TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNFLUENZA A VİRÜSÜ YÜZEY ANTİJEN PROTEİNİ HEMAGLUTİNİNİN MİKROORGANİZMALARDA ÇÖZÜNÜR HALDE ÜRETİLMESİ

AYŞE ARZU GÜL
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof.Dr. KADİR TURAN

İSTANBUL-2021

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 çalışması ile elde edilmemiş bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Ayşe Arzu GÜL

I.TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında desteğini ve tecrübelerini hiç esirgemeyen, çalışmamın planlanmasından tamamlanmasına kadar olan süreçte her daim ilgisini hissettiren, her sorunumu sabır ile dinleyen, zekâsı ve öngörüsü ile bana ve birçok insana ışık tutan, kendisiyle çalışmış olmayı büyük bir kazanç olarak gördüğüm tez danışmanım Prof. Dr. Kadir TURAN' a,

Katkılarından dolayı Biyokimya Anabilim Dalı Başkanları Prof. Dr. Azize ŞENER ve Prof. Dr. Derya ÖZSAVCI başta olmak üzere M. Ü. Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Laboratuvar çalışmalarımda bilgi birikimlerini ve desteklerini eksik etmeyen Ayşegül PİRİNÇAL ve Elif ÇAĞLAYAN'a ve her ihtiyacım olduğunda bilgilerinden ve tecrübelerinden faydalandığım sevgili arkadaşlarım Tuğba KOÇMAR ve Pınar ULUPINAR' a,

Her daim yanımda olan ve varlığı ile bana güç veren çok sevgili dostum Gülname LİKOĞLU'na,

Hayatım boyunca aldığım her kararda bana destek olup arkamda duran, benimle her zaman gurur duyan sevgili anne ve babam Arife GÜL ve Mehmet Adem GÜL'e, varlıklarıyla bana güç veren kardeşlerim Erdem GÜL ve Hayrunnisa GÜL'e teşekkürlerimi sunarım.

Ayşe Arzu GÜL

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

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

II. İÇİNDEKİLER

1.ÖZET…… **1**
2.SUMMARY…….. **2**
3.GİRİŞ VE AMAÇ…… **3**
4.GENEL BİLGİLER……. **8**
4.1. İnfluenza Virüsleri…… 8
4.2. İnfluenza Virüslerinin Morfolojisi…… 12
4.3. İnfluenza A Virüsü…… 13
4.3.1. İnfluenza A virüsünün moleküler yapısı ve replikasyon döngüsü…… 14
4.3.2. İnfluenza A virüsünün antijenik yapı değişiklikleri…….. 17
4.4. Yüzey Antijen Proteinleri……. 19
4.4.1. Hemaglutinin……. 19
4.4.2. Nöraminidaz…….. 20
4.5. İnfluenza Virüslerinde Tedavi Yöntemleri……... 21
4.5.1. Antiviral ilaçlar……. 22
4.5.2. Aşılar……. 25
4.6. Mikroorganizmlarda Rekombinant DNA Teknolojisi ile Protein Üretimi……. 27
5. GEREÇ VE YÖNTEM……... **31**
5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler……. 31
5.2. Enzimler…… 33
5.3. Ticari Kitler……... 33
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) besiyeri – 1 litre…… 35
5.5.4. YPD (Yeast-Pepton-Dekstroz) besiyeri – 1 litre…….. 35
5.5.5. Katı sentetik dekstroz (SD+Ade) besiyeri - 250 mL……. 36
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 …….. 37
5.8. Maya Hücreleri…….. 37
5.9. Çalışmanın Değişik Aşamalarında Kullanılan Oligonükleotid 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……... 39
5.10.4. 100x Konsantre triptofan (Trp) çözeltisi……. 39
5.10.5 50x Konsantre adenin (Ade) çözeltisi…….. 39
5.10.6. Dekstroz çözeltisi (%20 – a/h) ……... 39
5.10.7. Etidyum bromür (10mg/mL)……... 39
5.10.8. %70 Etil alkol…….. 39
5.10.9. Etilendiamintetraasetikasit (EDTA) çözeltisi (0.5 M, pH: 8.0)…….. 39
5.10.10 Fenol: kloroform: izoamil alkol (25:24:1) …… 39
5.10.11 Fizyolojik tuzlu su (FTS) …….. 40
5.10.12 Hidroklorik asit çözeltisi (3 N) ……. 40
5.10.13 Kalsiyum klorür çözeltisi (2.5 M)…….. 40
5.10.14 Lityum asetat çözeltisi (1M)…….. 40
5.10.15 Polietilen glikol çözeltisi (%40 –a/h) …… 40
5.10.16 Polietilen glikol çözeltisi (%50 –a/h) …… 40
5.10.17 Lityum klorür/PEG/TE çözeltisi ……... 41
5.10.18 Lityum klorür/TE çözeltisi (100 mM LiCl/10 mM Tris-Cl/1mM EDTA)……. 41

5.10.19 Lityum klorür/SDS çözeltisi (200 mM LiCl - %1 SDS, a/h) …… 41
5.10.20 Pipes çözeltisi (1 M) …….. 41
5.10.21 Potasyum klorür çözeltisi (2.5 M) ……. 41
5.10.22 Potasyum di-hidrojen fosfat çözeltisi (50 mM) …… 41
5.10.23 Di-potasyum hidrojen fosfat çözeltisi (50 mM) …… 41
5.10.24 Sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi (% 10 –a/h) …….. 41
5.10.25 Sodyum hidroksit çözeltisi (2 N)……... 42
5.10.26 Sodyum karbonat çözeltisi (1M) ……... 42
5.10.27 Sodyum di-hidrojen fosfat çözeltisi (200 mM) ……. 42
5.10.28 Di-sodyum hidrojen fosfat çözeltisi (200 mM) ……. 42
5.10.29 Akrilamid/bis-akrilamid çözeltisi (%29 akrilamid/%1 bis-akrilamid - a/h)…… 42
5.10.30 Amonyum persülfat (APS) çözeltisi (%10 – a/h) ……. 42
5.10.31 Gümüş nitrat-formaldehit çözeltisi (%0,1, a/h- %0.075, h/h) ……... 42
5.10.32 Görüntüleme çözeltisi (%2 sodyum karbonat, a/h-%0.04 …… 43
formaldehit, h/h- %0.0004 sodyum tiyosülfat, a/h)…… 43
5.10.33 Metanol:glasiyel asetik asit çözeltisi(%50 metanol,%10 glasiyel asetik asit)…… 43
5.10.34 Salmon sperm DNA (ssDNA) çözeltisi (5 mg/ml) ……... 43
5.11 Tamponlar ……... 43
5.11.1 Transformasyon tamponu …… 43
5.11.2 DNA ekstraksiyon tamponu (25 mM Tris-Cl, 50 mM glikoz, 10 mM EDTA pH: 8.0)…… 44
5.11.3 DNA ekstraksiyon tamponu II (0,2 N NaOH, %1 SDS) ……. 44
5.11.4 DNA ekstraksiyon tamponu III (3 M Potasyum: 5 M Asetat) …… 44
5.11.5 6x Konsantre DNA yükleme tamponu …… 44
5.11.6 50x Konsantre tris-asetat-EDTA (TAE) tamponu …….. 44
5.11.7 Tris-Cl tamponu (1 M, pH: 7.5) …….. 44
5.11.8 Tris/EDTA (TE) tamponu (10 mM Tris/1 mM EDTA, pH: 8) ……... 44
5.11.9 Potasyum fosfat tamponu (50 mM, pH: 7.5)…… 45
5.11.10 Sodyum fosfat tamponu (200 mM pH: 7.0) …….. 45
5.12 Transformasyon için *E. coli* Hücrelerinin Kompetent Hale Getirilmesi.. 45

5.13 Agaroz Jellerin Hazırlanması ve Elektroforez İşlemi ……. 45
5.14 Primerlerin Fosforillenmesi……. 46
5.15 İnfluenza HA0 ve HA1 Genlerini Kodlayan Maya ve Bakteri Ekspresyon Vektörlerinin Oluşturulması……. 46
5.15.1 İnsan IgG1 antikoru Fc bölgesini kodlayan dizi ile kaynaşmış influenza A/WSN/33 HA cDNA'larının elde edilmesi……... 47
5.15.2 pPinkα-HC plazmit DNA'sının ligasyon için hazırlanması……. 49
5.15.3 pET-14b plazmit DNA'sının ligasyon için hazırlanması……. 49
5.15.4 pLacI plazmit DNA'sının ligasyon için hazırlanması…….. 50
5.15.5 Ligasyon ve transformasyon…… 51
5.15.6 Koloni-PZR ile transformant bakteri kolonilerinin seçilmesi……. 52
5.15.7 Transformant bakteri kolonilerinden küçük ölçekte DNA izolasyonu. 52
5.15.8 Küçük ve orta ölçekte hazırlanan plazmit DNA'ların restriksiyon enzimleri ile kontrolü…….. 53
5.15.9 Plazmit DNA'ların PEG/NaCl ile saflaştırılması ve dizi analizleri…. 54
5.15.10 Orta ölçekte plazmit DNA'ların hazırlanması……... 54
5.16 Bakteri Ekspresyon Plazmitlerinin, Rekombinant Protein Üretimi İçin Farklı *E. coli* Suşlarına Transformasyonu…… 55
5.17 Ekspresyon Plazmiti Transforme Edilen *E. coli* Hücrelerinin Üreme Eğrilerinin oluşturulması…….. 55
5.18 Plazmit Transforme Edilen *E. coli* Hücrelerinde HA0 ve HA1 Proteinlerinin Sentezinin Analiz Edilmesi……... 55
5.19 Maya Ekspresyon Plazmitlerinin, *P. pastoris* Maya Hücrelerine Transformasyonu…….. 56
5.20 Plazmit Aktarılan *P. pastoris* Hücrelerinin İnfluenza Virüsü HA0 ve HA1 Genleri için PZR ile Kontrol Edilmesi…… 58
5.21 Plazmid Aktarılan *P. pastoris* Hücrelerinde HA0 ve HA1 Proteinlerinin Sentezinin Analiz Edilmesi……... 59
5.22 Protein Örneklerinin SDS- PAGE ve Gümüş Boyama Yöntemi ile Analiz Edilmesi…… 61
5.22.1 Poliakrilamid jellerin hazırlanması ve elektroforez……. 61
5.22.2 Jellerin gümüş boyama yöntemi ile boyanması……... 61

6.BULGULAR…….. **63**
6.1 İnfluenza A Virüsü HA Geni Klonlanan Plazmit Vektörünün Oluşturulması ile İlgili Veriler……. 63
6.1.1 Hemaglutinin ve insan IgG1 proteinine ait cDNA'larının çoğaltılması ile ilgili veriler……. 63
6.1.2 HA0.Fc ve HA1.Fc kodlayan bakteri ekspresyon vektörlerinin oluşturulması ile ilgili veriler…….. 69
6.1.3 HA0.Fc ve HA1.Fc kodlayan maya ekspresyon vektörlerinin oluşturulması ile ilgili veriler…….. 76
6.2 HA0.Fc ve HA1.Fc Proteini Kodlayan Plazmit Aktarılan Bakterilerin Üreme Profilleri ile İlgili Veriler……. 80
6.3 Bakteri Hücrelerinde HA0.Fc ve HA1.Fc Proteinlerinin Sentezi ile İlgili Veriler……... 86
6.4. *Pichia pastoris* ile Yapılan Çalışmalara İlişkin Veriler……. 87
6.5. *Pichia pastoris* Maya Hücrelerinin Transformasyonu ile İlişkin Veriler.. 88
6.6 Transformant Maya Irklarının HA1.Fc Genleri için Kontrolüne İlişkin Veriler……... 89
6.7 Maya Hücrelerinde HA1.Fc Proteininin Sentezi ile İlgili Veriler…….. 89
7. TARTIŞMA ve SONUÇ…….. **91**
8. KAYNAKLAR……. **99**
9. EKLER……. **114**
9.1 Poster Sunumu…… 114
10. ÖZGEÇMİŞ……... **118**

Kısaltmalar ve Simgeler Listesi

a/h	: Ağırlık/hacim
APS	: Amonyum persülfat
Bç	: Baz çifti
COVID-19	: Koronavirüs hastalığı 2019
DMSO	: Dimetil sülfoksit
dNTP	: Deoksiribonükleotit trifosfat
DO	: Amino asit çözeltisi (Drop Out)
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
FDA	: U.S. Food and Drug Administration
FTS	: Fizyolojik tuzlu su
h/h	: Hacim/hacim
HA	: Hemaglütinin
HEF	: Hemaglütinin Esteraz Füzyonu
IPTG	: İzopropiltiogalaktozid
IgG1	: İmmünoglobülin G 1
kDa	: Kilo dalton
LB	: Luria bertani
LBA	: Luria bertani agar
Leu	: Lösin
LiCl/PEG	: Lityum klorür/polietilen glikol
NA	: Nöraminidaz
M	: Molar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
Mw	: Moleküler ağırlık
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar

N	: Normal
OD	: Optik dansite
PAGE	: Poliakrilamit jel elektroforezi
PEG	: Polietilen glikol
PIPES	: 1,4-piperazindietansülfonik asit
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNP	: Ribonükleoprotein kompleksi
SD +Ade	: Adenin içeren SD besiyeri
SD – Ade	: Adenin içermeyen SD besiyeri
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
ssDNA	: Salmon sperm DNA
TAE	: Tris-asetat-EDTA
TE	: Tris-EDTA
TEMED	: Tetrametiletilendiamin
U	: Ünite
UV	: Ultraviyole
vRNP	: Viral ribonükleoprotein
YNB	: Maya azot kaynağı (yeast nitrogen base)
YPAD	: Maya özütü (yeast extract), pepton, adenin, dekstroz içeren besiyeri
YPD	: Maya özütü (yeast extract), pepton, dekstroz içeren besiyeri

IV. ŞEKİL VE TABLOLARIN LİSTESİ

i. Şekil Listesi

Şekil 1. İnfluenza virüs partikülü……... 12
Şekil 2. İnfluenza A virüsünün replikasyon döngüsü……..... 16
Şekil 3. İnfluenza virüslerinin antijenik değişiklikleri……... 18
Şekil 4. Hemaglutinin proteini yapısı……..... 19
Şekil 5. İnfluenza virüsü nöraminidaz proteininin yapısı…….. 21
Şekil 6. Kimyasal sentez ilaçlarının moleküler yapıları……..... 23
Şekil 7. Plazmid vektör haritası……..... 29
Şekil 8. HA1-Fc ve HA0-Fc cDNA'larının PZR ile çoğaltılmasında şablon olarak kullanılan plazmit vektörler…… 47
Şekil 9. PZR ile çoğaltılan influenza A virüsünün HA1.Fc (1) ve HA0.Fc (2) füzyon genlerinin agaroz jel elektroforezi ile incelenmesi…… 68
Şekil 10. *Nco*I restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirilen pET-14b plazmit DNA'sının agaroz jel elektroforezi ile incelenmesi… 69
Şekil 11. İnsan IgG1 Fc bölgesi ile füzyon halinde influenza virüsü HA0 ve HA1 proteini kodlayan pET-14b-HA0-Fc ve pET-14b-HA1- Fc plazmit vektörleri…. 70
Şekil 12. Transformasyon sonrası LBA (+amp) besiyerinde oluşan kolonilerden pET-14b-HA0-Fc **(A)** genleri taşıyan rekombinant plazmitlerin koloni-PZR ile seçilmesi ……..……... 70
Şekil 12. Transformasyon sonrası LBA (+amp) besiyerinde oluşan kolonilerden pET-14b-HA1-Fc **(B)** genleri taşıyan rekombinant plazmitlerin koloni-PZR ile seçilmesi……. 71
Şekil 13. Koloni-PZR ile pozitif sonuç veren kolonilerden hazırlanan pET-14b -HA0-Fc **(1)** ve pET-14b-HA1-Fc **(2)** plazmitlerinin *Nco*I ve/veya *Eco*RI restriksiyon enzimi ile kesilerek agaroz jel elektroforezi ile incelenmesi…….. 71
Şekil 14. pET-14b plazmimit vektörüne klonlanan HA1.Fc nükleotid dizi analizi kromatogramı……. 72

Şekil 15. Ters-PZR ile doğusal hale getirilen pAK plazmit DNA'larının agaroz jel elektroforezi ile analizi……..…. 73
Şekil 16. HA1.Fc ve HA0.Fc DNA'larının pAK plazmitinde LacI promotörü kontrolünde klonlanması ile elde edilen ekspresyon vektörlerinin restriksiyon haritaları …… 73
Şekil 17. Transformasyon sonrası LBA (+amp) besiyerinde oluşan kolonilerden pLacI-HA0-Fc **(A)** ve pLacI-HA1-Fc **(B)** genleri taşıyan rekombinant plazmitlerin koloni-PZR ile seçilmesi……..…….. 74
Şekil 18. Koloni-PZR ile pozitif sonuç veren kolonilerden hazırlanan pLac-HA0-Fc **(1)** ve pLac-HA1-Fc **(2)** plazmitlerinin *Eco*RI ve *Eco*RI/*Nco*I restriksiyon enzimi ile kesilerek agaroz jel elektroforezi incelenmesi……..... 75
Şekil 19. pLac-HA0-Fc ve pLac-HA1-Fc plamit vektörlerinde bulunan HA0.Fc (A) ve HA1.Fc (B) füzyon genlerinin nükleotid dizi analizi kromatogramları….. 76
Şekil 20. pPinkα-HC plazmit haritası **(A)** ve StuI restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirilen pPinkα-HC plazmit DNA'sının agaroz jel elektroforezi ile incelenmesi **(B)**…… 77
Şekil 21. HA1.Fc ve HA0.Fc DNA'larının pPinkα-HC plazmitinde klonlanması ile elde edilen maya ekspresyon vektörlerinin restriksiyon haritaları…… 77
Şekil 22. Transformasyon sonrası LBA (+amp) besiyerinde oluşan kolonilerin, pPinkα-HA1-Fc **(A)** ve pPinkα-HA0-Fc **(B)** rekombinant plazmitler için koloni -PZR ile analizi…….. 78
Şekil 23. Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilen pPinkα-HA1-Fc (**1**) ve pPinkα-HA0-Fc (**2**) plazmit vektörlerin agaroz jel elektroforezi profilleri…… 79
Şekil 24. pPinkα-HA1-Fc (A) ve pPinkα-HA0-Fc (B) plazmit vektörlerinde bulunan HA0.Fc (A) ve HA1.Fc (B) füzyon genlerinin nükleotid dizi analizi kromatogramı……..... 80
Şekil 25. pET14b-HA0-Fc ve pET14b-HA1-Fc plazmitleri ile transforme edilen *E. coli*/BL21 bakterilerinin LB (+amp) besiyerinde gösterdikleri üreme şekilleri 81
Şekil 26. pLacI-HA0-Fc ve pLacI-HA1-Fc plazmitleri ile transforme edilen *E. coli/*Mach1 (A) ve *E. coli/*DH5α (B) bakterilerinin LB (+amp) besiyerinde gösterdikleri üreme şekilleri……... 82

Şekil 27. pPinkα-HA0-Fc ve pPinkα-HA1-Fc plazmitleri ile transforme edilen *E. coli*/Mach1 (A) bakterilerinin LB (+amp) besiyerinde gösterdikleri üreme şekilleri …….. 83
Şekil 27. pPinkα-HA0-Fc ve pPinkα-HA1-Fc plazmitleri ile transforme edilen *E. coli*/DH5α (B) bakterilerinin LB (+amp) besiyerinde gösterdikleri üreme şekilleri …….. 84
Şekil 28. HA0.Fc ve HA1.Fc geni taşıyan plazmitler ile transforme edilen *E. coli*/BL21 (A), *E. coli*/Mach1 (B) ve *E. coli*/DH5α bakteri hücrelerinin LBA katı besiyerlerinde gösterdikleri üreme şekilleri…… 85
Şekil 29. Plazmit vektörler ile transforme edilen *E. coli* hücrelerinde HA0.Fc ve HA1.Fc proteinlerinin SDS PAGE/Gümüş boyama tekniği ile incelenmesi. **A**. pLacI-HA0-Fc veya pLacI-HA1-Fc plazmitleri ile transforme edilen *E. Coli/*BL21 hücreleri **B**. pLacI-HA0-Fc veya pLacI-HA1-Fc plazmitleri ile transforme edilen *E. Coli/*DH5α hücreleri **C**. pET14b-HA0-Fc veya pET14b- HA1-Fc plazmitleri ile transforme edilen *E. coli/*BL21 hücreleri……..... 87
Şekil 30. Elektroporasyon tekniği ile pPinkα-HA1 plazmiti ile transforme edilen *P. pastoris* Irk-1 (-Ade2) (**A**) ve Irk-3 (-Ade2, - Prb1) hücrelerinin (**B**) seçici besiyerinde oluşturdukları koloniler…..... 88
Şekil 31. Elektroporasyon tekniği ile transforme edilen *P. pastoris* maya kolonilerinden elde edilen genom DNA'larının HA1.Fc geni için PZR ile analiz edilmesi…….. 89
Şekil 32. pPinkα-HA1-Fc plazmiti ile transforme edilen P. pastoris Irk-1 ve Irk-3 hücrelerinden hazırlanan lizatların SDS-PAGE/Gümüş boyama tekniği ile incelenmesi…… 90

ii. Tablo Listesi

Tablo 1. İnfluenza A virüsünün genomik segmentleri ve bunların kodlanmış proteinleri……... 15

Tablo 2. İnfluenza aşılarının karşılaştırılması…… 27

Tablo 3. *Pichia pastoris* ırklarının genotipleri…… 37

Tablo 4. İnfluenza virüsü HA genlerinin PZR ile çoğaltılması, vektörlerin doğrusal hale getirilmesi ve oluşturulan plazmit vektörlerin DNA dizi analizleri ile kontrolünde kullanılan oligonükleotid primerler…… 38

1. ÖZET

İnfluenza A Virüsü Yüzey Antijen Proteini Hemaglutininin Mikroorganizmalarda Çözünür Halde Üretilmesi

Öğrenci Adı: Ayşe Arzu GÜL

Danışman Adı : Prof. Dr. Kadir TURAN

Amaç: İnsanlarda grip salgınlarına neden olan influenza A virüsleri membranlı virüslerdir. Virüs membranında taşınan hemaglutinin (HA) ve nöraminidaz (NA) proteinleri bu virüslerin immün sistemde tanınmasında önemlidir. Bu nedenle inaktif saf virüs partikülleri veya saflaştırılmış HA ve NA proteinleri aşı çalışmalarında kullanılmaktadır. Çalışmamızda influenza A virüsü yüzey antijen proteinlerinden HA'nın *Escherichia coli* ve *Pichia pastoris* hücrelerinde rekombinant olarak çözünür halde üretilmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: İnfluenza A/WSN/33 (H1N1) tipi virüsüne ait HA tam boyutta (HA0) veya HA1 domainini kodlayacak şekilde özgün oligonükleotid primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonuyla (PZR) çoğaltılıp insan IgG1 antikorlarının sabit bölgelerini kodlayan diziyle kaynaşmış halde bir ara vektöre klonlandı. Kaynaşmış genler (HA0-Fc/HA1-Fc) ara vektör üzerinden PZR ile çoğaltılıp *E. coli* ve *P. pastoris*'te ekspresyon yapan vektörlere aktarıldı. Edinilen plazmit vektörler *E. coli* ve *P. pastoris*'e transforme edilip hücrelerin üreme profilleri belirlendi. Sonrasında hücrelerde sentezlenen rekombinant proteinler SDS-PAGE/Gümüş boyama teknikleriyle incelendi.

Bulgular: *E. coli* hücrelerinde protein ekspresyonu için, HA0-Fc kontrolünde T7 promotörü (pET-14b-HA0-Fc/pET-14b-HA1-Fc) veya Lac promotörü (pLacI-HA0-Fc/pLacI-HA1-Fc) taşıyan plazmit vektörler oluşturulup transformasyon sonrası üreme profilleri incelendi. HA1-Fc kodlayan plazmit taşıyan bakterilerde bu protein yüksek seviyede üretilirken HA0-Fc füzyon protein ekspresyonu belirlenemedi. Maya hücreleri için oluşturulan pPinkα-HA0.Fc/pPinkα-HA1.Fc plazmitlerinin transformasyon sonrasında *P. pastoris* genomunda taşındığı PZR ile belirlendi ancak rekombinant proteinlerin ekspresyonu, SDS-PAGE/Gümüş boyama tekniğiyle saptanmadı.

Sonuç: Edinilen veriler, influenza A virüsü membran proteini, HA proteininin bütün olarak *E. coli* hücrelerinde sentezinin konak için ileri düzeyde toksiktir. Dolayısıyla, bu proteinin rekombinant olarak üretilmesini dizginleyen ekspresyon sistemlerinin uygun olduğu anlaşıldı. Ayrıca çalışmada *P. pastoris* hücrelerinde HA proteini ekspresyonunda kullanılan sistem uygun değildir.

Anahtar Kelimeler: İnfluenza A, hemaglutinin, rekombinant protein, aşı

2. SUMMARY

Production of the Hemagglutinin Surface Antigenic Protein of Influenza A Virus as a Soluble Form in Microorganism
Student Name: Ayşe Arzu GÜL

Name of Supervisor: Prof. Dr. Kadir TURAN

Objective: Influenza A viruses that cause influenza epidemics in humans are membrane viruses. The hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) proteins carried on the virus membrane are important in the recognition of these viruses in the immune system. Therefore, inactivated pure virus particles or purified HA and NA proteins are used in vaccine studies. In our study, it was aimed to recombinantly produce soluble HA, one of the influenza A virus surface antigen proteins, in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* cells.

Materials and Methods: The HA of influenza A/WSN/33 (H1N1) type virus was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using specific oligonucleotide primers encoding the full size (HA0) or HA1 domain, and fused with the sequence encoding the constant regions of human IgG1 antibodies into an intermediate vector was cloned. The fused genes (HA0-Fc/HA1-Fc) were amplified by PCR over the intermediate vector and transferred to vectors expressing *E. coli* and *P. pastoris.* Obtained plasmid vectors were transformed into *E. coli* and *P. pastoris* to determine the growth profiles of the cells. Afterward, recombinant proteins synthesized in cells were examined by SDS-PAGE/Silver staining techniques.

Results: For protein expression in E. coli cells, carrying T7 promoter (pET-14b-HA0-Fc/pET-14b-HA1-Fc) or Lac promoter (pLacI-HA0-Fc/pLacI-HA1-Fc) under HA0-Fc control plasmid vectors were created and growth profiles were examined after transformation. In bacteria carrying HA1-Fc coding plasmid, this protein was produced at high levels, but HA0.Fc fusion protein expression could not be determined. It was determined by PCR that the pPinkα-HA0.Fc/pPinkα-HA1.Fc plasmids created for yeast cells were transported in the P. pastoris genome after transformation, but the expression of recombinant proteins was not detected by SDS-PAGE/Silver staining technique.

Conclusion: The obtained data indicate that the synthesis of the influenza A virus membrane protein, HA protein, in *E. coli* cells as a whole is highly toxic to the host. Thus, expression systems that restrain the recombinant production of this protein were found to be suitable. In addition, the system used in the expression of HA protein in *P. pastoris* cells is not suitable.

Key Words: Influenza A, hemagglutinin, recombinant protein, vaccine

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Virüsler, çoğalmak için gerekli olan metabolik sistemlere sahip olmayan, sadece canlı bir konak hücre içerisinde çoğalabilen mikroskobik yapılardır. Yapısal olarak basit yapıda olmalarına rağmen ağır seyreden hastalıklara neden olabilirken, bazen de ölümcül olurlar (Carrasco-Hernandez ve ark., 2017).

İnfluenza virüsleri yapıları itibari ile konak türleri arasında çok hızlı yayılım gösterebilen virüslerdir. Bu virüsler daha çok mevsimsel olarak tekrarlayan nispeten hafif seyreden solunum yolu hastalıklarına neden olurken, bazen özellikle bağışıklık sistemi zayıf kişilerde ölümle sonuçlanabilecek ağır solunum yolu hastalıklarına sebep olabilmektedir. Dünya genelinde her yıl milyarlarca dolarlık ekonomik kayıplara da neden olmasının yanında en önemli mortalite ve morbidite sebeplerindendir. Virüsün genetik yapısında meydana gelen basit nokta mutasyonları veya önemli antijenik değişimler ile yeni virüs tipleri ortaya çıkabilmektedir. Bu değişimler sebebiyle influenza virüsü ile mücadele de birçok etkin ilaç ve aşı çalışması olmasına rağmen istenilen düzeyde başarılı sonuçlar alınamamaktadır (Simmonds ve Aiewsakun, 2018). İnfluenza, yetişkinlerde yıllık %5-10 ve çocuklarda %20-30 ortalama bir atak oranıyla küresel olarak ortaya çıkar. Hem influenza A hem de influenza B virüsleri mevsimsel salgınlara ve sezon dışı sporadik (kısıtlı bir alanda tek tük görünen vaka) vakalara ve salgınlara neden olur (Vaccines against influenza WHO position paper, 2012). Tipik bir grip, ani başlangıçlı ateş (≥ 38,5°C), kuru öksürük, boğaz ağrısı, vücut ağrıları ve baş ağrıları ile kendini gösterir. Diğer semptomlar genel yorgunluk, terleme, burun akıntısı, ayrıca mide bulantısı, kusma ve ishal şeklindedir. Daha ağır vakalarda enfeksiyon zatürreye, bakteriyel süper enfeksiyona ve hatta ölüme neden olabilir. Bununla birlikte, tüm hastalar tipik semptomlar göstermezler. Hastalığın süresi genellikle 5-7 gündür ve bu süre komplikasyonlara ve risk faktörlerine bağlı olarak daha uzun olabilir (RKI-Ratgeber, 2021).

Virüsler replikasyon, transkripsiyon ve translasyon gibi karmaşık metabolik reaksiyonları gerçekleştiremediklerinden dolayı metabolik olarak aktif ökoryatik veya prokaryotik özellikte konak hücrelere gereksinim duyarlar. Konak hücre dışında herhangi bir canlılık belirtisi göstermezler. Buna karşın genetik olarak büyük bir

çeşitlilik gösterirler. Virüs genomları çift/tek zincirli, halkasal/doğrusal, DNA/RNA şeklinde olabilirler (Lyons ve ve Lauring, 2018). Viroloji alanında öncü isimlerden olan David Baltimore, virüsleri genom yapılarına göre 6 ana kategoride sınıflandırmıştır, fakat daha sonra *Hepadnaviridae* ailesinde yer alan virüslerde olduğu gibi kısmi çift iplikli DNA genomu taşıyan virüsler de eklenerek virüsler 7 farklı sınıf altında toplanmıştır (Cann, 2005). Bu 7 grup arasından tek iplikli negatif polarite göstererek RNA genomu taşıyan 5.grup virüsleri, diğer virüs gruplarından ayrılırlar. Bu grup içerisinde yer alan virüsler tek parçalı genom yapısına sahip olanların yanı sıra parçalı genom yapısına sahip virüslerde bulunmaktadır. Bu tez çalışmasına konu olan influenza A virüsleri; influenza B, C ve D virüsleri ile birlikte bu grupta yer alan *Orthomyxoviridae* ailesinde sınıflandırılırlar (Hause ve ark., 2011; Zhu ve ark., 2017). *Orthomyxoviridae* ailesi içerisinde yer alan virüsler, yapılarında bulunan matriks proteinleri (M1) ve nükleoproteinlerin (NP) antijenik farklılıklarına göre 3 ana gruba ayrılmışlardır. Bunlar influenza A, influenza B ve influenza C virüsleridir. Son yıllarda sığırlar üzerine yapılan bir araştırmada izole edilen, mevcut influenza türlerinden antijenik özellikleri bakımından farklılık gösteren bir influenza türü keşfedilmiştir ve influenza D olarak sınıflandırılmıştır. Bu dört tip virüsten influenza A virüsleri, insan sağlığı için çok daha büyük risk taşıdığı için diğer influenza gruplarından ayrılırlar (Cann, 2005; Lyons ve Lauring, 2018).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), 1980 yılında influenza virüslerini tanımlamak için standart bir isimlendirme oluşturdu. Bu isimlendirmede antijenik tip (A, B veya C), konak menşei (virüsün insanlardan izole edilememesi durumunda), coğrafi menşei bölgesi, soy sayısı ve izolasyon yılı gibi bilgilerden yararlanılmaktadır. İnfluenza A virüslerinde isimlendirme yüzey antijen proteinleri hemaglutinin (HA) ve nöraminidaz (NA) alt tipleriyle gerçekleşir. Örneğin 2009 pandemik influenza A/California/04/2009 California, soy numarası 04, 2009 yılında ilk izole influenza A (H1N1) ve tip H1N1 olarak gösterilir (Dharmapalan, 2020; Loregian ve ark., 2014).

