ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS LPPX PROTEİNİN REKOMBİNANT TÜBERKÜLOZ AŞISI GELİŞTİRMEDE KULLANIMI

Cennet DOĞAN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2019

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Cennet DOĞAN tarafından hazırlanan **"*Mycobacterium tuberculosis*LppX proteinin rekombinant tüberküloz aşısı geliştirmede kullanımı"** adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafındanoy birliğiile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Teziolarak kabul edilmiştir.

Danışman **:** Doç. Dr. Sezer OKAY

Jüri Üyeleri :

Başkan : Dr. Öğretim Üyesi Şinasi AŞKAR

Üye : Doç. Dr. Sezer OKAY

Üye : Dr. Öğretim Üyesi Çiğdem AKIN PEKŞEN

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Tamer KEÇELİ
Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum "*Mycobacterium tuberculosis* LppX proteinin rekombinant tüberküloz aşısı geliştirmede kullanımı**"** konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programı"yla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim. (……/……/20…..).

Cennet DOĞAN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS LPPX PROTEİNİN REKOMBİNANT TÜBERKÜLOZ AŞISI GELİŞTİRMEDE KULLANIMI

Cennet DOĞAN

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Sezer OKAY

Tüberküloz (TB), *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) bakterisinin neden olduğu bulaşıcı bir hastalıktır. Bu hastalık için kullanılan tek aşı BCG'nin erişkinlerde koruyuculuğu yetersiz kalmaktadır. Bu çalışmanın amacı, rekombinant tüberküloz aşısı geliştirmek için MTB izolatından *lppX* genini moleküler tekniklerle klonlayıp, LppX proteinini rekombinant olarak saflaştırarak, bu proteinin Montanide ISA 720 adjuvanıyla formülasyonunun hümoral ve hücresel bağışıklığı tetikleme kapasitelerini araştırmaktır. Bu çalışma için ilk olarak ülkemizdeki bir verem hastasından izole edilmiş olan *M. tuberculosis* suşundan *lppX* geni pGEM-T, sonrasında pET28a vektörüne klonlanlanarak *E. coli* BL21 suşuna aktarılmıştır. *E. coli*'de ifade edilen his-tag'lı rekombinant LppX proteini nikel kolonkullanılarak saflaştırılmış ve Montanide ISA 720 VG adjuvanı ile 7:3 oranında aşı formülasyonu hazırlanmıştır. Aşı formülasyonu, adjuvan ve BCG aşısı, Balb/c farelere enjekte edilmiş ve farelerden belirli aralıklarda serum toplanmıştır. Western blot tekniği rekombinant proteini kalitatif olarak görüntülemek için yapılmıştır. Rekombinant proteine ve BCG aşısına özgün serum kullanıldığında beklenen büyüklükte bantlar gözlenirken, sadece adjuvana özgün serum kullanıldığında bant gözlenmemiştir. Hümoral ve hücresel bağışıklığı tetikleme kapasiteleri değerlendirilmiştir. Bağışıklama öncesinde ve sonrasında IgG değerleri karşılaştırıldığında, hazırlanan aşı formülasyonunun hümoral bağışıklık yanıtını anlamlı düzeyde artırdığı belirlenmiştir. Hücresel bağışıklığı tetikleme kapasitesi serum interferon-gama (IFN-γ) ve interlökin-12 (IL-12) düzeyleri ile ölçülmüştür. LppX formülasyonunun IFN-γ düzeyini artırmada BCG aşısı kadar etkin olduğu, ancak IL-12 tetiklemede yetersiz kaldığı gözlemlenmiştir. Daha sonra yapılacak çalışmalarda, farklı immünojenik proteinlerle oluşturulacak ikili veya üçlü füzyonların daha etkili olabileceği düşünülmektedir.

2019, 67 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: BCG, hücresel bağışıklık, Montanide ISA 720, rekombinant aşı, tüberküloz hastalığı

ABSTRACT

MSc. Thesis

UTILIZATION OF LPPX PROTEIN FROM *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* FOR DEVELOPMENT OF RECOMBINANT TUBERCULOSIS VACCINE

Cennet DOĞAN

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Sezer OKAY

Tuberculosis (TB) is a contagious disease caused by the bacterium *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Today, BCG is the only vaccine used against TB. However, the protection of this vaccine in adults is insufficient. The purpose of this study was to clone the *lppX* gene from MTB isolate and to purify recombinant LppX protein for development of recombinant TB vaccine. The *lppX* gene from MTB strain, isolated from a TB patient in our country, was cloned into first pGEM-T and then pET28a vectors and transferred to *E. coli* BL21 strain. His-tag recombinant LppX protein expressed in *E. coli* was purified using nickel columns, and a 7: 3 vaccine formulation was prepared with Montanide ISA 720 VG adjuvant. Vaccine formulation, adjuvant and BCG vaccine, weres. c injected to 5 Balb/c miceand serum samples were collected at regular intervals from mice. The Western blot assay was performed to qualitatively screen the recombinant protein. While bands of the expected size were observed using the recombinant protein and the BCG vaccine-specific serum, the band was not observed only when the adjuvant-specific serum was used. When the IgG values were compared before and after immunization, the vaccine formulationwas significantly increased the humoral immune response. The capacity of these formulations to induce cellular immunity in Balb/c mice was measured by serum interferon-gamma (IFN-γ) and interleukin-12 (IL-12) levels. It was observed that the LppX formulation was as effective as the BCG vaccine in increasing the level of IFN-γ but it was not sufficient to boost IL-12 levels. In future studies, it is thought that double or triple fusions to be formed with different immunogenic proteins may be more effective.

2019, 67 pages

KEYWORDS: BCG, cellular immunity, Montanide ISA 720, recombinant vaccine, tuberculosis disease.

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

"*Mycobacterium tuberculosis* LppX proteinin rekombinant tüberküloz aşısı geliştirmede kullanımı'' adlı bu çalışma 2019 yılında hazırlanarak Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak sunulmuştur. Bu çalışmanın amacı, rekombinant tüberküloz aşısı geliştirmek için *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) izolatından *lppX* genini moleküler tekniklerle klonlayıp, LppX proteinini rekombinant olarak saflaştırarak, bu proteinlerin Montanide ISA 720 adjuvanıyla formülasyonunun hümoral ve hücresel bağışıklığı tetikleme kapasitelerini araştırmak ve immünojenik etkisini belirleyerek ticari BCG aşısı ile karşılaştırmaktır.

Moleküler biyoloji dalında bana çalışma fırsatı veren akademik hayata atılmamı sağlayan ve her türlü desteğini esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Sezer OKAY'a sonsuz teşekkür ederim. Üzerimde emeği geçen eğitimimiz için desteklerini esirgemeyen Çankırı Karatekin Üniversitesi Biyoloji Bölümü değerli hocalarıma, her zaman yanımızda olduklarını hissettiğimiz değerli dostlarımıza, aileme teşekkür ederim.

TÜBİTAK tarafından 3501-Kariyer Geliştirme Programı kapsamında SBAG-214S359 numaralı proje ile bu tez çalışması desteklenmiştir.

Cennet DOĞAN
Çankırı, Mayıs 2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vi**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **vii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **viii**
1.GİRİŞ **1**
1.1.Tüberküloz Nedir? **1**
1.2. Mycobacterium tuberculosis'in Özellikleri **3**
1.3.Aşı Nedir? **6**
1.3.1.Rekombinant Aşılar **8**
1.3.2.BCG Aşısı **9**
1.4.MTB Virülans Faktörleri **10**
1.5. Lipoprotein X (LppX) Proteini **11**
2. MATERYAL VE YÖNTEM **14**
2.1.Materyal **14**
2.1.1. Bakteri ve Plazmitler **14**
2.1.2. Primer Dizaynı **15**
2.2. Yöntem **16**
2.2.1. *M. tuberculosis* Genomik DNA İzolasyonu **16**
2.2.2. Agaroz Jel Elektroforezi **16**
2.2.3. *16S rRNA* PZR **17**
2.2.4. *lppX* Geni için PZR **17**
2.2.5. Jel Ekstraksiyonu **18**
2.2.6. pGEM-T Ligasyon **18**
2.2.7. Kompetan Hücre Hazırlanması **19**
2.2.8. Transformasyon **19**
2.2.9. Mavi-Beyaz Koloni Seçimi **20**
2.2.10. pGEM-T Plazmit İzolasyonu **20**
2.2.11. Restriksiyon Enzim Kesimi **21**
2.2.12. pET28a Vektörü Ligasyonu ve *E. coli* BL21 Transformasyonu **21**
2.2.13. Rekombinant LppX Proteininin İfadesinin Artırılması **22**
2.2.14. Hücrelerin Parçalanması (Sonikasyon) ve Protein Saflaştırılması **22**
2.2.15. Protein Miktarının Artırılması **23**
2.2.15.1 İnkübasyon Süresi **23**
2.2.15.2 İnkübasyon Süresi ve IPTG Miktarı **23**
2.2.15.3 İnkübasyon Sıcaklığı ve IPTG Miktarı **24**
2.2.15.4 Beta-Merkaptoetanol Kullanımı **24**
2.2.15.5 Bakteri Kültürü Hacminin Artırılması **24**
2.2.15.6 Protein Yoğunluğunun Filtre Yöntemiyle Artırılması **25**
2.2.16. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamit Jel Elektroforezi) **25**
2.2.17. Protein Yoğunluğunun Kantitatif Ölçülmesi **25**
2.2.18. Saflaştırılan Proteinlerden Aşı Formülasyonlarının Hazırlanması **26**
2.2.19. Farelerde immünizasyon **26**
2.2.20. Western Blot **27**

2.2.21. Total Immünoglobulin G (IgG) Miktarının Belirlenmesi 28
2.2.22. İnterferon-gama (IFN-γ) Miktarının Belirlenmesi 29
2.2.23. İnterlökin 12 (IL-12) Miktarının Belirlenmesi 30
3. BULGULAR 32
3.1. Genomik DNA İzolasyonu ve 16S rRNA PZR 32
3.2. *lppX* Geni için PZR 33
3.3. *lppX* geni Jel Ekstraksiyonu 33
3.4. *lppX* Geninin pGEM-T Vektörüne ligasyonu ve pGEM-T-lppX Vektör Klonlanması 34
3.5. pGEM-T-*lppX* Plazmit İzolasyonuve Yapışkan Uçlu*LppX* Gen Eldesi..... 35
3.6. pET28-a(+) Vektörüne Ligasyon 35
3.7.pET28a- *lppX* Vektörün *E.coli BL21*'e Transformasyonu 36
3.8. Rekombinant LppX Proteininin Saflaştırılması 37
3.9. Western Blot 41
3.10.Total IgG Miktarı..... 42
3.11. İnterferon-gama (IFN-γ) Miktarı 43
3.12. İnterlökin 12 (IL-12) Miktarı..... 45
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 47
KAYNAKLAR 51
EK-1 KÜLTÜR ORTAMLARININ HAZIRLANMASI..... 55
EK-2 ÇÖZELTİLER VE TAMPONLAR 55
EK-3 KULLANILAN KİMYASAL, ENZİMLER VE KİTLER..... 62
EK-4 NÜKLEOTİD DİZİ ANALİZLERİ, BOYUT BELİRTEÇLERİ VE PLAZMİTLER..... 64
ÖZGEÇMİŞ..... 67

SİMGELER DİZİNİ

°C	Selsiyus
AIDS	Edinilmiş İmmün Yetmezlik Sendromu
Ala	Alanin
AMP	Adenozin monofosfat
Arg	Arjinin
BCG	Bacille Calmette Guerin
Bp	Baz çifti
CFU	Koloni oluşturma birimi
DNA	Deoksiribonükleikasit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
ELISA	Enzim bağlıimmunosorbent deneyi
Gly	Glisin
HIV	İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
IFN	İnterferon
IgG	İmmunoglobulinG
IL	İnterlökin
IPTG	İzopropil-ß-D-galaktopiranosit
Kb	Kilo baz
kDa	Kilo dalton
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
nm	Nanometre
OD	Optik dansite
ORF	Açık okuma çerçevesi
Pro	Prolin
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
rpm	Dakikadaki dönme sayısı
rRNA	Ribozomal ribonükleikasit
UV	Ultraviyole
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 1 2000-2018 yılları arasında dünya çapında meydana gelen TB insidansı ve TB ölümlerine ait oranlar 3
Şekil 1. 2 MTB'nin koloni yapısı ve elektron mikroskobu görüntüsü 5
Şekil 1. 3 MTB'nin genom yapısı 6
Şekil 1. 4 Enfeksiyonun erken basamaklarında DIM ve PGL tarafından makrofaj aktivitesinin yeniden modellenmesinin olası moleküler mekanizmaları 13

