

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞ VİRÜSÜ KELKİT SUŞU  
PROTEİNLERİNİN ÖKARYOTİK HÜCRELERDE STABİL İFADESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Özlem BAKANGİL**

**Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

**Biyoteknoloji Tezli Yüksek Lisans Programı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet Ziya DOYMAZ**

**OCAK 2024**

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞ VİRÜSÜ KELKİT SUŞU  
PROTEİNLERİNİN ÖKARYOTİK HÜCRELERDE STABİL İFADESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Özlem BAKANGİL  
(215309005)**

**Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

**Biyoteknoloji Tezli Yüksek Lisans Programı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet Ziya DOYMAZ**

**OCAK 2024**

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 215309005 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Özlem BAKANGİL, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞ VİRÜSÜ KELKİT SUŞU PROTEİNLERİNİN ÖKARYOTİK HÜCRELERDE STABİL İFADESİ” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

---

**Tez Danışmanı :**      **Prof. Dr. Mehmet Ziya DOYMAZ**      .....

Bezmialem Vakıf Üniversitesi

**Jüri Üyeleri :**      **Prof. Dr. Arif Kaygusuz**      .....

İstanbul Üniversitesi

**Doç. Dr. Şeref Gül**      .....

Bezmialem Vakıf Üniversitesi

**Teslim Tarihi**      :      **07.02.2024**

**Savunma Tarihi**    :      **17.01.2024**

*Aileme,*



## ÖNSÖZ

Yüksek lisans çalışmam boyunca her türlü desteği ile bana yol gösteren, her sorumu büyük bir sabır ve anlayışı ile yanıtlayan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet Ziya DOYMAZ'a şükran ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Nesibe Selma ÇETİN, Merve YAZICI, Ayşegül PİRİNÇAL, Burcu Nur AYDIN, Filiz KAPTAN, Esmahan ALACAN ve Sercan KESKİN'e teşekkür ederim.

Hayatımın her alanında hep desteklerini hissettiğim değerli arkadaşlarım İpek UZUN, Şule İNAN KENAR, Sümeyye ONAT, Büşra AYAZ ve Seda ÜSTÜN GÜNEY'e teşekkürlerimi sunarım.

Beni her koşulda destekleyen, her zaman yanımda olan canım annem, canım babam ve biricik ablama sonsuz teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

Aralık 2023

Özlem Bakangil  
(Moleküler Biyolog)

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

Özlem Bakangil

İmza

<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>İV</b>
<b>BEYAN</b> .....	<b>V</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>VI</b>
<b>KISALTMALAR</b> .....	<b>İX</b>
<b>SEMBOLLER</b> .....	<b>X</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b> .....	<b>XI</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	<b>xii</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>xiii</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>xiv</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>4</b>
2.1 Kırım Kongo Kanamalı Ateşi .....	4
2.1.1 Tarihçe.....	4
2.1.2 Epidemiyoloji .....	5
2.1.3 Etken.....	6
2.1.4 Bulaş .....	7
2.1.5 Patogenez .....	8
2.1.6 Tanı.....	9
2.1.5 Tedavi.....	11
2.2 Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü.....	12
2.2.1 Virüsün Yapısı ve Genomu .....	12
2.2.2 Viral Genomdan Kodlanan Proteinler.....	13
2.3 Protein Ekspresyon Sistemleri .....	16
2.3.1 Bakteriyel Ekspresyon Sistemleri .....	17
2.3.2 Memeli Hücre Ekspresyon Sistemleri.....	17
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	<b>21</b>
3.1 Çözeltiler ve Tamponlar .....	21
3.1.1 1 M pH:8 Tris-HCl çözeltisi.....	21
3.1.2 Luria-Bertani (LB) sıvı besiyeri .....	21
3.1.3 Ampisilin içeren LB sıvı besiyeri.....	21

3.1.4 %30 gliserollü LB sıvı besiyeri .....	21
3.1.5 LB Broth agar .....	21
3.1.6 Ampisilinli LB agar .....	22
3.1.7 SOC sıvı besiyeri .....	22
3.1.8 0.5 M kalsiyum klorid çözeltisi .....	22
3.1.9 PBS çözeltisi .....	22
3.1.10 Akrilamid/BİS solüsyonu .....	22
3.1.11 %20 SDS çözeltisi .....	22
3.1.12 %10 APS .....	23
3.1.13 SDS örnek hazırlama tamponu .....	23
3.1.14 10X SDS yürütme tamponu .....	23
3.1.15 1X TBS .....	23
3.1.16 TBST .....	23
3.1.17 Western Blot transfer çözeltisi .....	23
3.1.18 Western Blot bloklama solüsyonu .....	23
3.1.19 PBST .....	23
3.1.20 EIA kaplama tamponu .....	24
3.1.21 %37 Formaldehit .....	24
3.1.22 %4 Formaldehit .....	24
3.1.23 5X TBE tamponu .....	24
3.1.24 %1 Agaroz jel hazırlanışı .....	24
3.1.25 Poliakrilamid jel hazırlanışı .....	24
3.2 Malzemeler .....	25
3.3 Cihazlar .....	26
3.4 Yöntemler .....	27
3.4.1 Ekspresyon plazmitlerinin tasarlanması .....	27
3.4.2 Kompetan hücrelerin hazırlanması .....	32
3.4.3 Transformasyon .....	33
3.4.4 Agaroz jel elektroforezi .....	34
3.4.5 Bakteri stoklanması .....	35
3.4.6 Plazmid DNA izolasyonu .....	35
3.4.7 Restriksiyon endonükleaz kesim reaksiyonu .....	35
3.4.8 Hücre kültürü .....	36

3.4.9 Antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi.....	36
3.4.10 Transfeksiyon .....	37
3.4.11 Hücrelerin antibiyotik ile seleksiyonu.....	38
3.4.12 Stabil hücrelerin doğrulanması.....	38
3.4.13 Gen ekspresyon analizi.....	39
3.4.14 Protein izolasyonu ve analizi.....	40
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>43</b>
4.1 Plazmit Tasarımı ve Doğrulanması .....	43
4.1.1 Ekspresyon plazmitlerinin doğrulanması .....	43
4.2 Bakteriyel Transformasyon .....	44
4.2.1 Pozitif kolonilerin koloni PZR ile doğrulanması .....	44
4.3 Hücre Kültürü ve Transfeksiyon .....	44
4.3.1 Hücrelerin antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi.....	44
4.3.2 Transfeksiyon .....	46
4.4 Stabil Hücrelerin Oluşturulması ve Doğrulanması .....	48
4.4.1 Hücrelerin transfeksiyon sonrası antibiyotik seleksiyonu.....	48
4.4.2 Stabil hücrelerin genomik düzeyde PZR ile doğrulanması .....	53
4.4.3 Reverse Transkriptaz PZR (RT-PZR) ile ekspresyon analizi .....	53
4.3.3 Protein düzeyinde analiz .....	57
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>60</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>63</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>68</b>

## KISALTMALAR

<b>BGS-4</b>	: Biyogüvenlik seviyesi-4
<b>BHK</b>	: Yavru hamster böbrek hücresi
<b>CHO</b>	: Çin hamsteri yumurtalık hücresi
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>DSÖ</b>	: Dünya Sağlık Örgütü
<b>FDA</b>	: ABD Gıda ve İlaç İdaresi
<b>HEK 293</b>	: İnsan embriyonik böbrek hücresi
<b>Huh-7</b>	: İnsan hepatoselüler hücre hatları
<b>IFN</b>	: İnterferon
<b>IL</b>	: İnterlökin
<b>ISG</b>	: İnterferonla uyarılan gen
<b>kb</b>	: Kilobaz çifti
<b>kDa</b>	: Kilodalton
<b>KKKA</b>	: Kırım Kongo Kanamalı Ateşi
<b>KKKAV</b>	: Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>NP</b>	: Nükleoprotein
<b>NSs</b>	: Yapısal olmayan protein
<b>OTU</b>	: Over tümörü benzeri proteaz
<b>PEI</b>	: Polietilenimine
<b>RdRp</b>	: RNA bağımlı RNA polimeraz
<b>RNA</b>	: Ribonükleik Asit
<b>RNP</b>	: Ribonükleoprotein
<b>RT-PZR</b>	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
<b>STAT-1</b>	: Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü-1
<b>VCAM</b>	: Vasküler hücre adezyon molekülü

## SEMBOLLER

°C	: Derece Santigrat
μ	: Mikro
β	: Beta
Δ	: Delta
%	: Yüzde



## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 3.1 :</b> Tez çalışması kapsamında deneylerde kullanılan malzemelerin listesi..	25
<b>Tablo 3.2 :</b> Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları .....	26
<b>Tablo 3.3 :</b> Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primer sekansları .....	34
<b>Tablo 3.4 :</b> Koloni PZR için reaksiyon koşulları.....	34
<b>Tablo 3.5 :</b> Genomik DNA'dan yapılan PZR reaksiyon koşulları .....	39
<b>Tablo 4.1 :</b> Antibiyotik öldürme eğrisi sonuçları.....	45



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 2.1 : KKKAV'nün coğrafik dağılımı .....	6
Şekil 2.2 : KKKAV'nün bulaş yollarının şematik gösterimi.....	7
Şekil 2.3 : KKKAV hastalığının tanısında kullanılan test yöntemlerinin gösterimi ...	10
Şekil 2.4 : KKKAV genomu.....	13
Şekil 2.5 : KKKAV glikoproteinlerinin işlenmesi ve oluşan ürünler.....	15
Şekil 2.6 : KKKAV L segmentin genomik organizasyonunun gösterimi.....	16
Şekil 2.7 : Hücrelerdeki geçici ve stabil gen ekspresyon sürecinin gösterimi.....	20
Şekil 3.1 : KKKAV proteinlerini eksprese eden plazmitlerinin haritası .....	27
Şekil 4.1 : Ekspresyon plazmitlerinin doğrulanması .....	43
Şekil 4.2 : Transformasyon sonrası PZR ürünlerinin analizi.....	44
Şekil 4.3 : Antibiyotik öldürme eğrisi analizinin MTT testi ile değerlendirmesi.....	46
Şekil 4.4 : Transfeksiyon etkinliğinin yeşil floresan protein ile gösterilmesi .....	47
Şekil 4.5 : pcDNA 3eGFP plazmidinin stabil hale getirilmesi.....	49
Şekil 4.6 : KKKAV NP ile transfekte stabil hücrelerin oluşumu.....	50
Şekil 4.7 : KKKAV PreGn ile transfekte stabil hücrelerin oluşumu.....	51
Şekil 4.8 : KKKAV PreGc ile transfekte stabil hücrelerin oluşumu .....	52
Şekil 4.9 : Stabil hücrelerin genomik DNA'dan PZR ile doğrulanması.....	53
Şekil 4.10 : Stabil hücrelerin mRNA düzeyindeki analizi.....	54
Şekil 4.11 : KKKAV PreGn ile transfekte hücrelerin mRNA düzeyindeki analizi....	55
Şekil 4.12: RT-PZR ile hedef genlerdeki ekspresyonların kat değişim analizi.....	56
Şekil 4.13: Stabil hücrelerden elde edilen proteinlerin Western blot ile analizi .....	57
Şekil 4.14 : Stabil hücrelerden elde edilen proteinlerin EIA ile analiz sonuçları.....	58
Şekil 4.15: Stabil hücrelerin IFA ile görüntülenmesi.....	59

## KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞ VİRÜSÜ KELKİT SUŞU PROTEİNLERİNİN ÖKARYOTİK HÜCRELERDE STABİL İFADESİ

### ÖZET

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA), insanlarda ciddi hastalığa neden olan zoonotik bir bulaşıcı hastalıktır. Bu hastalık özellikle vektör kenelerin endemik olduğu ülkelerde yüksek ölüm oranı ile karakterizedir. KKKAV'nün biyolojisi ve immunolojisine yönelik çalışmalarda viral proteinler diğer viral sistemde olduğu gibi büyük öneme sahiptir. KKKAV proteinlerinin çeşitli süreçlerdeki önemi birçok araştırmalarda ele alınmış ve bu çalışmalarda KKKAV proteinleri genellikle geçici ifade sistemleri kullanılarak üretimi sağlanmıştır. Bununla birlikte, proteinlerin stabil ifadesi tüm çalışmalar için zaman içerisinde tutarlı ve güvenilir bir model olmaktadır. Bu yüksek lisans tez çalışmasında, insan hücrelerindeki glikozilasyon süreçlerini taklit edebilen ökaryotik hücre hatları kullanarak KKKAV glikoproteinlerinin ve nükleoproteinlerinin stabil ekspresyon ile sürekli bir şekilde üretilmesini amaçlanmıştır. Bunun için insan hepatoselüler hücre hatları (Huh-7), KKKAV proteinlerinin stabil ifadesinde kullanılmıştır. Hücrelerde seleksiyon için seçici antibiyotiklere olan dirençleri, MTT analizi ile değerlendirilmiştir. KKKAV NP, PreGn ve PreGc kodlayan plazmitler Lipofectamine® 3000 ve polietilenimine (PEI) gibi transfeksiyon ajanlarının yardımıyla hücrelere aktarılmıştır. KKKAV nükleoproteinlerini ve glikoproteinlerini kararlı bir şekilde ifade eden hücreler, antibiyotiklere dirençli olan kolonilerin seleksiyonu ile üretilmiştir. Hücrelerde transfekte edilen genin stabil ekspresyon için genoma entegrasyonunun tespiti, transfekte edilen KKKAV genlerine özgü primerler tasarlanarak polimeraz zincir reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Genomik düzeydeki doğrulamaların yanı sıra hücrelerdeki hedef proteinlerin ifadesi gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu, Western blot, enzim immünoanalizleri ve immunfloresan analizleri ile de test edilmiştir. Yapılan deneyler, KKKAV proteinlerinin stabil hücrelerde başarılı bir şekilde ifade edildiğini göstermiştir. Western blot analizi, stabil hücre hatlarında üretilen proteinlerin beklenen boyutta olduğunu ve antijenitelerini doğrularken, EIA analizi bunların antijenik özellikleri tekrar test edilmiştir. Ayrıca, immunfloresan yöntemle mikroskopik görüntüleme üretilen proteinlerin hücreler içindeki lokalizasyonunu ortaya koymuştur. Özetle, bu tez çalışmasında, stabil hücrelerde KKKAV'nün nükleoprotein ve glikoproteinleri başarılı bir şekilde üretilmiştir. Bu stabil hücre hatlarının, KKKAV'nün biyolojisi, immunolojisi ve patojenezi üzerine daha detaylı araştırmalarda önemli araçlar olarak hizmet etmesi beklenmektedir; çünkü bu virüs, araştırılması gereken öncelikli patojenlerden biri olarak kabul edilmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** KKKAV, Glikoprotein, Nükleoprotein, Stabil ifade.

## **STABLE EXPRESSION OF CRIMEAN CONGO HEMORRAGIC FEVER VIRUS KELKIT STRAIN PROTEINS IN EUKARYOTIC CELLS**

### **SUMMARY**

Crimean-Congo Hemorrhagic Fever (CCHF) is a zoonotic infectious disease that causes severe illness in humans. This disease is particularly characterized by a high mortality rate in countries where vector ticks are endemic. Viral proteins play a crucial role in the biology and immunology of CCHFV, similar to other viral systems. The significance of CCHFV proteins in various processes has been addressed in numerous studies, and in these investigations, CCHFV proteins are typically produced using transient expression systems. However, stable protein expression proves to be a consistent and reliable model for such studies over time. In this study, the aim was to continuously produce CCHFV glycoproteins and nucleoproteins by using eukaryotic cell lines that mimic glycosylation processes in human cells. Human hepatocellular cell lines (Huh-7) were employed for the stable expression of CCHFV proteins. The resistance of cells to selective antibiotics was evaluated through MTT analysis, followed by transfection using transfection agents such as Lipofectamine® 3000 and polyethylenimine (PEI). Cells expressing CCHFV nucleoproteins and glycoproteins in a stable manner were generated through the selection of antibiotic-resistant colonies. The detection of the transfected gene in the cells was performed using real-time PCR specific to the transfected CCHFV genes. Additionally, the expression of proteins was tested through immunofluorescence microscopy, Western blot, and enzyme immunoassays. The experiments demonstrated the successful expression of CCHFV proteins in stable cells. Western blot analysis confirmed that the produced proteins in the stable cell lines were of the expected sizes, while enzyme immunoassay (EIA) analysis confirmed their antigenic properties. Furthermore, immunofluorescence microscopic analysis revealed the localization of the produced proteins within the cells. The successful expression of CCHFV proteins in stable cells was demonstrated. These stable cell lines are expected to serve as important tools in further detailed investigations on CCHFV, contributing to the understanding of the virus's biology, immunology, and pathogenesis, as it is considered one of the priority pathogens for research.

**Keywords:** CCHFV, Glycoprotein, Nucleoprotein, Stable expression.

## 1.GİRİŞ

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA), insanlarda ciddi hemorajik hummaya neden olan zoonotik bir hastalıktır. Orta Doğu, Afrika, Asya ve Doğu Avrupa bölgelerinde yaygın olarak görülmekte olan bu hastalık, özellikle hayvanların ve kenelerin bulunduğu kırsal alanlarda yüksek prevalansa sahiptir. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA), insanlarda KKKA virüsü (KKKAV) tarafından oluşturulan bir hastalıktır.

Bu virüs, ilk kez 1940'larda, İkinci Dünya Savaşı'nın ardından Kırım yarımadasında 200 Sovyet askeri arasında ortaya çıkan bir salgın sırasında tanımlanmıştır. 1967 yılında Demokratik Kongo Cumhuriyeti'nde hasta bir çocuktan izole edilen bir virüsün Kırım Kongo Kanamalı Ateşi virüsünün, Kongo'da yüksek ateşle beliren hastalıklara sebep olan virüsle antijenik olarak benzer özelliklere sahip olduğunu anlaşılınca bu virüse Kırım Kongo kanamalı ateşi virüsü olarak isimlendirilmiştir [1,2]. İnsanlarda ölümcül hemorajik hummaya neden olan bu virüsün temel taşıyıcı vektörleri *Hyalomma* cinsi kenelerdir. Yapılan çalışmalarda, KKKAV'nin vektör ve rezervuarının başlıca *Hyalomma* cinsi keneler olduğunu belirlenmiştir, fakat özellikle endemik bölgelerde diğer kene türlerinin de KKKAV'nün yayılımında rol oynayabileceği gösterilmiştir [3]. Bu virüs, başlıca infekte kenelerin ısırıkları aracılığıyla bulaşmaktadır. Taşıyıcı vektör olan kenelerin doğada bol miktarda bulunması hastalığın özellikle kırsal bölgelerde hızlı yayılım göstermesine neden olmaktadır. Ayrıca, virüs infekte olan kenelerin, virüs taşıyan hasta bireylerin veya hayvanların vücut sıvıları veya kanıyla doğrudan temas yoluyla da bulaşabilmektedir. İnfeksiyon durumunda KKKA, başlangıçta belirsiz ateşli bir hastalık olarak başlamaktadır. İnfeksiyonun ilerleyen safhalarında ise, yüksek ateşli hastalıklardan şiddetli kanamalara ve multiorgan yetmezliklerine kadar ciddi komplikasyonlar gelişebilmektedir. Hastaneye yatırılan hastalarda ölüm oranı bölgeden bölgeye değişmekle birlikte özellikle endemik bölgelerde vaka ölüm oranı %30'a kadar çıkmaktadır. Virüs insanlarda ciddi komplikasyonlar ve ölümlere neden olurken hayvanlarda asemptomatiktir. Bu durum virüsün daha hızlı bir şekilde yayılmasına neden olmaktadır.

Kırım Kongo kanamalı ateşi virüsü, *Bunyavirales* takımının *Nairoviridae* ailesine ait, Orthonairovirus cinsine mensup bir RNA virüsüdür. KKKAV yanı sıra, *Nairoviridae* ailesi Nairobi koyun hastalığı virüsü, Dugbe virüs ve Hazara virüs (HAZV) gibi eklem bacaklı kaynaklı diğer virüsleri de içerir ancak bu virüsler KKKAV'den farklı olarak insanlarda hastalığa neden olmamaktadır [2,4,5]. Diğer bunyavirüslere benzer şekilde KKKAV, negatif polariteye sahip üç segmentli viral genome sahip bir RNA virüsüdür. Küçük(S), orta(M) ve büyük(L) olarak isimlendirilen segmentlerden çeşitli viral proteinler kodlanmaktadır. Yaklaşık 1.6 kb boyutunda olan S segmentten nükleoprotein (NP) olarak isimlendirilen bir protein kodlanır ve bu proteinin birincil işlevi, viral RNA'ları kuşatan ribonükleoprotein(RNP) kompleksini oluşturmaktır. NP, virüste en bol bulunan protein olduğundan virüse yönelik çalışmalarda önemli bir hedef olmaktadır [6,7]. M segmentten ise yaklaşık 4.5 kb boyutunda olup Gn ve Gc olarak isimlendirilen glikoproteinleri kodlamaktadır. Bu proteinler KKKAV yüzeyinde yer alıp virüsün hedef dokulara girişine aracılık etmektedir. Ayrıca bu glikoproteinler virüsün hücreyi infekte etmesinin ardından viryon oluşumunda da önemli görevlere sahiptir [5,6]. Glikoproteinler, KKKAV'nün hedef hücre yüzeyine bağlanmasındaki ilk aracı proteinler olduğu için viral patogeneze çalışmalarında odaklanılan en kritik proteinlerdir. Günümüzde Kırım Kongo Kanamalı Ateşi için halen onaylanmış herhangi bir aşı veya tedavi bulunmadığından bu alandaki araştırmalar büyük önem arz etmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından yüksek öncelikli bir patojen olarak sınıflandırılan bu patojen, aktif virüs halinde yalnızca biyogüvenlik seviyesi-4 olan laboratuvarlarda çalışılabilmektedir. Özellikle biyogüvenlik koşullarına sahip olmayan laboratuvarlarda, genellikle virüsün yapısını anlamak amacıyla virüse ait proteinlerle çalışmalar yürütülmekte olup bu proteinlerin etkili bir şekilde üretilmesi büyük önem taşımaktadır [1]. Bu alandaki çalışmalarda viral proteinler, prokaryotik ve ökaryotik hücreler kullanılarak başarı bir şekilde üretilmektedir. Prokaryotik hücrelerdeki protein üretimi her ne kadar başarılı olsa da insan benzeri translasyon sonrasında gerçekleşen glikolizasyon ve fosforilasyon gibi modifikasyonlardan yoksundur. Ökaryotik hücreler, biyolojik özellikleri bakımından insan hücrelerine daha benzerdir ve bu hücreler, translasyon sonrası modifikasyonları daha hassas ve doğru bir şekilde gerçekleştirme yetenekleriyle öne

çıkılmaktadır. Bu durum, üretilen proteinlerin biyolojik aktivitelerinin düzgün işleyişi açısından büyük bir öneme sahiptir. Bu amaçla memeli hücreleri gibi ökaryotik sistemlerin kullanımı, çeşitli terapötiklerin üretiminde ve aşı geliştirme çalışmalarında daha etkili ve güvenilir sonuçlar elde etme potansiyeline sahip protein üretimine olanak sunmaktadır [8,9,10]. Hedef proteinlerin memeli hücrelerinde üretiminde ise geçici ve stabil protein ekspresyonu olmak üzere iki temel gen mühendisliği stratejisinden yararlanılmaktadır. Geçici olarak protein üretimi, genellikle hücrelere kısa bir süre boyunca genetik materyalin tanıtılmasını içerir ve yalnızca belirli bir süre zarfında hedef proteinin üretimi gerçekleştirilmektedir. Bu yöntem, hızlı ve etkili sonuçlar sağlamaktadır fakat geçici olmasından dolayı uzun vadeli protein üretim çalışmaları için uygun değildir. Stabil transfeksiyon stratejisi ile gerçekleştirilen stabil protein ekspresyonunda ise genetik materyalin hücre genomuna entegre edilmekte ve bu da genetik materyalin kalıcı olarak hücrede bulunmasına ve hedeflenen proteinin uzun süreli üretimine olanak sağlamaktadır. Stabil protein ekspresyonu özellikle uzun vadeli ve yüksek düzeyde protein üretimi gereken durumlarda tercih edilmektedir [11,12,13].

Bu tez çalışmasında insan glikozilasyon süreçlerini taklit edebilen memeli hücre hatları kullanarak KKKAV viral proteinlerinden NP, PreGn ve PreGc'yi stabil olarak ekspresyon eden hücre hatlarının geliştirilmesi hedeflenmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen hücre hatlarının, BGS-4 koşullarına sahip olmayan laboratuvarlarda, oldukça patojen olan KKKAV'nün temel moleküler süreçlerini anlamak, antiviral stratejiler geliştirmek ve aşı çalışmalarını hızlandırmak için kullanılabileceği düşünülmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Kırım Kongo Kanamalı Ateşi

Kırım-kongo kanamalı ateşi (KKKA), *Bunyaviridae* ailesinden kene kaynaklı bir virüs olan *Nairovirus* cinsinden KKKAV'nün neden olduğu önemli bir hastalıktır. KKKA, Asya, Afrika, Avrupa ve Orta Doğu başta olmak üzere Dünya üzerinde 30'dan fazla ülkede %30'a varan ölüm oranıyla ciddi viral hemorajik ateş salgınlarıyla tanımlanan önemli bir viral enfeksiyondur [1]. İnsan enfeksiyonları, *Hyalomma* cinsi kene ısırıkları, enfekte bir hayvanın veya KKKA hastasının kanına veya vücut sıvılarıyla doğrudan maruz kalma sonucunda meydana gelmektedir [4]. Hastalık kuluçka, hemoraji öncesi, hemoraji ve iyileşme olmak üzere dört ayrı aşamada ortaya çıkmaktadır. Virüsün kuluçka süresi genellikle bir haftadan kısa olup virüse maruz kalma ve virüsün dozu ile ilişkilidir. Hemoraji öncesi dönem ortalama 2 ila 4 gün sürmektedir [14]. Hastalık genelde halsizlik, baş ağrısı, ateş ve kas ağrıları gibi oldukça spesifik olayan semptomlarla aniden başlamaktadır. Hemorajik sendrom, karaciğer yetmezliği, şiddetli morarma ve burun kanamaları gibi daha ciddi komplikasyonlar hastalığın ilerleyen dönemlerinde ortaya çıkmaktadır. KKKAV, yüksek ölüm oranı ve etkili tıbbi önlemlerin bulunmaması nedeniyle Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından yüksek öncelikli bir patojen olarak sınıflandırılmıştır. Spesifik tedavilerin bulunmaması, yüksek ölüm oranı, artan vektör biyonomisi ve iklim değişikliği nedeniyle KKKAV'ne yönelik aşı ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için günümüzde pek çok çalışmada yürütülmektedir [1,15].