Elektron mikroskobu (EM) ile influenza A ve B virüsleri morfolojik olarak neredeyse ayırt edilemezler. Küresel veya ipliksi bir şekle sahiptirler, küresel formlar çapı ortalama 100 nm'dir ve ipliksi formlar genellikle uzunluğu 300 nm'yi aşar (Palese ve Shaw, 2007). İnfluenza A ve B virüsü genomlarının her biri sekiz negatif polariteye sahip, tek zincirli viral RNA (vRNA) segmenti içerirken, influenza C virüsü yedi

segmentli bir genoma sahiptir. İnfluenza A ve B virüslerinin sekiz segmenti (ve influenza C virüsünün yedi segmenti), azalan uzunluk sırasına göre numaralandırılmıştır. PB2, PA, HA, NP ve NA proteinlerinin her biri ayrı bir RNA segmenti tarafından kodlanır. M2 ve NEP, alternatif olarak işlenmiş mRNA'lar üzerinden sentez edilirken PB1-F2, +1 alternatif okuma çerçevesinde kodlanır (Hause ve ark., 2013). İnfluenza C virüslerinin genomik organizasyonu genellikle influenza A ve B virüslerininkine benzerdir. Bununla birlikte, influenza C virüslerinde HEF proteini, HA ve NA proteinlerinin yerini alır ve bu nedenle influenza C virüs genomu, influenza A veya B virüslerininkinden bir eksik segmente sahiptir. İnfluenza D virüsleri ise sığırları ve domuzları enfekte edebilir. Sığırlarda herhangi bir semptoma yol açmayan influenza D virüsleri, domuzlarda hastalığa yol açabilmektedir (Wan ve ark., 2020).

İnfluenza A virüslerinde viral membran, kolesterol bakımından zenginleştirilmiş lipit salları ve transmembran glikoproteinler hemaglutinin (HA) ve nöraminidaz (NA) proteinleri içerir. Bu proteinler influenza A virüslerinin alt tiplere ayrılması için kullanılır (Palese ve Shaw, 2007). Üçüncü bir membran proteini, daha az bulunan matriks proteini 2 (M2)'dir. HA, NA ve M2 sırasıyla tip I, tip II ve tip III membran proteinleridir (Skehel ve Wiley, 2000). Virüslerde membranın hemen altında bir tabaka oluşturan matris proteini 1 (M1) virüs partikülünde en bol bulunan proteinidir. M1, viral ribonükleoproteinleri ve viral RNA polimeraz kompleksini oluşturan üç polimeraz proteinini (PA, PB1 ve PB2) içine alan bir iç tabaka oluşturur (Fields ve ark., 2013).

M2, PB1-F2 ve NB proteinleri, viroporinler, yani bir, iki veya hatta üç transmembran (TM) α-sarmal alanına sahip virüs kodlu kısa polipeptitler (yaklaşık 60-120 amino asit) olarak sınıflandırılır. Bu polipeptitler, membranları iyonlara geçirgenleştiren tipik olarak dört ila altı monomerden oluşan oligomerler oluşturur (Jalily ve ark., 2020; Muraki ve Hongo, 2010).

HA, influenza A viral genomlarının dördüncü negatif iplikli RNA segmenti tarafından kodlanır. Proteolitik olarak kesilmemiş HA proteini, HA0 olarak ifade edilir ve bu protein translasyon sonrası glikozile edilir ve enfekte hücrede endoplazmik retikulumda (ER) şaperonlar yardımı ile trimerik forma dönüştürülür. HA proteini translasyon sonrası glikozillendiği için glikoprotein yapıdadır. Virüsün konak hücreye

tutunmasında işlev görür. Virüs membranında yer alan bu protein, konak organizma savunma mekanizmasının en önemli hedeflerinden biridir. Konak organizmada bu proteinlere karşı antikor sentez edilir ve bu antikorlar viral enfeksiyonu inhibe etmekte rol alırlar (Ellebedy ve ark., 2009; Yang ve ark., 2013).

İnfluenza antiviral ilaçlarının geliştirilmesi ölüm oranını büyük ölçüde azaltmış olsa da influenza virüsü sentetik ilaca dirençli suşların ortaya çıkması nedeniyle dünya çapında halk sağlığı için hala büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Bu nedenle direnç oluşturmayan ve benzersiz farmakolojik aktiviteye sahip yeni ilaçların keşfedilmesi ve geliştirilmesi gerekmektedir. İnfluenza A virüsü yüzey antijen proteinleri HA ve NA proteinleri, virüsün konağı enfekte etmesinde aktif rol oynayan proteinler olduğundan ilaç ve aşı çalışmalarında M2 iyon kanalıyla birlikte tercih edilirler (Ellebedy ve ark., 2009; McKimm-Breschkin, 2013; Yin ve ark., 2021).

İnfluenza A virüsü salgınları zaman zaman tüm dünyayı etkisi altına alan pandemiler şeklinde kendini göstermektedir. Bu virüslere karşı korunmada izlenen yollar aşılama ve başta nöraminidaz inhibitörleri olmak üzere antiviral ilaçların kullanılmasıdır (Rewar ve ark., 2015). Zanamivir ve oseltamivir gibi antiviral ilaçlar, gribal enfeksiyonların önlenmesi veya tedavisi için kullanılan ilaçlardır. Bu ilaçlar hem influenza A tipi hem de B tipi virüsler karşı etkili olmakla birlikte, çok sayıda dirençli virüs tiplerinin ortaya çıkması yakın gelecekte çok önemli bir sorun olarak karşımıza çıkacağının işaretlerini vermektedir. Benzer sorunlar influenza aşılarında da yaşanmaktadır. Ülkemizde uygulanan influenza aşısı inaktive aşı olup üç viral suşa karşı antijenler içeren trivalan influenza aşısıdır. Trivalan influenza aşısı; influenza A(H3N2), influenza A(H1N1) virüs ve influenza B gibi üç farklı influenza virüsüne karşı virüsleri korunma sağlar. Mevsimlik influenza aşıları, bir önceki mevsimde insan popülasyonunda dolaşımda olan virüs suşları temel alınarak üretilir. Aşılar, her yıl yaygın olması en muhtemel suşları hedef alacak şekilde virüs tipleri seçilerek hazırlanmaktadır (Song, 2016).

İnaktive virüs aşıları kadar yaygın olmamakla birlikte, rekombinant olarak üretilen influenza HA ve NA proteinleri de influenza aşısı olarak kullanılmaktadır. Rekombinant aşılar daha güvenilir olmakla birlikte, embriyonlu tavuk yumurtasında üretilen ve inaktive edilen influenza aşılarına göre maliyeti biraz daha yüksektir. Buna

karşın DNA teknolojilerindeki gelişmeler çok daha geniş spektrumlu etki gösterecek, influenza aşılarının elde edilmesine olanak sağlayacak niteliktedir. Bu bağlamda tez çalışmasında, prokaryotik bir organizma olan *Escherichia coli* ve ökaryotik bir maya hücresi olan *Pichia pastoris*'in influenza virüsüne karşı kullanılabilecek bir aşının temel bileşeni olan HA proteinini üretme potansiyellerinin belirlenmesi amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda; influenza HA proteinin kodlayan genler insan IgG1 geni ile kaynaşmış halde hem bakteri hem de maya ekspresyon vektörlerinde klonlandı. Elde edilen bu plazmit vektörlerin bakteri ve maya hücrelerine IgG1 ile füzyon halde HA proteinlerini eksprese etme kapasiteleri incelendi.

4. GENEL BİLGİLER

4.1 İnfluenza Virüsleri

İnfluenza virüsleri *Orthomyxoviridae* ailesi içerisinde sınıflandırılan membranlı virüslerdir. Bu virüsler tek iplikli, negatif polarite gösteren parçalı yapıda RNA genomu taşırlar. *Orthomyxoviridae* ailesinde yer alan virüsler, nükleokapsid proteini (NP) ve matriks (M) proteinlerinin antijenik özelliklerine göre *Alfainfluenzavirus* (tür: influenza A virüsü), *Betainfluenzavirus* (tür: influenza B virüsü), *Gammainfluenzavirus* (tür: influenza C virüsü) ve *Deltainfluenzavirus* (tür: influenza D virüsü) olmak üzere dört farklı cins içerisinde değerlendirilmektedir (Hutchinson, 2018; King ve ark., 2012). *Alfainfluenzavirus* kapsamında yer alan influenza A virüsü, hemaglutinin (HA) ve nöraminidaz (NA) membran glikoproteinlerinin yapısına göre alt tiplere ayrılırlar. Bugüne kadar influenza A virüsünde 18 farklı HA alt tipi (H1–H18) ve 11 farklı NA alt tipi (N1–N11) tanımlanmıştır. Bunların yalnızca bir alt grubunun insan enfeksiyonlarına yol açtığı bilinse de tümü doğal konakçıları olan su kuşları ve kıyı kuşlarından izole edilmiştir (Yoon ve ark., 2014). HA ve NA'nın iki ek alt tipinin genomları yarasalardan dizilenmiştir (Tong ve diğerleri, 2012; Tong ve diğerleri, 2013). İki influenza A alt tipi (H1N1 ve H3N2) ve influenza B virüslerinin antijenik olarak farklı iki tipi insan popülasyonunda endemiktir (Grohskopf ve diğerleri, 2014; Medina ve García-Sastre, 2011).

İnfluenza B virüsü, HA yüzey antijeni özelliklerine göre, iki alt tipe (B/Yamagata ve B/Victoria) ayrılmaktadır (Hutchinson, 2018). İnfluenza C virüsünün; Taylor/47, Kanagawa/1/76, Yamagata/26/81, Aichi/1/81, Sao Paulo/378/82 ve Mississippi/80 tarafından temsil edilen altı evrimsel alt tipi bulunmaktadır (Matsuzaki ve ark., 2003). İnfluenza D virüsü ilk olarak 2011'de izole edilmiştir ve resmi olarak 2016'da adlandırılmıştır (https://www.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm) (Hause ve ark., 2013). İnfluenza D virüsü genetik olarak dört alt tip olarak değerlendirilmektedir. Bunlar; bağışıklık sisteminin birincil hedefi olan hemaglutinin-esteraz-füzyon (HEF) proteinine karşı üretilen nötralizan antikor temeline dayalı olarak D/OK, D/660, D/Yama2016 ve D/Yama2019 IDV tipleridir (Murakami ve ark., 2020; Odagiri ve ark., 2018).

İnfluenza A ve B virüs genomlarının her biri sekiz parçadan oluşurken, influenza C ve D virüs genomlarının her biri yedi parçadan oluşur ve bir NA segmentinden yoksundur. İnfluenza C ve D virüs genomlarının HEF segmenti, influenza A ve B virüs genomlarının hem HA hem de NA proteinlerinin fonksiyonlarına karşılık gelen reseptöre bağlanma, membran füzyonu ve esteraz aktivitesine sahip büyük bir zarf glikoproteinini kodlar. Dört tip influenza virüsü grubu içerinde, influenza A virüsleri her yıl mevsimsel salgınlara ve bazı durumlarda pandemilere neden olan en yaygın ve en patojenik olan virüslerdir. İnfluenza A virüsleri, insanlar, kuşlar, atlar, domuzlar, köpekler ve deniz memelileri de dahil olmak üzere çok sayıda farklı organizma grubunda enfeksiyon yapar (Medina ve García-Sastre, 2011; Webster ve ark., 1992). Su kuşları, tüm farklı influenza virüs alt tiplerini barındıran, yeniden yayılma potansiyeli olan ve insanların önceden var olan bağışıklığa sahip olmadığı yeni antijenik varyantlar üreten ana rezervuardır (Yoon ve ark., 2014). Kuş kökenli influenza virüsleri tür bariyerini geçebilir ve insanları enfekte ederek pandemilere neden olabilirler. Geçen yüzyıl içerisinde 1918 yılında İspanyol pandemisi (H1N1), 1957 Asya pandemisi (H2N2) ve 1968 Hong Kong pandemisi (H3N2) olmak üzere üç büyük influenza A pandemisi yaşanmıştır. İçerisinde bulunduğumuz 21.yüzyılın ilk influenza virüsü pandemisine, 2009 yılında, domuzlardan geçtiği düşünülen influenza A (H1N1) tipi virüs pandemisidir (Medina ve García-Sastre, 2011).

H5, H6, H7, H9 ve H10 tipi virüsler gibi domuz ve kuşlardan kaynaklanan diğer influenza A virüsleri de insanlara bulaşma ve yayılma potansiyeline sahiptir ve bazı durumlarda ağır seyreden hastalıklara ve ölümlere neden olabilirler (Medina ve García-Sastre, 2011; Graaf ve Fouchier, 2014).

İnfluenza B virüsleri, influenza A virüsleri gibi, insanlarda mevsimsel salgınlara neden olan virüslerdir. Bununla birlikte influenza pandemilerini tetikleme kabiliyetinden yoksundurlar. İnfluenza B virüsleri, insanları birincil rezervuar olarak kullanır. Bu virüslerin insanlardan foklar veya domuzlar gibi diğer türlere bulaştığı durumlar olmasına rağmen, büyük ölçüde insanlarda dolaşımda olan virüslerdir. İnfluenza C virüsleri insanları rezervuar olarak kullanır ve hafif seyreden solunum yolu semptomlarına neden olurlar (Koutsakos ve ark., 2016). Bazı çalışmalar, influenza C virüslerinin domuzlarda, köpeklerde ve sığırlarda bulaşma ve çoğaltma yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir (Wang ve Veit, 2016). İnfluenza D virüsleri, sığırları

birincil rezervuar olarak kullanır ve sığırlardan domuzlara bulaşabilir (Hause ve ark., 2013; Hause ve ark., 2014; Su ve ark., 2017). İnfluenza B virüslerine özgü antikorlar, özellikle sığırlarda, atlarda, küçük geviş getiren hayvanlarda, yaban domuzlarında, bufalolarda, develerde ve insanlarda da tespit edilmiştir, Bu durum influenza B virüslerinin, sığırlardan insanlara veya diğer hayvan türlerine kadar geniş bir konak yelpazesine sahip olabileceğini gösterir (Nedland ve ark., 2018; Quast ve ark., 2015; Salem ve ark., 2017; White ve ark., 2016; Yu ve ark., 2021).

İnfluenza virüsü enfeksiyonu ile ilişkili semptomlar, üst solunum yolu ile sınırlı ateş, boğaz ağrısı, burun akıntısı, öksürük, baş ağrısı, kas ağrısı ve yorgunluk ile karakterize hafif bir solunum yolu hastalığından; virüsün tipine bireyin bağışıklık sistemine göre şiddetli ve bazı durumlarda ölümcül pnömoniye kadar değişebilir. İnfluenza virüsü enfeksiyonu alt solunum yollarının sekonder bakteriyel enfeksiyonuna, bazı durumlarda kalp, merkezi sinir sistemi ve diğer organ sistemlerini etkileyen çok çeşitli solunum sistemi dışı komplikasyonlara da yol açabilir. Yıllık mevsimsel salgınlarla karakterize olmasına rağmen, zoonotik kökenli influenza A virüs tiplerini içeren sporadik ve öngörülemeyen küresel pandemik salgınlarda meydana getirebilir. Pandemik influenza her 10-40 yılda bir meydana gelir ve daha önce dolaşımda olan virüs tiplerinden antijenik olarak çok farklı olan yeni bir virüs tipi olarak karakterize edilir. Bu gibi durumlarda insanlarda önceden var olan bağışıklığın yetersiz kalması genellikle enfeksiyonun şiddetinde ve ölüm oranında artışa neden olur. (Krammer ve ark., 2018; Kwong, 2018; Sellers ve ark., 2017).

Şimdiye kadar; 1918 İspanyol gribi (H1N1), 1957 Asya gribi (H2N2), 1968 Hong Kong gribi (H3N2) ve 2009 domuz kökenli grip (H1N1) olmak üzere dört şiddetli grip salgını belgelenmiştir (Guan ve ark., 2010). Bu pandemilerin etiyolojik ajanları, influenza A virüslerinin grip pandemileriyle güçlü bir ilişkisini gösterir ve bu nedenle küresel topluluklar için büyük bir halk sağlığı tehdidi oluşturur. Bildirilen dört grip salgını arasında 1918 İspanyol grip salgını tarihteki en hızlı bulaşıcı hastalık salgını olarak kabul edilir (Martini ve ark., 2019). Birçok hastanın akut ve olumsuz pulmoner kanama ve ödemden muzdarip olduğu bildirilmiştir. Ciddi solunum yolu hastalıkları ile yaklaşık 50 milyon kişinin ölüme neden olmuştur (Fukuyama ve Kawaoka, 2011). Bazı çalışmalar 1918 pandemik influenza A virüsünün H1N1'in genomunu incelemeye

çalışmıştır, ancak hiçbiri enfeksiyon kaynağı olarak hizmet eden konak ile ilgili kesin bulgular sunamamıştır (Taubenberger ve ark., 1997; Taubenberger ve ark., 2005). 1918 influenza A virüsünün H1N1'in genomu, şimdiye kadar keşfedilen ve RNA genomları rastgele, sessiz nükleotid değişiklikleri yoluyla değiştirilen herhangi bir kuş veya memeli influenza A virüsünden farklıdır. 1918 H1N1'in genomu büyük olasılıkla bir kuş gribi virüsünden, insana bulaşmadan önce kuşlarda kapsamlı gen adaptasyonu yoluyla evrimleşmiştir (Taubenberger ve ark., 2006).

Yaklaşık kırk yıl sonra, ikinci influenza pandemisi 1957 yılında dünya popülasyonlarını vurmuştur. Pandemiye, insan influenza A virüsü H1N1 ve kuş influenza A virüsü H2N2 genomları arasındaki karışma (reassortment) yeni bir influenza A virüsü alt tipi (H2N2) neden olmuştur. Bu pandemi yaklaşık 1 milyon kişinin ölümüne neden olmuştur (MacKellar, 2007). Yaklaşık on yıl sonra, 1968 yılında, insan influenza A virüsü H2N2 ve kuş H3 alt tipi arasındaki genlerin yeniden sınıflandırmasıyla yeni bir influenza A virüsü alt tipi, yani H3N2 ile sonuçlanmıştır. (Lindstrom ve ark., 2004).

Yeni influenza A virüsü H3N2, daha önce tanımlanmış pandemik influenza A virüslerinden antijenik olarak farklıdır. Bu açıdan bakıldığında, yeni influenza alt tipine karşı önceden var olan bağışıklığın olmaması nedeniyle, virüs önemli ölçüde bulaşıcıydı ve hızla yayılabildi ve sonunda bir grip pandemisine yol açtı. 1968 Hong Kong gribi dünya çapında yaklaşık 1 milyon insanın ölümüne neden oldu ve bunlar arasında 65 yaş ve üzeri yaşlılar en çok etkilenen nüfus oldu (Tricco ve ark., 2013).

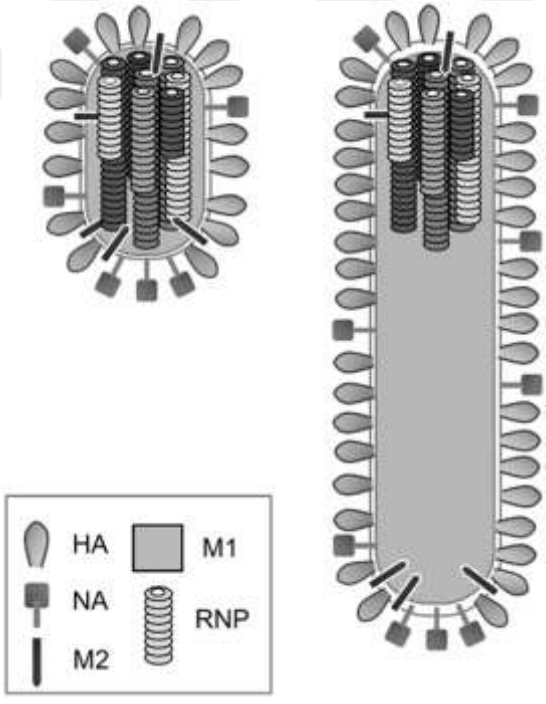
2009'da influenza A H1N1pdm09 virüsünün neden olduğu dördüncü grip salgınında onaylanmış 18.631 ölüm vakası gerçekleşmiştir (Simonsen ve ark., 2013). Genetik ve epidemiyolojik kanıtlar, Meksika'da meydana gelen ilk pdmH1N1 salgınının, H1 ve H2 arasındaki farklılığın %40-46 olduğu kanıtlanmış olan H1N1'in psödo-antijenik kaymasından kaynaklandığını göstermiştir (Gatherer, 2009). Genetik çeşitlilik nedeniyle, influenza A H1N1 tipi yeni bir influenza virüsü alt tipine (H1N1pdm09) evrimleşmiştir. Yeni ortaya çıkan H1N1pdm09 virüsünün dolaşımda bulunan H1N1 tipinden farklı olması nedeniyle uygulamada olan mevsimsel grip aşısı bu virüse karşı koruyucu etki göstermemiştir. Kuzey Amerika kaynaklı üçlü karışıma uğramış influenza A H1N2 tipi ile bir Avrasya domuz gribi H1N1 arasındaki antijenik

kaymanın yeni influenza A H1N1pdm09 virüsünün ortaya çıkmasına neden olduğu ileri sürülmüştür (Baldo ve ark., 2016; Christman ve ark., 2011; Mena ve ark., 2016; Smith ve ark., 2009).

4.2 İnfluenza Virüslerinin Morfolojisi

İnfluenza A ve influenza B virüslerinin genomları, NP proteinleri ile kompleks halinde ve çift katlı bir lipid tabakası içinde yer alan tek iplikli sekiz RNA segmentlerinden oluşur (Moreira ve ark., 2021).

Elektron mikroskobuyla (EM) incelendiğinde, bu virüslerinin küreler ya da filamentler halinde olduğu görülür. Küre şeklinde virüsler ortalama 100 nm çapındayken filament şeklinde olanlar ortalama 300 nm uzunluğundadır **(Şekil 1)**. Virüsün membranında yer alan hemaglutinin (HA) ve nöraminidaz (NA) glikoproteinlerinden; HA üçgenimsi çubuk şeklinde yer alırken, NA, mantar benzeri çıkıntılar yapar (Mtambo ve ark., 2021).



Şekil 1. İnfluenza virüs partikülü (Noda, 2012)

İnfluenza A ve influenza B virüslerinin antijenik özellikleri farklı olmakla birlikte viral genomlarının kodlandığı proteinler benzer görevlere sahiptir (Krammer ve ark., 2018). Virüs partikülleri; HA, NA ve matriks 2 (M2) proteinini içeren, enfekte ettikleri konak hücrelerden kaynaklanan bir membran ile sınırlanmıştır (Gamblin ve Skehel, 2010).

Viral membranın altında tek tabaka halinde matris 1 proteini (M1) bulunur. M1 proteinlerinin oluşturduğu katmanın içerisinde viral ribonükleoprotein (vRNP) partikülleri halinde genom segmentleri bulunur. Her bir vRNP bir RNA molekülü ve çok sayısız nükleoprotein (NP) ile sarılmış haldedir ve PB1, PB2 ve PA proteinlerinden oluşan RNA polimeraz enzimi taşır (Dou ve ark., 2018).

4.3 İnfluenza A virüsleri

İnfluenza A virüsleri insanlar dışında başta kanatlılar olmak üzere birçok memeli türünde enfeksiyon yaparlar. Özellikle insan dışında diğer organizmalarda enfeksiyon yapan influenza A virüslerin, mevsimsel grip salgınlarına ek olarak pandemilere neden olma potansiyeli yüksektir. 1918 İspanyol gribi, 1957 Asya gribi, 1968 Hong Kong gribi ve son olarak 2009 yılında domuz gribi olarak bilinen salgınlar influenza kaynaklı pandemilerdir. Geçmiş yaşanılan pandemiler değerlendirildiğinde, influenza A virüslerinin ortalama 10-40 yıllık zaman periyotlarında tekrarlayan pandemilere neden olduğu söylenebilir. İnfluenza A virüsün bir pandemiye neden olması için; insan bağışıklığı için yeni olması, insan konakçılar için öldürücü olması ve kişiden kişiye bulaşabilmesi gereklidir (Lowen ve ark., 2006).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) tahminlerine göre, influenza A virüsü global olarak bir pandemiye neden olduğunda, yaklaşık 3 ile 5 milyon arası kişiyi enfekte edecek ve bu enfeksiyonlar sonucu ortaya çıkan solunum yolu hastalıklarına bağlı olarak yaklaşık 300.000-650.000 kişi yaşamını yitirecektir (https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza (seasonal)).

İnfluenza A virüslerinin neden olduğu gribal enfeksiyonların başlıca belirtileri ateş, boğaz ağrısı, halsizlik, vücut ağrıları, öksürme ve burunda akıntısı şeklindedir ve çoğunlukla hastalar bir hafta içinde iyileşirler. Bununla birlikte yaşlılar, çocuklar ve bağışıklık sistemi baskılanmış olan kişilerde bu süre uzayabilir ve ağır seyreden enfeksiyonlar, ölümle sonuçlanabilir (Krammer ve ark., 2018).

İnfluenza A virüslerinin neden olduğu hastalıklar mevsimsel olarak tekrarlar ve bazı dönemlerde pandemiler şeklinde kendisini gösterir. Virüs salgınlarının sürekli olarak tekrarlamasının temel nedeni, influenza A virüslerinde görülen antijenik çeşitliliğin fazla olması ve yeni antijen tiplerinin ortaya çıkmasıdır (Igarashi ve ark., 2010).

4.3.1 İnfluenza A virüsünün moleküler yapısı ve replikasyonu

İnfluenza virüsleri yukarıda da belirtildiği gibi negatif polarite gösteren sekiz adet tek iplikli RNA moleküllerinden oluşmaktadır. RNA'ya bağlı RNA sentezi yapan viral RNA polimeraz proteinleri (PB1, PB1-F2, PB2 ve PA), hemaglutinin (HA), nöraminidaz (NA), nükleoprotein (NP), matriks proteinleri (M1 ve M2) viral RNA segmentleri tarafından kodlanan başlıca proteinlerdir. Bu proteinlere ek olarak virüs partikülünde çok az bulunan ya da hiç bulunmayan yapısal olmayan NS1 ve NS2 (NEP) proteinleri viral genom üzerinden kodlanır (Ebrahimi ve Tebianian, 2011; McCauley ve Mahy, 1983) **(Tablo 1)**.

İnfluenza A virüslerinde yüzey antijeni proteinleri olarak isimlendirilen HA, NA ve M2 proteini viral membran üzerinde yer alırlar. Bu proteinlerinden HA ve NA glikoproteinleri kolesterol bakımından zengin lipid sallarında daha yoğun olarak bulunurlar (Krammer ve ark., 2018).

HA proteini viral genomun 4.segmenti üzerinden öncül bir polipeptit olarak (HA0) sentez edilir ve tripsin veya furin benzeri proteazlar tarafından kesilerek HA1 ve HA2 alt birimlerine ayrılır. HA; viral replikasyon başlangıç aşaması olan hücre reseptörüne bağlanma ve sonrasında membran füzyonunun gerçekleşmesinde işlev görür (Fouchier ve ark., 2005).

Virüs membranında yer alan NA molekülleri tetramerik yapıda bulunurlar. (Air, 2012). NA, konak hücre membranında tomurcuk şeklinde oluşan virüslerin serbest kalmaları için gerekli olan bir enzimdir. Bununla birlikte viral membranda yer alan ve hücre reseptörlerine tutunmada işlev gören HA'nın işlevini engelleyecek kadar yüksek oranlarda bulunmaması gereklidir (Kosik ve Yewdell, 2019). Bu iki protein hücre yüzeyinde bulunan glikoproteinler ve glikolipidlerde bulunan sialik asit bakiyeleri ile etkileşim içerisine girerler (Matrosovich ve ark., 2004).

M2 proteini membranda yer alan HA ve NA proteinlerine oranla çok daha az bulunmakla birlikte, virüs partikülünde pH değişimine neden olan önemli bir iyon kanalı görevi görür. Bu işlevi nedeniyle M2 proteini enfeksiyonun ilk aşamalarında, viral ribonükleoproteinlerin M1 matriksinden ayrılıp salınmasında da rol alır. Virüs partikülünün içerisinde ender miktarlarda NS2 (NEP) ve viral RNA polimeraz enzimini (PB1, PB2, PA) de yapısında barındıran vRNA'lardan bulunmaktadır (Nayak ve ark., 2009). Viral membranın hemen altında ise tek tabaka halinde bulunan matriks 1 proteini virüsün yapısında en çok bulunan proteindir. (To ve Torres, 2019).

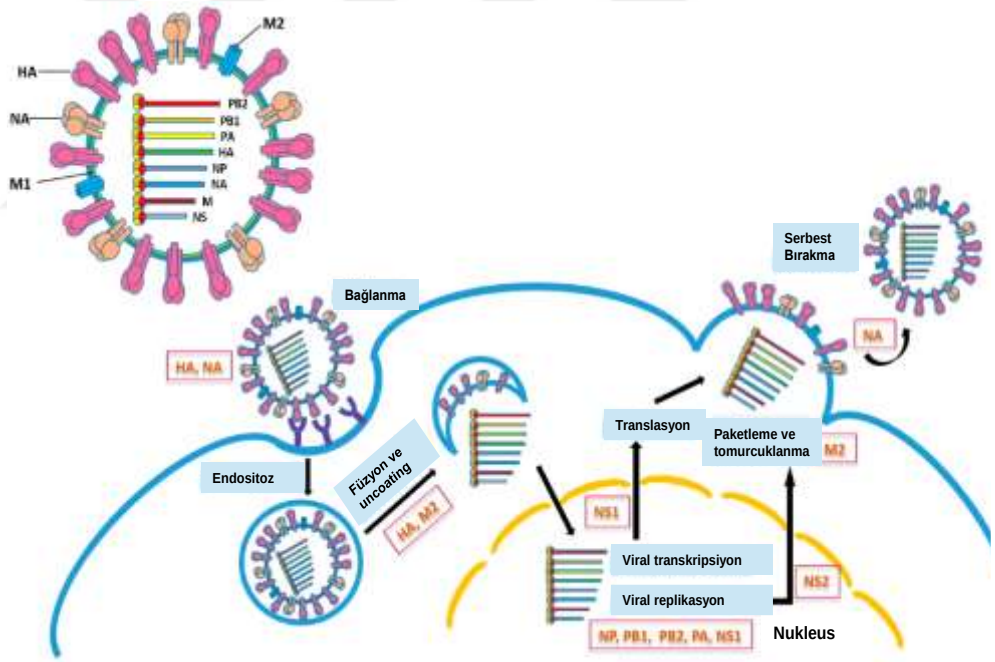
Tablo 1. İnfluenza A virüsünün genomik segmentleri ve bunların kodlanmış proteinleri (Bouvier ve ark., 2008'den değiştirilerek kullanılmıştır).

Segment	Kodlanan Proteinler	Proteinlerin İşlevleri
1	PB2	Polimeraz alt birimi; mRNA'nın başlık tanıması
2	PB1	Polimeraz alt birimi; RNA'nın uzaması, endonükleaz aktivitesi
	PB1-F2	Proapoptotik aktivite
3	PA	Polimeraz alt birimi; proteaz aktivitesi
4	HA	Viral zarf glikoproteini; majör antijen, reseptör bağlanması ve füzyon aktiviteleri
5	NP	RNA bağlayıcı protein; nükleer ithalatın yönetilmesi
6	NA	Viral zarf glikoproteini; sialidaz aktivitesi, virüs salınımı
7	M1	Matris proteini; vRNP etkileşimleri, RNA nükleer ihracatının düzenlemesi, viral tomurcuklanma
	M2	İyon kanalı; virüsün kaplanması ve montajı
8	NS1	İnterferon antagonist proteini; konak gen ekspresyonunun düzenlenmesi
	NEP/NS2	RNA'nın nükleer ihracatı

İnfluenza A virüsünün yaşam döngüsü **Şekil 2**'de görüldüğü gibi farklı aşamalar halinde değerlendirilebilir. Enfeksiyonun ilk aşaması virüsün hücre membranında yer alan proteinlerin sialik asit bakiyelerine bağlanmasıdır. Daha sonra bu olayı virüs partikülünün endositoz yoluyla konak hücre içerisine alınması, viral membran ve endozom membranının füzyonu ve virüs içeriğinin (vRNP'lerin) sitoplazmada serbest kalması izler. vRNP'lerin hücre çekirdeğe taşınması sonrasında viral RNA'nın

transkripsiyonu ve replikasyonu gerçekleşir. Hücre çekirdeğinde kurulan yeni vRNP'ler sitoplazmaya taşınır ve oradan da konak hücre zarında bir araya gelerek tomurcuklanma yoluyla yeni virionları oluştururlar (Nuwarda ve ark., 2021).

İnfluenza A virüsü HA glikoproteininin membran proteinlerine bağlı sialik asit bakiyelerine bağlanmasıyla virüsün replikasyon döngüsü başlar. vRNP'lerin sitoplazmaya salınabilmesi için pH değişiklikleri ve farklı endozomal aşamaların gerçekleşmesi gerekir. Endozomlarda ortamın pH değeri, viral replikasyonun devamı için önemlidir (Edinger ve ark., 2014). Düşük pH ortamı, HA da konformasyonel değişikliği neden olur ve viral membranın endozomal membran ile kaynaşmasına yardımcı olan füzyon peptidini ortaya çıkartır. Viral ve endozomal membranın kaynaşması vRNP'lerin hücre sitoplazmasında serbest kalmasını sağlar (Chen ve ark., 2008).



Şekil 2. İnfluenza A virüsünün replikasyon döngüsü (Zhu ve ark., 2017'den değiştirilerek kullanılmıştır).

