



FATİH ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Genetik Bölümü
Yüksek Lisans Programı

KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞ VİRÜSÜ ANTİJENİK NÜKLEOPROTEİN ÜRETİLMESİ VE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Duygu KIRKIK

EYLÜL 2015



**KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞ VİRÜSÜ ANTİJENİK
NÜKLEOPROTEİN ÜRETİLMESİ VE SİTOTOKSİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Duygu KIRKIK

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Yüksek Lisans Tezi

Fatih Üniversitesi

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Eylül 2015
İstanbul, Türkiye

ONAYLAMA SAYFASI

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı 530213002 numaralı öğrencisi Duygu KIRKIK tarafından hazırlanan bu tezin Yüksek Lisans Tezinde bulunması gereken yeterliliğe, kapsama ve niteliğe sahip olduğunu onaylıyorum.

Yrd.Doç.Dr. Esen BAKHAUTDIN
Tez Danışmanı

Bu tezin şekil ve içerik açısından Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tez Yazım Kılavuzunda belirtilen kurallara uygun formatta yazıldığını onaylıyorum.

Doç.Dr. Sevim IŞIK
Anabilim Dalı Başkanı

Tez Sınavı Jüri Üyeleri

Yrd.Doç.Dr.Esen BAKHAUTDIN

Yrd.Doç.Dr.Bakytzhan BAKHAUDTIN

Doç.Dr.Sevim IŞIK

Doç.Dr.Lokman ALPSOY

Yrd.Doç.Dr.Bora Kazım BÖLEK

Bu tezin Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tez Yazım Klavuzunda belirtilen kurallara uygun formatta yazıldığını onaylıyorum.

Doç.Dr. Lokman ALPSOY
Müdür

Eylül 2015

KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞ VİRÜSÜ ANTİJENİK NÜKLEOPROTEİN ÜRETİLMESİ VE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Duygu KIRKIK

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı - Yüksek Lisans Tezi
Eylül 2015

Tez Danışmanı: Yrd.Doç.Dr. Esen BAKHAUTDIN
Tez Eş Danışmanı: Yrd.Doç.Dr.Bakytzhan BAKHAUTDIN

ÖZET

Kırım-Kongo Kanamalı Ateş (KKKA) hastalığı keneler yoluyla bulaşan; hemorajik ve toksik etkilerle %30 ölüm riski taşıyan virütük bir hastalıktır. Ülkemizde KKKA hastalığı ilk defa 2002 yılında rapor edilmiş ve 2012 yılına kadar 7072 kişi bu hastalığa yakalanmış ve 356 kişi hayatını kaybetmiştir. KKKA hastalığını önleyici aşı ve hastalığı tedavi eden yaygın bir yöntem dünyada henüz yoktur. Ancak yapılan bilimsel araştırmalar sonucunda KKKA virüsünün genetik yapısı ortaya çıkarılmıştır. Literatürde bakteri aracılığıyla üretilen nükleoprotein (NP)'nin KKKA hasta serumlarındaki IgG ve IgM'i tanıdığı ve antijenik özellikte olduğu gösterilmiştir. Bizim amacımız da KKKA virüsünün antijenik nükleoprotein (NP)'nin rekombinant yolla elde edilmesi ve bu rekombinant proteinin hücre kültüründe toksisite testlerini yaparak güvenilirliğinin araştırılmasıdır. NP proteinini elde etmek için; ilk olarak NP geni GST vektörüne klonlanarak sekanslamaya gönderildi. Sekanslamada doğrulanmış plazmid *E.coli*'nin BL21(DE)3 suşuna transform edildi. Transformasyon sonrası, IPTG aracılığıyla, protein ekspresyonu sağlandı ve 80 kDa ağırlığındaki GST-NP proteinini saflaştırmak için "native" protein purifikasyonu metoduna başvuruldu. Yapılan yöntemden sonuç alınamayınca, bu kez NP geni C-terminal His-Tag vektörüne klonlandı. Sekanslamada doğrulanmış yeni plazmid aktarılarak IPTG aracılığıyla protein eksprese edildi ve 55 kDa ağırlığındaki His-Tag NP proteinini elde etmek için native ve denatüre olmak üzere iki farklı protein purifikasyonu metodu uygulandı. Denatüre protein purifikasyonu metoduyla protein başarılı bir şekilde elde edildi. 55 kDa ağırlığında olduğu bilinen NP His-Tag füzyon proteininin doğruluğu için western blot yöntemi uygulandı. rNP'nin toksisitesi MTT ve endotoksin metotları yardımıyla ölçüldü. Elde edilen verilere göre; yaptığımız çalışmada rNP'nin toksisite miktarının düşük olması, NP proteinin aşı çalışmalarında kullanılabileceğini göstermektedir.

Ayrıca bu çalışmada NP proteininin laboratuvar koşullarında, düşük maliyetli, güvenilir ve sınırsız miktarda üretilbileceği ispatlanmıştır. Bu çalışmanın sonucu, rekombinant NP'nin önce hayvan çalışmaları ve sonrasında aşı amaçlı kullanımının uygunluğu hakkında bilgi vermektedir.

Anahtar Kelimeler: Kırım Kongo virüsü, antijen, monoklonal antikor, aşı, nukleoprotein, sitotoksiste



THE PRODUCTION OF ANTIGENIC NUCLEOPROTEIN OF CRIMEAN-CONGO HEMORRHAGIC FEVER VIRUS AND THE RESEARCH OF ITS CYTOTOXIC EFFECTS

Duygu KIRKIK

M. S. Thesis – Medical Genetics
September 2015

Supervisor: Assist.Prof. Esen BAKHAUDTIN
Co-supervisor: Assist. Prof. Bakyzthan BAKHAUDTIN

ABSTRACT

Crimean-Congo Hemorrhagic Fever (CCHF) is a viral disease transmitted by ticks and CCHF virus causes a hemorrhagic and toxic syndrome in humans with mortality rates of up to 30%. CCHF disease has been reported in 2002 for the first time in our country, and 7,072 cases were reported and 356 people died until 2012. The preventive vaccines and treatment methods of CCHF disease are not yet available in the world. However, the complete sequence of viral genome of CCHF virus have been generated, and these efforts accelerated the research on the production of potential antigenic proteins and monoclonal antibodies. Recently, it has been shown that nucleoprotein (NP) of CCHF virus has antigenic properties by recognizing IgG and IgM in serum of CCHF patients. In this study, our aim is that to produce antigenic nucleoprotein (NP) by recombinant technology and to examine the safety of this recombinant protein by cytotoxicity tests in cell culture. First of all; NP gene was cloned into the GST vector and it was send to sequence and validate. After sequence validation, new plasmid was transformed in *E.coli* BL21(DE)3 strain and the native protein purification method was used to GST-NP protein that had 80 kDA molecular weight. When the experiment did not work, NP gene was cloned into His-Tag vector and product was sent to sequence and validate. Next, new plasmid was transformed in *E.coli* BL21(DE)3 strain. The native protein purification and denature protein purification methods were used to His-Tagged NP protein that had 55 kDA molecular weight. NP protein was got successfully with denature method. Next, westen blot was done to confirm molecular weight of His-tag NP protein. Afterwards toxicity of rNP was measured by endotoxin and MTT assays. According to our results, NP protein can be used in vaccine studies, because of low toxicity level of rNP. Additionally, it was proved that NP protein is cheap, reliable and highly producible. New products of this study will give information

about the appropriateness of recombinant NP to be studied in vivo and further in therapeutic purposes.

Keywords: CCHF virus, antigen, monoklonal antibody, vaccine, nucleoprotein, cytotoxic





Sevgili Aileme...

TEŞEKKÜR

Öncelikle çalıştığım konuda sürekli beni bilgilendiren, teorikte ve pratikte tecrübe ve deneyimleriyle bilgilerime bilgi katan ve yaptığım deneylerin, kısa sürede iyi sonuçlar almasında büyük katkısı ve emeği olan, en önemlisi nazımı her seferinde çeken tez hocam Sayın Yrd.Doç.Dr.Esen BAKHAUTDIN ve tez eş danışmanım Sayın Yrd.Doç.Dr. Bakzythan BAKHAUTDIN'e,

Tez çalışmalarım boyunca herhangi bir acil durumda yardımını esirgemeyen değerli arkadaşlarım, Duygu YAZICI, Mehtap AYDIN, Nur Pınar SANCAK, Derya Sultan KARABULUT, İlknur GÖKSOY'a

Son olarak tüm ömrüm boyunca ve bu çalışma sırasında bana destek olan, bugün bulunduğum yere gelmemi sağlayan, her zaman yanımda olan babam Doğan KIRKIK, annem Tülay KIRKIK, kardeşim Zeki KIRKIK ve teyzem Gülay MAMARAŞLI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, 213S153 numaralı TÜBİTAK proje desteği ve Fatih Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu tarafından P53011301 proje numarası ile desteklenmiştir.

BEYAN

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

Öğrencinin Adı, Soyadı

İmza

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|------|
| ÖZET | iii |
| ABSTRACT..... | v |
| İTHAF | vii |
| TEŞEKKÜR..... | viii |
| BEYAN..... | ix |
| İÇİNDEKİLER | x |
| TABLolar LİSTESİ..... | xiv |
| ŞEKİLLER LİSTESİ | xv |
| SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ | xvi |
| BÖLÜM 1 GİRİŞ..... | 1 |
| BÖLÜM 2 KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞ HASTALIĞI..... | 3 |
| 2.1 Kırım Kongo Kanamalı Ateş Virüsü. | 3 |
| 2.2 Kırım Kongo Kanamalı Ateş Hastalığı. | 3 |
| 2.3 Kırım Kongo Kanamalı Ateş Virüsüyle Yapılan Çalışmalar. | 5 |
| 2.3.1 Viroloji Çalışmaları..... | 7 |
| 2.3.2 Klinik Viroloji Çalışmaları | 7 |
| 2.3.3 Moleküler Metotlarla İlgili Çalışmalar | 7 |
| 2.3.4 Serolojik Çalışmalar..... | 8 |
| 2.3.5 Hastalıktan Korunma ve Tedavi Yollarıyla İlgili Çalışmalar | 9 |
| 2.3.6 Destekleyici Tedavi Çalışmaları | 9 |
| 2.3.7 Antiviral Tedavi Çalışmaları..... | 11 |
| 2.3.8 Spesifik İmmünoglobulin Tedavisi Çalışmaları..... | 12 |
| 2.3.9 Aşı ve Antiserum Çalışmaları | 12 |
| 2.4 Nükleoprotein ve Aşı Potansiyeli. | 14 |
| BÖLÜM 3 MATERYAL VE METOT | 15 |
| 3.1 Klonlama Çalışmaları için Kullanılan Kimyasallar..... | 15 |
| 3.2 Ekspresyon Çalışmaları için Kullanılan Kimyasallar..... | 15 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.2.1 | Bakteri Kültürü Çalışmaları için Kullanılacak Hücre Soyları | 15 |
| 3.2.2 | Bakteri Kültürü Çalışmaları için Kullanılacak Plazmidler | 16 |
| 3.3 | Çalışmada Kullanılan Araç ve Gereçler. | 18 |
| 3.4 | Bakteri Kültürü Çalışmaları için Hazırlanan Tampon ve Çözeltiler. | 18 |
| 3.5 | Protein Purifikasyonu. | 20 |
| 3.5.1 | Native (Doğal) Protein Purifikasyonu için Hazırlanan Tamponlar..... | 20 |
| 3.5.1.1 | Liziz Tamponu Hazırlanışı..... | 20 |
| 3.5.1.2 | Yıkama Tamponu Hazırlanışı | 20 |
| 3.5.1.3 | Elüsyon Tamponu Hazırlanışı | 20 |
| 3.6 | Denatürasyonla Protein Purifikasyonu..... | 21 |
| 3.6.1 | Denatürasyon ile Protein Purifikasyonu için Hazırlanan Tamponlar | 21 |
| 3.6.1.1 | Liziz Tamponu Hazırlanışı..... | 21 |
| 3.6.1.2 | Yıkama Tamponu Hazırlanışı | 21 |
| 3.6.1.3 | Elüsyon Tamponu Hazırlanışı | 21 |
| 3.7 | SDS-PAGE Jel Elektroforezi..... | 21 |
| 3.7.1 | SDS-PAGE Jel Elektroforezi için Hazırlanan Tamponlar | 21 |
| 3.8 | Western Blot. | 23 |
| 3.8.1 | Western Blot Çalışmaları için Kullanılan Kimyasallar..... | 23 |
| 3.8.1.1 | Transfer Tamponu Hazırlanışı..... | 23 |
| 3.8.1.2 | 1X PBS-T (Yıkama) Tamponu Hazırlanışı..... | 23 |
| 3.8.1.3 | Blotlama Solüsyonu Hazırlanışı | 23 |
| 3.9 | Endotoksin Çalışmaları..... | 24 |
| 3.9.1 | Kromojenik Endotoksin Miktar Tayini için Kullanılan Kimyasallar | 24 |
| 3.9.2 | Kromojenik Endotoksin Miktar Tayini Kitindeki Solüsyonlar..... | 24 |
| 3.10 | METOT. | 24 |
| 3.10.1 | <i>E.Coli</i> 'nin BL21(DE)3 ve DH5alpha Soyları için Kompetent Hücre Hazırlanışı | 24 |
| 3.10.2 | Transformasyon..... | 25 |
| 3.10.3 | Plazmid DNA Purifikasyonu (Midiprep) | 25 |
| 3.10.4 | İki Restriksiyon Enzimiyle DNA Vektörünün Kesimi | 26 |
| 3.10.5 | Kesilen Vektörün Purifikasyonu | 26 |
| 3.10.6 | NP Geminin PCR ile Çoğaltılması..... | 26 |
| 3.10.7 | NP Geninin Agaroz Jelden İzolasyonu | 27 |
| 3.10.8 | Ligasyon | 27 |

| | |
|--|-----------|
| 3.10.9 Sekanslama..... | 28 |
| 3.11 Ekspresyon..... | 28 |
| 3.11.1 Transformasyon..... | 28 |
| 3.11.2 Tek Koloni Stok Hazırlanışı..... | 28 |
| 3.11.3 IPTG indüksiyonu | 28 |
| 3.11.4 Affinite Kromatografisi için Kolon Hazırlanışı | 29 |
| 3.11.5 Native(Doğal) Metotla Protein Purifikasyonu | 29 |
| 3.11.6 Denatürasyon Metotla Protein Purifikasyonu | 30 |
| 3.11.7 SDS-PAGE Jel Elektroforezi | 30 |
| 3.11.8 Elde Edilen Proteinin Konsantre Edilmesi ve Konsantrasyon Ölçümü .. | 31 |
| 3.11.9 Western Blot..... | 32 |
| 3.12 Hücre Kültürü Çalışmaları..... | 32 |
| 3.12.1 Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar | 32 |
| 3.12.2 Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Hücre Soyları | 32 |
| 3.12.3 Sitotoksiste Çalışmaları için Solüsyon ve Tampon Hazırlanışı | 32 |
| 3.12.3.1 DMEM Stok Solüsyon Hazırlanışı..... | 32 |
| 3.12.3.2 1X PBS Stok Solüsyon Hazırlanışı | 32 |
| 3.12.3.3 FBS Stok Solüsyon Hazırlanışı | 32 |
| 3.12.3.4 Hücre Kültürü Laboratuvar Temizliği..... | 32 |
| 3.12.3.5 Steril Kabinin Temizliği..... | 33 |
| 3.12.3.6 CO ₂ 'li İnkübatörün Temizliği | 33 |
| 3.12.3.7 Kullanılan Malzemelerin Temizliği | 33 |
| 3.12.3.8 Dondurulan Hücrelerin Açılması | 33 |
| 3.12.3.9 Hücrelerin Pasajlanması | 34 |
| 3.12.3.10 Hücre Kültürü Kabına Hücre Ekimi Yapılması ve MTT Testi . | 34 |
| 3.13 Endotoksin Mikroplate Tayini..... | 34 |
| BÖLÜM 4 SONUÇLAR..... | 36 |
| 4.1 GST-NP Proteinini için Klonlama ve Expresyon..... | 36 |
| 4.1.1 NP Geninin Restriksiyon Enzimleri Yardımıyla Kesilmesi..... | 36 |
| 4.1.2 pGEX6-P-1 Vektörünün Restriksiyon Enzimiyle Kesilmesi | 37 |
| 4.1.3 Ligasyon..... | 37 |
| 4.1.4 Sekanslama..... | 37 |
| 4.1.5 NP-pGEX6-P-1'in (NP-GST) Transformasyonu ve IPTG ile Expresyon Edilmesi..... | 38 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 4.1.6 | NP-GST Proteinin (NP-pGEX6-P-1) Native Metotla Purifikasyonu | 39 |
| 4.1.7 | NP-pET28b (NP His-Tag Proteinin) Klonlaması ve Sekanslanması | 40 |
| 4.2 | His Tag Proteinini Purifikasyonu ve Sitotoksisite Ölçümü | 42 |
| 4.2.1 | NP-pET28b'nin (NP His-Tag) IPTG ile Eksprese Edilmesi | 42 |
| 4.2.2 | NP His-Tag Proteininin Native Metotla Purifikasyonu | 43 |
| 4.2.3 | NP His-Tag Proteininin Denatürasyon Metoduyla Purifikasyonu | 44 |
| 4.2.4 | rNP'nin Konsantre Edilmesi | 45 |
| 4.2.5 | rNP'nin Western Blot ile Teyit Edilmesi | 46 |
| 4.2.6 | KKKAV rNP'nin LAL Metoduyla Endotoksin Ölçümü | 47 |
| 4.2.7 | KKKAV rNP'nin MTT Testi ile Sitotoksisite Ölçümü | 48 |
| BÖLÜM 5 | SONUÇ VE YORUM | 50 |
| KAYNAKLAR | | 54 |

TABLÖLAR LİSTESİ

TABLO

| | | |
|-----|---|----|
| 1.1 | Yıllara Göre KKKA Hastalığı Vaka-Ölüm Dağılımı..... | 6 |
| 1.2 | KKKA Hastalığı Bulgusu Algoritması..... | 10 |
| 2.1 | Çalışmada Kullanılan Araç ve Gereçler | 18 |



ŞEKİLLER LİSTESİ

ŞEKİL

| | | |
|------|---|----|
| 1.1 | Kanamalı Kırım Kongo Virüsü Yapısı..... | 4 |
| 1.2 | L,M ve S segmenti..... | 4 |
| 1.3 | Enfeksiyon Yapıcı Kene Türleri..... | 5 |
| 2.1 | pGEX6P1 Vektör Haritası..... | 16 |
| 2.2 | pET28b(+) Vektör Haritası | 17 |
| 3.1 | NP Geninin BamHI ve XhoI Restriksiyon Enzimleriyle Kesilmesi | 36 |
| 3.2 | pGEX6P1 Vektörünün BamHI ve XhoI Restriksiyon Enzimleriyle Kesilmesi.... | 37 |
| 3.3 | NP-GST Proteininin (NP-pGEX6P1) IPTG ile İndüklenmesi | 38 |
| 3.4 | NP GST Proteinin Native Metotla Purifikasyon Edilmesi | 39 |
| 3.5 | pET28b Vektörünün NcoI ve XhoI Restriksiyon Enzimleriyle Kesilmesi | 40 |
| 3.6 | NP Proteinin pET28b’de Eksprese Olmuş Hali | 41 |
| 3.7 | NP Histag Proteinin (NP-pET28b) IPTG ile İndüklenmesi | 42 |
| 3.8 | NP Histag Proteininin Native Metotla Purifikasyon Edilmesi | 43 |
| 3.9 | NP Histag Proteininin Denatürasyon Metoduyla Purifikasyon Edilmesi | 44 |
| 3.10 | rNP’nin Konsantre Edilmesi | 45 |
| 3.11 | KKKAV rNP Proteininin Western Blot ile Teyit Edilmesi | 46 |
| 3.12 | KKKAV rNP Proteininin LAL Metoduyla Endotoksin Ölçümü | 47 |
| 3.13 | KKKAV rNP Proteininin Hepatokarsinoma Hücreleri Üzerinde Yapılan Sitetoksisite Ölçümü..... | 48 |
| 3.14 | KKKAV rNP Proteininin Hepatosit Hücreleri Üzerinde Sitotoksisite Ölçümü ... | 49 |

SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ

SEMBOL/KISALTMA

| | |
|----------------------------------|--------------------------------------|
| ALS | Antilenfositik Serum |
| APS | Amonyum Persülfat |
| CaCl ₂ | Kalsiyum Klorür |
| DNA | Deoksiribonükleik Asit |
| DNase | Büyükbaş hayvandan Deoksiribonükleaz |
| E.coli | Escherichia coli |
| ELISA | Enzim Bağlı İmmünosorbent Deneyi |
| FBS | Fetal Sığır Serum |
| IFA | İmmünoflorans Deneyi |
| IFN | İnterferon |
| IPTG | İzopropil-b-D-tiogalaktozid |
| KKKA | Kanamalı Kırım Kongo Ateş |
| KKKAV | Kanamalı Kırım Kongo Ateş Virüsü |
| KKKAH | Kanamalı Kırım Kongo Ateş Hastalığı |
| NaCl | Sodyum Klorür |
| NaH ₂ PO ₄ | Monosodyum fosfat |
| Ni-NTA | Nikel-Nitritotriasetik Asit |
| NiSO ₄ | Nikel Sülfat |
| NP | Nükleoprotein |
| PBS | Fosfat Tampon Çözeltisi |
| PBS-T | Fosfat-Tween Tampon Çözeltisi |
| PCR | Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| PMSF | Fenil metan sülfonil florür |
| PVDF | Polivinilidin Florür |
| RdRp | RNA bağımlı- RNA polimeraz enzimi |

| | |
|--------|--|
| RNA | Ribonükleik Asit |
| RNase | Büyükbaş hayvandan Ribonükleaz |
| ssRNA | Tek zincirli RNA |
| RT-PCR | Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| SDS | Sodyum Dedosil Sülfat |
| TEMED | Tetra Metil Etilen Diamin |
| Tris | Hidroksimeti |



BÖLÜM 1

GİRİŞ

Kırım-Kongo Kanamalı Ateş Hastalığı (KKKAH) Doğu -Batı Afrika, Avrupa ve Asya ülkelerinde endemik olan ve ülkemizde de ilk kez 2002 yılında görülen ve 2003 yılında tanımlanan bir enfeksiyon türüdür (Müdürlüğü 23.06.2009).

