

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HEPATİT C VİRUSUNUN “CORE”
PROTEİNİN PROKARYOTİK HÜCREDE İFADE
ETTİRİLİP SAFLAŞTIRILMASI**

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ERTAN ÇAKMAK

Danışman Öğretim Üyeleri

Prof Dr. Y. HAKAN ABACIOĞLU

Yrd. Doç. Dr. İ. MEHMET ALİ ÖKTEM

İZMİR-2007

TEŐEKKÜR

Eğitimim ve bu çalıőmam sũresince bana her tũrlũ desteği veren danıőmanlarım Prof Dr. Y. Hakan Abacıoğlu'na ve Yrd. Doç. Dr İ. Mehmet Ali Öktem'e, çalıőmam sırasında bana yol gösteren Prof. Dr. Neőe Atabey ve Yrd. Doç Dr. Esra Erdal'a, desteklerinden dolayı Prof. Dr. Zeynep Gũlay'a, Doç Dr. Arzu Sayıner'e, Doç. Dr. Nuran Esen'e, Dr. Hũseyin oban'a, Yrd. Doç Dr. Ogũn Sercan'a, Yrd. Doç. Dr. Zeynep Sercan'a, Prof. Dr. Gũlgũn Oktay'a, Doç Dr. Halil Resmi'ye, Yrd. Doç. Dr. Nergiz Murat'a ve dostum Uzm. Biyolog Murat okaklı'ya, ayrıca yetiőmemde emeği geçen tũm diğer hocalarıma ve aileme teőekkũr ederim.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ	vi
KISALTMALAR	vii
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİGİLER	4
4.1 Hepatit C Virusü	4
4.1.1 Yapı ve Genom Organizasyonu.....	4
4.1.2 HCV Poliprotein Yapısı.....	4
4.1.3 HCV'nin Yaşam Döngüsü.....	7
4.1.4 Viral Heterojenite.....	7
4.1.5 Konakçı İlişkisi.....	8
4.1.6 Yayılım ve Epidemiyoloji.....	8
4.1.7 İnfeksiyonun Bulaş Yolları.....	9
4.1.8 Klinik Özellikleri.....	10
4.1.9 Patogenez.....	11
4.1.10 Tanı.....	14
4.2 Özyapı Proteinini	16
4.2.1 Özyapı Proteinin Yapısı.....	16
4.2.2 Özyapı Proteinin Hücre İçi Dağılımı.....	18
4.2.3 Özyapı Proteinin Oligomerizasyonu.....	18
4.2.4 Özyapı Proteinin RNA ile Etkileşimi.....	18
4.2.5 Özyapı Proteinin Diğer HCV Proteinleri ile Etkileşimi.....	19
4.2.6 Özyapı Proteinin Etkileştiği Transkripsiyonel Faktörler ve Hücresel Proteinler.....	19
4.2.7 Özyapı Proteinin Lipit Metabolizması Üzerine Etkileri.....	19

4.2.8 Özyapı Proteinin Apoptoz Üzerine Etkileri	20
4.2.9 Özyapı Proteinin Onkojenik Potansiyeli	20
4.2.10 Özyapı Proteinin Bağışık Sistemine Etkileri	20
4.3 Gen Klonlama	21
4.3.1 Gen Klonlama Nedir?	21
4.3.2 Taşıyıcı DNA Molekülleri.....	21
4.3.3 Restriksiyon Endonükleazlar	22
4.3.4 Klonlama Teknikleri	23
4.3.4.1 TA Klonlaması.....	23
4.3.4.2 Yönlendirilmiş Klonlama.....	23
4.3.5 DNA Ligasyonu	24
4.3.6 Rekombinant Plazmitin Konak Hücreye Aktarılması	25
4.3.7 Rekombinant DNA'yı İçeren Hücrenin Saptanması.....	25
4.4 Escherichia coli'de Protein Üretimi ve Saflaştırılması	27
4.4.1 Vektör Seçimi.....	27
4.4.2 Konak Hücre Seçimi	27
4.4.3 Protein Üretimini Etkileyen Faktörler	27
4.4.4 Rekombinant Proteinin Üretimi	28
4.4.5 Protein Saflaştırması	29
5. GEREÇ VE YÖNTEM	32
5.1 Gereç.....	32
5.1.1 Çözeltiler	32
5.1.2 Enzimler.....	43
5.1.3 Antikorlar	43
5.1.4 Hazır Uygulamalar.....	43
5.1.5 Diğer Gereçler	43
5.2 Yöntem	45

5.2.1 Klonlanacak DNA'nın Eldesi	45
5.2.1.1 Kalıp RNA.....	45
5.2.1.2 Öncüllerin Belirlenmesi.....	45
5.2.1.3 cDNA Sentezi	46
5.2.1.4 DNA Çoğaltma	46
5.2.1.5 DNA Elektroforezi	48
5.2.2 Klonlama	49
5.2.2.1 TA Klonlaması	49
5.2.2.1.1 Taq Polimeraz ile DNA Çoğaltma.....	49
5.2.2.1.2 Ligasyon	50
5.2.2.1.3 Gliserol Stoğu Hazırlama.....	50
5.2.2.1.4 Kompetan Hücre Üretme.....	51
5.2.2.1.5 Transformasyon.....	52
5.2.2.1.6 Klon İçeren Hücrenin Saptanması	52
5.2.2.1.6.1 Kaynatma Yolu ile DNA Eldesi	53
5.2.2.1.6.2 Klon Tarama Amacıyla PZT Uygulaması	53
5.2.2.1.7 Alkalen Lizis ile Midiprep	54
5.2.2.1.8 DNA'nın Spektrofotometre ile Miktarının Saptanması	56
5.2.3 Yönlendirilmiş Klonlama.....	56
5.2.3.1 TA Klonlama Vektöründen Restriksiyon Enzim Kesimi ile Özyapı Proteinini Kodlayan DNA Dizisinin Çıkartılması.....	56
5.2.3.2 Agaroz Jelden DNA Eldesi	57
5.2.3.3 Yönlendirilmiş Klonlama İçin Ligasyon Reaksiyonu.....	58
5.2.3.4 pQE-C178'in Transforme Edilmesi.....	59
5.2.3.5 Rekombinant DNA'yı İçeren Kolonilerin Taranması.....	59
5.2.3.6 Rekombinant DNA'nın Eldesi.....	59
5.2.3.7 Rekombinant Vektörlerin Restriksiyon Enzim Analizi.....	60
5.2.3.8 Rekombinant Vektörün DNA Dizi Analizi	60

5.2.3.9 pQE-C178 Vektörünün M15 Suşuna Transformasyonu	60
5.2.4 Rekombinant Protein Üretimi.....	60
5.2.4.1 Küçük Çapta Protein Üretimi.....	60
5.2.4.2 Protein Eldesi	61
5.2.4.3 Bradford Yöntemi ile Protein Miktar Ölçümü	62
5.2.4.4 “Western Blotting”	62
5.2.4.4.1 Denatüre Edici Protein Elektroforezi.....	63
5.2.4.4.2 Denatüre Edici Protein Elektroforezi ile Ayrımlanan Proteinlerin PVDF (Poliviniliden florür) Membranına Transfer Edilmesi ve Bloklanması	64
5.2.4.4.3 Bloklanan Membrana Birincil ve İkincil Antikor Uygulanması	65
5.2.4.4.4 Proteinlerin Saptanması	65
5.2.4.5 Büyük Çapta Protein Üretimi.....	66
5.2.5 Üretilen Proteinin Saflaştırılması	66
5.2.5.1 Saflaştırılan Rekombinant Proteinin Saptanması.....	67
6. BULGULAR	68
6.1 PZT Ürünün Görüntüsü	68
6.2 TA Klonlaması ile Rekombinant Vektör içeren Kolonilerin Saptanması.....	69
6.3 Agaroz Jelden DNA Eldesi	70
6.4 pQE30 ve Özyapı Proteini178’in Yönlendirilmiş Klonlaması.....	71
6.5 pQE-C178 DNA Dizilimi.....	72
6.7 Filogenetik Çözümleme Bulguları.....	74
6.8 Küçük Çapta Protein Üretimin “Western Blot” ile Doğrulanması	75
6.9 Protein Saflaştırma Bulgusu.....	76
7. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	77
8. KAYNAKLAR.....	83

SEKİL LİSTESİ

Şekil 1: HCV'nin şematik yapısı.....	4
Şekil 2: HCV Poliproteinini şematik gösterimi	5
Şekil 3: HCV'nin yaşam döngüsü	7
Şekil 4: Hepatit C'nin akut dönem seyri.....	10
Şekil 5: Hepatit C'nin kronik dönem seyri	11
Şekil 6: Kyte ve Doolittle Ortalama Hidrofobisite Skalası.....	17
Şekil 7: Plazmit pQE-30'un haritası.....	22
Şekil 8: TA klonlamanın aşamaları	23
Şekil 9: Yönlendirilmiş klonlamanın aşamaları	24
Şekil 10: DNA parçalarının birbirine bağlanması.....	25
Şekil 11: Mavi-Beyaz koloni görüntüsü	26
Şekil 12: 6xHistidin'li proteinlerin saflaştırma basamakları	30
Şekil 13: HCV RT-PZT görüntüsü.....	68
Şekil 14: TA klonlamasında PZT ile pozitif olan kolonilerin görüntüsü	69
Şekil 15: Agaroz jelden DNA eldesinin ürün görüntüsü	70
Şekil 16: Yönlendirilmiş klonlamanın doğrulama görüntüsü	71
Şekil 17: DNA dizileme sonucu.....	72
Şekil 18: Kodlanan proteinin aminoasit dizisi	73
Şekil 19: Filogenetik ağaç.....	74
Şekil 20: Küçük çapta protein üretimini gösteren “Western Blot” sonucu	75
Şekil 21: Saflaştırılan protein ile yapılan “Western Blot” sonucu	76

KISALTMALAR

HCV: Hepatit C virusu (Hepatitis C virus)

HIV: Bağışıklık Sisteminin ökmesine Neden Olan Virus (Human immunodeficiency virus)

HBV: Hepatit B virusu (Hepatitis B virus)

HBsAg: Hepatit B yüzey antijeni

HSK: Hepatoselüler karsinoma

RNA: Ribonükleik asit

DNA: Deoksiribonükleik asit

cDNA: Komplementer DNA (Complementary DNA)

mRNA: Haberci RNA (Messenger RNA)

tRNA: Transfer RNA

UTR: Proteine dönüştürülmeyen bölge, (Untranslated region)

PZT: Polimeraz zincir tepkimesi (PCR: Polymerase chain reaction)

C178: Özyapı proteininin, ilk 178 aminoasitten oluşan rekombinant protein.

PKR: Çift iplikli RNA'ya bağımlı protein kinaz

RbRp: RNA'ya bağımlı RNA polimeraz

SR-B1: Çöpçü reseptörü sınıf B tip 1 (Scavenger receptor class B type 1)

LDL-R: Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü, (Low density lipoprotein receptor)

ALT: Alanin aminotransferaz

TNF: Tümör nekrozu faktörü (Tumor necrosis factor)

IFN: İnterferon

eIF2 α : Translasyon başlatıcı faktör 2 α

HRP: Yaban turpu peroksidazı (Horse-radish peroxidase)

SDS: Sodyum dodesil sülfat

SSA: Sığır serum albümini

IPTG: İzopropil- β -D-tiyogalaktopiranosid

LB: Luria-Bertani

PVDF: Poliviniliden diflorid (Poly-vinilidene floride)

IRES: “Internal Ribosomal Entry Site”

HVR1: Hypervariable region 1, (Çokdeğişken bölge 1)

ori: Replikasyon orijini, (Origin of replication)

EIA: “Enzyme immunoassay”

RT: “Reverse transcriptase”

PAGE: Poliakrilamid jel elektroforezi (Poly-acryl amide gel electrophoresis)

kDa: Kilo Dalton

kb: Kilo Baz

bp: Baz çifti (Base pairs)

IU: Enternasyonal ünite

u: Ünite

Rpm: Dakika devir sayısı (Revolution per minute)

1. ÖZET

Hepatit C virusu (HCV) zarflı, tek iplikli bir RNA virusudur. Dünya Sağlık Örgütünün tahminlerine göre dünyada 170 milyon kişinin HCV ile infekte olduğu tahmin edilmektedir. HCV ciddi morbidite ve mortalitesi yanı sıra, tedavi maliyetlerinin yüksekliği ile de önemli bir sağlık sorunudur.

HCV poliproteininden kodlanan ilk protein özyapı (core) proteindir. Bu protein virusun yapısına katılması dışında, hücresel işlevleri de virus lehine düzenleyebildiği gözlenmiştir. Bu nedenle bu proteinin virusun patogenezinde rol aldığı düşünülmektedir.

Çalışmada, özyapı proteinin ilk 178 aminoasidini kodlayan DNA dizisi PZT ile çoğaltıldı. PZT ürünü önce pGEM-T Easy TA vektörüne klonlandı. Ardından bu vektörden *Bam*HI ve *Hind*III ile kesilip pQE-30'a klonlandı. Ekspresyon, *E. coli* M15 (prep4) suşunda OD₆₀₀=0.7'de 1mM IPTG ile uyarılarak 3 saat süre ile yapıldı ve bakteriler santrifüj ile pellet haline getirip 8M ürede çözüldü. Protein saflaştırılması afinite kromatografisi (Ni-NTA matriks) ile yapıldı. Ekspresyon ve saflaştırılmış protein, "Western Blot" ile ECL substrat kullanılarak saptandı. Ekspresyon ve saflaştırma sonrasında beklenen 21kDa'luk bant büyüklüğü elde edildi.

Çalışmada, özyapı proteinin ilk 178 aminoasidi *E. coli*'de eksprese edilmiştir. Bu saflaştırılmış protein patogenez çalışmalarında, serolojik test hazırlanmasında kullanılabilir. Ayrıca klonlanan vektörler PZT'de pozitif kontrol olarak kullanılabilir. Bu çalışmada ile elde edilen bilgiler, gelecekte yapılacak prokaryotik ekspresyon çalışmaları için zemin oluşturacaktır.

Anahtar kelimeler: Hepatit C virusu, Özyapı (core) proteini, Klonlama, Ekspresyon, Saflaştırma

2. SUMMARY

Hepatitis C virus (HCV) is an enveloped, positive stranded RNA virus. The World Health Organization estimates that there are more than 170 million HCV infected individuals worldwide. Aside from the high morbidity and mortality of the HCV infection, the treatment costs can be a burden on health economics.

Core protein is the structural unit of the viral capsid. It also seems to be important for the viral pathogenesis by interfering with various cellular processes.

In this study, the first 178 amino acids coding sequence of the core protein was amplified using polymerase chain reaction (PCR) and cloned into the pGEM-T Easy TA cloning vector. Following digestion with *Bam*HI and *Hind*III, the insert was subcloned into the pQE-30 vector. The protein expression was carried out in the *E. coli* M15 (prep4) using IPTG as inducer. The bacterium was pelleted with centrifugation and resuspended in 8M urea. The purification of the recombinant protein was made with affinity chromatography (Ni-NTA). The detection of the expressed and purified protein was made with western blotting using chemiluminescent substrate. The expected 21kDA protein band was detected after the expression and purification.

In this study, the core protein was expressed in *E. coli*. The purified protein can be used in pathogenesis studies and in serologic tests as antigen. The cloned vector can be used as a positive control in PCR experiments.

Key words: Hepatitis C virus, Core protein, Cloning, Expression, Purification

3. GİRİŞ VE AMAC

Hepatit C virusu (HCV) zarflı, tek iplikli bir RNA virusudur. Çoğunluğu kronik seyreden hepatitlere ve bu zeminde gelişen siroz ve hepatoselüler karsinomaya (HSK) neden olur. Tüm dünyada ortalama prevalansın %3 olduğu ve yaklaşık 170 milyon kişinin bu virusla infekte olduğu tahmin edilmektedir. HCV ciddi morbidite ve mortalitesi yanı sıra, tedavi maliyetlerinin yüksekliği ile de önemli bir sağlık sorunudur.

HCV infeksiyonlarının nasıl kronikleştiği, bağışık yanıtlardan nasıl kaçabildiği tam olarak bilinmemektedir. Son yıllarda, virusun yapısal ve yapısal olmayan proteinlerinin hücresel süreçlerle etkileşebildiği ve farklı hücrelerin işlevlerini etkileyebildiklerini gösterilmiştir. Bu proteinlerden biri de özyapı (core) proteindir.

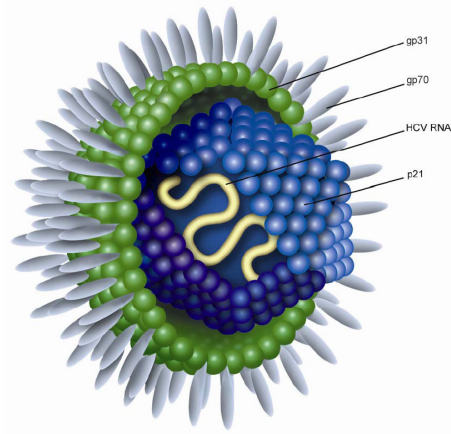
Bu çalışmada özyapı geninin klonlanması ve prokaryotik hücrelerde eksprese edilerek, saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan protein, patogenez çalışmaları yanı sıra bağışık yanıtların incelenmesinde ve tanısal testlerin geliştirilmesinde kullanılabilecektir. Ayrıca, elde edilen klonun PZT (Polimeraz Zincir Tepkimesi) incelemelerinde pozitif kontrol olarak kullanılması da olasıdır.

4. GENEL BİGİLER

4.1 Hepatit C Virusu

4.1.1 Yapı ve Genom Organizasyonu

HCV, 1989 yılında Choo ve arkadaşları tarafından ne-A ne-B hepatitli hasta kanları ile infekte edilen şempanzelerden moleküler klonlama teknikleri kullanılarak tanımlanmıştır (1). HCV *Flaviviridae* ailesinde *Hepacivirus* cinsi içinde sınıflandırılmıştır. Virus ikozahedral kapsidli, 50-70nm çapında, zarflı bir virustur (2,3). Virion yoğunlu 1.06-1.25g/mL'dir (4).



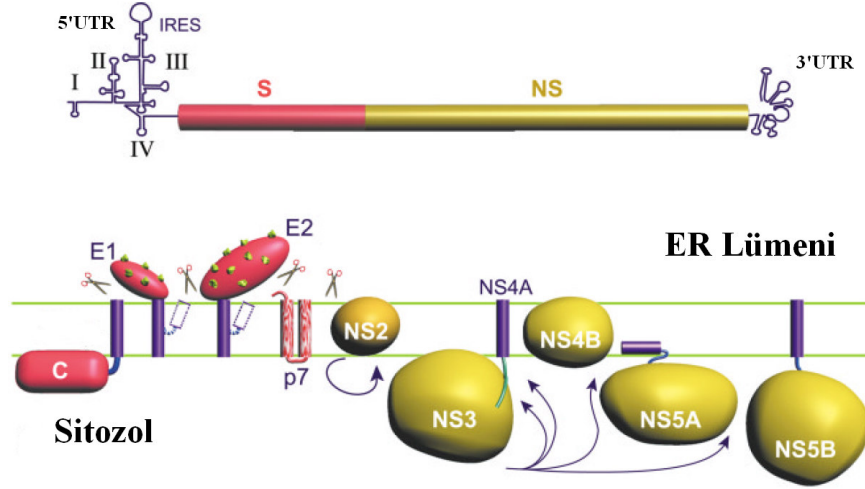
Şekil 1: HCV'nin şematik yapısı. E1 (gp31) ve E2 (gp70) zarf glikoproteinleri olup, viral kılıf özyapı proteini (p21) tarafından oluşturulur (Kaynak 5'ten alınmıştır).

HCV genomu tek iplikli, pozitif yönelimli bir RNA'dan oluşur. Genom yaklaşık 10kb büyüklüğündedir. Genomun 5' ve 3' ucunda protein kodlamayan ve iyi korunmuş iki bölge bulunmaktadır. 5' ucu poliprotein transkripsiyonundan, 3' ucu ise genomun replikasyonundan sorumludur (2).

4.1.2 HCV Poliprotein Yapısı

Viral genomda tek bir açık okuma çerçevesi bulunmaktadır. Bu bölge 3010-3011 aminoasit uzunluğunda bir poliprotein kodlamaktadır. Poliprotein işlenmesi sonucunda 10 adet protein oluşmaktadır. Bunlar 5' ucundan 3'ne doğru sırasıyla özyapı, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B'dir (2) (Şekil 2). Özyapı geninden ribozomal çerçeve kayması sonucu sentezlenen ve ARFP/F proteini adı verilen bir protein daha vardır (3). Özyapı ve zarf (E1 ve E2) proteinleri yapısal proteinler, diğer proteinler ise yapısal olmayan

(Non Structural; NS) proteinlerdir. Yapısal proteinler ve p7 proteini konak hücre proteazları, yapısal olmayan proteinler ise viral proteazlar tarafından poliproteinden kesilip ayrılmaktadır (2).



Şekil 2: HCV poliproteininin şematik gösterimi (Kaynak 3'ten alınmıştır).

Özyapı proteini viral kapsidi oluşturmasının yanı sıra virusun yaşam döngüsünde ve konak bağışık yanıtlarından kaçmasında rol alır (2). Bu protein 4.2 başlığı altında ayrıntılı olarak anlatılacaktır.

E1, 31kDa ağırlığında bir glikoproteindir ve zarf yapısında yer almaktadır. E1, özyapı proteini ile etkileşerek enkapsidasyonu sağlamaktadır (6,7).

E2, 70kDa ağırlığında bir glikoproteindir ve E1 gibi zarfta yer alır. E2 virionun hücreye tutunmasından sorumludur (2,6). E2 üzerinde bulunan çokdeğişken (hypervariable) bölgeler virüsü nötralizan antikordardan kaçmasını sağlar (8).

p7, 7kDa ağırlığında hidrofobik bir proteindir ve bir viroporin olduğu düşünülmektedir. İki adet transmembran bölgesine sahiptir ve hegzamerler oluşturmaktadır. Yapılan araştırmalarda p7'nin bir iyon kanalı olduğu ve HCV'nin infektevisinde rol aldığına dair bulgular elde edilmiştir (3).

NS2, 23kDa ağırlığında bir proteindir ve NS3 ile birlikte proteaz etkinliği göstermektedir. NS2 proteini, NS2/NS3 bileşkesindeki bir diziyi tanıyarak keser ve iki proteinin birbirinden ayrışmasını sağlar (3,6).

NS3, 68kDa ağırlığında bir proteindir. N-terminal bölgesinde NS4A kofaktörü ile birlikte serin proteaz, C-terminal bölgesinde helikaz aktivitesi göstermektedir. Serin proteaz aktivitesi sayesinde HCV poliprotein yapısındaki proteinlerini birbirinden ayırmaktadır (3,6).

NS4A, 6kDa ağırlığında ve NS3'ün kofaktörü olarak görev alan bir proteindir (2,6). N-terminal bölgesinde bulunan hidrofobik aminoasit kalıntısı NS3'ün proteaz işlevini düzenlemektedir (3,6).

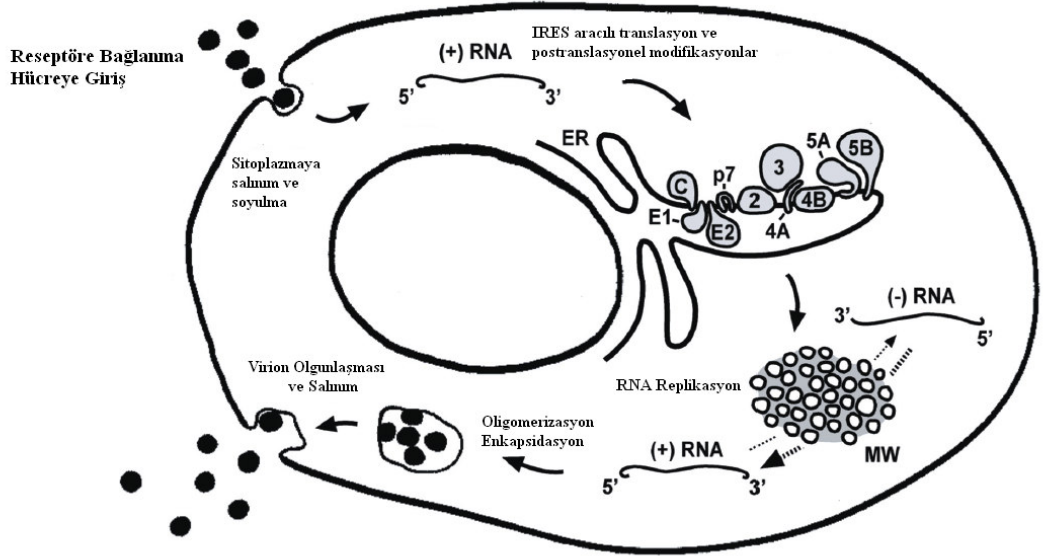
NS4B, 27kDa ağırlığında bir integral membran proteindir. Endoplazmik retikulum membranında değişikliğe neden olmaktadır. Bu değişiklik viral replikasyon kompleksini oluşturmaktadır (2,6).

NS5A'nın 56 ve 58kDa ağırlığında iki şekli vardır ve bu protein bir çinko metalloproteindir. NS5A'nın 58kDa ağırlığındaki şekli hiperfosforilasyondan kaynaklanmaktadır (9). Hiperfosforilasyon hem viral hem de konak hücre proteinleri tarafından gerçekleştirilmektedir (10,11). Hiperfosforile proteinin viral replikasyonda düzenleyici görevi vardır (12). Bu protein üzerinde çift iplik RNA'ya bağımlı protein kinaz (PKR) ile etkileşen "İnterferon Duyarlılığını Belirleyen Bölge (ISDR: Interferon-sensitivity-determining-region)" olarak adlandırılan bir bölgesi vardır. ISDR bölgesinin PKR ile etkileşimi interferon sağaltımını etkileyebileceği gösterilmiştir (2,13).