Şekil 2. 1 Western blot yönteminde izlenen transfer işlem sırası 28

Şekil 3. 1 MTB genomik DNA izolasyonu agaroz jel elektroforez görüntüsü 32
Şekil 3. 2 *16S rRNA* geni PZR agaroz jel görüntüsü 32
Şekil 3. 3 PZR sonucu agaroz jel görüntüsü 33
Şekil 3. 4 Jel ekstraksiyon sonrası agaroz jel görüntüsü 34
Şekil 3. 5 Mavi-beyaz koloni oluşumu 34
Şekil 3. 6 pGEM-T-lppX restriksiyon enzim kesimi agaroz jel görüntüsü 35
Şekil 3. 7 pET28a vektörünün *EcoRI* kesiminin agaroz jel görüntüsü 36
Şekil 3. 8 pET28a-*lppX* koloni taraması agaroz jel görüntüsü 37
Şekil 3. 9 Rekombinant proteinlerin nikel kolon uygulamalarının SDS-PAGE görüntüsü 38
Şekil 3. 10 3 saat inkübe edilen LppX protein örneklerinin SDS-PAGE görüntüsü 38
Şekil 3. 11 2-4 saat inkübasyon ve 0.5 mM IPTG kullanılan deneyin SDS-PAGE görüntüsü 39
Şekil 3. 12 1 mM ve 0.5 mM IPTG indüklemesi deneyinin SDS-PAGE görüntüsü 40
Şekil 3. 13 Beta-merkaptoetanol uygulamasının SDS-PAGE görüntüsü 40
Şekil 3. 14 Kültür hacmini artırma uygulaması SDS-PAGE görüntüsü 41
Şekil 3. 15 Saflaştırılan proteine ait SDS-PAGE ve Western blot görüntüsü 42
Şekil 3. 16 LppX antijenine karşı BCG antikorunun ve adjuvana karşı oluşan antikorun çapraz reaksiyonunu gösteren Western blot deneyi 42
Şekil 3. 17 Montanide ISA 720 VG adjuvanı ile hazırlanmış LppX proteinine ait aşı formülasyonunun Balb/c farelerdeki hümoral bağışıklık (total IgG) yanıtı 43
Şekil 3. 18 Farklı aşı gruplarının Balb/c farelerde tetikledikleri serum IFN-γ düzeyleri 44
Şekil 3. 19 Farklı aşı gruplarının Balb/c farelerde tetikledikleri serum IL-12 düzeyleri 45

EK-4
Şekil 1 PageRuler Plus Prestained protein marker ve Unstained protein moleküler ağırlık marker 65
Şekil 2 GeneRuler 50 bp DNA marker 65
Şekil 3 pGEM-T Easy klonlama vektörü 66
Şekil 4 pET-28a His-tag ekspresyon vektörü 66

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. 1 MTB'nin bulaşmasını etkileyen faktörler 2
Çizelge 1. 2 MTB'nin bilimsel sınıflandırılması 4
Çizelge 1. 3 MTB'nin virülans faktörleri 10
Çizelge 1. 4 LppX proteini genel açıklaması 12

Çizelge 2. 1 Deneylerde kullanılan bakteri suşları 14
Çizelge 2. 2 Deneylerde kullanılan plazmitler 14
Çizelge 2. 3 PZR'da kullanılan primerler 15
Çizelge 2. 4 Ligasyon miktarları 19
Çizelge 2. 5 SDS-PAGE jel hazırlamada kullanılan içerik ve miktarları 26
Çizelge 2. 6 Aşılamada kullanılan enjeksiyonlar 27
Çizelge 2. 7 Fareler için aşılama ve kan alma zamanları 27

Çizelge 3. 1 Farklı aşı gruplarının Balb/c farelerdeki serum IFN-γdüzeylerinin tek yönlü varyans analizi ve Turkey's testi ile karşılaştırılması 44
Çizelge 3. 2 Farklı aşı gruplarının Balb/c farelerdeki serum IL-12 düzeylerinin tek yönlü varyans analizi ve Turkey's testi ile karşılaştırılması 46

1.GİRİŞ

1.1.Tüberküloz Nedir?

Tüberküloz (TB) hastalığı, sıklıkla *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) bakterisinin neden olduğu, verem adı ile bilinen, geçmişi insanlık tarihi kadar eski olan, bulaşıcı bir hastalıktır. Geçen binlerce yıllık süre içinde tüberküloz insidansında artış ve azalmalar göstererek toplumun sağlığı bakımından her zaman kalıcı bir problem olma özelliğini sürdürmüştür. Tanımlanacak olursa; latent tüberküloz enfeksiyonu *M.tuberculosis* basili ile karşılaşmış ancak hastalık oluşturmamış; yapılan tüberkülin deri testinin (PPD) pozitif, akciğer grafisinin ve fizik muayene bulgularının normal olması durumuna denir. *M.tuberculosis* basilinin akciğerde lezyon oluşturması, şikâyetin devam etmesi, fizik muayene ve akciğer grafisinin patolojik bulgu içermesine tüberküloz hastalığı denir. (Kılıç vd. 2011).

Tüberküloz hastalığı pulmuner ve ekstrapulmuner olmak üzere iki şekilde görülmektedir. Hastalık süreci boyunca basil tipik olarak akciğerleri etkileyebilir buna pulmoner TB, bazen diğer bölgeleri de etkileyebilir buna ise ekstrapulmoner TB denir. Pulmoner TB hastası olan birinin öksürme hapşırma gibi yollarla bakteriyi dışarıya atması nedeniyle hava yoluyla hastalık bulaşmaktadır (Çizelge 1.1). Genellikle, MTB ile enfekte olmuş kişilerin çok az bir kısmı hastalığa yakalanır ancak HIV pozitif kişilerin hastalığa yakalanma oranı çok daha yüksektir. TB, erkeklerde kadınlardan daha çok görülür ve ekonomik olarak üretken yaş grubundaki yetişkinleri daha fazla etkilemektedir. (DSÖ, 2018).

Tüberküloz enfeksiyonunun vücuda yayılmasında üst solunum yollarında büyük partiküller tutulurken, alveollere küçük partiküller ulaşır. MTB basili alveoldeki makrofaj içine alınarak çoğalırlar. Lenf bezelerine giden bir kısım basil kan dolaşımı yardımı ile beyine, akciğer apekslerine, böbreklere, kemiklere ve diğer organlara yerleşirler. Bağışıklık sistemi yaklaşık olarak 2 ile 8 hafta arasında basilin yayılmasını önler (Özkara vd. 2003).

Çizelge 1.1 MTB'nin bulaşmasını etkileyen faktörler (Alaşan 2015)

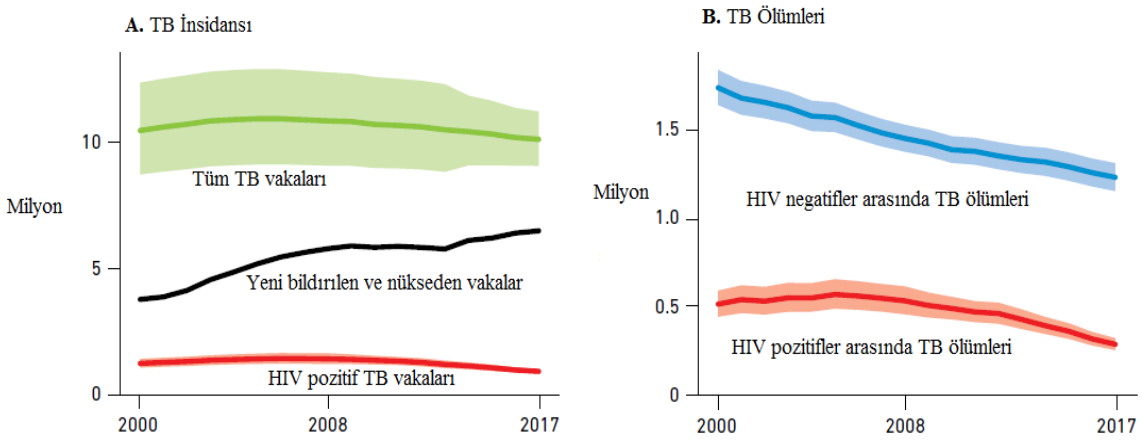
Tüberküloz Hastası	Ortam	Hedef Kişi
Balgamında MTB sayısı	Havalandırma (havanın hacmi artırılarak ortamdaki MTB seyreltilir)	Enfeksiyona/MTB'ye dirençlilik
Balgamın dağılması (öksürük, hapşırık, sulu balgam,)	Tekrar aynı havanın ortamda nufus etmesi	Hastalanmayı artıran durumlar ve diğer hastalıklar
MTB'nin canlılığı	Güneş ışığı, ultraviyole	MTB kaynağıyla geçirilen zaman
MTB'nin virülansı	Tüberküloz hastasına yakın olma	

Tüberküloz hastalığının tanısında dünya çapında en yaygın yöntem, balgam örneklerinde bakterinin mikroskop altında incelenmesine dayanan, balgam yayma mikroskopisidir. Son yıllarda tüberküloz tanı teknolojilerindeki gelişmeyle birlikte, hızlı moleküler tüberküloz tanı testleri kullanılmaya başlanılmış olmakla birlikte gelişmiş laboratuvar kapasitesi olan ülkelerde kültür metotlarıyla da TB tanısı yapılabilmektedir. (DSÖ, 2018).

Tüberküloz hastalığı dünyada ölümle sonuçlanan bir enfeksiyon hastalığı olarak önemini yitirmemiştir. Son otuz yıl içinde sosyo-ekonomik sorunlar, göçler, savaşlar, tüberküloz kontrol programlarının ihmal edilmesi ve özellikle de HIV/AIDS salgının ortaya çıkması ile tüberküloz hastalığının insindansın da birçok ülkede artışı olmuştur (Kılıçaslan 2007).

Tüberküloz basili ile dünya nüfusunun %2'si enfekte olmuştur. Tüberküloz her yıl 8,7 milyon insanda görülmekte, 2 milyonunda ölümle sonuçlanmaktadır (Şekil 1.1). Türkiye'de tüberküloz orta derecede yaygındır. T.C Sağlık Bakanlığı verilerinde her yeni yıl içerisinde 100.000 kişiden 30'unda tüberküloz hastalığı görülmektedir. DSÖ küresel TB 2018 Raporu'na göre Türkiye'de yaklaşık olarak yılda ortaya çıkan

yenitüberküloz hastası 13 ila 14 bin arasındadır. Tespiti yapılan yeni başlangıç görülen tüberküloz hasta sayısı %6 oranında her yıl azalmaktadır. Tüberküloz hastalarının %41 oranında kadın, %59 oranında erkektir. Tüberküloz hastalarının %64 oranında akciğer tüberkülozu ortaya çıkarken, %36 oranında diğer organlarda ortaya çıkmaktadır.



Şekil 1.1 2000-2018 yılları arasında dünya çapında meydana gelen (A) TB insidansı ve (B) TB ölümlerine ait oranlar(DSÖ, 2018)

1.2. Mycobacterium tuberculosis'in Özellikleri

Tüberküloz (verem) hastalığına yol açan *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) bakterisidir. İlk olarak Robert Koch adlı bilim adamı tarafından 24 Mart 1882 yılında tanımlanmıştır. Robert Koch yaptığı bu keşfi için tıp alanında 1905 yılında Nobel ödülünü almıştır. MTB'nin 1999 yılında genomu belirlenmiştir (Taylor 2003).

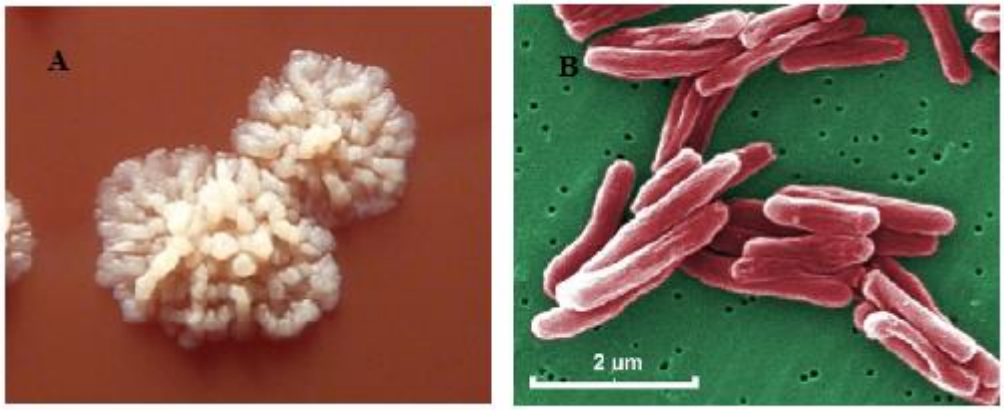
Mycobacteriaceace familyası içerisinde yer alırlar ve çomak şeklinde, asido rezistans, hareketsiz bakterilerdir. Patojen ve saprofit türleri de bulunur. MTB'nin bilimsel sınıflandırması Çizelge 1.2'de verilmiştir.