KKKAV; kene ısırması, tutunması ya da virüsün bulaştığı insanın veya hayvanın kanı ya da dokusuyla temas edilmesi sonucu insanları hasta etmektedir (Samudzi RR1 2012 Jan). Bu enfeksiyon türü, ateş, üşüme, miyalji, titreme gibi belirtilerin yanısıra, kan pıhtılaşma mekanizmalarını bozduğundan dolayı, karaciğer, böbrek ve akciğer yetmezliğine neden olabilmektedir (Bente et al. 2013).

KKKAV Bunyavirüs ailesinin bir üyesi olan Nairovirüs cinsinin bir türüdür. Bu virüs sekiz farklı genetik grubu içine almaktadır. Ülkemizdeki vakalardan alınan suş örneklerinin Güney Rusya ve Kosova ülkelerindeki vaka suşlarıyla benzer olduğu görülmüştür (Gozalan et al. 2007; Midilli et al. 2007; Tomanovic, Obradovic and Gligic 1996). KKKA ülkemizde içinde bulunduğu coğrafi bölgelerde giderek yaygınlaşan bir hastalıktır. Epidemik bölgelerde vaka oranlarına bağlı olarak, ölüm sayısı artış göstermektedir. Virüsün genomik yapısı üç segmentten oluşmakta olup, KKKAV'nün yapısı; helikel kapsidli, negatif polaritelidir.

Sağlık Bakanlığı'ndan alınan resmi bilgilere göre, ülkemizde 7072 kişi KKKA hastalığına yakalanmış ve 356 kişi yaşamını kaybetmiştir (Müezzinoğlu 2013). Hastalık genelde ilkbahar-sonbahar mevsimi aylarında kendini göstermektedir. En çok tarım ve hayvancılık ile uğraşanlar, veteriner hekimler, sağlık çalışanları, sağlık teknisyenleri

kasaplar risk grubu altındadır (Müdürlüğü 2014). Hastalığın tedavisi için etkin ve kesin olan bir yöntem şunda bulunmamaktadır.

Bu çalışmada amaç; laboratuvar koşullarında, oldukça düşük maliyetli olacak şekilde rekombinant aşı üretip, halk sağlığına yardımcı olmak ve ülke ekonomisine katkıda bulunmaktır. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar, ileride yapılacak olan aşı çalışmalarına yardımcı olarak, KKAV hastalığının önlenmesine ışık tutacaktır.

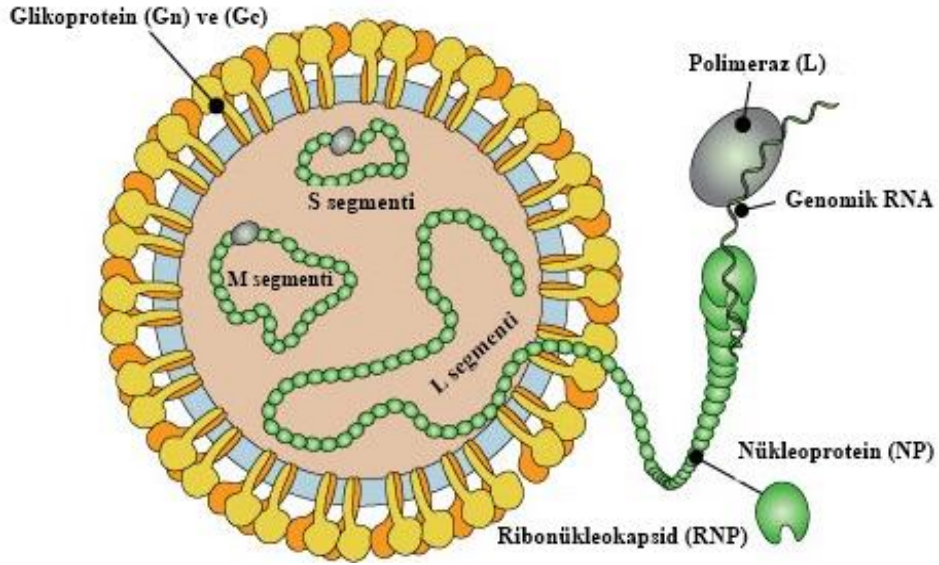


BÖLÜM 2

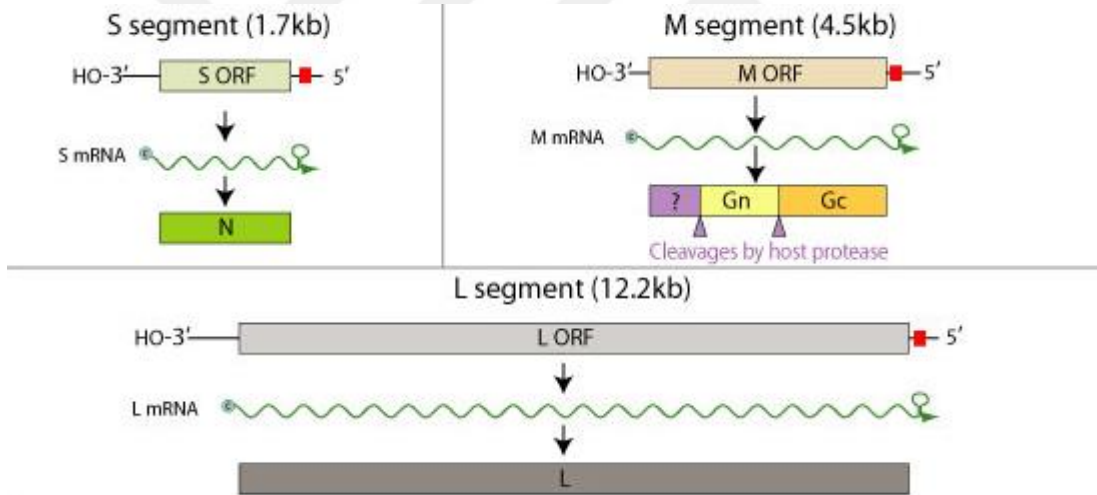
KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞ HASTALIĞI

2.1 KIRIM KONGO ATEŞ VİRÜSÜ

Kırım Kongo Kanamalı Ateş virüsü (KKKAV), Bunyavirus ailesinde bulunan Nairovirus cinsinin bir türüdür (Guo et al. 2012). KKKAV negatif polarite ve tek zincirli yapıya sahip helikel kapsidli, 100 nm boyutunda, zarflı bir RNA virüsüdür. Genomu; üç bölgeden oluşmakla birlikte, tek zincirli RNA (ssRNA) segmentiyle ribonükleoprotein kompleks formuna, nükleokapsid proteini tarafından enkapside olmaktadır. Ribonükleoprotein kompleksi viral genomik RNA'nın transkripsiyonu ve replikasyonu boyunca gereklidir (Wang et al. 2012). KKKAV'nün genomik RNA yapısı; L, M ve S adı verilen üç segment tarafından oluşmaktadır. L segmenti diğer iki segment arasından büyüğüdür ve birden fazla korunmuş fonksiyonel bölgesi ile karakterize olmuş, RNA bağımlı-RNA polimeraz enzimini (RdRp) kodlamaktadır (Kinsella et al. 2004). M segmenti Gn ve Gc adı verilen iki dış zarf glikoproteinini kodlarken, S segmenti viral nükleoproteini kodlamaktadır (Morikawa, Saijo and Kurane 2007). Genomik RNA'nın oluşmasını sağlayan, üç parçadan oluşmuş RNA segmentleri; 482 amino asite sahip olan bir nükleoprotein (NP) tarafından çevrelenmektedir (Saijo et al. 2002).



Şekil 1.1 80-120 nm yarıçapında, küre şeklinde zarflı bir yapıya sahiptir.

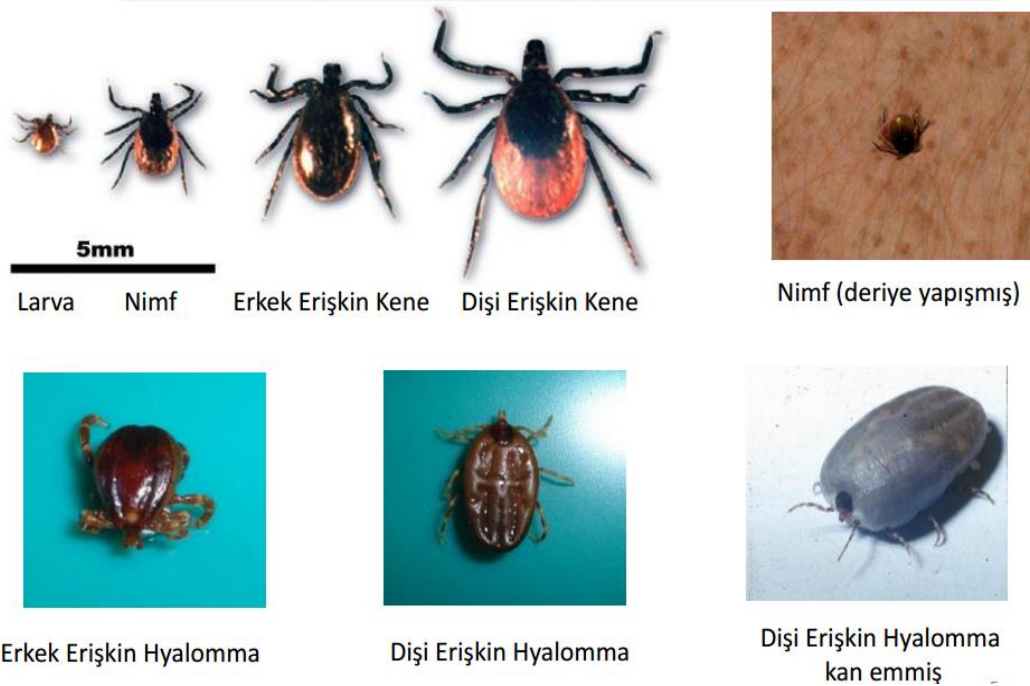


Şekil 1.2 Negatif iplikçikli RNA liner genomu üç segmentten oluşmuştur. L segmenti 6.8 - 12 kb arasında, M segmenti 3.2 - 4.9 kb arasında , S segmenti 1-3 kb arasındadır.

2.2 KIRIM KONGO ATEŞ VİRÜSÜ HASTALIĞI

Kırım Kongo Kanamalı Ateş sendromuna tarihte ilk kez 1944 yılında Batı Kırım bölgesinde rastlanmıştır. İlk kez 2002 yılında Türkiye’de görülen bu hastalık, başta Doğu Afrika ve Batı Afrika olmak üzere Asya ve Avrupa ülkelerinde de yaygın olarak görülmekte olan bir enfeksiyon türüdür (Müdürlüğü 2010).

KKKAV Hyalomma soyuna ait keneler tarafından, insanlara bulaşan, hastalığa sebep olan, bazen de hastalığı ölüme sonuçlandırabilen bir virüs türüdür (Bente et al. 2013). Hyalomma soyu dışında, hastalığı bulaştırdığı bilinen yaklaşık olarak 30 tane farklı türde kene vardır. Bu türlerden bazılarının öldürücü olduğu bilinirken bazı suşların şiddetli hastalıklara sebep olduğu bilinmektedir.



Şekil 1.3 Enfeksiyon yapıcı, kene türleri.

Ülkemizde coğrafi açıdan kırsal alan oldukça fazla bulunmaktadır ve kırsal alanlar kenelerin yaşaması için oldukça elverişli bir ortamdır. Keneler 6-8 bacağı olan, uçamayan, sıçramayan sadece yerden tırmanarak insan vücuduna infekte olan bir eklem bacaklı türüdür. Keneler sadece insan ve hayvan kanı emerek beslendiğinden dolayı,

hastalığı insanlara kolayca bulaştırmaktadırlar. Kenelerin geniş bir konakçı spektrumu vardır (Lani et al. 2014).

Tablo 1.1 Yıllara göre Kanamalı Kırım Kongo Hastalığı vaka- ölüm dağılımı.

| YILLAR | VAKA | ÖLÜM |
|-----------|------|------|
| 2002-2003 | 150 | 6 |
| 2004 | 249 | 13 |
| 2005 | 266 | 13 |
| 2006 | 438 | 27 |
| 2007 | 717 | 33 |
| 2009-2014 | 5824 | 279 |

KKKAH'na yakalanan insanlar ateş, miyalji, ishal, şiddetli kas ağrıları, baş ağrısı, iştahsızlık, mide bulantısı, karın ağrısı gibi şikayetlerle hastanelere başvurumaktadırlar (Williams et al. 2000).

KKKAH için belirlenmiş kesin bir tedavi yöntemi olmamakla birlikte, hastalıktan koruyacak herhangi bir aşı da bulunmamaktadır. Piyasada bulunan Ribavirin adlı antiviral ilacın tedaviye tam olarak yanıt vermediğini gösteren çalışmalar vardır (Lani et al. 2014).

2.3 KANAMALI KIRIM KONGO VİRÜSÜYLE İLGİLİ YAPILAN ÇALIŞMALAR

KKK sporodik insan enfeksiyonlarına neden olabilen, hayvan ve toplum sağlığını da önemli ölçüde tehdit eden bir virüs türüdür. Günümüzde ve geçmiş yıllarda antiviral ve immünoterapötik bileşenler dahil, tedavi stratejileri ve etkili aşı dizaynı üzerine çalışılmaktayken, KKKA patogenezinde; teşhis, epidemiyoloji/ekoloji çalışmaları

yapılmıştır. Günümüzde KKKAV ilgili birçok alanda çalışmalar yapılmıştır (Mishra et al. 2011; Papa et al. 2010; Sekercioglu 2013).

2.3.1 Viroloji Çalışmaları

KKKA temel patolojik anormalitelerin büyük bir kısmı hemorajik belirtilerde, damar işlev bozukluğunun bir sonucudur, dokuya doğru eritrosit ve plazma kırılımıyla oluşmaktadır (Ergonul 2006). Tip 1 interferon (IFN-a/b) üretimi virüs istilasına karşı en etkili ve hızlı konakçı sinyalıdır. Ayrıca IFN'lar antiviral mesajcılar, immun-modülasyonu ve apoptoz regülasyonu ve hücre proliferasyonunun inhibisyonu dahil biyolojik aktivitelerde geniş bir yer kaplamaktadır (Hertzog, O'Neill and Hamilton 2003; Le Bon and Tough 2002). KKKAV, IFN duyarlıdır (Andersson et al. 2006) ve insan konakçılarında yıkıcı etkisi üzerine hala çalışılmaktadır. IFN 'ların oynadığı rolü tespit etmek ve KKKA hayvan modeli geliştirmek için, kontrollü KKKAV replikasyonunu değerlendiren çalışmalar da yapılmıştır (Bente et al. 2010; Bereczky et al. 2010; Zivcec et al. 2013).

Günümüzde hayvan model çalışmaları aktif olan KKKAV enfeksiyonunun pro-inflamatuar yanıtını anlamak için kullanılmaktadır (Zivcec et al. 2013).

2.3.2 Klinik Viroloji Çalışmaları

Hastalığın bulaşmasından korunmak, hem hastalığın ilk günlerini yaşayan hem de durumu kritik olan hastalar için laboratuvar teşhisi yapılmalıdır. Bu nedenle KKKAV teşhisinde örnek toplamak için biyolojik önlem gerekliliği ve zaman alıcı prosedürlere bağlı olarak KKKA teşhisinde virüs izolasyonu nadiren de olsa denenmiştir. Hastalığın akut klinik örneklerinde KKKAV deteksiyonu için moleküler metotlar yaygın olarak kullanılmaktadır (Kaya et al. 2012). Klinik viroloji çalışmaları aşı ve teşhis çalışmalarının dizaynı için yeniden sınıflandırma ve rekombinasyon eşliğinde KKKAV'nün genetik çeşitliliği gözününe alınarak devam etmektedir (Papa et al. 2015).

2.3.3 Moleküler Metotlar

KKKAV genetik soyunun hızlı ve spesifik deteksiyonu için primerler dizayn edilmiştir. KKKAV'nün klinik örneklerde hızlı deteksiyonu için teşhis RT-PCR bazlı olarak yapılmaktadır (Yapar et al. 2005)-(Kondiah et al. 2010). Ticari bir kantitatif RT-

PCR kiti şuan da halen kullanılmaktadır. Moleküler methodlar düşük yoğunluklu makroarray (Wolfel et al. 2009), yüksek yoğunluklu DNA mikroarray (Filippone et al. 2013) kalorimetrik okuyucu kilitli problemler (Ke et al. 2011) ve loop-aracılı izotermal amplifikasyon tayinleri (Osman et al. 2013) dahil, basit ekipmanlar kullanılarak geliştirilmektedir. Bu tayinlerden bazıları kırsal alandaki hastanelerde KKKAV'nün hızlı deteksiyonu için RT-PCR'dan daha pratik olarak görülmektedir. Padlock problemler KKKAV replikasyonu çalışmalarına fırsat veren, komplementar RNA molekülü ve viral deteksiyonun amplifikasyonu in situ rolling döngüsü için kullanılmaktadır.

2.3.4 Serolojik Çalışmalar

Hastalığın 5.gününden sonra serolojik metotlar kullanılmaktadır. Hastalığın şiddetiyle KKKAV'ne sahip hastalarda antikor üretimi olmamakta ya da gecikmektedir. İnsan IgM ve IgG KKKAV spesifik antikorunun deteksiyonu için ELISA ve IFA kitleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Serolojik testlerde antijene benzeyen native (doğal) ya da rekombinant olan NP proteini kullanılmaktadır ve KKKAV NP proteini insanlarda erken indüklenir ve immün yanıt kalıcı ve güçlüdür. Spesifik KKKAV IgM ve IgG deteksiyonu için ELISA geliştirilmiştir (Emmerich et al. 2010). Antijene benzer rekombinant protein kullanarak KKKAV'ne karşı IgG ve IgM antikorunun paralel ölçümü için doğrudan ELISA'nın geliştirilmesi için çalışmalar yapılmaktadır (Vanhomwegen et al. 2012).

KKKAH'nın teşhisi için moleküler ve serolojik testlerin uygulanabilirliği, performansı ve niteliği değerlendirilmektedir (Vanhomwegen et al. 2012). KKKAV moleküler teşhisinin kalitesinin değerlendirmesindeki çalışmalar üzerinde performansla ilgili olarak farklılıklar görülmüştür. Bu farklılıkları göstermek için standardize olmuş protokoller ve gelişmiş performanslar gereklidir (Escadafal et al. 2012). Viral hastalığa sahip hastalarda, hastanın immünolojik statüsünün ve hastalığın izlenebilmesi yanı sıra hastalık boyunca örneklerin günlük değerlendirmesi için serolojik ve moleküler metotların kombinasyonu laboratuvar teşhisinin doğrulanması için önemlidir. Son günlerde yapılan çalışmalarda pseudo-plaque reduction olarak tanımlanan nötralizasyon testi KKKAV nötrale olmuş antikorların ölçümü için hızlı, hassas ve tekrarlanabilir iyi bir methoddur (Canakoglu et al. 2013). Nötralizasyon tayinleri en doğrulayıcı testlerdir.

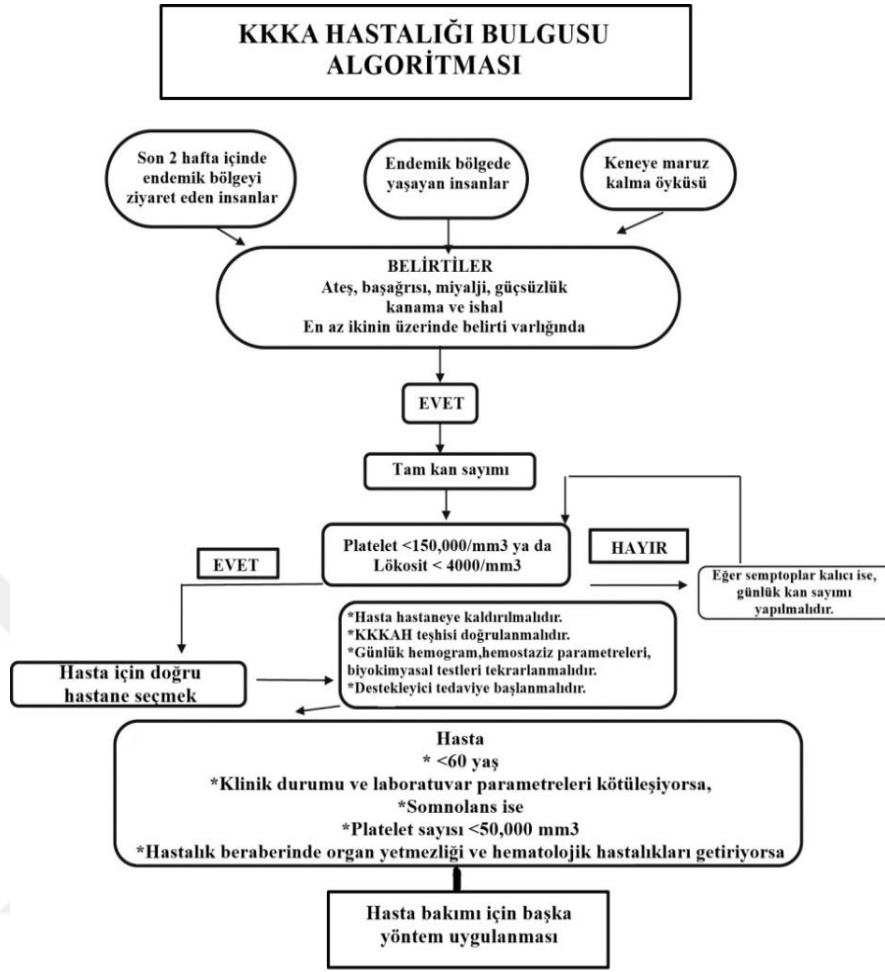
2.3.5 Hastalıktan korunma ve tedavi yolları alışmaları

Tedavi ve korunmaya yönelik çalışmalara günümüzde halen devam edilmektedir. KKKAV hastalarının tedavisi için yeteri derecede etkili ve spesifik bir tedavi uygulaması bulunmamaktadır. Farklılaşmış teşhisler önemlidir. KKKAH'nın spesifik olmayan semptomlarının başlangıcı, diğer enfeksiyonlara benzeyebilir. Bu sebeple yanlış tanı koymaya bağlı olarak, uygun tedavi gecikebilir. KKKHA hastaları etkin destekleyici tedaviyi takiben yakından gözlemlenmelidir (Erduran et al. 2013; Keshtkar-Jahromi et al. 2011).