NS5B, 65kDa ağırlığında bir proteindir. RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RbRp) etkinliğindedir (3,6). Diğer tüm pozitif iplikli RNA virusların RbRp'ı gibi NS5B'de GDD motifi içermektedir (14). Bu protein aynı zamanda terminal transferaz aktivitesi göstermektedir (15). RbRp'in aktivitesi divalent katyonlara (Mn^{2+} , Mg^{2+}) bağımlıdır. RNA'yı dakikada 150-200 nükleotit kadar uzatmaktadır (5). RbRp'in DNA polimerazlar gibi 3'→5' ekzonükleaz aktivitesi yoktur. Bu nedenle, uzatma esnasında çok hata yaparlar (16). RbRp'in neden olduğu mutasyon oranı tüm genomda 1.44×10^{-3} nükleotit/yıl'dır (17).

4.1.3 HCV'nin Yaşam Döngüsü

Virusun olası reseptörleri arasında CD81, SR-B1 (Scavenger receptor class B type 1) ve LDL-R (Low density lipoprotein receptor) yer alır (4). Virusun kltrin aracılı endozitozis ile hücre içine alındığı düşünülmektedir (18). Soyulma ardından serbest kalan viral genom 5' ucunda bulunan IRES (Internal ribozomal entry site) sayesinde genom ribozoma bağlanır ve translasyon başlar. Bu aşamada özyapı, E1, E2 ve p7 konak proteazları tarafından kesilerek poliproteinden ayrılır. Kalan diğer proteinlerde viral proteazlar tarafından kesilir. NS4B endoplazmik retikulum membranını değişikliğe uğratar ve veziküler replikasyon kompleksleri oluşur (2). Replikasyon bu komplekslerin içerisinde gerçekleşir. (19). Sentezlenen RNA varlığında özyapı proteini oligomerize olur (20). Membranın dış kısmına bakan E1 ile özyapı proteinleri arasında bulunan bir sinyal dizisi sayesinde enkapsidasyon gerçekleşir ve virion oluşur (7). Virion endoplazmik retikulum membranından tomurcuklanır ve ekzositozla salınır (17) (Şekil 3).



Şekil 3: HCV'nin yaşam döngüsü (Kaynak 21'den alınmıştır)

4.1.4 Viral Heterojenite

Viral polimerazın hata düzeltme işlevinin olmaması ve replikasyon hızının çok olmasına (günlük $\sim 10^{12}$ virion) bağlı olarak HCV'de genetik değişkenlik siktir (16,17). Bu nedenle, virusla infekte bireylerde birbirlerinden küçük farklarla ayrılabilen ve türümsü

(Quasispecies) olarak adlandırılan heterojen bir viral popülasyon ortaya çıkar (21). HCV türümsüleri nükleotit düzeyinde farklılık oranı %12'den küçüktür. Viral genomlar arasındaki değişkenlik %14-25 ise farklı alttiplerden, %28'den fazla ise farklı genotiplerden söz edilir (22).

HCV 6 ana genotipe ve 80'den fazla alttipe ayrılmıştır. Genotiplerin isimlendirilmesi 1,2,3 gibi Arap rakamlarıyla olmaktadır. Altıplerin isimlendirmesi ise küçük harflerle (a,b,c...) olmaktadır (23). Genotipler arasında coğrafi dağılım, patojenite ve interferon tedavisine yanıt gibi faktörler yönünden farklılıklar vardır.

Genotip 1,2,3 tüm dünyada yaygındır. Ancak, bir coğrafi bölgeden diğerine değişebilmektedir. HCV genotip 1a ve 1b ABD ve Avrupa'da yaygın olarak görülmektedir. Japonya'da HCV suşları ağırlıklı olarak genotip 1b'dir. Genotip 2a ve 2b Kuzey Amerika, Avrupa ve Japonya'da, 2c İtalya'da görülmektedir. HCV genotip 4 ise Kuzey Afrika'da ve Ortadoğu'da yaygındır. Genotip 5 ve 6 daha sık olarak Güney Afrika ve Hong Kong'da görülmektedir (21). Abacıoğlu ve arkadaşlarının, ülkemizde genotiplerinin dağılımını saptanmasına yönelik yaptıkları bir çalışmada hastaların, %75.3 genotip 1b, %19.1 genotip 1a, %3.4 genotip 2 ve %2.2'si genotip 4 bulunmuştur (24). Ülkemizde yapılan başka bir araştırmada ise hastaların %84'ü genotip 1b, %11'i genotip 1a, %3'ü genotip 2, %1'i genotip 3 ve %1'i genotip 4 bulunmuştur (25).

Genotip 1'in interferon tedavisine yanıtı, genotip 2 ve 3'e göre düşüktür (26).

4.1.5 Konakçı İlişkisi

HCV'nin bilinen tek konağı insandır. Deneysel olarak şempanzelerde (*Pan troglodyte*) infeksiyon oluşturulabilmektedir. HCV proteinlerinin bir ya da bir kısmının transgenik farelerde ekspresyonuyla oluşturulan modeller olmasına karşın, hiçbiri insanda ya da şempanzede oluşan infeksiyonu taklit edememektedir (27).

4.1.6 Yayılım ve Epidemiyoloji

HCV tüm dünyada yaygındır. Dünya Sağlık Örgütü tahminlerine HCV ile infekte birey sayısı 170 milyondur. Bu da dünya nüfusun %3'üne denk gelmektedir (28).

HCV'nin ABD'de ki prevalansı %1.8, Japonya'da %1.5-2.3, Mısır'da %22, Almanya'da %0.6, Fransa'da %1.1, Kanada'da %0.8, Avustralya'da %1.1, İtalya'da %2.2, Çin'de %2.1, Hindistan'da %5.5'dir (29). Ülkemizde Viral Hepatitle Savaşım Derneğinin tahminlerine göre HCV'nin prevalansı %0.3-1.8'dir (30).

4.1.7 İnfeksiyonun Bulaş Yolları

HCV posttransfüzyonel hepatitlerin en sık nedenidir. Donör kanlarının HCV antikorları yönünden taranması ile risk önemli oranda azaltılmıştır ancak sıfırlanmamıştır (29).

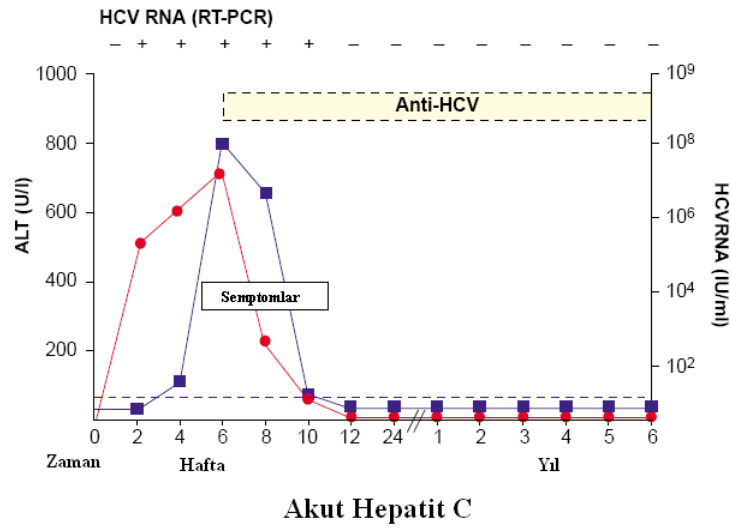
Gelişmiş ülkelerde damar içi uyuşturucu kullanımı ile HCV bulaşı birinci sırada yer almaktadır. ABD'de uzun süreleri damar içi uyuşturucu kullanan ve 30 yaşın üzerinde olan kişilerde HCV prevalansı %68 olarak saptanmıştır (29).

Gelişmiş ülkelerde sağlık hizmeti nedeniyle HCV ile bulaş çok düşük seviyededir, fakat gelişmemiş ülkelerde durum tam tersidir: dünyada en yüksek seroprevalansa sahip Mısır'da HCV bulaşı 1960–1987 yılları arasında sürmüş olan şistozomiyaz sağaltımı esnasında kullanılan kontamine enjektörler sonucu olmuştur. Hindistan'da kala-azar sağaltımı için birden çok ilaç enjeksiyonu alan kişilerde HCV prevalansı %31.1'dir (29).

HCV'de mesleksel, perinatal ve cinsel yolla bulaş görece düşük düzeydedir. Mesleksel bulaş en çok sağlık çalışanlarda görülmektedir. Kontamine iğne batması nedeniyle bulaş %0.3'tür (29). Ülkemizde sağlık çalışanları arasında yapılan araştırmalara göre HCV prevalansı %0.3-5.4 arasındadır (31,32). Yine ülkemizde yapılan bir çalışmaya göre kontamine iğne batmış olan hemşirelerde HCV prevalansı %7.9 olarak saptanmıştır (33). Perinatal bulaş, HIV koinfeksiyonu ve yüksek maternal viral yük varlığında daha sıktır (34). HCV'de perinatal bulaş %2.7-8.4 dolaylarındadır (29). Cinsel yolla HCV bulaşında risk, tek eşliler için yılda %0-0.6, birden çok kişi ile cinsel ilişki kurmuş kişilerde yılda %1'dir. ABD'de yapılan seroprevalans araştırmalarında elde edilen sonuçlara göre HCV'nin prevalansı seks işçilerinde %6, eşcinsel erkeklerde %4 ve cinsel yolla bulaşan hastalıklar kliniklerinde %4'tür (35).

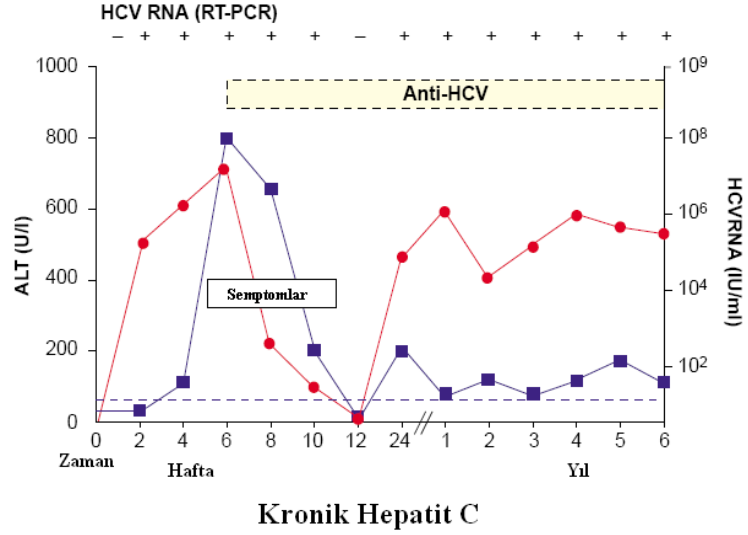
4.1.8 Klinik Özellikleri

Akut HCV infeksiyonun çoğu belirtisizdir. Belirtili seyreden nadir olgularda halsizlik, bulantı, üst sağ kadrın ağrısı ve sarılık gibi klasik hepatit semptomları görülür. Ortalama inkübasyon süresi 7 haftadır. Bulaştan 1-2 hafta sonra HCV-RNA saptanabilmekte ve 10^6 – 10^8 IU/mL düzeyine kadar çıkabilmektedir. Birkaç hafta sonrada serum alanin aminotransferaz (ALT) düzeyi artmakta ve semptomlar ortaya çıkmaktadır. Akut dönem genellikle 2-12 hafta sürer. Kendini sınırlayan akut HCV’de HCV-RNA düzeyi birkaç hafta içerisinde saptanamayacak düzeye iner ve ALT düzeyi normale döner (36) (Şekil 4).



Şekil 4: Hepatit C'nin akut dönem seyri (Kaynak 37'ten alınmıştır)

Akut Hepatit C'li hastaların %50-85'inde infeksiyon kronikleşmektedir (4). Kronik Hepatit C'li hastalarda semptomlar yok ya da siliktir. Hastaların üçte ikisinde ALT düzeyi akut Hepatit C'de ki gibi seyredebilir ve düzeyler genellikle normalin 1.5-10 kat dolaylarındadır. Kronik Hepatit C'li hastaların %22'sinde aktif kronik hepatit görülmektedir ve bu hastaların histolojik bulgularında karaciğer hasarı saptanmaktadır (36) (Şekil 5).



Şekil 5: Hepatit C'nin kronik dönem seyri (Kaynak 37'ten alınmıştır)

Kronik Hepatit C'li hastaların %10-20'sinde 10-20 yılda siroz gelişmektedir. Siroza sahip hastalarda ise yılda %1-4 insidansla HSK gelişmektedir (4).

HIV/HCV koinfeksiyonunda hem HCV hem de HIV infeksiyonun seyrinin hızlandığı saptanmıştır. ABD'de ve Avrupa'da HIV ile infekte kişilerde HCV koinfeksiyonu prevalansı %16-33'dür. Damar içi uyuşturucu kullanımı öyküsü olan HIV pozitif kişilerde HCV koinfeksiyonun prevalansı %84-88'dir (29).

HBV/HCV koinfeksiyonun klinik ve histolojik seyri tek başına HCV infeksiyonuna göre daha şiddetlidir. HBV/HCV koinfeksiyonu HSK gelişimini hızlandırmaktadır. HBsAg pozitif olan hastalarda görülen HCV prevalansı Yeni Zelanda'da %10, İtalya'da %7, Pakistan'da %0.6, Tayvan'da %2, Türkiye'de %0.6-3.7'dir (29,38).

Günde 50g'dan fazla alkol tüketen kişilerde artan oranda karaciğer fibrozu gözlenmiştir. Yüksek alkol tüketimi ile ilişkili olarak HCV infeksiyonunda siroz ve HCV'ye bağlı olarak ölüm riski de artmaktadır (29).

4.1.9 Patogenez

Virus zarf glikoproteinleri (E1 ve E2) aracılığıyla hücrel reseptörlere bağlanır (39). Olası reseptörler arasında CD81, LDL-R, SR-BI yer alır (4).

HCV primer olarak hepatotropik bir virustur. Karaciğer dokusunun gramında 10^8 - 10^{11} kopya düzeyinde HCV-RNA saptanmıştır (40). Ancak virusun B-lenfositler, pankreas, böbrek, akciğer vb. dokularda ara replikatif formları gösterilmiştir. Bu bulgular virusun hepatositler dışında farklı hücrelerde replike olabileceğini düşündürmektedir (2).

Enfeksiyonun ilk günlerinde, doğal bağışık yanıtı ait birçok hücrel gen ifade düzeyinde artış gözlenmektedir. Bunlar PKR, 2'-5' oligoadenilat sentetaz ve başka interferonla (IFN) ilgili transkripsiyonel faktörler ve sitokinlerle ilgili genlerdir. HCV tarafından endojen tip I IFN salınımı uyarılmaktadır, fakat bu viral replikasyonu inhibe etmemektedir (4,37).

HCV'ye özgü antikorlar enfeksiyonun 7-31 haftada saptanacak düzeye çıkmaktadır. HCV'de nötralizan antikorlar için hedef E2 zarf proteininde bulunan 27 aminoasit uzunluğundaki çokdeğişken bölge 1'dir (HVR1). HVR1 tüm HCV suşlarında en fazla aminoasit değişikliğine sahip bölgedir. Bu değişiklik sayesinde bu bölgeye karşı üretilen nötralizan antikorlardan virus kendini koruyabilmektedir (4,8).

Kendiliğinden sınırlanan akut HCV enfeksiyonunda güçlü ve etkin bir CD4+ T hücre yanıtı gözlemlenmektedir. Kronikleşen enfeksiyonlarda ise bu yanıt zayıf ve gecikmelidir. Bir hipoteze göre bu T hücre yanıtının zayıflığı, dentritik hücrelerin, T hücrelerini yeterince uyaramamasından kaynaklandığını öne sürmektedir. Olası diğer nedenler HCV'nin T hücre proliferasyonunu, differansiyasyonunu, matürasyonunu ve IFN- γ salınımı engellemesi ya da türümsülerin bu hücrelerin yanıtından kaçabilmesidir (4).

Akut HCV enfeksiyonun sınırlandırılmasında güçlü ve etkin bir CD8+ T hücre yanıtı gözlemlenmektedir. Bu yanıt kronikleşen enfeksiyonlarda zayıftır (4).

Hepatit C enfeksiyonunda karaciğer hasarı portal alanda lenfosit infiltrasyonu, nekroz ve dejeneratif lobular lezyonlar ile karakterizedir. Bu lezyonlar, yerel bağışık yanıtı ve bölgeye biriken T hücrelerden kaynaklanmaktadır. Karaciğer lezyonların şiddeti yerel Th1 sitokin salınımından ve sitotoksik T lenfositlerin Fas, TNF- α ve perforin aracılı apoptoz ile hücreleri öldürmelerinden kaynaklanmaktadır (4).

Akut Hepatit C enfeksiyonunun kronikleşmesine götüren nedenler tam olarak bilinmemektedir. Öne sürülen nedenler arasında virusun yüksek bir replikasyon kinetiğine

sahip olması yer alır. Bağışık yanıtın, günlük 10^{12} virion üretimi ve enfeksiyonun ilk haftalarında serumda 10^6 kopya/mL'ye çıkan HCV'nin yüksek replikasyon kinetiği ile baş edemediği düşünülmektedir. Diğer taraftan yüksek replikasyon kinetiği nedeniyle ortaya çıkan türümsüler bağışık yanıtı kaçılabilmektedir (37).

HCV'nin replikasyonu esnasında bazı proteinlerinin IFN yolağı ile etkileştiği ve bu yolağı baskılayabildiği gözlenmiştir. RNA virusların replikasyonu esnasında görülen çift iplikli RNA Toll-benzeri reseptör 3 ile saptanır ve bu reseptör IFN regülatör faktör 3 ile IFN yolağını harekete geçirir. Bu etkileşim ile sentezlenen tip 1 IFN PKR'yi uyarır ve PKR translasyon başlatıcı faktör 2α 'yı (eIF2 α) fosforilleyerek translasyonu durdurur. NS3/4A serin proteaz IRF3'ün fosforilasyonunu baskılamaktadır. E2, PKR ve eIF2 α 'nın fosforilasyon bölgeleri ile homoloji göstermektedir. Bu şekilde, E2 kendisinin fosforillenmesini sağlayarak diğer proteinlerin etkinliğini engellemiş olur. Ayrıca NS5A PKR'nin katalitik bölgesini baskılamaktadır ve bu şekilde işlevini durdurmaktadır. Böylece HCV, hücrenin enfeksiyon ile savaşmasını engellemektedir (37).

HCV'nin ayrıca bağışık yanıtı karşı da savaştığı düşünülmektedir. *In vitro* olarak E2, CD81'e bağlanarak doğal katil hücrelerin sitoksite, proliferasyon IFN- γ ve TNF- α salınımı baskıladığı gözlenmiştir. Kronik Hepatit C'li hastalarda ayrıca dentritik hücrelerin işlevleri zayıflamıştır. *In vitro* olarak özyapı proteinin kompleman reseptörüne bağlanması sonucunda CD8+ hücreleri IFN- γ salınımı ve proliferasyonu baskılanmaktadır (37).

HCV enfeksiyonunda steatoz görülmektedir. HCV genotip 3 enfeksiyonunda görülen steatozis virusa, diğer genotiplerde ise ekzojen metabolik bileşenlere bağlıdır (4).

Kronik Hepatit C'de fibroz görülmektedir. Fibroz, sürekli hücre yıkımı ve oluşumu nedeniyle gelişen kronik inflamasyondan kaynaklanmaktadır. Bu süreçte hepatik stellar hücrelerin önemli rolü bulunmaktadır. HCV enfeksiyonu esnasında bu hücreler etkindirler. Bu etkinlik hücrelerin miyofibroblast, ekstraselülmatriks bileşenleri ve düz kas α -aktini üretmesine neden olmaktadır. Fibroz gelişiminde viral faktörlerin rolü henüz aydınlatılabilmemiş değildir. Fibroza sahip hastalarda 10-20 yıllık süreçte %10-20 oranında siroz gelişmektedir. Alkol tüketimi siroz gelişimini hızlandırmaktadır (4).

Sirozlu hastaların %1-4'ünde ise HSK gelişmektedir. HSK gelişiminde önemli bir risk faktörü olan siroz dışında, alkol tüketimi, viral koinfeksiyon, diyabet ve obezite diğer

nedenler arasında yer almaktadır. Özyapı, NS3, NS4B ve NS5A proteinlerinin *in vitro* olarak birçok hücre hattını transforme edebildiği gösterilmiştir, fakat bu etkilerinin *in vivo* olarak da geçerli olup olmadığı bilinmemektedir (4).

HCV, kronik hepatit dışında ekstrahepatik manifestolara neden olmaktadır. Bunlar karışık kriyoglobulinemi, glomerulonefrit, seronegatif artrit, keratokonjunktivit, siyaladenit, lichen planus ve kutanöz vaskulit. HCV infeksiyonunda görülebilen non-Hodgkin lenfoma ile viral infeksiyon arasında bir ilişkinin varlığı düşünülmektedir (37).

4.1.10 Tanı

1989 yılında Kuo ve arkadaşları HCV'nin yapısal olmayan bölgesinden (C100) birinci nesil anti-HCV ELISA geliştirmişlerdir (2). Birinci nesil EIA duyarlılığı %80'dir. Duyarlılığı ve özgüllüğü arttırmak için yeni nesil EIA geliştirilmiştir. İkinci nesil EIA testlerinde birinci neslin kullandığı NS3 bölgesine ek olarak özyapı proteini eklenmiştir. Bu şekilde testin duyarlılığı %95 çıkarılmıştır Üçüncü nesil EIA'larda ise her iki proteine ek olarak NS5 proteini eklenmiştir ve testin duyarlılığı %96'ya çıkarılmıştır (41).

HCV'nin tanısında nükleik asit tabanlı testlerde kullanılmaktadır. En duyarlı yöntem kalitatif PZT'dir. Kalitatif PZT saptama alt sınırı 100 kopya/mL'dir. Kantitatif PZT testleri ile viral yük tayini yapılarak, hastanın sağaltıma verdiği yanıt izlenebilmektedir (41).

Kanda bulunan özyapı proteini virus replikasyonu gösteren bir bulgudur. Kan dolaşımında bulunan özyapı proteinin ölçülmesi ile elde edilen sonuç, kantitatif RT-PZT ile elde edilen sonuçlar ile örtüşmektedir. 1pg özyapı proteini 8.000IU/mL HCV-RNA'ya denk gelmektedir (42).

HCV'nin sağaltımında genotipin belirlenmesi önemlidir. Genotipin belirlenmesi sağaltımda kullanılacak ilaç miktarı ve süresini etkilemektedir. NS5 bölgesinin RT-PZT ile çoğaltılıp nükleik asit dizilemesi ile genotip saptanabilmektedir. Bir diğer yöntem restriksiyon enzim kesimidir. Bu yöntemde 5'UTR ya da NS5 RT-PZT ile ampliyeye edilir ve ardından amplikon 3-5 farklı restriksiyon enzimi ile kesimi yapılır. Kesim ürünü bilinen standartlarla birlikte agaroz jelde yürütülür ve sonuç, standartlar ile karşılaştırılarak değerlendirilir (43).

4.1.11 Sağaltım ve Koruma

HCV sağaltımında hedef, sağaltımın sonlandırılmasından altı ay sonra HCV-RNA'nın negatif kalmasıdır (44).

HCV'nin sağaltımında pegile interferon ve bir nükleozid analogu olan ribavirin kullanılmaktadır. HCV tedavisinin seyrini belirleyen en önemli etken virusun genotipidir. HCV genotip 1'in 48 haftalık bir tedavisinde yanıt %41-52'dir. Aynı dozlarla 24-48 haftalık bir genotip 2 veya 3 tedavisinde yanıt %76-84'tür (26). Pegile interferonun ABD'deki aylık maliyeti 1200\$ iken, ribavirin için bu rakam 1100\$'dır (44).

HCV'den başlıca korunma yolları bağışlanan kanların taranması, damar içi uyuşturucu kullanan kişilerin eğitilmesi, aseptik koşullarda ilaç enjeksiyonunun önlenmesi, dövme yaptırmada kullanılan araçlarının hijyenin sağlanması sayılabilir. HCV'ye karşı henüz bir aşı geliştirilememiştir (45).