Çizelge 1.2 MTB'nin bilimsel sınıflandırılması (Alaşan 2015)

ALEM	Bacteria
BÖLÜM	Actinobacteria
TAKIM	Actinomycetales
FAMİLYA	Mycobacteriaceae
CİNS	*Mycobacterium*
TÜR	*M. tuberculosis*

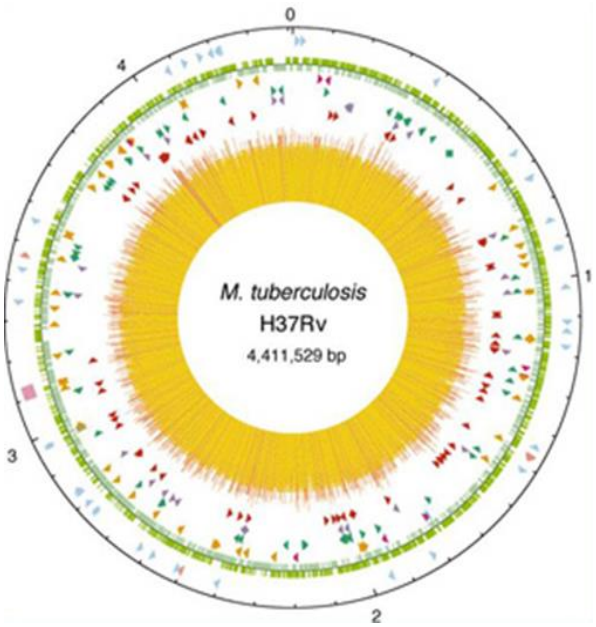
MTB, sporsuz, hareketsiz, 1-4 µm uzunluğunda, 0.3-0.6 µm eninde kapsülsüz çomak şeklinde bir bakteridir. Yavaş büyüme, dormansi, kompleks hücre duvarı ve hücre içi patogenez ile karakterizedir. MTB besi ortamında yaklaşık 24 saatte bir bölünür. Bu durum hastalığın kronik doğasını da belirler ve uzun bir tedavi süresini gerektirir. MTB'nin enfekte olan dokuda sessiz kaldığı dormansi halinde hastalık meydana gelmez ancak yaşlılık ve immün supresyon gibi bağışıklığın zayıfladığı durumlarda, bazen on yıllar sonra, dormant bakteri tekrar aktif hale gelir ve hastalık ortaya çıkar (Cole et al. 1998). MTB'nin koloni yapısı ve elektron mikroskobu görüntüsü Şekil 1.2'de gösterilmiştir.

Hücre duvarının hidrofobik özellik göstermesi ve boyaların eriyikleri ile az reaksiyon göstermelerinden dolayı gram boyası ile güç boyanırlar. Isı uygulaması yaparak boyama artırılabilmektedir. Bu bakteriyi boyamada Ehrlich Ziehl Neelsen yöntemi kullanılmaktadır. Bu boyama yöntemi ile mavi üzerinde kırmızı renkte görünürler. MTB'de mumsu bir kılıf bulunur ve bu yapı bakteriyi konak hücrelerden temizlenmeye karşı dirençli hale getirip orada on yıllarca hayatta kalmasına yardımcı olur. Bu mumsu kılıfa gömülü olan membran proteinleri ve membran bağlantılı proteinler ile hücre dışına salgılanan proteinler konak-patojen ilişkilerinde çok önemli rol oynadıkları için MTB' ye karşı ilaç ve aşı geliştirilmesinde potansiyel hedef olarak yer alırlar (Bell et al. 2012).



Şekil 1.2(A) MTB'nin koloni yapısı(Kubica et al. 2006) ve (B) elektron mikroskobu görüntüsü(Todar 2008)

MTB hücre içi bir patojen olup konağın makrofajlarına yerleşir. Burada, hücre içi ve lokal doku ortamını değiştirerek kazeöz, nekroz ve granuloma oluşturur. Birçok mikobakteriyel tür, makrofaj içerisinde siklik AMP (cAMP) patlaması yaparak hücrenin sinyal iletimini etkiler. Bakteri ayrıca hücre içinde hayatta kalabilmek için konakta fagozom oluşumunu engeller. MTB genomu 4.411.529 baz çiftinden oluşmaktadır (Şekil 1.3) ve %65.6 G+C içeriğine sahiptir. G+C içeriğini genom boyunca görece sabit olması, muhtemelen atipik baz kompozisyonuna sahip patojenite adacıklarının yatay transferinin olmadığını göstermektedir. MTB birçok antibiyotiğe doğal olarak dirençlidir ve bu durum tedaviyi zorlaştırır. Bu direnç, temel olarak geçirgenlik bariyeri olarak görev yapan ve yüksek hidrofobiye sahip hücre kılıfından kaynaklanır. Bunun yanı sıra, birçok potansiyel direnç determinantları genomda kodlanmaktadır. Bunlar, hidrolitik ya da ilaç modifiye eden enzimler (örneğin beta laktamazlar), birçok potansiyel ilaç dışa atım sistemleri ve ATP bağlanma kaseti (ABC) taşıyıcılarıdır (Cole et al. 1998).



Şekil 1.3MTB'nin genom yapısı(Cole et al. 1998)

1.3.Aşı Nedir?

Hayvanlarda ve insanlarda enfeksiyonlara karşı koruma sağlayan hümoral ve hücresel karakterde oluşan aktif bağışıklığı uyaran biyolojik maddeler aşı olarak adlandırılmaktadır. Vücudun mikroorganizmalara karşı korunmasında, pasif bağışıklık ve aktif bağışıklık görev almaktadır. Aşı kişilere hastalıklardan ve hastalıkların kötü sonuçlarından korumak için hastalığa yakalanma riskinin en yüksek olduğu dönemlerden önce yapılır (Anonim 1).

Moleküler biyoloji, immünoloji ve biyoteknolojideki yapılan çalışmalar ile ilerleme kaydetmesi, daha etkili, daha güvenilir, yüksek kalitede aşıların geliştirilmesini sağlamıştır. Aşıların immünojenik özelliklerini artırmak için bağışıklama stratejileri ve aşı formülasyonları geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Son zamanlarda DNA aşıları, bakteriyel ve viral aşılar ile aşılı, rekombinant ve doğal antijenlere dayalı subinit aşılar ve enfekte hayvanların ayırımını yapabilmeye yönelik marker aşıların geliştirilmesine ön planda yer verilmektedir. Bakteriyel enfeksiyonlarla mücadeleyi amaçlayarak geliştirilen aşı, aşılama yöntemleri ve aşı etkinliklerini arttırmaya yönelik yeni tip adjuvanlar önemlidir (Büyüktanır 2003).

Aşılarda aranacak özellikler (Topal 2013):

a) Uzun süre bağışıklık sağlamalı ve etkili olmalı
b) Dayanıklı, muhafaza edilebilir olmalı
c) Bir dozun ortaya çıkardığı bağışıklık yeterli olmalı
d) Toksik ve yan etkileri olmamalı
e) Ucuz olmalı, güvenilir olmalı ve kolay bulunmalı
f) Enfeksiyon meydana getirmemeli

Aşı tipleri canlı (atenüe) aşılar, inaktive aşılar, altünite (subunit) aşılar olmak üzere üç grupta incelenirler.

Canlı (atenüe) aşılar; çeşitli yöntemlerle patojenitesi yok edilmiş mikroorganizmalardan hazırlanan aşılardır. Doğal zayıflatılmış aşı suşları, suni zayıflatılmış olarak elde edilen suşlardan daha güvenilir ve standarttırlar. Tekrar virülans kazanma olasılığı, doğal zayıflatılmış suşlarda, çok zayıftır. Attenüe aşılar, latent enfekte, immün eğimi artmış ilaç kullanan ve immün yetmezliği olan bireylerde enfeksiyon sebep olabilir (Topal 2013).

İnaktive aşılar; virülansi yüksek olan suşların bazı yöntemlerle inaktive edilmesi ile hazırlanırlar. İnaktivasyon yapılırken kullanılan bazı inaktivanlar mikroorganizmaların antijenik yapılarını değiştirerek veya zarar vererek, vücutta oluşturduğu yanıtta değişiklik ve korumada azalma meydana getirebilir. İnaktivasyon yapılırken dikkat edilmediği durumlarda enfeksiyona yol açabilir. Vücutta oluşturduğu etki genellikle zayıf olduğu için bunu gidermek adına farklı adjuvanlar ile birlikte vücuda verilirler(Topal 2013).

Altünite (subunit aşılar); vücudun patojene bağışıklık geliştirmesini sağlayacak, patojenin genom veya proteom, parçalarının aşı olarak kullanılmasıdır. Bu nedenle üretilen aşı diğer aşıların yan etkilerini ve risklerini taşımamaktadır. Alt ünite aşılar üç grup altında incelenmektedir; alt ünite protein aşıları, toksoid aşılar ve rekombinant aşılar (Anonim 1).

1.3.1.Rekombinant Aşılar

Rekombinant aşılarda, mikroorganizmaların antijenik komponentleri çıkarıldıktan sonra alıcı bir hücreye transfer edilmesi, transfer edilen hücrede gen ürünü antijenik proteinin ekspresyonunun sağlanması, hücrelerde biriken proteinlerin elde edilmesi ve bunların deneme hayvanlarına verilerek bağışıklık kazandırılması amaçlanır. Bu yöntemle bakteri, virüs ve parazitlere karşı aşılar hazırlanmıştır. Rekombinant aşılar iki gruba ayrılmaktadır. Bunlar, protein aşıları ve DNA aşılarıdır. Patojene ait çok sayıda antijen bulunmasına rağmen bunların sadece bir kısmı koruyucu immün yanıt oluşturma özelliğine sahiptiler. İmmünolojik yöntemlerle ortaya çıkarılan potansiyel aşı antijenlerinin mümkün olan en yüksek saflıkta elde edilmeleri kritik bir adımı oluşturur. Saf olarak elde edilen koruyucu özellikli rekombinant aşılar diğer aşılara göre bazı avantajlara sahiptir (Akşit 2012). Bunlar;

a) Rekombinant alt ünite aşılar az sayıda immünojenik protein bulundurduğu için alerjiye neden olan diğer proteinler elemine edilmiş olur
b) Canlı patojen içermediği için yeniden hastalık oluşturma etkisi yoktur
c) Belirli proteinler kullanıldığı için spesifik tanıların geliştirilmesi mümkündür
d) Kullanılan adjuvanlar ile bağışıklık yanıtın yönü belirlenebilir

Bunun yanı sıra bazı dezavantajlarıda bulunmaktadır;

a) İn-vivo replikasyon ve kolonizasyon kabiliyetinde olmadıkları için immün yanıt ile sitotoksik T hücre yanıtını daha sınırlı ölçüde uyarması sayılabilir.
b) Sınırlı miktarda antijen içermesinden dolayı uzun süreli ve antijenik varyasyonlar gösteren infeksiyon etkenlerine karşı etkin koruyuculuk sağlayamama riski taşırlar.
c) Rekombinant aşılar hümoral ve hücresel bağışıklık yanıtını daha etkin uyarabilmeleri için adjuvanlara gerek duyulmaktadır.

1.3.2.BCG Aşısı

Bacille Calmette-Guérin (BCG), patojenitesiyok edilmiş, tüberküloz bakterisinin bütün yapısal özelliklerini taşıyan bir *Mycobacterium bovis* suşudur. Virülansı düşük, canlı bir aşıdır. Calmette ve Guerin tarafından 1908 yılında, Fransa'da bulunan bir aşıdır. T lenfositleri ve makrofajları aktive ederek tüberküloz enfeksiyonuna karşı savunmada bağışıklık mekanizmasını geliştirir. Tüberküloza karşı BCG aktif bağışıklık gelişmesini stimule etmek suretiyle bu hastalığın önlenmesinde endikedir. BCG aşısının hayatın ilk dönemlerinde yapılması, tüberküloz menenjit riskine karşı ve çocukluk zamanı tüberkülozuna karşı koruma sağlar. BCG aşısının güvenilirliği yüksektir, aşıdan sonra bazen görülebilen cilt lezyonları gibi basit komplikasyonlar ortaya çıkabilir (Kılıç vd. 2011).

BCG aşısı deri içine (İ.D) uygulanır, aşı ışığa ve ısıya çok dayanıksızdır. Aşı, patojen basilin yayılmasını lenfatik sitemle ve kanla engel olur. Bu şekilde hayatı tehdit eden miliyer tüberküloz, tüberküloz menenjit gibi rahatsızların görülme riskini azaltır. Meta analizlerde %50 oranında pulmunor TB önlemede etkili olduğu bulunmuştur. BCG aşısı tüberküloz hastalığına karşı immun yanıt mekanizmasını, virülans basilinin oluşturduğu enfeksiyondaki makrofajları ve T lenfositleri aktive ederek geliştirir. BCG aşısının güvenirliliğini, aşının komplifikasyonları yükseltir. Aşılamanın ardından görülen komplikasyonlar, aşılama yeri, derinliğine, aşının dozuna, kişinin yaşına, bağışıklık yapısına bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (Gökçay vd. 2000).

BCG aşısı, tüberküloz enfeksiyonuna karşı bir miktar koruma sağlayan aşıdır. BCG aşısı, MTB bakterisini maruz kalınırsa basilin bulaşmasını önlemez fakat hayatı tehdit eden bir hastalık yerine daha ılımlı daha az enfeksiyonla karşı karşıya gelmeyi sağlar. BCG aşısının, bağışıklık etkisini 6 ila 12 hafta arasında gösterebilir. BCG aşısı tüberküloza enfeksiyonuna karşı yüzde 50 ila 60 oranında bağışıklık gösterebilir ve kimi bireylerde zaman içinde, bazen etkisini yitirir (Kılıç vd. 2011).

BCG aşısını dezavantajı gelecek zamandaki Tüberkülin cilt testlerinden pozitif sonuç alınmasına neden olur. Bu, reaksiyona tüberküloz enfeksiyonunun mu yoksa BCG aşısının bir sonucu mu olduğunu belirleyemeyeceğimiz ihtimalini ortaya çıkarır.