2.3.6 Destekleyici Tedavi alışmaları

KKKA hastalığının en önemli aşamalardan biri tedavi ve destektir. Aşağıdaki algoritm bunu özetlemiştir (Ergonul 2008; Koksall et al. 2010).

Tablo1.2 KKKAH bulgusu algoritması.



KKKA teşhisinin doğrulanmasıyla hastalar, hastalığın takibi için genelde hastaneye kaldırılmaktadır. Tam kan sayımı, serum elektroliti, transaminaz düzeyleri, renal fonksiyon testleri, pıhtılaşma testleri hastalık hakkında bilgi verici ve çözümseldir. Özellikle solunum yolları ve böbrek komplikasyonları olan hastalar, yoğun bakım ünitesine sevkedilmektedir (Keshtkar-Jahromi et al. 2011; Leblebicioglu et al. 2012). Eğer hastalık kendini gösterirse, kan transfüzyonu ve diğer destekleyici tedaviler; taze donmuş plazma ve platelet transfüzyonu başlatılmaktadır. Tedavisi güç trombositopeniye sahip olan KKKA hastalarına intravenöz immünglobulin verilmektedir (Keshtkar-Jahromi et al. 2011; Leblebicioglu et al. 2012). KKKA vakalarında metilprednisolonun yararının raporlandığı çalışmalar mevcuttur (Dilber et al. 2010).

2.3.7 Antiviral Tedavisi Çalışmaları

Ribavirin bazı DNA ve RNA virüslerine karşı etkili ve virüsün sahip olduğu genetik materyalinin replikasyon olmasına müdahale eden antiviral bir ilaçtır (Bodur et al. 2011). KKKAV hastalığının kesin olarak tedavisi bilinmemektedir (Ceylan et al. 2013). Ribavirinin RNA virüslerine karşı etkisi bilindiğinden dolayı, KKKV hastalığı üzerinde ribavirinin etkisi araştıran çalışmalar yapılmıştır. Laboratuvar ortamında (in vitro) yapılan çalışmalarda ribavirinin etkinliği gösterilmiştir ancak klinik çalışmalarda hem etkinliğini hem de etkinliğinin olmadığını gösteren yayınlar vardır (Ergonul et al. 2004; Kurnaz et al. 2011; Mardani et al. 2003; Tignor and Hanham 1993).

Ribavirin KKKAV vakalarının tedavisi için kullanılan tek antiviral ilaçtır. Ribavirinle yapılan konsantrasyona bağlı in vivo ve in vitro çalışmada KKKAV replikasyonunu inhibe ettiği görülmüştür (Tignor and Hanham 1993). İnsanlarda yapılan klinik tetkiklerde geniş bir tesiri bulunmaktadır (Keshtkar-Jahromi et al. 2011). Fakat ribavirinin tesiri yine de tartışmalıdır. Bazı çalışmalarda hastalığın erken aşamasında ribavirinin faydasını gösterdiği görülmektedir (Tasdelen Fisgin et al. 2009). Fakat buna rağmen günümüzde yapılan çalışmalar ribavirinin faydasının desteklendiğini göstermemektedir. Bu çalışmalara rağmen 2004-2007 yıllarında Türkiye’de %12 ‘den %68’e ribavirin kullanımında bir azalma görülmüştür ve %5 civarında sabit kalan KKKAV ölüm oranındaki artış riski göze alınmıştır (Yılmaz et al. 2009). Randomize edilmiş ileriye dönül çalışmalar Türkiye’de Karadeniz bölgesinde gerçekleştirilmiştir ve bu çalışmalar ribavirin alındığında ya da alınmadığında hastalarda görülen ölüm oranı benzer göstermekle beraber, ribavirin tedavisi gören hastaların hastanede tedavi işlemi uzun sürdüğünü göstermiş ve ribavirin verilen KKKAV hastalarında klinik ve laboratuvar parametrelerinde pozitif etkinin belirlenmediğini saptamıştır (Koksal et al. 2010). Yayınlanan sistematik bir derleme ve meta-analiz KKKA tedavisinde ribavirinin etkili olduğu düşüncesini destekleyici bulmamaktadır. Ribavirin tedavisi gören ve görmeyen hastalar karşılaştırıldığında ribavirinle tedavi gören hastaların, canlılık oranının azaldığı, tedavisi süresinin uzunluğunun kısalmış olduğu ve kan ve kan ürünlerinin azalmasına neden olduğunu göstermemektedir (Ascioglu et al. 2011). Benzer sonuçlar diğer bir meta-analiz raporlamasından ribavirin alan hastalarda ilaca bağlı olumsuz etkiler raporlanmıştır (Soares-Weiser et al. 2010). Diğer bir taraftan, 6 hasta üzerinde yapılan çalışma enfeksiyonda erken ribavirin tedavisi ve

kortikosteroidlerle tedavi edilme kombinasyonunun daha yararlı olabileceğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (Jabbari et al. 2006).

2.3.8 Spesifik İmmüoglobulin Tedavisi Çalışmaları

Geçmiş yıllarda, bazı KKKAV hastaları at immunoglobulini ve iyileştirilmiş insan serumuyla birlikte tedavi edilmekteydi. Yani datalara ilişkin bu yaklaşımların geçerliliği hala sınırlıdır (Keshtkar-Jahromi et al. 2011; Soares-Weiser et al. 2010). Başta Bulgaristan olmak üzere, teröpatik ve profilaktik (hastalıktan koruyan ilaç) amaç için iyileştirilmiş KKKAV olan hastaların plasmasından spesifik immüoglobulin türetilip, kas içinden verilmektedir (Christova et al. 2009). Türkiyede yapılan bir çalışmada, yüksek miktarda viral KKKAV (10^8 kopya/mL) hastalığına sahip 15 hasta için, sağlıklı donörlerden KKKAV hiperimmüoglobulini hazırlanmıştır. Özellikle yüksek risk taşıyan hastalar için, anti-KKKAV hiperimmüoglobulin uygulaması teröpatik bir amaç olarak gösterilebilmektedir (Kubar et al. 2011).

2.3.9 Aşı ve Antiserum Çalışmaları

Hastalığa yada enfeksiyona neden olan mikroorganizmalara karşı bağışıklıktan sonra doğal yada yapay yollarla oluşturulmuş antikorları içeren seruma antiserum adı verilir (Berzofsky et al. 2004). Kanamalı Kırım Kongo Ateş virüsü hastalığı tedavisi için başta Bulgaristan ve Rusya olmak üzere Türkiye’de de antiserum elde etme ve geliştirme çalışmaları yapılmaktadır. Tıbbi araştırmalarda kullanıldığı en iyi bilinen Antilenfositik serum (ALS) adlı immünosupresandır (David-West and Osunkoya 1973). 1973 yılında Kongo virüsüyle enfeksiyon üzerine antilenfositik serumun etkileri çalışılmıştır ve ALS’nin önemli oranda enfeksiyonu iyileştirdiği görülmüştür. Antiserum uygulamaları yaklaşık 25 yıl önce ilk kez Bulgaristan’da yedi kişi üzerinde denenmiştir, antiserum tedavisinin yararlı olduğu hakkında net bir bilgi bulunmamaktadır. Yapılan çalışmada kişi sayısı çok düşük, tutulan verilerin çok az ve net olmamasından dolayı literatürde tedavinin bu şekilde yapılabilir olduğu hakkında kesin bilgi yoktur.

KKKAV aşı çalışmaları 1960 yıllarında başlamıştır (Keshtkar-Jahromi et al. 2011). İlk inaktif (ölü) aşı, KKKAV infekte olmuş fare ve sıçanlardan türetilmiş beyin dokusu temel alınmıştır. Bu aşı Sovyet Sağlık Bakanlığı tarafından 1970 yılında

onaylanmıştır. Aynı yıl, 2.ve 3. aşılardan sonra ve aşılardan önce yaklaşık 2000 sağlıklı bireyden serum örneği toplanmıştır ve nötralize KKKAV antikörlerinin varlığı test edilmiştir. Nötralize KKKAV antikörleri 3.dozdan sonra 1-4 hafta arasında gelişmektedir fakat 3-6 ay sonra azalmaktadır (Keshtkar-Jahromi et al. 2011; Maltezu and Papa 2011).

1974 yılında Sovyet aşısı Bulgaristanda ruhsatlandırıldı ve KKKAV'nün endemik olduğu yerlerde tarım çalışanları ve sağlık personelleri, ordu tarafından kullanıldı. Bulgaristan Sağlık Bakanlığı aşılamanın tanıtımından sonra KKKAV vakasının 4 kat azaldığının sayısını 22 yıllık periyotta raporlamıştır (Christova 2010).

Günümüzde DNA aşısı veya virüse benzer partükül temelli modern aşı yaklaşımları gelişmeye devam etmektedir ve knock-out fare modeliyle aşı geliştirilmesi için soruna yönelik çalışmalar yapılmaktadır (Keshtkar-Jahromi 2011; Mertens 2013).

KKKAV ile geniş spektrumda birçok çalışma yapılmıştır. 2005 yılında yapılan bir diğer çalışmada ise, KKKV glikoproteininin antijenik karakterizasyonu ve hücrel lokalizasyonu saptanmıştır. Yapılan çalışmada monoklonal antikor (MAbs) kullanılarak, yalnız yada beraber ekspres olduğunda G_N ve G_C 'nin lokalizasyonu ve glikoproteinlerin lokalizasyonundaki etkileşimi tanımlanmıştır (Bertolotti-Ciarlet et al. 2005).

İstanbul'daki KKKA vakaları tanımlanmış ve virüslerin genetik çeşitliliği hakkında çalışmalar yapılmıştır. PCR ve RT-PCR kullanarak KKKV enfeksiyonu görüntülenmiş ve aynı zamanda vakaların kan örnekleri serolojik araştırmalar için Ankaradaki laboratuvara gönderilip, incelenmiştir. 91 hastanın 10'u PCR ile saptanmış ve 10 hastadan 9'unun anti-KKKV IgM pozitif olduğu saptanmıştır. Klinik bulgularının arasında ateş, kanama ve miyalji olduğu görülmüş ve akciğer enzimleri, keratinin fosfokinaz ve laktaz dehidrogenaz seviyelerinde artış olduğu yapılan çalışmada gösterilmiştir (Midilli et al. 2007).

Üç hamile kadın kene ısırması sonucu incelenip, hastalar çeşitli testlerden geçmiştir ve hamilelik ve KKKA alanında da çalışma yapılmıştır. KKKAV enfeksiyonu geçiren hamile kadınlarda çocuk düşürme yada neonatal komplikasyonlara ve ölüme neden olabileceği saptanmıştır. KKKV'ün geçişi intrauterin ya da perinatal ile olabileceği düşünülmüştür (Ergonul et al. 2010).

2.4 NÜKLEOPROTEİNİN ÖNEMİ VE AŞI POTANSİYELİ

Virüsler DNA ya da RNA ile çevrelenmiş nükleoproteinlerdir. Yeni bir viral nükleik asitin sentezi, proteinin kabuğu, konak hücrede viral üreme için gerekli olan yeni enzim için gerekli olan genetik bilgiyi nükleik asit taşımaktadır.

RNA virüslerinin negatif ipliğinin tüm genomları, nükleoprotein (NP) tarafından örtülüdür. Viral RNA'ya bağımlı RNA polimeraz birlikte, ribonükleoprotein kompleks formları tüm viral transkripsiyonu ve replikasyonu için en küçük fonksiyonel birimdir (Turell et al. 2013). Nükleoprotein (NP) çok fonksiyonlu bir protein olmakla birlikte, viral yaşam döngüsünün bir çok safhasında RNA kılıflanmasının yanında ribonükleoprotein viral aşlamaya karşı geliştirilmesi ve konak hücre interferon cevabının inhibisyonu gibi rolleri de vardır (Martinez-Sobrido et al. 2006).

NP protein bir iç zar proteinidir ve iç zar proteinleri daha az mutasyona uğrar. NP proteini T hücrelerini aktive eder ve NP'nin korunmuş epitoplarına karşı alınan T hücre yanıtlarının, ana korunma mekanizması olduğu düşünülmektedir. Bu da aşı NP'nin aşı potansiyeli özelliği taşıdığı bir göstergesidir. NP ile stimule edilen T hücreleri, naïve fareye verildiğinde korunma transferi gerçekleştiğini gösteren çalışmalar vardır (Epstein et al. 2005; Huang et al. 2012). Ayrıca T hücrelerinin aşılama farelerde azalması, korunma için kötü bir etki gösterebilir ve NP ile yapılan aşılama ile CD4 ve CD8 T hücreleri koruma sağlamaya katkıda bulunabilir (Kedzierska, Turner and Doherty 2004). NP proteiniyle patolojik ve yaygın olan bir çok hastalığa karşı aşı çalışması yapılmıştır (Antrobus et al. 2014; Rodriguez-Carreno et al. 2005; Walter Muranyi* 2005).

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOT

3.1 KLONLAMA ÇALIŞMALARI İÇİN KULLANILAN KİMYASALLAR

Klonlama çalışmaları için gerekli olan enzimler Thermo Scientific/USA firmasından temin edilmiştir.

Jel ve PCR temizleme sistemi olarak Wizard SV Gel and PCR Clean-up System Promega/USA firmasından temin edilmiştir.

3.2 EKSPRESYON ÇALIŞMALARI İÇİN KULLANILAN KİMYASALLAR

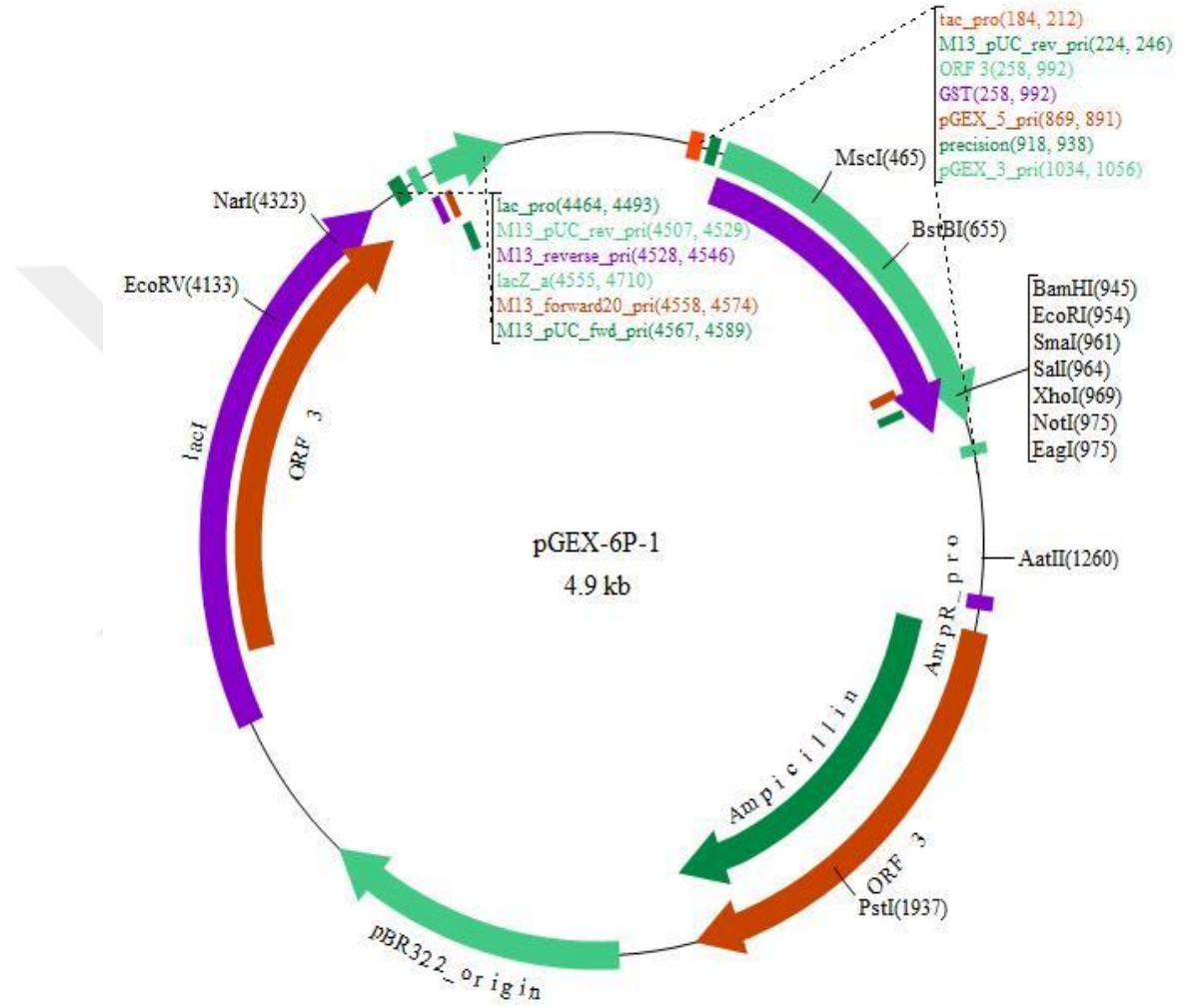
Bakteri kültürü ve SDS-PAGE çalışmaları için kullanılan tüm kimyasallar Sigma Aldrich, Merck, Biomatik firmalarından temin edilmiştir. Moleküler biyoloji çalışmaları için kullanılan enzimler, kimyasallar ve kitler, Thermo Scientific, Qiagen, Sigma ve Promega firmalarından sağlanmıştır.

3.2.1 Bakteri Kültürü Çalışmaları için Kullanılan Hücre Soyları

Klonlama ve stok yapmak üzere F- 80dlacZ M15 (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1hsdR17(rk-, mk+) phoAsupE44 -thi-1 gyrA96 relA1 genotipine sahip olan Dh5 α .hücresi (Laboratories 2014) , ekspresyon çalışmaları için ise F⁻ ompTgaldcmlonhsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) genotipine sahip olan hücre kullanılmıştır (Studier FW 1990).

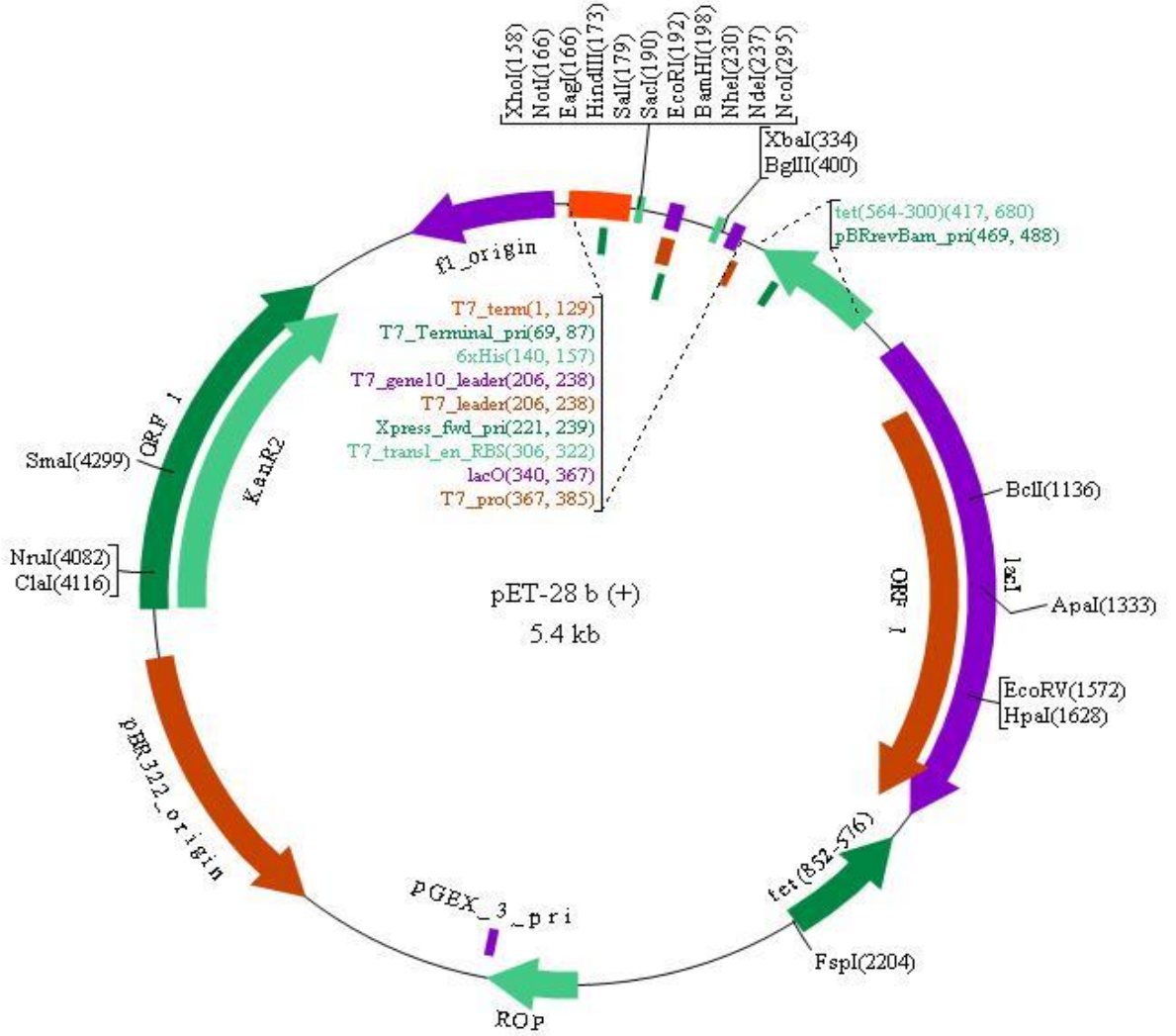
3.2.2 Bakteri Kültürü Çalışmaları için Kullanılan Plazmitler

Çalışmada klonlama ve ekspresyon amaçlı kullanılan plazmid pGEX-6P-1'in plazmid haritası şekil 2.1'de gösterildiği gibidir.



