

**ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**REKOMBİNANT *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* OMPA
PROTEİNİNİN ANTİJENİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Fatih KARABULUT

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ÇANKIRI
2017**

Her Hakkı Saklıdır.

TEZ ONAYI

Fatih KARABULUT tarafından hazırlanan “**Rekombinant *Mycobacterium tuberculosis* OmpA proteininin antijenik etkisinin araştırılması**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Sezer OKAY

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Sedef TUNCA GEDİK

Üye : Doç. Dr. Sezer OKAY

Üye : Yrd. Doç. Dr. Şinasi AŞKAR

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Doç. Dr. Tamer KEÇELİ

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

REKOMBİNANT *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* OMPA PROTEİNİNİN ANTİJENİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Fatih KARABULUT

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Sezer OKAY

Bu çalışmada, insanlarda tüberküloz (TB) hastalığının en önemli etkeni olan *Mycobacterium tuberculosis*'e karşı dünya genelinde kullanılan BCG aşısına alternatif yeni rekombinant aşı üretimi için *M. tuberculosis* OmpA proteininin kullanılabilirliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Erişkin bireylerde dünya genelinde halen kullanılmakta olan BCG aşısının koruyucu etkisinin çok az olmasından dolayı yeni rekombinant TB aşılarının geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Ülkemizdeki bir verem hastasından izole edilmiş olan *M. tuberculosis* suşundan *ompA* geni ilk olarak pGEM-T, ardından pET28a vektörüne klonlandı. *E. coli* BL21 suşunda ifade edilen his-tag taşıyan rekombinant OmpA proteini nikel kolonlar kullanılarak saflaştırıldı. Rekombinant OmpA ve yağ bazlı bir adjuvan olan Montanide ISA 720 VG 7:3 oranında karıştırılarak aşı formülasyonu hazırlandı. Aşı formülasyonu, adjuvan ve BCG aşısı, 5 BALB/c fareye s.c. enjekte edildi. İlk enjeksiyondan önce, 15., 30., 41. ve 66. günlerde farelerden kuyruk kanı alınarak serum örnekleri toplandı. Rekombinant OmpA'nın antijenik özelliklerini kalitatif olarak göstermek için Western blot deneyi uygulandı. Rekombinant OmpA ve BCG aşısına özgün serum kullanıldığında beklenen büyüklükte bantlar gözlenirken, sadece adjuvana özgün serum kullanıldığında bant gözlenmedi. OmpA içeren aşı formülasyonunun BALB/c farelerdeki hümmoral ve hüccresel bağışıklığı tetikleme kapasitesi değerlendirildi. OmpA formülasyonunun serum IgG seviyesini anlamlı düzeyde artırdığı, serum IFN- γ düzeyini artırmada BCG kadar etkin olduğu, serum IL-12 düzeyini artırmada ise zayıf olduğu belirlendi. Rekombinant OmpA proteininin ikili veya üçlü füzyonlarının oluşturulması, CpG oligonükleotitleri gibi hüccresel yanıtı artıran farklı adjuvanlar kullanılmasıyla, TB aşısı geliştirmede kullanılabileceği düşünülmektedir. Elde edilen bulgular ışığında OmpA aşı formülasyonunun akciğerde ve dalakta *M. tuberculosis* tutunmasını nasıl etkilediği ile ilgili koruyucu etki çalışmalarının da yapılması gerekmektedir.

2017, 91 Sayfa

ANAHTAR KELİMELEER: Bağışıklık yanıtı, immünoloji, interferon-gama, interlökin 12, rekombinant aşı

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION OF ANTIGENIC PROPERTIES OF RECOMBINANT OMPA PROTEIN FROM *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Fatih KARABULUT

Çankırı Karatekin University
Institute of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Sezer OKAY

In this study, it was aimed to investigate the potential of OmpA protein from *Mycobacterium tuberculosis* to be used for a new vaccine against *M. tuberculosis*, the causative agent of tuberculosis (TB) disease in human. Development of new recombinant TB vaccines are needed because the BCG vaccine in use worldwide is low in protection among the adults. The *ompA* gene from *M. tuberculosis* isolated from a Turkish patient was cloned first in pGEM-T, and then pET28a vector. The his-tagged OmpA protein expressed in *E. coli* BL21 strain was purified using nickel columns. The vaccine formulation was prepared mixing the recombinant OmpA and an oil-based adjuvant Montanide ISA 720 VG in 7:3 proportion. The vaccine formulation, adjuvant, and BCG vaccine was s.c. injected to 5 BALB/c mice. The sera samples were collected from the tail blood collected pre-immunization, 15th, 30th, 41st, and 66th days post-immunization. Western blot experiment was applied to show the antigenic property of recombinant OmpA qualitatively. The desired molecular weight bands were detected when the sera from recombinant OmpA and BCG injected mice were used; however, no band was seen using the sera specific to adjuvant was used. The capacity of OmpA formulation to induce the humoral and cellular immune response in BALB/c mice was evaluated. It was shown that the OmpA formulation induced the serum IgG level significantly, efficient in induction of serum IFN- γ level as BCG; however, weak in induction of serum IL-12 level. Recombinant OmpA protein might be used in TB vaccine development using double or triple fusions with different proteins, or different adjuvants inducing cellular response, such as CpG oligonucleotides. It is needed to evaluate the the protection capacity of OmpA formulation via assaying the *M. tuberculosis* adhesion in lungs and spleen.

2017, 91 pages

KEYWORDS: Immune response, immunology, interferon-gamma, interleukin 12, recombinant vaccine

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının amacı, Dünya Sağlık Örgütü'nün her yıl rapor olarak sunduğu dünya ve ülkemizi tehdit eden tüberküloz hastalığına karşı yeni bir rekombinant aşı geliştirilmesinde kullanılabilecek rekombinant OmpA proteinin antijenik etkisini belirlemek, dünya genelinde kullanılan ticari BCG aşısından daha etkin olabilecek yerli ve milli bir aşı üretmek amaçlanmıştır.

Tez çalışmamın planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren sayın hocam Doç. Dr. Sezer OKAY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Her türlü maddi ve manevi desteğiyle eğitim öğretim hayatım boyunca yanımda olan babam Ali KARABULUT, annem Rukiye KARABULUT, ablalarım Sümeyye KIZILOĞLU ve Hümeysra KARABULUT ÜNAL'a, biraderim Selman KARABULUT'a, enişterim Tolga KIZILOĞLU ve Murat ÜNAL' a çok teşekkür ederim. Aynı projede çalıştığımız ve Çankırı'ya geldiğimden bu yana arkadaşlığı, dostluğu, yardımsever ve misafirperverliği için Rukiye ÇETİN'e ayrıca teşekkür ederim.

“*Mycobacterium tuberculosis* OmpA Proteininin Antijenik Etkisinin Araştırılması” başlıklı bu tez çalışması Doç. Dr. Sezer OKAY Yürütücülüğünde TÜBİTAK 3501 Kariyer Geliştirme Programı kapsamındaki SBAG 214S359 nolu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

Fatih KARABULUT
Çankırı, Mayıs 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Tüberküloz.....	1
1.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4
1.3 <i>M. tuberculosis</i> Virülans Faktörleri.....	9
1.4 OmpA (Outer membrane protein A, Dış zar proteini A).....	10
1.5 Aşı.....	12
2. MATERYAL VE YÖNTEM	20
2.1 Bakteri ve Plazmitler	20
2.2 Primer Dizaynı	21
2.3 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Genomik Dna'sının Saflaştırılması.....	22
2.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	23
2.5 Jel Ekstraksiyon	24
2.6 pGEM-T Ligasyon Reaksiyonları	24
2.7 pET28-a (+) Ligasyon Reaksiyonları	25
2.8 <i>E. coli</i> DH5a Hücrelerine Transformasyon	25
2.9 Mavi-Beyaz Koloni Seçimi	26
2.10 Plazmit İzolasyonu	26
2.11 Manuel Plazmit İzolasyonu	27
2.12 Restriksiyon Enzim Kesimi	27
2.13 <i>E. coli</i> BL21 Hücrelerine Transformasyon	28
2.14 His-tag Proteinlerin Saflaştırılması	28
2.15 Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE).....	29
2.16 Poliakrilamid Jellerin Coomassie Blue R-250 ile Boyanması	30
2.17 Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi	30
2.18 Aşı Formülasyonlarının Hazırlanması.....	31
2.19 Western Blot	32
2.20 IgG ELISA	33
2.21 IFN- γ (İnterferon-gama) ELISA	34
2.22 IL-12 (İnterlökin 12) ELISA	35
3. BULGULAR	36
3.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Genomik DNA'sının Saflaştırılması, <i>16S rRNA</i> Analizi ve <i>ompA</i> Geninin Klonlanması	36
3.2 pET28-a (+) Vektörüne Klonlama.....	42
3.3 <i>ompA</i> Geninin <i>E. coli</i> BL21 Hücrelerinde İfadesi ve Rekombinant Proteinin Saflaştırılması	44
3.4 Protein Konsantrasyonunun Ölçülmesi ve Aşı Formülasyonunun Hazırlanması	45
3.5 Western Blot	46
3.6 Rekombinant OmpA Proteininin Hümorale Bağışıklık Yanıtı	49
3.7 İnterferon- gama (IFN- γ) ELISA	50
3.8 IL-12 (İnterlökin 12) ELISA	51

4. TARTIŞMA VE SONUÇ	53
KAYNAKLAR	63
EK A	70
EK B	72
EK C	73
EK D	78
ÖZGEÇMİŞ	80



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 DSÖ Tüberküloz 2015 raporu verilerine göre TB insidans, prevalans ve mortalite grafikleri	4
Şekil 1.2 M. tuberculosis elektron mikroskop görüntüsü	5
Şekil 1.3 M. tuberculosis'te aktif ve dormant hücre şematik gösterimi	6
Şekil 1.4 M. tuberculosis genom yapısı.	7
Şekil 1.5 M. tuberculosis hücre duvarı yapısı.	8
Şekil 1.6 Mycobacterium hücre duvarında OmpA proteinin görünümü.....	12
Şekil 1.7 BCG aşısını keşfeden bilim adamları	18
Şekil 2.1 Protein konsantrasyonlarının hesaplanması için kalibrasyon eğrisi.....	31
Şekil 2.2 Western blot deneyinde transfer sırasındaki düzen	33
Şekil 3.1 M. tuberculosis genomik DNA izolasyonu agaroz jel görüntüsü (M: 50 bp marker, 1: 6 µL DNA, 2: 12 µL DNA).	36
Şekil 3.2 ompA geni PZR agaroz jel görüntüsü (1: ompA PZR ürünü, 2: negatif kontrol, M: 50 bp marker).	37
Şekil 3.3 16S rRNA geni PZR agaroz jel görüntüsü (M: 50 bp marker, 1-2: PZR ürünü, 3: negatif kontrol).	37
Şekil 3.4 Mycobacterium tuberculosis izolatının 16S rRNA gen dizisi (Gen Bankası Erişim Numarası KY810766).	38
Şekil 3.5 M. tuberculosis hasta izolatının 16S rRNA dizisi BLAST analizi sonucu	39
Şekil 3.6 Jel ekstraksiyon sonrası agaroz jel görüntüsü (M: 50 bp marker, 1: ompA). ..	40
Şekil 3.7 pGEM-T-ompA mavi-beyaz koloni oluşumu görüntüsü.....	40
Şekil 3.8 pGEM-T-ompA plazmit izolasyonu agaroz jel görüntüsü (M: 50 bp marker, 1-2: ompA).	41
Şekil 3.9 pGEM-T-ompA restirksiyon enzim kesimi agaroz jel görüntüsü (M: 50 bp marker, 1-2: pGEM-T-ompA).	41
Şekil 3.10 M. tuberculosis hasta izolatının ompA gen dizisi (Gen Bankası erişim numarası KY848247)	42
Şekil 3.11 pET28-a plazmitinin BamHI restriksiyon enzimi ile kesiminin agaroz jel görüntüsü (M: 1 kb marker, 1-2: pET-BamHI).....	43
Şekil 3.12 pET28a-ompA plazmit izolasyonu agaroz jel görüntüsü (K: boş pET28a, 1-9 pET28a-ompA için taranan plazmitler, 1, 8 ve 9 numaralı plazmitler boş vektörden yukarıda gözlenmiştir).	43
Şekil 3.13 pET28a-ompA EcoRI-BamHI kesimi agaroz jel görüntüsü. (M: 50 bp marker, 1-2: ompA).	44
Şekil 3.14 Rekombinant OmpA proteinin nikel kolon uygulamasının SDS-PAGE görüntüsü (M: protein marker, K: IPTG eklenmemiş kontrol, L: IPTG eklenen kültür lizatı, F: kolona bağlanmayanlar, W: yıkama, E: elüsyon) ve Protein markerda bulunan bantların büyüklükleri.	46
Şekil 3.15 Saflaştırılan OmpA proteinine ait SDS-PAGE görüntüsü ve Saflaştırılan OmpA proteinine ait Western Blot görüntüsü (M: Prestained marker 1: OmpA).	47
Şekil 3.16 OmpA antijenine karşı BCG antikorunun çapraz reaksiyonunu gösteren Western blot deneyi (A: SDS-PAGE görüntüsü, B: Western blot görüntüsü, C: Bantların bulunduğu yerlerin çizgisel gösterimi. M: prestained marker, 1: OmpA).	48

Şekil 3.17 OmpA antijenine karşı BCG antikorunun çapraz reaksiyonunu gösteren Western blot deneyi (Adjuvan serumu ile yapılan Western blot deneyi).....	48
Şekil 3.18 Montanide ISA 720 VG adjuvanı ile hazırlanmış OmpA proteinine ait aşı formülasyonlarının BALB/c farelerdeki hümorale bağışıklık (total IgG) yanıtı. Serumların 1:800 seyreltme değerleri kullanılmıştır (***: $p < 0,001$).....	49
Şekil 3.19 Rekombinant OmpA aşı formülasyonunun BALB/c kobaylarda tetiklediği serum IFN- γ seviyesi.....	50
Şekil 3.20 OmpA formülasyonunun BALB/c farelerde tetiklediği serum IL-12 seviyesi.	51
Şekil 1 pGEM®-T Easy Klonlama Vektörü	70
Şekil 2 pET-28a(+) His-tag Tanımlama Vektörü	70
Şekil 3 Renklendirilmiş protein moleküler ağırlık merdiveni (fermentas #sm1811) ve renklendirilmemiş protein moleküler ağırlık merdiveni (fermentas #sm0431)	71
Şekil 4 GeneRuler™ 50bp DNA merdiveni	71

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 <i>M. tuberculosis</i> virülans faktörleri.....	10
Çizelge 2.1 Klonlama ve ekspresyonda kullanılan plazmitler	20
Çizelge 2.2 Kullanılan bakteri suşlarının özellikleri.....	21
Çizelge 2.3 PZR’de kullanılan primer özellikleri	21
Çizelge 2.4 PZR’de kullanılan içerik miktarları	23
Çizelge 2.5 PZR program ayarları	24
Çizelge 2.6 SDS-poliakrilamid jellerinin hazırlanması	29
Çizelge 2.7 Bradford ölçüm miktarları	30
Çizelge 2.8 Aşılama deneyindeki gruplar ve uygulamalar	32
Çizelge 2.9 Fareler için kan alma ve enjeksiyon zamanları.....	32
Çizelge 3.1 Bradford protein ve standart ölçümlerinin 595 nm’de absorban değerleri.....	46
Çizelge 3.2 OmpA aşısının BALB/c kobaylarda serum IFN- γ düzeylerinin tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey’s testi ile karşılaştırılması.	51
Çizelge 3.3 OmpA formülasyonunun BALB/c farelerde serum IL-12 düzeylerinin tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey’s testi ile karşılaştırılması.	52

SİMGELER DİZİNİ

Adenozintrifosfat	ATP
Amonyum persülfat	APS
Ampisilin	<i>amp</i>
Anlamli değil	AD
ATP Bağlanma Kaseti	ABC
Bacillus Calmette-Guérin	BCG
Baz çifti	bp
Beta	β -
Bir gece	o/n
Çok İlaça Dirençli Tüberküloz	ÇİD
Dakika Devir Sayısı	rpm
Deoksinükleotittriosfat	dNTP
Dünya Sağlık Örgütü	DSÖ
Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Deneyi	ELISA
Etilendiamin tetraasetik asit	EDTA
Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltii	pbs
Hidroklorikasit	HCl
İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü	HIV
İnterferon gama	IFN- γ
İnterlökin 12	IL-12
İzopropil- β -D-galaktopiranosid	IPTG
Kanamisin	<i>kan</i>
Kilo Baz	kb
Kilo Dalton	kDa
Lizis Elüsyon Yıkama	LEW
Luria Agar	LA
Luria Broth	LB
Outer Membran Protein A	OmpA
Poliakrilamid Jel Elektroforezi	PAGE
Polimeraz Zincir Reaksiyon	PZR
Ribo Nükleik Asit	RNA
Ribozomal RNA	rRNA
Sığır Serum Albumin	BSA
Siklik Adenozin Monofosfat	cAMP
Sodyum Dodesil Sülfat	SDS
Sodyum Klorür-Tris-EDTA	STE
Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi	SDS-PAGE
Tetrametil Etilen Diamin	TEMED
Tris Asetik asit Edta	TAE

1. GİRİŞ

1.1 Tüberküloz

Tüberküloz (TB), *Mycobacterium tuberculosis* kompleks olarak tanımlanan bir grup mikobakteri tarafından oluşturulan, çok değişik klinik görünlere sahip kronik bir hastalıktır. Genellikle akciğerleri (pulmoner TB), bazen de diğer bölgeleri (ekstrapulmoner TB) etkilemektedir. Akciğer TB hastaları bakteriyi öksürük ile dışarı atmakta ve hastalık hava yolu ile bulaşmaktadır. Genel olarak, 2-3 milyar insanın tahmini verilere göre nispeten küçük bir oranı (%5-15) *M. tuberculosis* ile enfekte olabileceği bildirilmiştir. Zamanımızda dünya nüfusunun yaklaşık olarak üçte birinin *M. tuberculosis* ile enfekte olduğu bilinmektedir (Rappuoli and Aderem 2011). Ancak TB olasılığı HIV ile enfekte kişiler arasında çok daha yüksektir (Gutierrez *et al.* 2005). TB, insanlık tarihi kadar eski bir geçmişe sahip ve tarih öncesi çağlardan bu yana bilinen bir hastalıktır. Viral hastalıkların aksine uzun inkübasyon devri olan enfeksiyöz bir etkiye sahiptir (Koprowski and Michael 1996).

Üç yüz milyon yıldan beri varlığını devam ettiren verem basili doğanın her yerinde bulunmaktadır. Aynı ortamı paylaşan insan ve hayvanlar sebebiyle aslında sığırlarda hastalık oluşturan patojenin mutasyon geçirerek insanlarda hastalık oluşturabilmek için *M. humanus*'a dönüşmüş olabileceğini ileri sürmüşlerdir (Koprowski and Michael 1996). Fakat tüberküloz basilinin genomu belirlendikten sonra *M. bovis*'ten mutasyon sonucu gelişen bir bakteri olmadığı anlaşılmıştır. Ancak *M. tuberculosis* ve *M. bovis* ortak bir atadan mutasyon sonucu farklılaşmış iki tür olabileceği de düşünülmektedir (Brosch *et al.* 2000). Sığır hastalık etmeni olan mikobakteri önceleri insanlarda lenf bezi ve kemik veremine sebep olmuştur. Daha sonradan akciğerlerde enfeksiyon oluşturan ve öksürük ile yayılan bir hastalık haline gelmiştir (Koprowski and Michael 1996).

TB, insanların hayatını tehdit eden bir hastalık olmakla birlikte, dünya genelinde ilk sıralarda yer alan ölüm sebeplerinden biridir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) dünya genelinde 2013 yılında 9 milyon kişide yeni TB olgusunun ve 1.5 milyon kişide ise TB'ye bağlı ölümlerin gerçekleştiğini bildirmiştir (DSÖ 2015).

TB önemli bir küresel sağlık sorunudur. TB, dünya çapında her yıl milyonlarca insan arasında ölümlere yol açan bir hastalık olan insan immün yetmezlik virüsü (HIV) yanında yer almaktadır. 2014 yılında tahmini olarak 9.6 milyon yeni TB vakası meydana gelmiştir. Bu vakaların 5.4 milyonu erkek, 3.2 milyonu kadınlarda ve 1 milyonu çocuklar arasında görülmüştür. 1.5 milyon TB ölümlerinin 1.1 milyonu HIV-negatif insanlar arasında gerçekleşirken 0.4 milyonu HIV-pozitif insanlar arasında görülmüştür (DSÖ 2015). TB ölümlerinin yaklaşık 890.000'i erkek, 480.000'i kadın ve 140.000'i çocuklardan oluşmaktadır. TB ölümlerinin sayısı kabul edilemeyecek kadar yüksek olmuştur. Zamanında tanı ve doğru tedavi ile hastalığa yakalanan insanlar tedavi edilebilir. DSÖ 1997 yılından bu yana her yıl küresel TB raporunu yayınlamıştır. Bu raporların amacı üye devletler tarafından onaylanan küresel, bölgesel ve ülke düzeyinde TB tanı ve tedavisinde hastalığın ilerleyişini göstermektir (DSÖ 2015).

TB hastalığına toplum dilinde birçok isim verilmiştir. İnsanları eriterek öldürdüğü için “tüketim hastalığı” anlamına gelen “consumption”, ölenlerin çoğu sararmış yüzlü ya da beyaz yüzlü olduğu için “Beyaz Ölüm” veya “Beyaz Veba” (White Death; White Plaque) ve çok önemli bir ölüm sebebi olduğu için de “Ölümün Kaptanı” (Captain of the death) bunlardan sadece birkaç tanesini teşkil etmektedir (Dubos and Dubos 1952).

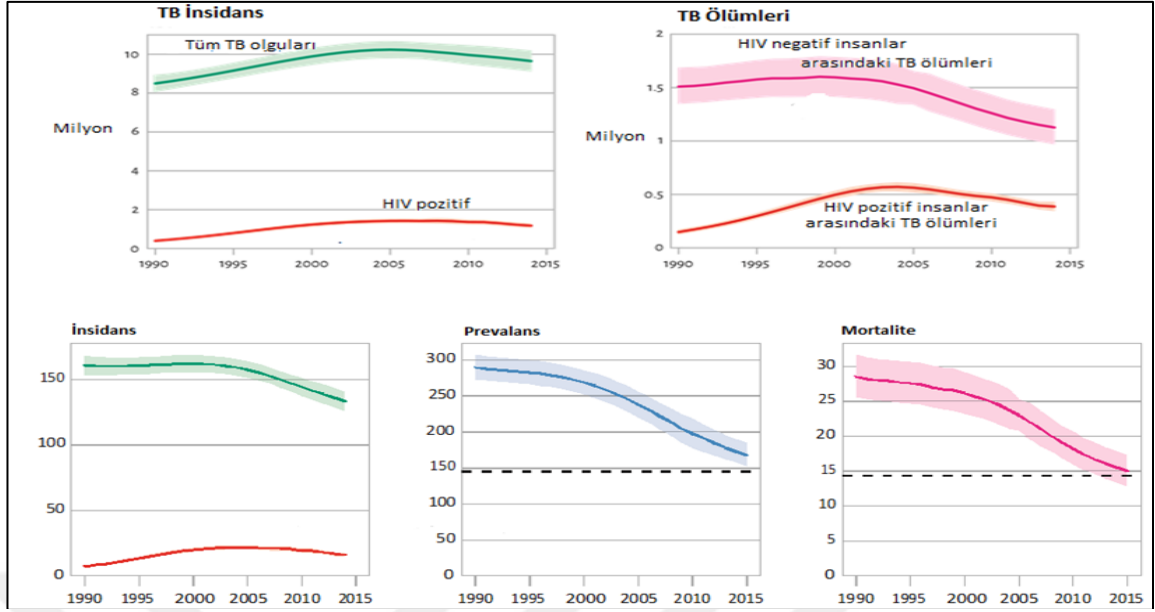
TB hastalığına yakalanan kişilerin sağlık kuruluşlarına geç başvuruda bulunması ya da uygun olan tedavilere erken zamanda başlamamaları nedeniyle her aktif akciğer TB'li olguların bir yılda 10-15 kişiyi enfekte edebileceği varsayıldığında, korunmanın ne derece önemli olduğu görülmektedir (Abu-Raddad *et al.* 2009). TB tanısındaki gecikmeler bu hastalığa yakalanan kişilerde, sekonder içerikli ilaçların

direncine ve mortalitede artışlara neden olabilmektedir. Bu enfeksiyona son vermenin en önemli basamağı toplumdaki bulaşma riskini azaltmaktır. Bunun için gerekli olan en etkili yöntem aktif aşılamaadır (Koç 2014).

TB tanısı için dünya çapında en yaygın yöntem balgam yayma mikroskopisidir. Bu yöntem balgam numunelerinin mikroskop altında incelenerek bakterilerin görüntülenmesidir. TB ve ilaca dirençli TB tanı ve tedavisinde son zamanlarda geliştirilen yeni moleküler tanı testleri kullanımı hızla artmaktadır. Daha gelişmiş laboratuvar kapasitesine sahip ülkelerde TB vakaları kültür yöntemleri üzerinden teşhis edilmektedir. Tedavi edilmez ise ölüm oranı yüksektir (DSÖ 2015).

TB hastalık olguları sıklığı açısından ölçülebilir. Hastalığın ölçülebilme sıklığı, belirli bir süre içinde ortaya çıkan yeni TB olgu sayısı olarak tanımlanabilir. Zaman içinde belirli bir noktada ortaya çıkan TB vakalarının sayısı prevalans olarak tanımlanır. Genellikle bir yıl içerisinde TB sonucu ölüm sayısı mortalite olarak adlandırılır. İnsidans ise belirli bir nüfusta belirli bir zaman dilimi içerisinde yeni TB olgularının sayısını ifade eder (Şekil 1.1) (DSÖ 2015).

TB için etkili ilaç tedavileri ilk olarak 1940'larda geliştirilmiştir. Tedavide en etkili birinci basamak anti-TB ilacı rifampisin 1960 yılında kullanılabilir hale getirilmiştir. İlaça duyarlı yeni TB vakaları için günümüzde önerilen tedavi birinci basamak olan izoniazid, rifampin, etambutol, pirazinamid ilaçlarının kullanımınıdır. %85 veya daha fazla başarılı olunan tedavi oranları üye devletler tarafından düzenli olarak DSÖ'ne bildirilmektedir. En güçlü anti-TB ilaçları olan izoniazid ve rifampisin direnç olarak tanımlanan çok ilaca dirençli TB (ÇİD-TB) tedavisi uzun süre, pahalı ve daha toksik ilaçlar kullanılmasını gerektirmektedir (DSÖ 2015).



Şekil 1.1 DSÖ Tüberküloz 2015 raporu verilerine göre TB insidans, prevalans ve mortalite grafikleri

1.2 *Mycobacterium tuberculosis*

Mikobakterilerin insanlık tarihinin ilk dönemlerinden beri var olduğu ve hastalık oluşturduğu düşünülmektedir. Bu büyük bakteri ailesinin, günümüzün ilerleyen laboratuvar teknolojileriyle tanımlanmış 130'dan fazla üyesi bulunmaktadır (Gutierrez *et al.* 2005).