1.4.MTB Virülans Faktörleri

Virülans, bir mikrobun ne derecede hastalık yapabileceğini ya da hastalığın şiddetini ifade ederken, patojen hastalığa neden olma yeteneği ifade etmek için kullanılır. Ekolojik olarak virülans, bir parazitin neden olduğu, konak organizmadaki evrimsel uyum azalmasıdır.

Rekombinant aşıların geliştirilebilmesi için öncelikle MTB'nin patogenezinde rol alan virülans faktörlerinin belirlenmesi önem taşımaktadır. Antibiyotik kasetleri kullanılarak gen susturma, komplementasyon, antisens RNA, proteomik ve genom analizi gibi yöntemlerle belirlenen virülans faktörleri, hücre salgısı ve hücre zarfı ile ilgili olanlar, hücre metabolizması ile ilgili enzimler ve transkripsiyon düzenleyiciler başlıkları altında incelenebilir (Smith 2003). Bell et al. (2012) MTB'nin hücre duvarı, membran, sitozol, lizat ve kültür filtratını proteomik bir yaklaşımla inceleyerek potansiyel virülans faktörlerini belirlemişlerdir (Çizelge 1.3).

Çizelge 1.3 MTB'nin virülans faktörleri (Smith 2003)

Genel Hücre Metabolizması ile İlgili Enzimler	**Transkripsiyon Düzenleyiciler**	**Hücre Salgısı ve Zarf İşlevi**
Aminoasit ve pürin biyosentetik genleri	Sigma faktörleri	Kültür filtre proteinleri
Lipit ve yağ asidi metabolizması	Cevap düzenleyiciler	Hücre yüzey bileşenleri
Metal alımı	Diğer transkripsiyon düzenleyicileri	
Anaerobik solunum ve oksidatif stres proteinleri		

Başarılı alt ünite protein aşılarının geliştirilmesi için bu virülans faktörlerinden daha fazla proteinin antijenik özelliklerinin uygun adjuvanlarla birlikte belirlenmesi

gerekmektedir. MTB virülans faktörleri, proteinlerin bilinen veya tahmin edilen işlevlerine göre gruplandırılmıştır (Junqueira-Kipnis et al. 2014).

1.5. Lipoprotein X (LppX) Proteini

Lipoproteinler; makromolekül olan lipid ve apolipoproteinlerden oluşur. Lipidler kompleks ve basit olarak iki ana başlıkta incelenirler. Kolesterol ve yağ asitleri en önemli iki basit lipid grubudur. Yağ asitlerinin ester oluşturmak üzere esterleşmeleri ile kompleks lipitler oluşur (Mergen vd. 2010).

Yukarıda bahsedilen lipitlerin vücutta sayısal aralıklarda ve kanda taşınabilmeleri için, suda eriyen apolipoproteinlerle birleşerek lipoproteinleri oluşturmaları gereklidir. Apolipoproteinler, lipoproteinlerin protein kısmını oluşturmaktadır (Mergen vd. 2010).

Apolipoproteinlerin temelde dört görevi vardır:

1. Lipoproteinin sekresyonu ve bir araya gelmesi
2. Lipoproteinin yapısal bütünlüğünü sağlamak
3. Enzimlerin inhibitörü veya koaktivatör
4. Tüm partikülün hücre içine alımı veya lipit içeriğinin selektif alımı için özgül reseptörlere veya proteinlere bağlanmak veya yanaşmak

Mycobacterium türünden lipoproteinler ailesi birçok proteinlerden oluşur (Sulzenbacher et al. 2006). Bu proteinler şunlardır:

LprG: MTB LprG proteininin 27 kDa membran bağlantılı lipoprotein. Bunun ifadesi bir immünojenik bağışıklığı için yeterli olup, farelerde enfeksiyonun büyümesi için gereklidir.

LppX: MTB'nin dış zarında bulunan kompleks lipitlerin translokasyonu için gerekli bir lipoproteindir ve bakterinin patojenitesinde rol aldığı gösterilmiştir. *lppX* geni 702 bç ve

233 aminoasit uzunluğunda, hücre duvarında ve hücre işlemlerinde görev alan bir proteini kodlamaktadır (Çizelge 1.4).

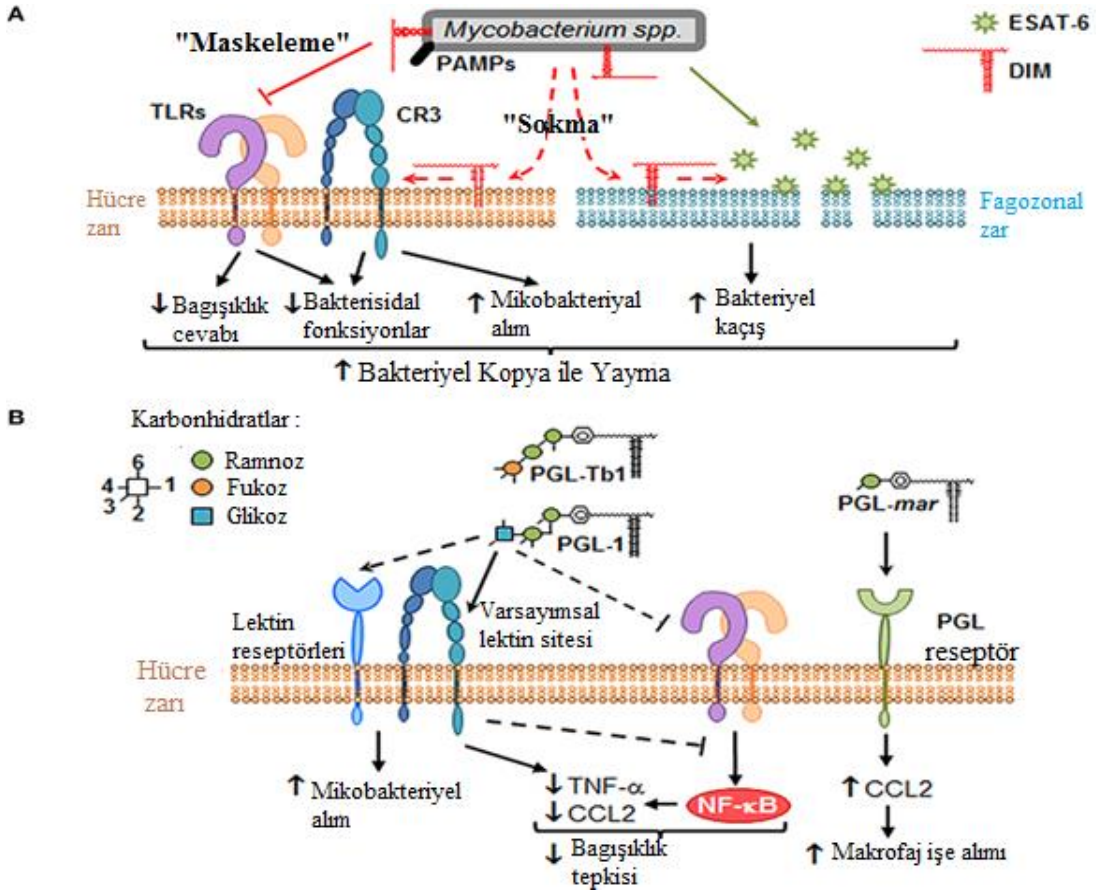
LprF: KDP ozmotik stres sinyal transdüksiyon yoluna dahil olan bir zar lipoproteini olduğu düşünülmektedir.

Çizelge 1.4 LppX proteini genel açıklaması (Anonim 2)

Gen Adı	*lppX*
RV Numarası	Rv2945c
Tip	CDS
Fonksiyon	Bilinmeyen
Ürün	Muhtemel korunmuş lipoprotein LppX
Moleküler kütle (Da)	24140.2
İzoelektrik nokta	4.8103
Gen uzunluğu (bp)	702
Protein Uzunluğu	233
Konum (kb)	3290.62
Fonksiyonel kategori	Hücre duvarı ve hücre işlemleri

MTB’nin dış membranında kompleks yapıdaki lipid LppX phthiocerol dimycocerosates (DIM)'e translokasyonu için gerekli bir lipoproteindir. LppX mutantı ve LppX proteini üzerinde yapılan işlevsel ve yapısal analizler sonucunda bu lipoproteinin rolü MTB hücre yüzeyine DIM taşınması da görev aldığı belirlenmiştir (Sulzenbacher et al. 2006).

LppX, MTB genomun içinde sentezlenerek ftioserol dimikoserosat (DIM) taşınmasını sağlayan bir proteindir. DIM makrofajlar tarafından reaktif nitrojen ara maddelerinin sidal etkinliğinden üretilir, MTB’yi korur ve enfeksiyonun erken bağışıklık tepkisi modüle eder (Sulzenbacher et al. 2006). Enfeksiyonun erken basamaklarında DIM ve fenolik glikolipidler (PGL) tarafından makrofaj aktivitesinin yeniden modellenmesinin olası moleküler mekanizmaları Şekil 1.4’ te gösterilmiştir.



Şekil 1.4 Enfeksiyonun erken basamaklarında (A) DIM ve (B) PGL tarafından makrofaj aktivitesinin yeniden modellenmesinin olası moleküler mekanizmaları (Arbues et al. 2014)

Bu çalışmanın amacı, rekombinant tüberküloz aşısı geliştirmek için *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) izolatından *lppX* genini moleküler tekniklerle klonlayıp, LppX proteinini rekombinant olarak saflaştırarak, bu proteinlerin Montanide ISA 720 adjuvanıyla formülasyonunun hümoral ve hücresel bağışıklığı tetikleme kapasitelerini araştırmak ve immünojenik etkisini belirleyerek ticari BCG aşısı ile karşılaştırmaktır.

2.MATERYAL VE YÖNTEM

2.1.Materyal

2.1.1. Bakteri ve Plazmitler

Bu çalışmada, bir verem hastasından izole edilen (Prof. Dr. Süheyla Sürücüoğlu, Celal Bayar Üniversitesi, Manisa, Türkiye)*M. tuberculosis* (MTB) bakterisi kullanıldı. Genetik olarak GeneXpert ve 16S rRNA analizleriyle tanımlandı. Laboratuvar deneylerinde kullanılan bakteri suşları Çizelge2.1'de ve plazmitler Çizelge 2.2'de verildi. Nükleotid dizi analizleri, plazmit vektörleri ve boyut belirteçleri Ek-4'de; kültür ortamlarının hazırlanması Ek-1'de, solüsyon ve tamponlar Ek-2'de; kullanılan kimyasal, enzimler ve kitler Ek-3'de sunuldu.

Çizelge 2.1 Deneylerde kullanılan bakteri suşları

BAKTERİ SUŞU	**KAYNAĞI**	**ÖZELLİĞİ**
M. tuberculosis 14/1649	Prof. Dr. Süheyla Sürücüoğlu	TB hasta izolatı
E. coli BL21	Novagen, Merck	*fhuA2 [lon] ompT gal [dcm] ΔhsdS*
E. coli DH5α	Amerikan tip Kültür koleksiyonu	F-Φ80*lac*ZΔM15Δ (*lac*ZYA-*arg*F) U169 *rec*A1 *end*A1 *hsd*R17

Çizelge 2.2 Deneylerde kullanılan plazmitler

PLAZMİT	**KAYNAĞI**	**MARKÖRÜ**	**BÜYÜKLÜĞÜ**
pET-28a (+)	Novagen, Merck	Kanamisin	5.3 kb
pGEM®-T Easy	Promega	Ampisilin	3.0 kb

M. tuberculosis bakterisini büyütmek için Lowenstein-Jensen Medium Slant BBL™ besiyeri kullanıldı. *E. coli* BL21 ve *E. coli* DH5α suşlarının büyümesi için Luria Broth (LB) sıvı besiyeri, saklanması için Luria Agar (LA) katı besiyeri kullanıldı. LA besiyerinde büyütülen kültürler +4°C'de saklanarak canlılığını muhafaza etmek için aylık yeni kültürler yapıldı. Bakteriyi uzun süre muhafaza etmek için ise LB besi yerinde büyütülen kültürler %50 gliserol içerisinde –80°C'de depolandı. Çizelge 2.1'de verilen bakteri için uygun antibiyotikler besiyerlerine ampisilin 100 µg/ml, kanamisin 30 µg/ml oranında kullanıldı.

2.1.2. Primer Dizaynı

PZR'da kullanılacak primerler (Çizelge 2.3) Primer3 (http://primer3.ut.ee) programında analiz edildi. PZR'den önce primerlerin seyreltilmesi yapıldı. Ayrı ayrı her primerin 100 pmol değerine ulaşması için 10 µL stok primere 90 µL saf su ilave edildi. 10 pmol değerinde primer elde edilerekPZR'da kullanıma hazır konsantrasyona getirildi.

Çizelge 2.3 PZR'da kullanılan primerler

Gen adı	Primer adı	Nükleotit dizisi	Gen (bç)	GC (%)	Tm (°C)
lppX	lppXF	5'-ggatccatgaatgatggaaaacggg-3'	702	48,0	62,9
lppX	lppXR	5'-agatctctagtcgacgttgacggg-3'	702	54,2	57,6
16S rRNA	16S rRNAF	5'-agagtttgatcatggctcag-3'	1300	45	46,4
16S rRNA	16S rRNAR	5'-ggttaccttgttacgactt-3'	1300	42,1	40,7

2.2.Yöntem

Rekombinant DNA teknikleri Okay (2011)' deki gibi yapıldı.

