TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNFLUENZA VİRÜSÜ YÜZEY ANTİJEN PROTEİNLERİNİN MİKROORGANİZMALARDA REKOMBİNANT OLARAK ÜRETİLMESİ VE ANALİZİ

ŞEYMA ÖZAYDIN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. KADİR TURAN

İSTANBUL - 2018

TEZ ONAYI

Kurum	: Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi	: Yüksek Lisans
Anabilim Dalı	: Biyokimya (ECZ)
Tez Sahibi	: Şeyma ÖZAYDIN
Tez Başlığı	: İnfluenza Virüsü Yüzey Antijen Proteinlerinin Mikroorganizmalarda Rekombinant Olarak Üretilmesi ve Analizi
Sınav Yeri	: Eczacılık Fakültesi – Biyokimya Anabilim Dalı
Sınav Tarihi	: 27.04.2018

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)	**Kurumu**	**İmza**
Prof. Dr. Kadir TURAN	Marmara Üniv., Eczacılık Fakültesi	
Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)		
Prof. Dr. Gülruh ALBAYRAK	İstanbul Üniv., Fen Fakültesi	
Dr. Öğr. Üyesi Erkan RAYAMAN	Marmara Üniv., Eczacılık Fakültesi	

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun ..10../05./2018 tarih ve 12.. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Göksel ŞENER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

-Sınav evrakları 3 iş günü içinde ıslak imzalı tek kopya halinde Enstitüye teslim edilmelidir.
-Bu form bilgisayar ortamında doldurulacaktır.

BEYAN

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

Şeyma ÖZAYDIN

I. TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca engin bilgi birikimi ve tecrübelerini esirgemeyen, çalışmamın planlanmasından oluşumuna kadar her aşamasında ilgi ve desteğini sürekli hissettiren, her soruma sabırla cevap vererek yönlendiren ve kendisiyle çalışmış olmayı büyük bir kazanç olarak gördüğüm Tez Danışmanım Prof. Dr. Kadir Turan' a minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Katkılarından dolayı Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Fikriye Uras başta olmak üzere M. Ü. Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımda yardımını gördüğüm, yararlı öneri ve eleştirileriyle bu noktaya gelmemde katkısı olan arkadaşım Burçak ŞENBAŞ' a tüm desteği için teşekkür ederim.

Hayatım boyunca bana her konuda destek olan ve çalışmalarım süresince birçok fedakarlık gösteren canım aileme teşekkürlerimi büyük bir borç bilirim.

Şeyma ÖZAYDIN

Bu tez çalışması, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenen SAG-C-YLP-130313-02065 ve SAG-C-YLP-SAG-C-YLP-080715-0324 no'lu projelerle sağlanan sarf malzemeleri ile gerçekleştirilmiştir.

I. TEŞEKKÜR……. **ii**
II. İÇİNDEKİLER……..… **iii**
III. KISALTMALAR…….. **ix**
IV. ŞEKİL ve TABLOLARIN LİSTESİ……... **x**
i. Şekil Listesi ……...… **xi**
ii. Tablo Listesi…….. **xv**

II. İÇİNDEKİLER

1 ÖZET 1
2 SUMMARY 2
3 GİRİŞ VE AMAÇ 3
4 GENEL BİLGİLER 5
4.1 İnfluenza Virüsleri 5
4.1.1 İnfluenza Virüslerinin Morfolojik Özellikleri 6
4.1.2 İnfluenza Virüslerinin Genom Yapıları ve Viral Proteinler 7
4.1.3 İnfluenza Virüsünün Replikasyonu 14
4.1.4 İnfluenza Virüslerinde Antijenik Değişmeler 16
4.1.5 İnfluenza Virüslerinin Epidemiyolojisi 19
4.2 İnfluenza Virüslerinden Korunma ve Tedavi Yöntemleri 21
4.2.1 Aşılar 22
4.2.2 Antiviral İlaçlar 23
4.2.3 Nöraminidaz İnhibitörleri (Zanamivir ve Oseltamivir) 25
4.2.4 RNA Polimeraz İnhibitörü 28
4.3 Rekombinant DNA Teknolojisi ve Mikroorganizmalarda Heterolog Protein Sentezi 28
5 GEREÇ VE YÖNTEM 32
5.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler 32
5.2 Enzimler 33

5.3 Ticari Kitler 34
5.4 Cihaz ve Gereçler 34
5.5 Besiyerleri 35
5.5.1 Luria Bertani (LB) Besiyeri 35
5.5.2 Luria Bertani Agar (LBA) Besiyeri 35
5.5.3 YPAD (Yeast- Pepton-Adenin-Dekstroz) Besiyerleri - 1 Litre 35
5.5.4 YPD (Yeast- Pepton-Dekstroz) Besiyerleri - 1 litre 35
5.5.5 Katı Sentetik Dekstroz (SD +Ade) besiyeri – 250 mL 35
5.5.6 Katı Sentetik Dekstroz (SD -Ade) besiyeri - 500 mL 36
5.5.7 BMMY Besiyeri (*İng.* Buffered Methanol-Complex Medium)- 500 mL 36
5.6 Plazmit Vektörler 36
5.7 Bakteri Suşları 36
5.8 Maya Hücreleri 36
5.9 Çalışmanın Değişik Aşamalarında Kullanılan Oligonukleotid Primerler 37
5.10 Çözeltiler 38
5.10.1 Amino Asit Karışımı / Drop Out (DO) Çözeltisi 38
5.10.2 100x Konsantre Lösin (Leu) Çözeltisi 38
5.10.3 100x Konsantre Histidin (His) Çözeltisi 38
5.10.4 100x Konsantre Triptofan (Trp) Çözeltisi 38
5.10.5 50x Konsantre Adenin (Ade) Çözeltisi 38
5.10.6 Dekstroz Çözeltisi (% 20 –a/h) 38
5.10.7 Etidyum Bromür (10 mg/ml) 38
5.10.8 %70 Etil Alkol 38
5.10.9 Etilendiamintetraasetik Asit (EDTA) Çözeltisi (0.5 M, pH: 8.0) 39
5.10.10 Fenol : Kloroform : İzoamil Alkol (25:24:1) 39
5.10.11 Fizyolojik Tuzlu Su (FTS) 39

5.10.12 Hidroklorik Asit Çözeltisi (3 N) 39
5.10.13 Kalsiyum Klorür Çözeltisi (2.5 M) 39
5.10.14 Lityum Asetat Çözeltisi (1M) 39
5.10.15 Polietilen Glikol Çözeltisi (% 40 –a/h) 40
5.10.16 Polietilen Glikol Çözeltisi (% 50 –a/h) 40
5.10.17 Lityum Asetat/PEG/TE Çözeltisi 40
5.10.18 Lityum Asetat/TE Çözeltisi (100 mM LiAc/10 mM Tris-Cl / 1mM EDTA) 40
5.10.19 Lityum Asetat/ SDS çözeltisi (200 mM LiOAc - %1 SDS, a/h) 40
5.10.20 Pipes Çözeltisi (1 M) 40
5.10.21 Potasyum Klorür Çözeltisi (2.5 M) 40
5.10.22 Potasyum di-Hidrojen Fosfat Çözeltisi (50 mM) 40
5.10.23 Di-Potasyum Hidrojen Fosfat Çözeltisi (50 mM) 40
5.10.24 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Çözeltisi (% 10 –a/h) 41
5.10.25 Sodyum Hidroksit Çözeltisi (2 N) 41
5.10.26 Sodyum Karbonat Çözeltisi (1M) 41
5.10.27 Sodyum Di-hidrojen Fosfat Çözeltisi (200 mM) 41
5.10.28 Di-Sodyum Hidrojen Fosfat Çözeltisi (200 mM) 41
5.10.29 Akrilamid/bis akrilamid çözeltisi (%29 akrilamid/%1 bis-akrilamid – a/h) 41
5.10.30 Amonyum Persülfat (APS) Çözeltisi (%10 – a/h) 41
5.10.31 Bloklama Çözeltisi (%5'lik yağsız süt tozu) 41
5.10.32 Gümüş Nitrat-Formaldehit Çözeltisi (%0.1, a/h - %0.075, h/h) 41
5.10.33 Görüntüleme Çözeltisi (%2 sodyum karbonat, a/h-%0.04 formaldehit, h/h - %0.0004 sodyum tiyosülfat, a/h) 42
5.10.34 Metanol:glasiyel asetik asit çözeltisi(%50 metanol,%10 glasiyel asetik asit) 42

5.10.35 %10 Tween-20 (a/h) 42
5.10.36 Salmon Sperm DNA (ssDNA) Çözeltisi (5 mg/ ml) 42
5.11 Tamponlar 42
5.11.1 Transformasyon Tamponu 42
5.11.2 DNA Ekstraksiyon Tamponu I (25 mM Tris-Cl, 50 mM glikoz, 10 mM EDTA pH: 8.0) 43
5.11.3 DNA Ekstraksiyon Tamponu II (0,2 N NaOH, % 1 SDS) 43
5.11.4 DNA Ekstraksiyon Tamponu III (3 M Potasyum : 5 M Asetat) 43
5.11.5 6x Konsantre DNA Yükleme Tamponu 43
5.11.6 50x Konsantre Tris-Asetat-EDTA (TAE) Tamponu 43
5.11.7 Tris-Cl Tamponu (1 M, pH: 7.5) 43
5.11.8 Tris/EDTA (TE) Tamponu (10 mM Tris / 1 mM EDTA, pH: 8) 43
5.11.9 Potasyum Fosfat Tamponu (50 mM pH: 7.5) 44
5.11.10 Sodyum Fosfat Tamponu (200 mM pH: 7.0) 44
5.11.11 20x Konsantre TBS Tamponu 44
5.11.12 TBS ve TBS-T Tamponu 44
5.12 *Pichia Pastoris* Maya Irklarının Kontrolü 44
5.13 Transformasyon için *Escherichia coli* Hücrelerinin Kompetent Hale Getirilmesi 44
5.14 Agaroz Jellerin Hazırlanması ve Elektroforez İşlemi 45
5.15 Spektrofotometrik Yöntemle DNA'nın Kantitatif ve Kalitatif Analizi 45
5.16 Primerlerin Fosforillenmesi 46
5.17 Protein Miktarlarının Belirlenmesi 46
5.18 İnfluenza HA ve NA Genlerini Kodlayan Maya ve Bakteri Ekspresyon Vektörlerinin Oluşturulması 46
5.18.1 İnfluenza A /WSN/33 HA cDNA'larının elde edilmesi 47
5.18.2 İnfluenza A /WSN/33 NA cDNA'larının elde edilmesi 48

5.18.3 pPinkα-HC plazmit DNA'sının ligasyon için hazırlanması 49

5.18.4 pET-14b plazmit DNA'sının ligasyon için hazırlanması 49

5.18.5 pGFP plazmit DNA'sının ligasyon için hazırlanması 50

5.18.6 Ligasyon ve transformasyon..... 51

5.18.7 Koloni-PZR ile Transformant Bakteri Kolonilerinin Seçilmesi..... 52

5.18.8 Transformant Bakteri Kolonilerinden Küçük Ölçekte DNA İzolasyonu..... 52

5.18.9 Küçük ve Orta Ölçekte Hazırlanan Plazmit DNA'ların Restriksiyon Enzimleri ile Kontrolü..... 53

5.18.10 Plazmit DNA'ların PEG/ NaCl ile Saflaştırılması ve Dizi Analizleri54

5.18.11 Orta Ölçekte Plazmit DNA'ların Hazırlanması 54

5.19 Bakteri Ekspresyon Plazmitlerinin, Rekombinant Protein Üretimi İçin Farklı *E. coli* Suşlarına Transformasyonu 55

5.20 Ekspresyon Plazmiti Transforme Edilen *E. coli* Hücrelerinin Üreme Eğrilerinin oluşturulması 55

5.21 Maya Ekspresyon Plazmitlerinin, *P. Pastoris* Maya Hücrelerine Transformasyonu 55

5.22 Plazmit Aktarılan *P. pastoris* Hücrelerinin İnfluenza Virüsü HA ve NA Genleri için PZR ile Kontrol Edilmesi 57

5.23 Plazmit Aktarılan *P. pastoris* Hücrelerinde HA ve NA Proteinlerinin Sentezinin Analiz Edilmesi 58

5.24 Protein Örneklerinin SDS- PAGE ve Western Blotting Melezleme ile Analiz Edilmesi 60

5.24.1 Poliakrilamid jellerin hazırlanması ve elektroforez 60

5.24.2 Jellerin gümüş boyama yöntemi ile boyanması..... 60

5.24.3 Western melezleme tekniği ile proteinlerin görüntülenmesi..... 61

5.25 Bakterilerde Sentez Edilen İnfluenza Virüsü HA ve NA Proteinlerinin Elektroforez Teknikleri ile Analiz Edilmesi..... 61

6 BULGULAR 63

6.1 İnfluenza Virüsü HA ve NA Proteini Kodlayan Plazmit Vektörünün Oluşturulması ile İlgili Veriler 63

6.1.1 HA ve NA cDNA'larının Çoğaltılması ile İlgili Veriler 63

6.1.2 HA ve NA Kodlayan Bakteri Ekspresyon Vektörlerinin Oluşturulması ile İlgili Veriler 66

6.1.3 HA ve NA Kodlayan Maya Ekspresyon Vektörlerinin Oluşturulması ile İlgili Veriler 75

6.2 HA ve NA Proteini Kodlayan Plazmit Aktarılan Bakterilerin Üreme Profilleri ile İlgili Veriler 79

6.3 Protein Miktar Tayini ile İlgili Veriler 80

6.4 Bakteri Hücrelerinde HA ve NA Proteinlerinin Sentezi ile İlgili Veriler 80

6.5 *P. pastoris* Maya Irklarının Kontrolüne İlişkin Veriler 84

6.6 *P. pastoris* Maya Irklarının Transformasyonu ile İlişkin Veriler 86

6.7 Transformant Maya Irklarının HA ve NA Genleri için Kontrolü ile İlişkin Veriler 86

6.8 Maya Hücrelerinde HA ve NA Proteinlerinin Sentezi ile İlgili Veriler 87

7 TARTIŞMA 89

8 KAYNAKLAR 100

9 ÖZGEÇMİŞ 115

III. KISALTMALAR

a/h	Ağırlık/hacim
Ade	Adenin
APS	Amonyum persülfat
Bç	Baz çifti
DANA	2-deoksi-2,3-dehidro-N-asetilnörominik asit
DMSO	Dimetil sülfoksit
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EtBr	Etidyum bromür
FTS	Fizyolojik tuzlu su
GP	Glikoprotein
Gr	Gram
g/L	Gram/litre
h/h	Hacim/hacim
HA	Hemaglütinin
HEF	Hemaglütinin Esteraz Füzyonu
HEK-293	İnsan embriyonik böbrek hücreleri
IPTG	İzopropiltiogalaktozid
kDa	Kilo dalton
LB	Luria bertani
LBA	Luria bertani agar
Leu	Lösin
LiAc/PEG	Lityum asetat/polietilen glikol
NA	Nöraminidaz
OD	Optik dansite
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PEG	Polietilen glikol
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SD +Ade	Adenin içeren SD besiyeri

SD – Ade	Adenin içermeyen SD besiyeri
SDS	Sodyum dodesil sülfat
ssDNA	Salmon sperm DNA
SV40	Simian Virüs 40
TAE	Tris-Asetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetrametiletilendiamin
UV	Ultraviyole
YNB	Maya azot kaynağı (yeast nitrogen base)
YPAD	Maya özütü (yeast extract), pepton, adenin, dekstroz içeren besiyeri
w/w	Ağırlık/ağırlık

VI. ŞEKİL ve TABLOLARIN LİSTESİ

i. Şekil Listesi

Şekil 1. İnfluenza A/PR8/8/34 virüslerinin elektron mikroskobu ile çekilen elektronmikrografı ve İnfluenza A virüsünün çizimsel görünümü…… 6

Şekil 2. İnfluenza A virüslerinin farklı morfolojik görünümleri……... 7

Şekil 3. Poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrıştırılmış, iki farklı tipte influenza A virüsü genomuna ait RNA segmentleri…….. 8

Şekil 4. İnfluenza virüslerinde membrana bağlı yüzey antijen proteinleri ve viral ribonükleoprotein partikülleri…… 9

Şekil 5. İnfluenza A virüsü RNA segmentleri ve bu segmentler üzerinden sentez edilen viral proteinler……. 10

Şekil 6. İnfluenza A virüslerinin konak hücreye tutunması (adsorpsiyon), girişi (penetrasyon) ve vRNP'lerin serbestleşmesi……. 11

Şekil 7. İnfluenza A virüsü HA proteinlerinin konak hücrelerde tutundukları reseptörlere bağlı sialik asit bakiyeleri ve virüslerin tercih ettikleri sialik asit bağlanma formları….. 11

Şekil 8. İnfluenza A virüsü replikasyonu sırasında tek bir polipeptid halinde sentez edilen HA proteini ve konak proteaz enzimleri ile kesilerek HA1 ve HA2 peptidlerine ayrılmış HA proteinleri……. 12

Şekil 9. İnfluenza A/Tanzania/205/2010 (H3N2) virüsüne ait tetramerik yapıda NA proteininin üç boyutlu globüler yapısı…… 13

Şekil 10. İnfluenza A virüsü yapısı ve replikasyonu……. 14

Şekil 11. İnfluenza A virüslerinde görülen antijenik yapı değişmeleri……. 18

Şekil 12. İnfluenza A virüsü tipleri ve bu virüslerin konak olarak kullandıkları organizmalar…….. 19

Şekil 13. İnaktive edilmiş influenza virüs aşılarının içeriği…… 23

Şekil 14. Anti-influenza A virüs aktivitesi gösteren adamantan türevi bileşiklerin molekül yapıları……... 24

Şekil 15. Amantadinin bağlanması ile oluşan amantadin/ M2 protein kompleksi…… 25

Şekil 16. İnfluenza A/Tokyo/3/67 (H2N2) virüsü NA enzimi ile sialik asit bakiyesi kompleksi model gösterimi…… 26

Şekil 17. İnfluenza virüsü enfeksiyonlarına karşı kullanım için ilgili otoritelerin onayını almış NA inhibitörleri…….. 27

Şekil 18. T-705 (Favipavir) İnfluenza virüsü RNA polimeraz enzimi inhibitörü. 28

Şekil 19. Rekombinant bir DNA molekülünün elde edilmesi ve çoğaltılması aşamaları 30

Şekil 20. PZR ile çoğaltılan İnfluenza A virüsünün HA ve NA genlerinin agaroz jel elektroforezi ile incelenmesi……...… 66

Şekil 21. *Nco*I restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirilen pET-14b plazmitinin agaroz jel elektroforezi ile kontrolü…… 67

Şekil 22. Myc uzantısı taşıyan İnfluenza virüsü HA ve NA cDNA'larının pET-14b plazmitine klonlanması ile oluşturulan bakteri ekspresyon vektörleri…… 67

Şekil 23. Transformasyon sonrası LBA (+amp) besiyerinde oluşan kolonilerin HA.myc veya NA.myc genleri taşıyan rekombinant plazmitler için koloni-PZR ile analizi…….. 68

Şekil 24. pET-14b-HA.myc (A) ve pET-14b-NA.myc (B) bakteri ekspresyon vektörüne klonlanan viral genlerin nükleotid dizi analizi kromatogramları……. 69

Şekil 25. pGFP plazmitinin ters PZR ile çoğaltılan bölgesi (A) ve PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile analizi…… 70

Şekil 26. İnfluenza A virüsü HA ve NA genlerinin Lac promotörü kontrolünde

klonlanması ile elde edilen *E. coli* ekspresyon vektörlerinin restriksiyon haritaları……. 71

Şekil 27. Transformasyon sonrası LBA (+amp) besiyerinde oluşan kolonilerin, pLac-HA.myc (A), pLac-NA.myc (B), pLac-HA (C) ve pLac-NA (D) rekombinant plazmitleri için koloni- PZR analizi……. 72

Şekil 28. Koloni-PZR ile pozitif sonuç veren kolonilerden hazırlanan pLac-HA (1) ve pLac-HA.myc(2) plazmitlerinin *Eco*RI; pLac-NA(3) ve pLac-NAmyc (4) plazmitlerinin *Eco*RI/*Pst*I restriksiyon enzimleri ile kesilerek agaroz jel elektroforezi…… 73

Şekil 29. pLac-HA (A), pLac-HA.myc (B), pLac-NA (C) ve pLac-NA.myc (D) bakteri ekspresyon vektörüne klonlanan viral genlerin nükleotid dizi analizi kromatogramları… 74

Şekil 30.pPinkα-HC plazmit haritası (A) ve *Stu*I restriksiyon enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirilen plazmit DNA'sının agaroz jel elektroforezi ile kontrolü (B)……. 75

Şekil 31. İnfluenza A virüsü HA ve NA genlerinin pPinkα-HC plazmitine klonlanması ile elde edilen maya ekspresyon vektörlerinin restriksiyon haritaları…….. 76

Şekil 32. Transformasyon sonrası LBA (+amp) besiyerinde oluşan kolonilerin, pPinkα-HA.myc (A) ve pPinkα-NA.myc (B) rekombinant plazmitler için koloni-PZR ile analizi…… 76

Şekil 33. İnfluenza A virüsü HA ve NA genleri klonlanan maya ekspresyon vektörlerinin restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesilerek kontrol edilmesi…….. 77

Şekil 34. pPinkα-HA.myc (A) ve pPinkα-NA.myc (B) maya ekspresyon vektörüne klonlanan viral genlerin nükleotid dizi analizi kromatogramları…….. 78

Şekil 35. İnfluenza A virüsü HA ve NA genleri klonlanan bakteri ekspresyon

plazmitleri ile transforme edilen *E. coli*/Mach1 ve *E. coli*/BL21 bakterilerinin LB (+amp) besiyerinde gösterdikleri üreme şekilleri…….. 79

Şekil 36. Bradford metodu ile BSA (bovin serum albümin, fraksiyon V) kullanılarak hazırlanan protein standart grafiği……. 80

Şekil 37. pET-14b-NA.myc ya da pET-14b-HA.myc ile transforme edilen, sıvı ya da katı besiyerinde üretilen *E. coli* /BL21 hücrelerinde viral proteinlerin SDS-PAGE/ Western melezleme tekniği ile analizi. ……. 81

Şekil 38. Farklı bakteri ekspresyon plazmitleri ile transforme edilen *E. coli* suşlarında viral protein sentezinin SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile analizi……. 82

Şekil 39. IPTG içeren ortamlarda üretilen *E. coli* hücrelerinde viral protein sentezinin SDS-PAGE/ Western melezleme tekniği ile analizi…….. 83

Şekil 40. pLac-NA ve pLac-HA plazmit vektörleri ile transforme edilen *E. coli*/Mach1 hücrelerinde viral proteinlerin SDS-PAGE / Gümüş boyama tekniği ile analizi…….. 84

Şekil 41. *P. pastoris* Irk-2 ve Irk-3 hücrelerinin farklı besi ortamlarında üreme özellikleri 85

Şekil 42. Elektroporasyon tekniği ile pPinkα-HA.myc ve pPinkα-NA.Myc plazmitleri ile transforme edilen *P. pastoris* ırk-2 hücrelerinin seçici besiyerinde oluşturdukları koloniler……. 86

Şekil 43. Elektroporasyon tekniği ile transforme edilen *P. pastoris* maya kolonilerinden elde edilen genom DNA'larının HA ve NA genleri için PZR ile analiz edilmesi……... 87

Şekil 44. pPinkα-HA.myc ve pPinkα-NA.myc plazmitleri ile transforme edilen *P. pastoris* ırk2 ve ırk3 hücrelerinden hazırlanan lizatların SDS-PAGE / Western melezleme tekniği ile analiz edilmesi…… 88

i. Tablo Listesi

Tablo 1. *Pichia pastoris* ırklarının genotipleri……. 37

Tablo 2. İnfluenza virüsü HA ve NA genlerinin PZR ile çoğaltılması, vektörlerin doğrusal hale getirilmesi ve oluşturulan plazmit vektörlerin DNA dizi analizleri ile kontrolünde kullanılan olionukleotid primerler…… 37

Başlık :**İnfluenza Virüsü Yüzey Antijen Proteinlerinin Mikroorganizmalarda Rekombinant Olarak Üretilmesi ve Analizi**

Öğrencinin Adı : Şeyma ÖZAYDIN

Danışmanı : Prof. Dr. Kadir TURAN

Anabilim Dalı : Biyokimya Anabilim Dalı

1 ÖZET

Amaç:

İnfluenza A virüsleri insanlarda sık sık tekrarlayan grip salgınlarına sebep olan zarflı virüslerdir. Virüs membranında yer alan HA ve NA proteinleri enfeksiyonların seyrini belirler. Bu proteinler, influenza virüsüne karşı kullanılan rekombinant aşıların da temel bileşenidir. Bu tez çalışmasında, aşı olarak kullanım potansiyeline sahip influenza virüsü HA ve NA proteinlerinin rekombinant DNA teknolojileri ile bakteri ve maya hücrelerinde üretilmesi, bakteri ve maya hücrelerinin bu proteinleri üretebilme kapasitelerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem:

Çalışmada viral genlerin elde edilmesinde İnfluenza A/WSN/33 (H1N1) virüsleri kullanıldı. Konak olarak *Escherichia coli* ve *Pichia pastoris* hücrelerinden yararlanıldı. HA ve NA proteinlerini kodlayan genler İnfluenza A virüsleri ile enfekte HEK293 hücrelerden ters transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu ile elde edildi. cDNA'lar, standart DNA klonlama teknikleri ile ekspresyon vektörlerine klonlandı. Elde edilen plazmit vektörler *E. coli* veya *P. pastoris* hücrelerine transforme edildi. Hücreler liziz tamponunda ya da sonikasyon ile parçalandı ve hücre lizatları SDS-PAGE / Western melezleme teknikleri ile viral proteinler için analiz edildi.

Bulgular ve Sonuç:

Çalışmada İnfluenza A virüsü HA ve NA proteinlerini kodlayan altı adet bakteri ekpresyon vektörü; dört adet maya ekpresyon vektörleri elde edildi. Vektörlerde taşınan genlerin doğruluğu DNA dizi analizleri ile ortaya kondu. *E. coli* hücrelerinde sentez edilen HA ve NA proteinlerinin hücreler için toksik olduğu ve bakteri üremesini ileri düzeyde yavaşlattığı saptandı. *E. coli* hücrelerinin NA proteinin HA proteinine göre daha yüksek düzeylerde sentez edebildiği görüldü. *P. pastoris* maya hücrelerinin ise, çalışmada denenen koşullarda, viral genleri genomlarında taşımalarına karşın SDS-PAGE/Western melezleme teknikleri ile belirlenebilecek düzeyde viral protein sentez etmediği saptandı.

Anahtar Kelimeler: İnfluenza, Hemaglütinin, Nöraminidaz, Rekombinant protein

Title	: **Production and Analysis of Influenza Virus Surface Antigen Proteins in Microorganisms**
Student's name	: Şeyma ÖZAYDIN
Supervisor	: Prof. Dr. Kadir TURAN
Department	: Department of Biochemistry

2 SUMMARY

Aim:

Influenza A viruses are enveloped viruses that cause recurrent flu epidemics in humans. Viral membrane proteins, HA and NA determine the course of infections. These proteins are also a key component of recombinant vaccines used against influenza virus. In this study, it was aimed to product the Influenza virus HA and NA proteins by using DNA technology in bacterial and yeast cells and, to compare the viral protein production capacity of these cells.

Material and Methods:

Influenza A/WSN/33 (H1N1) viruses were used for isolation of viral genes. *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* cells were used as hosts. The HA and NA genes were isolated by reverse transcription-polymerase chain reaction from influenza A virus-infected HEK293 cells. The cDNAs were cloned into the expression vectors by standard DNA cloning techniques. The resulting plasmids were transformed into *E. coli* and *P. pastoris* cells. The cells were lysed in lysis buffer or sonication, and the lysates were analyzed with SDS-PAGE / Western blotting techniques for viral proteins.

Results and Discussion:

In this study, six expression plasmids for bacteria and, four expression plasmids for yeast cells, encoding Influenza A virus HA and NA proteins, were constructed. The accuracy of the plasmids for viral genes were revealed with DNA sequencing. It was shown that the HA and NA proteins are very toxic for *E. coli* cells and, these proteins significantly reduce bacterial growth in culture. It was also found that *E. coli* cells produce NA protein at higher levels compering to HA protein. In *Pichia pastoris*, it was shown that the viral HA and NA genes were integrated in the yeast genome by using PCR. However, viral proteins could not be detected by SDS-PAGE / Western blotting techniques under the experimental conditions applied in the study.

Key Words: Influenza, Hemagglutinin, Neuraminidase, Recombinant protein

3 GİRİŞ VE AMAÇ

İnfluenza virüsleri insanlarda sık sık tekrarlayan grip salgınlarına sebep olan ve sekiz parçalı RNA genomu taşıyan zarflı virüslerdir. Bu virüsler, yol açtığı salgınlar sonucunda Dünya genelinde çok büyük ekonomik kayıplara ve özellikle bağışıklık sistemleri zayıf çocuk, yaşlı ve kalp-damar hastalıkları olan bireylerde yüksek oranda ölümlere neden olmaktadır.

İnfluenza virüsleri *Orthomyxoviridae* virüs ailesi içerisinde sınıflandırılırlar (Apostolov ve Flewett, 1969). Bu virüslerde RNA genom parçaları NP (nükleer protein) olarak adlandırılan proteinler ile paketlenmiş haldedir (McCauley ve Mahy, 1983; Zhilinskaya ve diğerleri, 1982). İnfluenza virüsleri matriks (M1) proteinleri ve NP proteinlerinin antijenik farklılıklarına göre A, B ve C alt tiplerine ayrılırlar. Yakın bir tarihte sığırlarda saptanan bir influenza tipinin bu üç tip virüsten farklı olduğu belirlenmiş ve D alt tipi olarak sınıflandırılmıştır (Flynn ve diğerleri, 2018). İnfluenza virüs tipleri arasında insan sağlığı açısından en büyük risk oluşturan virüsler A tipi virüslerdir.

Doğal olarak bir virüse ait tüm proteinler konak organizma için birer antijen özelliği taşır. Bununla birlikte influenza virüslerinin tanımlanması ve konak ile ilişkileri açısından ele alındığında dört farklı proteini antijen özellik açısından öne çıkmaktadır. Bunlar; NP proteini, matriks (M1) proteini, hemaglütinin (HA) proteini ve nöraminidaz (NA) proteinidir. NP antijenleri, virüs genomu ile kompleks halinde bulunur. İnfluenza virüslerinin A, B ve C tiplerine gruplandırılmasında bu proteinin antijenik özelliği göz önünde bulundurulur. Konak organizmada kendiliğinden antikor oluşumuna yol açar. Virüs partikülünün iç kısmında bulunması nedeniyle, bu proteine karşı oluşturulan antikorlar viral enfeksiyonu inhibe etmez (Grant ve diğerleri, 2013; Yewdell ve diğerleri, 1985). M1 proteinleri viral membranın hemen altında yer alırlar. M1 proteini de NP proteini gibi influenza virüslerinin tiplendirilmesine olanak sağlayan internal antijendir (Bucher ve diğerleri, 1989; Kordyukova ve diğerleri, 2008). HA proteini, viral membran üzerinde yer alan temel antijenlerden biridir. Konak hücrelerde translasyon sonrasında glikozillendiği için glikoprotein yapıdadır (Green ve diğerleri, 1982; Zhang ve diğerleri, 2012). Virüsün hücreye tutunmasında rol oynar. Duyarlı eritrositleri aglütine ettiği için bu proteinler hemaglütinin olarak adlandırılmıştır. İnfluenza A virüslerinin alt tiplere ayrılmasında bu antijenin özelliklerinden yararlanılır. Virüs membranında yer aldığı için konak organizmada bu proteinlere karşı

sentezlenen antikorlar viral enfeksiyonu inhibe edici özellik taşır (Hovanec ve Air, 1984; Sriwilaijaroen ve Suzuki, 2012). NA proteinleri, enzimatik aktiviteye sahip, virüs membranında yer alan proteindir. NA proteinleri de HA proteinleri gibi sentez edildikten sonra glikozillenen bir glikoproteindir ve influenza A virüslerinin alt tiplere ayrılmasında kullanılır. Virüslerin HA proteini ile konak hücre reseptörlerine bağlanmasına yardımcı olur. Hücre yüzeyindeki sialik asit bakiyelerini keser. Bu nedenle yeni sentez edilen virüs partiküllerinin serbest kalmasında da işlev görür. Bu proteine karşı oluşan antikorlar da viral replikasyonu engelleyici etki gösterir (Colman, 1994; Fields ve diğerleri, 1981; Shtyrya ve diğerleri, 2009).

İnfluenza virüs yüzey antijenleri, konak bağışıklık sistemi açısından büyük önem taşımaktadır. İnaktif halde virüsler ya da saflaştırılmış yüzey glikoproteinleri aşı olarak kullanılmaktadır. İnfluenza A virüsü HA ve NA proteinleri rekombinant DNA teknolojisi ile üretilerek de aşı olarak kullanılmaktadır. Çok yakın geçmişte Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (*İng. Food ve Drug Administration; FDA*) onayı alan rekombinant influenza aşısı, *Flublok*, böcek hücrelerinde üretilen ve saflaştırılan HA proteinlerinden oluşmaktadır (Baxter ve diğerleri, 2011; King ve diğerleri, 2009; Loeffen ve diğerleri, 2011; Treanor ve diğerleri, 2011). Dolayısıyla rekombinant DNA teknolojileri ile üretilecek influenza A virüsü yüzey antijen proteinleri aşı olarak kullanılabilmektedir (Mendelman ve diğerleri, 2001).

İnfluenza virüslerine ait HA ve NA yüzey antijen proteinleri enfeksiyonların seyrinde rolü olan en önemli proteinlerdir. Viral enfeksiyonların sürekli olarak tekrarlamasında etkili olan temel faktör, viral replikasyon sırasında bu proteinlerin yapısında meydana gelen değişmelerdir. Bu proteinler, influenza virüsüne karşı kullanılan rekombinant aşıların da temel bileşenidir. İnfluenza A virüslerine ait HA ve NA yüzey antijen proteinlerinin bakteri ve maya hücrelerinde üretilmesi bu tez çalışmasının konusunu oluşturmaktadır. Aşı olarak kullanım potansiyeline sahip influenza virüsü HA ve NA yüzey antijen proteinlerini rekombinant olarak bakteri ve maya hücrelerinde üretmek, bakteri ve maya hücrelerinin bu proteinleri üretebilme kapasitelerini belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda insan tipi influenza A/WSN/33 (H1N1) virüsüne ait HA ve NA proteinlerini kodlayan genler, bakteri ve maya ekspresyon vektörlerine klonlanmış ve bu plazmitler ile transforme edilen hücrelerde viral proteinlerin sentezi analiz edilmiştir.

4 GENEL BİLGİLER

Işık mikroskobu ile belirlenemeyecek kadar submikroskobik yapıda olmaları nedeniyle virüslerin tanımlanması uzun zaman almıştır. 19.yüzyıl sonlarında, bakterileri tutan filtrelerden geçebilen enfeksiyoz ajanların varlığı tespit edilmiştir. Virüslere karşı ilk aşı geliştiren Edward Jenner ve Louis Pasteur'ün de virüslerin varlığından haberleri yoktu. Edward Jenner çiçek aşısını (Baxby, 1999), Louis Pasteur ise kuduz aşını geliştirmiştir (Geison, 1978). Virüslerin varlığı ile ilgili ilk deneysel kanıtlar, bakterileri tutacak kadar küçük porlara sahip filtreler ile yapılan çalışmalardan gelmektedir. İlk kez 1892 yılında, Dmitry Ivanovsky tütünde hastalık yapan etmenlerin bakteri filtrelerinden geçebildiğini, elde ettiği filtrat ile sağlıklı bitkileri enfekte ederek göstermiştir (Lecoq, 2001). Martinus Beijerinck, filtreden geçen bu enfeksiyoz ajanları virüs olarak isimlendirmiştir (Nezelof, 2000; Theunissen, 1996). Daha sonra 20. Yüzyılın başlarında Felix d'Herelle tarafından bakterilerde enfeksiyon yapan virüsler, bakteriyofajlar keşfedilmiştir (Summers ve William, 1999). Bunları yeni birçok virüsün keşfedilmesi takip etmiştir.

İnfluenza virüsleri 1918-1919 yıllarında tüm Dünyada etkili olan, bir yıldan daha kısa sürede 40-50 milyon insanın yaşamını yitirmesine yol açan virüsler olmakla birlikte, bu virüsler ancak 1930'lu yılların başında tanımlanabilmiştir (Oldstone, 2009; Shors, 2008). Bir bakteri olan ve gribe yakalan kişilerde sekonder enfeksiyona neden olan *Haemophilus influenzae*, Alman bakteriyolog Richard Pfeiffer tarafından yanlışlıkla grip etkeni olarak tanımlanmış ve influenza olarak isimlendirilmiştir (Oldstone, 2009). 1933 yılının ilkbaharında İngiltere tıp araştırma konseyi (Medical Research Council-MRC) ekibinden araştırmacılar bir hasta boğaz ve burun akıntılarını filtre ettikten sonra gelinciklere uygulamışlar, yaklaşık 48 saat sonra influenza benzeri belirtiler gözlemlemişlerdir. Bu çalışma 1933 yılında Wilson Smith, Christopher H. Andrewesand ve Patrick Laidlaw tarafından Lancet'te yayımlanan, grip etkeni olarak influenza virüslerinin tanımlandığı çalışmaya temel oluşturmuştur (Smith W, 1933) .

4.1 İnfluenza Virüsleri

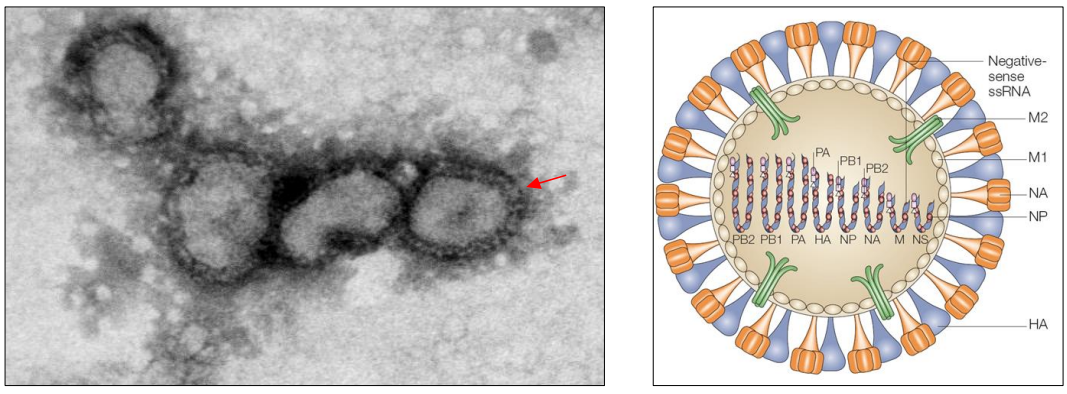
İnfluenza virüslerinin de yer aldığı *Orthomyxoviridae* ailesinde beş farklı virüs cinsi yer alır. Bunlar *İnfluenza* A, *İnfluenza* B, *İnfluenza* C, *Thogotovirus* ve *Isavirus'lerdir*. Bunlara son olarak *İnfluenza* D virüsleri de eklenmiştir (Flynn ve diğerleri, 2018). *Orthomyxovirus* Latincede *orthos* (düz veya doğru) ve *myxa* (mukus) kelimelerinden türetilmiştir. Bu virüs ailesi, negatif polarite gösteren (mRNA

moleküllerine komplementer) tek iplikli doğrusal RNA moleküllerinden oluşan genom yapısına sahiptirler. İnfluenza A ve B virüslerine ait genomlar sekiz adet RNA molekülünden oluşurken, İnfluenza C ve İnfluenza D virüslerinde genom yedi adet RNA molekülünden oluşur. *Thogotovirus* ailesi içerisinde yer alan *Thogoto virüs* altı, *Dhori virüs* ise muhtemelen yedi adet RNA molekülünden oluşan genoma sahiptir. Bu virüs ailelerinde genellikle her bir RNA segmenti üzerinden bir protein molekülü sentez edilir. Dolayısıyla, İnfluenza A ve B virüsleri birbirinden bağımsız HA ve NA glikoproteinlerine sahipken, İnfluenza C virüslerinde NA proteini bulunmaz. Bu virüslerde bunun yerine hemaglütinin-esteraz füzyon (HEF) proteini bulunmaktadır (Wang ve Veit, 2016). Thogoto virüsü ve Dhori virüslerinde ise bilinen İnfluenza virüs proteinleri ile ilişkisi olmayan tek bir glikoprotein (GP) belirlenmiştir (Morse ve diğerleri, 1992) . İnfluenza A virüsleri HA ve NA glikoprotein yapılarına göre çok sayıda alt tiplere ayrılırlar. Günümüze kadar İnfluenza B ve C virüsleri için alt tip tipler tanımlanmamıştır.

4.1.1 İnfluenza Virüslerinin Morfolojik Özellikleri

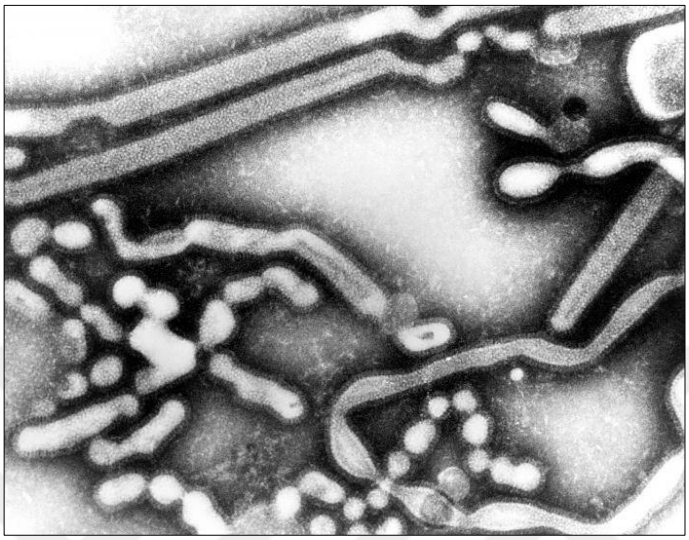
Tüm influenza virüsleri konak hücreden aldıkları bir membran ile sınırlanmış, yani membranlı virüslerdir. İnfluenza A ve B virüslerinde membran üzerinde çıkıntı yapan HA ve NA olmak üzere ayırt edici iki farklı integral membran proteini göze çarpar (Şekil 1). Buna karşın İnfluenza C virüs membranında HEF olarak adlandırılan tek tip membran glikoproteini bulunmaktadır.

A **B**



Şekil 1. İnfluenza A/PR8/8/34 virüslerinin elektron mikroskobu ile çekilen elektronmikrografı ve İnfluenza A virüsünün çizimsel görünümü. **A**. İnfluenza A/PR8/8/34 virüslerinin elektron mikroskobu ile çekilen elektronmikrografı. Ok işareti virüs membranında yer alan HA ve NA proteinlerini işaret etmektedir (K.Turan-yayınlanmamış veri). **B**. İnfluenza A virüsünün çizimsel görünümü (Horimoto ve Kawaoka, 2005).

İnfluenza virüsleri şekil olarak küresel, pleomorfik, flamentöz morfolojilerde ya da karışık formlarda bulunabilmektedir (Hoyle, 1968). Klinik izolatların sınırlı sayıda embriyonlu yumurta ya da hücre kültürlerinde pasajları yapılan virüsler küresel morfolojiden çok flamentöz morfoloji gösterirler (Şekil 2).



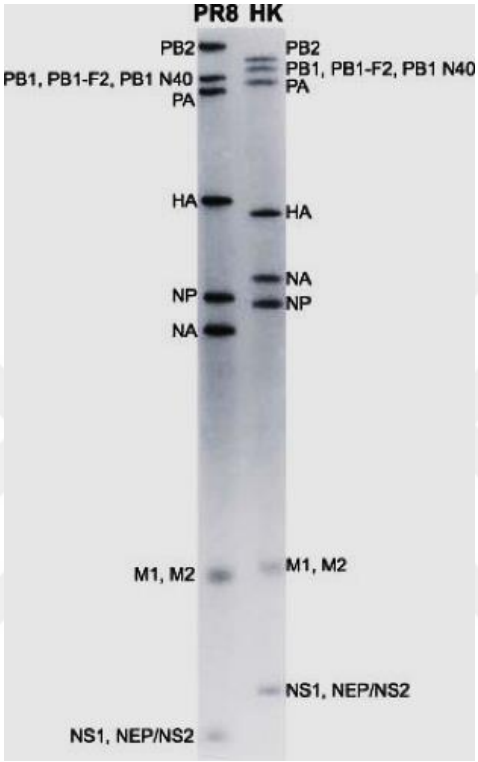
Şekil 2. İnfluenza A virüslerinin farklı morfolojik görünümleri. (https://pixnio.com/science/microscopy-images/influenza/transmission-electron-micrograph-tem-depicts-numbers-of-influenza / erişim tarihi 30.12.17)

Buna karşın uzun yıllar pasajları yapılan laboratuvar ırkları ortalama 80-120 nm çaplarında neredeyse tümü küresel morfolojiye sahiptirler (Şekil 1A). Farklı şekillerine rağmen, filamentöz virüsler de serolojik, hemaglütinasyon ve enzimatik özellikleri bakımından küresel morfolojide virüsleri ile benzerdirler. İnfluenza virüslerinin morfolojisini belirleyen temel faktörün M geni olduğu bilinmektedir (Bourmakina ve Garcia-Sastre, 2003; Roberts ve Compans, 1998). Bununla birlikte HA ve NP genlerinin de virüsün morfolojisinde etkili olduğu ileri sürülmektedir (Jin ve diğerleri, 1997; Mitnaul ve diğerleri, 1996; Smirnov ve diğerleri, 1991).