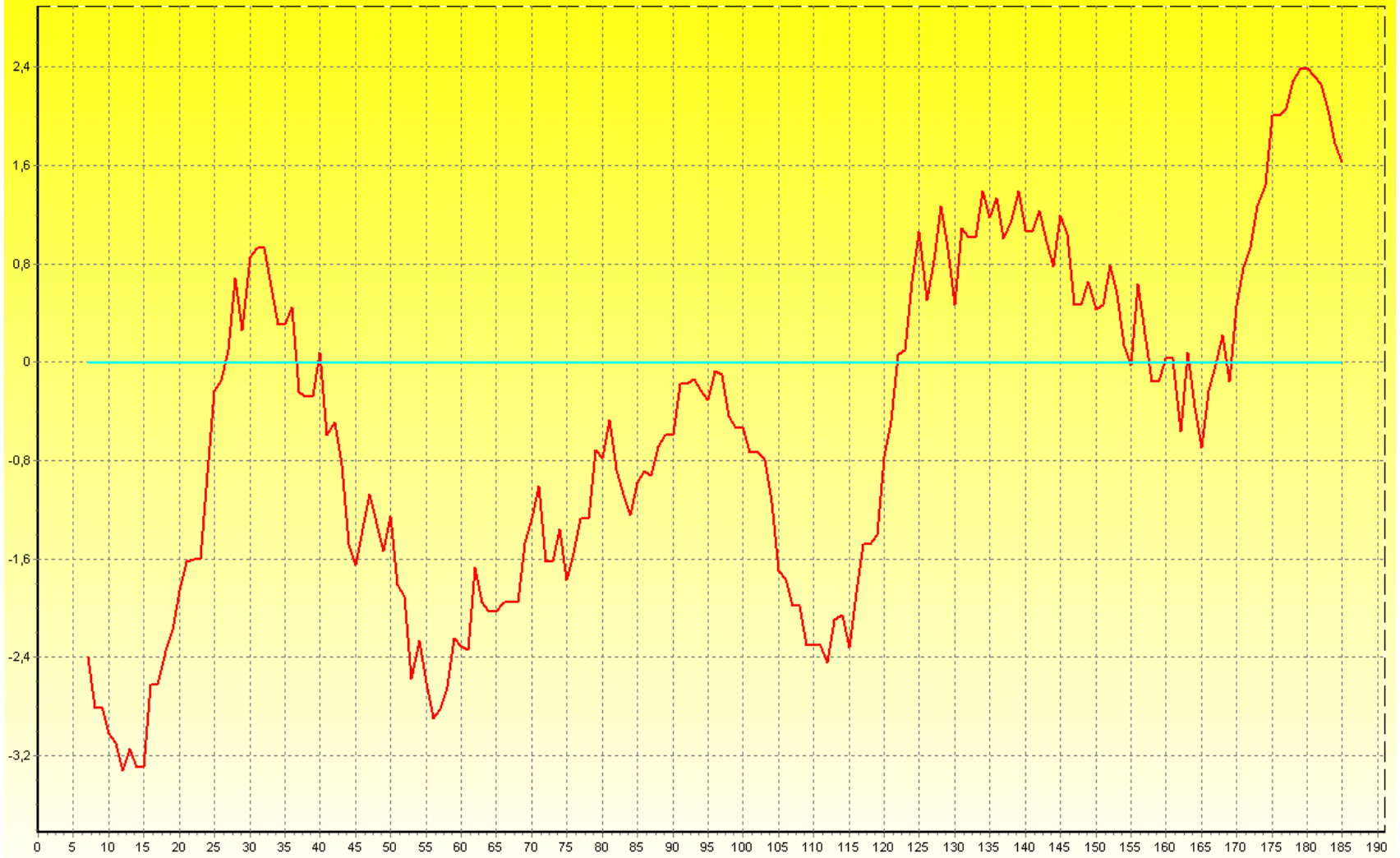
4.2 Özyapı Proteini

Özyapı proteini bazik yapıda bir proteindir (46). Tüm genotipler içerisinde en çok korunmuş protein özyapı proteindir. Nükleotit dizisi açısından %79.4-99, aminoasit dizilimi açısından %85.3-100 oranında korunmuştur (47). Bu proteinin virus için oldukça önemli işlevleri bulunmaktadır Bunlar arasında oligomerizasyon, RNA bağlama, hücre yolaklarını etkilemek sayılabilir.

4.2.1 Özyapı Proteinin Yapısı

Hücrede, özyapı proteinin iki şekli gözlenmektedir. İki şekil arasında ki fark endoplazmik retikulum membranında yer alan proteazların özyapı proteinini kesmesinden kaynaklanır. Bunlardan ilki 191 aminoasit uzunluğunda, 23kDa ağırlığındadır. İkincisi ise 174 aminoasit uzunluğunda ve 21kDa ağırlığındadır (46,48). p21 özyapı proteinin hücrede en çok karşılaşılan şeklidir (49).

Şekil 6'de özyapı proteinin HCV-TR1 suşundan BioEdit sürüm 7.0.9 ile oluşturulan Kyte ve Doolittle Ortalama Hidrofobisite Skalası görülmektedir (50). Proteinin yapısı bu grafik üzerinden anlatılacaktır. Eğrinin grafiğin negatif kısımda bulunması proteine ait bölgenin hidrofilik, pozitif kısımda bulunması proteine ait bölgenin hidrofobik doğada olduğu anlamına gelir.



Şekil 6: Kyte ve Doolittle Ortalama Hidrofobisite Skalası.

Özyapı proteinin ilk bölgesi yaklaşık olarak 122 aminoasit uzunluğundadır. Bu bölge hidrofiliktir ve immunojenik epitoplara büyük çoğunluğu burada yer alır (3,47).

122-174'cü aminoasitler arasında kalan bölge ikinci bölgeyi oluşturur ve birinci bölgeye nazaran daha hidrofobiktir. Bu bölge α -heliks yapısındadır (51). Özyapı proteini bu yapısıyla lipit damlacıklarına bağlanabilmektedir (52).

174-191'ci aminoasitler arasında kalan üçüncü bölge oldukça hidrofobiktir. Bu bölge hücre proteazları için iki adet peptid sinyali içermektedir. Birinci sinyal yaklaşık olarak 191'ci aminoasitte bulunur. Bu peptid sinyali, özyapı ve E1 proteini birbirinden ayırır (53). İkinci peptid sinyali ise 179 ve 182'ci aminoasitte bulunmaktadır. Proteinin bu bölgeden kesilmesi sonucunda özyapı proteinin olgun p21 şekli ortaya çıkmaktadır (54).

4.2.2 Özyapı Proteinin Hücre İçi Dağılımı

Özyapı proteini, hücre sitoplazmasında endoplazmik retikulumun sitoplazmaya bakan yüzeyinde ağırlıklı olarak granüler yapıda bulunmaktadır. Granüler yapıların incelendiğinde bunların lipit damlacıkları olduğu anlaşılmıştır (55,56). Ayrıca özyapı proteininin p21 şekli nukleusta saptanmıştır (57).

4.2.3 Özyapı Proteinin Oligomerizasyonu

Özyapı proteinin en önemli işlevi virusun kapsit yapısını oluşturmasıdır. *In vitro* olarak HCV-RNA varlığında ilk 124 aminoasidin oligomerizasyon için yeterli olduğu saptanmıştır (20).

Özyapı proteinin 36-91'ci ve 82-102'ci aminoasitler arasında kalan bölgeleri oligomerizasyondan sorumludur (58,59).

4.2.4 Özyapı Proteinin RNA ile Etkileşimi

Özyapı proteinin *in vitro* olarak RNA'ya bağlanabildiği gösterilmiştir. Bu bağlanma proteinin birinci bölgesi ile gerçekleşir. Bu bölgede RNA'nın şeker omurgası ile etkileşen bazı aminoasitler ağırlıklı olarak bulunmaktadır (60).

4.2.5 Özyapı Proteininin Diğer HCV Proteinleri ile Etkileşimi

Özyapı proteini E1 ile etkileşmektedir. Bu etkileşim enkapsidasyona neden olmaktadır. Etkileşim her iki proteinin C-terminallerinde bulunan birer sinyal peptid ile olmaktadır (7).

Özyapı proteini ile NS5A arasında da bir etkileşim saptanmıştır. Özyapı proteini NS5A'ya bağlanıp, NS5A'nın apoptoz esnasında kaspaza bağımlı proteolitik kesimine aracılık etmektedir. Bu kesim sonrasında NS5A, kendisini sitoplazmada tutan bölgesini kaybetmekte ve bu şekli ile nukleusa geçebilmektedir (61).

4.2.6 Özyapı Proteininin Etkileştiği Transkripsiyonel Faktörler ve Hücreyel Proteinler

Özyapı proteininin *c-myc*, Rous sarcoma virusu uzun terminal tekrarına (LTR), Simian virus 40 (SV40) erken genine ve interlökin-2, 2'-5' oligoadenilat sentetaz promotörlerini uyardığı, HIV-1 LTR, *c-fos*, HBV (Huh7 hücre hattında), p21^{Waf1} ve p53 promotörlerini ise baskıladığı gösterilmiştir (2).

Özyapı proteini hücrenin birçok proteini ile etkileşmektedir. Bunlar arasında, lenfotoksin β , TNF-1 alması, heterojen nükleer ribonükleoprotein K, p21^{Waf1}, p53, p73, STAT1, DEAD-box proteinleri (DDX3, DBX, CAP-Rf), apolipoprotein-AII, LZIP, retinoblastoma tümör süpresör proteini, kompleman reseptörü gC1qR ve 14-3-3 proteini yer alır (2,62).

4.2.7 Özyapı Proteininin Lipit Metabolizması Üzerine Etkileri

Özyapı proteini yoğun olarak lipit damlacıklarına bağlanır (57). Özyapı proteininin lipit damlacıklarına bağlanabilme yeteneği, ikinci bölgesinde bulunan α -heliks yapısından kaynaklanmaktadır (51,52). Özyapı proteini lipit metabolizmanın bir bileşeni olan apolipoprotein-AII ile etkileşime girmektedir ve salgılanmasını düzenlemektedir (64). HCV genotip 3 doğrudan steatoza neden olmaktadır. Bu genotipin kodladığı özyapı proteininin 164'cü aminoasidi olan fenilalaninin, bu aminoasidi içermeyen mutantlara göre, lipit üretimini arttırdığı gözlenmiştir (64). Özyapı proteinini üreten transgenik farelerde, yaşamlarının ikinci aylarında steatoz gelişmiştir (65).

4.2.8 Özyapı Proteinin Apoptoz Üzerine Etkileri

Özyapı proteinin apoptoz yolları üzerine değişik etkileri saptanmıştır. Özyapı proteinin HeLa hücrelerinde cisplatin aracılı apoptozu, MCF-7 hücrelerinde TNF- α aracılı apoptozu baskılamaktadır. Özyapı proteini, HepG2 hücrelerini Fas aracılı apoptozu duyarlı hale getirmektedir. Ayrıca BC10ME, HepG2 ve HeLa hücrelerinde TNF uyarılımlı apoptozu arttırmaktadır (2). Özyapı proteini, birçok hücre hattında nükleer faktör- κ B yolağını etkinleştirerek apoptozu baskıladığı gözlenmiştir (66).

4.2.9 Özyapı Proteinin Onkojenik Potansiyeli

Özyapı proteini Rat-1 hücrelerini, BALB/3T3 hücrelerini, NIH-3T3 hücrelerini, H-ras ile birlikte primer sıçan embriyo fibroblastları, primer insan hepatosit hücrelerini tümör fenotipine dönüştürdüğü gösterilmiştir (2,67,68).

Özyapı proteinini sürekli olarak üreten birbirinden bağımsız iki transgenik fare neslinde 16 ve 19'cu yaşam ayından sonra HSK gelişmiştir (69).

4.2.10 Özyapı Proteinin Bağışık Sistemine Etkileri

Özyapı proteinini, E1 ve E2'yi üreten rekombinant adenovirus ile infekte edilen lenfoid dentritik hücrelerinin allojenik T hücre stimülasyonunu azaltmaktadır. Özyapı proteinine sahip rekombinant aşılı virüsü ile enfekte edilen farelerde, özyapı proteinin aşılı virüsünün virulansını arttırmaktadır ve sitotoksik T lenfosit yanıtını düşürmektedir. Ayrıca E1, E2 veya NS3 ile birlikte dentritik hücre matürasyonunu da engellemektedir (66). Özyapı proteinin kompleman reseptörü gCIqR ile etkileşimi sonucu T hücre proliferasyonu baskılanmaktadır (62).

4.3 Gen Klonlama

4.3.1 Gen Klonlama Nedir?

Klonlama, istenilen bir DNA molekülünün *in vivo* olarak kopyalanması ve sayısız olarak çoğaltılmasıdır (70).

4.3.2 Taşıyıcı DNA Molekülleri

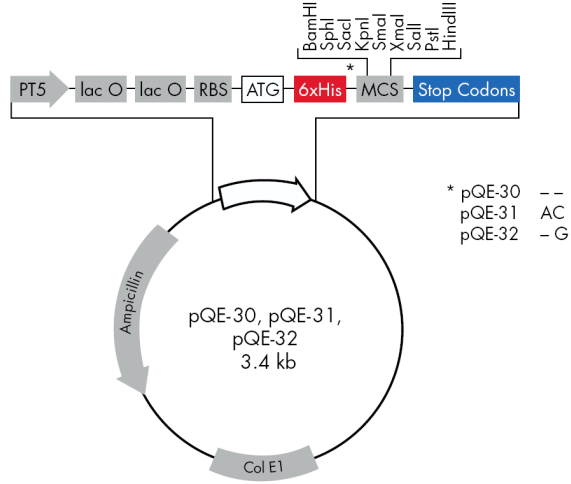
Klonlamada, plazmit adı verilen, kendi kendine çoğalabilen, ekstrakromozomal, çembersel DNA molekülleri kullanılmaktadır (71).

Klonlamada kullanılan plazmitler, çoğalabilmeleri, seçilebilmeleri ve yabancı DNA molekülünü taşıyabilecekleri bölgeler içerirler.

Plazmitlerin çoğalabilmeleri için replikasyon orjini (*ori*: Origin of replication) denen dizileri içermeleri gerekir. Bu diziler ayrıca plazmitin hücrede bulunan kopya sayısını da belirlemektedir. Örneğin, bu rakam pBR322 için 15-20, pUC için 500-700, pACYC184 için 10-12'dir (71).

Plazmitin seçilimi için konak hücrenin klonlanan plazmiti içermediği takdirde duyarlı olduğu ve çoğalamadığı bir antibiyotik kullanılmaktadır. Konak hücreye antibiyotik direnci, konak hücreye aktarılan plazmit tarafından kazandırılır. Bu şekilde sadece plazmit içeren hücreler çoğalacaktır. Plazmit seçiminde kullanılan antibiyotik direnç genlerine örnek olarak AmpR (Ampisilin), KanR (Kanamisin), TetR'dir (Tetrasiklin) verilebilir (72,73).

Plazmitlerin klonlanması istenilen DNA moleküllerini taşıyabildikleri bölgeler bulunmaktadır. Bu bölgeler restriksiyon endonükleazların tanıdıkları palindromik diziler içerir. Klonlanan DNA molekülü bu bölgeye sokulup, bağlanmaktadır (72,73) (Şekil 7).

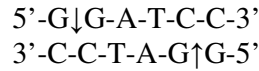


Şekil 7: Plazmit pQE-30'un haritası (Kaynak 74'ten alınmıştır).

4.3.3 Restriksiyon Endonükleazlar

Restriksiyon endonükleazlar genellikle bakterilerde bulunmaktadır. Bakteri, bir faj tarafından infekte olduğunda, bu enzimler faj DNA'sını kesip işlevsiz hale getirmektedir. Bakteri, kendi DNA'sının bu enzimler tarafından kesilmesini metilasyonla engellemektedir. Restriksiyon endonükleazlar palindromik DNA dizisini tanıyıp, DNA ipliğinin tamamını kesen enzimlerdir. Tanıdıkları dizinin uzunluğu 4-6 nükleotit kadardır. Bazı enzimler künt uç kesim yaparken bazıları yapışkan uç oluşturur (75). Aşağıda bazı enzimlerin kesim şekillerine örnek verilmiştir:

*Bam*HI'nın kesimi sonucu 5' yapışkan uçlar oluşur:



*Pae*I'nin kesimi sonucu 3' yapışkan uçlar oluşur:



*Eco*RV'nin kesimi sonucu künt uç oluşur:

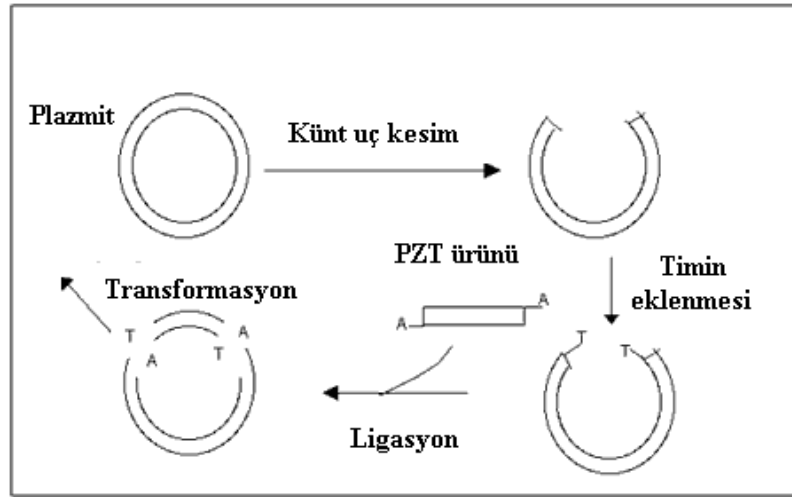


Aynı palindromik diziyi tanıyan enzimlere izoşizomer adı verilmektedir. Bir enzim, izoşizomeri kesimiyle aynı uçları oluşturabildiği gibi farklı uçlar da oluşturabilmektedir (76).

4.3.4 Klonlama Teknikleri

4.3.4.1 TA Klonlaması

TA klonlama yöntemi, PZT ürünlerini kolaylıkla klonlayabilmek için kullanılmaktadır. Çembersel halde olan plazmit, künt uç oluşturan bir restriksiyon endonükleaz ile doğrusal hale getirilir ve terminal transferaz aktivitesi olan bir polimerazla 3' uçlarına dTTP eklenir. PZT ürününe amplifikasyon esnasında ya da sonrasında polimerazın terminal transferaz aktivitesi ile dATP eklenir. Bu şekilde plazmitin ucunda bulunan timin (T), PZT ürününün ucunda bulunan adenin'le (A) eşleşebilmektedir. Her iki DNA molekülü uygun molar oranda karıştırılır ve DNA ligaz ile 3'-5' fosfodiester bağıyla bağlanır. Ardından rekombinant plazmit bakteriye aktarılır ve koloni oluşturması için inkübe edilir (77) (Şekil 8).

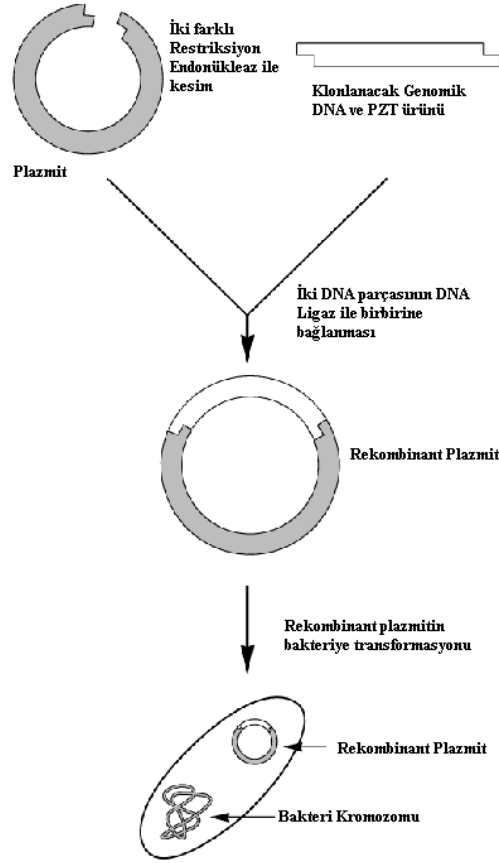


Şekil 8: TA Klonlaması (Kaynak 79'den alınmıştır).

4.3.4.2 Yönlendirilmiş Klonlama

Yönlendirilmiş klonlama ile PZT ürünleri, genomik DNA veya herhangi bir DNA parçası klonlanabilmektedir. Bu yöntemde çembersel plazmit yapışkan uca sahip olacak şekilde kesilir. Kesim, farklı palindromik dizileri tanıyan iki restriksiyon endonükleaz ile yapılmaktadır. Aynı enzimler ile klonlanacak DNA molekülü de kesilir. Bu şekilde vektör ve klonlanacak DNA birbirini tamamlayan uçlara sahip olmuş olur. TA klonlamasında olduğu

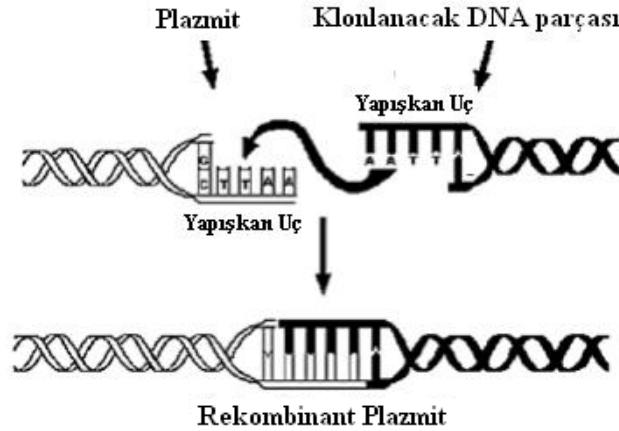
gibi kesilmiş plazmit ve klonlanacak DNA uygun molar oranda karıştırılır ve DNA ligaz ile bağlanır. Ardından rekombinant plazmit bakteriyeye aktarılır ve koloni oluşturması için inkübe edilir (70,72) (Şekil 9).



Şekil 9: Yönlendirilmiş klonlama (Kaynak 78'den alınmıştır).

4.3.5 DNA Ligasyonu

Klonlamada plazmit ve klonlanacak DNA molekülünün birbirine bağlanması gerekmektedir. Bu işlevi yerine getiren enzimler DNA ligazlardır. DNA ligazlar, DNA molekülünde 3' konumda bulunan şekeri 5' konumda bulunan fosfat ile kovalent olarak bağlamaktadır. Bu işlem için enerji gereklidir. Örneğin T4 ligaz dATP, *E.coli* DNA ligaz NAD kullanmaktadır. T4 ligaz hem yapışkan, hem de künt uçları verimli bir şekilde birbirine bağlamaktadır (80,81) (Şekil 10).



Şekil 10: DNA parçalarının birbirine bağlanması (Kaynak 82'den alınmıştır).

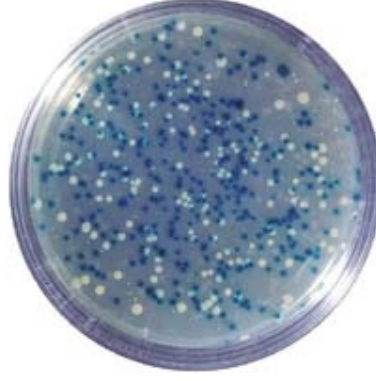
4.3.6 Rekombinant Plazmitin Konak Hücreye Aktarılması

Rekombinant plazmitin konak hücreye aktarılmasında transformasyon kullanılmaktadır. Elektroporasyon veya kimyasal yolla DNA alabilecek yeteneğe getirilen bakterinin bulunduğu ortama rekombinant plazmit aktarılır ve plazmit ile inkübe edilir. Bakteri, ortamda bulunan plazmitleri bünyesine almaktadır. Ardından bakteri seçim için kullanılacak antibiyotikli ortama eklenir ve bakterilerin koloni oluşturması için inkübasyona bırakılır (83,84).

4.3.7 Rekombinant DNA'yı İçeren Hücrenin Saptanması

Klonlama sonucunda her plazmit istenilen rekombinant DNA molekülünü içermeyebilir. Bu nedenle besiyerinde üreyen bakterilerin rekombinant plazmiti içerip içermediği yönünden taranması gerekmektedir (85). Hücrenin rekombinant DNA molekülünü içerip içermediğini saptamak için izlenebilecek yollar kullanılan plazmitin özelliğine göre değişmektedir.

Klonlama plazmitlerinde genellikle *lacZ* geni içermektedir. Bu gen, X-Gal'ı parçalar ve mavi renk oluşturur. Bu tür plazmitlerde klonlama bu genin ortasına yapılmaktadır ve başarılı bir klonlamada gen işlevsiz hale gelir. Dolayısıyla oluşan koloniler beyaz renktedir. Mavi renkli koloniler, klonlamanın başarılı olmadığını ve ortamda işlevsel *lacZ* geni içeren plazmitlerin bulunduğunu gösterir (85) (Resim 2).



Şekil 11: Mavi-Beyaz koloni görüntüsü (Kaynak 86'den alınmıştır)

Bir diğer yöntem plazmit eğer rekombinant DNA'yı eksprese edebiliyorsa protein üretimi için uyarılır ve ilgili proteine afinitesi olan bir antikor ile koloniler taranır. Antikoron bağlandığı koloni istenilen rekombinant plazmiti içermektedir (87).

Rekombinant plazmitin varlığı, plazmitin kolonilerden izole edilmesini takiben, PZT ya da restriksiyon enzim kesimi ile de değerlendirilebilmektedir (88).

4.4 Escherichia coli'de Protein Üretimi ve Saflaştırılması

4.4.1 Vektör Seçimi

Vektörde bulunan *ori*, kullanılan promotör, füzyon proteininin özellikleri, üretilen proteinin sudaki çözünürlüğünü, saflaştırılmasını etkilemektedir.

Protein eksprese eden vektörler klonlama vektörlerine benzemektedirler. Farklılıkları koloni seçiminde kullanılan *lacZ* veya benzer işleve sahip genler içermemeleri ve içerdikleri *ori*'lerin, plazmiti yüksek kopya sayısı ile hücrede tutmamasıdır. Klonlama vektörlerinde olduğu gibi ekspresyon vektörlerinde de *ori*, plazmiti yüksek kopya sayısı ile bakteride tutuyor olsaydı, eksprese edilen protein yüksek miktarlarda üretilirdi ve protein, inklüzyon cisimleri halinde hücrede birikebilirdi (89).

Promotör, protein üretim miktarını etkileyen bir bileşendir. Promotör ile üretim istenilen zamanda başlatılır ve ürün miktarı belirlenebilir. En çok kullanılan promotör *lac*'tır. Bu promotör bir şeker molekülü olan IPTG (İzopropil- β -D-tiyogalaktopiranosid) ile uyurabilmektedir (89).

Vektörlerin içerisinde bulunan füzyon proteinleri, saflaştırma esnasında kullanılacak afinite kromatografi tekniğini de belirlemektedir. Füzyon proteinlerin diğer işlevleri, üretmek istenilen proteinin inklüzyon cisimcikleri olarak hücrede birikmesini, üretilecek proteinin hücre tarafından üretim esnasında yıkılmasını engellemeleridir (89).

4.4.2 Konak Hücre Seçimi

Konak hücre seçimi protein üretim miktarını etkilemektedir. Herhangi bir *E. coli* suşunda (JM109, XL-1 Blue, DH5 α , vb.) protein üretmek mümkündür, fakat protein verimi yüksek değildir. Yüksek miktarda protein üretimi sağlayan *E. coli* suşları geliştirilmiştir. BL21, DE3, M15, SG13009 bu suşlara örnektir (89).

4.4.3 Protein Üretimini Etkileyen Faktörler

Klonlanan DNA molekülünde ribozoma bağlanma bölgesine komplementer dizi bulunmaması gerekmektedir. Böyle bir durumda mRNA ikincil bir yapı halini alabilir ve ribozoma bağlanma bölgesini örtebilir. Bu durumda mRNA ribozoma bağlanamayacaktır ve protein üretilmeyecektir (90).