2.2.1. *M. tuberculosis* Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonunda Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kiti kullanıldı. İlk olarak 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 2 mM EDTA, %1.2 Triton X-100 ve kullanılmadan hemen önce 20 mg/mL lizozim eklenerek lizis buffer hazırlandı. Bakteri hücreleri eppendorf tüpüne alınarak üzerine 180 µL lizis buffer eklendi. 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Devamında izolasyon kiti içerisinde bulunan lizis bufferdan 200 µL ve proteinaz K'dan 20 µL eklenerek homejen karışım elde etmek amacıyla vortekslendi. Hücrelerin parçalanması için yaklaşık olarak 30 dakika 56°C'de su banyosunda inkübasyon edildi. RNaz A' dan 20 µL eklenerek vortekslendi. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyon edildi. %50 etanoldan 400 µL eklenerek vortekslendi. Hazırlanan hücre lizatı kit içerisinde bulunan genomik DNA saflaştırma kolonuna transfer edilerek 6000×g'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda kolonun altında kalan sıvı kısım atıldı. 500 µL wash buffer 1 eklenerek 8000×g'de 1 dakika santrifüj edilerek ilk yıkama yapıldı. Altta kalan sıvı kısım atıldı. 500 µL wash buffer 2 eklenerek 12000×g 3 dakika santrifüj edildi. Altta kalan sıvı kısım tekrar atıldıktan sonra kolonda wash buffer kalıntısı olmaması için 12000×g 1 dakika boş olarak santrifüj edildi. Kolon yeni steril 1,5 mL eppendorf tüpüne alınıp ve kolonun tam ortasına gelecek şekilde 100 µL elüsyon buffer eklendi. Oda sıcaklığında 2 dakika inkübasyon edilerek, 8000×g'de 1 dakika santrifüj edildi. Saflaştırılmış DNA -20 dondurucuya kullanılmak üzere kaldırıldı.

2.2.2. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforez düzeneği için Thermo Scientific yatay jel elektroforez kullanıldı. İzole ettiğimiz MTB Genomik DNA için %0,8' lik jel ve TAE bufferı (EK-2) Mikrodalga fırında 3 dk kadar ısıtılarak jel hazırlandı ve jel kalıba döküldü. İzole edilen DNA örnekleri Thermo Scientific 6XDNA Loading Dye (LD) yükleme boyası ile DNA

bantlarının moleküler ağırlıklarının belirlenmesi içinde markör olarak Thermo Scientific GeneRuler 50 bp veya 1 kb DNA Ladder kullanılarak jele yüklendi. Yükleme yapılmadan önce dökülen agaroz jelin üzeri 1X TAE (EK-2) bufferı eklenerek kapatıldı. Yükleme miktarları sırası ile marker 10 µL hacimde, DNA örneği 18 µL olacak sekilde 15 µL DNA 3 µL LD yükleme boyası eklenerek 6 µL ve 12 µL hacimde yüklendi. 40 dakika 90 Volt elektrik akımı verilerek yürütme işlemi gerçekleştirildi. Yürütme işlemi tamamlandığında jel etidyum bromür (0,5 µg/mL) ile boyanarak DNA bantları Vilber Lourmat UV lambası ile görüntülendi.

2.2.3. *16S rRNA* PZR

MTB bakterisinin moleküler tür tespitini yapmak için *16S rRNA* geni Çizelge2.3'de verilen primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltıldı. PZR karışımı; Kalıp DNA 1 µL, F-R primer 1'er µL, MgCl2 5 µL, Taq buffer 5 µL, dNTP 1 µL, Taq DNA polimeraz 1 µL, dH2O 35 µL olarak 50 µL hacme tamamlandı. Başlangıç denatürasyonu 94°C 10 dakika, denatürasyon 94°C 1 dakika, primer bağlanması 43°C 30 saniye, zincir uzaması 72°C 1 dakika, son uzama 72°C 10 dakika olacak şekilde PZR programı uygulandı. PZR ürünü daha sonrasında %1'lik agaroz jelde 90 voltta 60 dakika yürütüldü.

2.2.4. *lppX* Geni için PZR

*lppX*geni PZR için Çizelge2.1.2.1'de verilen primerler kullanıldı. PZR karışımına 10X*Taq*buffer KCl, 25 mM $MgCl_2$, 10 mM dNTP karışımı, 10 pmol ileri ve geri primer, 1 U/µL *Taq* DNA polimeraz ve 10 ng kalıp DNA kullanıldı. Kalıp DNA 1 µL, F-R primer 1'er µL, $MgCl_2$5 µL, *Taq* buffer 5 µL, dNTP 1 µL, *Taq* DNA polimeraz 1 µL, dH_2O 35 µL, total hacim 50 µL eklendi. *Taq* DNA polimeraz tüplere başlangıç denatürasyon aşamasından sonra eklendi. PZR programı;

1) Başlangıç denatürasyonu 94°C 10 dakika
2) Denatürasyon 94°C 1 dakika
3) Primer bağlanması 52°C 30 saniye

4) Zincir uzaması 72°C 1 dakika
5) Son uzama 72°C 10 dakika olarak ayarlandı.

Denatürasyon primer bağlanması ve zincir uzaması basamağı 35 döngü olarak ayarlandı. PZR ürünleri %1'lik agaroz jel de yürütüldü.

2.2.5. Jel Ekstraksiyonu

Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kiti kullanılarak agaroz jelde görüntülenip kesilmiş PZR ürünlerinin saflaştırılması yapıldı. İlk olarak 1,5 mL eppendorf tüp içerisine kesilen jel konularak ve tartımı yapıldı. Kesilen bant üzerine tartım yapılan agırlığıyla 1:1 oranında kit içerisindeki bağlanma bufferı eklenerek jel tamamen çözünene kadar 50-60°C'de inkübasyon edildi. Jel karışımı kit içerisindeki kolona eklenerek 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek altta kalan süpernatant kısmı atıldı. Tekrardan kolona 100 µL bağlanma bufferı eklenerek 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek altta kalan süpernatant kısmı atıldı. Kolona 700 µL wash bufferı ekleyerek 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek alt kısıma kalan süpernatant atıldı. Wash bufferdan kurtulmak için kolon boş olarak 1 dakika santrifüj edildi. Kolon steril 1,5 mL eppendorf tüpüne alınarak tam orta noktasına gelecek şekilde 50 µL elüsyon bufferı eklenerek 1 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Saflaştırılmış DNA -20 °C'de saklanarak, saflaştırılan DNA'nın 5 µL'si %0,8'lik agaroz jelde 90 voltta 60 dakika yürütüldü.

2.2.6. pGEM-T Ligasyon

pGEM-T Easy (Promega) vektörüne jel ekstraksiyon sonunda saflaştırılan DNA +4°C'de bir gece inkübasyon ile ligasyon yapıldı (Çizelge 2.4)

Çizelge 2.4 Ligasyon miktarları

pGEM-T Easy Vektör	2 µL
PZR ürünü	6 µL
65 ^{o}C'de 5 dakika, buzda 5 dakika bekletilmiştir.	
T4 DNA ligaz	1 µL
2X Ligasyon buffer	1 µL

2.2.7. Kompetan Hücre Hazırlanması

Bakteri kültürü *E.coli* DH5α suşu LB besiyerine ekilerek bir gece 37°C'de büyütüldü. Steril 500 mL'lik erlenmayer şişesine 200 mL steril edilen LB besiyeri aktarılarak inkübasyon yapılan bakteri kültürünün ekimi yapıldı. Çalkalayıcı inkübatörde hücreler 37°C'de yaklaşık olarak 3 saat inkübe edildi. Optik dansite (O.D) değeri 600 nm'de 0,5-0,6'ya ulaştığı zaman hücre kültürü 10 dakika buz içerisinde bekletildi. Hücre kültürü steril falkon tüplere alınarak 3500 rpm 5 dakika +4°C'de santrifüj edildi ve üst kısımda kalan süpernatan atıldı. Alt kısımda kalan pelet 20 mL Buffer 1 (EK-2) eklenerek çözdürülerek ve 3500 rpm'de 5 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatan atıldı ve pelet 8 mL Buffer 2 (EK-2) içinde çözdürülerek steril eppendorf tüplere 220 µL olarak dağıtılarak -80°C'de muhafaza edildi.

2.2.8. Transformasyon

Kompetan hücreler buz üzerinde 15 dakika bekletilerek steril eppendorf tüplerine 100 µL dağıtıldı. 10 µL ligasyon ürünü kompetan hücre içine eklenerek pipetaj yapılır ve 30 dakika buz üzerinde inkübasyon edilir. İnkübasyon sonunda su banyosunda 42°C'de 90 saniye bekletilerek hemen buz üzerinde alınıp 5 dakika bekletildi. Sonrasında hücrelerin üzerine 500 µL LB besiyeri eklenerek çalkalamalı inkübatörde 37°C'de 100 rpm'de 80 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda 6000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek eklenen LB miktarı (500 µL) çekilir geriye kalan 100 µL içinde bakteri peleti

çözündürülür. 100 µg/mL ampisilin (*amp)* içeren LA besiyerine 40 µL X-gal (EK-2)ve 4 µL izopropil-ß-D-galaktopiranosit (IPTG EK-2) yayımı yapılmış ve hücrelerin ekimi bu besiyerine yapılarak 37°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı.

2.2.9. Mavi-Beyaz Koloni Seçimi

Transformasyon sonucunda ekim yapılan hücrelerde plazmitte bulunan *lacZ* geni içerisine klonlamak istenilen genimiz eklenmişse *lacZ* geni bozulacağından bakteri X-gali kullanamamakta ve koloniler beyaz olmaktadır. İstenilen gen eklenmemişse bakteri *lacZ* geni ile X-gali parçalamakta ve koloni mavi olmaktadır. Bu veriye göre oluşan beyaz koloniler seçildi. Yeniden LA+*amp* besiyerine X-gal, IPTG yayılarak seçilen beyaz kolonilerin çizgi ekimi yapılarak 37°C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı.

2.2.10. pGEM-T Plazmit İzolasyonu

Plazmit izolasyonunda kullanılacak bakteri kültürünü hazırlamak için steril falkon tüpüne 5 mL LB sıvı besiyerine çizgi ekim yapılan beyaz koloniden ekilerek 37^{o}C'de 1 gece inkübasyona bırakılarak hazırlandı. Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit kullanılarak plazmit izolasyonu yapıldı. 5 mL sıvı besiyerine ekilen bakteri kültürü 1,5 mL'lik eppendorf tüplerde üç tekrarlı olmak üzere 12000 rpm'de 1 dakika çöktürüldü. Alt kısımda kalan pelet üzerine 250 µL resüspansiyon bufferı eklenerek pipetajla bakteri peleti çözdürüldü. Daha sonra 250 µL lizis bufferı ekleyerek tüpler 4 ila 6 kez ters çevrilerek karıştırıldı. 350 µL nötralizasyon buffer eklenen, beyaz parçacıkların olduğu bir karışım oluşana kadar 4 ila 6 kez karıştırıldı. 12000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek beyaz parçacıklar dibe çökmesi sağlanarak üst kısımda kalan supernatant pipet yardımı ile dikkatli bir şekilde çekilerek kit içerisindeki kolona aktarıldı. Daha sonra 1 dakika 12000 rpm'de santrifüj edilerek alt kısımda kalan sıvı atıldı. 500 µL wash bufferı kolona eklenerek 12000 rpm'de 1 dakikasantrifüj edilerek altta kalan sıvı kısım atılmıştır. Aynı işlem ikinci kez wash bufferı ile tekrarlandı. Wash

bufferdan kurtulmak için 12000 rpm'de 1 dakika boş olarak kolon santrifüj edildi. Kolon steril eppendorf tüpüne aktarılarak toplamda hacmi 50 µL olacak şekilde kolon üzerine iki tekrarlı 25 µL elüsyon tamponu eklendi.2 dakika oda sıcaklığında bekletilip, 2 dakika 12000 rpm'de santrifüj edildi. Alt kısımda kalan plazmit DNA -20°C'de saklandı.

2.2.11. Restriksiyon Enzim Kesimi

Plazmit izolasyonu ile elde ettiğimiz plazmitlerin istenilen geni taşıyıp taşımadığını kontrol etmek amacı ile restriksiyon enzim kesimi yapıldı. Restriksiyon enzim kesimini için kullanılan miktarlar Plazmit DNA 8 µL, *EcoRI* enzimi 1 µL, *EcoRI* bufferı 1 µL olarak kullanıldı. Yapılan kesim işlemi 2 saat 37°C'de inkübasyon edilerek, %0,8'lik agaroz jele yüklenerek görüntülendi.

2.2.12. pET28a Vektörü Ligasyonu ve*E. coli* BL21 Transformasyonu

Toplamda *lppX* geni için 24 kez pET28a ligasyonu yapıldı. pGEM-T-*lppX* plazmitinin *EcoRI*enzimi ile kesilmesiyle elde edilmiş yapışkan uçlara sahip *lppX* geni ve *Eco*RIile kesilmiş pET28a vektörü kullanıldı. Fazla sayıda koloni veren transformasyonların ligasyonları şu oranlarda yapıldı; 6 µL insert, 2 µL pET-*Eco*RIvektör, 1 µL T4 ligaz, 1 µL T4 ligaz buffer. Bi diğer oran şu şekildedir; 5 µL insert, 3 µL pET-*Eco*RIvektör, 1 µL T4 ligaz, 1 µL T4 ligaz buffer.