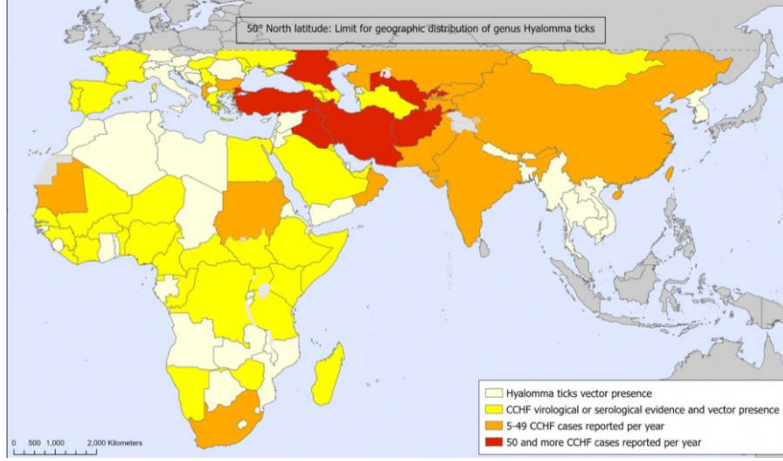
#### 2.1.1 Tarihçe

Kırım kongo kanamalı ateşi hastalığına benzer birçok vaka her ne kadar 12.yüzyılda Tacikistan'da tanımlanmış olsa da hastalığa ait ilk klinik vaka 1944 yılında Kırım'da yaklaşık 200 Sovyet askerlerinde hemorajik sendrom ve ateşin belirlenmesiyle raporlanmıştır. Kırım'ın ardından KKKA Rusya, Sovyet Sosyalist Cumhuriyetler Birliği (SSCB), İran, Bulgaristan, Pakistan, Senegal, Kosova, Türkiye, Yunanistan, ve

Kenya'ya tespit edilmiştir. Hastalık bilimsel olarak 1967 yılında Sovyet bilim adamı Chumakov'un Özbekistan'dan bir hastadan izole ettiği virüs ile tanımlanmıştır [2,14]. Ayrıca 1956 yılında benzer klinik semptomlara neden olan bir virüs, Demokratik Kongo Cumhuriyeti'ndeki bir çocuktan da izole edilmiştir. Kongo ve Özbekistan suşlarının antijenik benzerlikleri 1969 yılında gösterilmesinin ardından virüs Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü olarak yeniden adlandırılmıştır [2].

### 2.1.2 Epidemiyoloji

Kırım-Kongo kanamalı ateşi (KKKA), Türkiye, İran, Pakistan, Afganistan ve Rusya dahil olmak üzere Afrika ve Avrasya'nın geniş bir coğrafi alanını etkileyen, kene kaynaklı, insanlarda görülen viral bir hastalıktır. Arbovirüsler arasında Dang virüsünden sonra ikinci en geniş yayılım gösteren KKKAV, insan sağlığını önemli ölçüde etkilemektedir [2]. 1944'de Kırım'daki ilk vakanın bildirilmesinin ardından virüs diğer ülkelerde de yayılım göstermiştir. 1960'lı yıllarda Sovyetler Birliği'nde, 1970'li yıllarda 1105 vaka ile bildirilen Bulgaristan'da ve 1965 ile 1974 yılları arasında 260 çiftçinin enfekte olduğu Çin'de ilk belirgin vakalar raporlanmıştır [2,14]. Türkiye'de ise ilk vaka 2002 yılında Anadolu'nun Tokat ilçesinde bir grup hastanın ateş ve peteşiyal döküntü ile hastaneye başvurması sonucu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda hastalarda ortak olarak kene ısırığı öyküsü tespit edilmiştir [16]. KKKAV, keneler ve memeliler arasındaki enzootik bir döngüde mevcut olup virüsün coğrafi dağılımı, *Hyalomma* cinsi keneleri (*H. marjinatum*, *H. anatolicum*, *H. truncatum*, *H. impeltatum* ve *H. imprium*) içeren birincil kene vektör türlerinin dağılımı ile ilişkilidir [6,16]. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2022 yılındaki verilerine göre KKKA hastalığının en sıklıkla görüldüğü bölgeler Türkiye ve İran başta olmak üzere Orta Doğu ülkeleridir (Şekil 2.1).



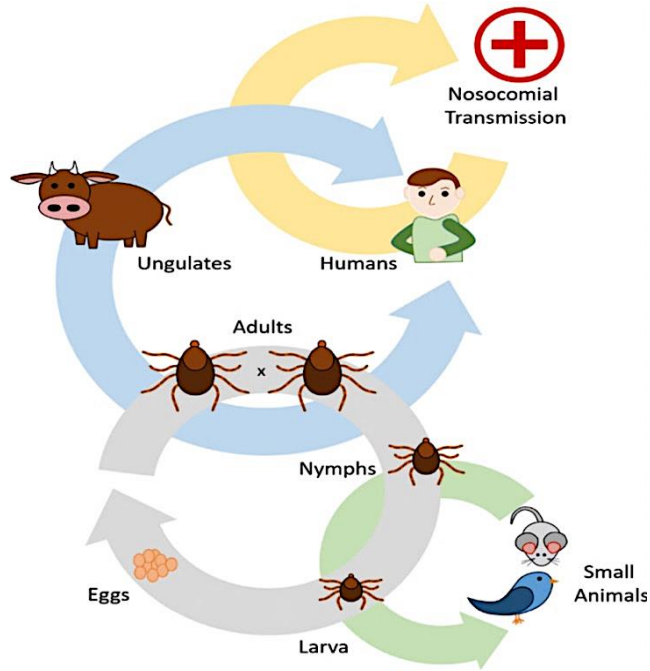
**Şekil 2.1:** KKKAV'nün coğrafik dağılımı. DSÖ'nün 2022 yılındaki verilere göre Dünya genelinde KKKAV'nün gösterimi [15].

### 2.1.3 Etken

Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA), *Bunyaviridae* ailesinden *Nairovirüs* cinsine dahil olan negatif polariteye sahip RNA virüsü olan KKKAV infeksiyonundan kaynaklanmaktadır. *Nairovirus* cinsi, 7 farklı serolojik alt gruba ayrılan 34 farklı virüsten oluşmakta olup ağırlıklı olarak KKKAV, Nairobi koyun ve Dugbe virüsleri insanlarda hastalığa neden olmaktadır [2,16]. KKKAV antijenik yapısı üzerine yapılan çalışmalarda Kırım ve Afrika suşları arasında herhangi bir farklılık tespit edilememiştir. Günümüzde ise viral genomun sekanslanması sonucunda sekiz farklı genetik soy tespit edilmiştir. Avrupa soyu olarak isimlendirilen soy, Balkan yarımadasından Türkiye üzerinden Rusya'ya kadar uzanan bir bölgeyi kapsayan Doğu Avrupa'da bulunan virüsleri içermektedir. AP92 olarak isimlendirilen ve çoğunlukla Yunanistan'da bulunan ikinci soy ise daha az patojenik olması ile karakterizedir. Üçüncü soy Orta Asya'da, dördüncü soy ise Pakistan, Madagaskar ve İran'daki bazı suşlarda bulunmaktadır. Beşinci soy, İran'da Moritanya ve Senegal'de bulunan türlerden oluşmaktadır. Kalan diğer soylar ise yalnızca Afrika'da tespit edilmiştir [2,14].

#### 2.1.4 Bulaş

Ixodid (sert) keneler, özellikle *Hyalomma* cinsine ait olanlar, KKKK etkeni virüsün temel rezervuarı ve vektörleri olarak bilinmektedir. Kenelerin yanı sıra sığır, domuz, keçi, koyun ve tavşan gibi çok sayıda omurgalı hayvan da virüs için destekleyici konakçı görevi sağlamaktadır [4]. Artropod kaynaklı bir virüs olan KKKAV, insanlara kene ısırığı yoluyla veya viremik hayvanlardan veya insanlardan gelen vücut sıvılarına temas sonucunda bulaşmaktadır (Şekil 2.2). Özellikle kırsal bölgelerde çalışan kişiler (örneğin askerler, çiftçiler, orman işçileri ve yürüyüşçüler) ve hayvanlarla yakın temas halinde olan kişiler (örneğin çobanlar, çiftçiler, kasaplar, mezbaha çalışanları ve veterinerler) için virüse maruz kalma riski oldukça yüksektir [2,6,14]. Kırsal alanlardaki bulaşların yanı sıra hastanelerde tıbbi ekipmanların uygun olmayan şekilde sterilize edilmesi sonucu sağlık çalışanlarında da KKKK'nin belgelenmiş vakaları mevcuttur. Bununla birlikte, CCHFV'nin insandan insana bulaşma durumu yoktur. Ebola virüsdeki gibi insandan insana bulaşma yoluyla devam eden yaygın salgınlar KKKK için rapor edilmemiştir [14].



Şekil 2.2 : KKKAV'nün bulaş yollarının şematik gösterimi [17].

### 2.1.5 Patogenez

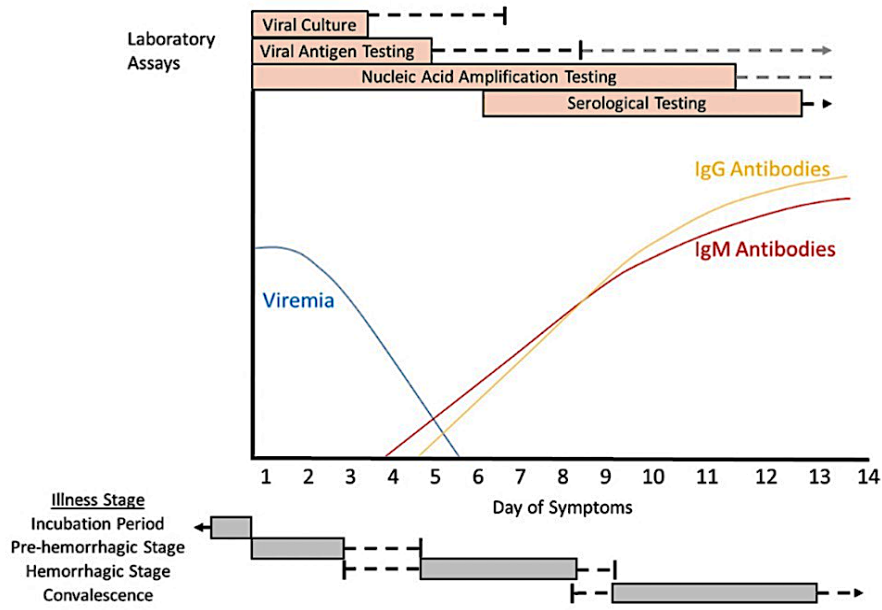
KKKAV oldukça patojenik bir virüs olup bu virüsü derinlemesine çalışabilmek için biyogüvenlik seviyesi 4 (BGS-4) olan laboratuvar koşullarında çalışılması gerekmektedir. KKKA'nın patogenezini anlamak için yürütülen araştırmalar, çalışma laboratuvarlarının yetersizliği nedeniyle yavaş ilerlemektedir ve hastalığa dair belirsizlikler halen aydınlatılamamıştır. 1944'te KKKA ilk defa tanımlandığında, hastalıkla ilişkilendirilen ana patolojik anormalliğinin kanama ve plazmadan interstisyel boşluğa sıvı kaybıyla sonuçlanan vasküler fonksiyon bozukluğu olduğu bildirilmiştir [7]. KKKAV'nün insan damar sistemini doğrudan infekte edebildiğine dair hali hazırda bulunan tek kanıt, mononükleer fagositler, hepatositler ve endotelial hücrelerden izole edilen viral RNA ve antijenlerin tespitini açıklayan 1997 yılında çeşitli KKKA vakaların otopsi sonucunda hazırlanan bir rapordur [18].

KKKA patogenezinde en çok virüs ve konakçı hücreler arasındaki etkileşim sorumluluğu olarak belirtilmektedir. Virüs, kene ısırığı yoluyla ilk bariyer olarak epitelyum tabakasını geçmektedir. Virüsün hücrelere girişini kolaylaştıran viral proteinlerin bulunduğu bazolateral membran, virüslerin girişini ve virüsün kan dolaşımına salınımını sağlayarak virüsün hücreye girdiği bölgeden farklı alanlarda da yayılım göstermesine neden olmaktadır. Endotel hücreleri ve bağışıklık hücreleri virüs-konak etkileşimi ve KKKA hastalığın patogenezinde etkin olan başlıca hücrelerdir [19]. KKKA patogenezinde proinflamatuvar sitokin yanıtlarının önemi birçok çalışmada gösterilmiştir. İnterferonlar (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  ve IFN- $\gamma$ ) tümör nekroz faktör  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ), interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6), interlökin-10 (IL-10), interlökin-15 (IL-15) ve interlökin-17 (IL-17) gibi sitokinler KKKA hastalığının şiddeti ile ilişkilendirilen önemli biyokimyasal belirteçlerdir. KKKAV enfeksiyonu, sitokinlerin, koagulanların ve diğer inflamatuvar aracılardan salınması yoluyla inflamatuvar yanıtı etkilemektedir. Örneğin dendritik hücrelerden salınan IL-1, IL-6 ve TNF- $\alpha$  gibi sitokinler tarafından endotel hücreleri hem doğrudan hem de dolaylı olarak aktive olarak inflamatuvar yanıtın başlatılmasına öncülük etmektedir [19,20]. Doğal immün sisteminin üyesi olan interferonlar (IFN'ler), enfeksiyonun yayılmasını sınırlayarak hızlı ve etkili bir antiviral yanıt için oldukça önemli rol üstlenmektedir. Viral replikasyon üzerine tip I IFN'lerin (IFN- $\alpha$  ve  $\beta$ ) salgılanması ve ardından interferonla uyarılan genlerin (ISG'ler)

yukarı regülasyonu indüklenmektedir. Bu nedenle interferonlar, özellikle infeksiyonun erken döneminde, viral protein ekspresyonunun inhibisyonu ve apoptozu düzenleyebilmektedir [20]. Sitokinler inflomasyonu düzenleme ve bağışıklık sistemi yanıtlarını değiştirebilme yeteneğine sahip olduğundan KKKA hastalarının farklı dönemlerinde farklı seviyelerde bulunmaktadır. Türkiye'de hafif ve ciddi vakalarla yapılan bir araştırmada serumdaki sitokin yanıtları analiz edilerek yüksek TNF- $\alpha$  düzeyleri ciddi KKKA ile ilişkilendirilirken, yüksek IL-6 düzeyleri hem hafif hem de ciddi vakalarda yüksek olduğu tespit edilmiştir [6,7]. Hasta serumlarından analiz edilen sitokin seviyelerinin hayvan modellerinde de benzer olduğu gösterilmiştir. Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü-1 (STAT-1) nakavt fare modelleri KKKAV ile infekte edilerek hastalığın erken dönemlerindeki serum sitokin seviyelerine bakıldığında IL-6, IL-10 ve TNF- $\alpha$ 'nın yüksek seviyelere ulaştığı gözlenmiştir [7,21]. KKKA hastalarındaki hemorajik tablo , Lökosit adezyon molekülleri (ICAM), vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM) ve E-selektin genlerinin artan ekspresyon düzeyleri ile ilişkilendirilmektedir. Bu genlerdeki yukarı regülasyonun vasküler geçirgenliğin artmasına yol açarak kanama olasılığını arttırdığı bildirilmiştir [22].

### **2.1.6 Tanı**

Endemik bölgelerde yüksek mortaliye sahip olan KKKA başlangıçta diğer ateşli hastalıklar benzer semptomlarla ortaya çıkabilmektedir. Hastalığın hızlı ve doğru teşhisi hem vakaların yönetimi hem de bulaşın önlenmesi açısından kritik bir öneme sahiptir. KKKA tanısı koymak için kullanılan laboratuvar testleri, doğrudan hastalık etkeni virüsün tespiti yoluyla veya dolaylı olarak konakçı organizmanın infeksiyona karşı bağışıklık tepkisinin belirlenmesi yoluyla gerçekleştirilmektedir [14]. Tanıda kullanılan laboratuvar testleri arasında gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), enzim bağlı immünosorbent testi (EIA), virüs izolasyonu ve serumda KKKAV'ne spesifik antikorların (IgM ve IgG) varlığının analiz edilmesi yer almaktadır (Şekil 2.3).



**Şekil 2.3:** KKKK hastalığının tanısında kullanılan test yöntemlerinin gösterimi [23].

Klinik öyküsü KKKK ile uyumlu olan bir hastanın laboratuvar tanısı, hastalığın akut döneminde kandaki viral antijenin ELISA ile yakalanması ve viral yükün birkaç saat içerisinde belirlenmesini sağlayan hassas bir yöntem olan RT-PZR ile yapılabilmektedir. KKKK virüsünün suş varyasyonları göz önüne alındığında, en yüksek düzeyde hassasiyetli tanı için nükleik asit amplifikasyon testlerinin immünolojik analizlerle birlikte kullanılması gerekmektedir. Serolojik testlerin uygulanmasında da hastanın hastalığının hangi döneminde bulunduğu çok önemlidir. Şiddetli KKKK vakalarında antikor üretimi gecikebileceğinden veya hiç oluşmayabileceğinden, KKKAV'nin serolojik tanısı ciddi vakalarda yanlış negatif sonuçlara neden olabilmektedir. Bu nedenle serolojik tanı, hastalığın 5 ila 7 gün sonrasında daha faydalı olmaktadır. Bu yöntemlerin yanı sıra BSG-4 biyogüvenlik kontrol seviyesi gerektiren KKKK virüsünün izolasyonu, zorlu güvenlik gereksinimleri ve zaman alıcı bir süreç olması nedeniyle nadiren bir teşhis aracı olarak kullanılmaktadır [14,24]. Moleküler testlerin yanı sıra immünohistokimyasal boyama yöntemi, KKKAV ile infekte olan dokularda viral antijenlerin varlığını gösterebilmektedir [24,25].

### 2.1.7 Tedavi

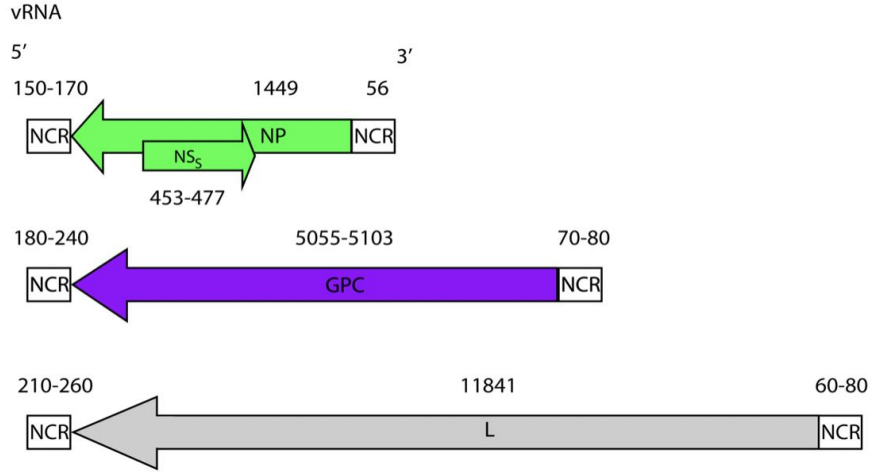
KKKA hastalığına yönelik tedavi seçenekleri sınırlı olup tedavilerin çoğu viral replikasyonu engellemeye veya konakçının enfeksiyona karşı oluşturduğu yanıtı modüle etmeye odaklanmıştır. Hastalığın erken dönemindeki spesifik olmayan semptomlar diğer birçok viral kaynaklı enfeksiyon hastalıklarına benzer olduğundan çoğu zaman KKKA hastalarının tedavisi için geç kalınmaktadır. Günümüzde FDA onaylı KKKAV için spesifik bir antiviral bulunmamaktadır. Bir guanozin analogu olan ribavirin, viral kanamalı ateş hastalıklarında özellikle KKKA, Lassa ateşi ve hantavirus enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan tek antiviral ilaçtır. Ribavirin KKKAV enfeksiyonunun özellikle erken dönemlerinde viral replikasyonu engellemesinden dolayı bir tedavi seçeneği olarak kullanılmaktadır. Ribavirin kullanımını KKKA tedavisindeki etkinliği halen tartışmalıdır. Her ne kadar ribavirin ölümcül şekilde enfekte olmuş STAT1<sup>-/-</sup> farelerde ve STAT2<sup>-/-</sup> hamsterlerin tedavisinde etkili olsa da, aynı şekilde KKKAV ile enfekte olmuş IFNAR<sup>-/-</sup> farelerinde ölüme karşı koruma sağlamadığını ortaya koymuştur. Bu nedenle, ribavirin kullanımının KKKAV tedavisindeki rolü ve tedavilerin sonucu hakkındaki tartışmalar halen devam etmektedir [21,26,27]. Yapılan diğer çalışmalarda ribavirinin yanı sıra, favipiravir veya bir türevi olan H44 kullanımının, ölümcül şekilde enfekte olmuş fare modellerinde önemli ölçüde koruyucu etki gösterdiği ve virusle enfekte hedef dokulardaki viral yükleri önemli ölçüde azalttığı raporlanmıştır [28]. Favipiravir aynı zamanda KKKAV ile enfekte sinomolgus makaklarında da etkili olup ve birçok dokudaki viremiyi ve viral yükü azalttığı bildirilmiştir. Hayvan modellerinde yapılan bu çalışmalar, favipiravir veya H44 kullanımının KKKAV ile enfekte hastalarda da etkili olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca Covid-19 pandemisinde SARS-CoV-2 enfeksiyonunun tedavisinde kullanılan bir antiviral olan molnupiravirin, KKKAV enfeksiyonunun tedavisinde de favipiravir ile benzer etkinlik gösterdiği bulunmuştur [28,29]. KKKA vakalarında antiviral tedavilerinin yanı sıra antikor bazlı tedaviler de uygulanabilmektedir. Her ne kadar daha detaylı çalışmalar yapılmamış olsa da, sınırlı çalışmalardan elde edilen veriler, KKKAV enfeksiyonundan kurtulan bireylerden alınan plazma veya antikorların KKKAV ile enfekte olan hastalarda yarar

sağlayabileceğini göstermektedir [30]. KKKAV infeksiyonu diğer hemorajik ateş hastalıkları gibi düzensiz bir inflamatuvar yanıtı ve sitokin fırtınalarına neden olmaktadır. Bu nedenle, KKKA hastalarında hiperinflamatuvar konak hücre yanıtını baskılanmasında antiinflamatuvar ilaçların kullanılmasına yönelik sınırlı sayıda araştırmalarda yapılmıştır. KKKA hastaları üzerinde yapılan karşılaştırmalı bir çalışmada, yüksek doz metilprednizolonun ribavirin ile birlikte kullanımının, yalnızca ribavirin tedavisine kıyasla antiviral ve antiinflamatuvar ilaçların birlikte uygulanmasının daha iyi bir sonuç verdiği raporlanmıştır [31].

## 2.2 Kırım Kongo Kanamalı Ateş Virüsü

### 2.2.1 Virüsün Yapısı ve Genomu

Kırım Kongo Kanamalı Ateş Virüsü, *Bunyaviridae* ailesine ait, *Nairovirus* cinsinden bir RNA virüsüdür. Özellikle endemik bölgelerde yüksek morbidite ve mortaliteye neden olan kene kaynaklı bu patojen, 100 nm çapında küresel virionlara sahiptir. KKKAV genomu diğer bunyavirüslerde olduğu gibi küçük (S), orta (M) ve büyük (L) olmak üzere üç tek sarmallı negatif RNA segmentlerinden oluşmaktadır [6,14]. Kodlanmayan bölgeler (NCR), KKKAV'nin küçük (S), orta (M) ve büyük (L) segmentlerinin 5' ve 3' uçlarında bulunup bunyavirüs genomlarının dairesel görünümüne katkı sağlamaktadır. Kodlanmayan bölgeler L segmentten kodlanan RNA'ya bağımlı RNA polimerazın viral genomun transkripsiyon veya replikasyonunu başlatması için gerekmektedir [6,32]. Her bir segment bir açık okuma çerçevesi (ORF) ve tüm *Nairovirus*'lerde korunmuş olan dokuz terminal nükleotid (5'-UCUCAAGA – 3'AGAGUUUCU) dizilerini içermektedir. Korunmuş diziler viral promotor bölgeler olarak görev yapmaktadır. Virüsün her bir segmenti farklı viral proteini kodlamaktadır. Küçük (S) segmentten nükleoprotein, orta (M) segmentten glikoproteinler ve L segmentten RNA bağımlı RNA polimeraz (RdRp) üretilmektedir [6,14,32].



**Şekil 2.4:** KKKAV genomu. KKKAV, üç segmentli bir RNA genomuna sahiptir. Küçük (~1,6 kb), orta (~5,4 kb) ve büyük (~12,1 kb) segmentler sırasıyla NP, GPC ve L proteinini kodlar. Küçük segment aynı zamanda pozitif anlamda yapısal olmayan bir S proteinini (NSs) de kodlamaktadır. Kodlama bölgelerinin yanında kodlamayan bölgeler (NCR'ler) bulunmaktadır [6].

## 2.2.2 Viral Genomdan Kodlanan Proteinler

Kırım kongo kanamalı ateşi virüsünün genomundaki her bir segmentten farklı viral proteinler kodlanmaktadır. Bu proteinler S segmentten kodlanan nükleokapsid proteinini (NP), M segmentten kodlanan Gn ve Gc olarak isimlendirilen glikoproteinler ve L segmentten kodlanan RNA bağımlı RNA polimerazdır. Bu proteinler KKKA virüsünün replikasyonunda etkili olup infeksiyonun seyrini etkileyerek KKKA patogenezinde kritik rol oynamaktadır [6].