Enfekte hücrede serbest kalan viral ribonükleoproteinler (RNP) sitoplazmadan çekideğe taşınırlar. Tüm RNP'lerin (8 adet) tamanının ayrı ayrı mı yoksa bir bütün

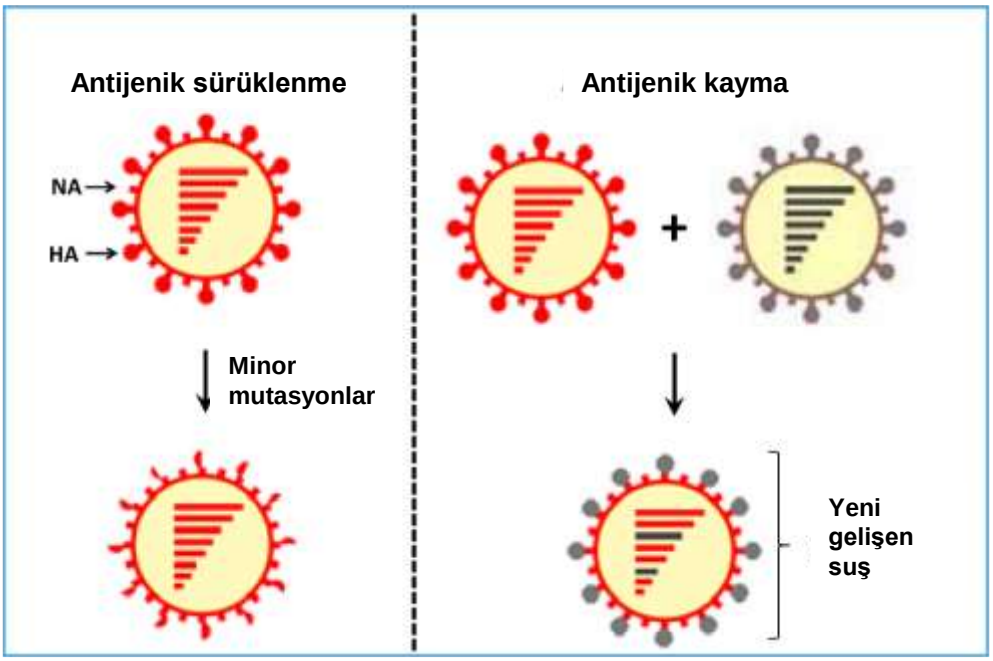
olarak mı taşındığı hala tam olarak anlaşılamamıştır. Ayrıca tüm RNP bileşiminde yer alan proteinler, nükleusa taşınmanın gerçekleşmesi için gerekli en az bir NLS (nükleer lokalizasyon sinyali) içermelidir. (Zheng ve Tao, 2013).

İnfuenza virüslerinde diğer bir çok RNA virüsünden farklı olak transkripsiyon ve replikasyon hücre çekirdeğinde gerçekleşir (Peacock ve ark., 2019). vRNA polimeraz enzimi, viral transkripsiyon ve replikasyonu kataliz eden bir enzimdir (Weis ve Te Velthuis, 2021). Viral RNP de yer alan RNA molekülünün 5' ve 3' uçlarına bir adet polimeraz kompleksi (PB1, PB2 ve PA) bağlıdır (Hutchinson ve Fodor, 2013; Te Velthuis ve Fodor, 2016). İnfluenza virüsü RNA polimeraz enzimi, viral mRNA'ların sentezinde poliadenilasyondan da sorumludur (Poon ve ark., 1999; Wandzik ve ark., 2020). Hücrelerde yeni sentez edilen viral RNA polimeraz alt birimleri (PB1, PB2 ve PA) ve NP proteinleri çekirdeğe taşınır ve pozitif tamamlayıcı bir RNA (cRNA) ara ürününün oluşmasını sağlarlar. Burada oluşan cRNA'lar, NP'ler ve vRNA polimeraz ile birleşerek cRNP'leri oluştururlar. Bu cRNA molekülleri viral RNA'ların replikasyonunu için gereklidir (York ve ark., 2013). vRNP'ler, vRNA'nın tamamlayıcısı olan cRNA'ya replikasyonunu primersiz bir şekilde gerçekleştirir ancak bu işlem sadece yeni sentezlenen polimeraz ve NP kullanılarak cRNP oluşturduklarında gerçekleşir (Vreede ve ark., 2004). Replikasyon sonucu oluşan vRNA'lar NP ve RNA polimeraz alt üniteleri ile birlikte vRNP'leri oluşturur ve nükleustan sitoplazmaya, oradan da hücre membranına taşınırlar. Viral partiküllerin enfekte hücrelerden ayrılmasında NA glikoproteininin sialidaz aktivitesi önemlidir. NA enzimi, virüsün serbet kalmasını engelleyen HA ile hücre yüzeylerindeki sialik asit reseptörleri arasındakı bağı keserek virüs yaşam döngüsünün tamamlanmasını sağlar (Blanco-Lobo ve ark., 2019; Tisoncik ve ark., 2011).

4.3.2 İnfluenza A virüslerinde antijenik yapı değişiklikleri

Viral membran üzerinde bulunan hemaglutinin (HA) ve nöraminidazın (NA) glikoproteinlerinde mutasyonlar sonucu meydana gelen değişmeler virüse önceden kazanılmış bağışıklıklığın yetersiz kalmasına neden olur ve virüsün yayılmasını kolaylaştırır. HA ve NA proteinlerinde değişikliklere neden olan mutasyonlar antijenik sürüklenme (antijenic drift) olarak adlandırılır (Taubenberger ve Kash, 2010). Diğer taraftan farklı influenza A virüsü tiplerinin (genel olarak zoonotik bir rezervuar) bir

konak organizmayı aynı anda enfekte etmesi, viral genomlarda karışmalara ve yeni virüs tiplerinin ortaya çıkmasına neden olabilmektedir **(Şekil 3)**. Bu tip karışmalar virüslerde antijenik kayma (antigenic shift) olarak adlandırılan büyük değişmeler neden olmakta ve büyük pandemiler ile sonuçlanmaktadır (Nelson ve Holmes, 2007).



Şekil 3. İnfluenza virüslerinin antijenik değişiklikleri

İnfluenza A virüsleri, konak hücre membranında bulunan glikoproteinlere bağlı sialik (N-asetilnöraminik) asit bakiyelerini tanırlar (Ayora-Talavera, 2018). Glikoproteinlere bağlı olan sialik asit bakiyeleri virüsün hücrelere girişinde reseptör işlevi görür. Domuzlarda enfeksiyon yapan virüsler, galaktoz moleküllerine hem α2,6 hem de α2,3 bağları ile bağlı sialik asit bakiyelerine bağlanırken, kuş tipi virüsler α2,3-bağlı sialik asitlere ve insan tipi influenza virüsleri ise α2,6 bağlı sialik asitlere bağlanırlar. Virüs bağlanması, yalnızca terminal sialik asit bakiyeleri için HA afinitesine değil, aynı zamanda oligosakkaritin yapısına ve reseptörlerin protein veya lipit kısımlarına ve ayrıca hücre yüzeyindeki reseptörlerin miktarına ve erişilebilirliğine bağlıdır (Matrosovich ve ark., 2004).

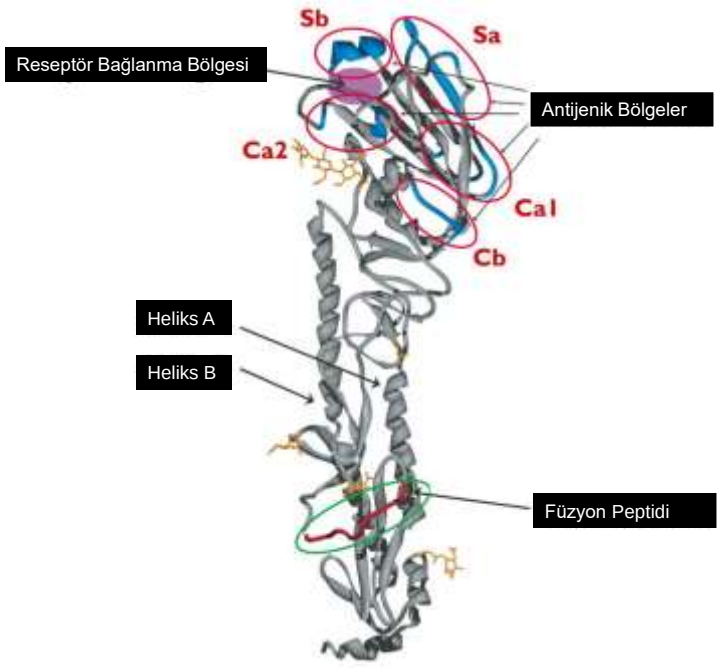
HA ve NA kodlayan viral RNA'nın segmentlerindeki baz değişikliklerinin anlaşılması, influenza A virüsü suşlarının antijenik sürüklenmesinde önceden var olan bağışıklıktan kaçmalarını sağlayarak büyük bir avantaj olarak katkıda bulunur.

Bugüne kadar sadece üç HA (H1, H2 ve H3) ve iki NA (N1 ve N2) alt tipinin insan pandemilerine neden olduğu ve bu pandemilerin birçok insanın hayatına mal olduğu bilinmektedir (Lee ve ark., 2007; Viboud ve ark., 2016). Antijenik kayma, insan popülasyonunun önceden var olan bağışıklığa sahip olmadığı için ve tamamen yeni pandemik potansiyele sahip olabilecek bir virüsün ortaya çıkmasıyla sonuçlanabileceğinden endişe vericidir.

4.4 İnfluenza Virüsü Yüzey Antijen Proteinleri

4.4.1 Hemaglutinin

İnfluenza A virüsü yüzey antijen proteinlerinin en önemlisi hemaglutinin (HA) proteinidir. Glikozillenmiş bir molekül olan HA viral membran üzerinde trimerik formda bulunur. Her bir HA proteini yapısal olarak; alfa heliks yapıları içeren bir gövde ve bu gövdenin üzerine antiparalel beta katlanma motiflerinden oluşan küresel yapıda baş bölgesi olmak üzere iki farklı bölgeden oluşur **(Şekil 4)**. H1 ve H3 alt tiplerinde sialik asit için reseptör bağlanma bölgesi olarak adlandırılan Sa, Sb, Ca1, Ca2 ve Cb olarak bilinen olası değişken antijen belirleyici yapılar yer alır (Skehel ve Wiley, 2000).



Şekil 4. Hemaglutinin proteini yapısı (Bouvier ve Palese, 2008' den değiştirilerek kullanılmıştır).

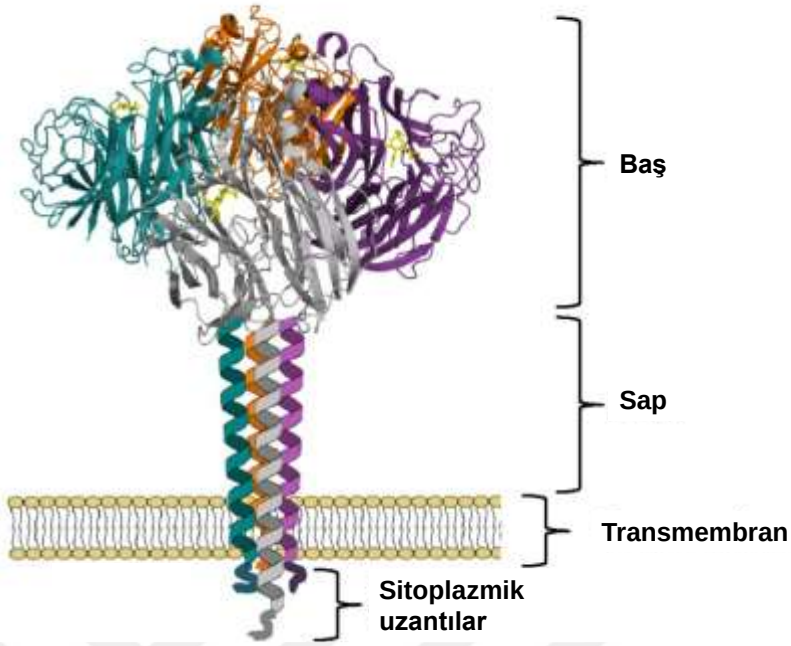
Trimerik yapıda HA proteinleri viral membran üzerinde dağılmış olarak bulunur (Harris ve ark., 2006). HA moleküleri, C-terminal sitoplazmik bölgeleri ile direkt olarak, matriks protein katmanı ile etkileşim içerisinde olacak şekilde viral membrana bağlanır.

Viral replikasyon sırasında, HA proteinleri serin proteazlar enzimleri tarafından kesilerek HA1 ve HA2 olarak adlandırılan iki peptide ayrılır. Bu olay HA proteinin aktivasyonu, dolayısıyla virüsün enfeksiyon yapabilmesi bakımından önemlidir. HA2 peptidinin viral membranın hücre membranları ile kaynaşmasında işlev gördüğü düşünülürken, HA1 peptidi antijenik motifleri ve reseptör bağlama bölgelerini kapsamaktadır (Luo, 2012).

HA proteinlerine karşı oluşturulan antikorlar, virüsün nötralize olmasına ve enfektivitesini etkisiz hale gelmesine neden yardımcı olur. Buna karşın mutasyonlar sonucunda virüs suşlarının hemaglutinin antijenik motiflerinde sıkça amino asit değişiklikleri meydana gelir. Bununla birlikte HA trimerinin gövde-baş biçimi, suşlar ve oluşan alt tipler arasında korunmaktadır (Del Rosario ve ark.,2021).

4.4.2 Nöraminidaz

İnfluenza A virüslerinin ikinci önemli yüzey antijen proteini olan nöraminidaz (NA) tetramerik yapıdadır ve hemaglutinin (HA) trimerleri arasına serpiştirilmiş olarak daha az sayıda bulunur. NA sialidaz enzimatik aktivitesine sahip bir glikoproteindir (Wen ve Wan, 2019). NA, sialik asit bakiyelerini sialiloligosakkaritlerden koparır ve yeni oluşacak olan virüs partiküllerinin serbest kalmasına olanak sağlar (Tscherne ve García-Sastre, 2011). NA enzimleri virüs membranında homotetramerik yapıda bulunur. Bu proteinler, dört farklı yapısal bölgeden oluşur. Bunlar; katalitik baş bölgesi, sap kısmı, transmembran bölgesi ve sitoplazmik kuyruktur (McAuley ve ark., 2019) **(Şekil 5)**.



Şekil 5. İnfluenza virüsü nöraminidaz proteininin yapısı (McAuley ve ark., 2019'dan değiştirilerek kullanılmıştır).

NA, glikolipitler ve glikoproteinlere benzer olarak bir dizi glikokonjugattan terminal α-2,3 ya da α-2,6 ketosidik bağlantı sialik asidin parçalanmasını hızlandırarak HA tarafından kabul edilen reseptörleri parçalayan bir enzim olarak işlev görür ve virüsün replikasyon döngüsünde temel rol oynar. NA, HA ve sialik asit bakiyelerini bölen ve yeni sentezlenen virionların yüzey glikoproteinlerinden hareketini kolaylaştırarak virüsün konakçı hücreden salınmasına yardımcı olarak biyolojik bir makas görevi görmektedir (Nuwarda ve ark., 2021).

4.5 İnfluenza Virüslerine Karşı Korunma Yolları

Özellikle hayvanlardan insanlara bulaşacak şekide adaptasyon geçiren influenza A virüsleri çok ağır seyreden hastalıklara neden oldukları bilinmektedir. Bu durum toplum sağlığı için endişe vericidir ve iyi takip edilebilmesine, koruyucu bakımlar (ilaç gibi) ve aşı şeklinde tedavilerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. İnfluenza A virüsleri ve günümüzde pandemiye dönüşen koronavirüsler gibi solunum yollarını etkisi altında bırakan virüsler, global çapta milyonlarca insanın ölüme neden olmaktadır (Wille ve Holmes, 2020).

Viral kaynaklı hastalıklarla mücadelede yetersiz olmakla birlikte antiviral ilaçlar ve aşılar en önemli araçlardır. İnfluenza virüslerinin sürekli mutasyonlar geçirmesi bu virüsün neden olduğu enfeksiyonlarla ile mücadele etmeyi zorlaştırmaktadır (Jiang ve ark., 2020; Lyons ve Lauring, 2018; Roubidoux ve ark., 2021).

4.5.1 Antiviral ilaçlar

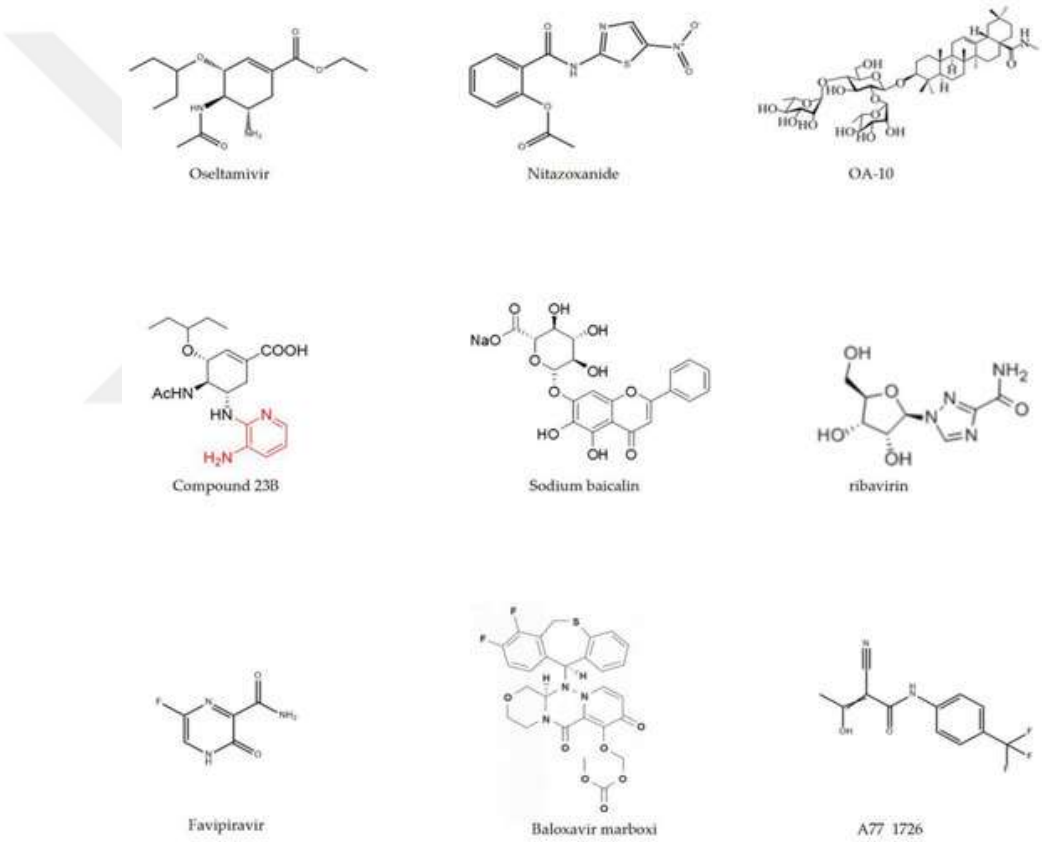
İnfluenza A virüslerinin değişken doğaları nedeniyle uzun vadeli koruma sağlayan aşıların ve ilaçların geliştirmesi açısından zorluklar yaşanmaktadır. Bu zorluğa rağmen araştırmacılar influenza virüsünün tedavisinde kullanılabilecek nöraminidaz (NA) inhibitörleri ve matriks 2 (M2) proteinini bloke eden iki farklı ilaç grubu geliştirmişlerdir (Shen ve ark., 2015).

NA inhibitörleri, influenza virüslerinin NA enzimi aktivtesini bloke etmekte ve virüs partiküllerinin enfekte hücrelerden ayrılarak serbest kalmasını engellemektedir. Bunun sonucunda viral replikasyon hızı düşmekte ve virüsler etkisiz hale getirebilmektedir.

Oseltamivir, zanamivir ve peramivir en çok bilinen etkili NA inhibitörleridir (Shen ve ark., 2015; Wu ve ark., 2016). Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA: U.S. Food and Drug Administration) tarafından onay alan, oseltamivir fosfat (Tamiflu), zanamivir (Relenza) ve peramivir (Rapivab) influenza virüsü enfeksiyonlarına karşı kullanılmaktadır **(Şekil 6)**. Bu ilaçlar sialik asit benzeri moleküller olduğundan influenza yüzey antijen proteini olan NA glikoproteinini hedef almakta, hem influenza A hem de influenza B virüslerine karşı etki göstermektedir. Bununla birlikte enfeksiyonun erken evrelerinde daha etkili olan ilaçlardır. Viral enfeksiyonlara karşı, küçük moleküllü antivirallerin ve bunların kombinasyonların önemli bir değeri olduğu kanıtlanmış olsa da, COVID-19'e benzer bir salgına karşı yeni küçük moleküllü antivirallerin araştırılması ve geliştirilmesi oldukça zorlu bir süreçtir (Grobler ve ark., 2020; Narkhede ve ark., 2021).

Zanamivir ve oseltamivirin molekülleri 1990'lı yıllarda keşfedilmiştir (Kim ve ark., 1997; von Itzstein ve ark., 1993) ve ilk olarak 1999 yılında insanlarda influenza enfeksiyonlarına karşı kullanıldığı için ilgili otoritelerce onay verilmiştir. Bu ilaçların her ikiside influenza A ve influenza B virüslerine karşı oldukça etkilidir. Zanamivir

ilk olarak oral yoldan hastalara verildiğinde biyoyararlanım açısından zayıf etki göstermiştir bu sebeple daha sonraları toz halinde geliştirelerek inhalasyon yoluyla hastalara verilmiştir (Cass ve ark., 1999). Oseltamivir tasarlanırken zanamivirden yararlanılmıştır fakat oral biyoyararlanımı iyileştirilerek sunulmuştur (Kim ve ark., 1997). Bir diğer NA inhibitörü olan peramivir, yapısal olarak zanamivir ve oseltamivirden farklıdır (Babu ve ark., 2000). Oral kullanımında biyoyararlanımı düşük olduğundan intravenöz olarak uygulanmasının etkili olduğu gösterilmiştir (Barroso ve ark., 2005).



Şekil 6. Kimyasal sentez ilaçlarının moleküler yapıları. (Yin ve ark., 2021)

İnfluenza A virüsü M2 proteini bloke eden ilaçlar virüs replikasyonunu kot atma aşamasında inhibe etmektedir (Lamb, 2020). Bu grubun temsilcisi olan ilaçlar adamantan türevi olan olan amantadin ve rimantadindir (Balannik ve ark., 2009). Bu antiviral ilaçlar sadece A tipi virüsler üzerinde etkilidir. M2 proteini blokerlerinin en

önemli dezavantajları profilaktik olarak kullanılabilmesi ve sıklıkla dirençli virüs tiplerinin ortaya çıkmasıdır. Örneğin amantadin, M2 proteininin 31. amino asidinde meydana gelen bir mutasyonla, virüsü inhibe etme kabiliyetini kaybettirir (Duncan ve ark., 2020). Direçli virüs suşlarının ortaya çıkması NA inhibitörleri için de söz konusudur. Bu nedenle araştırmacılar çalışmalarını yüksek oranda korunmuş olmaları nedeniyle influenza virüsü RNA polimerazlar enzimi üzerinde yoğunlaşmıştır (Müller ve ark., 2012). RNA polimeraz üzerine yapılan çalışmalar ribavirin ve favipiravir başta olmak üzere bu tip ilaçlar antiviral olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Pagadala, 2019).

İnfluenza virüsü yüzey antijen proteini olan hemaglutinin (HA), antiviral grip ilaçları için uygun bir hedeftir fakat HA üzerinde amino asitlerin yerini alan ilaca dirençli suşların ortaya çıkması sebebiyle HA üzerinde etkili inhibitörler geliştirilememiştir (Yang ve ark., 2013).

Antiviral ilaçlara karşı direncin ortaya çıkmamasını sağlamak amacıyla virüslerin takip edilmeleri gerekmektedir. S31N baskın mutasyonuna neden olan H3N2 influenza virüslerine karşı amantadin direnci, bu ilacın klinikte kullanılmasını sınırlamıştır (Dong ve ark., 2015). H275Y baskın mutasyonuna neden olan H1N1 influenza A virüslerinde oseltamivir direnci keşfedilmiştir fakat mevcut suşlarda dolaşma oranı daha düşüktür (Lackenby ve ark., 2018).

Dikkate değer şekilde antiviral etkinliğe sahip olan bir oleanolik asit türevi olan OA-10, ‘H5N1, PR8 (H1N1), H9N2 ve H3N2’ dahil influenza virüslerinde önemli bir şekilde inhibe edici bir etkiye sahiptir. Çekirdeğe nükleik asidin taşınmasını sağlayan viral genomu, koruyucu kapsitinden ayrılması için gereken viral-endozomal membranın birleşmesi için gerekli HA2 alt biriminin konformasyonel farklılıklarını engelleyerek etkisini gösteriri ve böylece influenza virüsünün replikasyonunu inhibe etmiş olur (Ye ve ark., 2020).

Favipiravir, influenza virüsüne karşı geliştirilen bir antiviral ilaçtır. Tüm RNA virüslerine karşın önemli bir antiviral kabiliyete sahiptir ve Japonya da antiviral ilaç olarak ruhsatlandırılmıştır. İnfluenza virüslerinde RNA polimerazın etkinliğini engeller ve bunun sonucunda viral genom mutasyona uğramış olur. Favipiravir ilacının

yapısı gereği sonraki pandemilerde temel bir ilaç olarak kullanılması muhtemel bir olaydır (Shiraki ve ark., 2020).

4.5.2 Aşılar

İnfluenza A virüsleri zaman zaman pandemilere neden olmakla birlikte, her yıl tekrarlayan mevsimsel salgınlara neden olurlar. Bu salgınların yaşandığı süreçte, özellikle 65 yaş ve üzeri insanlar, 2 yaş ile altında bulunan bebekler ve kronik hastalıkları olan bireyler influenza virüsünün yol açtığı komplikasyonlar nedeniyle büyük risk altında kalırlar. Dolayısıyla, yüzde yüz koruma sağlamasa da aşılar, tüm yaş grupları için koruma sağlayabilmenin en etkin yollarından biri olarak görülmektedir (McLean ve ark., 2015; Roubidoux ve ark., 2021; Smetana ve ark., 2018).

Aşılar hastalığın ortaya çıkmasını engellemede ya da azaltmada ve patojen yayılmasını kontrol altında tutmada önmeli araçlardır. Kazanılmış bağışıklığın daha uzun süreli devamlılığının sağlanması ve yüksek risk grubunda bireylerin korunmaları için farklı aşı geliştirme stratejilerine gereksinim vardır (Wohlbold ve Krammer, 2014).

Bağışıklık sisteminin en önemli viral komponenti olan ve en çok değişkenlik gösteren influenza virüsü yüzey antijen proteinleri hemaglutinin (HA) ve nöraminidaz (NA) proteinleri kullanımda olan aşıların hedefinde olan moleküllerdir. Buna karşın HA ve NA antijenlerinin yapılarında meydana gelen tahmin edilemeyen değişiklikler, uzun süre etkili olacak aşıların geliştirlmesindeki en önemli engellerden birisidir (Tan ve ark., 2021). İnfluenza aşılarının formülasyonları, influenza A virüsü suşlarında o yıl baskın olan suşa göre her yıl yeniden değerlendirilir (Gerdil, 2003). Ancak, o yıl dolaşımda bulunan baskın influenza suşlarının belirlenebilmesi için en az 6 aylık süre gerekmektedir ve bu sebeple influenza aşılarının üretimi uzun zamanlar almaktadır (Yap ve ark., 2018).

Bununla birlikte aşının geliştirilmesi sürecinde, viral genomda meydana gelecek değişmeler virüsün antijenik yapısında da değişmeye neden olacağından aşıların etkinliğini azaltabilir. Bu durumda, doğal olarak çalışılan aşının, yeni ortaya çıkacak influenza alt tipleri ile uyumsuz olması kaçınılmazdır.

Paules ve arkadaşlarının yaptığı araştırma, Amerika'da 2014-2015 yılındaki verilere göre, virüs enfeksiyonlarına karşı zayıf bağışıklık, 65 yaş üstü kişilerde yüksek mortalite ve morbiditeye yol açtığını göstermiştir (Paules ve ark., 2018). Bu zorlukların aşılabilmesi için, influenza virüsü tiplerinin çoğuna karşı etkili olabilecek tek veya çoklu antijenik bileşenleri içeren yeni aşılara gereksinim vardır (Romeli ve ark., 2020).

Yakın bir zamanda, influenza A virüsü alt tiplerinin büyük bir kısmına karşın koruma sağlayacak geniş spektrumlu bir influenza aşısının geliştirilmesi gündeme gelmiştir ve influenza aşılarının her sene yenilenme ihtiyacının ortadan kaldırılması hedeflenmiştir. Bunun için özellikle influenza virüsü membran proteinlerinden matriks 2 proteininin ektodomain kısmı (M2e) ayrıntılı olarak incelenmiştir. M2e'nin influenza virüsü membranı üzerinde bulunması bağışıklık sistemi için uygun bir hedeftir. HA ve NA proteinlerine göre daha az değişiklik göstermesi daha uzun koruma sağlayabilir (Saelens, 2019; Zhang ve ark., 2014).

Günümüzde üretilen influenza aşıları arasında canlı zayıflatılmış, soğuğa adapte edilmiş influenza aşıları (LAIV), inaktive virüs aşıları ve rekombinant olarak üretilen HA dörtlü aşı (örn., Flublok Quadrivalent) bulunmaktadır (Cox ve ark., 2015; Mohn ve ark., 2018) **(Tablo 2)**.

Tablo 2. İnfluenza aşılarının karşılaştırılması (Tan ve ark., 2021'den değiştirilerek kullanılmıştır).

LAIV	**İnaktif Grip Aşısı**	**Rekombinant HA Quadrivalent Aşı**
Hümoral (antikor) ve T-hücre yanıtları dahil olmak üzere çok yönlü bağışıklık yanıtlarını indükler.	Viral majör yüzey glikoproteinlerini, yani hemaglutinin ve nöraminidaz içerir. Çoğunlukla antikor yanıtlarını indükler.	Standart inaktive influenza aşısından üç kat daha fazla HA içerir. İnfluenza virüsü enfeksiyonlarını önlemek için anti-HA antikorlarının üretimini indükler.
2 yaş ve üzeri alıcılarda kullanım için lisanslanmıştır.	6 aylık ve daha büyük alıcılarda kullanım için lisanslanmıştır.	18 yaş ve üzeri yetişkinlerde kullanım için lisanslanmıştır.
Burun içinden uygulanır (doğal enfeksiyonu taklit eder).	Kas içinden uygulanır.	Kas içinden uygulanır.

LAIV, insan sağlığı açısından risk oluşturmayan, zayıflatılmış influenza A suşlarını (H1N1 ve H3N2 tipleri) ve influenza B suşlarını (Yamagata ve Victoria) kapsar. Virüsler, soğuk sıcaklıklara uyum sağlamak üzere yönlendirilir (< 33°C) ve insana intranazal olarak uygulanır, ancak insan vücudunda (36,5°C) etkin olarak çoğalamazlar. Genel olarak LAIV, inaktive aşılara göre daha etkin bağışıklık yanıtı oluşturduğu kabul edilmektedir. Bu zayıflatılmış influenza virüsleri, sağlıklı bireyler için herhangi bir risk oluşturmasa da bağışıklığı baskılanmış kişilerde ciddi komplikasyonlara neden olabilmektedir (Sridhar ve ark., 2015).

İnaktif influenza aşıları deterjan ya da organik çözücüler ile inaktive edilen virüs partikülleri ya da saf HA ve NA proteinlerinden oluşur (Wong ve Ross, 2016).

4.6 Mikroorganizmalarda Rekombinant Protein Üretimi

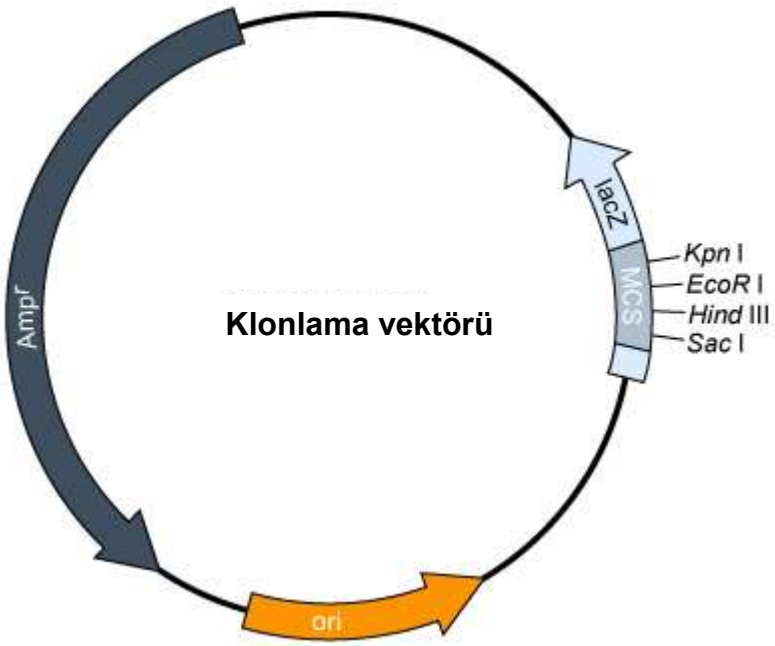
Rekombinant DNA teknolojilerinin önemli işlemlerinden olan gen aktarımı teknikleri için temel oluşturan çalışmalar 1928'de İngiliz bilim insanı Frederick Griffith tarafından gerçekleştirilmiştir. Griffith, zatürre salgınına sebebi olarak *Streptococcus pneumoniae* bakterileri ile yaptığı çalışmalar sonucunda genetik bilginin hücreden

hücreye aktarılabildiğini göstermiş ve bu olaya "genetik transformasyon" ismini vermiştir (Griffith, 1928). Bununla birlikte, Stanley Cohen ve Annie Chang'in 1973 yılında in vitro koşullarda yeni bir plazmit (rekombinant plazmit) elde etmeleri ile gerçek anlamda rekombinant DNA teknolojilerinin temeli atılmıştır (Khan ve ark., 2016). Farklı orjin iki DNA'nın kombinasyonu sonucu yeni bir DNA molekülü oluşmuştur (Cohen, 2013). Günümüzde rekombinant DNA teknolojileri çok farklı bilim dallarında ve biyoteknoloji alanında yaygın olarak kullanılmaktadır.