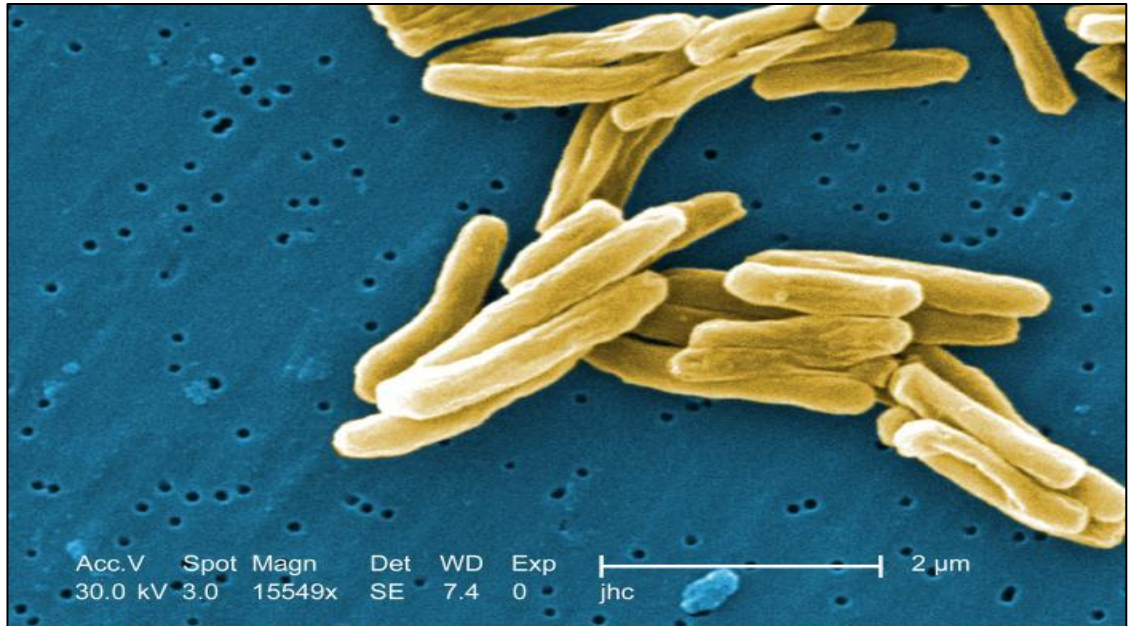
Bu türler patojen, patojen olmayan (saprofit) ve fırsatçı mikobakteriler olmak üzere üç gruba ayrılırlar. Sayı olarak en az üyeye sahip olan patojen mikobakteri grubu, en önemli mikobakteri türü olan *M. tuberculosis*'i de içinde barındırır. *Mycobacterium* cinsi, Prokaryot aleminin, Firmicutes bölümünün, Actinobacteria sınıfının, Actinomycetales takımının, Mycobacteriaceae ailesine dahil olup bu ailedeki tek cinstir (Köksal *et al.* 2003).

İnsanda en sık hastalık oluşturan mikobakteri türü, tüberküloz hastalığının etkeni olan *M. tuberculosis*'tir. *M. tuberculosis*, *M. tuberculosis* kompleksinin bir üyesidir. Bu kompleks içinde *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M.*

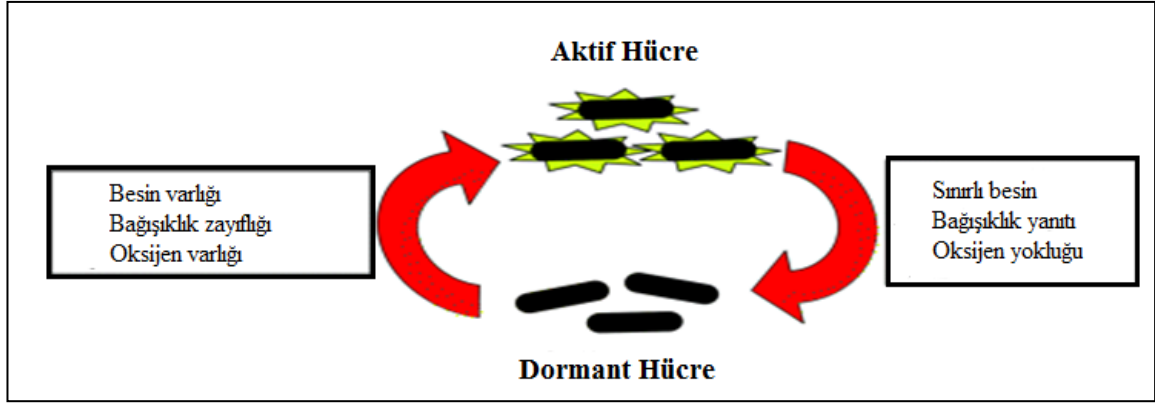
pinnipedii ve *M. caprae* bulunurlar. DNA hibridizasyon çalışmaları sonucunda bu kompleksdeki suşlar arasında yakın homoloji olduğu gösterilmiştir (Gutierrez *et al.* 2005).

M. tuberculosis, Gram pozitif 1-4 µm uzunluğunda 0.3-0.6 µm eninde, ince ve bazen hafifçe kıvrık, hareketsiz, sporsuz, kapsülsüz çomak şeklinde ve zorunlu aerobik bir bakteridir (Şekil 1.2). Tüberkül basilinin bazı karakteristik özellikleri vardır. Bunlar yavaş büyüme, dormansi, karmaşık hücre membranı hücre içi patogenezi ve genetik homojenliktir. *M. tuberculosis* büyüme süresi sentetik ortam veya enfekte olmuş canlıda ortalama 24 saattir (Cole *et al.* 1998).

Basil enfekte doku içerisinde suskun bir hale geçer ve bu durum dormansi olarak adlandırılmaktadır. Dormansi durumu basilin metabolik faaliyetlerinin durdurulmasıdır. Fakat bu durumda enfeksiyon etkisi ortadan kalkmamaktadır. Bağışıklık yaşlanma veya bağışıklık baskılanması yolu ile azalır ve ilk enfeksiyondan sonra dormansi durumuna geçen bakteriler herhangi bir immün yetmezlik durumunda yeniden aktif hale geçebilir (Şekil 1.3) (Cole *et al.* 1998).



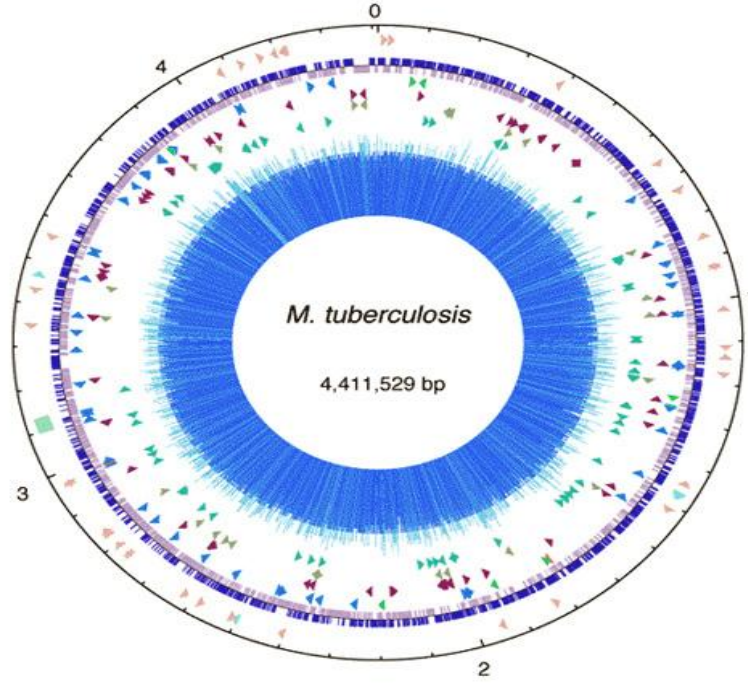
Şekil 1.2 *M. tuberculosis* elektron mikroskop görüntüsü (<http://www.microbiologybook.org>)



Şekil 1.3 *M. tuberculosis*'te aktif ve dormant hücre şematik gösterimi (Wayne and Sohaskey 2001)

M. tuberculosis'te mumsu bir kılıf bulunur ve bu yapı bakteriyi konak immün sistem hücrelerine karşı dirençli hale getirir. *M. tuberculosis* hücre içi bir patojen olup konağın makrofajlarına yerleşir. Burada hücre içi ve lokal doku ortamını değiştirerek kazeöz nekroz ve granuloma oluşturur. Çeşitli mikobakteri türü enfeksiyonları makrofajlar içerisinde siklik AMP (cAMP) patlamasına neden olarak hücre içi sinyal iletimini etkiler (Agarwal *et al.* 2009). Bakteri ayrıca hücre içerisinde hayatta kalabilmek için konakta fagozom oluşumunu engeller (Bell *et al.* 2011).

M. tuberculosis genomu (Şekil 1.4), 4,411,529 baz çifti, 4 bin gen ve yaklaşık %65,6 G-C içeriğine sahiptir. Kromozom halkasal yapıda ve *Escherichia coli* genomuyla yaklaşık aynı büyüklüktedir. *M. tuberculosis*'in genomu yaklaşık 7 milyon bp'lik kromozomu olan *M. smegmatis* gibi hızlı üreyen çevresel mikobakteri türlerinden daha kısadır. Bu durum hücre içi ortamdaki genetik izolasyona ve hücre içi ortamda gereksiz olan genlerin kaybına bağlanmaktadır. Genomundaki yüksek G-C içeriğini yansıtacak şekilde *M. tuberculosis* glisin, alanin, prolin ve arjininden zengin proteinler içerirken, A-T'den zengin kodonların kodladığı lizin ve asparajin amino asitleri düşük oranlarda bulunmaktadır. Yüksek G-C içeriği bakterinin aerobik yaşam şekliyle ilişkilidir. Buna karşın, *M. tuberculosis* anaerobik ortamlara da uyum sağlayabilecek metabolik potansiyele sahiptir (Brosch *et al.* 2000).

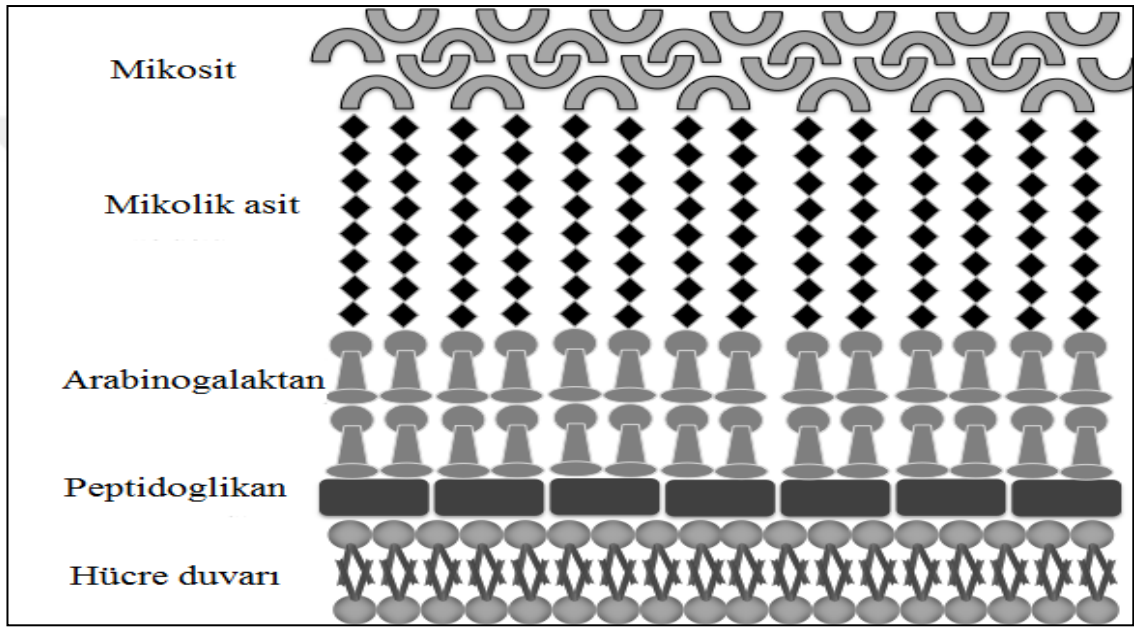


Şekil 1.4 *M. tuberculosis* genom yapısı (Cole *et al.* 1998).

M. tuberculosis birçok antibiyotiğe doğal olarak dirençlidir ve bu da tedaviyi zor hale getirmektedir. Bu direnç esas olarak geçirgenlik bariyeri görevi olan son derece hidrofobik hücre zarından kaynaklanmaktadır. Ancak birçok potansiyel direnç belirleyiciler genomda kodlanmıştır. Bunlar; hidrolitik veya ilaç değiştirici enzimler örneğin; β -laktamazlar, birçok potansiyel dışa atım sistemleri ve ATP bağlanma kaseti (ABC) taşıyıcılarıdır. Bu direnç mekanizmaları hakkında mevcut olan bilgiler sayesinde ilaçların daha etkili kullanımı ve yeni tedavilerin geliştirilmesi sağlanmaktadır (Cole *et al.* 1998).

Tüberküloz basilinin hücre duvarı diğer bakterilere göre çok daha kalındır ve yüksek oranda lipid içerir. Hücre duvarının dış kısmı mikolik asit denen, 60- 90 karbonlu, uzun ve dallı yağ asitlerinden oluşur. Mikolik asitler arabinogalaktan molekülleri aracılığıyla daha iç kısımdaki peptidoglikan tabakasına bağlanırlar. Hücre duvarının iç kısmını oluşturan peptidoglikan tabakası, tüberküloz basilinin şeklini veren ana yapı olmanın yanısıra, yapısal bütünlüğün korunmasında da önemlidir. Dıştan içe doğru mikolik asit, arabinogalaktan ve peptidoglikandan

oluşan bu sağlam yapı, bir zırh gibi mikobakteri hücrelerini çevreler. Bu yapının sağlamlığı, lipoarabinomannan, mannosfosfoinositid, serbest lipid ve polipeptidlerin de katılımıyla, daha da artar. Arabinogalaktan tabakası, mikolik asitlerle peptidoglikan arasında köprü görevi gören dallanmış bir polisakkarittir (Brennan 2003). *M. tuberculosis* hücre duvarı (Şekil 1.5), diğer bakterilerin hücre duvarı ile karşılaştırıldığında oldukça kalın ve olağanüstü bir lipofilik özellik taşır. *M. tuberculosis* hücre duvarı üç tabakadan oluşmaktadır.



Şekil 1.5 *M. tuberculosis* hücre duvarı yapısı (Soulen *et al.* 1998).

Peptidoglikan (mürein), plazma zarının üzerinde bulunan en iç tabakadır. Kısa peptit zincirleri ve çapraz bağlarla sıkıca bağlanan uzun polisakkarit zincirlerinden oluşmuştur. Hücrenin sert yapısını sağlar. Arabinogalaktan, peptidoglikan tabakasının üzerinde bulunan ikinci tabakadır. Hücre duvarı kitlesinin %35'ini oluşturur ve peptidoglikan tabakasına fosfodiester köprüleriyle bağlıdır. Arabinogalaktanların yan zincirindeki uç arabinaz birimlerine mikolik asit diye adlandırılan uzun zincirli bir grup yağ asidi kovalent olarak bağlanır. Mikoizidler, en dış tabakayı oluşturur. Peptidoglikolipitlerden oluşmuştur. Hücre duvarında

bulunan ve duvar ağırlığının %60'ını oluşturan lipitler bu tabakada bulunur. Bu lipitler mikolik asitleri içerir (Ullrich 2009).

Mum kıvamındaki bu kalın hücre duvarı birçok ilaç molekülünün hücre içine girişini engelleyerek doğal bir direnç oluşturur. *M. tuberculosis*'e etkili olacak ilaçlar öncelikle bu tabakadan kolayca geçebiliyor olmalıdır. Bunun yanısıra lipidden zengin bu kalın hücre duvarı, mikroskopik inceleme amacıyla uygulanan birçok boyanın hücre içine geçişine de engel olur. Bu nedenle mikobakterilerin boyanabilmesi amacıyla diğer bakteriler için kullanılan boyama yöntemlerinden daha farklı boyama yöntemleri kullanılır (Ryll *et al.* 2001, Ullrich 2009). *M. tuberculosis*, hücre duvarı yapısında oldukça fazla lipit içermesi nedeni ile asit ve alkole dayanıklıdır. Konak hücreleri tarafından salınan eritici enzimlere ve bakterisidal ilaçlara karşı dirençlidir (Ullrich *et al.* 2009).

1.3 *M. tuberculosis* Virülans Faktörleri

M. tuberculosis en başarılı insan patojenleri arasında yer almasına rağmen patojenitesi hakkında pek fazla bilgi bulunmamaktadır. Robert Koch tüberküloz basilinin keşfi sırasında basilin toksin üretmediğini göstermiştir. *M. tuberculosis* virülans faktörleri, proteinlerin bilinen veya tahmin edilen işlevlerine göre gruplandırılmıştır (Çizelge 1.1) (Smith 2003). Aynı zamanda *M. tuberculosis*'te tanımlanan birçok virülans faktörü *M. smegmatis* gibi patojen olmayan mikobakteri türlerinde de görülebilmektedir. Bakterinin virülansı ile ilgili olarak, bir genin varlığı ya da yokluğundan daha çok ne kadar eksprese edildiği önemli olabilmektedir (Pym and Small 2006).

M. tuberculosis'in ölümcül olmasının sebebinin basit bir cevabı ne yazık ki son yüzyıldır elde edilen bilgilere rağmen bulunamamıştır. *M. tuberculosis*'in diğer patojen bakteriler gibi hastalık nedeni olan klasik bir virülans faktörleri yoktur. Mortalite (ölüm) ve morbidite (hastalık) terimleri virülans için kullanılmaktadır. Virülans ile ilişkili diğer bir parametre ise, bakteriyel yüküdür yani ilk enfeksiyondan

sonra konak canlı içinde bulunan bakteri sayısıdır. *M. tuberculosis* bir hücre içi patojeni olduğu için genelde makrofaj hücrelerini enfekte etmektedir. Bu nedenle fagositik hücreler *M. tuberculosis* ve mutantlarının ölümcüllüğünü analiz etmek için kullanılabilir (Smith 2003).

Çizelge 1.1 *M. tuberculosis* virülans faktörleri (Smith 2003).

Hücre salgısı ve zarf işlevi	Kültür filtre proteinleri, hücre yüzey bileşenleri
Hücre metabolizması ile ilgili enzimler	Lipit ve yağasidi metabolizması, aminoasit ve pürin biyosentetik genleri, metal alımı, anaerobik solunum ve oksidatif stres proteinleri
Transkripsiyon düzenleyiciler	Sigma faktörleri, cevap düzenleyiciler, diğer transkripsiyon düzenleyiciler

1.4 OmpA (Outer membrane protein A, Dış zar proteini A)

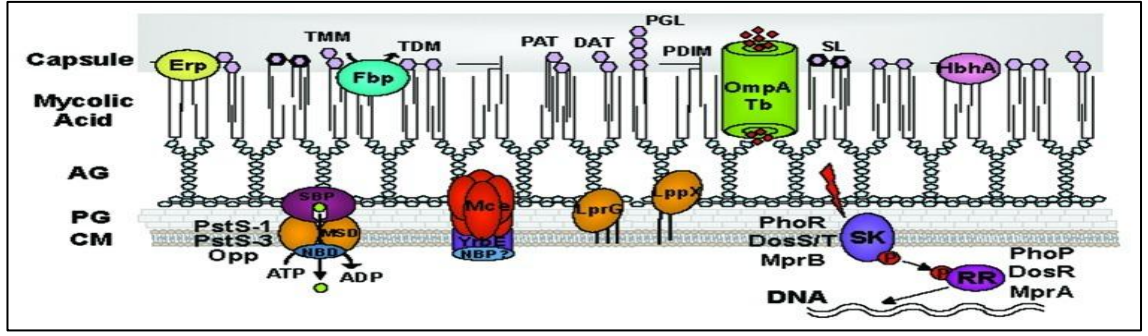
ompA geni 981 bp olarak tanımlanmıştır. Gen, 7.28 izoelektrik noktasına sahip aminoasitlerden oluşan 33.5 kDa ağırlığında bir protein kodlamaktadır. *ompA* N-terminal sinyal peptid ve C-terminal korunmuş etki alanı bulunmaktadır. Gözenek oluşturucu dış zar membran proteini OmpA, *M. tuberculosis*'te ana fagozomların asit direnci için gerekli hastalık oluşturma faktörüdür. OmpA iki bağımsız alandan oluşmaktadır ve bu alanlar prolin açısından zengindir. OmpA, yüksek oranda suda çözünmektedir (Singh and Verma 2008).

M. tuberculosis hücre duvarı son derece hidrofobik özelliktedir ve güçlü bir bariyer oluşturmaktadır. *E. coli* dış membranı ile karşılaştırıldığında yaklaşık 100 kat daha az geçirgendir. *ompA*-TB aktivitesi pH değişkenliğinden etkilenmektedir. Düşük pH değerlerinde *ompA* geçirgenliğinde bir azalma olduğu görülmüştür. *ompA*-TB'nin bu özel davranışı düşük pH koşullarında ve hafif asidik ortamda karşılaşılan

konak makrofajların fagozomlarına karşı *M. tuberculosis*'in hayatta kalabilmesi için faydalı olduğu ileri sürülmüştür. Aynı zamanda *ompA*-TB mikobakteriyel türlerin virülans faktörlerinden birisidir (Senaratne *et al.* 1998).

M. tuberculosis genomik veri tabanında, dış zar membran proteini ile homoloji gösteren açık okuma çerçevesine sahip olduğu görülmüştür. Bu gen, Gram negatif bakterilerde bulunan porinler içeren *ompA* familyasına ait bir protein kodladığı belirtilmiştir. *ompA*-TB, 1.4-1.8 nm gözenek çapına ve düşük spesifik aktiviteye sahip bir porin gibi davranan ve aynı zamanda aktif olarak tek kanallı iletkenlik gösteren bir proteindir (Şekil 1.6). SDS-PAGE ile 38 kDa'luk bir moleküler ağırlığa sahip olduğu görülmüştür (Ryan *et al.* 1998).

OmpA prolince zengin bölge tarafından ayrılan iki bağımsız bölgeden oluşmuştur. Karboksil ucunun çözünürlü yapısı gram pozitif bakterilerindeki gibi diğer OmpA proteinleri ile benzerlik göstermektedir. N-terminal (73–204) uçta ise lipid ikili tabakada kanal oluşturmada etkili olan a1b sandviç yapı gözlemlenmiştir. OmpA'nın farklılığı bakteri proteinlerinin fosfolipitlerle etkileşimini sağlayan BON (Bacterial OsmY and Nodulation) bağlı örtüşen iki alt birimden oluşmasından kaynaklanmaktadır. *ompATb73–204* ileri düzeyde suda çözünmesine rağmen model membranlarda yeni kanalları oluşturabilmektedir. *ompATb73–204* minor oligomerik içeriği ve majör monomerik şekli üzerinde "A HADDOCK modeling of the NMR" ile elde edilen veriler tip III salgı sistemi gibi fosfolipit membrana girebilmek için oligomerik halka oluşturabilmektedir (Yang *et al.* 2011).



Şekil 1.6 *Mycobacterium* hücre duvarında OmpA proteininin görünümü (Forrellad *et al.* 2013)

1.5 Aşı

Canlı veya ölü antijenik mikroorganizmaları, bakteri toksinlerini, toksoidleri, bakteri ve virüslerin belirli bölgelerinden alınmış antijenik materyalleri içeren, uygulandıkları organizmada belirli bir enfeksiyon veya intoksikasyon etkenine karşı bağışıklık sağlayan biyolojik maddelere aşı denir (Klegerman and Groves 1992).

Aşılar bulaşıcı hastalıklar buna bağlı sakatlık ve ölümlerin azaltılması ve en önemlisi uzun vadede hastalık etmeninin ortadan kaldırılması açısından insan ve toplum sağlığını korumada vazgeçilmez bir öneme sahiptir (Calis *et al.* 2001). Yeni aşı geliştirme hedefi; yeni aşı antijenlerinin ve terapötik antikor/antiserumların geliştirilmesi, mevcut olanların üretim teknolojilerinin iyileştirilmesi, immünojenitesi yeterli bir prototip ve formülasyonunun oluşturulması hedeflenmektedir. Öncelikli olarak ülkenin yada bölgenin ihtiyaçlarına göre hazırlanmalıdır. Bunun yanı sıra bir aşıda bulunması gereken özellikler; etkin , stabil, ucuz , güvenli ve erişilebilir olmasıdır. Aşı uygulama yolları; intramuskuler, intravenöz, intradermal, subkutan, intranazal ve oraldır (Nicolas and Guy 2008).

Aşı geliştirmede adjuvanların önemli bir rolü vardır. Adjuvan, antijenlerle fiziksel veya kimyasal bağlantı yoluyla bağışıklık tepkilerini arttıran yardımcı bir maddedir. Özellikle adjuvanlar, aşı içerisindeki antijenlere karşı spesifik bağışıklık tepkilerinin artırılmasına yardımcı olur (Kuroda *et al.* 2013). Son zamanlarda,

yüzlerce malzeme adjuvan olarak denenmiştir. Bakteriyel metabolitler, bağışıklık uyarıcı madde içeren mineral yağ/yüzey aktif madde, mikropartikül, nükleik asit, lipozom ve polisakkarit bunlardan bazılarıdır, ancak yalnızca alüminyum esaslı adjuvanlar küresel bazda yaygın olarak kullanılmaya devam edilmektedir (He *et al.* 2015). Alüminyum adjuvanları hücrel immün yanıtın oluşmasında yetersiz kalmaktadır. Bağışıklık yanıtı oluşturulması gereken ve dünyadaki en önemli ölüm nedenleri olarak kabul edilen HIV (İnsan bağışıklık yetmezlik virüsü), tüberküloz ve sıtma aşılarında kullanılamamaktadır (Aguilar and Rodriguez 2007). Alt ünite tüberküloz aşısı çalışmalarında, koruyucu bir bağışıklık yanıtı için güçlü bir adjuvan kullanılması gerekmektedir. Tüberküloza karşı dirençte Th1 tipi hücrel bağışıklık, özellikle de interferon gamma (IFN- γ) ve interlökin 12 (IL-12) sitokinleri büyük öneme sahiptirler (da Costa *et al.* 2014). Modern aşılarında kullanılan saf rekombinant veya sentetik antijenlerle ilgili en önemli sorun, genelde geleneksel veya inaktif aşılarla göre çok daha az immünojenik olmasıdır. Bu nedenle, insan aşılarında geliştirilmiş ve daha güçlü adjuvanlara büyük bir ihtiyaç duyulmaktadır. Özellikle, hücrel (Th1) bağışıklığı uyarabilen, güvenli ve toksik olmayan adjuvanlara yönelik talep vardır (Petrovsky and Aguilar 2004)

Aşısı tipleri

Günümüzde kullanılan aşıların hemen hemen hepsi bakteriyel ve viral enfeksiyonlara karşıdır. 3 tip aşısı vardır; zayıflatılmış mikroorganizma (canlı), inaktive edilmiş mikroorganizmalar ve alt ünite aşılar (Ada 2003).

Klasik aşılar başlıca organizma aşıları ve alt ünite aşıları olarak iki ana grup halinde bölünebilir. Bu, bakteriyel ve viral aşılar için de geçerlidir. Kullanımda olan birçok bakteriyel aşılar, bakteriyel bileşenler ve alt birimlerine dayalı olabilir. Ancak viral aşılarında tüm organizma canlı zayıflatılmış veya inaktive edilerek aşısı olarak kullanılmaktadır. Bazı durumlarda alt ünite viral aşılar klasik aşılar arasında yer almaktadır (Beigel *et al.* 2009).

Canlı aşılar

Bazı canlı bakteriyel aşılar, insan aşılarının en başarılısı olarak kabul edilmiştir. Canlı aşılar bir ya da iki uygulama ile uzun süre bağışıklık kazandırır. Hastalığa neden olan mikroorganizma özel laboratuvar koşullarında üretilerek virülansını veya hastalığa neden olan özelliklerini kaybeder. Bu tip aşuların en önemli avantajı hem hümmoral, hem de hüccresel bağışık yanıt oluşturdıkları için genellikle tek doz olarak uygulanıp güçlendirme dozu gerektirmemeleridir (Abbas *et al.* 2003).