4.1.2 İnfluenza Virüslerinin Genom Yapıları ve Viral Proteinler

İnfluenza virüslerinin genomları yukarıda da değinildiği gibi negatif polarite gösteren tek iplikli RNA moleküllerinden oluşur. İnfluenza A ve B virüsleri sekiz adet RNA segmenti, influenza C virüsleri ise yedi adet RNA segmenti taşırlar. Genom boyutları farklı influenza virüs aileleri arasında büyük çeşitlilik göstermektedir. Bu çeşitlilik aynı virüs ırklarının alt tipleri arasında da mevcuttur. Şekil 3'te İnfluenza A virüsü alt tiplerinden influenza A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) ve A/Hong Kong/8/68

(H3N2) virüslerine ait sekiz parçadan oluşan RNA genomlarının PAGE sonuçları bu durumu belirgin bir şekilde ortaya koymaktadır. Ortalama genom boyutları olarak ele alındığında en uzun genom yapısı influenza B virüslerinde (ortalama 14.600 baz) görülür. Bunu sırasıyla İnfluenza A (ortalama 13.600 baz) ve İnfluenza C virüsü genomlari (ortalama 12.900 baz) izler.

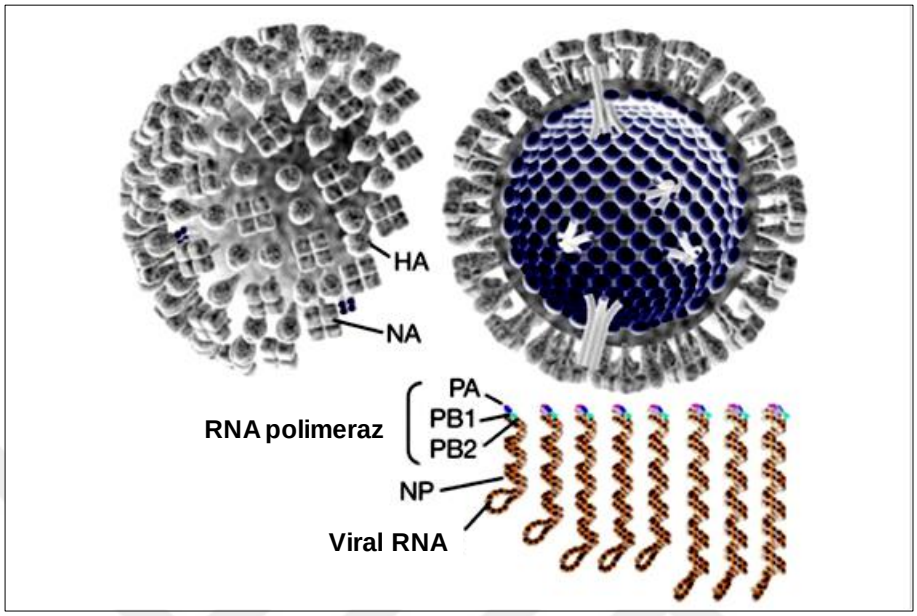


Şekil 3. Poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrıştırılmış, iki farklı tipte influenza A virüsü genomuna ait RNA segmentleri (İnfluenza A/Puerto Rico/8/34/H1N1 ve A/Hong Kong/8/68/H3N2) (Palese, 1977).

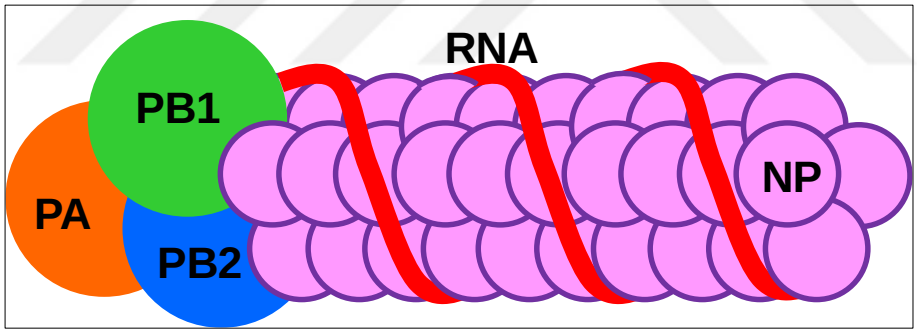
Tüm İnfluenza A virüsü tiplerinde her bir RNA segmentinde, 3'-uçtaki 12 nükleotid ve 5'-uçtaki 13 nükleotidlik bölge büyük oranda korunmuştur ve bu diziler promotör olarak işlev görürler (Fodor ve diğerleri, 1994; Fodor ve diğerleri, 1995; Li ve Palese, 1992; Neumann ve Hobom, 1995; Parvin ve diğerleri, 1989; Piccone ve diğerleri, 1993; Seong ve Brownlee, 1992a; Seong ve Brownlee, 1992b; Yamanaka ve diğerleri, 1991). Benzer bir durum İnfluenza B ve C virüsleri için de geçerlidir. Kısmen komplementerlik özelliği gösteren bu dizilerin saç tokası şekli oluşturduğu düşünülmektedir (Hsu ve diğerleri, 1987). İnfluenza virüsü RNA molekülleri, viral nükleer protein ile kompleks halinde taşınmaktadır. Viral ribonükleoprotein partikülleri

(vRNP) olarak adlandırılan bu yapılar üzerinde, RNA moleküllerinin transkripsiyonu ve replikasyonunu kataliz eden RNA polimeraz enzimleri de taşınmaktadır (Şekil 4).

A

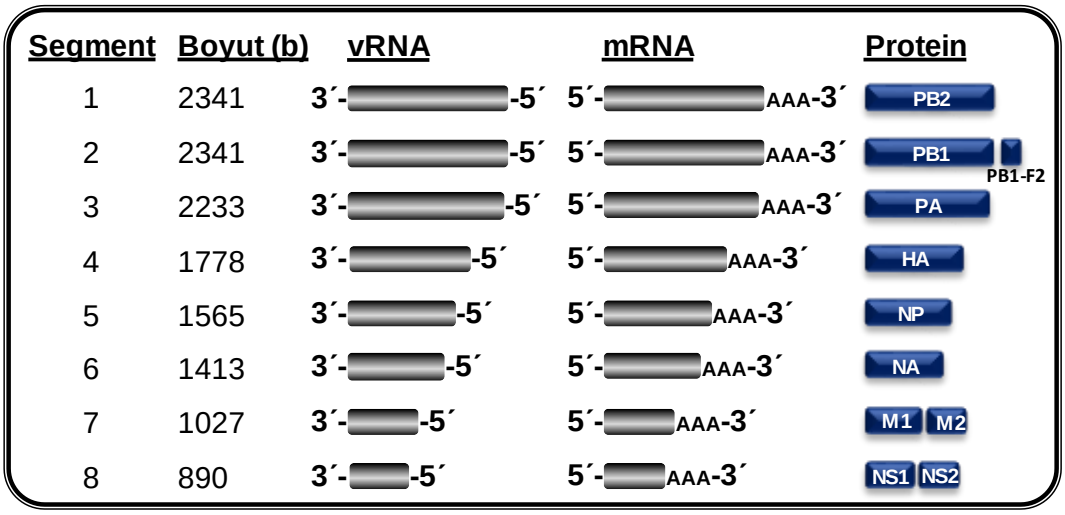


B



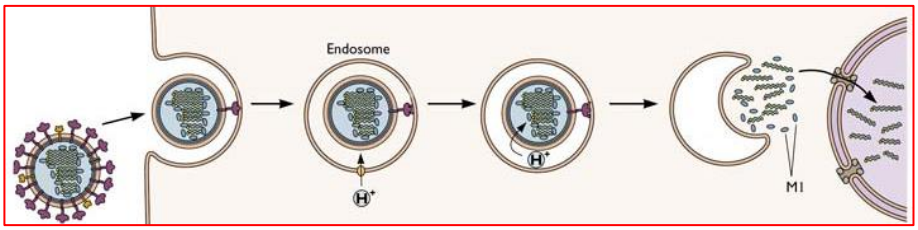
Şekil 4. İnfluenza virüslerinde membrana bağlı yüzey antijen proteinleri ve viral ribonükleoprotein partikülleri. **A**. (vRNP) (Neumann ve diğerleri, 2009). **B**. Viral RNA molekülü, NA proteinleri ve viral RNA polimeraz enziminden oluşan ribonükleoprotein partikülleri (vRNP).

En büyük üç viral RNA segmenti tarafından kodlanan PB1, PB2 ve PA proteinleri viral RNA polimeraz enzimi olarak işlev görür (Şekil 5). Viral RNA polimeraz hem viral RNA'nın replikasyonundan hem de viral mRNA'ların sentezinden sorumludur. Bu enzimi oluşturan proteinler vRNP'lere bağlı olarak taşınır (Honda ve diğerleri, 1990; Honda ve diğerleri, 1988) (Şekil 4B).



Şekil 5. İnfluenza A virüsü RNA segmentleri ve bu segmentler üzerinden sentez edilen viral proteinler (Pirinçal, 2014).

HA ve NA proteinleri virüsün en önemli yüzey glikoproteinleridir. HA proteini enfeksiyon sırasında virüsün konak hücreye bağlanmasından ve vRNP'lerin hücre sitoplazmasında serbest kalmasından sorumludur (Leser ve Lamb, 2005). Bugüne kadar İnfluenza A virüsü için 18 ayrı HA tipi (H1-H18) tanımlanmıştır (Kawaoka ve Neumann, 2012). İnsanlarda enfeksiyon yapan influenza A virüsleri H1, H2 ve H3 tipi HA proteini taşımaktadır (Cui ve diğerleri, 2011). Virüs membranında yer alan NA proteini, hücre yüzeyindeki sialik asit bakiyelerini kesen bir enzimdir, viral infeksiyon sırasında hücre membranında oluşmuş olan (kurulma) virüs partiküllerinin tomurcuklanma ile serbest kalmasını sağlar (Markushin ve diğerleri, 1988). NA proteini, HA proteini ile birlikte virüsün alt tipini belirler (Kawaoka ve Neumann, 2012). Bugüne kadar influenza A virüslerinde serolojik olarak ayırt edilebilen 11 farklı NA tipi (N1-N11) saptanmıştır (Kawaoka ve Neumann, 2012). Virüsün yedinci RNA segmenti üzerinden alternatif işlenme sonucunda M1 ve M2 proteinleri sentez edilir (Markushin ve diğerleri, 1988). M1 proteini virüste en fazla miktarda bulunan ve viral membranın hemen altında yer alan bir proteindir. M1 proteininin viral genlerin transkripsiyonunda regülasyonla ilgili bir işleve sahip olduğu düşünülmektedir (Bui ve diğerleri, 2000). İyon kanalı proteini olarak işlev gören M2 ise, endozom ve virüs membranlarının pH değişimine bağlı olarak füzyona uğraması ve bunun sonucunda vRNP'lerin sitoplazmada serbest kalmasını sağlar (Grigoryan ve diğerleri, 2011) (Şekil 6). NS1 ve NS2 proteinleri virüs genomunun en küçük parçası olan sekizinci segment üzerinden sentez edilir (Lamb ve Choppin, 1979).

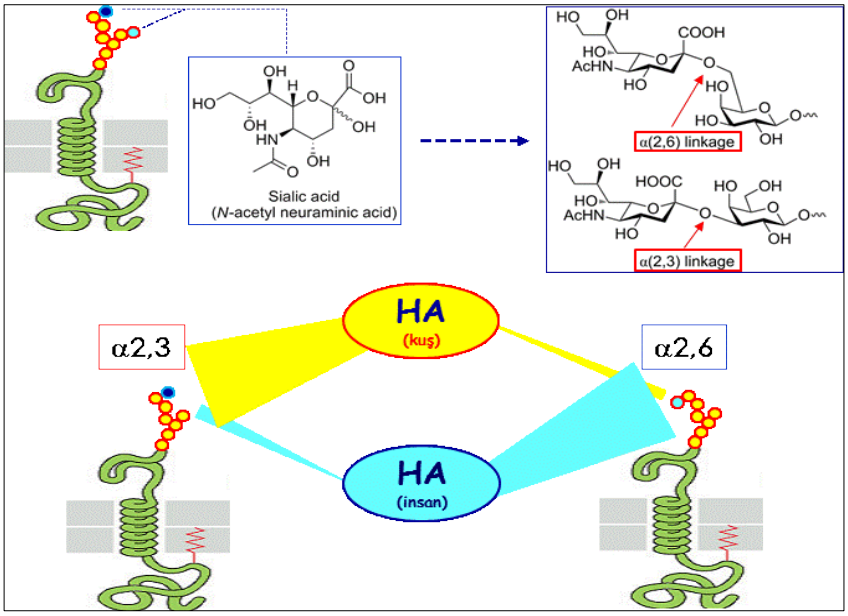


Şekil 6. İnfluenza A virüslerinin konak hücreye tutunması (adsorpsiyon), girişi (penetrasyon) ve vRNP'lerin serbestleşmesi.

İnfluenza A virüsü NS1 proteini, virüs parikülünde varlığı saptanamamış, yapısal olmayan (*İng. Non-Structural;NS*) bir proteindir (Basu ve diğerleri, 2009). Virüs partikülünde az miktarda bulunan NS2 proteini ise M1 proteini ile birlikte vRNP'lerin transportunda işlev görür. Bu nedenle NEP (*İng. nuclear export protein*) olarak da adlandırılır (Kawaoka ve Neumann, 2012; Neumann ve diğerleri, 2000).

Hemaglütinin Proteini (HA)

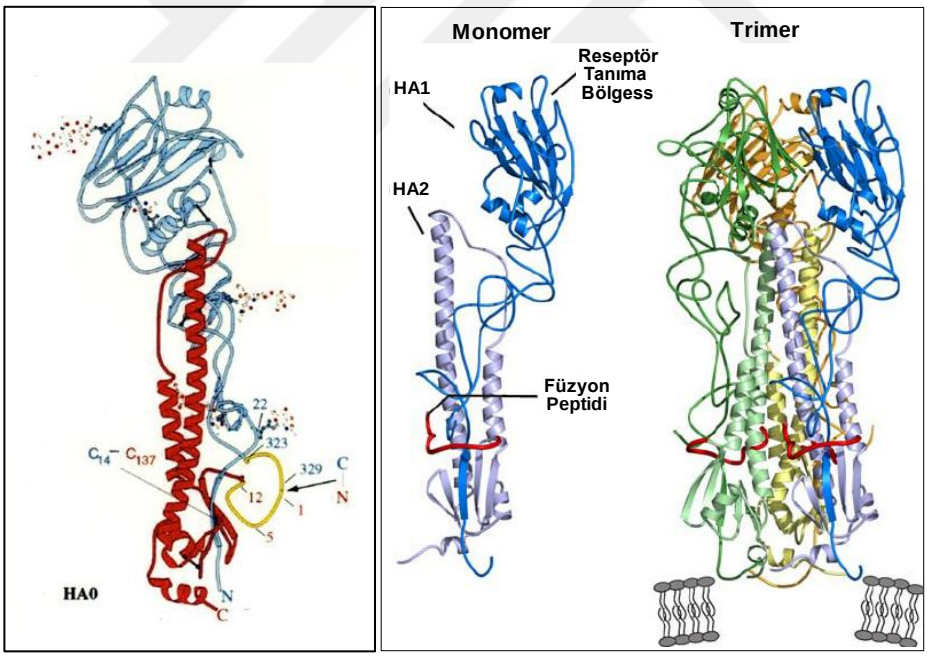
İnfluenza A virüslerinde zarf glikoproteinlerinden biri olan hemaglütinin (HA) proteini dördüncü viral RNA segmenti üzerinden sentez edilir. HA proteini konak hücre yüzeyindeki sialik asit reseptörlerine tutunmayı sağlar ve virüs ile konak hücre membranlarının füzyonundan da sorumludur (Skehel ve Wiley, 2000; Takahashi ve diğerleri, 2009).



Şekil 7. İnfluenza A virüsü HA proteinlerinin konak hücrelerde tutundukları reseptörlere bağlı sialik asit bakiyeleri ve virüslerin tercih ettikleri sialik asit bağlanma formları.

İnsan influenza virüsleri, α-2,6 glikozit bağları ile bağlı sialik asit bakiyelerine bağlanırken; kanatlı orjinli influenza ırkları galaktoza α-2,3 glikozit bağı ile bağlı olan sialik asit bakiyelerine bağlanır (Şekil 7). Domuzlar, epitel hücrelerinin hem α-2,6 hem de α-2,3 glikozit bağları ile bağlı sialik asit bakiyeleri taşıması nedeniyle aynı anda farklı virüs ırkları ile infekte olabilme özelliğine sahiptir. Bu özellik rekombinasyona uğramış yeni virüs tiplerinin ortaya çıkmasında domuzları uygun bir konak haline getirmektedir (Gambaryan ve diğerleri, 2005).

Virüs ile infekte hücrelerde HA başlangıçta tek bir polipeptit molekülü olarak (HA0) sentezlenir. Bu protein viral membran üzerinde homotrimerik formda bulunur. Asidik ortamda (pH: 5-6) HA0 proteini tripsin ya da tripsin benzeri hücresel bir proteaz enzim tarafından kesilerek HA1 ve HA2 olmak üzere iki peptide ayrılır (White ve Wilson, 1987). İki peptide kesilmiş HA proteinleri viral membran üzerinde trimerik formda yer alır (Şekil 8). HA0 proteininin proteolitik kesimi influenza virüsü replikasyonu için hayati önem taşımaktadır.

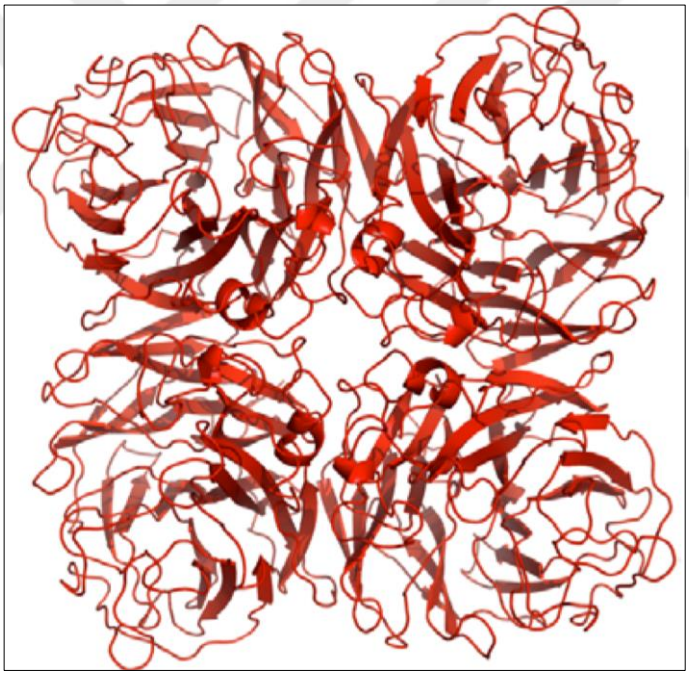


Şekil 8. İnfluenza A virüsü replikasyonu sırasında tek bir polipeptid halinde sentez edilen HA proteini (HA0) (Gowthaman ve diğerleri, 2016), konak proteaz enzimleri ile kesilerek HA1 ve HA2 olmak üzere iki peptide ayrılmış HA protein ve viral membrana bağlı trimerik formda HA proteinleri.
http://slideplayer.com/slide/686233/2/images/9/Activation+of+Fusion+Activity+of+Flu+HA0+by+Cleavage.jpg –erişim tarihi: 01.01.2018.

Hücre yüzeyindeki sialik asit reseptörlerine bağlanan virüsler endositoz ile hücre içerisine alınır. Endozom içerisinde yer alan virüslerin RNA moleküllerinin (vRNP'ler) serbestleşmesi için viral membran ile endozom membranının füzyona uğraması gerekmektedir. Bu da ancak HA proteinlerinin proteolitik kesim sonucunda aktive olması ile mümkündür. Endozom içinde asidik ortam, proteolitik olarak kesilmiş olan HA proteininde konformasyonel bir değişime sebep olur ve proteinde yer alan füzyon için önemli olan hidrofobik bölgenin açığa çıkmasını neden olur (Steinhauer, 1999). Bu da viral ve endozomal membranların kaynaşması ile vRNP'lerin sitoplazmada serbest kalmasını sağlar.

Nöraminidaz Proteini (NA)

Nöraminidaz (NA), virüsün altıncı RNA segmenti üzerinden sentez edilir. Viral membranda homotetrametrik yapıda bulunur (Şekil 9).



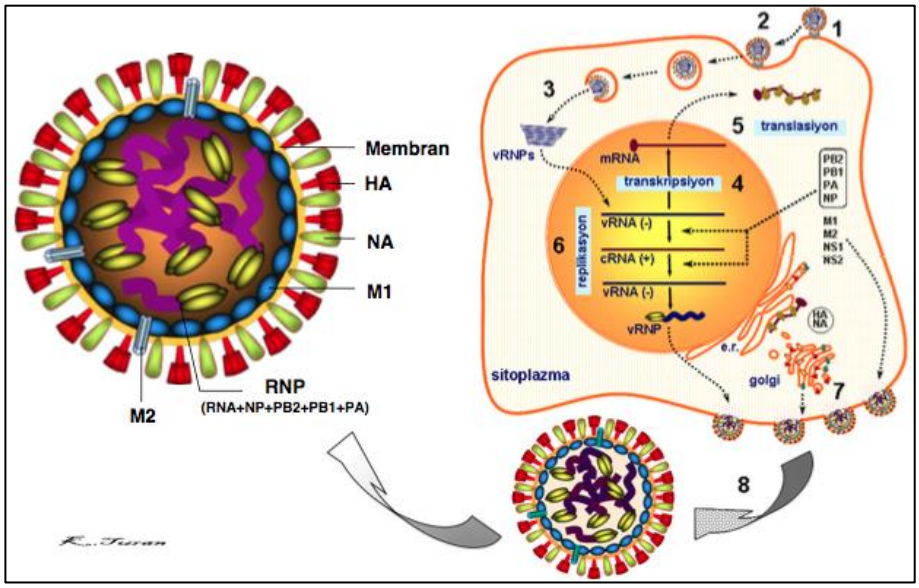
Şekil 9. İnfluenza A/Tanzania/205/2010 (H3N2) virüsüne ait tetramerik yapıda NA proteininin üç boyutlu globüler yapısı (Zhu ve diğerleri, 2012).

NA enzim aktivitesine sahip bir proteindir (Gottschalk, 1957), sialik asit içeren glikoproteinlerden terminal sialik asit ve sialik asite komşu olan bir şeker (D- galaktoz veya D-galaktozamin) arasındaki α-glikozid bağının kesilmesini katalizler (Palese ve diğerleri, 1974). Bu şekilde sialik asit bakiyelerinin kesilmesi, HA proteininin sialik asite bağlanmasının önüne geçerek virüsün infekte hücreden serbest hale geçişini

kolaylaştırır. Nöraminidaz ayrıca solunum yollarındaki müsin tabakasını, nöraminik asit bakiyelerini de keserek uzaklaştırır. Böylece virüslerin konak hücrelere bağlanmasına yardımcı olur (Matrosovich, 2004). Yine bu özelliğiyle; serbestleşen virüslerin epiteli kaplayan mukopolisakkaritlerin içinden geçişini sağlayarak virionların hücre yüzeyinde kümeleşmesinin önüne geçmektedir.

4.1.3 İnfluenza Virüsünün Replikasyonu

İnfluenza virüslerinde tutunma, viral HA molekülünün globüler yapıda olan eksternal uzantısındaki reseptör bağlanma bölgesi ile konak hücre üzerindeki sialik aside (N-acetyl neuraminic acid) bağlanmasıyla gerçekleşir (Bouvier ve Palese, 2008; Carroll K.C., 2013). Virüsün HA proteini aracılığıyla konak hücre yüzeyindeki sialik aside tutunmasının ardından reseptöre bağlı endositoz yoluyla hücre içine alınır (Us, 2010). Endozom içeriğinin asiditesi virüs kılıfı için iki açıdan önemlidir. Birincisi; düşük pH, HA molekülünün yapısında değişikliğe sebep olur ve HA2 bölgesindeki füzyon peptidinin açığa çıkmasını sağlar. Böylece aktifleşen füzyon peptidi endozomal membran ile viral zarfın füzyonunu sağlar. İkincisi; virionun iç kısmındaki asidite artışı protein-protein (NP ve M1) iletişimini bozar ve vRNP'lerin matriks proteininden serbest kalmasına neden olur. Böylece vRNP'ler füzyon sonucu açılan bölgeden sitoplazmaya geçer (Bouvier ve Palese, 2008) (Şekil 10).



Şekil 10. İnfluenza A virüsü yapısı ve replikasyonu. 1.Tutunma (adsorpsiyon); 2. Giriş (penetrasyon); 3. Kot atma; 4. Transkripsiyon; 5. Translasyon; 6. Replikasyon; 7. Kurulma; 8. Serbestleşme (Turan, 2010).

Viral RNA replikasyonu hücre nükleusunda gerçekleşir. Viriondan serbest kalan viral RNP'lerin hücre çekirdeğine taşınması, sahip oldukları özel nüklear transport sinyalleri sayesinde olur. Viral RNP'ler üzerinde taşınan RNA polimeraz enzimi, negatif polariteli vRNA'yı kalıp olarak kullanarak iki tür RNA sentezler. Birincisi; viral proteinlerin sentezinde kullanılacak olan mRNA, ikincisi; genomik viral RNA'ların sentezinde kalıp olarak kullanılacak olan komplementer RNA (cRNA) molekülleridir (Bouvier ve Palese, 2008). Hücre çekirdeğine ulaşan viral RNA segmentlerinin transkripsiyonu, RNA moleküllerini kalıp olarak kullanan RNA polimeraz enzimi (RdRP) tarafından gerçekleştirilir. Bu enzim üç farklı polipeptidin (PB2, PB1ve PA) bir araya gelmesi ile oluşmuştur. İnfluenza virüsü RNA polimeraz enzimi bu işlevini gerçekleştirebilmek için hücresel RNA polimeraz II enzimine gereksinim duyar. Viral RNA polimeraz enzimi konak RNA polimeraz tarafından sentez edilen mRNA'ların 5′ ucundaki şapka (cap) yapısı ile birlikte 10-13 nukleotid uzunluğunda bir bölgeyi primer olarak kullanır. Bu nedenle İnfluenza virüsleri, viral mRNA sentez edebilmek için çekirdeğe bağımlılık göstermektedir (Krug ve Alonso-Caplen, 1989; Plotch ve diğerleri, 1981). İnfluenza virüslerinde transkripsiyon, PB2 alt ünitesinin, konak mRNA'sındaki "cap" yapısını tanımasıyla başlar. Bunu takiben PB1 alt ünitesi de endonükleaz aktivitesi ile konak mRNA'sından "cap" bölgesini kesip alır (cap snatching). Böylelikle viral mRNA transkripsiyonu başlatılmış olur (Çıblak Akçay, 2011). Negatif polariteli vRNA'nın 5′-ucundaki kodlanmayan bölgesinde 5-7 adet urasil molekülü şeklinde PolyA sinyali bulunur. Viral RNA polimeraz bunu pozitif polariteli mRNA'ya transkribe ederken urasil moleküllerini adenin molekülleri ile eşler ve polyA kuyruğu şekillenmiş olur. Böylece viral mRNA'nın poly A kuyruğu ve "cap" ekleme işlemi tamamlanmış olur, viral mRNA çekirdekten hücre sitoplazmaya taşınır ve ribozomlarda translasyonu gerçekleştirilir (Bouvier ve Palese, 2008; Us, 2010). Virüs membranında yer alan, HA, NA ve M2 proteinlerinin sentezi için kalıp görevi gören mRNA'lar endoplazmik retikuluma bağlı ribozomlar tarafından transkripisyona tabi tutulur, viral proteinler endoplazmik retikulumdan sonra post-translasyonal modifikasyon için golgi kompleksine taşınırlar. Bu üç membran proteini modifikasyon sonrası özel sinyaller aracılığı ile kurulum için hücre memranına yönelirler (43). Diğer taraftan PA, PB1, PB2 ve NP proteinleri çekirdeğe geri dönerek cRNA'lardan genomik vRNA ipliklerinin sentezini gerçekleştirir. Yeni sentezlenen negatif ipliklerin çoğu vRNA'yı oluştururken, bazıları da tekrar mRNA sentezine katılır (Çıblak, 2011).

Genomik vRNA sentezi viral mRNA transkripsiyonundan farklı olarak poly A ya da şapka yapısı ekleme işlemi gerektirmez, tüm genom replike edilir. Genomik vRNA'ların çekirdekten taşınması NEP (İng. *nuclear export protein*) olarak da isimlendirilen NS2 ve M1 proteinleri tarafından düzenlenir. M1 hem viral RNA'lar hem de NP proteinleri ile etkileşim halindedir. Bu nedenle M1, bu iki yapıyı vRNP kompleksi olarak bir araya getirir. M1 aynı zamanda NEP ile de etkileşim halindedir ve bu etkileşim M1-RNP kompleksinin nükleoporin proteinleri aracılığı ile sitoplazmaya geçişini sağlar (Bouvier ve Palese, 2008). M1 proteini sitoplazmada sentezlendikten sonra çekirdeğe geri döner ve vRNP-NEP kompleksini hücre zarına yönlendirir ve HA, NA ve M2 proteinleriyle bir araya getirmek suretiyle virüsün kurulması işlemini başlatır (Palese P., 2007). Önceleri vRNA segmentlerinin virion içerisinde rastgele bir şekilde paketlendiği düşünülüyordu, fakat daha sonra segmentlerin virion içine seçilerek yerleştirildiği ve olayda vRNA'nın kodlama yapmayan 3′ ve 5′ bölgelerindeki sis-etkili (cis-acting) sinyallerinin rol oynadığı, böylece oluşan yeni virionların tüm segmentleri içerenlerinin enfektif olabildiği fikri ileri sürülmüştür (Bancroft C.T., 2002; Fujii ve diğerleri, 2003; Us, 2010). Konak hücre yüzeyinde virionun tomurcuk şeklini alması, M1 matriks proteininin konak hücre sitoplazmik membranının altında birikmesiyle başlar. Tomurcuklanma işlevi tamamlandığında viral membran üzerindeki HA proteinleri virionların hücre yüzeyindeki sialik asitlere bağlanmasına sebep olmaktadır (Akçay, 2011). Bu aşamada NA enzimi, hücre membranındaki sialik asit bakiyelerini kesmekte ve HA'nın sialik aside yapışmasını önleyerek virüslerin serbest kalmalarını kolaylaştırmaktadır. NA enziminin işlevi virüsün hücreden serbestleşmesinden sonra da devam etmektedir. Virüs membranında yer alan bu enzim solunum yolu mukozasında bulunan sialik asit bakiyelerini keserek virüsün epiteli kaplayan mukopolisakkaridlerin içinden geçişini kolaylaştırmaktadır (Çalışkan, 2011).

4.1.4 İnfluenza Virüslerinde Antijenik Değişmeler

İnfluenza A virüsleri iki farklı mekanizma ile antijenik özelliklerini değiştirmektedir. Bunlardan birincisi, viral RNA moleküllerinin replikasyonu sırasında meydana gelen nokta mutasyonlarıdır. İnfluenza A virüsleri genom olarak negatif iplikli RNA moleküllerine sahip oldukları için, RNA moleküllerini kalıp olarak kullanarak replikasyonu ve transkripsiyonu gerçekleştirecek RNA'ya bağımlı RNA polimeraz enzimi (RdRP) taşımaktadır. İnfluenza virüsü RNA bağımlı-RNA polimeraz

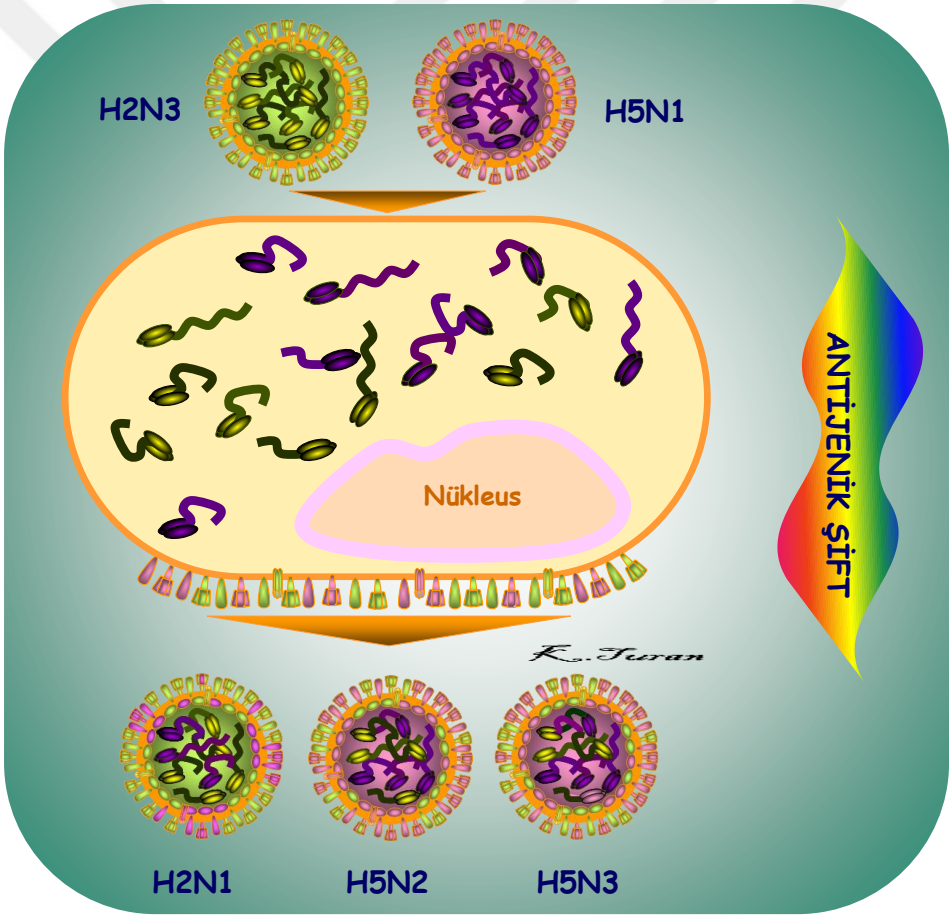
enzimi diğer birçok viral RNA polimerazlarda olduğu gibi hata yapma frekansı yüksektir (Couch, 1996). Buna karşın bu enzimlerin replikasyonu sırasında oluşan hatalarını düzeltme yetenekleri yoktur. Dolayısıyla virüsün her replikasyonunda, virüs genomunu oluşturan RNA segmentlerinde nokta mutasyonları meydana gelir. Viral RNA segmentlerinde oluşan nokta mutasyonlarının birikimi sonucunda, özellikle virüsün yüzey antijenlerinin (HA ve NA) değişikliğe uğraması antijenik sapma (antigenic drift) olarak adlandırılır (Bouvier ve Palese, 2008). Bu değişmeler zamanla birikir ve konak bağışıklık sisteminin virüsü tanımasını güçleştirir (Şekil 11A). Antijenik sapmalar epidemilere yol açar ve her üç tip influenza virüsü (tip A, B, C) için de geçerlidir.

İnfluenza A virüslerinde antijenik yapı değişimlerine yol açan ikinci önemli olay ise, virüsün parçalı genom yapılarından kaynaklanan yeniden düzenlenme (*İng. reassortment*) olaylarıdır. Antijenik kayma (*shift*) olarak tanımlanan bu olaylar virüs genom yapısında önemli değişmelere yol açar. Daha önce de değinildiği gibi influenza virüsleri tek zincirli ve çok parçalı RNA moleküllerinden oluşan bir genoma sahiptirler (Bouvier ve Palese, 2008). Bir konak hücrenin aynı anda iki farklı influenza A virüsü alt tipi ile infekte olması sonucunda hücrelerde her iki virüse ait RNA segmentlerinin çoğalmasına olanak verir. Bu tip enfeksiyonlarda virüs kurulumu sırasında RNA segmentlerin gelişi güzel bir araya gelerek yeni özelliklerde virüs partiküllerinin oluşması kaçınılmazdır (Şekil 11B). Bu şekilde farklı RNA segmentlerinin yeni kombinasyonlar oluşturması, genom tarafından kodlanan viral antijenlerin konak savunma mekanizması tarafından tanınmayacak düzeyde değişmesine neden olacaktır. Bu yeni virüs tiplerinin tüm Dünya'yı etkileyen pandemilere yol açma olasılığı yüksek olacaktır. Büyük antijenik değişmeler (antijenik shift) sadece tip A virüslerinde gözlenmiştir (Nakajima, 2003).

A



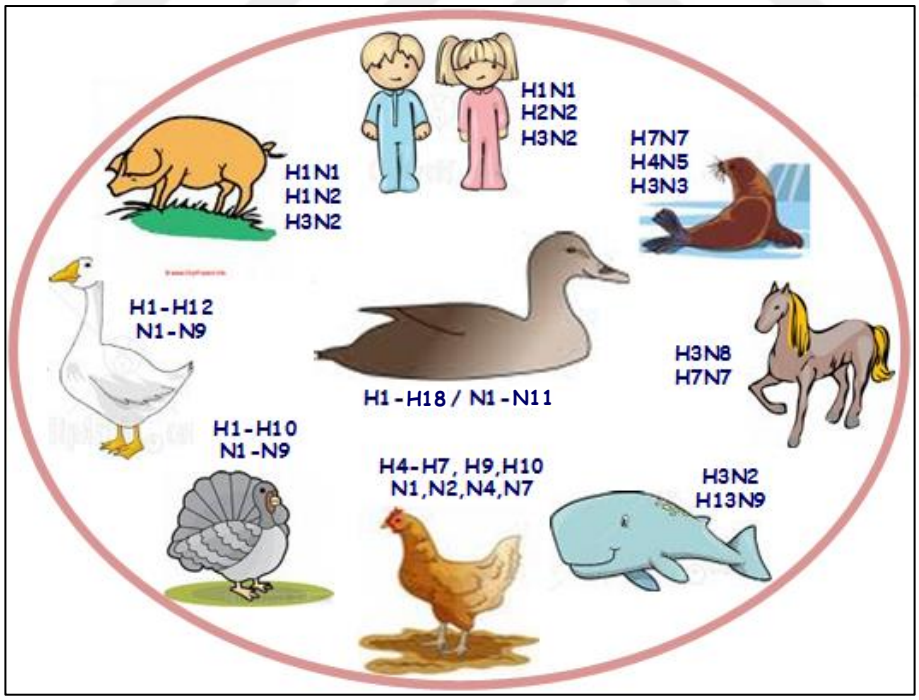
B



Şekil 11. İnfluenza A virüslerinde görülen antijenik yapı değişmeleri. **A**. Antijenik sapma (antijenik drift), **B.** Antijenik kayma (antijenik shift) (Turan, 2010).

4.1.5 İnfluenza Virüslerinin Epidemiyolojisi

Dünya genelinde her yıl 3 milyondan fazla kişi solunum yolu enfeksiyonlarından dolayı hayatını kaybetmektedir. Bu sayı tüm ölümlerin yaklaşık % 6.4'ünü oluşturmaktadır (Schappert ve Nelson, 1999). Solunum yolu infeksiyonlarına yol açan etkenlerin başında ise influenza virüsleri gelmektedir. Bu nedenle influenza virüslerinin neden olduğu salgınları insan sağlığı açısından çok büyük önem taşımaktadır. İnfluenza A virüslerinin antijenik özellikleri, İnfluenza B ve C tipi virüslere göre çok daha fazla değişikliğe uğramaktadır (Şanlı, 2010). Bu da insanlarda daha sık grip salgınları anlamına gelmektedir. Özellikle, büyük antijenik değişikliklerde grip salgınları pandemilere dönüşebilmektedir. İnfluenza virüsleri, genetik değişime uğramaları, başta kuşlar olmak üzere birçok memeli organizmayı konak olarak kullanmaları (Şekil 12), yaş, cinsiyet ve ırk fark etmeksizin her bireyi enfekte edebilme yetenekleri, epidemiler ve kimi zaman yüksek mortalite ile seyreden pandemiler oluşturmaları nedeniyle geçmişte olduğu gibi günümüzde de güncelliğini korumaktadır (Hsieh ve diğerleri, 2006).



Şekil 12. İnfluenza A virüsü tipleri ve bu virüslerin konak olarak kullandıkları organizmalar.

Tarihsel süreç içerisinde ilk grip salgını, M.Ö. 412 yılında Hipokrat ve Livy tarafından bildirilmiştir (Kuszewski ve Brydak, 2000). İlk influenza pandemisine ait

kayıtlar 1580 yılına aittir. İnfluenza A virüsleri 20. yüzyılda üç büyük pandemiye neden olmuştur (Hsieh ve diğerleri, 2006). Bunlardan, 1918-1919 yıllarındaki pandemi en büyük olanıdır ve farklı kaynaklara göre 20-50 milyon kişinin ölümüne yol açtığı belirtilmektedir (Taubenberger, 2005). Bu pandemide Dünya nüfusunun % 20 - 40'ının etkilendiği düşünülmektedir. İspanyol gribi olarak da bilinen bu salgında etkili olan virüsün İnfluenza A/ H1N1 olduğu belirlenmiştir (Shortridge, 1999). 1957-1958 yıllarında Asya gribi (İnfluenza A/H2N2) ve 1968-1969 yıllarında Hong Kong gribi (İnfluenza A/H3N2) 20. yüzyılda görülen diğer pandemileridir. Ayrıca 1977-1978 yıllarında daha önce ortaya çıkan İnfluenza A/H1N1 virüs tipinin Rus gribi olarak da adlandırılan yeni bir salgına yol açmıştır bilinmektedir. Bu yüzyılın başında, 2009 yılı şubat-mart aylarında Meksika'da ortaya çıkan, Nisan ayında ABD'de tanımlanan ve hızla dünyaya yayılan domuz kaynaklı İnfluenza A (H1N1) virüsü yeni bir pandemiye yol açmıştır (Morens ve diğerleri, 2010).

Pandeminin karakteristik özellikleri; çok hızlı yayılım göstermesi, aynı zamanlarda farklı bölgelerde salgınlar gerçekleştirmesi, yaz ayları dahil olmak üzere olağan grip mevsimi dışında da görülmesi, tüm yaş gruplarında yüksek atak hızları ile seyretmesi, özellikle sağlıklı genç erişkinlerde yüksek mortalite oranları ve hastalığın salgından hemen önce ve sonra çoklu olgu dalgaları şeklinde görülmesidir (Balkan, 2013). Ortaya çıkan yeni bir İnfluenza A tipi virüsün, bu virüse karşı bağışıklık geliştirmemiş olan çok sayıdaki insan topluluğunu etkilemesi "İnfluenza pandemisi" olarak tanımlanmaktadır. Pandemiler, dünya genelinde birçok noktada aynı anda grip salgınlarının görülmesine ve çok sayıda insanda hastalıklara, aynı zamanda ölümlere neden olmaktadır. Ulaşımın ve iletişimin çok kolay olduğu günümüzde yeni bir İnfluenza virüsünün yol açtığı salgın çok hızlı bir şekilde tüm Dünya'ya yayılabilmektedir.

Nisan 2009 tarihinde, Amerika Birleşik Devletleri, Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri (*İng. Centers for Disease Control and Prevention-CDC*) iki vakadan alınmış örneklerde yeni bir İnfluenza A/H1N1 virüs tipi saptamış ve yeni belirlenen bu virüsün Meksika'da Mart 2009 tarihinden itibaren grip benzeri hastalık vakalarında artışa yol açtığını belirlemiştir. Bu yeni virüsün domuzlarda, kanatlılarda ve insanlarda hastalık yapan grip virüslerindeki bazı segmentlerden oluştuğu belirlenmiştir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 25 Nisan 2009 tarihinde Dünya'da pandeminin 4. düzeyde, 30 Nisan 2009 tarihinde ise 5. düzeyde olduğunu bildirmiş ve

salgın hızla yayılmaya başlamıştır (Akın, 2010). DSÖ, 11 Haziran 2009 tarihinde İnfluenza pandemi alarm düzeyini 6'ya yükseltmiştir (Cengiz, 2010). Pandemi alarm düzeyinin 6'ya yükseltilmesi, salgının artık her ülkede başlayabileceği anlamına gelmektedir (Şanlı, 2010). Pandemi, ilan edildiği tarihten sonra Dünya genelinde çok hızlı bir şekilde yayılmıştır. Ağustos 2009 tarihi sonu itibarıyla, hem kuzey hem de güney yarım kürede görülen İnfluenza vakalarının neredeyse tamamının etkeninin İnfluenza A 2009 (H1N1) virüsü olduğu ortaya çıkmıştır. Pandemi 2009 yılı sonbahar aylarında kuzey yarım kürede, batıdan doğuya doğru hızla yayılım göstermiştir (Badur, 2012). Pandemi tüm Dünya'da 212'den fazla ülkede milyonlarca grip vakasına ve resmi rakamlara göre 15.921 ölüme neden olmuştur (Balkan, 2013).