DNA teknolojileri özellikle moleküler genetik alanında yapılan araştırmalarda kullanılabildiği gibi genler üzerinden kodlanan ticari değeri olan peptit ve proteinlerin üretilmesinde de kullanılmaktadır. Aktarılacak gen ya da genler başta plazmit vektörler olmak üzere, taşıyıcı DNA moleküllerine ya da virüs genomlarına entegre edilir (Berg ve Mertz, 2010).

Plazmitler bakterilerde yaygın olarak bulunan ve özellikle antibiyotiklere karşı direnç oluşturan proteinleri kodlayan genlerin aktarılmasında iş gören ve bu yönüyle antibiyotiklere direncin yayılmasını sağlayan ve kendilerini kopyalayabilen DNA molekülleridir (Carattoli, 2013). Bakterilerde bulunan bu doğal plazmitlerin yanı sıra yapay olarak da plazmitler oluşturulmakta ve DNA teknolojilerinde vektör olarak kullanılmaktadır (Shintani ve ark., 2015).

DNA teknolojilerinde bakteriyel plazmitlerin dışında farklı vektörlerin kullanıldığı ekspresyon sistemleride bulunmaktadır. Bu ekspresyon sistemlerinde plazmitler, fajlar, kosmidler, BAC'lar (bakteriyel yapay kromozom), YAC'lar (maya yapay kromozomları) MAC'lar (memeli yapay kromozomları) ve HAC'lar (insan yapay kromozomları) gen taşıyıcı vektörlerdir. Bu vektörlerin ortak olarak içerdiği temel bileşenler; antibiyotik direnç geni, replikasyon orijini ve genlerin eklendiği çoklu klonlama bölgeleridir (Adamson ve ark., 2011) **(Şekil 7)**. Vektörlerde bulunan antibiyotik direnç genleri, transformasyonda konak hücre olarak kullanılan transformant bakterilerin seçimleri için kullanılır (Alalam ve ark., 2020).



Şekil 7. Plazmid vektör haritası.

Rekombinant protein üretiminde, proteinin yapısal özelliklerine göre prokaryotik ya da ökaryotik organzimalar konak olarak kullanılabilmektedir. Bu organizmalar arasında *Escherichia coli* ve *Bacillus subtilis* gibi bakteriler, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Pichia pastoris* gibi mayalar, *Spodoptera frugiperda* gibi böcek hücreleri, farklı memeli ve bitki hücreleri örnek verilebilir (von Schaewen ve ark., 2018). Farklı konak organizmalarda rekombinant proteinlerin etkin bir şekilde sentez edilebilmesi için, proteini kodlayacak gende kodon optimizasyonunun yapılması, uygun promotör ve sonlandırma dizilerinin seçilmesi, eğer protein salgı formunda üretilecek ise gen dizilimine bazı sinyal dizilerinin eklenmesi gerekmektedir (Chen ve ark., 2021).

Rekombinant DNA teknolojisi sadece bilimsel araştırmalarda değil aynı zamanda tıp ve ilaç sektöründe de yaygın olarak kullanılmaktadır. Günümüzde protein yapıda çeşitli hormonların, monoklonal antikorların ve aşıların üretilmesi rekombinant DNA teknolojilerine dayalı olarak gerçekleştirilmektedir (Neda Mousavi ve ark., 2016).

Bu tez çalışması kapsamında ise influenza A virüsü yüzey antijeni olan hemaglutinin (HA) glikoproteininin mikroorganizmalarda rekombinant olarak üretilmesi ve analizi

hedeflenmiştir. Bu çerçevede influenza A/WSN/H1N1 virüsüne ait hemaglutinin geni RT-PCR tekniği elde edilmiş ve insan IgG1 antikorunun değişken olmayan bölgesini (Fc) kodlayan DNA dizisi kaynaşmış olarak bakteri ve maya ekpresyon vektörlerine klonlanmıştır. Elde edilen plazmit vektörler *E. coli* bakterileri ve *P. pastoris* maya hücrelerine transforme edilmiş ve bu hücrelerin rekombinant HA proteinlerinin üretebilme potansiyelleri değerlendirilmiştir.

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 klorür	Merck, Almanya
Lösin	Sigma Aldrich, ABD
Magnezyum klorür	Merck, Almanya
Mangan klorür	Merck, Almanya
Orto-Nitrofenil Galaktozid (ONPG)	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
Salmon Sperm DNA	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 BamHI, AflII, EcoRI, MluI, HindIII, NcoI, StuI (MBI Fermentas, Roche ya da New England Biolabs) restriksiyon endonükleazları kullanıldı.

DNA modifikasyon enzimleri

Gen klonlama çalışmalarının farklı aşamalarında Klenow enzimi, T4 DNA Ligaz, T4 DNA polinükleotid kinaz (MBI Fermentas, Roche veya New England Biolabs) ve Alkalen Fosfataz (SAP: Shrimp Alkaline Phosphatase) 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 izolasyonu deneylerinde, RNA'ları uzaklaştırmak amacıyla RNaz A (Roche) enzimi kullanıldı.

5.3 Ticari Kitler

Çalışmanın değişik aşamalarında, küçük ve 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
Dikey jel elektroforez cihazları	Cleaver Scientific, UK
Etüv	Memmert, Almanya
Hassas Terazi	Shimadzu, Japonya
Manyetik Karıştırıcı	Heidolph, Almanya
Masaüstü santrifüj	Hettich, Almanya
Mikropipetler	Gillson-Thermo-Eppendorf
Mikrosantrifüj	Eppendorf, Almanya
Otoklav	N-Biotek, Güney Kore
pH metre	Hanna instruments, Portekiz
PZR Cihazları	ABI, ABD/Techne, İngiltere
Soğutmalı Sanrifüjler	Sigma, ABD/Backman, ABD
Sonikatör	Bandelin
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 D

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.

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.

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. 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. Katı YPD besiyerleri için, ortama otoklav öncesi % 2 (a/h) final konsantrasyonda agar katıldı. Otoklav sonrasında, besiyerine dekstroz eklendi ve 10 cm'lik 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 maya özütü, 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

Escherichia coli ve *Pichia pastoris* hücrelerinde HA0 ve HA1 proteinini kodlayacak ekspresyon vektörlerinin oluşturulmasında pGFP, pET-14b ve pPinkα-HC (Invitrogen) plazmitlerinden yararlanıldı.

5.7 Bakteri Suşları

Plazmitlerin üretilmesinde konak bakteri olarak *E. coli/Mach1* ırkı kullanıldı. İnfluenza A virüsüne özgü HA0 ve HA1 genlerinin ekspresyonunda ise *E. coli/Mach1* ile birlikte *E. coli/BL21* ve *E. coli/DH5α* suşlarından yararlanıldı.

5.8 Maya Hücreleri

İnfluenza virüsü HA0 ve HA1 proteinlerinin üretilmesinde heterolog protein ekspresyonunda yaygın olarak tercih edilen *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 **(Tablo 3).** *P. pastoris* ırk 1 sadece Ade2 geni bakımından mutasyonlu iken, diğer ırklar ise Prb1 ve/veya Pep4 proteaz genleri bakımından delesyonlu ırklardır.

Tablo 3. *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 4**'de verilen oligonükleotid primerlerden yararlanıldı.

Tablo 4. İnfluenza virüsü HA genlerinin PZR ile çoğaltılması, vektörlerin doğrusal hale getirilmesi ve oluşturulan plazmit vektörlerin DNA dizi analizleri ile kontrolünde kullanılan oligonükleotid primerler.

Primer Adı	Nükleotid Dizisi
pET-sq-For:	5’- AGGGAGACCACAACGGTTTC-3’
pET-sq-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’
pGEX-3’ seq:	5’-CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG-3’
HA(-SP)-W-For:	5’-ATGGACACAATATGTATAGGCTAC-3’
HA1-W-Rev:	5’-ACACTCATGCATTGACGCG-3’
α- Factor- 5’ For:	5’-CGCGTCAATGCATGAGTGT-3’
HA-For:	5’-ATGGACACAATATGTATAGGCTAC-3’
IgG1-Rev:	5’- TATGGATCC TCATTTACCCGGGGACAGGGAGA-3’
pAK-LacI-For:	5'-GCGCAACGCAATTAATGTAAGTTA-3'
pAK-LacI/GTG-Rev:	5'- CACATTCACCACCCTGAATTGA-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 : izoamil 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.

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 klorür/PEG/TE çözeltisi

6.7 ml % 50 PEG, 1 ml 1 M LiCl, 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 klorür/TE çözeltisi (100 mM LiCl/10 mM Tris-Cl/1mM EDTA)

25 ml 1M LiCl, 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 klorür/SDS çözeltisi (200 mM LiCl - %1 SDS, a/h)

35 ml deiyonize distile su, 10 ml 1 M LiCl 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 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.

5.10.32 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.

5.10.33 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.

5.10.34 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 (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.

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

Çalışmada kullanılan *E. coli* ırklarının, plazmit transfomasyonu öncesi kompetent hale getilmesi için, -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 37 °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.

5.13 Agaroz Jellerin Hazırlanması ve Elektroforez İşlemi

Çalışmada kullanılan DNA moleküllerinin analizinde % 1'lik (a/h) agaroz jeller kullanıldı. 1 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 1 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.

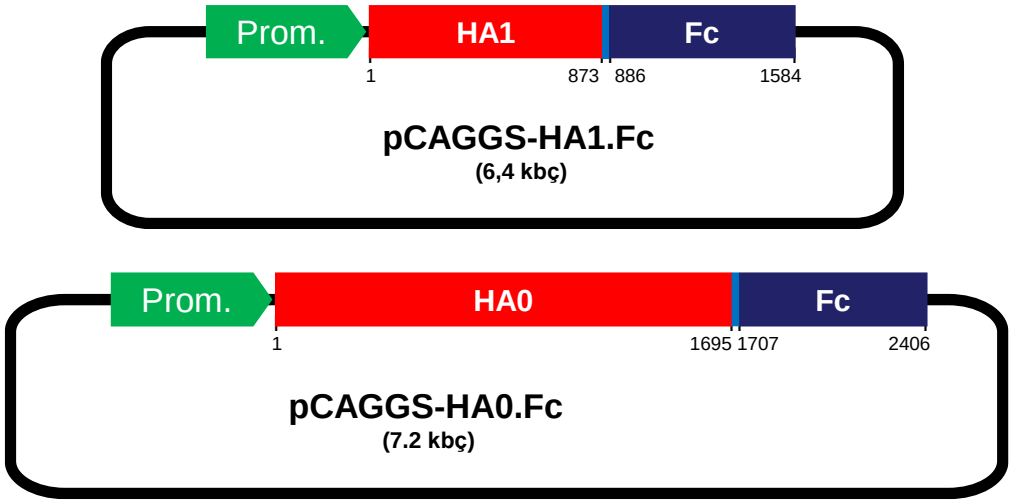
5.14 Primerlerin Fosforillenmesi

PZR ile çoğaltılan cDNA'ların, uç bölgelerde restriksiyon enzimleri için hedef dizi taşımadıkları ve bu enzimler ile kesilmedikleri durumlarda, sentetik oligonükleotid primerler T4-polinükleotid 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 polinükleotid 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***

5.15 İnfluenza HA0 ve HA1 Genlerini Kodlayan Maya ve Bakteri Ekspresyon Vektörlerinin Oluşturulması

İnsan IgG1 geni Fc bölgesini kodlayan DNA dizisi ile kaynaşmış haldeki influenza A virüsü HA1 ve HA0 genlerinin PZR ile çoğaltılmasında **Şekil 8'**de verilen pCAGGS-HA1-Fc ve pCAGGS-HA0-Fc plazmit vektörleri kalıp olarak kullanıldı. Bu plazmit vektörler farklı proje çalışması için tez danışmanım Prof. Dr. Kadir Turan tarafından oluşturulmuştur (Yayınlanmamış veri). PZR ile çoğaltılan HA1-Fc ve HA0-Fc cDNA'ları, standart DNA klonlama teknikleri ile bakteri ve plazmit vektörlerine klonlandı.



Şekil 8. HA1-Fc ve HA0-Fc cDNA'larının PZR ile çoğaltılmasında şablon olarak kullanılan plazmit vektörler.

5.15.1 İnsan IgG1 antikoru Fc bölgesini kodlayan dizi ile kaynaşmış influenza A/WSN/33 HA cDNA'larının elde edilmesi

HA1-Fc ve HA0-Fc kaynaşmış gen dizileri, pCAGGS-HA1-Fc ve pCAGGS-HA0-Fc plazmit vektörleri üzerinden **Tablo 4**'de verilen HA-For ve IGG1-Rev primerleri ile PZR ile çoğaltıldı. Primerler PZR öncesinde T4-polinukleotid kinaz enzimi ile fosforillendi. Bunun için aşağıdaki reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon ortamı 37 °C'da 1 saat bekletildi. Sonrasında 85 °C'da 5 dakika bekletilerek T4 polinükleotid kinaz enziminin inaktive olması sağlandı.

Reaksiyon Karışımı	
HA-For :	*2 µl (200 pMol)*
IGG1-Rev :	*2 µl (200 pMol)*
rATP karışımı (10 mM) :	*8 µl*
Reaksiyon tamponu (x10) :	*2 µl*
Deiyonize distile su :	*5.5 µl*
T4 polinukleotid kinaz (10U/µl) :	*0.5 µl*
Toplam hacim :	*20 µl*

PZR reaksiyonları 0.2 ml'lik PZR tüplerinde 40 µl hacim içerisinde gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımları aşağıda verildiği şekilde hazırlandı.

PZR için Reaksiyon Karışımı

Plazmit DNA'sı (10 ng/µl)	*: 2.0 µl*
Fosforillenmiş Primer karışımı (10 pmol/µl)	*: 4.0 µl*
dNTP karışımı (2.5 mM)	*: 4.0 µl*
$MgSO_4$ (25 mM)	*: 2.0 µl*
Tampon (x10)	*5.5 µl*
T4 polinukleotid kinaz (10U/µl)	*: 2.0 µl*
KOD plus (1U/µl)	*: 0.5 µl*
Toplam hacim	**: 40.0 µl**

Reaksiyon koşulları; 95°C'da 5 dakika ön denatürasyondan sonra, 30 döngü; 95 °C - 15 sn/55 °C -15 sn/68 °C- 1,5 dakika ve bir döngü 68 °C - 10 dakika olarak belirlendi. PZR ürünleri % 1'lik agaroz jel kullanılarak elektroforez ile kontrol edildi. PZR ürünleri, 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 veya HA-Fc 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 ve 50 °C'da 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 silikaya bağlı DNA 30 µl TE tamponu ile elüe edildi ve ligasyonda kullanılmak üzere -20 °C'da saklandı.

5.15.2 pPinkα-HC plazmit DNA'sının ligasyon için hazırlanması

İnfluenza A virüsü HA0 ve HA1 genleri *Pichia 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 *StuI* enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirildi. Reaksiyon 50 µl hacim içersinde gerçekleştirildi. 5 µg pPinkα-HC plazmit DNA'sı deiyonize distile su ile 45 µl'ye tamamlandı, üzerine 5 µl 10x konsantre StuI tamponu ve 1 µl (10U) StuI 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, StuI enzimini inaktive etmek amacıyla 20 dakika 80 °C'da bekletildi. Plazmit DNA'nın defosforilasyonu için örnek üzerine 2 µl (2U) 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 5.10.10'da 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.

5.15.3 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 5 µg pET-14b plazmit DNA'sı deiyonize distile su ile 90 µl'ye tamamlandı, üzerine 10 µl 10x konsantre NEBuffer 3.1 tamponu ve 1 µl (10 U) NcoI restriksiyon endonükleaz enzimi eklendi ve 37 °C'da 2 saat inkübe edildi. Plazmit DNA'ların kesilmesi %1'lik agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. 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 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.

5.15.4 pLacI plazmit DNA'sının ligasyon için hazırlanması

HA0-Fc ev HA1-Fc cDNA'larını, *E coli* Lac promotörü kontrolünde klonlamak için pAK-Taq plazmitinden türetilen pAK plazmitinden yararlanıldı (Güneş, 2019). Halkasal yapıda pAK plazmitini *lacI* promotörünü takip eden bölgeden açarak doğrusal hale getirmek için ters (inverz) PZR tekniğinden yararlanıldı.

PZR deneyinde **Tablo 4**'de nükleotid dizileri verilen *pAK-LacI-For,* ve *pAK-LacI/GTG-Rev* primerler kullanıldı.

PZR için Reaksiyon Karışımı

pAK Plazmit DNA'sı	*1,0 µl (25 ng)*
pAK-LacI-For (10 pM/µl)	*2,0 µl*
pAK-LacI/GTG-Rev (10 pM/µl)	*2,0 µl*
dNTP karışımı (2,5 mM)	*3,0 µl*
Reaksiyon tamponu (x10)	*4,0 µl*
$MgSO_4$ (25 mM)	*2.0 µl*
Deiyonize distile su	*25 µl*
KOD plus (1U/µl)	*1.0 µl*
Toplam hacim	***40,0 µl***

PZR koşulları; 95°C sıcaklıkta 3 dakikalık ön denatürasyondan sonra, 32 döngü "95 °C'da 20 saniye/54 °C'da 20 saniye/68 °C'da 4 dakika" ve bir döngü 68 °C 10 dakika olarak belirlendi. PZR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi ve yukarıda belirtildiği şekilde **(Şekil 8)** agaroz jel elektroforezi tekniği ile saflaştırıldı. Saflaştırılan doğrusal DNA molekülleri daha sonra ligasyonda kullanılmak üzere -20°C'da saklandı.

5.15.5 Ligasyon ve transformasyon

Yukarıda ayrıntılı olarak anlatıldığı şekilde hazırlanan cDNA örnekleri ve doğrusal hale getirilen plazmit DNA'larının yaklaşık konsantrasyonları, agaroz jel üzerinde bilinen standart DNA konsantrasyonları ile karşılaştırılarak saptandı. Ortalama 20-30 ng plazmit DNA'sı 40-50 ng cDNA ile karıştırıldı ve hacmi 18 µl'ye tamamlandı. DNA karışımına 2 µl 10x konsanre ligasyon tamponu ve 1 µl T4 DNA ligaz enzimi (TaKaRa) eklendi. Ligasyon işlemi, 15 °C'a ayarlanmış PZR cihazında bir gece bekletilerek gerçekleştirildi. İşlem sonrası transformasyon için ligasyon ürünleri 1.5 ml'lik plastik tüpelere aktarıldı. Üzerlerine transformasyon için *E. coli* hücrelerinin kompetent hale getirilmesinde 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.

5.15.6 Koloni-PZR ile transformant bakteri kolonilerinin seçilmesi

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

PZR için Reaksiyon Karışımı

İleri Primer (10 pM/µl):	*1,0 µl*	*N x 1.0 µl*
Geri Primer (10 pM/µl):	*1,0 µl*	*N x 1.0 µl*
dNTP karışımı (2,5 mM):	*1,0 µl*	*N x 1.0 µl*
MgCl2 (50 mM):	*1,0 µl*	*N x 1.0 µl*
Reaksiyon tamponu (x10):	*2,0 µl*	*N x 2.0 µl*
Deiyonize distile su:	*8,9 µl*	*N x 8.9 µl*
Taq Polimeraz (5U/µl):	*0,1 µl*	*N x 0.1 µl*
Toplam hacim:	*15 µl*	***N x 15 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 dakika olarak belirlendi. PZR sonrası örneklere 5 µl x6 konsantre jel yükleme tamponu eklendi ve 10 µl örnek %1'lik agaroz jele uygulandı ve sonuçlar değerlendirildi.

5.15.7 Transformant bakteri kolonilerinden küçük ölçekte DNA izolasyonu

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 kullanıldı. Seçilen kolonilerden ampisilin içeren 5

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 kontrol edildi. Agaroz jel üzerinde beklenen elektroforez profilleri veren DNA örnekleri PEG/NaCl ile çöktürülerek kısmen saflaştırıldı ve DNA dizi analizinde kullanıldı.

5.15.8 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 reaksiyon tamponu ve 2 U restriksiyon endonukleaz enzimi eklendi. Küçük ölçekte hazırlanan DNA örneklerinde, gereken durumlarda ortama 0.3- 0.5 µl RNaz (10 µg/µl) enzimi eklendi. 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-HA0-Fc:	*MluI, BamHI, NcoI, AflII, EcoRI*
pPinkα-HA1-Fc:	*MluI, BamHI, NcoI, AflII, EcoRI*
pLac-HA0-Fc:	*BamHI, NcoI, EcoRI*
pLac-HA1-Fc:	*BamHI, NcoI, EcoRI*
pET-14b-HA0-Fc:	*BamHI, NcoI, EcoRI*
pET-14b-HA1-Fc:	*BamHI, NcoI, EcoRI*

5.15.9 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.

5.15.10 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.

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

İnsan IgG1 antikoru Fc bölgesi ile kaynaşmış halde influenza virüsü HA0 ve HA1 proteinlerinin sentezi için *E. coli/Mach1*, *E. coli/DH5α* ve *E. coli/BL21*suşlarından yararlanıldı. Plazmitler kimyasal yöntemle kompetent *E. coli* hücrelerine transforme edildi.

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

pLac-HA1-Fc, pLac-HA0-Fc, pET-14b-HA0-Fc ve pET-14b-HA1-Fc ekspresyon plazmitleri transforme edilen Dh5α, BL21 ve Mach1 suşlarından 5 ml LB (+amp) besiyerinde doygun kültürler hazırlandı. Elde edilen doygun kültürlerden 75 ml taze LB (+) besiyerine 0,5'er ml eklendi ve kültürler 37 °C, 180 dev/dak'ya ayarlı çalkalayıcı etüvde üremeye bırakıldı. İlk andan itibaren (0. saat) 1'er saat aralıklarla 1'er ml örnek alındı ve örneklerin optik dansiteleri 600 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçüldü. Elde edilen değerler kullanılarak üreme eğrileri oluşturuldu.

5.18 Plazmit Transforme Edilen *E. coli* Hücrelerinde HA0 ve HA1 Proteinlerinin Sentezinin Analiz Edilmesi

İnfluenza virüsü proteinlerinin rekombinant olarak sentezinde *E. coli/BL21, E. coli/Mach1* 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. 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 5 dakika bekletilerek proteinlerin denatüre olması sağlandı.

Örnekler 15000 dev/dak hızda santrifüj edildikten sonra SDS-PAGE/Gümüş Boyama Yöntemi ile incelendi.

5.19 Maya Ekspresyon Plazmitlerinin, *P. pastoris* Maya Hücrelerine Transformasyonu

pPinkα-HC plazmiti, maya genomuna entegre olma özelliği taşıyan plazmit olduğu için, transformasyondan önce plazmitler AflII restriksiyon enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirildi. Bunun için 10 µg pPinkα-HA0-Fc ve pPinkα-HA1-Fc DNA'sı deiyonize distile su ile 90 µl'ye tamamlandı ve üzerine 10 µl 10x konsantre reaksiyon tamponu, 2.5 µl (25 U) AflII 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. Plazmit vektörlerinin *P. pastoris* hücrelerine aktarılmasında, kimyasal bir yöntem olan lityum klorür/polietilen glikol (Lityum klorür/PEG) ile transformasyon ve elektroporasyon yöntemi denendi.

Lityum klorür/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 devam edilmeme kararı alındı. 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 transformasyonunda ikinci yöntem olarak elektroporasyon yöntemi uygulandı. 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 ºC'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.

5.20 Plazmit Aktarılan *P. pastoris* Hücrelerinin İnfluenza Virüsü HA0 ve HA1 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 klorür/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. Genomik DNA içeren üst faz PZR için kalıp olarak kullanıldı.

P. pastoris genom DNA'sının influenza HA0 ve HA1 genleri için PZR ile kontrolü

Transformant *P. pastoris* hücrelerinden hazırlanan genomik DNA'lara influenza virüsü geni taşıyan plazmitlerin entegre olup olmadığı PZR ile kontrol edildi. Bunun için farklı kolonilerden elde edilen DNA örnekleri kalıp olarak kullanılarak HA(-sp)-For ve EIGG-Rev/BamHI primer çiftleri ile PZR gerçekleştirildi. PZR için aşağıdaki karışım hazırlandı.

PZR için Reaksiyon Karışımı

Genom DNA'sı:	*2,0 µl*
HA-For:	*2,0 µl*
EIGG - Rev/BamHI:	*2,0 µl*
Buffer (x10):	*3µL*
dNTP karışımı (2.5 mM):	*2,0 µl*
MgCl2(50 mM):	*3µL*
Deiyonize distile su:	*16 µL*
Taq DNA polimeraz (5U/µl):	*0,2µL*
Toplam hacim:	***20 µL***

Reaksiyon koşulları: 94°C'da 3 dakika ön denatürasyon; 33döngü, 94 °C'da 20 saniye 58 °C'da 20 saniye- 72 °C'da 75 saniye; 1 döngü, 72 °C'da 5 dakika, olarak belirlendi. PZR ürünleri %1'lik agaroz jeli kullanılarak analiz edildi.

5.21 Plazmid Aktarılan *P. pastoris* Hücrelerinde HA0 ve HA1 Proteinlerinin Sentezinin Analiz Edilmesi

PZR ile influenza 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

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 edilerek 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 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/Gümüş Boyama Yöntemi ile incelendi.

5.22 Protein Örneklerinin SDS- PAGE ve Gümüş Boyama Yöntemi İle 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.

5.22.1 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.

5.22.2 Jellerin gümüş boyama yöntemi ile boyanması

Poliakrilamid jellerde ayrıştırılan daha az miktarlarda proteinlerin analiz edilmesi için gümüş boyama yöntemi uygulandı. Elektroforez işleminden sonra jeller metanol: glasiyel asetik asit çözeltisi (%50: %10) içerisinde 2 saat, %50'lik metanol içerisinde 20 dakika bekletildi. 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.

6.BULGULAR

6.1 İnfluenza A Virüsü HA Geni Klonlanan Plazmit Vektörünün Oluşturulması ile İlgili Veriler

İnfluenza A virüsü yüzey antijeni proteinlerinden biri olan hemaglutinin (HA), viral genomun 4. RNA segmenti üzerinden kodlanmaktadır. HA proteinleri virüs membranı üzerinde yer almaktadır. Genellikle membran proteinlerinin rekombinant olarak üretilmesi, hücrelerde sitoplazmada çözünür formda bulunan proteinlere göre daha zordur. Daha önce yapılan bir çalışmada doğal haliyle HA proteininin *Escherichia coli* hücrelerinde üretilmesinin konak hücre çoğalmasını önemli ölçüde yavaşlattığı saptanmıştır (Özaydın, 2018). Bu verilerden yola çıkarak, bu tez çalışmasında influenza A/WSN/33 (H1N1) tipi virüse ait HA proteininin insan IgG1 antikorlarının değişken olmayan bölgesi (Fc) ile kaynaşmış halde rekombinant olarak üretilmesi hedeflenmiştir. Bunun için influenza A/WSN virüsü HA geni insan IgG1 antikoru Fc bölgesini kodlayan DNA dizisi ile kaynaşmış olarak *Escherichia coli* ve *Pichia pastoris*'te ekspresyon yapan plazmit vektörlerine klonlanmıştır.

6.1.1 Hemaglutinin ve insan IgG1 proteinine ait cDNA'larının çoğaltılması ile ilgili veriler

İnfluenza A/WSN tipi virüse ait HA proteinini insan IgG1 antikoru Fc bölgesi ile kaynaşmış halde kodlayan cDNA'ların çoğaltılmasında aşağıda verilen HA geni ve insan IgG1 gene referans dizileri temel alındı.

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

ATGAAGGCAAAACTACTGGTCCTGTTATATGCATTTGTAGCTACAGATGCAGACACA
ATATGTATAGGCTACCATGCGAACAACTCAACCGACACTGTTGACACAATATTCGAG
AAGAATGTGGCAGTGACACATTCTGTTAACCTGCTCGAAGACAGACACAACGGGAAA
CTATGTAAATTAAAAGGAATAGCCCCACTACAATTGGGGAAATGTAACATCATCGGA
TGGCTCTTGGGAAATCCAGAATGCGACTCACTGCTTCCAGCGAGATCATGGTCCTAC
ATTGTAGAAACACCAAACTCTGAGAATGGAGCATGTTATCCAGGAGATTTCATCGAC
TATGAGGAACTGAGGGAGCAATTGAGCTCAGTATCATCATTAGAAAGATTCGAAATA
TTTCCCAAGGAAAGTTCATGGCCCAACCACACATTCAACGGAGTAACAGCATCATGC

TCCCATAGGGGAAAAAGCAGTTTTTACAGAAATTTGCTATGGCTGACGAAGAAGGGG
GATTCATACCCAAAGCTGACCAATTCCTATGTGAACAATAAAGGGAAAGAAGTCCTT
GTACTATGGGGTGTTCATCACCCGTCTAGCAGTGATGAGCAACAGAGTCTCTATAGT
AATGGAAATGCTTATGTCTCTGTAGCGTCTTCAAATTATAACAGGAGATTCACCCCG
GAAATAGCTGCAAGGCCCAAAGTAAAAGATCAACATGGGAGGATGAACTATTACTGG
ACCTTGCTAGAACCCGGAGACACAATAATATTTGAGGCAACTGGTAATCTAATAGCA
CCATGGTATGCTTTCGCACTGAGTAGAGGGTTTGAGTCCGGCATCATCACCTCAAAC
GCGTCAATGCATGAGTGTAACACGAAGTGTCAAACACCCCAGGGATCTATAAACAGC
AATCTCCCTTTCCAGAATATACACCCAGTCACAATAGGAGAGTGCCCAAAATATGTC
AGGAGTACCAAATTGAGGATGGTTACAGGACTAAGAAACATCCCATCCATTCAATAC
AGAGGTCTATTTGGAGCCATTGCTGGTTTTATTGAGGGGGGATGGACTGGAATGATA
GATGGATGGTATGGTTATCATCATCAGAATGAACAGGGATCAGGCTATGCAGCGGAT
CAAAAAAGCACACAGAATGCCATTAACGGGATTACAAACAAGGTGAACTCTATTATC
GAGAAAATGAACACTCAATTCACAGCTGTGGGTAAAGAATTCAACAACTTAGAAAAA
AGGATGGAAAATTTAAATAAAAAAGTTGATGATGGGTTTCTGGACATTTGGACATAT
AATGCAGAATTGTTAGTTCTACTGGAAAATGGAAGAACTTTGGATTTCCATGACTTA
AATGTGAAGAATCTGTACGAGAAAGTAAAAAGCCAATTAAAGAATAATGCCAAAGAA
ATCGGAAATGGGTGTTTTGAGTTCTACCACAAGTGTGACAATGAATGCATGGAAAGT
GTAAGAAATGGGACTTATGATTATCCAAAATATTCAGAAGAATCAAAGTTGACAGGG
AAAAGATAGATGGAGTGAAATTGGAATCAATGGGGGTGTATCAGATTCTGGCGATCT
ACTCAACTGTCGCCAGTTCACTGGTGCTTTTGGTCTCCCTGGGGGCAATCAGTTTCT
GGATGTGTTCTAATGGGTCTTTGCAGTGCAGAATATGCATCTGA

İnsan IgG1 ağır zincir geni (GenBank: AF237583.1)

CCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTG
GGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGG
TGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTAC
AGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGG
GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA
AGAGAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGTGTCTGCTGGAAGCCAGGCTC
AGCGCTCCTGCCTGGACGCATCCCGGCTATGCAGTCCCAGTCCAGGGCAGCAAGGCA
GGCCCCGTCTGCCTCTTCACCCGGAGGCCTCTGCCCGCCCCACTCATGCTCAGGGAG

AGGGTCTTCTGGCTTTTTCCCCAGGCTCTGGGCAGGCACAGGCTAGGTGCCCCTAAC
CCAGGCCCTGCACACAAAGGGGCAGGTGCTGGGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATATC
CGGGAGGACCCTGCCCCTGACCTAAGCCCACCCCAAAGGCCAAACTCTCCACTCCCT
CAGCTCGGACACCTTCTCTCCTCCCAGATTCCAGTAACTCCCAATCTTCTCTCTGCA
GAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGGTAAGCCAGCC
CAGGCCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAG
GGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTGACACGTCCACCTCCATCTCTTCCTCAGCACCTGA
ACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCAT
GATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC
TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA
GCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCT
GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCT
CCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGTGGGACCCGTGGGGTGCG
AGGGCCACATGGACAGAGGCCGGCTCGGCCCACCCTCTGCCCTGAGAGTGACCGCTG
TACCAACCTCTGTCCCTACAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCC
CATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCT
TCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACT
ACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGC
TCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGC
ATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAAT
GAGTGCGGTACCCGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTGGCCCT
GGAAGTTGCCACTCCAGTGCCCACCAGCCTTGTCCTAATAAAATTAAGTTGCATCAT
TTTGTCTGACTAGGTGGCCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGGTGGGATGGAG
CAAGGGGCAAnGTTGGGAAGACAACCTGTAnGGCCTGCGGGGTCTATTGGGAACCCA
ACT

Metot kısmında da belirtildiği gibi HA1.Fc ve HA0.Fc kaynaşmış gen dizilimleri daha önce oluşturulan pCAGGS-HA1-Fc ve pCAGGS-HA0-Fc plazmit vektörleri üzeinden PZR ile çoğaltıldı. Bu plazmit vektörlere klonlanmış HA1.Fc ve HA0.Fc dizileri aşağıda verilmiştir.