### 2.2.2.1 Küçük (S) Segmentten Kodlanan Proteinler

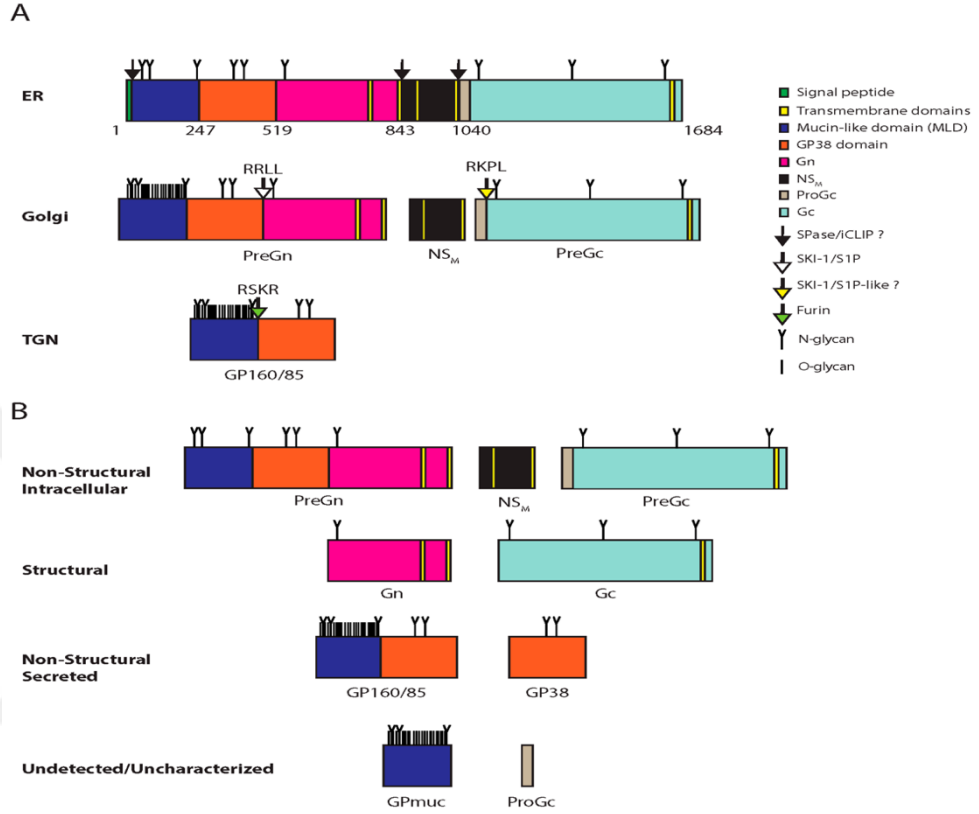
Kırım kongo kanamalı ateşi virüsü küçük (S) segmenti yaklaşık 1.5 kilobaz çifti (kb) uzunluğunda olup yaklaşık 53kDA boyuttaki viral nükleoprotein (NP) ve küçük yapısal olmayan proteini (NSs) kodlamaktadır. Viral proteinler arasında konak hücrede en fazla bulunan protein virüsün genetik materyalinin korunmasında işlevsel olan nükleoproteinler olup birincil işlevleri viral RNA ile etkileşime girerek ribonükleoprotein (RNP) kompleksini oluşturmaktır. NP'nin RNP oluşumundaki rolü ile ilişkili olarak L proteininin amino ve karboksi terminal bölgeleri ile etkileşime girdiği ve hücrelerde L proteini ile ortak lokalizasyona sahip olduğu gösterilmiştir [3,7,26]. Nükleoprotein hücre içerisinde başka işlevleri de mevcuttur NP, diğer viral

parçacıkların yokluğunda bile hücrelerden salınabilir ve küresel virionların oluşmasını sağlayabilmektedir [6,33]. NP'nin viral kaynaklı immün kaçışa da katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. Antiviral yanıtın nükleoproteine karşı hedeflendiği, interferon tarafından uyarılan MxA geninin KKKAV replikasyonunu engellemesini bildiren çalışmalarla gösterilmiştir [34]. NP'nin yanı sıra S segmentten kodlanan küçük yapısal olmayan proteinlerde viral süreçlerde etkilidir. Son zamanlarda KKKAV NSs'nin mitokondriyal bölgeye yerleştiği ve mitokondriyal membran potansiyelini bozarak apoptozu indüklediği bildirilmiştir [6].

#### **2.2.2.2. Orta (M) Segmentten Kodlanan Proteinler**

Kırım kongo kanamalı ateşi virüsü orta (M) segmenti yaklaşık 5.2 kilobaz çifti(kb) uzunluğunda olup virionların yüzeyinde yer alan yapısal glikoproteinler (Gn ve Gc), yapısal olmayan protein (NSm) ve salgılanan yapısal olmayan glikoproteinler (NSG'ler) GP85, GP160 ve GP38 olarak işlenen yaklaşık 225kDa boyutunda bir poliproteini kodlamaktadır. M segmentten glikoprotein öncülleri (GPC), N-glikosilasyonun meydana geldiği (N-glikan) endoplazmik retikulumda sentezlenmektedir. Sentezlenen bu poliprotein hızla sinyal peptidaz kompleksi ve/veya zar içi bölücü proteazlar (iCLIP'ler), tarafından yapısal olmayan M proteini(NSm), zarla bağlı Gn ve Gc öncü (PreGn ve PreGc) proteinlerine parçalanmaktadır. 85kDa boyutunda oluşan PreGc SKI-1/S1P enzimiyle 75 kDa boyutundaki Gc glikoproteinine işlenmektedir. PreGn ise musin benzeri alanının O-glikozile edildiği (O-glikan) Golgi cisimciğine giderek RRLL motifinde subtilisin kexin izozim-1/site-1 proteaz (SKI-1/S1P) enzimi ile 160/85 kDa büyüklüğündeki Musin-benzeri protein/GP38 kompleksi ve 37 kDa büyüklüğündeki Gn proteinine ayrılmaktadır. Yapısal olmayan glikoproteinlerden GP85 ve dimer formunda salgılandığında GP160 olarak isimlendirilen musin-GP38 kompleksi furin enzimi tarafından 38 kDa boyutundaki GP38 ve halen boyutu tam bilinmeyen musin benzeri protein parçalarına ayrılmaktadır (Şekil 2.5) [35]. M segmentten sentezlenen yapısal proteinler olan Gn ve Gc'nin hücre yüzeyi reseptörleriyle etkileşerek virüsün hücreye girişini sağlaması, virüs nötralizasyonunun bu glikoproteinlere karşı antikörlerle gerçekleşmesi ve akut enfeksiyonlu bireylere antikörlerin pasif transferi ile kısmi koruma sağlanması

nedeniyle son yıllarda bu proteinlerin yapı ve fonksiyonlarının karakterizasyonuna yönelik çalışmalar oldukça artmıştır.

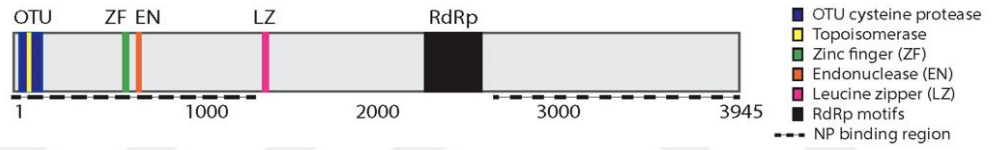


**Şekil 2.5:** KKKAV glikoproteinlerinin işlenmesi ve işlenme sonucu oluşan ürünler. (A)GPC'nin hücre içerisindeki işlenme süreci (B) GPC işlenmesi sonucunda oluşan ürünler [6].

### 2.2.2.3 Büyük (L) Segmentten Kodlanan Proteinler

Kırım kongo kanamalı ateşi virüsü büyük (M) segmenti yaklaşık 12 kilobaz çifti (kb) uzunluğundadır. *Nairovirüs*'ler, *Bunyaviridae* ailesinin diğer üyelerine göre yaklaşık 4000 aminoasitlik daha büyük bir L proteinine sahiptir. L proteini, amino terminusta over-tümörü benzeri (OTU) bir proteaz içerir ve hem de-ISGylating hem de deubikitinyasyon fonksiyonlarına sahiptir. *Bunyaviridae* ailesinin tüm üyelerinde, L segmentinden virüsün genetik materyalini çoğaltmasında ve bulaşmasında kritik bir rol oynayan önemli bir bileşen olan RNA bağımlı RNA polimeraz (RdRp) kodlanmaktadır [6,14]. RdRp yanı sıra L segmentinde yer alan over tümörü benzeri (OTU) sistein proteazı, virüsün çoğalmasında ve viral patogeneizde muhtemel önemli

görevli bulunmaktadır. Viral OTU alanları, hedef proteinden ubiquitin (Ub) ve interferon uyarılmış gen 15 (ISG15) konjugatlarını hidrolize edebilen bir sistein proteazının temel bir bileşeni olarak işlev görmektedir. Ayrıca OTU proteazı, RdRp'nin serbestleşmesinde, çeşitli hücrel sinyal yolları ve bağışıklık tepkilerinde işlevsel olmaktadır [36]. KKKAV L segmentten üretilen L proteini ayrıca endonükleaz aktivitesine de sahiptir. Bu aktivite ile viral RNA'ların uç bölgelerinde yaygın olarak bulunan trifosfat bakiyeleri diğer pek çok RNA virüsünün aksine monofosforile edilmektedir. Viral RNA'ların uç bölgelerinde bulunan bu trifosfat bakiyeleri, retinoik asitle indüklenebilir gen 1 (RIG-I)'in hücrelerdeki antiviral cevabı başlatabilmesi için en önemli hedeflerdir. L proteindeki endonükleaz aktivitesi, viral RNA'nın RIG-I tarafından tanınması engelleyerek virüsün immün yanıtta kaçmasına neden olmaktadır [6].



**Şekil 2.6 :** KKKAV L segmentin genomik organizasyonunun gösterimi [7].

### 2.3 Protein Ekspresyon Sistemleri

Rekombinant protein üretimi başta ilaç sektörü olmak üzere bilimsel ve endüstriyel alanda önde gelen bir araştırma alanıdır. Proteinler, canlı organizmalardaki metabolik süreçleri düzenleyerek günlük işlevlerin yerine getirilmesine yardımcı olan biyolojik moleküllerdir. Fakat protein üretimindeki mutasyonlar veya yanlış işleme süreçleri biyolojik işleyişte aksamalara yol açarak çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Günümüzde bu tür hastalıklar, rekombinant olarak üretilen proteinlerin aşı veya ilaç formunda geliştirilmesiyle tedavi edilebilmektedir. Bu nedenle protein üretimi hastalıkların önlenmesinde veya tedavisinde insan sağlığı açısından hayati bir öneme sahip olup bu alandaki araştırmalar giderek artmaktadır [37]. Rekombinant DNA teknolojisi ile protein üretiminde prokaryotik organizmalar, mayalar, bitki hücreleri ve ökaryotik hücre hatları gibi çok çeşitli sistemler kullanılabilir. Bu ekspresyon sistemlerin seçimi proteinin üretim hedeflerine ve biyolojik aktivitesi gibi gereksinimlere bağlı olarak yapılmaktadır [38].

### 2.3.1 Bakteriyel Ekspresyon Sistemleri

Rekombinant protein üretiminde en sık tercih edilen ekspresyon sistemleri bakteriyel sistemleridir. Özellikle *E. coli* protein ekspresyon sistemi en yaygın kullanılan ve ekonomik açıdan en verimli olan sistemler arasındadır. Rekombinant DNA teknolojisinin en basit konakçısı prokaryotik bakteri sistemleridir. İlk rekombinant FDA onaylı ilaç olan insan insülini, *Escherichia coli* (*E. coli*) tarafından diyabet tedavisi için elde edilerek 1980'lerin başlarında kullanıma sunulmuştur [38]. Bakteriyel sistemlerin tercih edilme nedenleri arasında, bakterilerin fizyolojilerinin detaylı olarak karakterize edilmiş olması, kolay bakım ve manipülasyon imkanı sunması, ekonomik beslenme kaynaklarının kullanılabilirliği, hızlı büyüme ve yüksek hücre yoğunluklarına ulaşabilme yetenekleri, pratik ve uygun ölçeklendirme olanağı, ayrıca çeşitli güçlü indükleyici promotorlarla gen ifadesinin kolayca sağlanabilmesi yer almaktadır [38,39]. Bu avantajların yanı sıra pek çok protein ökaryotik hücrelerde bulunan özel modifikasyonlara ihtiyaç duymakta olup bu da bakteriyel ekspresyon sistemlerinin bu proteinlerin üretiminde kullanımını sınırlamaktadır. Örneğin disülfüt bağları genellikle bakteri hücreleri içinde oluşturulamaz ve bakteriyel sistemler ökaryotik proteinleri üretse bile nadiren düzgün şekilde oluşturabilmektedir. Bu durum üretilen proteinin biyolojik aktivitesini olumsuz yönde etkilemektedir [38,40].

### 2.3.2 Memeli Hücre Ekspresyon Sistemleri

Memeli hücre hatları, insan benzeri protein üretimi için önemli ekspresyon sistemleridir. Bu hücrelerinin kullanımı, rekombinant proteinlerin doğru katlanması, translasyon sonrası modifikasyonları ve biyolojik aktivitelerin düzgün işleyişi açısından çok önemlidir. Bu nedenle terapötik proteinlerin ve biyofarmasötiklerin yaklaşık %70'i memeli hücre hatlarında üretilmektedir. Çin hamsteri yumurtalık (CHO), insan embriyonik böbrek hücreleri (HEK 293) ve yavru hamster böbrek (BHK) hücreleri rekombinant protein üretiminde yaygın olarak kullanılan hücre hatlarıdır.

Diğer hücre hatlarıyla kıyaslandığında CHO hücreleri, kolaylıkla manipüle edilebilmesi nedeniyle büyük ölçekli protein üretiminde daha çok tercih edilmektedir [37,38]. Çalışmanın amacına göre memeli hücrelerinde geçici veya stabil olarak protein ekspresyonu gerçekleştirilebilmektedir (Şekil 2.7).

### **2.3.2.1 Geçici Protein Ekspresyonu**

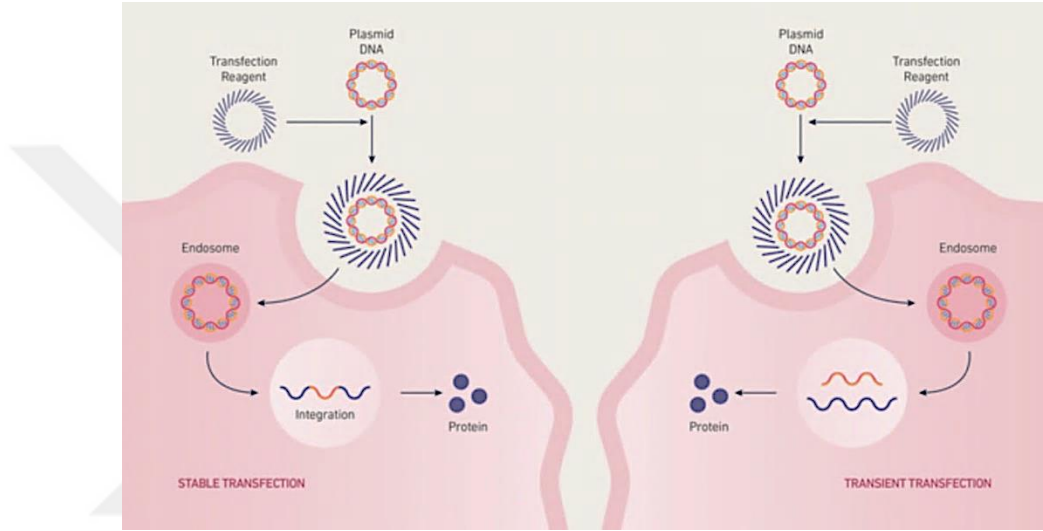
Geçici protein ekspresyonu, hücrelere kalsiyum fosfat (CaPi) veya polietilenimine (PEI) gibi bir kimyasal taşıyıcı ajan aracılığıyla dışarıdan aktarılan genetik materyalin hücrenin genomuna entegre olmadan geçici olarak ifade edilmesi şeklinde tanımlanır. Bu sistem genellikle plazmid DNA veya viral vektörler aracılığıyla gerçekleşir. Aktarılan genetik materyal, konak hücrenin DNA'sıyla birleşemediğinden, birkaç hücre replikasyon döngüsünden sonra kaybolmaktadır. Geçici protein ekspresyonu yapan hücreler genellikle kısa vadeli gen ekspresyonunun etkilerini incelemek, RNAi aracılı gen susturma gerçekleştirmek veya hızlı bir şekilde küçük ölçekli rekombinant proteinler üretmek amacıyla kullanılmaktadır. Ayrıca geçici ekspresyon, stabil şekilde transfekte edilmiş hücrelerde zaman alıcı büyütme sürecine girmeden seçilen parametreleri optimize etmeyi hedeflerken yararlı olabilmektedir. Bu yöntem genellikle kısa süreli protein üretiminde kullanılmaktadır [40,41]. Sistemin avantajlarının yanı sıra gen ekspresyonunda genellikle yüksek maliyetli reaktiflerin kullanılması ve büyük ölçekli üretim için uygun olmaması gibi sınırlamalar da bulunmaktadır [11]. Örneğin, geçici protein ekspresyonunda transfeksiyon reaktifi ve plazmid DNA dahil olmak üzere oldukça büyük miktarda tüketilebilir reaktifler gerektirmekte olup mali açıdan engelleyici olabilmektedir. Buna ek olarak protein verimi, bir deneyden veya kişiden diğerine önemli ölçüde değişebilen bir faktör olan transfeksiyon verimliliği ile direkt ilişkilidir [12].

### 2.3.2.2 Stabil Protein Ekspresyonu

Küçük ölçekli protein ekspresyon deneylerinin çoğunluğu, geçici gen ekspresyon sistemleri ile gerçekleştirilmektedir. Stabil protein ekspresyon sistemleri, biyofarmasötiklerin maliyetlerinin azaltılması veya uzun vadeli protein üretimi için kullanılan bir yöntemdir. Stabil transfekte edilmiş hücreler yalnızca protein üretimi için değil sinyal iletimi, iyon kanalı araştırması, ilaç hedefi taraması ve immünoterapi için ilaç geliştirme gibi farklı alanlardaki çalışmalar için de uygun bir sistem olmuştur [12,13]. Stabil protein ekspresyon sistemleri, sürekli bir şekilde protein üretiminde kullanılan avantajlı bir sistemdir. Geliştirilen hücre hatlarında, hücrelerin çoğalmasıyla birlikte aktarılan genin ekspresyonu korunarak stabil olarak ifadesi sağlanmaktadır. Ayrıca, stabil ifade sistemleri genellikle yüksek protein verimliliği ve uzun süreli kararlı protein ekspresyonu ifadesi sağlamaktadır. Bu durum deneylerin tekrarlanabilirliği ve güvenilirliği açısından oldukça önemlidir [13]. Stabil protein ekspresyonunda hedef proteini kodlayan genin hücrelerin genomuna entegre olması gerekmektedir. Genomik entegrasyon genellikle homolog rekombinasyon veya transpozonların kullanımı gibi mekanizmalarla gerçekleştirilmektedir. Hedef proteini kodlayan genetik materyal ile genomu entegre edileceği hedef bölge arasında benzer veya homoloji gösteren bölgeler arasında homolog rekombinasyon gerçekleşmektedir. Transfeksiyonun ardından hücre, transfekte edilen genetik materyali kendi genomunda bulunan benzer genetik dizileri içeren bölgelerle eşleştirmektedir. Homoloji gösteren bölgeler arasında rekombinasyon başlamadan önce, bu bölgelerdeki DNA çift zincirinin kırılması gerçekleşmektedir. Bu noktada transfekte edilen genetik materyalin lineer bir şekilde hücrelere verilmesi hedef gen sekansında oluşabilecek hataları en aza indirmektedir.

Çift zincir kırıklarının ardından hücre, transfekte edilen genetik materyali homolog bölgelerle birleştirerek rekombinasyon sürecini tamamlayıp transfekte edilen genetik materyali genomuna başarılı bir şekilde entegre etmektedir.

Konakçı genomuna kromozomal entegrasyon, yalnızca seçici bir işaretleyici geninin varlığına dayanmaktadır. Antibiyotik direnç genleri gibi bu seleksiyonu sağlayan genler klonal hücre hatlarının izole edilerek kararlı hale getirilmesinde kullanılmaktadır. Bu yöntemin dikkat çeken dezavantajı, kromozomal entegrasyon sürecinin genellikle rastgele olarak gerçekleşmesi ve bazı durumlarda gen susturulmasına neden olabilmesidir [12,13,39].



Şekil 2.7 : Hücrelerdeki geçici ve stabil gen ekspresyon sürecinin gösterimi [42].

### **3.GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1 Çözeltiler ve Tamponlar**

##### **3.1.1 1 M pH:8 Tris-HCl Çözeltisi**

121,14 g Tris tartılmış 900 ml deiyonize su eklenerek çözdürülmüş ve HCl ile pH 8'e ayarlanıp ardından hacim 1 litreye tamamlanmıştır.

##### **3.1.2 Luria-Bertani (LB) Sıvı Besiyeri**

10 g tripton, 5 gram maya ekstraktı ve 10 gram NaCl tartılıp 1L deiyonize su ile çözdürülüp 121°C'de otoklavlanarak steril hale getirilmiştir. LB besiyeri +4°C'de kullanılana kadar muhafaza edilmiştir.

##### **3.1.3 Ampisilin İçeren LB Sıvı Besiyeri**

10 ml LB sıvı besiyerine 10 µl stok konsantrasyonu 100 mg/ml olan ampisilin çözeltisinden eklenerek bakterilerin sıvı kültürde üremesi için kullanılmıştır.

##### **3.1.4 %30 Gliserollü LB Sıvı Besiyeri**

LB sıvı besiyerinin 10 ml'sine 3 ml gliserol eklenerek bakterilerin -80°C'de stoklanmasında kullanılmıştır.

##### **3.1.5 LB Broth Agar**

10 g tripton, 5 gram maya ekstraktı, 10 gram NaCl ve 15 gram bakteriyel agardan tartılıp 1L deiyonize su ile çözdürülüp 121°C'de otoklavlanarak sıcaklığı düşüp katılaşmadan petri kaplarına dağıtılmıştır. Katılaşan LB agar besiyeri 37°C'de bir gün bekletilerek kontaminasyon kontrolü yapıp kullanılana kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir.

### **3.1.6 Ampisilinli LB Agar**

3.1.5' de hazırlanan besiyerine antibiyotik eklenebilecek kadar soğuduğunda ml'inde 100 µg olacak şekilde ampisilin çözeltisinden eklenerek petri kaplarına dağıtılmıştır. Besiyerleri bir gece 37°C'de kontaminasyon için kontrol edilerek +4 °C'de kullanılana kadar muhafaza edilmiştir.

### **3.1.7 SOC Sıvı Besiyeri**

5 gram maya ekstraktı, 20 gram tripton, 10 ml 1M NaCl, 1 ml 2.5M KCl ve 20 ml 2M MgSO<sub>4</sub>, 990 ml deiyonize su ile karıştırılıp pH:7.5'a ayarlandıktan sonra 121°C'de otoklavlanmıştır. Ardından 10 ml steril %20 glikoz çözeltisi eklenip bir gece 37°C'de kontaminasyon kontrolü yapıp -20°C'de kullanılana kadar saklanmıştır.

### **3.1.8 0.5 M Kalsiyum Klorid Çözeltisi**

110,8 g kalsiyum klorid tartılıp 500 ml deiyonize suda çözdürülmüştür. 121°C'de otoklavlanan çözelti +4°C'de saklanmıştır.

### **3.1.9 PBS Çözeltisi**

0.2 gram KCl, 8 gram NaCl, 1.44 gram Sodyum Fosfat Dibazik (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) ve 0.24 gram Potasyum Fosfat Monobazik (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) tartılarak 1L deiyonize suda çözüldürülmüştür. HCl ile pH değeri 7.4'e ayarlandıktan sonra 121°C'de otoklavlanıp +4°C'de muhafaza edilmiştir.

### **3.1.10 Akrilamid/BİS Solüsyonu**

43,8 gram akrilamid ve 1.2 gram N'-N'-bis-metilen-akrimalid 150 ml deiyonize suda çözdürülüp 0.45 µm'lik filtrelerden geçirildikten sonra +4°C'de muhafaza edilmiştir.

### **3.1.11 %20 SDS Çözeltisi**

200 gram sodyum dodesil sülfat (SDS) 900 ml deiyonize suda çözdürülüp hacim 1 litreye tamamlandıktan sonra oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

### **3.1.12 %10 APS**

100 miligram amonyum persulfat (APS) 1 ml deiyonize su ile çözdürölüp +4°C'de muhafaza edilmiştir.

### **3.1.13 SDS Örnek Hazırlama Tamponu**

0,625 ml 1 M Tris (pH 6.8), 2.5 ml gliserol, 4 ml %5 SDS ve 0.4 ml %1 Bromofenol mavisi 2,475 ml deiyonize suda çözdürölüp oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Örnekler hazırlanmadan önce hazırlanan tampondan 950 µl alınarak 50 µl β-merkaptotanol ile karıştırılıp örneklerin üzerine ile 1:1 oranında eklenmiştir.

### **3.1.14 10X SDS Yürütme Tamponu**

15.15 gram tris, 72 gram glisin ve 5 gram SDS 500 ml deiyonize suda çözdürölüp oda sıcaklığında saklanmıştır.

### **3.1.15 1X TBS**

9 gram NaCl, 10 ml 1 M Tris-HCl ve 2 ml Tween 20, 1 litre distile suda karıştırılarak çözdürölmüştür.

### **3.1.16 TBST**

0,5 ml Tween 20, 999,5 ml 1X TBS içerisine eklenerek hazırlanmıştır.

### **3.1.17 Western Blot Transfer Çözeltisi**

3 gram Tris, 14,4 gram glisin ve 200 ml Metanol, 1 litre deiyonize suda çözdürölerek +4°C'de muhafaza edilmiştir.

### **3.1.18 Western Blot Bloklama Solüsyonu**

2,5 gram süt tozu 50 ml TBST içerisine eklenerek %5'lik süt tozu içeren solüsyon hazırlanmıştır.

### **3.1.19 PBST**

0.2 gram KCl, 8 gram NaCl, 1.44 gram Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.24 gram KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 500 µl Tween 20 1litre deiyonize su içerisinde hazırlanarak +4°C'de muhafaza edilmiştir.

### **3.1.20 EIA Kaplama Tamponu**

3,03 gram  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  , 6 gram  $\text{NaHCO}_3$  1 litre deiyonize su içerisinde karıştırıp pH değeri 9.6'ya ayarlandıktan sonra +4°C'de muhafaza edilmiştir.

### **3.1.21 %37 Formaldehit**

1.85 gram paraformaldehit ve 90 µl 1 N NaOH, 3.5 mL deiyonize su ile ısı yardımıyla çözdürülüp 0,22 µm filtre ile filtrelenerek oda ısısında saklanmıştır.

### **3.1.22 %4 Formaldehit**

1.081 ml %37 Formaldehit çözeltisi, 9 ml su ile karıştırılarak hazırlanmıştır.

### **3.1.23 5X TBE Tamponu**

30.5 gram borik asit, 60.5 gram Tris baz, 3.7 gram EDTA 1 litre deiyonize su içerisinde çözdürülerek oda ısısında muhafaza edilmiştir.

### **3.1.24 %1 Agaroz Jel Hazırlanışı**

1 gram agaroz 100 ml 0.5X TBE tamponunda çözdürülerek hazırlanmıştır.

### **3.1.25 Poliakrilamid Jel Hazırlanışı**

Ekspresyon ürünlerinin analizi için konsantrasyonu %12 resolving, %8 stacking olacak şekilde SDS PAGE jel hazırlanmıştır. Resolving için; 2.4 ml deionize suyun içerisine 5.0 ml akrilamid/bis, 2.5 ml 1.5 M Tris HCl, 0.1 ml 10% SDS, 50 µl 10%APS ve 5 µl TEMED eklenmiştir. Her bir jel için hazırlanan cam kasetlerin arasına 5 ml dökülüp üzerine jelde oluşabilecek baloncukların giderilebilmesi için izopropanol de eklenerek jel donmaya bırakılmıştır. Stacking jel için ise 4.1 ml deionize suyun içerisine 3.3 ml akrilamid/bis, 2.5 ml 0.5 M Tris HCl, 0.1 ml 10% SDS, 50 µl 10%APS ve 10 µl TEMED eklenerek resolving jelinin üzerine dökülmüştür. Örneklerin yükleneceği kuyuları oluşturacak olan taraklar da stacking jelinin üzerine yerleştirilerek donması beklenmiştir. (maddelerin miktarlarını kontrol et)

### 3.2 Malzemeler

Tez çalışması kapsamında kullanılan malzemeler Tablo 3.1’de listelenmiştir.