Bu tür aşuları geliştirmek için dört genel yaklaşım kullanılmıştır; Öncü bir yaklaşım olarak Edvard Jenner, insanlarda aşı olarak doğal bir konakçı patojen kullanmıştır. Yaygın olarak kullanılan yabanıl tip mikroorganizmalar insanlarda bağışıklık ve uzun süre kalıcılık sağlamak için doku kültürlerinde ya da hayvan konaklarda pasajlanır. Salgınlar sırasında düşük virülans şusları izole edilmiştir. Olumsuz koşullarda, çok düşük ve 37°C'nin üstündeki sıcaklıklarda büyüyen mutantlar seçilmiştir. İnfluenza virüsünün soğuya uyarlanmış suşları 25°C'de büyütülmüştür ve viral genlerin mutasyona uğradığı görülmüştür. Bu tür suşların klinik çalışmaları 1960'lardan beri var olmasına rağmen insan için kullanımları mevcut değildir (Ada 2003).

19. yüzyılın son çeyreğinden itibaren, veba, tifüs, kolera, difteri ve tüberküloz gibi ciddi hastalıkların etkeni olan bakteriler ortaya çıkmıştır. Bu bakteri kültürlerinin elde edilmesi bakteriyel aşuların geliştirilmesine yol açmıştır. Viral aşılarda olduğu gibi, ilk bakteriyel aşılarda zayıflatılmış canlı aşular geliştirilerek elde edilmiştir. Pasteur, eski *Pasteurella pestis* kültürlerini kullanarak inek, keçi ve koyun şarbonlarına karşı basili ısıtarak (42-43°C) ilk veteriner aşı uygulamasını gerçekleştirmiştir (Arnon 2011).

Canlı zayıflatılmış aşular en geniş ve farklı bağışıklık cevaplarını tetikleme potansiyeline sahiptir. Bu bağışıklık yanıtla bir sonraki enfeksiyona karşı korumada bunu kontrol etmekte ve temizlemede etkin olabilir (Ada 2003).

İnaktive aşılar

Pek çok inaktive aşı etkinliği değişen bakteri temellidir. Zayıflatılmış canlı aşılarla göre bu aşılar önemli ölçüde yüksek dozlar halinde ve daha sık uygulama gerektirmektedir. Bakteriyel aşılar, genellikle hastalığı önlemekte etkilidir. Bu tür aşılar düşük etkili, inaktive edilmiş patojenleri içermektedir (Ada 2003).

Hastalığa neden olan mikroorganizmanın kimyasal yolla veya ısı ile tamamen inaktive edilmesi yoluyla üretilirler. Bu aşılar stabil ve güvenilirdir, hastalığa neden olabilecek bir forma dönüşmezler. Canlı aşılarla nazaran dolaşımdaki antikorlarla çok daha az etkileşime girdikleri için genellikle hümoral bağışıklık yanıt oluştururlar (Beyazova and Aktaş 2007).

İnaktif hale getirilmiş aşılar genellikle arzu edilen bağışıklık tepkilerini indükler fakat T hücresi tepkisi oluşturmaz. Birçok virüs, bakteri ve parazit tarafından oluşturulan hücre içi enfeksiyonları temizlemek amacıyla önemli bir bağışıklık tepkisi verdiği ortaya koyulmuştur (Ada 2003).

Alt birim aşılar

Yeni nesil aşıların asıl gereği, mikroorganizmalara karşı hem hücre içi hem hücre dışı enfeksiyonları önleyecek şekilde antikor oluşturmalarıdır. Bu tür antikorlar tarafından tanınan bir ya da birkaç epitop mikroorganizma yüzeyinde bulunan protein ya da karbonhidratlarda mevcuttur. Bu tür bileşenlerin izole edilmesi ilk viral ve bakteriyel alt ünite aşıların oluşturulmasında temel olmuştur. Viral influenza ve hepatit B aşılarında mikroorganizmanın yüzey antijenleri kullanılmıştır. Bakteriyel aşılarında ise kapsüllü bakterilerin farklı polisakkarit bazlı bileşenleri aşı olarak kullanılmıştır (Arnon 2011).

Alt birim aşılar da bağışıklık büyük ölçüde arttırılmıştır. Özellikle bebekler için protein taşıyıcısına karbonhidrat birleştirmek suretiyle immünoglobulin üretimi için T hücrelerinin bağışıklığa katılımı sağlanmıştır. Genetik mühendisliği ile yapılan aşı döneminde antijen kodlayan genlerin maya hücrelerine transferi ile önemli bir ilerleme meydana gelmiştir. Alt birim aşılar yetişkinlerde bağışıklık yanıtını %17'ye kadar arttırmıştır (Ada 2003).

Mikroorganizmalardan ayrıştırılmış antijenik maddeler, parçalar veya mikroorganizmaların ürettiği toksinlerin laboratuvar koşullarında inaktive edilmesi ile oluşturulan toksoidler kullanılarak üretilmiş toksoid aşılar bu grupta yer almaktadır. Toksoid aşılar mikroorganizmalar tarafından üretilen ve zararlı olan toksinin inaktive edilmesiyle oluşturulan aşılardır. Toksoid antitoksik antikorların yapımını harekete geçirirler. Bu grupta yer alan polisakkarit aşılar B lenfositik yanıt oluşturmak için pek de güçlü antijenik yapılar değildir. Ancak, vücuttan kolay atılmadıkları ve lenfoid dokularda uzun süre kaldıkları için uzun süre tekrarlayan spesifik B lenfosit yanıtı oluştururlar. Alt birim aşılar rekombinant olarak da üretilebilirler (Abbas *et al.* 2003).

Alt ünite aşılar da inaktive edilmiş aşılar gibi hücre aracılı bağışıklık elde edilmesi daha zordur. Daha iyi bir immün yanıt için antijenin daha uzun süreli salınmasını sağlayan bir yardımcı madde (adjuvan) gerektirir (Okay 2011).

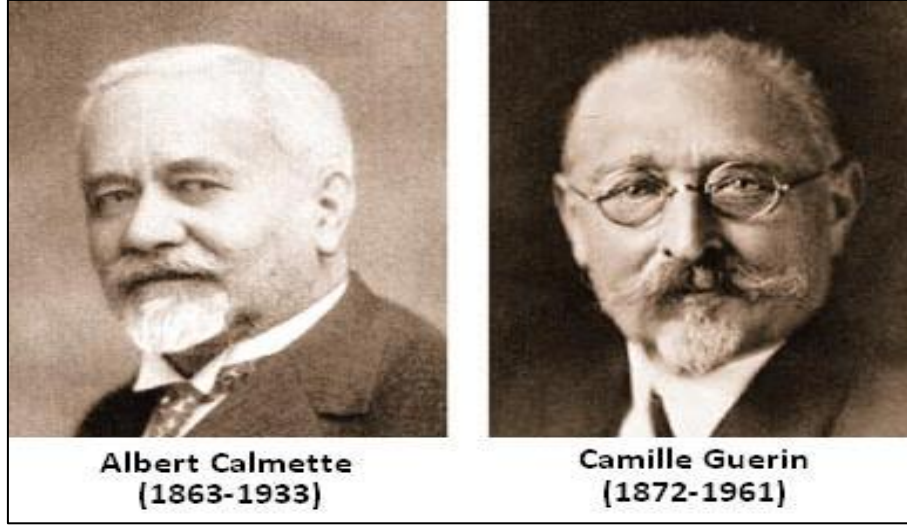
Rekombinant aşılar, biyolojinin diğer alanlarına benzer şekilde aşılama konusunda rekombinant DNA yaklaşımları yeni bir uygulama getirmiştir. Rekombinant DNA teknolojisi antijenlerin belirlenmesinde ve izole edilmesinde kullanılabilir. Bu nedenle, bir organizmanın tüm antijenlerinin veya bir kısmının ekspresyonu ve klonlanması mümkün hale gelmiştir. Böylece aşı geliştirme ile ilgili bazı sorunlar aşılmıştır. Birinci olarak yerli materyal elde edilmesi ile ilgili sorunlar aşılabilmektedir. Geleneksel teknolojiler kullanılarak antijenlerin saf formu ve değerlendirme testleri ile birlikte antijenin yeterli miktarda elde edilmesi oldukça zor olmuştur. İkinci olarak, rekombinant teknolojiler daha verimli bir sunum ve

başıklık elde etmek için istenilen bir vektör ile belirli bir antijenin ekspresyonunu kolaylaştırmıştır. Üçüncü olarak, bu teknolojiler pratik bir aşı gelişimi için istenen antijenin büyük ölçüde elde edilmesini sağlamıştır. Bundan başka rekombinant DNA teknikleri ile patojenik organizmalarla daha güvenli çalışmalar yapılmıştır (Beyer *et al.* 2002).

Alt ünite aşuların üretimi için bazı proteinler daha az etkiye sahip çok zahmetli ve maliyet artışına sebep olan geleneksel saflaştırma yöntemleri kullanılarak hazırlanmıştır. Rekombinant DNA teknolojisi in-vitro büyümesi zor olan patojenler için kompleks bileşenlerin yeterli miktarda saflaştırılması için aşı gelişimini yüksek derecede kolaylaştırmıştır. Antijeni kodlayan gen, bir vektör üzerinde klonlanmış ve *E.coli* gibi bir bakteri konakçıya sokulur. Rekombinant mikroorganizmalar laboratuvar ortamında büyük ölçüde kültürlenir ve istenen protein ekspresyonu, IPTG indüksiyonu gibi farklı yöntemler kullanılarak oluşturulmaktadır. İlgili protein ile birlikte rekombinant organizmanın diğer proteinleri de izole edilebilir. Ancak konak organizma stabilitesini veya korunabilirliğini kaybedebilir ve bu da proteinin üç boyutlu yapısını değiştirebilir (Okay 2011).

BCG aşısı

Calmette ve Guerin (Şekil 1.7) insana zararsız ancak onu TB'ye karşı aşılayıp koruyabilen bir aşı haline getirmiş olduğu mikroba BCG aşısı ismini uygun bulmuştur (Koç 2014). BCG aşısı insan soyunda kullanılan canlılığı azaltılmış ilk aşıdır. *M. bovis* suşunun patates, gliserin ve sığır safrası içeren besi yerinde çok defa pasajlanarak virulans özelliğini kaybettiği belirlenmiştir. BCG'nin ilk kullanımı Fransa'da çocuklara ağız yoluyla immünite sağlamak amacıyla uygulanmıştır (Koç 2014).



Şekil 1.7 BCG aşısını keşfeden bilim adamları (<http://www.drbrianstork.com>)

BCG aşısı, virulan basilinin meydana getirmiş olduğu enfeksiyona benzer şekilde olup, T lenfositlerini ve makrofajları aktif hale getirerek TB'ye karşı savunmada bağışıklık yanıt mekanizmasını geliştirmektedir. BCG aşısının ilk defa kullanılan *M. bovis* suşundan üretilmiş olan Pasteur kökeni kaynak kökenidir. Bu aşının üretilen kültürlerle ve tekniklere göre bağışıklık yanıtı değişiklikler göstermektedir (Smith 2003). Bazı BCG kaynakları güçlü (Pasteur 1173P2) bazı BCG kaynakları zayıf (Glaxo 1077) olarak adlandırılmıştır. Güçlü olanın immün yanıtı daha kuvvetli ve daha güçlü bir gecikmiş tip hipersensivite göstermekle birlikte daha iyi koruma sağlamaktadır (Stenger *et al.* 1998).

BCG aşısı insanlar da %80 aralığında etkinlik göstermektedir. Aşının en önemli faydası, çocuklarda TB menenjit ve yaygın hastalığa karşı %75-86 koruyucu etkisinin olmasıdır. Bu koruyuculuk, aşılanan kişinin bağışıklık durumu, genetiği, beslenmesi, aşılama yapılmadan önce mikobakteriler ile enfekte olup olmamasına ve aşıda kullanılan BCG suşunun güçlülüğüne bağlıdır (Brewer and Colditz 1995).

TB'den korunmada BCG aşılama tüm dünyada kabul görmüştür fakat koruyuculuğunun düşük seviyede olduğu da bilinmektedir. Bu nedenle BCG yerine geçebilecek aşı çalışmaları; çocuklarda şiddetli TB riskini azaltmalı, dünya genelinde en yaygın şekilde olan yetişkin akciğer TB'ye karşı değişken korumayı

düzeltilmeli ve HIV pozitif çocuk hastalarda BCG' nin geniş yelpazeli olan hastalık riskini azaltmalıdır (Da Costa *et al.* 2014). Yeni aşı çalışmaları değerlendirilecek olursak, genetik olarak modifiye olan BCG, proteinlerin antijenlerine karşı rekombinant subunit aşular, mukozal aşular, konjuge karbonhidrat aşular ve bunun yanı sıra tedavi amaçlı aşular olarak literatürlerde görülmektedir (Junqueira-Kipnis *et al.* 2014).

Yeni TB aşısı geliştirme çalışmalarında hali hazırda var olan BCG'yi iyileştirmek ya da BCG yerine birkaç alternatif geliştirilmiştir. Bu aşılardan biri özgül ve güvenli olduğu varsayılan alt birim protein aşularıdır. Bu aşuların geliştirilmesi için yapılan çalışmaların çok önemli olduğu bildirilmektedir. Bu aşular uygun olan bağışıklık geliştirebilmeleri için seçici bağışıklık epitoplarına sahip olmalıdırlar (Soares *et al.* 2013).

Subunit protein aşular, canlı ya da inaktive edilmiş mikroorganizmalardan oluşan aşular ile beraber kıyaslandığında tam anlamıyla bir immün yanıtı aktif hale getiremezler. Bundan dolayı aşı formulasyonuna adjuvanlar eklenmesi tavsiye edilmektedir. Araştırmacılar, bağışıklık tepkisini daha güçlü hale getirmek için bu etkiye sahip interlökinler, lipoprotein, lipit ve bağışıklığı aktif hale getiren peptitler gibi moleküllerle beraber aşuların bağışıklık epitoplarını kaynaştırarak aşuların güçlülüğünü değerlendirmişlerdir. Adjuvan moleküllerle subunit proteinlerin füzyon aşuları kendi başına ya da canlı vektörlerle beraber güçlülüğü araştırılmaktadır. Sınırlı ölçüdeki çalışmalara karşın, *M. tuberculosis* epitopları ile adjuvanların moleküler füzyonu, yeni aşı geliştirmede önemli bir alandır (Junqueira-Kipnis *et al.* 2014).

Yakın zamandaki çalışmalarda, rekombinant füzyon proteini ve sağlanan korunmanın BCG ile benzer olduğu raporlarda belirtilmiştir (Soares *et al.* 2013)

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Bakteri ve Plazmitler

Tez kapsamında kullanılan *Mycobacterium tuberculosis* izolatu, Türkiye'deki bir hastadan Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Süheyla Sürücüoğlu tarafından temin edildi ve genetik olarak (GeneXpert) GenoType MTBC (Hain Lifescience, Almanya) ve 16S rRNA analizleriyle tanımlandı. Deneylerde kullanılan plazmitler Çizelge 2.1'de, bakteri suşları Çizelge 2.2'de verildi. Plazmit vektörleri ve büyüklük belirteçleri Ek A'da sunuldu.

Çizelge 2.1 Klonlama ve ekspresyonda kullanılan plazmitler

Plazmit	Büyüklük	Marker	Kaynak
pET-28a (+)	5.3 kb	<i>kan</i> (Kan ^r)	Novagen, Merck (Almanya)
pGEM [®] -T Easy	3.0 kb	<i>amp</i> (Amp ^r)	Promega Inc. (Madison, WI)

Büyütme ve saklama koşulları

M. tuberculosis büyümesi için Lowenstein-Jensen Medium Slant BBL[™] besiyeri, *Escherichia coli* BL21 ve *E. coli* DH5 α suşlarının büyümesi için Luria Broth (LB, Ek B) sıvı besiyeri ve saklanması için Luria Agar (LA, Ek B) katı besiyeri kullanıldı. Büyütülen kültürler +4°C'de saklanarak aylık alt kültürler yapıldı. LB'de büyütülen kültürler %50 gliserol içinde uzun süreli saklanması için -80°C'de depolandı. LB ve LA besiyerlerine gerekli olan uygun antibiyotikler ampisilin 100 µg/ml, kanamisin 30 µg/ml konsantrasyonda kullanıldı.

Çizelge 2.2 Kullanılan bakteri suşlarının özellikleri

Bakteri suşu	Özellik	Kaynak
<i>M. tuberculosis</i> 14/1649	TB hasta izolatu	Prof. Dr. Süheyla Sürücüoğlu
<i>E. coli</i> DH5 α	F- Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i>	Amerikan tip Kültür koleksiyonu
<i>E. coli</i> BL21	<i>fhuA2 [lon] ompT gal [dcm] ΔhsdS</i>	Novagen, Merck (Almanya)

2.2 Primer Dizaynı

PZR’de kullanılacak primerler NCBI (Natural Center for Biotechnology Information) Gen Bankası’ndaki diziler kullanılarak Primer 3 ve BLAST programları aracılığı ile belirlendi (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3 PZR’de kullanılan primer özellikleri

Gen adı	Primer adı	Nükleotid dizisi	Gen uzunluğu	GC içeriği	Tm
<i>ompA</i>	ompAF	5’-ggatccgtggcttctaaggcggg-3’	981 bp	%63,6	62,6°C
<i>ompA</i>	ompAR	5’-agatcttagttgaccacgatctcg-3’	981 bp	%44,0	54,9°C
<i>16S-rRNA</i>	16SF	5’-agagtttgatcatggctcag-3’	1300 bp	%45,0	46,4°C
<i>16S-rRNA</i>	16SR	5’-ggttacctgttacgactt-3’	1300 bp	%42,1	40,7°C

2.3 *Mycobacterium tuberculosis* Genomik DNA'sının Saflaştırılması

M. tuberculosis genomik DNA'sı Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit ile saflaştırıldı. Başlamadan önce, Gram-pozitif bakteri lizis buffer hazırlandı. 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 mM EDTA, %1.2 Triton X-100 ve kullanımdan hemen önce 20 mg/mL lizozim eklendi. 2×10^9 CFU/mL'ye kadar büyütülen bakteri kültürü 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerinde 10 dakika 5000xg.'de santrifüj edildi. Üstteki sıvı faz atıldı. Pellet üzerine 180 µL manuel olarak hazırlanan Gram-pozitif bakteri lizis buffer eklendi. 30 dakika 37°C'de inkübe edildi. Ardından 200 µL Lysis Solution ve 20 µL Proteinase K eklendi. Homojen bir süspansiyon elde etmek için vortekslendi. 56°C'de çalkalamalı su banyosu ya da sallanan platformlu termomikser kullanılarak hücreler parçalanana kadar yaklaşık 30 dakika inkübe edildi. 20 µL RNase A Solution eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra 400 µL %50 etanol eklenerek vortekslendi. Hazırlanmış lizat GeneJET Genomic DNA Purification Column toplama tüpüne transfer edildi. 1 dakika 6000xg.'de santrifüj edildi. Sıvı kısmı içeren toplama tüpü atıldı ve kolon yeni bir 2 mL toplama tüpüne yerleştirildi. Ardından 500 µL Wash Buffer 1 (etanol eklenmiş) eklendi. 1 dakika 8000xg.'de santrifüj edildi. Sıvı faz atılarak kolon toplama tüpüne geri yerleştirildi. Tekrar 500 µL Wash Buffer 2 (etanol eklenmiş) purifikasyon kolonuna eklenmedi. 3 dakika yüksek hızda (12000xg.) santrifüj edildi. Toplama tüpü atılmış ve kolon yeni steril 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı. 100 µL Elution Buffer kolon membranının merkezine eklendi, 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 1 dakika 8000xg.'de santrifüj edildi. Purifikasyon kolonu atılmış ve saflaştırılmış DNA kullanılmak üzere -20°C deposuna kaldırıldı.

Agaroz jel elektroforezi

Elektroforez işlemi Thermo Scientific EC 300 XL güç kaynağı ve Thermo Scientific OWL EasyCast B2 jel tankında yatay olarak gerçekleştirildi. Biomax Prona Agarose'dan 0.8 g tartıldı ve üzerine 100 mL 1X TAE (Tris, Asetik asit,

Edta, Ek C) buffer eklendi. DNA örneklerini jele yüklemek için Thermo Scientific 6X DNA Loading Dye, DNA bantlarının moleküler ağırlıklarını belirlemek için Thermo Scientific GeneRuler 50 bp DNA Ladder (0.5 µg/µL, Ek A) kullanıldı. 15 µL genomik DNA örneğine 3 µL 6X LD eklendi. Yükleme işleminden önce jelin yüzeyini tamamen kapatacak şekilde 1X TAE tamponu eklendi. Marker hacmi ise 10 µL olarak ayarlandı. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra 60 dakika 90 Volt elektrik akımı verilerek yürütüldü. Yürütme işleminden sonra jel etidyum bromür çözeltisi (0,5 µg/mL, TAE tamponu) ile boyandı. DNA bantları Vilber Lourmat UV lambası ile görüntüldü.

2.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PZR karışımı, 10 X *Taq* buffer (Fermantas), 25 mM MgCl₂ (Fermantas), 10 mM dNTP mix (Fermantas), 0,4 mM ileri ve geri primer, 1 U/µL *Taq DNA polimeraz* (Fermantas) ve 10 ng kalıp DNA ile hazırlandı. Karışımın toplam hacmi dH₂O ile 50 µL'ye tamamlandı. Primerler kullanımdan önce seyreltildi. PZR içerik miktarları Çizelge 2.4'te, PZR döngüleri Çizelge 2.5'da gösterildi. PZR sonrasında ürünler %1'lik agaroz jelde yürütüldü.

Çizelge 2.4 PZR'de kullanılan içerik miktarları

PZR içeriği	Miktar
Kalıp DNA	1 µL
F-R primer	1-1 µL
MgCl ₂	5 µL
<i>Taq</i> buffer	5 µL
dNTP	1 µL
<i>Taq</i> DNA polimeraz	1 µL
dH ₂ O	35 µL

Çizelge 2.5 PZR program ayarları

Aşama	<i>ompA</i>	<i>16S rRNA</i>	
Başlangıç denatürasyonu	94°C-10 dakika	94°C-10 dakika	
Denatürasyon	94°C-1 dakika	94°C-1 dakika	35 döngü
Primer bağlanma	52°C-30 saniye	43°C-30 saniye	
Uzama	72°C-1 dakika	72°C-1 dakika	
Son uzama	72°C-10 dakika	72°C-10 dakika	

2.5 Jel Ekstraksiyon

İstenen PZR ürünü bantları jelden Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit ile ekstrakte edildi. Temiz bir bistüri yardımıyla ilgili DNA bandı jelden kesilerek tartıldı. Jel kesitine 1:1 oranında Binding buffer eklendi. Jel tamamen çözünene kadar 50-60°C'de ısıtıldı. GeneJET Purifikasyon kolonuna çözündürülerek jel çözeltisi eklendi. Maksimum 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve sıvı faz atıldı. Purifikasyon kolonuna 700 µL Wash buffer eklendi ve 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Wash buffer'dan kurtulmak için purifikasyon kolonu boş olarak 1 dakika santrifüj edildi. Kolon yeni steril 1,5 mL ependorf tüpüne alındı. Kolonun merkezine 50 µL Elution buffer eklenmiş ve 1 dakika bekletilmiştir. 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Saflaştırılan DNA -20°C'de saklandı. Jel ekstraksiyon işlemi bittikten sonra ürünler %0,8'lik agaroz jelde 90 voltta 60 dakika yürütüldü.

2.6 pGEM-T Ligasyon Reaksiyonları

pGEM-T Easy (Promega) vektöre PZR ürünlerinin bağlanması için 5 µL 2X Ligasyon buffer, 1 µL pGEM-T Easy vektör, 3 µL PZR ürünü ve 1 µL T4 DNA ligaz ile +4°C'de bir gece (o/n) inkübasyonda ligasyon yapıldı. pGEM-T'ye klonlanan genin Sanger dizileme işlemi BGI Europe şirketinde yapıldı.

2.7 pET28-a (+) Ligasyon Reaksiyonları

Ligasyonda kullanılmak üzere pET28-a(+) vektör hazırlandı. *ompA* geni *Bam*HI restriksiyon enzimi ile kesildi ardından pET28-a vektörü kullanıldı. Vektör kesimi için bir gece önceden ekimi yapılan *E. coli* pET28-a kültüründen plazmid izolasyonu yapıldı. İzolasyon sonrası 17 µL pET28-a plazmit, 2 µL *Bam*HI buffer, 1 µL *Bam*HI restriksiyon enzimi ile kesim yapılarak 37°C'de 90 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası kesimler agaroz jele yüklenerek 90V'ta 90 dakika yürütüldü. Jel sonucunda jel ekstraksiyon yapıldı. Ekstraksiyon ürünleri ligasyonda vektör olarak kullanıldı. Ligasyon reaksiyonu için 13 µL insert, 3 µL pET-*Bam*HI vektör, 1 µL T4 ligaz buffer (Promega), 1 µL T4 ligaz (Promega) kullanıldı. İlk olarak vektör ve insert karıştırıldı daha sonra 65°C'de su banyosunda 5 dakika bekletildi. 5 dakika sonunda buza alınan karışım 10X T4 ligaz buffer ve 5 U/µL T4 ligaz eklenerek 16°C'de 16 saat inkübe edildi. Ligasyon ürünleri ve *E. coli* DH5α kompetan hücreleri ile transformasyon yapıldı. 30 µg/mL kanamisin içeren agar besiyerinde 37°C'de bir gece inkübe edildi.

2.8 *E. coli* DH5α Hücrelerine Transformasyon

Transformasyon için ilk olarak kompetan hücre hazırlandı. Bakteri kültürü Luria Broth (LB) besiyerine ekilerek bir gece (o/n) 37°C 'de büyütülen *E.coli* DH5α suşudur. 200 mL steril LB besiyerine inkübe edilen bakteri kültürünün ekimi yapıldı. OD₆₀₀ 0,4-0,6'ya ulaşana kadar 37°C'de 160 rpm'de çalkalayıcı inkübatörde kültür büyütüldü. Kültürün OD₆₀₀ değeri 0,4-0,6'ya ulaştığı zaman 10 dakika buzda bekletildi. Kültür steril falkon tüplere aktarıldı ve 3500 rpm'de 5 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant atıldı. Pellet üzerine 20 mL Buffer 1 (Ek C) eklendi. Tekrar 3500 rpm'de 5 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant atıldı ve pellet üzerine 8 mL Buffer 2 (Ek C) eklendi. Buz içerisinde pellet çözündürüldü. Bu şekilde hazırlanan kompetan hücreler -80°C'de saklandı.

-80°C'de bekletilen kompetan hücreler buz üzerinde 15 dakika çözünmesi için bekletildi. 10 µL ligasyon ürünü 100 µL kompetan hücre içine eklendi ve hafif bir şekilde pipetaj yapıldı. Hücre ve ligasyon ürün karışımı 30 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edildi. Buz üzerinde inkübasyonu tamamlanan hücreler su banyosunda 42°C'de 90 saniye ısı şokuna maruz bırakıldı. Isı şokunun ardından hücreler hızlıca buz üzerine alınarak 5 dakika bekletildi. 5 dakika sonunda herhangi bir antibiyotik içermeyen 500 µL LB besiyeri eklendi. Karışım 37°C'de 100 rpm'de çalkayacı inkübatörde 80 dakika inkübasyona bırakıldı. Hücreler 6000 rpm'de 5 dakika santrifüje tabi tutularak 100 µL içinde bakteri pelleti çözüldürüldü. Transforme edilen hücreler uygun bir antibiyotik (100 µg/mL ampisilin) içeren seçici besiyerine ekildi. Mavi-beyaz koloni seçimi için 80 mg/mL X-gal (Ek C), 0,5 mM IPTG (Ek C) ile LB agar yüzeyi kaplandı. Ekimler 37°C'de bir gece inkübe edildi.