pCAGGS plazmitine klonlanan HA1.Fc Füzyon Geni Nukleotid Dizisi

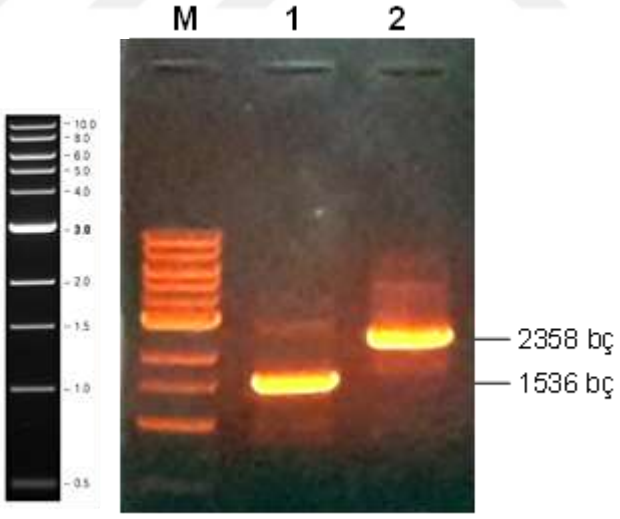
ATGGACACAATATGTATAGGCTACCATGCGAACAATTCAACCGACACTGTTGACACA
GTACTCGAGAAGAATGTGACAGTGACACACTCTGTTAACCTGCTCGAAGACAGCCAC
AACGGAAAACTATGTAGATTAAAAGGAATAGCCCCACTACAATTGGGGAAATGTAAC
ATCGCCGGATGGCTCTTGGGAAACCCAGAATGCGACCCACTGCTTCCAGTGAGATCA
TGGTCCTACATTGTAGAAACACCAAACTCTGAGAATGGAATATGTTATCCAGGAGAT
TTCATCGACTATGAGGAGCTGAGGGAGCAATTGAGCTCAGTGTCATCATTCGAAAGA
TTCGAAATATTTCCCAAAGAAAGCTCATGGCCCAACCACAACACAAACGGAGTAACG
GCAGCATGCTCCCATGAGGGGAAAAGCAGTTTTTACAGAAATTTGCTATGGCTGACG
GAGAAGGAGGGCTCATACCCAAAGCTGAAAAATTCTTATGTGAACAAAAAAGGGAAA
GAAGTCCTTGTACTGTGGGGTATTCATCACCCGCCTAACAGTAAGGAACAACAGAAT
CTCTATCAGAATGAAAATGCTTATGTCTCTGTAGTGACTTCAAATTATAACAGGAGA
TTTACCCCGGAAATAGCAGAAAGACCCAAAGTAAGAGATCAAGCTGGGAGGATGAAC
TATTACTGGACCTTGCTAAAACCCGGAGACACAATAATATTTGAGGCAAATGGAAAT
CTAATAGCACCAATGTATGCTTTCGCACTGAGTAGAGGCTTTGGGTCCGGCATCATC
ACCTCAAACGCATCAATGCATGAGTGTggaggatctggaGAGCCCAAATCTTGTGAC
AAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTC
TTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC
ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC
GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC
AGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC
AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACC
ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCC
CGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAT
CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAG
ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACC
GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAG
GCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAATGA

pCAGGS plazmitine klonlanan HA0.Fc Füzyon Geni Nukleotid Dizisi

ATGGACACAATATGTATAGGCTACCATGCGAACAACTCAACCGACACTGTTGACACA
ATATTCGAGAAGAATGTGGCAGTGACACATTCTGTTAACCTGCTCGAAGACAGACAC
AACGGGAAACTATGTAAATTAAAAGGAATAGCCCCACTACAATTGGGGAAATGTAAC
ATCACCGGATGGCTCTTGGGAAATCCAGAATGCGACTCACTGCTTCCAGCGAGATCA
TGGTCCTACATTGTAGAAACACCAAACTCTGAGAATGGAGCATGTTATCCAGGAGAT
TTCATCGACTATGAGGAACTGAGGGAGCAATTGAGCTCAGTATCATCATTAGAAAGA
TTCGAAATATTTCCCAAGGAAAGTTCATGGCCCAACCACACATTCAACGGAGTAACA
GTATCATGCTCCCATAGGGGAAAAAGCAGTTTTTACAGAAATTTGCTATGGCTGACG
AAGAAGGGGGATTCATACCCAAAGCTGACCAATTCCTATGTGAACAATAAAGGGAAA
GAAGTCCTTGTACTATGGGGTGTTCATCACCCGTCTAGCAGTGATGAGCAACAGAGT
CTCTATAGTAATGGAAATGCTTATGTCTCTGTAGCGTCTTCAAATTATAACAGGAGA
TTCACCCCGGAAATAGCTGCAAGGCCCAAAGTAAAAGATCAACATGGGAGGATGAAC
TATTACTGGACCTTGCTAGAACCCGGAGACACAATAATATTTGAGGCAACTGGTAAT
CTAATAGCACCATGGTATGCTTTCGCACTGAGTAGAGGGTTTGAGTCCGGCATCATC
ACCTCAAACGCGTCAATGCATGAGTGTAACACGAAGTGTCAAACACCCCAGGGATCT
ATAAACAGCAATCTCCCTTTCCAGAATATACACCCAGTCACAATAGGAGAGTGCCCA
AAATATGTCAGGAGTACCAAATTGAGGATGGTTACAGGACTAAGAAACATCCCATCC
ATTCAATACAGAGGTCTATTTGGAGCCATTGCTGGTTTTATTGAGGGGGGATGGACT
GGAATGATAGATGGATGGTATGGTTATCATCATCAGAATGAACAGGGATCAGGCTAT
GCAGCGGATCAAAAAAGCACACAGAATGCCATTAACAGGATTACAAACAAGGTGAAC
TCTGTTATCGAGAAAATGAACACTCAATTCACAGCTGTGGGTAAAGAATTCAACAAC
TTAGAAAAAAGGATGGAAAATTTAAATAAAAAAGTTGATGATGGGTTTCTGGACATT
TGGACATATAATGCAGAATTGTTAGTTCTACTGGAAAATGAAAGAACTTTGGATTTC
CATGACTTAAATGTGAAGAATCTGTACGAGAAAGTAAAAAGCCAATTAAAGAATAAT
GCCAAAGAAATCGGAAATGGGTGTTTTGAGTTCTACCACAAGTGTGACAATGAATGC
ATGGAAAGTGTAAGAAATGGGACTTATGATTATCCAAAATATTCAGAAGAATCAAAG
TTGAACAGGGAAAAGATAGATGGAGTGAAATTGGAATCAATGGGGGTGTATCAGATT
CTGGCGATCTACTCAACTGTCGCCAGTTCACTGGTGCTTTTGGTCTCCCTGGGGGCA
ATCAGTTTCTGGATGTGTTCTAATGGGTCTTTGCAGTGCAGAATATGCATCggagga
tctggaGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCT
GAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC

ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC
CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA
AAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTC
CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCC
CTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA
CAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTG
ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT
GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTC
TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC
TCCCTGTCCCCGGGTAAATGA

İnsan IgG1 Fc bölgesi ile kaynaşmış HA genlerinin PZR ile çoğaltılmasında HA-For ve HA-Fc-Rev primerler kullanıldı. PZR sonucu elde edilen ürünler % 1'lik agaroz jel kullanılarak incelendi. **Şekil 9**'da verilen sonuçlardan da görüldüğü gibi HA1.Fc ve HA0.Fc genleri için beklenen 1536 bç ve 2358 bç boyutlarında DNA fragmentleri elde edildi.



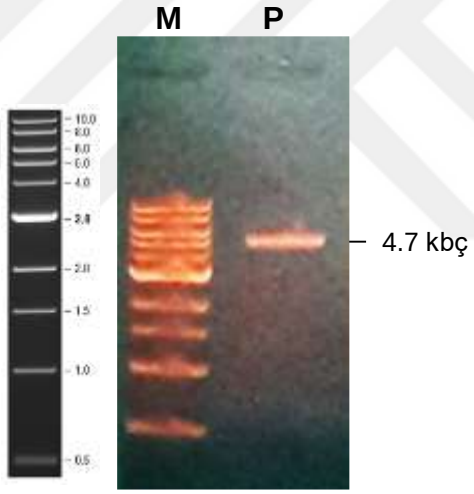
Şekil 9. PZR ile çoğaltılan influenza A virüsünün HA1.Fc **(1)** ve HA0.Fc **(2)** füzyon genlerinin agaroz jel elektroforezi ile incelenmesi. **M**. 1 kb ladder (NEB/N3232). Elektroforez işlemi, %1'lik agaroz jell kullanılarak, 100 V sabit gerilim altında 30 dakikada tamamlandı.

6.1.2 HA0.Fc ve HA1.Fc kodlayan bakteri ekspresyon vektörlerinin oluşturulması ile ilgili veriler

Çalışmada influenza virüsü genleri T7 bakteriyofajı RNA polimerazı promotörü ve *E. coli* Lac promotörü kontrolünde klonlanarak iki farklı grup ekspresyon vektörü oluşturuldu.

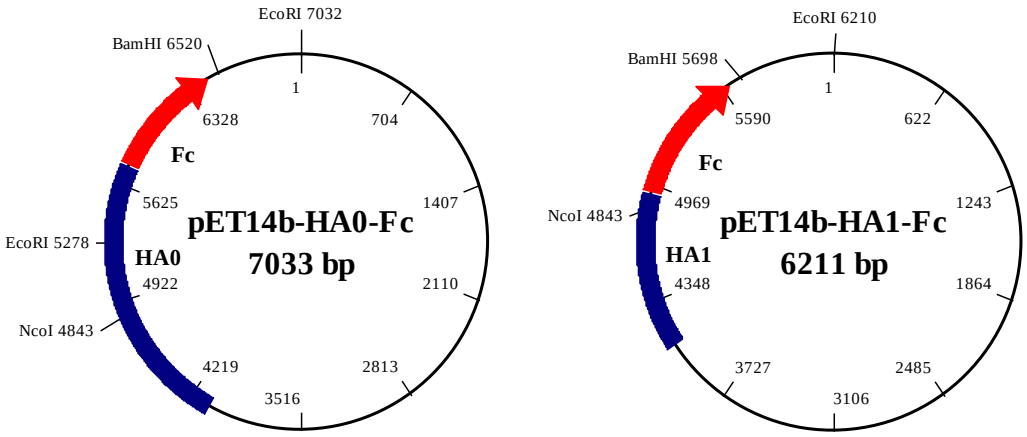
pET-14b bakteri ekspresyon vektörünün oluşturulması ile ilgili veriler

PZR ile çoğaltılarak elde edilen HA1.Fc ve HA0.Fc füzyon pET-14b plazmit 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 agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi **(Şekil 10).**



Şekil 10. *Nco*I restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirilen pET-14b plazmit DNA'sının agaroz jel elektroforezi ile incelenmesi. **M.** 1 Kbp ladder (NEB/N3232). Elektroforez işlemi %1'lik agaroz jel ile 100V sabit gerilim altında 25 dakikada gerçekleştirildi.

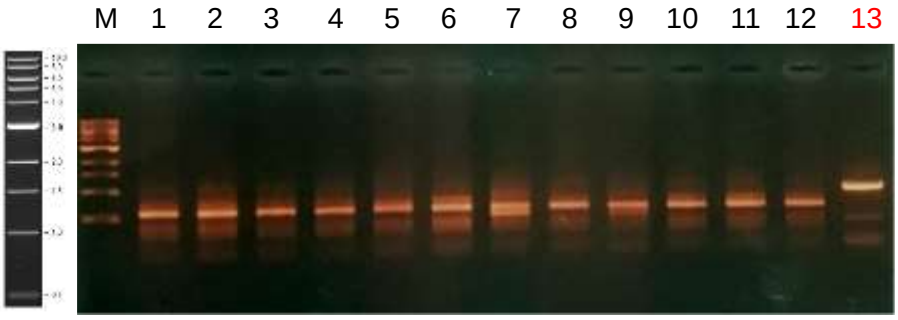
Kesilerek doğrusal hale getirilen DNA sırası ile Klenow enzimi ve alkalen fosfataz enzimleri ile muamele edilerek küt uçlu defosforillenmiş plazmit DNA'ları elde edildi. Hazırlanan plazmit DNA'ları, PZR ile çoğaltılan HA0.Fc ve HA1.Fc DNA fragmentleri ile ligasyona uğratıldı ve **Şekil 11'**de restriksiyon haritaları verilen pET14b-HA0-Fc ve pET-14b-HA1-Fc *E. coli* ekspresyon vektörleri oluşturuldu.



Şekil 11. İnsan IgG1 Fc bölgesi ile füzyon halinde influenza virüsü HA0 ve HA1 proteini kodlayan pET-14b-HA0-Fc ve pET-14b-HA1-Fc plazmit vektörleri.

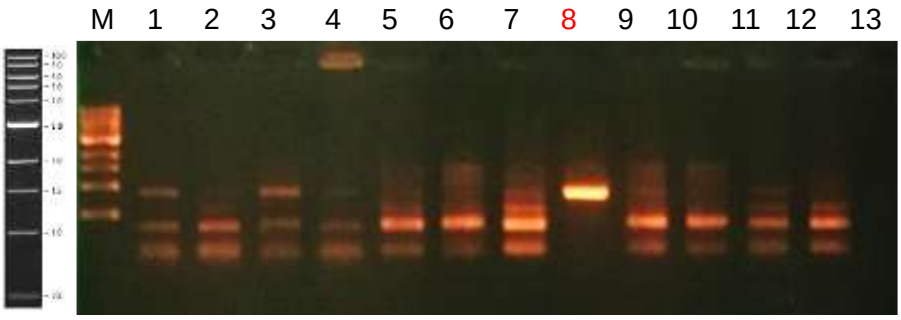
Ligasyondan sonra DNA örnekleri kompetent *E. coli/Mach1* hücrelerine transforme edildi. Ampisilin içeren katı LB besiyerinde oluşan transformant kolonilerden gelişi güzel seçilen belirli sayıda örnek koloni-PZR ile kontrol edildi **(Şekil 12)** ve pozitif sonuç veren örneklerden küçük ölçeklerde plazmit DNA'lar hazırlandı.

A



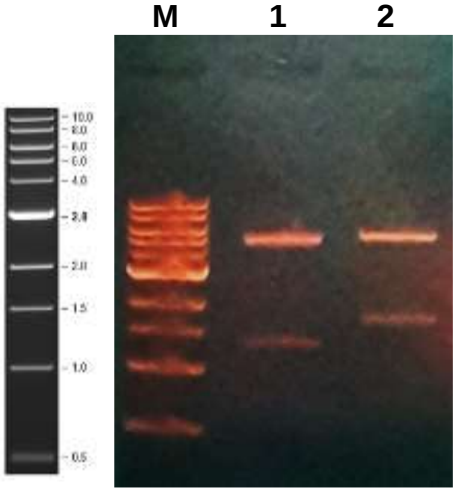
Şekil 12. Transformasyon sonrası LBA (+amp) besiyerinde oluşan kolonilerden pET-14b-HA0-Fc **(A)** ve pET-14b-HA1-Fc **(B)** genleri taşıyan rekombinant plazmitlerin koloni-PZR ile seçilmesi**.** PZR'nda pET-sq-For ve HA1-Rev primerleri kullanıldı. Kırmızı numaralı örnekler beklenen rekombinant plazmitleri içeren kolonileri göstermektedir. **M.** 1 Kbp ladder (NEB/N3232). Elektroforez işlemi %1'lik agaroz jel ile 100V sabit gerilim altında 25 dakikada gerçekleştirildi.

B



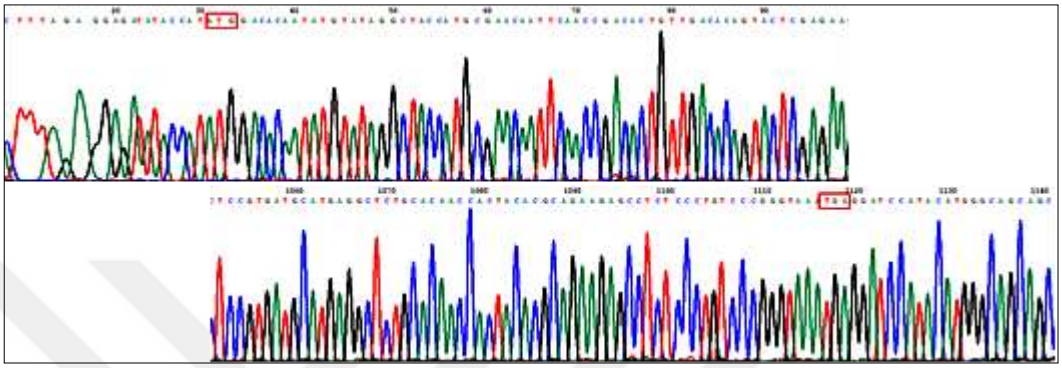
Şekil 12. (devamı) Transformasyon sonrası LBA (+amp) besiyerinde oluşan kolonileden pET-14b-HA0-Fc **(A)** ve pET-14b-HA1-Fc **(B)** genleri taşıyan rekombinant plazmitlerin koloni-PZR ile seçilmesi**.** PZR'nda pET-sq-For ve HA1-Rev primerleri kullanıldı. Kırmızı numaralı örnekler beklenen rekombinant plazmitleri içeren kolonileri göstermektedir. **M.** 1 Kbp ladder (NEB/N3232). Elektroforez işlemi %1'lik agaroz jel ile 100V sabit gerilim altında 25 dakikada gerçekleştirildi.

Koloni-PZR ile pozitif sonuç veren kolonilerden hazırlanan plazmit DNA'lar ilk aşamada restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek oluşan DNA fragmentleri agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi **(Şekil 13)**. Agaroz jel üzerinde *Nco*I ve *Eco*RI enzimleri ile kesilen pET-14b-HA1-Fc plazmiti için 4844 bç ve 1367 bç boyutlarında bantlar; *Eco*RI ile kesilen pET-14b-HA0-Fc plazmiti için 5279 bç ve 1754 bç boyutlarında bantlar saptandı.



Şekil 13. Koloni-PZR ile pozitif sonuç veren kolonilerden hazırlanan pET-14b-HA0-Fc **(1)** ve pET-14b-HA1-Fc **(2)** plazmitlerinin *Nco*I ve/veya *Eco*RI restriksiyon enzimi ile kesilerek agaroz jel elektroforezi ile incelenmesi. **M.** 1 Kbp ladder (NEB/N3232). Elektroforez işlemi %1'lik agaroz jel ile 100V sabit gerilim altında 25 dakikada gerçekleştirildi.

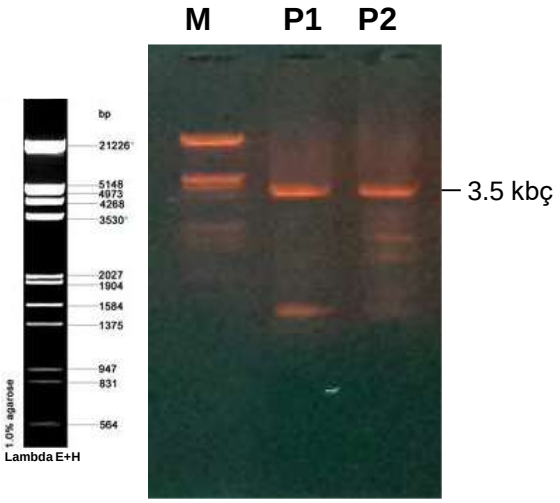
Koloni-PZR ve sonrasında restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek kontrol edilen rekombinant plazmitlerde klonlanan genler DNA dizi analizleri ile de kontrol edildi. Elde edilen sonuçlar tasarlanan vektörler ile birebir benzer olduğunu gösterdi **(Şekil 14).**



Şekil 14. pET-14b plazmimit vektörüne klonlanan HA1.Fc DNA'larının nükleotid dizi analizi kromatogramı. Kromatogramlarda sadece klonlanan genlerin plazmit DNA'ya bağlanma bölgelerine ait dizileri verilmiştir.

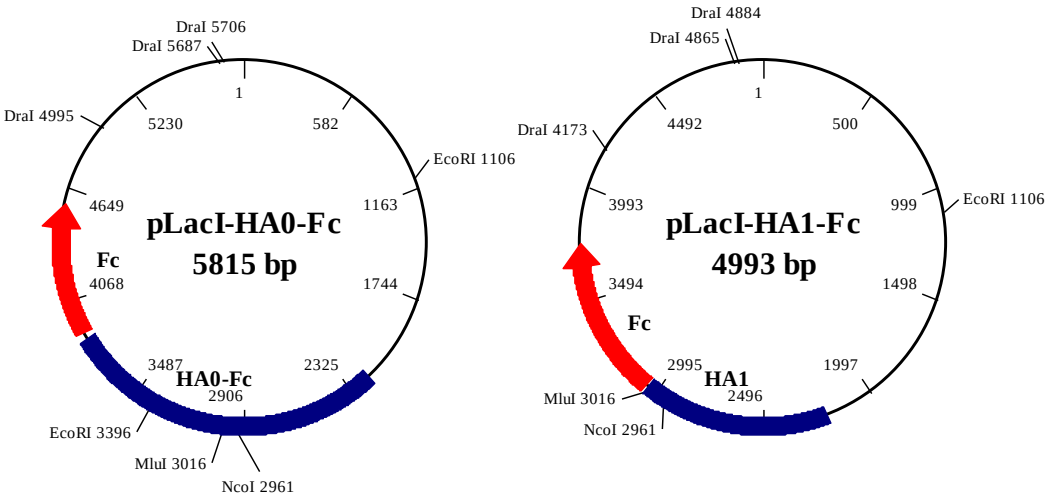
pLacI Bakteri Ekspresyon Vektörünün Oluşturulması ile İlgili Veriler

HA1.Fc ve HA0.Fc genleri pAK plazmitinde LacI promotörü kontrolünde klonlandı. Bu plazmit ters (inverz) PZR tekniği ile doğrusal hale getirildi. Bu işlem sırasında **Tablo 4**'de nukleotid dizileri verilen *pAK-LacI-For* ve *pAK-LacI/GTG-Rev* primeri kullanıldı ve plazmit üzerinde bulunan LacI geni uzaklaştırıldı. PZR ile elde edilen doğrusal DNA molekülleri agaroz jel elektroforezi ile incelendi **(Şekil 15).**



Şekil 15. Ters-PZR ile doğusal hale getirilen pAK plazmit DNA'larının agaroz jel elektroforezi ile analizi. P1 ve P2 farklı Mg^{2+} konsantrasyonlarında PZR ile çoğaltılan DNA örneklerini göstermektedir. **M.** Lambda DNA/EcoRI+HindIII. Elektroforez işlemi %1'lik agaroz jel ile 100V sabit gerilim altında 25 dakikada gerçekleştirildi.

Ters PZR ile çoğaltılarak doğrusal hale getirilen pAK plamzit DNA'sı HA1.Fc ve HA0.Fc DNA fragmentleri ile ligasyona uğratıldı ve **Şekil 16**'de restriksiyon haritaları verilen pLacI-HA1-Fc ve pLacI-HA0-Fc plazmit vektörleri elde edildi.



Şekil 16. pLacI-HA0.Fc ve pLacI-HA1.Fc DNA'larının pAK plazmitinde LacI promotörü kontrolünde klonlanması ile elde edilen ekspresyon vektörlerinin restriksiyon haritaları.

Transformasyon sonrası katı besiyerinde oluşan koloniler arasında rekombinant plazmit taşıyanlar PZR ile belirlendi. PZR'nda pGEX-3' sq For ve HA1-W-Rev primerleri kullanıldı **(Şekil 17).**

A

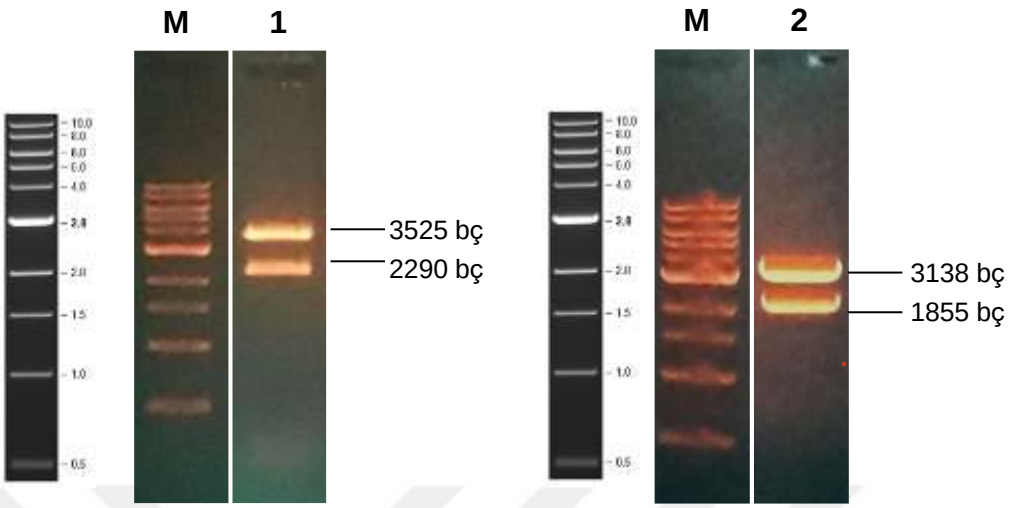


B



Şekil 17. Transformasyon sonrası LBA (+amp) besiyerinde oluşan kolonileden pLacI-HA0-Fc **(A)** ve pLacI-HA1-Fc **(B)** genleri taşıyan rekombinant plazmitlerin koloni-PZR ile seçilmesi**.** Kırmızı numaralı örnekler beklenen rekombinant plazmitleri içeren kolonileri göstermektedir. Elektroforez işlemi %1'lik agaroz jel ile 100V sabit gerilim altında 25 dakikada gerçekleştirildi. **M.** 1 Kbp ladder (NEB/N3232).

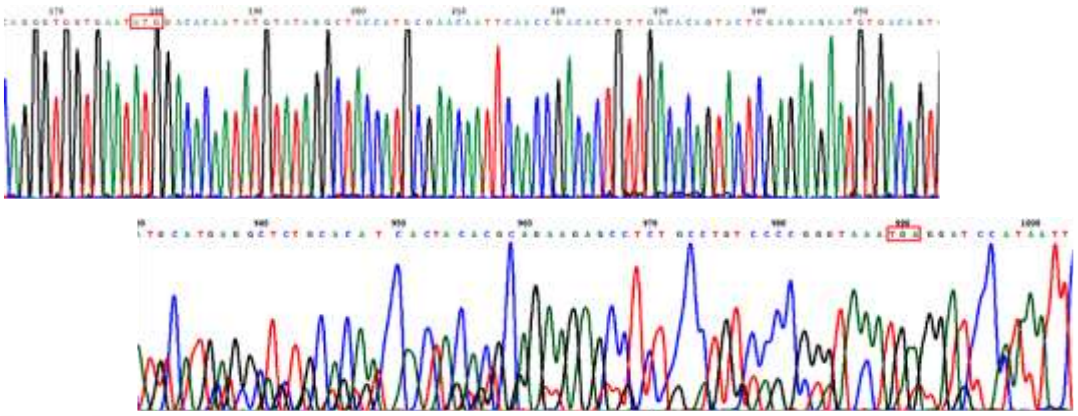
Koloni-PZR ile seçilen kolonilerden küçük ölçeklerde plazmit DNA'lar hazırlandı ve plazmitlerin restriksiyon haritaları göz önünde bulundurularak *Eco*RI ve *Eco*RI/*Nco*I restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesildi (**Şekil 18)**. Agaroz jel elektroforez sonucunda pLacI-HA0-Fc için 3525 bç ve 2290 bç; pLacI-HA1-Fc plazmiti için ise 1855 bç ve 3138 bç boyutlarda beklenen DNA fragmentleri saptandı.



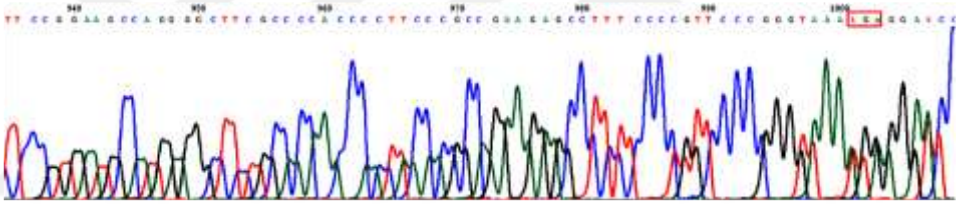
Şekil 18. Koloni-PZR ile pozitif sonuç veren kolonilerden hazırlanan pLac-HA0-Fc **(1)** ve pLac-HA1-Fc **(2)** plazmitlerinin *Eco*RI ve *Eco*RI/*Nco*I restriksiyon enzimi ile kesilerek agaroz jel elektroforezi incelenmesi. Elektroforez işlemi %1'lik agaroz jel ile 100V sabit gerilim altında 25 dakikada gerçekleştirildi. **M.** 1 Kbp ladder (NEB/N3232).

pLac-HA0-Fc ve pLac-HA1-Fc plazmitlerine klonlanan genlerin nihai kontrolleri DNA dizi analizleri ile yapıldı. Elde edilen sonuçlar tasarlanan vektörler ile birebir aynı olduğunu gösterdi **(Şekil 19).**

A



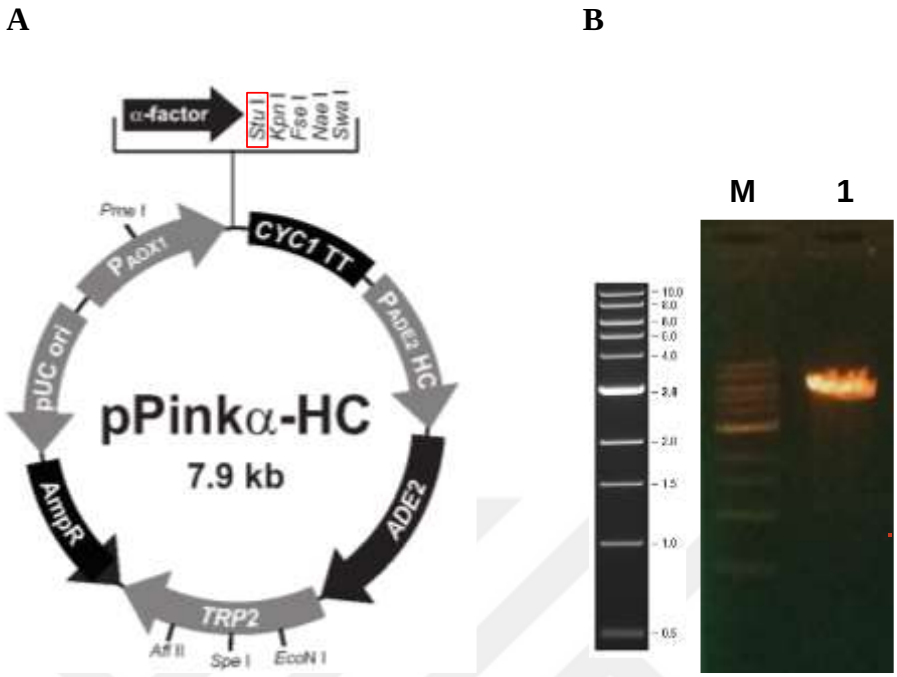
B



Şekil 19. pLac-HA0-Fc ve pLac-HA1-Fc plamit vektörlerinde bulunan HA0.Fc (A) ve HA1.Fc (B) füzyon genlerinin nükleotid dizi analizi kromatogramları. Kromatogramlarda sadece klonlanan genlerin plazmit DNA'ya bağlanma bölgelerine ait DNA dizileri verilmiştir.

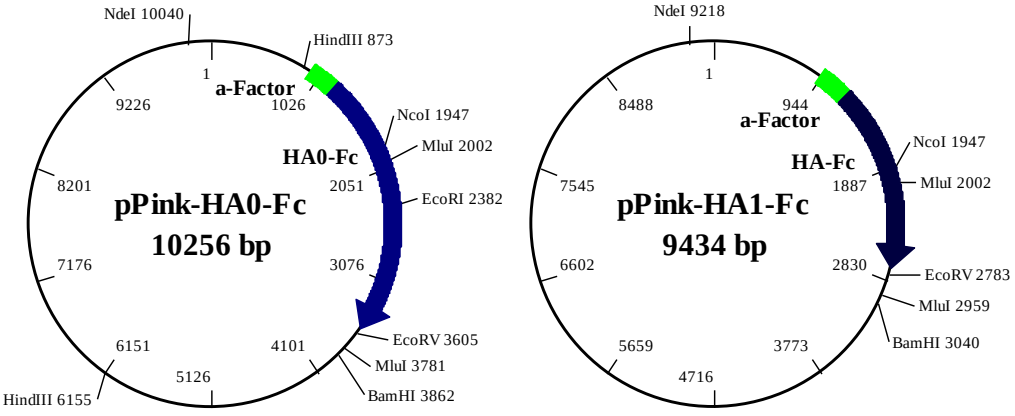
6.1.3 HA0.Fc ve HA1.Fc kodlayan maya ekspresyon vektörlerinin oluşturulması ile ilgili veriler

P. pastoris maya hücrelerinin HA0.Fc ve HA1.Fc füzyon proteinlerini sentez edebilme potansiyellerini belirlemek amacıyla, bu hücrelerde protein ekspresyonu için geliştirilen pPinkα-HC plazmitinden yararlanıldı. HA0.Fc ve HA1.Fc proteinlerini kodlayan genler pPinkα-HC plazmitinde, alfa faktör sinyal dizisi kodlayan diziden hemen sonra, aynı kodon çerçevesinde olacak şekilde klonlandı. Bunun için pPinkα-HC plazmiti StuI restriksiyon enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirildi **(Şekil 20).**



Şekil 20. pPinkα-HC plazmit haritası **(A)**, StuI restriksiyon endonukleaz enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirilen pPinkα-HC plazmit DNA'sının agaroz jel elektroforezi ile incelenmesi **(B)**. **M.** 1 Kbp ladder (NEB/N3232).