**Tablo 3.1 :** Tez çalışması kapsamındaki deneylerde kullanılan malzemelerin listesi.

Huh-7 hücre hattı
FBS (Gibco)
DMEM(Gibco)
Penisilin/ Streptomisin (Gibco)
T-25 cm <sup>2</sup> doku kültürü şişeleri (NEST <sup>®</sup> )
T-75 cm <sup>2</sup> doku kültürü şişeleri (NEST <sup>®</sup> )
6 kuyulu hücre kültür plakası (NEST <sup>®</sup> )
24 kuyulu hücre kültür plakası (NEST <sup>®</sup> )
96 kuyulu hücre kültür plakası (NEST <sup>®</sup> )
10, 200, 1000 µl pipet uçları (NEST <sup>®</sup> )
Petri kapları (Isolab)
5, 10, 25 ml serolojik pipet (NEST <sup>®</sup> )
5, 10 ml şırınga (Beybi)
1,5 ml Kriyojenik Tüpler (NEST <sup>®</sup> )
Restriksiyon enzimleri (NEB)
Tripsin/EDTA (Thermo Scientific)
iNtRON's DNA-spin <sup>™</sup> Plasmid DNA Purification Kit
QIAamp DNA Mini Genomic DNA Purification Kit
Formaldehit
Dimetil sülfoksit (DMSO)
DH5α kimyasal olarak kompetan <i>E. coli</i> suşu
Ampisilin (BioShop, Burlington, CANADA)
G418 Sülfat (Thermo Scientific)
LB besi yeri (LB Broth with Agar, Sigma-Aldrich Co, MO, USA) SOC
Hygromisin B (Thermo Scientific)
Puromisin (Santa Cruz)
Lipofectamine <sup>™</sup> 3000 Transfection Reagent(Invitrogen,Thermo Scientific)
İzopropanol
Metanol
Etanol
KKKAV NP Kodlayan Plazmid (Twist Bioscience)
KKKAV PreGn Kodlayan Plazmid (Twist Bioscience)
KKKAV PreGc Kodlayan Plazmid (Twist Bioscience)
Agaroz (Sigma-Aldrich)
Etidyum bromür
Sodyum dodesil sülfat (SDS)
Pierce RIPA Liziz Buffer (Thermo Scientific)
KKKAV NP Monoklonal Antikoru 9D5 (BEI, NR40270)
KKKAV NP Monoklonal Antikoru 2B11(BEI, NR40257)
KKKAV PreGn Monoklonal Antikoru 13G8(BEI, NR40294)
KKKAV PreGc Monoklonal Antikoru 11E7(BEI, NR40277)
Anti-Mouse IgG HRP (sc-2005; Santa Cruz Biotechnology,Dallas, TX, USA).
Goat anti-mouse IgG FITC(Abcam, ab6785)
WesternBright Sirius Chemiluminescent Detection Kit(Advansta, California)
PVDF membranı (Amersham <sup>™</sup> , Germany)
Sülfürik asit
TMB solüsyonu
Hoechst (DAPI) boya (Invitrogen)

### 3.3 Cihazlar

Tez çalışması kapsamında deneylerde kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları Tablo 2’de gösterilmiştir.

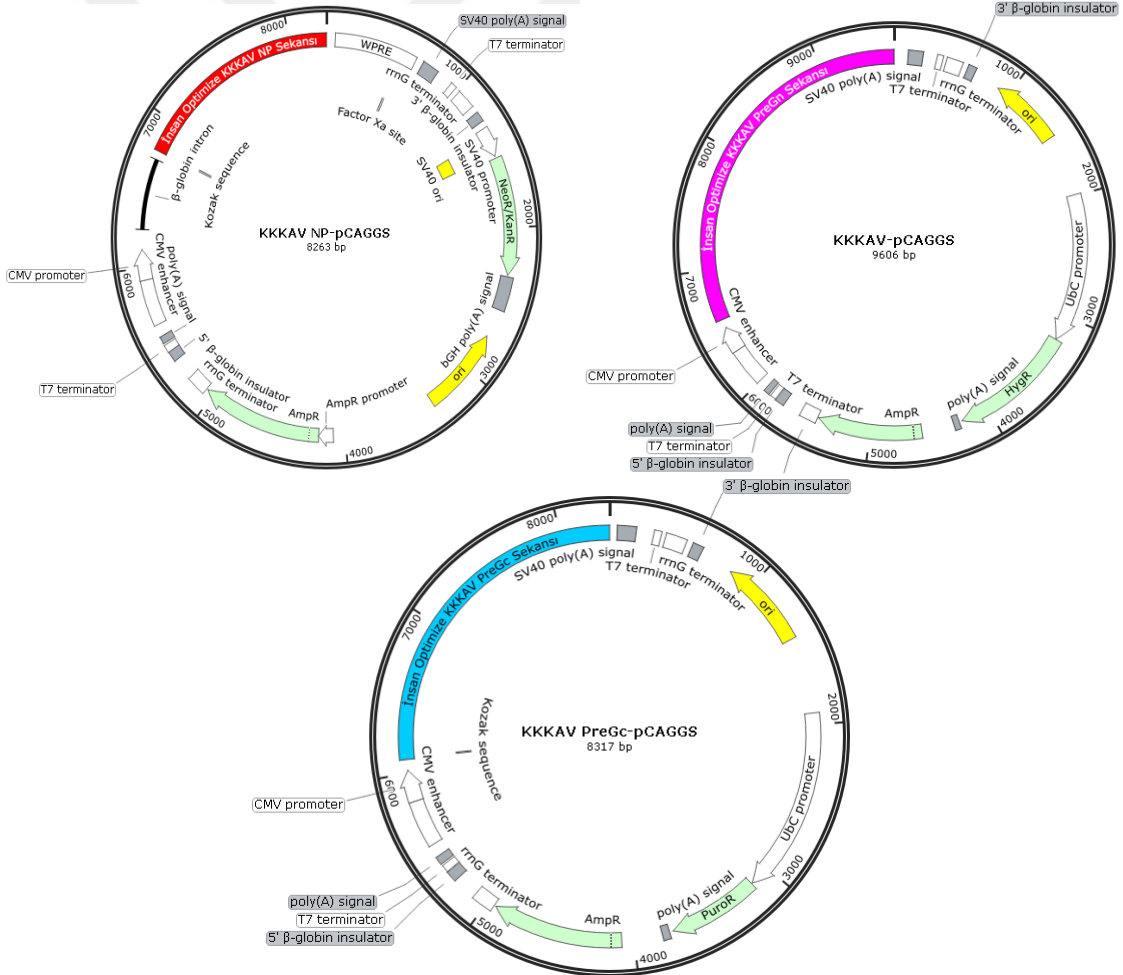
**Tablo 3.2 :** Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları.

Cihazın Adı	Tezde Kullanım Amacı
Class II Biyolojik Güvenlik Kabini (Thermo Fisher Scientific)	Hücre kültürü
37°C CO <sub>2</sub> 'li inkübatör (Thermo Scientific)	Hücre kültürü
Normal ve soğutmalı santrifüjler (Beckman, Avanti)	Hücre kültürü, RNA ve protein izolasyonu
PZR Cihazı (BioRad)	PZR çalışmaları ve inkübasyon
İnverted Mikroskop ve Işık Mikroskop	Hücre Kültürü
EIA Mikroplaka Okuyucu ve EIA Mikroplaka Yıkayıcısı	EIA
Agaroz jel görüntüleme sistemi (Biorad GelDoc XR+)	PCR, RNA ve cDNA ürünlerinin görüntülenmesi
Kemilüminesans görüntüleme sistemi (Fusion FX Solo S)	Western blot görüntüleme
Dikey SDS-PAGE jel elektroforez sistemi (BioRad)	SDS-PAGE ve Western blot
Nanodrop spektrofotometre (Thermo Scientific)	DNA, RNA ve protein miktar tayini
pH metre (Milwaukee)	Çözelti hazırlanması
Biorad Mini Trans-Blot® Elektroforetik Transfer Sistemi	Western blot transferi
Normal (Heratherm™ Compact Microbiological Incubators) ve CO <sub>2</sub> Etüvler (Thermo Scientific™ Forma™ Series 3)	Bakteri ve hücre kültürü
Biotek Cytation 5	İFA Görüntüleme
Qiagen Rotor Gene Q	RT-PZR
Distile su cihazı	Genel
Vorteks (VWR)	Genel
Hassas Terazı	Genel
Su Banyosu (Witeg)	Genel
Buz makinası (Scotsman)	Genel
Kuru ısı bloğu (Thermo Scientific)	Genel

### 3.4 Yöntemler

#### 3.4.1 Ekspresyon plazmitlerinin tasarlanması

KKKAV Kelkit suşu NP, PreGn ve PreGc proteinlerini kodlayan genler, GenBank veri tabanından alınarak memeli hücrelerde ekspresyon için optimize edilmiş ve pCAGGS vektörü içerisinde liyofilize halde ticari olarak temin edilmiştir. (Twist Bioscience, ABD) (KKKAV NP Erişim no: GQ337053.1, KKKAV PreGc Erişim no: KC867273.1). Tasarlanan ekspresyon plazmitlerinin haritaları Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



**Şekil 3.1:** KKKAV proteinlerini eksprese eden plazmitlerin haritası. KKKAV NP, KKKAV PreGn ve KKKAV PreGc proteinlerini eksprese eden genleri taşıyan pCAGGS plazmitlerinin haritası.

İnsan optimize KKKAV NP, KKKAV PreGn ve KKKAV PreGc sekansları ise aşağıya eklenmiştir.

>KKKAV NP Kodon Optimize Sekans

GGTACCGCCACCATGGAGAATAAAATCGAAGTCAATAGTAAAGACGAAA  
TGAATAAGTGGTTCGAGGAGTTCAAGAAAGGCAACGGTTTGATGGACAC  
CTTTACGAATTCTTATAGTTTCTGCGAAAACGTCCCTAACCTTGACAAATT  
CGTATTTCAAATGGCTTCTGCTACTGACGACGCCAGAAAGATAGCATT  
ACGCGTCCGCCCTCGTTGAGGCTACAAAATTTTGCGCCCAATCTACGAG  
TGCGCATGGGTGTCAAGCACCGGAATCGTCAAGAAAGGCCTGGAATGGT  
TTGAGAAAGACTCCGGGACCATTAAGTCCTGGGACGAAAATTACGCCGA  
ACTCAAAGTGGACGTGCCAAAGATTGAGCAGCTCGCAAACCTATCAGCAA  
GCCGCCCTGAAATGGCGCAAAGATATCGGGTTTCGAGTGAATGCCAATA  
CTGCCGCACTGTCTAATAAGGTATTGGCCGAGTATAAGGTGCCCGGGGA  
GATCGTAATGAGCGTGAAGGAGATGTTGAGCGATATGATCCGGAGACGT  
AACCTGATCCTGAATCGGGGCGGCGACGAGAACCCTCGTGGACCTGTTTC  
TCGGGAGCACGTTGAATGGTGTAGAGAGTTCGTGAAGGGAAAATATATT  
ATGGCCTTTAACCCACCCTGGGGCGATATTAATAAGTCCGGACGCAGCGG  
CATTGCTCTCGTAGCCACCGGACTCGCAAACTGGCTGAACTGAAGGC  
AAGGGCGTCTTTGATGAGGCAAAGAAAACAGTTGAAGCGTTAAACGGCT  
ACCTCGATAAACATAGAGATGAGGTGGATAAAGGCCTCTGCAGATAGTAT  
GATCACCAATCTGCCCAAACATATCGCTAAGGCCAGGAACTGTACAAG  
AACAGCAGCGCCCTGAGAGCCCAGGGAGCCCAAATCGATACTCCCTTTA  
GTAGCTTCTATTGGCTTTATAAAGCAGGCGTCACACCTGAAACATTTCT  
ACAATTAGCCAATTTCTCTTCGAGTTAGGTGAACAACCCCGCGGCACTAA  
GAAGATGAAGAAAGCCTTGTTATCCACGCCCATGAAATGGGGCAAGAAG  
CTGTACGAACTGTTTCGACAGACGATTCCTTTCAACAAAATCGAATTTATAT  
GCATCCCGCAGTATTAACGGCGGGCCGGATATCAGAGATGGGCGTGTGT  
TTCGGGACTATTCCAGTGGCAAACCCGGACGACGCAGCACAAAGGGTCCG  
GGCACACGAAATCAATACTGAATCTCCGAACTTCAACCGAAACAAATAA  
CCCCTGTGCAAAGACTATCGTGAAGTTGTTTCGAGATTCAGGAGACTGGGT  
TCAATATTCAAGATATGGATATAGTAGCATCAGAACATCTTCTCCATCAG

TCTATAGTGGGTAAACAGAGCCCTTTTCAGAACGCGTATAATGTGAAAGG  
GAACGCAACATCAGCAAATATTATATGAGGATCCGCTAGCCTCGAG

>KKKAV PreGn Kodon Optimize Sekans

GGTACCGCCACCATGCCAACAAATATCATGCACACACCCTGGTATGTTT  
TATCCTGTATCTTCAACTTTTATGCCTTGGTGGTGCACACGGCCAACTGAA  
TGCGACCGAGCATAACGGCACCAATAATACGACTGCCCTGGGGCTTCCC  
AGTCCCCTAAACCCCAATGTCAACCACGCCCCCTCATGCGCCCGAGAGC  
TCAACTATTAAGCCAACAACCTCTATCTCCGAGGCCGAGGGTTCTGGTGA  
GACTACATCTCCGCCTAATACTACGCAAGGACTCTCATCCCCGAAACAA  
CCAGCGAGCGGCCGGCCACTACAAGTATTTCAACAAGTTCAACCGATTCT  
ACCAATCCAACACTACGCAAATGACTGATAATACACCAACTCCTACTGTGTC  
TACTTCCCCTTCTTCCCTACCAAGTACTCCCAGTACGCCTCAGGGTATCCA  
CCACCCGGCTCGCTCTCTCCTGAGCGTGAGCTCTCCAAAACACTGTCACTA  
CTCCTACCCCGACTTCACCCGGGGAAATGAGTAGCGAGACTTCCTCTCAA  
CATTCCGCTATGTCCCGCATTCTACACCGCATACTGCCACAAGAGTTTCT  
ACGGAAATAACTAATCATAGGACCCCGCGGCAGTCCGAGAGCTCTGCCC  
AACAAACTACACCTTCCCCTATGACCAGCCCCGCTCAGTCTATTCTGTTA  
ATGTCTGCAGCCCCAACCGCCGTACAGGATATCCACCCTTCACCGACCAA  
TCGCAGCAAACGGAATCTGGAAACTGAGATTATATTGACTCTCCCAGG  
GCCTTAAGAAGTATTATGGCAAATCTTGAAATTGTTACATTTGACTCTG  
GAGCAAGATACTGAGGGATTGCTGGAGTGGTGCAAAGGGAATCTGGGAA  
GCAATTGCGACGACGATTTCTTCCAGAAAAGGATTGAGGAGTTCTTTATG  
ACAGGGGAATGTTATTTAACGAGGTGTTGCAGTTCAAGACGCTCTCCAC  
CTTGTCACCGACTGAACCATCCCACGCACGGCTTCCCCTGCCGAGCCTT  
TTAAGTCCTATTTTCGCAAAGGGTTTCTGAGTATTGACTCTGGGTATTTTA  
GTGCTAAGTGCTACCCAGGAGCTCCGCATCTGGCCTGCAACTTATAAAC  
GTCACACAGCATCCTGCCAGAATCGCCGAGACTCCCGGCCCGAAAACCA  
CGTCCCTCAAGACTATAAATTGCATCAATCTGCGAGCGTCCGTTTTCAAG

GAGCATCGCGAGGTTCGAAATTAACGTTCTGTTACCCCAAATCGCTGTGAA  
TCTGTCTAATTGTCACGTCGTAATAAACAGTCACGTGTGCGACTATAGCC  
TCGATACAGACGGACCTGTACGACTCCCCAGGATATAACCACGAGGGTAC  
ATTTATCCCTGGCACATACAAGATTGTTATTGATAAGAAGAACAACACTGA  
ACGATAGATGCACTTTGGTGACTAATTGCGTCATCAAAGGCAGGGAAGT  
CAGGAAAGGACAGAGTGCCTCAGACAATATAAGACCGAGATTAATAATC  
GGGAAAGCCTCTACCGGGTCCGCAAGTTGTTAAGCGAAGAACCGGGAG  
ACGATTGTATCTCTCGCACACAACACTGCTGCGTACCGAGACGGCTGAAATT  
CACGACGATAATTACGGCGGCCCTGGCGACAAGATTACAATATGTAATG  
GCAGCACAATCGTCGACCAACGCTTAGGGTCTGAGCTTGGATGCTACACA  
ATTAATCGGGTTAAAAGTTTTAAACTGTGTAAGAATAGTGCAACCGGAA  
AGACGTGCGAAGTGGATTCAACGCCCGTGAAATGTCGCCAGGGGTCTG  
CCTCAAGATTACGCAGGAAGGCCGGGGACATGTGAAGCTTTCACGGGGT  
TCCGAAGTCGTGCTCGACGCCTGTGATAGTTCTTGCGAGGTGATGATCCC  
AAAGGGGACAGGCGACATTCTTGTGATTGCTCCGGCGGTCAACAGCACT  
TTCTCAAGGATAATCTGATCGATCTTGGTTGTCCACACATTCCCTTGCTCG  
GGCGGATGGCCATATATATCTGTAGGATGTCTAACCACCCCGGACCACT  
ATGGCCTTCCTGTTTTGGTTTTCTTCGGTTACGTGATAACCTGCATTTTCT  
GTAAAGCCCTCTTCTACAGCTTAATTATAATCGGGACGCTGGGCAAGAAA  
ATTAACAGTACCGCGAGCTCAAGCCCCAGACTTGTACAATCTGCGAAA  
CTGCGCCCGTAAACGCTATTGACGCCGAGATGCACGATCTGAATTGCTCC  
TATAACATCTGTCCCTACTGCGCCTCTCGACTTACGTCAGACGGACTCGC  
AAGACACGTGACTCAGTGTCCAAAACGTAAGGAAAAGGTCGAAGAAACA  
GAGCTCTATCTTAATTTGGAGCGAATCCCATGGATCGTACGGAAATTGCT  
GCAAGTCAGCGAATCTACCGGGGTGCTCTTAAGCGCTCTTCTTGGCTCA  
TCGTGCTCCTGGTATTGTTGACTGTGTCTCTGTCTCCCGTGCAATCCGCCC  
CAGTCGGCCACGGCAAAACGATTGAGATTTACCAAACCTAGAGAGGGTTT  
TGCTAGTATTTGCTTGTTCATGCTCGGTTCTATCCTGTTTCATCGTGAGCTG  
TCTGGTAAAGGGCCTGGTCGATAGCGTGAGCGAGTCCTTCTTTCCAGGAT  
TGTCCGTGTGCAAACTTGTTCATCGGGTCCGTGAACGGATTCGAGATC  
GAGTCACATAAGTGTTATTGCAGTCTGTTCTGTTGTCCTTATTGCCGACAT  
TGTAGTGCCGATCGGGAGATCCATCAACTGCATCTCTCAATTTGTAAGAA

GAGAAAGACTGGCAGTAACGTTATGTTAGCTGTATGTAAGAGAATGTGTT  
TCCGCGCCACAATCGAGGCTAGTAGGAGAGCTTTGCTGATAAGATCAATC  
ATTAACACAACATTCGTGATCTGTATATTGACTCTGACGATTTGCGTCGT  
GTCAACGAGTGCCTGAGGATCCCTCGAG

>KKKAV PreGc Kodon Optimize Sekans

GGTACCGCCACCATGGTCTGTAAGCGCATGTGCTTTAGGGCAACCATCGA  
AGCCAGCAGAAGGGCCCTGCTCATCCGAAGCATTATCAATACCACTTTTG  
TAATATGCATCTTGACGTTGACAATCTGTGTTGTGAGCACCTCTGCCGTG  
GAGATGGAAAACCTGCCCGCAGGAACCTTGGGAGCGGGAGGAGGACTTGA  
CAAATTTCTGTCATCAGGAATGCCAGGTGACTGAGACGGAATGCCTCTGT  
CCATACGAAGCTCTTGTGCTCCGAAAACCTCTGTTCTTGGACAGTATTGT  
GAAAGGCATGAAGAATCTGCTCAACTCCACAAGCCTGGAGACAAGCCTT  
TCAATCGAGGCCCCCTGGGGAGCAATAAATGTCCAATCAACCTTTAAGCC  
AACTGTATCCACTGCAAATATAGCACTCAGTTGGAGCTCAGTGGTGCACA  
GAGGCAACAAGATCCTTGTACAGGCCGGTCTGAATCAATTATGAAACT  
GGAGGAAAGGACAGGAGTCAGCTGGGACCTGGGCGTGGAAAGATGCCTCT  
GAGTCCAAACTCCTGACCGTCTCCATCATGGATTTGTCACAAATGTATTC  
TCCTGTTTTTGAGTATCTGTCAGGAGACAGACAGGTTGAGGAATGGCCCA  
AGGCAACTTGTACTGGTGACTGCCCGGAAAGGTGTGGCTGTACATCATCA  
ACCTGCCTGCATAAAGAATGGTCTCACTCCAGAAACTGGCGGTGTAATCC  
CACTTGGTGCTGGGGAGTGGGAACCGGCTGCACCTGCTGCGGGGTGGAT  
GTAAAAGATTTGTTTACCGACCACATGTTTCGTCAAGTGGAAGGTGGAATA  
CATAAAAACCTGAAGCTATCGTCTGTGTTGCGCTCACCAGCCAAGAGCGCC  
AGTGCAGTCTGATTGAGGCCGGGACTCGCTTCAACCTGGGCCCTGTGACT  
ATTACCCTGTCCGAGCCAAGGAACATTCAGCAGAAGCTCCCTCCTGAGAT  
TATCACGTTGCATCCCAAATGAAGAAGGCTTCTTCGACTTGATGCATG  
TACAGAAAGTGTTGTCTGCCAGTACAGTGTGTAAGCTGCAGTCCTGCACG  
CATGGGATACCGGGAGACTTGCAAGTTTACCACATCGGCAATTTGCTGAA  
AGGGGATCGGGTCAACGGGCATCTCATTCAACAAGATCGAATCTCATTTCA  
ACACCTCTTGGATGTCCTGGGACGGTTGTGACCTTGACTACTACTGCAAC  
ATGGGGGATTGGCCCTCTTGCACCTTATACAGGAGTGACCCAGCACAACCA

TGCGGCCTTTGTCAACTTGCTGAACATTGAGACTGACTACACGAAAACCT  
TCCACTTCCACTCTAAAAGAGTCACAGCGCATGGGGACACCCCACAGTTG  
GACCTCAAGGCCCGACCGACCTACGGTGCCGGTGGGATCACTGTGCTGGT  
TGAGGTGGCTGACATGGAGCTGCACACCAAGAAGGTTGAAATCTCAGGC  
CTGAAGTTCGCATCCCTGGCTTGCACGGGTTGCTATGCTTGTAGCTCTGG  
CATCTCCTGTAAAGTGCGAATTCATGTCGATGAGCCTGATGAGCTCACAG  
TACACGTAAAGAGCAGTGATCCAGACGTGGTTGCCGCTAGTACCAGTCTC  
ATGGCGAGGAAGCTTGAGTTTGGGACAGACAGCACCTTCAAGGCCTTTTC  
CGCTATGCCCAAACCTCTTTGTGTTTTTATATTGTGGAGAGAGAATACT  
GCAAGTCCTGCAGTGAAGATGATACCCAAAAATGTGTTGACACACGGCT  
TGAGCAGCCACAGAGCATACTGATCGAGCACAAAGGAACGATCATTGGA  
AAGCAGAATGATACTTGCACAGCCAAGGCAAGCTGTTGGCTGGAGAGCG  
TCAAGAGTTTCTTTTATGGATTGAAGAATATGCTTGGCAGTGTGTTTGGT  
AATCTGTTTCATAGGCATTCTCTTGTTCCTTGCCCCTTTCGTCCTGCTCGTG  
CTGTTCTTTATGTTTGGGTGGAAAATCCTGTTCTGCTTTAAGTGTTGCCGC  
AGGACCCGCGGCCTTTTTAAGTATCGGCACCTCAAGGACGATGAGGAAA  
CAGGCTACCGGCGCATTATTGAGAGACTGAACAGCAAGAAAGGGAAGAA  
TCGCCTGCTTGATGGTGATAGACTGGCTGATAGGAAAATCGCTGAGCTGT  
TCTCCACAAAAACACACATCGGCTGAGGATCCCTCGAG

#### **3.4.2 Kompetan hücrelerin hazırlanması**

Transformasyonda kullanılmak üzere bakteriler kalsiyum klorür ile kimyasal olarak kompetan hale getirilmiştir. Kompetan bakteri üretiminde tüm bakteriler Luria Bertani (LB) besiyerinde büyütülmüştür. Bu amaçla -80°C’de muhafaza edilen bakteri stoğu antibiyotik içermeyen LB agar pleyte ekilmiştir. Gece boyu inkübasyonun ardından tek bir koloni seçilip 25 ml LB besiyerinde 37°C, 250 devirde OD<sub>600</sub>’si 0,4-0,6 değerine ulaşana dek 4 ila 6 saat boyunca inkübe edilmiştir. Hücreler istenen miktarlara ulaşıncaya dek 10 dakika soğutulup ardından 4°C’de 5 dakika boyunca 10000 devirde toplanmıştır. Santrifüjün ardından süpernatant dökülerek çöktürülen hücreler 10 ml soğuk 0.1M kalsiyum klorid ile resüspanse edilmiştir. 300’er µl kompetan hücre -80’de soğutulan mikrosantrifüj tüplerinin içerisine eklenip sonraki deneylerde kullanılmak üzere -80°C’de muhafaza edilmiştir.

### 3.4.3 Transformasyon

Ticari olarak satın alınan KKKAV NP, Gn ve Gc proteinlerini eksprese eden plazmid kalsiyum kloridile kompetent hale getirilen *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 'ya transforme edilmiştir. Öncelikle hazırlanan kompetan hücreler -80°C'den direkt buza çıkarılarak buz içerisinde erimeye bırakılmıştır. 50  $\mu$ l kompetan hücreye 30 ng plazmid DNA'sı eklenmiş ve 30 dakika boyunca buzda inkübe edilmiştir. Hücrelere 90 saniye boyunca 42°C'de tutulup hemen buzun üzerine alınarak 5 dakika da buzun üzerinde bekletilerek ısı şoku yapılmıştır. Ardından oda ısısında olan SOC besleyici besiyerinden DNA-kompetan hücre karışımının üzerine eklenerek 37°C'de 250 devirde çalkalama hızında 1 saat boyunca hücreler büyümeye bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından ilgili antibiyotik direnç geni olan 100 $\mu$ g/ml ampisilini içeren LB agar pleytlere ekilerek 37°C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir.