Ülkemizde ilk pandemik grip vakası 17 Mayıs 2009 tarihinde kayıtlara geçmiştir. İlk olgu ise 18 Haziran 2009 tarihinde bildirilmiştir. İlk okul salgını ekim ayında gözlenmiştir. Bu olaydan on gün sonra bir sağlık çalışanında ilk ölüm vakası bildirilmiştir. Aralık ayından itibaren hafifleme dönemine giren pandemide son ölüm bildirimi 6 Mart 2010 tarihinde yapılmıştır (Ertem ve diğerleri, 2012). Türkiye genelinde yaklaşık 6.5 milyon kişi gribe yakalanmış, 13.111 hasta birey hastanelere yatırılmış, 2721 birey yoğun bakıma alınmış, 1161 birey ventilatöre bağlanmış ve 656 birey ise hayatını kaybetmiştir. Hayatını kaybedenlerin %59.1'ini kronik hastalığı bulunanlar, %6.1'ini gebeler veya lohusalar oluşturmuştur (Balkan, 2013). Pandemik ve mevsimsel İnfluenza dönemlerinde hastaneye yatırılan ve kaybedilen hastaların yaş grupları incelendiğinde pandemik ve mevsimsel İnfluenzanın farklı seyir gösterdiği anlaşılmaktadır. Örneğin mevsimsel İnfluenza enfeksiyonlarında hastaneye yatırılan hastaların %60'ı, kaybedilen hastaların %90'ı 65 yaş üzeri iken, pandemi süresince hastaneye yatırılan hastaların % 90'ı, kaybedilenlerin ise % 87'si 65 yaş altındadır (https://www.cdc.gov/h1n1flu/pdf/h1n1_estimates_graphics_apr19.pdf- –Erişim Tarihi: 05.01.2018)

4.2 İnfluenza Virüslerinden Korunma ve Tedavi Yöntemleri

İnfluenza virüsleri insandan insana çok kolay bulaşabilen üst solunum yolu enfeksiyonlarına yola açar. En belirgin semptomları; ateş, kas ağrıları, halsizlik, burun akıntısı ve hapşırmadır. Bağışıklık sistemi zayıf olan kişilerde bronşit ve pnömöni gelişme olasılığı yüksektir. Tam bir koruma sağlamamakla birlikte İnfluenza virüs enfeksiyonlarına karşı korunmanın en önemli yolu aşılanmadır. Hasta bireylerin

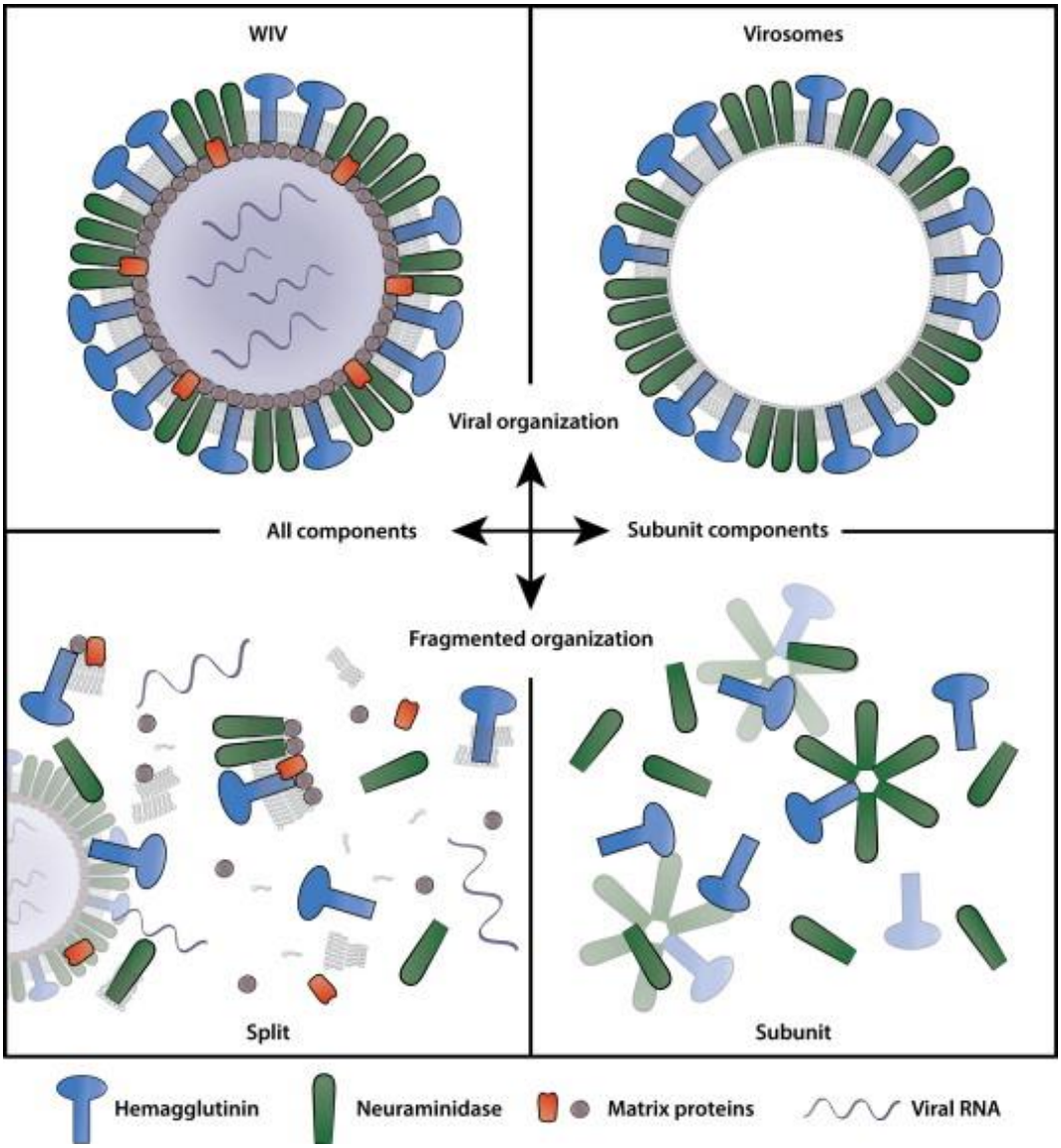
tedavisinde ise anti-influenza virüs aktivitesine sahip ilaçlardan yararlanılır.

4.2.1 Aşılar

Günümüzde İnfluenza virüsü enfeksiyonlarına karşı korunmada en geçerli yol aşılanmadır. Aşılamada daha çok influenza virüsü komplikasyonlarının risk oluşturduğu bireyler ya da bu bireylere virüs bulaştıracabilecek olanlar üzerinde odaklanılmıştır. Örneğin Amerika Birleşik Devletlerinde 6 aydan küçük çocular; 65 yaş ve üstü pulmoner ya da kardiyovasküler kronik bozuklukları olan bireyler; astımlı çocuklar; influenza enfeksiyonlarının yaygın olduğu mevsimlerde hamile olmayı düşünen kadınlar; kronik metabolik hastalıklar (diabetes mellitus dahil), böbrek fonksiyon bozukluğu, hemoglobinopati veya immun sistemin baskılanması (immünosupresyon dahil olmak üzere) nedeniyle düzenli tıbbi takibe ihtiyaç duyan kişiler için influenza aşısı şiddetle önerilmektedir. (CDC/2017: https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/rr/rr6505a1.htm?s_cid=rr6505a1_w#groups_recommended_vaccination – Erişim Tarihi: 05.01.2018).

Mevsimlik İnfluenza aşıları, bir önceki mevsimde insan popülasyonda dolaşımda olan virüs suşları temel alınarak üretilmektedir. İnfluenza aşıları genellikle üç farklı suşun (trivalen) karışımından oluşmaktadır. Bunlar iki farklı İnfluenza A suşu (H3N2 ve H1N1) ve bir İnfluenza B suşu antijenlerini içerir. Bununla birlikte ilave suşlarda aşı bileşeni olarak kullanılabilmektedir. Örneğin, 2017-18 yılı için CDC verilerine göre önerilen kuadrivalen İnfluenza aşıları iki İnfluenza B suşu içermektedir. Bu sezon için önerilen trivalen aşılar, İnfluenza A/Michigan/45/2015 (H1N1) pdm09–benzeri virüs, A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2)-benzeri virüs, ve B/Brisbane/60/2008–benzeri virüslerden oluşmaktadır. Kuadrivalen aşılar için ise bu virüslere ek olarak İnfluenza B/Phuket/3073/2013 önerilmiştir. https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/66/rr/rr6602a1.htm#influenzavaccinecompositionandavailableproducts– (Erişim Tarihi: 10.01.2018). Bu sezon için geliştirilen aşıların önemli bir bölümü split inaktive aşılardır. Split aşılar, yüzey antijen proteinleri başta olmak üzere influenza virionunda taşınan tüm proteinleri içeren aşılardır (Şekil 13). Diğer taraftan, bu sezon için geliştirilen aşılar arasında rekombinant olarak üretilen ve virüsün sadece yüzey antijen proteinlerini içeren subunit aşılar da yer almaktadır. 2016-2017 yılı için hazırlanan influenza aşıları arasında bir de canlı attenüe influenza virüs aşısı da yer almaktadır. Viral antijenleri taşıyan membran veziküllerinden oluşan ve virozom olarak adlandırılan influenza aşısı bulunmamaktadır. (https://www.cdc.gov/flu/about/qa/

vaxsupply.htm - Erişim Tarihi: 10.01.2017). Rekombinant subunit aşılar intramüsküler ya da intradermal, inaktif split aşılar intramüsküler; canlı atenüe aşı ise intranasal olarak uygulanmaktadır.

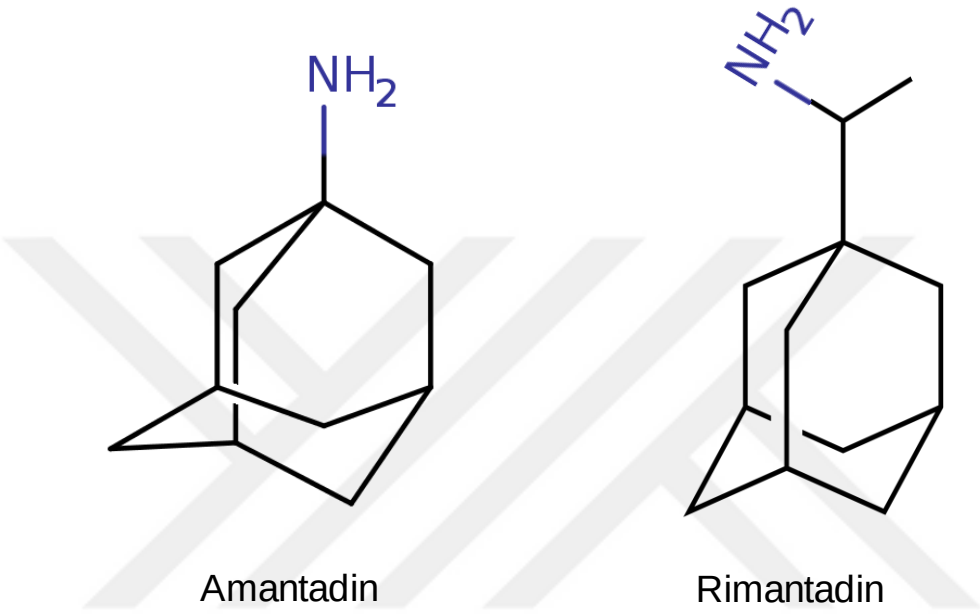


Şekil 13. İnaktive edilmiş influenza virüs aşılarının içeriği. İçerikleri farklı dört aşı kompozisyonu. WIV inaktive edilmiş bütün halinde influenza virüsü partikülü (WIV; whole inactivated virüs) (Bi ve diğerleri, 2015)

4.2.2 Antiviral İlaçlar

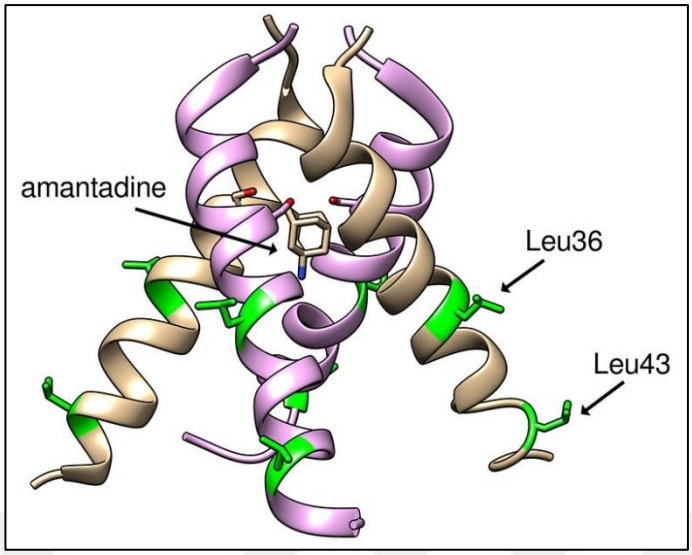
İnfluenza virüsü enfeksiyonlarının tedavisi ya da profilaksisinde kullanılan, nöraminidaz inhibitörleri (zanamivir, oseltamivir vb.) ve M2 blokörü adamantan türevleri (amantadin ve rimantadin) olmak üzere iki grup antiviral mevcuttur.

Nöraminidaz inhibitörleri hem İnfluenza A hem de İnfluenza B virüslerine karşı, adamantanlar ise sadece İnfluenza A'ya karşı etkilidirler. Hastaneye yatış gerektiren hastalık, ilerleyici, ağır veya komplike hastalık varlığında veya komplikasyon gelişme riski yüksek olan kişilerde 48 saat içinde tedavinin başlanması önerilir (Fiore A.E., 2011). Adamantan türevi bileşikler olan amantadin ve rimantadin İnfluenza A virüslerine ait M2 proteininin fonsiyonunu bozarak antiviral etki gösterirler (Şekil 14).



Şekil 14. Anti-influenza A virüs aktivitesi gösteren adamantan türevi bileşiklerin molekül yapıları.

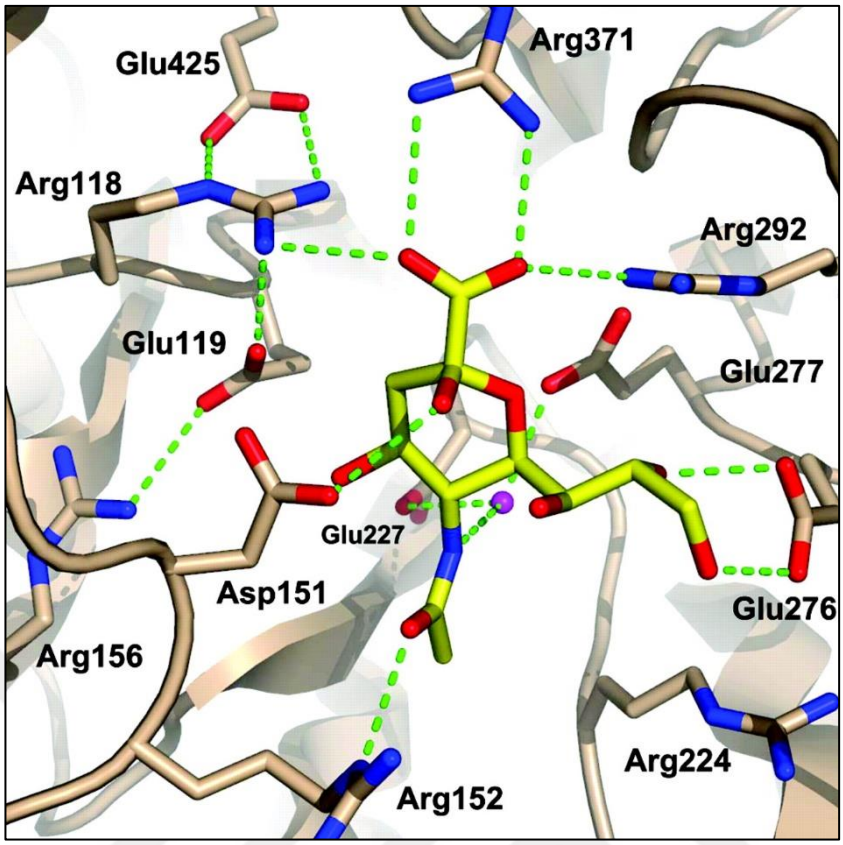
Bu antiviraller İnfluenza A virüslerinin M2 kanalına bağlanarak iyon kanalını oluşturan bölgenin yapısını, dolayısıyla işlevini bozarlar (Şekil 15) (Aoki, 1998). Amantadin ve rimantadin, 1966'da Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi'nden (*İng. Food and Drug Administration; FDA*) onay almış olmasına rağmen sadece İnfluenza A virüslerine karşı etkin olmaları, bu moleküllere karşı hızla direnç gelişimi ve istenmeyen yan etkilerinden dolayı kullanımları sınırlıdır. 2005-2006 yıllarında CDC'nin yaptığı bir çalışmada ABD'de dolaşımdaki İnfluenza A virüslerinin %91'inin amantadin ve rimantadine dirençli olduğu saptanmış ve 2005-2006 sezonunda bu antivirallerin proflaksi ya da tedavi amaçla kullanılmasının önerilmediğini bildirmiştir. (https://www.cdc. gov/flu/weekly/pdf/External_F0935.pdf: Erişim Tarihi-5.1.2018)



Şekil 15. Amantadinin bağlanması ile oluşan amantadin/ M2 protein kompleksi (Pettersen ve diğerleri, 2004).

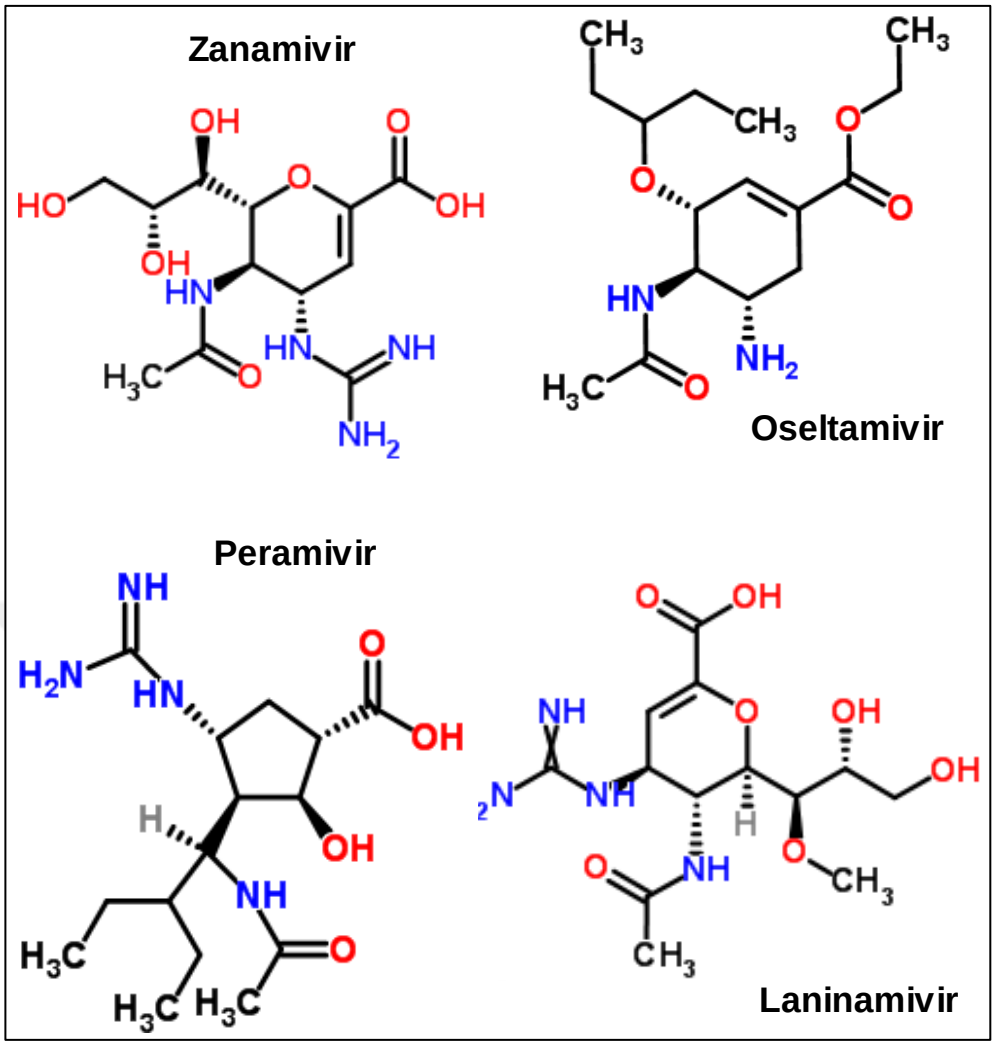
4.2.3 Nöraminidaz İnhibitörleri (Zanamivir ve Oseltamivir)

İnfluenza virüsü yüzey antijen proteinlerinden olan ve enzimatik aktiviteye sahip NA anti-influenza virüs özelliği taşıyan moleküllerin geliştirilmesinde çok önemli bir hedef molekül olmuştur. NA enzimi daha önce de belirtildiği gibi enfekte hücrelerde sialik ait bakiyelerini keserek virüs partiküllerinin serbest kalmasını sağlar. NA proteinini inhibe ettiği saptanan ilk inhibitör, 2-deoksi-2,3-dehidro-N-asetilnörominik asit (DANA) molekülüdür. 1970'lerde yapılan *in vitro* çalışmalarda *DANA*'in trifluoroasetil türevinin potansiyel bir nöraminidaz inhibitörü olduğu düşünülmüş, hücre kültürlerinde başarılı sonuçlar alınmıştır (Smith ve diğerleri, 2001). Bununla birlikte hayvan modellerine yapılan çalışmalarda istenilen başarı sağlanamamıştır. Sonraki çalışmalarda sialik asitin aktif bölgeye nasıl konumlandığının anlaşılması (Şekil 16) ile DANA'ya 4-guanidino grubu eklenmiş, molekülün bağlanma özelliği geliştirilmiş ve sialik asit analoğu olan bu bileşiğe zanamivir adı verilmiştir (Çalışkan, 2011). Şekil 17'de molekül yapısı verilen zanamivir, 2000 yılında hastalarda kullanım için ilgili otoritelerin onayını almış ilk nöraminidaz inhibitörüdür (Kamali ve Holodniy, 2013). Zanamivir oral inhalasyon yolu ile kullanımı olan bir antiviraldir (Çağatay 2012).



Şekil 16. İnfluenza A/Tokyo/3/67 (H2N2) virüsü NA enzimi ile sialik asit bakiyesi kompleksi model gösterimi (Yen ve diğerleri, 2006).

Araştırmacılar NA molekülünün aktif bölgesinin kristal yapısından yararlanarak sentezi daha kolay ve biyoyararlanımı daha yüksek yeni bir molekül geliştirmişlerdir. Bu molekül, etil ester ön-ilaç şekli olan oseltamivir fosfattır (Şekil 17) (Air, 2012). Oral yolla alınan oseltamivir fosfatın ortalama %80 oranında sistemik olarak emildiği ve karaciğer esterazları tarafından aktif ilaç şekli olan oseltamivir karboksilata dönüştürüldüğü saptanmıştır (Moscona, 2005). Oseltamivir, zanamivirin aksine ağızdan kullanıldığında biyoyararlanımı yüksek olan bir ön ilaçtır. İnfluenza A ve B tiplerine karşı hem prolaktik ve hem de tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Oseltamivir genelde az yan etkisi olan bir ilaç olup en çok görülen yan etki mide bağırsak sistemi ile ilgilidir (Çiftçi ve diğerleri, 2016). Oseltamivir ile erken tedaviye başlandığında, yatan hastalarda önemli ölçüde sağkalım sağlandığı ve *Influenza 2009 (H1N1)* virüsü ile enfekte olan ağır hastalarda hayatta kalmayı önemli ölçüde etkilediği gösterilmiştir (Dominguez-Cherit ve diğerleri, 2009; Jain ve diğerleri, 2009).



Şekil 17. İnfluenza virüsü enfeksiyonlarına karşı kullanım için ilgili otoritelerin onayını almış NA inhibitörleri.

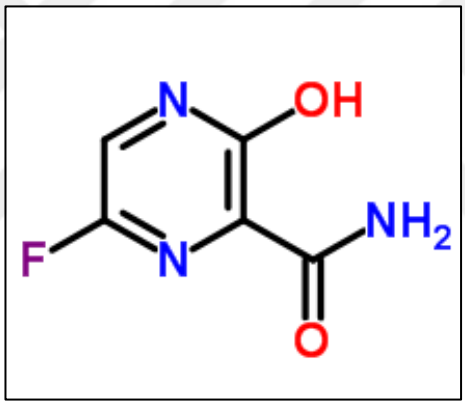
NA inhibitörleri arasında yer alan yeni bileşikler, Peramivir ve Laninamivir'dir (Şekil 17) (Barik, 2012). Peramivir, 2014 yılında FDA onayı almış ve 18 yaş ve üzeri hastalarda kullanımı öngörülmüş bir nörominidaz inhibitörüdür. İnfluenza A ve B suşlarına karşı etki gösterir. Sadece intravenöz olarak uygulanmaktadır. Laninamivir ise 2010 yılında Japonya'da kullanılmak üzere ilgili otoritelerin onayını almıştır. Oseltamivire dirençli virüsler de inhibe ettiği rapor edilen uzun etkili umut verici bir bileşiktir (Vavricka ve diğerleri, 2011). İnfluenza A ve B virüslerine karşı oral inhalasyonla kullanılmaktadır.

Bugün için influenza virüsleri ile mücadelede en etkili yol nöraminidaz inhibitörü antiviral ilaçlar ve aşılardır. Aşılar her yıl güncellenmekte ve % 60-90 oranlarında koruma sağlayabilmektedir. Bu virüsler ile mücadelede karşılaşılan en önemli sorun

çok kısa sürede aşı ve antivirallere karşı dirençli virüs tiplerinin ortaya çıkmasıdır. Yapılan çaılşmalar, özellikle NA enziminin sialik asit bağlanma cebinde yer alan amino asitlerin değişmesi sonucunda mevcut tüm nöraminidaz inhibitörlerine karşı dirençli virüs tiplerinin ortaya çıkabildiğini göstermektedir. Bu da influenza virüslerine karşı her an hazırlıklı olmayı, yeni ve etkili stratejiler geliştirmeyi zorunlu hale getirmektedir.

4.2.4 RNA Polimeraz İnhibitörü

İnfluenza virüsü enfeksiyonlarında etkili olabileceği düşünülen önemli viral hedef moleküllerinden biri de RNA polimeraz enzimidir. RNA'yı kalıp olarak kullanan bu enzim hem mRNA'ların hem de genomik RNA (vRNA)'ların sentezinden sorumludur. Bu enzimin inhibe olması virüs çoğalmasını olanaksız hale getirecektir. Son yıllarda viral RNA polimeraz enzimini inhibe etmek için geliştirilen en önemli bileşiklerden biri T-705 ya da Favipavir'dir (Furuta ve diğerleri, 2017) (Şekil 18).



Şekil 18. T-705 (Favipavir) İnfluenza virüsü RNA polimeraz enzimi inhibitörü.

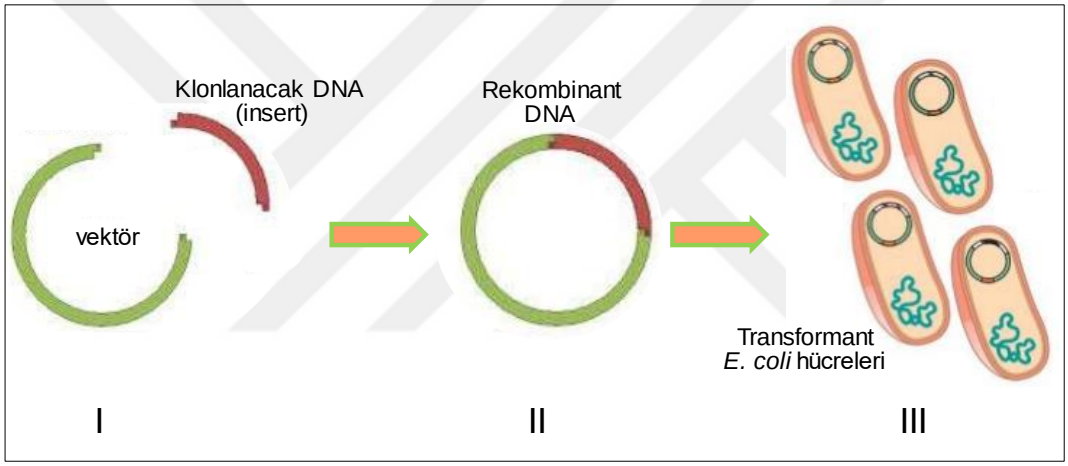
T-705, anti-influenza ajan olarak gelecek vadeden bir bileşiktir. Japonya'da oral yolla İnfluenza A ve B virüslerine karşı kullanılmak için onay başvurusu yapılmış bir moleküldür. İnsan RNA polimerazlar üzerinde etkili olmamakla birlikte İnfluenza dışında diğer bazı RNA virüslerine karşı da etkili olduğu bilinmektedir.

4.3 Rekombinant DNA Teknolojisi ve Mikroorganizmalarda Heterolog Protein Sentezi

Rekombinant DNA teknolojilerindeki gelişmeler, tüm yaşam bilimleri ile ilgili araştırmalara büyük bir ivme kazandırmıştır. 1970'li yılların başlarında DNA moleküllerinin *in vitro* ortamda çeşitli enzimler ile manipüle edilerek değişikliğe uğratılması ve bakterilere aktarıldığında bu moleküllerin işlevsel olduklarının

gösterilmesi DNA teknolojileri için temel oluşturmuştur. Bu gelişmelere, 1960'lı yıllarda DNA'yı substrat olarak kullanan DNA polimerazlar, ligazlar ve endo-/ekzo-nükleaz enzimleri gibi enzimlerin keşfedilmesi ve karakterizasyonları çok önemli etki yapmıştır. Bakterilerde restriksiyon-modifikasyon sistemlerinin temel bileşeni olan restriksiyon endonükleazları, DNA molekülünde özgün noktalarda tanıma yapma ve kesebilme özelliğine sahiptirler. Bu özellikleri nedeniyle restriksiyon endonükleaz enzimleri, bilim insanlarına DNA'yı manipüle edebilme olanağı sunmuştur. Rekombinant DNA teknolojilerinde kullanılan enzimler tip II restriksiyon-modifikasyon sistemi içerisinde değerlendirilen enzimlerdir. İlk izole edilen restriksiyon endonükleaz enzimi, alman bakteriyolog Richard Pfeiffer (Oldstone, 2009) tarafından yanlışlıkla grip ile ilişkilendirilen *Haemophilus influenzae* bakterisinden izole edilmiş olan *Hin*dII endonükleaz enzimidir (Kelly ve Smith, 1970; Smith ve Wilcox, 1970). Bu enzim, DNA molekülü üzerinde "GTY/RAC" dizisini tanır (Y-primidin bazı; R-purin bazı) ve kesim yapar. Nathans D. ve Danna K. (Danna ve Nathans, 1971) Simian virüs 40 (SV40)'a ait DNA molekülünü *Hin*dII restriksiyon enzimi ile keserek farklı boyutlarda fragmentlere ayırmış ve oluşan DNA fragmentlerini poliakrilamid jel elektroforezi ile analiz etmişlerdir. Bu araştırmacılar, oluşan DNA fragmentlerinin, belirli büyüklüklerde özgün fragmentler olduğunu, dolayısıyla, bu enzimlerin DNA moleküllerinin haritalanmasında kullanılabileceğini göstermişlerdir (Danna ve Nathans, 1971). Diğer taraftan restriksiyon endonükleazlarının, *in vitro* koşullarda DNA moleküllerinin kesilerek yeniden bir araya getirilmesinde kullanılabilme potansiyelinin anlaşılması uzun sürmedi. Jackson ve arkadaşları (Jackson ve diğerleri, 1972), restriksiyon endonükleaz enzimi ile keserek doğrusal hale getirdikleri SV40 virüsüne ait DNA moleküllerini, *Escherichia coli*'ye ait galaktoz operonu ve Lambda bakteriyofaj genlerini taşıyan DNA fragmenti ile birbirine bağlayarak *in vitro* koşullarda yeni bir DNA molekülü elde etmeyi başardılar. Aynı tarihlerde Cohen ve arkadaşları (Cohen ve diğerleri, 1973), *Eco*RI enzimini kullanarak *in vitro* koşullarda oluşturdukları rekombinant plazmitlerin *E. coli* bakteri hücrelerinde replike olabildiğini, kısaca biyolojik olarak işlevsel olduğunu göstermişlerdir. 1974 yılında yayınladıkları bir çalışmada ise Morrow ve arkadaşları (Morrow ve diğerleri, 1974) ökaryotik bir organizmaya ait DNA molekülünün bakteri hücrelerinde replikasyon ve transkripsiyon yapabildiğini ortaya koymuşlardır. Bu araştırmacılar *Xenopus laevis'*e ait 18S ve 28S ribozomal RNA moleküllerini kodlayan

genleri pSC101 plazmitine klonlayarak *E. coli* hücrelerine transforme ettiler ve oluşturulan rekombinant DNA'nın aktif olduğunu gösterdiler. Rekombinant DNA teknolojileri için temel olan bu çalışmaları, insana ait insülin (Goeddel ve diğerleri, 1979), insan büyüme hormonu (Olson ve diğerleri, 1981) ve alfa-interferon (Nagata ve diğerleri, 1980) gibi proteinlerin ya da hormonların daha ucuz ve güvenilir bir şekilde heterolog olarak üretilebilmesine olanak sağladı. Günümüzde bu teknolojı çok yaygın olarak yaşam bilimleri ve yaşam bilimleri ile ilişkili farklı disiplinlerde, temel araştırma, ticari değeri olan rekombinant proteinleri üretme, gen tedavisi, genetiği değiştirilmiş organizma elde etme gibi amaçlarla kullanılmaktadır. Şekil 19'da çok basit olarak bir rekombinant DNA'nın elde edilmesi ve *E. coli* hücrelerinde üretilmesi şema halinde verilmiştir.



Şekil 19. Rekombinant bir DNA molekülünün elde edilmesi ve çoğaltılması aşamaları.

Rekombinant DNA teknolojilerinin önemli uygulama alanlarından biri de bir patojenik organizmaya ait antijenik özellik taşıyan proteinlerin bakteri, maya ya da diğer ökaryotik organizmalarda üretilmesi, saflaştırılması ve aşı olarak formüle edilmesidir. Rekombinant aşılar olarak tanımlanan bu ürünler arasında İnfluenza virüslerine ait yüzey antijen proteinleri, HA ve NA proteinleri de yer almaktadır. İnsan sağlığı açısından risk oluşturan, her yıl milyarlarca dolar ile ifade edilen ekonomik kayıplara ve binlerce insanın yaşamını yitirmesine yola açan bu virüslere karşı korunmada, aşılar çok önemli bir yer tutmaktadır. Dolayısıyla, tez çalışmasında aşı olarak kullanılabilen influenza A virüsü HA ve NA proteinlerinin mikroorganizmalarda heterolog olarak üretilemesi ve analizi konusu ele alınmıştır. Bu bağlamda İnfluenza A/WSN/H1N1 virüsüne ait HA ve NA genleri reverz transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-

PCR) tekniği ile çoğaltılmış; bakteri ve maya ekspresyon vektörlerine klonlanmıştır. Bu plazmit vektörler ile transforme edilen bakteri ve maya hücrelerinin İnfluenza A virüsü HA ve NA proteinlerini sentez etme potansiyelleri araştırılmıştır.

5 GEREÇ VE YÖNTEM

5.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Adenin	Sigma Aldrich, ABD
Agar	Difco, ABD
Agaroz	Sigma Aldrich, ABD
Ampisilin	Carlo Erba, İtalya
Bromofenol mavisi	Sigma Aldrich, ABD
Dekstroz	Sigma Aldrich, ABD
Dimetil sülfoksit	Sigma Aldrich, ABD
Etidyum bromür	Fluka, Almanya
Etil alkol	Sigma Aldrich, ABD
Etilendiamintetraasetik asit	Sigma Aldrich, ABD
Fenol	Sigma Aldrich, ABD
Glasiyel asetik asit	Sigma Aldrich, ABD
Gliserin	Sigma Aldrich, ABD
Glukoz	Sigma Aldrich, ABD
Hidrojen klorür	Merck, Almanya
Histidin	Sigma Aldrich, ABD
İzoamil alkol	Sigma Aldrich, ABD
İzopropanol	Sigma Aldrich, ABD
Kanamisin	Roche, Almanya
Kalsiyum klorür	Sigma Aldrich, ABD
Kloroform	Merck, Almanya
Lityum asetat	Merck, Almanya
Lösin	Sigma Aldrich, ABD
Magnezyum klorür	Merck, Almanya
Mangan klorür	Merck, Almanya
Orto-Nitrofenil Galaktozid(ONFG)	Sigma Aldrich, ABD
Polietilenglikol- 4000	Sigma Aldrich, ABD
Pipes	Sigma Aldrich, ABD
Potasyum asetat	Merck, Almanya
Potasyum dihidrojen fosfat	Merck, Almanya

Dipotasyum hidrojen fosfat	Merck, Almanya
Potasyum klorür	Sigma Aldrich, ABD
ssDNA	Sigma Aldrich, ABD
Sodyum asetat	Sigma Aldrich, ABD
Sodyum karbonat	Carlo Erba, İtalya
Sodyum dodesil sülfat	Sigma Aldrich, ABD
Sodyum dihidrojen fosfat	Merck, Almanya
Disodyum hidrojen fosfat	Merck, Almanya
Sodyum hidroksit	Merck, Almanya
Sodyum klorür	Carlo Erba, İtalya
Tris	Sigma Aldrich, ABD
Triptofan	Sigma Aldrich, ABD
Urasil	Sigma Aldrich, ABD
2-β-Merkaptoetanol (2-ME)	Sigma Aldrich, ABD

5.2 Enzimler

Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri

Genlerin klonlanması çalışmalarında ve elde edilen plazmit DNA'ların kontrol edilmesinde değişik aşamalarda *Bam*HI, *Afl*II, *Eco*RI, *Dra*I, *Hind*III, *Nco*I, *Nde*I, *Pst*I *Stu*I (MBI Fermentas, Roche ya da New England Biolabs) restriksiyon endonükleazları kullanıldı.

DNA Modifikasyon Enzimleri

Gen klonlama çalışmalarının farklı aşamalarında Alkalen Fosfataz (SAP: Shrimp Alkaline Phosphatase), Klenow enzimi, T4 DNA Ligaz ve T4 DNA polinükleotid kinaz (MBI Fermentas, Roche veya New England Biolabs) enzimleri kullanıldı.

Termostabil DNA polimerazlar

PZR ile DNA moleküllerinin çoğaltılması ve plazmit vektörlerin kontrolü deneylerinde standart Taq DNA polimeraz enzimleri (New England Biolabs veya Biotechrabbit) ve Kod Plus (Toyobo, Japonya) enziminden yararlanıldı.

Diğer enzimler

DNA izolasonu deneylerinde, RNA'ları uzaklaştırmak amacıyla RNaz A (Roche) enzimi kullanıldı.

5.3 Ticari Kitler

Çalışmanın değişik aşamalarında, orta ölçekte plazmit DNA izolasyon kiti (Qiagen), DNA jel ekstraksiyon kiti (Qiagen) ve DNA ligasyon kiti (TaKaRa) kullanıldı.

5.4 Cihaz ve Gereçler

Çalkalayıcı etüv	N-Biotek, Güney Kore
Çalkalayıcı su banyosu	GFL, Almanya
Derin Dondurucu (-80 °C)	Panasonic, Japonya
Etüv	Memmert, Almanya
Hassas Terazi	Shimadzu, Japonya
Manyetik Karıştırıcı	Heidolph, Almanya
Mikropipetler	Gillson-Thermo-Eppendorf
Mikrosantrifüj	Eppendorf, Almanya
Masaüstü santrifüj	Hettich, Almanya
Otoklav	N-Biotek, Güney Kore
pH metre	Hanna instruments, Portekiz
PZR Cihazları	ABI, ABD / Techne, İngiltere
Soğutmalı Sanrifüjler	Sigma, ABD /Backman, ABD
Steril Çalışma Kabini	Holten, Danimarka
Sterilizatör	Heraeus, Almanya
Su banyosu	GFL-Thermolab, Almanya
Tüp karıştıcı (vorteks)	Heidolph, Almanya
U.V. Transillüminatör	Vilber Lourmat, Fransa
Yatay jel elektroforez cihazı	Labnet, ABD
Dikey jel elektroforez cihazları	Cleaver Scientific, UK
DNR Bio-Görüntüleme sistemi	İsrail
Kemilüminesans tarayıcı	LI-COR, ABD
Sonikatör	Bandelin

5.5 Besiyerleri

5.5.1 Luria Bertani (LB) Besiyeri

10 gr tripton (Bacto), 5 gr maya özütü (Bacto) ve 10 gr sodyum klorür deiyonize distile su içerisinde çözüldü ve 1 litreye tamamlandı (Maniatis ve diğerleri, 1982).

5.5.2 Luria Bertani Agar (LBA) Besiyeri

LB sıvı besiyerine %1.5 (a/ h) oranında agar eklenerek hazırlandı.

LB ve LBA besiyerleri 1 atmosfer basınçta, 121 °C'da 20 dakika otoklavda tutularak steril edildi. Gerektiğinde besiyerlerine 100 µg/ ml final konsantrasyonda antibiyotik (ampisilin) eklendi (Maniatis ve diğerleri, 1982).

5.5.3 YPAD (Yeast- Pepton-Adenin-Dekstroz) Besiyerleri - 1 Litre

10 gr maya özütü, 20 gr pepton ve 0.1 gr adenin distile su içerisinde çözündürülerek 900 ml'e tamamlandı. pH ayarı için ortama 1 parça NaOH kristali eklendi. Besiyerleri 1 atmosfer basınçta, 121 °C'da 20 dakika otoklavda tutularak steril edildi. Otoklav sonrası ortama 100 ml %20 (a/ h) konsantrasyonda steril dekstroz çözeltisi eklendi ve oda sıcaklığında stoklandı.

Katı YPAD besiyerlerinin hazırlanmasında, ortamına %2 oranında agar katıldı. Otoklav sonrasında, besiyerine dekstroz eklendi ve 10 cm'lik petrilere döküldü. Oda sıcaklığında katılaşan besiyerleri +4 ºC'da saklandı.

5.5.4 YPD (Yeast- Pepton-Dekstroz) Besiyerleri - 1 litre

10 gr maya özütü ve 20 gr pepton su içerisinde çözündürülerek 900 ml'ye tamamlandı. pH ayarı için besiyerine 1 parça NaOH kristali eklendi. Besiyerleri 1 atmosfer basınçta, 121 °C'da 20 dakika otoklavda tutularak steril edildi. Otoklav sonrasında 100 mL % 20 (a/ h) konsantrasyonda steril dekstroz çözeltisi eklendi ve oda sıcaklığında saklandı.

Katı YPD besiyerleri için, ortama otoklav öncesi % 2 (a/ h) final konsantrasyonda agar katıldı. Otoklav sonrasında, besiyerine dektroz eklendi ve 10 cmlik petrilere döküldü. Oda sıcaklığında katılaşan besiyerleri +4 ºC da saklandı.

5.5.5 Katı Sentetik Dekstroz (SD +Ade) besiyeri – 250 mL

1.7 gr aminoasit içermeyen YNB 200 ml distile su içerisinde çözündürüldü, üzerine 6 gr agar eklendi ve 121 °C'da 20 dakika otoklavda tutularak steril edildi. Otoklav

sonrası besi ortamına steril edilmiş 25 ml % 20 (a/ h) dekstroz çözeltisi, 25 ml 10x konsantre DO (Drop Out) çözeltisi, 2.5 ml 100x konsantre triptofan, 2.5 ml 100x konsantre lösin, 2.5 ml 100x konsantre histidin, 5 ml 50x konsantre adenin eklendi. Besiyeri 10 cm'lik petrilere dökülerek oda sıcaklığında katılaşması sağlandı ve +4°C'da saklandı.

5.5.6 Katı Sentetik Dekstroz (SD -Ade) besiyeri - 500 mL

3.5 gr amino asit içermeyen maya azot kaynağı (yeast nitrogen base: YNB) 400 ml distile su içerisinde çözündürüldü. Ortama 10 gr agar eklendi. Besiyeri 121 °C'da 20 dakika otoklavda tutularak steril edildi. Otoklavlama işleminden sonra ortama 50 ml steril edilmiş % 20 (a/ h) dekstroz ve 50 ml x10 konsantre Drop Out 5 ml 100x konsantre triptofan, 5 ml 100x konsantre lösin, 5 ml 100x konsantre histidin eklendi. Besiyeri 12 cm'lik petrilere döküldü ve oda sıcaklığında katılaşmaları sağlandı.

5.5.7 BMMY Besiyeri (*İng.* Buffered Methanol-Complex Medium)- 500 mL

5 gr yeast, 10 gr pepton ve 6.7 gr YNB 400 ml distile su içerisinde çözündürüldü ve otoklavlandı. Otoklav sonrasında besiyerine steril 50 ml 10x konsantre methanol (%5-h/h) ve 50 ml 10x konsantre potasyum fosfat tamponu (1M, pH: 6) eklendi. Besiyeri oda sıcaklığında saklandı.

5.6 Plazmit Vektörler

E. coli ve *P. pastoris* hücrelerinde HA ve NA proteinini kodlayacak ekspresyon vektörlerinin oluşturulmasında pET-14b, pGFP, ve pPinkα-HC (Invitrogen) plazmitlerinden yararlanıldı.

5.7 Bakteri Suşları

Plazmitlerin üretilmesinde konak bakteri olarak *E. Coli*/Mach1 ırkı kullanıldı. İnfluenza A virüsüne özgü HA ve NA genlerinin ekspresyonunda ise *E. coli* /Mach1 ile birlikte BL21(DE3), Top10, JM107 ve DH5α suşlarından yararlanıldı.

5.8 Maya Hücreleri

İnfluenza virüsü HA ve NA proteinlerinin üretilmesinde *P. pastoris* maya hücreleri kullanıldı. Bu hücreler Invitrogen firmasından ticari olarak satın alındı. Deneylerde Ade2 geni mutasyona uğratılmış dört farklı *P. pastoris* ırkından (Irk 1-4) yararlanıldı.

P. pastoris ırk 1 sadece Ade2 geni bakımından mutasyonlu iken, diğer ırklar ise Prb1 ve/veya Pep4 proteaz genleri bakımından delesyonlu ırklardır.

Tablo 1. *Pichia pastoris* ırklarının genotipleri.

Maya ırkı	Genotip (Delesyonlu Genler)
P. pastoris (Irk 1)	Ade2
P. pastoris (Irk 2)	Ade2, Pep4
P. pastoris (Irk 3)	Ade2, Prb1
P. pastoris (Irk 4)	Ade2, Pep4, Prb1

5.9 Çalışmanın Değişik Aşamalarında Kullanılan Oligonukleotid Primerler

Üzerinde çalışılan genlerin cDNA üzerinden çoğaltılması, DNA dizi analizleri ve polimeraz zincir reaksiyonu ile rekombinant bakteri kolonilerinin seçilmesinde (koloni-PZR) Tablo 2'de verilen oligonükleotid primerlerden yararlanıldı.