Kodon ikilemi *E. coli*'nin ökaryotlarda bulunan bazı kodonları zayıf tanınmasından kaynaklanmaktadır. Örneğin arjinini kodlayan AGG, AGA, CGG, CGA, lösini kodlayan CUA, prolini kodlayan CCC *E. coli* tarafından zayıf algılanır ve bu durumda translasyon durur; ribozom içerdiği mRNA degrade edilene kadar işlevsiz kalır (89,91).

Bazı proteinler konak hücre için toksik özelliklere sahip olabilir. Elektron transport ile etkileşen proteinler, hücrenin metabolik aktivitelerini etkileyen proteinler ve membran proteinleri toksik olabilmektedir (92,93). Bu tür proteinlerin üretilmesi esnasında promotör uyarılmadan önce sızıntılı (leaky) protein üretimi nedeniyle hücreler ya yavaş ürerler ya da ölürlür. Bu sorun, sızıntılı protein üretimini engelleyecek miktarda promotörü baskılayan süpresör protein kullanımı ile çözülebilmektedir (90).

Hidrofobik bölgeler konak hücreyi yaşamsal olarak etkileyebilmektedir. Rekombinant proteinin içerisinde bulunan yüksek orandaki hidrofobik bölgeler veya transmembran bölgeleri hücrenin sitoplazma membranına geçerek yapısını bozabilmektedir. Böyle bir durumda hücre ölmekte ve protein sentezi durmaktadır. Translasyon esnasında ısıyı düşürmek, proteini füzyon proteini olarak eksprese etmek bu sorunu çözebilmektedir (94).

Translasyonu kontrol eden bir başka bileşen, translasyonu durdurucu kodonun özelliğidir. *E. coli* en çok UAA durdurma kodonunu tercih eder ve translasyonu durdurucu kodonun hemen arkasından gelen nükleotit translasyonun sonlandırılma oranını etkiler. En etkin durdurma kodonu UAAU olarak saptanmıştır (95).

4.4.4 Rekombinant Proteinin Üretimi

Büyük miktarda protein üretimine geçmeden önce küçük hacimlerde protein üretimi yapmak ve en verimli protein üretimi için koşulları belirlemek gerekmektedir. Bu aşamada ortam, protein çözünürlüğü, uyarım zamanını, uyarım düzeyi, üretim süresi gibi protein üretimini etkileyecek bileşenler saptanır (96).

En uygun uyarım zamanı bakterilerin üreme eğrisinde logaritmik fazda olmaktadır. Bakterilerin logaritmik faza ulaştıkları optik yoğunluğun ölçülmesiyle belirlenir (97).

Rekombinant protein üretiminde kullanılan besiyerinin seçimi ve besiyerinin pH değeri üretilecek protein miktarını belirlemektedir. Besiyerlerinde, seçilimi yapılacak plazmitlere uygun antibiyotik içermeleri gerekmektedir. Besiyerinin yeterince

havalandırılması için üretim yapılacak flaskın hacmi kullanılacak besiyerinin 4-8 katı kadar olmalıdır (96,97).

Rekombinant protein üretimi yapılacak besiyerine 20'de bir oranında bir gece önceden hazırlanmış inokulum besiyeri ekilir ve uygun optik yoğunluğa ulaşana kadar çalkalanır. Uygun optik yoğunluğa ulaşmış besiyeri plazmitin sahip olduğu promotörüne uygun bir substrat ile uyarılarak rekombinant protein üretimi başlatılır. Belirlenen üretim süresi sonunda hücreler santrifüj yapılarak toplanır. Rekombinant protein içeren hücreler, yaş pellet halinde -80°C'da saklanabilmektedir (96).

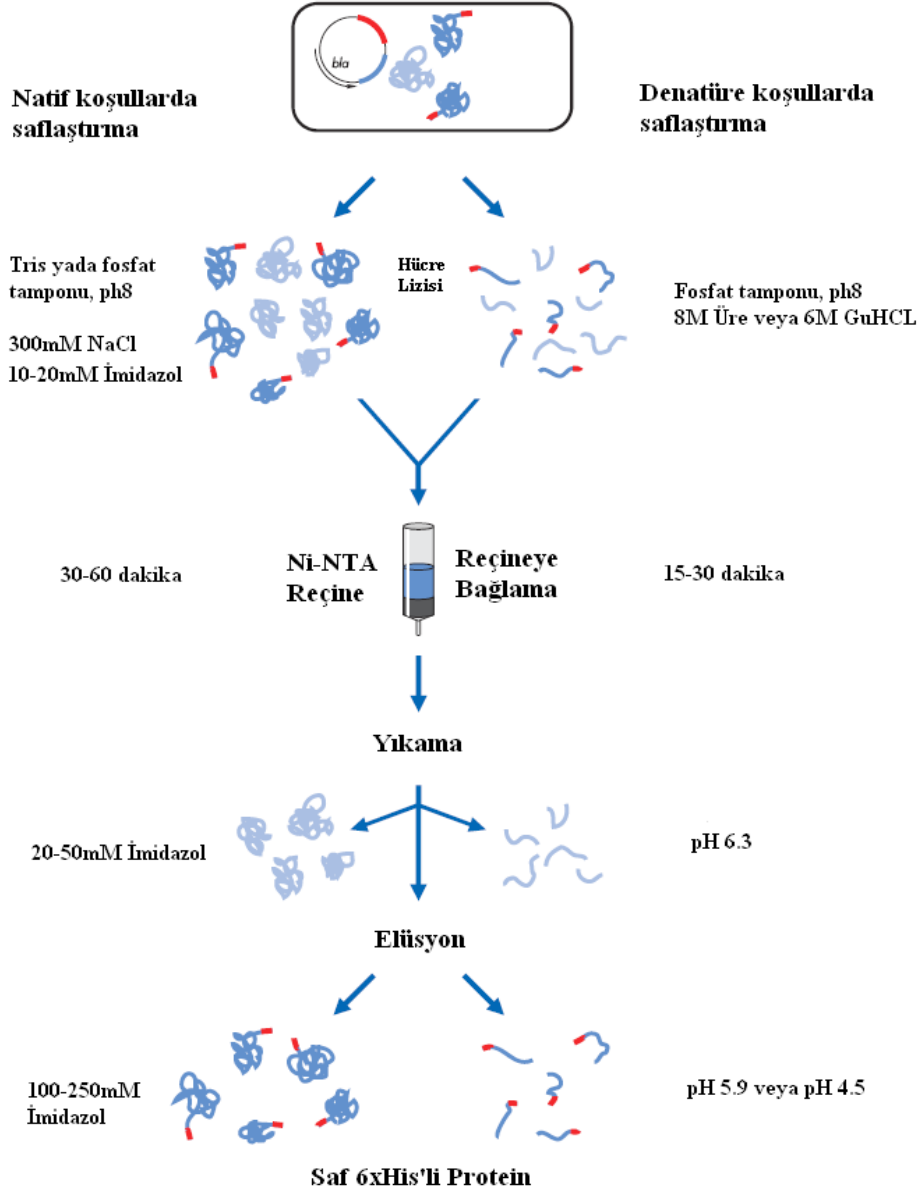
4.4.5 Protein Saflaştırması

Protein denatüre edici ya da doğal koşullar altında saflaştırılabilir. Protein inklüzyon cisimcikleri halinde ise saflaştırma denatüre edici koşullarda, değil ise doğal ya da denatüre edici koşullarda saflaştırılmalıdır (96,98).

Doğal koşullar altında saflaştırmada hücre dondurup çözmekle ya da sonikasyonla parçalanır. Bu aşamada proteinlerin proteazlar tarafından parçalanmasını engellemek için ortama proteaz inhibitörlerinin eklenmesi gerekmektedir (96,97).

Denatüre edici koşullar altında saflaştırma yapılırken 6M guanidyum hidroklorür veya 8M üre gibi kaotrop ajanlar kullanılmaktadır. Kaotrop ajanlar bir yandan bakteri hücrelerini parçalarken, diğer yandan proteinlerin tüm ikincil ve dördüncül yapılarını bozarak inklüzyon cisimciklerinin çözünür hale gelmesini sağlar (98).

Saflaştırmada kullanılacak afinite kromatografisi tekniği kullanılan füzyon proteinine bağlı olarak değişmektedir. Füzyon proteini, saflaştırma esnasında kromatografi matriksine tutunur, diğer tüm proteinler yıkamalarla uzaklaştırılır ve ardından uygun pH veya iyon konsantrasyonu altında elüsyon gerçekleştirilir (99,100). Şekil 11'de 6xHistidin ile yapılan bir doğal ve denatüre edici koşullar altında saflaştırma basamakları görülmektedir.



Şekil 12: 6xHistidin'li proteinlerin saflaştırma basamakları (Kaynak 101'ten alınmıştır).

Saflaştırma sonrası füzyon proteinin uzaklaştırılması gerekebilir. Füzyon proteini ile rekombinant protein arasında kimyasal olarak etkilenen veya proteolitik kesim sağlayacak aminoasit dizisi eklenir. Kesim bu dizilerden yapıldıktan karışımda bulunan füzyon proteini ve rekombinant protein birbirinden ayrılmalıdır. Bunun için tekrar afinite kromatografisi ile saflaştırma yapılır. Füzyon proteini kromatografi matrisine bağlanırken üretilen rekombinant protein yıkama basamaklarında elüe olacaktır (99).

Denatüre koşullar altında saflaştırılmış bir protein ikincil yapısını kaybeder ve bu nedenle biyokimyasal işlevselliğini yitirir. Proteini renatüre etmek için çözündüğü kaotropun konsantrasyonu basamaklar halinde düşürmek ve çözülden tamamen uzaklaştırmak gerekmektedir. Bu işlem için diyaliz yapılmaktadır. Protein özeltisi diyaliz membranının içerisine konur ve kaotropun giderek azalan çözeltilerin içerisinde diyaliz edilmesi sağlanır. Protein bu şekilde azalan kaotrop konsantrasyonlarında ikincil yapısına tekrar veya kısmen dönecektir (98).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1 Gereç

5.1.1 Çözeltiler

Çözeltilerin hazırlanmasında 18.2MΩ ddH₂O, besiyerlerin hazırlanmasında dH₂O kullanılmıştır. Otoklavlama yarım litre hacim için 121°C 1Atm basınç altında, 15 dakika süre ile yapılmıştır. Kimyasalların miktarları, belirtilen hacimler için hesaplanmıştır.

1M Tris-Cl, pH8.0 – 100mL

Tris 12.114g (Sigma T 8524)

HCl ile pH8.0'e ayarlandı ve ddH₂O ile son hacim 100mL'ye tamamlandı. Otoklavlama ile sterilize edilip oda ısısında saklandı

1.5M Tris-Cl, pH8.8 – 100mL

Tris 18.17g (Sigma T 8524)

HCl ile pH8.8'e ayarlandı ve ddH₂O ile son hacim 100mL'ye tamamlandı. Otoklavlama ile sterilize edilip oda ısısında saklandı.

1M Tris-Cl, pH6.8 – 100mL

Tris 12.114g (Sigma T 8524)

HCl ile pH6.8'e ayarlandı ve ddH₂O ile son hacim 100mL'ye tamamlandı. Otoklavlama ile sterilize edilip oda ısısında saklandı.

0.15M Tris-Cl, pH7.6 – 100mL

Tris 1.8171g (Sigma T 8524)

HCl ile pH7.6'ya ayarlandı ve ddH₂O ile son hacim 100mL'ye tamamlandı. Otoklavlama ile sterilize edilip oda ısısında saklandı

0.5M Na₂EDTA, pH8.0 – 500mL

Na₂EDTA·2H₂O 91.08g (Sigma ED2P)

NaOH ile pH8.0'e ayarlandı. ddH₂O ile son hacim 500mL'ye tamamlandı ve otoklavlandı. 4°C'da saklandı.

10xTris-EDTA, pH8.0 – 100mL

1M Tris-Cl, pH8.0 10mL

0.5M Na₂EDTA pH8.0 2mL

ddH₂O ile son hacim 100mL'ye tamamlandı. Otoklavlama ile sterilize edilip oda ısısında saklandı.

50xTris Asetik EDTA – 1000mL

Tris 0.2M (242g) (Sigma T 8524)

0.5M Na₂EDTA, pH8.0 100mL

Asetik asid 57.1mL (Merck 100056)

ddH₂O ile son hacim 1000mL'ye tamamlandı ve oda ısısında saklandı.

10x DNA Yükleme Tamponu – 100mL

Bromfenol mavisi 0.25g (Sigma B 5525)

Ksilen siyanol 0.25g (Sigma X 4126)

150mM Tris pH7.6 33mL

Gliserol (Saf) 60mL (J.T.Baker M77809)

ddH₂O 7mL

Oda ısısında saklandı.

Etidyum Bromid – 10mL

Etidyum bromid 0.1g (Sigma E 8751)

ddH₂O 10mL

Işık geçirmeyen bir cam şişe içerisinde 4°C’da saklandı.

0.1M IPTG – 10mL

İzopropil β-D-tiyogalaktopiranosid 0.2383g (Applichem A4978)

ddH₂O ile son hacim 10mL’ye tamamlandı ve 0.45µm’lik filtre ile steril edilip, 1mL’lik alikotlar haline -20°C’da saklandı.

X-Gal – 5mL

X-Gal 0.1g (Applichem A4978)

5mL N,N dimetilformamid içerisinde çözüldü. 0.5mL’lik alikotlar halinde -20°C’da saklandı.

1M KCl – 100mL

KCl 7.455g (Merck 104934)

ddH₂O ile son hacim 100mL’ye tamamlandı ve oda ısısında saklandı.

0.15M NaCl – 100ml

NaCl 0.877g (Merck 106400)

ddH₂O ile son hacim 100mL’ye tamamlandı ve oda ısısında saklandı.

1M MgCl₂ – 100mL

MgCl₂·6H₂O 20.33g (Ridel-de Haën 13152)

ddH₂O ile son hacim 100mL’ye tamamlandı ve oda ısısında saklandı.

10N NaOH - 100mL

NaOH 40g (Merck 106462)

ddH₂O ile son hacim 100mL'ye tamamlandı ve oda ısısında saklandı.

1M Glikoz – 100mL

D-Glikoz 18.01g (Merck 108337)

ddH₂O ile son hacim 100mL'ye tamamlandı ve oda ısısında saklandı.

3M NaOASETAT, pH5.2 – 100mL

NaOASETAT·3H₂O 40.824g (Sigma S 8625)

Asetik asid ile pH5.2'ye ayarlandı ve ddH₂O ile son hacim 100mL'ye tamamlandı.
Otoklavlama ile sterilize edilip oda ısısında saklandı.

5M KOASETAT – 100mL

KOASETAT 49.075g (Sigma P 1190)

ddH₂O ile son hacim 100mL'ye tamamlandı ve 4°C'da saklandı.

Ampisillin Stok Solüsyonu (100mg/mL) – 10mL

Ampisillin 1g (Applichem A0839)

ddH₂O ile son hacim 10mL'ye tamamlandı ve 0.45µm'lik filtre ile sterilize edilip,
-20°C'da 0.5mL'lik alikotlar halinde saklandı.

Kanamisin Stok Solüsyonu (25mg/mL) – 10mL

Kanamisin 0.25g (Applichem A1493)

ddH₂O ile son hacim 10mL'ye tamamlandı ve 0.45µm'lik filtre ile sterilize edilip,
-20°C'da 0.5mL'lik alikotlar halinde saklandı.

Luria Bertani Sıvı Besiyeri– 500mL

Luria Bertani 12.5g (Sigma L 3522)

dH₂O ile son hacim 500mL'ye tamamlandı ve otoklavlanıp, 4°C'da saklandı.

Luria Bertani Agar Plakları – 500mL

Luria Bertani Agar 20g (Sigma L 3147)

dH₂O ile son hacim 0.5L'ye tamamlandı ve otoklavlandı. Ardından petri kaplarına döküldü ve kaplar 4°C'da saklandı. 25µg/mL kanamisin ve/veya 100µg/mL ampisillin içeren besiyerlerine aşağıda belirtilen miktarlarda antibiyotik eklenmiştir.

Ampisillin (100mg/mL) 0.5mL

Kanamisin (25mg/mL) 0.5mL

Antibiyotikler besiyeri otoklavlandıktan sonra 50-55°C sıcaklıktayken eklenip petri kaplarına dökülmüştür ve 4°C'da saklanmıştır.

SOC Besiyeri – 100mL

Tripton 20g (Lab M MC005-A)

Maya ekstraktı 5g (Acumedia 7184A)

NaCl 0.5g (Merck 106400)

1M KCl 2.5mL

10M NaOH pH7.0'ye ayarlandı ve dH₂O ile 970mL'ye tamamlandı ve otoklavlandı. Ardından 0.45µm'lik filtre ile sterilize edilen 10mL 1M MgCl₂ ve 20mL 1M glikoz eklendi ve 4°C'da saklandı.

TFB1 – 500mL

MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.1M (10.165g)	(Ridel-de Haën 13152)
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.050 (4.94g)	(Applichem A2087)
KOasetat	0.03M (1.47g)	(Sigma P 1190)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.01M (0.74g)	(Merck 102381)
Gliserol (Saf)	%15 (v/v) (75mL)	(J.T.Baker M77809)

Asetik asid ile pH5.8'e ayarlandı (Gliserol pH ayarlandıktan sonra eklendi) ve ddH₂O ile son hacim 500mL'ye tamamlanıp, 0.45µm'lik filtre ile sterilize edildi. 4°C'da saklandı.

TFB2 – 500mL

MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.01M (1.02g)	(Ridel-de Haën 13152)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1M (7.351g)	(Merck 102381)
MOPS	0.01M (1.05g)	(Sigma M 1254)
Gliserol (Saf)	%15 (v/v) (75mL)	(J.T.Baker M77809)

KOH ile pH6.8'e ayarlandı (Gliserol pH ayarlandıktan sonra eklendi) ve ddH₂O ile son hacim 500mL'ye tamamlanıp, 0.45µm'lik filtre ile sterilize edildi. 4°C'da saklandı.

Alkalen lizis solüsyon 1 – 100mL

D-Glikoz	0.05M (0.9g)	(Merck 108337)
1M Tris-Cl, pH8.0	0.025M (2.5mL)	
0.5M EDTA, pH8.0	0.01M (2mL)	

ddH₂O ile son hacim 100mL'ye tamamlandı ve otoklavlanıp, 4°C'da saklandı.

Alkalen lisis solüsyon 2 – 10mL

10N NaOH	0.2N (0.2mL)	
Sodyum dodesil sülfat	%1 (w/v) (0.1g)	(Sigma L 4390)

Taze hazırlandı ve oda ısında kullanıldı.

Alkalen lisis solüsyon 3 – 100mL

5M KOAsetat	60mL	
Glasiyal Asetik asid	11.5mL	
ddH ₂ O	28.5mL	

4°C’da saklandı.

STE – 100mL

1M Tris-Cl, pH8.0	0.01M (0.001mL)	
NaCl	0.1M (0.584g)	(Merck 106400)
0.5M Na ₂ EDTA, pH8.0	0.001M (0.0002mL)	

ddH₂O ile son hacim 100mL’ye tamamlandı ve otoklavlanıp, 4°C’da saklandı.

SDS, %10 – 100mL

Sodyum dodesil sülfat	10g	(Sigma L 4390)
-----------------------	-----	----------------

Kristaller 68°C’da çözdürüldü ve ddH₂O ile son hacim 100mL’ye tamamlandı.

Amonyum persülfat, %10 – 5mL

Amonyum persülfat	0.5g	(Sigma A 7460)
-------------------	------	----------------

ddH₂O ile son hacim 5mL’ye tamamlandı. 4°C sıcaklıkta iki hafta süre ile saklandı.

Akril-bisakril-amid,%30 – 100mL

Akrilamid	29g	(Sigma A 9099)
N,N'-metilenbisakrilamid	1g	(Sigma M 2022)

37°C'de ddH₂O içinde çözüldü ve son hacim 100mL'ye tamamlandı. Işık geçirmeyen bir cam şişede 4°C'da saklandı.

10xSDS-PAGE Yürütme Tamponu – 1000mL

Sodyum dodesil sülfat	%1 (w/v) (10g)	(Sigma L 4390)
Tris	0.25M (30.3g)	(Sigma T 8524)
Glisin	1.92M (144.1g)	(Sigma G 7126)

ddH₂O ile son hacim 1000mL'ye tamamlandı ve oda ısısında saklandı.

2xSDS-PAGE Protein Yükleme Tamponu – 100mL

1M Tris-Cl, pH6.8	0.09M (0.009mL)	
Gliserol (Saf)	%20 (v/v) (20mL)	(J.T.Baker M77809)
Sodyum dodesil sülfat	%2 (w/v) (2g)	(Sigma L 4390)
Bromfenol mavisi	%0.02 (w/v) (20mg)	(Sigma B 5525)
DTT	0.1M (1.54g)	(Applichem A2948)

ddH₂O ile son hacim 100mL'ye tamamlandı ve -20°C'da 0.5mL'lik alikotlar halinde saklandı.

5xSDS-PAGE Protein Yükleme Tamponu – 100mL

1M Tris-Cl, pH6.8	0.225M (0.225mL)	
Gliserol (Saf)	%50 (v/v) (50mL)	(J.T.Baker M77809)
Sodyum dodesil sülfat	%5 (w/v) (5g)	(Sigma L 4390)
Bromfenol mavisi	%0.05 (w/v) (50mg)	(Sigma B 5525)
DTT	0.1M (3.85g)	(Applichem A2948)

ddH₂O ile son hacim 100mL'ye tamamlandı ve -20°C'da 0.5mL'lik alikotlar halinde saklandı.

Yarı-Kuru Transfer Tamponu – 500mL

Tris	0.025M (1.52g)	(Sigma T 8524)
Glisin	0.15M (5.63g)	(Sigma G 7126)
Metanol	%10 (v/v) (50mL)	(Merck 106008)

ddH₂O ile son hacim 500mL'ye tamamlandı ve oda ısısında saklandı.

10xTris Tamponlu Tuzlu Su (TTS) – 500mL

Tris	0.1M (6.057)g	(Sigma T 8524)
NaCl	1.5M (43.83)g	(Merck 106400)

HCl ile pH7.4'e ayarlandı ve ddH₂O ile son hacim 500mL'ye tamamlanıp, oda ısısında saklandı.

TTS-Tween 20 (TTST) – 500mL

10xTTS	50mL	
Tween20	2.5mL	(Applichem A1389)

ddH₂O ile son hacim 500mL'ye tamamlandı.

%3'lük Sığır Serum Albumini (SSA) bloklama tamponu – 50mL

SSA 1.5g (Applichem A1391)

TTST ile son hacim 50mL'ye tamamlandı.

SSA Standardı, 2mg/mL - 5mL

11mg SSA 5mL tampon B'de çözüldü ve optik dansite $A_{280}=1.322$ olana kadar tampon B eklendi. 0.5mL alikotlar halinde -20°C 'da saklandı

Bradford Boyası – 100ml

Coomassie Brilliant Blue G250 %0.01 (w/v) (0.01g) (Sigma B 0770)

Etanol (saf) %5 (v/v) (5ml) (Applichem A3578)

orto-Fosforik asit, %85 (w/v) %8.5 (v/v) (10ml) (Applichem A0637)

“Coomassie Brilliant Blue G250” önce etanolde çözüldü ve üzerinde fosforik asit eklendi. ddH₂O ile son hacim 100mL'ye tamamlandı. Solüsyon, filtre kâğıdı ile süzüldü ve ışık almayan bir şişede 4°C 'da saklandı.

Tampon B – 100mL

NaH₂PO₄ 0.1M (1.38g) (Sigma S 8625)

Tris 0.01M (0.12g) (Sigma T 8524)

Üre 8M (48.05g) (Sigma U 5378)

10M NaOH ile pH8.0'e ayarlandı ve ddH₂O ile 100mL'ye tamamlanıp oda ısısında saklandı. Kullanmadan önce pH kontrol edilip, tekrar ayarlandı.

Tampon C – 100mL

NaH ₂ PO ₄	0.1M (1.38g)	(Sigma S 8625)
Tris	0.01M (0.12g)	(Sigma T 8524)
Üre	8M (48.05g)	(Sigma U 5378)

HCl ile pH6.3'e ayarlandı ve ddH₂O ile 100mL'ye tamamlanıp oda ısısında saklandı.
Kullanmadan önce pH kontrol edilip, tekrar ayarlandı.

Tampon D – 100mL

NaH ₂ PO ₄	0.1M (1.38g)	(Sigma S 8625)
Tris	0.01M (0.12g)	(Sigma T 8524)
Üre	8M (48.05g)	(Sigma U 5378)

HCl ile pH5.9'a ayarlandı ve ddH₂O ile 100mL'ye tamamlanıp oda ısısında saklandı.
Kullanmadan önce pH kontrol edilip, tekrar ayarlandı.

Tampon E – 100mL

NaH ₂ PO ₄	0.1M (1.38g)	(Sigma S 8625)
Tris	0.1M (0.12g)	(Sigma T 8524)
Üre	8M (48.05g)	(Sigma U 5378)

HCl ile pH4.5'e ayarlandı ve ddH₂O ile 100mL'ye tamamlanıp oda ısısında saklandı.
Kullanmadan önce pH kontrol edilip, tekrar ayarlandı.