Gen ifadesinin sağlanabilmesi için RekombinantpET28a-*lppX* plazmitinin kompetan haline getirilen *E. coli* BL21suşuna ısı şoku ile aktarıldı. Rekombinant koloniler kanamisin (*kan*) direncine göre seçilerek kompetan hücre hazırlanması ve transformasyon işlemi *E. coli* DH5α'da olduğu gibi yapıldı. Bir gece inkübasyon sonunda oluşan kolonilerden tek koloni seçilerek yeniden LA+*kan* besiyerine çizim ekimi yapılarak 37°C'de bir gece inkübasyon yapıldı.

E.coli BL21pET28a-*lppX* kültüründenmanuel plazmit izolasyonu yapıldı.Bir gece öncesinden çizim ekim yapılmış olan koloniler steril ortamda pipet ucu ile kazınarak

eppendorf tüplere alındı. Tüplere 100 µL STE buffer (EK-2) eklenerek çözünene kadar vortekslendi. Buz üzerinde 20 dakika bekletilen tüplere, 60 µL lizis buffer (EK-2) eklenerek vortekslendi. 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılarak ardından su banyosunda 10 dakika 70°C'de inkübasyon yapıldı. Sonrasında tüpler soğuk suya tutularak 10 dakika 12000 rpm'de santrifüj edilerek, sonucunda oluşan süpernatan jele yüklendi. Plazmit izolasyonları agaroz jelde yürütülerek, istenilen geni taşımayan pET28a vektörü, kontrol olarak kullanıldı.

2.2.13. Rekombinant LppX Proteininin İfadesinin Artırılması

LppX geni pET28a vektörüne klonlandıktan sonra *E. coli* BL21 suşunda uçlarına 6 tane histidin eklenerek ifade edilir. Histidin aminoasidinin nikel iyonlarına karşı afinitesi bulunur. Bu nedenden dolayı histidinli proteinler afinite kromatografi tekniğiyle nikel içeren kolonlar kullanılarak saflaştırıldı.

Rekombinant plazmit taşıyan BL21 hücreleri kan içeren LB sıvı besiyerine 5 mL olacak şekilde ekimi yapılarak 37°C'de 1 gece inkübe edildi. 100 mL LB besiyerine 30 µg/mL kan ve 5 mL hücre kültürü eklenerek 37°C'de OD600 0,5-0,6 oluncaya kadar inkübasyon yapıldı. Bakteri yoğunluğu 0,5-0,6'ya geldiği zaman besiyerine 1 mM IPTG eklendi ve kontrol grubuna IPTG eklenmedi. IPTG'nin protein ekspresyonunu indüklemesi için 5 saat 165 rpm'de ve 37°C'de çalkalanarak inkübasyon edildi. Hücreler 4500 rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatanlar atılıp ve alt kısımda kalan hücreler -20'de muhafaza edildi.

2.2.14. Hücrelerin Parçalanması (Sonikasyon) ve Protein Saflaştırılması

IPTG eklenerek protein ekspresyon indüklemesi yapılan çöktürülmüş hücrelerin üzerine 1X LEW (EK-2) bufferdan 5 mL eklenerek hücreler çözünene kadar vorteks yapıldı. Hücreler Bandelin-Sonoplus sonikatör yardımı ile %60 şiddetle 6 ila 10 saniyede parçalandı. 15000 rpm'de 15 dakika santrfifüj edilerek hücre atıklarından arındırıldı. Üste kalan süpernatanlar falkon tüplere toplandı.

Macherey-Nagel Protino® Ni-TED 2000 paketlenmiş saflaştırma kolanları rekombinant proteinlerin saflaştırılmasında kullanıldı. Saflaştırma kolonunu dengelemek için ilk olarak 1X LEWbufferden4 mL eklendi. Sonrasında protein örnekleri kolona eklendi. Arkasından yıkama işlemi için kolonlara 4 mL 1X LEW buffere eklendi. Aynı işlem bir kez daha tekrarlandı. Yıkama basamağından sonra nikellere bağlanan his-tag'lı protein elüsyon işlemi yapılarak toplandı. 3 mL 1X elüsyon bufferı eklenerek üç kez tekrarlandı.

2.2.15.Protein Miktarının Artırılması

Protein miktarının artırılması için bir dizi optimizasyon deneyi yapıldı.

2.2.15.1 İnkübasyon Süresi

LppX proteininin IPTG indüklemesini artırmak için bir gece öncesinden tekrardan hücre ekimi yapıldı. Ekimler 100 mL LB+*kan* besiyerine ekildi, OD değerleri 0,51-0,58 arasında ayarlandı ve 1 mM IPTG eklendi. İnkübasyon süresi 5 saat yerine 37°C'de 3 saat olarak kullanıldı. İnkübasyon sonunda hücreler 10 dakika 4500 rpm'de çöktürülerek, sonikasyon cihazı ile parçalama işlemi yapıldı. Hücre lizatları 15 dakika 15000 rpm'de santrifüjedilerek hücre lizatı jele yüklendi. 90 dakika 90 voltta yürütüldü.

2.2.15.2 İnkübasyon Süresi ve IPTG Miktarı

LppX için tekrar bir gece önceden hücre ekimi yapıldı. 200 mL LB besiyerine 200 µL *kan* ve 10 mL kültür eklendi. OD değeri 0,5-0,6 arası olan ekimlere IPTG miktarı 0,5 mM olarak eklendi. 37°C'de 2 saat inkübe edilen ekimler den 100 mL'si alınarak çöktürme işlemi yapıldı. Geriye kalan 100 mL ekime 2 saat daha inkübasyon yapıldı. Toplamda 4 saat inkübasyona bırakılan hücrelere 4500 rpm 10 dakika çöktürme işlemi yapılarak sonikasyon tekniği uygulandı.

2.2.15.3 İnkübasyon Sıcaklığı ve IPTG Miktarı

Yeniden LppX için bir gece önce ekim yapıldı. Kültürler 5 mL olarak ayrı ayrı 100 mL'lik LB+*kan* besiyerine ekildi. Ekimlerin OD 0,5-0,6 değerleri gelene kadar 37°C'de inkübasyon edildi. 100 mL'lik ayrı ayrı ekimleri yapılan kültürlere, 1 mM IPTG diğerine 0,5 mM IPTG eklenerek, IPTG eklenen örnekler 4saat 30°C'de inkübasyon edilerek sonrasında hücreler 4500 rpm 10 dakika çöktürüldü. Çöktürme işlemi sonrasında hücrelere sonikasyon tekniği ile parçalama işlemi uygulandı. Parçalanan hücre lizatları 15 dakika 15000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatantlar alınarak elde edilen lizat jelde görüntülendi.

2.2.15.4Beta-Merkaptoetanol Kullanımı

IPTG ile indüklenmiş hücreler sonikasyon tekniği ile parçalandı. Ancak bazı durumlarda rekombinant proteinler fazla miktarda kükürt bağı içermekte ya da parçalanmaya dayanıklı inklüzyon yapılarında bulunmaktadır. Bu durumlarda, denatürasyona dayanıklı yapılar beta-merkaptoetanol ile denatüre edilebilmektedir. Bu nedenle, miktarı düşük bulunan LppX proteini için -20 °C'de bulunan pellet hücrelerine yeniden parçalama işlemi uygulandı. 50 mL LEW buffer içerisine 100 µL beta-merkaptoetanol eklendi. Hücreler bu buffer içinde çözdürülerek sonikasyon tekniği uygulandı. Sonikasyondan sonra 15 dakika 15000 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant alındı. Elde edilen lizatlar jelde görüntülendi.

2.2.15.5 Bakteri Kültürü Hacminin Artırılması

LppX proteininin indüklenmesinin ve yoğunluğunun artırılması amacıyla, inkübasyon süresi, sıcaklığı, IPTG oranı ve beta-merkaptoetanol uygulaması optimizasyonları sonucunda olumlu sonuç alınamadığı için bu proteinin *E. coli* BL21 hücrelerine toksik etki yapmış ve bakterinin bu proteinin miktarını artırmadığı sonucuna varıldı. Bu sebeple, kültürde az miktarda bulunan rekombinant proteinden yeterli miktarda elde edebilmek için kültür hacmini artırma yoluna gidildi. Daha önceden 100 mL olarak yapılan kültürlerin miktarı 10 kat artırılarak 1 L'ye çıkarıldı. 1 L kültürün tamamı daha

önceki standart yöntemle hazırlanıp 50 mL kültür lizatı elde edildi. Bu lizatın tamamı tek nikel kolondan geçirildi.

2.2.15.6 Protein Yoğunluğunun Filtre Yöntemiyle Artırılması

Rekombinant protein yoğunluğunu artırmak, imidazol ve üre gibi kimyasallardan arındırmak için elde edilen elüsyon ürününe Amicon® Ultra-0.5 Centrifugal Filter 10 kDa (Millipore) filtre uygulaması yapıldı. Bu filtre, 10 kDa'nun altındaki proteinleri ve karışımdaki tuzları süzmektedir. Filtreye 500 µL elüsyon eklenmiş ve 7 dakika 13000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında filtreden geçmeyen kısım falkon tüplerde toplanarak filtre tekniğinden sonra protein yoğunluğu kantitatif olarak Bradford yöntemi ile ölçüldü.

2.2.16. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamit Jel Elektroforezi)

SDS-PAGE jelleri Laemmli 1970'e göre hazırlanarak (Çizelge 2.5) Mini-PROTEAN® Tetra Cell sistemindehazırlandı. Jel işlemi bittikten sonra örneklerin yüklemesi yapıldı. 50 µL yüklenecek örnek ile 10 µL yükleme boyası (EK-2)karıştırıldı. Marker olarakta Broad Range (New England Biolabs) Protein Marker kullanıldı. Yürütme sistemine jel dikkatli bir şekilde yerleştirilerek taraklar jelden çıkarıldı. Jelin üzerine 1X koşturma tamponu (EK-2) eklendi. Daha sonra yükleme işlemi yapılarak, yaklaşık olarak 90 dakika 100 voltta yürütüldü. Jelin boyanması için Coomassie Blue R-250 (EK-2) boya solüsyonu içerisinde 5 dakika bekletildi. Ardından boyadan arındırma çözeltisi (EK-2) içerisinde bir gece bekletildi.

2.2.17. Protein Yoğunluğunun Kantitatif Ölçülmesi

Bradford (1976) yöntemiyle; saflaştırılan rekombinant LppX proteininin yoğunluğu kantitatif olarak ölçüldü. Öncelikli olarak Bradford çözeltisi hazırlandı. 1 mg/mL BSA (bovin serum albumin) kullanılması standart eğri kabul edildi. Spektrofotometre ile hazırlanan örneklerin O.D'si 595 nm'de ölçülerek rekombinant proteinin yoğunluğu 1 mg/mL olarak ayarlandı.

Çizelge 2.5 SDS-PAGE jel hazırlamada kullanılan içerik ve miktarları

%12 Ayırma jeli	**%4 İstifleme jeli**
4 mL Akrilamit/bis	0,65 mL Akrilamit/bis
3,35 mL dH_2O	3,50 mL dH_2O
2,5 mL Tris HCl (pH 8.0)	1,25 mL Tris HCl (pH 6,8)
100 µL SDS (%10)	50 µL SDS (%10)
50 µL APS (%10) (amonyum persülfat)	25 µL APS (%10)
5 µL TEMED (tetrametil etilen diamin)	5 µL TEMED

2.2.18. Saflaştırılan Proteinlerden Aşı Formülasyonlarının Hazırlanması

Hasta izolatı olan *M. tuberculosis* bakterisindenklonlanan GenoType MTBC (Hain Lifescience, Almanya) analizi ile doğrulanan ve *E. coli*'de ifade edilip saflaştırılan LppX proteininden 1 mg/ml konsantrasyonda stok hazırlandı.

Montanide ISA 720 VG adjuvanı 7:3oranında alınarak saflaştırılan rekombinant protein ile karıştırılarak aşı formülasyonu hazırlandı (Scalzo et al. 1995; Mutiso et al. 2012). Hazırlanan karışım 1 dakika vortekslenerek 4^oC'de 24 saat bekletildi. Aşı formülasyonun steril olup olmadığını doğrulamak için 0,1 ml Luria Agar besiyerine ekim yapılarak 37^oC'de 24 saat inkübasyon yapıldı.

2.2.19. Farelerde immünizasyon

Farelerde immünizasyon için 6 ila 8 haftalık Balb/c dişi fareler kullanıldı. Beşerli 3 gruba ayrılan farelere uygulanan enjeksiyonlar Çizelge 2.6'da gösterildi.

Aşılama ve kan alma zamanı Çizelge 2.7'de verildi. Farelerden ilk uygulanan enjeksiyondan önce toplamda yaklaşık 0,1 ml kuyruk kanı alınarak ardından 1. enjeksiyon (0,33 ml aşı veya adjuvan) uygulandı. 2 hafta sonunda aynı şekilde kuyruk

kanı alınıp ardından 2. enjeksiyon uygulandı. Devamında seyreden 30., 41. ve 66. günlerde de kan alınarak serumlar toplanarak farelere ötanazi işlemi uygulandı. Farelerden alınan serumlar kullanılana kadar -20 C'de muhafaza edildi.