Tablo 2. İnfluenza virüsü HA ve NA genlerinin PZR ile çoğaltılması, vektörlerin doğrusal hale getirilmesi ve oluşturulan plazmit vektörlerin DNA dizi analizleri ile kontrolünde kullanılan olionukleotid primerler.

Primer Adı	Nükleotid Dizisi
Vector-GFP-For	5'- CATTCGTAGAATTCCAACTG-3'
Vector-GFP-Rev	5'- AGCTGTTTCCTGTGTGAAATTG-3'
Vector-GFP-seq-For	5'- TTATGCTTCCGGCTCGTATG-3'
Vector-GFP-seq-Rev	5'- GACAAGTTGGTAATGGTAGC-3'
pET-seq-For	5'- AGGGAGACCACAACGGTTTC-3'
pET-seq-Rev	5'- TGGCAGCAGCCAACTCAGC-3'
seq/α-Factor-For	5'- TACTATTGCCAGCATTGCTGC-3'
seq/CYC1-Rev	5'- GCGTGAATGTAAGCGTGAC-3'
HA-PR8-For	5'- ATGAAGGCAAACCTACTGGT-3'
HA-PR8-Rev	5'- TCAGATGCATATTCTGCACTGCA-3'
NA-PR8-For	5'- ATGAATCCAAATCAGAAAATAATAAC-3'
NA-PR8-Rev	5'- TCACTTGTCAATGGTGAATGGC-3'
HA.myc-Rev	5'- CAGGATCCTACAGGTCCTCCTCGCTGATCAGC TTCTGCTCTAGAGCGATGCATATTCTGCACTGCA-3'
NA.myc-Rev	5'- TAGAATTCACAGGTCCTCCTCGCTGATCAGCTT CTGCTCTAGAGCCTTGTCAATGGTGAATGGCAA-3'

5.10 Çözeltiler

5.10.1 Amino Asit Karışımı / Drop Out (DO) Çözeltisi

Adenin, histidin, lösin ve triptofan içermeyen amino asit karışımından (Clontech - 630428) 0.6 gr, 100 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek x10 konsantre çözelti hazırlandı. Çözelti 121 °C'da 20 dakika otoklavda tutularak steril edildi. Seçici besiyerlerinin hazırlanmasında ortama 1/10 oranında katıldı.

5.10.2 100x Konsantre Lösin (Leu) Çözeltisi

0.5 gr lösin deiyonize distile su içinde çözündürüldü ve çözeltinin hacmi 50 ml'ye tamamlandı. Çözelti 121 °C'da 20 dakika otoklavda tutularak steril edildi.

5.10.3 100x Konsantre Histidin (His) Çözeltisi

0.25 gr histidin deiyonize distile su içinde çözündürüldü ve çözeltinin hacmi 50 ml'ye tamamlandı. Çözelti 121 °C'da 20 dakika otoklavda tutularak steril edildi.

5.10.4 100x Konsantre Triptofan (Trp) Çözeltisi

0.5 gr triptofan deiyonize distile su içinde çözündürüldü ve çözeltinin hacmi 50 ml'ye tamamlandı. Çözelti 121 °C'da 20 dakika otoklavda tutularak steril edildi.

5.10.5 50x Konsantre Adenin (Ade) Çözeltisi

0.25 gr adenin deiyonize distile su içinde çözündürüldü ve çözeltinin hacmi 50 ml'ye tamamlandı. Çözelti 121 °C'da 20 dakika otoklavda tutularak steril edildi.

5.10.6 Dekstroz Çözeltisi (% 20 –a/h)

100 gr dekstroz deiyonize distile su içinde çözündürüldü ve çözeltinin hacmi 500 ml'ye tamamlandı. Çözelti 121 °C' da 20 dakika otoklavda tutularak steril edildi.

5.10.7 Etidyum Bromür (10 mg/ml)

0.1 gr etidyum bromür 10 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek hazırlandı.

5.10.8 %70 Etil Alkol

350 ml saf etil alkol deiyonize distile su ile 500 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

5.10.9 Etilendiamintetraasetik Asit (EDTA) Çözeltisi (0.5 M, pH: 8.0)

93.05 gr EDTA 400 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü. Pellet halde NaOH eklenerek çözeltinin pH'sı 8'e ayarlandı ve hacmi 500 ml'ye tamamlandı. Çözelti 121 °C'da 20 dakika otoklavda tutularak steril edildi. (EDTA Mw: 372.24)

5.10.10 Fenol : Kloroform : İzoamil Alkol (25:24:1)

Kristal halde fenol, 65 °C'da çözündürüldü ve oksidasyonu önlemek için ortama % 0.1 (a/h) konsantrasyonda olacak şekilde 8-hidroksikinolin eklendi. Fenol üzerine eşit hacimde 0.5 M Tris-Cl tamponu (pH: 8) eklendi ve 30-60 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Fenol ve tamponun iki faz halinde ayrılması için, ortam 4 °C'da bekletildi ve üst faz bir su trompu yardımıyla uzaklaştırıldı. Aynı işlem 0.1 M Tris-Cl tamponu ile fenolün pH değeri> 7.8 olana kadar tekrarlandı. Üst fazın yaklaşık % 90'ı uzaklaştırıldı ve doyurulmuş fenol 4 °C'da saklandı. Fenol: Kloroform: İzoamil alkol karışımı hazırlamak için, Tris-Cl tamponu ile doyurulmuş fenol, 25:24:1 (F:K:İ) oranlarında kloroform ve izoamil alkol ile karıştırıldı ve DNA çalışmalarında kullanıldı (Maniatis ve diğerleri, 1982).

5.10.11 Fizyolojik Tuzlu Su (FTS)

4.5 gr sodyum klörür deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü ve çözeltinin hacmi 500 ml'ye tamamlandı. Çözelti, otoklavda 121 °C'da 1 atmosfer basınç altında 20 dakika tutularak steril edildi.

5.10.12 Hidroklorik Asit Çözeltisi (3 N)

75 ml deiyonize distile suya 29.56 g (25 ml) % 37'lik (a/a) HCl çözeltisi eklenerek hazırlandı. (HCl Mw: 36.46; d: 1.186 g/ml)

5.10.13 Kalsiyum Klorür Çözeltisi (2.5 M)

69.4 gr kalsiyum klorür deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü ve çözeltinin hacmi 250 ml'ye tamamlandı. Çözelti 121 °C'da 20 dakika otoklavda tutularak steril edildi. ($CaCl_2$ Mw: 110.98)

5.10.14 Lityum Asetat Çözeltisi (1M)

10.2 gr lityum asetat deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü ve çözeltinin hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti 0.2 μm filtreden geçildi. (CH_3CO_2Li Mw: 102)

5.10.15 Polietilen Glikol Çözeltisi (% 40 –a/h)

40 gr PEG-4000 deiyonize distile su içinde çözündürüldü ve çözeltinin hacim 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti 0.45 μm filtreden geçirildi ve oda sıcaklığında saklandı.

5.10.16 Polietilen Glikol Çözeltisi (% 50 –a/h)

50 gr PEG-4000 deiyonize distile su içinde çözündürüldü ve çözeltinin hacim 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti 0.45 μm filtreden geçirildi ve oda sıcaklığında saklandı.

5.10.17 Lityum Asetat/PEG/TE Çözeltisi

6.7 ml % 50 PEG, 1 ml 1 M LiAc, 0.2 ml 0.5M Tris- Cl (pH: 7.5), 0.02 ml 0.5M EDTA (pH: 7.5) distile su ile hacmi 10 ml'ye tamamlandı.

5.10.18 Lityum Asetat/TE Çözeltisi (100 mM LiAc/10 mM Tris-Cl / 1mM EDTA)

25 ml 1M LiAc, 5 ml 0.5M Tris-Cl (pH: 7.5), 0.5 ml 0.5 M EDTA (pH: 8) deiyonize distile su ile 250 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

5.10.19 Lityum Asetat/ SDS çözeltisi (200 mM LiOAc - %1 SDS, a/h)

35 ml deiyonize distile su, 10 ml 1 M LiOAc ve 5 ml %10 SDS karıştırılarak hazırlandı.

5.10.20 Pipes Çözeltisi (1 M)

30.2 gr pipes, 80 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü, pH'sı 7.5'e ayarlandıktan sonra hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti otoklavda steril edildikten sonra oda sıcaklığında saklandı. (Pipes Mw: 302.37)

5.10.21 Potasyum Klorür Çözeltisi (2.5 M)

93.2 gr potasyum klorür deiyonize distile su içerisinde çözüldü ve çözeltinin hacmi 500 ml'ye tamamlandı. (KCl Mw:74.55)

5.10.22 Potasyum di-Hidrojen Fosfat Çözeltisi (50 mM)

6.8 gr potasyum dihidrojen fosfat deiyonize distile su içerisinde çözüldü ve çözeltinin hacmi 100 ml'ye tamamlandı. (KH_2PO_4 Mw: 136.09)

5.10.23 Di-Potasyum Hidrojen Fosfat Çözeltisi (50 mM)

17.4 gr di-potasyum hidrojen fosfat deiyonize distile su içerisinde çözüldü ve çözeltinin hacmi 200 ml'ye tamamlandı. (K_2HPO_4 Mw: 174.18)

5.10.24 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Çözeltisi (% 10 –a/h)

10 gr SDS deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü ve çözeltinin hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

5.10.25 Sodyum Hidroksit Çözeltisi (2 N)

8 gr sodyum hidroksit deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü ve çözeltinin hacmi 100 ml'ye tamamlandı. (NaOH Mw: 39.99)

5.10.26 Sodyum Karbonat Çözeltisi (1M)

21.19 gr sodyum karbonat deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü ve çözeltinin hacmi 200 ml'ye tamamlandı. (Na_2CO_3 Mw: 105.99)

5.10.27 Sodyum Di-hidrojen Fosfat Çözeltisi (200 mM)

3.12 gr sodyum di-hidrojen fosfat deiyonize distile su içerisinde çözüldü ve çözeltinin hacmi 100 ml'ye tamamlandı. ($NaH_2PO_4.2H_2O$ Mw: 156.02)

5.10.28 Di-Sodyum Hidrojen Fosfat Çözeltisi (200 mM)

5.67 gr di-sodyum hidrojen fosfat deiyonize distile su içerisinde çözüldü ve çözeltinin hacmi 200 ml'ye tamamlandı. (Na_2HPO_4 Mw: 141.96)

5.10.29 Akrilamid/bis akrilamid çözeltisi (%29 akrilamid/%1 bis-akrilamid – a/h)

29 gr akrilamid ve 1 gr bis-akrilamid deiyonize distile su içerisinde çözüldü ve çözeltinin hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti 0.2 µm filtreden geçirildi.

5.10.30 Amonyum Persülfat (APS) Çözeltisi (%10 – a/h)

1 gr amonyum persülfat deiyonize distile su içerisinde çözüldü ve çözeltinin hacmi 10 ml'ye tamamlandı.

5.10.31 Bloklama Çözeltisi (%5'lik yağsız süt tozu)

25 gr yağsız süt tozu deiyonize distile su içerisinde çözüldü ve çözeltinin hacmi 474 ml'ye tamamlandı. Çözeltiye 25 ml 20x konsantre TBS ve 1 ml %10 sodyum azid (NaN_3) eklendi.

5.10.32 Gümüş Nitrat-Formaldehit Çözeltisi (%0.1, a/h - %0.075, h/h)

0.1 gr gümüş nitrat deiyonize distile su içerisinde çözüldü ve çözeltinin hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Çözeltiye 200 µl %37'lik formaldehit eklendi.

5.10.33 Görüntüleme Çözeltisi (%2 sodyum karbonat, a/h-%0.04 formaldehit, h/h - %0.0004 sodyum tiyosülfat, a/h)

2 gr sodium karbonat deiyonize distile su içerisinde çözüldü ve çözeltinin hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Çözeltiye 200 µl %37'lik formaldehit ve 40 µl %1'lik sodyum tiyosülfat (a/h) eklendi.

5.10.34 Metanol:glasiyel asetik asit çözeltisi(%50 metanol,%10 glasiyel asetik asit)

40 ml deiyonize distile su, 50 ml methanol ve 10 ml glasiyel asetik asit karıştırılarak hazırlandı.

5.10.35 %10 Tween-20 (a/h)

5 gr (4.52 ml) Tween-20 üzerine toplam hacim 50 ml olacak şekilde deiyonize distile su eklenerek hazırlandı. (d= 1.105 gr/ml)

5.10.36 Salmon Sperm DNA (ssDNA) Çözeltisi (5 mg/ ml)

50 mg ssDNA 10 ml TE tamponunda (pH: 8) çözündürüldü. Çözelti otoklavda 121 °C'da 1 atmosfer basınç altında 1 dakika tutuldu. Otoklav sonrası DNA eşit hacimde fenol: kloroform: izoamil alkol ile ekstre edildi. Bunun için DNA çözeltisine eşit hacimde fenol: kloroform: izoamil alkol eklendi ve karıştırıldı. Karışım 4500 dev/dak hızda 15 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi. DNA içeren üst faz ayrıldı ve üzerine, 0.1 hacim 3M sodyum asetat ve 2.5 hacim saf etil alkol eklendi. Çözelti tüp karıştırıcıda 4- 5 sn. karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10-15 dakika bekletildi ve 4500 dev/dak hızda 4 °C'da 25 dakika santrifüj edildi. DNA çökeltisi üzerine 5 ml %70 etil alkol eklendi ve tekrar 4500 dev/dak hızda 4 °C'da 5 dakika santrifüj edildi. DNA çökeltisi oda sıcaklığında kurutuldu ve 8 ml TE tamponu içerisinde çözündürüldü. DNA konsantrasyonu spektrofotometrik yöntemle ölçüldü ve konsantrasyon 5 mg/ ml'ye ayarlandı. Denatüre edilmiş ssDNA örmeği agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildikten sonra ileride kullanılmak üzere -20 °C'da saklandı.

5.11 Tamponlar

5.11.1 Transformasyon Tamponu

2 ml 1 M Pipes, 2 ml 2.5 M $CaCl_2$, 20 ml 2.5 M KCl ve 150 ml deiyonize distile su karıştırıldı. Çözeltinin pH'sı 6.7'ye ayarlandıktan sonra üzerine 20 ml 0.55 M $MnCl_2$

eklendi, hacmi deiyonize distile su ile 200 ml'ye tamamlandı. Tampon 0.2 µm filtreden geçirilerek steril edildi.

5.11.2 DNA Ekstraksiyon Tamponu I (25 mM Tris-Cl, 50 mM glikoz, 10 mM EDTA pH: 8.0)

5 ml 1 M Tris- Cl, 10 ml 1 M glikoz ve 4 ml 0.5 M EDTA çözeltisi karıştırıldı, deiyonize distile su ile hacmi 200 ml'ye tamamlandı.

5.11.3 DNA Ekstraksiyon Tamponu II (0,2 N NaOH, % 1 SDS)

Bir hacim 2 N NaOH, 1 hacim % 10 SDS çözeltisi ve 8 hacim deiyonize distile su karıştırılarak hazırlandı.

5.11.4 DNA Ekstraksiyon Tamponu III (3 M Potasyum : 5 M Asetat)

60 ml 5 M potasyum asetat ve 11,5 ml glasiyal asetik asit deiyonize distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı. (CH_3CO_2K Mw: 98.14)

5.11.5 6x Konsantre DNA Yükleme Tamponu

25 mg bromofenol mavisi 6,55 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü; üzerine 3,45 ml % 87'lik gliserin eklendi ve hacmi 10 ml'ye tamamlandı.

5.11.6 50x Konsantre Tris-Asetat-EDTA (TAE) Tamponu

242 gr Tris deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek hacmi 843 ml'ye tamamlandı. Çözelti üzerine 57 ml glasiyel asetik asit, 100 ml 0.5 M EDTA çözeltisi (pH: 8.0) eklendi. Agaroz jel elektroforez deneylerinde 1:50 oranında seyreltilerek kullanıldı.

5.11.7 Tris-Cl Tamponu (1 M, pH: 7.5)

121,1 gr Tris 800 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü. 3 N HCl çözeltisi ile pH'sı 7.5'e ayarlandıktan sonra hacmi 1litreye tamamlandı. Tris-Cl tamponu otoklavda 121 °C'da 1 atmosfer basınç altında 20 dakika tutularak steril edildi. (Tris Mw: 121.1)

5.11.8 Tris/EDTA (TE) Tamponu (10 mM Tris / 1 mM EDTA, pH: 8)

10 ml 1 M Tris-Cl tamponu (pH: 8.0) ve 2 ml 0.5 M EDTA çözeltisi (pH: 8.0) deiyonize distile su ile 1 litreye tamamlanarak hazırlandı.

5.11.9 Potasyum Fosfat Tamponu (50 mM pH: 7.5)

200 ml 50 mM dipotasyum hidrojen fosfat çözeltisi üzerine, pH değeri 7.5 oluncaya kadar 50 mM potasyum dihidrojen fosfat çözeltisi eklenerek hazırlandı.

5.11.10 Sodyum Fosfat Tamponu (200 mM pH: 7.0)

100 ml 200 mM disodyum hidrojen fosfat çözeltisi üzerine, pH değeri 7 olana kadar 200 mM sodyum dihidrojen fosfat çözeltisi eklenerek hazırlandı.

5.11.11 20x Konsantre TBS Tamponu

160 gr NaCl, 4 gr KCl ve 60 gr Tris 800 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü, çözeltinin pH'sı 7.4'e ayarlandı ve hacmi 1000 ml'ye tamamlandı. Tampon 121 °C'da, 1 atmosfer basınç altında, 20 dakika otoklavda tutularak steril edildi.

5.11.12 TBS ve TBS-T Tamponu

TBS 50 ml 20x konsantre TBS tampon, deiyonize distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak hazırlandı. TBS- T tamponu için ortama ortalama 10 ml %10 Tween- 20 eklendi.

5.12 *P. Pastoris* Maya Irklarının Kontrolü

Mayalarda Ade2 geni pürin nükleotidlerinin *de novo* sentez yolağının altıncı kademesini kataliz eden fosforibozil amino imidazole karboksilaz enzimini kodlamaktadır (Jones ve diğerleri, 1982). Bu nedenle Tablo 1'de verilen Ade2 maya ırkları, üremeleri için adenin bazına gereksinim duyarlar. Buna karşın, Ade2 geni taşıyan pPinkα-HC plazmitleri ile transforme edildiklerinde, bu genin ekspresyon düzeyine göre pembe ile beyaz arasında değişen tonlarda koloniler oluşturmaktadır. Bu özelliklerinden yola çıkarak, gen aktarımından önce, maya ırkları, YPD, YPAD, SD (-Ade) ve SD (+Ade) besiyerlerine ekilerek üreme özellikleri test edildi. Bunun için -80 ºC'da saklanan maya stoklarından bir öze yardımıyla katı besiyerlerine ekim yapıldı. Kültürler 30 ºC'da 48 saat inkübe edildi ve oluşan koloniler incelendi.

5.13 Transformasyon için *E. coli* Hücrelerinin Kompetent Hale Getirilmesi

Çalışmada kullanılan *E. coli* ırkları plazmit transfomasyonu için kompetent hale getirildi. Bu amaçla, -80 °C'da saklanan bakteri stoklarından LBA katı besiyerine öze ile ekim yapıldı ve 37 °C'da bir gece boyunca üretildi. Katı besiyerinde oluşan

kolonilerden birer koloni alındı ve 5 ml LB sıvı besiyerlerine ekim yapıldı. Kültürler 37 °C'da 150 dev/dak çalkalama hızında bir gece boyunca üretildi. Hazırlanan 5 ml'lik kültürler 150 ml taze LB besiyerlerine aktarıldı ve 23 °C'da 150 dev/dak çalkalama hızında üremeye bırakıldı. Kültürler, OD_{600} = 0.25 - 0.3 değerine eriştiğinde kompetent hücre hazırlamak için kullanıldı. Kültürler 4 °C'da 10 dakika, 4000 dev/dak hızda santrifüj edilerek bakteriler çökeltildi. Çökeltiler 40 ml soğuk bakteri transformasyon tamponu içerisinde süspanse edildi ve 15- 20 dakika buz içerisinde bekletildi. Hücreler 4 °C'da 10 dakika 4000 dev/dak hızda tekrar santrifüj edildi. Hücre çökeltileri 10 ml soğuk transformasyon tamponunda süspanse edildi. Hücre süspansiyonları üzerine 10 dakika ara ile iki kez 350 µl DMSO eklendi. Hazırlanan hücreler ya direkt olarak transformasyonda kullanıldı ya da ileride kullanılmak üzere -80 °C'da saklandı (Inoue ve diğerleri, 1990).

5.14 Agaroz Jellerin Hazırlanması ve Elektroforez İşlemi

Çalışmada kullanılan DNA moleküllerinin analizinde % 1-1.5'lik (a/h) agaroz jeller kullanıldı. 1-1.5 gr agaroz 98 ml distile su içerisinde kaynatıldı. Çözeltinin üzerine 2 ml x50 konsantre TAE tampon eklendi ve 65- 70 °C'a kadar soğutuldu. Çözeltiye 2 µl etidyum bromür (10 mg/ ml) çözeltisinde eklendi ve yatay jel kasetlerine döküldü. Oda sıcaklığında katılaşan jeller TAE tamponu içeren elektroforez tankına yerleştirildi. DNA örnekleri 5:1 oranında x6 konsantre DNA yükleme tamponu ile karıştırılarak jele uygulandı. Elektroforez işlemi 100 V sabit gerilim altında 20- 25 dakikada tamamlandı. DNA bantları UV transillüminatör ile görünür hale getirildi ve fotoğrafları çekildi.

5.15 Spektrofotometrik Yöntemle DNA'nın Kantitatif ve Kalitatif Analizi

DNA ve RNA moleküllerinin miktar ve kalite tayinlerinde spektrofotometik yöntemlerden yararlanıldı. Örneklerin 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri aşağıda verilen formüllere uygulanarak miktarları saptandı (Maniatis ve diğerleri, 1982).

$$DNA\ konsantrasyonu\ (\mu g/ml) = OD_{260} \cdot D \cdot K_D$$

$$RNA\ konsantrasyonu\ (\mu g/ml) = OD_{260} \cdot D \cdot K_R$$

[OD_{260}, 1 cm çapında quartz küvet kullanılarak 260 nm dalga boyunda ölçülen örneklerin absorbans değeri; D, sulandırım katsayısı; K_D, (50 µg/ ml); K_R, (40 µg/ ml)].

DNA ya da RNA örneklerinin OD_{260}/ OD_{280} değerlerine bakılarak saflıkları hakkında fikir edinildi (Bu oran kaliteli DNA için ~1.8; RNA için ise ~2.0'dir).

5.16 Primerlerin Fosforillenmesi

PZR ile çoğaltılan cDNA'ların, uç bölgelerde restriksiyon enzimleri için hedef dizi taşımadıkları ve bu enzimler ile kesilmedikleri durumlarda, sentetik oligonukleotid primerler T4-polinukleotid kinaz enzimi ile fosforillendikten sonra deneylerde kullanıldı. Bunun için aşağıdaki reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon ortamı 37 °C'da 1 saat bekletildi. Sonrasında 85 °C'da 5 dakika bekletilerek T4 polinukleotid kinaz enziminin inaktive olması sağlandı.

Reaksiyon Karışımı

İleri primer	:	*2.0 µl (200 pMol)*
Geri Primer	:	*2.0 µl (200 pMol)*
rATP karışımı (10 mM)	:	*8.0 µl*
Reaksiyon tamponu (x10)	:	*2.0 µl*
Deiyonize distile su	:	*5.5 µl*
T4 polinukleotid kinaz (10U/µl)	:	*0.5 µl*
Toplam hacim	:	***20.0 µl***

5.17 Protein Miktarlarının Belirlenmesi

Maya veya bakteri kültürlerinden hazırlanan hücre lizatlarında total protein miktarları Bradford yöntemi (Bradford, 1976) ile tayin edildi. Bunun için bovin serum albumin (BSA) kullanılarak protein standart grafiği hazırlandı. Belirli miktarlarda BSA içeren (1-20 µg) 100 µl hacimde çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan BSA çözeltilerine 1 ml Bradford belirteci eklendi ve iyice karıştırıldı. Örnekler oda sıcakklığında 5 dakika bekletildikten sonra, 595 nm dalga boyunda optik densiteleri (OD_{595}) ölçüldü. Elde edilen değerler ve BSA miktarları ile protein standart grafiği oluşturuldu. Oluşturulan standart grafiğin eğim formülü, bilinmeyen protein örneklerinin konsantrasyonlarının belirlenmesinde kullanıldı.

5.18 İnfluenza HA ve NA Genlerini Kodlayan Maya ve Bakteri Ekspresyon Vektörlerinin Oluşturulması

İnfluenza A virüsü HA ve NA proteinlerini kodlayan DNA'lar, tez danışmanım Prof. Dr. Kadir Turan tarafından farklı proje çalışmaları kapsamında, İnfluenza A/WSN/33 (H1N1) virüsleri ile enfekte edilen HEK293 hücrelerden hazırlanan

cDNA'lar üzerinden, gene özgü primerler kullanılarak PZR ile çoğaltıldı. Elde edilen HA ve NA cDNA'ları, standart DNA klonlama teknikleri ile pPinkα-HC (*Pichia pastoris* için) ve pET-14b (*Escherichia coli* için) plazmit vektörlerine klonlandı.

5.18.1 İnfluenza A /WSN/33 HA cDNA'larının elde edilmesi

İnsan tipi influenza A virüsü HA geni hem doğal haliyle hem de Western melezleme deneyleri ile bu proteinin ekspresyonunu saptamak amacıyla Myc uzantısı (EQKLISEEDL) kodlayacak şekilde (HA.myc) plazmit vektörlere klonlandı. HA cDNA'sını PZR ile çoğaltmak için Tablo 2'de dizileri verilen HA-For ve HA-Rev; HA.myc cDNA'sını çoğaltmak için ise HA-For ve HA.myc-Rev primer çiftleri kullanıldı. Primerler **5.16**'da anlatıldığı gibi PZR öncesinde T4-polinukleotid kinaz enzimi ile fosforillendi. PZR reaksiyonları 0.2 ml'lik PZR tüplerinde 40 µl hacim içerisinde gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımları aşağıda verildiği şekilde hazırlandı.

PZR İçin Reaksiyon Karışımı

cDNA	:	*2.0 µl*
HA-For (10 pM µl)	:	*2.0 µl*
HA-Rev ya da HA/myc-Rev (10 pM µl)	:	*2.0 µl*
dNTP karışımı (2.5 mM)	:	*2.0 µl*
$MgSO_4$ (25 mM)	:	*2.0 µl*
Tampon (x10)	:	*4.0 µl*
Deiyoize distile su	:	*25.5 µl*
KOD plus (1U/µl)	:	*0.5 µl*
Toplam hacim	:	***40.0 µl***

Reaksiyon koşulları, 97 °C'da 2 dakika ön denatürasyondan sonra, 32 döngü; 95 °C - 15 sn/ 50 °C -20 sn/ 68 °C- 1 dakika ve bir döngü 68 °C - 10 dakika olarak belirlendi. PZR ürünleri % 1'lik agaroz jel kullanılarak elektroforez ile kontrol edildi. PZR ile çoğaltılan HA cDNA'ları, fenol: kloroform: izoamil alkol (25:24:1) ile ekstre edildi. Bunun için PZR ürünlerinin hacmi 100 µl'ye tamamlandı ve eşit hacimde fenol: kloroform: izoamil alkol ile karıştırıldı. Ortam 14.000 dev/dak hızda, 20 °C'da 5 dakika santrifüj edildi. Üst faz yeni bir tüpe aktarıldı ve üzerine 0.1 hacim 3M sodyum asetat ve 2.5 hacim saf etil alkol eklendi. Örnekler 10 dakika buz üzerinde bekletildi ve 4 °C'da 15 dakika 14.000 dev/dak hızda santrifüj edildi. DNA çökeltisi % 70 etil alkol ile yıkandı, kurutuldu ve 20 µl deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü. Hazırlanan

PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile saflaştırıldı. Örneklere (20 µl) 5µl 6x konsantre DNA yükleme tamponu eklendi ve % 1'lik agaroz jele uygulandı. Elektroforez işlemi, TAE tamponu içerisinde 100 V sabit gerilim altında 20-25 dakikada tamamlandı. Elektroforez sonrası HA ve HA/myc DNA bantları UV ışık altında bir bisturi yardımıyla kesilip çıkartıldı ve 1.5 ml'lik plastik tüpe aktarıldı. DNA moleküllerinin agaroz jelden geri alınmasında DNA jel ekstraksiyon kiti (Qiagen) kullanıldı. Örneklerin üzerine 3 hacim çözündürme tamponu ve 10 µl silika eklendi. 50 °C su banyosunda jel çözünene kadar bekletildi. Bekleme süresince kısa aralıklarla karıştırıldı. Daha sonra 15.000 dev/dak hızda 1 dakika santrifüj edildi. Üst sıvılar uzaklaştırıldı ve agaroz kalıntılarını temizlemek için çökelti 500 µl çözündürme tampon ile yıkandı. Çökelti iki kez 500 µl yıkama tampon ile yıkandıktan sonra oda sıcaklığında (ya da 45-50 °C'da) kurutuldu. Kurutma işleminden sonra silkaya bağlı DNA 30 µl TE tamponu ile elüe edildi ve ligasyonda kullanılmak üzere -20 °C'da saklandı.

5.18.2 İnfluenza A /WSN/33 NA cDNA'larının elde edilmesi

İnfluenza virüsü NA geni de HA geninde olduğu gibi hem doğal haliyle hem de myc uzantılı NA (NA.myc) kodlayacak şekilde plazmit vektörlere klonlandı. NA ve NA.myc cDNA'larının PZR ile çoğaltılmasında, İnfluenza A/WSN (H1N1) virüs tipine özgü NA geni için dizayn edilen primerlerden (Tablo 2) yararlanıldı. Doğal NA cDNA'sı için NA-For ve NA-Rev primer çifti; NA.myc cDNA'sı için ise NA-For ve NA.myc-Rev primer çifti kullanıldı. Primerler PZR öncesi T4- polinukleotid kinaz ile fosforillendi. PZR reaksiyonları için aşağıda verilen reaksiyon karışımlar hazırlandı.

PZR İçin Reaksiyon Karışımı

cDNA	:	*2.0 µl*
NA-For (10 pM µl)	:	*2.0 µl*
NA-Rev ya da NA/myc-Rev (10 pM µl)	:	*2.0 µl*
dNTP karışımı (2.5 mM)	:	*2.0 µl*
$MgSO_4$ (25 mM)	:	*2.0 µl*
Tampon (x10)	:	*4.0 µl*
Deiyoize distile su	:	*25.5 µl*
KOD plus (1U/µl)	:	*0.5 µl*
Toplam hacim	:	***40.0 µl***

Reaksiyon koşulları, 97 °C'da 2 dakika ön denatürasyondan sonra, 32 döngü; 95 °C- 15 sn/ 47 °C- 20 sn / 68 °C- 1 dakika ve bir döngü 68 °C- 10 dakika olarak belirlendi. PZR ürünleri % 1'lik agaroz jel kullanılarak elektroforez ile kontrol edildi ve cDNA'lar **5.18.1** ve **5.18.2**'de ayrıntılı olarak anlatıldığı şekilde agaroz jel elektroforezi ile saflaştırıldı. Saflaştırılan ürünler ileride ligasyon deneylerinde kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

5.18.3 pPinkα-HC plazmit DNA'sının ligasyon için hazırlanması

İnfluenza A virüsü HA ve NA genleri *P. pastoris* maya hücrelerinde ekspresyon yapan pPinkα-HC plazmit vektöründe, *Saccharomyces cerevisiae* maya hücrelerine özgü salgı proteini olan α-faktörünün sinyal dizisini kodlayan DNA dizisi ile aynı kodon çerçevesi içerisinde olacak şekilde klonlandı. Bunun için pPinkα-HC plazmiti *Stu*I restriksiyon enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirildi. Reaksiyon 50 µl hacim içerisinde gerçekleştirildi. 5 µg pPinkα-HC plazmit DNA'sı deiyonize distile su ile 45 µl'ye tamamlandı, üzerine 5 µl 10x konsantre *Stu*I tamponu ve 0.5 µl (5 U) *Stu*I restriksiyon endonükleaz enzimi eklendi ve 37 °C'da 2 saat inkübe edildi. Plazmit DNA'nın kesilip kesilmediği agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. Reaksiyon ortamı, *Stu*I enzimini inaktive etmek amacıyla 20 dakika 80 °C'da bekletildi. Plazmit DNA'nın defosforilasyonu için örnek üzerine 2 µl (2 U) SAP (Shrimp Alkalen Phosphatase) enzimi eklendi ve 37 °C'da 1 saat inkübe edildi. Defosforile edilen plazmit DNA örneğinin hacmi deiyonize distile su ile 100 µl'ye tamamlandı ve **5.18.1**'de verildiği şekilde fenol: kloroform: izoamil alkol ile ekstre edildikten sonra etil alkol ile çökeltildi. DNA çökeltisi kurutuldu, 30 µl deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü ve ligasyonda kullanılmak üzere -20 °C'da saklandı.

5.18.4 pET-14b plazmit DNA'sının ligasyon için hazırlanması

İnfluenza A virüsü yüzey antijen proteinlerini *E. coli* hücrelerinde sentez etmek amacıyla, bu proteinleri kodlayan genler bakteri ekspresyon plazmiti pET-14b plazmit vektörüne klonlandı. Bu vektör T7 RNA polimeraz enzimi için promotör dizisi taşıyan bir vektördür. Dolayısıyla, pET-14b plazmitinde T7 RNA polimeraz promotör dizisi kontrolünde klonlanan genler sadece T7 RNA polimeraz enzimi kodlayan bakteri suşlarında (*E. coli* BL21- DE3) aktiftir. Çalışmada pET-14b plazmiti T7 RNA polimeraz promotör dizisinden hemen sonra *Nco*I enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirildi. Bunun için aşağıda verilen reaksiyon karışımı hazırlandı ve ortam 37 °C'da 1

saat bekletilerek plazmit DNA'sı kesildi. Plazmit DNA'ların kesilmesi %1'lik agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

Reaksiyon karışımı:		
pET-14b (5 µg)	:	*10.0 µl*
Reaksiyon tamponu / NEBuffer 3.1 (x10 konsantre)	:	*10.0 µl*
Deiyonize distile su	:	*79.0 µl*
Enzim (NcoI) (10U/µl)	:	*1.0 µl*
Toplam hacim	**:**	***100.0 µl***

Kesilen DNA örnekleri eşit hacimde fenol/ kloroform/ izoamil alkol ile ekstre edildi ve etanol ile çökeltildi. DNA çökeltileri kurutulduktan sonra 43 µl deiyonize distile suda çözündürüldü. Doğrusal hale gelen, yapışkan uçlu plazmit DNA molekülleri Klenow enzimi ile küt uçlu hale dönüştürüldü. Bunun için 43 µl'lik DNA çözeltilerine 5 µl NEBuffer 2 (NEB), 2 µl 2.5 mM dNTP karışımı ve 0.5 µl (2.5 U) Klenow enzimi eklendi. Reaksiyon 37 °C'da 30 dakikada tamamlandı. Örnekler tekrar eşit hacimde fenol: kloroform: izoamil alkol ile ekstre edildi ve etanol ile çökeltildi. DNA çökeltisi 26 µl deiyonize distile suda çözündürüldü. Defosforilasyon için çözeltiye 3 µl SAP tamponu ve 1 µl (1 U) SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*, Fermentas) enzimi eklendi. Reaksiyon 37 °C'da 60 dakikada tamamlandı ve sonrasında ortam 65 °C'da 20 dakika bekletilerek SAP enzimi inaktive edildi. DNA örnekleri ligasyonda kullanılmak üzere -20 °C'da saklandı.

5.18.5 pGFP plazmit DNA'sının ligasyon için hazırlanması

İnfluenza A virüsü HA ve NA proteinlerini kodlayan genlerin *lac* promotörü kontrolünde klonlanmasında pGFP plazmitinden yararlanıldı. Bu plazmitlerin doğrusal hale getirilmesi ve yeşil flüoresan protein (GFP) geninin çıkartılmasında ters (inverz) PZR tekniği uygulandı. pGFP vektöründe GFP kodlayıcı DNA dizisi dışında kalan bölüm *Vector-GFP-For* ve *Vector-GFP-Rev* primer çifti (Tablo 2) kullanılarak PZR ile çoğaltıldı. Bunun için aşağıda verilen reaksiyon karışımı hazırlandı.

PZR İçin Reaksiyon Karışımı

pGFP plazmit DNA (10 ng/ µl)	:	*2.0 µl*
Vector-GFP-For (10 pM/µl)	:	*2.0 µl*
Vector-GFP-Rev (10 pM/µl)	:	*2.0 µl*
dNTP karışımı (2.5 mM)	:	*2.0 µl*
$MgSO_4$ (25 mM)	:	*2.0 µl*
Reaksiyon tamponu (x10)	:	*4.0 µl*
Deiyonize distile su	:	*25.5 µl*
KOD plus (1U/µl)	:	*0.5 µl*
Toplam hacim	:	***40.0 µl***

PZR koşulları 95 °C'da 3 dakika ön denatürasyon; 32 döngü, 95 °C'da 20 saniye / 54 °C'da 20 saniye / 68 °C'da 3 dakika; 1 döngü, 68 °C'da 10 dakika olarak belirlendi. PZR sonucu elde edilen ürünler %1'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi. Sonrasında örnekler yukarıda verildiği gibi (**5.18.1**) fenol: kloroform: izoamil alkol ile ekstre edildi ve etil alkol ile çökeltildi. DNA çökeltisi kurutuldu, 30 µl deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü ve ligasyonda kullanılmak üzere -20 °C'da saklandı.

5.18.6 Ligasyon ve transformasyon

Yukarıda ayrıntılı olarak anlatıldığı şeklide hazırlanan cDNA örnekleri ve doğrusal hale getirilen plazmit DNA'ların yaklaşık konsantrasyonları, agaroz jel üzerinde bilinen standart DNA konsantrasyonları ile karşılaştırılarak saptandı. DNA moleküllerinin yaklaşık molekül ağırlıkları (ng) ve baz çifti olarak büyüklükleri göz önünde bulundurularak pikomol olarak konsantrasyonları hesaplandı (http://www.molbiol.edu.ru/eng/scripts/01_07.html - Erişim tarihi 02.08.2017). Ligasyon işlemi 20 µl hacim içerisinde gerçekleştirildi. PZR tüplerinde (0.2 ml) 10-30 ng plazmit DNA'sı (0.0020- 0.0059 pmol/ pPinkα-HC; 0.0033- 0.0100 pmol/ pET-14b; 0.0060-0.0181 pmol/ pGFP) ve 25-50 ng cDNA (0.045- 0.090 pmol/ HA; 0.056-0.112 pmol/NA) karıştırıldı ve hacmi 10 µl'ye tamamlandı. DNA karışımına 10 µl DNA ligasyon çözeltisi (TaKaRa) eklendi. Ligasyon işlemi, örnekler 15 °C'a ayarlanmış PZR cihazında bir gece bekletilerek gerçekleştirildi. İşlem sonrası transformasyon için ligasyon ürünleri 1.5 ml'lik plastik tüpelere aktarıldı. Üzerlerine **5.13**'de anlatıldığı gibi hazırlanan kompetent hücrelerden 100-150 µl eklendi; 20 dakika buz içinde, 75 sn 42 °C'da su banyosunda, 2 dakika buz içinde ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha

sonra ortama 500 µl antibiyotik içermeyen LB besiyeri eklendi ve 37 °C'da 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 150 µl hücre süspansiyonu antibiyotikli LBA katı besiyerine cam baget ile yayılarak ekildi. Katı besiyerleri bir gece boyunca 37 °C'da inkübe edildi. Katı besiyerlerinde oluşan transformant koloniler, uygun primerler kullanılarak koloni-PZR yöntemi ile kontrol edildi. Doğru plazmit DNA taşıdıkları saptanan kolonilerden küçük ölçekte plazmit DNA'ları hazırlandı.

5.18.7 Koloni-PZR ile Transformant Bakteri Kolonilerinin Seçilmesi

Transformasyon işlemi sonucunda katı besiyerlerinde oluşmuş kolonilerden yaklaşık 10-20 koloni steril kürdan ile alınarak, LBA katı besiyerine ekim yapıldı ve kürdan üzerinde kalan bakteriler 0.2 ml PZR tüpünde 5 µl deiyonize su içerisinde süspanse edildi. Örnekler PZR cihazında 95 °C'de 5 dakika bekletilerek hücrelerin parçalanması sağlandı. Daha sonra örneklerin üzerine aşağıda verildiği şekilde hazırlanmış reaksiyon karışımından 15 µl eklendi. (N: örnek sayısı)

PZR İçin Reaksiyon Karışımı

		x1	*xN*
İleri Primer (10 pM/µl)	:	*1.0 µl*	*Nx 1.0 µl*
Geri Primer (10 pM/µl)	:	*1.0 µl*	*Nx 1.0 µl*
dNTP karışımı (2,5 mM)	:	*1.0 µl*	*Nx 1.0 µl*
$MgCl_2$ (50 mM)	:	*1.0 µl*	*Nx 1.0 µl*
Reaksiyon tamponu (x10)	:	*2.0 µl*	*Nx 2.0 µl*
Deiyonize distile su	:	*8.9 µl*	*Nx 8.9 µl*
Taq Polimeraz (5U/µl)	:	*0.1 µl*	*Nx 0.1 µl*
Toplam hacim	:	***15.0 µl***	*Nx**15.0 µl***

PZR koşulları; 95 °C'da 2 dakika ön denatürasyon; 32 döngü, 95 °C'da 15 saniye / 50-55 °C'da 15 saniye / 72 °C'da 1- 2 dakika; 1 döngü, 72 °C'da 5 dakika olarak belirlendi. PZR sonrası örnekler 5 µl x6 konsantre jel yükleme tamponu ile karıştırıldı, 10-15 µl örnek % 1'lik agaroz jele uygulandı ve agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi.

5.18.8 Transformant Bakteri Kolonilerinden Küçük Ölçekte DNA İzolasyonu

Ligasyon ve transformasyon işlemlerinden sonra, LBA besiyerlerinde elde edilen ve koloni- PZR ile ön seleksiyonu yapılan kolonilerden kontrol ve dizileme için kullanılmak üzere küçük ölçekte plazmit DNA izolasyonları yapıldı. Plazmit DNA izolasyonları için alkali-SDS liziz yöntemi (Green ve Sambrook, 2018) kullanıldı.

Seçilen kolonilerden ampisilin içeren 3 ml LB besiyerine ekim yapıldı. Örnekler 37 °C'da bir gece boyunca çalkalayıcı etüvde inkübe edilerek doygun kültürler hazırlandı. Elde edilen doygun kültürler 7500 dev/dak hızda 3 dakika santrifüj edilerek hücreler çökeltildi. Hücre çökeltisi 100 µl DNA Ekstraksiyon Tamponu I içerisinde süspanse edildi. Hücre süspansiyonuna taze hazırlanmış 200 µl DNA Ekstraksiyon Tamponu II eklendi ve hafifçe karıştırılarak hücrelerin parçalanması sağlandı. Parçalanan hücrelerin üzerine 150 µl DNA Ekstraksiyon Tamponu III eklendi ve karıştırıldıktan sonra buz üzerinde 10 dakika bekletildi. İstenmeyen hücresel artıklar ve genomik DNA, 4 °C'da, 15000 dev/dak hızda 15 dakika santrifüj edilerek çökelti halinde uzaklaştırıldı. Plazmit DNA içeren üst sıvı üzerine 2.5 hacim etil alkol eklendi ve karıştırıldı. Örnekler 15- 20 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 20 °C'da, 14000 dev/dak hızda 15 dakika santrifüj edilerek DNA çökeltildi. DNA çökeltisi % 70 etil alkol ile yıkandı ve kurutulduktan sonra 30-50 µl TE tamponu içerisinde çözündürüldü. Hazırlanan küçük ölçekte plazmit DNA örnekleri, restriksiyon haritalarına göre uygun restriksiyon endonükleazları ile kesilerek agaroz jel elektroforezi ile doğrulukları konrol edildi. Agaroz jel üzerinde beklenen elektroforez profilleri veren DNA örnekleri PEG/ NaCl ile çöktürülerek kısmen saflaştırıldı ve DNA dizi analizinde kullanıldı.

5.18.9 Küçük ve Orta Ölçekte Hazırlanan Plazmit DNA'ların Restriksiyon Enzimleri ile Kontrolü

Çalışmada elde edilen rekombinant plazmitler, restriksiyon haritaları göz önünde bulundurularak uygun restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesildi ve agaroz jel elektroforezi ile kontrolleri yapıldı. Bunun için 0.5-1 µg DNA örnekleri deiyonize distile su ile 18 µl'ye tamamlandı. Üzerine 2 µl x10 konsantre tampon ve 2-5 U arasında değişen miktarlarda restriksiyon enzimi eklendi. Küçük ölçekte hazırlanan DNA örneklerinde, gereken durumlarda 0.3- 0.5 µl RNaz (10 µg/ µl) enzimi kullanıldı. Örnekler 37 °C'da 1-2 saat kesime bırakıldı. Sonrasında örnekler 5 µl x6 konsantre jel yükleme tamponu ile karıştırıldı ve % 1'lik agaroz jeller kullanarak elektroforez tekniği ile analiz edildi. Çalışma kapsamında elde oluşturulan plazmitler için kullanılan restriksiyon enzimleri aşağıda verildi.