İzopropanol (Sigma I 9516)

Agaroz (Sigma A 9539)

N-N dimetil formamid (Appllichem A3676)

HCl %37 (Merck 100314)

Fenol:Kloroform:İzoamilalkol (24:25:1) (Appllichem A0889)

5.1.2 Enzimler

<i>Taq</i> Polimeraz (5u/μL)	(Fermentas #EP0406)
<i>Pfu</i> Polimeraz (2.5u/μL)	(Fermentas #EP0509)
<i>Bam</i> HI (10u/μL)	(Fermentas #ER0051)
<i>Hind</i> III (10u/μL)	(Fermentas #ER0501)
Ribonükleaz inhibitörü (20-50u/μL)	(Appllichem A3934)
“Ribonuclease A” (10mg/mL)	(Fermentas #EN0531)
“RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase”	(Fermentas #EP0441)

5.1.3 Antikorlar

“RGS-His Antibody”	(Qiagen 34610)
“Sheep Anti-Mouse (IgG) Horse Radish Peroxidase”	(Chemicon AP300P)

5.1.4 Hazır Uygulamalar

“Rapid Ligation Kit”	(Fermentas #K1422)
“DNA Extraction Kit”	(Fermentas #K0513)
“QIAexpress Type IV Kit”	(Qiagen 32149)
“Chemilucifer ECL Detection System”	(Chemicon 2600)
“pGEM-T Easy Vector System”	(Promega A1380)

5.1.5 Diğer Gereçler

GeneRuler1™ 50bp	(Fermentas #SM0371)
GeneRuler™ 1kb	(Fermentas #SM0311)
“Prestained Protein Molecular Weight Marker”	(Fermentas #SM0441)
PVDF Membran	(Millipore IPVH15150)

Röntgen Filmi (Kodak 5256441)

3MM blotlama kağıdı (Whatman GB005)

10mM dNTP Mix (Fermentas #R0191)

Dış İleri öncül: 5'- GAA AGC GTC TAG CCA TGG CGT TAG T -3'

Dış Geri öncül: 5'- CGT AGG GGA CCA GTT CAT CAT CAT ATC CC -3'

İç İleri öncül: 5'- CGC GGA TCC ATG AGC ACG AAT CCT AAA -3'

İç Geri öncül: 5'- CGC AAG CTT AGA GGA AGA TAG AGA AAG AGC
AAC C -3'

5.2 Yöntem

5.2.1 Klonlanacak DNA'nın Eldesi

5.2.1.1 Kalıp RNA

Çalışmada kalıp RNA olarak Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nda tanısal araştırma amacıyla elde edilmiş genotipi 1 olan 60209418 UIN numaralı hastanın HCV RNA ekstraktı kullanıldı.

5.2.1.2 Öncüllerin Belirlenmesi

“Nested” PZT için iki çift öncül belirlendi. Öncüllerin hangi bölgelerin arasını çoğaltacağını belirlemek amacıyla HCV veri bankasına (<http://hcv.lanl.gov>) kayıtlı tüm genotiplerin nükleotit dizileri indirildi ve BioEdit 7.0.9 sürümü ile hizalandı (102). Dış öncüller olarak 5' kodlanmayan bölge ve E1 içerisinde bulunan ve tüm genotipler içerisinde korunmuş olan bölgeler seçildi. İç öncüller olarak özyapı proteinin 1'ci ve 534'cü nükleotit arasında kalan bölgeyi çoğaltılacak öncüller tasarlandı. İç öncüllerinden ileri öncül olanına *Bam*HI kesim bölgesi ve kesim etkinliğini arttırmak için 5' ucuna üç adet fazla nükleotit eklendi. Geri öncülüne ise *Hind*III kesim bölgesi ve bu kesim bölgesi ile özyapı proteinin 534'cü nükleotit arasına bir timin eklendi. Bu şekilde TAA dur kodonu oluştu. Ayrıca *Hind*III restriksiyon enzimin kesim etkinliğini arttırmak için 3' ucuna üç adet nükleotit eklendi. H77 (GenBank erişim numarası: AF009606) suşuna göre dış öncüllerin konumları sırasıyla 71'ci nükleotit ve 1300'üncü nükleotit, iç öncüllerin konumları sırasıyla 342'nci nükleotit ve 852'inci nükleotittir.

Dış Öncüller

İleri öncül: 5'- GAA AGC GTC TAG CCA TGG CGT TAG T -3'

Geri öncül: 5'- CGT AGG GGA CCA GTT CAT CAT CAT ATC CC -3'

İç Öncüller

İleri öncül: 5'- CGC GGA TCC ATG AGC ACG AAT CCT AAA -3'

Geri öncül: 5'- CGC AAG CTT AGA GGA AGA TAG AGA AAG AGC
AAC C -3'

5.2.1.3 cDNA Sentezi

PZT, DNA çoğaltmaktadır. HCV ise bir RNA virusudur. Bu nedenle çoğaltma yapabilmek için önce cDNA sentezi yapıldı. cDNA sentezi üretici firmanın (Fermentas #EP0441) tavsiyeleri doğrultusunda yapıldı.

1. 5µL kalıp RNA 200µL'lik tüpe kondu.
2. 40pmol dış geri öncül eklendi
3. Son hacim 11µL olacak şekilde ddH₂O ile tamamlandı.
4. Tüp ısı döngü cihazında (Techne TC-412) 70°C'da 5 dakika inkübe edildi ve ardından buzda soğutuldu.
5. 5x reaksiyon tamponundan 4µL, 10mM dNTP'den 2µL, ribonükleaz inhibitöründen 1µL (20u) eklendi. Son hacim 19µL olacak şekilde ddH₂O ile tamamlandı.
6. Karışım ısı döngü cihazında 37°C'da 5 dakika inkübe edildi.
7. Karışıma 1µL (200u) M-MuLV enzim eklendi.
8. Karışım ısı döngü cihazında 42°C'da 60 dakika inkübe edildi.
9. Reaksiyon, tüpün 70°C'da 10 dakika ısıtılarak durduruldu ve 4°C'da soğutuldu.
10. Sentezlenen cDNA -20°C'da saklandı.

5.2.1.4 DNA Çoğaltma

Polimeraz nedeniyle oluşabilecek nükleotit hatalarını en aza indirmek amacıyla çoğaltmada 3'→5' ekzonükleaz aktivitesi olan *Pfu* polimeraz seçildi. Çoğaltma iki aşamalı olarak yapıldı. Çoğaltma için öncelikle dış sonra iç öncüller kullanıldı. Reaksiyonlar 50µL hacimde yapıldı ve ısı döngü cihazı olarak Techne TC412 kullanıldı.

Dış öncüllerle çoğaltma:

Karışım:

ddH ₂ O	35,5µL
10x Tampon (MgSO ₄ 'lı)	5µL
dNTP (10mM)	1µL
Dış ileri öncül (10mM/µL)	1,5µL
Dış geri öncül (10mM/µL)	1,5µL
<i>Pfu</i> (2,5u/µL)	0,5µL
cDNA	5µL

Döngüler:

• Ön Denatürasyon	94°C	3 dakika	
• Denatürasyon	94°C	45 saniye	} 30 döngü
• Tavlama	50°C	45 saniye	
• Uzatma	72°C	2 dakika	
• Son uzatma	72°C	10 dakika	
• Saklama	4°C	∞	

İç öncüllerle çoğaltma:

Karışım:

ddH ₂ O	40,5µL
10x Tampon (MgSO ₄ 'lı)	5µL
dNTP (10mM)	1µL
Dış ileri öncül (10mM/µL)	1 µL

Dış geri öncül (10mM/μL)	1μL
<i>Pfu</i> (2,5u/μL)	0,5μL
Kalıp DNA	1μL

Döngüler:

• Ön Denatürasyon	94°C	3 dakika	
• Denatürasyon	94°C	45 saniye	} 30 döngü
• Tavlama	50°C	45 saniye	
• Uzatma	72°C	1 dakika	
• Son uzatma	72°C	10 dakika	
• Saklama	4°C	∞	

5.2.1.5 DNA Elektroforezi

PZT ürünlerini görüntülemek amacıyla agaroz jel elektroforezi yapıldı. Jel 25mL 1xTAE içerisinde %1'lik (w/v) agaroz karıştırıldı. Mikrodalga fırında orta güçte agaroz eritildi. İçerisine 1.2 μL etidyum bromid (10mg/mL) karıştırıldı ve tarağı hazır jel kabına dökülüp donması için oda ısısına bırakıldı. Jel donduktan sonra tarak dikkatlice jelin içerisinden çıkarıldı ve jel kalıp ile birlikte elektroforez tankına (Thermo EC320) yerleştirildi. 4.5μL PZT ürününe 10xDNA yükleme tamponundan 0.5μL karıştırıldı ve jelde açılmış kuyulara yüklendi. Kuyulardan birisine “marker” yüklendi. Elektroforez güç kaynağı (Thermo EC135-90) 120V'a ayarlandı ve jel 30-60 dakika yürütüldü. Jel translüminatörde orta dalga UV'de (280-340nm) görüntülendi ve (Vilber Lourmat Infinity-1000/26MX) cihazıyla fotoğrafı çekildi. Görüntülen bant büyüklükleri “marker” ile karşılaştırıldı.

Çalışma kapsamında dış öncüllerle yapılan PZT'nin ürünü için ~1.2kb, iç öncüllerle yapılan PZT'nin ürünü için 553bp, pQE-30 için ~3.4kb, pGEM-T Easy için ~3kb, pQE-C178 için ~4kb, pGEM-C178 için ~3.6kb bant büyüklükleri görüntülendi.

5.2.2 Klonlama

5.2.2.1 TA Klonlaması

İç öncüllerle yapılan PZT'nin ürünü TA klonlaması ile pGEM-T Easy vektörüne klonlandı. İçerisinde özyapı proteininin ilk 178 aminoasidini (C178) içeren bu klon, restriksiyon enzim kesimi için substrat olarak kullanıldı.

Vektör 3015bp uzunluğunda ve seçilimi ampisillin ile yapılmaktadır. Klonlama, vektörün içerisinde bulunan *lacZ* genin ortasına yapılmaktadır. Bu şekilde *lacZ* geni inaktif olmakta ve besiyerinde bulunan X-Gal'ı parçalayamamaktadır. Bu nedenle, klonlanan geni içeren koloniler beyaz renkte görülmektedir.

Vektör bir TA klonlama vektörüdür ve 3' uçlarında serbest timinler bulunmaktadır. Bu vektöre klonlama yapabilmek için klonlanacak DNA molekülün 5' uçlarında adenin bulunması gerekmektedir. PZT'de kullanılan *Pfu* polimerazın terminal transferaz aktivitesi yoktur. Bu nedenle iç öncüllerle çoğaltılan ürün, terminal transferaz aktivitesi olan *Taq* polimeraz ile tekrar çoğaltılmıştır.

5.2.2.1.1 *Taq* Polimeraz ile DNA Çoğaltma

Isı döngü cihazı olarak Techne TC-412 kullanıldı.

Karışım:

ddH ₂ O	37,5µL
10x Tampon	5µL
MgCl ₂	3µL
dNTP (10mM)	1µL
İç ileri öncül (10mM/µL)	1µL
İç geri öncül (10mM/µL)	1µL
<i>Taq</i> (5u/µL)	0,5µL (Fermentas #EP0406)
Kalıp DNA	1µL

Döngüler:

- | | | | |
|-------------------|------|-----------|------------|
| • Ön Denatürasyon | 94°C | 3 dakika | |
| • Denatürasyon | 94°C | 45 saniye | } 30 döngü |
| • Tavlama | 50°C | 45 saniye | |
| • Uzatma | 72°C | 1 dakika | |
| • Son uzatma | 72°C | 10 dakika | |
| • Saklama | 4°C | ∞ | |

PZT ürünü 5.2.1.5 başlığında anlatıldığı şekilde görüntülendi.

5.2.2.1.2 Ligasyon

Ligasyon üretici firmanın (Fermentas #K1422) önerileri doğrultusunda yapıldı.

1. Buz üstünde bulunan 200µL'lik tüpe 5µL ddH₂O, 1µL (50ng/µL) pGEM-T Easy vektörü ve 1µL *Taq* polimeraz ile çoğaltılmış PZT ürünü, 2µL 5xLigasyon tamponu ve 1µL T4 ligaz karıştırıldı.
2. Karışım 22°C'da 60 dakika ısı döngü cihazında (Techne TC-412) inkübe edildi.

5.2.2.1.3 Gliserol Stoğu Hazırlama

Kompetan hazırlamada, klonlanmış hücrelerin saklanması gliserol stokları kullanıldı. Gliserol stoklarında %5 gliserol (v/v) bulunmaktadır.

1. Bir deney sonucunda (klonlama, vb.) LB agar plaklarında üremiş olan kolonilerden bir tanesi 0.9mL LB sıvı besiyeri içeren mikrosantrifüj tüpüne (eğer hücre klon içeriyorsa seçilim için gerekli antibiyotikler içeren besiyeri olmalı) ekildi ve 200 rpm'de çalkalanarak 37°C'da bir gece inkübe edildi.
2. Bir gece öncesinden üreyen kültüre 100µL %50 gliserol (v/v) karıştırıldı.
3. Hücreler -80 °C'da dondurularak saklandı.

5.2.2.1.4 Kompetan Hücre Üretme

Klonlama yapabilmek için transformasyon yeteneği arttırılmış hücre kullanıldı. Kompetan hücre hazırlamak için “The Qiaexpressionist™” (Qiagen) kullanma kılavuzunda yer alan yöntem izlendi.

1. JM109 gliserol stoğundan LB agar plağına canlandırıldı ve bir gece 37°C’da inkübe edildi.
2. Bir gün önce ekilen ve üreyen JM109 suşundan bir koloni 10mL LB sıvı besiyerine ekildi ve gece boyunca 200rpm’de çalkalanarak 37°C’da inkübasyona bırakıldı.
3. Gece boyunca üremiş kültürden kültürden 1mL 100mL 37°C’de ki LB sıvı besiyerine ekildi ve 200rpm çalkalama hızı ile 37°C’da inkübe edildi.
4. Kültür, 60 dakika inkübasyon sonrasında her 20 dakikada bir 600nm’de OD ölçüldü (Thermo MultiSkan) ve OD₆₀₀=0,5’de kültür önceden buzda soğutulmuş iki adet 50mL konik tabanlı tüpe aktarıldı.
5. Kültürü içeren konik tabanlı tüp buda 10 dakika soğumaya bırakıldı.
6. Kültürü içeren konik tabanlı tüp 4°C’da 4000g ile 5 dakika santrifüj (Heraeus Labofuge 400R) edildi ve süpernatant dikkatlice atıldı.
7. Pelletin üzerine 30mL TFB1 tamponu eklendi ve pellet vorteks ile tamponun içerisine süspanse edildi. Ardından konik tabanlı tüp 90 dakika bu içerisinde inkübe edildi.
8. Konik tabanlı tüp 4°C’da 4000g’de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant dikkatlice atıldı.
9. Pelletin üzerine 4mL TFB2 tamponu eklendi. Pellet vorteks ile tamponun içerisine süspanse edildi.
10. Hücreler 200µL alikotlar mikrosantrifüj tüpleri içerisinde -80°C’da dondurularak saklandı.

5.2.2.1.5 Transformasyon

Ligasyon ürününün kompetan hücelere aktarılması için transformasyon yapıldı. Uygulamada (+) kontrol olarak pQE-40, (-) kontrol olarak 1xTE kullanılmıştır.

1. Buzda soğutulmuş 3 adet mikrosantrifüj tüpüne 50µL kompetan JM109 kondu ve klonlama tüpü (V), pozitif kontrol tüpü (+), negatif kontrol tüpü (-) olarak işaretlendi.
2. Vektör tüpüne 1µL ligasyon ürünü, pozitif kontrol tüpüne 1µL (10ng/µL) pQE-40 vektör, negatif kontrol tüpüne 1µL 1xTE eklendi.
3. Tüpler parmak vurularak nazikçe karıştırıldı ve 30 dakika süresince buzda inkübe edildi.
4. Tüplere 42°C sıcaklığında ki ısı bloğunda 60 saniye ısı şoku verildi ve ardından 2 dakikalığına buz üzerine alındı.
5. Tüplere önceden 37°C'da ısıtılmış 500µL SOC besiyeri karıştırıldı.
6. Tüpler 200rpm çalkalama hızı ile 37°C'da 60 dakika inkübe edildi.
7. Pozitif ve negatif kontrolden 100µL, klon içeren tüpten 2x100µL ve 2x50µL önceden 37°C'da ısıtılmış ampicillin (100µg/mL), 100mM IPTG, 20mM X-Gal içeren LB agar plaklarına ekildi.
8. Plaklar 30°C'da bir gece inkübe edildi.

5.2.2.1.6 Klon İçeren Hücrenin Saptanması

pGEM-T Easy vektöründe klon içeren hücrenin seçimi görsel olarak yapılmaktadır. Klon içeren koloniler beyaz, içermeyenler ise mavi olarak görülmektedir. Her transformasyon deneyinde belirli bir oranda artalan koloni çıkabilmektedir. Bu nedenle rekombinant vektör içerdiği düşünülen koloniler, rekombinant vektör içerdiklerine dair başka bir yöntem ile tekrar taranması gerekmektedir. Bu çalışma kapsamında PZT kullanılmıştır.

5.2.2.1.6.1 Kaynatma Yolu ile DNA Eldesi

Bir klonlama deneyinde istenilen klonu saptamak amacıyla onlarca koloni taraması gerekebilir. Kaynatma yolu ile DNA eldesi kolay, hızlı ve ucuz bir yöntemdir ve elde edilen DNA PZT’de kalıp olarak kullanılabilir.

1. Transformasyon sonrası üreyen ve klon içerdiği düşünülen koloniler 1mL ampisillin (100µg/mL) içeren LB sıvı besiyeri içeren mikrosantrifüj tüplerine ekildi ve 200rpm’de çalkalanarak 37°C’da bir gece inkübe edildi.
2. Bir gün önce ekilen ve üreyen kültürlerden 100µL kültür 400µL ddH₂O içeren mikrosantrifüjlere karıştırıldı. Ana kültürde artan 900µL kültüre 100µL %50 gliserol (v/v) karıştırıldı ve bunlar gliserol stoğu olarak -80°C’da dondurularak saklandı.
3. 500µL’ye sulandırılmış kültür içeren tüpler 100°C’da ayarlanmış ısı bloğunda 15 dakika kaynatıldı.
4. Tüpler 10000g’de 10 dakika santrifüj (Eppendorf Centrifuge 5415C) edildi.
5. Elde edilen DNA, 4°C’da PZT uygulamak için saklandı.

5.2.2.1.6.2 Klon Tarama Amacıyla PZT Uygulaması

Kaynatma yolu ile elde edilen DNA’lar kalıp olarak kullanılacaktır. Her 10 örnekte bir kullanılacak negatif kontrol için ddH₂O, pozitif kontrol olarak iç öncüllerle çoğaltılan 5.2.2.1.1 başlığında ki PZT ürünü kullanıldı. Isı döngü cihazı olarak Techne TC-412 kullanıldı ve reaksiyon 20µL hacimde yapıldı.

Karışım:

ddH ₂ O	14.4µL
10x Tampon	2µL
MgCl ₂	1.2µL
dNTP (10mM)	0.4µL

İç ileri öncül (10mM/ μ L)	0.4 μ L
İç geri öncül (10mM/ μ L)	0.4 μ L
<i>Taq</i> (5u/ μ L)	0,2 μ L
Kalıp DNA	1 μ L

Döngüler:

- | | | | |
|-------------------|------|-----------|------------|
| • Ön Denatürasyon | 94°C | 3 dakika | |
| • Denatürasyon | 94°C | 45 saniye | } 30 döngü |
| • Tavlama | 50°C | 45 saniye | |
| • Uzatma | 72°C | 1 dakika | |
| • Son uzatma | 72°C | 10 dakika | |
| • Saklama | 4°C | ∞ | |

PZT ürünleri 5.2.1.5 başlığında anlatıldığı şekilde görüntülendi.

5.2.2.1.7 Alkalen Lizis ile Midiprep

Rekombinant DNA içeren koloniden çok miktarda DNA elde etmek için alkalen lizis yöntemi ile Midiprep yapıldı. Elde edilen vektör restriksiyon enzim kesimi için substrat olarak kullanıldı ve içerisinden elde edilen C178 pQE-30 vektörüne klonlandı.

1. Rekombinant DNA içeren klonun gliserol stoktan ampisillin (100 μ g/mL) LB agar plaklağına canlandırıldı ve bir gece 37°C’da inkübe edildi.
2. Bir gün önce ekilen ve üreyen kolonilerden bir tanesi 10mL ampisillinli (100 μ g/mL) Sıvı LB içeren 100mL’lik Erlenmayer içine ekildi ve 37°C’da bir gece çalkalanarak inkübe edildi.
3. Kültür 15 mL’lik konik tabanlı tüpe aktarıldı ve 4°C’da 2000g’de 10 dakika santrifüj edildi.

4. Süpernatant atıldı ve pellet 4mL STE'de süspanse edildi ve 4°C'da 2000g'de 10 dakika santrifüj (Heraeus Labofuge 400R) edildi.
5. Süpernatant'dan 3mL çekilip atıldı ve pellet kalan 1mL'lik tampona süspanse edilip mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Ardından tüp 4°C'da 15000g'de 1 dakika santrifüj edildi.
6. Süpernatant atıldı ve 4°C soğukluğunda 200µL alkalen lizis solüsyonu 1 ile sert vorteksleme yapılarak süspanse edildi.
7. Tüpe 400 µL taze hazırlanmış alkalen lizis 2 solüsyonu eklendi ve sıkıca kapatılarak 5 kez ters yüz edilerek karıştırıldı ve 3 dakika buz üstünde bekletildi.
8. Tüpe 300 µL 4°C'da sıcaklığında alkalen lizis solüsyonu 3 eklendi ve tüp birkaç kez tersyüz edilerek visköz hale gelen bakteri lizatı ile tamamen temas etmesi sağlandı. Tüp 3-5 dakika buz üzerinde bekletildi.
9. Bakteriyel lizat 4°C'da 5 dakika son hızda santrifüj edildi.
10. 600 µL süpernatant yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
11. Tüpe 600 µL fenol:kloroform:izoamilalkol eklendi. 30 saniye vorteksleme ile iki fazın karışması sağlandı, sonra da emülsiyon son hızda 4°C'da 2 dakika santrifüj edildi ve üst faz yeni tüpe aktarıldı.
12. Tüpe 600 µL oda sıcaklığındaki izopropanol eklendi ve vorteksle karıştırıldıktan sonra 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
13. Tüp oda sıcaklığında 5 dakika son hızla santrifüj (Eppendorf Centrifuge 5415C) edildi.
14. Pelletin varlığı kontrol edilerek süpernatant dikkatlice çekilip atıldı. Tüpe 1mL %70 etanol (v/v) eklendi ve tüp ters yüz edilerek pellet yıkandı. Ardından tüp son hızda 2 dakika santrifüj edildi.
15. Pelletin varlığı kontrol edilerek süpernatant dikkatlice çekilip atıldı. Ardından tüp kısa süreli santrifüj edilerek tüpün çeperlerinde kalan sıvı çöktürüldü ve atıldı. Tüpün kapağı açık vaziyette pellet 15 dakika kurumaya bırakıldı.

16. Tüpe 100µL RNase A (20mg/mL) içeren 1xTE konu ve pellet nazıkçe vortekslenerek çözüldü.

17. DNA eldesi -20°C’da saklandı.

DNA eldesi 5.2.1.5 başlığında anlatıldığı şekilde görüntüledi.

5.2.2.1.8 DNA’nın Spektrofotometre ile Miktarının Saptanması

Midiprep ile elde edilen DNA spektrofotmetre ile ölçüldü. Bunun için 10µL DNA 90µL 1xTE mikrosantrifüj tüpü içerisinde karıştırıldı. 100µL 1xTE kör olarak kullanıldı. Her iki çözelti ayrı ayrı temizliği ddH₂O ile yapılan küvetlere aktarıldı. 1xTE bulunan kör spektrofotometre cihazının (Thermo MultiSkan) kör kuyusuna, DNA içeren küvet ise ölçüm kuyusuna yerleştirildi. Ölçüm 260nm ve 280nm’de yapıldı. 260nm’de yapılan ölçüm 50 (dsDNA için) ve 10 (dilüsyon faktörü) ile çarpıldı. Elde edilen rakam µg cinsinden mL’de bulunan DNA miktarını ifade etmektedir. 260nm’deki değerin 280nm’deki değere bölünmesi ile edilen değer örneğin saflığını ifade etmektedir. Bu değerin saf DNA için 1.8-2 arasında olması beklenir. Bu değer 1.8 altında ise örnekte protein kontaminanı, 2 üzerinde ise RNA kontaminanı var demektir.

5.2.3 Yönlendirilmiş Klonlama

Yönlendirilmiş klonlama ile özyapı proteini kodlayan DNA dizisi pQE-30 vektörüne aktarıldı. Bu rekombinant vektör ile daha sonra protein üretimi yapıldı.

5.2.3.1 TA Klonlama Vektöründen Restriksiyon Enzim Kesimi ile Özyapı Proteinini Kodlayan DNA Dizisinin Çıkartılması

pGEM-T Easy vektörüne klonlanan 178 aminoasitlik özyapı proteini kodlayan DNA dizisinin 5’-ucuna *Bam*HI 3’-ucuna *Hind*III’ün tanıdığı palindromik diziler eklenmiştir. DNA dizisi ve pQE-30’da bu enzimler ile kesildi. Daha sonra yürütülerek agaroz jelden DNA elde edildi.

pGEM-C178 için karışım:

*Bam*HI 1µL

*Hind*III 1µL

10x*Bam*HI tamponu 2µL

DNA 1µg

ddH₂O ile son hacim 20µL'ye tamamlandı

pQE-30 için karışım:

*Bam*HI 1µL

*Hind*III 1µL

10x*Bam*HI tamponu 2µL

DNA 1µg

ddH₂O ile son hacim 20µL'ye tamamlandı

Tüp ısı döngü cihazında (Techne TC-412) 37°C'da 90 dakika inkübe edildi ve ardından reaksiyon 80°C'da 10 dakika inkübe edilerek inhibe edildi.

5.2.3.2 Agaroz Jelden DNA Eldesi

Restriksiyon enzim kesimi sonrasında pGEM-C178 vektöründen C178, pQE-30'dan ise 45 nükleotitik çoklu klonlama bölgesi ayrıldı. İstenilen DNA moleküllerinin bulunduğu çözeltilerden ayırmak için agaroz jelden DNA eldesi yöntemi kullanıldı. pQE-30'da 3.4kb'lı bant ve pGEM-C178 için 542bp'lik bant jelden izole edildi. Bu yöntemin uygulamasında "DNA Extraction Kit (Fermentas #K0513)" kullanıldı.

1. DNA elektroforez yöntemi 5.2.1.5'de benzer şekilde uygulandı. Fark olarak geniş tarak kullanıldı.
2. Boş iki adet mikrosantrifüj tüpü tartıldı ve ağırlıkları not edildi.