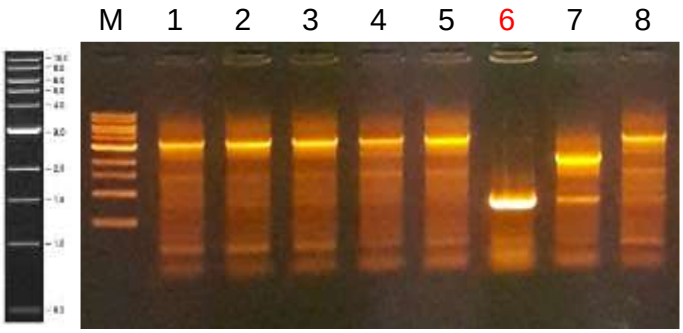
Doğrusal hale getirilen pPinkα-HC plazmit DNA'sı yukarıda anlatıldığı şekilde (bknz 6.1.3) hazırlanan HA0.Fc ve HA1.Fc DNA fragmentleri ile ligasyona uğratıldı ve **Şekil 21** 'de restriksiyon haritaları verilen pPinkα-HA0-Fc ve pPinkα-HA1-Fc maya ekspresyon vektörleri elde edildi.



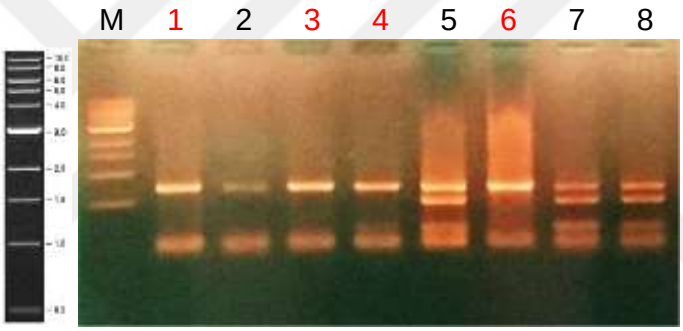
Şekil 21. HA1.Fc ve HA0.Fc DNA'larının pPinkα-HC plazmitinde klonlanması ile elde edilen maya ekspresyon vektörlerinin restriksiyon haritaları.

Oluşturulan diğer plazmit örneklerinde olduğu gibi, viral gen taşıyan transformant kolonileri de koloni-PZR ile kontrol edildi **(Şekil 22).**

A

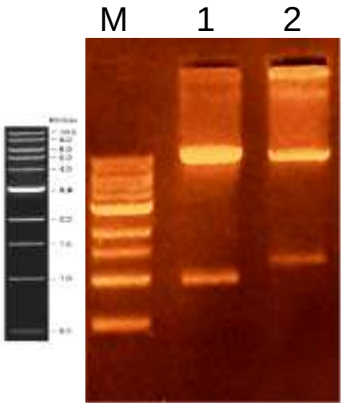


B



Şekil 22. Transformasyon sonrası LBA (+amp) besiyerinde oluşan kolonilerin, pPinkα-HA1-Fc **(A)** ve pPinkα-HA0-Fc **(B)** rekombinant plazmitler için koloni-PZR ile analizi. PZR'nda Seq/α-Factor-For ve HA1-W-Rev primerleri kullanıldı. Elektroforez işlemi %1'lik agaroz jel ile 100V sabit gerilim altında 25 dakikada gerçekleştirildi. **M.** 1 Kbp ladder (NEB/N3232).

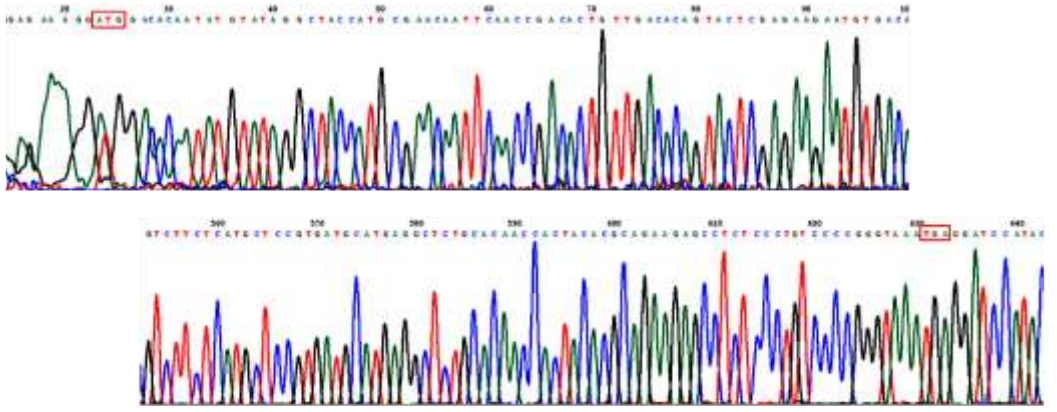
Koloni-PZR testlerinde pozitif sonuç veren kolonilerden hazırlanan DNA örneklerinden pPinkα-HA1-Fc MluI enzimi ile; pPinkα-HA0-Fc ise *Eco*RI/*Bam*HI, restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi **(Şekil 23)**. Enzim kesimi sonucunda pPinkα-HA0-Fc için 8480 bp ve 954 bp boyutlarında; pPinkα-HA0-Fc için ise 8776 bp ve 1480 bp boyutlarında beklenen DNA fragmentleri elde edildi.



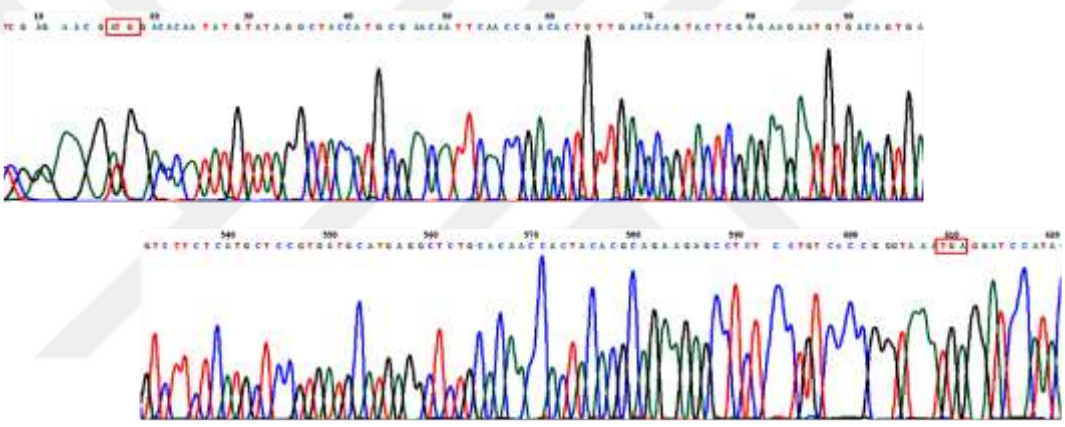
Şekil 23. Restriksiyon endonukleaz enzimleri ile kesilen pPinkα-HA1-Fc (**1**) ve pPinkα-HA0-Fc (**2**) plazmit vektörlerin agaroz jel elektroforezi profilleri. pPinkα-HA1-Fc MluI enzimi ile, pPinkα-HA0-Fc ise *EcoR*I ve *Bam*HI enzimleri ile kesildi. Elektroforez işlemi %1'lik agaroz jel ile 100V sabit gerilim altında 25 dakikada gerçekleştirildi.**M.** 1 Kbp ladder (NEB/N3232).

Maya ekspresyon plazmitleri de bakteri hücrelerinde olduğu gibi PEG/NaCl ile kısmen saflaştırıldıktan sonra DNA dizi analizleri ile kontrol edildi. Elde edilen sonuçlar, kromatogramların tasarlanan vektörlerin dizileri ile birebir uyumlu olduğunu ortaya koydu **(Şekil 24).**

A



B



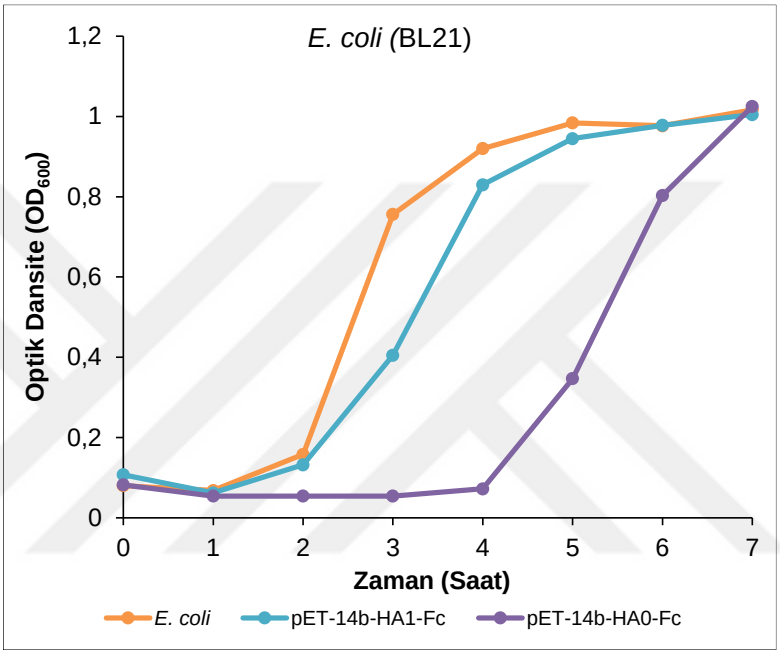
Şekil 24. pPinkα-HA1-Fc (A) ve pPinkα-HA0-Fc (B) plazmit vektörlerinde bulunan HA0.Fc (A) ve HA1.Fc (B) füzyon genlerinin nükleotid dizi analizi kromatogramı. Kromatogramlarda sadece klonlanan genlerin plazmit DNA'ya bağlanma bölgelerine ait diziler verilmiştir.

6.2 HA0.Fc ve HA1.Fc Proteini Kodlayan Plazmit Aktarılan Bakterilerin Üreme Profilleri ile İlgili Veriler

İnsan IgG1 Fc bölgesini kodlayan dizi ile füzyon halinde HA genlerin, bakteriyofaj T7 RNA polimeraz enzimi promotörü, *E. coli* Lac promotörü ve maya AOX1 promotörü kontrolünde klonlanması ile elde edilen rekombinant plazmitlerin, dolayısıyla bu plazmitler üzerinden kodlanan HA0.Fc ve HA1.Fc proteinlerinin *E. coli*/BL21, *E.*

coli/Mach1 ve *E. coli*/DH5α bakterilerinin üremeleri üzerine etkileri hem sıvı besiyerlerinde hem de katı besiyerlerinde incelendi.

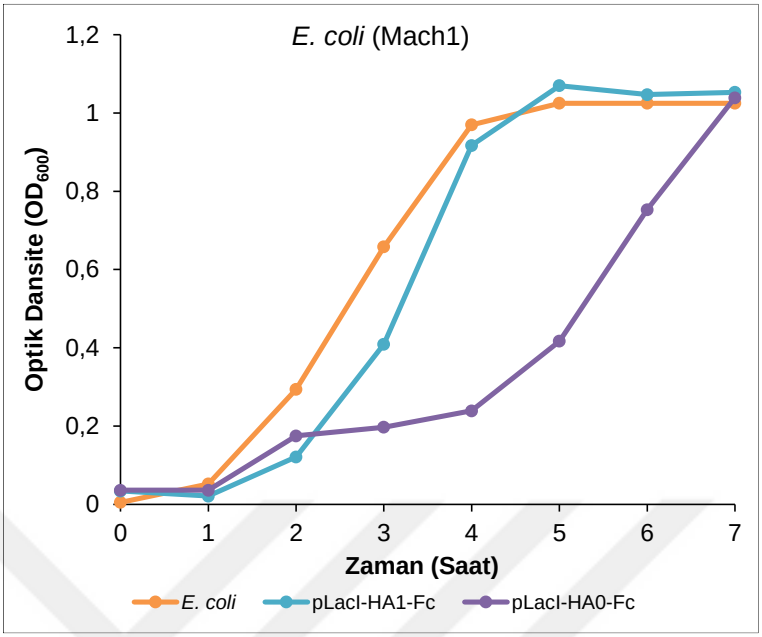
pET14b-HA0-Fc veya pET14b-HA1-Fc plazmitleri ile trasnforme edilen, T7 RNA polimeraz enzimi sentez eden *E. coli/BL21* hücrelerinden, HA0.Fc kodlayan hücrelerin üreme hızında ileri düzeyde bir yavaşlama kaydedildi **(Şekil 25).**



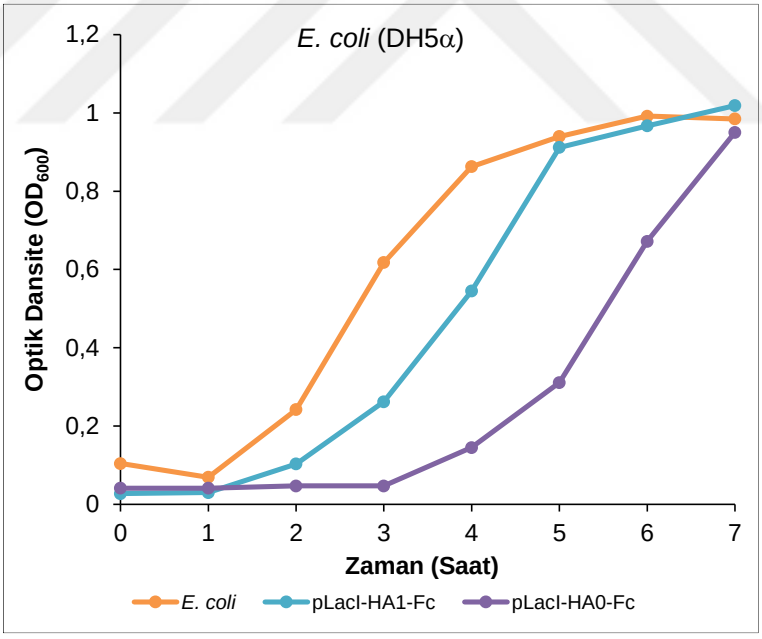
Şekil 25. pET14b-HA0-Fc ve pET14b-HA1-Fc plazmitleri ile transforme edilen *E. coli/BL21* bakterilerinin LB (+amp) besiyerinde gösterdikleri üreme şekilleri. Kültürler 37 °C'da, 180 dev/dak çalkalama hızında inkübe edildi.

Diğer taraftan LacI promotörü kontrolünde viral gen taşıyan plazmitlerin (pLacI-HA0-Fc ve pLacI-HA1-Fc) konak bakteri üremesi üzerine olası etkileri hem *E. coli/Mach1* hem de *E. coli/DH5α* hücrelerinde denendi. Bu hücrelerde de HA0.Fc kodlayan plazmitlerin bakteri üreme hızında önmeli ölçüde yavaşlamaya neden olduğu görüldü **(Şekil 26)**. Buna karşın HA1.Fc kodlayan hücrelerde üreme hızlarında önemli bir değişiklik saptanmadı.

A



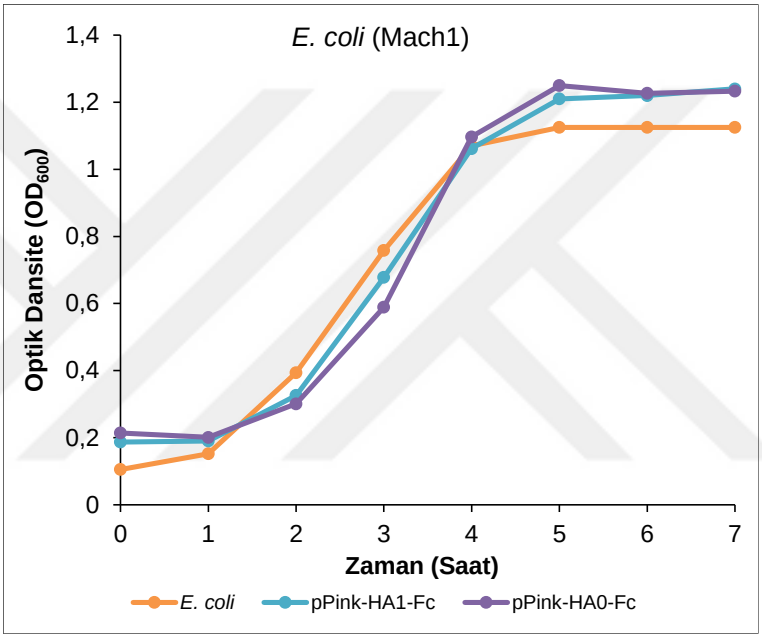
B



Şekil 26. pLacI-HA0-Fc ve pLacI-HA1-Fc plazmitleri ile transforme edilen *E. coli*/Mach1 (A) ve *E. coli*/DH5α (B) bakterilerinin LB (+amp) besiyerinde gösterdikleri üreme şekilleri. Kültürler 37 °C'da, 180 dev/dak çalkalama hızında inkübe edildi.

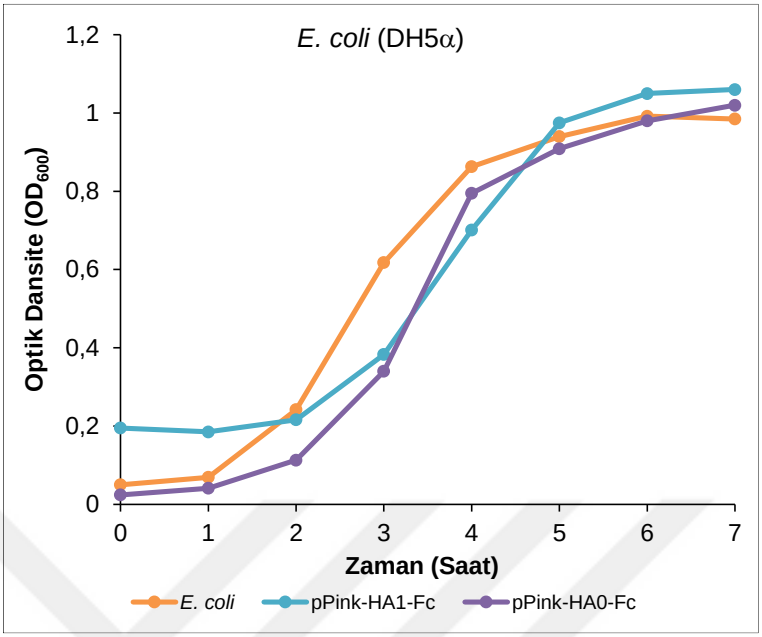
Genlerin en önemli kontrol elementleri olan promotör dizileri genellike belirli organizma grubu için özgünlük gösterir. pPinkα-HC plazmiti üzerinde bulunan AOX1 promötörü *P. pastoris* hücrelerine özgü bir promotördür. Bununla birlikte, kontrol için bu iki maya ekspresyon vektörü (pPinkα-HA0-Fc ve pPinkα-HA1-Fc) ile transforme edilen *E. coli*/Mach1 ve *E. coli*/DH5α hücrelerinin sıvı besiyerlerinde üreme profilleri değerlendirildi **(Şekil 27)**. Elde edilen veriler her iki plazmit ile transforme edilen bakteri suşlarının normal üreme profili gösterdiğini ortaya koydu.

A



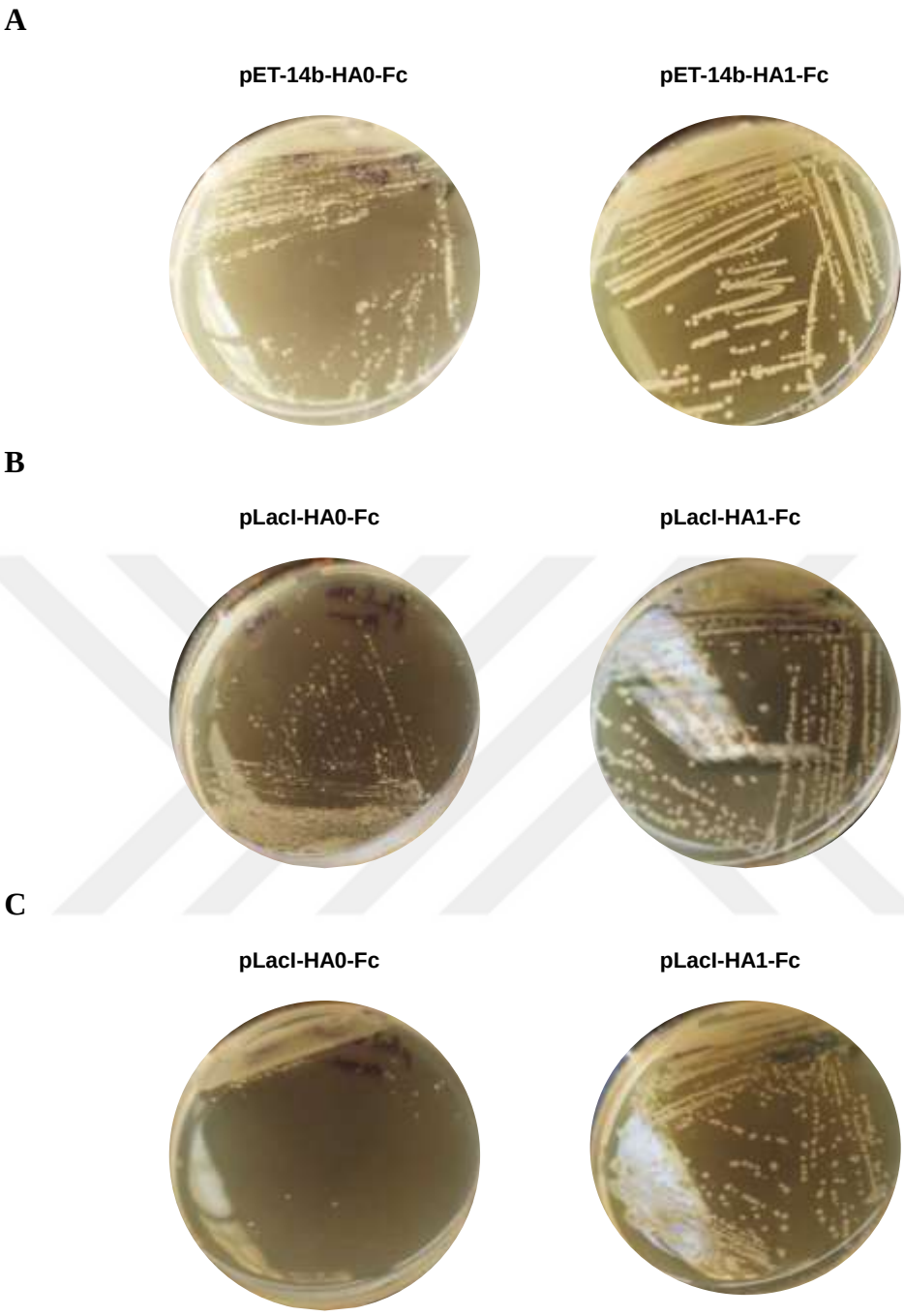
Şekil 27. pPinkα-HA0-Fc ve pPinkα-HA1-Fc plazmitleri ile transforme edilen *E. coli*/Mach1 (A) ve *E. coli*/DH5α (B) bakterilerinin LB (+amp) besiyerinde gösterdikleri üreme şekilleri. Kültürler 37 °C'da, 180 dev/dak çalkalama hızında inkübe edildi.

B



Şekil 27. (devamı) pPinkα-HA0-Fc ve pPinkα-HA1-Fc plazmitleri ile transforme edilen *E. coli*/Mach1 (A) ve *E. coli*/DH5α (B) bakterilerinin LB (+amp) besiyerinde gösterdikleri üreme şekilleri. Kültürler 37 °C'da, 180 dev/dak çalkalama hızında inkübe edildi.

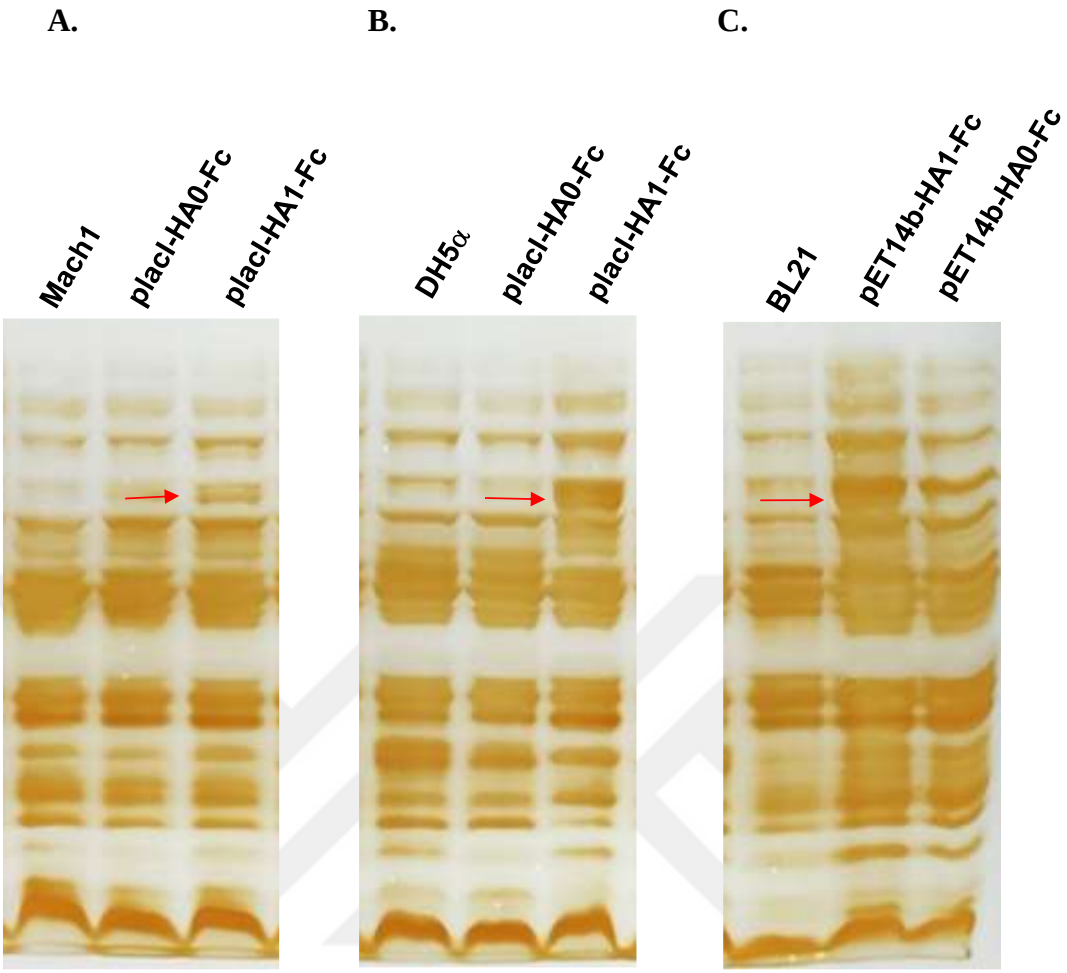
İnfluenza A virüsü HA0 ve HA1 protenin kodlayan plazmit vektörler ile transforme edilen farklı *E. coli* suşları katı besiyerine yayma tekniği ile ekildi. Bir gece boyunca 37 ºC'da inkübe edilen kültürlerde bakteri üreme profilleri **Şekil 28'**de verildi. Elde edilen sonuçlar, HA0.Fc proteinini kodlayan plazmitler ile transforme edilen bakterilerin daha yavaş ürediği ve daha küçük koloniler oluşturduğu gösterdi.



Şekil 28. HA0.Fc ve HA1.Fc geni taşıyan plazmitler ile transforme edilen *E. coli*/BL21 (A), *E. coli*/Mach1 (B) ve *E. coli*/DH5α bakteri hücrelerinin LBA katı besiyerlerinde gösterdikleri üreme şekilleri. Bakteriler katı besiyerine ekildikten sonra 37 ºC'da bir gece inkübe edildi.

6.3 Bakteri Hücrelerinde HA0.Fc ve HA1.Fc Proteinlerinin Sentezi ile İlgili Veriler

Plazmitler üzerinden HA0.Fc ve HA1.Fc proteinerinin *E. coli* hücrelerinde sentez edilip edilmedikleri SDS-PAGE/Gümüş boyama tekniği ile incelendi. Plazmit aktarılan *E. coli* hücreleri sıvı besi ortamlarında doygunluğa erişene kadar üretildi ve hücreler SDS örnek yükleme tamponunda parçalandı. *E. coli/*Mach1, *E.coli/*DH5α ve *E.coli/*BL21 hücrelerinden hazırlanan örneklerin elektroforez sonuçları **Şekil 29'**de verildi. HA1.Fc geni taşıyan plazmitler ile transforme hücrelerde bu gen üzeriden kodlanan proteinin sentez edildiği saptandı. pLacI-HA1-Fc plazmitinin *E. coli/*DH5α hücrelerinde daha yüksek düzeyde HA1.Fc proteini sentez edildiği görüldü **(Şekil 29/B).** Buna karşın bu plazmit ile transforme edilen *E. coli/Mach1* hücrelerinde daha düşük düzeyde HA1.Fc sentezi saptandı **(Şekil 29/A).** pET14b plazmiti T7 RNA polimeraz enzimi promotör dizisi taşıdığı için, pET14b-HA0-Fc ve pET14b-HA1-Fc plazmitleri sadece T7 RNA polimeraz enzimi sentez edien *E. coli* BL21 hücrelerine transforme edildi ve bu hücrelerde HA0.Fc ve HA1.Fc proteinleri için değerlendirildi. Elektroforez sonuçları *E. coli* BL21 hücrelerinden HA1.Fc proteinin etkin olarak eksprese olduğu görüldü **(Şekil 29/C).** HA0.Fc proteini kodlayan plazmitler ile transforme edilen hücrelerde, gümüş boyama tekniği ile ayırt edilebilecek düzeyde protein sentezi saptanamadı.



Şekil 29. Plazmit vektörler ile transforme edilen *E. coli* hücrelerinde HA0.Fc ve HA1.Fc proteinlerinin SDS PAGE/Gümüş boyama tekniği ile incelenmesi. **A**. pLacI-HA0-Fc veya pLacI-HA1-Fc plazmitleri ile transforme edilen *E. coli* BL21 hücreleri. **B**. pLacI-HA0-Fc veya pLacI-HA1-Fc plazmitleri ile transforme edilen *E. coli* DH5α hücreleri. **C**. pET14b-HA0-Fc veya pET14b-HA1-Fc plazmitleri ile transforme edilen *E. coli* BL21 hücreleri. Protein örnekleri %10'luk poliakrilamid jele uygulandı ve elektroforez işlemi 40V/jel sabit gerilimde 15 dakika, 80V/jel gerilimde 60 dakikada tamamlandı.

6.4. *Pichia pastoris* ile Yapılan Çalışmalara 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 HA1.Fc proteinlerini sentez edebilme potansiyeli araştırıldı. Çalışmada yararlanılan *P. pastoris* ırkları Ade1 geni bakımından mutasyona uğratılmış olan ırklardır. Ade1 geni transformant mayaların seleksiyonuna olanak

sağlamaktadır. Diğer taraftan adenin içermeyen zengin besiyerlerinde de pembe koloniler oluşturmaktadır.

6.5. *Pichia pastoris* Maya Hücrelerinin Transformasyonu ile İlişkin Veriler

P. pastoris hücrelerinin plazmitler ile transformasyonunda Lityum klorür/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 klorür/PEG ile yapılan transformasyon deneylerinde beklenen sonuçlar alınamadı. **Şekil 30**'da elektroporasyon tekniği ile pPinkα-HA1-Fc plazmitleri ile transforme edilen *P. pastoris* Irk-1 ve Irk-3 hücrelerinin seçici besiyerinde oluşturdukları koloniler görülmektedir.

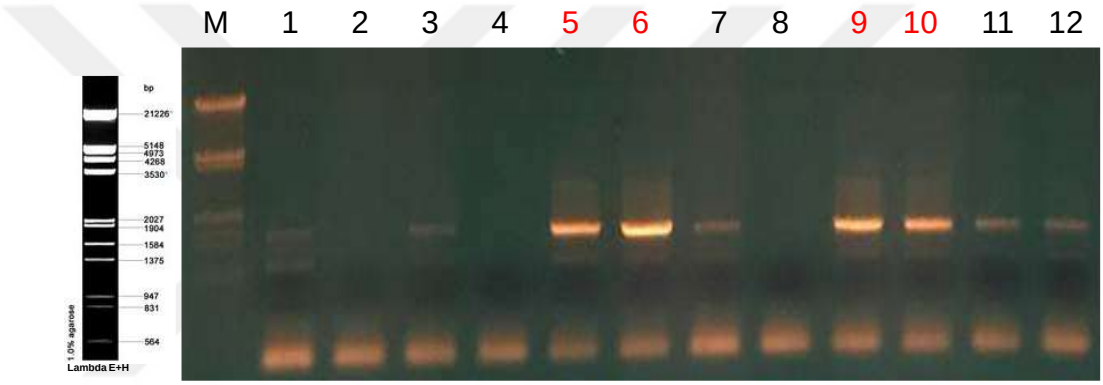
A **B**



Şekil 30. Elektroporasyon tekniği ile pPinkα-HA1 plazmiti ile transforme edilen *P. pastoris* Irk-1 (-Ade2) (**A**) ve Irk-3 (-Ade2, -Prb1) hücrelerinin (**B**) seçici besiyerinde oluşturdukları koloniler.