Plazmitler		***Kullanılan Restriksiyon Enzimleri***
pPinkα-HA.myc	:	*Eco*RI, *Afl*II
pPinkα-NA.myc	:	*Eco*RI, *Afl*II
pLac-HA.myc	:	*Eco*RI
pLac-NA.myc	:	*Bam*HI, *Nde*I
pET-14b-HA.myc	:	*Eco*RI, *Bam*HI
pET-14b-NA.myc	:	*Bam*HI, *Dra*I
pET-14b-NA	:	*Pst*I

5.18.10 Plazmit DNA'ların PEG/ NaCl ile Saflaştırılması ve Dizi Analizleri

Küçük ölçekte hazırlanan ve TE tamponunda çözündürülmüş olan plazmit DNA'ları eşit hacimde fenol: kloroform: izoamil alkol ile ekstre edildi. DNA içeren üst faz yeni bir tüpe aktarıldı ve 4 hacim PEG/ NaCl çözeltisi ile iyice karıştırıldıktan sonra 1 saat buz üzerinde bekletildi. Sürenin sonunda 4 °C'da 15000 dev/dak hızda, 25 dakika santrifüj edilerek DNA çökeltildi. Çökelti 1 ml %70 etil alkol ile yıkandı, kurutuldu ve 50-100 µl TE içerisinde çözündürüldü. Uygun görülen DNA örnekleri dizi analizlerinde kullanıldı. DNA dizi analizleri için özel bir şirketten hizmet alındı.

5.18.11 Orta Ölçekte Plazmit DNA'ların Hazırlanması

DNA dizi analizleri sonucu doğru olduğu kesinleşen plazmit DNA'ları orta ölçekte çoğaltıldı ve saflaştırıldı. Bu amaçla plazmitler kompetent *E. coli* hücrelerine transforme edildi. Plazmit taşıyan bakteri kolonilerinden steril bir kürdan ile 5 ml ampisilin içeren LB besiyerine ekildi ve 37 °C'da bir gece inkübe edilerek ön kültürler hazırlandı. Hazırlanan kültürler, 50 ml taze LB besiyerlerine aktarıldı ve 37 °C'da 180 dev/dak çalkalama hızında 14-16 saat süreyle üremeye bırakıldı. Elde edilen doygun kültürler plazmit DNA izolasyonu ve saflaştırmasında kullanıldı. Plazmitlerin izolasyonu ve saflaştırmasında orta ölçekte plazmit DNA izolasyon kiti (Qiagen) kullanıldı. Yöntem olarak üretici firmanın önerdiği yol izlendi. Elde edilen DNA'ların miktarı ve kalitesi, 260/ 280 nm dalga boylarında spektrofotometrede ölçümler alınarak saptandı. Plazmit DNA'ları, restriksiyon haritalarına uygun olarak seçilen enzimler ile kesilerek agaroz jel elektroforezi ile yeniden kontrol edildi ve daha sonraki deneylerde kullanılmak üzere -20 °C'da saklandı.

5.19 Bakteri Ekspresyon Plazmitlerinin, Rekombinant Protein Üretimi İçin Farklı *E. coli* Suşlarına Transformasyonu

İnfluenza virüsü HA ve NA proteinlerinin sentezi için *E. coli*/Mach1, *E. coli*/JM107, *E. coli*/DH5α, *E. coli*/Top10 ve *E. coli*/BL21(DE3) suşlarından yararlanıldı. Hücreler, **5.13**'de anlatıldığı şekilde kompetent hale getirildi. Plazmitler kimyasal yöntemle (bk. **5.18.6**) kompetent *E. coli* hücrelerine transforme edildi.

5.20 Ekspresyon Plazmiti Transforme Edilen *E. coli* Hücrelerinin Üreme Eğrilerinin oluşturulması

Bakteri ekspresyon plazmitleri pLac-HA, pLac-NA, pLac-HA.myc, pLac-NA.myc, pET-14b-HA.myc ve pET-14b-NA.myc öncelikle BL21 ve Mach1 suşlarına transforme edildi (bk **5.18.6**). Katı besiyerinde oluşan kolonilerden 3 ml LB (+) sıvı besiyerine ekildi ve kültürler bir gece boyunca 37 ºC'da inkübe edildi. Elde edilen doygun kültürlerden 75 ml taze LB (+) besiyerine 1'er ml eklendi ve kültürler 37 °C, 180 dev/dak'ya ayarlı çalkalayıcı etüvde üremeye bırakıldı bırakıldı. İlk andan itibaren (0. saat) 1'er saat aralıklarla 1'er ml örnek alındı ve örneklerin optik densiteleri 600 nm'ye ayarlı bir spektrofotometre ile ölçüldü. Elde edilen değerler kullanılarak üreme eğrileri oluşturuldu.

5.21 Maya Ekspresyon Plazmitlerinin, *P. Pastoris* Maya Hücrelerine Transformasyonu

pPinkα-HC plazmiti, maya genomuna entegre olma özelliği taşıyan plazmit olduğu için, transformasyondan önce plazmitler *Afl*II restriksiyon enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirildi.

İnfluenza virüsü HA ve NA geni taşıyan maya ekspresyon vektörlerinin doğrusal hale getirilmesi:

Maya ekspresyon plazmitlerinden (pPinkα-HA.myc ve pPinkα-NA.myc) 10 µg deiyonize distile su ile 90 µl'ye tamamlandı ve üzerine 10 µl x10 konsantre reaksiyon tamponu, 2.5 µl (25 U) *Afl*II restriksiyon enzimi eklendi. Kesim işlemi 37 °C'da 2 saat sürede gerçekleştirildi. Plazmit DNA'larının kesilmesi agaroz jel ile kontrol edildi. Sonrasında örnekler fenol: kloroform: izoamil alkol ile ekstre edildi ve etil alkol ile çökeltildi. DNA çökeltileri 50 µl TE içerisinde çözündürüldü ve transformasyonda kullanıldı. Viral gen taşıyan maya ekspresyon vektörlerinin *P. pastoris* hücrelerine

aktarılmasında, kimyasal bir yöntem olan lityum asetat/polietilen glikol (Lityum asetat/PEG) ile transformasyon ve elektroporasyon yöntemi denendi.

P. pastoris hücrelerinin hazırlanması ve kimyasal yöntem ile transformasyon:

Lityum asetat/PEG ile transformasyon için katı besiyerinde üretilen farklı *P. pastoris* ırklarına (ırk 1-4) ait kolonilerinden birer koloni steril koşullarda öze ile alınarak 5 ml YPAD sıvı besiyerine ekildi ve 30 °C'da 200 dev/dak çalkalanma hızında 20-24 saat süreyle üremeye bırakıldı. Proteaz genleri bakımından normal olan ırk-1'e ait ön kültürden, hızlı ürediği için 1 ml, proteaz genlerinden biri bakımından mutant olan ırk 2 ve 3'e ait ön kültürlerden 2 ml, iki proteaz geni bakımından da mutant olan ve yavaş üreme gösteren ırk-4'e ait ön kültürden 4 ml alınarak 25 ml taze YPAD besiyerine ekim yapıldı. Besiyerleri bir gece boyunca, 30 °C'da 200 dev/dak çalkalanma hızında üremeye bırakıldı. İnkübasyondan sonra her kültürden 5 ml alınarak 50 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı. Hücreler 3000 dev/dak hızda (1200 g) santrifüj edilerek çöktürüldü. Hücreler 20 ml taze YPAD besiyerinde süspanse edildi ve 30 °C'da 1 saat süre ile 200 dev/dak çalkalanma hızında inkübe edildi ve tekrar santrifüj edilerek çökeltildi. Hücreler 20 ml FTS ile yıkandıktan sonra 20 ml LiCl/TE tamponunda süspanse edildi. Hücreler 3000 dev/dak hızda (1200 g) santrifüj edilerek çöktürüldü. Hücre çökeltileri 1 ml LiCl/TE tamponunda süspanse edildi. Mikrosantrifüj tüplerine (1.5 ml) 1 µg kesilmiş plazmit DNA'sı, 50 µg (5 µg/µl) denatüre edilmiş salmon sperm DNA'sı ve 100 µl hücre süspansiyonu eklenerek karıştırıldı. Ortama 700 µl LiCl/TE/PEG çözeltisi eklendi ve 30 °C'da 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 88 µl DMSO eklendi ve 42 °C'da 8 dakika bekletilerek hücreler sıcaklık şoku etkisinde bırakıldı. Hücreler oda sıcaklığında 5 dakika 3000 dev/dak hızda (1200 g) santrifüj edilerek çöktürüldü. Hücre çökeltileri iki kez 1 ml FTS ile yıkandı ve 300 µl FTS içerisinde süspanse edildi. Hazırlanan hücre süspansiyonundan 200 µl, adenin içermeyen katı SD besiyerine cam bagetle yayılarak ekildi. Kültürler 30 °C'da 4-5 gün süre ile üremeye bırakıldı. Katı besiyerinde üreyen transformantlar, protein analizlerinde kullanıldı.

P. pastoris hücrelerinin elektroporasyon yöntemi ile transformasyonu:

Yukarıda belirtildiği şekilde her bir maya ırkı için 5 ml YPAD besiyerinde ön kültürler hazırlandı. Ön kültürlerden 1 ml alınarak 50 ml taze YPAD besiyerlerine inoküle edildi ve 30 °C'da bir gece boyunca üremeye bırakıldı. Kültürler 3000 dev/dak

hızda (1200g) 5 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü. Hücre çökeltileri 50 ml soğuk distile su içerisinde süspanse edildi ve tekrar santrifüj edilerek çöktürüldü. Bu işlem bir kez daha tekrar edildi. Hücre çökeltileri 20 ml 1 M soğutulmuş sorbitol içerisinde süspanse edildi ve santrifüj edildi. Hücreler 1 ml soğuk sorbitol içerisinde tekrar süspanse edildi ve transformasyon işlemine kadar buz içerisinde bekletildi. Her bir transformasyon deneyinde yaklaşık 2.5 µg (0.25µg/µl) doğrusal hale getirilmiş plazmit DNA kullanıldı. DNA örnekleri 80 µl hücre süspansiyonu ile karıştırıldı ve daha önceden soğutulmuş transformasyon küvetlerine aktarıldı. Elektroporasyon 1500V, 5 milisaniyeye ayarlı bir elektroporatör cihazında (Eppendorf: multiporator / electroporator 2510) gerçekleştirildi. Elektrik şoku uygulamasından hemen sonra, hücre süspansiyonuna buz içerisinde soğutulmuş 1 M sorbitol eklendi ve 30 °C'da, karıştırmaksızın 2 saat bekletildi. Daha sonra her bir hücre süspansiyonlarından 250 µl, adenin içermeyen katı SD besiyerine cam bagetle yayılarak ekildi. Kültürler 30 °C'da transformant koloniler belirginleşene kadar (5-7 gün) inkübe edildi.

5.22 Plazmit Aktarılan *P. pastoris* Hücrelerinin İnfluenza Virüsü HA ve NA Genleri için PZR ile Kontrol Edilmesi

Adenin içermeyen SD besiyerlerinde üreyen transformantlardan, 10-20 arasında değişen sayılarda örnek alınarak küçük ölçeklerde kültürler hazırlandı ve %20 (v/v) final konsantrasyonda olacak şekilde gliserin eklenerek -80 °C'da saklandı. Bu stoklardan hazırlanan kültürler hem DNA izolasyonunda hem de protein analizlerinde kullanıldı.

P. pastoris hücrelerinden genomik DNA izolasyonu:

Transformant maya stoklarından öze ile SD (-ade) katı besiyerlerine ekim yapıldı ve besiyerleri iki gün boyunca 30°C'da inkübe edildi. Katı besiyerinde oluşan kolonilerden 2-3 adet steril öze ile alınarak 100 µl distile su içerisinde süspanse edildi. Hücre süspansiyonuna 100 µl lityum asetat/SDS çözeltisi eklendi ve 75 °C'da 5 dakika bekletildi. Daha sonra ortama 600 µl saf etil alkol eklendi, karıştırıldı ve 3 dakika 15.000 dev/dak hızda santrifüj edilerek DNA ve hücre artıkları çöktürüldü. Çökelti % 70 etil alkol ile yıkandıktan sonra üzerine 100 µl TE tamponu eklenerek iyice karıştırıldı. Karışım 2 dakika 15.000 dev/dak hızda santrifüj edildi (Looke ve diğerleri, 2011). Genomik DNA içeren üst faz PZR için kalıp olarak kullanıldı.

P. pastoris genom DNA'sının İnfluenza HA ve NA genleri için PZR ile kontrolü

Transformant *P. pastoris* hücrelerinden hazırlanan genomik DNA'lara İnfluenza virüsü geni taşıyan plazmitlerin entegre olup olmadığı PZR ile kontrol edildi. Bunun için farklı kolonilerden elde edilen DNA örnekleri kalıp olarak kullanılarak *HA-For*/ *Cyc-1-Rev* veya *NA -For*/ *Cyc-1-Rev* primer çiftleri (Tablo 2) ile PZR gerçekleştirildi. PZR için aşağıdaki karışım hazırlandı.

PZR İçin Reaksiyon Karışımı

Genom DNA'sı	:	*2.0 µl (30-40 ng)*
HA-For veya NA -For (10 pM/µl)	:	*1.0 µl*
Cyc-1-Rev (10 pM/µl)	:	*1.0 µl*
dNTP karışımı (2.5 mM)	:	*1.0 µl*
$MgCl_2$ (50 mM)	:	*1.0 µl*
Reaksiyon tamponu (x10)	:	*2.0 µl*
Deiyonize distile su	:	*11.5 µl*
Taq DNA polimeraz (5U/µl)	:	*0.5 µl*
Toplam hacim	:	***20.0 µl***

Reaksiyon koşulları: 95 °C'da 3 dakika ön denatürasyon; 28 döngü, 95 °C'da 15 saniye - 48 °C'da 15 saniye - 72 °C'da 60 saniye; 1 döngü, 72 °C'da 5 dakika, olarak belirlendi. PZR ürünleri % 1'lik agaroz jeli kullanılarak analiz edildi.

5.23 Plazmit Aktarılan *P. pastoris* Hücrelerinde HA ve NA Proteinlerinin Sentezinin Analiz Edilmesi

PZR ile İnfluenza virüsü geni taşıdığı saptanan maya kolonilerinden hazırlanan kültürlerde, viral proteinlerin sentez edilip edilmediği poliakrilamid jel elektroforezi teknikleri ile analiz edildi.

Viral proteinlerin sentezi için P. pastoris kültürlerinin hazırlanması ve protein sentezinin uyarılması

İnfluenza virüsü HA ve NA genleri, pPinkα-HC plazmitinde, metil alkol ile indüklenen alkol oksidaz geni (AOX1) promotörü kontrolünde klonlandığı için, hazırlanan maya kültürleri metil alkol içeren besiyerinde üretildi. İlk aşamada transforme edilen maya kolonileriden 5 ml SD (-Ade) besiyerine ekim yapıldı ve bir

gece boyunca, 30 °C'da 200 dev/dak çalkalanma hızında üretilerek ön kültürler hazırlandı. Daha sonra, kültürler santrifüj edildi ve hücreler çöktürüldü. Hücre çökeltileri 20 ml metanol içeren BMMY besiyerinde süspanse edildi ve 30 °C'da 200 dev/dak hızda inkübe edilerek hücrelerin üremesi sağlandı. İnkübasyondan 12 saat sonra kültür ortamlarından alınan örnekler protein analizi için kullanıldı. Kültürlerden alınan belirli hacimdeki örnekler 5000 dev/dak hızda 5 dakika santrifüj edilerek hücreler çökeltildi. Üst sıvılar salgı formunda viral protein analizi için kullanılmak üzere -80 °C'da saklandı. Çökelti halindeki hücrelerden aşağıda belirtildiği şekilde total protein ekstreleri hazırlandı.

P. pastoris hücrelerinden total protein ekstraksiyonu

Yukarıda belirtildiği şekilde BMMY besiyerlerinde hazırlanan kültürlerden elde edilen hücre çökeltilerinden total protein ekstraksiyonunda iki farklı yol izlendi. Birincisi, 1 ml kültürden elde edilen hücre çökeltileri distile su ile yıkandıktan sonra 100 µl distile su içerisinde tekrar süspanse edildi. Hücre süpansiyonları eşit hacimde 0.6 N NaOH çözeltisi ile karıştırıldı ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Sonrasında, süspansiyonlar 5000 dev/dak hızda 5 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü ve üst sıvı atıldı. Hücre çökeltileri saf su ile yıkandıktan sonra 100 µl distile içerisinde süspanse edildi ve eşit hacimde x4 konsantre SDS örnek yükleme tamponu ile karıştırıldı. Hücrelerin parçalanması ve proteinlerin denatürasyonu için örnekler 95-100 °C'da kaynar suda 5 dakika bekletildi. Hücresel artıkları çöktürmek için örnekler 15.000 dev/dak hızda 5 dakika santrifüj edildi ve üst sıvılar analizlerde kullanıldı. Hücre lizatlarının hazırlanmasında ikinci yol olarak sonikasyon ile hücrelerin parçalanması yönteminden yararlanıldı. Kültür ortamlarında alınan 5 ml'lik örnekler santrifüj edlerek hücreler çökeltildi ve 0.5 ml liziz tamponunda (50 mM Tris, 150 mM NaCl, % 0.1 NP-40, 2 mM PMSF, pH: 8) tekrar süspanse edildi. Hücre süspansiyonları gücü %75'e ayarlı bir sonikatör ile buz üzerinde 30 saniye sonikasyon, 15 saniye bekleme döngüleri halinde 5 dakika süre ile sonike edildi. Sonrasında örnekler 15.000 dev/dak hızda 5 dakika santrifüj edildi ve üst sıvılar ayrıldı. Üst sıvılar eşit hacimde x4 konsantre SDS örnek yükleme tamponu ile karıştırıldı ve 95-100 °C'da kaynar suda 5 dakika bekletildikten sonra, SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile incelendi.

5.24 Protein Örneklerinin SDS- PAGE ve Western Blotting Melezleme ile Analiz Edilmesi

Maya hücrelerinden ekstre edilen proteinler ya da besi ortamına salgılanması olası viral proteinler sodyum dodesil sülfat - poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile analiz edildi.

5.24.1 Poliakrilamid jellerin hazırlanması ve elektroforez

Protein elektroforezi için 100x100x1 mm boyutlarında jeller kullanıldı. Jeller % 10'luk ayırma ve % 6'lık paketleme jeli olarak iki kısım halinde hazırlandı. Jellerin % 10'luk akrilamid içeren birinci bölümü (ayırma jeli); 2 ml stok akrilamid/bisakrilamid çözeltisi, 1.5 ml 4x konsantre ayırma jel tamponu, 2.5 ml deiyonize distile su, 50 µl APS (%10 – w/v) ve 20 µl TEMED karıştırılarak hazırlandı ve jel kasetlerine döküldü. Jel yüzeyine 500 µl deiyonize distile su yayılarak yüzeyin düzgün polimerize olması sağlandı. Daha sonra jeller 20-30 dakika oda sıcaklığında polimerizasyona bırakıldı. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra jel yüzeyindeki su atıldı. % 6'lık akrilamid içeren jellerin ikinci bölümü (paketleme jeli); 1 ml stok akrilamid/bisakrilamid çözeltisi, 1.25 ml 4x konsantre paketleme jel tamponu, 2.75 deiyonize distile su, 25 µl APS (%10 w/v) ve 10 µl TEMED ile karıştırılarak hazırlandı. Karışım daha önce hazırlanan ayırma jeli üzerine döküldü, jel tarakları yerleştirildi ve oda sıcaklığında polimerizasyonu sağlandı. Elektroforez işlemi Tris-Glisin tamponunda gerçekleştirildi. Hazırlanan jel kasetleri elektroforez tankına yerleştirildi. Analiz edilecek protein örnekleri 1:3 oranında 4x örnek yükleme tamponu ile karıştırıldı ve 5 dakika kaynar suda tutularak proteinlerin denatüre edildikten sonra, her bir örnekten 10-15 µl arasında değişen miktarlarda jele uygulandı. Elektroforez her bir jel kaseti için ilk 20 dakika 40 volt, daha sonra 80 volt gerilim altında yaklaşık 1.5- 2 saatte tamamlandı.

5.24.2 Jellerin gümüş boyama yöntemi ile boyanması

Poliakrilamid jellerde ayrıştırılan daha az miktarlarda proteinlerin analiz edilmesi için gümüş boyama yöntemi uygulandı (Hakkıoğlu, 2017; İbişoğlu, 2015). Elektroforez işleminden sonra jeller metanol: glasiyel asetik asit çözeltisi (%50: %10) içerisinde 2 saat, %50'lik metanol içerisinde 20 dakika bekletidi. Jel 100 ml deiyonize distile su içerisinde hafifçe karıştırılarak 20 dakika süre ile 2 kez yıkandı. Yıkamanın ardından %0.02'lik sodyum tiyosülfat ile 2 dakika muamele edildi ve 100 ml deiyonize distile su ile 2 kez yıkandı. Jel karanlıkta % 0.1 gümüş nitrat / %0.074 formaldehit çözeltisi

içerisinde 30 dakika bekletildi ve deiyonize distile su içerisinde 2 dakika süre ile tekrar yıkandı. Jeller görüntüleme çözeltisinde (%0.04 formaldehit, %2 sodyum karbonat, %0.0004 sodyum tiyosülfat) bekletilerek protein bantlarının görünür hale gelmesi sağlandı. Jeller metanol: glasiyel asetik asit çözeltisine alınarak reaksiyon durduruldu ve bir dijital kamera ile görüntüleri alındı.

5.24.3 Western melezleme tekniği ile proteinlerin görüntülenmesi

Elektroforez işlemi sonucunda poliakrilamid jel üzerinde ayrılan proteinler nitroselüloz membranlara transfer edildi. Bunun için transfer kasetleri arasında "sünger-filtre kağıdı - nitrosellüloz membran - jel - filtre kağıdı - sünger" sırasına göre transfer sandviçi hazırlandı. Hazırlanan transfer sandviçi transfer tamponu ile doldurulmuş tanka yerleştirildi ve 45 voltta 45 dakika ve 90 voltta 90 dakika sürede transfer işlemi tamamlandı. Protein transferi işleminden sonra nitroselüloz membranlar, 1-2 saat bloklama çözeltilsinde bekletildi. Daha sonra membranlar bir gece boyunca, bloklama çözeltisinde belirli oranında (1/200 - 1/1000) sulandırılan primer antikor etkisinde bırakıldı. Primer antikor olarak fare orijinli monoklonal anti-myc antikorları (Millipore # 05-724) kullanıldı. Primer antikor uygulaması sonrasında membranlar üç kez 25 dakika TBS-T ile yıkandı ve 30 dakika 1/5000 oranında TBS içerisinde sulandırılan yaban turpu peroksidazı (*İng*. HRP: *horseradish peroxidase*) bağlı keçi anti-fare IgG antikorları (Pierce # 31430) ile işleme kondu. Sonrasında membranlar üç kez 15 dakika TBS-T ile yıkandı. Proteinler kemilüminesans substrat (H&C, RPN2232) ile görüntülendi. Görüntülemede kemilüminesans tarayıcı cihaz (C-DiGit Blot Scanner, LI-COR) ya da yüksek performanslı jel görüntüleme sistemi (DNR Bio-Görüntüleme sistemi) kullanıldı.

5.25 Bakterilerde Sentez Edilen İnfluenza Virüsü HA ve NA Proteinlerinin Elektroforez Teknikleri ile Analiz Edilmesi

İnfluenza virüsü proteinlerinin rekombinant olarak sentezinde *E. coli*/BL21, *E. coli*/Mach1, *E. coli*/JM107 ve *E. coli*/DH5α ırklarından yararlanıldı. İnfluenza virüsü genlerinin klonlanması ile elde edilen plazmit vektörler ile transforme edilen hücrelerden küçük ölçeklerde kültürler hazırlandı. Bunun için LBA (+amp) besiyerlerinde oluşan kolonilerden steril bir kürdan alınarak LB (+amp) besiyerlerine ekim yapıldı. Kültürler 8-10 saat süre ile 37 °C'da, 150 dev/dak çalkalama hızında inkübe edildi. Gerekli durumlarda inkübasyondan 6 saat sonra besiyerine 400 µM final

konsantrasyonda *E. coli'*de laktoz operonunu indükleyen bir madde olan izopropil tiyogalaktozid (IPTG) eklendi. Bu kültürler IPTG eklendikten sonra 4 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kültürlerden 1 ml örnek alınarak 8000 dev/dak hızda oda sıcaklığında santrifüj edildi. Hücre çökeltileri 1 ml distile su içerisinde süspanse edildi ve tekrar santrifüj edildi. Çökeltiler 100 µl distile su içerisinde süspanse edildi ve eşit hacimde x4 konsantre SDS örnek tamponu ile karıştırıldı. Elde edilen hücre lizatları 95-100 °C'da kaynar suda bekletilerek proteinlerin denatüre olması sağlandı. Örnekler 15000 dev/dak hızda santrifüj edildi ve üst faz SDS-PAGE ile analizlerde kullanıldı. Bakterilerden elde edilen total proteinlerin analizinde **5.24.2** ve **5.24.3**'te maya hücreleri için verilen yöntemler uygulandı.

6 BULGULAR

6.1 İnfluenza Virüsü HA ve NA Proteini Kodlayan Plazmit Vektörünün Oluşturulması ile İlgili Veriler

İnfluenza virüslerine ait HA ve NA proteinleri, virüs membranında yer alan temel yüzey antijen proteinleridir. Bu proteinlerden HA proteini virüsün 4. RNA segmenti, NA proteini ise 6. RNA segmenti üzerinden kodlanmaktadır. Bu çalışmada, HA ve NA proteinlerini kodlayacak cDNA'lar İnfluenza A/WSN/33 virüsü ile enfekte edilen HEK293 hücrelerinden hazırlandı. Elde edilen cDNA'lar PZR ile çoğaltılarak, bakteri ve maya ekspresyon vektörlerine klonlandı. Oluşturulan ekspresyon vektörleri hem restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek, hem de DNA dizi analizleri ile kontrol edildi.

6.1.1 HA ve NA cDNA'larının Çoğaltılması ile İlgili Veriler

İnfluenza A/WSN/33 virüsü HA ve NA proteinlerini kodlayan DNA fragmentleri, bu virüs ile enfekte edilen HEK293 hücrelerinden hazırlanan cDNA'lar üzerinden PZR ile çoğaltıldı. Virüs cDNA'ları tez danışmanım Prof.Dr. Kadir Turan tarafından farklı proje çalışmaları kapsamında hazırlanmış, dolayısıyla bu çalışmada ayrıca cDNA elde edilmesine yönelik çalışma yapılmamıştır. Aşağıda İnfluenza A/WSN/33 virüsüne ait verilen referans HA ve NA genlerine ait nükleotid dizileri göz önünde bulundurularak gene özgü primerler oluşturuldu.

CY034132:6-1703 / (Influenza Research Database)
Influenza A virus (A/WSN/1933(H1N1)) / hemagglutinin / HA / Segment:4

ATGAAGGCAAAACTACTGGTCCTGTTATATGCATTTGTAGCTACAGATGCAGA
CACAATATGTATAGGCTACCATGCGAACAACTCAACCGACACTGTTGACACAA
TATTCGAGAAGAATGTGGCAGTGACACATTCTGTTAACCTGCTCGAAGACAGA
CACAACGGGAAACTATGTAAATTAAAAGGAATAGCCCCACTACAATTGGGGAA
ATGTAACATCATCGGATGGCTCTTGGGAAATCCAGAATGCGACTCACTGCTTC
CAGCGAGATCATGGTCCTACATTGTAGAAACACCAAACTCTGAGAATGGAGCA
TGTTATCCAGGAGATTTCATCGACTATGAGGAACTGAGGGAGCAATTGAGCTC
AGTATCATCATTAGAAAGATTCGAAATATTTCCCAAGGAAAGTTCATGGCCCA
ACCACACATTCAACGGAGTAACAGCATCATGCTCCCATAGGGGAAAAAGCAGT
TTTTACAGAAATTTGCTATGGCTGACGAAGAAGGGGGATTCATACCCAAAGCT

GACCAATTCCTATGTGAACAATAAAGGGAAAGAAGTCCTTGTACTATGGGGTG
TTCATCACCCGTCTAGCAGTGATGAGCAACAGAGTCTCTATAGTAATGGAAAT
GCTTATGTCTCTGTAGCGTCTTCAAATTATAACAGGAGATTCACCCCGGAAAT
AGCTGCAAGGCCCAAAGTAAAAGATCAACATGGGAGGATGAACTATTACTGGA
CCTTGCTAGAACCCGGAGACACAATAATATTTGAGGCAACTGGTAATCTAATA
GCACCATGGTATGCTTTCGCACTGAGTAGAGGGTTTGAGTCCGGCATCATCAC
CTCAAACGCGTCAATGCATGAGTGTAACACGAAGTGTCAAACACCCCAGGGAT
CTATAAACAGCAATCTCCCTTTCCAGAATATACACCCAGTCACAATAGGAGAG
TGCCCAAAATATGTCAGGAGTACCAAATTGAGGATGGTTACAGGACTAAGAAA
CATCCCATCCATTCAATACAGAGGTCTATTTGGAGCCATTGCTGGTTTTATTG
AGGGGGGATGGACTGGAATGATAGATGGATGGTATGGTTATCATCATCAGAAT
GAACAGGGATCAGGCTATGCAGCGGATCAAAAAAGCACACAGAATGCCATTAA
CGGGATTACAAACAAGGTGAACTCTATTATCGAGAAAATGAACACTCAATTCA
CAGCTGTGGGTAAAGAATTCAACAACTTAGAAAAAAGGATGGAAAATTTAAAT
AAAAAAGTTGATGATGGGTTTCTGGACATTTGGACATATAATGCAGAATTGTT
AGTTCTACTGGAAAATGGAAGAACTTTGGATTTCCATGACTTAAATGTGAAGA
ATCTGTACGAGAAAGTAAAAAGCCAATTAAAGAATAATGCCAAAGAAATCGGA
AATGGGTGTTTTGAGTTCTACCACAAGTGTGACAATGAATGCATGGAAAGTGT
AAGAAATGGGACTTATGATTATCCAAAATATTCAGAAGAATCAAAGTTGAACA
GGGAAAAGATAGATGGAGTGAAATTGGAATCAATGGGGGTGTATCAGATTCTG
GCGATCTACTCAACTGTCGCCAGTTCACTGGTGCTTTTGGTCTCCCTGGGGGC
AATCAGTTTCTGGATGTGTTCTAATGGGTCTTTGCAGTGCAGAATATGCATCT
GA

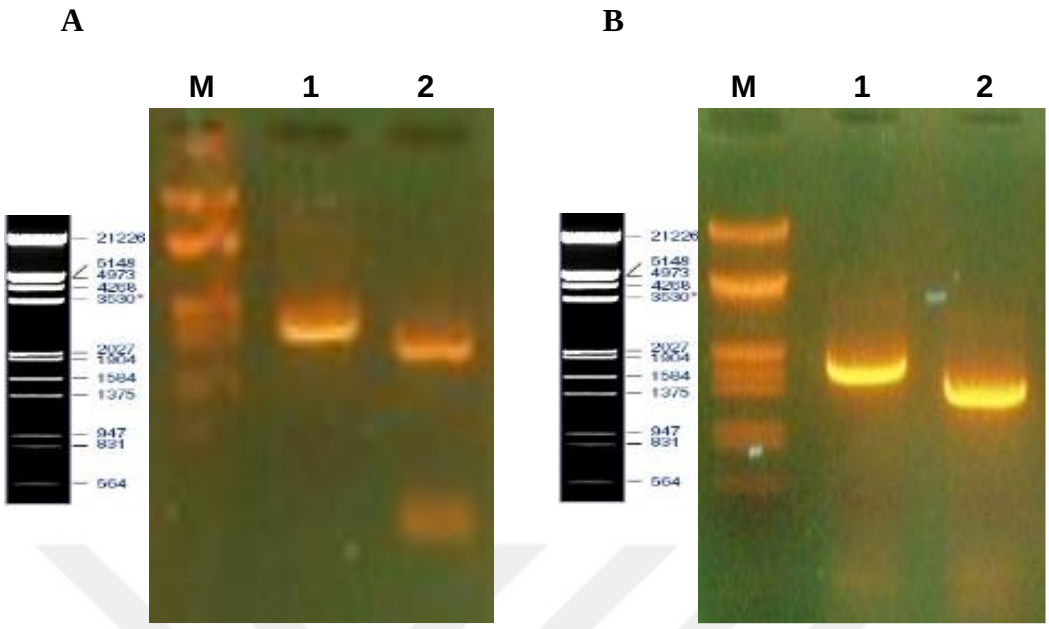
CY034134:1-1362 / (Influenza Research Database)

Influenza A virus (A/WSN/1933(H1N1)) / neuraminidase / NA / Segment:6

ATGAATCCAAACCAGAAAATAATAACCATTGGGTCAATCTGTATGGTAGTCGG
AATAATTAGCCTAATATTGCAAATAGGAAATATAATCTCAATATGGATTAGCC
ATTCAATTCAAACCGGAAATCAAAACCATACTGGAATATGCAACCAAGGCAGC
ATTACCTATAAAGTTGTTGCTGGGCAGGACTCAACTTCAGTGATATTAACCGG
CAATTCATCTCTTTGTCCCATCCGTGGGTGGGCTATACACAGCAAAGACAATG
GCATAAGAATTGGTTCCAAAGGAGACGTTTTTGTCATAAGAGAGCCTTTTATT

TCATGTTCTCACTTGGAATGCAGGACCTTTTTTCTGACTCAAGGCGCCTTACT
GAATGACAAGCATTCAAGGGGGACCTTTAAGGACAGAAGCCCTTATAGGGCCT
TAATGAGCTGCCCTGTCGGTGAAGCTCCGTCCCCGTACAATTCAAGGTTTGAA
TCGGTTGCTTGGTCAGCAAGTGCATGTCATGATGGAATGGGCTGGCTAACAAT
CGGAATTTCTGGTCCAGATGATGGAGCAGTGGCTGTATTAAAATACAACGGCA
TAATAACTGAAACCATAAAAAGTTGGAGGAAGAATATATTGAGAACACAAGAG
TCTGAATGTACCTGTGTAAATGGTTCATGTTTTACCATAATGACCGATGGCCC
AAGTGATGGGCTGGCCTCGTACAAAATTTTCAAGATCGAGAAGGGGAAGGTTA
CTAAATCAATAGAGTTGAATGCACCTAATTCTCACTACGAGGAATGTTCCTGT
TACCCTGATACCGGCAAAGTGATGTGTGTGTGCAGAGACAATTGGCACGGTTC
GAACCGACCATGGGTGTCCTTCGACCAAAACCTAGATTATAAAATAGGATACA
TCTGCAGTGGGGTTTTCGGTGACAACCCGCGTCCCAAAGATGGAACAGGCAGC
TGTGGCCCAGTGTCTGCTGATGGAGCAAACGGAGTAAAGGGATTTTCATATAA
GTATGGTAATGGTGTTTGGATAGGAAGGACTAAAAGTGACAGTTCCAGACATG
GGTTTGAGATGATTTGGGATCCTAATGGATGGACAGAGACTGATAGTAGGTTC
TCTATGAGACAAGATGTTGTGGCAATGACTGATCGGTCAGGGTACAGCGGAAG
TTTCGTTCAACATCCTGAGCTAACAGGGCTAGACTGTATGAGGCCTTGCTTCT
GGGTTGAATTAATCAGGGGGCTACCTGAGGAGAACGCAATCTGGACTAGTGGG
AGCATCATTTCTTTTTGTGGTGTGAATAGTGATACTGTAGATTGGTCTTGGCC
AGACGGTGCTGAGTTGCCGTTCACCATTGACAAGTAG

Myc uzantısı kodlayan dizi taşıyan cDNA'lar elde etmek için Tablo 2'de verilen myc kodlayıcı dizi eklenmiş geri primerler (HA.myc-Rev ya da NA.myc-Rev) kullanıldı. PZR sonucu elde edilen ürünler % 1'lik agaroz jeller kullanılarak incelendi. Şekil 20'de verilen sonuçlardan da görüldüğü gibi HA ve NA genleri için beklenen ~ 1700 bç (HA) ve 1370 bç. (NA) boyutlarda DNA fragmentleri elde edildi.



Şekil 20. PZR ile çoğaltılan İnfluenza A virüsünün HA ve NA genlerinin agaroz jel elektroforezi ile incelenmesi. **M.** Standart DNA (*Hind*III ve *Eco*RI enzimleri ile kesilen Lambda DNA'sı - λ/*Hind*III+*Eco*RI) **A.** Myc uzantısı taşımayan HA **(1)** ve NA **(2)** cDNA'ları. **B.** Myc uzantısı taşıyan HA.myc **(1)** ve NA.myc **(2)** cDNA'ları. Elektroforez işlemi, %1'lik agaroz jeller kullanılarak, 100 V sabit gerilim altında 30 dakikada tamamlandı.

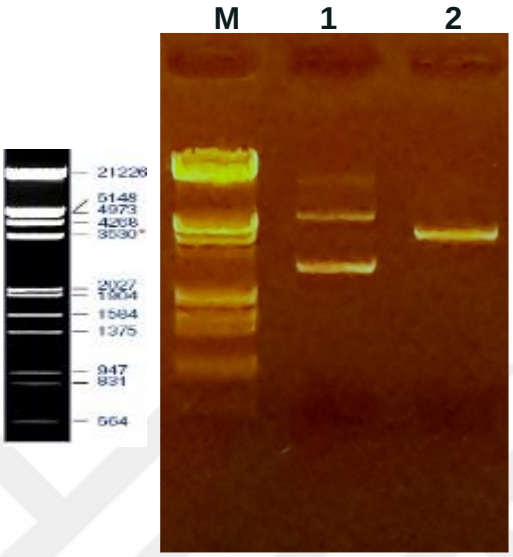
6.1.2 HA ve NA Kodlayan Bakteri Ekspresyon Vektörlerinin Oluşturulması ile İlgili Veriler

Çalışmada influenza virüsü genleri T7 bakteriyofajı RNA polimerazı promotörü ve *E. coli* Lac promotörü kontrolünde klonlanarak farklı ekspresyon vektörleri oluşturuldu. Bunun için bu promotör dizilerine sahip pGFP ve pET-14b plazmit vektörlerinden yararlanıldı.

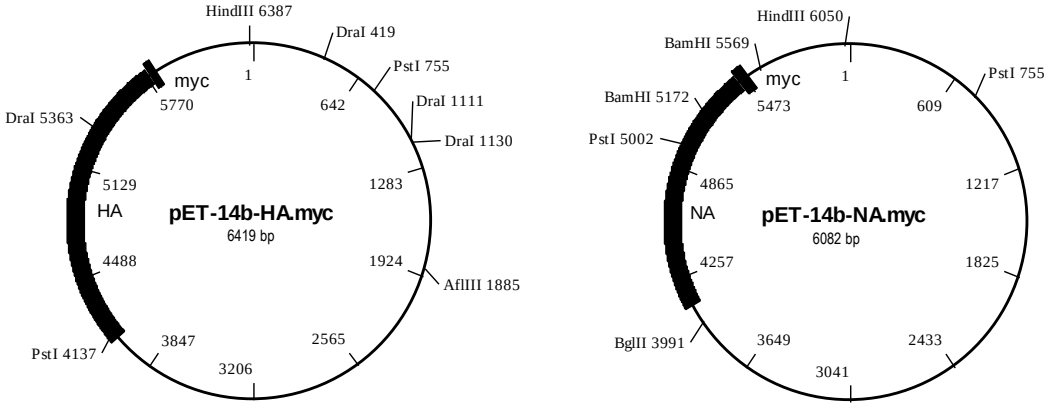
pET-14b Bakteri Ekspresyon Vektörünün Oluşturulması ile İlgili Veriler

Myc uzantısı taşıyan geri primerler kullanılarak elde edilen myc uzantılı viral genler (Şekil 20B) pET-14b bakteri ekspresyon vektöründe T7 RNA polimeraz enzimi promotör dizisi kontrolünde klonlandı. Bunun için pET-14b plazmit DNA'sı *Nco*I restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirildi. Kesilen DNA örneği %1'lik agaroz jel kullanılarak elektroforezi ile kontrol edildi (Şekil 21). Kesilerek doğrusal hale getirilen DNA sırası ile Klenow enzimi ve alkalen fosfataz

enzimleri ile muamele edilerek küt uçlu defosforillenmiş plazmit DNA'ları elde edildi. Hazırlanan plazmit DNA'ları, PZR ile çoğaltılan HA.myc ve NA.myc DNA fragmentleri ile ligasyona uğratılarak Şekil 22'de restriksiyon haritaları verilen pET-14b-HA.myc ve pET-14b-NA.myc bakteri ekspresyon vektörleri oluşturuldu.

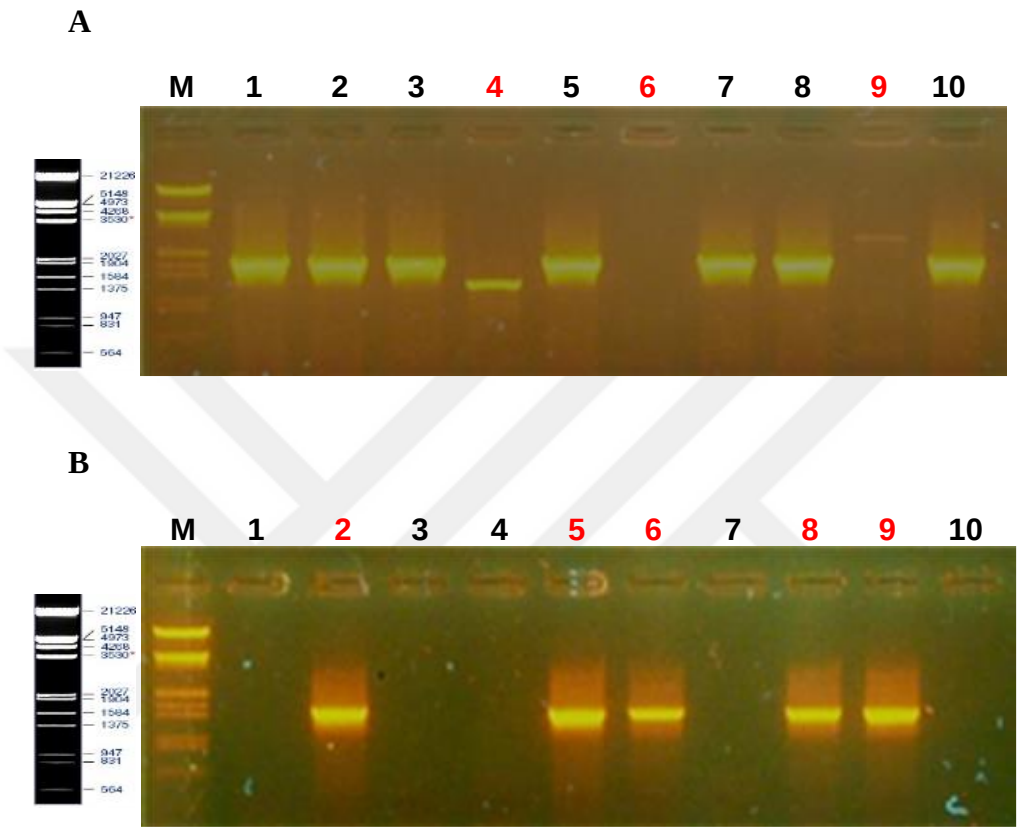


Şekil 21. *Nco*I restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirilen pET-14b plazmitinin agaroz jel elektroforezi ile kontrolü. **1.** Kesilmemiş DNA örneği. **2.** *Nco*I ile kesilmiş DNA örneği. Şekil 20'de verilen elektroforez koşulları uygulandı. M. Standart DNA (λ/*Hind*III+*EcoR*I).



Şekil 22. Myc uzantısı taşıyan İnfluenza virüsü HA ve NA cDNA'larının pET-14b plazmitine klonlanması ile oluşturulan bakteri ekspresyon vektörleri.

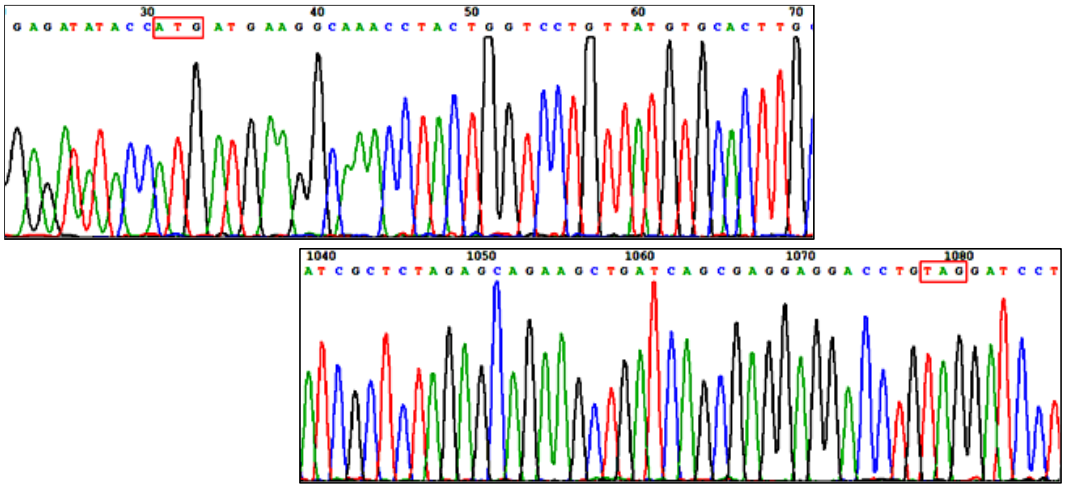
Ligasyondan sonra DNA örnekleri kompetent *E. coli*/Mach1 hücrelerine transforme edildi. Ampisilin içeren katı LB besiyerinde oluşan transformant kolonilerden gelişigüzel seçilen belirli sayıda örnek koloni-PZR ile kontrol edildi (Şekil 23) ve pozitif sonuç veren örneklerden küçük ölçeklerde plazmit DNA'lar hazırlandı.