Şekil 2.1 pGEX-6P1 Vektör Haritası.

Çalışmada kullanılan ekspresyon amaçlı plazmid pET28b (+)'dir. Plazmid haritası şekil 2.2'de gösterildiği gibidir.



Şekil 2.2 pET28b (+) Vektör Haritası (Rood 2005).

3.3 ÇALIŞMADA KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER

Tablo 2.1 Deney esnasında kullanılan araç ve gereçler.

| Kullanılan Gereç | Marka |
|------------------------------|--------------------|
| -80 C Buzdolabı | DaihanScientific |
| CO2 'li İnkübatör | ThermoScientific |
| Otoklav | Alp |
| pH metre | Ohaus |
| Su banyosu | Inovia |
| SDS-page aparatları | ThermoScientific |
| Mikrosantrifuj | ThermoScientific |
| Santrifuj | Inovia |
| Agaroz jel aparatları | ThermoScientific |
| Orbital Çalkalayıcı | Inovia |
| Elektroforez Güç Kaynağı | ThermoScientific |
| Isıtıcı Blok | Inovia |
| Vorteks | ThermoScientific |
| Buz makinesi | Scotsman AF80 |
| Pipetler | ThermoScientific |
| Elektronik tartı | Densi |
| Etüv | ThermoScientific |
| Western Blot aparatları | Biorad |
| Çalkalayıcı İnkübatör | ThermoScientific |
| Nanodrop | ThermoScientific |
| LaminarFlow | Isocide/Labculture |
| +4 ve -20 Buzdolabı | Samsung |
| Mikrodalga Fırın | Arçelik |
| Mikroskop | Lecica DFC295 |
| Manyetik karıştırıcı ısıtıcı | Biosan |
| Santrifuj | Nüve NF8000 |
| PCR makinesi | Techne |

3.4 BAKTERİ KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI İÇİN HAZIRLANAN TAMPON VE ÇÖZELTİLER

LB broth: 25gr/mL toz halindeki sıvı besiyeri 1000 mL dH₂O içerisinde çözülerek, 121 °C'de 20 dakika otoklavlanarak hazırlandı.

LB Agar: 35gr/mL toz halindeki katı besiyeri 1000 mL dH₂O içerisinde çözülerek, 121 °C'de 20 dakika otoklavlanarak hazırlandı.

Kanamisin stok solüsyonu: 0.5 gr/mL toz halindeki antibiyotik 10 mL ddH₂O içerisinde çözülüp, 0.22 µm'lik filtre kullanılarak steril edildi ve eşit miktar olacak şekilde ependorf tüplere aktarılıp, -20°C de muhafaza edildi.

0.5 M IPTG stok solüsyonu: 2.38 gr IPTG, 20 mL dH₂O içinde çözülerek, 0.22 µm'lik filtre yardımıyla steril edildi ve eşit miktarda olacak şekilde ependorf tüplere aktarılıp, -20°C'de muhafaza edildi.

1 mg/mL DNase stok: 10 mg DNase 75 mM NaCl ve %20 gliserol içeren 10 mL ddH₂O içerisinde çözüldü ve eşit miktarda olacak şekilde ependorf tüplere aktarılıp, -20°C'de muhafaza edildi.

5 mg/mL RNase stok solüsyonu: 5 mg RNase , 1 mL ddH₂O içerisinde çözülüp ve ddH₂O içerisinde çözüldü ve eşit miktarda olacak şekilde ependorf tüplere aktarılıp, -20°C'de muhafaza edildi.

100 mM PMSF: 174 mg toz halindeki phenylmethanesulfonylfluoride 10 mL isopropanol çözülüp, ependorf tüplere eşit şekilde aktarılıp, -20°C'de muhafaza edildi.

1M DTT stok solüsyonu: 1.54 gr toz halindeki ditiyotretol (DTT) 10 mL dH₂O içinde çözülüp, 0.22 µm şırınga yardımıyla filtrelendikten sonra ependorf tüplere eşit şekilde aktarılıp, -20°C'de muhafaza edildi.

10 mg/mL lizozom stok solüsyonu: 1gr lizozom 100 mL ddH₂O içerisinde çözülüp ve eşit miktarda olacak şekilde ependorf tüplere aktarılıp, -20°C'de muhafaza edildi.

1M NaH₂PO₄ stok tamponu: 29.995 g toz halindeki sodyum fosfat 250 mililitre dH₂O içinde çözülüp ve 0.22 µm şırınga yardımıyla filtrelendi. (NaH₂PO₄: 119.98g/mol)

5M NaCl stok tamponu: 292.214 g/mol toz halindeki sodyum klorür 1 litre dH₂O içinde çözülüp, filtre yardımıyla steril edildi. (NaCl:58.449 g/mol)

500 mM İmidazole stok tamponu: 3.40 g toz halindeki imidazol alındı ve 100 mililitre dH₂O içinde çözüldü. (İmidazol: 68,077g/mol)

3.5 NATIVE PROTEİN PURİFİKASYONU

3.5.1 Native (Doğal) Protein Purifikasyonu için Hazırlanan Tampon ve Çözeltiler

3.5.1.1 Liziz Tamponu Hazırlanışı

50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 10mM İmidazol, 5mg/mL RNase, 1mg/mL DNase, 10mg/mL Lizozom, 150mM PMSF

Total hacim 20 mL olacak şekilde dH₂O eklendi ve total hacimin %0.05'i kadar triton ilave edildi. Çözelti; manyetik karıştırıcı kullanılarak, homojen hale getirilip, kullanılmadan önce, pH 8.0 olacak şekilde ayarlandı.

3.5.1.2 Yıkama Solüsyonu Hazırlanışı

50mM NaH₂PO₄, 100mM NaCl, 20mM İmidazol

Kimyasalları eklenip, total hacim 40 mL olacak şekilde dH₂O eklendi ve çözelti; manyetik karıştırıcı kullanılarak, homojen hale getirilip, kullanılmadan önce, pH8.0'a ayarlandı.

3.5.1.3 Elüsyon Solüsyonu Hazırlanışı

50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 250mM İmidazol

Kimyasalları eklenip, total hacim 10 mL olacak şekilde dH₂O eklendi ve çözelti; manyetik karıştırıcı kullanılarak, homojen hale getirilip, kullanılmadan önce, pH 8.0'a ayarlandı.

3.6 DENATURASYON İLE PROTEİN PURİFİKASYONU

3.6.1 Denatürasyon ile Protein Purifikasyonu için Hazırlanan Tampon ve Çözeltiler

3.6.1.1 Liziz Tamponu Hazırlanışı:

20mM NaH₂PO₄, 500mM NaCl, 8M UREA

Kimyasalları eklenip, total hacim 10 mL olacak şekilde dH₂O eklendi ve çözelti; manyetik karıştırıcı kullanılarak, homojen hale getirilip, 56 °C’de ısıtıldı ve filtreden süzülerek steril edildi. Çözelti kullanılmadan önce, pH 7.8’e ayarlandı.

3.6.1.2 Yıkama Tamponu Hazırlanışı

20mM NaH₂PO₄, 500mM NaCl, 8M UREA, 10mM İmidazole

Kimyasalları eklenip, total hacim 40 mL olacak şekilde dH₂O eklendi ve çözelti; manyetik karıştırıcı kullanılarak, homojen hale getirilip, 56 °C’de ısıtıldı ve filtreden süzülerek steril edildi. Çözelti kullanılmadan önce, pH 6.0’a ayarlandı.

3.6.1.3 Elüsyon Tamponu Hazırlanışı

20mM NaH₂PO₄, 500mM NaCl, 8M UREA

Kimyasalları eklenip, total hacim 5 mL olacak şekilde dH₂O eklendi ve çözelti; manyetik karıştırıcı kullanılarak, homojen hale getirilip, 56 °C’de ısıtıldı ve filtreden süzülerek steril edildi. Çözelti kullanılmadan önce, pH 4.0’a ayarlandı.

3.7 SDS-PAGE JEL ELEKTROFOREZİ

3.7.1 SDS-PAGE Jel Elektrofrezisi için Hazırlanan Tampon ve Çözeltiler

1.5M Tris-Cl : Ayırma jeli için gerekli olan 9.09 gr Tris, 50 mL dH₂O içinde çözülüp, HCl ile pH’ı 8.8 ‘e ayarlandı.

1.0M Tris-CI: Yıgma jeli için gerekli olan 6.06 gr Tris, 50 mL dH₂O içinde çözülüp, HCl ile pH'ı 6.8 'e ayarlandı.

%10 SDS: 0.1gr SDS (Sodyum Dedosil Sülfat) 10 mL dH₂O içinde çözülüp, oda sıcaklığında muhafaza edildi.

%10 APS: 0.1gr APS (Amonyum Per Sülfat), 10 mL dH₂O içinde çözülüp, +4°C'de muhafaza edildi.

%10'luk Ayırma Jelinin Hazırlanışı: Jeli hazırlamak için; 2 mL dH₂O, 1.7 mL 1.5M Tris-CI (pH:8.8), 1.3 mL %10 Akrilamid karışımı (sigma A3574), 50 µL %10 SDS, 50µL, %10 APS, 2 µL temed kullanıldı ve jelin polimerize olması için 40 dakika inkübe edildi.

Toplayıcı Jelin Hazırlanışı: Jeli hazırlamak için; 1.4 mL dH₂O, 330 µL 1.0 M Tris-CI (pH:6.8), 250 µL %10 Akrilamid karışımı (sigma A3574), 20 µL %10 SDS, 20 µL %10 APS, 2 µL temed kullanıldı ve jelin polimerize olması için 40 dakika inkübe edildi.

4X'lik Numune Tamponu Hazırlanışı: 2.4 mL 1M Tris/HCl pH:6.8, 4 mL %100 (v/v) gliserol, 0.8 g SDS, 4mg Bromofenol mavisi, 0.5 mL βmercaptoethanol kimyasalları ile hazırlanan numune tamponu, eşit miktarda 1.5 mL'lik ependorf tüplere paylaştırıldı.

SDS Yürütme Tamponunun Hazırlanması: 1X SDS yürütme tamponu için; 3 g Tris-Baz, 14.4 g Glisin, 1 g SDS kimyasalları alınıp, 1 L dH₂O'ya eklendi. Manyetik karıştırıcıda karıştırılıp, homojen hale gelen tamponun pH'ı 8.3'e ayarlandı.

Boyama Solüsyonunun Hazırlanması: 0.5 gr %0.1 Comassive Blue Brilliant, 200 mL %40 Metanol, 10 mL %2 Asetik asit kimyasalları alınıp, 500 mL dH₂O'ya eklendi. Manyetik karıştırıcıda karıştırılıp, homojen hale getirildi. Hazırlanan tampon oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Boyayı Çözme Solüsyonunun Hazırlanması: 200 mL %40 Metanol, 10mL %2 Asetik asit kimyasalları alınıp, 500 mL dH₂O'ya eklendi. Manyetik karıştırıcıda karıştırılıp, homojen hale getirildi. Hazırlanan tampon oda sıcaklığında muhafaza edildi.

3.8 WESTERN BLOT

3.8.1 Western Blot Çalışmaları için Kullanılan Kimyasallar

Kullanılan antikor pierce His-Tag Monoklonal antikor, Thermo Fisher Scientific/USA ve kullanılan kimyasallar Sigma Aldrich /USA firmasından sağlandı.

Blotlama için kullanılan fiber ped ve PVDF membran GE Healthcare Life Sciences/USA firmasından sağlandı.

Deteksiyon için kullanılan SprayRapidStep™ ECL maddesi (Merck/USA) firmasından temin edildi.

3.8.1.1 Transfer Tamponu Hazırlanışı:

25 mM Tris pH:8.3, 192 mM glisin, %20 (v/v) ethanol, %0.05 (w/v) SDS kullanılarak, total hacmi 1000 mL olacak şekilde dH₂O ile tamamlandı. Manyetik karıştırıcı ile karıştırıldıktan sonra homojen hale gelen karışım +4°C'de muhafaza edildi.

3.8.1.2 1X PBS-T Tamponu (Yıkama Tamponu) Hazırlanışı:

10X PBS tamponundan 100 mL alınarak, 900mL dH₂O'ya ilave edildi. İçerisine %0.1 olacak şekilde Tween 20 eklendi. Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

3.8.1.3 Blotlama Solüsyonu Hazırlanışı:

Hazırlanan 1X PBS-T solüsyonundan 250 mL alınarak, içerisine %5 süt tozu ilave edildi ve karıştırıcı yardımıyla homojen hale getirilen süt tozu, +4°C'de muhafaza edildi.

3.9 ENDOTOKSİN ÇALIŞMALARI

3.9.1 Kromojenik Endotoksin Miktar Tayini için Kullanılan Kimyasallar

Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantiation Kit, Thermo Fisher Scientific/USA firmasından temin edilmiştir.

3.9.2 Kromojenik Endotoksin Miktar Tayini Kiti için Solüsyonların Hazırlanışı

Liyofilize olmuş *Escherichia Coli* (*E.coli*) endotoksin standart (011:B4) 1 mL endotoksinsiz suyun içerisinde çözüldü ve farklı konsantrasyonlarda hazırlandı. Daha sonra, liyofilize olmuş limulusamebocyte lysate 1.4 mL endotoksinsiz suyun içerisinde çözüldü. Son olarak kromojenik substrat ise 6.5 mL endotoksinsiz suyun içerisinde çözüldü. Endotoksin miktar tayini yapılması için protein; istenilen konsantrasyona getirilerek, pH'ı 6-8'ye ayarlandı.

3.10 METOT

3.10.1 *E.coli*'nin BL21(DE)3 ve DH5 α soyu için Kompetent Hücre Hazırlanışı

LB katı besiyerine, *E.coli*'nin DH5 α soyu olan bakteri, tek koloni halinde ekilmiştir. Ekilen kolonilerden bir tane alınarak, 5 mL LB sıvı besiyerine, 5 μ L amphisilinle birlikte 37°C'ye ayarlanmış çalkalayıcı inkübatör içerisinde 220 rpm'de bir gece boyunca bırakıldı. 16-18 saat sonra, sıvı bakteri kültüründen 1 mL alındı ve 200 mL LB sıvı besiyerinin içerisine, 200 μ L amphisilinle birlikte aktarılıp, 37°C'ye ayarlanmış çalkalayıcı inkübatörün içinde 200-250 rpm'de 3 saat boyunca OD₆₀₀= 0.6'ya çıkıncaya kadar büyütüldü. OD₆₀₀=0.6'ya ulaşan kültür, bu aşamada 10 dakika boyunca buzda bekletildi. Kültür falkon tüplere aktarılarak +4°C 'de 3600 rpm'de 15 dakika boyunca sentrifuj edildi ve supernatant atıldı. Pellet, 10 mL 0.1M CaCl₂ ile yavaşça çözüldü ardından, 1200 rpm'de 10 dakika boyunca sentrifujlendi ve supernatant atıldı. Pellet, 6.5mL 0.1M CaCl₂ ile çözüldü ve 0°C'de 2 saat boyunca inkübe edildi. Daha sonra üzerine 1.2mL otoklavlanmış %80 gliserol eklendi ve buz içinde 10 dakika boyunca bekletildi. Hazırlanan kompetent hücre 1.5 mL'lik ependorf tüplere eşit miktarda bölündü ve -80°C'de muhafaza edildi.

3.10.2 Transformasyon

-80°C’de muhafaza edilen *E.coli*’nin DH5 α soylu kompetent hücrelerinden alındı ve 10 dakika boyunca buzda bekletildi. Çözünen kompetent hücrelerin içerisine, verimliliği arttırmak amacıyla 2 μ L 0.5M β -mercaptoethanol eklendi ve 1 dakika boyunca buzda inkübe edildi. Daha sonra kompetent hücrelerden 3 adet alındı ve sırasıyla NP geni, pET28b, pGEX6P1 plasmidlerinden 1’er μ L eklendi. 30 dakika boyunca buzda bekletildi. Isıtıcı blok yardımıyla 42°C’de 30 saniye boyunca ısı şok uygulandı ve 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Oda sıcaklığındaki 450 μ L LB sıvı besiyeri, sırasıyla tüplere katıldı ve 37°C’ye ayarlanmış çalkalayıcılı inkübatörde 1 saat 220 rpm’de inkübe edildi. Bir saatin ardından hücreler sırasıyla, transformasyon için hazırlanan amphisilinli ve kanamisinli katı besiyerine yayma yöntemiyle ekildi ve 37°C’de 1 gece inkübe edildi.

3.10.3 Plazmid DNA Purifikasyonu (Midiprep)

Transfekte edebilecek saflıkta plazmitin elde edilmesi için, DNA izolasyonu IDTM PURE Spin Column Plasmid DNA Midiprep Kit (Labs Biotechnology / Canada) kullanılarak yapıldı. İlk olarak falkon tüp içerisine, 5 mL LB sıvı besiyeri, 5 μ L kanamisin ve pET28b tek koloni koyuldu ve 37°C’de 1 gece inkübe edildi. 100 μ L Solusyon I pelletin üzerine eklendi ve yavaşça karıştırıldı. 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve 200 μ L Solusyon II, karışımın üzerine eklendi ve karışımın eklendiği falkon tüp, 4-6 kez bir alt bir üst şeklinde yavaşça karışması için çevrildi. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi. İnkübe olan karışımın üzerine, 350 μ L Solusyon III eklendi ve yavaşça karıştırıldı. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi. Solusyon I, II, ve III ile çözülen pellet, 12000 rpm’de 5 dakika sentrifuj edildi. Sentrifuj edilen karışımın supernatant kısmı kolona aktarıldı ve 10000 rpm’de 2 dakika sentrifuj edildi. Sentrifuj edilmiş karışımın, flow-trough kısmı atıldı ve kolon iki kez 750 μ L yıkama solüsyonu ile yıkandı. Otoklavlanmış 1.5mL ependorf tüpün içerisine transfer edildi, 50 μ L elusyon tamponu ile 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve 10000 rpm’de 2 dakika sentrifuj edildi. Purifikasyon işlemi bittikten sonra, nanodrop ile elde edilen DNA’nın konsantrasyonu ölçüldü. DNA -20°C’de muhafaza edildi.

3.10.4 İki restriksiyon enzimiyle DNA vektörünün Kesimi

pET28b için, NcoI ve XhoI enzimi (Thermo Scientific/Fermantas) kullanıldı. İlk olarak 1 µg pET28b için, 4 µL 10 X Fast Digest buffer, 1 µL XhoI enzimi, 1 µL NcoI enzimi, 14 µL dH₂O kullanıldı. İyice pipetlendi ve birkaç dakika sentrifuj edildi. 37°C'ye ayarlanmış ısıtıcı blok ile 3 saat inkübe edildi ve hazırlanan %1'lik agaroz jelde yürütüldü.

3.10.5 Kesilen vektörün purifikasyonu

İki restriksiyon enzimiyle kesilmiş olan plazmid, %1'lik agaroz jelde yürütüldü. Agaroz jel elektroforezi bittiğinde, jel UV altında gözlemlendi. Kesilen DNA bandının bulunduğu kısım jelden kesilip çıkarıldı ve tartıldı. 1.5 mL'lik ependorf tüpe aktarıldı. Kesilen her 10 µg DNA bandı için, 10 µL membran bağlama solüsyonu uygulandı. Jelin tamamı çözülene kadar 55°C'de inkübe edildi. Çözünen jel mini kolona transfer edildi ve 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve 16000 x g 'de 1 dakika sentrifuj edildi. Ethanol eklenmiş, 700 µL yıkama solüsyonu ile yıkandı ve 16000 x g 'de 1 dakika sentrifuj edildi. Flow-trough kısmı atıldı. 500 µL membran yıkama solüsyonu ile yıkandı ve 16000 x g 'de 5 dakika sentrifuj edildi. Kolon otoklavlanmış 1.5 mL'lik ependorf tüpe takıldı ve 50 µL nüklazsız su (elüsyon tamponu) ile kolon yıkandı. İki enzimle kesilen plazmid, ethanolden kurtulmak için 1 dakika kapağı açık şekilde, oda sıcaklığında inkübe edildi. 16000 x g'de 1 dakika sentrifuj edildi ve elde edilen ürün -20°C'de muhafaza edildi.

3.10.6 NP geninin PCR ile çoğaltılması

NP geninin PUC57 vektöründen spesifik iki primer dizayn edildi.

Primerler;

hNP-BamHI-Forward: GACGGATCCATGGAAAACAAAATCG

hNP-XhoI-Reverse: ATCTCGAGTTAAATGATGTTGGCGCT.

Bu primerler Sentegen/Türkiye firmasından temin edildi.

İlk olarak 1 µg NP geni alındı ve PCR ile çoğaltılması için üzerine, 0.5µL BamHI-Forward primer ve 0.5 µL XhoI-Reverse primer eklendi. Üzerine 25 µL Dream Taq PCR Master Mix ve 25 µL dH₂O eklendi. Polimeraz zincir reaksiyonu için (TECHNE-TC512) gerekli olan sıcaklık; 95°C 3 dakika 1 siklus, 95°C 30saniye, 56°C 30 saniye,72°C 1 dakika'da toplam 30 siklus, 72°C 10 dakika 1 sikludur. Oluşan PCR ürünü %1'lik agaroz jelde görüntülendi.