Çizelge 2.6 Aşılamada kullanılan enjeksiyonlar

Grup No	**Enjeksiyon içeriği**	**Balb/c fare sayısı**	**Enjeksiyon sayısı ve yolu**
1	0,1 mg LppX+0,23 ml adjuvan	5	2 x s.c.
2	0,1 ml PBS+0,23 ml adjuvan	5	2 x s.c.
3	0,1 ml steril PBS içerisinde 1x105 CFU BCG	5	2 x s.c.

Çizelge 2.7 Fareler için aşılama ve kan alma zamanları

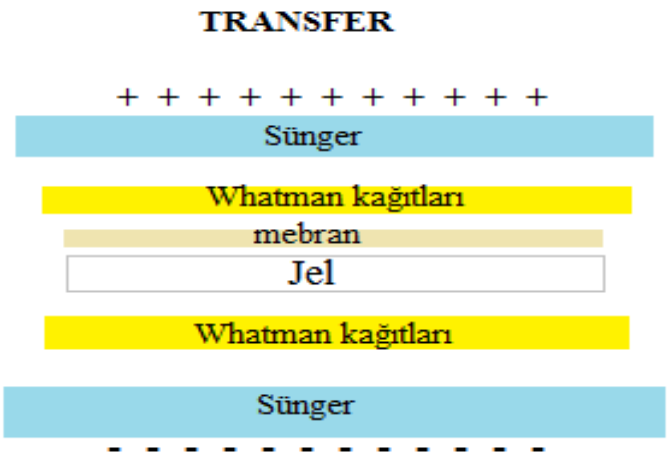
Gün	**İşlem**
1. gün	Kan alma, 1. Enjeksiyon
15. gün	Kan alma, 2. Enjeksiyon
30. gün	Kan alma
41. gün	Kan alma
66. gün	Kan alma, ötanazi

2.2.20. Western Blot

Balb/c farelerde rekombinant LppX proteini spesifik antikor üretimini kalitatif olarak görüntülemek amacıyla Western blot deneyi yapıldı. İlk olarak 2 adet SDS-poliakrilamit jel üzerinde protein yürütülerek jelin bir tanesi Coomassie Brilliant Blue ile boyandı. Sonrasında diğer kalan jel, 3MM Whatman® kağıtları, 0,2 µm nitroselüloz membran (Bio-Rad, Hercules, CA), 1Xtransfer tamponu (EK-2) ile ıslatılalarak üst üste dizilir ve Bio-Rad Mini Trans-Blot® Cell kullanılarak transfer gerçekleştirildi. Proteine özgü

serumun kullanıldığı deneyde, membranda prestained (önceden boyanmış) markörların konumu baz alınarak her bir proteinin bulunduğu yer birbirinden ayrıldı. Membran 1XTBS (EK-2) ile hazırlanan %10 süttozu içerisinde 37oC'de 2 saat inkübasyona bırakılarak 1XTTBS ile 10 dakika yıkandı. Sonrasında membran, %5 süttozu ile 1:400 seyreltilen primer antikor (proteine veya BCG'ye spesifik fare antikoru) içerisinde oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon edildi. Sonrasında membran 1XTTBS ile 10 dakika yıkanır ve %5 süttozu ile 6 µl:100 ml seyreltilen sekonder antikor (antimouse IgG, Sigma) ile oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon edildi. Membranlar, tekrar 1XTTBS ile 10 dakika yıkanıp bantlar görülene kadar AP konjugat substrat (Bio-Rad, Hercules, CA) kiti uygulanarak karanlık ortamda bekletildi. Bantlar görülünce substrat uzaklaştırılıp membran distile su ile yıkandı.

Bu deneye BCG grubu eklenemedi çünkü İl Sağlık Müdürlüğü'nden temin edilen 1 flakon şişe ticari BCG aşısının içerisinde bulunan bakteri sayısı çok düşük olduğu için yeterli miktarda protein izolasyonu sağlanamadı. Kullanılan adjuvanın protein yapısında olmamasından dolayı adjuvan için de Western blot yapılamadı.



Şekil 2.1 Western blot yönteminde izlenen transfer işlem sırası

2.2.21. Total Immünoglobulin G (IgG) Miktarının Belirlenmesi

Balb/c farelerinde Rekombinant LppX proteini uyardığı hümoral bağışıklık (total IgG) düzeyi kantitatif olarak ELISA deneyi ile belirlendi. 96 kuyucuklu ELISA plaklarına

0,05 M karbonat tamponu (EK-2) içerisinde 1 µg/kuyucuk konsantrasyonunda saflaştırılmış rekombinant proteinler eklenerek plakların üzeri kapatılırak 4 C'de bir gece bekletildi. Plaklar 3 defa yıkama buffer (EK-2) ile yıkanmış ardından kuyucuklara 50 µl bloklama buffer (EK-2) eklenerek 37 C'de 1 saat inkübasyon edildi. Aşılama tekniği sonucu LppX proteinine özgü serum bloklama çözeltisi içerisinde 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 ve 1:3200 seyreltmelerle kuyucuklara eklenerek 37 C'de 1 saat inkübasyon edildi. Plaklar 4 defa yıkama buffer ile yıkanarak ardından tekrar kuyucuklara bloklama buffer içerisinde 1:1000 seyreltilmiş tavşandan elde edilen alkalin fosfataz bağlı anti-fare IgG (Sigma) eklenerek 37 C'de 1 saat inkübasyon edildi. Plaklar 4 defa yıkama buffer ile yıkandıktan sonra her kuyucuğa 100 µL kolorimetrik bir substrat olan AP Conjugate Substrate (Bio-Rad) eklendi. Plaklar 30 dakika oda sıcaklığında karanlık ortamda bekletildikten sonra her kuyucuğa 50 µl 1 M NaOH eklenerek tepkime durduruldu. Tepkime sonucu oluşacak optik yoğunluk Rayto RT-2100C ELISA okuyucuda 405 nm'de analiz edildi. Elde edilen sonuçlar istatistiksel yönden anlamlı olup olmadığı GraphPad Prism 5 programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Dunnett testi ile analiz edildi.

2.2.22. İnterferon-gama (IFN-γ) Miktarının Belirlenmesi

Balb/c farelerinde Rekombinant proteinin uyardığı hücresel bağışıklık (IFN-γ) seviyesi kantitatif olarak ELISA deneyi ile belirlendi. Mouse IFN-γ ELISA Total Kit (Thermo) serum IFN-γ seviyesinin belirlenmesinde kullanıldı. 96 kuyucuklu ELISA plakasında kuyucuk başına 50 µL serum örneği ve 50 µL 3:1 oranında seyreltilen standartlar (3000, 1000, 333, 111, 37, 0 pg/mL) eklendi. Örnekler ikişerli tekrar olarak kullanıldı. Plaka dikkatli bir şekilde yapışkan plaka kapağı ile kapatılarak oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda plaka kapağı çıkartılarak plaka içi dökülmeden numuneleri içeren tüm kuyucuklara 50 µL biyotinlenmiş antikor reaktifi eklendi. Biyotinlenmiş antikor reaktifini eklerken pipet ucu ile numunelere dokundurmamaya özen gösterildi. Plakanın üzeri dikkatli bir şekilde yapışkan plaka kapağı ile örtülerek oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon yapıldı. İnkübasyon sonunda plaka kapağı çıkarılarak plaka üç kez 1X yıkama bufferı (EK-2) ile yıkandı. Hazırlanan streptavidin-HRP (12 mL Streptavidin-HRP tamponuna 30 µL Streptavidin-HRP konsantresi) çözeltisi her bir kuyucuğa 100

µL eklenerek yeni bir yapışkan plaka kapağı ile plaka kapatıldı ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyon yapıldı. Sonrasında plaka kapağı çıkarılarak 1X yıkama buffer ile üç kez yıkandı. Devamında her kuyucuğa 100 µL TMB substrat çözeltisi eklenerek numuneler karanlık bir ortamda oda sıcaklığında 30 dakika boyunca renk reaksiyonu oluşması için inkübasyon yapıldı. İnkübasyon sonrasında her kuyucuğa 100 µL reaksiyon durdurma buffer eklendi ve reaksiyon durdurulduktan 30 dakika sonra optik yoğunluk Rayto RT-2100C ELISA plak okuyucuda 405 nm'de ölçüldü. Elde edilen sonuçların istatistiksel yönden anlamlı olup olmadığı GraphPad Prism 5 programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey's testi ile analiz edildi.

2.2.23. İnterlökin 12 (IL-12) Miktarının Belirlenmesi

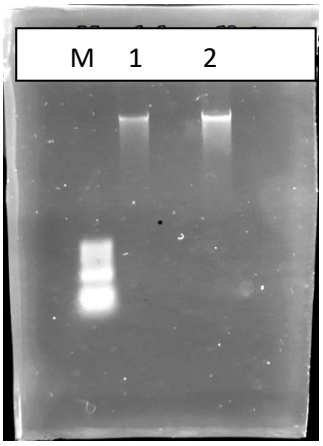
Balb/c farelerinde Rekombinant proteinin uyardığı hücresel bağışıklık (IL-12) seviyesi kantitatif olarak ELISA deneyi ile belirlendi. Mouse IL-12 ELISA Total Kit (Thermo) Serum IL-12 seviyesinin belirlenmesi için kullanıldı. 96 kuyucuklu ELISA plağına her kuyucuğa çift olarak 50 µL dilüent standart (12,5 µL serum ile 37,5 µL standart) eklendi. Sonrasında 50 µL 2:1 oranında seyreltilen standartlar (3000, 1500, 750, 375, 188, 94, 47, 0 pg/mL) eklendi. Plaka dikkatli bir şekilde yapışkan plaka kapağı ile örtülerek oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon yapıldı. Ardından plaka kapağı çıkarılarak üç kez 1X yıkama bufferı (EK-2) ile yıkandı. Numune veya standartları içeren her kuyucuğa 100 µL biyotinlenmiş antikor reaktifi eklenerek, biyotinlenmiş antikor reaktifini eklerken pipet ucu ile numunelere dokundurmamaya özen gösterildi. Plakanın üzeri dikkatli bir şekilde yapışkan plaka kapağı ile örtülerek oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon yapıldı. Sonrasında plaka kapağı çıkarılarak üç kez yıkama buffer ile yıkanarakhazırlanan streptavidin-HRP (12 mL Streptavidin-HRP tamponu'na 30 µL Streptavidin-HRP konsantresi) çözeltisi her bir kuyucuğa 100 µL olarak eklendi. Yeni bir yapışkan plaka kapağı ile plaka kapatılarak oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyon edildi. İnkübasyon sonrasında plaka kapağı çıkarılarak yıkama bufferı ile üç kez yıkandı. Ardından her kuyucuğa 100 µL TMB substrat çözeltisi eklenerek numune karanlık bir ortamda oda sıcaklığında 30 dakika boyunca renk reaksiyonu oluşması için inkübe edilerek, inkübasyon sonunda her kuyucuğa 100 µL reaksiyon durdurma buffer eklendi. Reaksiyonu durdurulduktan 30 dakika sonra optik yoğunluk Rayto RT-2100C

ELISA plak okuyucuda 405 nm'de ölçülerek, ortaya çıkan sonuçların istatistiksel yönden anlamlı olup olmadığı GraphPad Prism 5 programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey's testi ile analiz edildi.

3. BULGULAR

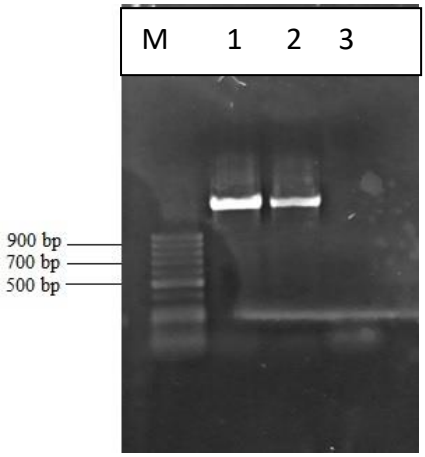
3.1. Genomik DNA İzolasyonu ve 16S rRNA PZR

Hasta izolatı *M. tuberculosis*(MTB) bakterisiningenomik DNA'sı kit ile izole edilerek agaroz jelde analiz görüntülendi. Genomik DNA izolasyon işleminin başarılı olduğu gözlemlendi(Şekil 3.1).



Şekil 3.1 MTB genomik DNA izolasyonu agaroz jel elektroforez görüntüsü**(** M: marker, 1: 6 µl DNA, 2: 12 µl DNA)

SaflaştırılanMTBbakterisinin tür tanımlanması için *16S rRNA* geni PZR yapıldı. Agaroz jelde görüntülendiğinde istenilen büyüklükte bant elde edildi (Şekil 3.2).