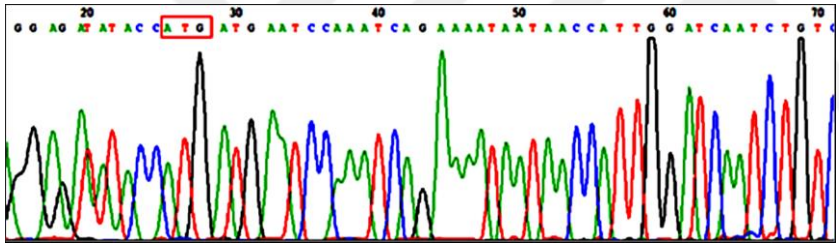
Şekil 23. Transformasyon sonrası LBA (+amp) besiyerinde oluşan kolonilerin HA.myc **(A)** veya NA.myc **(B)** genleri taşıyan rekombinant plazmitler için koloni-PZR ile analizi.1-10. Gelişigüzel seçilen koloni numaralarını göstermektedir. **M.** Standart DNA (λ/*Hind*III+*Eco*RI). Şekil 20'de verilen elektroforez koşulları uygulandı.

Koloni-PZR deneylerinde pozitif sonuç veren örneklerden hazırlanan küçük ölçekte plazmit DNA'lardan her bir vektör için birer örnek DNA dizi analizleri ile kontrol edildi. Şekil 24'de pET-14b plazmitine klonlanan viral genlerin DNA dizi analizi sonuçları verilmiştir. Sonuçlar, influenza HA ve NA genlerinin doğru noktada ve doğru yönde plazmit DNA'sına bağlandığını gösterdi.

A



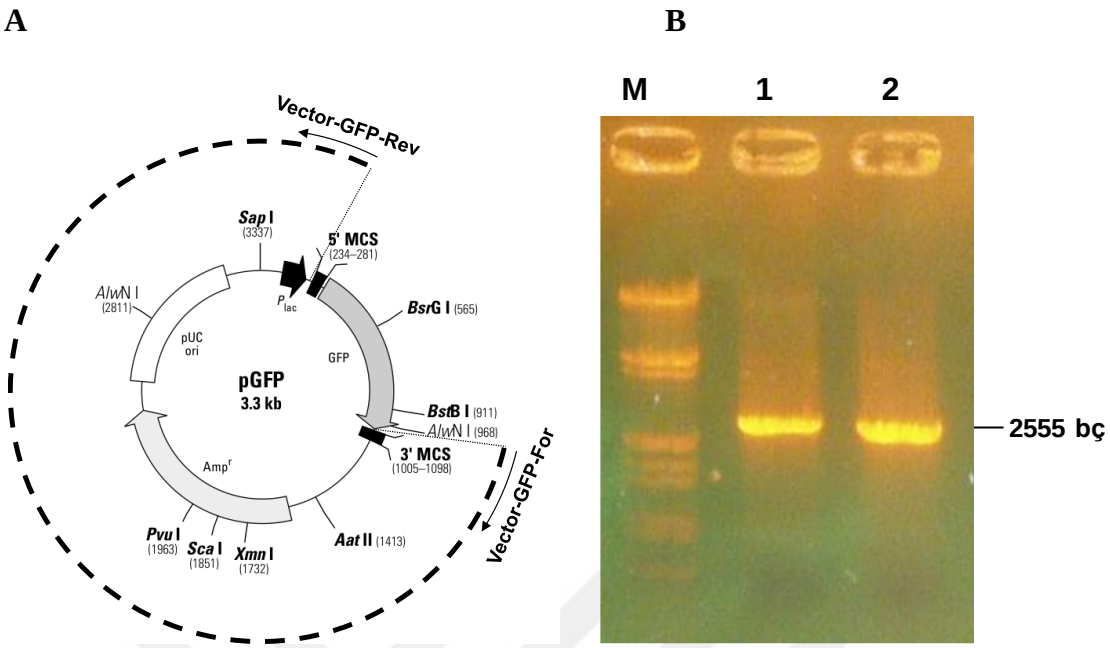
B



Şekil 24. pET-14b-HA.myc **(A)** ve pET-14b-NA.myc **(B)** bakteri ekspresyon vektörüne klonlanan viral genlerin nükleotid dizi analizi kromatogramları. Şekilde sadece viral genlerin plazmit DNA'ya bağlanma bölgelerine ait DNA dizileri verilmiştir.

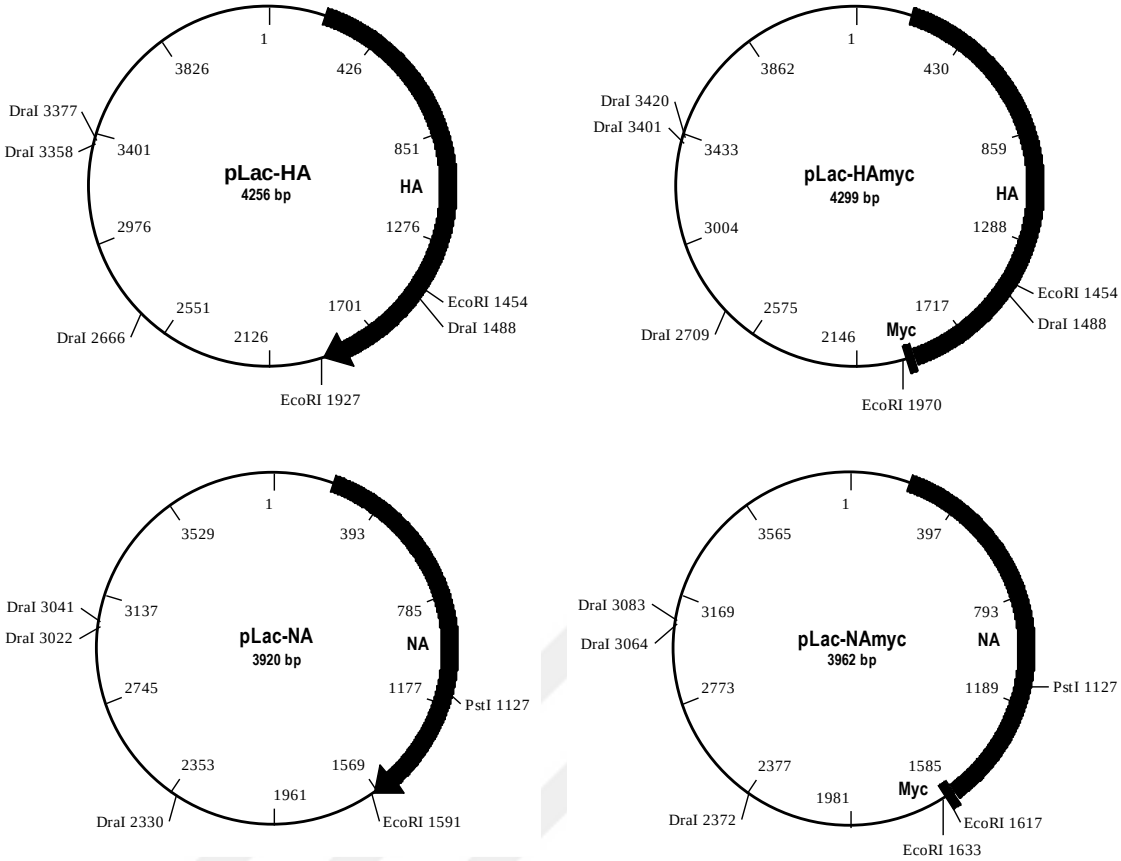
pGFP Bakteri Ekspresyon Vektörünün Oluşturulması ile İlgili Veriler

İnfluenza A virüsünün HA ve NA proteinlerini kodlayan genlerinin *E. coli* Lac promotörü kontrolünde klonlanmasında bu promotör diziyi taşıyan pGFP plazmit vektöründen yararlanıldı. pGFP plazmit Vector-GFP-For/Vector-GFP-Rev primer çifti (Tablo 2) kullanılarak GFP geni açık okuma çerçevesi taşımayan kısmı ters (inverz) PZR tekniği ile çoğaltılarak doğrusal hale getirildi (Şekil 25A). PZR ürünleri % 1'lik agaroz jel kullanılarak jel elektroforezi ile kontrol edildi ve 2555 baz çiftlik beklenen boyutlarda DNA fragmentleri saptandı (Şekil 25B).



Şekil 25. pGFP plazmitinin ters PZR ile çoğaltılan bölgesi **(A)** ve PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile analizi **(B). M**. Standart DNA (λ/*Hind*III+*Eco*RI). Elektroforez işleminde Şekil 20'de verilen koşulları uygulandı.

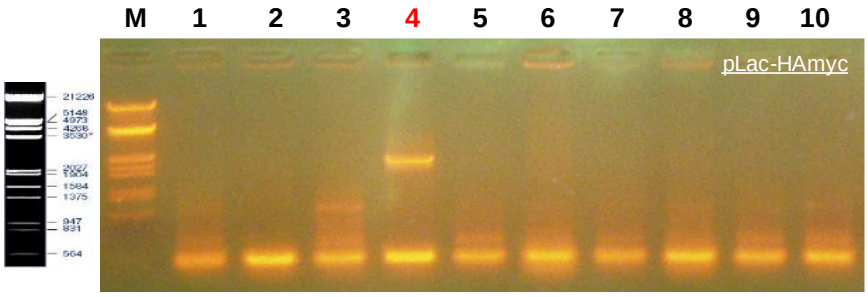
Ters PZR ile çoğaltılan, Lac promotör dizisi de taşıyan plazmit DNA'ları agaroz jel elektroforezi ile saflaştırıldı ve yukarıda açıklandığı şekilde hazırlanan İnfluenza A virüsü HA ve NA genleri ile ligasyona uğratıldı. Ligasyon sonucunda Şekil 26'da restriksiyon haritaları verilen pLac-HA, pLac-HA.myc, pLac-NA ve pLac-NA.myc plazmit vektörleri oluşturuldu.



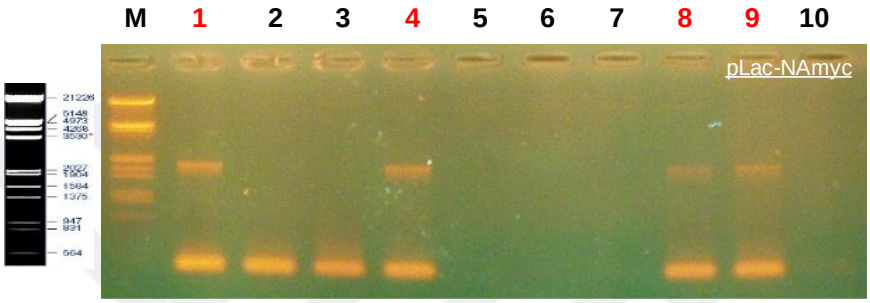
Şekil 26. İnfluenza A virüsü HA ve NA genlerinin Lac promotörü kontrolünde klonlanması ile elde edilen *E. coli* ekspresyon vektörlerinin restriksiyon haritaları.

Ligasyon ve transformasyondan sonra doğru plazmit taşıyan bakteri kolonileri, koloni-PZR ile belirlendi. PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile analizi sonucunda beklenen boyutlarda DNA fragmentleri elde edildi (Şekil 27).

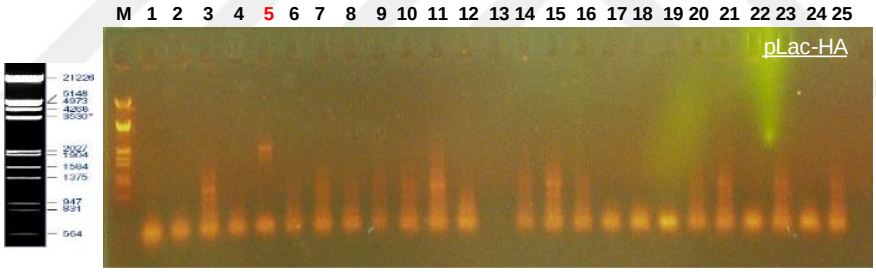
A



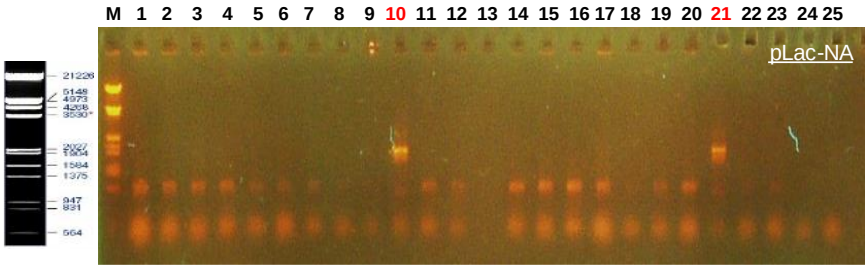
B



C

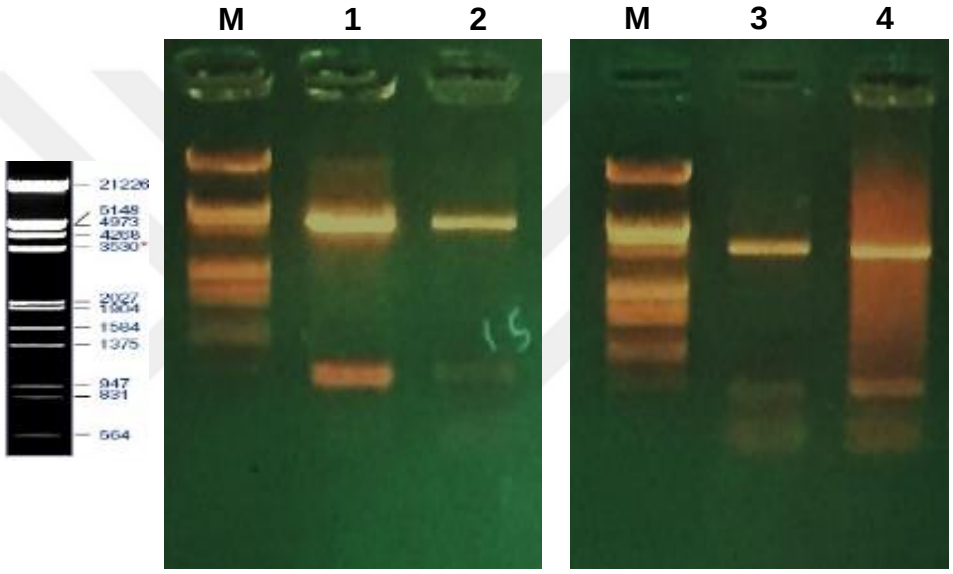


D



Şekil 27. Transformasyon sonrası LBA (+amp) besiyerinde oluşan kolonilerin, pLac-HA.myc **(A),** pLac-NA.myc **(B),** pLac-HA **(C)** ve pLac-NA **(D)** rekombinant plazmitleri için koloni-PZR analizi. 1-25. Gelişigüzel seçilen koloni numaralarını göstermektedir. **M.** Standart DNA (λ/*Hind*III+*Eco*RI). Elektroforez işleminde Şekil 20'de verilen koşullar uygulandı.

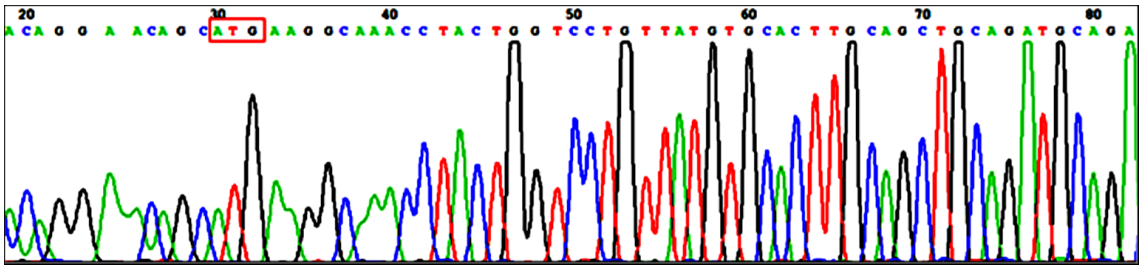
Koloni-PZR ile pozitif sonuç veren kolonilerden hazırlanan plazmit DNA'lar ilk aşamada restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek oluşan DNA fragmentleri agaroz jel elektroforezi tekniği ile analiz edildi. Agaroz jel üzerinde *Eco*RI enzimi ile kesilen pLac-HA plazmiti için 3783 ve 473 bç boyutlarda; aynı enzim ile kesilen pLac-HA.myc plazmiti için 3783 ve 515 bç boyutlarda; *Eco*RI ve *Pst*I enzimleri ile kesilen pLac-NA plazmiti için 3456 ve 464 bç boyutlarda; aynı enzimler ile kesilen pLac-NA.myc plazmiti için ise 3472 ve 490 bç. boyutlarda beklenen DNA fragmentleri gözlendi (Şekil 28).



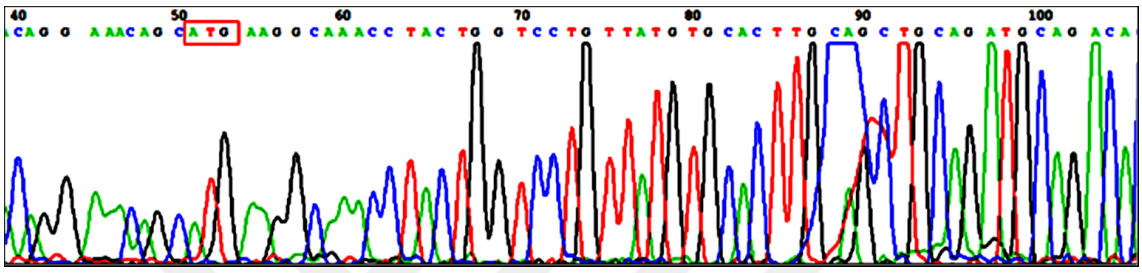
Şekil 28. Koloni-PZR ile pozitif sonuç veren kolonilerden hazırlanan pLac-HA **(1)** ve pLac-HA.myc **(2)** plazmitlerinin *Eco*RI restriksiyon enzimi ile; pLac-NA **(3)** ve pLac-NA **(4)** plazmitlerinin *Eco*RI/*Pst*I restriksiyon enzimleri ile kesilerek agaroz jel elektroforezi. **M**. Standart DNA (λ/*Hind*III+*Eco*RI). Elektroforez işleminde Şekil 20'de verilen koşullar uygulandı.

Koloni-PZR ve sonrasında restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek kontrol edilen plazmitlerden seçilen birer örnek DNA dizi analizleri ile de kontrol edildi (Şekil 29). Elde edilen sonuçlar tasarlanan vektörler ile birebir benzer olduğunu göstedi.

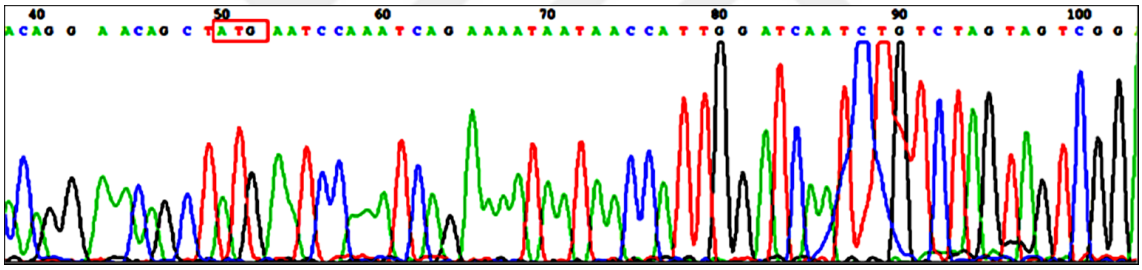
A



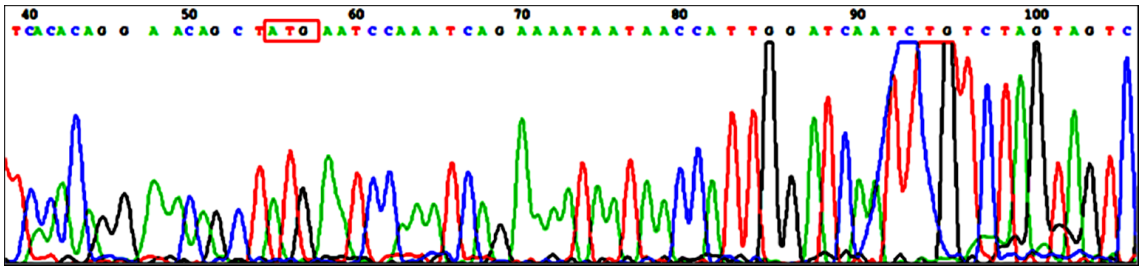
B



C



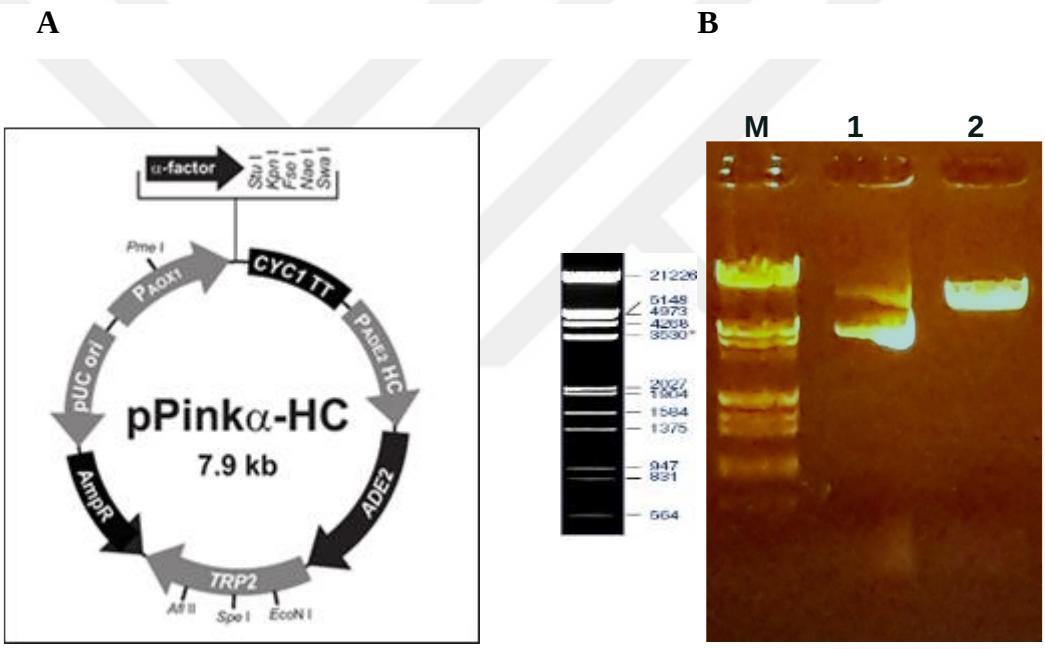
D



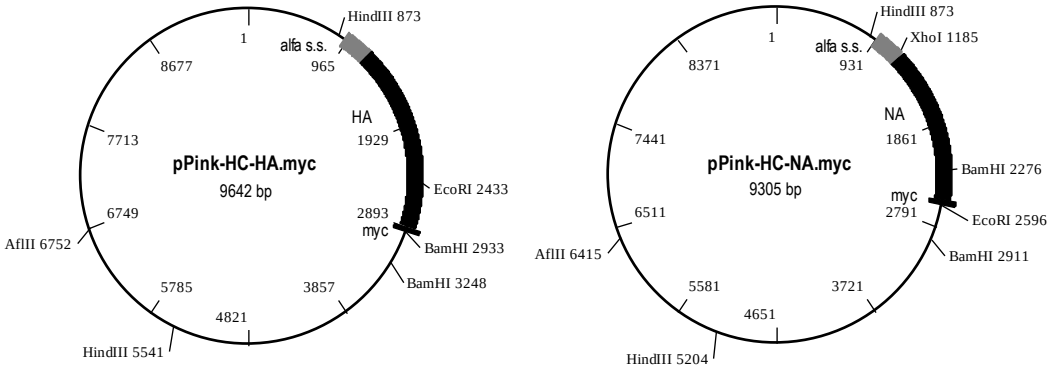
Şekil 29. pLac-HA **(A),** pLac-HA.myc **(B),** pLac-NA **(C)** ve pLac-NA.myc **(D)** bakteri ekspresyon vektörüne klonlanan viral genlerin nükleotid dizi analizi kromatogramları. Şekilde sadece viral genlerin plazmit DNA'ya bağlanan 5′-bölgelerine ait DNA dizileri verilmiştir.

6.1.3 HA ve NA Kodlayan Maya Ekspresyon Vektörlerinin Oluşturulması ile İlgili Veriler

P. pastoris maya hücrelerinin İnfluenza A virüsü HA ve NA proteinlerini sentez edebilme potansiyellerini belirlemek amacıyla, bu hücrelerde heterolog protein sentezi için geliştirilen pPinkα-HC plazmitinden yararlanıldı. Myc uzantısı kodlayıcı dizi taşıyan HA ve NA genleri pPinkα-HC plazmitinde, alfa faktör sinyal dizisi kodlayan diziden hemen sonra klonlandı. Bunun için pPinkα-HC plazmiti *Stu*I enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirildi (Şekil 30). Doğrusal hale getirilen plazmit DNA'ları PZR ile çoğaltılan HA.myc ve NA.myc DNA fragmentleri ile ligasyona uğratıldı. Şekil 31'de restriksiyon haritaları verilen vektörler elde edildi.



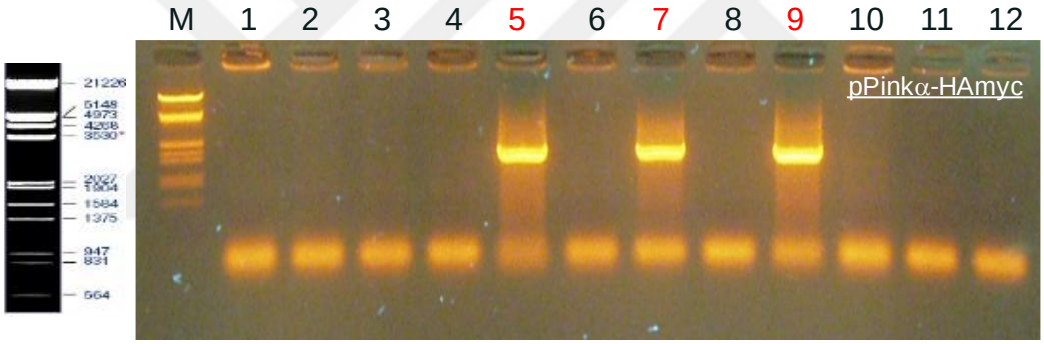
Şekil 30. pPinkα-HC plazmit haritası **(A)** ve *Stu*I restriksiyon enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirilen pPinkα-HC plazmit DNA'sının agaroz jel elektroforezi ile kontrolü **(B)**. **1**. Kesilmemiş plazmit DNA örneği. **2**. Doğrusal hale getirilen plazmit DNA. **M**. Standart DNA (λ/*Hind*III+*Eco*RI). Elektroforez işleminde Şekil 20'de verilen koşullar uygulandı.



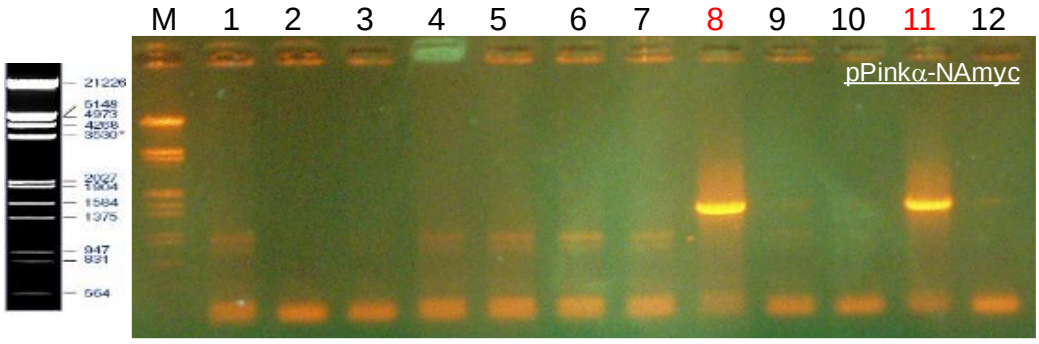
Şekil 31. İnfluenza A virüsü HA ve NA genlerinin pPinkα-HC plazmitine klonlanması ile elde edilen maya ekspresyon vektörlerinin restriksiyon haritaları.

Oluşturulan diğer plazmit örneklerinde olduğu gibi, viral gen taşıyan transformant kolonileri de koloni-PZR ile kontrol edildi (Şekil 32).

A

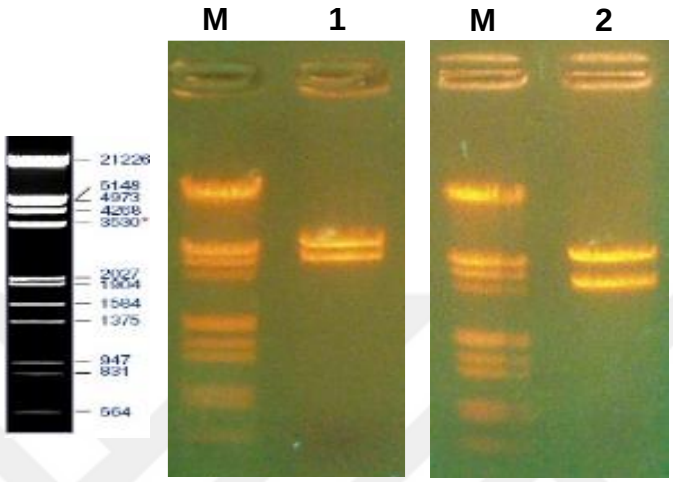


B



Şekil 32. Transformasyon sonrası LBA (+amp) besiyerinde oluşan kolonilerin, pPinkα-HA.myc **(A)** ve pPinkα-NA.myc **(B)** rekombinant plazmitler için koloni-PZR ile analizi. **1-12.** Gelişigüzel seçilen kolonileri göstermektedir. **M.** Standart DNA (λ/*Hind*III+*Eco*RI). Elektroforez işleminde Şekil 20'de verilen koşullar uygulandı.

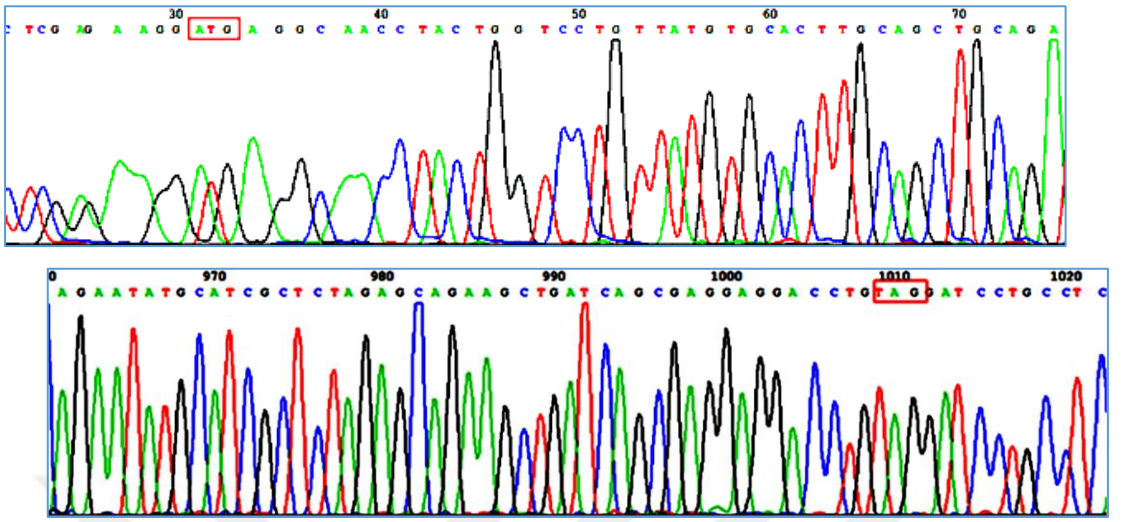
Koloni-PZR testlerinde pozitif sonuç veren kolonilerden hazırlanan DNA örnekleri *Eco*RI/*Afl*II restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek agaroz jel elektrofrezi ile ikinci kez kontrol edildi (Şekil 33). Enzim kesimi sonucunda pPinkα-HA.myc için 5323 bç ve 4319 bç boyutlarda; pPinkα-NA.myc için 5486 bç ve 3819 bç boyutlarında beklenen DNA fragmentleri elde edildi.



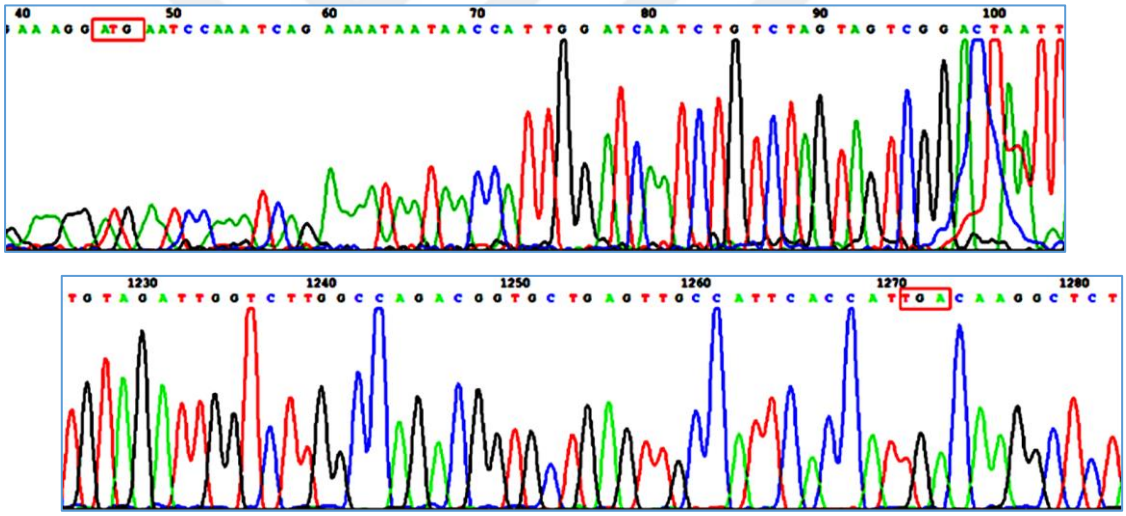
Şekil 33. İnfluenza A virüsü HA ve NA genleri klonlanan maya ekspresyon vektörlerinin restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesilerek kontrol edilmesi.**1**. pPinkα-HA.myc (*Eco*RI+*Afl*II). **2.** pPinkα-NA.myc (*Eco*RI+*Afl*II). **M**. Standart DNA (λ/*Hind*III+*Eco*RI). Elektroforez işleminde Şekil 20'de verilen koşullar uygulandı.

Maya ekspresyon plazmitleri de **5.16.10**'da anlatıldığı gibi PEG/NaCl ile kısmen saflaştırıldıktan sonra DNA dizi analizleri ile kontrol edildi (Şekil 34). Elde edilen sonuçlar, kromatogramların tasarlanan vektörlerin dizileri ile birebir aynı olduğunu ortaya koydu.

A



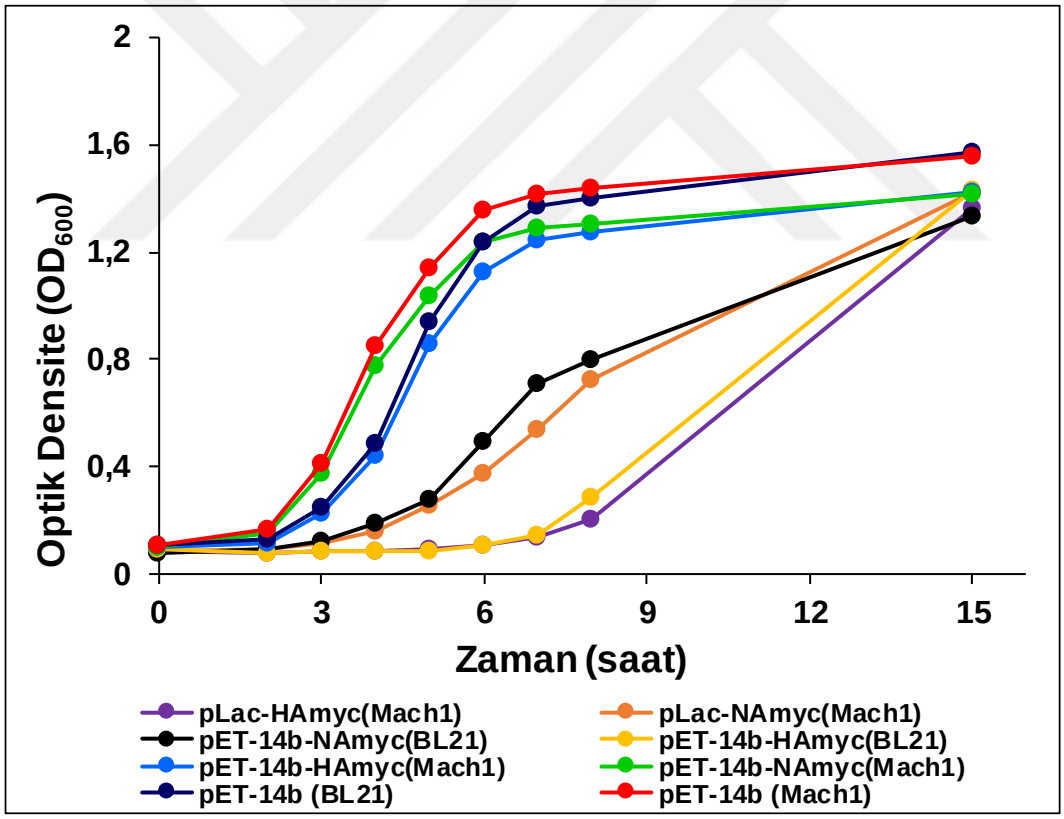
B



Şekil 34. pPinkα-HA.myc **(A)** ve pPinkα-NA.myc **(B)** maya ekspresyon vektörüne klonlanan viral genlerin nükleotid dizi analizi kromatogramları. Şekilde sadece viral genlerin plazmit DNA'ya bağlanan bölgelere ait DNA dizileri verilmiştir.

6.2 HA ve NA Proteini Kodlayan Plazmit Aktarılan Bakterilerin Üreme Profilleri ile İlgili Veriler

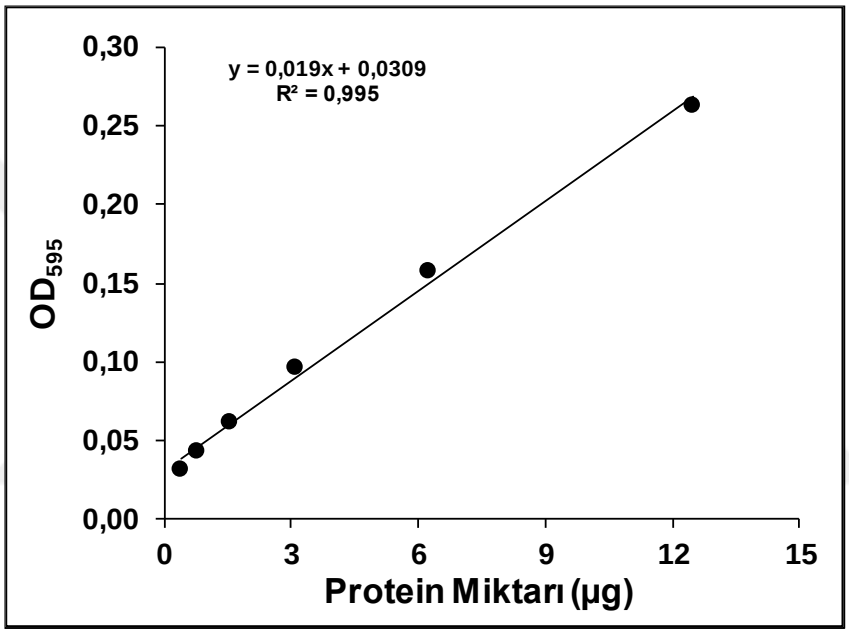
6.1.2'de belirtildiği gibi viral genlerin *E. coli* Lac promotörü ve bakteriyofaj T7 RNA polimeraz enzimi promotörü kontrolünde klonlanması ile elde edilen bakteri ekspresyon vektörlerinin, dolayısıyla bu vektörler üzerinden sentez edilen HA.myc ve NA.myc proteinlerinin *E. coli*/Mach1 ve *E. coli*/BL21 bakterilerinin üremeleri üzerine etkileri belirlendi. Bakteriyofaj T7 promotörü kontrolünde viral gen taşıyan plazmitler ile transforme edilen ve T7 RNA polimeraz enzimi sentez etmeyen *E. coli*/Mach1 hücrelerinin normal üreme gösterdiği saptandı. Buna karşın T7 RNA polimeraz enzimi sentez eden *E. coli*/BL21 hücrelerinin üreme hızında önemli bir yavaşlama kaydedildi. Diğer taraftan Lac promotörü kontrolünde viral gen taşıyan plazmitler *E. coli*/Mach1 hücrelerinin çoğalmasında da yavaşlamaya neden oldu (Şekil 35).



Şekil 35. İnfluenza A virüsü HA ve NA genleri klonlanan bakteri ekspresyon plazmitleri ile transforme edilen *E. coli*/Mach1 ve *E. coli*/BL21 bakterilerinin LB (+amp) besiyerinde gösterdikleri üreme eğrileri. Kültürler 37 °C'da, 180 dev/dak çalkalama hızında inkübe edildi.

6.3 Protein Miktar Tayini ile İlgili Veriler

Viral proteinlerin SDS-PAGE/Western melezleme teknikleri ile analizinde hücrelerden hazırlanan lizatlarındaki total protein miktarları Bradford metodu ile belirlendi. Bradford metodu için, belirli miktarlarda bovin serum albümin - fraksiyon V kullanılarak protein standart grafiği hazırlandı (Şekil 36). Standart protein grafiği üzerinden elde edilen eğim formülünden bilinmeyen hücre lizatlarında total protein miktarları belirlendi. Uygulanan koşullarda hazırlanan hücre lizatlarında protein miktarları ortalama 1-2 mg/ml olarak belirlendi.

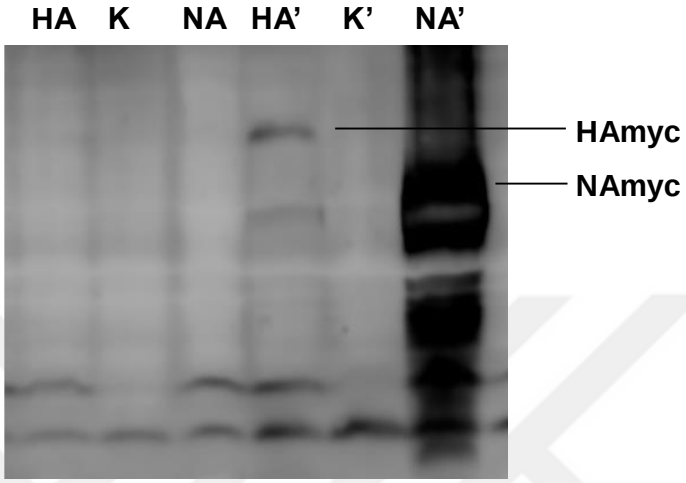


Şekil 36. Bradford metodu ile BSA (bovin serum albümin, fraksiyon V) kullanılarak hazırlanan protein standart grafiği.

6.4 Bakteri Hücrelerinde HA ve NA Proteinlerinin Sentezi ile İlgili Veriler

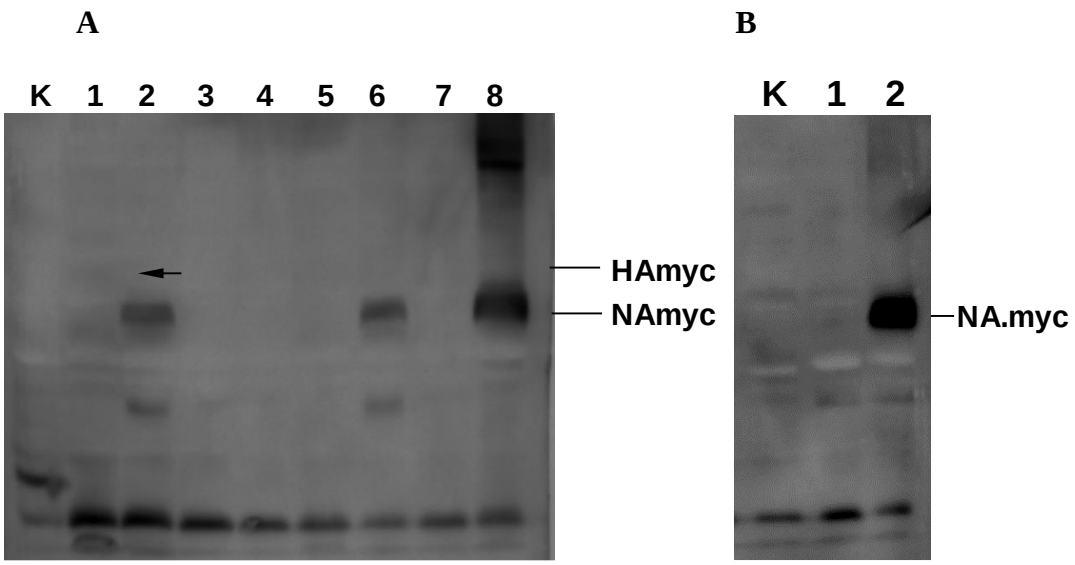
İnfluenza virüsü HA ve NA proteinlerini bakteri hücrelerinde sentez etmek *için E. coli*/Mach1, *E. coli*/Top10, *E. coli*/JM107 ve *E. coli*/BL21 suşlarından yararlanıldı. Şekil 35'te verildiği gibi viral genleri taşıyan plazmitler ile transforme edilen bazı *E. coli* hücreleri sıvı besi ortamlarında çok düşük hızlarda üreme gösterdi. Bu nedenle hem sıvı LB besiyerlerinde hem de katı LBA besiyerlerinde üretilen bakteri hücreleri viral proteinler için analiz edildi. Farklı suşlar denenmekle birlikte *E. coli*/Mach1 ve *E. coli*/BL21 suşlarından daha iyi sonuçlar alındığı için, bu suşlar ile ilgili veriler sunuldu, diğer suşlarla yapılan deney sonuçları değerlendirmeye alınmadı. Şekil 37'de bakteriyofaj T7 promotörü kontrolünde viral gen taşıyan plazmitler ile transforme

edilen *E. coli*/BL21 hücrelerinin viral proteinleri için Western melezleme ile analiz sonuçları görülmektedir. Elde edilen sonuçlar katı besiyerinde üretilen hücre lizatlarında myc uzantılı viral proteinlerin varlığını gösterdi. Bununla birlikte myc uzantılı HA proteini miktarının çok düşük düzeylerde olduğu saptandı. Sıvı besiyerlerinde üretilen hücrelerde viral proteinler belirlenemedi.