3.10.7 NP Geni'nin Agaroz Jel'den İzolasyonu

PCR ile çoğaltılmış olan gen, %1'lik agaroz jelde yürütüldü. Agaroz jel elektroforezi bittiğinde, jel UV altında gözlemlendi. Kesilen DNA bandının bulunduğu kısım jelden kesilip çıkarıldı ve tartıldı. 1.5mL'lik ependorf tüpe aktarıldı. Kesilen her 10µg DNA bandı için ,10µL membran bağlama solüsyonu uygulandı. Jelin tamamı çözülene kadar 55°C'de inkübe edildi. Çözünen jel mini kolona transfer edildi ve 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübe sonrası 16000 x g 'de 1 dakika sentrifuj edildi.Ethanol eklenmiş, 700 µL yıkama solüsyonu ile yıkandı ve 16000 x g 'de 1 dakika sentrifuj edildi. Flow-trough kısmı atıldı. 500 µL membran yıkama solüsyonu ile yıkandı ve 16000 x g 'de 5 dakika sentrifuj edildi. Kolon otoklavlanmış 1.5mL'lik ependorf tüpe takıldı ve 50 µL nüklazsız su (elasyon tamponu) ile kolon yıkandı. Gen, ethanolden kurtulmak için 1 dakika kapağı açık şekilde, oda sıcaklığında inkübe edildi ve 16000 x g'de 1 dakika sentrifuj edildi ve elde edilen ürün -20°C'de muhafaza edildi.

3.10.8 Ligasyon

2 µL 10X T4 DNA ligaz solüsyonu,37.5ng restriksiyon enzimiyle kesilmiş NP geni ile 50ng restriksiyon enzimiyle kesilen vektör,1 µL T4 DNA ligaz enzimi ile20 µL distile su ile tamamlanarak, ependorf tüp içerisine yerleştirildi. İyice pipetlenip, birkaç dakika boyunca sentrifuj edildi. 16°C'de kohesiv uçlar için bir gece inkübe edildi. Blunt (küt) ucu ise 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübe sonrası elde edilen ürün ısı inaktivasyonu yapmak üzere 65°C'de 10 dakika inkübe edildi. İnkübe sonrası elde edilen plazmid buzda soğutuldu ve çalışıp çalışmadığını kontrol etmek amacıyla transformasyon yapılarak, 5 er koloni seçildi. İzole edilen genler doğruluğu kontrol edilmek üzere sekanslamaya gönderildi.

3.10.9 Sekanslanma

Klonlanan vektörlerin sekanslaması Genscript/USA firması tarafından yapılmıştır.

3.11 EKSPRESYON

3.11.1 Transformasyon

-80°C'de muhafaza edilen *E.coli*'nin BL21(DE)3 suşu kompetent hücrelerinden alındı ve 10 dakika boyunca buzda bekletildi. Çözünen kompetent hücrelerin içerisine verimliliği arttırmak amacıyla 2 µL 0.5M β-mercaptoethanol eklendi ve 1 dakika boyunca buzda inkübe edildi. Daha sonra kompetent hücrelerden 2 adet alındı ve sırasıyla pUC57 (kontrol amaçlı), ve NP-pET28b'den 1'er µL eklendi. 30 dakika boyunca buzda bekletildi. Isıtıcı blok yardımıyla 42°C'de 30 saniye boyunca ısıl şok uygulandı ve 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Oda sıcaklığındaki 450 µL LB sıvı besiyeri, sırasıyla tüplere katıldı ve 37°C'ye ayarlanmış çalkalayıcı inkübatörde 1 saat 220 rpm'de inkübe edildi. Bir saatin ardından hücreler sırasıyla, transformasyon için hazırlanan kanamisinli katı besiyerine yayma yöntemiyle ekildi ve 37°C'de 1 gece inkübe edildi. Ertesi gün inkübatörden alınan petriyerler +4°C'de kontamine olmayacak şekilde parafilmle edilip, muhafaza edildi.

3.11.2 Tek Koloni Stok Hazırlama

Katı besiyerine ekilmiş olan NP-Pet28b vektöründen 1 koloni alındı ve 5 µL kanamisinle, 5 mL LB sıvı besiyerinin içerisine bırakıldı. 220 rpm'de 37°C'de 1 gece inkübe edildi. Çoğalan bakteri 1.5 mL'lik ependorf tüplere %15'i gliserol olacak şekilde paylaştırıldı ve -80°C'de muhafaza edildi.

3.11.3 IPTG indüksiyonu

20 mL LB sıvı besiyerinin içine, 200 µL bakteri (NP-pET28b), 20 µL kanamisin eklendi 220 rpm'de 37°C'de 16-18 saat inkübe edildi. 16-18 saat inkübe edilen bakteri kültüründen 12.5 mL alınıp, 250 µL kanamisin ile 250 mL LB sıvı besiyerinin içerisine bırakıldı ve OD₆₀₀= 0.6'ya çıkıncaya kadar büyütüldü. İndüklenmeyen bakteriden 1 mL

örnek alındı ve 10 dakika 6000 rpm’de sentrifuj edildi. Supernatant kısmı atıldı. Pellet -20°C’de muhafaza edildi. OD₆₀₀= 0.6’ya ulaşan bakterilere 250 µL 0.5M IPTG eklendi ve 4 saat 220 rpm 37°C’de inkübe edildi. İndüklenen bakteriden 1 mL örnek alındı ve 10 dakika 6000 rpm’de sentrifuj edildi. Supernatant kısmı atıldı. Pellet -20°C’de muhafaza edildi. Geriye kalan bakteri 250 mL’lik şişelere aktarılarak, 10 dakika 6000 rpm’de sentrifuj edildi. Supernatant kısmı atıldı. Pellet -20°C’de muhafaza edildi.

3.11.4 Afinite Kromotografisi için Kolon Hazırlanışı

Ni-NTA Agaroz (Qiagen) firmasından temin edildi. Kolon (Biorad/USA) dH₂O ile yıkandı. Her 1mL Ni-NTA resin için 10 µg liziz edilmiş bakteri kullanıldı. Toplam 4mL resin eklendi. Kolon dH₂O ile tekrar yıkandı ve resinin üzerine kurumaması için 5mL %20’lik ethanol eklendi. +4°C’de dik duracak şekilde muhafaza edildi.

3.11.5 Native (Doğal) Protein Purifikasyonu

-20°C’den alınan pellet çözünmesi için 30dakika boyunca buzda bekletildi. Daha sonra 250mL’lik bakteri pelleti, hazırlanan 10 mL’lik liziz tampon ile pipetaj yapılarak çözüldü. 15mL’lik falcona aktarıldı. 5x15 saniye sonikatör yardımıyla parçalandı. Hücreler sıvı azot ile donduruldu ve 42°C ‘ye ayarlanan su banyosunda çözüldü. Çözünen hücrelerden SDS’de yürütüp, karşılaştırmak üzere liziz olmuş bakteriden 50µL örnek alındı. Liziz sonrası hücreler, 16000 rpm’de 45 dakika sentrifuj edildi. Sentrifuj sonrası supernatant farklı bir falkon tüpe transfer edildi. SDS’de yürütüp, karşılaştırmak için supernatanttan 50 µL örnek alındı. Purifikasyon için hazırlanan His-Tag kolon, liziz tamponla aktiveleştirildi. Üzerine supernatant eklendi. Kolon +4°C’de 1 saat 120 rpm’de inkübe edildi. İnkübe sonrası kolondan supernatant aktıldı ve akan flow-troughdan SDS’de yürütüp, karşılaştırmak üzere 50 µL örnek alındı. Kolon 30 mL hazırlanan yıkama solüsyonu ile yıkandı ve SDS’de yürütüp, karşılaştırmak üzere 50 µL örnek alındı. İyice yıkanan kolona 10 mL elüsyon solüsyonu eklendi ve 2 dakika inkübe edildi. SDS’de yürütüp, karşılaştırmak üzere 50 µL örnek alındı. Ve elde edilen protein +4°C’de muhafaza edildi.

3.11.6 Denatürasyon ile Protein Purifikasyonu

-20°C'den alınan pellet çözünmesi için 30 dakika boyunca buzda bekletildi. Daha sonra 250mL'lik bakteri pelleti, hazırlanan 10 mL'lik liziz tampon ile pipetaj yapılarak çözüldü. 15 mL'lik falcona aktarıldı. İçerisine 25X 50 µL protease inhibitör eklendi. SDS'de yürütüp, karşılaştırmak üzere liziz olmuş bakteriden 50 µL örnek alındı. Liziz sonrası hücreler, 10,000 rpm'de 30 dakika sentrifuj edildi. Sentrifuj sonrası supernatant farklı bir falkon tüpe transfer edildi. SDS'de yürütüp, karşılaştırmak için supernatantan 50 µL örnek alındı. Purifikasyon için hazırlanan His-Tag kolon, liziz tamponla aktifleştirildi. His-Tag resinle bağlanması için üzerine supernatant eklendi. Kolon oda sıcaklığında 30 dakika 60 rpm'de inkübe edildi. İnkübe sonrası kolondan supernatant akıtıldı ve akan flow-troughdan SDS'de yürütüp, karşılaştırmak üzere 50 µL örnek alındı. Kolon 40 mL hazırlanan yıkama solüsyonu ile yıkandı ve SDS'de yürütüp, karşılaştırmak üzere 50 µL örnek alındı. İyice yıkanan kolona 5 mL elüsyon solüsyonu eklendi ve 5 dakika inkübe edildi. SDS'de yürütüp, karşılaştırmak üzere 50µL örnek alındı ve elde edilen protein +4°C'de muhafaza edildi.

3.11.7 SDS-PAGE Jel Elektroforezi

IPTG indüksiyonu ve protein purifikasyon sırasında alınan örnekler sırasıyla;

- İndüklenmemiş NP-pET28b
- İndüklenmiş NP-pET28b
- Liziz pellet- NP-pET28b
- Liziz supernatant- NP-pET28b
- Flow-through- NP-pET28b
- Yıkama- NP-pET28b
- Elüsyon- NP-pET28b
- Marker

Marker olmak üzere 4X'lik sds numune tamponu ile karıştırılarak, 5 dakika boyunca kaynatıldı. 130V'da 130 dakika boyunca yürütüldü. Jel 40 dakika boyunca 50 rpm'de SDS boya solüsyonu ile boyandı. Boyanan jel 40 dakika boyunca 2 kez boya çözücü solüsyonla yıkandı ve görüntüsü alındı.

3.11.8 Elde Edilen Proteinin Konsantre Edilmesi ve Konsantrasyonunun Ölçümü

SDS-PAGE jel elektroforezi üzerinde gözlemlenen 5 mL protein amicon ultra 50K falkon tüp ile 4000X g'de 25 mL PBS ile yıkanarak yabancı maddelerden arıtılıp, en saf hale gelene kadar konsantre edildi. Nanodrop yardımıyla elde edilen proteinin konsantrasyonu ölçmek için aşağıdaki formül uygulandı.

Protein konsantrasyonu= (OD₂₈₀/Ekstinksiyon katsayısı) x seyreltilmiş örnek. Miktarı hesaplanan protein, ependorf tüplere aktarılarak, -80°C'de muhafaza edildi.

3.11.9 Western Blot

Aranan proteini bulmak için elde edilen protein 1:1 oranında alındı ve markerla birlikte SDS-Page jel elektroforezi yapılarak, yürütüldü. Jel, hazırlanan 10 mL'lik transfer solüsyona aktarıldı. Görüntülenecek jel büyüklüğüne göre, bir membran ve iki adet fiber ped kesildi. Jel, membran ve fiber pedler 15 dakika 10 mL transfer solüsyonda çalkalayıcı yardımıyla dengelendi. Sırasıyla ped, jel, membrane ve ped blotlama için "sandwich" methoduna göre hazırlandı ve blotlama yapmak üzere makineye aktarıldı. Blotlama yöntemiyle protein membrana geçirildi. Blotlama yöntemiyle membrana geçirilen protein, membrandaki proteine spesifik antikorun bağlanması için , membran; hazırlanan 10 mL'lik süt tozunun içerisine yerleştirildi ve 1:2000 seyreltilen 6 X His-Tag Mouse Antikor ile birlikte 60 rpm'de orbital çalkalayıcıda 90 dakika inkübe edildi. İnkübe sonrası, membran 3 kez 10'ar dakika PBS-T ve 1 kez 5 dakika PBS solüsyonuyla orbital çalkalayıcıda 80 rpm'de yıkandı. Yıkanan membran kasete yerleştirildi ve membran 200 µL ECL maddesi ile yıkandı ve kasetin kapağı kapatılarak 5 dakika inkübe edildi. İnkübe sonrası kasetin kapağı açıldı ve deteksiyon için membran üzerine X-ray film yerleştirildi,1 dakika inkübe edildi. İnkübe sonrası film alınarak, aranan protein görüntülenmek amacıyla makineye aktarıldı.

3.12 HÜCRE KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI

3.12.1 Hücre Kültürü Çalışmaları için Kullanılan Kimyasallar

Hücre kültüründe kullanılan hücre medyumunu (DMEM with 4.5 g/L Glucose with L-Glutamine), FBS (Fetal Bovine Serum), Wisent, USA/Canada firmasından temin edilmiştir. Penisilin Streptomisin solüsyonu, Lonza/USA firmalarından sağlanmıştır. HepG2 hücresi ATCC sağlanmıştır. DMSO (Dimetil Sülfoksit) ve Tripan Blue Solüsyonu Sigma Aldrich firmasından sağlanmıştır.

3.12.2 Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Hücre Soyları

İnsan hepatoselülerkarsinoma hücresi 59 pasajlık (HEPG2) ve erkek "Wistar Albino" primer hepatosit Fatih Üniversitesi'nden temin edilmiştir.

3.12.3 Sitotoksite Çalışmaları için Solüsyon ve Tamponların Hazırlanışı

3.12.3.1 DMEM stok solüsyon

500 mL DMEM (Gibco) alındı ve içerisine 5 mL L-Glutamine ve 5 mL Penisilin/Streptomisin eklendi. 50 mL'lik falkon tüplere paylaştırılıp, parafilmle ve +4°C'de muhafaza edildi.

3.12.3.2 1X PBS stok solüsyon

10X PBS (Lonza) olarak temin edilen solüsyonun içerisinden 100 mL alındı ve 900 mL dH₂O'un içerisine ilave edildi. Hazırlanan solüsyon filtrelendi ve 15 mL'lik falkon tüplere eşit olarak paylaştırıldı.

3.12.3.3 FBS stok solüsyon

Fetal Bovine Serum (FBS wisent) +56°C'de bir saat inaktive edilip, eşit miktarda şişelere paylaştırıldı ve kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edildi.

3.12.3.4 Hücre Kültürü Laboratuvarının Temizliği

Hücre kültürü laboratuvarı düzenli olarak dH₂O, %70'lik ethanol ile temizlendi. Hücre kültürü laboratuvarında bulunan su banyosu, sentrifuj makinesi ve flow laminar

(hava kabini) içerisindeki aparatlar çamaşır suyu ile yıkanıp, %70 etanol ile kurumaya bırakıldı. Çalışma sonunda 15 dakika UV lambası açılarak, ortamın steril hale gelmesi sağlandı.

3.12.3.5 Steril Kabinin Temizliği

Kabin her çalışma başında ve sonunda kabin otoklavlı dH₂O ve %70'lik etanol ile temizlendi ve çalışma sonunda ortamın tekrar kullanılabilir hale steril gelmesi için UV lambası açıldı .

3.12.3.6 CO₂'li İnkübatörün Temizliği

İnkübatörün içerisindeki tüm aparatlar önce otoklavlı distile su, daha sonra %70'lik etanol ile temizlendi. CO₂ seviyesi düzenli şekilde takip edildi. İnkübatör filtreleri periyodik olarak değiştirildi.

3.12.3.7 Kullanılan Malzemelerin Temizliği

Hücre kültürü çalışmaları için steril ortam çok önemlidir. Hücre kültüründe kullanılan tüm cam şişeler, ependorf tüpler, pipet uçları, 121°C'de 15 dakika otoklavlandı. Otoklavlanmayan tampon, çözelti yada 0.22µm'luk filte ile filtrelendi.

3.12.3.8 Dondurulan Hücrelerin Açılması

37°C'ye ayarlanmış su banyosunda DMEM ve FBS ılıtıldı. Çalışmada kullanılacak steril kabin çalıştırıldı ve temizlendi. Dışarıdan kabin içerisine alınacak tüm malzemelerin dış yüzeyi %70'lik etanolle temizlenerek içeri alındı.

Azot tankından çıkarılan HepG2 hücreleri su banyosunda çözüldükten sonra DMEM ve FBS ile hazırlanan medyum içerisine alındı. 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve pellet bir miktar medyum ile çözülerek flasklara paylaştırıldı. Flaskların ebatına göre medyum ilave edilerek, hücreler %5 CO₂ içeren 37°C sıcaklıktaki inkübatörün içerisine hücreler büyüyene kadar bırakıldı.

3.12.3.9 Hücrelerin Pasajlanması

Mikroskop altında incelenip, yapıştığı ve çoğaldığı görülen hücrelerin medyumunu atıldı ve yıkamak için üzerine 5mL 1X'lik PBS eklendi. Yapışık hücre tabakasını kaldırmak için 1.2 mL tripsin eklendi ve 37 °C 'de 2-3 dakika inkübe edildi. %10FBS olacak şekilde 5 mL DMEM eklendi ve hücreler falkon tüpe transfer edildi. 2000 rpm'de 5 dakika sentrifuj edildi. Sentrifuj edilen hücrelerin supernatant kısmı atıldı ve pellet 5mL DMEM yardımıyla çözüldü. Çözülen hücrenin 15 µL'si mikroskop altında sayım yapmak için ayrıldı ve hücrelerin geri kalanı 75 cm² flask içerisine ekim yapıldı. Hücreler 37 °C, %5 CO₂ inkübatöre konuldu ve 2 günde bir aynı işlem tekrarlandı.

3.12.3.10 Hücre Kültürü Kabına Hücre Ekimi ve MTT Testi

MTT testi için 24 kuyucuklu plate kullanıldı ve her kuyuda 100.000 hücre olacak şekilde, her kuyuya 1mL hücre ekimi yapıldı. Ekilen hücreler 24 saat inkübe edildi ve inkübesonrası medyum vakum pompa yardımıyla çekildi. Hücrelerin üzerine 500 µL medyum eklendi. Kuyucuklara farklı konsantrasyonlarda elde edilen protein uygulandı ve hücreler 24 saat inkübe edildi. İnkübe sonrası tüm medyum vakum pompa yardımıyla tekrar çekildi ve hücrelerin üzerine 500 µL 1X'lik PBS ve 50 µL MTT boyası eklendi. Hücreler 2-3 saat inkübe edildi. İnkübe sonrası, vakum pompa yardımıyla hücrelerin üzerindeki tüm solüsyon çekildi ve her kuyucuğa 400 µL DMSO eklendi. 5 dakika boyunca çalkalayıcıya koyuldu ve 96 kuyucukluplate alınarak her kuyuya 250 µ örnek eklendi ve ELISA okuyucuda 560 ve 690 nm'de ölçüm yapıldı. Elde edilen sonuç grafiğe aktarıldı.

3.13 ENDOTOKSİN TAYİNİ

Tüm malzemeler kullanılmadan önce, oda sıcaklığında inkübe edildi. Mikroplate ısıtıcı blok yardımıyla 37⁰ C'de 10 dakika dengelendi. Kuyucuklara 50 µL örnek eklendi ve 37⁰ C'de 5 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübe sonrası kuyucuklara 50 µL LAL eklendi ve pipetlendi. 10 saniye çalkalanan mikroplate 37⁰ C'de 10 dakikada inkübe edildi. İnkübe sonrası kuyucuklara 100 µL subsrat solüsyonu eklendi ve pipetleme yardımıyla karıştırıldı. 10 saniye çalkalanan mikroplate, 37⁰ C'de 10 dakika tekrar inkübe edildi. Mikroplate'in kapağı kapatıldı ve 10 dakika çalkalayıcıya bırakıldı.

İnkübe sonrası plate tekrar 37°C ' ye alınarak 6 dakika inkübe edildi. İnkübe sonrası kuyucuklara $50\ \mu\text{L}$ %25'i asetik asit olacak şekilde stop reagent eklendi ve pipetlenen karışım 10 dakika boyunca çalkalayıcıda inkübe edildi. Plate 405-410 nm absorbansda okutuldu ve değişim grafiği çizilerek gözlemlendi.

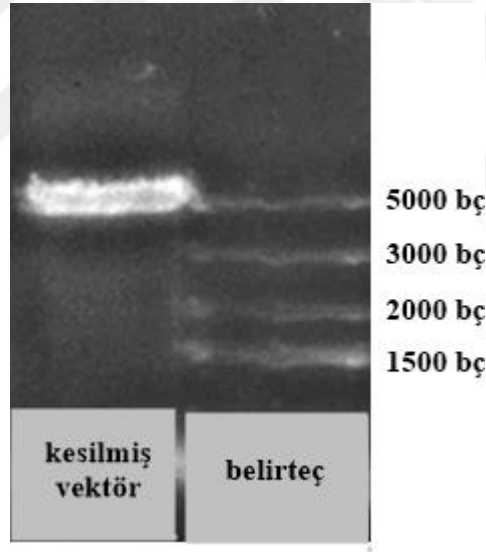


BÖLÜM 4

SONUÇLAR

4.1 GST-NP PROTEİNİ İÇİN KLONLAMA ve EKSPRESYON

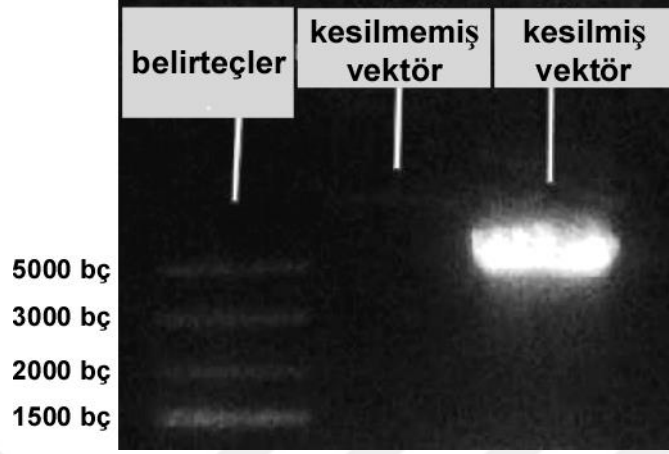
4.1.1 NP Geninin Restriksiyon Enzimleri Yardımıyla Kesilmesi



Şekil 3.1 NP geninin BamHI ve XhoII enzimleriyle kesilmesi.