2.9 Mavi-Beyaz Koloni Seçimi

X-gal ve IPTG yayılan agar üzerinde mavi-beyaz koloni oluşumları gözlemlendi. İlgili geni taşıyan plazmitler bakteri tarafından sentezlenerek beyaz koloni oluşumları gözlemlendi. Beyaz koloniler dikkatli bir şekilde seçilerek yeni X-gal, IPTG yayılan LA+*amp* besiyerine çizim ekimi yapıldı. Bir gece (o/n) 37°C'de inkübasyona bırakıldı.

2.10 Plazmit İzolasyonu

E. coli plazmit DNA izolasyonu için Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit kullanıldı. Bakteri kültürü 100 µg/mL ampisilin içeren LB besiyerinde bir gece 37°C'de büyütüldü. 5 mL bakteri kültürü 1,5 mL'lik ependorf tüplerde 12000 rpm'de 1 dakika çöktürüldü. Pellet üzerine 250 µL Resuspension Solution eklendi ve pellet kalıntısı kalmayana kadar pipetleme yapıldı. Karışıma 250 µL Lysis Solution eklenerek tüpler 4-6 kez ters çevrilerek karıştırıldı. Karışıma 350 µL Neutralization Solution eklendi. Tüpler beyaz bir çökelti oluşumu gözlemlenene

kadar 4-6 kez karıştırıldı. Hücre lizatı 12000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve santrifüj sonunda sıvı faz GeneJET spin kolona alındı. 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolona iki seferde 500 µL Wash Solution eklendi ve 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Steril ependorf tüpüne kolon aktarıldı. Kolonun merkezine 50 µL Elution Buffer eklendi. 12000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi ve plazmit DNA -20°C'de saklandı. Son aşama olarak izole edilen plazmit DNA'larının agaroz jel elektroforezinde 90 dakika ve 90V'de yürütüldü ve etidyum bromür ile boyanarak UV lambası altında görüntülendi.

2.11 Manuel Plazmit İzolasyonu

Transformasyon sonucu oluşan koloniler LA+ *kan* besiyerinde bir gece önceden çizim ekim yapılarak büyütüldü. Bakteri hücreleri steril ortamda pipet ucu ile kazıyarak alındı. Daha sonra steril ependorf tüpe konuldu. Tüplere 100 µL soğuk STE buffer (Ek C) eklenerek hücreler çözünene kadar vortekslendi. Buz üzerinde 20 dakika bekletildikten sonra 60 µL lizis buffer (Ek C) eklendi ve karışımın homojen dağılımını sağlamak için tekrar vortekslendi. Ardından steril ependorf tüpler 10 dakika beklemeye bırakıldı. Son olarak 70°C'de su banyosunda 10 dakika inkübe edildikten sonra 12000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Sıvı fazdan 20 µL alınarak agaroz jel elektroforezinde yürütüldü.

2.12 Restriksiyon Enzim Kesimi

Plazmit izolasyonu yapılan örneklerin doğrulanması için restriksiyon enzim kesimi yapıldı. Enzim kesimi 6 µL plazmit DNA, 4 µL 10X Tango Buffer, 1 µL BamHI-BglII ve 8 µL dH₂O ile yapıldı. Karışım 1-2 saat boyunca 37°C'de inkübe edildi. Örnekler %0,8'lik agaroz jelde yürütüldü. Bu işlemlerin ardından jel ekstraksiyon yapıldı.

2.13 *E. coli* BL21 Hücrelerine Transformasyon

Oluşturulan rekombinant plazmit kompetan hale getirildi. *E. coli*-BL21 suşuna ısı şoku ile aktarıldı. Rekombinant koloniler kanamisin direncine göre seçildi. -80°C'de bekletilen kompetan hücreler buz üzerinde 15 dakika bekletildi ardından 1 µL istenilen geni taşıyan rekombinant plazmit 100 µL kompetan hücre içerisine eklendi. 30 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edildi. İnkübasyonu tamamlanan hücreler su banyosunda 42°C'de 90 saniye ısı şokuna uğratıldı. Isı şokunun ardından hücreler hızlıca buz üzerine alınarak 5 dakika bekletildi. Sürenin sonunda herhangi bir antibiyotik içermeyen LB besiyeri ekleme işlemi yapılan karışım 37°C'de 100 rpm'de çalkayıcı inkübatörde 80 dakika inkübasyona bırakıldı. 80 dakika sonunda hücreler 6000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda bakteri çökeltisi çözüldürüldü. Hücre çözeltisi 30 µg/mL *kan* içeren LB agar besiyerine yayılarak ekimi yapıldı. 37°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı.

Bir gece inkübasyon sonunda oluşan kolonilerden tek koloni seçilerek 30 µg/mL *kan* içeren LB agar besiyerine çizim ekimi yapıldı. Çizim ekimler bir gece 37°C'de inkübe edildi. Çizim ekimlerden manuel plazmit izolasyonu yapıldı. Plazmit izolasyonları agaroz jelde yürütüldü.

2.14 His-tag Proteinlerin Saflaştırılması

pET28-*ompA* taşıyan rekombinant *E. coli* BL21 hücreleri 30 µg/mL kanamisin içeren LB besiyerinde büyütüldü. Hücre kültürü yeni LB besiyerine eklendi ve ekimler 37°C'de OD₆₀₀ 0,5-0,6 oluncaya kadar inkübe edildi. Bakteri yoğunluğu 0,5-0,6'ya geldiği zaman protein ekspresyonunu indüklemek için 1 mM izopropil-β-D-galaktopiranosid (IPTG, Sigma) eklendi ve 37°C'de 5 saat 165 rpm'de çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler 4500 rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Protein saflaştırılması için Protino[®] Ni-TED 2000 Packed Columns (Macherey-Nagel, Germany) protein purifikasyon kiti kullanıldı. Pellet üzerine 1X LEW buffer (Ek C) eklendi ve hücreler tamamen çözünene kadar

vortekslenildi. Hücreler sonikatör (Bandelin-Sonopuls) kullanılarak 6x10 saniyede %60 şiddetle parçalandı. Hücre atıklarından kurtulmak için 15000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Rekombinant proteini içeren sıvı faz Protino[®] Ni-TED 2000 Packed Columns (Macherey-Nagel, Germany) purifikasyon kolonları kullanılarak saflaştırma işlemi yapıldı. Kolonu dengelemek amacıyla ilk aşamada 1X LEW buffer eklendi. Ardından rekombinant proteini içeren supernatant kolondan geçirildi. Yıkama işlemi için 1X LEW buffer kullanıldı. Son olarak his-tag proteinleri elde etmek amacıyla kolondan 1X elüsyon buffer geçirildi. Saflaştırılan proteinler sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile görüntülenerek tespit edildi.

2.15 Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) jelleri Laemmli (1970)'e göre hazırlandı (Çizelge 2.6). SDS-PAGE için, Mini-PROTEAN[®] Tetra Cell Handcasting accessory kit kullanıldı. İlk olarak %12 ayırma jeli daha sonra %4 istifleme jeli hazırlandı. Jeller yürütme sistemine yerleştirildi ve örnekler yükleme boyası ile birlikte jele yüklendi. Jelin üzerine 1X yürütme tamponu eklendi. 150 voltta yaklaşık 90 dakika yürütme işlemi yapıldı (Laemmli 1970).

Çizelge 2.6 SDS-poliakrilamid jellerinin hazırlanması

%12 Ayırma jeli	%4 İstifleme jeli
4 mL Akrilamid/bis	0,65 mL Akrilamid/bis
3,35 mL dH ₂ O	3,50 mL dH ₂ O
2,5 mL Tris HCl (pH 8.0)	1,25 mL Tris HCl (pH 6,8)
100 µL SDS (%10)	50 µL SDS (%10)
50 µL APS (%10) (amonyum persülfat)	25 µL Aps (%10)
5 µL TEMED (tetrametil etilen diamin)	5 µL TEMED

2.16 Poliakrilamit Jellerin Coomassie Blue R-250 ile Boyanması

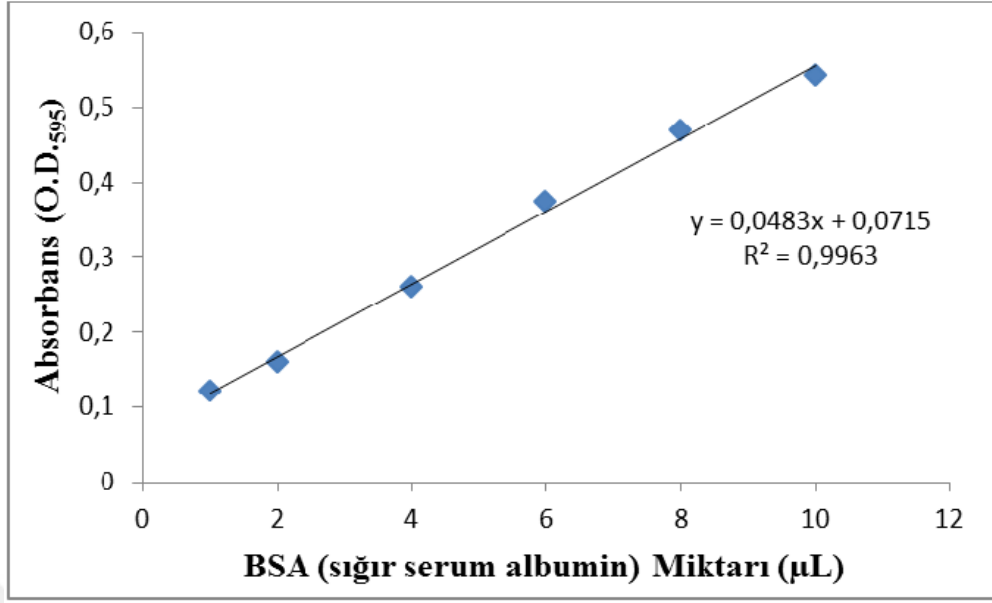
Elektroforezden sonra jeller oda sıcaklığında 100 mL yeni hazırlanarak Coomassie Blue R-250 boya içinde 5 dakika boyunca boyanmaya bırakıldı. Jeller daha sonra en az 1 saat boyunca boya uzaklaştırma çözeltisinde tutularak boyadan arındırıldı.

2.17 Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Protein konsantrasyonu Bradford yöntemi (1976) ile ölçüldü. Absorbans değeri Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBG) asidik çözeltisinin proteine bağlanması için 595 nm'de ölçüldü (Bradford 1976). Test reaktifi, 50 mL %95 etanol içinde 100 mg Coomassie Blue G-250 boyası eritilerek 100 mL %85 fosforik asit ile karıştırıldı ardından toplam hacim saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı. Karışım daha sonra filtre kağıdından geçirilerek süzüldü. Sığır serum albumini (BSA) proteinin standart eğrisini oluşturmak için kullanıldı. Ependorf tüplere 2,4,6,8 ve 10 µL hacimde 1 mg/mL BSA eklendi. Saf su ile 100 µL'ye tamamlandı. Blank için bir ependorf tüp içerisine 100 µL saf su ilave edildi. Deney reaktifi her tüpe 900 µL olarak eklendi (Çizelge 2.7). Örnekler Shimadzu UV-1601 spektrofotometre ile 595 nm'de ölçüldü. Kalibrasyon eğrisi standartlar kullanılarak oluşturuldu. Protein miktarı oluşturulan eğri denklemleri kullanılarak hesaplandı (Şekil 2.1).

Çizelge 2.7 Bradford ölçüm miktarları

Blank		100 µL dH ₂ O	900 µL CBG-250
Standart (x3)	2-4-6-8-10 µL BSA	98-96-94-92-90 µL dH ₂ O	900 µL CBG-250
Protein (x3)	2 µL protein	98 µL dH ₂ O	900 µL CBG-250



Şekil 2.1 Protein konsantrasyonlarının hesaplanması için kalibrasyon eğrisi

2.18 Aşı Formülasyonlarının Hazırlanması

GenoType MTBC (Hain Lifescience, Almanya) testi ile doğrulanan hasta izolatından (*M. tuberculosis*) klonlanan ve *E. coli*'de ifade edilerek saflaştırılan OmpA proteininden 1 mg/mL konsantrasyonda stok hazırlandı.

Seppic firmasının ürün bilgisine dayanarak 7:3 oranında Montanide ISA 720 VG adjuvan ve antijen karıştırılarak aşı formülasyonu hazırlandı (Aucouturier et al. 2002). Karışımlar 1 dakika vorteksledikten sonra 4°C'de 24 saat bekletildi. Aşı formülasyonlarının 0,1 mL'si Luria Agar besiyerine ekim yapılarak 37°C'de 24 saat inkübe edilerek aşılardan steril oldukları doğrulandı.

Aşılama deneyleri için 8 haftalık dişi BALB/c fareler kullanıldı. Fareler beşerli 3 gruba ayrıldı ve yapılan enjeksiyonlar Çizelge 2.8'de gösterildi. İlk enjeksiyondan önce farelerden toplamda yaklaşık 0,1 mL kuyruk kanı alındı ve ardından 1. enjeksiyon (0,33 ml aşı veya adjuvan) yapıldı. 2 hafta sonra tekrar kuyruk kanı alınıp ardından 2. enjeksiyon yapıldı. Devamında 30., 41. ve 66. günlerde de kan

alınarak serumlar toplandı ve farelere ötanazi işlemi uygulandı. Serumlar kullanılana kadar -20°C’de saklandı. Enjeksiyon ve kan alma zamanları Çizelge 2.8 ve 2.9’da gösterildi.

Çizelge 2.8 Aşılama deneyindeki gruplar ve uygulamalar

Grup No.	Enjeksiyon içeriği	BALB/c fare sayısı	Enjeksiyon sayısı ve yolu
1	0,1 mg OmpA+0,23 mL adjuvan	5	2x subkutan
2	0,1 mL PBS+0,23 mL adjuvan	5	2x subkutan
3	0,1 mL steril PBS içerisinde 1×10^5 CFU BCG	5	2x subkutan

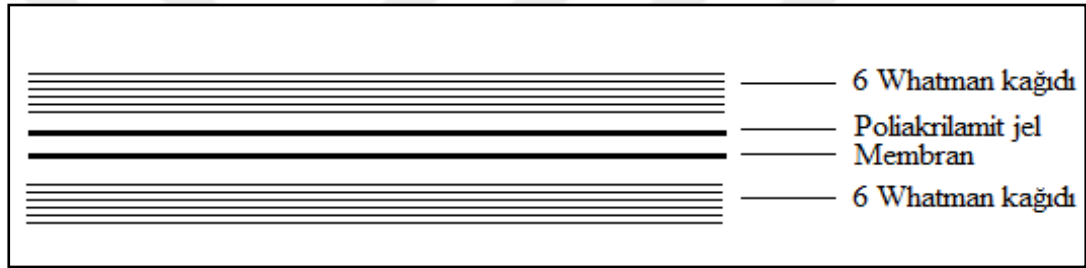
Çizelge 2.9 Fareler için kan alma ve enjeksiyon zamanları

Gün	İşlem
1. gün	Kan alma, 1. Enjeksiyon
15. gün	Kan alma, 2. Enjeksiyon
30. gün	Kan alma
41. gün	Kan alma
66. gün	Kan alma, ötanazi

2.19 Western Blot

Rekombinant OmpA proteinin BALB/c farelerde spesifik antikor üretimini kalitatif olarak görüntülemek için Western blot deneyi yapıldı (Burnette 1981). Öncelikle protein 2 adet SDS-poliakrilamit jel üzerinde yürütüldü ve jelin bir tanesi Coomassie Brilliant Blue ile boyandı. Diğer jel, 3MM Whatman® kağıtları ve 0,2 µm nitroselüloz membran (Bio-Rad, Hercules, CA), 1X transfer tamponu (Ek C) ile ıslatıldı ve Şekil 2.2'deki sıraya göre dizilerek transfer gerçekleşti (Bio-Rad Mini Trans-Blot® Cell). Proteine özgü serumun kullanıldığı deneyde, membranda prestained (önceden boyanmış) markırların konumu göz önüne alınarak proteinin

bulunduğu yer belirlendi. Membranlar 1X TBS (Ek C) ile hazırlanmış %10 süttozu içerisinde 37°C'de 2 saat bekletildi. Süre sonunda 1X TTBS (%0,5 Twin, 1X TBS) ile 10 dakika yıkandı. Daha sonra her bir membran, %5 süttozu ile 1:400 seyreltilmiş primer antikor (proteine veya BCG'ye spesifik fare antikor) içerisinde oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Ardından, membranlar 1X TTBS ile 10 dakika yıkandıktan sonra %5 süttozu ile 6 µl:100 mL seyreltilmiş sekonder antikor (antimouse IgG, Sigma) ile oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Membranlar, tekrar 1X TTBS ile 10 dakika yıkandıktan sonra bantlar görülene kadar AP konjugat substrat (Bio-Rad, Hercules, CA) kiti uygulandı. Bantlar görülünce substrat uzaklaştırılıp membran distile su ile yıkandı.



Şekil 2.2 Western blot deneyinde transfer sırasındaki düzen

2.20 IgG ELISA

Rekombinant OmpA proteinlerinin BALB/c farelerinde uyardıkları hümmoral bağışıklık (total IgG) düzeyi kantitatif olarak ELISA deneyi ile belirlendi (Engvall and Perlmann 1971). 96 kuyucuklu ELISA plaklarına 0,05 M karbonat tamponu (Ek C) içerisinde 1 µg/kuyucuk konsantrasyonunda saflaştırılan rekombinant proteinler eklendi. Plakların üzeri kapatılarak 4°C'de bir gece bekletildi. Plaklar 3 defa yıkama çözeltisi (Ek C) ile yıkandıktan sonra kuyucuklara 50 µl bloklama çözeltisi (Ek C) eklendi ve 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Aşılama deneyi sonucu her bir antijene özgü serum bloklama çözeltisi içerisinde 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 ve 1:3200 seyreltmelerle kuyucuklara eklendi ve 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Plaklar 4 defa yıkama çözeltisi ile yıkandıktan sonra kuyucuklara bloklama çözeltisi içerisinde 1:1000 seyreltilmiş tavşandan elde edilen alkalın

fosfataz bağı anti-fare IgG (Sigma) eklendi ve 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Plaklar 4 defa yıkama çözeltisi ile yıkandıktan sonra her kuyucuğa 100 µL kolorimetrik bir substrat olan AP Conjugate Substrate (Bio-Rad) eklendi. Plaklar karanlık bir ortamda 30 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra her kuyucuğa 50 µl 1 M NaOH eklenerek tepkime durduruldu. Tepkime sonucu oluşacak optik yoğunluk Rayto RT-2100C ELISA okuyucuda 405 nm'de analiz edildi.

2.21 IFN-γ (İnterferon-gama) ELISA

Rekombinant OmpA proteinin BALB/c farelerinde uyandırdıkları hücresel bağışıklık (IFN-γ) seviyesi kantitatif olarak ELISA deneyi ile belirlendi. Serum IFN-γ seviyelerinin belirlenmesi için Mouse IFN-γ ELISA Total Kit (Thermo) kullanıldı. 96 kuyucuklu ELISA plağına her kuyucuga ikişerli tekrar olarak 50 µL serum örneği ve 50 µL 3:1 oranında seyreltilmiş standartlar (3000:1000:333:111:37:0 pg/mL) eklendi. Plaka dikkatli bir şekilde yapışkan plaka kapağı ile kapatılarak oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda plaka kapağı çıkartılarak plak içi dökülmeden numuneleri içeren tüm kuyucuklara 50 µL biyotinlenmiş antikor reaktifi eklendi. Biyotinlenmiş antikor reaktifini eklerken pipet ucu ile numunelere dokunduramaya özen gösterildi. Plakanın üzeri dikkatli bir şekilde yapışkan plaka kapağı ile örtülerek oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda plaka kapağı çıkarıldı. Plaka üç kez yıkama tamponu (30X yıkama tamponu (50 mL), 1,5 L distile su) ile yıkandı. Hazırlanan streptavidin-HRP (12 mL Streptavidin-HRP tamponu'na 30 µL Streptavidin-HRP konsantresi) çözeltisi her bir kuyucuğa 100 µL olarak eklendi. Yeni bir yapışkan plaka kapağı ile plaka kapatıldı ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda plaka kapağı çıkarılarak yıkama tamponu ile üç kez yıkandı. Ardından her kuyucuğa 100 µL TMB substrat çözeltisi eklendi. Numuneler karanlık bir ortamda oda sıcaklığında 30 dakika boyunca renk reaksiyonu oluşması için inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her kuyucuğa 100 µL reaksiyon durdurma solüsyonu eklendi. Reaksiyonu durdurulduktan 30 dakika sonra optik yoğunluk Rayto RT-2100C ELISA plak okuyucuda 405 nm'de ölçüldü.

2.22 IL-12 (İnterlökin 12) ELISA

Rekombinant OmpA proteinin BALB/c farelerinde uyandırdıkları hücresel bağışıklık (IL-12) seviyesi kantitatif olarak ELISA deneyi ile belirlendi (Engvall and Perlmann 1971, Chensue *et al.* 1996). Serum IL-12 seviyelerinin belirlenmesi için Mouse IL-12 ELISA Total Kit (Thermo) kullanıldı. 96 kuyucuklu ELISA plağına her kuyucuga çift olarak 50 µL dilüent standart (12,5 µL serum ile 37,5 µL standart) eklendi. Ardından 50 µL 2:1 oranında seyreltilmiş standartlar (3000:1500:750:375:188:94:47:0 pg/mL) eklendi. Plaka dikkatli bir şekilde yapışkan plaka kapağı ile örtülerek oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda plaka kapağı çıkarılarak üç kez yıkama tamponu (30X yıkama tamponu (50 mL), 1,5 L distile su) ile yıkandı. Numune veya standartları içeren her kuyucuğa 100 µL biyotinlenmiş antikor reaktifi eklendi. Biyotinlenmiş antikor reaktifini eklerken pipet ucu ile numunelere dokundurmamaya özen gösterildi.

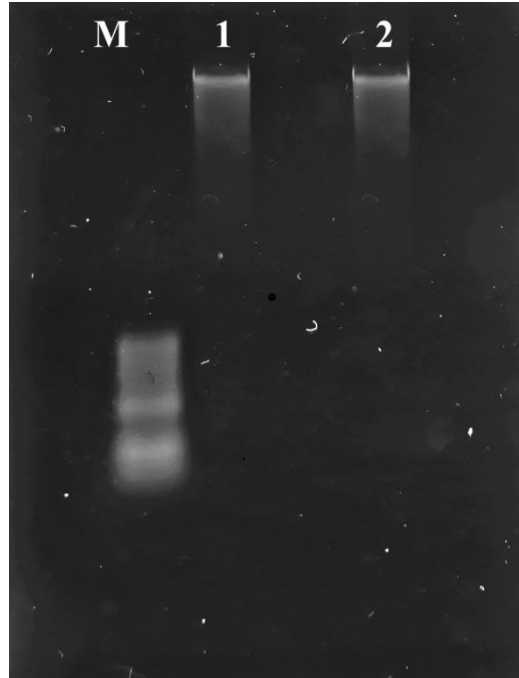
Plakanın üzeri dikkatli bir şekilde yapışkan plaka kapağı ile örtülerek oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda plaka kapağı çıkarılarak üç kez yıkama tamponu ile yıkandı. Hazırlanan streptavidin-HRP (12 mL Streptavidin-HRP tamponu'na 30µL Streptavidin-HRP konsantresi) çözeltisi her bir kuyucuğa 100 µL olarak eklendi. Yeni bir yapışkan plaka kapağı ile plaka kapatıldı ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda plaka kapağı çıkarılarak yıkama tamponu ile üç kez yıkandı. Ardından her kuyucuğa 100 µL TMB substrat çözeltisi eklendi. Numuneler karanlık bir ortamda oda sıcaklığında 30 dakika boyunca renk reaksiyonu oluşması için inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her kuyucuğa 100 µL reaksiyon durdurma solüsyonu eklendi. Reaksiyonu durdurulduktan 30 dakika sonra optik yoğunluk Rayto RT-2100C ELISA plak okuyucuda 405 nm'de ölçüldü.

3. BULGULAR

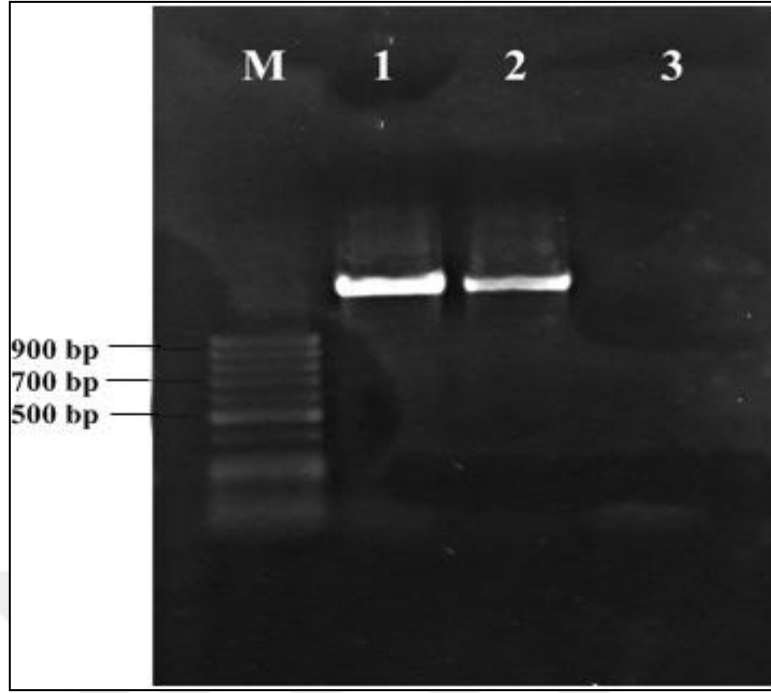
3.1 *Mycobacterium tuberculosis* Genomik DNA'sının Saflaştırılması, 16S rRNA Analizi ve ompA Geninin Klonlanması

Mycobacterium tuberculosis hasta izolatu genomik DNA'sı başarılı bir şekilde saflaştırılmıştır (Şekil 3.1). *M. tuberculosis* izolatının tür düzeyinde tanımlanması amacıyla 16S rRNA (Şekil 3.2) ve ompA geninin (Şekil 3.3) PZR ile çoğaltılması için kullanılmıştır.

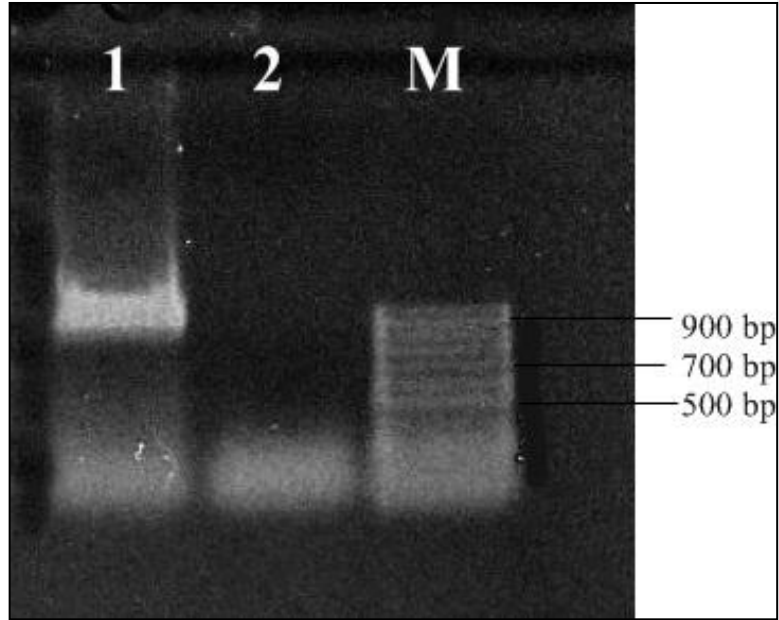
M. tuberculosis izolatının tür düzeyinde tanımlanması amacıyla elde edilen bantlardan jel ekstraksiyon yapılmıştır. Jel ekstraksiyonunun ardından nükleotit dizi analizi yapılmıştır (Şekil 3.4). Nükleotit dizisi BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analizi sonucu *M. tuberculosis* ile %100 uyum gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.1 *M. tuberculosis* genomik DNA izolasyonu agaroz jel görüntüsü (M: 50 bp marker, 1: 6 µL DNA, 2: 12 µL DNA).