#### 3.4.3.1 Pozitif Kolonilerin Seçimi

Transformasyonun ardından antibiyotikli LB agar besiyerinde gece boyu inkübasyonun ardından büyüyen kolonilerden hedef gen açısından pozitif olan kolonilerin seçimi koloni PZR ve restriksiyon endonükleazlarıyla kesim reaksiyonu ile yapılmaktadır. Koloni PZR için kolonilerin her biri ayrı ayrı öze veya pipet ucu ile alınarak 30  $\mu$ l MGW'de resüspense edilmektedir. Burada kolonilerin bir kısmının alınırken aynı koloninin diğer kısmının pleytte kalmasına dikkat edilmiştir. Bu durum pozitif kolonilerin belirlenmesinin ardından hedef geni içeren koloniden kültür başlatılması için önemlidir. Koloni PZR için seçilen ve MGW'de resüspense edilen süspansiyon 95°C'de 5 dakika kaynatılarak PZR'da kalıp DNA olarak kullanılmıştır. Tablo 3.3'de gösterilen KKKAV NP, Gn ve Gc'ye spesifik primerlerle 2  $\mu$ L kalıp DNA, 1  $\mu$ L 1  $\mu$ M ileri ve geri primer, 1  $\mu$ L 10  $\mu$ M dNTP, 2,5  $\mu$ l 10X PCR Tamponu, 0.75  $\mu$ l 25mM MgCl<sub>2</sub> ve en son 0.125  $\mu$ l Taq polimeraz PZR karışımına eklenerek PZR reaksiyonu kurulmuştur.

PZR koşulları Tablo 3.4’de bulunmaktadır. PZR’ın yanı sıra aynı kolonilerden antibiyotikli LB’de kültür başlatılıp plazmid DNA izolasyonu yapıp kesim reaksiyonu ile de kolonilerin ilginin genini içerip içermediğini belirlenebilmektedir. 500 µg DNA için 1 Unit enzim olacak şekilde bir kesim reaksiyonu hazırlanarak karışım 37°C’de 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. PZR ve kesim ürünleri agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiştir.

**Tablo 3.3:** Polimeraz zincir reaksiyonlarında kullanılan primer sekansları.

Hedef Gen	İleri Primer Sekansı 5' – 3' Sekans	Geri Primer Sekansı 5' – 3' Sekans
KKKAV NP	CAAATGGCTTCTGCTACTGA	CATTCACCTCGAAACCCGATA
KKKAV PreGn	AGACTACATCTCCGCCTAAT	AAGTCTCGCTACTCATTTC
KKKAV PreGc	AATGGTCTCACTCCAGAAAC	ATAATCTCAGGAGGGAGCTT

**Tablo 3.4 :** Koloni PZR için reaksiyon koşulları.

Döngü	Faz	Sıcaklık	Süre
1	Başlangıç denatürasyonu	95 °C	5 dakika
34	Denatürasyon	95 °C	15 saniye
34	Bağlanma	54 °C	30 saniye
34	Uzama	72 °C	30 saniye
34	Son uzama	72 °C	5 dakika

#### 3.4.4 Agaroz Jel Elektroforezi

PZR ve restriksiyon endonükleaz kesim ürünlerinin görüntülenmesi agaroz jel elektroforezinde yapılmıştır. Öncelikle ürünler 6x yükleme boyası ile karıştırılıp jelle 10’ar µL olacak şekilde yüklenmiştir . Elektroforez, 120 volt ve 400 Amperlik bir akım kullanılarak 30 dakika boyunca gerçekleştirilmiştir.

### **3.4.5 Bakteri Stoklanması**

Transformasyon sonucu hedef geni barındıran koloniler, antibiyotikli sıvı LB besiyerinde 37°C'de 250 devirde gece boyu inkübe edilmiştir. Bir sonraki gün büyüyen bakteri süspansiyonu %30'u gliserol olan LB sıvı besiyeri içerisinde 1:1 oranında karıştırılarak -80 C'de stok olarak saklanmıştır.

### **3.4.6 Plazmid DNA İzolasyonu**

Transformasyon sonucu pozitif olan koloniler, 5 ml'lik selektif antibiyotikli LB sıvı besiyerinde gece boyu büyümeye bırakılmıştır. 12-14 saat sonra bakteri kültüründen plazmid DNA izolasyonu IntronBio DNA-spin™ Plazmid DNA Pürifikasyon Kiti kullanılarak yapılmıştır (INTRON Biotechnology Inc, Korea). Kitteki talimatlara göre gerçekleştirilen DNA izolasyonunda öncelikle bakteri kültürü 10000 devirde 10 dakika santrifüjlenerek toplanmıştır. Süpernatant uzaklaştırılıp bakteri peletlere 300 µl resüpsiyon solüsyonu eklenerek iyici çözdürülmüştür. Ardından 300 µl liziz solüsyonu bakteri pelet süspansiyonunun üzerine eklenerek vortekslenmeden 10 defa alt üst edilip üç dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Liziz aşamasının ardından 350 µl nötralizasyon solüsyonu eklenerek karışım 5 dakika buz üzerinde inkübe edilmiştir. 13000 devirde ve +4°C'de 10 dakika boyunca santrifüjlenen karışımın süpernatantı kit içerisinde mevcut olan, DNA bağlama kapasitesi yüksek olan kolonlara eklenmiştir. Yıkama işlemlerinin ardından kolonlarda tutunan DNA, kolona MGW eklenmesiyle elüe edilmiştir. Absorbansa dayalı miktar tayini yapılan plazmit DNA sonraki deneylerde kullanılmak üzere - 20°C'de saklanmıştır.

### **3.4.7 Restriksiyon Endonükleaz Kesim Reaksiyonu**

Transformasyon sonrasında pozitif kolonilerden elde edilen plazmid DNA restriksiyon endonüklazları kullanılarak yapılan kesim reaksiyonu ile doğrulanmıştır. 1 µg plazmid DNA'yı kesmek için, 0.2 µl *NdeI* (10U/µl) enzimi ile 10X enzim tampon solüsyonu (CutSmart® Tampon, New England Biolabs, Inc.) toplamda 20 µl hacminde karıştırılarak 37°C'de 1 saat boyunca inkübe edilmiştir.

Transfeksiyonda kullanılmak üzere KKKAV NP, KKKAV PreGn , KKKAV PreGc kodlayan plazmitler *XhoI* enzimi ile transfeksiyonun etkinliğinin kontrolünde kullanılan pcDNA 3eGFP plazmidi *BglII* enzimi ile kesilerek lineer hale getirilmiştir. 10 µg plazmid DNA 20U enzim ile 10X enzim tampon solüsyonu (CutSmart® Tampon, New England Biolabs, Inc.) içerisinde toplamda 100 µl hacminde karıştırılarak 37°C'de 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Kesim ürünleri agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiştir.

### **3.4.8 Hücre Kültürü**

KKKAV NP, Gn ve Gc genlerinin memeli hücrelerde ekspresyonu için insan hepatoma hücrelerinden türetilmiş bir hücre hattı olan Huh-7 hücreleri kullanılmıştır.

#### **3.4.8.1 Huh-7 hücrelerinin hazırlanması**

Huh-7 hücreleri, Dulbecco'nun modifiye medyumunda (DMEM) (Gibco by Life Sciences, EU Approved (Hollanda)), %10 fetal sığır serumu (FBS) (Gibco by Life Sciences, EU Approved (Güney Amerika) ve %1 Penicillin/Streptomycin (PES) (Gibco by Life Technologies, Paisley, Birleşik Krallık) içeren vasat içerisinde 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübe edilerek kültürlenmiştir. Hücrelerin yoğunlukları %60-70 arasında tutularak her 2-3 günde bir vasatları yenilenmiştir. Hücreler %80 doluluk oranına ulaştıklarında Tripsin-EDTA(Gibco by Life Sciences, EU Approved (Hollanda)) ile kaldırılarak deneyin amacına göre pasajlanmıştır.

### **3.4.9 Antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi**

#### **3.4.9.1 Öldürme eğrisi analizi**

KKKAV NP, PreGn ve PreGc proteinlerini üreten stabil hücre hatları, transfeksiyonla hücrelere verilen plazmitlerdeki selektif antibiyotiklerle geliştirilmiştir. Bu amaç için öncelikle hücrelerin hygromycin B, puromisin ve G418 sülfat antibiyotiklerine karşı optimal antibiyotik konsantrasyonu belirlenmiştir. Hücreler 96 kuyulu plakanın her bir kuyusunda 3000 hücre olacak şekilde pasajlanarak bir gece 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde büyütülmüştür. Ertesi gün hücrelerin vasatı uzaklaştırıp sırasıyla eski medyum uzaklaştırılmıştır ve hücreler iki kez DPBS ile yıkanmıştır.

0, 0.2, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 1 mg/ml G418 sülfat; 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1 mg/ml Hygromisin B ve 0, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3 µg/ml puromisin (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, USA) içeren hücre vasatları çift kuyulara sırasıyla eklenmiştir. Negatif kontrol olarak tasarlanan kuyulardaki hücelere antibiyotik içermeyen vasatlar eklenmiştir. Hücrelerin iki günde bir medyumları değiştirilerek farklı konsantrasyonlardaki antibiyotiklerin hücelere etkisi mikroskop altında incelenmiştir. Yedi gün antibiyotik uygulanmasının ardından her bir antibiyotik için optimal doz hem mikroskopik gözlemlerle hem de MTT hücre canlılığı analizi ile belirlenmiştir.

#### **3.4.9.2 MTT analizi**

MTT analizi, hücre metabolik aktivitesini değerlendirmek için kullanılan kolorimetrik bir yöntemdir. Bu analiz, sarı tetrazolium tuzunun (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür veya MTT) metabolik olarak aktif hücreler tarafından mor renkli formazan kristallerine indirgenmesine dayanmaktadır. MTT analizi için 96 kuyulu pleytlere ekilerek ödürme eğrisi deneyi gerçekleştirildi. Bir hafta sonra stok konsantrasyonu 5 mg/ml olan MTT solüsyonundan her bir kuyuya 50'şer µl eklenmiştir. 37°C'de 4 saat inkübasyonun ardından kuyulardaki vasat dikkatlice çekilerek 100'er µl DMSO solüsyonu eklenerek 595 nm'deki absorpsiyon değeri ölçülmüştür.

#### **3.4.10 Transfeksiyon**

KKKAV NP, PreGn ve PreGc proteinlerini kodlayan genleri içeren plazmidler transfeksiyon ile Huh-7 hücrelerine aktarılmıştır. Polyethyleneimine(PEI) ve Lipofectamine™ gibi transfeksiyon ajanları kullanılarak hücelere gen aktarımı gerçekleştirilmiştir. PEI ile transfeksiyonda, PEI'nin lineer formu kullanılmıştır. Transfeksiyondan bir gün önce hücreler 6 kuyulu pleyte kuyu başı 500.000 hücre olacak şekilde pasajlanıp 37 ° C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübe edilmiştir. Deneye başlamadan önce %70-80 dolulukta hücelerde bulunan FBS'li vasat uzaklaştırıp hücreler 3 kez DPBS ile yıkanarak her kuyuya 2 ml yalnızca DMEM içeren medyum eklenmiştir. PEI ile transfeksiyon, yeşil floresan proteini kodlayan eGFP genini içeren pcDNA 3.1 eGFP vektörü kullanılarak optimize edilmiştir.

Bunun için kuyu başı 4 µg plazmit DNA ile 12 µg PEI karıştırılıp hızlıca vortekslenerek 30 dakika oda ısısında bekletilmiştir. DNA:PEI karışımı hücrelere yavaş yavaş eklenerek 4 saat 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> ile inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından hücrelerin vasatları aspire edilerek hücrelerin normal kültürlenmesinde kullanılan FBS ile desteklenmiş DMEM medyumuna eklenmiştir. Bir diğer yöntem olan katyonik özellikli transfeksiyon ajanı olan Lipofectamine™ (Invitrogen, ABD) ile de hücrelere gen aktarımı yapılmıştır. Üretici firmanın talimatları uygulanarak transfeksiyon tamamlanmıştır.

#### **3.4.11 Hücrelerin antibiyotik ile seleksiyonu**

KKKAV NP, PreGn ve PreGc genlerini içeren plazmitler transfeksiyon ile Huh-7 hücrelerine aktarıldıktan 72 saat sonra hücrelerin vasatları öldürme eğrisi deneyi ile belirlenen optimal antibiyotik konsantrasyonunu içeren vasatlarla değiştirilmiştir. Her üç günde bir hücrelerin vasatları antibiyotikli vasatla değiştirilerek transfekte olan ve olmayan antibiyotik direnç geni barındıran hücrelerin seleksiyonu yapılmıştır. Dirençli olan hücreler 96 kuyulu pleytte tek hücreye düşürülerek tek bir hücreden üreyen koloni oluşumları gözlenmiş ve koloniler büyütülerek transfeksiyonla aktarılan plazmidi sürekli olarak ifade eden stabil hücre hatları elde edilmiştir.

#### **3.4.12 Stabil hücrelerin doğrulanması**

Spesifik antibiyotiklere dirençli olan hücreler hedef gene spesifik primerlerin kullanıldığı PZR ile genomik düzeyde doğrulanmıştır.

##### **3.4.12.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu**

Stabil hücreler T-25'lik flasklarda %80 doluluğa sahip olan hücreler 3000 devir 3 dakika santrifüjlenip toplanarak Qiagen DNeasy Blood & Tissue kiti ile genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen genomik DNA'lardan hedef genin varlığı gene özel tasarlanan Tablo 3.3'de gösterilen primerler kullanılarak PZR ile doğrulanmıştır. 500 ng kalıp DNA, 1 µL 1 µM ileri ve geri primer, 1 µL 10 µM dNTP, 2,5 µl 10X PCR Tamponu, 0,75 µl 25mM MgCl<sub>2</sub> ve en son 0,125 µl Taq polimeraz eklenerek Tablo 3.5'de belirtilen koşullarda PZR reaksiyonu kurulmuştur.

**Tablo 3.5 :** Genomik DNA'dan yapılan polimeraz zincir reaksiyonunun koşulları.

Döngü	Faz	Sıcaklık	Süre
1	Başlangıç denatürasyonu	95 °C	30 saniye
35	Denatürasyon	95 °C	15 saniye
35	Bağlanma	53 °C	30 saniye
35	Uzama	68 °C	30 saniye
35	Son uzama	68 °C	5 dakika

### 3.4.13 Gen ekspresyon analizi

KKKAV NP, PreGn ve PreGc proteinlerinin stabil hücrelerdeki ekspresyonu mRNA düzeyinde gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) ile gösterilmiştir. Bu amaç için öncelikle total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapılmıştır.

#### 3.4.13.1 RNA izolasyonu

Hücrelerden total RNA izolasyonu Zymo Direct-zol™ RNA MiniPrep kiti ile yapılmıştır. T-25'lik flasklarda büyütülen hücreler %80-90 doluluk oranına ulaştınca Tripsin-EDTA ile toplanmıştır. Ardından hücre peleti 3 kez DPBS ile 14.000 devir 5 dakika santrifüjlenip yıkanarak 300 µl DPBS eklenip iyice vortekslenmiştir. Hücre lizatının üzerine 600 µl Trizol solüsyonu eklenip santrifüjlenmiştir. Tüm santrifüj işlemleri 13.000 devir 30 saniye oda ısısında gerçekleştirilmiştir. Süpernatantlar yeni RNase içermeyen mikrosantrifüj tüplerine aktararak tüplerin üzerine örneklerin hacmi kadar %96'lık etanol eklenip kitin geliştirdiği RNA bağlayan kolonlara aktarılmıştır. Yıkama ve DNase uygulamalarından sonra kolondaki ürün 30 µl MGW ile elüe edilerek Nanodrop™ cihazı ile miktarı tayin edilmiştir. Elde edilen RNA -80°C'de muhafaza edilerek kullanılmıştır.

#### 3.4.13.2 cDNA Sentezi

Total RNA izolasyonunun ardından Applied Biosciences High Capacity cDNA sentez kiti ile RNA cDNA'ya çevrilmiştir. Bu amaçla 2 µg RNA, 2 µl 10X random primer, 2 µl 10X RT buffer, 0.8 µl 25X dNTP, 1µl revers transkriptaz enzimi ile son hacim 20 µl olacak şekilde MGW eklenerek reaksiyon kurulmuştur.

Sırasıyla 25°C’de 10 dakika, 37°C’de 120 dakika, 85°C’de 5 saniye inkübe edilecek şekilde reverse transkripsiyon reaksiyonu başlatılmıştır. Elde edilen cDNA Nanodrop™ cihazı ile ölçülerek -80°C’de muhafaza edilmiştir.

#### **3.4.13.3 RT-PZR reaksiyonunun kurulması**

Stabil hücrelerden elde edilen cDNA örnekleri Bioline SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kiti kullanılarak RT-PZR’da analiz edilmiştir. 1 µg cDNA örnekleri 10 µl 2x SensiFAST SYBR® No-ROX karışımı, 0.8 µl 10µM ileri ve geri primer ve son hacim 20 µl olacak şekilde karıştırılarak reaksiyon kurulmuştur. RT-PZR reaksiyonunda hem hedef gene spesifik primerler hem de housekeeping gen olarak kullanılan GAPDH genine spesifik primerler kullanılmıştır. Polimeraz aktivasyonu 95°C’de 2 dakikada, 40 döngü olacak şekilde; denatürasyon 95°C’de 2 saniye, primer bağlanması 56°C’de 15 saniye ve uzama 72°C’de 20 saniye de gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar eşik değeri 0.03 olacak şekilde baz alınarak analiz edilmiştir.

#### **3.4.14 Protein İzolasyonu ve Analizi**

KKKAV NP, PreGn ve PreGc proteinleri stabil olarak eksprese eden hücrelerden Thermo Scientific Pierce RIPA Liziz solüsyonu ile yapılmıştır. T-75’lik flaklarda büyütülen hücrelerin vasatları dikkatli bir şekilde uzaklaştırılıp 3 kez soğuk DPBS ile yıkanmıştır. Hücrelerin üzerine 1 ml proteinaz inhibitörü eklenmiş soğuk RIPA buffer eklenerek 15 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. Ardından hücre sıyrıcı ile hücreler toplanarak 4°C’de 14.000 devirde 15 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Santrifüjün ardından süpernatant alınıp Nanodrop™ cihazı ile protein miktarı tayin edilerek sonraki deneylerde kullanılmak üzere -20°C’de muhafaza edilmiştir.

##### **3.4.14.1 Western Blotlama**

Stabil hücrelerden izole edilen proteinler, Western blot analizi ile her bir proteine özgü ticari antikolar kullanılarak tespit edilmiştir. Bu amaçla analiz edilecek proteinler öncelikle SDS-PAGE’de yürütülmüştür. Bunun için örnekler 1:1 oranında SDS örnek hazırlama solüsyonu ile karıştırılıp 95°C’de 10 dakika kaynatılmıştır. SDS-PAGE için örnekler 20 µl hacimde SDS jel kuyularına yüklenerek 50V 40 dakika, 200V 40 dakika boyunca yürütülmüştür. Örnekler ek olarak proteinin boyutlarını görebilmek için ilk

kuyuya 3 µl ticari protein markeri da yüklenmiştir. SDS-PAGE tamamlandıktan sonra jel bir nitroselülöz membrana Biorad Mini Trans-Blot® Elektroforetik Transfer Sistemi ile transfer edilmiştir. 100V 1 saatlik transferin ardından membran %5 süt tozu solüsyonu ile 2 saat oda ısısında bloklamaya bırakılmıştır. Proteinler ticari olarak temin edilen KKKAV NP 9D5 (BEI, NR40270) ve 2B11(BEI, NR40257), KKKAV PreGn 13G8(BEI, NR40294) ve (BEI, NR40281), KKKAV PreGc ise 11E7(BEI, NR40277) monoklonal antikorlarının kullanıldığı birincil antikorlar üretici firmanın önerdiği dilüsyonlarda %5'lik süt tozu solüsyonunun içerisinde hazırlanıp membrana eklenerek gece boyu +4 °C'de inkübe edilmiştir. Ertesi gün membran 3 kez 5'er dakika TBST solüsyonu ile yıkanarak %5'lik süt tozu içerisinde uygun dilüsyonla hazırlanmış ikincil antikorla 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İkincil antikorun horseradish peroxidase (HRP) enzimi ile konjuge halde bulunması, western blot görüntüleme solüsyonu ECL'de bulunan luminol ile enzim-substrat reaksiyonu gerçekleştirmesini ve proteinlerin kemilüminesans aracılı görüntülenmesini sağlamaktadır. Sekonder antikor inkübasyonunun ardından membran 3 kez 5'er dakika TBST solüsyonu ile yıkanarak Fusion FX Solo cihazında görüntülenmiştir.

#### **3.4.14.2 Enzim İmmunoassay(EIA)**

Hücrelerden izole edilen ve miktarı belirlenen proteinler EIA için kuyu başı 500 µg protein olacak şekilde EIA kaplama solüsyonu içerisinde seyreltilerek 96 kuyulu pleytin her bir kuyusuna 100'er µl dağıtılarak + 4 °C'de gece boyu inkübe edilmiştir. Ertesi gün pleytteki antijenler aspire edilerek her kuyuya 200 µl %5 süt tozu içeren bloklama solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 2 saat bekletilmiştir. Ardından kuyulardaki solüsyon aspire edilerek 3 kez 200 µl PBST eklenerek kuyular yıkanmıştır. Birincil antikor olarak kullanılacak KKKAV NP 9D5 (BEI, NR40270) ve 2B11(BEI, NR40257), KKKAV PreGn 13G8(BEI, NR40294) ve (BEI, NR40281), KKKAV PreGc ise 11E7(BEI, NR40277) monoklonal antikorlar EIA bloklama solüsyonunun 1:1000 dilüsyonda hazırlanıp her kuyuya 100'er µl eklenerek 1 saat 37°C'de bekletilmiştir. İnkübasyonun ardından kuyulardaki bağlanmayan antikorlar 3 kez 200 µl PBST eklenerek iyice yıkanmıştır. İkincil antikor olarak kullanılan anti-mouse IgG HRP antikoruna EIA bloklama solüsyonu içerisinde 1:3000 dilüsyonda

hazırlanarak 100'er µl olacak şekilde kuyulara eklenerek 1 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Ardından pleyt aynı şekilde tekrar 3 defa PBST ile yıkanarak sekonder antikordaki HRP ile reaksiyona girecek TMB'den 100'er µl her bir kuyuya eklenmiştir. HRP-TMB reaksiyonundan oluşan kolorometrik değişim takip edilerek 5 dakika sonra durdurma solüsyonu olan 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> her bir kuyuya 100 µl olacak şekilde eklenmiştir. Pleytteki renk değişimi iMark™ Microplate Absorbance Reader cihazında 450 nm dalga boyunda ölçülerek analiz edilmiştir.

#### **3.4.14.3 İmmünfloresans Yöntemi (İFA)**

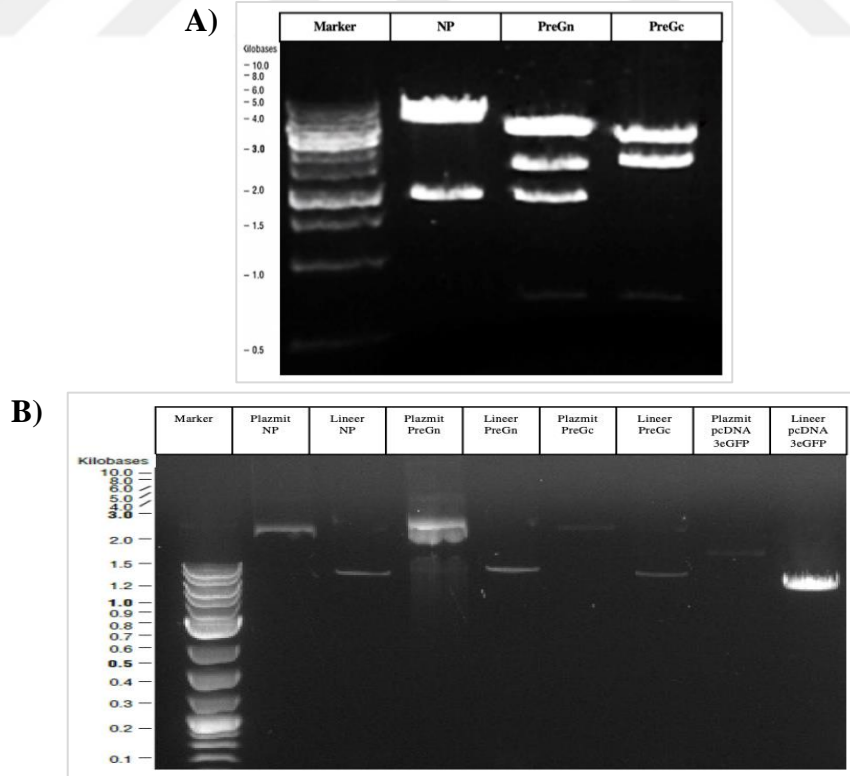
Üretilen proteinlerin hücre içerisindeki lokalizasyonu immünfloresans yöntemi ile gösterilmiştir. Bu amaçla hücreler öncelikle 24 kuyulu pleytte kuyu başı 200.000 hücre olacak şekilde pasajlanmıştır. Bir gün sonra hücrelerin dolulukları kontrol edilerek hücre vasatı aspire edilip hücreler 3 kez PBS ile yıkayıp 500 µl 4% paraformaldehit (pH 7.4) her bir kuyuya eklenerek 37°C'de 10 dakika bekletilmiştir. Ardından paraformaldehit uzaklaştırılıp hücreler 3 kez PBS ile yıkanarak 500 µl 0.1% Triton X-100 permabilizasyon solüsyonu eklenerek 15 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir. Triton içeren solüsyon 3 kez PBS yıkamalarıyla uzaklaştırılıp her kuyuya 500 µl %2 BSA solüsyonu eklenerek oda ısısında 1 saat bloklamaya bırakılmıştır. Ardından hücreler 1 kez PBS ile yıkanarak %0.1 BSA içerisinde hazırlanan birincil antikor eklenerek 1 saat oda ısısında inkübe edilmiştir. Birincil antikordan sonra ikincil antikor da hücrelerin 3 kez PBS ile yıkanmasının ardından eklenerek karanlık bir ortamda 45 dakika bekletilmiştir. İkincil antikor inkübasyonunun ardından hücreler tekrar 3 kez PBS ile yıkayıp her kuyuya 500 µl PBS eklenerek Biotek Cytation 5 cihazı ile görüntülenmiştir.