3. Jel translimünatörün üzerinde görüntülendi ve ilgili bantlar en kısa süre içerisinde temiz bir bistürü ile kesilip boş tüplere aktarıldı.
4. Agaroz jel bulunan tüpler tekrar tartıldı ve boş ağılıkları ile farklar hesaplandı. Buna göre 1g jel, 1mL agaroz hacmi olarak kabul edildi.
5. Agaroz hacmin üç katı kadar “Binding Solution” eklendi ve 55°C’ye ayarlanmış ısı bloğunda 5 dakikada eritildi.
6. Silika toz vorteks ile süspans edildi ve 10µL silika toz erimiş agaroz-DNA çözeltisine eklendi. Silikanın çözelti içerisinde asılı kalması için ara ara nazikçe vorteksleyerek ısı bloğunda 55°C’da 5 dakika inkübe edildi.
7. Silika 5 saniye süre ile yapılan son süratte kısa santrifüj (Eppendorf Centrifuge 5415C) ile çöktürüldü ve süpernatant atıldı. 500µL -20°C sıcaklığındaki “Wash Buffer” tüpe eklendi ve tüp vortekslenerek silika çözeltiye süspans edildi. Bu basamak üç kez tekrar edildi.
8. Silika 30 saniye süre ile yapılan son süratte santrifüj ile çöktürüldü ve süpernatant atıldı. Silika 35µL 1xTE eklendi ve silika vortekslenerek süspans edildi ve ara ara vortekslenerek 55°C’da 5 dakika ısı bloğunda inkübe edildi.
9. Silika 30 saniye süre ile yapılan son süratte santrifüj ile çöktürüldü ve süpernatantın 25µL’si yeni bir tüpe aktarıldı.
10. Silikanın bulunduğu tüpe 25µL 1xTE eklendi ve silika vorteks ile süspans edilerek ara ara vortekslenerek 55°C’da 5 dakika ısı bloğunda inkübe edildi.
11. Silika 30 saniye süre ile yapılan son süratte santrifüj ile çöktürüldü ve süpernatantdan 25µL alınarak diğer eluatın bulunduğu tüpe aktarıldı.

Elde edilen DNA miktarlarını ölçmek için 5.2.2.1.8 başlığında olduğu gibi ölçüldü ve 5.2.1.5 başlığındaki gibi görüntülendi.

5.2.3.3 Yönlendirilmiş Klonlama İçin Ligasyon Reaksiyonu

Yönlendirilmiş klonlamada ligasyon reaksiyonun kurulması için DNA moleküllerin belirli bir oranda bulunması gerekmektedir. Bu oranlar 1:1, 1:3, 1:5, 1:10’dur (birinci değer

vektörü temsil etmektedir). Reaksiyona katılacak DNA miktarının hesaplanması basitçe şöyle olmaktadır: vektörün baz uzunluğu takılacak DNA molekülüne bölünür ve elde edilen rakam ile reaksiyona sokulacak vektör miktarı bölünür. Bu işlemde elde edilen son değer ise reaksiyona katılacak olan vektöre takılacak DNA miktarını ifade etmektedir. DNA miktarları kurulan bu ligasyon reaksiyonu için şu formülle hesaplandı:

$$C178^{\mu g} / \mu L = \frac{pQE - 30^{\mu g} / \mu L}{\frac{pQE - 30 \text{ bp}}{C178 \text{ bp}}}$$

Ligasyon üretici firmanın (Fermentas #K1422) önerileri doğrultusunda yapıldı.

Karışım:

1. Buz üstünde bulunan 200 μ L'lik tüpe 100ng kesilmiş pQE-30 ve 17ng C178, 4 μ L 5xLigasyon tamponu, 1 μ L T4 ligaz karıştırıldı ve son hacim 20 μ L olacak şekilde ddH₂O ile tamamlandı. 1:3 oranında ki reaksiyon için 51ng, 1:5 oranındaki reaksiyon için 85ng, 1:10 oranındaki reaksiyon için 170ng C178 kullanıldı.
2. Karışım 22°C'da 60 dakika ısı döngü cihazında (Techne TC-412) inkübe edildi.

5.2.3.4 pQE-C178'in Transforme Edilmesi

Transformasyon 5.2.2.1.5 başlığında anlatıldığı gibi yapıldı. Farklı olarak LB Agar plaklarına IPTG ve X-Gal eklenmemiştir ve LB agar plaklarında antibiyotik olarak ampisillin (100 μ g/ml) ve kanamisin (25 μ g/ml) kullanılmıştır.

5.2.3.5 Rekombinant DNA'yi İçeren Kolonilerin Taranması

Rekombinant pQE-C178 klonunu içeren kolonin saptanması 5.2.2.1.6 başlığında anlatıldığı gibi yapıldı.

5.2.3.6 Rekombinant DNA'nın Eldesi

pQE-C178 klonunu içeren klondan Midiprep 5.2.2.1.7 başlığında anlatıldığı gibi yapıldı.

5.2.3.7 Rekombinant Vektörlerin Restriksiyon Enzim Analizi

pQE-C178 klonlamanın doğrulanması amacıyla restriksiyon enzim analizi ile incelendi. Yöntem 5.2.3.1 başlığında olduğu gibi uygulandı. Kontrol olarak 5.2.2.1.1 başlığında amplifiye edilen üründen, kesilmiş ve kesilmemiş boş pQE-30 kullanıldı. Kesim ürünleri 5.2.1.5 başlığında anlatıldığı biçimde yürütüldü ve görüntüldü.

5.2.3.8 Rekombinant Vektörün DNA Dizi Analizi

5.2.3.6 başlığında anlatıldığı üzere elde edilen pQE-C178 vektörünün DNA dizi analizi için vektör, “Macrogen” firmasına gönderildi. Dizi analizi pQE-30 için tasarlanan ileri ve geri öncüller ile yaptırıldı. Bunun için firmaya ayrı ayrı tüplerde bulunan ileri ve geri DNA dizileme öncüllerinden 10µL (5pmol/µL) ve 10µL (0.8µg/µL) rekombinant vektör gönderildi.

5.2.3.9 pQE-C178 Vektörünün M15 Suşuna Transformasyonu

Protein üretimi için kullanılan *E.coli* suşu M15'tir. Bu suş proteazlar yönünden kusurludur ve bu nedenle protein üretimi için uygun bir suştur. M15'in içerisinde Prep4 (Qiagen) adında bir plazmit bulunmaktadır. Bu plazmit kanamisin ile seçilmektedir. İşlevi, yeterli miktarda *lac* promotörünü baskılayacak *lac* süpresörü üretmektir. Transformasyon 5.2.2.1.5 başlığında anlatıldığı gibi yapılmıştır. Tüm besiyerilerine ampisillin'e (100µg/mL) ek olarak kanamisin (25µg/mL) bulunmaktadır ve 5.2.3.6 başlığında anlatıldığı üzere elde edilen pQE-C178 vektör M15'e transforme edilmiştir. Elde edilen kolonilerden 5.2.2.1.3 başlığında anlatıldığı şekilde gliserol stokları hazırlandı.

5.2.4 Rekombinant Protein Üretimi

5.2.4.1 Küçük Çapta Protein Üretimi

Rekombinant protein üretimi için öncelikle rekombinant vektörü içeren bakterinin proteini ifade edip etmediği kontrol edildi ve ardından büyük çapta protein üretildi. Küçük çapta protein üretiminde, üretimin zamana bağlı değişimi izlendi. Bunun üretim için uyarım yapıldıktan sonra her saatte kültürden belirli bir miktar örnek alındı ve incelemek üzere saklandı. Deneyde negatif kontrol olarak boş pQE-30 içeren M15 ve pozitif kontrol olarak Eroğlu ve arkadaşların protein ekspresyonu için klonlamış oldukları vektör kullanıldı (105).

1. pQE-C178, (-) ve (+) kontroller gliserol stoklarından ampisillin (100µg/mL) ve kanamisin (25µg/mL) içeren LB agar plaklarına ekildi ve bir gece 37°C'da inkübe edildi.
2. Bir gün öncesinden üremiş suşlardan birer koloni alındı ve 100mL Erlenmayer içerisinde 10 mL ampisillin (100µg/mL) ve kanamisin (25µg/mL) içeren LB sıvı besiyerine ekildi. Kültürler 200rpm çalkalanarak 37°C'da bir gece inkübe edildi.
3. Bir gün öncesinden üremiş kültürlerden hacmen 1/20 oranında 500mL balon içerisinde önceden 37°C'da ısıtılan, ampisillin (100µg/mL) ve kanamisin (25µg/mL) içeren 100mL LB sıvı besiyerine ekildi ve 200 rpm çalkalanarak 37°C'da inkübe edildi.
4. Bir saat inkübasyon sonunda 600nm'de optik dansite ölçümü (Thermo MultiSkan) yapıldı Ölçüm OD₆₀₀=0.7 oluncaya kadar tekrar edildi ve ardından kültürler son konsantrasyon 1mM olacak şekilde stok IPTG (100mM'dan) eklendi. IPTG eklenmeden önce, boş ağırlığı tartılmış 50mL konik tabanlı tüpe 20mL uyarılmamış örnek alındı. Örnek 4°C'de 4000g'de 5 dakika santrifüj (Heraeus Labofuge 400R) edilerek pellet haline getirildi ve süpernatant atıldı. Yaş pellet tartıldı ve ardından -80°C'de dondurularak saklandı.
5. Bir, iki, üç, dördüncü ve beşinci saatlerde örnek, boş ağırlığı tartılmış 50mL konik tabanlı tüplerin içerisine alındı. Örnek 4°C'da 4000g'de 5 dakika santrifüj edilerek pellet haline getirildi ve süpernatant atıldı. Yaş pellet tartıldı ve -80°C'da dondurularak saklandı.

5.2.4.2 Protein Eldesi

Protein üretimini saptayabilmek için "Western Blot" yapıldı. Bu amaçla, 8M üre kullanılarak bakteriler parçalandı ve proteinler çözünür hale getirildi. Ardından miktarları saptandı. Protein denatüre koşullar altında incelendi.

1. 5.4.1 başlığında anlatıldığı üzere elde edilen bakteri pelletleri 15 dakika bu üzerinde çözüldü.

2. Bir gram yaş pellete 5mL tampon B eklendi. Pellet nazikçe vortekslenerek üre içerisinde süspansiyon edildi ve bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
3. Süspansiyon oda ısısında 200rpm çalkalanarak 60 dakika inkübe edildi.
4. Süspansiyon oda ısısında 10000g'de 30 dakika santrifüj (Heraeus Labofuge 400R) edildi.
5. Süpernatant yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alınarak -80°C'da dondurularak saklandı.

5.2.4.3 Bradford Yöntemi ile Protein Miktar Ölçümü

“Western Blot” yapabilmek için kuyulara yüklenecek protein miktarı standardize edildi. Bunun için Bradford yöntemi ile protein miktar ölçümü yapıldı (104). Yöntemin ilkesi fosforik asit varlığında kırmızı rengi alan “Coomassie Brilliant Blue G250”nin protein ile karşılaştığında, proteini bağlayarak mavi renge dönüşmesine dayanmaktadır. Bu yöntemde bilinen standart protein örnekleri ile bilinmeyen protein örnekleri saptandı. Bunun için 2mg/mL SSA stoktan 0, 10µg, 25µg, 50µg, 75µg, 100µg SSA protein standartları kullanıldı.

1. 5.4.2 başlığında anlatıldığı üzere elde edilen protein örnekleri buz üzerinde çözüldü ve bir mikrosantrifüj tüpünde 10µL'si 90µL 150mM NaCl ile 100µL'ye tamamlandı. Mikrosantrifüj tüpleri içerisinde 100µL 0, 10µg, 25µg, 50µg, 75µg, 100µg SSA protein standartları hazırlandı.
2. Bradford ölçüm boyasından her tüpe 1mL eklendi. Tüpler vortekslenerek 5 dakika oda ısısında inkübe edildi.
3. Tüplerden 200µL örnek bir mikroplağa dağıtıldı ve ölçüm 595nm'de spektrofotometre (Thermo MultiSkan) ile ölçüm yapıldı.
4. Konsantrasyonu bilinen protein örnekleri ile bir standart eğri çizildi ve bu eğri ile bilinmeyen örneklerdeki protein konsantrasyonu saptandı.

5.2.4.4 “Western Blotting”

Elde edilen protein eldelerinde C178'in varlığını saptamak için “Western Blot” yöntemi kullanıldı. Bunun için öncelikle 20µL'de 100µg protein içeren protein örnekleri

hazırlandı ve ardından örnekler denatüre edici protein elektroforezi ile ayrıldı. Elektroforez sonrasında ayrımlanan proteinler, PVDF membrana aktarıldı ve membran antikorlar ile işleme için kemilümenesan yöntemi ile saptandı.

5.2.4.4.1 Denatüre Edici Protein Elektroforezi

Üretilecek Özyapı proteini 21kDA ağırlığında olduğundan %15'lik ayrılma jeli ve %5'lik paketleme jeli kullanıldı. Jellerin kalınlığı 0.75mm'dir. Hazırlanan jellerin içerikleri şöyledir:

	<u>%15'lik jel</u>	<u>%5'lik jel</u>
ddH ₂ O	1.1mL	2.1
Akrilamid-bis-akrilamid karışımı, %30	2.5mL	0.5mL
1.5M Tris-Cl pH8.8	1.3mL	*0.38mL
SDS, %10	0.05mL	0.03mL
Amonyum Persülfat, %10	0.05mL	0.03mL
TEMED	0.002mL	0.003mL

*%5'lik paketleme jeli için 1M Tris-Cl pH 6.8 kullanılmıştır.

1. Jel dökme aygıtı kullanılarak %15'lik poliakrilamid jel döküldü. Üzerine hava ile teması kesecek şekilde isopropanol eklendi. Jel 45 dakika donmaya bırakıldı.
2. İsoopropanol döküldü ve kurutma kağıdı ile fazla sıvı alındı. Üzerine %5'lik paketleme jeli döküldü ve tarak uygun şekilde yerleştirildi. Jel 45 dakika donmaya bırakıldı.
3. 5.4.2 başlığında elde edilen protein örnekleri buz üzerinde çözüldü. Mikrosantrifüj tüplerine örneklerden 5xSDS-PAGE yükleme tamponu ile birlikte 20µL'sinde 100µg protein olacak şekilde hazırlandı ve 100°C 5 dakika kaynatıldı.
4. Jel dikey elektroforez tankına (Thermo EC120) yerleştirildi ve tanka 1xSDS-PAGE yürütme tamponu eklendi. Protein "markerdan" 5µL'si (Fermentas #SM0441) birinci kuyuya, hazırlanan örneklerden 20µL'si jelin kalan kuyularına kondu.

5. Elektroforez güç kaynağı (Thermo EC135-90) 10mA'e ayarlandı ve örnekler bromfenol ayırılama jeline ulaşana kadar bu akımda yürütüldü. Ardından güç kaynağı 20mA'e ayarlandı ve yürütme, bromfenol jelin sonuna ulaşana kadar devam edildi.

5.2.4.4.2 Denatüre Edici Protein Elektroforezi ile Ayrımlanan Proteinlerin PVDF (Poliviniliden florür) Membranına Transfer Edilmesi ve Bloklanması

“Western Blot” yönteminde proteinler antikorlar ile bir membran üzerinde karşılaşılır ve aranılan proteinin saptanması bu membran üzerinde gerçekleşir. Bunun için jelde ayrımlanan proteinler elektroforez ile jelden membrana transfer edilirler. Transfer için “yarı-kuru” yöntemi kullanıldı. Transfer sonrasında membranın proteinsiz kalan kısımları, kullanılan antikorların bağlanmadığı başka bir protein ile blokladı.

1. PVDF membran 30 saniye kadar saf metanol içerisinde bekletilir ve porların açılması sağlandı. Ardından 5 dakika kadar yarı-kuru transfer tamponunda bekletildi ve tampon ile doyması sağlandı. Membran büyüklüğünde 4 tabaka 3mm 3MM blotlama kağıdı kesildi ve bu filtre kağıtları yarı-kuru transfer tamponu ile doyuruldu.
2. Yarı-kuru transfer elektroforez ünitesinin (Sigma B2529) taban elektroduna iki tabaka ıslak 3MM blotlama kağıdı, üzerine doymuş PVDF membran, membranın üzerinde 5.4.4.1 başlığında anlatıldığı üzere yürütülmüş jel ve bu jelin üzerine yine iki adet ıslak 3MM blotlama kağıdı kondu ve üzerinde temiz bir cam tüpü döndürerek hava kabarcıkları alındı. Elektroforez ünitesinin diğer elektrodu ile ünite sıkıca kapatıldı.
3. Elektroforez güç kaynağı (Thermo EC135-90) 10V'a ayarlandı ve transfer sabit voltaj altında 45 dakika süre ile yapıldı.
4. Transfer sonrasında elektroforez ünitesi açıldı ve membran TTTS-T içerisinde çözülmüş %3 SSA (w/v) ile oda ısısında 1 saat süreyle döndürülerek blokladı.

5.2.4.4.3 Bloklanan Membrana Birincil ve İkincil Antikor Uygulanması

Bloklanan membranlara önce birincil, ardından bunu tanıyan ikincil antikorlar uygunlandı. Her iki antikor TTTS-T içerisinde çözünmüş %3 SSA'da (w/v) sulandırıldı. Birincil antikor fare kökenli anti-RGSHis (Qiagen) ve ikincil antikor olarak yaban turpu peroksidaz (horse-radish peroxidase) işaretli anti-fare IgG (Chemicon) antikorunu kullanıldı. Sulandırma oranları sırasıyla 1:2000 ve 1:10000'dir

1. Membranın bulunduğu bloklama solüsyonu döküldü ve birincil antikorun (RGS-His Antibody) 1:2000 sulandırma oranında bulunduğu %3 SSA'lı (w/v) TTTS-T tamponu membranın bulunduğu konik tabanlı tüpe kondu. Membran oda ısısında bir saat döndürüldü.
2. Birincil antikorun bulunduğu tampon döküldü ve membranın bulunduğu tüp iki defa 5 dakika döndürülerek TTTS-T ile yıkandı.
3. Membranın yıkandığı TTTS-T tamponu döküldü ve ikincil antikorun (Anti-Mouse (IgG) HRP) 1:10000 sulandırma oranında bulunduğu %3 SSA'lı (w/v) TTTS-T tamponu membranın bulunduğu konik tabanlı tüpe kondu. Membran oda ısısında bir saat döndürüldü.
4. İkincil antikorun bulunduğu tampon döküldü ve membranın bulunduğu tüp altı defa 10 dakika döndürülerek TTTS-T ile yıkandı.

5.2.4.4.4 Proteinlerin Saptanması

İkincil antikor yıkamaları tamamlandıktan sonra yaban turpu peroksidaz ile tepkiyen ECL substrat (Chemicon 2600) kullanıldı. ECL tarafından verilen sinyaller ışığa duyarlı bir film ile saptandı ve filmin banyosu ile protein bantları görüntüledi.

1. İkincil antikorun çözündüğü tampon döküldü ve membran nazikçe dH₂O ile yıkandı. Membran düzgün bir şekilde temiz bir camın üzerine yerleştirildi.
2. ECL reageni üretici firma talimatları doğrultusunda hazırlandı ve membranın üzerini kaplayacak şekilde döküldü. Reaksiyonu gerçekleşmesi için 2-3 dakika beklendi

3. Membran bir röntgen film kasetinin içerisine alındı ve karanlık odada bu kasete röntgen filmi (Kodak 5256441) eklendi. Uygun görülen bir pozlandırma süresi ile pozlandırıldı (1 saniye-30 dakika).
4. Film karanlık odada kasetten çıkartılarak banyosu yapıldı ve sonuç değerlendirildi. Yeterli pozlandırma gerçekleşmediği durumda üçüncü basamak tekrar edildi.

5.2.4.5 Büyük Çapta Protein Üretimi

Protein ifadesi doğrulandıktan sonra büyük çapta protein üretimine geçildi. Büyük çapta protein 5.2.4.1 başlığında anlatıldığı gibi yapılmıştır. Fark olarak inokulum kültürü 100mL olarak hazırlandı ve üretim 2 kere 2 litre hacim balonun içerisinde yarım litre ampicillin (100µg/mL) ve kanamisin (25µg/mL) içeren Sıvı LB ile yapıldı. Ayrıca saat başı örnek alınmadı, üçüncü saatte tüm örnekler toplandı.

5.2.5 Üretilen Proteinin Saflaştırılması

Protein eldesi içerisinden üretilen 6xHistidin’li C178 saflaştırıldı. Bunun için “The Qiaexpressionist™” (Qiagen) kullanma kılavuzunda denatüre edici koşullar altında protein saflaştırması için önerilen yöntem izlenerek yapıldı.

1. Dört mililitre Protein eldesi için %50’lik Ni-NTA’dan 1mL eklendi ve oda ısısında 200rpm çalkalanarak 60 dakika inkübe edildi.
2. Lizat-reçine karışımı tıpalarla kapatılmış kolona yüklendi.
3. Kolon taban tıpası açık vaziyette 600rpm’de santrifüj (Heraeus Labofuge 400R) edildi ve akan solüsyon toplandı.
4. Kolon 2 defa 4mL tampon C ile yıkandı. Her yıkamada kolon taban tıpası açık vaziyette 600rpm’de santrifüj edildi ve akan solüsyon toplandı.
5. Rekombinant protein 4 kere 0.5mL tampon D ile, ardından 4 kere 0.5mL tampon E ile elüe edildi. Her elüsyonda kolon taban tıpası açık vaziyette 600rpm’de santrifüj edildi ve akan elutlar toplanıp -80°C’da dondurularak saklandı.

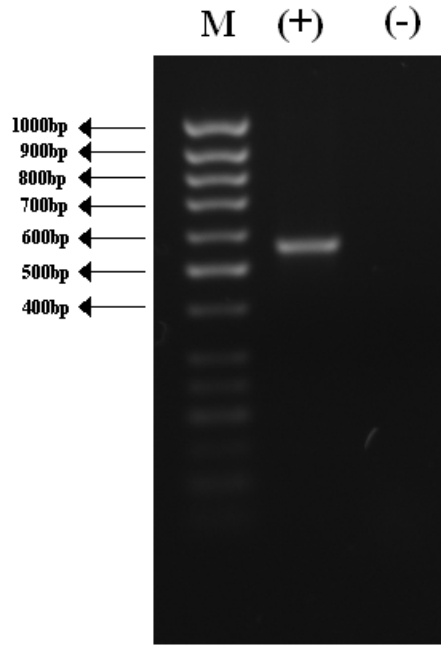
5.2.5.1 Saflaştıran Rekombinant Proteinin Saptanması

Protein saflaştırıldıktan sonra elde edilen protein miktarı saptandı ve “Western Blot” ile görüntüledi. Bunun için 5.2.4.3 başlığından 5.2.4.4.4 başlığına olan tüm basamaklar uygulandı. Fark olarak 5.2.5 başlığının 3’cü basamağından elde edilen çözeltilerden kuyu başına 50µg, diğer basamaklarda elde edilenlerden 10µg yüklendi.

6. BULGULAR

6.1 PZT Ürünün Görüntüsü

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nda tanısal amaçla araştırılan ve HCV pozitif olduğu saptanan bir hastadan izole edilen viral RNA kullanılarak RNA eldesinden önce cDNA sentezlendi ve ardından "nested" PZT yapıldı. Bu PZT ürünü %1'lik agaroz jelde görüntüldü. Resim 2 PZT sonucunu göstermektedir.



Şekil 13: HCV RT-PZT görüntüsü

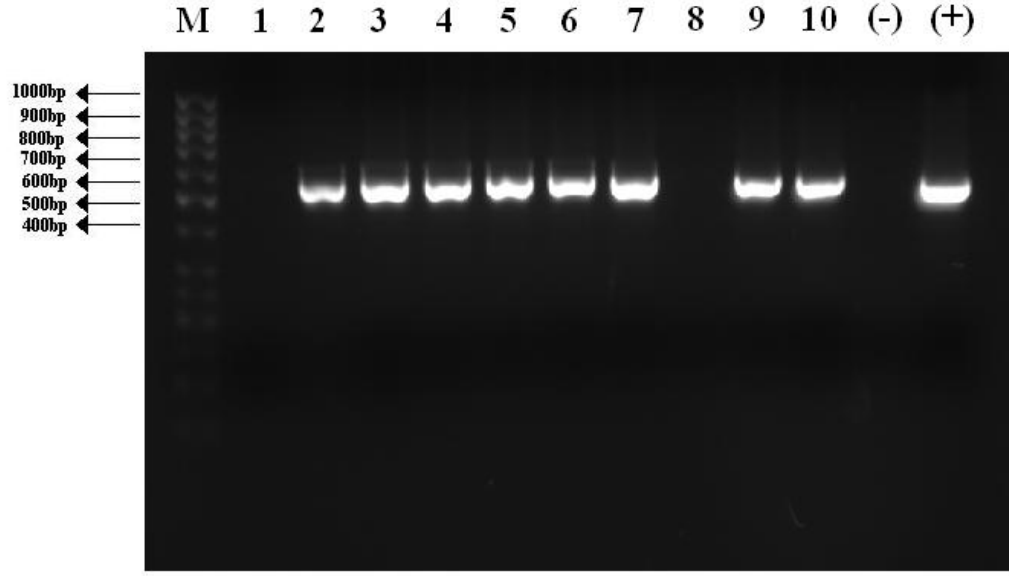
M: "Marker" (Fermentas #SM0371)

(+): Hasta örneği (553bp)

(-): Negatif kontrol

6.2 TA Klonlaması ile Rekombinant Vektör içeren Kolonilerin Saptanması

İç öncüllerle yapılan amplifikasyon ürünü pGEM-T Easy vektörüne klonlandı ve bu klonlama sonrasında rekombinant vektörü içeren koloni PZT ile tarandı. Resim 3'te bu tarama işleminin sonucunu göstermektedir.



Şekil 14: TA Klonlanmasında PZT ile pozitif olan kolonilerin görüntüsü.