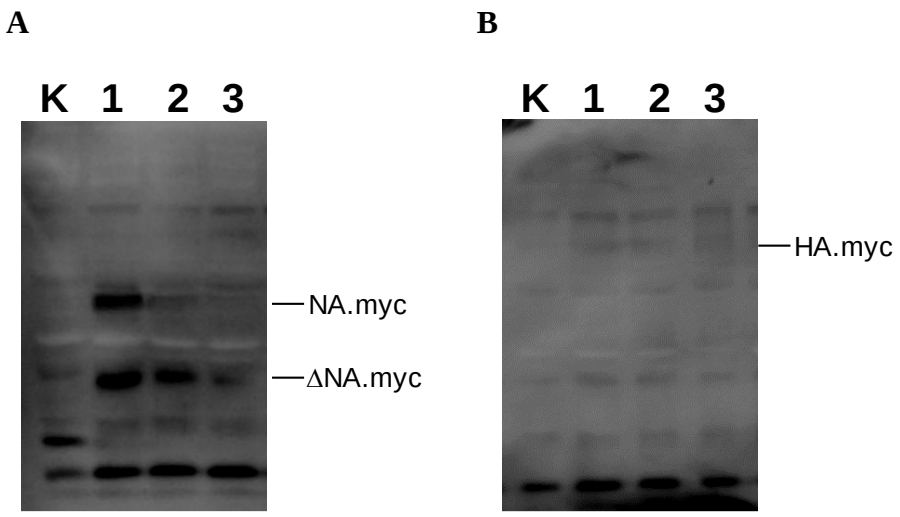
Şekil 37. pET-14b-NA.myc ya da pET-14b-HA.myc ile transforme edilen, sıvı (**HA, K, NA**) ya da katı besiyerinde (**HA´, K´, NA´**) üretilen *E. coli* /BL21 hücrelerinde viral proteinlerin SDS-PAGE/ Western melezleme tekniği ile analizi. **K** ve **K´.** plazmit taşımayan bakteri lizatları.

Şekil 38'de, bakteriyofaj T7 RNA polimerazı promotörü ya da *E. coli* Lac promotörü kontrolünde viral gen taşıyan plazmitler ile transforme edilen *E. coli*/Mach1 ve *E. coli*/BL21 bakteri suşlarında, viral proteinlerin SDS-PAGE/Western melezleme sonuçları verilmiştir. Elde edilen veriler influenza virüsü HA proteini sentezinin, genin klonlandığı promotör tipine ya da bakteri suşuna bağlı olmaksızın, yok denecek kadar düşük düzeylerde olduğunu gösterdi. Myc uzantısı taşıyan NA proteinlerinin ise her iki bakteri suşunda da Lac promotörü kontrolünde klonlanan gen üzerinden sentez edildiği, T7 promotörü kontrolündeki genin ise beklendiği şekilde sadece *E. coli*/BL21 bakteri suşunda ekspresyon yaptığı saptandı (Şekil 38A). pLac-NA.myc plazmiti taşıyan bakteri suşundan hazırlanan lizatlarda beklenen büyüklükte (50~kD) NA.myc proteini ile birlikte, daha küçük (30~kD) bir protein bandı da saptandı. Küçük protein bandı, pET-14b-NA.myc plazmiti taşıyan bakteri suşlarına ait lizatlarda görülmedi (Şekil 38B)



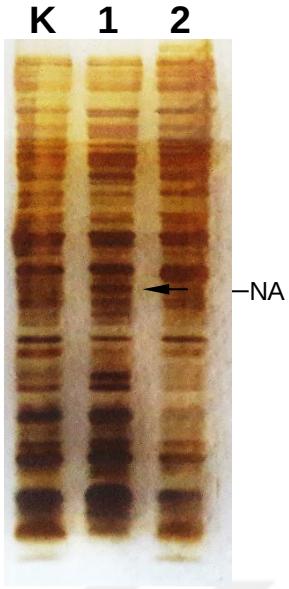
Şekil 38. Farklı bakteri ekspresyon plazmitleri ile transforme edilen *E. coli* suşlarında viral protein sentezinin SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile analizi. **A**: K. Bakteri, *E. coli* / Mach1, **1**. pLac-HA.myc / Mach1, **2**. pLac-NA.myc / Mach1, **3**. pET-14b-HA.myc / Mach1, **4**. pET-14b-NA.myc / Mach1, **5**. pLac-HA.myc / BL21, **6.** pLac-NA.myc / BL21, **7**. pET-14b-HA.myc / BL21; **8**. pET-NA.myc / BL21. **B**: **K**. Bakteri *E. coli* / BL21, **1**. pET-14b-NA / BL21, **2**. pET-14b-NA.myc / BL21.

E. coli hücrelerinde doğal koşullarda laktoz operonunu indükleyen IPTG'in *E. coli* hücrelerinde plazmitler üzerinden viral protein sentezine etkileri, katı besiyerine farklı konsantrasyonda IPTG eklenerek belirlendi. IPTG içermeyen, 100 µmol ve 400 µmol final konsantrasyonlarda IPTG içeren besiyerlerinde üretilen hücrelere ait NA.myc ve HA.myc ekspresyon profilleri Şekil 39'da verildi. Elde edilen sonuçlar beklenenin aksine, IPTG varlığında rekombinant NA.myc protein sentezinin negatif yönde etkilendiğini gösterdi. Benzer şekilde pET-14b-HA.myc plazmiti ile transforme edilen *E. coli*/BL21 hücrelerinde de IPTG'in HA.myc ekspresyonu üzerinde olumlu bir etki yapmadığı saptandı (Şekil 39B).



Şekil 39. IPTG içeren ortamlarda üretilen *E. coli* hücrelerinde viral protein sentezinin SDS-PAGE/ Western melezleme tekniği ile analizi. **A**: K. *E.coli* / Mach1, **1**. pLac-NA.myc / Mach1 (-IPTG), **2**. pLac-NA.myc / Mach1 (100 µmol IPTG), **3**. pLac-NA.myc / Mach1 (400 µmol IPTG). **B**: **K**. *E.coli* / BL21, **1**. pET-14b-HA.myc / BL21 (-IPTG), **2**. pET-14b-HA.myc / BL21 (100 µmol IPTG), **3**. pET-14b-HA.myc / BL21 (400 µmol IPTG).

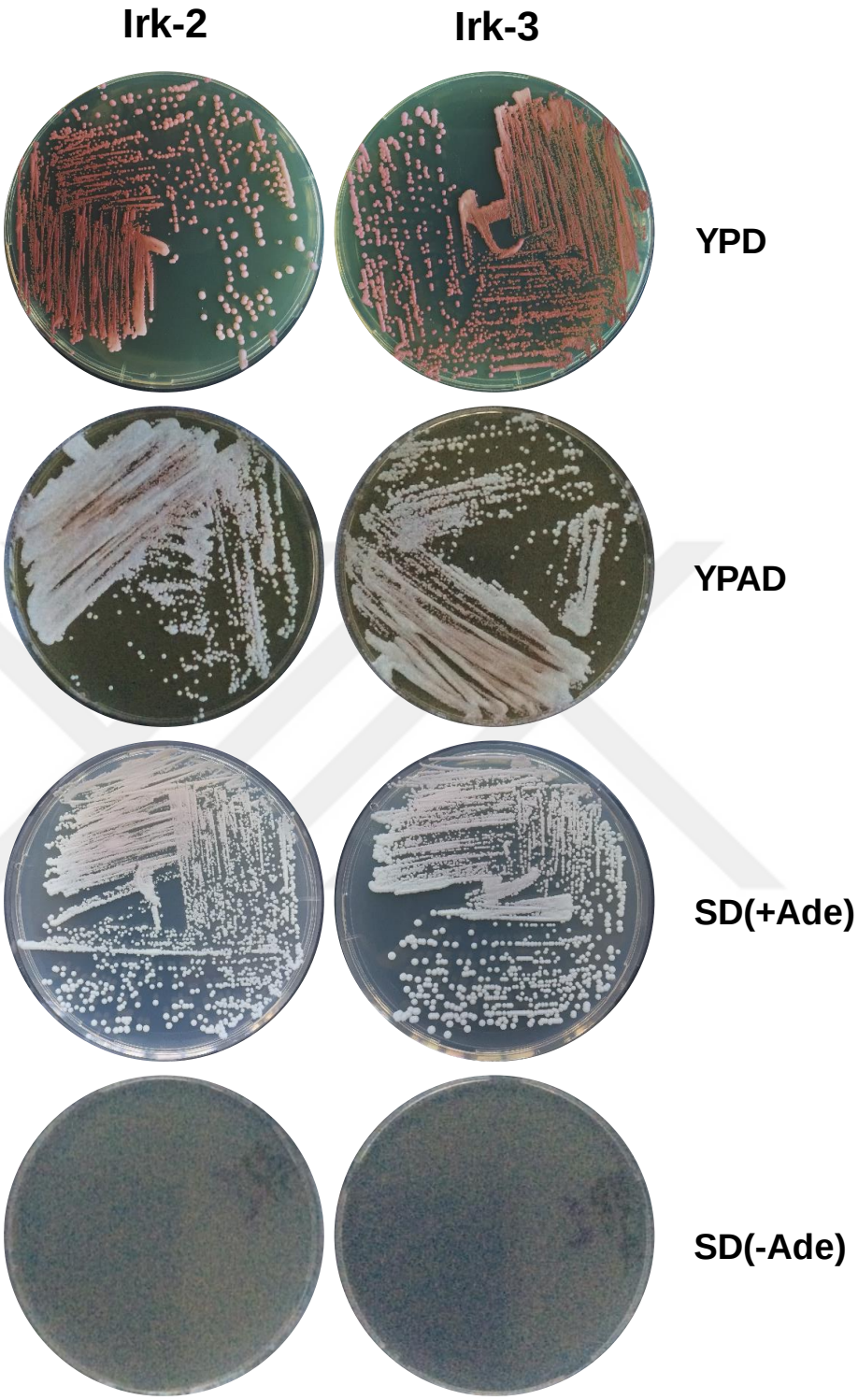
Myc uzantısı taşımayan viral proteinleri kodlayan pLac-NA ve pLac-HA plazmit vektörlerinin *E. coli* / Mach1 hücrelerinde ekspresyon yapıp yapmadıkları SDS-PAGE sonrası örneklerin gümüş boyama tekniği ile boyanması ile incelendi (Şekil 40). Myc uzantısı taşımayan NA proteini ayrı bir bant olarak saptanırken, HA proteini belirlenemedi.



Şekil 40. pLac-NA ve pLac-HA plazmit vektörleri ile transforme edilen *E. coli*/Mach1 hücrelerinde viral proteinlerin SDS-PAGE / Gümüş boyama tekniği ile analizi. **K**. *E. coli* / Mach1, **1**. pLac-NA / Mach1, **2**. pLac-HA / Mach1.

6.5 *P. pastoris* Maya Irklarının Kontrolüne İlişkin Veriler

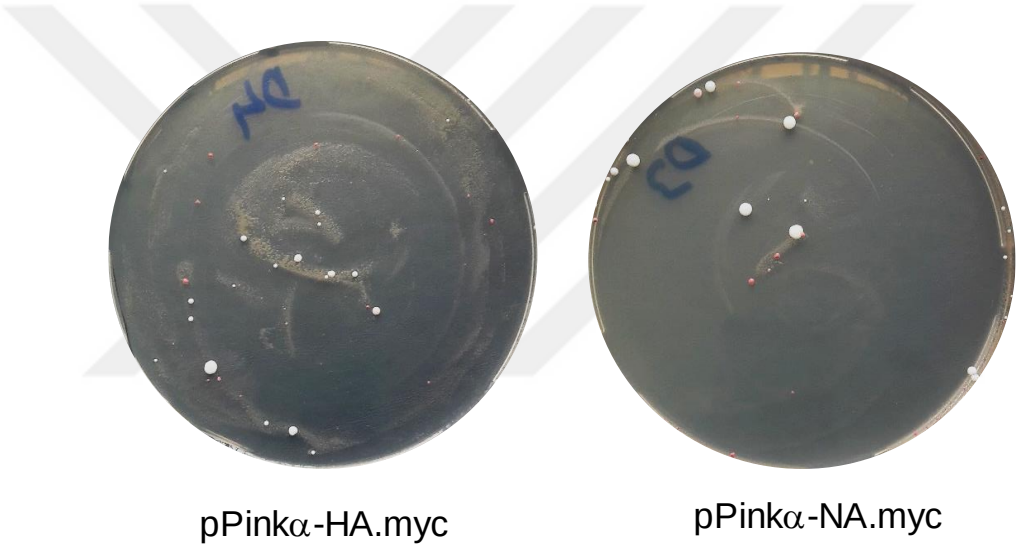
P. pastoris, hızlı çoğalabilen ve methilotropik (metanol ve metanı karbon kaynağı olarak kullanabilen) bir organizmadır. Bu özelliklerinden dolayı heterolog protein üretimi çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Bu tez çalışması kapsamında *P. pastoris'*in influenza virüsü HA ve NA proteinlerini sentez edebilme potansiyeli de araştırıldı. Çalışmada yararlanılan *P. pastoris* ırkları ade1 geni bakımından mutanttır. Bu gen transformant mayaların seleksiyonuna olanak sağlamaktadır. Diğer taraftan adenin içermeyen zengin besiyerlerinde de pembe koloniler oluşturmaktadır. Viral gen taşıyan plazmitler ile transforme edilmeden önce maya ırkları, YPD, YPAD, SD (-Ade) ve SD (+Ade) besiyerlerine ekilerek üremeleri kontrol edildi. Şekil 41'de görüldüğü gibi *P. pastoris* ırk2 ve ırk3 hücrelerinin adenin içeren zengin besiyerinde (YPAD) ve sentetik dekstoz besiyerinde (SD +Ade) beyaz koloniler oluşturduğu, adenin içermeyen zengin besiyerinde (YPD) ise pembe koloniler oluşturduğu saptandı. Buna karşın adenin içermeyen sentetik dekstoz besiyerinde (SD -Ade) üreme gözlenmedi.



Şekil 41. *P. pastoris* Irk-2 ve Irk-3 hücrelerinin farklı besi ortamlarında üreme özellikleri.

6.6 *P. pastoris* Maya Irklarının Transformasyonu ile İlişkin Veriler

P. pastoris hücrelerinin viral gen aktarılan pPinkα-HC plazmitleri ile transformasyonunda Lityum asetat/PEG ve elektroporasyon yöntemi olmak üzere iki farklı yöntem denendi. Transformasyondan sonra tamponlanmış fizyolojik tuzlu su içerisinde süspanse edilen hücreler SD(-Ade) besiyerine ekildi ve kültürler 5-7 gün boyunca 30°C'da inkübe edildi. Transformasyon deneylerinde elektroporasyon tekniği ile daha verimli sonuçlar elde edildi. Lityum asetat/PEG ile yapılan transformasyon deneylerinde beklenen sonuçlar alınamadı. Şekil 42'de elektroporasyon tekniği ile pPinkα-NA.myc ve pPinkα-HA.Myc plazmitleri ile transforme edilen *P. pastoris* ırk-2 hücrelerinin seçici besiyerinde oluşturdukları koloniler görülmektedir.

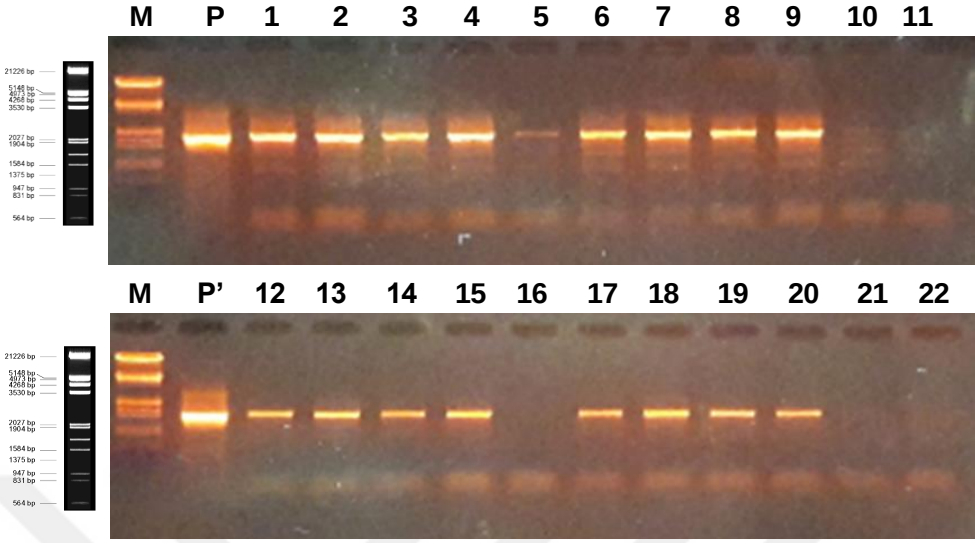


Şekil 42. Elektroporasyon tekniği ile pPinkα-HA.myc ve pPinkα-NA.Myc plazmitleri ile transforme edilen *P. pastoris* ırk-2 hücrelerinin seçici besiyerinde oluşturdukları koloniler.

6.7 Transformant Maya Irklarının HA ve NA Genleri için Kontrolü ile İlişkin Veriler

SD(-ade) seçici katı besiyerinde koloni oluşturan *P. pastoris* transformantlarının viral gen taşıyıp taşımadıkları PZR ile belirlendi. Bunun için elektroporasyon tekniği ile transforme olmuş maya transformant kolonilerden genom DNA izolasyonu yapıldı. DNA örnekleri kalıp olarak kullanılarak HA ve NA genlerine özgü primerler ile PZR gerçekleştirildi. PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile incelendi (Şekil 43). Elde edilen sonuçlar, beyaz renkte koloniler oluşturan transformantların viral genleri

taşıdığını gösterdi. Daha küçük ve pembe renkte kolonilerin ise viral genleri taşımadığı saptandı.



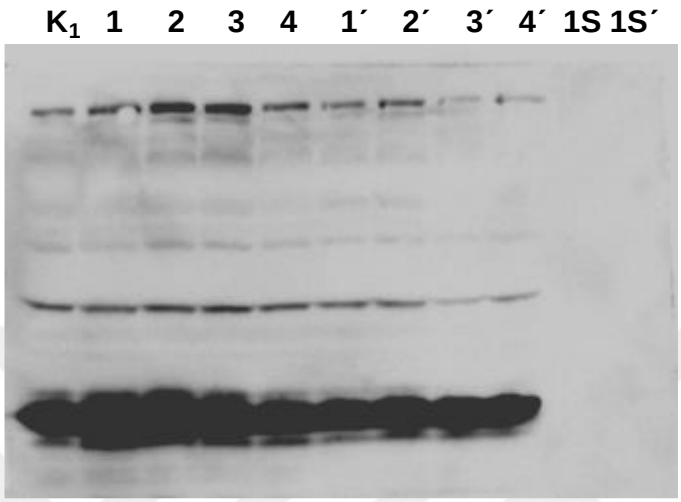
Şekil 43. Elektroporasyon tekniği ile transforme edilen *P. pastoris* maya kolonilerinden elde edilen genom DNA'larının HA ve NA genleri için PZR ile analiz edilmesi.**P**. Plazmit (pPinkα-HA.myc); **1-5**. pPinkα-HA.myc ile transforme edilen *P. pastoris* ırk-2 kolonileri; **6-10.** pPinkα-HA.myc ile transforme edilen ırk-3 kolonileri; P′. Plazmit (pPinkα-NA.myc); **13-16**. pPinkα-NA.myc ile transforme edilen *P. pastoris* ırk-2 kolonileri; **17-23**. pPinkα-NA.myc ile transforme edilen ırk-3 transformant kolonileri; **11**. Transforme olmamış *P. pastoris* ırk-2; **22**. Transforme olmamış *P. pastoris* ırk-3. **5, 10, 16** ve **21**. örnekler pembe renkte kolonilerden izole edilen DNA'lar kalıp olarak kullanılarak gerçekleştirilmiştir. **M**. Standart DNA (λ/*Hind*III+*Eco*RI).

6.8 Maya Hücrelerinde HA ve NA Proteinlerinin Sentezi ile İlgili Veriler

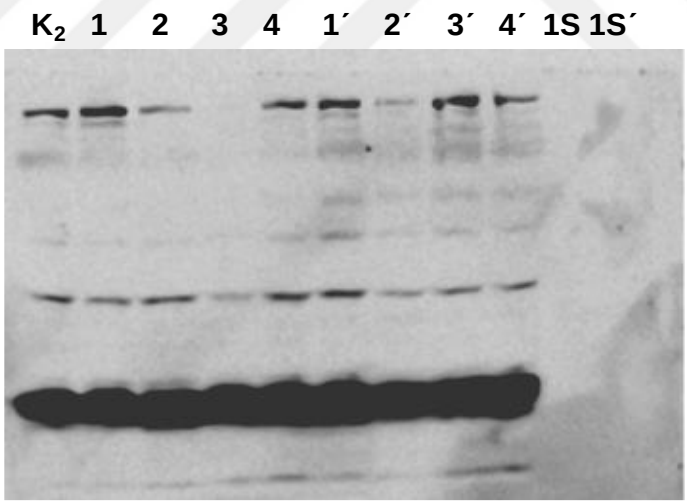
PZR ile İnfluenza virüsü geni taşıdığı saptanan maya kolonilerin (bk. Şekil 42) metanol içeren BMMY besiyerinde üretilmesi ile hazırlanan kültürlerde, hücrelerde viral proteinlerin sentez edilip edilmediği poliakrilamid jel elektroforezi ve sonrasında Western melezleme teknikleri ile incelendi. Şekil 43'de, PZR ile yapılan kontrollerde pozitif sonuç veren maya kolonilerinden hazırlanan lizatların ve iki koloninin üretildiği besi ortamının viral proteinler için Western melezleme ile analiz sonuçları verilmiştir. Anti-myc antikoru kullanılarak yapılan Western melezleme deneyleri sonucunda elde edilen veriler karşılaştırıldığında, transforme olmuş maya lizatlarında beklenen büyüklüklerde viral proteinler belirlenemedi. Tüm örneklerde saptanan farklı

büyüklüklerde protein bantlarının özellikle HRP konjuge sekonder antikorun spesifik olmayan bağlanmalarından kaynaklandığı saptandı.

A



B



Şekil 44. pPinkα-HA.myc (**A**) ve pPinkα-NA.myc (**B**) plazmitleri ile transforme edilen *P. pastoris* ırk2 (1-4) ve ırk3 (1´-4´) hücrelerinden hazırlanan lizatların SDS-PAGE / Western melezleme tekniği ile analiz edilmesi. **K_1**. Plazmit taşımayan *P. pastoris* ırk-2 hücre lizatı. **K_2**. Plazmit taşımayan *P. pastoris* ırk-3 hücre lizatı. **1S** ve **1S´. 1** ve **1´** no'lu maya örneklerinin üretildiği besi ortamları. Deneylerde primer antikor olarak fare monoklonal anti-myc antikoru, sekonder antikor olarak ise biyotin konjuge anti-fare IgG antikoru kullanıldı. Görüntülemede SA-HRP (*İng. streptavidin horseradish peroxidase*) kullanıldı.

7 TARTIŞMA

Virüsler, replikasyonları için canlı bir hücreye gereksinim duyan zorunlu hücre içi parazitleridir. Kendi proteinlerini sentez edebilecek translasyon ve protein modifikasyonu gibi mekanizmalara sahip değildirler. İnsan için patojenik özellik taşıyan bakteriler ve mantarlar ile karşılaştırıldığında, virüslerin çoğalmalarını inhibe edecek moleküller için hedef olabilecek virüs özgün olayları çok sınırlı sayıdadır (Samji, 2009). Bu bakımdan, konak hücreler için toksik olmayan antiviral ilaçların sayısı yok denecek kadar azdır. Bu durum influenza virüsleri için de geçerlidir. Günümüzde influenza virüs infeksiyonlarına karşı kullanılan antiviral ilaçlar M2 proteini ve NA proteini inhibitörleri ile sınırlıdır. M2 inhibitörleri amantadin ve türevi bileşiklerdir, sadece A tipi influenza virüslerinde profilaktik olarak etkilidirler (Uhnoo ve diğerleri, 2003). Adamantan türevi (amantadin ve rimantadin) olan bu bileşiklerin, insanlarda enfeksiyon yapan mevsimsel influenza virüs tiplerinin çoğunun bu ilaçlara karşı dirençli olmaları nedeniyle kullanımı önerilmektedir. İnfluenza virüslerinin yüzey antijenlerinden nöraminidaz (NA) enzimini inhibe eden bileşikler ise M2 blokerlerine göre çok daha etkili ilaçlardır. Hem influenza A hem de influenza B virüslerini inhibe edebilmektedirler. Nöraminidaz inhibitörleri enfekte hücrelerde oluşan yeni virüs partiküllerinin serbestleşmesini inhibe eden moleküllerdir (Alymova ve diğerleri, 2005; Holsinger ve diğerleri, 1994; Mendel ve Sidwell, 1998). Enfekte olmuş hücrelerde influenza virüsü bileşenleri (vRNP'ler) hücre membranı üzerinde bir araya gelerek kurulma işlemi gerçekleşir ve tomurcuklanma ile konak hücreden ayrılırlar. Bu aşamada virüsün HA proteinleri, konak hücre membranlarında yer alan sialik asit bakiyelerine bağlanması ile virüsün serbestleşmesini engeller. Viral replikasyonun tamamlanmasında sorun oluşturan bu durum, NA enziminin sialik asit bakiyelerini kesmesi ile ortadan kalkar. NA inhibitörleri, viral replikasyonun tamamlanması için önem taşıyan bu enzimatik reaksiyonu, NA enziminin aktif bölgesine bağlanarak inhibe ederler. Bununla birlikte, influenza virüslerinin genom dinamizmi, NA enziminin aktif bölgesinde de sıklıkla değişmelere neden olmakta ve NA inhibitörlerinin hedef bölgelere bağlanmasını engelleyebilmektedir. Yapılan çalışmalar, kullanımda olan NA inhibitörlerine karşı dirençli virüs tiplerinin yaygınlaştığını göstermektedir (McKimm-Breschkin, 2013; Pires de Mello ve diğerleri, 2018; Ruangrung ve diğerleri, 2016; Wu ve diğerleri, 2016). Dolayısıyla ortaya çıkacak yeni influenza virüs tiplerine karşı, ilaçların da sürekli olarak güncellenmesi gerekmektedir.

İnfluenza virüslerine karşı korunmada uygulanan yöntemlerden biri de aşılardır. Aşılar, insan ve hayvanlarda humoral ve hücresel yoldan aktif bağışıklığı uyararak enfeksiyonlara karşı koruma sağlayan biyolojik maddelerdir. Mikroorganizmalar tarafından oluşturulan hastalıklara karşı vücut, bağışıklık sistemi ile yanıt verir. Bağışıklık sisteminin hastalık etkeni vücuda girmeden etkeni tanıması ve onu yenecek yanıtı oluşturması aşılamanın temel ilkesidir (Lee ve Quan, 2016; Loeffen ve diğerleri, 2011; Ohmit ve diğerleri, 2014). Bazı mikroorganizmalara karşı geliştirilen aşılar uzun süreli bağışıklık sağlarlar. Bu durum influenza virüsleri için geçerli değildir. İnfluenza virüsü aşıları, virüsün hızlı değişmesi nedeniyle, her yıl güncellenen aşılardır (Kidd, 2014). Bir sonraki sezonda uygulanacak virüs aşılarının içeriği Dünya Sağlık Örgütü (WHO: World Health Organization) ile Gıda ve İlaç Yönetimi (FDA: U.S. Food ve Drug Administration) tarafından belirlenmektedir. Bu aşılar, insanlarda dolaşımda olan iki influenza A tipi (H1N1 ve H3N2) ve influenza B virüsünde üretilmektedir. Örneğin Dünya Sağlık Örgütü'nün 2016-2017 sezonu için önerdiği virüs tipleri: A/California/7/2009 (H1N1), A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2) ve B/Brisbane/60/2008 virüsleri ya da benzerleridir (http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2016_17_north/en - Erişim Tarihi: 25.06.2016). İnfluenza virüslerine karşı kullanılan aşıların büyük bir bölümü embriyonlu tavuk yumurtasında üretilen virüslerden elde edilmektedir.

Yirminci yüzyılın son çeyreğinde temelleri atılan rekombinant DNA teknolojileri, moleküler biyoloji ve genetik alanında yapılan çalışmalara büyük bir ivme kazandırırken, uygulamada da tedavi olarak kullanılan rekombinant birçok protein faktör peptit hormonunun, ucuz ve güvenilir formda üretilmesinde olanak sağlamıştır. Rekombinant DNA teknolojilerinin en önemli uygulamalarından biri de birçok virüse karşı koruma sağlayan rekombinant aşıların üretilmemesidir. İnfluenza virüslerine karşı kullanılan aşıların bir kısmı, rekombinant olarak üretilen influenza virüsü HA yüzey antijen proteinlerinden oluşmaktadır. Örneğin 2014-2015 sezonu için böcek hücrelerinde üretilen kuadrivalen rekombinant influenza aşısı (RIV4), her bir influenza tipi için 45 µg HA proteini içermektedir (Dunkle ve diğerleri, 2017). Diğer taraftan, rekombinant influenza virüs aşısı üretmek için mayalar büyük bir potansiyel taşımaktadır (Athmaram ve diğerleri, 2011; Lei ve diğerleri, 2016).

İnfluenza virüsüne karşı üretilen aşılar, bireyleri yüzde yüz viral enfeksiyonlara karşı koruma sağlamasa da özellikle çocuklarda, yaşlılarda ve kalp-damar hastalığına

sahip bireylerde kullanılması büyük bir önem taşımaktadır (Antonova ve diğerleri, 2014; Nguyen ve diğerleri, 2016; Strouse ve diğerleri, 2010). Kullanımda olan aşıların büyük bir çoğunluğu tavuk embriyonunda üretilen virüslerin inaktivasyonu ile elde edilmektedir. Diğer taraftan rekombinant olarak üretilen influenza aşıları da her geçen gün artmaktadır. Bu aşıların üretilemesinde ökaryotik böcek hücreleri ve mayalar tercih edilmektedir. Üretilmesi ucuz ve kolay olması nedeniyle çeşitli maya türleri, influenza virüsü aşılarının üretilmesi çalışmalarının odağında yer almaktadır. Bu Yüksek Lisans tez çalışması kapsamında da, influenza virüslerine karşı bağışıklık oluşumunda önem taşıyan, HA ve NA yüzey antijen proteinlerin bakteri ve maya hücrelerinde rekombinant olarak üretilmesi, bakteri ve maya hücrelerinin bu proteinleri üretme potansiyellerinin karşılaştırılması hedeflenmiştir. Bunun için farklı *E. coli*'nin suşları ve son yıllarda üzerinde çokça çalışılan *P. pastoris* maya türü kullanılmıştır. Çalışmanın hedefi doğrultusunda, İnfluenza A/WSN/33 (H1N1) virüs tipine ait HA ve NA genleri reverz transkripisyon-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) ile çoğaltılmış, bakteri ve maya hücrelerinde ekspresyon yapan plazmit vektörlere aktarılmıştır. Elde edilen plazmit vektörlerin doğrulukları, uygun restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesildikten sonra agaroz jel elektroforezi teknikleri ile ve sonrasında DNA dizi analiz teknikleri ile ortaya konmuştur. Daha sonra elde edilen bu plazmit vektörler, farklı *E. coli* suşlarına ya da *P. pastoris* hücrelerine trasforme edilmiş ve bu hücrelerde viral protein sentezi miktarları, denatüre poliakrilamid jel elektroforezi teknikleri ile incelenmiştir.

Viral bir proteinin bakteri ya da mayalarda üretilmesi, bu organizmalarda ekspresyon yapacak vektörlerin oluşturulmasını gerektirmektedir. Bu tez çalışması kapsamında hem *E. coli* hem de *P. pastoris* hücrelerinde ekspresyon yapacak plazmit vektörler oluşturuldu. İnfluenza virüsü yüzey antijenlerini kodlayan HA ve NA genleri, influenza A/33/WSN (H1N1) ile enfekte edilen HEK293 hücrelerinden hazırlanan cDNA'lar üzerinden PZR ile çoğaltılarak elde edildi (Şekil 20). HA ve NA genleri hem doğal şekliyle (Şekil 20A), hem de SDS-PAGE/Western melezleme teknikleri ile viral proteinlerin analizinde kolaylık sağlayacak şekilde, myc epitopu kodlayan dizi ile kaynaşmış olarak (Şekil 20B) elde edildi. Elde edilen HA ve NA genleri bakteri ve maya ekspresyon vektörlerine klonlandı.

İnfluenza virüsü HA ve NA proteinlerinin membran proteinleri olması ve bakteri hücreleri için yabancı bir molekül olmaları nedeniyle, yaşanabilecek olası

ekspresyon sorunlarını aşabilmek için farklı bakteri promotör dizilerinden yararlanıldı. Promotör diziler, canlılarda genlerin anlatım yapmalarında ve gen anlatımının kontrolünde iş gören genlerin yukarı (upsteam) bölgesinde, transkripsiyonun başlangıç noktasından hemen önce yer alan en önemli cis-etkili elementlerden biridir (Estrem ve diğerleri, 1999). Ökaryotik organizma genlerine ait promotörler ile karşılaştırıldığında bakteri promotör dizileri çok daha basit yapıdadırlar (Crish ve diğerleri, 2006). Ökaryotik organizma genlerinde olduğu gibi bakterilerde de bir kısım genler sürekli anlatım yaparken diğer bir kısım genler ortam koşullarına göre regüle edilirler. *E. coli* hücrelerine ait regüle edilen genlere en iyi örnek klasik laktoz ve triptofan operonu gen kümeleridir (Jacob ve Monod, 1961). Bu iki operona ait promotörler regüle edilen promotörlerdir. Bakterilerde heterolog gen ekspresyonu için yaygın olarak yararlanılan promotörler arasında *lac*, *trp*, *taq*, *recA, tetA, cspA ve lacUV5* promotörleri sayılabilir (Rosano ve Ceccarelli, 2014). Bunlara ek olarak, bakteri hücrelerini konak olarak kullanan bir kısım bakteriyofaj promotörleri de rekombinant protein üretimi çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada *E. coli* hücrelerinde işlevsel olan iki farklı promotör diziden yararlanıldı. Bunlardan biri laktoz gen operonu promotörü (P_{lac}), diğeri ise T7 bakteriyofaj promotörüdür. T7 bakteriyofaj promotörü taşıyan ekspresyon vektörleri ilk kez Studier ve Moffatt tarafından (Studier ve Moffatt, 1986) *E. coli* hücrelerinde heterolog protein ekspresyonu için geliştirilmiştir. Bu promotörü kullanan T7 RNA polimeraz enzimi çok yüksek polimerizasyon aktivitesine sahiptir ve *E. coli* RNA polimeraz enziminden yaklaşık beş kat daha hızlı zincir sentezi gerçekleştirebilmektedir (Golomb ve Chamberlin, 1974; Studier ve Moffatt, 1986). Doğal koşullarda T7 RNA polimeraz promotörü *E. coli* hücrelerinde bulunmaz ve konak RNA polimeraz enzimi tarafından da tanınmaz. Bu nedenle T7 RNA polimeraz promotörünün işlev görebilmesi için konak hücreye, bu promotörü tanıyan T7 RNA polmeraz enziminin kazandırılması gerekir. Studier ve Moffatt *E. coli* hücrelerini bu geni taşıyan bir lambda bakteriyofajı ile enfekte ederek ya da lacUV5 promotör dizisi kontrolünde T7 RNA polimeraz genini bakteri genomuna entegre ederek sağlamışlardır (Studier ve Moffatt, 1986). Çalışmada konak olarak kullanılan *E. coli* BL21 (DE3) suşunda T7 RNA polimeraz enzimi, lacUV5 promotörü kontrolündedir ve bu enzimin sentezi laktoz analoğu olan fakat β-galaktozidaz enzimi için substrat olarak işlev görmeyen IPTG ile pozitif yönde uyarılmaktadır. Çalışmada T7 promotör dizisi kontrolünde HA ve NA kodlayan plazmit vektörlerin elde edilmesinde bu promotör

dizisi taşıyan ve *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerinde anlatım yapan pET-14b plazmit vektöründen yararlanıldı. PZR ile çoğaltılan myc uzantısı taşıyan influenza HA ve NA genleri bu plazmit vektörüne klonlanarak pET-14b-HA.myc ve pET-14b-NA.myc bakteri ekspresyon vektörleri oluşturuldu (Şekil 22). Her iki plazmit vektörün kontrolü hem koloni-PZR testleri (Şekil 23) ile hem de DNA dizi analizleri ile ortaya kondu (Şekil 24). Bu çalışma kapsamında elde edilen diğer *E. coli* ekspresyon vektörleri, pGFP plazmit vektörü üzerinden oluşturuldu. pGFP plazmiti laktoz operonuna ait lac promotör dizisi taşımaktadır. Bu dizi kor promotör elementlerinin (-35 ve -10 dizileri) yanısıra, lac operatör dizisi ve CAP (*İng. catabolite activator protein* : katabolit tarafından aktive edilen protein) dizisi de taşımaktadır. pGFP plazmit vektörünün GFP kodlayan bölgesi dışında kalan kısmı ters PZR ile çoğaltılarak doğrusal hale getirildi (Şekil 25). Elde edilen bu doğrusal plazmit DNA'sı hem doğal hem de myc uzantılı HA ve NA cDNA'ları ile ligasyona uğratılarak, pLac-HA, pLac-HA.myc, pLac-NA ve pLac–NA.myc plazmit vektörleri elde edildi (Şekil 26). Lac promotör dizisi taşıyan bu plazmitler de hem koloni-PZR (Şekil 27) ve restriksiyon endonükleaz enzimleri (Şekil 28) ile kesildikten sonra agaroz jel elektroforezi ile, hem de DNA dizi analizleri (Şekil 29) ile kontrol edilerek doğrulukları saptandı.

Rekombinant DNA tekniklerinden yararlanarak, heterolog protein üretiminde yararlanılan diğer önemli bir organizma grubu da mayalardır. *Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Kluyveromyces lactis* ve *P. pastoris* rekombinant protein üretimi çalışmalarında öne çıkan maya türleridir. Mayaların bakterilere göre en önemli avantajları, ökaryotik organizmalar olmaları ve buna bağlı olarak memeli hücrelerinde gerçekleştirilen translasyon sonrası modifikasyonların tümü olmasa bile bir kısmını gerçekleştirebiliyor olmalarıdır (Dolence ve Poulter, 1995; Oliveira ve Sauer, 2012). Memeli hücreleri ile karşılaştırıldığında ise üretilmeleri hem çok kolay hem de çok ucuzdur. Bu nedenle özellikle bakterilerde aktif formda sentez edilemeyen heterolog proteinler için tercih edilen organizmalardır. *S. cerevisiae* sadece heterolog protein üretimi çalışmalarında değil, aynı zamanda endüstri alanında ekmek, bira ve şarap üretiminde de binlerce yıldır kullanılan bir organizmadır (Feldmann, 2011). Son yıllarda *S. cerevisiae* aynı familya *(Saccharomycetaceae*) içerisinde yer alan *P. pastoris* türü de, sahip oldukları özellikler nedeniyle rekombinant protein üretimi çalışmlarında yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. *P. pastoris*'in diğer maya türlerine göre en önemli avantajı çok hızlı ve besi ortamında çok daha yoğun

bir şekilde üreyebilmesidir. *P. pastoris*'in bir diğer özelliği metilotrop (*İng. methylotroph*) olmasıdır. Bu hücreler metil alkolü enerji kaynağı olarak kullanabilmektedirler. Dolayısıyla, diğer mikroorganizmalara göre daha yüksek metil alkol konsantrasyonlarına karşı toleranslıdırlar. Bu özellik *P. pastoris*'in kültüre edildiği ortamın diğer mikroorganizmalar tarafından kontamine edilme olasılığını azaltmaktadır. *P. pastoris* hücreleri, primer alkollerin oksidasyonunu katalizleyen enzimleri kodlayan Aox1 ve Aox2 genlerine sahiptir. Bu genler, metil alkol ile pozitif yönde uyarılan güçlü promotör dizilerine sahiptirler. Bu promotörler metil alkolün aksine glikoz ile baskılanırlar (Daly ve Hearn, 2005). Bu nedenle *P. pastoris* hücrelerinde rekombinant protein üretmek için tasarlanan genler genellikle metil alkol tarafından uyarılan Aox gen promotörü kontrolünde klonlanır. Diğer taraftan *P. pastoris* rekombinant protein üretmek amacıyla ticari olarak geliştirilen plazmit vektörler de bulunmaktadır. Bu çalışmada yararlanılan pPinkα-HC Aox gen promotörü taşıyan ve *P. pastoris* hücrelerinde rekombinant protein sentezi için geliştirilen bir vektördür (Şekil 30A). pPinkα-HC plazmit vektörü *Stu*I enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirildi (Şekil 30B) ve influenza virüsü HA.myc ve NA.myc cDNA'ları ile ligasyona uğratılarak maya ekspresyon vektörleri oluşturuldu (Şekil 31). Elde edilen pPinkα-HA.myc ve pPinkα-NA.myc plazmit vektörlerinin doğrulukları da hem uygun restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek, agaroz jel elektroforezi (Şekil 33) ile hem de DNA dizi analizleri ile ortaya kondu (Şekil 34).

İnfluenza A virüsüne ait HA ve NA yüzey antijen proteinleri, virüs partikülünde membrana bağlı olarak taşınan proteinlerdir (Gamblin ve Skehel, 2010; Neumann ve diğerleri, 2009). Ökaryotik hücrelerde hücre membranına bağlı bulunan proteinler, sitoplazmik ya da nükleer lokalizasyon gösteren diğer proteinlerden farklı olarak, endoplazmik retikulum membranına bağlı ribozomlar üzerinde sentez edilirler (Blobel ve Dobberstein, 1975a; Blobel ve Dobberstein, 1975b). Dolayısıyla, farklı bir protein trafiğini izleyerek membranlara taşınırlar. Bu olaylarda, proteinlerin taşıdıkları sinyal diziler ve membranlara bağlanmasını sağlayan hidrofobik bölgeler (domein) büyük önem taşımaktadır. Çalışmada HA ve NA cDNA'ları, sinyal dizileri ve hidrofobik bölgeleri kodlayacak şekilde bir bütün halinde bakteri ve maya ekspresyon vektörlerine klonlanmıştır. Dolayısıyla bu plazmitler üzerinden sentez edilecek HA ve NA proteinlerinin bakteri ve maya hücrelerindeki davranışlarını tahmin etmek güçtür. Ayrıca rekombinant olarak üretilen proteinler konak bakteri için toksik etki

gösterebilmektedir. Gen klonlama çalışmalarının transformasyon aşamasında, bazı plazmitler ile transforme edilen bakterilerin normalden çok daha küçük koloniler oluşturduğu gözlenmiştir. Bu gözlemlerden yola çıkarak HA ve NA proteinlerinin konak bakteri üremelerine etkileri sıvı kültürlerde test edilmiştir. Bu deneyde *E. coli*/ Mach1 ve *E .coli* /BL21 suşları T7 RNA polimeraz promotörü ve/veya Lac promotörü kontrolünde viral gen taşıyan plazmitler ile transforme edilmiş ve bu hücrelerin üreme hızları plazmit taşımayan hücreler ile karşılaştırılmıştır (Şekil 35). pLac-HA.myc ve pLac-NA.myc aktarılan *E. coli* /Mach1 hücrelerinin üreme hızlarının çok düşük olduğu, kontrol kültürlerin doygunluğa eriştiği sürelerde, dikkate değer bir hücre artışı olmadığı görüldü. Bu sonuç, bu plazmitlerin *E. coli*/Mach1 hücrelerinde ekspresyon yaptıklarını, fakat bu hücrelerin üremesini ileri düzeyde inhibe ettiğini gösterdi. Buna karşın *E. coli* Mach1 hücrelerinde aktif olmayan T7 RNA polimeraz promotörü taşıyan plazmitler (pET-14b-HA.myc ve pET-14b-NA.myc) hücre üremeleri üzerinde önemli bir negatif etki oluşturmadı. Diğer taraftan pET-14b-HA.myc ve pET-14b-NA.myc plazmitleri aktarılan *E. coli* /BL21 hücrelerinin üreme hızları Mach1 suşunun aksine önemli ölçüde inhibe olmuştur. Hücre üreme eğrilerinin belirlendiği kültür ortamlarına Lac promotörü ya da T7 RNA polimeraz genini kontrol eden lacUV5 promotörünü aktive etmek için IPTG eklenmemiştir. *E. coli* /BL21 hücrelerinin IPTG ile uyarılan lacUV5 promotörü kontrollünde T7 RNA polimeraz geni taşımaktadır. Normal koşullarda, IPTG olmayan ortamda T7 RNA polimeraz enziminin sentez edilmemesi, buna bağlı olarak viral proteinlerin de sentez edilmemesi beklenmektedir. Fakat lacUV5 promotörünün düşük düzeyde olsa aktif olduğu ve hücrelerde sentez edilen T7 RNA polimeraz enziminin pET-14b plazmiti üzerindeki T7 promotörü kontrolündeki genlerin ekspresyon yapmaları için yeterli olduğu görülmüştür (Eken, 2017).