## 4.BULGULAR

### 4.1 Plazmit Tasarımı ve Doğrulama

#### 4.1.1 Ekspresyon plazmitlerinin doğrulanması

Ticari olarak elde KKKAV nükleoprotein ve glikoproteinlerini eksprese eden plazmitler *NcoI* ve *NdeI* restriksiyon endonükleazının kullanıldığı kesim reaksiyonu ile boyut temelli olarak doğrulanmıştır. KKKAV NP kodlayan plazmit *NcoI* ile kesilerek 6323 bp ve 1940 bp boyutunda iki bant elde edilmiştir. KKKAV PreGn kodlayan plazmit *NdeI* enzimi ile kesildiğinde 4109 bp, 3278 bp, 1942 bp ve 676 bp boyutunda DNA parçaları elde edilmiştir. KKKAV PreGc ise *NdeI* enzimi ile kesildiğinde 4192 bp, 3449 bp ve 676 bp uzunluğunda DNA fragmentlerinin varlığı agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.1A). Transfeksiyonda kullanılmak üzere KKKAV NP, PreGn ve PreGc kodlayan plazmitler *XhoI* enzimi ile pcDNA 3eGFP plazmidi ise *BglII* enzimi ile tek bir noktadan kesilerek lineerize edilmiştir (Şekil 4.1B).



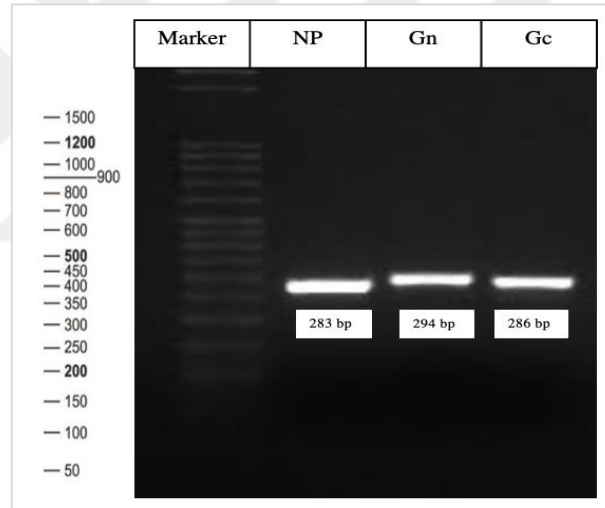
Şekil 4.1: Ekspresyon plazmitlerinin doğrulanması. KKKAV NP, PreGn ve PreGc proteinleri kodlayan plazmitlerim kesim reaksiyonları sonucunda oluşan ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

## 4.2 Bakteriyel Transformasyon

KKKAV Kelkit suşu NP, Gn ve Gc proteinlerini kodlayan plazmid DNA'lar *E.coli* DH5 $\alpha$  hücrelerine başarılı bir şekilde transforme edilmiştir. Ampisilin direnç geni içeren plazmid DNA'ları alan transforme bakteriler ampsilinli LB agarda büyütülerek seçilimi yapılmıştır.

### 4.2.1 Pozitif kolonilerin koloni PZR ile doğrulanması

Transformasyonun ardından ampisilili LB agarda kolonilerin hedef geni taşıyıp taşımadığı koloni PZR ile doğrulanmıştır. KKKAV NP, Gn ve Gc genlerine spesifik primerlerle yapılan PZR sonucucu Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2: Transformasyon sonrası seçilen kolonilerden yapılan PZR reaksiyon ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.

## 4.3 Hücre Kültürü ve Transfeksiyon

### 4.3.1 Hücrelerin antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi

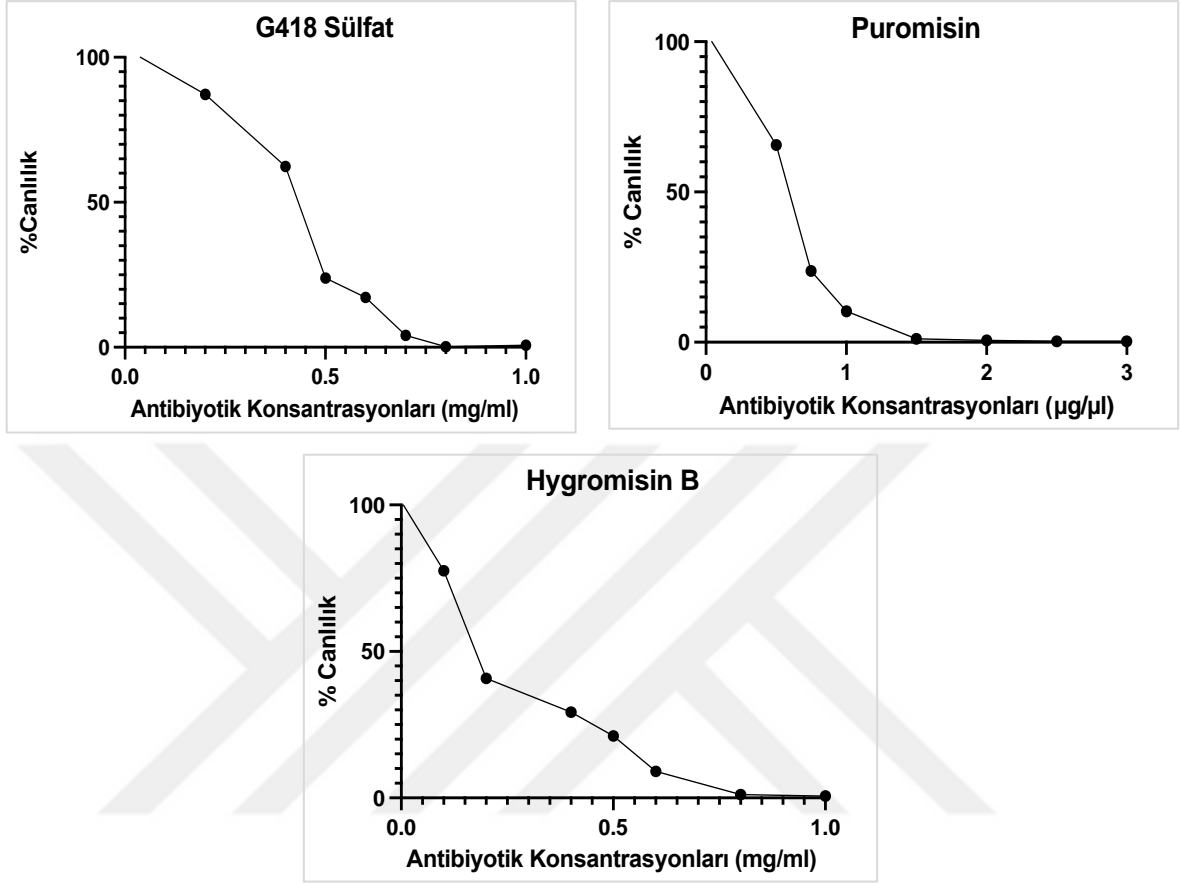
Stabil hücre hatları oluşturulmadan önce, hücreler için en uygun antibiyotik dozunun belirlenmesi amacıyla öldürme eğrisi analizi gerçekleştirilmiştir. G418 Sülfat, puromisin ve hygromycin B antibiyotikleri Huh-7 hücrelerine uygulanarak her bir antibiyotiğin düşük, optimum ve yüksek dozu belirlenmiştir.

Öldürme eğrisi analizlerinde düşük doz, hücelere minimal etki gösteren veya hüceleri minimal düzeyde inhibe eden, hücre canlılığının yüksek olduğu antibiyotik konsantrasyonunu ifade etmektedir. Diğer yandan, yüksek doz antibiyotikler hücelere belirgin derecede zarar veren toksik bir konsantrasyonu temsil etmektedir. Optimal doz ise hücre canlılığını en iyi şekilde korunduğu, hedeflenen seleksiyonun etkin bir şekilde gerçekleştirilebildiği kritik bir antibiyotik konsantrasyonunu ifade etmektedir. Her üç antibiyotüğün hücelere üzerindeki etkisi mikroskopik incelemeler ve MTT analizi ile değerlendirildi. Mikroskopik incelemelerde antibiyotik uygulanmasının ardından 1-2 gün sonra tüm hüceleri öldüren doz yüksek doz olarak tanımlanırken 7 gün antibiyotik uygulanmasının ardından hücre canlılığının bulunduğu doz düşük doz olarak belirlenmiştir. Optimal doz ise ilk 3 günde hücelerin yarısını, 7 günün sonunda ise hücelerin tamamını öldüren antibiyotik dozu olarak seçilmiştir (Tablo 4.1).

**Tablo 4.1:** Mikroskopik gözlemler sonucunda Huh-7 hüceleri için her bir antibiyotüğün düşük, optimal ve yüksek olarak belirlenen doz miktarları.

	<b>Düşük Doz</b>	<b>Optimal Doz</b>	<b>Yüksek Doz</b>
<b>G418 Sülfat</b>	0.3 mg/ml	0.8 mg/ml	1.5 mg/ml
<b>Puromisin</b>	0.5 µg/ml	1.5 µg/ml	2.5 µg/ml
<b>Hygromisin B</b>	0.3 mg/ml	0.8 mg/ml	1.5 mg/ml

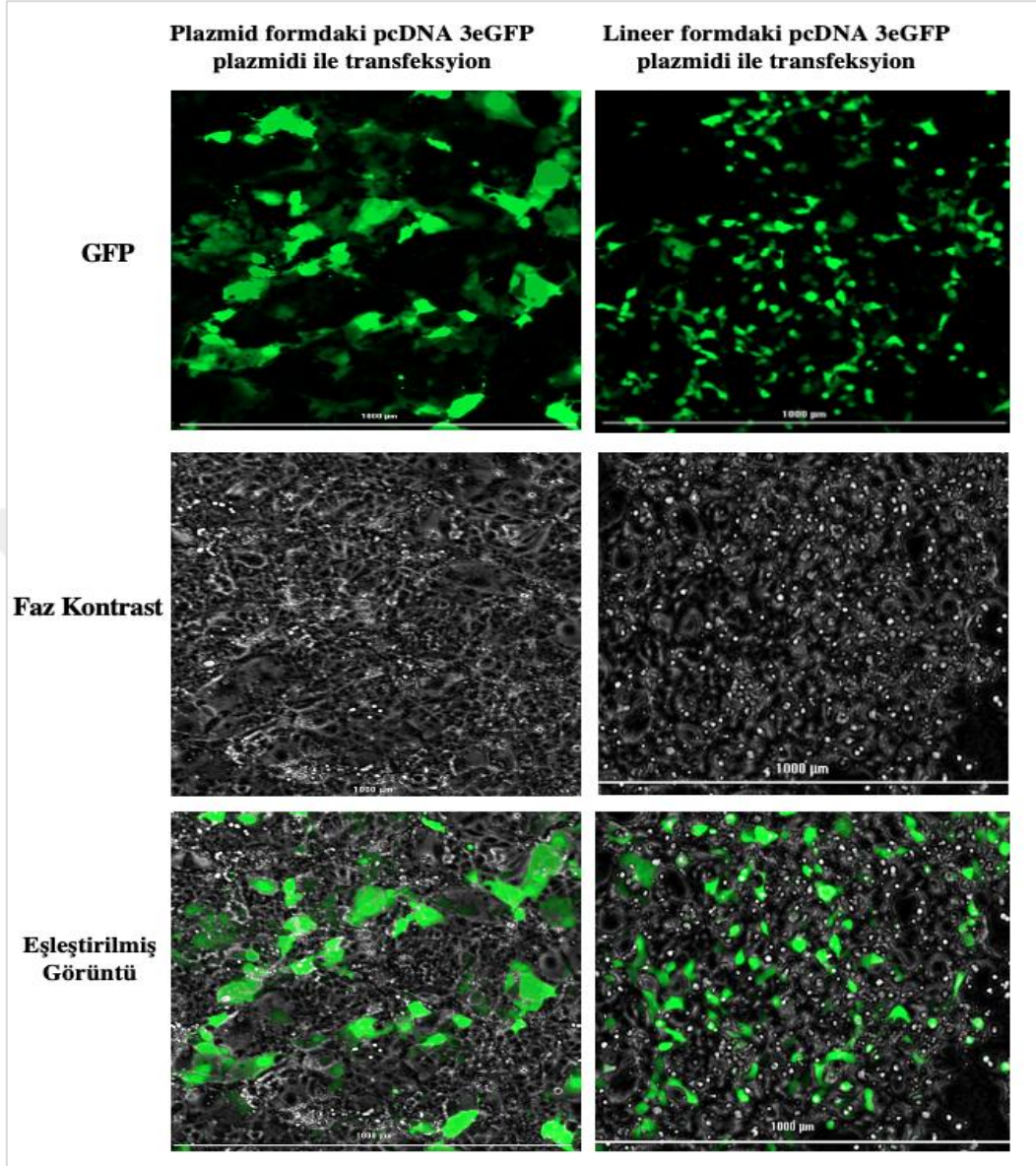
Mikroskopik gözlemler sonucunda belirlenen antibiyotik dozları MTT analizi ile doğrulanarak analiz sonuçları Şekil 4.3'de gösterilmiştir. G418 Sülfat için düşük doz uygulamasında (0.3 mg/ml) hücelerde minimal etki gözlenirken, optimal dozda (0.8 mg/ml) hücre ölüm oranının arttığı ve yüksek dozda (1.5 mg/ml) toksisitenin belirginleştiği gözlemlenmiştir. Puromisin için düşük doz uygulamasında (0.5 µg/ml) hücelerde canlılık oranının yüksek olduğu gözlenirken, optimal dozda (1.5 µg/ml) hücre ölüm oranının arttığı ve yüksek dozda (2.5 µg/ml) ise toksisitenin arttığı gözlemlenmiştir. Hygromisin B'de ise düşük doz uygulamasında (0.3 mg/ml) hücelere etkisinin sınırlı olduğu, optimal dozda (0.8 mg/ml) etkinin arttığı ve yüksek dozda (1.5 mg/ml) toksisitenin belirginleştiği gözlenmiştir.



**Şekil 4.3 :** Antibiyotik öldürme eğrisi analizinin MTT testi ile değerlendirilmesi. Her bir antibiyotik için uygulanan antibiyotik öldürme eğrisi analizinin MTT testi kantitatif olarak değerlendirilmiştir.

#### 4.3.2 Transfeksiyon

KKKAV NP, PreGn ve PreGc proteinlerini üreten plazmit ve lineer formdaki DNA'lar ve transfeksiyonun etkinliğini göstermek yeşil floresan proteini kodlayan, plazmid ve lineer formdaki pcDNA 3eGFP ekspresyon vektörü hücelere başarılı şekilde transfekte edilmiştir. Transfeksiyonun etkinliğini göstermek için kullanılan yeşil floresan proteine ait ışımalar Şekil 4.4'de gösterilmiştir. Transfeksiyondan 24 saat sonra yapılan görüntülemelerde plazmid ve lineer formdaki pcDNA 3eGFP ile aynı koşullar altında transfekte edilen hücelerdeki yeşil floresan proteinin ekspresyonları arasında büyük bir fark görülememiştir. Transfeksiyonun başarısı %70-80 olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.4).

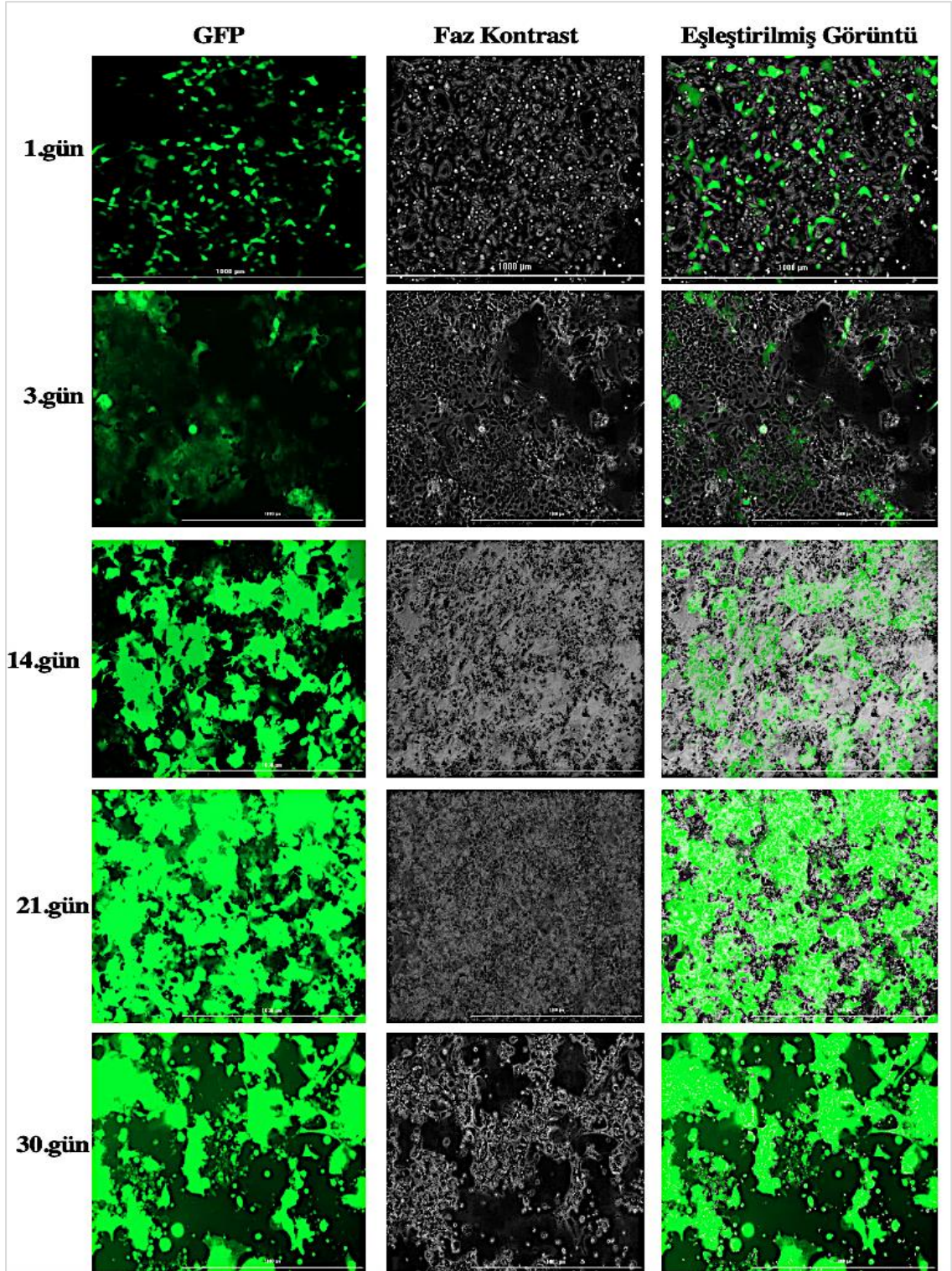


**Şekil 4.4:** Transfeksiyon etkinliğinin yeşil floresan protein ile gösterilmesi. Lineer ve plazmit formdaki pcDNA 3 eGFP plazmidi ile yapılan transfeksiyonların etkinliğinin yeşil floresan protein ışımalarının transfeksiyondan 24 saat sonra görüntülenmesi ile kıyaslanması.

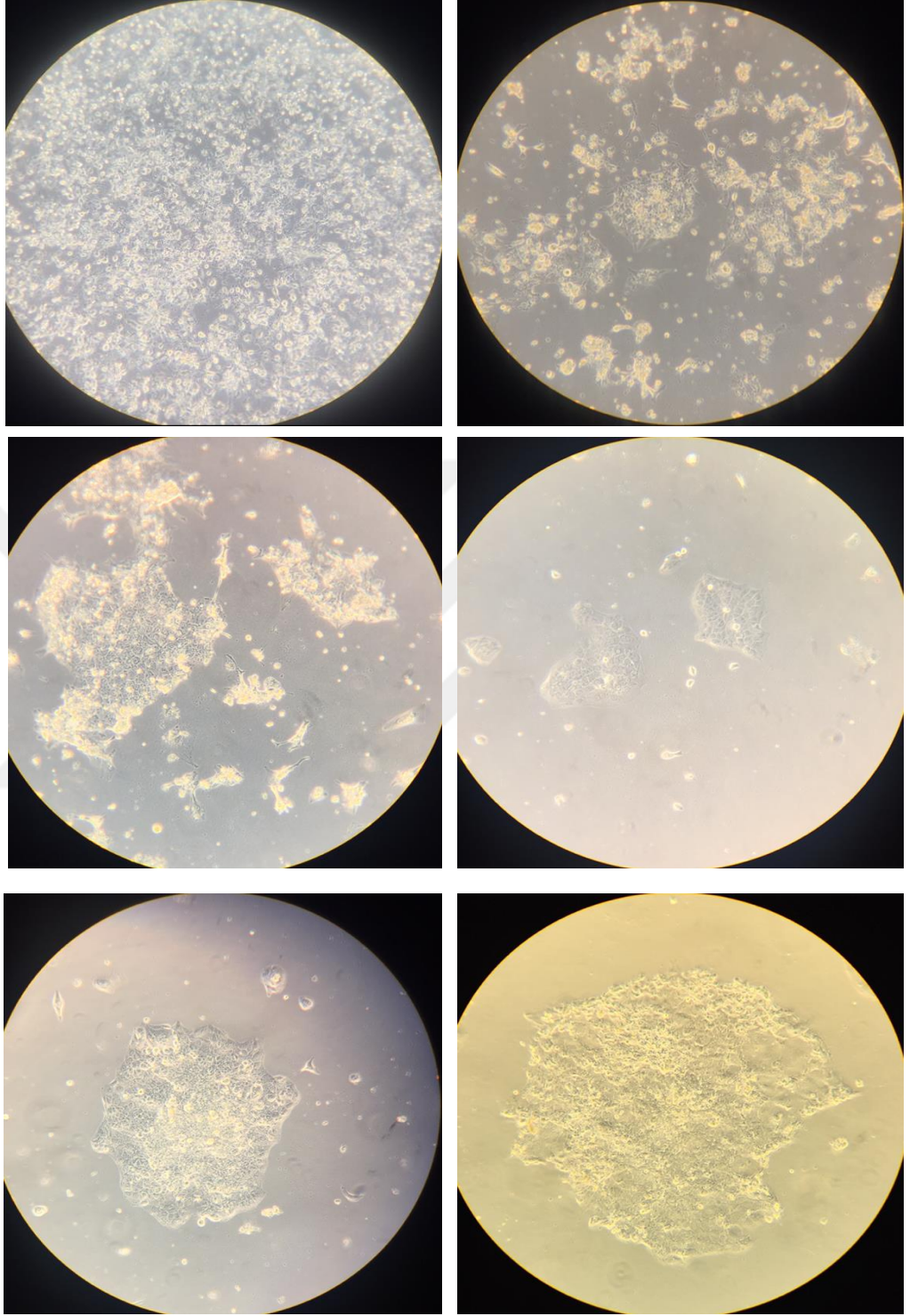
#### **4.4 Stabil Hücrelerin Oluşturulması ve Doğrulanması**

##### **4.4.1 Hücrelerin transfeksiyon sonrası antibiyotik seleksiyonu**

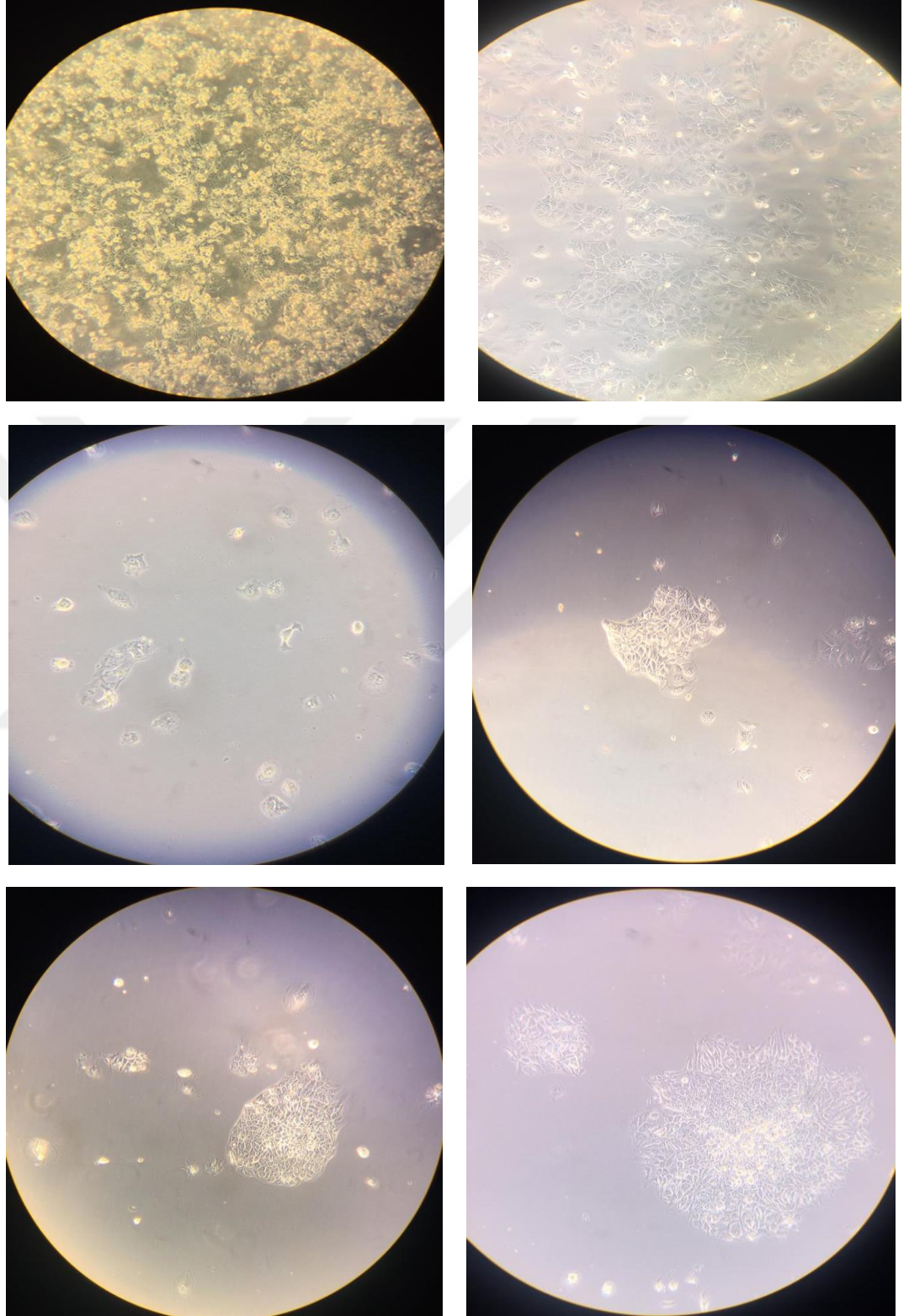
Transfeksiyonun ardından transfekte olan hücreler transfekte olmayan hücrelerden her bir plazmidin taşıdığı antibiyotik direnç geni ile seçilmiştir. Antibiyotik öldürme eğrisi analizinin ardından KKKAV NP proteinini eksprese eden transfekte hücreler 0.8 mg/ml G418 Sülfat antibiyotik içeren medyumla seleksiyonu 8 haftanın sonunda tamamlanmıştır (Şekil 4.6). KKKAV PreGn proteinini eksprese eden transfekte hücreler 0.8 mg/ml hygromycin B içeren medyumla koloni oluşumları gözlenene kadar muamele edilmiştir (Şekil 4.7). KKKAV PreGc proteinini eksprese eden hücreler ise 1.5 µg/ml puromisin içeren medyumla seleksiyonu tamamlanmıştır (Şekil 4.8). Antibiyotik seleksiyonu 8 hafta sonunda tamamlanarak yalnızca istenen proteini eksprese eden hücrelerden oluşan koloniler elde edilmiştir. Bu plazmitlerin yanı sıra stabil hücrelerin seleksiyonu G418 sülfat direnç geni taşıyan pcDNA 3eGFP plazmidini ile transfekte edilen hücrelerin seleksiyonunun farklı zamanlardaki yeşil floresan proteinin görüntülenmesi ile de gösterilmiştir. Farklı zamanlarda alınan görüntülerden transfekte olmayan hücrelerin zamanla öldüğü, yalnızca transfekte olan ve GFP ışığı veren hücrelerin antibiyotik uygulanmasının ardından canlılığına devam ettiği görülmüştür (Şekil 4.5).