Şekil 3.2 *ompA* geni PZR agaroz jel görüntüsü (1: *ompA* PZR ürünü, 2: negatif kontrol, M: 50 bp marker).



Şekil 3.3 *16S rRNA* geni PZR agaroz jel görüntüsü (M: 50 bp marker, 1-2: PZR ürünü, 3: negatif kontrol).


```
AGTCGAACGGAAAGGTCTCTTCGGAGATACTCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAAC
ACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATAC
CGGATAGGACCACGGGATGCATGTCTTGTGGTGAAAGCGCTTTAGCGGTGTGGG
ATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGACGGCCTACCAAGGCGACGA
CGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTCCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCCA
GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGAT
GCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTACCCAT
CGACGAAGGTCGGGTTCTCTCGGATTGACGGTAGGTGGAGAAGAAGCACCGGC
CAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATT
ACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGTTTGTGCGGTTGTTGCGTAAATCTCACGG
CTTAACTGTGAGCGTGCGGGCGATACGGGCAGACTAGAGTACTGCAGGGGAGAC
TGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGG
CGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGC
GAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGTACTAGGTGTG
GGTTTCCTTCCTGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGTACCCCGCCTGGG
GAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAGTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGACAAGCG
GCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACA
TGCACAGGACGCGTCTAGAGATAGGCGTTCCTTGTGGCCTGTGTGCAGGTGGTG
CATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG
CAACCCTTGTCTCATGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTCGTGAGAGACTGCC
GGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTC
CAGGGCTTACACATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCGATGCCGCGAGG
TTAAGCGAATCCTTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGTCTGCAACTCGACC
CCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGT
TCCCCGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAACACCCGAAG
CCAGTGGCCTAACCCTCGGGAGGG
```

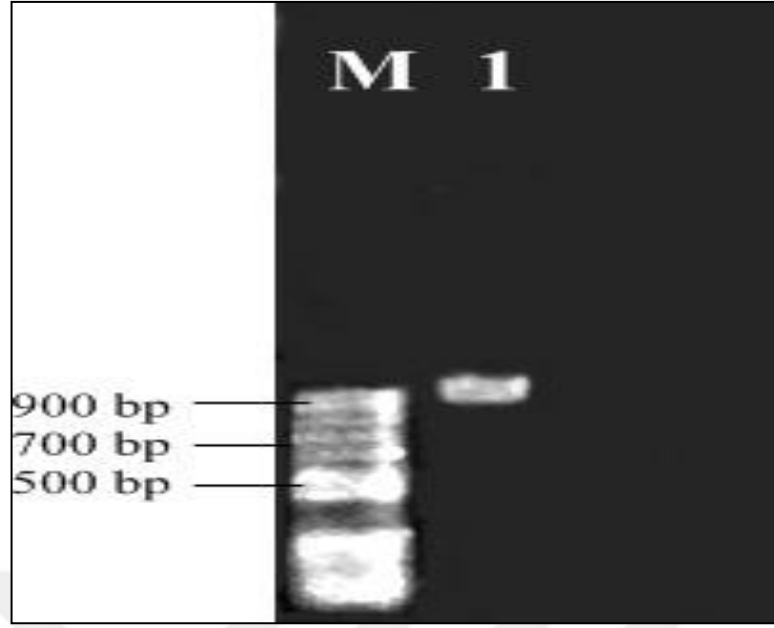
Şekil 3.4 *Mycobacterium tuberculosis* izolatının *16S rRNA* gen dizisi (Gen Bankası Erişim Numarası KY810766).

PZR ürünü pGEM-T ligasyonunda kullanılmak amacıyla agaroz jelden kesilerek ekstrakte edilmiş (Şekil 3.6), ligasyon ürünü kompetan hücre halinde hazırlanmış *E. coli* DH5 α hücrelerine transforme edilmiştir. Elde edilen kolonilerden istenilenleri ampisilin direncine ve *lacZ* geninin aktivitesine göre tespit edilmiştir. Klonlama amacıyla istediğimiz gen pGEM-T plazmitte bulunan *lacZ* geni içerisine eklenmiş halde bulunuyorsa *lacZ* geni bozulduğu için bakteri X-gali kullanamamakta ve

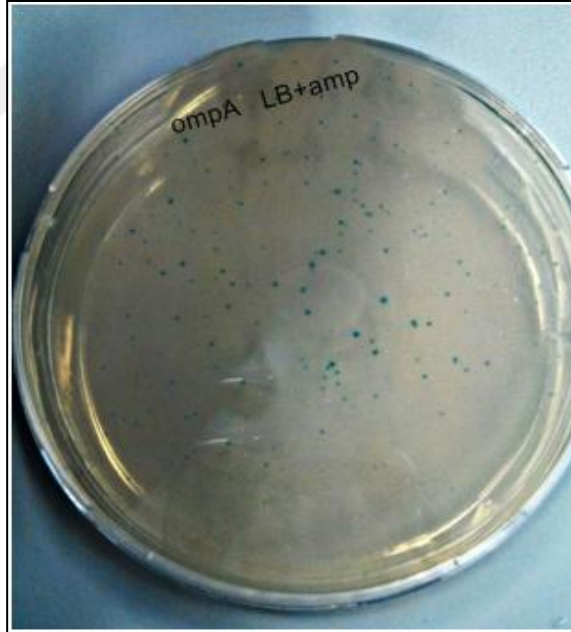
beyaz koloniler gözlemlenmektedir. Eldesi sağlanmak istenen gen *lacZ* genine eklenmemişse bakteri X-gali kullanabilmekte ve mavi koloniler gözlemlenebilmektedir (Şekil 3.7). Beyaz koloniler seçilerek plazmit izolasyonu yapılmıştır (Şekil 3.8). Daha sonra restriksiyon enzim kesimi ile doğrulama işlemi yapılmıştır (Şekil 3.9).

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Mycobacterium tuberculosis strain MTB1_complete genome	2567	2567	100%	0.0	100%	CP020381.2
<input type="checkbox"/>	Mycobacterium tuberculosis strain 14/1649_16S_ribosomal_RNA_gene_partial_sequence	2567	2567	100%	0.0	100%	KY810766.1
<input type="checkbox"/>	Mycobacterium tuberculosis TRS10 genome	2567	2567	100%	0.0	100%	CP009195.1
<input type="checkbox"/>	Mycobacterium tuberculosis TRS2 genome	2567	2567	100%	0.0	100%	CP009186.1
<input type="checkbox"/>	Mycobacterium tuberculosis 1821ADB45 genome	2567	2567	100%	0.0	100%	CP009206.1
<input type="checkbox"/>	Mycobacterium tuberculosis 1821ADB40 genome	2567	2567	100%	0.0	100%	CP009202.1
<input type="checkbox"/>	Mycobacterium tuberculosis TRS26 genome	2567	2567	100%	0.0	100%	CP009193.1
<input type="checkbox"/>	Mycobacterium tuberculosis TRS25 genome	2567	2567	100%	0.0	100%	CP009192.1
<input type="checkbox"/>	Mycobacterium tuberculosis TRS24 genome	2567	2567	100%	0.0	100%	CP009191.1
<input type="checkbox"/>	Mycobacterium tuberculosis TRS27 genome	2567	2567	100%	0.0	100%	CP009190.1
<input type="checkbox"/>	Mycobacterium tuberculosis TRS8 genome	2567	2567	100%	0.0	100%	CP009196.1
<input type="checkbox"/>	Mycobacterium tuberculosis TRS28 genome	2567	2567	100%	0.0	100%	CP009194.1
<input type="checkbox"/>	Mycobacterium tuberculosis TRS4 genome	2567	2567	100%	0.0	100%	CP009189.1
<input type="checkbox"/>	Mycobacterium tuberculosis TRS6 genome	2567	2567	100%	0.0	100%	CP009188.1
<input type="checkbox"/>	Mycobacterium tuberculosis TRS18 genome	2567	2567	100%	0.0	100%	CP009185.1
<input type="checkbox"/>	Mycobacterium tuberculosis TRS15 genome	2567	2567	100%	0.0	100%	CP009184.1
<input type="checkbox"/>	Mycobacterium tuberculosis TRS12 genome	2567	2567	100%	0.0	100%	CP009182.1
<input type="checkbox"/>	Mycobacterium tuberculosis TRS14 genome	2567	2567	100%	0.0	100%	CP009181.1
<input type="checkbox"/>	Mycobacterium tuberculosis TRS23 genome	2567	2567	100%	0.0	100%	CP009180.1
<input type="checkbox"/>	Mycobacterium tuberculosis TRS5 genome	2567	2567	100%	0.0	100%	CP009179.1
<input type="checkbox"/>	Mycobacterium tuberculosis TRS7 genome	2567	2567	100%	0.0	100%	CP009178.1
<input type="checkbox"/>	Mycobacterium tuberculosis TRS19 genome	2567	2567	100%	0.0	100%	CP009177.1

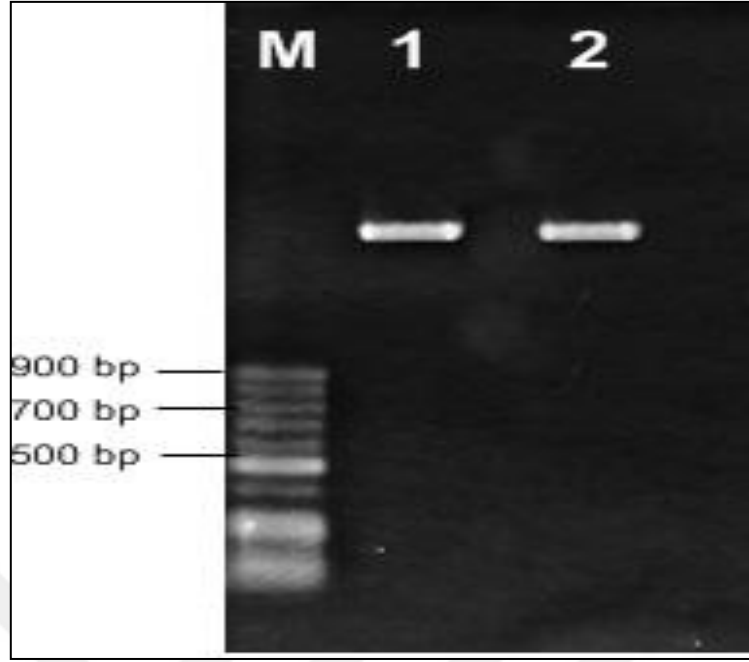
Şekil 3.5 *M. tuberculosis* hasta izolatının 16S rRNA dizisi BLAST analizi sonucu



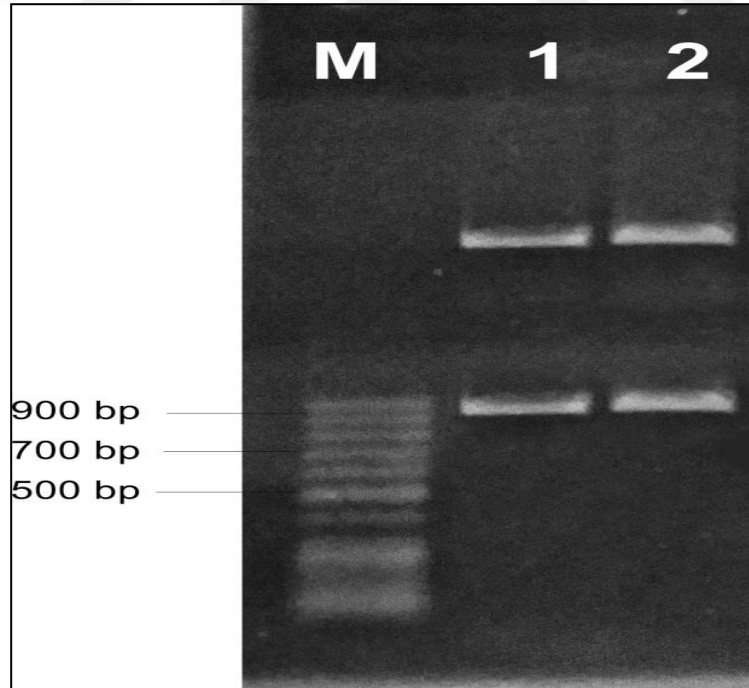
Şekil 3.6 Jel ekstraksiyon sonrası agaroz jel görüntüsü (M: 50 bp marker, 1: *ompA*).



Şekil 3.7 pGEM-T-*ompA* mavi-beyaz koloni oluşumu görüntüsü



Şekil 3.8 pGEM-T-ompA plazmit izolasyonu agaroz jel görüntüsü (M: 50 bp marker, 1-2: ompA).



Şekil 3.9 pGEM-T-ompA restirksiyon enzim kesimi agaroz jel görüntüsü (M: 50 bp marker, 1-2: pGEM-T-ompA).

Başarılı sonuç alınan pGEM-T-*ompA* rekombinantının Sanger dizileme işlemi BGI Europe şirketinde yaptırılmıştır. Dizileme işleminin ardından klonlanan genin *ompA* geni olduğu tespit edilerek doğrulanmıştır (Şekil 3.10).

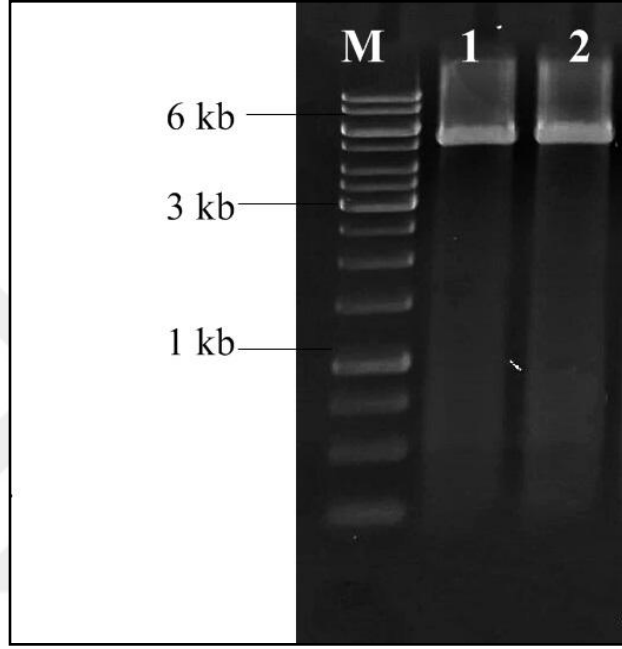
```
GTGGCTTCTAAGGCGGGTTTGGGCAAACACCCGCGACCACCGACGCG  
CGACGAACTCAGAAATTCTACCGGGGCTCGCCGGGCCGTCCGTGGCTGA  
TTGGCGCGGTGGTTATTCCGTTGCTGATAGCGGCAATCGGTTACGGTGC  
ATTGAGCGGCCCCAGTCCGTTACCGGACCGACCGGTGTGTTGCCGACA  
CTGACACCGACCAGCACCCGGGGCGCTTCTGCGTTGTCCTTGTCTTTGCT  
GTCAATTAGCCGCAGCGGCAACACCGTTACTCTGATCGGTGACTTCCCC  
GATGAGGCCGCCAAGGCGGCCTTGATGACGGCGCTCAACGGCTTGCTTG  
CTCCGGGCGTGAACGTCATCGACCAGATTCACGTCGATCCCGTTGTGCG  
ATCACTTGATTTCTCAAGTGCAGGAAACAGTTTTTCACCGCCAGCGTGCCG  
ATTCTGATTTTGGCCTCAAAGTCGAAAGGGACACCGTCACCTTGACCG  
GAACTGCCCCCTTCATCCGAGCACAAGGACGCAGTGAAGCGCGCGGGCGA  
CCAGCACCTGGCCTGACATGAAAATCGTTAACAATATTGAGGTTACGGG  
GCAGGCACCGCCAGGACCCCCGGCCTCCGGCCCATGTGCCGACCTGCA  
ATCAGCCATCAATGCCGTGACGGGTGGACCCATCGCGTTTGGCAACGAC  
GGGGCTAGTCTGATCCCAGCCGACTATGAAATCCTGAACCGGGTAGCCG  
ACAAGCTCAAGGCATGTCCGGACGCTCGGGTGACGATCAACGGCTACA  
CCGACAACACCGGCAGCGAAAGTATCAATATCCCGTTGAGCGCTCAGC  
GAGCCAAGATAGTCGCCGACTACCTGGTTGCCCGCGGAGTTGCCGGCG  
ATCACATTGCCACCGTGGGTCTCGGTTTCGGTGAATCCGATCGCCAGCAA  
CGCCACACCCGAGGGGCGCGCCAAGAATCGTCGCGTTCGAGATCGTGGT  
CAACTAA
```

Şekil 3.10 *M. tuberculosis* hasta izolatının *ompA* gen dizisi (Gen Bankası erişim numarası KY848247)

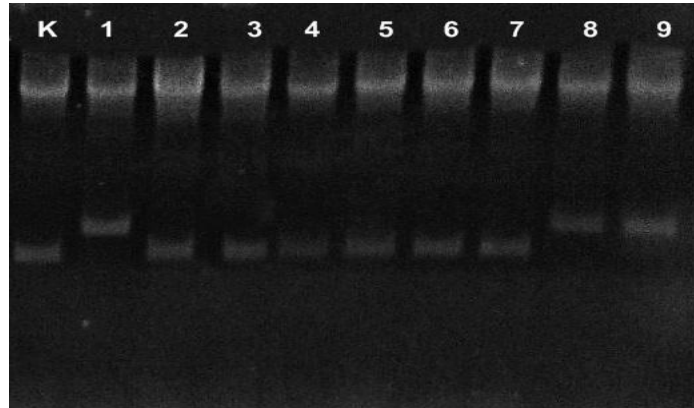
3.2 pET28-a (+) Vektörüne Klonlama

ompA genini pET28-a vektörüne klonlamak için plazmit *Bam*HI restriksiyon enzimi ile kesilmiştir (Şekil 3.11). *ompA* geni için toplamda 53 adet pET28a ligasyonu ile birlikte transformasyon yapılmıştır. Tüm transformasyonların sonucunda 1500'e yakın koloni gözlemlenmiştir. Bu kolonilerin yaklaşık 1300 adet taranmış, 3 adet koloniden pozitif sonuç elde edilmiştir. Ligasyon işleminde *Bgl*III-*Bam*HI restriksiyon enzimleri ile kesilen pGEM-T-*ompA* plazmitinden elde edilen *ompA* geni ve *Bam*HI restriksiyon enzimi ile kesilen pET28a vektörü kullanılmıştır (Şekil

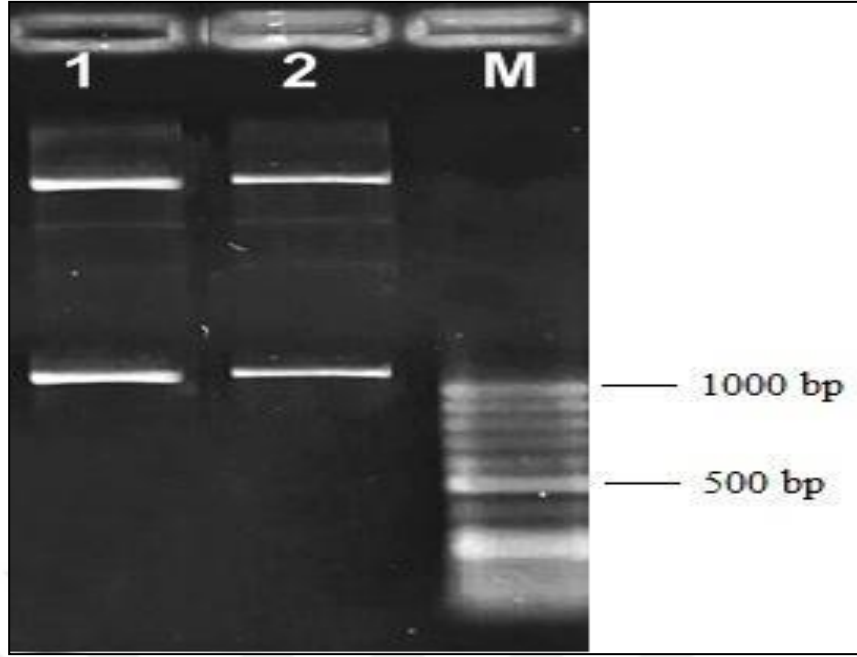
3.12). Kit ile izolasyonu yapılan plazmitler *EcoRI-BamHI* restriksiyon enzimleri ile kesilerek agaroz jelde yürütme işlemi yapılmıştır. Yürütme işleminin ardından oluşan jel görüntüsünde 2 örnek beklenen büyüklükte bant verdiği gözlemlenmiştir (Şekil 3.13). Sonuç olarak, pET28a-*ompA* rekombinantı başarılı bir şekilde elde edilmiştir.



Şekil 3.11 pET28-a plazmitinin *BamHI* restriksiyon enzimi ile kesiminin agaroz jel görüntüsü (M: 1 kb marker, 1-2: pET-*BamHI*)



Şekil 3.12 pET28a-*ompA* plazmit izolasyonu agaroz jel görüntüsü (K: boş pET28a, 1-9 pET28a-*ompA* için taranan plazmitler, 1, 8 ve 9 numaralı plazmitler boş vektörden yukarıda gözlenmiştir).



Şekil 3.13 pET28a-ompA EcoRI-BamHI kesimi agaroz jel görüntüsü. (M: 50 bp marker, 1-2: ompA).

3.3 ompA Geninin *E. coli* BL21 Hücrelerinde İfadesi ve Rekombinant Proteinin Saflaştırılması

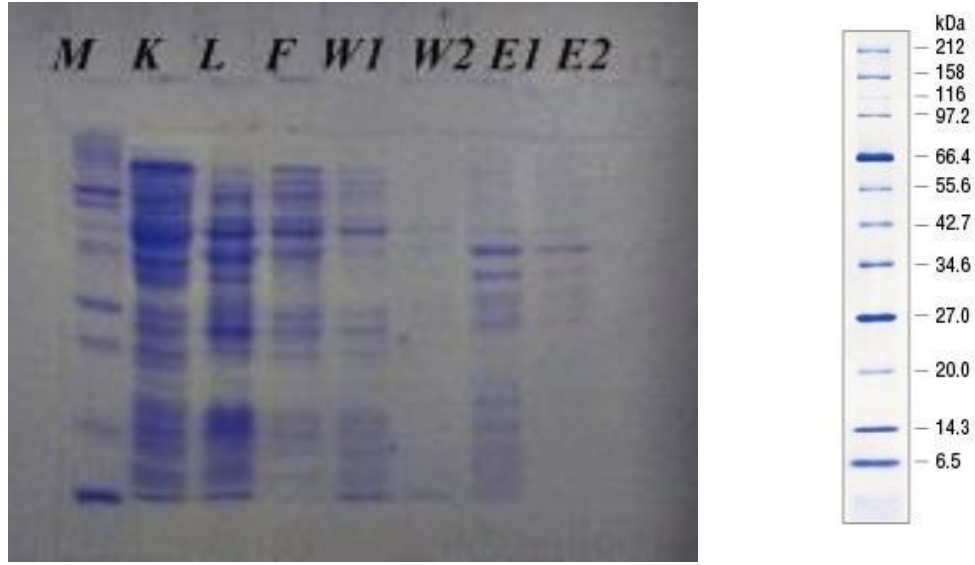
E. coli bakterisinden gen ekspresyonu ve rekombinant protein saflaştırmak amacıyla, *E. coli* DH5 α suşu kullanılarak pET28a-ompA rekombinant plazmitin oluşturulmuştur. Rekombinant proteinin üretimini sağlamak için rekombinant plazmit kompetan hücre haline getirilerek *E. coli* BL21 hücrelerine transformasyonu sağlanmıştır. Oluşan rekombinant koloniler kanamisin dirençliliğine göre seçilmiştir. Daha sonra plazmit izolasyonları agaroz jelde yürütülmüştür. Kontrol amacıyla ompA genini taşıyan pET28a vektörü jele yüklenmiştir. Yürütme işleminin ardından jel görüntüsünde BL21'den ve DH5 α 'dan izole edilen rekombinant pET28a-ompA plazmitleri aynı seviyede bant verdikleri gözlemlenmiştir.

pET28a vektörüne klonlaması gerçekleştirilen ompA geni *E. coli* BL21 suşunda ifade olurken uçlarına 6 tane histidin eklenmektedir. Histidin amino asidinin nikel

iyonlarına karşı afinitesi bulunmaktadır. Afinite özelliğinden dolayı histidinli proteinler nikel içeren kolonlardan afinite kromatografi tekniği kullanılarak saflaştırılma işlemi yapılmıştır. Protein ekspresyonunun indüklenmesi amacıyla 1 mM IPTG kullanılmıştır. IPTG ihtivasından dolayı indüklenen BL21 kültürü santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Santrifüj işleminin ardından oluşan pellet 8 M üre içeren LEW tamponu içerisinde çözündürülmüştür. Homojen olarak dağılan hücreler sonikasyonla parçalama işlemine tabi tutulmuştur. Oluşan hücre lizatları santrifüjlenerek çöktürme işlemi yapılmıştır. Histidin bağlı rekombinant proteinleri içeren süpernatantlar nikel içeren Ni-TED (Macherey-Nagel) purifikasyon kolonlarından geçirilmiştir. Elde edilen proteinin saflığı SDS-PAGE üzerinde gözlemlenmiştir. Jel görüntüsü sonucunda denatüre şartlarda elde edilen 30-35 kDa büyüklüğündeki rekombinant OmpA proteininin saflaştırılma işlemi başarılı olmuştur (Şekil 3.14).

3.4 Protein Konsantrasyonun Ölçülmesi ve Aşı Formülasyonunun Hazırlanması

Saf hale getirilen rekombinant OmpA proteininin konsantrasyonu kantitatif olarak Bradford yöntemiyle ölçülerek belirlenmiştir (Bradford 1976). Rekombinant proteinin konsantrasyonu 1 mg/mL olarak tayin edilmiştir (Çizelge 3.1). GenoType MTBC (Hain Lifescience, Almanya) testi ile doğrulama işlemi yapılan *M. tuberculosis* hasta izolatından klonlanan ve *E. coli*'de ifade edilip saflaştırılmış olan OmpA proteininden 1 mg/ml konsantrasyonda stoklar hazırlanmıştır. 7:3 oranında Montanide ISA 720 VG adjuvan:antijen homojen olarak karıştırılmış, aşı formülasyonu hazır hale getirilmiştir (Lawrence *et al.* 1997). Aşı formülasyonunun Luria Agar besiyerine ekim işlemi yapılmıştır. Sonuç olarak, aşılardan steril oldukları gözlemlenmiştir.



Şekil 3.14 Rekombinant OmpA proteinin nikel kolon uygulamasının SDS-PAGE görüntüsü (M: protein marker, K: IPTG eklenmemiş kontrol, L: IPTG eklenen kültür lizati, F: kolona bağlanmayanlar, W: yıkama, E: elüsyon) ve Protein markerda bulunan bantların büyüklükleri.