NP geni DH5 α hücrelerine aktarılıp, izole edilerek, sınırsız bir gen kaynağı haline getirildi ve protein ürünü elde etmek için klonlama yapmak üzere, NP geni, pGEX6P1 vektörü için BamHI, XhoI restriksiyon enzimleri ve PCR ürünleri yardımıyla ile kesildikten sonra, %1'lik agaroz jelde koşturuldu (Şekil 3.1). Jel üzerinde görüntülenen NP geni, Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kiti kullanılarak saflaştırıldı.

4.1.2 pGEX6-P-1 Vektörünün Restriksiyon Enzimleriyle Kesilmesi



Şekil 3.2 pGEX6P1 vektörünün BamHI ve XhoII restriksiyon enzimleriyle kesilmesi.

pGEX6P1 vektörü DH5a hücrelerine aktarılarak, sınırsız vektör kaynağı haline getirildi ve DNA izolasyonu kiti yardımıyla DNA izolasyonu yapıldı. NP geninin kesildiği restriksiyon enzimleriyle (BamHI ve XhoI), pGEX6P1 vektörü de kesildi (Şekil 3.2) ve %1'lik agaroz jel üzerinde yürütüldü. Elektroforez sonrası, görüntülenen DNA Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kiti kullanılarak saflaştırıldı.

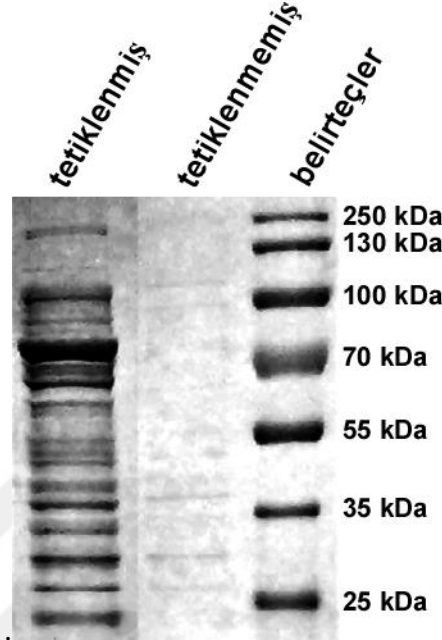
4.1.3 Ligasyon

Restriksiyon enzimleriyle kesilmiş olan NP geni ve pGEX6P1 vektörü ile T4 ligaz enzimi yardımıyla birleştirilmiştir.

4.1.4 Sekanslama

Klonlanan NP DNA'sına ait herhangi bir çerçeve kayması, mutasyon, yanlış kodlama gibi olayların olup olmadığını teyit etmek amacıyla, elde edilen yeni plazmid kontrol edilmek üzere yurtdışına gönderildi. Sekanslama sonucunda, ekspresyon aşaması için gerekli şartlar optimize edildi.

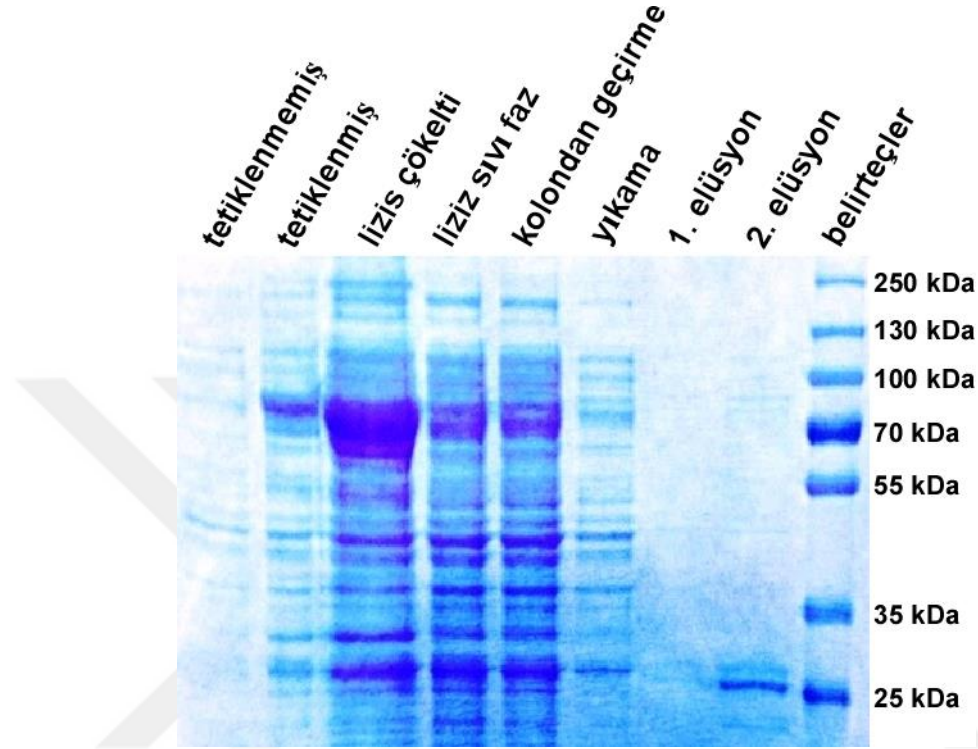
4.1.5 NP-pGEX-6-P1'in (NP-GST) Transformasyonu ve IPTG ile Ekspres Edilmesi



Şekil 3.3 NP-pGEX6P1'in IPTG ile indüksiyonu. Ağırlığı 80 kDa olduğu bilinen NP protein IPTG yardımıyla tetiklenmiştir.

Sekanslamada doğruluğu ispatlanan NP cDNAsı, ekspresyon işleminde kullanılmak üzere, BL21(DE)3'e ve stok oluşturmak için de DH5alpha kompetent bakteri hücrelerine aktararak transformasyon işlemi gerçekleştirildi. BL21(DE)3 kompetent hücresiyle transformasyon işlemi gerçekleştirilen NP cDNA'sından, GST-NP füzyon proteini elde etmek için IPTG kullanılarak, uygun ortam, sıcaklık ve inkübasyon süresi optimize edilerek elde edildi. Bakteri DNA'sında genlerin çalışmasını sağlayan, düzenleyen ve kontrol etmekle yükümlü genler bulunmaktadır ve isopropylthiogalactosid (IPTG), β -galactosidoz geni için bir uyarıcı olduğundan, IPTG varlığında enzimi sentezlenmektedir böylece, rekombinant plasmid hücre içerisine girdikten sonra, laktöz analogu olan IPTG'nin eklenmesiyle birlikte ilgili gen ekspres olmaktadır. Yukarıdaki şekilde 80 kDa ağırlığında olduğu bilinen NP-pGEX6P1 (şekil 3.3) IPTG ile indüklenerek üretilmiştir. SDS-PAGE yardımıyla indüklenen NP gösterilmiştir.

4.1.6 NP-GST Proteininin (NP-pGEX-6-P1) Native Metotla Protein Purifikasyonu

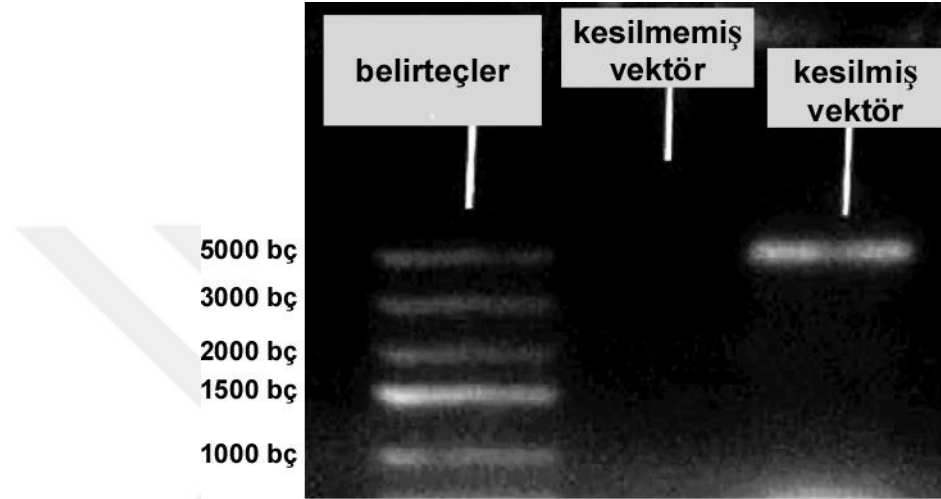


Şekil 3.4 NP GST proteininin native (doğal) metotla protein purifikasyonunun SDS-PAGE görüntüsü.

Eksprese olmuş NP-pGEX6P1 proteini GST tag içerdiğinden dolayı, NP-GST füzyon proteinini elde etmek için GST rezin kullanıldı ve native (doğal) protein purifikasyonu metodu uygulanıp, elde edilecek olan proteinin varlığı %10'luk SDS-PAGE hazırlanarak görüntülendi (Şekil 3.4). Öncelikle control amacıyla birinci kuyucukta tetiklenmemiş olan protein, ikinci kuyucukta 80 kDa 'da olduğu bilinen protein IPTG yardımıyla tetiklendi. SDS-PAGE üzerinde tetiklendiği görüntülenen protein, native protein metodu uygulanarak elde edilmek istendi. Bu sebeple protein üçüncü kuyucukta gösterildiği gibi lizis solüsyonuyla lizis edildi ve lizis edilen protein inkübe edildikten sonra sentrifuj edildi. Sentrifuj sonrası alınan örnek dördüncü kuyucukta yürütüldü ve proteinin supernatanta geçip geçmediği gösterildi. Sentifujdan alınan protein rezine bağlandı ve örnek alındı analiz edilmek üzere beşinci kuyucuğa koyuldu, Yıkama solüsyonu yardımıyla yıkanan protein altıncü.kuyucukta yürütüldü ve

elüsyon tamponu kullanılarak elde edilmek istenen protein yedinci ve sekizinci. kuyucukta gösterildi. Sonuç olarak SDS-PAGE üzerinde native metot yardımıyla GST-NP proteinin elde edilemediği gösterilmiştir.

4.1.7 NP-pET28b (NP HIS-TAG PROTEİNİNİN) Klonlaması ve Sekanslanması



Şekil 3.5 pET28b vektörünün NcoI ve XhoI restriksiyon enzimleriyle kesilmesi.

GST-NP purifikasyonu istenildiği gibi çalışmadığından dolayı, ikinci metot olan His-Tag purifikasyonuna başvuruldu. Bu sebeple, klonlama aşaması NP geni ve pET28b için tekrarlandı. NP geni NcoI ve XhoI enzimleriyle kesildi. Ardından rekombinant bir vektör olan pET28b de NcoI ve XhoI restriksiyon enzimleriyle kesildi (Şekil 3.5).

NP geni ve pET28b kesildikten sonra, T4 ligaz enzimi yardımı ile ligasyon metodu uygulanarak birleştirildi. Elde edilen yeni plazmid de doğruluğu teyit edilmek amacıyla yurtdışına gönderildi. Şekil 3.6'da NP geninin pET28b'de eksprese olmuş hali gösterilmiştir.

```

10      20      30      40      50      60
MENKIEVNSK DEMNKWFEEF KKGNGLMDTF TNSYSFCENV PNLDKFVFQM ASATDDAQKD

70      80      90      100     110     120
SIYASALVEA TKFCAPIYEC AAVSSTGIVK KGLEWFEKDS GTIKSWDENY AELKVDVPKI

130     140     150     160     170     180
EQLANYQQA LKWRKDIGFR VNANTAALSN KVLAEYKVPG EIVMSVKEML SDMIRRRNLI

190     200     210     220     230     240
LNRGGDENPR GPVSREHVEW CREFVKGKYYI MAFNPPWGD I NKSGRSGIAL VATGLAKLAE

250     260     270     280     290     300
TEGKGVFDEA KKTVEALNGY LDKHRDEV DK ASADSMITNL PKHIAKAQEL YKNSSALRAQ

310     320     330     340     350     360
GAQIDTPFSS FYWLYKAGVT PETFPTISQF LFE LG EQPRG TKMKMKALLS TPMKWGKKLY

370     380     390     400     410     420
ELFADDSFQQ NRIYMHPAVL TAGRISEM GV CFGTIPVANP DDAAQGS GHT KSILNLR TST

430     440     450     460     470     480
ETNNPCA KTI VKLFEIQETG FNIQDM DIVA SEHLLHQ SIV GKQSPFQ NAY NVKGNATSAN

490
IILEHHHHHH

```

Şekil 3.6 NP proteininin pET28b de ekspres olmuş hali.

Amino asit sayısı :490

Moleküler ağırlığı : 54959.4

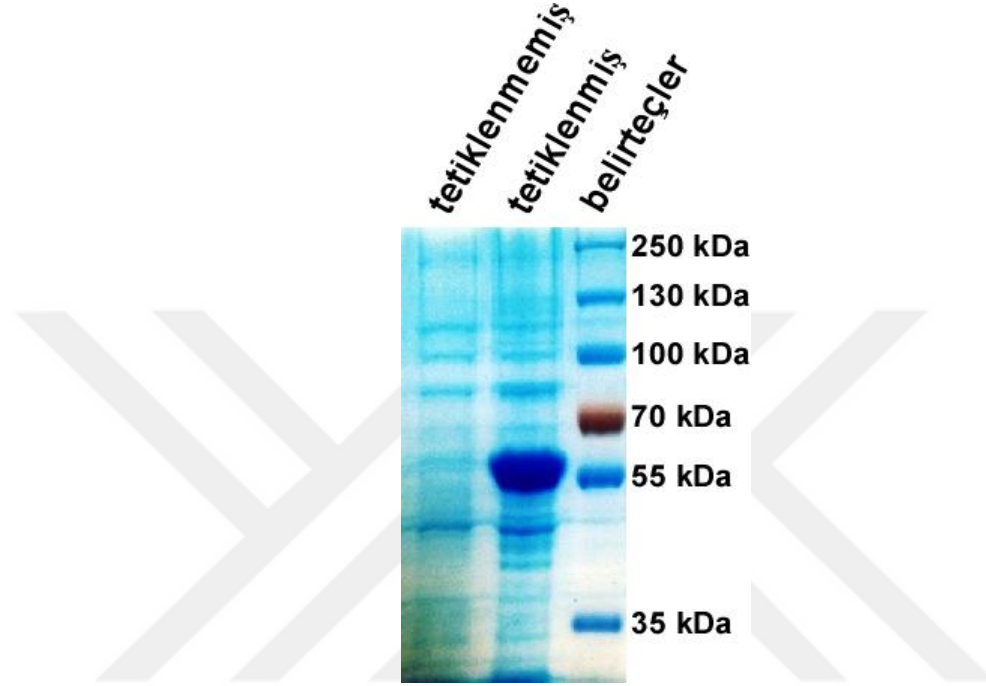
PI: 6.91

Ext. coefficient 70360

Abs 0.1% (=1 g/l) 1.280

4.2 His-Tag Proteinini Purifikasyonu ve Sitotoksiste Ölçümü

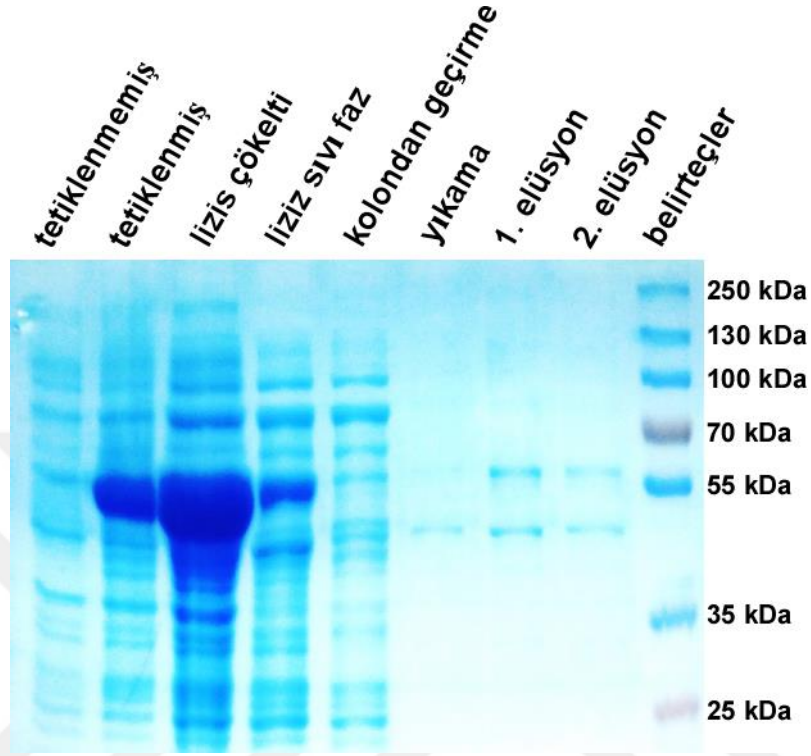
4.2.1 NP-pET28b'nin (NP His-Tag) IPTG ile Eksprese Edilmesi



Şekil 3.7 NP His-Tag proteinin IPTG ile indüksiyonu.

NP cDNA'sı, *E.coli*'nin BL21(DE)3 suşuna transforme edildi. Transformasyon sonrası, uygun ortam oluşturularak, IPTG yardımıyla gen eksprese edildi. SDS-PAGE üzerinde birinci kuyucukta tetiklenmemiş protein ve ikinci kuyucukta 55 kDa ağırlığında olduğu bilinen proteinin IPTG yardımıyla tetiklendiği gösterilmiştir.

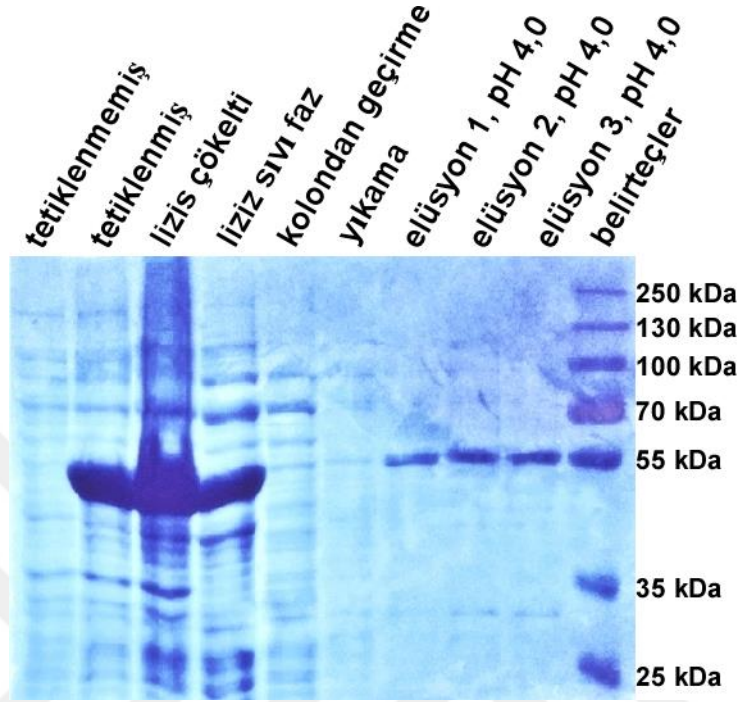
4.2.2 NP His-Tag Proteinin Native Metotla Purifikasyonu



Şekil 3.8 NP His-Tag proteinin native (doğal) metotla protein purifikasyonu.

Eksprese olmuş NP His-Tag proteinini elde etmek için ilk olarak native (doğal) protein purifikasyonu metoduna başvurulmuştur. Protein purifikasyonu esnasında elde edilen ürünler karşılaştırmak amacıyla %10'luk SDS-PAGE ile görüntülenmiştir. Şekil 3.8'de gösterildiği gibi birinci. kuyucukta NP His-Tag proteinin indüklenmemiş hali, ikinci kuyucukta 55 kDa ağırlığında olduğu bilinen NP His-Tag proteinin IPTG ile indüklenmiş hali, üçüncü kuyucukta lizis solüsyonu yardımıyla proteinin lizis edilmiş hali, dördüncü kuyucukta sentrifuj eldikten sonra elde edilen proteinin supernatantı, beşinci kuyucukta rezine bağlandıktan sonraki hali, altıncı kuyucukta yıkama solüsyonu ile yıkanmış hali ve yedinci ve sekizinci kuyucukta proteinin elüsyon solüsyonu kullanılarak elde edilip edilemediği görüntülenmiştir. Beklenen proteinin büyüklüğü 55kDa olduğundan, elusyona bakıldığında, protein purifikasyonunun yeterli derecede elde edilemediği gözlemlenmiştir.

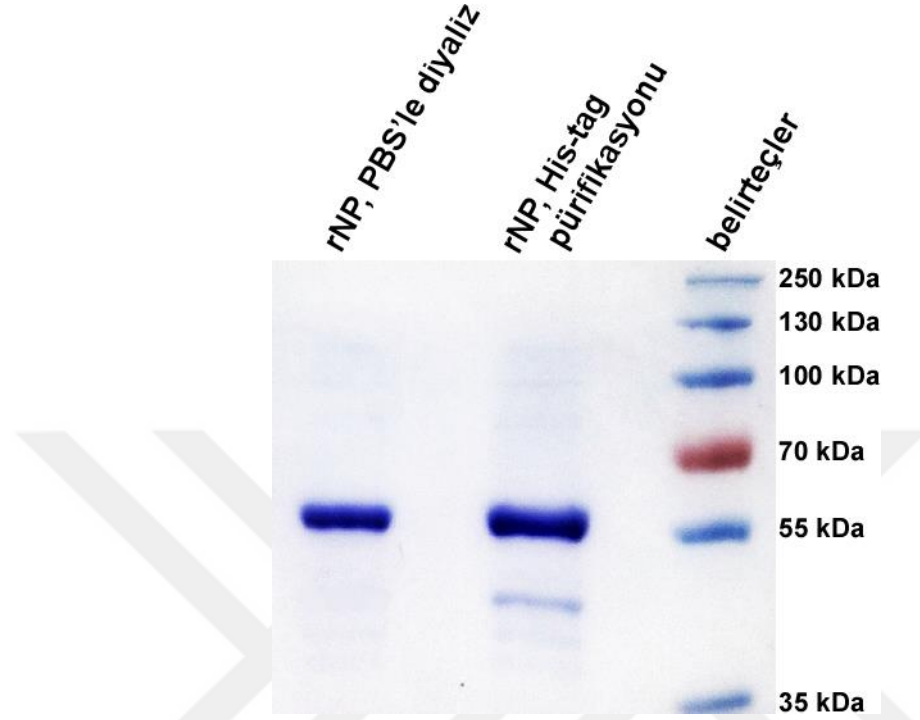
4.2.3 NP His-Tag Proteininin Denatürasyon Metoduyla Purifikasyonu



Şekil 3.9 NP His-Tag proteininin denatürasyon metodu purifikasyonu.