6.6 Transformant Maya Irklarının HA1.Fc Genleri için Kontrolüne İlişkin Veriler

SD (-ade) seçici katı besiyerinde üreyen *P. pastoris* transformantlarının HA1.Fc geni taşıyıp taşımadıkları PZR ile belirlendi **(Şekil 31)**. Bunun için belirli sayıda transformant maya kolonilerinden genom DNA izolasyonu yapıldı. DNA örnekleri kalıp olarak kullanılarak HA1.Fc genine özgü primerler ile PZR gerçekleştirildi. PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile incelendi. Elde edilen sonuçlar, beyaz renkte koloniler oluşturan transformantların bazılarının viral genleri taşıdığını gösterdi.

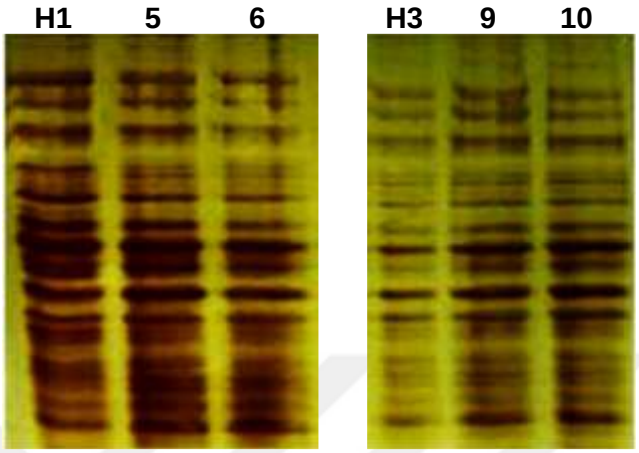


Şekil 31. Elektroporasyon tekniği ile transforme edilen *P. pastoris* maya kolonilerinden elde edilen genom DNA'larının HA1.Fc geni için PZR ile analiz edilmesi. **1-6.** pPinkα-HA1-Fc ile transforme edilen *P. pastoris* ırk1 kolonileri; **7-12.** pPinkα-HA1.Fc ile transforme edilen ırk-3 kolonileri. Elektroforez işlemi %1'lik agaroz jel ile 100V sabit gerilim altında 25 dakikada gerçekleştirildi. **M.** Standart DNA (λ/HindIII+EcoRI).

6.7 Maya Hücrelerinde HA1.Fc Proteininin Sentezi ile İlgili Veriler

PZR ile HA1.Fc geni taşıdığı saptanan maya kolonilerin metanol içeren BMMY besiyerinde üretilmesi ile hazırlanan kültürlerde, hücrelerde viral proteinlerin sentez edilip edilmediği poliakrilamid jel elektroforezi ve sonrasında gümüş boyama tekniği ile incelendi. **Şekil 32**'de PZR ile yapılan kontrollerde pozitif sonuç veren 5, 6, 9 ve 10 nolu maya kolonilerinden hazırlanan lizatların SDS-PAGE/Gümş boyama sonuçları verilmiştir. Elde edilen sonuçlar, HA1.Fc geni taşıyan *P. pastoris*

hücrelerinde gümüş boyama tekniği ile ayırt edilebilecek miktarlarda rekombinant protein sentez edilmedini göstermiştir.



Şekil 32. pPinkα-HA1-Fc plazmiti ile transforme edilen *P. pastoris* Irk-1 ve Irk-3 hücrelerinden hazırlanan lizatların SDS-PAGE/Gümüş boyama tekniği ile incelenmesi. **H1**, **H3**. Transforme olmamış Irk-1 ve Irk-3 lizatları.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

İnfluenza A virüsleri çok parçalı genom yapıları ve viral genlerin replikasyon ve transkripsiyonunu kataliz eden RNA bağımlı RNA polimeraz enzimlerinin sentez sırasında oraya çıkan hataları düzeltme yeteneğine sahip olmaması nedeniyle yapısal özelliklerinin çok hızlı değiştiren virüslerdir. Bu hızlı değişim süreci, influenza A virüslerinin çok sayıda kuş ve memeli türünü kapsayan çok geniş yelpazede canlılarda çoğalabilme ve enfeksiyon yapabilme olanağı sağlamaktadır. İnfluenza A virüslerinin insanlarda zaman zaman pandemilere neden olmasının temelinde de bu virüsün genetik özelliklerini sürekli değiştirmesi yatar. Bu nedenle, insanların influenza A virüs enfeksiyonlarından kaçınması çok zordur. İnfluenza virüs enfeksiyonlarından korunmada kullanılan aşıların mevcut dolaşımda olan virüs tiplerine göre sürekli olarak güncellenmesi gerekmektedir. Diğer taraftan, influenza A virüslerine karşı kullanılan antiviral ilaçlar da zaman içerisinde etksini kaybetme tehlikesi ile karşı karşıyadır. Günümüzde influenza A virüslerine karşı kullanılan en etkili antiviral ilaçlar çeşitli nöraminidaz inhibitörleridir (Kosik ve Yewdell, 2019). Yapılan araştırmalar, bu ilaçlara karşı dirençli virüs tiplerinin her geçen gün arttığını göstermektedir (Yin ve ark., 2021).

İnfluenza A virüslerinde en çok değişkenlik gösteren proteinler, virüs membranında yer alan HA ve NA glikoproteinleridir. Bu proteinler, virüs partiküllerinin konak hücre savunma mekanzimaları tarafından tanınmasında büyük önem taşırlar. Bu bakımdan, mutasyonlar sonucunda bu proteinlerde meydana gelen değişmeler zamanla konak savunma sisteminin virüs algılamasını güçleştirir. Bu durum daha önce hastalığı geçirmiş olsa bile influenza A virüsleri ile tekrar enfekte olmamıza neden olur.

İnfluenza A virüsü HA proteinlerinin en önemli işlevi virüs partiküllerinin konak hücre membranında yer alan reseptörlere tutunmasını sağlamak ve hücre içerisine viral membran ve endozom membranının füzyona uğramasını sağlayarak virüs genomunun sitoplazmada serbest kalmasını sağlamaktır (Du ve ark., 2019). Membran üzerinde yer alan diğer antijenik protein olan NA enzimi enfekte hücrelerde yeni oluşan virüs partiküllerinin serbetleşmesinde işlev görürler (Du ve ark., 2019). Her iki yüzey antijen proteini, konak savunma sisteminin en önemli hedef molekülleri

olduğu için, özellikle rekombinat olarak üretilen bu proteinler influenza virüslerine karşı aşı olarak kullanılma potansiyeli vardir. Bu nedenle, rekombinant HA antijenik proteini içeren bir grip aşısı Amerika Birleşik Devletleri'nde 2013 yılında kullanım onayı almıştır (https://www.cdc.gov/flu/prevent/how-fluvaccine-made.htm - erişim tarihi 15.07.2021).

Aşı ya da değişik amaçlar için kullanılan ve ticari değeri olan proteinleri maliyetler de değerlendirilerek genellikle rekombinant DNA teknolojileri ile üretilmektedir. Bunun için ilk aşamada proteini kodlayan gen, protein sentezinde kullanılacak hücre tipine göre uygun bir plazmit vektöre klonlanmaktadır. Yine proteinin yapısal özellikleri göz önünde bulundurularak üretilecek rekombinant proteinler için uygun bir ekspresyon modeli belirlenmektedir. Rekombinant proteinler için kullanılacak ekspresyon modellerinde, prokaryotik organizmalar (bakteriler), mayalar, böcek hücreleri ya da memeli hücreleri temel alınmaktadır. Bakteriler rekombinant DNA teknolojileri ile protein sentezinde en çok kullanılan organizma grubudur (Biotechnol Adv. Sep-Oct 2012;30(5):1102-7; Biotechnol J. 2006 Feb;1(2):164-86). Özellikle tıpta terapötik amaçlı kullanılan proteinlerin üretilmesinde rekombinant DNA teknikleri büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla ilk rekombinant ürünler yaklaşık 35 yıl önce önce *Escherichia coli*'de üretilmiş ve sayıları her geçen gün artmıştır (Baeshen ve ark., 2014). Günümüzde başta *E. coli* olmak üzere bakteri ekspresyon sistemleri, verim ve maliyet açısından daha da geliştirilmiştir (Protein Science 2019 Vol 28:1412–1422; Doi: 10.1002/Pro.3668). Hızlı çoğalmaları, yüksek verim ve manipülasyon kolaylığı gibi avantajlarından dolayı glikozile edilmemiş peptitlerin ve proteinlerin ekspresyonu için bakteri ekspresyon sistemleri ideal sistemlerdir. Bununla birlikte glikozillenmiş daha kompleks proteinlerin aktif olarak üretilmesinde bakteriyal ekspresyon sistemleri genellikle uygun sistemler değildirler. (Protein Science 2019 Vol 28:1412–1422; Doi: 10.1002/Pro.3668). Bu gibi durumlarda ökaryotik ekspresyon sistemlerinin kullanılması gerekmektedir. Ökaryotik ekspresyon sistemleri arasında maya ekspresyon sistemleri maliyet ve büyük ölçeklerde üretim için uygun tekniklerdir. Maya ekspresyon sistemlerinde kullanılan organizmaların başında *Saccharomyces cerevisiae* gelmektedir. Diğer önemli maya türleri arasında ise *Pichia pastoris* ve *Kluyveromyces lactis* yer almaktadır. Bu hücrelerde heterolog olarak sentez edilen proteinler her zaman uygun

translasyon sonrası modifikasyonlara uğratılmamaktadır. Bu nedenle bazı terapötik proteinlerin rekombinant olarak üretilmesinde zorunlu olarak ökaryotik ekspresyon sistemleri kullanılmaktadır (Celik ve Calık , 2012).

Bu tez çalışması kapsamında insanlarda solunum yolu enfeksiyonlarına neden olan influenza A virüsü yüzey antijen proteinlerinden HA proteinin *E. coli* bakterisi ve *P. pastoris* maya hücrelerinde rekombinant olarak üretilmesi amaçlanmıştır. İnfluenza A virüsü HA proteini membrana bağlı bir proteindir. Bu nedenle rekombinant DNA teknolojileri ile üretilen membranlara bağlı olmayan proteinlere kıyasla membrana bağlı proteinlerin üretilmesi ve ekstraksiyonunda önemli sorunlar ile karşılaşılabilmektedir. Daha önce influenza A, HA ve NA proteinlerini kodlayan plazmitler ile transforme edilen *E. coli* hücrelerinin çok düşük üreme profilleri gösterdiği ortaya konmuştur (Özaydın, 2018). Bunun en önemli nedeni sentez edilen rekombinant proteinlerin *E. coli* hücrelerinde toksik etki göstermeleridir. Bu toksik etkinin nedeni HA ve NA proteinlerinin hücresel membranlar ile sıkı etkileşimi olabilir. Dolayısıyla, tez çalışması kapsamında HA proteinin insan IgG1 antikoru Fc bölgesi ile kaynaşmış olarak *E. coli* ve *P. pastoris* hücrelerinden üretilmesi hedeflendi.

İnfluenza A WSN tipi virüsü HA proteinini bütün olarak (HA0) ya da sadece HA1 bölgesinin, insan IgG1 Fc proteini ile kaynaşmış olarak kodlayan pCAGGS plazmit vektörleri üzerinden PZR ile çoğaltılarak **(Şekil 8)** oluşan fragmentler *E. coli* ve *P. pastoris* hücrelerinde ekspresyon yapan plazmitlere klonlandı.

E. coli hücrelerinde rekombinant protein sentezi için farklı ekspresyon vektörleri geliştirilmiştir. *E. coli* ekspresyon vektörleri arasındaki öne çıkan farklılık gen ekspresyonunu transkripsiyon düzeyeninde kontrol eden promotör dizileridir. Bu vektörlerin bir kısmında konstitütif promotörler bulunurken, bir kısmında kontrol altında tutulan promotörler bulunmaktadır (Chou, 2007).

Bu tez çalışması kapsamında, *E. coli* hücrelerinde protein sentezi için iki farklı promotör dizisi taşıyan plazmit vektöründen yararlanıldı. Bunlardan biri T7 bakteriyofaj promotörü taşıyan pET14b plazmiti ikincisi ise pAK plazmitidir. HA0.Fc ve HA1.Fc genleri pET14b plazmit DNA'sında T7 bakteriyofaj promotörü kontrolünde klonlandı ve pET14b-HA0.Fc ve pET14b-HA1.Fc ekspresyon vektörleri elde edildi **(Şekil 11)**. Bu vektörlerin doğrulukları hem restriksiyon endonükleaz

enzimleri ile kesilerek hem de DNA dizi analizleri ile ortaya kondu **(Şekil 13 ve Şekil 14)**.

Bakteriyofaj T7 RNA polimeraz enzimi, promotör özgünlüğü yüksek olan bir enzimdir, dolayısıyla sadece T7 promotörü kontrolünde olan genler üzerinden mRNA sentezini kataliz eder (Rong ve ark., 1988). Çok düşük hata yapma oranına sahip olan T7 polimeraz enzimi 99 kDa ağırlığında, kofaktör olarak Mg^{2+} iyonuna gereksinim duyar. Bakteriyofaj T7 promotör dizileri *E. coli* RNA polimeraz enzimi tarafından tanınmaz. Bu nedenle bu promotör kontrolünde gen aktarılan plazmit vektörlerinin, T7 RNA polimeraz enzimi sentez eden *E. coli* hücrelerine transforme edilmesi gerekmektedir. Normal koşullarda bakteriyofaj T7 RNA polimeraz enzimi *E. coli* hücrelerinde sentez edilen bir enzim değildir. Dolayısıyla T7 RNA polimeraz enzimini kodlayan genin konak *E. coli* hücrelere aktarılması zorunludur. Bakteriyofaj T7 promotörü ve T7 RNA polimeraz enzimine bağımlı ekspresyon sistemi ilk kez Studier ve arkadaşları (Dubendorff ve Studier, 1991; Rosenberg ve ark., 1987; Studier ve Moffatt, 1986) tarafından geliştirilmiştir. Bakteriyofaj T7 RNA polimeraz promotörü taşıyan pET plazmit vektörleri bu araştırmacılar tarafından oluşturmuştur. Araştırmacılar, *E. coli* hücrelerinde bu plazmitlerin ekspresyon yapabilmesi için gerek duyulan T7 RNA polimeraz enzimini, bu enzimi kodlayan geni taşıyan Lambda fajı ile konak hücreleri enfekte ederek sağlamışlar ya da bakteriyofaj T7 RNA polimeraz enzimi sentez eden *E. coli* ırkı (BL21-DE3) geliştirmişlerdir. *E. coli/BL21-DE3* ırkı, T7 RNA polimeraz genini, IPTG ile indüklenen *lacUV5* promotör kontrolünde genomuna entegre olmuş halde taşımaktadır. Dolayısıyla, bu hücrelerinde bakteriyofaj T7 RNA polimeraz enzimi sentezi IPTG ile indüklenmektedir. Bu çalışmada da ilk aşamada, insan IgG1 Fc bölgesini kodlayan dizler ile kaynaşmış halde influenza A virüsü HA genleri (HA0.Fc ve HA1.Fc) T7 RNA polimeraz promotörü kontrolünde pET14b plazmit vektörlerine klonlandı ve *E. coli*/*BL21 (DE3)* hücrelerine transforme edildi. Bu plazmit vektörlerinin *E. coli* hücrelerinde HA0.Fc ve HA1.Fc kodlayıp kodlamadıkları SDS-PAGE teknikleri ile incelendi **(Şekil 29)**. SDS-PAGE ile ayrıştırılan proteinler gümüş boyama ile görünür hale getirildi. Elde edilen veriler, *E. coli/BL21* hücrelerinde influenza A virüsü HA proteinin amino-terminal yarımını oluşturan HA1 bölgesinin insan IgG1 Fc bölgesi ile kaynaşmış halde etkin olarak sentez edildiğini; buna karşın tam boyutta (HA0) proteinin ise gümüş boyama tekniği

ile belirlenebilecek düzeyde olmadığını ortaya koydu. Bu sonuçlar influenza A virüsü IgG1 Fc proteini ile kaynaşmış durumda da olsa HA proteinin *E. coli* hücrelerinde tam boyutta sentez için uygun olmadığını gösterdi. Bakterilerde ya da diğer ekspresyon sistemlerinde hücreler için toksik olan proteinlerin sentezinde, ilgili proteini kodlayacak genler regüle edilebilen bir promotör kontrolünde klonlanır. Bu çalışmada da influenza HA genleri pET14b plazmitinde T7 bakteriyofaj promotörü kontrolünde klonlanmıştır. Bakteriyofaj T7 promotörü konstitütif bir promotördür. Bununla birlikte *E. coli* hücrelerinde bu promotörün aktif olabilmesi için bakteriyofaj T7 RNA polimeraz enzimine gereksinim vardır. Bu gereksinin, *E. coli/BL21(DE3)* hücrelerinde, *lacUV5* promotör kontrolünde T7 RNA polimeraz geni bakteri genomuna entegre edilerek giderilmiştir (Studier ve Moffatt, 1986). *LacUV5* promotörü IPTG ile indüklenen bir promotördür (Namdev ve ark., 2019) Dolayısıyla pET14b plazmit vektöründe T7 bakteriyofaj promotörü kontrolünde klonlanan genlerin ekspresyonlarının indirekt olarak regüle edilmesi söz konusudur. Buna karşın yaptığımız denemelerde pET14b plazmiti ile transforme edilen *E. coli*/*BL21* hücrelerinin IPTG ile uyarılmadan da ilgili genlerin ekspresyonunu yaptığını göstermiştir. Dolayısyla, *E. coli/BL21(DE3)* hücrelerinde T7 bakteryofaj RNA polimeraz enzimini kodlayan gen IPTG ile regüle edilebilen *lacUV5* promotör kontrolünde klonlanmış olsa da ortama IPTG eklenmeden de hücrelerde transkripsiyon için yetecek kadar T7 RNA polimeraz enzimin sentez edildiği anlaşılmaktadır. Literatür verileri de *lacUV5* promotörünün çok sıkı bir kontrol mekanizmasına sahip olmadığını göstermektedir (Mertens ve ark., 1995; Studier, 1991).

Prokaryotik ekspresyon sistemi olarak *E. coli* hücrelerinde heterolog protein sentezinde *tac, lac, lacUV5* ve *trc* gibi farklı *E. coli* promotör dizilerinden yararlanmaktır. Bu kapsamda T7 bakteriyofaj RNA polimeraz promotörü dışında, *E. coli* RNA polimeraz enzimi tarafından tanınan laktoz operonuna ait LacI promotör dizisinden yararlanıldı. LacI proteinin *E. coli* hücrelerinden belirli düzeyde konstitütif olarak sentez edilen ve laktoz operonunu kontrol eden düzenleyici bir proteindir (ACS Synth. Biol. 2014, 3, 949−95; Balaeff ve ark., 2004; Villa ve ark., 2005). Çalışmada HA1.Fc ve HA0.Fc DNA fragmentleri pAK plazmiti üzerinde bulunan LacI promotör dizisi kontrolünde klonladı ve pLacI-HA1-Fc ve pLacI-HA0-Fc rekombinant ekspresyon vektörleri elde edildi **(Şekil 16)**. Bu plazmit vektörler klonlanan genlerin

doğrulukları DNA dizi analizleri ile ortaya kondu **(Şekil 19)**. LacI promotörü kontrolünde klonalanan HA1.Fc ve HA0.Fc genlerinin *E. coli* hücrelerinde ekspresyon yapıp yapmadıkları ve bu plazmitleri taşıyan bakterilerin LB besiyerlerinde üreme durumları *E. coli*/*Mach1* ve *E. coli*/*DH5α* bakteri suşlarında çalışıldı. LB sıvı besiyerlerinde, HA0.Fc kodlayan plazmit ile transforme edilen her iki *E. coli* suşunun üreme hızında ileri düzeyde yavaşlama olduğu saptandı **(Şekil 26)**. Benzer şekilde HA1.Fc kodlayan plazmit transforme edilen hücrelerin de HA0-Fc kodlayan plazmite oranla düşük düzeyde de olsa hücrelerin üreme hızında yavaşlamaya neden olmuştur. Bu sonuçlar özelliklde tam boyutta HA proteinin (HA0) *E. coli* hücrelerinde sentezinin hücreler için önemli ölçüde toksik olduğunu ortaya koymuştur. Plazmitler ile transforme edilen hücrelerin katı besiyerinde gösterdikleri üreme profilleri bu sonucu destekler niteliktedir **(Şekil 28)**.

LacI promotörü kontrolünde klonlanan HA1.Fc ve HA0.Fc genlerinin *E. coli* hücrelerinde ekspresyon yapıp yapmadıkları SDS-PAGE/Gümüş boyama tekniği ile de incelendi. Konak bakteri olarak *E. coli*/*Mach1 (B*) ve *E. coli*/*DH5α* suşları denendi. Elde edilen veriler T7 bakteriyofaj T7 promotörü kontrolündeki genlerde olduğu gibi, HA1.Fc geninin her iki *E. coli* suşunda da ekspresyon yaptığını ortaya koydu **(Şekil 29)**. Buna karşın pLacI-HA0.Fc plazmiti ile transforme edilen *E. coli* hücrelerinde beklenen HA0.Fc proteinin ekspresyonu SDS-PAGE/Gümüş boyama tekniği ile belirlenemedi.

İnfluenza A virüsü yüzey antijenleri glikoprotein yapıda proteinlerdir. Glikozilasyon proteinlerin aktiviteleri açısından büyük önem taşımaktadır (Loregian ve ark., 2014). Diğer taraftan aşı olarak kullanım potansiyeline sahip proteinlerin beklenen bağışıklık yanıtı oluşturabilmeleri için bazı durumlarda uygun formatta glikolize olması gerekmektedir. Prokaryotik ekspresyon sistemleri önemli avantajlara sahip olmakla birlikte, ökaryotik hücrelere özgü olan glikozilasyon işlemlerinin gerçekleştirememeleri, ökaryotik organizma proteinlerinin rekombinant olarak üretilmesinde önemli bir dezavantajdır (Celik ve Calık, 2012). Mayalar memeli hücreleri ile karşılaştırıldığında çok kolay ve daha düşük maliyette üretilebilen ökaryotik organizmalardır. Mayalar, bakteriler ile karşılaştırıldığında, glikozilasyon gibi translasyon sonrası modifikasyonlar yapabilmeleri ve proteinlerin daha uygun bir şekilde katlanmasına olanak vermeleri gibi önemli avantajlara sahiptirler (Choi ve

diğerleri, 2003). Bununla birlikte hücrelerin zor parçalanması ve proteaz enzimleri bakımından zengin olmaları dezavantaj olarak değerlendirilebilir (Zhang ve diğerleri, 2011). Bira mayası olarak da bilinen *Saccharomyces cerevisiae* çok iyi tanımlanmış, biyoteknolojik çalışmalarda ve rekombinant protein üretimi çalışmalarımda en yaygın kullanılan maya türüdür. Bununla birlikte *Pichia pastoris* ve *Kluyveromyces lactis* gibi mayalar da yaygın olarak kullanılmaktadır (Molecular Biotechnology (2019) 61:365–384). *P. pastoris* hücreleri hızlı çoğalma ve yoğun üreme kapasiteleri ile birçok heterolog proteinin ekspresyonunda başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Goodrick ve diğerleri, 2001; Macauley-Patrick ve diğerleri, 2005; Sreekrishna ve diğerleri, 1989).

Bu nedenle bu çalışmada da influenza A virüsü HA proteinlerinden rekombinant olarak üretilmesinde *P. pastoris* hücreleri de denenmiştir. Bunun için HA1.Fc ve HA0.Fc genleri *P. pastoris* hücreleri için geliştirilmiş pPinkα-HC plazmit vektöründe AOX1 promotör dizisi kontrolünde klonlanmıştır **(Şekil 20)**. Elde edilen maya ekspresyon vektörlerinin doğrulukları DNA dizi analizleri ile saptanmıştır **(Şekil 24)**. Plazmitlerin *P. pastoris* maya hücrelerine transformasyonunda kimyasal yöntem (PEG/LiCl ile transformasyon) ve elektroporasyon yöntemi denendi. Kimyasal yöntem ile başarılı bir sonuç alınmadı. Buna karşın elektroporasyon tekniği olumlu sonuç verdi **(Şekil 30)**. Elektroporasyon sonrasında transformant koloniler Adenin içermeyen seçici besiyerinde (SD-Ade) seçildi ve bu kolonilerden çoğaltılan hücrelerden izole edilen genomik DNA' nın influenza A virüsü HA1 geni taşıyıp taşımadığı PZR ile belirlendi **(Şekil 31)**. HA1.Fc geni maya hücrelerinde metanol ile uyarılan AOX1 geni kontrolünde klonlanmış olduğundan, PZR ile pozitif reaksiyon veren maya kolonilerin metanol içeren BMMY besiyerinde üretildi. Maya hücrelerinin HA1.Fc proteini sentez edip etmedikleri SDS-PAGE/Gümüş boyama tekniği ile değerlendirildi. SDS Örnek yükleme tamponunda parçalanan hücre lizatlarında Gümüş boyama tekniği ile belirlenebilecek düzeyde rekombinant protein saptanamadı **(Şekil 32)**. pPinkα-HC plazmitlerinde *S. erevisiae* hücrelerine ait α-faktör proteini sinyal dizisini ile kaynaşmış halde klonlanan HA1.Fc geninin DNA dizi analiz sonuçları, klonlama ile ilgili teknik bir hatanın olmadığını göstermiştir **(Şekil 29)**. Diğer taraftan transformant *P. pastoris* hücrelerinin HA1.Fc genini genomunda taşıdığı PZR ile kanıtlanmıştır. Dolayısyla HA1.Fc proteinin *P. pastoris* hücrelerinde saptanamamış olmasının farklı nedenlerde kaynaklandığı düşünülmektedir. Bunlardan

biri *P. pastoris* hücrelerinde rekombinant proteini yarılanma ömrünün kısa olma olasılığıdır. Maya hücrelerinde rekombinant proteinlerin sentez edilmesinde karşılaşılan sorunlardan biri, proteinlerin proteolitik yıkımı olayıdır. Mayalar genel olarak proteaz enzimleri bakımından zengin hücrelerdir (Gimenez ve diğerleri, 2000; Kobayashi ve diğerleri, 2000). *S. cerevisiae* proteaz enzimleri bakımından daha iyi çalışılmıştır. Bu hücreler kadar iyi karakterize edilmemiş olmakla birlikte, *P. pastoris* hücrelerinde de rekombinant proteinlerin proteolitik yıkımı ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır (Kobayashi ve diğerleri, 2000; Sinha ve diğerleri, 2003; Werten ve diğerleri, 1999; Zhou ve Zhang, 2004). Dolayısıyla transformant *P. pastoris* hücrelerinde HA1.Fc proteinin saptanamamış olmasının nedenlerinden biri rekombinant proteinlerin proteolitik yıkımı olabilir.

Sonuç olarak, bu tez çalışması kapsamında influenza A virüsü yüzey antijen proteinlerinden HA proteinin insan IgG1 antikoru değişken olmayan bölgesi (Fc) ile bütün halinde (HA0) ya da bir bölümü (HA1) kaynaşmış olarak *E. coli* bakterisinde ve *P. pastoris* maya hücrelerinde üretilmesi ve analizi hedeflenmiştir. Bu bağlamda HA0.Fc ve HA1.Fc proteinlerini kodlayacak genler bakteri ve maya ekspresyon vektörlerine klonlanmıştır. Oluşturulan plazmit vektörlerin nihai kontrolleri DNA dizi analizleri ile ortaya konmuştur. Plazmit vektörler bakteri hücrelerine kimyasal yöntem ile; maya hücrelerine ise elektroporasyon tekniği ile transforme edilmiştir. Her iki konak türünde de rekombinant proteinlerin üretilip üretilmediği SDS-PAGE/Gümüş boyama tekniği ile analiz edilmiştir. Elde edilen veriler, transforme edilen farklı *E. coli* suşlarının HA1.Fc proteininin sentezine olanak tanıdığını göstermiştir. Buna karşın bu hücrelerde HA0.Fc proteini SDS-PAGE/Gümüş boyama tekniği ile belirlenememiştir. *P. pastoris* ile yapılan çalışmalarda ise olumlu sonuç alınamamıştır. Deneysel veriler değerlendirildiğinde virüs membranına bağlı bir glikoprotein olan HA proteinin özellikle bütün olarak sentez edildiğinde bakterilerde ileri düzeyde toksik etki yaptığı ortaya konmuştur. Transformant *P. pastoris* hücrelerinde rekombinant proteinlerin saptanamamış olmasının nedenlerinden birinin de bu hücrelerin zengin proteaz enzimi içeriklerinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

8.KAYNAKLAR

Adamson AD, Jackson D, Davis JR. Novel approaches to in vitro transgenesis. J Endocrinol. 2011 Mar;208(3):193-206.

Air G. M. (2012). Influenza neuraminidase. Influenza and other respiratory viruses, 6(4), 245–256.

Alalam, H., Graf, F. E., Palm, M., Abadikhah, M., Zackrisson, M., Boström, J., Fransson, A., Hadjineophytou, C., Persson, L., Stenberg, S., Mattsson, M., Ghiaci, P., Sunnerhagen, P., Warringer, J., & Farewell, A. (2020). A High-Throughput Method for Screening for Genes Controlling Bacterial Conjugation of Antibiotic Resistance. mSystems, 5(6), e01226-20.

Ayora-Talavera G. Sialic acid receptors: focus on their role in influenza infection. Journal of Receptor, Ligand and Channel Research. 2018;10:1-11.

Babu Y.S., Chand P., Bantia S., Kotian P., Dehghani A., El-Kattan Y., Lin T.H., Hutchison T.L., Elliott A.J., Parker C.D., et al. Bcx-1812 (rwj-270201): Discovery of a novel, highly potent, orally active, and selective influenza neuraminidase inhibitor through structure-based drug design. J. Med. Chem. 2000; 43:3482–3486.

Baeshen, N. A., Baeshen, M. N., Sheikh, A., Bora, R. S., Ahmed, M. M., Ramadan, H. A., Saini, K. S., & Redwan, E. M. (2014). Cell factories for insulin production. Microbial cell factories, 13, 141.

Balaeff A., Mahadevan L., Schulten K. (2004) Structural basis for cooperative DNA binding by CAP and lac repressor. Structure 12:123-32.

Balannik, V., Wang, J., Ohigashi, Y., Jing, X., Magavern, E., Lamb, R. A., Degrado, W. F., & Pinto, L. H. (2009). Design and pharmacological characterization of inhibitors of amantadine-resistant mutants of the M2 ion channel of influenza A virus. Biochemistry, 48(50), 11872–11882.

Baldo V., Bertoncello C., Cocchio S., Fonzo M., Pillon P., Buja A., Baldovin T. The new pandemic influenza A/(H1N1) pdm09 virus: Is it really “new”? J. Prev. Med. Hyg. 2016;57: E19–E22.

Barroso L., Treanor J., Gubareva L., Hayden F.G. Efficacy and tolerability of the oral neuraminidase inhibitor peramivir in experimental human influenza: Randomized, controlled trials for prophylaxis and treatment. Antivir. Ther. 2005; 10:901–910.

Berg, P., & Mertz, J. E. (2010). Personal reflections on the origins and emergence of recombinant DNA technology. Genetics, 184(1), 9–17.

Blanco-Lobo, P., Nogales, A., Rodríguez, L., & Martínez-Sobrido, L. (2019). Novel Approaches for The Development of Live Attenuated Influenza Vaccines. Viruses, 11(2), 190.

Bouvier, N. M., & Palese, P. (2008). The biology of influenza viruses. Vaccine, 26 Suppl 4(Suppl 4), D49–D53.

Cann, AJ, Principles of Molecular Virology, 4th Edition, Elsevier Academic Press, San Diego, 2005p.120.

Carrasco-Hernandez R, Jácome R, López Vidal Y, Ponce de León S ILAR J. Are RNA Viruses Candidate Agents for the Next Global Pandemic? A Review. 2017 Dec 15; 58(3):343-358.

Cass L.M., Efthymiopoulos C., Bye A. Pharmacokinetics of zanamivir after intravenous, oral, inhaled or intranasal administration to healthy volunteers. Clin. Pharm. 1999; 36:1–11.

Carattoli A. Plasmids and the spread of resistance. Int J Med Microbiol. 2013 Aug;303(6-7):298-304.

Celik E, Calık P. Production of recombinant proteins by yeast cells. Biotechnol Adv. 2012 Sep-Oct;30(5):1108-18.

Chen, B. J., Leser, G. P., Jackson, D., & Lamb, R. A. (2008). The influenza virus M2 protein cytoplasmic tail interacts with the M1 protein and influences virus assembly at the site of virus budding. Journal of virology, 82(20), 10059–10070.

Chen, Y., Graf, L., Chen, T., Liao, Q., Bai, T., Petric, P. P., Zhu, W., Yang, L., Dong, J., Lu, J., Chen, Y., Shen, J., Haller, O., Staeheli, P., Kochs, G., Wang, D., Schwemmle, M., & Shu, Y. (2021). Rare variant MX1 alleles increase human susceptibility to zoonotic H7N9 influenza virus. Science (New York, N.Y.), 373(6557), 918–922.