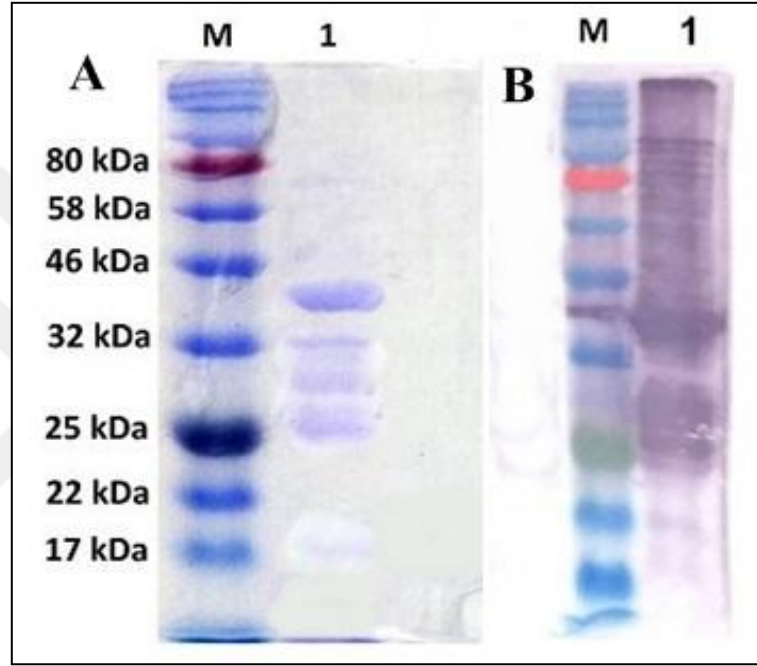
Çizelge 3.1 Bradford protein ve standart ölçümlerinin 595 nm’de absorbans değerleri

	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3	Ort. Abs.
1	0,111	0,150	0,168	0,143
2	0,212	0,221	0,206	0,213
3	0,217	0,224	0,228	0,223
4	0,297	0,289	0,340	0,308
5	0,321	0,393	0,350	0,354
OmpA	0,045	0,039	0,051	0,045

3.5 Western Blot

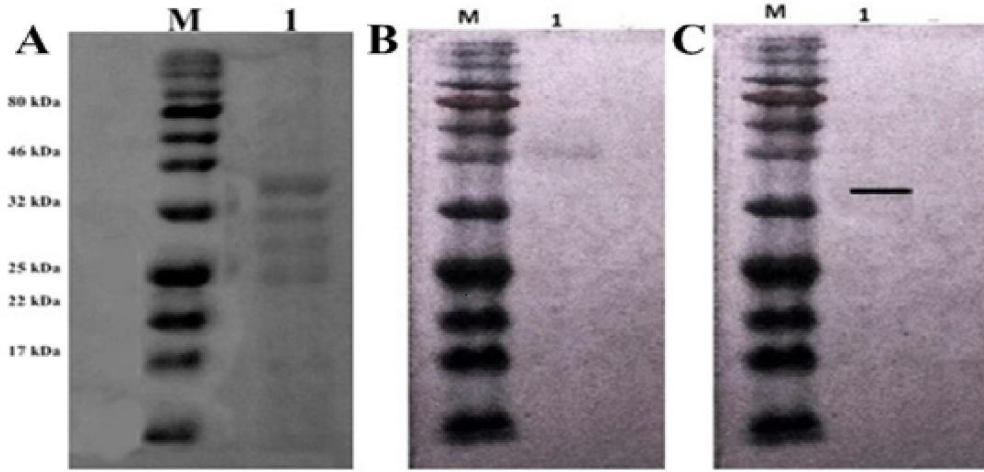
Rekombinant OmpA proteinin BALB/c farelerde spesifik olarak antikor üretimini kalitatif olarak analiz etmek amacıyla Western blot deneyi yapılmıştır (Burnette 1981). Exspasy biyoinformatik analizi sonucunda hesaplanan (uçlarına eklenen 6 histidinle beraber) OmpA proteininin moleküler ağırlığı 34,5 kDa olarak belirlenmiştir. OmpA proteinin SDS-PAGE analizi sonucunda gözlemlenen

moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 40 kDa olarak gözlemlenmiştir (Şekil 3.15). Tüm bu verilerin aksine, proteinin katlanmalarından veya dimer oluşturma ihtimallerinden dolayı farklı moleküler ağırlıkta bantlar da gözlemlenmiştir. Bu nedenle rekombinant proteine özgü antikorların primer antikor olarak kullanıldığı Western blot analizi sonucunda yukarıda sayılan ana bantlara ek olarak farklı bantlar da gözlemlenmiştir (Şekil 3.15).

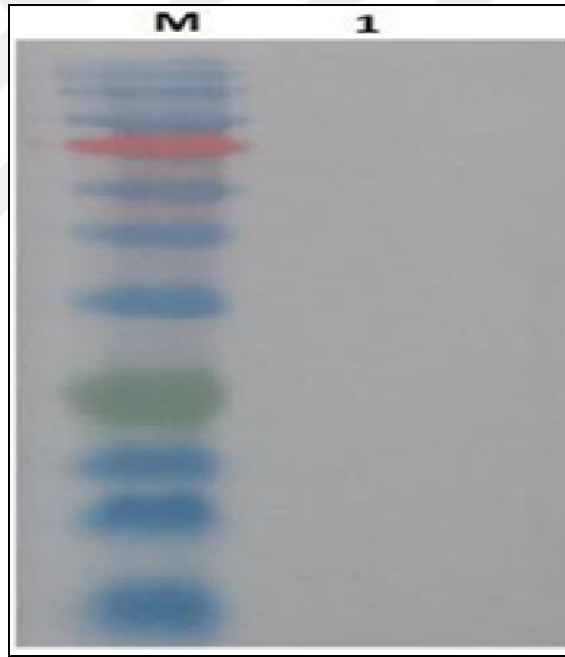


Şekil 3.15 (A) Saflaştırılan OmpA proteinine ait SDS-PAGE görüntüsü ve (B) Saflaştırılan OmpA proteinine ait Western Blot görüntüsü (M: Prestained marker 1: OmpA).

Primer antikor vazifesi görmesi amacıyla BCG'ye özgü antikor kullanıldığında da ana bantlara çapraz reaksiyon verdiği gözlemlenmiştir (Şekil 3.16). Fakat, *M. tuberculosis* OmpA antijenini BCG'ye özgü antikorlar güçlü tanıyamadığı için bantlar net bir şekilde gözlemlenememiştir (Şekil 3.17).



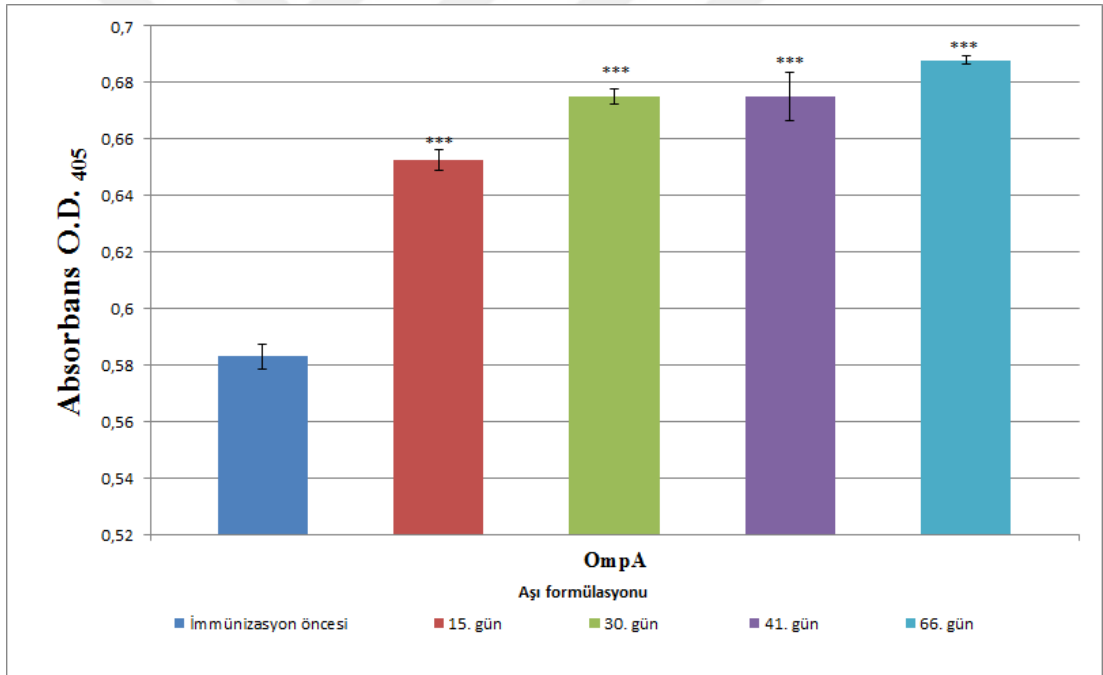
Şekil 3.16 OmpA antijenine karşı BCG antikorunun çapraz reaksiyonunu gösteren Western blot deneyi (A: SDS-PAGE görüntüsü, B: Western blot görüntüsü, C: Bandın bulunduğu yerlerin çizgisel gösterimi. M: prestained marker, 1: OmpA).



Şekil 3.17 OmpA antijenine karşı adjuvan serumu ile yapılan Western blot deneyi (M: prestained marker, 1: OmpA).

3.6 Rekombinant OmpA Proteininin Hümorale Bağışıklık Yanıtı

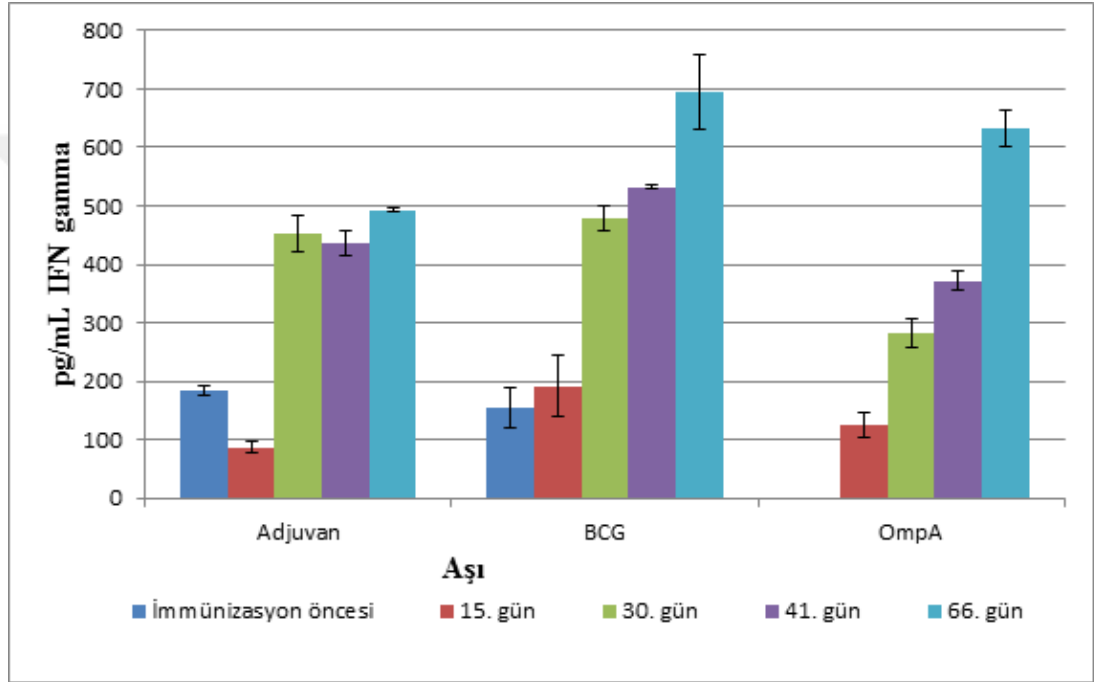
Rekombinant OmpA proteininin BALB/c farelerinde uyardığı hümorale bağışıklık (total IgG) düzeyi kantitatif olarak ELISA deneyi ile tespit edilmiştir (Engvall and Perlmann 1971). İmmünizasyondan önceki değerler, immünizasyon sonrasındaki değerler ile GraphPad Prism programında tek yönlü varyans analizi ve Dunnett testi kullanılarak belirlenmiş ve karşılaştırılmıştır (Şekil 3.18). Pre-immünizasyonun kontrol grubu olarak belirlenip istatistiksel anlam değerlerine bakıldığında ilk aşılama sonrası en iyi hümorale bağışıklık yanıtının %99,9 güvenilirlikte OmpA tarafından tetiklendiği tespit edilmiştir. Oluşan hümorale bağışıklık yanıtın 66. güne kadar yüksek kaldığı tespit edilmiştir.



Şekil 3.18 Montanide ISA 720 VG adjuvanı ile hazırlanmış OmpA proteinine ait aşı formülasyonlarının BALB/c farelerdeki hümorale bağışıklık (total IgG) yanıtı. Serumların 1:800 seyreltme değerleri kullanılmıştır (***: p<0,001).

3.7 İnterferon- gama (IFN- γ) ELISA

Rekombinant olarak OmpA proteini ile hazırlanan aşı formülasyonu ile birlikte piyasada bulunan ve ticari olarak kullanılmakta olan BCG aşısı ile beraber sadece Montanide ISA 720 VG adjuvan BALB/c kobaylarında verdiği hücresel bağışıklık seviyesi kantitatif olarak IFN- γ ELISA deneyi ile tespit edilmiştir. (Şekil 3.19)



Şekil 3.19 Rekombinant OmpA aşı formülasyonunun BALB/c kobaylarda tetiklediği serum IFN- γ seviyesi

OmpA, BCG ve adjuvana ait değerler kendi aralarında GraphPad Prism 5 programında tek yönlü varyans analizi yapıldı. Ardından Tukey's analizi yapılarak karşılaştırıldı. (Çizelge 3.2) 15. gün sonunda adjuvan BCG ve OmpA arasında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. 30. gün sonunda OmpA formülasyonunun tetiklediği IFN- γ seviyesi adjuvan ve BCG'nin tetiklediği seviyeden düşük bulundu. 41. günde OmpA formülasyonu ve adjuvanın tetiklediği serum IFN- γ seviyesinde istatistiksel bir fark bulunmazken BCG tarafından sağlanan IFN- γ düzeyi bu iki gruptan yüksek bulunmuştur. 66. günün sonunda OmpA formülasyonunun

tetiklediği IFN- γ seviyesiyle adjuvan ve BCG'nin tetiklediği seviye arasında istatistiksel bir fark bulunmamaktadır.

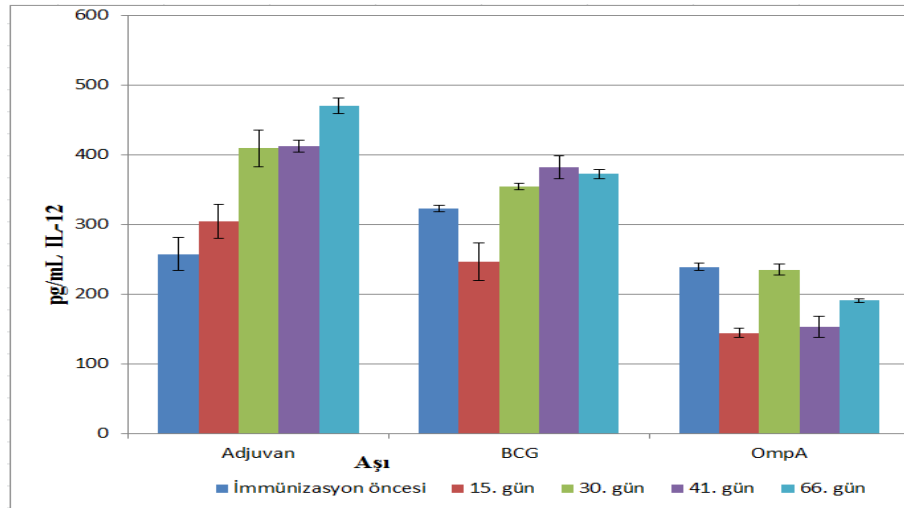
Çizelge 3.2 OmpA aşısının BALB/c kobaylarda serum IFN- γ düzeylerinin tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey's testi ile karşılaştırılması.

Aşı Grupları	İmmünizasyon Öncesi	15. gün	30. gün	41. gün	66. gün
Adj - BCG	AD	AD	AD	*	*
Adj - ompA	**	AD	*	AD	AD
BCG - ompA	*	AD	**	***	AD

*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; AD: anlamlı değil

3.8 IL-12 (İnterlökin 12) ELISA

Rekombinant ompA proteini ile hazırlanan aşı formülasyonu ve ticari BCG aşısı sadece Montanide ISA 720 VG adjuvanın BALB/c farelerinde uyardıkları hücresel bağışıklık düzeyi IFN- γ 'ya ek olarak kantitatif IL-12 ELISA deneyi ile tespit edilmiştir. (Şekil 3.20) rekombinant ompA aşısına ait değerler birbirleri ile GraphPad Prism 5 programında tek yönlü varyans analizi ve Tukey's testi yapılarak kıyaslanmıştır (Çizelge 3.3)



Şekil 3.20 OmpA formülasyonunun BALB/c farelerde tetiklediği serum IL-12 seviyesi.

15. günün sonunda BCG ve OmpA formülasyonunun tetiklediği IL-12 seviyesi arasında istatistiksel anlamda bir fark bulunmamaktadır. Bunun dışındaki tüm zaman dilimleri sonucunda OmpA formülasyonu ile aşılanmış farelerdeki serum IL-12 seviyesi adjuvan ve BCG aşısının tetiklediği IL-12 düzeyine kıyasla daha düşük bulunmuştur.

Çizelge 3.3 OmpA formülasyonunun BALB/c farelerde serum IL-12 düzeylerinin tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey's testi ile karşılaştırılması.

Aşı Grupları	İmmünizasyon Öncesi	15. gün	30. gün	41. gün	66. gün
Adj - BCG	*	AD	AD	AD	**
Adj - OmpA	AD	*	***	***	***
BCG - OmpA	**	AD	**	***	***

*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; AD: anlamlı değil

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Dış Zar Proteini A (OmpA)

Son dönemde yapılan çalışmalar potansiyel aşı adayları olarak dış zar proteinlerinin kullanılabilirliğini göstermiştir. OmpA (Outer Membran Protein A)'da bu dış zar proteinlerinden bir tanesidir. OmpA proteini, yüzeye maruz bırakılan lokalizasyonu, genel koruma ve hastalarda güçlü antikor tepkileri ortaya çıkarmak gibi pek çok özelliğe sahiptir (Du Pin Calmo *et al.* 2017).

M. tuberculosis'te gözenek oluşturucu dış membran proteini OmpA konakçı fagazomlarında asidik direnç için gerekli olan virulans bir faktördür (Yao *et al.* 2012). OmpA, konakçı hücrelerin savunma mekanizmalarının üstesinden gelmek için patojenik mikobakterilerin oluşturduğu düşük pH'lı ortama adaptasyonda rol alır (Da Silva and Palomino 2011). Gen, patojen mikobakteriye özgündür, bu nedenle anti-TB kemoterapinin geliştirilmesinde ilgi çekici bir adaydır (Peter *et al.* 2010).

OmpA dış membranda en fazla görülen protein olup dış membranın peptidoglikan tabakaya bağlanmasında rol alır. OmpA ayrıca bakteriyofaj ve diğer bakteri pilusları için reseptör görevi görmektedir. Bu proteinler, düşük molekül ağırlıklı hidrofilik bileşiklerin hücre içine pasif difüzyonunu sağlamaktadır. *ompA*-TB kodlayan genin bir sinyal dizisi olduğu belirlenmiş ve bu dizi *M. tuberculosis*'ten salgılanan diğer antijen proteinlerin dizisi ile oldukça benzerlik göstermiştir. Bu nedenle *ompA*-TB aynı zamanda antijenik özelliğe sahip immünojenik bir proteindir (Yang *et al.* 2011).

Bununla birlikte, OmpA bakterilerde azot metabolizması, besince yoksul ortamlara adaptasyon ve / veya konakçı organizma ile simbiyoz oluşturma gibi fonksiyonları olan bir protein ailesini oluşturmaktadır. *M. tuberculosis ompA* amonyak salınımına

destekleyebilir, konakçının çevre şartlarına adaptasyonuna yardımcı olmaktadır (De Marchis *et al.* 2011).

ISA Montanide 720 Adjuvan

Montanide ISA adjuvanları, metabolize mineral yağları, metabolize edilmeyen mineral yağları veya iki yağın karışımı ile elde edilen farklı yüzeyetkin maddeleri içeren bir adjuvan grubudur (Miles *et al.* 2005). Montanide ISA 720, çeşitli hayvan türlerinde ve insan sıtma, HIV ve kanser klinik denemelerinde yüksek antikor titrelerini uyaran, skualen bazlı, yağ içinde su emici bir adjuvandır (Pickering *et al.* 2004, Zhu *et al.* 2011).

Montanide ISA 720 alüminyum hidroksite alternatif bir adjuvan olarak insanlarda deneysel kullanımı onaylanmıştır (Masina *et al.* 2003, Toledo *et al.* 2001, Oliveira *et al.* 2005). İnsanlarda hümmoral immün yanıt ve Th1 tipi hüccresel cevap için uyarıcı olduğu gösterilmiştir (Masina *et al.* 2003). Bununla birlikte, Montanide ISA 720 primatlarla yapılan aşılama çalışmalarında da hümmoral ve hüccresel immün yanıt bakımından olumlu yönde çok iyi sonuçlar göstermiştir (Masina *et al.* 2003, Collins *et al.* 2006).

Montanide ISA 720 kullanılarak formüle edilen katepsin B'den oluşan bir aşı, *Schistosoma mansoni*'nin sıçangil şistozomiyazına karşı yüksek düzeyde koruma sağlamıştır. Formülasyon, parazit yükünün tüm biçimlerini önemli ölçüde azaltabilir, antijen spesifik antikorların sağlam üretimini uyarabilir ve Th1 / Th2 uyarımı başlatabilir olduğu anlaşılmıştır. Daha da önemlisi, aşılanmış hayvanlardan izole edilen splenositler, kontrol hayvanları ile karşılaştırıldığında, Th1 sitokinleri, IFN- γ , IL-12 ve TNF- α ve Th2 sitokinleri IL-5 ve IL-4'ün daha yüksek seviyelerini salgıladıkları tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, şistozomiyaza karşı aşı adayları olarak Sm-cathepsin B / Montanide ISA 720 VG'nin yeni bir aşı adayları potansiyelini olduğunu göstermektedir (Ricciardi *et al.* 2016).

Gurung vd. (2014) *M. avium* alttür paratuberculosis'e karşı yapmış oldukları rekombinant aşı geliştirme çalışmalarında Montanide adjuvanının MAP2698c ve MAP3567 proteinleriyle birlikte kuvvetli bir IFN- γ cevabı oluşturduğunu göstermiştir.

Hepatit C Virüsü (HCV)'ye, spesifik Th1-tipi bağışıklık yanıtlarının gücünü arttırmak için yeni bir aşı çalışması yapılmıştır. ELISPOT tahlili Montanide ISA 720'yi adjuvanı kullanılarak tekli veya çoklu proteinle bağışıklamanın, bu adjuvanı içermeyen formülasyondan daha güçlü IFN- γ üreten Th1 yanıtları indüklediğini ortaya koymuştur. Montanide ISA 720'yi adjuvanı kullanılarak yapılan protein aşılması aynı zamanda humoral yanıtları arttırmıştır. Spesifik IgG izotipleri test edildiğinde, Montanide ISA 720 adjuvanı kullanılarak oluşturulan protein immünizasyonu, tek başına protein immünizasyonuna kıyasla daha yüksek titrelerde IgG2a antikorlar ürettiği bildirilmiştir. IgG2a'daki artış, ELISPOT tahlili ile gösterilen IFN- γ salgılayan Th1 hücrelerinin indüksiyonu ile benzerlik göstermiştir. Sonuç olarak, Montanide ISA 720 adjuvanı kullanılarak formülasyonu oluşturulan protein aşılması, BALB/c farelerinde HCV'ye karşı hücre sel bağışıklığın (Th1 tipi) yanı sıra humoral bağışıklık tepkilerini büyük ölçüde arttırdığı gözlemlenmiştir (Qi Qiu *et al.* 2008).

Arévalo-Herrera *et al.* (2011) *Plasmodium vivax* circumsporozoite (CS)'nin Montanide ISA 720 veya Montanide ISA 51 adjuvanlarında formüle edilen CS proteininin amino (N), merkezi tekrar (R) ve karboksil (C) bölgelerine karşılık gelen üç sentetik polipeptid kombinasyonu kemirgenlerde ve primatlarda immünojenlik açısından değerlendirmek amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Deney hayvanları, BALB/c fareleri ve Aotus maymunları, test ve kontrol gruplarına ayrılmıştır. Aşılama üç kez 50 ve 100 μ g aşı veya plasebo dozları ile immünize etmişlerdir. Antijene spesifik antimalaryal antikorlar enzime bağlı immünosorbent testi, immünofloresan antikor testi ve IFN- γ cevapları enzime bağlı immünosorbent deneyi (ELISAspot) ile belirlenmiştir. Her iki aşı formülasyonunda yüksek immünojenik özellikler göstermiştir. Fareler, C ve R polipeptidlerine karşı daha iyi

antikor tepkileri geliştirirken, N polipeptidi maymunlarda daha immünojeniktir. Montanide ISA 720 ve Montanide ISA 51 formülasyonları arasındaki farklar anlamlı olmamıştır.

Giane A. Oliveira *et al.* (2005) yapmış oldukları çalışmada, çok güçlü suda yağ adjuvantı olan Montanide ISA 720'nin formülasyonu ile oluşturulan ICC-1132'nin artan dozlarda intramusküler olarak uygulayarak immünojenikliğini değerlendirmişlerdir. Aşının en sık görülen şikâyeti olan geçici enjeksiyon bölgesinde oluşan ağrı tolere edilmiştir. 20 ug ve 50 ug ICC-1132/ISA 720 ile aşılanan tüm denekler, anti-immünojen ve anti-HBc (Hepatit B Nükleus) antikorları üretmişlerdir. Bu iki gruptaki gönüllülerin çoğunluğu ağırlıklı olarak opsonize edici immünoglobülin antikorlar geliştirmiştir. Montanide ISA 720 formüllü aşının tek bir enjeksiyonundan sonra pik titreleri ve parazite özgü antikorun direnci test edilmiştir. ICC-1132/ ISA 720 aşısının periferik kan mononükleer hücreleri çoğaltılmış ve rekombinant *P. falciparum* CS proteini ile uyarıldığında sitokinlerin (interlökin 12 ve IFN- γ) ve CS-spesifik CD4⁺ T hücre yanıtlarının yüksek seviyede olduğu tespit edilmiştir. Montanide ISA 720 ile formüle edilmiş tek doz bir ICC-1132 sıtma hastalığına karşı yeni bir aşı adayı olarak umut vadetmektedir.

Tüberküloz Hastalığına Karşı Aşı Geliştirme

Mikobakteriler, mikolik asitlerden oluşan bir dış zar ve çok çeşitli diğer lipidler içerir (Siroy *et al.* 2008). *Mycobacteria*, dış çift katlı lipit tabakası ile kendini korur, şimdiye kadar bilinen en kalın biyolojik membrana ve düşük geçirgenliği sahiptir. Bu nedenle etken olduğu hastalığın tedavisi zorlaşmaktadır. β -laktam antibiyotikleri gibi birçok anti bakteriyel ajanlara karşı içsel direnç oluşturmaktadır. Mikobakteriyel bariyer ve dış zar gram negatif bakterilerden biyokimyasal olarak farklıdır fakat aynı işlevleri yerine getirmektedir (Verma *et al.* 2008). İnsanda en sık hastalık oluşturan mikobakteri türü, tüberküloz hastalığının etkeni ve *Mycobacterium* kompleksinin bir üyesi olan *M. tuberculosis*'tir (Gutierrez *et al.* 2005).

Tüberküloz hastalığına neden olan ve *M. tuberculosis* olarak isimlendirilen tüberküloz basili ilk kez 1882'de Robert Koch tarafından keşfedilmiştir. Koch ayrıca, *M. tuberculosis*'i incelemek ve araştırmalarda bulunabilmek amacıyla boyama teknikleri geliştiren ve kültür oluşturabilmek için katı besiyerlerini kullanan ilk araştırmacıdır. Koch, 1930'da William Wells tüberküloz basilinin insanlara inhalasyon (solunum) yoluyla bulaştığını keşfetmiştir (Taylor *et al.* 2003).

