır.

### YÜKSEK LİSANS TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Guney F., Doymaz M.Z.**, 2019. Humoral Immune Response to Glycoprotein C of Crimean Congo Hemorrhagic Fever (CCHFV) Virus Kelkit Strain, VII. European Congress of Virology,2019, Hollanda (Poster sunumu)