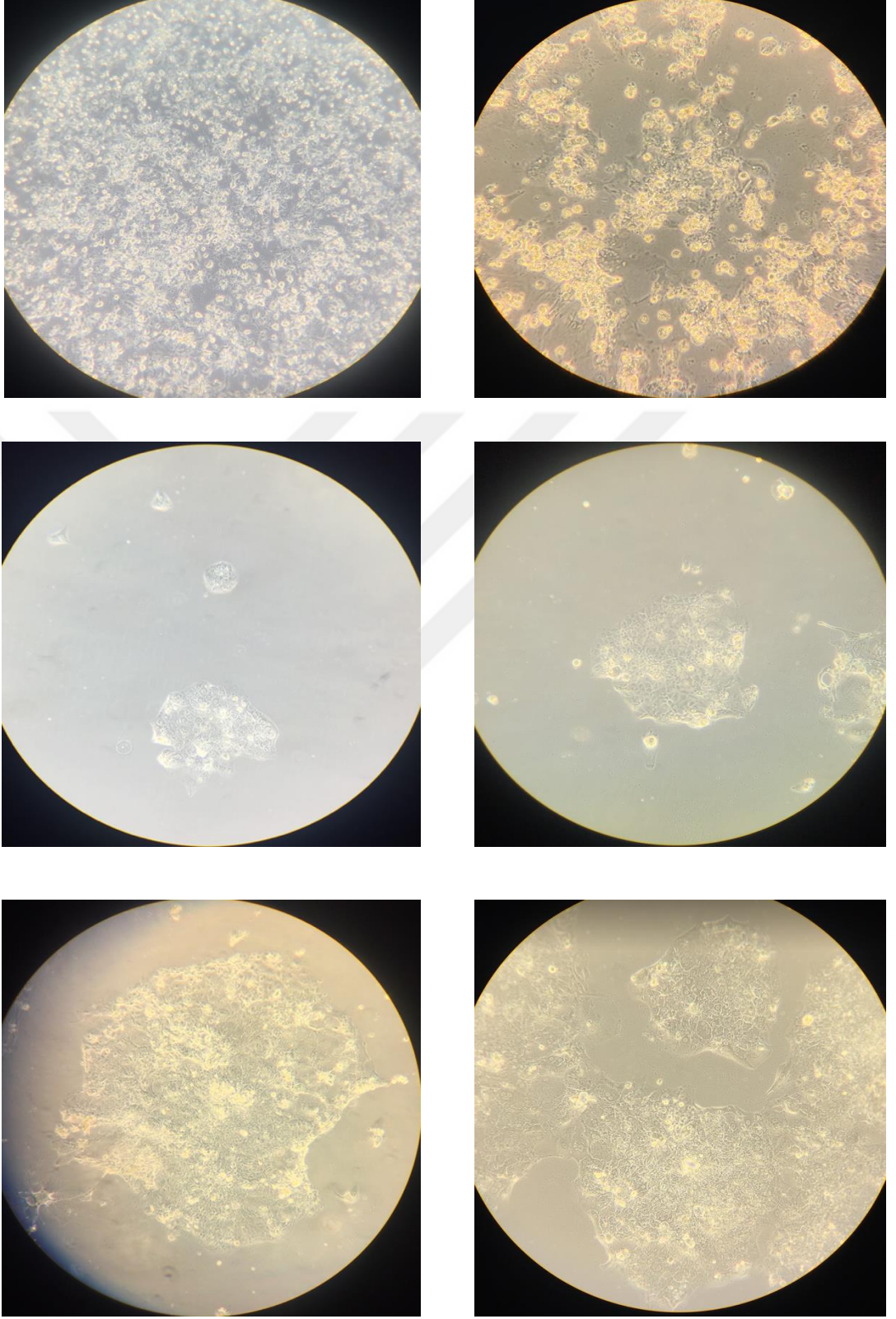
**Şekil 4.5:** pcDNA 3 eGFP plazmidinin stabil hale getirilmesi. 0.8 mg/ml G418 sülfatlı medyum ile yapılan seleksiyonun stabil hale getirilen hücrelerin farklı günlerdeki GFP ışımalarının gösterimi.



**Şekil 4.6:** KKKAV NP ile transfekte stabil hücrelerin oluşumu. KKKAV NP ile transfekte edilen Huh-7 hücrelerinin 0.8 mg/ml G418 sülfat antibiyotiği ile seleksiyonu sonucunda zamanla kolonilerin oluşumu.



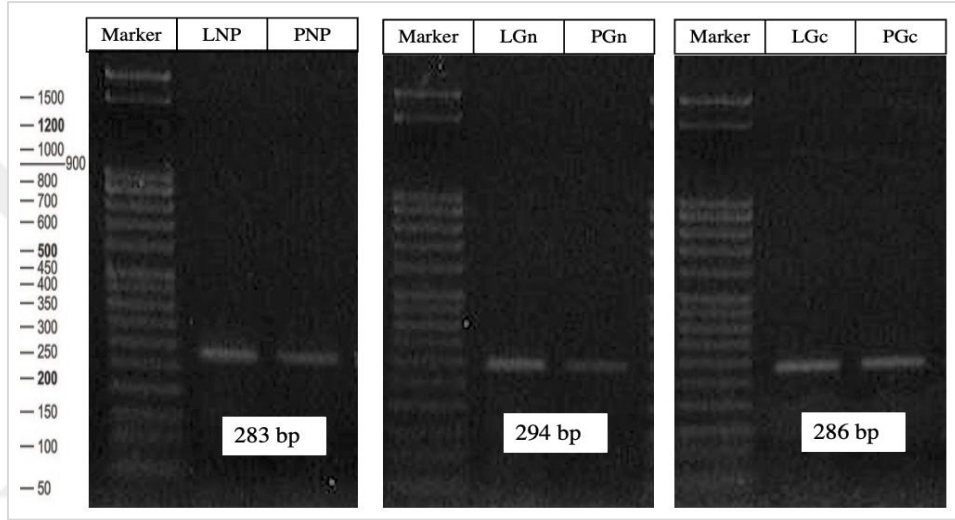
**Şekil 4.7:** KKKAV PreGn ile transfekte edilen Huh-7 hücrelerinin 0.8 mg/ml hygromisin B'de antibiyotiği ile seleksiyonu sonucunda zamanla kolonilerin oluşumu.



**Şekil 4.8:** KKKAV PreGc ile transfekte edilen Huh-7 hücrelerinin 1.5 µg/ml puromisin antibiyotiği ile seleksiyonu sonucunda zamanla kolonilerin oluşumu.

#### 4.4.2 Stabil hücrelerin genomik düzeyde PZR ile doğrulanması

Antibiyotik seleksiyonu ile seçilen hücrelerden genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Hedef genlere özgü primerlerle genomik DNA'lardan yapılan polimeraz zincir reaksiyonu ile hedef genlerin genomik DNA'ya entegre olduğu doğrulanmıştır (Şekil 4.9).

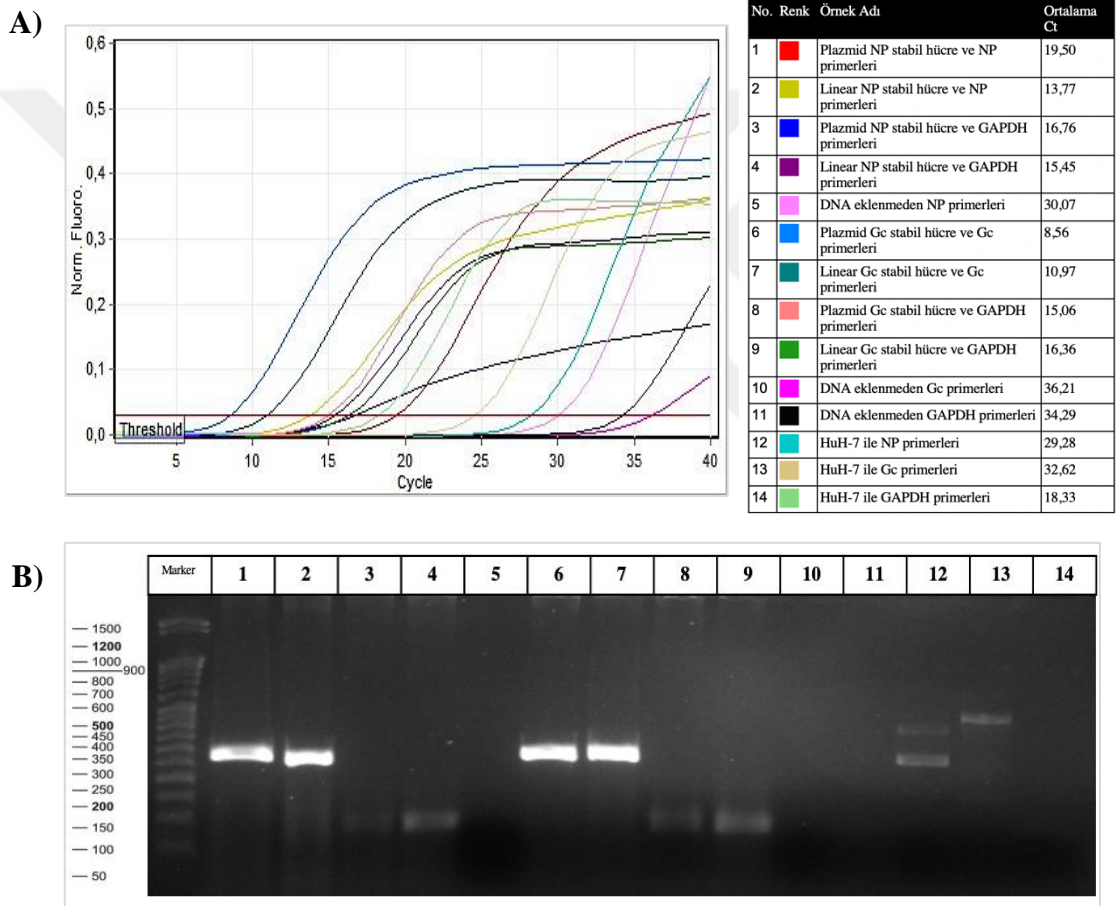


**Şekil 4.9 :** Stabil hücrelerin genomik DNA'sından yapılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. LNP:KKKAV NP kodlayan plazmidin lineer haliyle transfekte edildiği stabil hücrelerden elde edilen genomik DNA, PNP: KKKAV NP kodlayan plazmidin transfekte edildiği stabil hücrelerden elde edilen genomik DNA, LGn:KKKAV PreGn kodlayan plazmidin lineer hale getirilerek transfekte edildiği stabil hücrelerden elde edilen genomik DNA, PGn: KKKAV PreGn kodlayan plazmidin transfekte edildiği stabil hücrelerden elde edilen genomik DNA, LGc:KKKAV PreGc kodlayan plazmidin lineer hale getirilerek transfekte edildiği stabil hücrelerden elde edilen genomik DNA, PGc: KKKAV PreGc kodlayan plazmidin transfekte edildiği stabil hücrelerden elde edilen genomik DNA.

#### 4.4.3 Reverse Transkriptaz PZR (RT-PZR) ile ekspresyon analizi

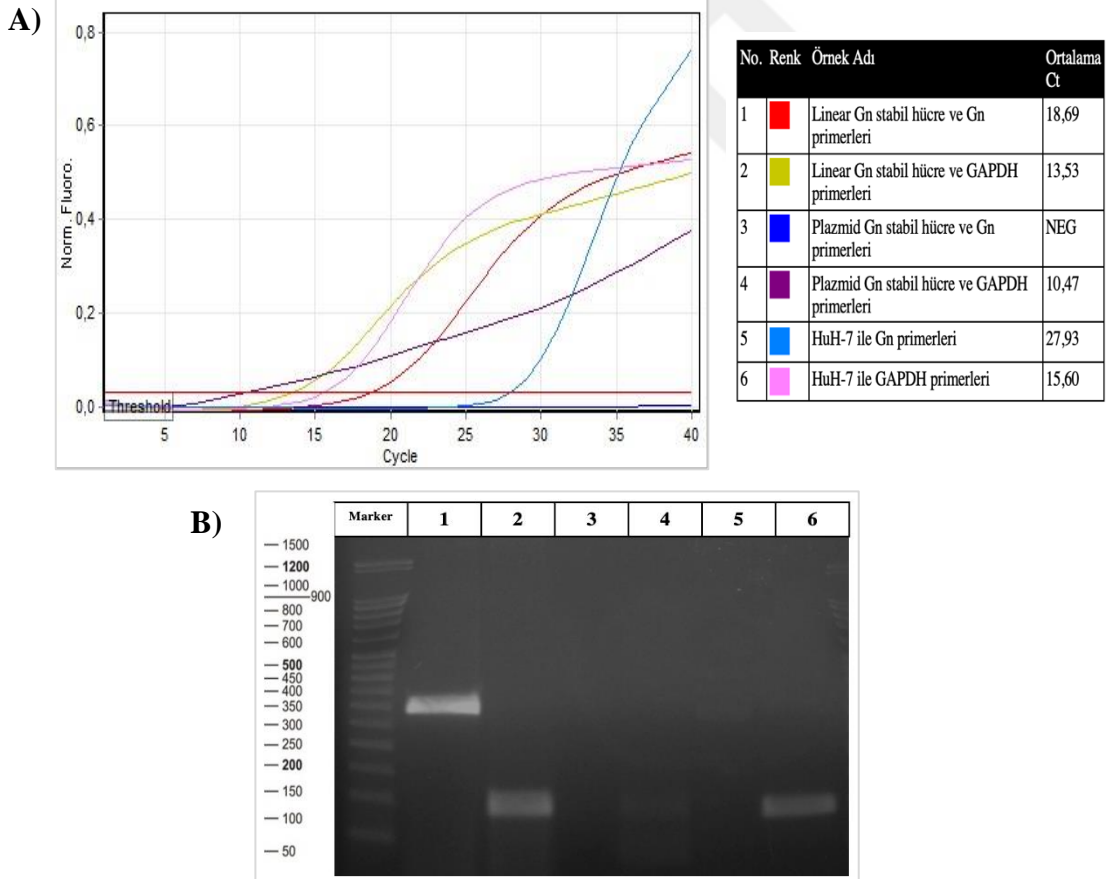
Genomik DNA'ya entegre olan KKKAV NP, PreGn ve PreGc proteini kodlayan genlerin mRNA düzeyinden ekspresyon analizi RT-PZR ile yapılmıştır. Hücrelerden yapılan total RNA izolasyonu ve cDNA sentezinin ardından hedef genlerin ekspresyonu RT-PZR ile gösterilmiştir. Reaksiyonlarda insan GAPDH geni housekeeping gen olarak kullanılıp 0.03 eşik değerinde analiz edilmiştir.

Şekil 4.10A'da KKKAV NP ve PreGc genlerini genoma entegre eden stabil hücrelerden mRNA düzeyindeki ekspresyon analizi gösterilmektedir. Hem plazmit hem de lineer formdaki DNA'lar ile genoma entegre olan KKKAV NP ve PreGc genleri hücre içerisinde düzgün bir şekilde transkripsiyon ve translasyon süreçlerini tamamlayarak hedef proteinlerin başarılı bir şekilde eksprese etmiştir. RT-PZR sonucunda elde edilen fragmentlerin beklenen boyutlarda olup olmadığı agaroz jel elektroforezinde yürütülerek doğrulanmıştır (Şekil 4.10B).



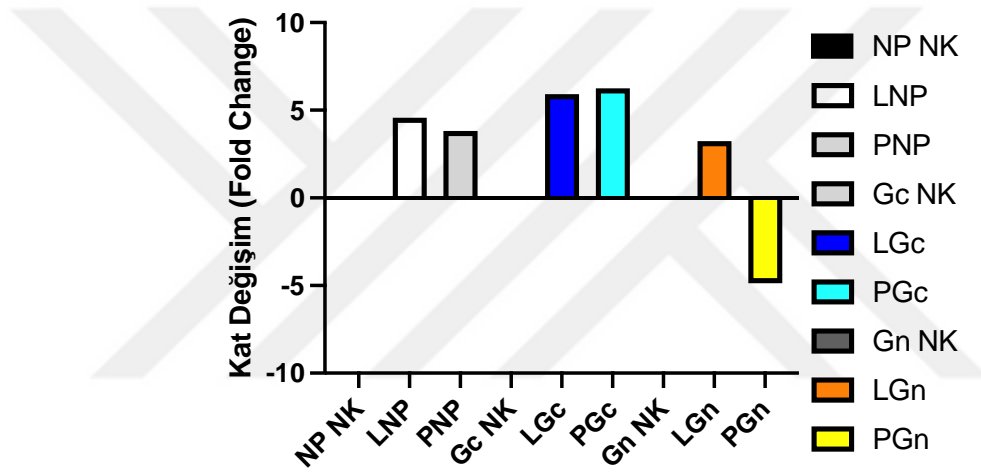
**Şekil 4.10 :** Stabil hücrelerin mRNA düzeyindeki analizi. KKKAV NP ve KKKAV PreGc ile transfekte edilen hücrelerin mRNA düzeyindeki RT-PZR ekspresyon analizi sonuçları. A) Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu sonucunda elde edilen ham data ve Ct değerleri. B) RT-PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi.

Şekil 4.11A’da KKKAV PreGn genini genoma entegre eden stabil hücrelerden mRNA düzeyindeki ekspresyon analizi gösterilmektedir. Hem plazmit hem de lineer DNA formunda hücrelere transfekte edilen KKKAV PreGn genini kodlayan DNA lineerize halde genoma entegre olan hücrelerde transkripsiyon ve translasyon süreçlerini başarılı bir şekilde tamamlanmıştır. Lineerize edilmeyen, plazmit DNA formunda hücrelere aktarılan KKKAV PreGn kodlayan DNA ise mRNA düzeyinde yapılan analizlerde gen ekspresyonu bakımından negatif sonuç vermiştir. Bu durum genoma entegrasyon sırasında gerçekleşen homolog rekombinasyonda çift iplikli DNA kırılımının rastlantısal olarak gerçekleşmesi ve PreGn kodlayan gende oluşabilecek bir hata ile açıklanabilmektedir. Şekil 4.11A’da elde edilen sonuçlar reaksiyondan elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi ile boyut temelli olarak da doğrulanmıştır (Şekil 4.11B).



**Şekil 4.11 :** KKKAV PreGn ile transfekte edilen hücrelerin mRNA düzeyindeki RT-PZR ekspresyon analizi sonuçları. A) Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu sonucunda elde edilen ham data ve Ct değerleri. B) RT-PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi.

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyon sonuçları hedef genlerin ekspresyon düzeyindeki artış veya azalışın kaç kat olduğunu belirten kat değişim analizi ile de hesaplanmıştır. Hedef genlerin  $\Delta Ct$  değerleri, her gene ait Ct değerinin, housekeeping gen olarak kullanılan GAPDH genine ait Ct değerinden çıkartılması ile hesaplanmıştır.  $\Delta\Delta Ct$  değeri, hedef genin  $\Delta Ct$  değeri ile transfekte edilmemiş hücrelerin mRNA'sının her gene özgü primerler kullanılarak yapılan reaksiyonlardan elde edilen  $\Delta Ct$  değerleri arasındaki farkın hesaplanmasıyla elde edilmiştir. Gen ekspresyonlarındaki kat değişim analizleri  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri üzerinden gösterilmiştir (Şekil 4.12).

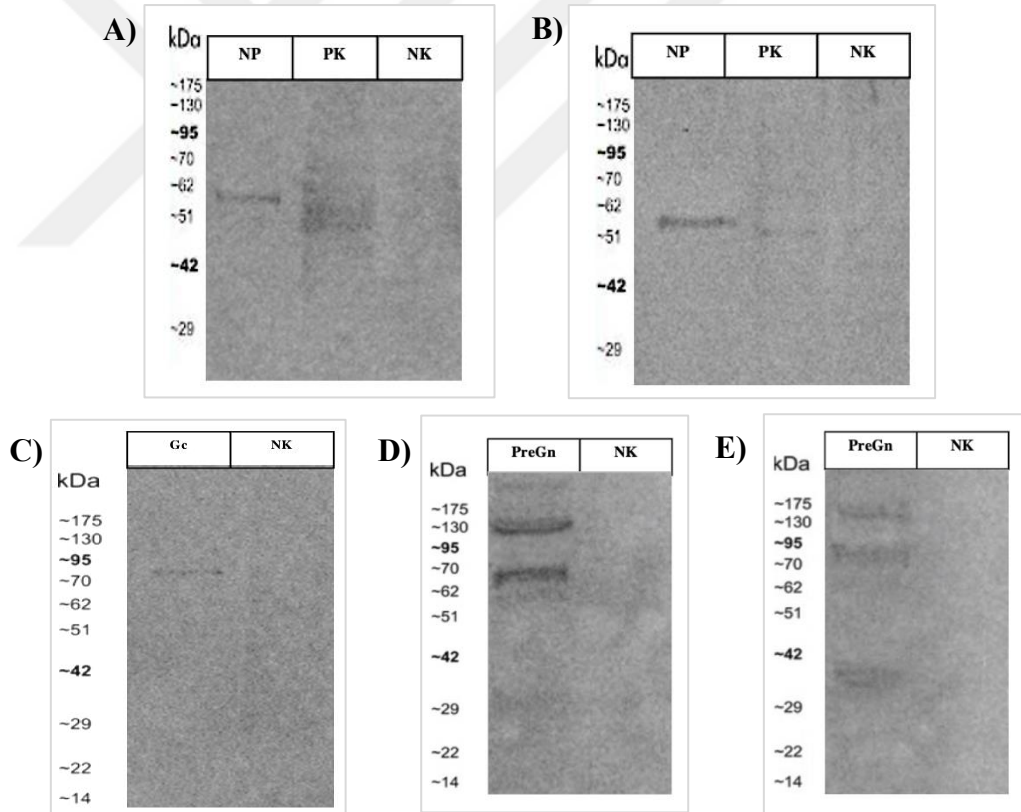


**Şekil 4.12** : RT-PZR ile hedef genlerdeki ekspresyonların kat değişim analizi. NP NK:Transfekte olmamış Huh-7 mRNA'sı ve NP primerleri, LNP:Lineer formda transfekte edilen stabil hücrelerin mRNA'sı ve NP primerleri, PNP: Plazmit formda transfekte edilen stabil hücrelerin mRNA'sı ve NP primerleri, Gc NK:Transfekte olmamış Huh-7 mRNA'sı ve Gc primerleri ile reaksiyonu, LGc:Lineer formda transfekte edilen stabil hücrelerin mRNA'sı ve Gc primerleri, PGc: Plazmit formda transfekte edilen stabil hücrelerin mRNA'sı ve Gc primerleri, Gn NK:Transfekte olmamış Huh-7 mRNA'sı ve Gn primerleri ile reaksiyonu, LGn:Lineer formda transfekte edilen stabil hücrelerin mRNA'sı ve Gn primerleri, PGn: Plazmit formda transfekte edilen stabil hücrelerin mRNA'sı ve Gn primerleri ile reaksiyonundan elde edilen Ct değerlerinden hesaplanan kat değişim miktarları.

#### 4.4.4 Protein Düzeyinde Analiz

##### 4.4.4.1 Western Blotlama yöntemi ile protein tespiti

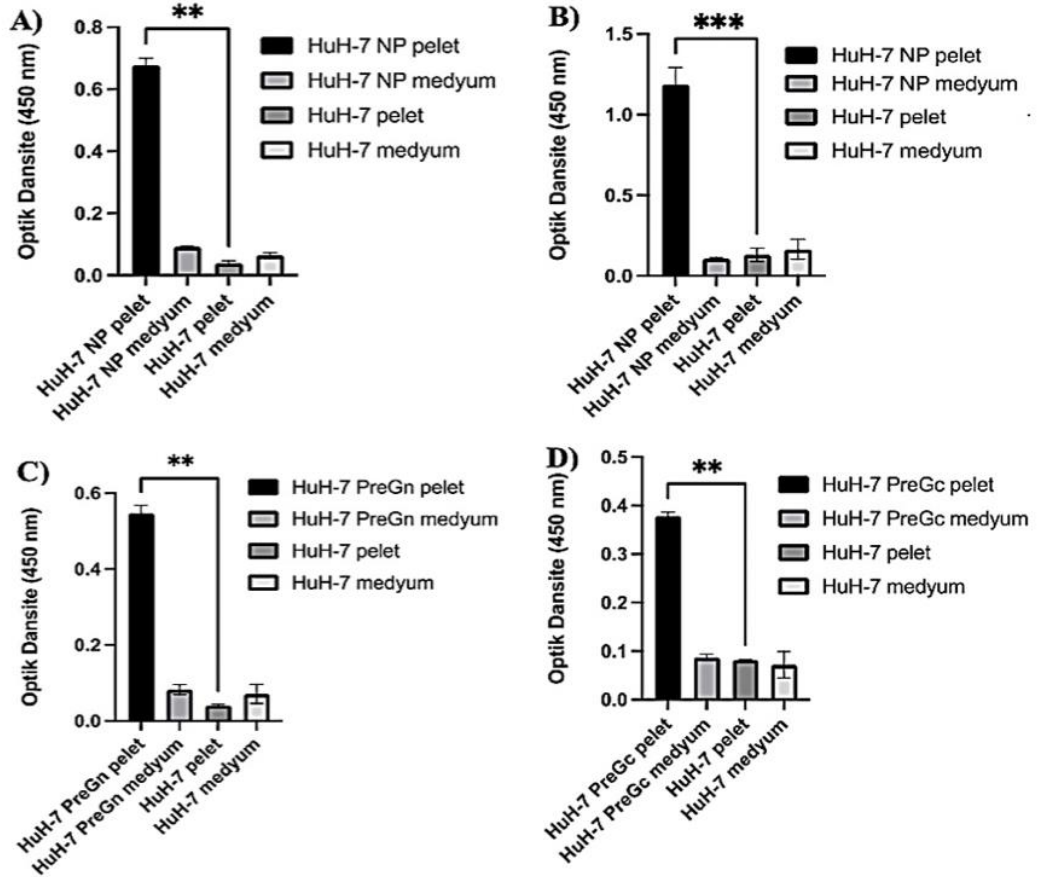
Western blot analizleri için KKKAV NP, PreGn ve PreGc proteinini stabil olarak üreten hücreler ve negatif kontrol olarak herhangi bir gen transfekte edilmemiş hücrelerin peleti eşit konsantrasyonlarda SDS-PAGE’de yürütülerek ticari olarak temin edilen spesifik antikörlerin kullanılmasıyla analiz edilmiştir. Şekil 4.13A ve Şekil 4.13B’de yaklaşık 57 kDa boyutundaki NP, Şekil 4.13C’de ise yaklaşık 75kDa büyüklüğündeki Gc proteinin varlığı gösterilmiştir. Şekil 4.13D ve Şekil 4.12E’de ise 140 kDa boyutundaki PreGn ve işlenmesi sonucunda ortaya çıkan 160/85 kDa boyutundaki Musin benzeri domain/GP38 kompleksi, 37 kDa boyutundaki Gn ve yaklaşık 38 kDa boyutundaki GP38 proteinlerinin üretimi gösterilmiştir.