Basil Calmette-Guerin (BCG) aşısı, yaklaşık bir asır önce *Mycobacterium* kompleksinin bir üyesi olan ve tüberküloz basilinin bütün yapısal özelliklerini taşıyan, *M. bovis* suşunun zayıflatılmasıyla oluşturulmuş bir formudur. Camille Guerin ve Albert Calmette 1921'de oral yolla uygulanan ilk başarılı insan BCG aşısının mucitleridir. BCG, günümüzde TB'ye karşı tek lisanslı aşı olarak kullanılmaya devam etmektedir (Colditz *et al.* 1994). BCG virulansı düşük canlı bir aşıdır. BCG aşısı ile ilgili çalışmalar 1930' da başlamışken, temel çalışmalar 1950'lerde yapılmıştır (Fine 1995).

Aşının ilk kullanımından başlayarak günümüze kadar immün yanıt cevaplarını ölçmek amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmıştır. BCG aşısının aktivasyonunda farklılıklar bulunmuştur. Tüm bu veriler göz önüne alınarak araştırmalar neticesindeki en önemli sonuç BCG'nin tüberküloza karşı etkili koruyucu immün yanıt sağladığı fakat pulmoner tüberkülozun engellenmesindeki etkinliğin çok ama çok sınırlı olmasıdır. BCG aşılamaını takip eden 15 yılın sonrasında, BCG'nin yetişkinlerde pulmoner tüberküloza karşı koruyucu immün yanıt sağlayamadığını göstermiştir (Agger and Andersen 2001).

1921 yılında ilk kez bir yenidoğana uygulanmış ve o zamandan beri 4 milyardan fazla kişiye BCG aşısı yapılmıştır (Starke 2004). BCG'de suş varyasyonu ve standardizasyondaki eksiklik, bağışıklama sonuçlarının değerlendirilmesindeki temel sorunları oluşturmaktadır (Collins *et al.* 2006, Grange *et al.* 1984). BCG'nin günümüzde uygulanan gerçek dozu yaklaşık 10^6 kob'dur. Hayvanlarda büyük

dozlar küçük dozlara göre sonraki karşılaşmada daha iyi sonuçlar verdiğiinden, uygun olan en yüksek doz kullanılmaktadır. Bununla birlikte istenmeyen yan etkilerin daha sık olduğu yenidoğanlarda, lokal komplikasyonları azaltmak amacıyla, daha büyük çocuklara yapılanın yarı dozunda uygulama eğilimi vardır (Starke 2004).

Tüberküloza karşı korunmada yeni aşilar çalışmaları yapılması gerekmektedir. BCG aşısı primer hastalığa karşı daha iyi koruma sağladığı halde reaktivasyon veya reinfeksiyon tipindeki hastalıklara karşı etkinliği zayıftır. BCG aşısı HIV'li hastalarda da tüberkülozu önleyememektedir. Aşının herhangi bir popülasyonda 15 yıldan daha fazla koruma sağladığının kanıtı yoktur (Fine *et al.* 2001).

Aday aşiların bazıları hayvan modellerinde BCG kadar veya daha iyi aktivite göstermelerine karşın insanlardaki araştırmalar devam etmektedir. Aşiların koruyuculuğunu belirleyen kanıtlanmış veriler saptanamamıştır (Dalmia and Ramsay 2012)

Son 20 yılda moleküler tekniklerin ve immünolojinin ilerlemesi ile rekombinant *Mycobacteria* subunit proteinleri ve DNA aşiları ile ilgili yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bazı araştırmacılar ise BCG aşısının geliştirilmesi ile veya canlı, atenüe *M. tuberculosis* aşısı ile ilgili araştırmalar yürütmektedir (Reed *et al.* 2003).

Li ve arkadaşlarının (2014) yapmış oldukları çalışmada; Ad5-CEAB'ın immün yanıtını ölçerek değerlendirmek istemişlerdir. Bu amaçla kobay modeller, Ad-CEAB ile iki haftalık periyotlarla üç defa intranazal instilasyon (mukozanın aşı ile teması) yöntemi ile aşılama işlemini gerçekleştirmişlerdir. İki haftalık periyotlarla üç defa yapılan aşılamadan sonra alınan sonuçlara göre Ad5-CEAB'ın in vivo olarak immün yanıtı indükleyebildiğini tespit etmişlerdir (Li *et al.* 2014).

Li ve arkadaşları (1999) yapmış oldukları diğer bir çalışmada immünojenik dört *M. tuberculosis* antijeni (ESAT-6, MPT-64, KatG ve HBHA) seçmiş ve kobayları kas içi olarak aşılamışlardır. Bunun sonucunda yapılan aşılamanın humoral ve koruyucu immün yanıt verdiği tespit edilmiştir. Elde edilen verilere göre dört antijenden sadece ESAT-6'nın enfeksiyonun yayılmasını kontrollere göre önemli seviyede düşürdüğü tespit edilmiştir (Li *et al.* 1999).

Horwitz ve arkadaşlarının (2000) gerçekleştirmiş oldukları bir çalışmada; Mtb' de 30 kDa MSP'yi genetik anlamda tanımlayan ve sekresyonunu sağlayan iki canlı aşı oluşturulmuştur. Rekombinant aşılardan koruyucu immün yanıt indüklediği tespit edilmiştir (Horwitz *et al.* 2000).

Delogu ve Brennan (2001) yapmış oldukları çalışmada tüberküloz hastalığına karşı *M. tuberculosis* PE, PE_PGRS proteinlerini kullanarak rekombinant bir aşı oluşturmuşlardır. Kobayların *M. tuberculosis* ile enfekte edilmesi esnasında rekombinant PE_PGRS'e karşı humoral immün yanıt gözlemlenmiştir. Araştırmanın sonuçları yorumlandığında, konakçının *M.tuberculosis* ile enfekte edilmesi sırasında PE_PGRS genlerinin eksprese edildiği tespit edilmiştir (Delogu and Brennan 2001).

Yakın zamanda *M. tuberculosis*' te bulunan 30 kDa büyük bir sekresyon proteinini ifade eden canlı bir rekombinant aşı rBCG30'un, kobay modellerinde tüberküloza karşı daha etkili olduğunu araştırmak amacıyla bir çalışma yapılmıştır. BCG suşu ile kıyaslandığında rBCG30, deri altı olarak uygulandığında 30 kDa proteinine göre, antikor titrelerinin ölçülmesi sonucunda daha fazla hücre aracılı ve humoral immün yanıt tepkileri indüklediği tespit edilmiştir. rBCG30 ile aşılanan kobaylar BCG ile aşılanan kobaylar kıyaslandığında r30'a karşı daha güçlü immün yanıtlar gösterdiği tespit edilmiştir (Horwitz *et al.* 2006).

Marcus ve arkadaşları yapmış oldukları bir araştırmada günümüzde tüberküloz hastalığı ile ilgili sorunlara ait çözümleri bulmak amacıyla *M. tuberculosis*

kullanılarak iki yeni, canlı zayıflatılmış aşı adayı düşünülmüştür; echA7 ve MosR. Kobaylar, BCG ve hazırlanan diğer aşilar ile aşılanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, BCG'ye oranla hazırlanan aşiların kobaylarda daha güçlü immün yanıt oluşturduğu tespit edilmiştir (Marcus *et al.* 2015).

Kita ve arkadaşları yaptıkları çalışmada tüberküloz hastalığına karşı iki yeni aşı geliştirmişlerdir. HSP65 + mIL-12 / HVJ ile aşılanan kobaylar, BCG ile aşılanan kobaylarla karşılaştırıldığında akciğerler, karaciğer ve dalaktaki CFU sayısının azalması ile saptanmıştır. Bu aşının aktifliğini arttırmak ve güçlendirmek amacıyla 72f füzyon genini (r72f BCG) ihtiva eden bir rekombinant BCG üretilmiştir. ELISPOT testi, r72f BCG'nin daha güçlü olarak IFN- γ indüklediğini göstermiştir. Kobay modelinde BCG'ye kıyasla daha fazla T-hücreleri üretilmiştir (Kita *et al.* 2005).

Langermans ve arkadaşlarının birlikte yürüttükleri bir çalışmada; TB hastalığı için, fare ve kobay modellerinde koruyucu immün yanıt gösteren bunula birlikte umut vaat eden bir aşı adayı da Ag85B ve ESAT-6'nın bir füzyonudur. Farklı iki adjuvanla Ag85B-ESAT-6 füzyon proteini ile maymunlara aşılanmanın yapılması, *M. tuberculosis* ile mücadele edilen hayvanlarda bakteri sayısını azalttığı görülmüştür. Birbirinden bağımsız iki deneyde, primatların Ag85B-ESAT-6 ile aşılanmasının koruyucu immün yanıtları indüklediğini göstermiştir. Ag85B-ESAT-6'nın ileri de yapılacak klinik ölçümler için güçlü bir aşı adayı olduğu tespit edilmiştir. Alt birim aşısı olan Ag85B-ESAT-6 primatlarda immün yanıt oluşturmaktadır. Hem ESAT-6 hem de Ag85B kobaylarda güçlü IgG immün yanıtlarını indüklemiştir. Bilhassa, bu hayvan ESAT-6'ya karşı en yüksek seviyede IgG antikoruna sahipken, düşük IFN- γ seviyesi gösterdiği tespit edilmiştir (Langermans *et al.* 2005).

Lu ve arkadaşlarının Ag85b ve füzyon proteini ESAT6-CFP10'un birleşiminden elde edilen rekombinant tüberküloz aşısı AEC / BC02 aşısını geliştirmişlerdir. AEC / BC02 aşısı, farklı zamanlarda kobaylarda antijen spesifik interferon- γ salgılayan T

hücrelerinin hem yüksek hemde güçlü bir frekansı ile karakterize edilen bir hücresel bağışıklık tepkisini ortaya koymuştur. Kobay, koruyucu aşı yapılmadan önce (AEC/BC02) *M. tuberculosis*'e karşı koruyucu etki gösterememiştir. Tüm bunların yanı sıra kobayda, latent bir enfeksiyon modellenmesinde, *M. tuberculosis*'in yeniden etkin ve etkili bir şekilde kontrol edilmesini sağlamıştır. Ayrıca akciğer ve dalaktaki bakteri yükünü düşürdüğüde tespit edilmiştir (Lu *et al.* 2015).

Ag85b'ye karşı gösterilen immün yanıtlar, devamlı olarak verilen yanıtlara kıyasla EC'ye verilen yanıtlardan daha kuvvetli olduğu ortaya çıkmıştır. Tüm bunlar Ag85b'nin hem daha güçlü hem de daha yüksek seviyede bir immünojenik etkisi olduğunu göstermiştir. Yapılan çalışma sonucunda tüm veriler ele alındığında, AEC/BC02 aşılmasının, kobaylarda uzun süreli spesifik hücresel immün yanıt tepkilerini uyardığını açığa çıkarmıştır (Chen *et al.* 2010, Lu *et al.* 2015).

Aşılınmış rat kobaylarında LTK63/Ag85B-ESAT-6 ile aşılamanın BCG ile aşılana rat kobaylarına göre immün yanıtı artırdığı tespit edildi. BCG ile aşılana rat kobaylarına göre *M. tuberculosis* LTC63/Ag85B-ESAT-6 aşılınmış rat kobaylarının akciğerlerinde anti *M. tuberculosis*'e özgül CD4 T hücrelerinde önemli bir artış gözlemlendi. BCG ile aşılınmış rat kobaylarına kıyasla LTK63/Ag85B-ESAT-6 ile aşılınmış rat kobaylarında korelasyon gözlemlendi. Tüm bu sonuçlar ışığında LTK63/Ag85B-ESAT-6 *M. tuberculosis*' e karşı koruyucu bir aşı adayı olmakla birlikte immün yanıt artırma gücünün yüksek olduğu tespit edilmiştir (Dietrich *et al.* 2006).

Tüberküloz hastalığından etkilenen diğer bir sistem santral sinir sistemi enfeksiyonudur. Yapılan bir çalışmada, gelişme geriliği ve konstitüsyonel semptomları olan ve yaygın akciğer dışı tüberkülozun ortaya çıktığı, iki yaşındaki bir çocuk sunulmuştur. Çocuğun tüberküloz yakın teması olarak annesinin yayma pozitif akciğer tüberkülozu olduğu ve antitüberküloz tedavi aldığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, Hindistan'da, tüm yeni doğanlara BCG aşısı yapılmasını ve yayma

pozitif akciğer tüberkülozlu erişkinlerin temashlarının tüberkülin testinin yapılarak isoniyazid proflaksisine alınmasını tavsiye edilmektedir (Patil *et al.* 2017).

Türkiye’de bir hastadan alınan MTB suşundan klonlanarak *E. coli*’den rekombinant olarak saflaştırılan ve Montanide ISA 720 VG adjuvanı ile formüllenen OmpA proteininin BALB/c farelerde indükledikleri hüneral ve hünerel immün sistem yanıtları bu çalışmada ilk defa tespit edilmiştir. OmpA formülasyonunun antikör (IgG) seviyesini güçlendirmede başarılı olduğu saptanmıştır. Prados-Rosales *et al.* (2017)’nin çalışmasında yüksek IgG seviyesinin tüberküloza karşı korumada etkili olduğu gösterilmiştir. OmpA formülasyonu ile aşılana BALB/c farelerdeki serum IL-12 seviyesi adjuvan ve BCG tarafından tetiklenenden düşük bulunmuştur fakat aşılama sürecinin sonunda OmpA formülasyonunun tetiklediği serum IFN- γ düzeyiyle BCG aşısının tetiklediği seviye arasında istatistiksel bir fark gözlenmemiştir. Böylece, IFN- γ düzeyini artırmada OmpA formülasyonunun BCG aşısı kadar etkili olduğu tespit edilmiştir. İleride yapılacak çalışmalarda OmpA kullanılarak oluşturulacak füzyonların daha etkili hünerel immün yanıt oluşturabileceği düşünölmektedir. Bununla birlikte, hünerel yanıtı artıran CpG oligonökleotitler gibi farklı adjuvanlarda çalışmalarda olumlu yönde etkili olacaktır. Sonuç olarak, *M. tuberculosis* OmpA proteini ile hazırlanacak bir formülasyon, ticari BCG aşısına alternatif yeni bir rekombinant aşı adayı olarak kullanılabilir.

KAYNAKLAR

- Abbas, A.K., and Litchman, A.H. 2003. Cellular and Molecular Immunology. 5th Ed.
- Abu-Raddad, L.J., Sabatelli, L., and Achterberg, J.T. 2009. Epidemiological benefits of more-effective tuberculosis vaccines, drugs, and diagnostics. *Proc Natl Acad Sci USA*; 106:13980-85.
- Ada, G. 2003. Overview of vaccines. In: Vaccine protocols (2nd ed.). Edited by Robinson, A., Hudson, M.J., Cranage, M.P. Humana Press, New Jersey, USA. pp. 1-14.
- Agarwal, N., Lamichhane, G., Gupta, R., Nolan, S. and Bishai, W. R. 2009. Cyclic AMP intoxication of macrophages by a Mycobacterium tuberculosis adenylate cyclase, *Nature*, 460 (7251), 98-102.
- Agger, E. and Andersen, P. 2001. Tuberculosis subunit vaccine development: on the role of interferon- γ . *Vaccine*, 19(17); 2298-2302.
- Aguilar, J. and Rodriguez, E. 2007. Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine*, 25(19); 3752-3762.
- Arévalo-Herrera, M., Vera, O., Castellanos, A., Céspedes, N., Soto, L., Corradin, G. and Herrera, S. 2011. Preclinical Vaccine Study of Plasmodium vivax Circumsporozoite Protein Derived-Synthetic Polypeptides Formulated in Montanide ISA 720 and Montanide ISA 51 Adjuvants. *Am J Trop Med Hyg.*, 4(84); 21-27.
- Arnon, R. 2011. Overview of vaccine strategies. In: Vaccine design: innovative approaches and novel strategies. Edited by Rappuoli, R. and Bagnoli, F. Caister Academic Press, Norfolk, UK. pp. 1-17.
- Aronson, NE., Santosham, M., and Comstock, GW. 2004. Long-term efficacy of BCG vaccine in American Indians and Alaska Natives: A 60-year follow-up study. *JAMA*; 291:2086-91.
- Aucouturier, J., Dupuis, L., Deville, S., Ascarateil, S. and Ganne, V. 2002. Montanide ISA 720 and 51: a new generation of water in oil emulsions as adjuvants for human vaccines. *Expert review of vaccines*, 1(1); 111-118.
- Beigel, J., Voell, J., Huang, C.M., Burbelo, P.D., and Lane, H.C. 2009. Safety and immunogenicity of multiple and higher dose of an inactivated influenza A/H5N1. *J. Infect. Dis.* 200, 501-509.
- Bell, C., Smith, G. T., Sweredoski, M. J. and Hess, S. 2012. Characterization of the Mycobacterium tuberculosis proteome by liquid chromatography mass spectrometry-based proteomics techniques: a comprehensive resource for tuberculosis research, *Journal of Proteome Research*, 11 (1), 119-130.
- Beyazova, U., ve Aktaş, F. 2007. Çocukluk Çağı Aşılamaları ve Erişkin Bağışıklaması.
- Beyer, W., Palache, A., De Jong, J., and Osterkausk, A. 2002. Cold-adapted live influenza vaccine versus inactivated vaccine: Systematic vaccine reactions, local and systematic antibody response and vaccine efficacy. A meta-analysis. *Vaccine* 20, 1340-1353.
- Bhamidi, S. 2009. Mycobacterial cell wall arabinogalactan. bacterial polysaccharides: current innovations and future trends. Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-45-5.

- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2); 248-254.
- Brennan, P. 2003. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*; 83: 91-7.
- Brewer, TF., and Colditz, GA. 1995. Relationship between bacille Calmette-Guérin (BCG) strains and the efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. *Clin Infect Dis*; 20:126-35.
- Brosch, R., Gordon, S. and Eiglmeier, K. 2000. Genomics, Biology, and Evolution of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. In: Hatfull GF, Jacobs WR Jr; eds. *Molecular Genetics of Mycobacteria*. 1st ed. Washington, DC: ASM Press; 19-36.
- Burnette, W. N. 1981. Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical biochemistry*, 112(2); 195-203.
- Calis, S., F. Oner, S. Kas and A. Hincal (2001). "Approaches to education of pharmaceutical biotechnology in faculties of pharmacy." *Current pharmaceutical biotechnology* 2(2): 143-155.
- Calmette, A., Guerin Camille, <http://www.drbrianstork.com>.
- Chen, L., Xu, M., Wang, Z. Y., Chen, B. W., Du, W. X., Su, C. X., Shen, B., Zhao, A. H., Dong, N. and Wang, Y. J. 2010. The development and preliminary evaluation of a new *Mycobacterium tuberculosis* vaccine comprising Ag85b, HspX and CFP- 10: ESAT- 6 fusion protein with CpG DNA and aluminum hydroxide adjuvants. *Pathogens and Disease*, 59(1); 42-52.
- Chensue, S. W., Warmington, K. S., Ruth, J. H., Sanghi, P. S., Lincoln, P. and Kunkel, S. L. 1996. Role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in Th1 (mycobacterial) and Th2 (schistosomal) antigen-induced granuloma formation: relationship to local inflammation, Th cell expression, and IL-12 production. *The Journal of Immunology*, 157(10); 4602-4608.
- Colditz, G. A., Brewer, T. F., Berkey, C. S., Wilson, M. E., Burdick, E., Fineberg, H. V. and Mosteller, F. 1994. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis: meta-analysis of the published literature. *Jama*, 271(9); 698-702.
- Collins, C., Grange, J. and Yates, M. 1984. *Mycobacteria in water*. *Journal of Applied Bacteriology*, 57(2); 193-211.
- Collins, W.E., Barnwell, J.W., Sullivan, J.S., Nace, D. Williams, T. Bounngaseng, A., Roberts, J., Strobert, E. McClure, H. and Saul, A. 2006. Assessment of transmission-blocking activity of candidate Pvs25 vaccine using gametocytes from chimpanzees. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 74; 215-221.
- Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., and Gordon, S. V. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence, *Nature*, 393 (6685), 537-544.
- da Costa, A.C., Costa-Júnior Ade, O., and de Oliveira, F.M. 2014. A new recombinant BCG vaccine induces specific Th17 and Th1 effector cells with higher protective efficacy against tuberculosis. *PLoS One*; 9:e112848.

- Da Silva, P. E. A. and Palomino, J. C. 2011. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66(7); 1417-1430.
- Dalmia, N. and Ramsay, A. J. 2012. Prime–boost approaches to tuberculosis vaccine development. *Expert review of vaccines*, 11(10); 1221-1233.
- Delogu, G. and Brennan, M. J. 2001. CompARative immune response to PE and PE_PGRS antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and immunity*, 69(9); 5606-5611.
- De Marchis, F., Pompa, A., Mannucci, R., Morosinotto, T. and Bellucci, M. 2011. A plant secretory signal peptide targets plastome-encoded recombinant proteins to the thylakoid membrane. *Plant molecular biology*, 76(3-5); 427-441.
- Dietrich, J., Andersen, C., Rappuoli, R. T., Doherty, M. C., Jensen, G. and Andersen, P. 2006. Mucosal administration of Ag85B-ESAT-6 protects against infection with *Mycobacterium tuberculosis* and boosts prior bacillus Calmette-Guerin immunity. *The Journal of Immunology*, 177(9); 6353-6360.
- Dormandy, T. 1999. A history of Tuberculosis. The Hambleton Press. London and Rio Grande, Page 1-50.
- du Pin Calmon, F., Cloud, J. M., Medard, M. and Zeng, W. 2017. Multi-path data transfer using Network Coding, Google Patents.
- Dubos, R., and Dubos, J. 1987. *The White Plaque: Tuberculosis, Man and Society*. London: Rutgers University Press. *Gazi Medical Journal*; 18(2):47–65.
- Engvall, E. and Perlmann, P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9); 871-874.
- Fine, P., Floyd, S., Stanford, J., Nkhosa, P., Kasunga, A., Chaguluka, S., Warndorff, D., Jenkins, P., Yates M. and Ponnighaus, J. 2001. Environmental mycobacteria in northern Malawi: implications for the epidemiology of tuberculosis and leprosy. *Epidemiology and infection*, 126(03); 379-387.
- Fine, P. E. 1995. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *The Lancet*, 346(8986); 1339-1345.
- Forrellad R., Klepp, L., Gioffré, A., Sabio y García, J., Morbidoni, H., de la Paz Santangelo, M., Cataldi A. and Bigi., F. 2013 Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*, 2013 Jan 1;4(1):3-66.
- He, P., Zou Y. and Hu Z. 2015. Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 11(2); 477-488.
- Horwitz, M. A., Harth, G., Dillon, B. J. and Masleša-Galić, S. 2000. Recombinant bacillus Calmette–Guérin (BCG) vaccines expressing the *Mycobacterium tuberculosis* 30-kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(25); 13853-13858.
- Horwitz, M. A., Harth, G., Dillon, B. J. and Masleša-Galić, S. 2006. A novel live recombinant mycobacterial vaccine against bovine tuberculosis more potent than BCG. *Vaccine*, 24(10); 1593-1600.
- Gurung, R. B., Purdie, A. C., Whittington, R. J. and Begg, D. J. 2014. Cellular and humoral immune responses in sheep vaccinated with candidate antigens

- MAP2698c and MAP3567 from *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4-93.
- Gutierrez, M., Brisse, S. and Brosch, R. 2005. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PloS Pathogens*; 1: 55-61.
- Junqueira-Kipnis, AP., Marques, LM., and Kipnis, A. 2014. Role of fused *Mycobacterium tuberculosis* immunogens and adjuvants in modern tuberculosis vaccines. *Front Immunol*; 5:188.
- Kita, Y., Tanaka, T., Yoshida, S., Ohara, N., Kaneda, Y., Kuwayama, S., Muraki, Y., Kanamaru, N., Hashimoto, S. and Takai, H. 2005. Novel recombinant BCG and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. *Vaccine*, 23(17); 2132-2135.
- Klegerman, M.E. 1992. *Vaccines. Pharmaceutical Biotechnology. Interpharm Press.* p.:64-76.
- Kocagöz, S. 2014. Aşı teknolojileri ve aşı tipleri. *Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi.*
- Koç, A. N. 2014. BCG Aşısı ve Yerine Gelecek Yeni Yaklaşımlar.
- Koprowski, E. H. and Michael, B. 1996. *Microbe Hunters-Then and Now. BMJ*, 313; 1340.
- Köksal, F. ve Yaman, A. 2003. Farklı bir bakteri topluluğu mikobakterilerde hücre duvar yapısı. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu, , Samsun, Sempozyum Kitabı: 34-47.
- Kuroda, E., Coban, C. and Ishii, K. J. 2013. Particulate adjuvant and innate immunity: past achievements, present findings, and future prospects. *International reviews of immunology* 32(2); 209-220.
- Kuzdan, C., and Bakır, M. 2012. Tüberküloz aşısı. Eds: Badur S, Bakır M, Akademi Yayınları, İstanbul 1. Baskı; 309-327.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227; 680-685.
- Langermans, J. A., Doherty, T. M., Vervenne, R. A., van der Laan, T., Lyashchenko, K., Greenwald, R., Agger, E. M., Aagaard, C., Weiler, H. and van Soolingen, D. 2005. Protection of macaques against *Mycobacterium tuberculosis* infection by a subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85B and ESAT-6. *Vaccine*, 23(21); 2740-2750.
- Lawrence, G. W., Saul, A., Giddy, A. J., Kemp, R. and Pye, D. 1997. Phase I trial in humans of an oil-based adjuvant Seppic Montanide Isa 720. *Vaccine*, 15(2); 176-178.
- Ledermann, J., Harter, P., Gourley, C., Friedlander, M., Vergote, I., Rustin, G., Scott, C. L., Meier, W., Shapira-Frommer, R. and Safra, T. 2014. Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial. *The lancet oncology*, 15(8); 852-861.
- Levinson, W. 2008. *Review of Medical Microbiology and Immunology, McGraw-Hill Companies.* Çeviri: Özgünen T. Kitap: Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmmünolojisi. Güneş Tıp Kitabevleri;161-8.
- Li, Z., Howard, A., Kelley, C., Delogu, G., Collins, F. and Morris, S. 1999. Immunogenicity of DNA vaccines expressing tuberculosis proteins fused to tissue plasminogen activator signal sequences. *Infection and immunity*, 67(9); 4780-4786.