M: “Marker” (Fermentas #S0M371)

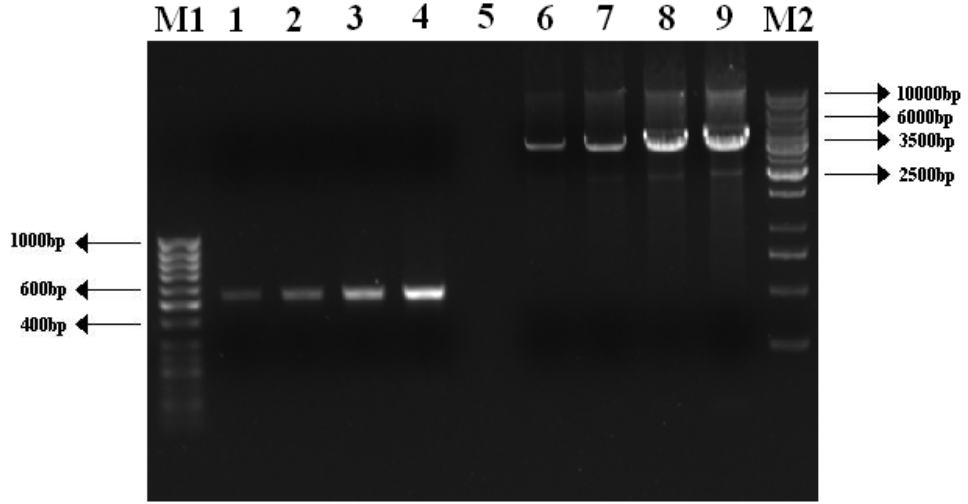
1-10: Kolonilerden yapılan PZT ürünleri (553bp)

(-): Negatif kontrol

(+): Pozitif kontrol (553bp)

6.3 Agaroz Jelden DNA Eldesi

TA klonlama sonrasında pGEM-T Easy-C178 Midiprep ile izole edildi ve pQE-30 ile birlikte restriksiyon enzim (*Bam*HI, *Hind*III) kesimine alındı. Kesim ürünleri agaroz jelde yürütülüp buradan izole edildiler. Resim 4’de agaroz jelden DNA eldesinin ürünleri göstermektedir.

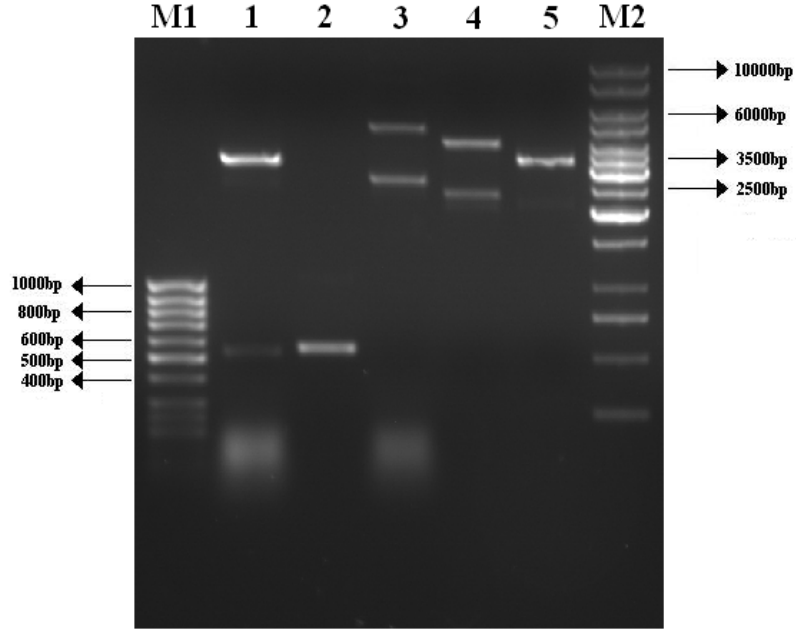


Şekil 15: Agaroz jelden DNA eldesinin ürün görüntüsü.

- M1: “Marker” (Fermentas #SM0371)
- 1-4: Değişik konsantrasyonlarda kesilmiş (*Bam*HI, *Hind*III) C178 (542bp)
- 5: Boş
- 6-9: Değişik konsantrasyonlarda kesilmiş (*Bam*HI, *Hind*III) pQE-30 (~3.4kb)
- M2: “Marker” (Fermentas #SM0311)

6.4 pQE30 ve Özyapı Proteini178'in Yönlendirilmiş Klonlaması

pQE-30 ve C178 yönlendirilmiş klonlama yöntemi ile klonlandı. Resim 4'te bu klonlanmanın restriksiyon enzim analizi ile doğrulaması görülmektedir.



Şekil 16: Yönlendirilmiş klonlamanın doğrulama görüntüsü.

M1: "Marker" (Fermentas #SM0371)

1: Kesilmiş (*Bam*HI, *Hind*III) pQE-C178; pQE30 ve C178. (~3.4kb, 542bp)

2: C178 PZT ürünü (542bp)

3: pQE-C178 (~4kb)

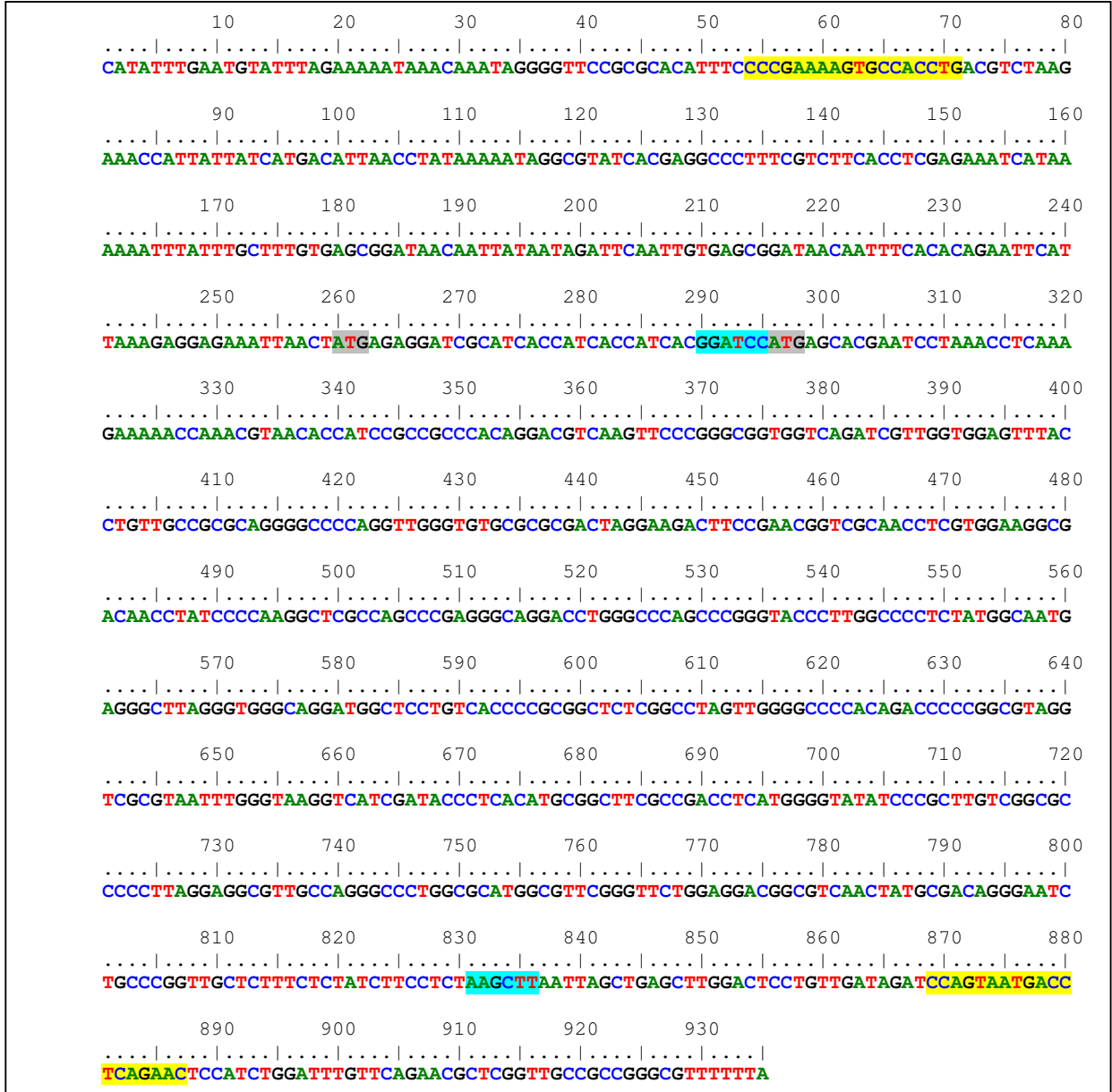
4: pGEM-C178 (~3.6kb)

5: Kesilmiş (*Bam*HI, *Hind*III) pQE-30 (~3.4kb)

M2: "Marker" (Fermentas #SM0311)

6.5 pQE-C178 DNA Dizilimi

Protein üretimine geçmeden önce klonlanan proteinin vektörün çerçevesine oturduğu doğrulanması gerekmektedir. Bu nedenle vektörün DNA dizi analizi yapıldı. Şekil 13'te DNA dizi analizinin sonucu görülmektedir. Şekil 14'te protein kodlayan dizi görülmektedir.



Şekil 17: DNA dizileme sonucu. Sarı renkte olan nükleotidler sırasıyla ileri ve geri dizilime öncülü, gri renkte olan nükleotitler Metyonin, turkuaz renkte olan nükleotidler sırasıyla *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon kesim dizileridir.

```
      10      20      30      40      50      60      70      80
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MRGSHHHHHHGSMSSTNPKPQRKTKRNTIRRPQDVKFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRLGVRATRKTSEERSQPRGRROPKPA

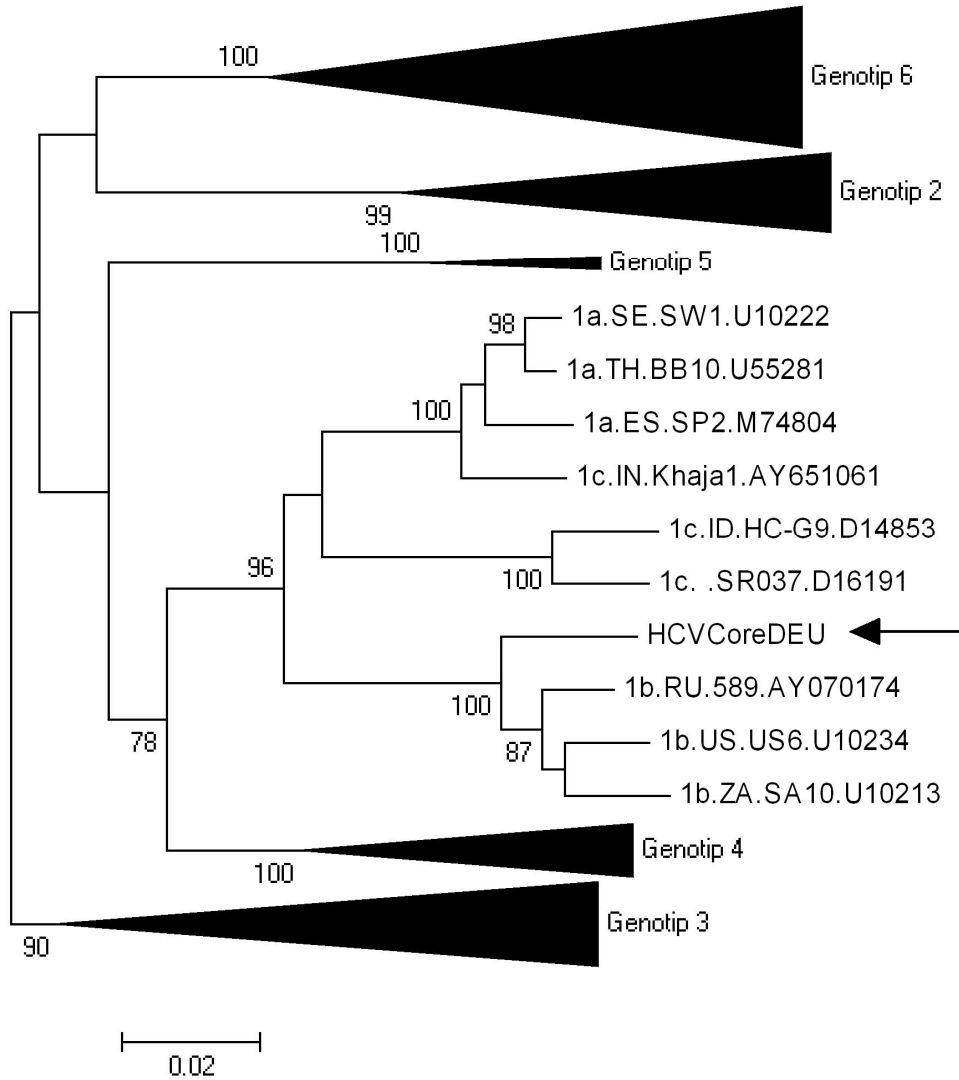
      90     100     110     120     130     140     150     160
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
RQPEGR.TWAQPGYPWPLYGNEGLGWAGWLLSPRGSRPSWGPDPRRRSRNLGKVIDTLTCGFADLMGYIPLVGAPLGGVA

      170     180     190
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
RALAHGVRVLEDGVNYATGNLPGCSFSIFL*
```

Şekil 18: Kodlanan proteinin aminoasit dizisi

6.7 Filogenetik Çözümleme Bulguları

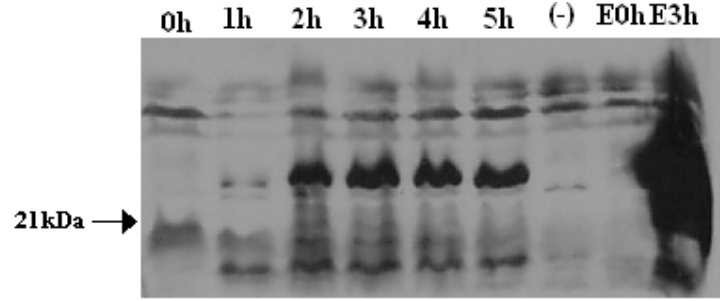
Çalışma kapsamında klonlanan DNA dizisi, HCV veri tabanından (<http://hcv.lanl.gov>) indirilen HCV genotip referans dizilerinin (102) özyapı proteinlerinin ilk 178 aminoasidini kodlayan DNA dizi ile birlikte filogenetik çözülmesi yapıldı. Yazılım olarak Mega sürüm 4 kullanıldı (105). Dizi, “Neighbor-Joining” yöntemi ile çözülmesi yapıldı. Model olarak “Jukes-Cantor” kullanıldı. Yazılımın çizdiği filogenetik ağaç ile klonlanan C178’in genotip 1b olduğu saptandı (Şekil 15).



Şekil 19: Filogenetik ağaç

6.8 Küçük Çapta Protein Üretimin “Western Blot” ile Doğrulanması

Proteinin vektörün çevresine oturduğu DNA dizi analizi ile doğrulandıktan sonra küçük çapta protein üretildi ve vektörün protein eksprese edebildiği gösterildi. Resim 5 “Western Blot” sonucunu göstermektedir. E0h ve E3h Eroğlu ve arkadaşlarının klonladıkları vektör ile yapılan protein üretimini göstermektedir. C178 için beklenen büyüklük 21kDa’dur.



Şekil 20: Küçük çapta protein üretimini gösteren “Western Blot” sonucu.

0h: Uyarılmamış örnek

1-5h: Uyarılmış örnek

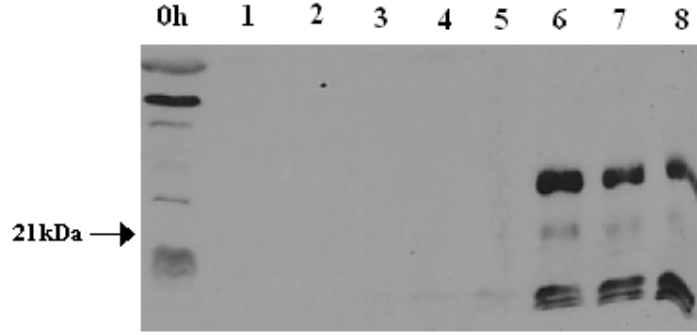
(-): pQE-30

E0h: Uyarılmamış örnek

E3h: Uyarılmış örnek

6.9 Protein Saflaştırma Bulgusu

Protein saflaştırıldıktan sonra saflaştırılan proteinin varlığı “Western Blot” ile gösterildi. Resim 6 saflaştırılan proteini gösteren görüntüdür. C178 için beklenen büyüklük 21kDa’dur.



Şekil 21: Saflaştırılan protein ile yapılan “Western Blot” sonucu.

0h: Uyarılmamış örnek.

1-4: 8M Üre pH 5.9 ile yapılan elüsyon (ardışık eluatlar).

5-8: 8M Üre pH 4.5 ile yapılan elüsyon (ardışık eluatlar).

7. TARTIŞMA VE SONUC

HCV'nin özyapı proteini, bakteriyel ekspresyon sistemleri ile birçok çalışmada üretilmiştir. Tan ve arkadaşları özyapı proteinin, NS3 birlikte eksprese edip hasta serumları ile “Western Blot” hazırlamıştır (106). Benzer bir şekilde Osborne ve arkadaşları özyapı proteini ve NS3'ü bakteride eksprese etmişlerdir (107). Her iki çalışmada özyapı proteinin ilk 105 aminoasidini kodlayan dizi klonlanıp bakteride eksprese edilmiştir. Yeh ve arkadaşları özyapı proteinin 2-127'ci aminoasitleri arasındaki diziyi eksprese ederek akut dönem anti-HCc antikorları “Western Blot” ile saptamak için kullanmıştır (108). Aoyagi ve arkadaşları ise özyapı proteinin ilk 160 aminoasidini üretip, bununla EIA hazırlamışlardır (109). Eroğlu ve arkadaşları ise 6xHistidin'e füzyon proteini konumda C178'i ekprese etmişlerdir ve bununla EIA hazırlamışlardır (103). Seong ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmalarında özyapı proteinin 191 aminoasidini üretmeye çalışmışlarsa da bunu başaramamışlardır. Nedeni ise özyapı proteinin üçüncü bölgesi oldukça hidrofobik olması ve bakteride eksprese edilememesi olarak düşünülmüştür. Aynı çalışmada ise 123 aminoasidini ise üretmeleri mümkün olmuştur (110). De-ming ve arkadaşları çalışmalarında maltoz bağlayıcı protein, Seong ve arkadaşları ise glutatyon-s-transferaz'a füzyon konumda özyapı proteinini eksprese etmişlerdir. Kunkel ve arkadaşları özyapı proteinin ilk 124 ve 174 aminoasidini eksprese edip, rekombinant protein ile oligomerizasyon çalışması yapmışlardır (20). Bu çalışmada, ekspresyon, Eroğlu ve arkadaşlarının kullandıkları yöntem izlenerek yapılmıştır.

Çalışma kapsamında ilk tasarlanan PZT'de iki sorun bulunuyordu. Tek basamaklı olarak planlanan bu tepkimede bir duyarlılık sorunu saptandı. Bu nedenle yeni öncüller iki basamakta yapılmak üzere “nested” PZT olarak tasarlandı.

İkinci sorun ise geri öncülün 3' ucunda *SphI* (*PaeI*) restriksiyon enzim kesim bölgesi bulunuyordu. Bu kesim dizisi kullanılan pQE-30 vektörünün çoklu klonlama bölgesinde *BamHI* kesim dizisinin hemen arkasından gelmektedir. Sözü edilen kesim bölgelerin birbirine yakın olması nedeniyle klonlama gerçekleştirilemiyordu, çünkü restriksiyon endonükleazlarının DNA'yı verimli bir şekilde kesebilmeleri için kesim dizisinde hem 5' hemde 3' ucunda fazladan birkaç nükleotitin bulunması gerekmektedir (111). Bu nedenle yeni tasarlanan “nested” PZT de iç öncüllerde geri öncül de *HindIII* kesim bölgesi eklenmiş ve böylece Bu şekilde kesim dizilerin vektörlerdeki konumlarına göre 12bp'den fazla aralık verilmiştir (112).

Özyapı proteini 191 aminoasit uzunluğunda olmasında karşın çalışmadaki öncüller özyapı proteinin ilk 178 aminoasidini kodlayan diziyi çoğaltacak şekilde tasarlanmıştır. Bunun nedeni 174'üncü aminoasitten itibaren kodlanan 3'cü bölgenin oldukça hidrofobik olması ve bu bölge nedeniyle bakterilerde özyapı proteinin sentezlenememesidir (103,110).

Yeni öncüllere doğrudan PZT ürününü kullanılarak klonlama gerçekleştirilememiştir. Kullanılan restriksiyon endonükleazları aynı tampon (*Bam*HI tamponu) içerisinde verimli bir şekilde çalışmamaktadır. Bu nedenle her bir enzimin uygun tampon ile kesimi ayrı iki basamakta yapılmıştır. Birinci enzim ile kesim yapıldıktan sonra tamponu uzaklaştırmak için etanol presipitasyonu yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntem ile DNA kaybı yüksek olduğundan kalan ürün ile yönlendirilmiş klonlama yapılamamıştır. Bu nedenle TA vektörü ile ara klonlama basamağı uygulanmıştır. Klonlamadan elde edilen rekombinant vektör, tek basamakta restriksiyon kesimine alınmış ve kesim ürünü agaroz jelden izole edilmiştir. Agaroz jelden elde edilen kesim ürünü ile ekspresyon vektörüne yapılan klonlama başarılı sonuç vermiştir.

pQE30 vektörüne ait dizileme öncüllerinin kullanıldığı DNA dizi analizi ile klonlanan pQE-C178 vektöründe çerçevenin uygun şekilde oturtulduğu doğrulanmış ve daha sonra protein üretimine geçilmiştir.

Protein üretiminde kullanılan ilk *E. coli* suşu JM109 olmuştur. Bu suş ile yapılan pozitif kontrol (pQE-40) ekspresyonun uyarılmamış örneğinde az miktarda 26kDa DHFR proteini gözlenmiştir. Her ne kadar JM109 suşunda kromozomal olarak bir *lac* süpresörü bulunsa da, bunun bazal ekspresyonu baskılayamadığı gözlenmiştir. Bu nedenle ekspresyon deneylerinin *E. coli* M15 suşunda sürdürülmesine karar verilmiştir. Bu suşun içerisinde Prep4 (Qiagen) plazmiti bulunmaktadır. Deney, bu plazmit ile tekrarlandığında, plazmit üzerinde kodlanan *lac* süpresörün bazal ekspresyonu baskılayabildiği gözlenmiştir.

Bakterilerde üretilen rekombinant proteinler genellikle yoğun olarak ifade edilmektedir. Bu nedenle çoğu zaman üretilen protein SDS-PAGE jelinin "Coomassie Brilliant Blue" ile boyamasından sonra gözle görülebilmektedir, fakat bu çalışma kapsamında böyle bir görüntü elde edilememiştir. Bunun nedeni klonlanan dizide protein üretimini etkileyecek elemanların bulunması veya protein üretimi için seçilen koloninin protein üretmemesi olarak düşünülmüştür. Ayrıca bakterilerin ökaryotik bir proteini üretmede

zorlanabileceği ve özyapı proteinin ikinci bölgesinde bulunan α -heliks yapısının protein üretimi etkiyebileceği düşünülerek, aynı hastadan özyapı proteinin ilk 123 aminoasidini eksprese eden bir vektör daha klonlanmıştır. Bu vektör ile yapılan protein üretimi “Coomassie Brilliant Blue” boyaması ile incelendiğinde ilk vektör ile aynı sonuç elde edilmiştir.

Protein üreten bir koloni saptamak için transformasyon sonrasında koloni “blotting” yöntemi kullanılmış ve sonuç olarak üreyen hiçbir kolonin protein üretmediği görülmüştür. Bunun sebebi kolonilerin hiç ya da düşük miktarda protein üretmesi olarak düşünülmüştür. Vektörün DNA dizileme sonucunda herhangi bir sorun bulunmamaktaydı. Vektörün promotörü, ribozoma bağlanma bölgesi sorunsuz olarak görünüyordu. Klonlanan dizi vektörün çerçevesine oturmuştu ve durma kodonların doğru yerde oluştu. Bunlar, vektörde bir sorun bulunmadığının göstergesi olarak kabul edilmişti. Bakterilerin klonlanan vektör ile protein üretebilmesi gerekiyordu. Sonuçta sorunun, üretilen proteinin saptanmasında kullanılan yöntemler veya yöntemlerde kullanılan boyanın/substratın duyarlılığı düşük olması nedeniyle proteininin saptanamaması olarak düşünülmüştü.

Koloni “blotting” yönteminde konjugat HRP işaretliydi ve substrat olarak duyarlılığı düşük olan 4-kloro-1-naftol kullanıldı (113). Ayrıca SDS-PAGE jelinin boyanmasında, protein saptama 300ng duyarlılığı düzeyinde olan “Coomassie Brilliant Blue R250” boyası kullanıldı (114). Bu nedenle ilerleyen aşamalarda protein saptama duyarlılığı yüksek olan “Western Blot” kullanılmaya karar verildi.

“Western Blot” yapılabilmesi için kuyu başına yüklenen proteinin standardize edilmesi gerekmektedir. Protein standardizasyonu için çalışma kapsamında “Bradford” protein ölçüm yöntemi kullanılmıştır. Protein örnekleri 8M üre içerisinde çözünmüştür ve buna uygun olarak da kullanılan standart protein de 8M üre içerisinde çözünmüştür. Yöntem 4M konsantrasyon üzerinde bulunan üreden etkilenmektedir (104). Bu nedenle ölçümde çizilen standart eğrinin hata oranı yüksekti, ama aynı örneklerin farklı ölçümlerde, ölçülen ilk değerlerine göre fazla bir sapma göstermemiş olduklarından (sapma $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 'den azdır), ölçüm yöntemi bu çalışma için tekrarlanabilir bulunmuştur.