Eksprese olmuş NP His-Tag proteini, denatürasyon protein purifikasyonu metoduyla elde edilmiştir. Purifikasyon sırasında elde edilen ürünler %10'luk SDS-PAGE ile görüntülenmiştir. Şekil 3.9'da gösterildiği gibi birinci kuyucukta NP His-Tag proteinin indüklenmemiş hali, ikinci kuyucukta 55 kDa ağırlığında olduğu bilinen NP His-Tag proteinin IPTG ile indüklenmiş hali, üçüncü kuyucukta lizis solüsyonu yardımıyla lizis edilmiş hali, dördüncü kuyucukta, sentrifujdan sonra elde edilen supernatantı, beşinci kuyucukta rezine bağlanıp, inkübe edildikten sonraki hali, altıncı kuyucukta yıkanmış hali, yedinci, sekizinci ve dokuzuncu kuyucukta proteinin elde edilmiş olduğu görüntüsü gösterilmiştir. Beklenen proteinin büyüklüğü 55kDA olduğundan denature protein purifikasyonu metoduyla protein, başarılı bir şekilde elde edilmiştir.

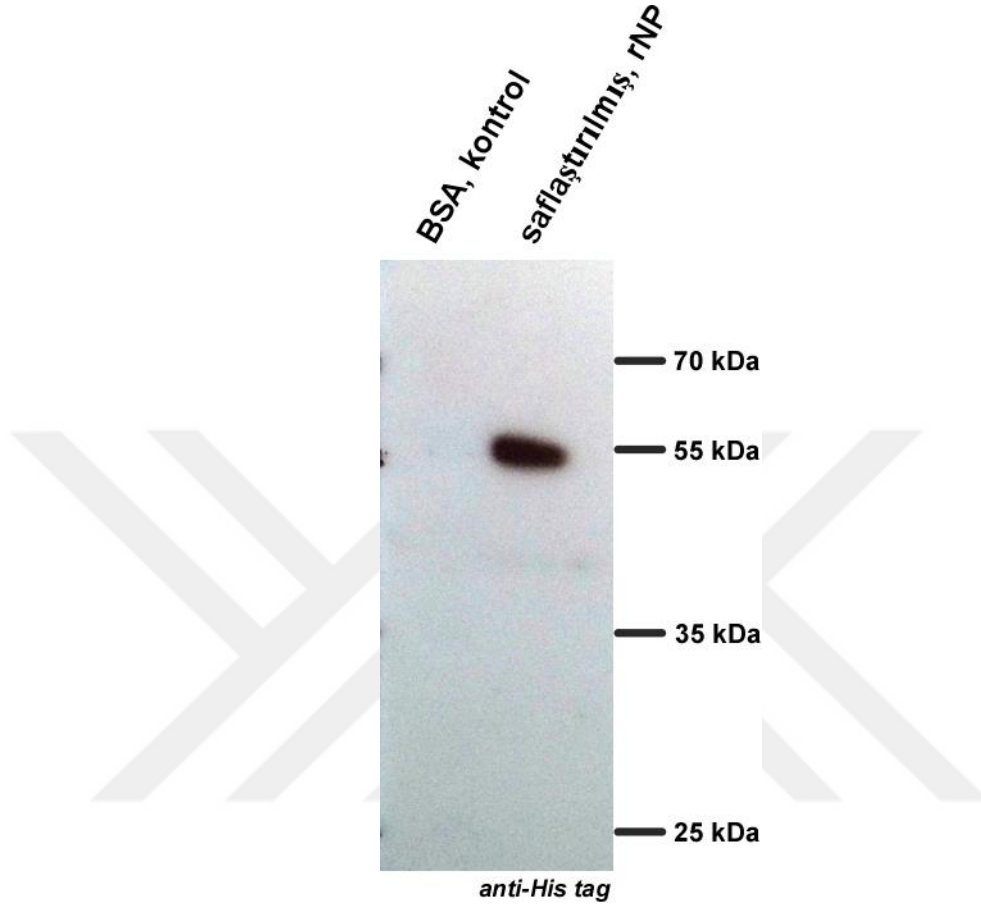
4.2.4 rNP'nin Konsantre Edilmesi



Şekil 3.10 Miktarı 2mg/mL olan NP'nin,, PBS ile yıkanmadan önce ve PBS ile yıkandıktan sonraki halinin SDS-PAGE yardımıyla görüntülenmesi.

Proteinler yoğun tuz ve fosfat içeren tampon içerisinde elde edildiği için çeşitli kimyasallar içermektedir. Bu sebeple, elde edilen proteinleri daha saf hale getirip, konsantre etmek için proteinler PBS ve filtreli sentrifuj tüpü yardımıyla yıkandı ve 2mg/mL olacak şekilde konsantrasyonu ölçüldü. Şekil 3.10'da gösterildiği gibi birinci kuyucukta rNP'nin PBS'le yıkanıp, konsantre edildiği, ikinci kuyucukta rNP'nin PBS ile yıkanmadan önceki hali gösterilmiştir. Şekil 3.10' da görüldüğü gibi rNP PBS ile konsantre edilmeden önce spesifik bantlar içermektedir fakat konsantre edildikten sonra spesifik bantlar kaybolmuştur.

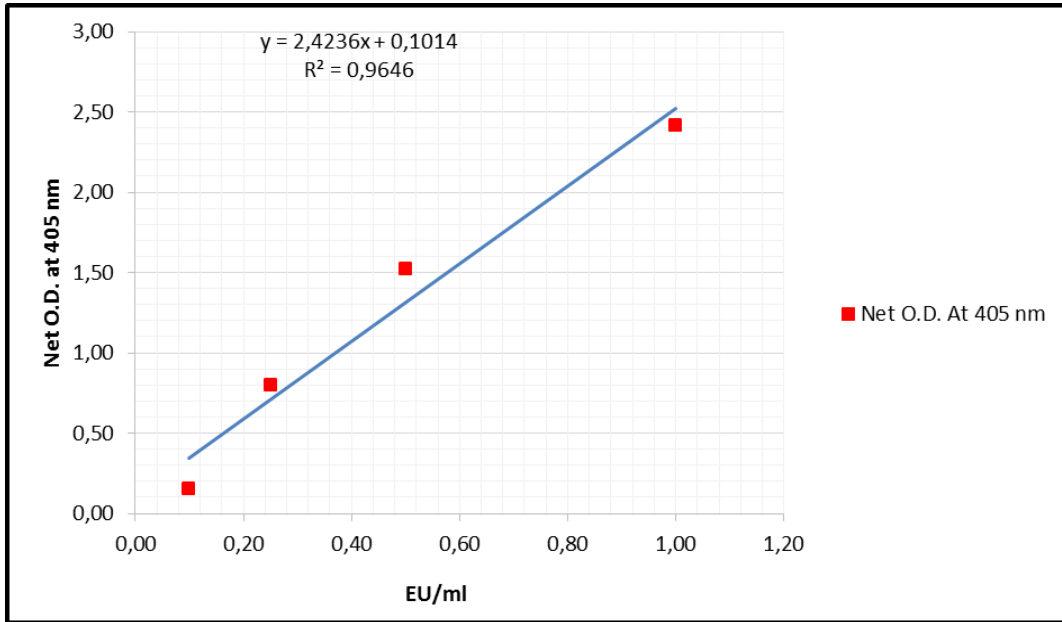
4.2.5 rNP'nin Western BLOT ile Teyit Edilmesi



şekil 3.11 KKKAV rNP proteininin western blot ile doğrulanması.

Western Blot yöntemiyle, SDS-PAGE'den sonra proteinler transfer solüsyonu yardımıyla PVDF membrana aktarılıp, ardından 1:2000 dilüsyonunda mouse His-Tag ve anti His-Tag antikor kullanılarak, proteinlere bloklama yapılmıştır. Bloklama sonrası proteinlerin deteksiyonu yapılp, şekil 3.11 de gösterildiği gibi X-RAY filmde gösterilmiştir. Bu metotla proteinin 55 kDa'da istenilen protein olduğu ispatlanmıştır.

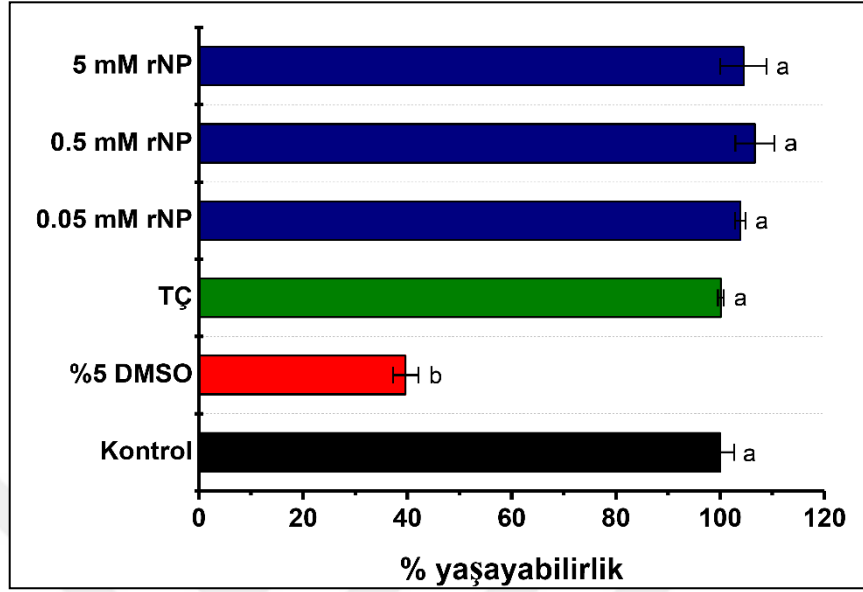
4.2.6 KKKAV rNP'nin LAL Metoduyla Endotoksin Ölçümü



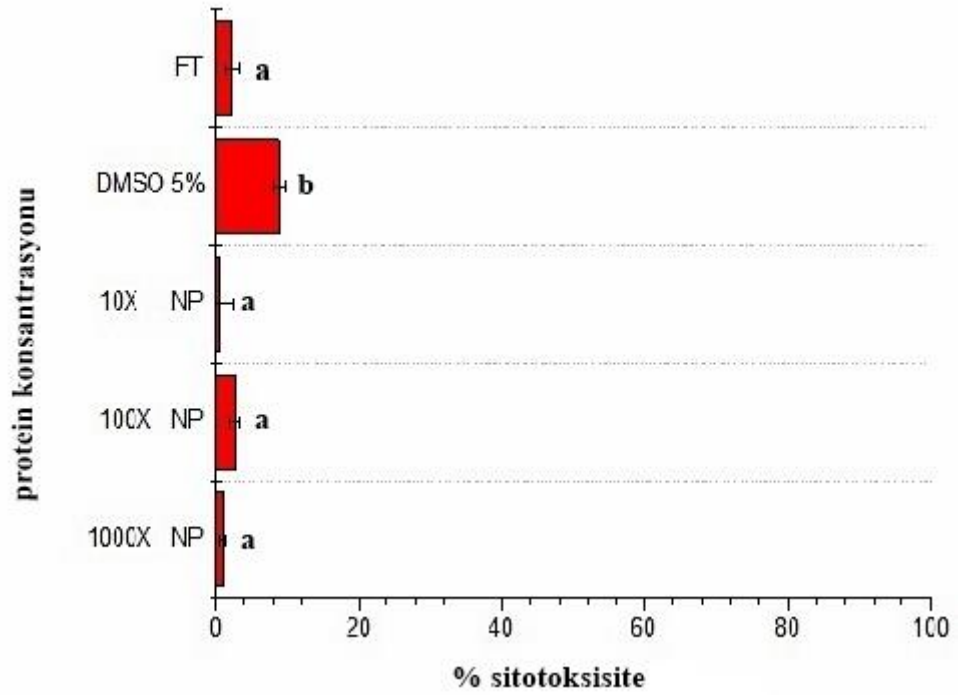
Şekil 3.12 Kromojenik testteki endotoksin miktarının standart eğri grafiği.

Kromojenik testteki endotoksin miktarının standart eğri grafiği şekil 3.11'de gösterilmiştir. Yapılan endotoksin ölçümüne göre, konsantrasyonu 2mg/mL olan bir proteinde yaklaşık olarak 11 EU/mL endotoksin bulunmaktadır. Bu miktar FDA endotoksin limiti olan 350 EU/mL den çok az bir değerdir.

4.2.7 KKKAV rNP'nin MTT Testi ile Sitotoksosite Ölçümü



Şekil 3.13 HepG2 hücre hattında rNP'nin toksisitesinin MTT assay ile ölçülmesi. Deney 3 kez tekrarlandı ve rNP nin hücre ölümünde istatistiksel bir fark yaratmadığı hesaplandı (n=3, p < 0.05).



Şekil 3.14 Primer hepatosit hücrelerinde rNP'nin toksisitesinin MTT assay ile ölçülmesi. Deney 3 kez tekrarlandı ve rNP nin hücre ölümünde istatistiksel bir fark yaratmadığı hesaplandı (n=3, p < 0.05).

BÖLÜM 5

TARTIŞMA VE SONUÇ

RNA segmentleri nükleoprotein tarafından örülüdür. Viral çalışmaların en önemli dalı nükleokapsid araştırmalarıdır. Virüs nükleokapsid yapıları insan immün sisteminin uyarılmasında önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle multi-epitop peptit aşularının ve özgün tanı araçlarının geliştirilmesinde en önemli aşamayı NPs temsil etmektedir. KKKAV hastalığında IgG antikorlarının deteksiyonu için bakteriyal olarak anlatımı yapılan NP antijeninin kullanılması, bunun önemli örneklerinden biridir.

Çalışmamızda, NP proteinini elde etmek için, klonlama ve ekspresyon olmak üzere iki temel metot kullanıldı. Klonlama aşamasında, öncelikle NP geni spesifik primerlerle çoğaltılıp, BamHI ve XhoI enzimleriyle kesildi (Şekil 3.1). Insert olarak kullanılacak pGEX6P1 vektörü de XhoI ve BamHI enzimleri ile kesildi (Şekil 3.2). Bu aşamada hedef DNA'nın plazmide transferi gerçekleştirilmeden önce, restriksiyon enzimleriyle kesilmiş olan hedef DNA ve plazmitlerinin saflaştırılması gerekmektedir. Kesilen gen ve vektör, genomik DNA purifikasyon kiti yardımıyla saflaştırıldı. Saflaştırılmış gen ve plazmit T4 DNA ligaz enzimi kullanılarak, ligasyon işlemi gerçekleştirildi. Ligasyon sonrası, klonlamanın son aşaması olan sekanslamayla, vektöre aktarılan NP DNA'sının doğruluğu teyit edildi. Böylece dizileme sonucunda herhangi bir mutasyon, açık okuma çerçevesi, yanlış kodlama içermeyen yeni plazmid ikinci aşama olan ekspresyon için hazır hale getirilmiş oldu.

Çalışmanın ikinci aşaması olan ekspresyonda, sekanslamada doğruluğu ispatlanan NP cDNAsı (rekombinant DNA), ekspresyon işlemi için BL21(DE)3'e ve stok oluşturmak için de DH5alpha kompetent bakteri hücrelerine aktararak transformasyon işlemi gerçekleştirildi. Laboratuvar koşullarında, düşük maliyete elde

ettiğimiz kompetent hücrelerden BL21(DE)3 ekspresyon işlemi için, DH5alpha kompetent hücresi ise plazmid izolasyonu için kullanıldı. BL21(DE)3 kompetent hücresiyle transformasyon işlemi gerçekleştirilen NP cDNA'sından, GST-NP füzyon proteini elde etmek için IPTG kullanılarak, uygun ortam, sıcaklık ve inkübasyon süresi optimize edilerek elde edildi. Bu sayede 80kDa ağırlığında olduğu bilinen protein tetiklenmiş ve (Şekil 3.3) gen ekspresyonu gerçekleştirilmiş oldu. Gen ekspresyonu sonrası saflaştırılmaya hazır hale gelen GST-NP füzyon proteini, native (doğal) protein purifikasyonu metoduyla, saflaştırılma gerçekleştirildi. NP proteinini elde etmek için kullanılan GST rezinin amacı, immobilize olmuş glutatyon sefaroz kolonuyla, çözünen GST füzyon proteinlerini elde etmektir. Bakterinin hücre lizatından saf çözünür GST proteini elde etmek için, kullanılacak liziz solüsyonuna enzim aktivitesini inhibe etmek için proteaz inhibitörü, DNase, lizozom, triton ve özellikle kullanılacak proteinin yapısı ribozomal RNA yapısında olduğu için RNase gibi indirgeyici maddeler eklendi ve protein liziz edildi. Liziz işlemi gerçekleştirildikten sonra yüksek hızda santrifuj uygulanan protein, GST rezin ile bağlandıktan sonra, yıkanarak, elüsyon edildi. Bu işlemler sonunda istenilen proteinin elde edilmesi beklenirken, kümelenerek çökme (aggregate) meydana geldi (Şekil 3.4). 80 kDa ağırlığında görülmesi beklenen NP-GST füzyon proteini görüntülenemedi. Bu sebeple, KKKAV rNP'nini elde etmek için, NP geni bir diğer vektör olan pET28b içine klonlandı. Sekanslama yardımıyla doğruluğu teyit edilen (Şekil 3.6), NP cDNA'sı, *E.coli*'nin BL21(DE)3 suşuna transforme edildi. Transformasyon sonrası, aynı koşullar sağlanıp, uygun ortam oluşturularak, IPTG yardımıyla gen eksprese edildi (Şekil 3.7). Burada amaç NP His-Tag proteini elde etmektir. Bir önceki klonlama için kullanılan purifikasyon işlemleri aynen gerçekleştirildi fakat native yolla herhangi bir sonuç görüntülenemedi. 55 kDa ağırlığında olduğu bilinen NP His-Tag füzyon proteini elde edilemedi (Şekil 3.8). İstenilen proteinin bu metotla elde edilememesinin (elüsyon olmamasının) nedeni, proteinin çözünemeyen bir yapıya sahip olmasıdır. Genelde *E.coli* içerisinde üretilen ve yüksek ekspresyon veren rekombinant proteinlerin çoğu yapı bakımından bu şekilde kümelenmektedir. Elde ettiğimiz NP proteini de çok fazla eksprese olduğundan, kümelenme meydana getirmiş olabilir. Yapılan çalışmalarda kümelenme sorununu çözmek için proteine yüksek hızda santrifuj işlemi uygulanabilirliği gösterilmiştir (Queensland 2015). Ancak elde etmek istediğimiz rekombinat protein, yüksek hızda santrifuj işlemi yapılmasına rağmen, tekrar elüsyon olmayarak, çözünmemesi stabilitesini korumuştur. Genelde, rekombinant proteini purifiye etmenin yanısıra, proteini çözünür

hale getirip, tekrar doğal konformasyonuna çevirip, biyolojik açıdan aktif bir hale getirmenin daha zor olduğu gösterilmiştir. Over-eksprese olmuş proteinlerin, denatürasyon koşullarında, saflaştırılması söz konusu olabilir (Benjamin Schlager* 2012). Bu sebeple NP His-Tag proteini elde etmek için denatürasyonla protein purifikasyonu metotuna başvuruldu. Histag proteinin bağlanması için Ni-NTA rezin kullanıldı. Kullanılan rezin 6x His-Tag proteinleri için seçici ve yüksek affinite sergilemektedir. Oda sıcaklığında, üre ya da guanidin hidroklorür kullanılarak yapılan purifikasyon işlemi, çözünmeyen proteinin, çözünebilirliğini arttırmaktadır. Bu metot da, yüksek konsantrasyonda tuzlar, fosfat kullanarak, His-Tag proteini oda sıcaklığında liziz edildi. Denatüre edilen protein, Ni-NTA agaroz rezine bağlandı. Yıkama ve elüsyon işlemleri de gerçekleştirildikten sonra, KKKAV rNP'i başarılı bir şekilde elde edildi (Şekil 3.9). Elde edilen NP proteini yüksek miktarda tuz ve fosfat içeren denatürasyon ajanları ile birçok işlemle tabii tutuldu. Bu nedenle NP proteinini daha saf hale getirmek için tampon değişimi uygulandı. NP'yi en saf hale getirmek için; tampon değiştirme işlemi filtreli santrifuj ve PBS kullanılarak gerçekleştirildi (Şekil 3.10). Saflaştırılan KKKAV rNP'nin konsantrasyonu ölçüldü ve 2.67 mg/mL olarak NP proteini elde edildiği saptandı. Elde edilen proteinin, 55 kDa ağırlığındaki protein olduğunu ispatlamak amacıyla western blotlama yapıldı (Şekil 3.11) ve western blot sonucuna göre, proteinin elde etmek istenilen protein olduğu doğrulandı.

Yapılan çalışma sonunda, KKKAV rNP'i başarılı bir şekilde elde edildi. Elde edilen proteinin herhangi bir bakteriyal endotoksin içerip içermediğini belirlemek amacıyla, Limulus Amoebocyte Lysate (LAL) testi uygulandı. Bakteriyal endotoksinin tespiti için uygulanan LAL methoduyla 2mg/mL, 1mg/mL, 0.5mg/mL konsantrasyonlarındaki NP proteininin içerdiği endotoksin miktarı ölçüldü. Verilen standart eğri grafiğinde (Şekil 3.12) yapılan testin doğruluğu ispatlandı ve elde edilen sonuçlara göre proteinin yaklaşık 11 EU/mL endotoksin içerdiği belirlendi. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi'nin (FDA) kurallarına göre kullanılacak aşı intravasküler ya da intramüsküler enjeksiyonda ortalama 70kg ağırlığındaki bir insan için, vücuda 350 EU/mL endotoksinin girmesinde bir sakınca bulunmamaktadır (Administration 2015).