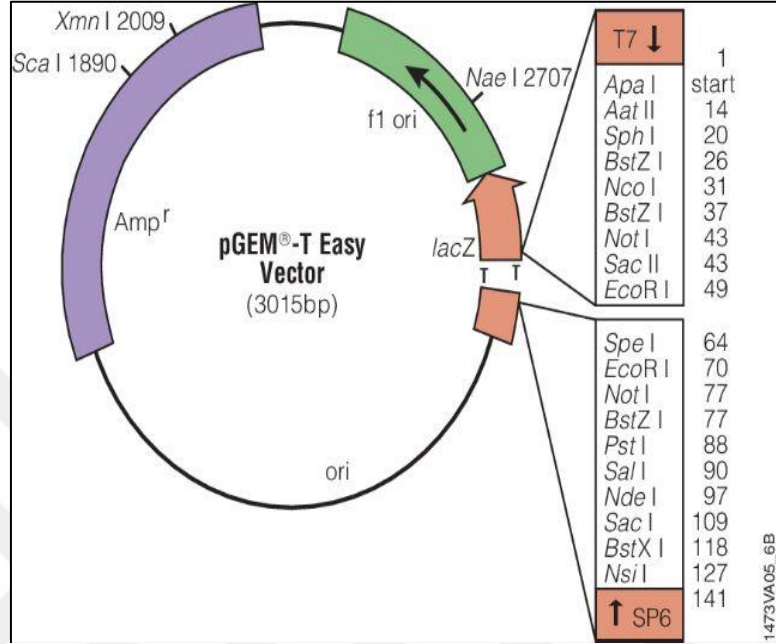
- Li, W., Deng, G., Li, M., Zeng, J., Zhao, L., Liu, X. and Wang, Y. 2014. A recombinant adenovirus expressing CFP10, ESAT6, Ag85A and Ag85B of *Mycobacterium tuberculosis* elicits strong antigen-specific immune responses in mice. *Molecular immunology*, 62(1); 86-95.
- Lu, J., Chen, B., Wang, G., Fu, L., Shen, X., Su, C., Du, W., Yang, L. and Xu, M. 2015. Recombinant tuberculosis vaccine AEC/BC02 induces antigen-specific cellular responses in mice and protects guinea pigs in a model of latent infection. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 48(6); 597-603.
- Marcus, S. A., Steinberg, H. and Talaat, A. M. 2015. Protection by novel vaccine candidates, *Mycobacterium tuberculosis* Δ mosR and Δ echA7, against challenge with a *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain. *Vaccine*, 33(42); 5633-5639.
- Masina, S., Gicheru, M.M., Demotz, S.O., and Fasel, N.J. 2003. Protection against cutaneous leishmaniasis in outbred vervet monkeys, using a recombinant histone H1 antigen. *Journal of Infectious Diseases*, 188; 1250- 1257.
- Miles, A. P., McClellan, H. A., Rausch, K. M., Zhu, D., Whitmore, M. D., Singh, S., Martin, L. B., Wu, Y., Giersing, B. K., Stowers, A. W., Long, C. A., Saul, A. 2005. Montanide ISA 720 vaccines: quality control of emulsions, stability of formulated antigens, and comparative immunogenicity of vaccine formulations. *Vaccine*, 23(19); 2530-2539.
- Nicolas, J. and Guy, B. 2008. Intradermal, epidermal and transcutaneous vaccination: from immunology to clinical practice. *Expert review of vaccines*, 7(8); 1201-1214.
- Nikiforuk, A. 2000. Mahşerin Dört Atlısı. İletişim Yayıncılık A.Ş. İstanbul; Sayfa: 49-66.
- Okay, S. 2011. Development of recombinant vaccines composed of PlpE and OmpH from *Pasteurella multocida* A:3. Doktora Tezi. Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Oliveira, A. G., Wetzel, K., Mauricio Calvo-Calle, J., Nussenzweig, R., Schmidt, A., Birkett, A., Dubovsky, F., Tierney, E. et al. 2005. Safety and Enhanced Immunogenicity of a Hepatitis B Core Particle Plasmodium falciparum Malaria Vaccine Formulated in Adjuvant Montanide ISA 720 in a Phase I Trial. *Infect Immun*, 73(6); 3587.
- Öner, F., ve Eratalay, A. 2001. Aşılar ve Adjuvanları. *Journal of Pharmaceutical Science*, 25; 21-33.
- Patil, S., Nagargoje, N. and Choudhary, C. 2017. Tuberculous Meningitis in Two-Year-Old Male Boy: Evidence of Recent Transmission from Mother to Baby. *Respiratory Case Reports*, 6(1).
- Peter, J., Green, C., Hoelscher, M., Mwaba, P., Zumla, A. and Dheda, K. 2010. Urine for the diagnosis of tuberculosis: current approaches, clinical applicability, and new developments. *Current opinion in pulmonary medicine*, 16(3); 262-270.
- Pym, A. and Small, P. 2006. Mycobacterial evolution: Insights from genomics and population genetics. In: Seifert HS, Dirita VJ; eds. *Evolution of Microbial Pathogens*. 1st ed. Washington, DC: ASM Press; 301-25.
- Petrovsky, N. and Aguilar, J. C. 2004. Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunology and cell biology*, 82(5); 488-496.

- Pickering, A. K., Osorio, M., Lee, G., Grippe, M. V. K., Bray, M. and Merkel, T. J. 2004. Cytokine response to infection with *Bacillus anthracis* spores. *Infection and immunity*, 72(11); 6382-6389.
- Rappuoli, R., and Aderem, A. 2011. 2020 vision for vaccines against HIV, tuberculosis and malaria. *Nature*; 473:463-9.
- Reed, S., Alderson, M., Dalemans, W., Lobet, Y. and Skeiky, Y. 2003. Prospects for a better vaccine against tuberculosis. *Tuberculosis*, 83(1); 213-219.
- Ricciardi, A., Visitsunthorn, K., Dalton, J. P. and Ndao, M. 2016. A vaccine consisting of *Schistosoma mansoni* cathepsin B formulated in Montanide ISA 720 VG induces high level protection against murine schistosomiasis. *BMC Infectious Diseases*, 16(1); 112.
- Raynaud, C., Papavinasasundaram, K., Speight, R., Springer, B., Sander, P., Böttger, E., Colston, J. and Draper, P. 2002. The functions of OmpATb, a pore-forming protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology*, 46 (1), 191-201.
- Ryll, R., Kumazawa, Y. and Yano, I. 2001. Immunological properties of trehalose dimycolate (cord factor) and other mycolic acid-containing glycolipids - a review. *Microbiol Immunol*; 45: 801-11.
- Ryan, J. J., Lopez, S. J. and Werth, T. R. 1998. Administration time estimates for WAIS-III subtests, scales, and short forms in a clinical sample. *Journal of Psychoeducational Assessment*, 16(4); 315-323.
- Senaratne R., Mobasher, H., Papavinasasundaram, K., Jenner P., Lea E. and Draper, P. 1998. Expression of a Gene for a Porin-Like Protein of the OmpA Family from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Journal of Bacteriology*, 180 (14), 3541-3547.
- Singh, J. and Verma, R. 2008. Cloning and molecular characterization of outer membrane protein A (ompA) gene from *Mycobacterium bovis*. *Microbiol Immunol*, 52, 410-417.
- Smith, D., Harding, G., and Chan, J. 1979. Potency of 10 BCG vaccines as evaluated by their influence on the bacillemic phase of experimental airborne tuberculosis in guinea-pigs. *J Biol Stand*; 7:179-97.
- Siroy, A., Mailaender, C., Harder, D., Koerber, S., Wolschendorf, F., Danilchanka, O., Wang, Y., Heinz, C. and Niederweis, M. 2008. Rv1698 of *Mycobacterium tuberculosis* represents a new class of channel-forming outer membrane proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 283(26): 17827-17837.
- Smith, I. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence, *Clinical Microbiology Reviews*, 16 (3), 463.
- Soares, AP., Kwong Chung, CK., and Choice, T. 2013. Longitudinal changes in CD4(+) T-cell memory responses induced by BCG vaccination of newborns. *J Infect Dis*; 207: 1084-94.
- Stead, W. 1996. Epidemiology of the Global Distribution of Tuberculosis. In: Koprowski H, Oldstone MBA. Eds. *Microbe Hunters. Then and Now*. Medi-Ed Pres; 23: 311- 317.
- Stenger, S., Hanson, DA., and Teitelbaum, R. 1998. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science*; 282:121-5.
- Yang, Y., Auguin, D., Delbecq, S., Dumas, E., Molle, G., Molle, V., Roumestand, C. and Saint, N. 2011. Structure of the *Mycobacterium tuberculosis* OmpATb

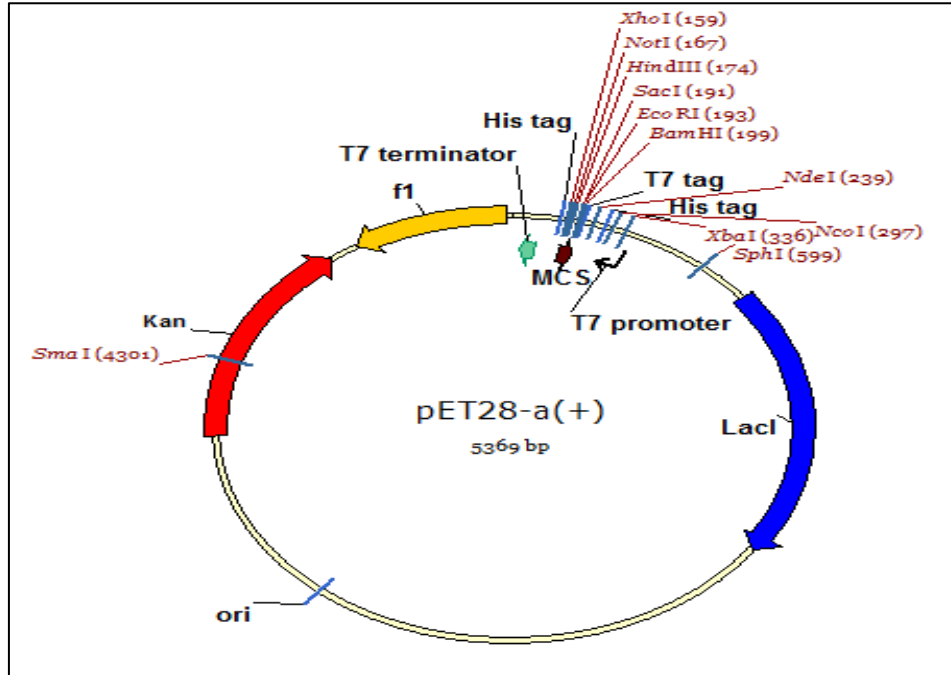
- protein: a model of an oligomeric channel in the mycobacterial cell wall. *Proteins*, 79 (2), 645-661.
- Soulen, R., Byers, J., Osofsky, M., Nadgorny, B., Ambrose, T., Cheng, S., Broussard, P. R., Tanaka, C., Nowak, J. and Moodera, J. 1998. Measuring the spin polarization of a metal with a superconducting point contact. *Science*, 282(5386); 85-88.
- Starke, J. R. 2004. Tuberculosis in children. *Seminars in respiratory and critical care medicine*, Copyright© 2004 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA.
- Stenger, S., Hanson, D. A., Teitelbaum, R., Dewan, P., Niazi, K. R., Froelich, C. J., Ganz, T., Thoma-Uszynski, S., Melián, A. N. and Bogdan, C. 1998. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science*, 282(5386); 121-125.
- Taylor, J. L., Turner, O. C., Basaraba, R. J., Belisle, J. T., Huygen, K. and Orme, I. M. 2003. Pulmonary necrosis resulting from DNA vaccination against tuberculosis. *Infection and immunity*, 71(4); 2192-2198.
- Toledo, H., Baly, A., Castro, O., Resik, S., Laferte, J., Rolo, F., Navea, L., Lobaina, L., Cruz, O. and Miquez, J. 2001. A phase I clinical trial of a multi-epitope polypeptide TAB9 combined with Montanide ISA 720 adjuvant in non-HIV-1 infected human volunteers. *Vaccine*, 19; 4328-4336.
- Ullrich, M. 2009. *Bacterial polysaccharides: current innovations and future trends*, Horizon Scientific Press.
- Verma, R., Lee, P., Lee, S., Springham, S. V., Tan, T., Rawat R. S., and Krishnan, M. 2008. Order of magnitude enhancement in neutron emission with deuterium-krypton admixture operation in miniature plasma focus device. *Applied Physics Letters*, 93(10); 101501.
- World Health Organization. 2015. *Guidelines on the management of latent tuberculosis infection*.
- Qi Qiu, R., Yuan-Hu, W., Xuanmao, J., Bo, J., Fuminaka, S., Teresa, G., Harvey, J., Alter, J. and Wai-Kuo, S. 2008. Induction of multispecific Th-1 type immune response against HCV in mice by protein immunization using CpG and Montanide ISA 720 as adjuvants. *Vaccine*, 5527-5534.
- Yao, Y., Barghava, N., Kim, J., Niederweis, M. and Marassi, F. M. 2012. Molecular structure and peptidoglycan recognition of *Mycobacterium tuberculosis* ArfA (Rv0899). *Journal of molecular biology*, 416(2); 208-220.
- Zhu, D., McClellan, H., Dai, W., Gebregeorgis, E., Kidwell, M. A., Aebig, J., Rausch, K. M., Martin, L. B., Ellis R. D. and Miller, L. 2011. Long term stability of a recombinant *Plasmodium falciparum* AMA1 malaria vaccine adjuvanted with Montanide® ISA 720 and stabilized with glycine. *Vaccine*, 29(20); 3640-3645.

EK A

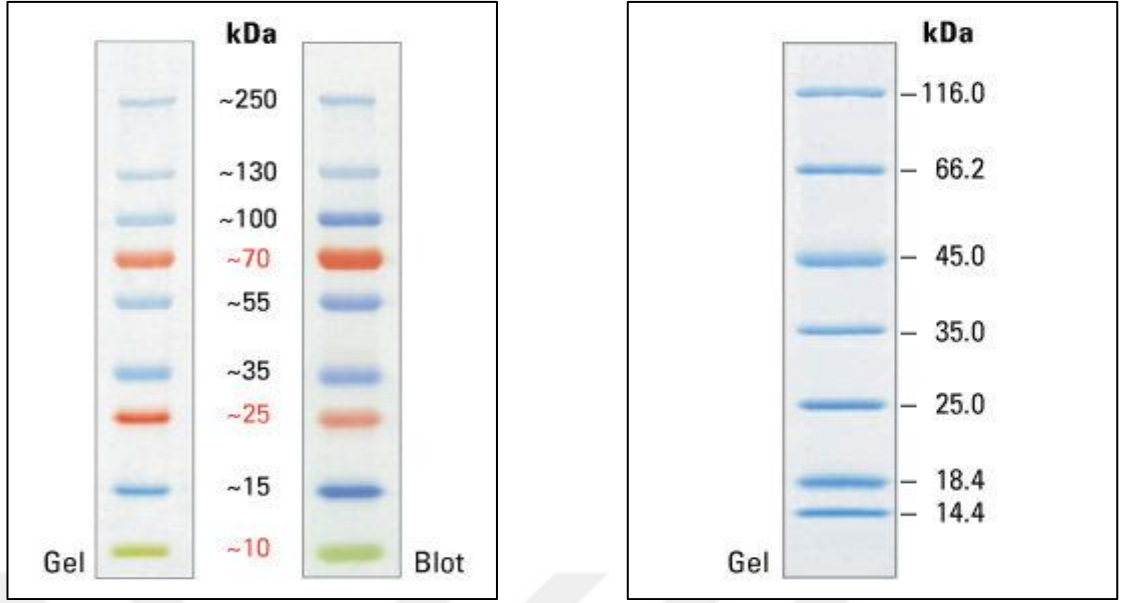
A1. Plazmit Vektörleri ve Büyüklük Belirteçleri



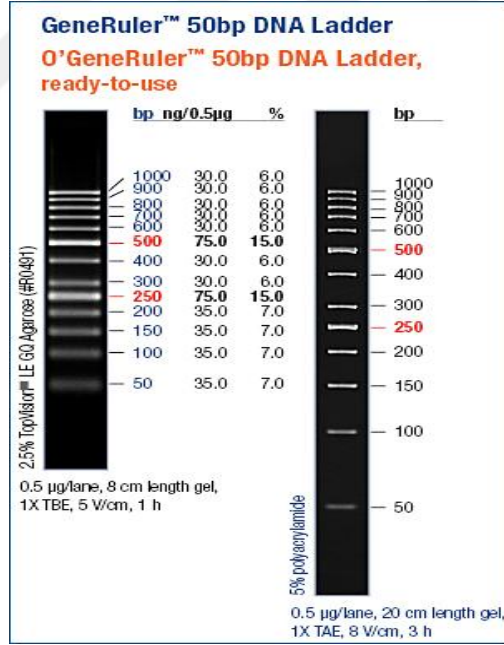
Şekil 1 pGEM®-T Easy Klonlama Vektörü



Şekil 2 pET-28a(+) His-tag Tanımlama Vektörü



Şekil 3 Renklendirilmiş protein moleküler ağırlık merdiveni (fermentas #sm1811) ve renklendirilmemiş protein moleküler ağırlık merdiveni (fermentas #sm0431)



Şekil 4 GeneRuler™ 50bp DNA merdiveni

EK B

Kültür Ortamlarının İeriği

B1. Luria Broth

Agar 15g
Broth 10g
Saf su ile hacmi 1000 ml' ye tamamlandıktan sonra pH 7 olarak ayarlandı. 121 °C'de 15 dakika otoklavlandı.

B2. Luria Agar:

Agar 15 g
Saf su ile hacmi 1000 ml' tamamlandıktan sonra pH 7 olarak ayarlandı. 121 °C'de 15 dakika otoklavlandı.

EK C

Çözelti İçerikleri

C1. Agaroz Jel Elektroföresi

Tris Asetat EDTA Tamponu (TAE 50X)

- Tris-baz 242 g
- Glasiyel asetik asit 57,1 mL
- EDTA (0.5 M, pH 8.0) 100 mL

Saf su ile hacmi 1000 mL'ye tamamlanır.

C1.2. Yükleme Tamponu (10X)

- Bromofenol mavisi (w/v) %0,25
- Ksilen siyanol FF (w/v) %0,25
- Sükröz (w/v) %40

C2. SDS-Poliakrilamit Jel Elektroföresi (PAGE)

C2.1. Akrlamit/Bis

- Akrlamit 146 g
- N.N'-Metilen-bis akrilamit 4 g

Saf su ile hacmi 500 mL'ye tamamlanır ardından filtre edilerek 4°C'de ışıksız ortamda saklanır.

C2.2. Tris Tamponu (1.5 M)

- Tris-baz 54,45 g
- Saf su 150 ml

Hidroklorik asit ile pH 8.8' e ayarlandıktan sonra hacim 300 mL'ye tamamlanır. 4°C' de muhafaza edilir.

C2.3. Tris Tamponu (0.5 M)

- Tris-baz 6 g
- Saf su 60 ml

Hidroklorik asit ile pH 6.8' e ayarlandıktan sonra hacim 100 mL'ye tamamlanır. 4°C' de muhafaza edilir.

C2.4. Koşturma Tamponu (10X)

- Tris-baz 30 g
- Glisin 144 g
- SDS 10 g

Saf su ile hacmi 1000 mL'ye tamamlanır.

C2.5. Örnek Yükleme Tamponu (4X)

- Tris-HCl (1 M, pH 6.8) 2 ml
- EDTA (0.5 M) 1 ml
- Gliserol 4 ml
- SDS 0,8 g
- β -merkaptoetanol 0,4 ml
- Bromofenol mavisi 0,008 g

Saf su ile hacmi 10 mL'ye tamamlanır.

C2.7. Coomassie Mavisi R-250 Boyası

- Coomassie Blue R-250 0,25 g
- Metanol 125 ml
- Glasiyal asetik asit 25 ml
- Saf su 100 ml

C2.8. Boya Uzaklaştırma Çözeltisi

- Metanol 100 ml
- Glasiyal asetik asit 100 ml
- Saf su 800 ml

C3. Western Blot

C3.1. Aktarma Tamponu (1X)

- Metanol 200 ml
- Tris-baz 3,63 g
- Glisin 14,4 g
- SDS 0,37 g

Saf su ile hacmi 1000 mL'ye tamamlanır.

C3.2. Tris Tamponlu Tuz Çözeltisi (TBS) (1X)

- Tris-baz 2,42 g
- NaCl 29,2 g

Saf su ile hacmi 1000 mL'ye tamamlanır.

C4. Protein Saflaştırma

C4.1. LEW (Lizis-Elüsyon-Yıkama) Tamponu (pH 8.0)

- Üre 8 M
- NaCl 300 mM
- NaH₂PO₄ 50 mM

C4.2. DB (Diyaliz Tamponu, pH 8.0)

- NaH₂PO₄ 50 mM
- NaCl 500 mM
- Üre 4 M

C5. *E. coli* Kompetan Hücrelerin Hazırlanması

C5.1. Tampon 1

- RuCl 100 mM
- KAc 30 mM
- CaCl₂ 10 mM
- Gliserol 15%

Seyreltilmiş asetik asit ile pH 5.8'e ayarlanır ve filtre edilerek steril hale getirilir.

C5.2. Tampon 2

- CaCl₂ 75 mM
- RuCl 10 mM
- MOPS 10 mM
- Gliserol %15

0,2 M KOH ile pH 6.5'e ayarlanır ve filtre edilerek steril hale getirilir.

C6. IPTG (İzopropil-β-D-tiyo galaktozit) Koloni Seçimi İçin

- IPTG 100 mg
- Saf su 1 ml

Solüsyon filtre ile steril edildikten sonra -20°C'de muhafaza edilir.

C7. X-Gal (5-bromo-4-kloro-3-indol-B-D-galaktozit)

- X-Gal 20 mg
- Dimetilformamit 1 ml

Çözeltinin ışığa karşı korunması sağlanır ve -20°C'de muhafaza edilir.

C8. Plazmit İzolasyonu

C8.1. STE Tamponu

- Sükroz (w/v) % 10,3
- Tris-HCl (pH 8.0) 25 mM
- EDTA (pH 8.0) 5 mM

C8.2. Lizis Tamponu

- NaOH 0,3 M
- SDS (w/v) % 2

C9.ELISA Antikor Titrelerinin Tespiti İçin

C9.1. Karbonat/Bikarbonat Tamponu (0.05 M)

- Na₂CO₃ 1,59 g
- NaHCO₃ 3,88 g

Saf su ile 1000 mL'ye tamamlanarak pH 9.6'ya ayarlanır ve 4°C'de muhafaza edilir.

C9.2. Yıkama Çözeltisi (1X PBS - 0.1% Tween-20)

- NaCl 8 g
- KCl 0,2 g
- Na₂HPO₄ 1,44 g
- KH₂PO₄ 0,24 g
- Twin-20 1 ml

Saf su ile 1000 mL'ye tamamlanarak pH 7.2'ya ayarlanır ve 4°C'de muhafaza edilir.

C9.3. Bloklama Çözeltisi

- 1X PBS - %0,1 Twin-20 içerisinde %2 (w/v) BSA.

C.10 ELISA Serum INF- γ Titrelerinin Tespiti İçin

C10.1. Kaplama Tamponu (1X PBS)

- NaCl 8 g
- KCl 0.2 g
- Na₂HPO₄ 1.44 g
- KH₂PO₄ 0.24 g

Saf su ile hacmi 1000 mL'ye tamamlanarak pH 7.4'e ayarlanır ve 4°C'de muhafaza edilir.

C10.2. Bloklama Tamponu

- 1X PBS içerisinde %4 (w/v) BSA ve %5 (w/v) sükröz.

C10.3. Deney Tamponu

- 1X PBS içerisinde %2 (w/v) BSA.

C10.4. Yıkama Tamponu (1X PBS-0.2% Tween-20)

- NaCl 8 g
- KCl 0.2 g
- Na₂HPO₄ 1.44 g
- KH₂PO₄ 0.24 g
- Tween-20 2 ml

Saf su ile hacmi 1000 mL'ye tamamlanarak pH 7.4'e ayarlanır ve 4°C'de muhafaza edilir.

C10.5. Durdurma Çözeltisi

0,18 M Sülfirik asit

EK D

Enzimler, Kimyasallar Ve Kitlerin Tedarikçileri

D1.Kimyasallar

Tedarikçiler

Akrilamit	Sigma
Agar-Agar	Merck
Agaroz	Biomax (Prona)
Amonyum persulfat	AppliChen
Ampisilin	Sigma
Anti-fare IgG	Sigma
Bovin-serum albümin	Merck
Bromofenol mavisi	Merck
CaCl ₂ .2H ₂ O	Merck
Coomassie Blue G-250	Fluka
Coomassie Blue R-250	Fluka
Dimetilformaldehit	Merck
dNTPler	Fermentas
EDTA	Sigma
Etanol	Sigma
Etidyum bromür	Sigma
Formaldehit	Merck
Glasiyal asetik asit	Merck
Gliserol	Sigma
Glisin	Merck
HCl	Merck
IPTG	Merck
Kanamisin	Sigma
KCl	Merck
KH ₂ PO ₄	Merck
Luria Broth	Merck
Metanol	Sigma
MOPS	Sigma
N.N'-Metilen-bis akrilamit	Sigma
Na ₂ HPO ₄	Merck
NaCl	Sigma
NaHCO ₃	Merck
NaOH	Merck
Penisilin/streptomisin	Biochrom
Fenol/Kloroform/izoamilalkol	Amresco
Potasyum asetat	Merck
RuCl	Merck
SDS	Sigma
Yağsız süt tozu	Sigma

Sükroz	Merck
TEMED	Sigma
Tris-baz	Sigma
Tris-HCl	Fluka
Twin-20	Merck
Üre	Sigma
X-gal	Sigma
Ksilen siyanol FF	Merck
2-merkaptetanol	Merck

D2.Enzimler

<i>Bam</i> HI	Fermentas
<i>Bgl</i> II	Fermentas
T4 DNA ligaz	Fermentas
<i>Taq</i> DNA polimeraz	Fermentas

D3.Kitler

Jel Ekstraksiyon Kiti	Thermo Scientific
Protino Ni-TED 2000 Kolonları	Macherey-Nagel
Fare IFN- γ Kiti	Thermo Scientific
Fare IL-12 Kiti	Thermo Scientific
pGEMT Easy Vektör Kiti	Promega
Plazmit İzolasyon Kiti	Thermo Scientific
Genomik DNA İzolasyon Kiti	Thermo Scientific

ÖZGEÇMİŞ

Doğum Tarihi ve Yeri:20.10.1990 İstanbul/Üsküdar

Uyruğu:T.C

Mesleği:Biyolog

Medeni Hali:Bekar

Askerlik Durumu:Tecilli

Sürücü Belgesi:B

Telefon:+90 537 676 77 05

E-mail: fatihkrblt@hotmail.com

Eğitim:

Yüksek Lisans:Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji A.B.D

Bitirme Tezi:*Mycobacterium tuberculosis* OmpA proteininin Antijenik etkisinin Araştırılması

Tez Yöneticisi:Doç. Dr. Sezer OKAY

Lisans:Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü 2013

Yabancı Diller:İngilizce

Bilgisayar Deneyimi:Microsoft Office, Windows 7-vista-xp, Excel,Word PowerPoint, İnternet

Çalıştığım Kurumlar:

Gebze Fatih Devlet Hastanesi Biyokimya & Mikrobiyoloji Laboratuvarları Laboratuvarı (Stajyer) 2011, KOCAELİ

TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi İmmünoloji Laboratuvarı (Stajyer) 2011, KOCAELİ

Özel Afşinbey Anadolu Sağlık Meslek Lisesi 2013 (Öğretmen), KOCAELİ

Fusun Erdemir Anadolu Sağlık Meslek Lisesi 2013 (Öğretmen), KOCAELİ

Liv Hospital Satış ve Pazarlama Supervisor 2017, ANKARA

İdari Tecrübe : Özel Afşinbey Anadolu Sağlık Meslek Lisesi 2013 (Müdür Yardımcısı)

Ödüller ve Burslar:TÜBİTAK 3501 Kariyer Geliştirme Programı kapsamındaki SBAG 214S359 nolu projede bursiyer

Ulusal Sertifikalar:18. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi 2015

Tezler:*Mycobacterium tuberculosis* OmpA proteininin Antijenik etkisinin Araştırılması

Poster/Sunum:18. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi Konya Dedeman Otel TÜBİTAK 3501 Kariyer Geliştirme Projesi Rekombinant BCG Aşısı Geliştirme Poster Sunumu 2015

Faaliyetler:

Toyota A.Ş, Darıca Belediyesi, Ets Tur & Xanadu Snow White Otel, Arı Medikal, Karabulut Mühendislik, Arten Reklam Ajansı, Zafer Medya Ve Obje Dijital' in sponsorluğunu yaptığı Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü 53. Dönem Mezunlarının Mezuniyet Töreni Organizatörlüğü

Aldığım Görevler:

ÇAKÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Öğrenci Başkanlığı, 2016

ÇAKÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Öğrenci Başkanlığı, 2016

ÇAKÜ Öğrenci Konseyi Divan Kurulu Başkanlığı, 2016

Referanslarım:

Referans-1:Doç. Dr. Sezer Okay

Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Tel : 0 531 573 39 96 | E-Posta : sezerokay@gmail.com

Referans-2:Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE

Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Tel : 0 532 596 57 33 | E-Posta : gullucem@atauni.edu.tr