“Western Blot” yaparken proteinlerin eşit konsantrasyonlarda yüklemenin yanı sıra eşit hacimlerde yürütülmesine dikkat edilmiştir. Bu şekilde örneklerin aynı hızda ilerlemesi sağlanmıştır. Birincil antikorun sulandırma oranı üretici firmanın önerisi doğrultusunda

1:2000 oranda sabit tutularak ikincil antikor konsantrasyonları değiştirilerek en uygun sulandırma oranı saptanmaya çalışılmıştır. İkincil antikor için 1:300'den 1:10000'e kadar sulandırma oranları denendi ve en uygun sulandırma oranı 1:10000 olarak saptanmıştır. Bloklama için %5 süt tozu ve %3 SSA denenmiştir. Süt tozu kullanıldığında özgül olmayan antikor bağlanmaları tüm membran üzerinde görülmüştür. Bu durum SSA kullanıldığında görülmemiştir ve çalışmada bloklama için SSA kullanılmıştır.

Çalışmada bir eksiklik olarak üretilen proteinin, anti-özyapı antikorları ile varlığı araştırılamamıştır. Nedeni ise gereçlerin arasında anti-insan (IgG) antikorunun bulunmamasıdır. Klonlanan vektörün DNA dizi analizi sonucunda klonlanan dizinin vektörün çerçevesinde oturduğu görülmüştür. Elde edilen doğru çerçevedeki DNA dizisi ve bu dizinin aminoasit çevrilmiş hali HCV'nin diğer suşlarında ki özyapı dizileri ile hizalandığında uyumludur. Bu nedenle vektörden üretilen proteinin HCV'ye ait özyapı proteininin ilk 178 aminoasidi olduğu kabul edilmiştir.

“Western Blot” sonucunda birden çok bant görülmüştür. Bunları boyutları sırasıyla 28kDa, 21kDa, 16.5kDa, 15kDa ve 14kDa'dur (yaklaşık olarak). Beklenen bant büyüklüğü 21kDa'dur. Tüm bu bant büyüklükleri daha yoğun miktarda çalışmada kontrol olarak kullanılan Eroğlu ve arkadaşlarının klonladıkları vektörle yapılan protein üretiminde de görülmüştür.

28kDa büyüklüğünde olan bandın nedeni protein ifadesinin dur kodonunda durmaması ve transkript uzunluğu kadar devam etmesi olarak düşünülmüştür. Klonlanan dizide oluşturulan dur kodonu UAA'dır. Ayrıca vektörün sahip olduğu kendine ait ikinci bir UAA dur kodonu vardır. Dur kodonun hemen sonra gelen nükleotit translasyonun dur kodonunda durma olasılığını etkilemektedir. Çalışmada klonlanan rekombinant vektörde dur kodonun hemen arkasından gelen nükleotid G'dir (UAAG). Vektörde bulunan dur kodon arkasından gelen nükleotit ise U'dir (UAAU). *E.coli*'nin dur kodonun en çok tercih ettiği şekli ise UAAU'dur. Dur kodonları, translasyonu %100 oranında durduramamaktadır. UAAU ve UAAG'in translasyonu durdurabilme oranı sırasıyla %80 ve %55 olarak bildirilmiştir (95).

16.5kDa, 15kDa ve 14kDa'luk bant büyüklükleri oluşmasında neden olarak klonlanan dizinin içerisinde bulunan ve *E.coli*'de zayıf tanınan kodonların fazlalığından kaynaklandığı düşünülmüştür. *E.coli*'de translasyon bu zayıf kodonlardan birisine denk gelirse translasyon

durabilir ya da +1 çerçeve kayması ile de devam edebilir. Translasyonun erken dönemde durması ise kısa kalan protein parçaları oluşmaktadır (89,91). Klonlanan dizide translasyonu etkileme olasılığı bulunan ve *E. coli* tarafından zayıf olarak tanınan 10 adet arjinin ve 10 adet prolin kodonu bulunmaktadır. Zayıf kodon için üç çözüm vardır. Ya yönlendirilmiş mutagenез ile aminoasitte değişiklik yapmadan nükleotit değişikliği yapılır ya da zayıf kodon içermeyen bir dizi klonlanabilir, fakat yönlendirilmiş mutagenез yapmak veya zayıf kodon içermeyen transkript oluşturmak kolay değildir. Üçüncü çözüm ise bu zayıf kodonların tRNA'larını sentezleyen vektörlerin bakteriye transforme edilmesidir (89). Bu şekilde bakteri eksik kaldığı kodonlar yönünden takviye edilmiş olur. Bu çalışma kapsamında herhangi bir kodon ikilemine çözüm olarak herhangi birşey denenmemiştir.

Eroğlu ve arkadaşların klonladıkları vektör ile yapılan kontrol protein üretimi ise çalışma kapsamında klonlanan vektör ile yapılan protein üretim miktarından daha çok olduğu görülmüştür. Bu üretim verimsizliğe neden olabilecek ve ribozoma bağlanan bölgeyi örtebilecek olası ikincil RNA yapıların varlığı araştırılmıştır (89,115). Çalışma kapsamında klonlanan vektörden oluşturduğu varsayılan transkript Mfold sürüm 3.2 yazılımı ile 37°C için ikincil yapıları araştırılmıştır (116). Yazılım 25 değişik olası ikincil mRNA yapısı öngörmüştür (veri gösterilmemektedir). Öngördüğü olası ikincil mRNA yapılarında ribozoma bağlanan bölge klonlanan dizinin 3' ucuna komplementer olduğu görülmüştür. Aynı öngörü Eroğlu ve arkadaşlarının klonladığı vektör için geçerli olup olmadığı sınınamamıştır, çünkü bu çalışma kapsamında vektörün DNA dizi analizi yapılmamıştır. mRNA'da ribozoma bağlanan bölgeye tamamlayıcı dizi bulunması durumunda translasyon verimliliği düştüğü bildirilmektedir (89,115). Ayrıca çalışmada aynı hastanın özyapı proteinin ilk 123 aminoasidini ifade eden bir vektör daha klonlanmıştı. Bu vektörün DNA dizi analizi olmamasına rağmen, ilk vektörde ki yazılım tarafından öngörülen ribozoma bağlanma bölgesini etkileyecek diziyi içermemektedir. Bu farklılığa rağmen protein üretimi "Coomassie Brilliant Blue" boyaması ile saptanamamıştır. Bu durumda, eğer translasyonu etkileyen elemanlar bulunuyorsa, bunların transkriptin 5' ucunda olduğunu düşündürmektedir.

Üretim verimini düşürebilecek bir başka etki mRNA stabilizasyonunun sağlanamamasından olabilir. Çalışmada vektörden sentezlenen mRNA'nın sağlamlığı hakkında bilgi verebilecek bir araştırma yapılmadı (89,116).

Eksprese edilen proteinin büyük miktarlarda üretimi yapılmıştır. Bu üretimde küçük çapta protein üretiminde belirlenen uygun koşullar kullanılmıştır. Üretilen protein denatüre edici koşul altında saflaştırılmıştır. Bu işlem üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapılmıştır. Rekombinant proteinin pH4.5'te elüe olduğu görülmüştür. Bu nedenle bu proteinin devamlı üretiminde elüsyon bu pH'ta yapılması uygun olacağı düşünülmektedir. Eluatlarda özgül olmayan bağlanma sonucu elüe olan proteinlerle birlikte protein miktarı yaklaşık olarak $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ olduğu saptanmıştır. Özgül olmayan bağlanma sonucu birlikte saflaştırılan proteinleri azaltmak amacıyla histidinle yarışan imidazol kullanılabilir. Bunun için proteini kromatografi maktriksine bağlayacak tampon içerisinde kullanılacak en uygun imidazol konsantrasyonunun belirlenmesi gerekmektedir.

Gelecekte aynı yöntemle başka rekombinant protein üretimi yapılması durumunda rekombinant dizinin arkasına güçlü dur kodonların eklenmesi, bakteriye zayıf tRNA'ların takviye edilmesi, eğer HCV gibi bir RNA virusunun proteini üretilmek isteniyorsa, değişik suşların aynı şekilde klonlanıp en uygun olanının protein üretiminde kullanılması önerilmektedir.

Çalışma kapsamında HCV özyapı proteini, düşük miktarda da olsa üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma kapsamında elde edilen bilgiler gelecekte başka rekombinant protein üretimi için temel oluşturacaktır. Saflaştırılan protein ise patogenezi çalışmaları yanı sıra bağışık yanıtların incelenmesinde ve tanısal testlerin geliştirilmesinde kullanılabilir. Ayrıca, elde edilen klonun PZT incelemelerinde pozitif kontrol olarak kullanılması da olasıdır.

8. KAYNAKLAR

1. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, ve ark. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 1989;244:359-362
2. Kato N. Molecular virology of hepatitis C virus. *Acta Med Okayama*. 2001;55:133-159
3. Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, ve ark. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology*. 2004;39:5-19
4. Pawlotsky JM. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends Microbiol*. 2004;12:96-102
5. Krekulová L, Reháč V, Riley LW. Structure and functions of hepatitis C virus proteins: 15 years after. *Folia Microbiol*. 2006;51(6):665-680
6. Grakoui A, Wychowski C, Lin C, Feinstone SM, ve ark. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol*. 1993;67:1385-1395
7. Roingear P, Hourieux C, Blanchard E, Brand D, ve ark. Hepatitis C virus ultrastructure and morphogenesis. *Biol Cell*. 2004;96:103-108
8. Weiner AJ, Geysen HM, Christopherson C, Hall JE, ve ark. Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:3468-3472
9. Tellinghuisen TL, Marcotrigiano J, Gorbalenya AE, Rice CM. The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. *Biol Chem*. 2004;279:48576-48587
10. Tanji Y, Kaneko T, Satoh S, Shimotohno K. Phosphorylation of hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS5A. *J Virol*. 1995;69:3980-3986
11. Reed KE, Xu J, Rice CM. Phosphorylation of the hepatitis C virus NS5A protein in vitro and in vivo: properties of the NS5A-associated kinase. *J Virol*. 1997;71:7187-7197
12. Evans MJ, Rice CM, Goff SP. Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:13038-13043

13. Gale MJ, Korth MJ, Tang NM, Tan SL, ve ark. Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology*. 1997;230:217-227
14. Koonin EV. The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *J Gen Virol*. 1991;72:2197-2206
15. Behrens SE, Tomei L, De Francesco R. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J*. 1996;15:12-22
16. Domingo E, Escarmís C, Sevilla N, Moya A, ve ark. Basic concepts in RNA virus evolution. *FASEB J*. 1996;10:859-864
17. Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol*. 2000;81:1631-1648
18. Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, Wakita T, ve ark. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol*. 2006;80:6964-6972
19. Gosert R, Egger D, Lohmann V, Bartenschlager R, ve ark. Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol*. 2003;77:5487-5492
20. Kunkel M, Lorinczi M, Rijnbrand R, Lemon SM, ve ark. Self-assembly of nucleocapsid-like particles from recombinant hepatitis C virus core protein. *J Virol*. 2001;75:2119-2129
21. Davis GL. Hepatitis C virus genotypes and quasispecies. *Am J Med*. 1999;107:21S-26S
22. Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, ve ark. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol*. 1993;74:2391-2399
23. Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, Bonino F, ve ark. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology*. 1994;19:1321-1324
24. Abacioglu YH, Davidson F, Tuncer S, Yap PL, ve ark. The distribution of hepatitis C virus genotypes in Turkish patients. *J Viral Hepat*. 1995;2:297-301
25. Bozdayi AM, Aslan N, Bozdayi G, Türkyilmaz AR, ve ark. Molecular epidemiology of hepatitis B, C and D viruses in Turkish patients. *Arch Virol*. 2004;149:2115-2129

26. Mihm U, Herrmann E, Sarrazin C, Zeuzem S. Review article: predicting response in hepatitis C virus therapy. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;23:1043-1054
27. Guha C, Lee SW, Chowdhury NR, Chowdhury JR. Cell culture models and animal models of viral hepatitis. Part II: hepatitis C. *Lab Anim (NY).* 2005;34:39-47
28. World Health Organization. Hepatitis C: global prevalence. *Wkly Epidemiol Rec* 1997;72:341-348
29. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis.* 2005;5:558-567
30. http://www.vhsd.org/slayt_seti/hepatit_c.htm (Erişim tarihi: 29.07.2007)
31. Ozsoy MF, Oncul O, Cavuslu S, Erdemoglu A, ve ark. Seroprevalences of hepatitis B and C among health care workers in Turkey. *J Viral Hepat.* 2003;10:150-156
32. Kosgeroglu N, Ayranci U, Vardareli E, Dincer S. Occupational exposure to hepatitis infection among Turkish nurses: frequency of needle exposure, sharps injuries and vaccination. *Epidemiol Infect.* 2004;132:27-33
33. Ayranci U, Kosgeroglu N. Needlestick and sharps injuries among nurses in the healthcare sector in a city of western Turkey. *J Hosp Infect.* 2004 Nov;58(3):216-223
34. Dal Molin G, D'Agaro P, Ansaldi F, Ciana G, ve ark. Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus: rate of infection and assessment of viral load and IgM anti-HCV as risk factors. *J Med Virol.* 2002;67:137-142
35. Terrault NA. Sexual activity as a risk factor for hepatitis C. *Hepatology.* 2002;36:S99-S105
36. Hoofnagle JH. Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology.* 1997;26:15S-20S
37. Racanelli V, Rehermann B. Hepatitis C virus infection: when silence is deception. *Trends Immunol.* 2003;24:456-464
38. Yakaryilmaz F, Gurbuz OA, Guliter S, Mert A, ve ark. Prevalence of occult hepatitis B and hepatitis C virus infections in Turkish hemodialysis patients. *Ren Fail.* 2006;28:729-735
39. Hsu M, Zhang J, Flint M, Logvinoff C, ve ark. Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:7271-7276

40. Sugano M, Hayashi Y, Yoon S, Kinoshita M, ve ark. Quantitation of hepatitis C viral RNA in liver and serum samples using competitive polymerase chain reaction. *J Clin Pathol.* 1995;48:820-825
41. Lok AS, Gunaratnam NT. Diagnosis of hepatitis C. *Hepatology.* 1997;26:48S-56S
42. Caruntu FA, Benea L. Acute hepatitis C virus infection: Diagnosis, pathogenesis, treatment. *J Gastrointestin Liver Dis.* 2006;15:249-256
43. Podzorski RP. Molecular testing in the diagnosis and management of hepatitis C virus infection. *Arch Pathol Lab Med.* 2002;126:285-290
44. Kim AI, Saab S. Treatment of hepatitis C. *Am J Med.* 2005;118:808-815
45. Alter MJ. Prevention of spread of hepatitis C. *Hepatology.* 2002;36:93-98
46. Santolini E, Migliaccio G, La Monica N. Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J Virol.* 1994;68:3631-3641
47. Bukh J, Purcell RH, Miller RH. Sequence analysis of the core gene of 14 hepatitis C virus genotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:8239-8243
48. Yasui K, Wakita T, Tsukiyama-Kohara K, Funahashi SI, ve ark. The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J Virol.* 1998;72:6048-6055
49. Lo SY, Masiarz F, Hwang SB, Lai MM, ve ark. Differential subcellular localization of hepatitis C virus core gene products. *Virology.* 1995;213:455-461
50. Yildiz E, Oztan A, Sar F, Pinarbasi E, ve ark. Molecular characterization of a full genome Turkish hepatitis C virus 1b isolate (HCV-TR1): a predominant viral form in Turkey. *Virus Genes.* 2002;25:169-177
51. Boulant S, Vanbelle C, Ebel C, Penin F, ve ark. Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features. *J Virol.* 2005;79:11353-11365
52. Hope RG, McLauchlan J. Sequence motifs required for lipid droplet association and protein stability are unique to the hepatitis C virus core protein. *J Gen Virol.* 2000;81:1913-1925
53. Hijikata M, Kato N, Ootsuyama Y, Nakagawa M, ve ark. Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:5547-5551

- 54.** Hüseyin P, Langen H, Mous J, Jacobsen H. Hepatitis C virus core protein: carboxy-terminal boundaries of two processed species suggest cleavage by a signal peptide peptidase. *Virology*. 1996;224:93-104
- 55.** Harada S, Watanabe Y, Takeuchi K, Suzuki T, ve ark. Expression of processed core protein of hepatitis C virus in mammalian cells. *J Virol*. 1991;65:3015-3021
- 56.** Barba G, Harper F, Harada T, Kohara M, ve ark. Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:1200-1205
- 57.** Suzuki R, Matsuura Y, Suzuki T, Ando A, ve ark. Nuclear localization of the truncated hepatitis C virus core protein with its hydrophobic C terminus deleted. *J Gen Virol*. 1995;76:53-61
- 58.** Matsumoto M, Hwang SB, Jeng KS, Zhu N, ve ark. Homotypic interaction and multimerization of hepatitis C virus core protein. *Virology*. 1996;218:43-51
- 59.** Klein KC, Dellos SR, Lingappa JR. Identification of residues in the hepatitis C virus core protein that are critical for capsid assembly in a cell-free system. *J Virol*. 2005;79:6814-6826
- 60.** Fan Z, Yang QR, Twu JS, Sherker AH. Specific in vitro association between the hepatitis C viral genome and core protein. *J Med Virol*. 1999;59:131-134
- 61.** Goh PY, Tan YJ, Lim SP, Lim SG, ve ark. The hepatitis C virus core protein interacts with NS5A and activates its caspase-mediated proteolytic cleavage. *Virology*. 2001;290:224-236
- 62.** Irshad M, Dhar I. Hepatitis C virus core protein: an update on its molecular biology, cellular functions and clinical implications. *Med Princ Pract*. 2006;15:405-416
- 63.** Sabile A, Perlemuter G, Bono F, Kohara K, ve ark. Hepatitis C virus core protein binds to apolipoprotein AII and its secretion is modulated by fibrates. *Hepatology*. 1999;30:1064-1076
- 64.** Hourieux C, Patient R, Morin A, Blanchard E, ve ark. The genotype 3-specific hepatitis C virus core protein residue phenylalanine 164 increases steatosis in an in vitro cellular model. *Gut*. 2007 Jan 9
- 65.** Moriya K, Yotsuyanagi H, Shintani Y, Fujie H, ve ark. Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice. *J Gen Virol*. 1997;78:1527-1531

66. McLauchlan J. Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J Viral Hepat.* 2000;7:2-14
67. Smirnova IS, Aksenov ND, Vonsky MS, Isaguliants MG. Different transformation pathways of murine fibroblast NIH 3T3 cells by hepatitis C virus core and NS3 proteins. *Cell Biol Int.* 2006;30:915-919
68. Ray RB, Meyer K, Ray R. Hepatitis C virus core protein promotes immortalization of primary human hepatocytes. *Virology.* 2000;271:197-204
69. Moriya K, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, ve ark. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med.* 1998;4:1065-1067
70. Miles JS, Wolf CR. Principles of DNA cloning. *BMJ.* 1989;299:1019-1022
71. del Solar G, Giraldo R, Ruiz-Echevarria MJ, Espinosa M, Diaz-Orejas R. Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998;62:434-464
72. Hamer DH, Thomas CA. Molecular cloning of DNA fragments produced by restriction endonucleases SaI and BamI. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1976;73:1537-1541
73. Sutcliffe JG. pBR322 restriction map derived from the DNA sequence: accurate DNA size markers up to 4361 nucleotide pairs long. *Nucleic Acids Res.* 1978;5:2721-2728
74. <http://www1.qiagen.com/literature/pqesequences/pqe3x.pdf> (Erişim tarihi: 11.08.2007)
75. Goodsell DS. The molecular perspective: restriction endonucleases. *Stem Cells.* 2002;20:190-191
76. Roberts RJ, Macelis D. Restriction enzymes and their isoschizomers. *Nucleic Acids Res.* 1991;19:2077-2109
77. D Marchuk, M Drumm, A Saulino, F S Collins. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res.* 1991;19:1154
78. <http://www.medigenomix.de/molbio6techinfo.html> (Erişim Tarihi: 01.08.2007)
79. <http://www.animalgenome.org/edu/doe/fig11a.html> (Erişim Tarihi: 01.08.2007)

80. Pfeiffer BH, Zimmerman SB. Polymer-stimulated ligation: enhanced blunt- or cohesive-end ligation of DNA or deoxyribooligonucleotides by T4 DNA ligase in polymer solutions. *Nucleic Acids Res.* 1983;11:7853-71
81. Modrich P, Lehman IR, Wang JC. Enzymatic joining of polynucleotides. XI. Reversal of *Escherichia coli* deoxyribonucleic acid ligase reaction. *J Biol Chem.* 1972;247:6370-6372
82. [http://openwetware.org/wiki/20.109\(F07\):_DNA_ligation_and_bacterial_transformation](http://openwetware.org/wiki/20.109(F07):_DNA_ligation_and_bacterial_transformation) (Erişim tarihi: 12.08.2007)
83. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 1983;166:557-580
84. Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 1988;16:6127-6145
85. Chaffin DO, Rubens CE. Blue/white screening of recombinant plasmids in Gram-positive bacteria by interruption of alkaline phosphatase gene (*phoZ*) expression. *Gene.* 1998;219:91-99
86. <http://www.edvotek.com/300.html> (Erişim tarihi: 12.08.2007)
87. Dahlroth SL, Nordlund P, Cornvik T. Colony filtration blotting for screening soluble expression in *Escherichia coli*. *Nat Protoc.* 2006;1:253-258
88. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979;7:1513-1523
89. Sorensen HP, Mortensen KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol.* 2005;115:113-128
90. Hannig G, Makrides SC. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* 1998;16:54-60
91. Kim S, Lee SB. Rare codon clusters at 5'-end influence heterologous expression of archaeal gene in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 2006;50:49-57
92. Hoffmann F, Weber J, Rinas U. Metabolic adaptation of *Escherichia coli* during temperature-induced recombinant protein production: 1. Readjustment of metabolic enzyme synthesis. *Biotechnol Bioeng.* 2002;80:313-319
93. Arechaga I, Miroux B, Runswick MJ, Walker JE. Over-expression of *Escherichia coli* F1F(o)-ATPase subunit a is inhibited by instability of the *uncB* gene transcript. *FEBS Lett.* 2003;547:97-100

- 94.** Liu J, Kong Y, Zhu L, Wang Y, ve ark. High-level expression of the C-terminal hydrophobic region of HCV E2 protein ectodomain in *E. coli*. *Virus Genes*. 2002;25:5-13
- 95.** Poole ES, Brown CM, Tate WP. The identity of the base following the stop codon determines the efficiency of in vivo translational termination in *Escherichia coli*. *EMBO J*. 1995;14:151-158
- 96.** Ma X, Zheng W, Wang T, Wei D, ve ark. Optimization and high-level expression of a functional GST-tagged rHLT-B in *Escherichia coli* and GM1 binding ability of purified rHLT-B. *J Microbiol*. 2006;44:293-300
- 97.** Berrow NS, Bussow K, Coutard B, Diprose J, ve ark. Recombinant protein expression and solubility screening in *Escherichia coli*: a comparative study. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2006;62:1218-1226
- 98.** Rudolph R, Lilie H. In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB J*. 1996;10:49-56
- 99.** Davis GD, Elisee C, Newham DM, Harrison RG. New fusion protein systems designed to give soluble expression in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*. 1999;65:382-388
- 100.** Liu J, Zhu LX, Kong YY, Li GD, Wang Y. Purification and application of C-terminally truncated hepatitis C virus E1 proteins expressed in *Escherichia coli*. *World J Gastroenterol*. 2005;11:503-507
- 101.** The QIAexpressionist™. Qiagen 2003. S64
- 102.** Kuiken C, Yusim K, Boykin L, Richardson R. The Los Alamos HCV Sequence Database. *Bioinformatics*. 2005;21:379-384
- 103.** Eroglu C, Yildiz E, Ozturk M, Pinarbasi E. A highly sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assay of antibodies to hepatitis C virus. *Acta Virol*. 2000;44:29-33
- 104.** Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-254
- 105.** Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol Biol Evol*. 2007;24:1596-1599

- 106.** Tan D, Hu G, Terukatsu A, Zhang Z. Molecular cloning, sequencing and expression of core and NS3 fragments of HCV from patients with HCV infection. *Chin Med J.* 1993;105:522-526
- 107.** Osborne S, Ceconato E, Griva S, Garetto F, Calogero R, Rosa C, Bonelli F. Expression in *E. coli* and purification of a chimeric p22-NS3 recombinant antigen of hepatitis C virus (HCV). *FEBS Lett.* 1993;324:253-257
- 108.** Yeh CT, Han CM, Lo SY, Ou JH, Fan KD, Sheen IS, Chu CM, Liaw YF. Early detection of anti-HC_c antibody in acute hepatitis C virus (HCV) by western blot (immunoblot) using a recombinant HCV core protein fragment. *J Clin Microbiol.* 1994;32:2235-2241
- 109.** Aoyagi K, Ohue C, Iida K, Kimura T, Tanaka E, Kiyosawa K, Yagi S. Development of a simple and highly sensitive enzyme immunoassay for hepatitis C virus core antigen. *J Clin Microbiol.* 1999;37:1802-1808
- 110.** Seong YR, Lee EK, Choi S, Chon SK, Im DS. Overexpression and simple purification of a truncated, immunologically reactive GST-HCV core (1-123) fusion protein. *J Virol Methods.* 1996;59:13-21
- 111.** Jung V, Pestka SB, Pestka S. Efficient cloning of PCR generated DNA containing terminal restriction endonuclease recognition sites. *Nucleic Acids Res.* 1990;18:6156
- 112.** Sambrook J, Russel DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Volume 2)* 3th. New York, Cold Spring Harbor, 2001;1.86
- 113.** Frederick MA. *Current Protocols in Molecular Biology.* Wiley Interscience, 2005;10.8.12
- 114.** Frederick MA. *Current Protocols in Molecular Biology.* Wiley Interscience, 2005;10.6.25
- 115.** Wu X, Jörnvall H, Berndt KD, Oppermann U. Codon optimization reveals critical factors for high level expression of two rare codon genes in *Escherichia coli*: RNA stability and secondary structure but not tRNA abundance. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;313:89-96
- 116.** Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:3406-3415