Choi BK, Bobrowicz P, Davidson RC, Hamilton SR, Kung DH, Li H, Miele RG, Nett JH, Wildt S, Gerngross TU. Use of combinatorial genetic libraries to humanize N-linked glycosylation in the yeast Pichia pastoris. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2003; 100: 5022-5027.

Chou CP. Engineering cell physiology to enhance recombinant protein production in Escherichia coli. Appl Microbiol Biotechnol. 2007 Sep;76(3):521-32.

Christman M.C., Kedwaii A., Xu J., Donis R.O., Lu G. Pandemic (H1N1) 2009 virus revisited: An evolutionary retrospective. Infect. Genet. Evol. 2011; 11:803–811.

Cohen, M.; Zhang, X.Q.; Senaati, H.P.; Chen, H.W.; Varki, N.M.; Schooley, R.T.; Gagneux, P. Influenza A penetrates host mucus by cleaving sialic acids with neuraminidase. Virol. J. 2013, 10, 321.

Cox M.M.J., Izikson R., Post P., Dunkle L. Safety, efficacy, and immunogenicity of Flublok in the prevention of seasonal influenza in adults. Ther. Adv. Vacc. 2015; 3:97–108.

Del Rosario, J., da Costa, K., Asbach, B., Ferrara, F., Ferrari, M., Wells, D. A., Mann, G. S., Ameh, V. O., Sabeta, C. T., Banyard, A. C., Kinsley, R., Scott, S. D., Wagner, R., Heeney, J. L., Carnell, G. W., & Temperton, N. J. (2021). Exploiting Pan Influenza A and Pan Influenza B Pseudotype Libraries for Efficient Vaccine Antigen Selection. Vaccines, 9(7), 741.

Dharmapalan, D. Grip. Hint J Pediatr 87, 828-832 (2020).

Dong G., Peng C., Luo J., Wang C., Han L., Wu B., Ji G., He H. Adamantane-resistant influenza a viruses in the world (1902–2013): Frequency and distribution of m2 gene mutations. PLoS ONE. 2015;10: e0119115.

Dou D, Revol R, Östbye H, Wang H, Daniels R. Influenza a Virus Cell Entry, Replication, Virion Assembly and Movement. Front Immunol (2018) 9:1581. 10.3389/fimmu.2018.01581

Du, R., Cui, Q., & Rong, L. (2019). Competitive Cooperation of Hemagglutinin and Neuraminidase during Influenza A Virus Entry. Viruses, 11(5), 458.

Dubendorff JW, Studier FW. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. J Mol Biol. 1991 May 5;219(1):45-59.

Duncan, M. C., Onguéné, P. A., Kihara, I., Nebangwa, D. N., Naidu, M. E., Williams, D. E., Balgi, A. D., Andrae-Marobela, K., Roberge, M., Andersen, R. J., Niikura, M., Ntie-Kang, F., & Tietjen, I. (2020). Virtual Screening Identifies Chebulagic Acid as an Inhibitor of the M2(S31N) Viral Ion Channel and Influenza A Virus. Molecules (Basel, Switzerland), 25(12), 2903.

Ebrahimi, S. M., & Tebianian, M. (2011). Influenza A viruses: why focusing on M2e-based universal vaccines. Virus genes, 42(1), 1–8.

Edinger, T. O., Pohl, M. O., & Stertz, S. (2014). Entry of influenza A virus: host factors and antiviral targets. The Journal of general virology, 95(Pt 2), 263–277.

Ellebedy, AH ve Webby, RJ (2009). Grip aşıları. Aşı, 27 Ek 4 (Ek 4), D65–D68.

Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M. Fields Virology. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; Philadelphia, PA, USA: 2013.

Fouchier, R. A., Munster, V., Wallensten, A., Bestebroer, T. M., Herfst, S., Smith, D., Rimmelzwaan, G. F., Olsen, B., & Osterhaus, A. D. (2005). Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. Journal of virology, 79(5), 2814–2822.

Fukuyama S., Kawaoka Y. The Pathogenesis of Influenza Virus Infections: The Contributions of Virus and Host Factors. Curr. Opin. Immunol. 2011; 23:48–486.

Gamblin, S. J., & Skehel, J. J. (2010). Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. The Journal of biological chemistry, 285(37), 28403–28409.

Gatherer D. The 2009 H1N1 influenza outbreak in its historical context. J. Clin. Virol. 2009; 45:174–178.

Gerdil C. The annual production cycle for influenza vaccine. Vaccine. 2003; 21:1776–1779.

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

Graaf M, Fouchier RAM. Role of receptor binding specificity in influenza A virus transmission and pathogenesis. Embo J. 2014; 33:823–841.

Griffith F. (1928). The Significance of Pneumococcal Types. The Journal of hygiene, 27(2), 113–159.

Grobler J.A., Anderson A.S., Fernandes P., Diamond M.S., Colvis C.M., Menetski J.P., Alvarez R.M., Young J.A.T., Carter K.L. Accelerated Preclinical Paths to Support Rapid Development of COVID-19 Therapeutics. Cell Host Microbe. 2020; 28:638–645.

Grohskopf LA, Olsen SJ, Sokolow LZ, Bresee JS, Cox NJ, Broder KR, Karron RA, Walter EB Centers for Disease C and Prevention. Prevention and control of seasonal influenza with vaccines: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) -- United States, 2014–15 influenza season. MMWR Morbidity and mortality weekly report. 2014; 63:691–697.

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. Biotechn bioengineering 2001; 74: 492-497.

Guan Y., Vijaykrishna D., Bahl J., Zhu H., Wang J., Smith G.J. The emergence of pandemic influenza viruses. Prot. Cell. 2010; 1:9–13.

Güneş A. 2019 *Haloarcula hispanica*'ya ait proteaz enzimlerinin *Escherichia coli*'de rekombinant olarak üretilmesi ve analizi: Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Y.Lisans Tezi.

Harris, A.; Cardone, G.; Winkler, D.C.; Heymann, J.B.; Brecher, M.; White, J.M.; Steven, A.C. Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2006, 103, 19123–19127.

Hause, B. M., Ducatez, M., Collin, E. A., Ran, Z., Liu, R., Sheng, Z., Armien, A., Kaplan, B., Chakravarty, S., Hoppe, A. D., Webby, R. J., Simonson, R. R., & Li, F. (2013). Isolation of a novel swine influenza virus from Oklahoma in 2011 which is distantly related to human influenza C viruses. PLoS pathogens, 9(2), e1003176.

Hause BM, Collin EA, Liu R, Huang B, Sheng Z, et al. Characterization of a novel influenza virus in cattle and swine: proposal for a new genus in the Orthomyxoviridae family. mBio. 2014;5: e00031–00014.

Hutchinson, E. C., & Fodor, E. (2013). Transport of the influenza virus genome from nucleus to nucleus. Viruses, 5(10), 2424–2446.

Hutchinson EC. Influenza virus. Trends Microbiol. 2018; 26:809–810.

Igarashi, M., Ito, K., Yoshida, R., Tomabechi, D., Kida, H., & Takada, A. (2010). Predicting the antigenic structure of the pandemic (H1N1) 2009 influenza virus hemagglutinin. PloS one, 5(1), e8553.

Jalily, P.H.; Duncan, M.C.; Fedida, D.; Wang, J.; Tietjen, I. Put a cork in it: Plugging the M2 viral ion channel to sink influenza. Antivir. Res. 2020, 178, 104780.

Jiang, D.; Wang, Q.; Bai, Z.; Qi, H.; Ma, J.; Liu, W.; Ding, F.; Li, J. Could Environment Affect the Mutation of H1N1 Influenza Virus? Int. J. Environ. Res. Public Health 2020, 17, 3092. f])

Khan, S., Ullah, M. W., Siddique, R., Nabi, G., Manan, S., Yousaf, M., & Hou, H. (2016). Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life. International journal of genomics, 2016, 2405954.

King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ, editörler. Virüs Taksonomisi. Elsevier; San Diego, CA, ABD: 2012. Aile—Orthomyxoviridae; s. 749-761

Kim CU, Lew W, Williams MA, Liu H, Zhang L, Swaminathan S, Bischofberger N, Chen MS, Mendel DB, Tai CY, Laver WG, Stevens RC. Influenza neuraminidase inhibitors possessing a novel hydrophobic interaction in the enzyme active site: design, synthesis, and structural analysis of carbocyclic sialic acid analogues with potent anti-influenza activity. J Am Chem Soc. 1997 Jan 29;119(4):681-90.

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.)

Kosik I, Yewdell JW. Influenza Hemagglutinin and Neuraminidase: Yin–Yang Proteins Coevolving to Thwart Immunity. Viruses (2019) 11(4):346. 10.3390/v11040346

Koutsakos M, Nguyen THO, Barclay WS, Kedzierska K. Knowns and unknowns of influenza B viruses. Future Microbiol. 2016; 11:119–135.

Krammer, F., Smith, G., Fouchier, R., Peiris, M., Kedzierska, K., Doherty, P. C., Palese, P., Shaw, M. L., Treanor, J., Webster, R. G., & García-Sastre, A. (2018). Influenza. Nature reviews. Disease primers, 4(1), 3.

Kwong JC, et al. Acute myocardial infarction after laboratory-confirmed influenza infection. N. Engl. J. Med. 2018; 378:345–353.

Lackenby A., Besselaar T.G., Daniels R.S., Fry A., Gregory V., Gubareva L.V., Huang W., Hurt A.C., Leang S.K., Lee R.T.C., et al. Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors and status of novel antivirals, 2016–2017. Antiviral Res. 2018; 157:38–46.

Lamb R.A. The structure, function, and pathobiology of the influenza a and b virus ion channels. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2020;10: a038505.

Lee, V.J.; Chen, M.I.; Chan, S.P.; Wong, C.S.; Cutter, J.; Goh, K.T.; Tambyah, P.A. Influenza pandemics in Singapore, a tropical, globally connected city. Emerg. Infect. Dis. 2007, 13, 1052–1057.

Lindstrom S.E., Cox N.J., Klimov A. Genetic Analysis of Human H2n2 and Early H3n2 Influenza Viruses, 1957–1972: Evidence for Genetic Divergence and Multiple Reassortment Events. Virology. 2004; 328:101–119.

Loregian A, Mercorelli B, Nannetti G, Compagnin C, Palù G. Antiviral strategies against influenza virus: towards new therapeutic approaches. Cell Mol Life Sci. 2014 Oct;71(19):3659-83.

Lowen, A. C., Mubareka, S., Tumpey, T. M., García-Sastre, A., & Palese, P. (2006). The guinea pig as a transmission model for human influenza viruses. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103(26), 9988–9992.

Luo M. (2012). Influenza virus entry. Advances in experimental medicine and biology, 726, 201–221.

Lyons, D.M.; Lauring, A.S. Mutation and Epistasis in Influenza Virus Evolution. Viruses 2018, 10, 407.

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

MacKellar L. Pandemic influenza: A review. Popul. Dev. Rev. 2007; 33:429–451.

Martini M., Gazzaniga V., Bragazzi N., Barberis I. The Spanish Influenza Pandemic: A lesson from history 100 years after 1918. J. Prev. Med. Hyg. 2019;60: E64–E67.

Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk HD. Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. J Virol. 2004; 78:12665–12667.

Matsuzaki Y, Mizuta K, Sugawara K, Tsuchiya E, Muraki Y, et al. Frequent reassortment among influenza C viruses. J Virol. 2003; 77:871–881.

McAuley, J. L., Gilbertson, B. P., Trifkovic, S., Brown, L. E., & McKimm-Breschkin, J. L. (2019). Influenza Virus Neuraminidase Structure and Functions. Frontiers in microbiology, 10, 39.

McCauley, J. W., & Mahy, B. W. (1983). Structure and function of the influenza virus genome. The Biochemical journal, 211(2), 281–294.

McKimm-Breschkin J. L. (2013). Influenza neuraminidase inhibitors: antiviral action and mechanisms of resistance. Influenza and other respiratory viruses, 7 Suppl 1(Suppl 1), 25–36.

McLean H.Q., Thompson M.G., Sundaram M.E., Kieke B.A., Gaglani M., Murthy K., Piedra P.A., Zimmerman R.K., Nowalk M.P., Raviotta J.M. Influenza vaccine effectiveness in the United States during 2012–2013: Variable protection by age and virus type. J. Infect. Dis. 2015; 211:1529–1540.

Medina RA, García-Sastre A. Influenza A viruses: new research developments. Nat Rev Microbiol. 2011; 9:590–603.

Mena I., Nelson M.I., Quezada-Monroy F., Dutta J., Cortes-Fernández R., Lara-Puente J.H., Castro-Peralta F., Cunha L.F., Trovão N.S., Lozano-Dubernard B., et al. Origins of the 2009 H1N1 influenza pandemic in swine in Mexico. eLife. 2016; 5:16777.

Mertens N., Remaut E., Fiers W. (1995) Tight transcriptional control mechanism ensures stable high-level expression from T7 promoter-based expression plasmids. Biotechnology (N Y) 13:175-9

Mohn K.G.-I., Smith I., Sjursen H., Cox R.J. Immune responses after live attenuated influenza vaccination. Hum. Vacc. Immunother. 2018; 14:571–578.

Moreira, E. A., Yamauchi, Y., & Matthias, P. (2021). How Influenza Virus Uses Host Cell Pathways during Uncoating. Cells, 10(7), 1722.

Mtambo, S. E., Amoako, D. G., Somboro, A. M., Agoni, C., Lawal, M. M., Gumede, N. S., Khan, R. B., & Kumalo, H. M. (2021). Influenza Viruses: Harnessing the Crucial Role of the M2 Ion-Channel and Neuraminidase toward Inhibitor Design. Molecules (Basel, Switzerland), 26(4), 880.

Murakami S, Sato R, Ishida H, Katayama M, Takenaka-Uema A, et al. Influenza D virus of new phylogenetic lineage, Japan. Emerg Infect Dis. 2020; 26:168–171.

Muraki Y, Hongo S. The molecular virology and reverse genetics of influenza C virus. Jpn J Infect Dis. 2010 May;63(3):157-65. PMID: 20495266.

Müller, K.H.; Kakkola, L.; Nagaraj, A.S.; Cheltsov, A.V.; Anastasina, M.; Kainov, D.E. Emerging cellular targets for influenza antiviral agents. Trends Pharmacol. Sci. 2012, 33, 89–99.].

Namdev, P., Dar, H. Y., Srivastava, R. K., Mondal, R., & Anupam, R. (2019). Induction of T7 Promoter at Higher Temperatures May Be Counterproductive. Indian journal of clinical biochemistry: IJCB, 34(3), 357–360.

Narkhede, Y. B., Gonzalez, K. J., & Strauch, E. M. (2021). Targeting Viral Surface Proteins through Structure-Based Design. Viruses, 13(7), 1320.

Nayak DP, Balogun RA, Yamada H, Zhou ZH, Barman S. Influenza virus morphogenesis and budding. Virus Res. 2009 Aug;143(2):147-61.

Neda Mousavi, N., Memarnejadian, A., Hadjati, J. & Aghasadeghi, M. R. Construction and Production of Foxp3- Fc (IgG) DNA Vaccine / Fusion Protein. Med. Biotechnol. 8, 57–64 (2016).

Nedland H, Wollman J, Sreenivasan C, Quast M, Singrey A, et al. Serological evidence for the co-circulation of two lineages of influenza D viruses in equine populations of the Midwest United States. Zoonoses Public Health. 2018;65: e148–e154. doi: 10.1111/zph.12423.

Nelson MI, Holmes EC. The evolution of epidemic influenza. Nat Rev Genet. 2007 Mar;8(3):196-205.

Noda T. (2012). Native morphology of influenza virions. Frontiers in microbiology, 2, 269.

Nuwarda, R. F., Alharbi, A. A., & Kayser, V. (2021). An Overview of Influenza Viruses and Vaccines. Vaccines, 9(9), 1032.

Odagiri T, Ishida H, Li J-Y, Endo M, Kobayashi T, et al. Antigenic heterogeneity among phylogenetic clusters of influenza D viruses. J Vet Med Sci. 2018; 80:1241–1244.

Özaydın Ş. 2018. İnfluenza virüsü yüzey antijen proteinlerinin mikroorganizmalarda rekombinant olarak üretilmesi ve analizi: Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Y.Lisans Tezi.

Pagadala, N.S. AZT acts as an anti-influenza nucleotide triphosphate targeting the catalytic site of A/PR/8/34/H1N1 RNA dependent RNA polymerase. J. Comput. Aided Mol. Des. 2019, 33, 387–404

Palese P., Shaw M.L. Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. Fields Virol. 2007:1647–1689.

Paules C.I., Sullivan S.G., Subbarao K., Fauci A.S. Chasing seasonal influenza—the need for a universal influenza vaccine. N. Engl. J. Med. 2018; 378:7–9.

Peacock, T., James, J., Sealy, J. E., & Iqbal, M. (2019). A Global Perspective on H9N2 Avian Influenza Virus. Viruses, 11(7), 620.

Poon, L. L., Pritlove, D. C., Fodor, E., & Brownlee, G. G. (1999). Direct evidence that the poly(A) tail of influenza A virus mRNA is synthesized by reiterative copying of a U track in the virion RNA template. Journal of virology, 73(4), 3473–3476.

Quast M, Sreenivasan C, Sexton G, Nedland H, Singrey A, et al. Serological evidence for the presence of influenza D virus in small ruminants. Vet Microbiol. 2015; 180:281–285.

Rewar, S., Mirdha, D., & Rewar, P. (2015). Treatment and Prevention of Pandemic H1N1 Influenza. *Annals of global health*, *81*(5), 645–653.

RKI-Ratgeber, R. K. I. (2021). Influenza (Teil 1): Erkrankungen durch saisonale Influenzaviren.

Romeli S., Hassan S.S., Yap W.B. Multi-Epitope Peptide-Based and Vaccinia-Based Universal Influenza Vaccine Candidates Subjected to Clinical Trials. Malays. J. Med.L Sci. Mjms. 2020; 27:10.

Rong, M., He, B., McAllister, W. T., & Durbin, R. K. (1998). Promoter specificity determinants of T7 RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95*(2), 515–519. https://doi.org/10.1073/pnas.95.2.515

Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Chang AE, Avis FP, Leitman S, Linehan WM, Robertson CN, Lee RE, Rubin JT, et al. A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. N Engl J Med. 1987 Apr 9;316(15):889-97.

Roubidoux, EK ve Schultz-Cherry, S. (2021). Grip Virüsü Aşılarının Geliştirilmesinde Kullanılan Hayvan Modelleri. Aşılar, 9 (7), 787.

Saelens X. The Role of Matrix Protein 2 Ectodomain in the Development of Universal Influenza Vaccines. J. Infect. Dis. 2019;219: S68–S74.

Salem E, Cook EAJ, Lbacha HA, Oliva J, Awoume F, et al. Serologic evidence for influenza C and D virus among ruminants and Camelids, Africa, 1991-2015. Emerg Infect Dis. 2017; 23:1556–1559.

Sellers SA, Hagan RS, Hayden FG, Fischer WA., 2nd The hidden burden of influenza: A review of the extra-pulmonary complications of influenza infection. Influenza Other Respir. Viruses. 2017; 11:372–393.

Shen, Z.; Lou, K.; Wang, W. New small-molecule drug design strategies for fighting resistant influenza A. Acta Pharm. Sin. B 2015, 5, 419–430.

Shintani, M., Sanchez, Z. K., & Kimbara, K. (2015). Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. Frontiers in microbiology, 6, 242.

Shiraki, K.; Daikoku, T. Favipiravir, an anti-influenza drug against life-threatening RNA virus infections. Pharmacol. Ther. 2020, 209, 107512.

Smith G.J., Vijaykrishna D., Bahl J., Lycett S.J., Worobey M., Pybus O.G., Ma S.K., Cheung C.L., Raghwani J., Bhatt S. Origins, and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. Nature. 2009;459:1122–1125.

Simmonds, P. ve Aiewsakun, P. (2018). Virüs sınıflandırması - çizgiyi nerede çiziyorsunuz?. Viroloji Arşivleri , 163 (8), 2037–2046.

Simonsen L., Spreeuwenberg P., Lustig R., Taylor R.J., Fleming D.M., Kroneman M., Van Kerkhove M.D., Mounts A.W., Paget W.J. Global mortality estimates for the 2009 Influenza Pandemic from the GLaMOR project: A modeling study. PLoS Med. 2013;10:e1001558.

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. Biotechn Progress 2003; 19: 794-802.)

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

Smetana J., Chlibek R., Shaw J., Splino M., Prymula R. Influenza vaccination in the elderly. Hum. Vacc. Immunother. 2018; 14:540–549.

Song, X., Xiao, J., Deng, J., Kang, Q., Zhang, Y., & Xu, J. (2016). Time series analysis of influenza incidence in Chinese provinces from 2004 to 2011. Medicine, 95(26), e3929.

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.

Sridhar S., Brokstad K.A., Cox R.J. Influenza vaccination strategies: Comparing inactivated and live attenuated influenza vaccines. Vaccines. 2015; 3:373–389.

Studier FW, Moffatt BA. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J Mol Biol. 1986 May 5;189(1):113-30.

Studier F.W. (1991) Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. J Mol Biol 219:37-44.)

Su S, Fu X, Li G, Kerlin F, Veit M. Novel influenza D virus: epidemiology, pathology, evolution and biological characteristics. Virulence. 2017; 8:1580–1591.

Tan, M. P., Tan, W. S., Mohamed Alitheen, N. B., & Yap, W. B. (2021). M2e-Based Influenza Vaccines with Nucleoprotein: A Review. Vaccines, 9(7), 739.

Taubenberger, J. K., & Kash, J. C. (2010). Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation. Cell host & microbe, 7(6), 440–451.

Taubenberger J.K., Morens D.M. 1918 Influenza: The mother of all pandemics. Rev. Biomed. 2006; 17:69–79.

Taubenberger J.K., Reid A.H., Krafft A.E., Bijwaard K.E., Fanning T.G. Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus. Science. 1997; 275:1793–1796. doi: 10.1126/science.275.5307.1793.

Taubenberger J.K., Reid A.H., Lourens R.M., Wang R., Jin G., Fanning T.G. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. Nature. 2005; 437:889–893.

Te Velthuis, A. J., & Fodor, E. (2016). Influenza virus RNA polymerase: insights into the mechanisms of viral RNA synthesis. Nature reviews. Microbiology, 14(8), 479–493.

Tscherne, D. M., & García-Sastre, A. (2011). Virulence determinants of pandemic influenza viruses. The Journal of clinical investigation, 121(1), 6–13.

Tisoncik, J. R., Guo, Y., Cordero, K. S., Yu, J., Wang, J., Cao, Y., & Rong, L. (2011). Identification of critical residues of influenza neuraminidase in viral particle release. Virology journal, 8, 14.

Tricco A.C., Chit A., Soobiah C., Hallett D., Meier G., Chen M.H., Tashkandi M., Bauch C.T., Loeb M. Comparing influenza vaccine efficacy against mismatched and matched strains: A systematic review and meta-analysis. BMC Med. 2013

To, J., & Torres, J. (2019). Viroporins in the Influenza Virus. Cells, 8(7), 654.

Tong S, Li Y, Rivailler P, Conrardy C, Castillo DA, Chen LM, Recuenco S, Ellison JA, Davis CT, York IA, et al. A distinct lineage of influenza A virus from bats. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012; 109:4269–4274.

Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, Yang H, Chen X, Recuenco S, Gomez J, et al. new world bats harbor diverse influenza A viruses. PLoS pathogens. 2013;9: e1003657.

Varghese JN, Laver WG, Colman PM. Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 A resolution. Nature. 1983; 303:35–40.

Vaccines against influenza WHO position paper – November 2012. Wkly Epidemiol Rec. 2012 Nov 23;87(47):461-76. English, French. PMID: 23210147.

Viboud, C.; Simonsen, L.; Fuentes, R.; Flores, J.; Miller, M.A.; Chowell, G. Global mortality impact of the 1957–1959 influenza pandemic. J. Infect. Dis. 2016, 213, 738–745.

Villa E., Balaeff A., Schulten K. (2005) Structural dynamics of the lac repressor-DNA 74 complex revealed by a multiscale simulation. Proc Natl Acad Sci U S A 102:6783-8.

von Itzstein M., Wu W.Y., Kok G.B., Pegg M.S., Dyason J.C., Jin B., Van Phan T., Smythe M.L., White H.F., Oliver S.W., et al. Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. Nature. 1993; 363:418–423.

von Schaewen, A., Jeong, I. S., Rips, S., Fukudome, A., Tolley, J., Nagashima, Y., Fischer, K., Kaulfuerst-Soboll, H., & Koiwa, H. (2018). Improved recombinant protein production in Arabidopsis thaliana. Plant signaling & behavior, 13(6), e1486149.

Vreede, F. T., Jung, T. E., & Brownlee, G. G. (2004). Model suggesting that replication of influenza virus is regulated by stabilization of replicative intermediates. Journal of virology, 78(17), 9568–9572.

Wan, X. F., Ferguson, L., Oliva, J., Rubrum, A., Eckard, L., Zhang, X., Woolums, A. R., Lion, A., Meyer, G., Murakami, S., Ma, W., Horimoto, T., Webby, R., Ducatez, M. F., & Epperson, W. (2020). Limited Cross-Protection Provided by Prior Infection Contributes to High Prevalence of Influenza D Viruses in Cattle. Journal of virology, 94(18), e00240-20.

Wandzik JM, Kouba T, Karuppasamy M, Pflug A, Drncova P, Provaznik J, Azevedo N, Cusack S. A Structure-Based Model for the Complete Transcription Cycle of Influenza Polymerase. Cell. 2020 May 14;181(4):877-893.e21.

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

Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. Microbiol Rev. 1992; 56:152–179.

Weis, S., & Te Velthuis, A. (2021). Influenza Virus RNA Synthesis and the Innate Immune Response. Viruses, 13(5), 780.

Wen, F., & Wan, X. F. (2019). Influenza Neuraminidase: Underrated Role in Receptor Binding. Trends in microbiology, 27(6), 477–479.

Werten MW, van den Bosch TJ, Wind RD, Mooibroek H, de Wolf FA. Pichia pastoris tarafından rekombinant jelatinlerin yüksek verimli salgılanması. Maya. 1999 Ağustos;15(11):1087-96.

White SK, Ma W, McDaniel CJ, Gray GC, Lednicky JA. Serologic evidence of exposure to influenza D virus among persons with occupational contact with cattle. J Clin Virol. 2016; 81:31–33.

Wille, M.; Holmes, E.C. The Ecology and Evolution of Influenza Viruses. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2020, 10, a038489.)

Wohlbold TJ, Krammer F. In the Shadow of Hemagglutinin: A Growing Interest in Influenza Viral Neuraminidase and its Role as a Vaccine Antigen. Viruses (2014) 6:2465. 10.3390/v6062465

Wong T., Ross T.M. Steps Forwards in Diagnosing and Controlling Influenza. InTech; London, UK: 2016. Steps toward a Universal Influenza Vaccine: Research Models and Comparison of Current Approaches; pp. 87–118.

Wu, Y., Gao, F., Qi, J., Bi, Y., Fu, L., Mohan, S., Chen, Y., Li, X., Pinto, B. M., Vavricka, C. J., Tien, P., & Gao, G. F. (2016). Resistance to Mutant Group 2 Influenza Virus Neuraminidases of an Oseltamivir-Zanamivir Hybrid Inhibitor. Journal of virology, 90(23), 10693–10700.

Yang, J., Li, M., Shen, X., & Liu, S. (2013). Hemagglutinin'i hedef alan influenza A virüs giriş inhibitörleri. Virüsler , 5 (1), 352-373.

Yap W.B., Toong S.T., Hassan S.S., Lafi A.S.A., Santhanam J., Khaithir T.M.N., Musa N.F., Huyop F. Universal Oral Vaccine for Influenza Infections. J. Sains Kesihat. Malays. 2018; 16:51–64.

Ye, M.; Liao, Y.; Wu, L.; Qi, W.; Choudhry, N.; Liu, Y.; Chen, W.; Song, G.; Chen, J. An Oleanolic Acid Derivative Inhibits Hemagglutinin-Mediated Entry of Influenza A Virus. Viruses 2020, 12, 225.

Yin, H., Jiang, N., Shi, W., Chi, X., Liu, S., Chen, J. L., & Wang, S. (2021). Development and Effects of Influenza Antiviral Drugs. Molecules (Basel, Switzerland), 26(4), 810.

Yoon SW, Webby RJ, Webster RG. Evolution and ecology of influenza a viruses. Current topics in microbiology and immunology. 2014; 385:359–375.

York, A., Hengrung, N., Vreede, F. T., Huiskonen, J. T., & Fodor, E. (2013). Isolation and characterization of the positive-sense replicative intermediate of a

negative-strand RNA virus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 110(45), E4238–E4245.

Yu, J., Li, F., & Wang, D. (2021). The first decade of research advances in influenza D virus. The Journal of general virology, 102(1), jgv001529.

Zhang T, Lei J, Yang H, Xu K, Wang R, Zhang Z. An improved method for whole protein extraction from yeast Saccharomyces cerevisiae. Yeast 2011; 28: 795- 798.

Zhang H., Wang L., Compans R.W., Wang B.-Z. Universal Influenza Vaccines, a Dream to Be Realized Soon. Viruses. 2014; 6:1974–1991.

Zheng, W., & Tao, Y. J. (2013). Structure and assembly of the influenza A virus ribonucleoprotein complex. FEBS letters, 587(8), 1206–1214.

Zhou WB, Zhang YX. Purification and identification of recombinant hirudin and its degradation products expressed in Pichia pastoris. Pre Biochem-Biotechnology 2004; 34: 239-252.)

Zhu, W., Wang, C., & Wang, B. Z. (2017). From Variation of Influenza Viral Proteins to Vaccine Development. International journal of molecular sciences, 18(7), 1554.

9.EKLER

9.1.Ek-1. Poster Sunumu

Production of the Hemagglutinin Surface Antigenic Protein of Influenza A Virus as a Soluble Form in Microorganism

ISOPS 13th International Symposium on Pharmaceutical Medical Sciences, Ankara, 2021

Ankara/ 22-25 June 2021

ANKARA UNIVERSITY
FACULTY OF PHARMACY

ISOPS 13th International SYMPOSIUM ON PHARMACEUTICAL SCIENCES

Book of Abstracts



JUNE 22-25, 2021
ANKARA, TURKEY

PRODUCTION OF THE HEMAGGLUTININ SURFACE ANTIGENIC PROTEİN OF INFLUENZA A VIRUS AS A SOLUBLE FORM IN MICROORGANISMS

[1]Gül A. A., [2]Turan K.

[1]Enstitute of Health Sciences, Marmara University, Istanbul-Turkey, aysearzugul@gmail.com
[2]Department of Basic Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Marmara University, Istanbul-Turkey, kadirturan@marmara.edu.tr

Introduction: Influenza A viruses, which cause frequent recurring flu outbreaks in humans, are enveloped viruses and carry an eight-part single-stranded RNA genome (Husain, 2014). Influenza viral hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) proteins are important for the recognition of the virus by the immune system because they are located on the viral membrane. For this reason, inactivated viruses or purified HA and NA surface antigenic proteins are used as vaccines. Both proteins are glycosylated after being synthesized in the host cells. HA proteins have a role in the attachment of the virus to the cells (Li, H. and Cao, B. 2017). In this work it was aimed is to clone the gene encoding the influenza A virus HA protein into plasmid vectors fused with other genes and to synthesize the HA protein in soluble form in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris.*

Materials and Methods: The ful- length HA (HA0) gene or a part of the gene coding HA1 domain of Influenza A/WSN/33 (H1N1) type virus was amplified with polymerase chain reaction. These fragments were fused with the sequence encoding non-variable regions of human IgG1 antibodies in an intermediate plasmid vector. The fused genes (HA0-Fc and HA1-Fc) were cloned into the plasmid vectors expressing in *E. coli* and *P. pastoris.* The resultant recombinant plasmids were transformed into *E. coli* and *P. pastoris*. The growth curves of transformants were evaluated and the recombinant proteins synthesized in the cells were analyzed with SDS-PAGE/Silver Staining.

Results: For the production of recombinant protein in *E. coli* cells, four different vectors, carrying the T7 promoter (pET-14b-HA0-Fc and pET-14b-HA1-Fc) or the Lac promoter (pLacI-HA1-Fc and pLacI-HA0-Fc), were obtained. It was observed that the growth rate of *E. coli* BL21(DE3) and *E. coli/*Mach1 was significantly decreased after transforming with the plasmids coding HA0-Fc under the control of T7 promoter or Lac promoter. In contrast, the cells transformed with plasmids coding HA1-Fc fusion protein were grown at close rate to the control cells. SDS-PAGE/Silver staining assays showed that HA1-Fc fusion proteins were synthesized at a higher level in bacteria than that of HA0-Fc proteins. In *P. pastris* transformed with pPinkα-HA0.Fc and pPinkα-HA1.Fc plasmids, it was shown that the HA0.Fc and HA1.Fc fusion genes were integrated in the yeast genome by using PCR. However, the expression of the recombinant proteins was not detected with SDS-PAGE analysis.

Conclusions: The result showed that the full-length viral HA proteins synthesized in cells are highly toxic to host bacteria, even when synthesized as fusion with another protein. In contrast, the HA1 domain of the HA protein can be efficiently produced in *E. coli* cells as fusion with human IgG1 Fc. However, it was observed that the expression system used in the study was not suitable for the recombinant production of viral HA proteins in *P. pastoris* cells.

Acknowledgements

This work was partially supported by a grant from The Scientific and Technological Research Council of Turkey (grant number: 112S518).and a grant from the scientific research foundation of Marmara University (grant number:SAG-C-YLP-080715-0324)