Bakterilerde rekombinant protein üretiminde karşılaşılan önemli sorunlardan biri, bu hücrelerde sentez edilen bir kısım proteinlerin aktivite gösterdikleri üç boyutlu yapıya sahip olmamalarıdır (Baneyx ve Mujacic, 2004). Özellikle ökaryotik organizma proteinlerinin katlanmasında önemli olan sistemlerin ve şaperon proteinlerin bakterilerde bulunmaması, yanlış katlanmalara ve inaktif kümeleşmelerin (agregatlar) oluşumlarına neden olmaktadır (Baneyx ve Mujacic, 2004). Bir diğer önemli sorun, sentez edilen rekombinant proteinlerin konak hücreler için toksik olmasıdır. Bu çalışmaya konu olan influenza A virüsü HA ve NA proteinlerinin *E. coli* hücrelerinin üreme hızlarını ileri düzeyde yavaşlattıkları görüldü (Şekil 35). Diğer taraftan viral

proteinlerin sentez edildiği hücrelerin katı besiyerinde de daha küçük koloniler oluşturduğu gözlendi. Deneylerde farklı *E. coli* suşları denenmekle birlikte, daha iyi sonuç alındığı için çalışmalar *E. coli*/Mach1 ve *E. coli*/BL21 suşları üzerinde yoğunlaştırıldı. Bu hücrelerde sentez edilen viral proteinler denatüre koşullarda SDS-PAGE ile analiz edildi. Bakteriyofaj T7 promotörü kontrolünde viral gen taşıyan plazmitler (pET-14b-HA.myc ve pET-14b-NA.myc) ile transforme edilen *E. coli*/BL21 hücreleri hem sıvı besiyerinde hem de katı besiyerinde üretilerek, hücrelerde sentez edilen viral proteinler Western melezleme tekniği ile görüntülendi (Şekil 37). Sıvı besiyerinde üretilen hücre lizatlarında HA ve NA proteinleri saptanamadı. Katı besiyerinde oluşan bakteri kolonilerinin toplanması ile hazırlanan lizatlarda NA proteinin etkin bir şekilde sentez edildiği saptandı. Şekil 37' de verilen elektroforez profili incelendiğinde, anti-myc antikoru ile işaretlenen NA proteini için beklenen büyüklükte protein bandı dışında daha küçük boyutlarda protein bantları görülmektedir. Bu protein bantlarının, hücre içerisinde gerçekleşen proteolitik yıkım ya da NA geni açık okuma çerçevesi içerisinde, farklı noktalarda başlayan translasyonun sonucu olabileceği düşünülmektedir. Aynı koşullarda geçekleştirilen deneylerde influenza HA proteini sentezinin, sadece katı besiyerinde üretilen hücrelerde, NA proteinine göre çok daha düşük düzeyde sentez edilebildiği görüldü. Aynı vektörde aynı pozisyonda klonlanan HA ve NA genleri üzerinden farklı düzeylerde protein sentez edilmesi, gen kontrol elementlerinden çok proteinlerin; proteolitik enzimlere duyarlılıkları, hücre için toksik olmaları ve/veya yarılanma ömürleri gibi kendi doğal özelliklerinden kaynaklandığı sonucunu vermektedir.

İnfluenza HA ve NA genlerinin klonlanmasında karşılaşılacak olası sorunları en aza indirmek amacıyla genler farklı promotör dizilerinin kontrolünde klonlanmıştır. Yukarıda da değinildiği gibi, T7 RNA polimeraz promotörü kontrolünde klonlanarak elde edilen HA ekspresyon plazmiti ile *E. coli*/BL21 hücrelerinde beklenen düzeyde viral protein sentezi saptanamadı. Bu nedenle *lac* promotörü kontrolünde gen taşıyan plazmit vektörlerin viral protein kodlama potansiyelleri hem *E. coli*/Mach1 hem de *E. coli*/BL21 bakteri suşlarında test edildi (Şekil 38). Belirli koşullarda üretilen hücrelerden hazırlanan lizatların SDS-PAGE / western melezleme tekniği ile analizi verileri, *E. coli* hücrelerinde influenza HA proteinin yeteri kadar sentez edilemediği sonucunu verdi. Bu sonuçlar *E. coli* hücrelerinde HA proteini sentezinin, genin klonlandığı promotör tipine ya da bakteri suşuna bağlı olmadığını gösterdi. Diğer

taraftan influenza A virüsü NA proteininin hem T7 RNA polimeraz promotörü hem de *E. coli lac* promotörü kontrolünde klonlanan genler üzerinden sentez edilebildiği saptandı. Beklendiği gibi T7 RNA polimeraz promotörü taşıyan plazmitler, bakteriyofaj RNA polimeraz enzimi kodlamayan *E. coli* / Mach1 hücrelerinde ekspresyon yapmadı.

Bu çalışmada viral genlerin klonlandığı lac promotörünün ve *E. coli* / BL21 hücrelerinde sentez edilen T7 RNA polimeraz enzimini kodlayan geni kontrol eden lacUV5 promotörünün doğal koşullarda laktoz operonunu indükleyen IPTG ile pozitif yönde uyarılması beklenmektedir. Bu nedenle lac promotörü kontrolünde NA geni taşıyan pLac-NA.myc plazmitinin *E. coli* /Mach1 hücrelerinde; T7 RNA polimeraz promotörü kontrolünde HA geni taşıyan pET-14b-HA.myc plazmitinin ise *E. coli* / BL21 hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda IPTG varlığında viral proteinleri eksprese etme düzeyleri araştırıldı. Şekil 39A'da görüldüğü gibi, beklenenin aksine pLac-NA.myc plazmitinin *E. coli* / Mach1 hücrelerinde, IPTG içermeyen ortamda daha iyi sonuç verdiği saptandı. IPTG içeren ortamlarda tam boyutta NA.myc protein miktarının doza bağlı olarak azaldığı görüldü. Bunu IPTG'in hücre içerisinde farklı mekanizmaları tetikleyerek NA proteinin proteolitik yıkımını arttırdığı ya da protein translasyonu sırasında, protein sentezi için başlangıç noktası tercihini değiştirme olasılığından kaynaklanabileceği sanılmaktadır. Benzer şekilde pET-14b-HA.myc plazmiti taşıyan *E. coli* / BL21 hücrelerinde de IPTG'in pozitif yönde bir etkisi saptanamadı. IPTG içeren ve içermeyen ortamlarda üretilen *E. coli* / BL21 hücrelerinde HA.myc protein düzeyinde bir değişiklik görülmedi.

Yukarıda da değinildiği gibi, ökaryotik yapıda olmaları nedeniyle, özellikle kompleks proteinlerin rekombinant olarak sentez edilmesinde, üretilmeleri kolay ve ucuz olan maya hücreleri ön plana çıkmaktadır. Bu çalışmada da methilotropik özellik taşıyan ve çok hızlı çoğalabilen *P. pastoris* maya hücreleri influenza virüsü yüzey antijen proteinlerini rekombinant olarak sentez edilmesi için denendi. Ade1 geni bakımından mutant olan bu hücreler ilk aşamada YPD, YPAD, SD (-Ade) ve SD (+Ade) seçici besiyerlerinde üretilerek fenotipik olarak kontrol edildi ve beklenen üreme özellikleri saptandı (Şekil 41). Sonrasında maya hücreleri, bu hücrelerde ekspresyon için oluşturulan pPinkα-NA.myc ve pPinkα-HA.Myc plazmitleri ile transforme edildi. Transformasyonda hem kimyasal metot (Lityum asetat/PEG) hem de elektroporasyon yöntemi denendi. Kimyasal metot ile beklenen sonuçlar alınamadı.

Buna karşın elektroporasyon yöntemi gerçekleştirilen transformasyonda yeteri kadar transformant koloni elde edildi (Şekil 42). Deneylerde kullanılan SD (-ade) seçici katı besiyerleri sadece transformant *P. pastoris* hücrelerinin beyaz koloniler oluşturmasına olanak vermektedir. Bununla birlikte, viral proteinlerin sentezi için analiz edilecek maya kolonilerinin HA ve NA genleri taşıyıp taşımadıkları PZR ile de kontrol edildi. Seçilen belirli sayıda beyaz kolonilerden ve az sayıda pembe renkte koloniden genom DNA'ları izole edildi (Looke ve diğerleri, 2011) ve bu DNA'lar kalıp olarak kullanılarak, HA ve NA genlerine özgü primer çiftleri ile PZR gerçekleştirildi. Agaroz jel elektroforezi ile incelenen örneklerden, beyaz renkte koloniler oluşturan transformantların viral genleri taşıdığını buna karşın daha küçük ve pembe renkte kolonilerin ise viral genleri taşımadığı ortaya kondu (Şekil 43).

P. pastoris maya hücreleri, insülin gibi insan orijinli proteinler ile birlikte diğer birçok heterolog proteinin ekspresyonunda başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Goodrick ve diğerleri, 2001; Macauley-Patrick ve diğerleri, 2005; Sreekrishna ve diğerleri, 1989). Bu hücreler insan orijinli rekombinant proteinlerinin üretilemesinde önemli bir potansiyele sahiptir (Baeshen ve diğerleri, 2014; Porro ve diğerleri, 2011). Örneğin Xie ve arkadaşları (Xie ve diğerleri, 2008) *P. pastoris* hücrelerinde 3.7 g/L düzeyinde insülin öncül proteini sentez edildiğini belirtmişlerdir. Bununla birlikte mayalarda en çok karşılaşılan sorunlardan biri, bu hücrelerin proteaz enzimleri bakımından zengin olmaları ve rekombinant olarak sentez edilen proteinlerin proteolitik olarak yıkılma uğramasıdır (Gimenez ve diğerleri, 2000; Kobayashi ve diğerleri, 2000). Maya hücreleri ortam koşullarına göre değişebilen düzeylerde proteolitik enzimler üretebilmektedir (Hansen ve diğerleri, 1977). Bira mayası olarak da bilinen *S. cerevisiae* proteaz enzimleri bakımından daha iyi bilinmektedir. *S. cerevisiae* kadar iyi tanımlanmamış olmakla birlikte, *P. pastoris* hücreleri de rekombinant olarak üretilen proteinlerin proteolitik yıkımı ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır (Kobayashi ve diğerleri, 2000; Sinha ve diğerleri, 2003; Werten ve diğerleri, 1999; Zhou ve Zhang, 2004). Bu tez çalışması kapsamında da *P. pastoris* hücrelerinin influenza virüsü HA ve NA proteinlerini rekombinant olarak sentez edebilme potansiyelleri araştırılmıştır. Bu bağlamda, seçici SD (-ade) katı besiyerlerinde çoğalan ve PZR ile viral genleri genomlarında taşıyan maya örneklerinde, HA ve NA proteinlerinin sentez edilip edilmediği SDS-PAGE / western melezleme tekniği ile analiz edilmiştir. Metot kısmında verildiği gibi farklı koşularda üretilen ve metanol ile

indüklenen *P. pastoris* hücrelerinin, influenza virüsü HA ve NA proteinleri Western melezleme tekniği ile belirlenebilecek düzeylerde sentez etmediği gözlenmiştir. Bu sonucun farklı nedenlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bunlardan biri yukarıda da değinildiği gibi, *P. pastoris* hücrelerinin proteaz enzimleri bakımından zengin olmaları ve heterolog proteinlerin hızla yıkımına neden olmalarıdır. *E. coli* hücrelerinin üreme hızını büyük ölçüde düşüren bu proteinlerin, *P. pastoris* hücrelerinin üreme hızını önemli düzeyde etkilemese de bu hücrelerde de hücre içi bazı metabolik faaliyetler üzeninde negatif etki yapması olasılığı vardır. Bir diğer önemli etken, her ne kadar *P. pastoris* hücrelerinde heterolog protein ekspresyonu için geliştirilmiş olsa da, viral proteinler için oluşturulan ekspresyon vektörünün uygun olmamasıdır. Athmaram ve diğerleri (Athmaram ve diğerleri, 2011) *P. pastoris* hücrelerinde, pPIC9KH1N1HA plazmit vektörünü kullanarak influenza virüsü HA proteinini sentez ettiklerini rapor etmeleri bu olasılığı arttırmaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışmada özellikle influenza A virüslerine karşı aşı olarak kullanılabilme potansiyeline sahip, HA ve NA yüzey antijen proteinlerinin rekombinant olarak bakteri ve maya hücrelerinde üretilmesi ve bu hücrelerin membrana bağlı bu viral proteinleri sentez edebilme kapasiteleri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, her iki proteinin de doğal haliyle klonlandığında *E. coli* hücrleri tarafından sentez edildiğini, ancak bu viral proteinlerin konak bakteri hücreleri için ileri düzeyde toksik olduğunu ortaya koydu. Bu sorunun aşılmasının, viral proteinlerin bir bütün olarak değil belli bölgelerinin örneğin eksternal domein'lerini sentez edecek şekilde genlerin klonlaması ile ya da "*T7 promotörü /E. coli BL21*" ekspresyon sisteminden farklı daha iyi regülasyon sağlayan bir ekspresyon sisteminin kullanılması ile mümkün olabileceği sonucuna varılmıştır. Benzer bir durum *P. pastoris* hücreleri için de geçerlidir. Uygulanan koşullarda viral protein sentez etmeyen *P. pastoris* hücrelerinde, farklı promotör ve sekresyon sinyal dizileri taşıyan plazmit vektörleri kullanılarak bu sorunların aşılabileceği düşünülmektedir.

8 KAYNAKLAR

Air GM, Influenza neuraminidase. Influenza and other respiratory viruses 2012;6:245-256.

Akın L, Türkiye'de Pandemik Grip Epidemiyolojisi. Hacettepe Tıp Dergisi 2010:5-12.

Alymova IV, Taylor G, Portner A: Neuraminidase inhibitors as antiviral agents. Curr Drug Targets Infect Disord 2005;5:401-409.

Antonova E, Ambrose CS, Kern D, Block SL, Caspard H, Tunceli O: Seasonal influenza vaccination trends from 2007-2011 in privately insured children and adults in the United States. Vaccine 2014;32:6563-6568.

Aoki FY, Text Book of Influenza Section Amantadine and Rimantadine, Oxford: Blackwell Science, 1998.

Apostolov K, Flewett TH: Further observations on the structure of influenza viruses A and C. The Journal of general virology 1969;4:365-370.

Athmaram TN, Saraswat S, Santhosh SR, Singh AK, Suryanarayana WS, Priya R, Gopalan N, Parida M, Rao PV, Vijayaraghavan R: Yeast expressed recombinant Hemagglutinin protein of novel H1N1 elicits neutralising antibodies in rabbits and mice. Virology journal 2011;8:524.

Badur S, Pandemik Influenza A (H1N1) 2009: Ülkemizde Ve Dünyada Epidemiyolojik Özellikleri. İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi 2012, April;73.

Baeshen NA, Baeshen MN, Sheikh A, Bora RS, Ahmed MM, Ramadan HA, Saini KS, Redwan EM: Cell factories for insulin production. Microbial cell factories 2014;13:141.

Balkan İ, Pandemik Grip. Journal of Experimental and Clinical Medicine 2013:193-200.

Bancroft C.T. PTG: Evidence For Segment-Nonspecific Packaging of the İnfluenza A Virus Genome. Journal of virology 2002;76:7133-7139.

Baneyx F, Mujacic M: Recombinant protein folding and misfolding in Escherichia coli. Nat Biotechnol 2004;22:1399-1408.

Barik S, New treatments for influenza; in. BMC Medicine, 2012.

Basu D, Walkiewicz MP, Frieman M, Baric RS, Auble DT, Engel DA: Novel influenza virus NS1 antagonists block replication and restore innate immune function. Journal of virology 2009;83:1881-1891.

Baxby D, Edward Jenner's Inquiry; a bicentenary analysis. Vaccine 1999;17:301-307.

Baxter R, Patriarca PA, Ensor K, Izikson R, Goldenthal KL, Cox MM: Evaluation of the safety, reactogenicity and immunogenicity of FluBlok(R) trivalent recombinant baculovirus-expressed hemagglutinin influenza vaccine administered intramuscularly to healthy adults 50-64 years of age. Vaccine 2011;29:2272-2278.

Bi Y, Xie Q, Zhang S, Li Y, Xiao H, Jin T, Zheng W, Li J, Jia X, Sun L, Liu J, Qin C, Gao GF, Liu W: Assessment of the internal genes of influenza A (H7N9) virus contributing to high pathogenicity in mice. Journal of virology 2015;89:2-13.

Blobel G, Dobberstein B: Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. J Cell Biol 1975a;67:852-862.

Blobel G, Dobberstein B: Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. J Cell Biol 1975b;67:835-851.

Bourmakina SV, Garcia-Sastre A: Reverse genetics studies on the filamentous morphology of influenza A virus. The Journal of general virology 2003;84:517-527.

Bouvier NM, Palese P: The biology of influenza viruses. Vaccine 2008;26 Suppl 4:D49-53.

Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-254.

Bucher D, Popple S, Baer M, Mikhail A, Gong YF, Whitaker C, Paoletti E, Judd A: M protein (M1) of influenza virus: antigenic analysis and intracellular localization with monoclonal antibodies. J Virol 1989;63:3622-3633.

Bui M, Wills EG, Helenius A, Whittaker GR: Role of the influenza virus M1 protein in nuclear export of viral ribonucleoproteins. Journal of virology 2000;74:1781-1786.

Carroll K.C. BJS, Morse S.A. and Mietzner T.A., ed 27.,McGraw-Hill Education, USA, 2013.

Cengiz A, Pandemik H1N1 İnfluenza: Çocuklarda Klinik Bulgular Tanı, Tedavi. Hacettepe Tıp Dergisi 2010:28-37.

Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, Helling RB: Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A 1973;70:3240-3244.

Colman PM, Influenza virus neuraminidase: structure, antibodies, and inhibitors. Protein Sci 1994;3:1687-1696.

Couch R, Orthomyxoviruses; in th, Baron S (eds): Medical Microbiology. Galveston (TX), 1996.

Crish JF, Gopalakrishnan R, Bone F, Gilliam AC, Eckert RL: The distal and proximal regulatory regions of the involucrin gene promoter have distinct functions and are required for *in vivo* involucrin expression. J Invest Dermatol 2006;126:305-314.

Cui S, Wu C, Zhou H, Zhao R, Guo L, Wang J, Hung T: Secretory expression of all 16 subtypes of the hemagglutinin 1 protein of influenza A virus in insect cells. Journal of virological methods 2011;177:160-167.

Çağatay A, Pandemik İnfluenza'da Antiviral Tedavi. İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi 2012.

Çalışkan Eryeğen K, Solunumsal Patojen Virüsler ve İnfluenza A H1N1 (domuz gribi)'nin Multipleks PZR Yöntemleri ile Tanısı; Afyon Kocatepe Üniversitesi, 2011.

Çıblak Akçay M, Türkiye'de İnfluenza A (H1N1, H3N2) İzolatlarında Antiviral Direnç Mutasyonlarının Araştırılması; İstanbul, İstanbul University, 2011.

Çiftçi E, Karbuz A, Kendirli T: İnfluenza ve Oseltamivir Kullanımı. Türk Pediatri Arşivi 2016:63-71.

Daly R, Hearn MT: Expression of heterologous proteins in Pichia pastoris: a useful experimental tool in protein engineering and production. Journal of molecular recognition : JMR 2005;18:119-138.

Danna K, Nathans D: Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of Hemophilus influenzae. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1971;68:2913-2917.

Dolence JM, Poulter CD: A mechanism for posttranslational modifications of proteins by yeast protein farnesyltransferase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1995;92:5008-5011.

Dominguez-Cherit G, Lapinsky SE, Macias AE, Pinto R, Espinosa-Perez L, de la Torre A, Poblano-Morales M, Baltazar-Torres JA, Bautista E, Martinez A, Martinez

MA, Rivero E, Valdez R, Ruiz-Palacios G, Hernandez M, Stewart TE, Fowler RA: Critically Ill patients with 2009 influenza A(H1N1) in Mexico. JAMA 2009;302:1880-1887.

Dunkle LM, Izikson R, Patriarca P, Goldenthal KL, Muse D, Callahan J, Cox MMJ, Team PSCS: Efficacy of Recombinant Influenza Vaccine in Adults 50 Years of Age or Older. N Engl J Med 2017;376:2427-2436.

Eken B, Thermus aquaticus DNA Polimeraz I Enziminin Rekombinant DNA Teknolojisi ile Üretilmesi, Saflaştırılması ve Analizi. Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2017, İstanbul, Türkiye.

Ertem M, İnandı T, Çan G, Ergör A, Şaşmaz CT, Ayoğlu F, Kaya M. Türkiye Halk Sağlığı Raporu; Halk Sağlığı Uzmanları Derneği, 2012.

Estrem ST, Ross W, Gaal T, Chen ZW, Niu W, Ebright RH, Gourse RL: Bacterial promoter architecture: subsite structure of UP elements and interactions with the carboxy-terminal domain of the RNA polymerase alpha subunit. Genes Dev 1999;13:2134-2147.

Feldmann H, Yeast: Molecular and Cell Biology. Weinheim, Wiley-Blackwell, 2011.

Fields S, Winter G, Brownlee GG: Structure of the neuraminidase gene in human influenza virus A/PR/8/34. Nature 1981;290:213-217.

Fiore A.E. FA, Shay D., Gubareva L., Bresee J.S., Uyeki T.M.: Morbidity and Mortality Weekly Report Recommendations and Reports/Centers for Disease Control; in: MMWR Recommendations and reports. Antiviral Agents For The Treatment and Chemoprophylaxis Of İnfluenza- Recommendations Of The Advisory Committee On Immunization Practices (ACIP), 2011, vol 60, pp 1-24.

Flynn O, Gallagher C, Mooney J, Irvine C, Ducatez M, Hause B, McGrath G, Ryan E: Influenza D Virus in Cattle, Ireland. Emerging infectious diseases 2018;24:389-391.

Fodor E, Pritlove DC, Brownlee GG: The influenza virus panhandle is involved in the initiation of transcription. Journal of virology 1994;68:4092-4096.

Fodor E, Pritlove DC, Brownlee GG: Characterization of the RNA-fork model of virion RNA in the initiation of transcription in influenza A virus. Journal of virology 1995;69:4012-4019.

Fujii Y, Goto H, Watanabe T, Yoshida T, Kawaoka Y: Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2003;100:2002-2007.

Furuta Y, Komeno T, Nakamura T: Favipiravir (T-705), a broad spectrum inhibitor of viral RNA polymerase. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci 2017;93:449-463.

Gambaryan AS, Karasin AI, Tuzikov AB, Chinarev AA, Pazynina GV, Bovin NV, Matrosovich MN, Olsen CW, Klimov AI: Receptor-binding properties of swine influenza viruses isolated and propagated in MDCK cells. Virus research 2005;114:15-22.

Gamblin SJ, Skehel JJ: Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. The Journal of biological chemistry 2010;285:28403-28409.

Geison GL, Pasteur's work on rabies: reexamining the ethical issues. Hastings Cent Rep 1978;8:26-33.

Gimenez JA, Monkovic DD, Dekleva ML: Identification and monitoring of protease activity in recombinant Saccharomyces cerevisiae. Biotechnology and bioengineering 2000;67:245-251.

Goeddel DV, Kleid DG, Bolivar F, Heyneker HL, Yansura DG, Crea R, Hirose T, Kraszewski A, Itakura K, Riggs AD: Expression in Escherichia coli of chemically synthesized genes for human insulin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1979;76:106-110.

Golomb M, Chamberlin M: Characterization of T7-specific ribonucleic acid polymerase. IV. Resolution of the major *in vitro* transcripts by gel electrophoresis. The Journal of biological chemistry 1974;249:2858-2863.

Goodrick JC, Xu M, Finnegan R, Schilling BM, Schiavi S, Hoppe H, Wan NC: High-level expression and stabilization of recombinant human chitinase produced in a continuous constitutive Pichia pastoris expression system. Biotechnology and bioengineering 2001;74:492-497.

Gottschalk A, Neuraminidase: the specific enzyme of influenza virus and Vibrio cholerae. Biochim Biophys Acta 1957;23:645-646.

Gowthaman V, Singh SD, Dhama K, Srinivasan P, Saravanan S, Murthy TR, Sukumar K, Mathapati B, Lebarbenchon C, Malik YS, Ramakrishnan MA: Isolation and phylogenetic characterization of haemagglutinin and neuraminidase genes of

H9N2 low pathogenicity avian influenza virus isolated from commercial layers in India. Virusdisease 2016;27:382-386.

Grant E, Wu C, Chan KF, Eckle S, Bharadwaj M, Zou QM, Kedzierska K, Chen W: Nucleoprotein of influenza A virus is a major target of immunodominant CD8+ T-cell responses. Immunology and cell biology 2013;91:184-194.

Green MR, Sambrook J: Preparation of Plasmid DNA by Alkaline Lysis with Sodium Dodecyl Sulfate: Maxipreps. Cold Spring Harb Protoc 2018;2018:pdb prot093351.

Green N, Alexander H, Olson A, Alexander S, Shinnick TM, Sutcliffe JG, Lerner RA: Immunogenic structure of the influenza virus hemagglutinin. Cell 1982;28:477-487.

Grigoryan G, Moore DT, DeGrado WF: Transmembrane communication: general principles and lessons from the structure and function of the M2 proton channel, K(+) channels, and integrin receptors. Annu Rev Biochem 2011;80:211-237.

Hakkıoğlu E, Mikroorganizmalarda İnsan Proinsülin Proteininin Üretilmesi ve Analizi, M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2017 , İstanbul, Türkiye.

Hansen RJ, Switzer RL, Hinze H, Holzer H: Effects of glucose and nitrogen source on the levels of proteinases, peptidases, and proteinase inhibitors in yeast. Biochimica et biophysica acta 1977;496:103-114.

Holsinger LJ, Nichani D, Pinto LH, Lamb RA: Influenza A virus M2 ion channel protein: a structure-function analysis. J Virol 1994;68:1551-1563.

Honda A, Mukaigawa J, Yokoiyama A, Kato A, Ueda S, Nagata K, Krystal M, Nayak DP, Ishihama A: Purification and molecular structure of RNA polymerase from influenza virus A/PR8. J Biochem 1990;107:624-628.

Honda A, Ueda K, Nagata K, Ishihama A: RNA polymerase of influenza virus: role of NP in RNA chain elongation. J Biochem 1988;104:1021-1026.

Horimoto T, Kawaoka Y: Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. Nature reviews Microbiology 2005;3:591-600.

Hovanec DL, Air GM: Antigenic structure of the hemagglutinin of influenza virus B/Hong Kong/8/73 as determined from gene sequence analysis of variants selected with monoclonal antibodies. Virology 1984;139:384-392.

Hoyle L, In: The influenza viruses. New York, Springer-Verlag, 1968.

Hsieh YC, Wu TZ, Liu DP, Shao PL, Chang LY, Lu CY, Lee CY, Huang FY, Huang LM: Influenza pandemics: past, present and future. J Formos Med Assoc 2006;105:1-6.

Hsu MT, Parvin JD, Gupta S, Krystal M, Palese P: Genomic RNAs of influenza viruses are held in a circular conformation in virions and in infected cells by a terminal panhandle. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1987;84:8140-8144.

İbişoğlu Ş, Rekombinant Olarak Üretilecek Çözünür Halde Glukagon Reseptör Proteininin Glukagona Olan İlgisinin Araştırılması. M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 2015, İstanbul, Türkiye.

Inoue H, Nojima H, Okayama H: High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. Gene 1990;96:23-28.

Jackson DA, Symons RH, Berg P: Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of Escherichia coli. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1972;69:2904-2909.

Jacob F, Monod J: Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. Journal of molecular biology 1961;3:318-356.

Jain S, Kamimoto L, Bramley AM, Schmitz AM, Benoit SR, Louie J, Sugerman DE, Druckenmiller JK, Ritger KA, Chugh R, Jasuja S, Deutscher M, Chen S, Walker JD, Duchin JS, Lett S, Soliva S, Wells EV, Swerdlow D, Uyeki TM, Fiore AE, Olsen SJ, Fry AM, Bridges CB, Finelli L, Pandemic Influenza AVHIT: Hospitalized patients with 2009 H1N1 influenza in the United States, April-June 2009. N Engl J Med 2009;361:1935-1944.

Jin H, Leser GP, Zhang J, Lamb RA: Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase cytoplasmic tails control particle shape. Embo Journal 1997;16:1236-1247.

Jones EW, Zubenko GS, Parker RR: PEP4 gene function is required for expression of several vacuolar hydrolases in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 1982;102:665-677.

Kamali A, Holodniy M: Influenza treatment and prophylaxis with neuraminidase inhibitors: a review. Infect Drug Resist 2013;6:187-198.

Kawaoka Y, Neumann G: Influenza viruses: an introduction. Methods in molecular biology 2012;865:1-9.

Kelly TJ, Jr., Smith HO: A restriction enzyme from Hemophilus influenzae. II. Journal of molecular biology 1970;51:393-409.

Kidd M: Influenza viruses: update on epidemiology, clinical features, treatment and vaccination. Curr Opin Pulm Med 2014;20:242-246.

King JC, Jr., Cox MM, Reisinger K, Hedrick J, Graham I, Patriarca P: Evaluation of the safety, reactogenicity and immunogenicity of FluBlok trivalent recombinant baculovirus-expressed hemagglutinin influenza vaccine administered intramuscularly to healthy children aged 6-59 months. Vaccine 2009;27:6589-6594.

Kobayashi K, Kuwae S, Ohya T, Ohda T, Ohyama M, Ohi H, Tomomitsu K, Ohmura T: High-level expression of recombinant human serum albumin from the methylotrophic yeast Pichia pastoris with minimal protease production and activation. J Biosci Bioeng 2000;89:55-61.

Kordyukova LV, Serebryakova MV, Polyakov VY, Ovchinnikova TV, Smirnova YA, Fedorova NV, Baratova LA: Influenza A virus M1 protein structure probed by in situ limited proteolysis with bromelain. Protein Pept Lett 2008;15:922-930.

Krug RM, Alonso-Caplen, Expression and replication of the influenza virus genome. Plenum Press, New York, 1989.

Kuszewski K, Brydak L: The epidemiology and history of influenza. Biomed Pharmacother 2000;54:188-195.

Lamb RA, Choppin PW: Segment 8 of the influenza virus genome is unique in coding for two polypeptides. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1979;76:4908-4912.

Lecoq H, Discovery of the first virus, the tobacco mosaic virus: 1892 or 1898?. C R Acad Sci III 2001;324:929-933.

Lee GJ, Quan FS: Protection induced by early stage vaccination with pandemic influenza virus-like particles. Vaccine 2016.

Lei H, Jin S, Karlsson E, Schultz-Cherry S, Ye K: Yeast Surface-Displayed H5N1 Avian Influenza Vaccines. J Immunol Res 2016;2016:4131324.

Leser GP, Lamb RA: Influenza virus assembly and budding in raft-derived microdomains: a quantitative analysis of the surface distribution of HA, NA and M2 proteins. Virology 2005;342:215-227.

Li X, Palese P, Mutational analysis of the promoter required for influenza virus virion RNA synthesis. Journal of virology 1992;66:4331-4338.

Loeffen WL, de Vries RP, Stockhofe N, van Zoelen-Bos D, Maas R, Koch G, Moormann RJ, Rottier PJ, de Haan CA: Vaccination with a soluble recombinant hemagglutinin trimer protects pigs against a challenge with pandemic (H1N1) 2009 influenza virus. Vaccine 2011;29:1545-1550.

Looke M, Kristjuhan K, Kristjuhan A: Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. Biotechniques 2011;50:325-328.

Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM: Heterologous protein production using the Pichia pastoris expression system. Yeast 2005;22:249-270.

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J, Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.

Markushin S, Ghiasi H, Sokolov N, Shilov A, Sinitsin B, Brown D, Klimov A, Nayak D: Nucleotide sequence of RNA segment 7 and the predicted amino sequence of M1 and M2 proteins of FPV/Weybridge (H7N7) and WSN (H1N1) influenza viruses. Virus research 1988;10:263-271.

Matrosovich MN, Matrosovich, T. Y., Gray, T., Roberts, N. A., and Klenk, H. D: Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium, J Virol, 2004.

McCauley JW, Mahy BW, Structure and function of the influenza virus genome. The Biochemical journal 1983;211:281-294.

McKimm-Breschkin JL, Influenza neuraminidase inhibitors: antiviral action and mechanisms of resistance. Influenza and other respiratory viruses 2013;7 Suppl 1:25-36.

Mendel DB, Sidwell RW: Influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. Drug Resist Updat 1998;1:184-189.

Mendelman PM, Cordova J, Cho I: Safety, efficacy and effectiveness of the influenza virus vaccine, trivalent, types A and B, live, cold-adapted (CAIV-T) in healthy children and healthy adults. Vaccine 2001;19:2221-2226.

Mitnaul LJ, Castrucci MR, Murti KG, Kawaoka Y: The cytoplasmic tail of influenza A virus neuraminidase (NA) affects NA incorporation into virions, virion morphology, and virulence in mice but is not essential for virus replication. Journal of virology 1996;70:873-879.

Morens DM, Taubenberger JK, Harvey HA, Memoli MJ: The 1918 influenza pandemic: lessons for 2009 and the future. Crit Care Med 2010;38:e10-20.

Morrow JF, Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, Goodman HM, Helling RB: Replication and transcription of eukaryotic DNA in Escherichia coli. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1974;71:1743-1747.

Morse MA, Marriott AC, Nuttall PA: The glycoprotein of Thogoto virus (a tick-borne orthomyxo-like virus) is related to the baculovirus glycoprotein GP64. Virology 1992;186:640-646.

Moscona A, Neuraminidase inhibitors for influenza. N Engl J Med 2005;353:1363-1373.

Nagata S, Mantei N, Weissmann C: The structure of one of the eight or more distinct chromosomal genes for human interferon-alpha. Nature 1980;287:401-408.

Nakajima K: [The mechanism of antigenic shift and drift of human influenza virus]. Nihon rinsho Japanese journal of clinical medicine 2003;61:1897-1903.

Neumann G, Hobom G: Mutational analysis of influenza virus promoter elements *in vivo*. The Journal of general virology 1995;76 (Pt 7):1709-1717.

Neumann G, Hughes MT, Kawaoka Y: Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. The EMBO journal 2000;19:6751-6758.

Neumann G, Noda T, Kawaoka Y: Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. Nature 2009;459:931-939.

Nezelof C, [The tobacco mosaic virus from Martinus Beijerinck to James Watson]. Rev Prat 2000;50:1633-1637.

Nguyen JL, Yang W, Ito K, Matte TD, Shaman J, Kinney PL: Seasonal Influenza Infections and Cardiovascular Disease Mortality. JAMA Cardiol 2016;1:274-281.

Ohmit SE, Thompson MG, Petrie JG, Thaker SN, Jackson ML, Belongia EA, Zimmerman RK, Gaglani M, Lamerato L, Spencer SM, Jackson L, Meece JK,

Nowalk MP, Song J, Zervos M, Cheng PY, Rinaldo CR, Clipper L, Shay DK, Piedra P, Monto AS: Influenza vaccine effectiveness in the 2011-2012 season: protection against each circulating virus and the effect of prior vaccination on estimates. Clin Infect Dis 2014;58:319-327.

Oldstone MBA, Viruses, Plagues, and History: Past, Present and Future, USA, Oxford University Press, 2009.

Oliveira AP, Sauer U: The importance of post-translational modifications in regulating Saccharomyces cerevisiae metabolism. FEMS Yeast Res 2012;12:104-117.

Olson KC, Fenno J, Lin N, Harkins RN, Snider C, Kohr WH, Ross MJ, Fodge D, Prender G, Stebbing N: Purified human growth hormone from E. coli is biologically active. Nature 1981;293:408-411.

Palese P: The genes of influenza virus. Cell 1977;10:1-10.

Palese P, Tobita K, Ueda M, Compans RW: Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. Virology 1974;61:397-410.

Palese P. SMLaEKDM, Howley P.M., Orthomyxoviridae: The Viruses And Their Replication, Philadelphia, 2007.

Parvin JD, Palese P, Honda A, Ishihama A, Krystal M: Promoter analysis of influenza virus RNA polymerase. Journal of virology 1989;63:5142-5152.

Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE: UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. J Comput Chem 2004;25:1605-1612.

Piccone ME, Fernandez-Sesma A, Palese P: Mutational analysis of the influenza virus vRNA promoter. Virus research 1993;28:99-112.

Pires de Mello CP, Drusano GL, Adams JR, Shudt M, Kulawy R, Brown AN: Oseltamivir-zanamivir combination therapy suppresses drug-resistant H1N1 influenza A viruses in the hollow fiber infection model (HFIM) system. Eur J Pharm Sci 2018;111:443-449.

Pirinçal A: İnfluenza Virüsü NS1 Proteini ile İlişkili Hücresel Faktörlerin Maya İkili-Hibrid Metodu ile Saptanması; Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2014, İstanbul, Türkiye.

Plotch SJ, Bouloy M, Ulmanen I, Krug RM: A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. Cell 1981;23:847-858.

Porro D, Gasser B, Fossati T, Maurer M, Branduardi P, Sauer M, Mattanovich D: Production of recombinant proteins and metabolites in yeasts: when are these systems better than bacterial production systems? Applied microbiology and biotechnology 2011;89:939-948.

Roberts PC, Compans RW: Host cell dependence of viral morphology. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1998;95:5746-5751.

Rosano GL, Ceccarelli EA: Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. Frontiers in microbiology 2014;5:172.

Ruangrung K, Suptawiwat O, Maneechotesuwan K, Boonarkart C, Chakritbudsabong W, Assawabhumi J, Bhattarakosol P, Uiprasertkul M, Puthavathana P, Wiriyarat W, Jongkaewwattana A, Auewarakul P: Neuraminidase Activity and Resistance of 2009 Pandemic H1N1 Influenza Virus to Antiviral Activity in Bronchoalveolar Fluid. Journal of virology 2016;90:4637-4646.

Samji T: Influenza A: understanding the viral life cycle. Yale J Biol Med 2009;82:153-159.

Schappert SM, Nelson C: National Ambulatory Medical Care Survey: 1995-96 summary. Vital Health Stat 13 1999:i-vi, 1-122.

Seong BL, Brownlee GG: A new method for reconstituting influenza polymerase and RNA *in vitro*: a study of the promoter elements for cRNA and vRNA synthesis *in vitro* and viral rescue *in vivo*. Virology 1992a;186:247-260.

Seong BL, Brownlee GG: Nucleotides 9 to 11 of the influenza A virion RNA promoter are crucial for activity *in vitro*. The Journal of general virology 1992b;73 (Pt 12):3115-3124.

Shors T, Understanding Viruses. Sudbury, Mass, Jones & Bartlett Publishers, 2008.

Shortridge KF: The 1918 'Spanish' flu: pearls from swine? Nat Med 1999;5:384-385.

Shtyrya YA, Mochalova LV, Bovin NV: Influenza virus neuraminidase: structure and function. Acta Naturae 2009;1:26-32.

Sinha J, Plantz BA, Zhang W, Gouthro M, Schlegel V, Liu CP, Meagher MM: Improved production of recombinant ovine interferon-tau by mut(+) strain of Pichia pastoris using an optimized methanol feed profile. Biotechnology progress 2003;19:794-802.

Skehel JJ, Wiley DC: Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. Annu Rev Biochem 2000;69:531-569.

Smirnov YA, Kuznetsova MA, Kaverin NV: The Genetic-Aspects of Influenza-Virus Filamentous Particle Formation. Archives of virology 1991;118:279-284.

Smith BJ, Colman PM, Von Itzstein M, Danylec B, Varghese JN: Analysis of inhibitor binding in influenza virus neuraminidase. Protein science : a publication of the Protein Society 2001;10:689-696.

Smith HO, Wilcox KW: A restriction enzyme from Hemophilus influenzae. I. Purification and general properties. Journal of molecular biology 1970;51:379-391.

Smith W AC, Laidlaw PP: A virus obtained from influenza patients. Lancet 1933;II:66-68.

Sreekrishna K, Nelles L, Potenz R, Cruze J, Mazzaferro P, Fish W, Fuke M, Holden K, Phelps D, Wood P, et al.: High-level expression, purification, and characterization of recombinant human tumor necrosis factor synthesized in the methylotrophic yeast Pichia pastoris. Biochemistry 1989;28:4117-4125.

Sriwilaijaroen N, Suzuki Y: Molecular basis of the structure and function of H1 hemagglutinin of influenza virus. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci 2012;88:226-249.

Steinhauer DA: Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. Virology 1999;258:1-20.

Strouse JJ, Reller ME, Bundy DG, Amoako M, Cancio M, Han RN, Valsamakis A, Casella JF: Severe pandemic H1N1 and seasonal influenza in children and young adults with sickle cell disease. Blood 2010;116:3431-3434.

Studier FW, Moffatt BA: Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. Journal of molecular biology 1986;189:113-130.

Summers, William C: Félix d'Herelle and the Origins of Molecular Biology, Yale University Press, 1999.

Şanlı K, İnfluenza Virüsü ve Domuz Gribi. JOPP Dergisi 2010; 2:4-12.

Takahashi T, Hashimoto A, Maruyama M, Ishida H, Kiso M, Kawaoka Y, Suzuki Y, Suzuki T: Identification of amino acid residues of influenza A virus H3 HA

contributing to the recognition of molecular species of sialic acid. FEBS Lett 2009;583:3171-3174.

Taubenberger JK, The virulence of the 1918 pandemic influenza virus: unraveling the enigma. Arch Virol Suppl 2005:101-115.

Theunissen B, The beginnings of the "Delft tradition" revisited: Martinus W. Beijerinck and the genetics of microorganisms. J Hist Biol 1996;29:197-228.

Treanor JJ, El Sahly H, King J, Graham I, Izikson R, Kohberger R, Patriarca P, Cox M: Protective efficacy of a trivalent recombinant hemagglutinin protein vaccine (FluBlok(R)) against influenza in healthy adults: a randomized, placebo-controlled trial. Vaccine 2011;29:7733-7739.

Turan K, İnfluenza virüsü ile ilgili endişeler yersiz mi? Sentez Dergisi, Marmara Eczacılık Kulubü, 2010:22-96.

Uhnoo I, Linde A, Pauksens K, Lindberg A, Eriksson M, Norrby R, Swedish Consensus G: Treatment and prevention of influenza: Swedish recommendations. Scand J Infect Dis 2003;35:3-11.

Us AD, Pandemik İnfluenza İnfeksiyonunda Etyopatogenez ve Laboratuvar Tanı Yöntemleri. Hacettepe Tıp Dergisi 2010;41:13-27.

Vavricka CJ, Li Q, Wu Y, Qi J, Wang M, Liu Y, Gao F, Liu J, Feng E, He J, Wang J, Liu H, Jiang H, Gao GF: Structural and functional analysis of laninamivir and its octanoate prodrug reveals group specific mechanisms for influenza NA inhibition. PLoS pathogens 2011;7:e1002249.

Wang M, Veit M: Hemagglutinin-esterase-fusion (HEF) protein of influenza C virus. Protein Cell 2016;7:28-45.

Werten MW, van den Bosch TJ, Wind RD, Mooibroek H, de Wolf FA: High-yield secretion of recombinant gelatins by Pichia pastoris. Yeast 1999;15:1087-1096.

White JM, Wilson IA: Anti-peptide antibodies detect steps in a protein conformational change: low-pH activation of the influenza virus hemagglutinin. J Cell Biol 1987;105:2887-2896.

Wu Y, Gao F, Qi J, Bi Y, Fu L, Mohan S, Chen Y, Li X, Pinto BM, Vavricka CJ, Tien P, Gao GF: Resistance to Mutant Group 2 Influenza Virus Neuraminidases of an Oseltamivir-Zanamivir Hybrid Inhibitor. Journal of virology 2016;90:10693-10700.

Xie T, Liu Q, Xie F, Liu H, Zhang Y: Secretory expression of insulin precursor in pichia pastoris and simple procedure for producing recombinant human insulin. Preparative biochemistry & biotechnology 2008;38:308-317.

Yamanaka K, Ogasawara N, Yoshikawa H, Ishihama A, Nagata K: *In vivo* analysis of the promoter structure of the influenza virus RNA genome using a transfection system with an engineered RNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1991;88:5369-5373.

Yen HL, Hoffmann E, Taylor G, Scholtissek C, Monto AS, Webster RG, Govorkova EA: Importance of neuraminidase active-site residues to the neuraminidase inhibitor resistance of influenza viruses. Journal of virology 2006;80:8787-8795.

Yewdell JW, Bennink JR, Smith GL, Moss B: Influenza A virus nucleoprotein is a major target antigen for cross-reactive anti-influenza A virus cytotoxic T lymphocytes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1985;82:1785-1789.

Zhang WQ, Song SX, Wang TZ: [Advances in the structure and function of pandemic A/H1N1/2009 influenza virus HA protein]. Bing Du Xue Bao 2012;28:444-452.

Zhilinskaya IN, Kozeletskaya KN, Stamkulova AA, Golubev DB: Analysis of the genome structure of influenza A virus strains isolated during the epidemics of 1977-1980. Virologie 1982;33:237-240.

Zhou WB, Zhang YX: Purification and identification of recombinant hirudin and its degradation products expressed in Pichia pastoris. Preparative biochemistry & biotechnology 2004;34:239-252.

Zhu X, McBride R, Nycholat CM, Yu W, Paulson JC, Wilson IA: Influenza virus neuraminidases with reduced enzymatic activity that avidly bind sialic Acid receptors. Journal of virology 2012;86:13371-13383.

9 ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	ŞEYMA	**Soyadı**	ÖZAYDIN
Doğum Yeri	Fatih/İstanbul	**Doğum Tarihi**	25.06.1992
Uyruğu	T.C.	**TC Kimlik No**	10331524458
E-mail	seymaozaydinn@gmail.com	**Tel**	05394337133

Eğitim Bilgileri

	Mezun Olduğu Yer/Bölüm	**Mezuniyet Tarihi**
Yüksek Lisans	Marmara Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü/ Biyokimya	2018
Lisans	Kocaeli Üniversitesi/Fen-Edebiyat Fakültesi/ Kimya	2015
Lise	Atakent Selçuk Paker Anadolu Lisesi	2010

İş Deneyimi

Görevi	**Kurum**	**Süre**
Stajyer	Atabay İlaç Fabrikası	07.2014-08.2014

Yabancı Dil Bilgisi

	Okuyup Anlama	**Konuşma**	**Yazma**
İngilizce	orta	orta	orta

Sınav Bilgileri

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
ALES	67,54	66,08	60,4

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma Becerisi**
Microsoft Office Excel	İyi
Microsoft Office Power Point	İyi
Microsoft Office Word	İyi