KKKAV rNP'inin herhangi bir toksisitesinin olup olmadığını teyit etmek amacıyla, rNP'ye hem hepatokarsinoma hem de primer hücrelerde MTT testiyle sitotoksosite ölçümü yapıldı. Öncelikle, 0.05uM, 0.5uM 5uM ve 50 uM

konsantrasyonlarındaki antijenik NP proteininin sitotoksik etkisine; hepatokarsinoma hücreleri üzerinde bakıldı. Çalışma sonunda, NP'nin HepG2 ve primer hepatosit hücreleri üzerinde herhangi bir toksik etkisi olmadığı gözlemlendi. (Şekil 3.13, Şekil 3.14). LAL testinde karşılaşılan endotoksin miktarı, hücre çalışmalarında hiçbir toksisiteye neden olmamıştır. Ayrıca TÜBİTAK projesi için yapılan aşı çalışmasında elde edilen rNP hayvana enjekte edilmiştir ve histopatolojik hiçbir bulguya neden olmamakla birlikte, kan değerlerinde hiçbir olumsuz etki görülmemiştir.

Elde ettiğimiz verilere göre; yaptığımız çalışmada NP proteininin laboratuvar koşullarında, düşük maliyetli, güvenilir ve sınırsız miktarda üretilebileceği ispatlanmıştır. Elde edilen proteindeki toksisite miktarının çok çok düşük olması, NP proteinin, aşı çalışmalarında kullanılabilirliğini, göstermiştir. Bu yüzden bu çalışmada üretilen rekombinant protein, aşı çalışmalarına ve gelecekte KKKAH taşıyan hastaların tedavi edilmesine ışık tutacaktır. Bununla beraber başka hastalıkların tedavisine, aşı için ön basamak olan antikor, antijen ve toksin üretimine katkıda bulunacaktır. Ülkemizde yerli antikor üretimini başlatarak, düşük maliyetli, güvenilir aşı yapımına destek olacaktır.

KAYNAKLAR

- Administration, U.S. Food and Drug. 2015. "Bacterial Endotoxins/Pyrogens."
- Andersson, I., A. Lundkvist, O. Haller, and A. Mirazimi. 2006. "Type I interferon inhibits Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in human target cells." *J Med Virol* 78(2):216-22.
- Antrobus, R. D., T. K. Berthoud, C. E. Mullarkey, K. Hoschler, L. Coughlan, M. Zambon, A. V. Hill, and S. C. Gilbert. 2014. "Coadministration of seasonal influenza vaccine and MVA-NP+M1 simultaneously achieves potent humoral and cell-mediated responses." *Mol Ther* 22(1):233-8.
- Ascioglu, S., H. Leblebicioglu, H. Vahaboglu, and K. A. Chan. 2011. "Ribavirin for patients with Crimean-Congo haemorrhagic fever: a systematic review and meta-analysis." *J Antimicrob Chemother* 66(6):1215-22.
- Benjamin Schlager, Anna Straessle and Ernst Hafen. 2012. "Use of anionic denaturing detergents to purify insoluble proteins after overexpression." *BMC Biotechnology*.
- Bente, D. A., J. B. Alimonti, W. J. Shieh, G. Camus, U. Stroher, S. Zaki, and S. M. Jones. 2010. "Pathogenesis and immune response of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in a STAT-1 knockout mouse model." *J Virol* 84(21):11089-100.
- Bente, D. A., N. L. Forrester, D. M. Watts, A. J. McAuley, C. A. Whitehouse, and M. Bray. 2013. "Crimean-Congo hemorrhagic fever: history, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity." *Antiviral Res* 100(1):159-89.
- Berezky, S., G. Lindegren, H. Karlberg, S. Akerstrom, J. Klingstrom, and A. Mirazimi. 2010. "Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infection is lethal for adult type I interferon receptor-knockout mice." *J Gen Virol* 91(Pt 6):1473-7.
- Bertolotti-Ciarlet, A., J. Smith, K. Strecker, J. Paragas, L. A. Altamura, J. M. McFalls, N. Frias-Staheli, A. Garcia-Sastre, C. S. Schmaljohn, and R. W. Doms. 2005. "Cellular localization and antigenic characterization of crimean-congo hemorrhagic fever virus glycoproteins." *J Virol* 79(10):6152

- Berzofsky, J. A., J. D. Ahlers, J. Janik, J. Morris, S. Oh, M. Terabe, and I. M. Belyakov. 2004. "Progress on new vaccine strategies against chronic viral infections." *J Clin Invest* 114(4):450-62.
- Bodur, H., A. Erbay, E. Akinci, P. Onguru, N. Bayazit, S. S. Eren, and A. Kubar. 2011. "Effect of oral ribavirin treatment on the viral load and disease progression in Crimean-Congo hemorrhagic fever." *Int J Infect Dis* 15(1):e44-7.
- Canakoglu, N., E. Berber, M. Ertek, M. D. Yoruk, S. Tonbak, Y. Bolat, M. Aktas, A. Kalkan, and A. Ozdarendeli. 2013. "Pseudo-plaque reduction neutralization test (PPRNT) for the measurement of neutralizing antibodies to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus." *Viol J* 10:6.
- Ceylan, B., A. Calica, O. Ak, Y. Akkoyunlu, and V. Turhan. 2013. "Ribavirin is not effective against Crimean-Congo hemorrhagic fever: observations from the Turkish experience." *Int J Infect Dis* 17(10):e799-801.
- Christova, I., A. Di Caro, A. Papa, C. Castilletti, L. Andonova, N. Kalvatchev, E. Papadimitriou, F. Carletti, E. Mohareb, M. R. Capobianchi, G. Ippolito, and G. Rezza. 2009. "Crimean-Congo hemorrhagic fever, southwestern Bulgaria." *Emerg Infect Dis* 15(6):983-5.
- Christova, I., Kovacheva, T., Georgieva, D., Ivanova, S., and Argirov, D. 2010. "Vaccine against Congo-Crimean haemorrhagic fever virus – Bulgarian input in fighting the disease." *Probl Inf Parasit Dis.*:37.
- David-West, T. S., and B. O. Osunkoya. 1973. "The effect of anti-lymphocytic serum of infection by congo virus (Crimean haemorrhagic fever virus related) and Mokola virus (rabies virus related)." *Br J Exp Pathol* 54(3):274-82.
- Dilber, E., M. Cakir, E. Erduran, I. Koksall, E. Bahat, M. Mutlu, A. Y. Celtik, and A. Okten. 2010. "High-dose methylprednisolone in children with Crimean-Congo haemorrhagic fever." *Trop Doct* 40(1):27-30.
- Emmerich, P., T. Avsic-Zupanc, S. Chinikar, A. Saksida, C. Thome-Bolduan, A. Parczany-Hartmann, A. G. Langroudi, M. Moradi, S. Ahmeti, S. Gunther, and J. Schmidt-Chanasit. 2010. "Early serodiagnosis of acute human Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infections by novel capture assays." *J Clin Virol* 48(4):294-5.
- Epstein, S. L., W. P. Kong, J. A. Misplon, C. Y. Lo, T. M. Tumpey, L. Xu, and G. J. Nabel. 2005. "Protection against multiple influenza A subtypes by vaccination with highly conserved nucleoprotein." *Vaccine* 23(46-47):5404-10.
- Erduran, E., A. Bahadir, N. Palanci, and Y. Gedik. 2013. "The treatment of crimean-congo hemorrhagic fever with high-dose methylprednisolone, intravenous immunoglobulin, and fresh frozen plasma." *J Pediatr Hematol Oncol* 35(1):e19-24.
- Ergonul, O. 2006. "Crimean-Congo haemorrhagic fever." *Lancet Infect Dis* 6(4):203-14.

2008. "Treatment of Crimean-Congo hemorrhagic fever." *Antiviral Res* 78(1):125-31.
- Ergonul, O., A. Celikbas, B. Dokuzoguz, S. Eren, N. Baykam, and H. Esener. 2004. "Characteristics of patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever in a recent outbreak in Turkey and impact of oral ribavirin therapy." *Clin Infect Dis* 39(2):284-7.
- Ergonul, O., A. Celikbas, U. Yildirim, A. Zenciroglu, D. Erdogan, I. Ziraman, F. Saracoglu, N. Demirel, O. Cakmak, and B. Dokuzoguz. 2010. "Pregnancy and Crimean-Congo haemorrhagic fever." *Clin Microbiol Infect* 16(6):647-50.
- Escadafal, C., S. Olschlager, T. Avsic-Zupanc, A. Papa, J. Vanhomwegen, R. Wolfel, A. Mirazimi, A. Teichmann, O. Donoso-Mantke, and M. Niedrig. 2012. "First international external quality assessment of molecular detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus." *PLoS Negl Trop Dis* 6(6):e1706.
- Filippone, C., P. Marianneau, S. Murri, N. Mollard, T. Avsic-Zupanc, S. Chinikar, P. Despres, V. Caro, A. Gessain, N. Berthet, and N. Tordo. 2013. "Molecular diagnostic and genetic characterization of highly pathogenic viruses: application during Crimean-Congo haemorrhagic fever virus outbreaks in Eastern Europe and the Middle East." *Clin Microbiol Infect* 19(2):E118-28.
- Gozalan, A., B. Esen, J. Fitzner, F. S. Tapar, A. P. Ozkan, M. C. Georges-Courbot, R. Uzun, F. Gumuslu, L. Akin, and H. Zeller. 2007. "Crimean-Congo haemorrhagic fever cases in Turkey." *Scand J Infect Dis* 39(4):332-6.
- Guo, Y., W. Wang, W. Ji, M. Deng, Y. Sun, H. Zhou, C. Yang, F. Deng, H. Wang, Z. Hu, Z. Lou, and Z. Rao. 2012. "Crimean-Congo hemorrhagic fever virus nucleoprotein reveals endonuclease activity in bunyaviruses." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(13):5046-51.
- Hertzog, P. J., L. A. O'Neill, and J. A. Hamilton. 2003. "The interferon in TLR signaling: more than just antiviral." *Trends Immunol* 24(10):534-9.
- Huang, B., W. Wang, R. Li, X. Wang, T. Jiang, X. Qi, Y. Gao, W. Tan, and L. Ruan. 2012. "Influenza A virus nucleoprotein derived from Escherichia coli or recombinant vaccinia (Tiantan) virus elicits robust cross-protection in mice." *Viol J* 9:322.
- Jabbari, A., S. Besharat, A. Abbasi, A. Moradi, and K. Kalavi. 2006. "Crimean-Congo hemorrhagic fever: case series from a medical center in Golestan province, Northeast of Iran (2004)." *Indian J Med Sci* 60(8):327-9.
- Kaya, S., G. Yilmaz, B. Ertunc, and I. Koksall. 2012. "Parotitis associated with Crimean Congo hemorrhagic fever virus." *J Clin Virol* 53(2):159-61.
- Ke, R., A. Zorzet, J. Goransson, G. Lindegren, B. Sharifi-Mood, S. Chinikar, M. Mardani, A. Mirazimi, and M. Nilsson. 2011. "Colorimetric nucleic acid testing assay for RNA virus detection based on circle-to-circle amplification of padlock probes." *J Clin Microbiol* 49(12):4279-85.

- Kedzierska, K., S. J. Turner, and P. C. Doherty. 2004. "Conserved T cell receptor usage in primary and recall responses to an immunodominant influenza virus nucleoprotein epitope." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(14):4942-7.
- Keshtkar-Jahromi, M., J. H. Kuhn, I. Christova, S. B. Bradfute, P. B. Jahrling, and S. Bavari. 2011. "Crimean-Congo hemorrhagic fever: current and future prospects of vaccines and therapies." *Antiviral Res* 90(2):85-92.
- Keshtkar-Jahromi, M., Kuhn, J.H., Christova, I., Bradfute, S.B., Jahrling, P.B., and Bavari, S. 2011. "Crimean-Congo hemorrhagic fever: current and future prospects of vaccines and therapies." *Antiviral Res.* (98):85-92.
- Kinsella, E., S. G. Martin, A. Grolla, M. Czub, H. Feldmann, and R. Flick. 2004. "Sequence determination of the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus L segment." *Virology* 321(1):23-8.
- Koksal, I., G. Yilmaz, F. Aksoy, H. Aydin, I. Yavuz, S. Iskender, K. Akcay, S. Erensoy, R. Caylan, and K. Aydin. 2010. "The efficacy of ribavirin in the treatment of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Eastern Black Sea region in Turkey." *J Clin Virol* 47(1):65-8.
- Kondiah, K., R. Swanepoel, J. T. Paweska, and F. J. Burt. 2010. "A Simple-Probe real-time PCR assay for genotyping reassorted and non-reassorted isolates of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in southern Africa." *J Virol Methods* 169(1):34-8.
- Kubar, A., M. Haciomeroglu, A. Ozkul, U. Bagriacik, E. Akinci, K. Sener, and H. Bodur. 2011. "Prompt administration of Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) virus hyperimmunoglobulin in patients diagnosed with CCHF and viral load monitorization by reverse transcriptase-PCR." *Jpn J Infect Dis* 64(5):439-43.
- Kurnaz, F., G. Metan, R. Coskun, L. Kaynar, B. Eser, and M. Doganay. 2011. "A case of Crimean-Congo haemorrhagic fever successfully treated with therapeutic plasma exchange and ribavirin." *Trop Doct* 41(3):181-2.
- Laboratories, MC LAB / Molecular Cloning. 2014. "Dh5-Alpha Competent E. Coli."
- Lani, R., E. Moghaddam, A. Haghani, L. Y. Chang, S. AbuBakar, and K. Zandi. 2014. "Tick-borne viruses: a review from the perspective of therapeutic approaches." *Ticks Tick Borne Dis* 5(5):457-65.
- Le Bon, A., and D. F. Tough. 2002. "Links between innate and adaptive immunity via type I interferon." *Curr Opin Immunol* 14(4):432-6.
- Leblebicioglu, H., H. Bodur, B. Dokuzoguz, N. Elaldi, R. Guner, I. Koksal, H. Kurt, and G. C. Senturk. 2012. "Case management and supportive treatment for patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever." *Vector Borne Zoonotic Dis* 12(9):805-11.

- Maltezou, H. C., and A. Papa. 2011. "Crimean-Congo hemorrhagic fever: epidemiological trends and controversies in treatment." *BMC Med* 9:131.
- Mardani, M., M. K. Jahromi, K. H. Naieni, and M. Zeinali. 2003. "The efficacy of oral ribavirin in the treatment of crimean-congo hemorrhagic fever in Iran." *Clin Infect Dis* 36(12):1613-8.
- Martinez-Sobrido, L., E. I. Zuniga, D. Rosario, A. Garcia-Sastre, and J. C. de la Torre. 2006. "Inhibition of the type I interferon response by the nucleoprotein of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus." *J Virol* 80(18):9192-9.
- Mertens, M., Schmidt, K., Ozkul, A., and Groschup, M.H. 2013. " The impact of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus on public health." *Antiviral Res.* (98):248-60.
- Midilli, K., A. Gargili, O. Ergonul, G. Sengoz, R. Ozturk, M. Bakar, and F. Jongejan. 2007. "Imported Crimean-Congo hemorrhagic fever cases in Istanbul." *BMC Infect Dis* 7:54.
- Mishra, A. C., M. Mehta, D. T. Mourya, and S. Gandhi. 2011. "Crimean-Congo haemorrhagic fever in India." *Lancet* 378(9788):372.
- Morikawa, S., M. Saijo, and I. Kurane. 2007. "Recent progress in molecular biology of Crimean-Congo hemorrhagic fever." *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 30(5-6):375-89.
- Müdürlüğü, T.C Sağlık Bakanlığı Aksaray Sağlık. 2014. "KKKAH nedir ve Korunma Yolları."
- Müdürlüğü, TC. Sağlık Bakanlığı Aksaray Sağlık. 2010. "KENE ile bulaşan KKKA." *Sağlık&Güncel*.
- Müdürlüğü, Tokat Halk Sağlığı. 23.06.2009. "Kırım Kongo Kanamalı Ateş Hastalığı ve KKKA Vaka Yönetim Algoritması."
- Müezzinoğlu, Mehmet. 2013. "Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. TSHK Zoonotik ve Vektörel Hastalıklar Daire Başkanlığı." Türkiye Büyük Millet Meclisi.
- Osman, H. A., K. H. Eltom, N. O. Musa, N. M. Bilal, M. I. Elbashir, and I. E. Aradaib. 2013. "Development and evaluation of loop-mediated isothermal amplification assay for detection of Crimean Congo hemorrhagic fever virus in Sudan." *J Virol Methods* 190(1-2):4-10.
- Papa, A., V. Dalla, E. Papadimitriou, G. N. Kartalis, and A. Antoniadis. 2010. "Emergence of Crimean-Congo haemorrhagic fever in Greece." *Clin Microbiol Infect* 16(7):843-7.

- Papa, A., A. Mirazimi, I. Koksai, A. Estrada-Pena, and H. Feldmann. 2015. "Recent advances in research on Crimean-Congo hemorrhagic fever." *J Clin Virol* 64:137-43.
- Queensland, The University of. 2015. "Protein Aggregation." *Protein expression Facility*.
- Rodriguez-Carreno, M. P., M. S. Nelson, J. Botten, K. Smith-Nixon, M. J. Buchmeier, and J. L. Whitton. 2005. "Evaluating the immunogenicity and protective efficacy of a DNA vaccine encoding Lassa virus nucleoprotein." *Virology* 335(1):87-98.
- Rood, Julian. 2005. *Plasmid Biology*. A Journal of Mobile Genes and Genomes.
- Saijo, M., T. Qing, M. Niikura, A. Maeda, T. Ikegami, C. Prehaud, I. Kurane, and S. Morikawa. 2002. "Recombinant nucleoprotein-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin G antibodies to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus." *J Clin Microbiol* 40(5):1587-91.
- Samudzi RR1, Leman PA, Paweska JT, Swanepoel R, Burt FJ. 2012 Jan. "Bacterial expression of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus nucleoprotein and its evaluation as a diagnostic reagent in an indirect ELISA." *J Virol Methods* (179(1)):70-6.
- Sekercioglu, C. H. 2013. "Guineafowl, ticks and Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey: the perfect storm?" *Trends Parasitol* 29(1):1-2.
- Soares-Weiser, K., S. Thomas, G. Thomson, and P. Garner. 2010. "Ribavirin for Crimean-Congo hemorrhagic fever: systematic review and meta-analysis." *BMC Infect Dis* 10:207.
- Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW. 1990. "Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes." *Methods Enzymol*.
- Tasdelen Fisgin, N., O. Ergonul, L. Doganci, and N. Tulek. 2009. "The role of ribavirin in the therapy of Crimean-Congo hemorrhagic fever: early use is promising." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 28(8):929-33.
- Tignor, G. H., and C. A. Hanham. 1993. "Ribavirin efficacy in an in vivo model of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHF) infection." *Antiviral Res* 22(4):309-25.
- Tomanovic, S., M. Obradovic, and A. Gligic. 1996. "Serologic diagnosis of Crimean hemorrhagic fever in Kosovo and Metohia." *Vojnosanit Pregl* 53(6):477-81.
- Turell, L., J. W. Lyall, L. S. Tiley, E. Fodor, and F. T. Vreede. 2013. "The role and assembly mechanism of nucleoprotein in influenza A virus ribonucleoprotein complexes." *Nat Commun* 4:1591.
- Vanhomwegen, J., M. J. Alves, T. A. Zupanc, S. Bino, S. Chinikar, H. Karlberg, G. Korukluoglu, M. Korva, M. Mardani, A. Mirazimi, M. Mousavi, A. Papa, A.

- Saksida, B. Sharifi-Mood, P. Sidira, K. Tsergouli, R. Wolfel, H. Zeller, and P. Dubois. 2012. "Diagnostic assays for Crimean-Congo hemorrhagic fever." *Emerg Infect Dis* 18(12):1958-65.
- Walter Muranyi*, Udo Bahr*, Martin Zeier* and Fokko J. van der Woude. 2005. "Hantavirus Infection." *American Society of Nephrology*.
- Wang, Y., S. Dutta, H. Karlberg, S. Devignot, F. Weber, Q. Hao, Y. J. Tan, A. Mirazimi, and M. Kotaka. 2012. "Structure of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus nucleoprotein: superhelical homo-oligomers and the role of caspase-3 cleavage." *J Virol* 86(22):12294-303.
- Williams, R. J., S. Al-Busaidy, F. R. Mehta, G. O. Maupin, K. D. Wagoner, S. Al-Awaidy, A. J. Suleiman, A. S. Khan, C. J. Peters, and T. G. Ksiazek. 2000. "Crimean-congo haemorrhagic fever: a seroepidemiological and tick survey in the Sultanate of Oman." *Trop Med Int Health* 5(2):99-106.
- Wolfel, R., J. T. Paweska, N. Petersen, A. A. Grobbelaar, P. A. Leman, R. Hewson, M. C. Georges-Courbot, A. Papa, V. Heiser, M. Panning, S. Gunther, and C. Drosten. 2009. "Low-density microarray for rapid detection and identification of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus." *J Clin Microbiol* 47(4):1025-30.
- Yapar, M., H. Aydogan, A. Pahsa, B. A. Besirbellioglu, H. Bodur, A. C. Basustaoglu, C. Guney, I. Y. Avci, K. Sener, M. H. Setteh, and A. Kubar. 2005. "Rapid and quantitative detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus by one-step real-time reverse transcriptase-PCR." *Jpn J Infect Dis* 58(6):358-62.
- Yilmaz, G. R., T. Buzgan, H. Irmak, A. Safran, R. Uzun, M. A. Cevik, and M. A. Torunoglu. 2009. "The epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey, 2002-2007." *Int J Infect Dis* 13(3):380-6.
- Zivcec, M., D. Safronetz, D. Scott, S. Robertson, H. Ebihara, and H. Feldmann. 2013. "Lethal Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infection in interferon alpha/beta receptor knockout mice is associated with high viral loads, proinflammatory responses, and coagulopathy." *J Infect Dis* 207(12):1909-21.