**Şekil 4.13:** Stabil hücrelerden elde edilen proteinlerin Western blot ile analizi. A) 9D5 B) 2C11 monoklonal antikoru ile NP üretiminin analizi. NP: KKKAV NP stabil ekspres eden hücrelerin peleti, PK: Bakteride üretilen KKKAV NP, NK: transfekte olmayan Huh-7 peleti. C) 11E7 monoklonal antikoru ile KKKAV Gc üretiminin analizi. Gc: KKKAV Gc stabil ekspres eden hücrelerin peleti, NK: transfekte olmayan Huh-7 peleti. D) 13G8 E) 7F5 monoklonal antikoru ile KKKAV PreGn üretiminin analizi. PreGn: KKKAV PreGn stabil ekspres eden hücrelerin peleti, NK: transfekte olmayan Huh-7 peleti.

#### 4.4.4.2 Enzim İmmunoassay (EIA) ile proteinlerin antijenik özelliklerinin gösterilmesi

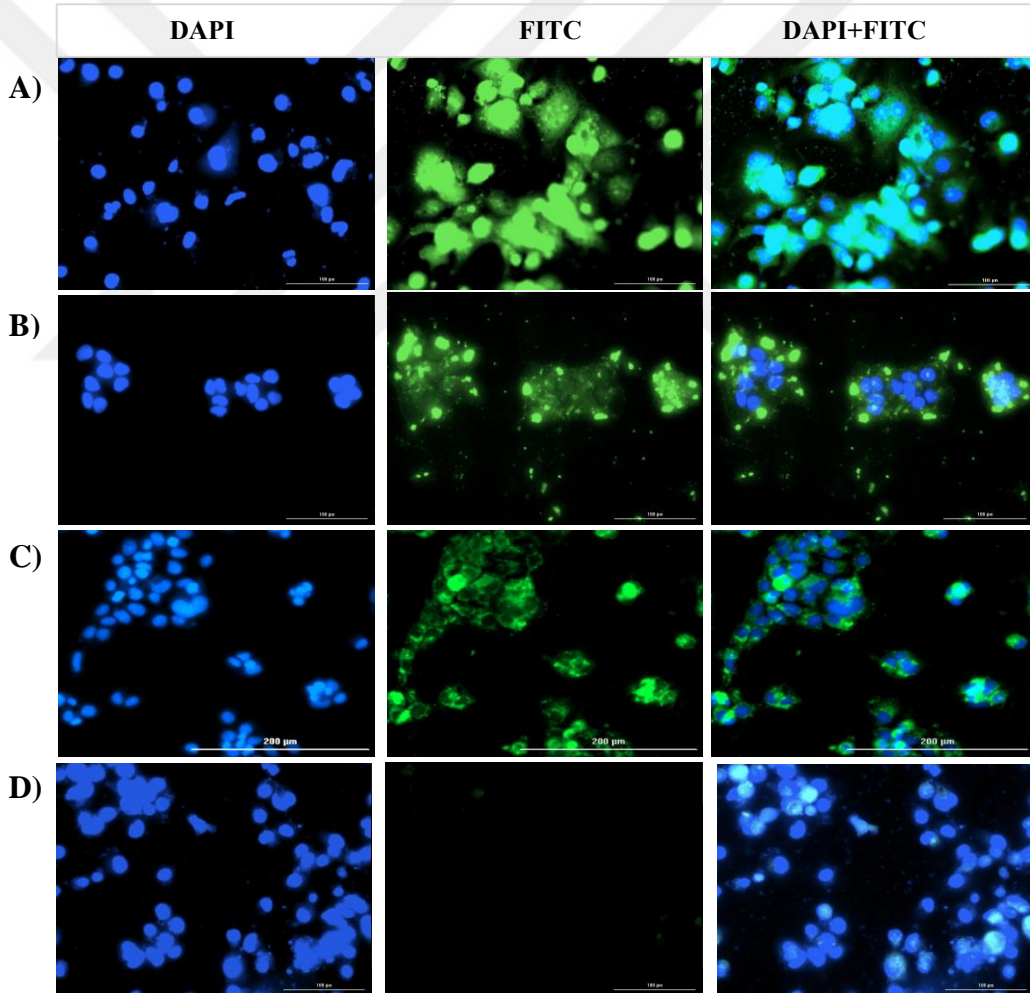
KKKAV nükleoprotein ve glikoproteinlerini stabil olarak eksprese eden hücrelerden üretilen proteinlerin antijenik özellikleri EIA ile gösterilmiştir. Bu amaçla her bir proteine spesifik monoklonal antikolar kullanılarak EIA tamamlanmıştır. Elde edilen ham veriler Graphpad Prism programıyla analiz edilerek Şekil 4.14’de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlarda hedef proteinler stabil hücrelerin peletinde detekte edilmiş, hücre medyumundan anlamlı bir pozitiflik saptanamamıştır.



**Şekil 4.14:** Stabil hücrelerden elde edilen proteinlerin EIA ile analiz sonuçları. EIA’da katı faz antijeni olarak stabil hücrelerin peleti ve medyumunu ile negatif kontrol olarak transfecte edilmemiş Huh-7 hücre peleti ve medyumunu da kuyu başı 500 ng/well olacak şekilde kullanılmıştır. Birincil antikor olarak A) NP-spesifik 9D5 monoklonal antikor, B) NP-spesifik laboratuvarımızda üretilen mAb, C) PreGn spesifik 13G8 antikor, D) PreGc spesifik 11E7 monoklonal antikor kullanılmıştır.

#### 4.4.4.3 İmmüno Floresan Analiz (İFA) ile hücre içi protein lokalizasyonunun analizi

KKKAV nükleoprotein ve glikoproteinlerinin hücresel ekspresyonu immüno floresan analizleri ile görüntülenmiştir. Bu amaçla hücreler method kısmında belirtilen protokol ile hazırlanarak ticari monoklonal antikorlar ile inkübe edilip FITC ile görünür hale getirilmiştir. Şekil 4.15A'da görüldüğü üzere KKKAV NP'nin Huh-7 hücrelerinde başarılı bir şekilde ifade edilerek daha çok hücrenin sitoplazmasında yoğunlaştığı gösterilmiştir. Şekil 4.15B ve Şekil 4.15C'de ise KKKAV PreGn ve PreGc proteinlerinin hücrelerde başarılı bir şekilde üretilerek NP'den farklı olarak daha çok hücrelerin membranlarında bulunduğu gösterilmiştir.



**Şekil 4.15 :** KKKAV NP, PreGn ve PreGc proteinlerini stabil eksprese eden hücrelerin İFA ile görüntülenmesi. Stabil hücrelerden A)KKKAV NP eksprese edenler 9D5, B)KKKAV PreGc eksprese edenler 11E7, C)KKKAV PreGn eksprese edenler ise 13G8 monoklonal antikorların kullanılmasıyla detekte edilmiştir. D)Negatif kontrol olarak her bir spesifik antikor, transfekte edilmemiş hücrelerle de inkübe edilerek görüntülenmiştir.

## 5.TARTIŞMA

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi, *Nairovirus* cinsine ait bir RNA virüsü olan Kırım Kongo Kanamalı Ateşi virüsünün neden olduğu zoonotik bir viral hastalıktır. Hastalık, viral bulaşmadan sorumlu vektör olan *Hyalomma* kenesinin küresel yayılımıyla ilişkili olan geniş bir dağılıma sahiptir. Bu virüs özellikle Orta Doğu, Afrika, Asya ve Doğu Avrupa'da yaygın olarak görülen bir hastalık etkeni olup prevalansı coğrafi bölgelere göre değişiklik göstermekle birlikte, zoonotik bir virüs olması nedeniyle hayvanların ve kenelerin bulunduğu alanlarda oldukça yüksektir [43,44]. Ülkemiz gibi endemik bölgelerde yüksek ölüm oranına yol açan virüsün genomu S, M ve L olmak üzere üç segmentten oluşmaktadır. S segment, NP olarak isimlendirilen KKKAV'nün yaşam döngüsünde büyük öneme sahip bir nükleoproteini kodlamaktadır. Bu protein virüste en bol bulunan protein olması ve yüksek immünojeniteye sahip olması nedeniyle KKKA çalışmalarında umut verici hedeftir. M segmentten ise Gn ve Gc adı verilen glikoproteinleri kodlamaktadır. Bu proteinler virüsün yüzeyinde bulunup ve virüsün konakçı hücrelere girişini kolaylaştırmaktan sorumludur. Aynı zamanda glikoproteinler KKKAV enfeksiyonu sırasındaki bağışıklık tepkisinin birincil hedefleri olduğundan KKKA çalışmalarında büyük öneme sahiptir [45].

Bu çalışmada insan hücrelerindeki glikozilasyon süreçlerini taklit edebilen ökaryotik hücrelerde KKKAV glikoproteinlerini ve nükleoproteinlerini stabil bir şekilde üreten hücre hatları başarılı bir şekilde geliştirilmiştir. Bu amaç için öncelikle KKKAV NP, PreGn ve PreGc optimize sekanslarını taşıyan plazmitler ticari olarak temin edilip kesim reaksiyonları ve PZR ile doğrulanmıştır. Stabil ekspresyon için hedef genin hücrenin genomuna entegre olması gerektiğinden hedeflenen gen bir bütün olarak parçalanmadan genomu entegre olması için transfeksiyondan önce uygun restriksiyon enzimleri ile kesilerek lineer hale getirilmiştir. Hedef geni taşıyan her bir ekspresyon vektörünün hem plazmid formu hem de lineer formu hücrelere transfekte edilmiştir. Genellikle lineer formdaki DNA ile yapılan transfeksiyonlarda verim düşük olmaktadır [46]. Lineer ve plazmit formlardaki DNA'lar ile gerçekleştirilen transfeksiyonun etkinliği yeşil floresan proteini eksprese eden pcDNA 3eGFP plazmiti

kullanılarak analiz edilmiştir. Sonuç olarak bu iki formdaki DNA'lar ile gerçekleştirilen transfeksiyonların etkinliklerinde çok büyük bir fark gözlenmemiştir (Şekil 4.4). Transfeksiyon ve antibiyotik seleksiyonlarının ardından lineer ve plazmid formdaki DNA'lar ile transfekte olan her bir hücrenin genomik DNA'sı izole edilmiş ve hedef genin genoma entegre olduğu polimeraz zincir reaksiyonu ile gösterilmiştir (Şekil 4.9). mRNA düzeyinde RT-PZR ile gerçekleştirilen analizlerde ise KKKAV PreGn genini taşıyan plazmid formdaki DNA ile transfekte edilen hücrelerde hedeflenen proteinin ekspresyonu gerçekleşmemiştir. Plazmid DNA formundaki KKKAV NP ve KKKAV PreGc genlerini stabil eksprese eden hücrelerde ise böyle bir soruna rastlanılmamıştır. Bu durum plazmid DNA'daki PreGn sekansında genoma entegrasyon sırasında meydana gelen bir hata ile ilişkilendirilmiştir. Lineer formdaki KKKAV NP, PreGn ve PreGc genlerini içeren DNA'lar ile transfekte edilen stabil hücreler ise hem DNA düzeyinde PZR ile hem de mRNA düzeyinde RT-PZR ile başarılı bir şekilde doğrulanmıştır (Şekil 4.9 ve Şekil 4.12). Üretilen viral proteinlerin antijenitesi Western blot ve EIA ile ticari olarak temin edilen monoklonal antikolar kullanılarak analiz edilmiştir. Ökaryotik sistemlerde proteinler hücre içinde sentezlendikten sonra glikozilasyon ve fosforilasyon gibi çeşitli post-translasyonel modifikasyonlara uğrayabilmektedir. Bu modifikasyonlar, proteinin moleküler kütlelerini değiştirebilmektedir [47]. Şekil 4.13'de gösterilen Western blot sonuçlarında KKKAV NP proteinini stabil olarak eksprese eden Huh-7 hücrelerinden üretilen NP'nin boyutunun, daha önceden bakteri hücrelerinde üretilen ve pozitif kontrol olarak kullanılan NP'nin boyutundan yaklaşık 2-3 kDa daha büyük olması ökaryotik hücrelerde meydana gelen bu post-translasyonel modifikasyonlar ile açıklanabilmektedir. Western blot analizlerinin yanı sıra viral proteinler EIA'da transfekte olmamış Huh-7 hücreleri ile de kantitatif olarak analiz edilmiştir. EIA sonuçlarında hedeflenen proteinlerin hücrelerin pelletinden detekte edilirken, hücrelerin içerisinde bulunduğu medyunda herhangi bir anlamlı sonuca rastlanılmamıştır (Şekil 4.14). Stabil üretimleri doğrulanan viral proteinlerin hücre içerisindeki lokalizasyonları immunfloresan analizi ile gösterilmiştir. Görüntüleme sonuçları KKKAV NP'nin genellikle sitoplazmada yoğunlaştığını, KKKAV Gn ve Gc proteinlerinin ise hücre membranlarında daha çok yoğunlaştığını göstermiştir (Şekil 4.15).

Sonuç olarak bu çalışmada Kırım Kongo Kanamalı Ateşi virüsü nükleoprotein ve glikoproteinlerini kararlı bir şekilde ifade eden hücre hatları başarılı bir şekilde oluşturulmuştur. Bu hücre hatlarının viral proteinleri uzun vadeli ve güvenilir bir şekilde üretebilecek potansiyele sahip olacağı düşünülmektedir. Özellikle, bu hücre hatlarının BGS-4 koşullarına sahip olmayan laboratuvarlarda, KKKAV'nün temel moleküler süreçlerini anlamak, antiviral stratejiler geliştirmek ve aşı çalışmalarını ilerletmek gibi araştırma alanlarında işlevsel bir sistem olarak kullanılacağı ön görülmektedir.



## KAYNAKLAR

- [1] Dai, S., Deng, F., Wang, H., Ning, Y. (2021). Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus: Current Advances and Future Prospects of Antiviral Strategies, *Viruses*, 22;13(7):1195.
- [2] Fillâtre, P., Revest, M., Tattevin, P. (2019). Crimean-Congo hemorrhagic fever: An update. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 49(8):574-585.
- [3] Gargili, A. (2017). The role of ticks in the maintenance and transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: a review of published field and laboratory studies, *Antiviral Research*. 144, 93–119.
- [4] Papa, A., Tsergouli, K., Tsioka, K., Mirazimi, A. (2017). Crimean-Congo Hemorrhagic Fever: Tick-Host-Virus Interactions, *Front Cell Infection Microbiology*, 26;7:213.
- [5] Burt, F. J., Spencer, D. C., Leman, P. A., Patterson, B., Swanepoel, R. (1996). Investigation of tick-borne viruses as pathogens of humans in South Africa and evidence of Dugbe virus infection in a patient with prolonged thrombocytopenia, *Epidemiology and Infection*, 116, 353–361.
- [6] Zivcec, M., Scholte, F.E., Spiropoulou, C.F., Spengler, J.R., Bergeron, É. (2016). Molecular Insights into Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus, *Viruses*, 21;8(4):106.
- [7] Bente, D.A., Forrester, N.L., Watts, D.M., McAuley, A.J., Whitehouse, C.A., Bray, M. (2013) Crimean-Congo hemorrhagic fever: history, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity, *Antiviral Research*, 100(1):159-89.
- [8] Khan, K.H. (2013). Gene expression in Mammalian cells and its applications, *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 3(2):257-63.
- [9] Gupta, V., Sengupta, M., Prakash, J., Tripathy, B.C. (2016). Production of Recombinant Pharmaceutical Proteins, *Basic and Applied Aspects of Biotechnology*, 23:77–101.
- [10] Müller, D., Bayer, K. & Mattanovich, D. (2006). Potentials and limitations of prokaryotic and eukaryotic expression systems for recombinant protein production – a comparative view. *Microbial Cell Fact*, 5:16.1.
- [11] **Therapeutic antibody engineering : current and future advances driving the strongest growth area in the pharmaceutical industry. (2013).** Erişim Tarihi: 2 Ekim 2023. (<https://search.worldresearches.org/title/870891982>).
- [12] Dalton, A.C., Barton, W.A.(2014). Over-expression of secreted proteins from mammalian cell lines, *Protein Science*, 23(5):517-25.
- [13] Dyson, MR., Shadbolt, SP., Vincent, KJ., Perera, RL., McCafferty, J. (2004). Production of soluble mammalian proteins in Escherichia coli: identification of protein features that correlate with successful expression, *BMC Biotechnol* 4:32.
- [14] Hawman, D.W., Feldmann, H. (2023). Crimean–Congo haemorrhagic fever virus. *Nature Microbiology* 21, 463–477.
- [15] **World Health Organization Crimean-Congo haemorrhagic fever (CCHF).** Erişim Tarihi: 13 Kasım 2023.(<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/crimean-congo-haemorrhagic-fever>).

- [16] **Leblebicioglu, H., Ozaras, R., Irmak, H., Sencan, I. (2016).** Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey: Current status and future challenges, *Antiviral Research*, 126, 21-34.
- [17] **Kuehnert, P. A., Stefan, C. P., Badger, C. V., & Ricks, K. M. (2021).** Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus (CCHFV): A Silent but Widespread Threat. *Current Tropical Medicine Reports*, 8(2), 141-147.
- [18] **Burt, F. J., Swanepoel, R., Shieh, W. J., Smith, J. F., Leman, P. A., Greer, P. W., Zaki, S. R. (1997).** Immunohistochemical and in situ localization of Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) virus in human tissues and implications for CCHF pathogenesis, *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 121(8), 839-846.
- [19] **Oncü, S. (2013).** Crimean-Congo hemorrhagic fever: an overview, *Virologica Sinica*, 28(4), 193-201.
- [20] **Weber, F., & Mirazimi, A. (2008).** Interferon and cytokine responses to Crimean Congo hemorrhagic fever virus; an emerging and neglected viral zoonosis, *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 19(5-6), 395-404.
- [21] **Bente, D. A., Alimonti, J. B., Shieh, W. J., Camus, G., Ströher, U., Zaki, S., & Jones, S. M. (2010).** Pathogenesis and immune response of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in a STAT-1 knockout mouse model, *Journal of Virology*, 84(21), 11089-11100.
- [22] **Vestweber, D. (2007).** Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium, *Immunological Reviews*, 218, 178-196.
- [23] **Raabe, V.N. (2020).** Diagnostic Testing for Crimean-Congo Hemorrhagic Fever, *Journal of Clinical Microbiology*, 58(4), e01580-19.
- [24] **Mazzola, L.T., Kelly-Cirino, C. (2019).** Diagnostic tests for Crimean-Congo haemorrhagic fever: A widespread tickborne disease, *BMJ Global Health*, 4, e001114.
- [25] **Centers for Disease Control and Prevention.(2018).** Erişim Tarihi: 9 Aralık 2023.([https://www.cdc.gov/vhf/crimeancongo/diagnosis/index.html#:~:text=Laboratory%20tests%20that%20are%20used,ELISA%20\(IgG%20and%20IgM\)](https://www.cdc.gov/vhf/crimeancongo/diagnosis/index.html#:~:text=Laboratory%20tests%20that%20are%20used,ELISA%20(IgG%20and%20IgM))).
- [26] **de la Calle-Prieto, F, Martín-Quirós, A, Trigo, E, et al. (2018).** Therapeutic management of Crimean-Congo haemorrhagic fever, *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica (English ed.)*, 36(8), 517–522.
- [27] **Oestereich, L., Rieger, T., Neumann. (2014).** Evaluation of antiviral efficacy of ribavirin, arbidol, and T-705 (favipiravir) in a mouse model for Crimean-Congo hemorrhagic fever, *PLoS Negl Tropical Disease*, 8(5), e2804.
- [28] **Wang, Q., Cao, R., Li, L. (2022).** In vitro and in vivo efficacy of a novel nucleoside analog H44 against Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, *Antiviral Research*, 199, 105273.
- [29] **Hawman, D. W., et al. (2020).** Efficacy of favipiravir (T-705) against Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infection in cynomolgus macaques, *Antiviral Reserach*, 1:13-22.

- [30] **Keshtkar-Jahromi, M., Kuhn, JH., Christova, I. (2011).** Crimean-Congo hemorrhagic fever: Current and future prospects of vaccines and therapies, *Antiviral Research*, 90(2), 85-92.
- [31] **Sharifi-Mood, B., Alavi-Naini, R., Metanat, M. (2013).** Efficacy of high-dose methylprednisolone in patients with Crimean-Congo haemorrhagic fever and severe thrombocytopenia, *Trop Doct*, 43(2), 49-53.
- [32] **Clerex-Van Haaster, C.M., Clerex, J.P., Ushijima, H. (1982).** The 3' terminal RNA sequences of bunyaviruses and nairoviruses (Bunyaviridae): Evidence of end sequence generic differences within the virus family, *Journal of Virology*, 61, 289-292.
- [33] **Zhou, ZR., Wang, ML., Deng, F. (2011).** Production of CCHF virus-like particle by a baculovirus-insect cell expression system, *Virol Sin*, 26(5), 338-346.
- [34] **Andersson, I., Bladh, L., Mousavi-Jazi M. (2004).** Human MxA protein inhibits the replication of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, *Journal of Virology*, 78(8), 4323-4329.
- [35] **Bergeron, É., Zivcec, M., Chakrabarti, A.K. (2015).** Recovery of Recombinant Crimean Congo Hemorrhagic Fever Virus Reveals a Function for Non-structural Glycoproteins Cleavage by Furin, *PLoS Pathogen*, 11(5), e1004879.
- [36] **Frias-Staheli, N., Giannakopoulos, N.V., Kikkert, M. (2007).** Ovarian tumor domain-containing viral proteases evade ubiquitin- and ISG15-dependent innate immune responses, *Cell Host Microbe*, 2(6), 404-416.
- [37] **Khan, KH. (2013).** Gene expression in Mammalian cells and its applications, *Adv Pharm Bull*, 3(2), 257-263.
- [38] **Gupta, V., Sengupta, M., Prakash, J., Tripathy, B.C. (2016).** Production of Recombinant Pharmaceutical Proteins, *Basic and Applied Aspects of Biotechnology*.
- [39] **Chen, R. (2012).** Bacterial expression systems for recombinant protein production: E. coli and beyond, *Biotechnology Advances*, 30(5), 1102-1107.
- [40] **Müller, D., Bayer, K. & Mattanovich, D. (2006).** Potentials and limitations of prokaryotic and eukaryotic expression systems for recombinant protein production – a comparative view, *Microb Cell Fact*, 5, P61.
- [41] **Hacker, D. L., Wurm, F. M. (2017).** Recombinant DNA Technology for Production of Protein Therapeutics in Cultured Mammalian Cells. *Reference Module in Life Sciences*.
- [42] **An Introduction to Transfection, Transfection Protocol and Applications.** (2023).Erişim Tarihi: 11 Aralık 2023. (<https://www.technologynetworks.com/cell-science/articles/an-introduction-to-transfection-transfection-protocol-and-applications-371627>).
- [43] **Shahhosseini, N., Wong, G., Babuadze, G., Camp, J. V., Ergonul, O., Kobinger, G. P., Chinikar, S., & Nowotny, N. (2021).** Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Asia, Africa and Europe, *Microorganisms*, 9(9), 1907.
- [44] **Appannanavar, S. B., & Mishra, B. (2011).** An update on Crimean-Congo hemorrhagic fever, *Journal of Global Infectious Diseases*, 3(3), 285-292.
- [45] **Ozdarendeli, A. (2023).** Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus: Progress in Vaccine Development, *Diagnostics (Basel)*, 13(16), 2708.

- [46] **Gargili, A. (2017).** The role of ticks in the maintenance and transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: A review of published field and laboratory studies, *Antiviral Research*, 144, 93–119.
- [47] **Ramazi, S., Zahiri, J. (2021).** Post-translational modifications in proteins: Resources, tools and prediction methods, *Database (Oxford)*.



## ÖZGEÇMİŞ

**Ad-Soyad** : Özlem Bakangil  
**Doğum Tarihi ve Yeri** :  
**E-posta** :

### ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2021, İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik
- **Yüksek lisans** : 2024, Bezmialem Vakıf Üniversitesi , Biyoteknoloji

### MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 2021-Halen Araştırma Görevlisi, Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

### YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- Expression, Purification and Immunogenic Characterization of Multicopy Recombinant Hepatitis B Surface Antigen in Methylophilic *Pichia pastoris*  
**Bakangil Ö., Karaaslan E., Hasanoğlu Sayın S., Keskin S., Doymaz M.Z.** 5<sup>th</sup> International Molecular Immunology and Immunogenetics Congress (MIMIC-V), İzmir, Türkiye, 20 Ekim 2022.
- Stable Expression of Proteins of Crimean Congo Hemorrhagic Fever Virus In Eukaryotic Cells: A Reliable Model for Investigating Virus Biology and Pathogenesis  
**Bakangil Ö., Yazıcı M., Çetin N.S., Doymaz M.Z.** 3rd International Conference on Crimean Congo Hemorrhagic Fever, Thessaloniki, Yunanistan, 19-21 Eylül 2023.
- Ökaryotik Hücrelerde Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü (KKKAV) Proteinlerinin Stabil İfadesi: Virus Biyolojisi ve Patogenez Araştırmaları İçin Güvenilir Bir Model  
**Bakangil Ö., Yazıcı M., Çetin N.S., Doymaz M.Z.** 6. Ulusal Uygulamalı Biyolojik Bilimler Kongresi, Eskişehir, Türkiye, 3-05 Kasım 2023.