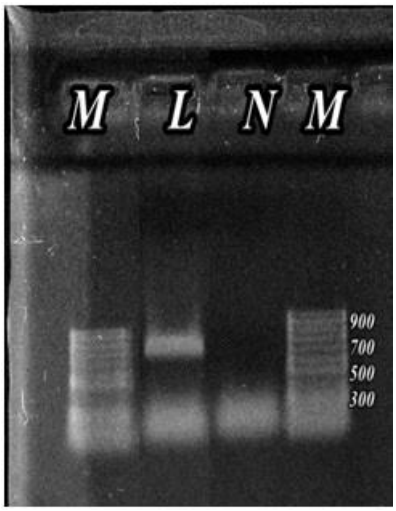


Şekil 3.2*16S rRNA* geni PZR agaroz jel görüntüsü(M: marker, 1-2: PZR ürünü, 3: negatif kontrol)

PZR sonucu agaroz jelde elde edilen bantlar jel ekstraksiyon yapılarak nükleotit dizi analizi gerçekleştirildi. BLAST analizi sonucunda MTB ile %100 uyumlu olduğu gözlemlendi. Elde edilen nükleotit dizisi Ek-4'te verildi. Ayrıca GenoType MTBC (Hain Lifescience, Almanya) testi ile hasta izolatının *M. tuberculosis* bakterisi olduğu doğrulandı.

3.2. *lppX* Geni için PZR

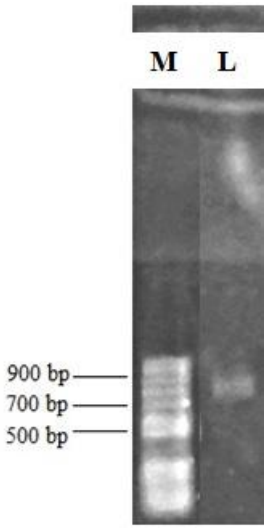
M. tuberculosislppX genini çoğaltmak için PZR yapılarak ve agaroz jeldeyürütüldü. Agaroz jel görüntülemesi sonucunda *lppX* genindebeklenilen büyüklükte bant gözlemlendi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 PZR sonucu agaroz jel görüntüsü(M: marker, L: *lppX*, N: negatif kontrol)

3.3. *lppX* geni Jel Ekstraksiyonu

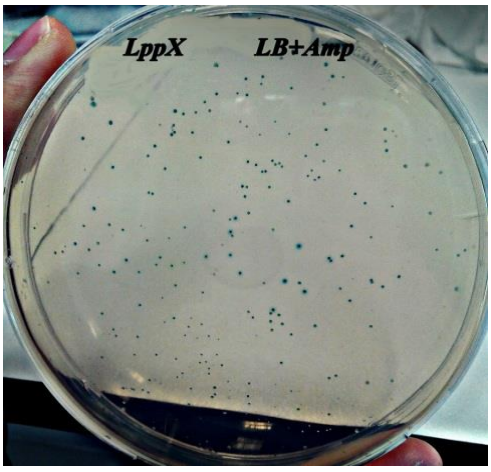
lppX geni için yapılan PZR sonucunda agaroz jelde elde edilen bant kesilerek jel ekstraksiyon yapıldı. Elde edilen jel ekstraksiyon ürünü kalitesini gözlemlemek için agaroz jelde görüntülendi. Elde edilen ürünün klonlama için uygun olduğu gözlemlendi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 Jel ekstraksiyon sonrası agaroz jel görüntüsü(M: marker, L: *lppX*)

3.4. *lppX* Geninin pGEM-T Vektörüne ligasyonu ve pGEM-T-lppX Vektör Klonlanması

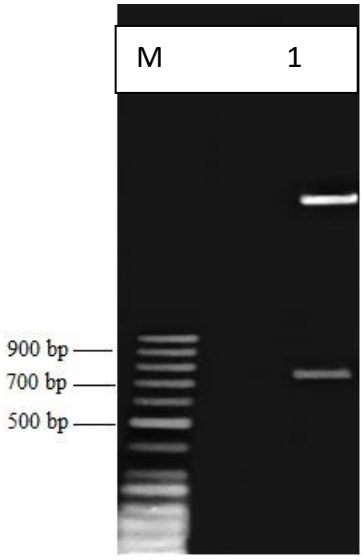
PZR ile çoğaltılan, jel ekstraksiyonu ile elde edilen gen ve pGEMT-T vektörü kullanılarak ligasyon yapıldı. Ligasyon ürünü*E. coli* DH5α kompetan hücrelerine aktarıldı. Transformasyon sonucunda istenilen geni taşıyan rekombinant pGEM-T vektörünü seçebilmek için, *lacZ* geninin bozulmasına ve ampisilin dirençliliğine dayanan mavi-beyaz seçilim özellikleri kullanıldı. Ampisilin içeren ve X-gal+IPTG yayılan agar üzerinde mavi-beyaz koloni oluşumları gözlemlenlendi (Şekil 3.5).



Şekil 3.5 Mavi-beyaz koloni oluşumu(pGEM-T-*lppX*)

3.5. pGEM-T-*lppX* Plazmit İzolasyonuve Yapışkan Uçlu*LppX* Gen Eldesi

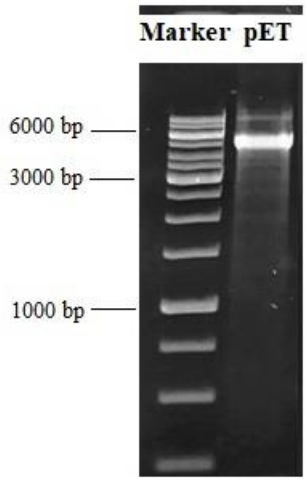
Transformasyon sonucunda oluşan koloniler LA+amp+X-gal+IPTG besiyerine ekim yapılıp, bu bakterilerden plazmit izolasyonu yapıldı. İzolasyon sonrası *Eco*RIile restriksiyon enzim kesimi yapılıp, jel sonucunda pGEM-T-*lppX* beklenen değerlerde bant gözlemlendi (Şekil 3.6). pGEM-T-*lppX* dizilemeye gönderilerek, doğrulama sonucu nükleotit dizileri Ek-4'te verilmiştir.



Şekil 3.6 pGEM-T-lppX restriksiyon enzim kesimi agaroz jel görüntüsü(M: marker, 1: lppX)

3.6. pET28-a(+) Vektörüne Ligasyon

Ligasyonda *lppX* genini klonlamakiçinpET28a vektörü *Eco*RI ilekesildi. Agaroz jel görüntüsü Şekil 3.7'de verildi.

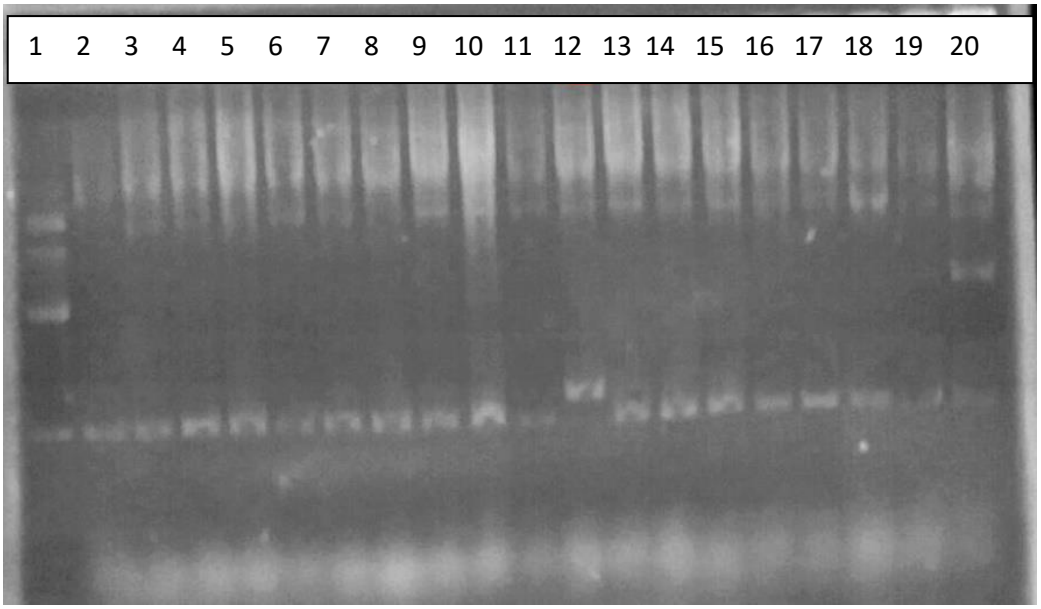


Şekil 3.7 pET28a vektörünün *EcoRI* kesiminin agaroz jel görüntüsü

3.7. pET28a- *lppX* Vektörün *E.coli BL21*'e Transformasyonu

Transformasyon sonucunda 300'e yakın koloni oluştu. Oluşan kolonilerin yaklaşık olarak 100 tanesi taranarak sonuç alındı. Fazla sayıda koloni oluşmuş olmasından dolayı, koloni taramasını manuel plazmit izolasyonuyla yapıldı. Jel sonucunda marker olarak yüklenen boş pET28a vektörden yüksek bant gösteren 1 tane örnek çıktı (Şekil 3.8).

Boş pET28a vektöründen yüksekte bant gözlemlenen plazmiti taşıyan koloni sıvı LB+kanamisin besiyerine ekildi Kit ile plazmit izole edilip *Bam*HIenzimi ile kesildi. Kesim agaroz jele yüklenerek, jel sonucunda 700 bp civarında bant gözlendi. Sonuç olarak pET28a-*lppX* rekombinantı başarılı bir şekilde elde edildi.

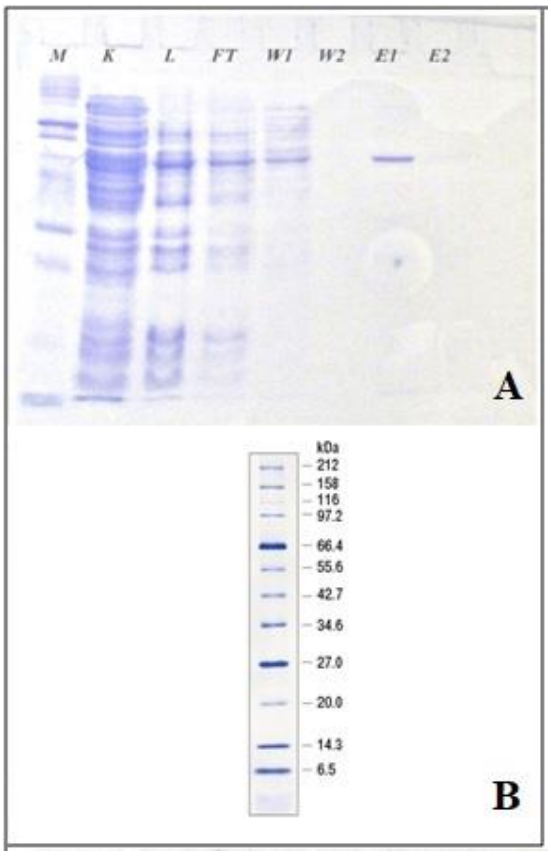


Şekil 3.8pET28a-*lppX* koloni taraması agaroz jel görüntüsü(1 ve 20: boş pET28a, 2-19: -*lppX*) 12 numaralı plazmit boş pET28a'dan yukarıda bulundu

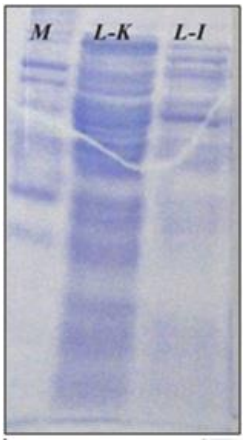
3.8. Rekombinant LppX Proteininin Saflaştırılması

E. coli BL21 hücrelerine aktarılan pET28a vektörü içerisindeki *lppX* geninin ekspresyonu IPTG ile indüklenmiş ve nikel kolonlar kullanılarak His-tag taşıyan rekombinant protein saflaştıldı. SDS-PAGE jel analizi ile görüntülendi (Şekil 3.9). LppX proteini saf olarak elde edildi. Ancak IPTG indüksiyonu ve saflaştırılmış protein yoğunluğunun düşük kaldığı gözlemlendi.

Saflaştırılan proteinin miktarlarının artırılması için bir dizi optimizasyon deneyi yapıldı. İlk olarak inkübasyon süresi 5 saat yerine 3 saat olarak yapıldı. Jel sonucunda protein indüklenmesinin iyi olmadığı gözlemlendi (Şekil 3.10).

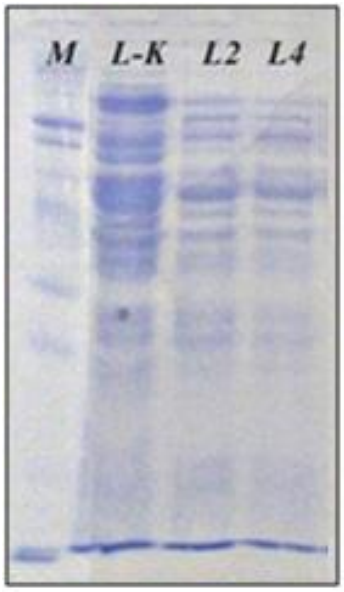


Şekil 3.9 Rekombinant proteinlerin nikel kolon uygulamalarının SDS-PAGE görüntüsü(A: LppX proteini, M: protein marker, K: IPTG eklenmemiş kontrol, L: IPTG eklenen kültür lizatı, F: flow-through (kolona bağlanmayanlar), W: yıkama, E: elüsyon. B: Protein markerda bulunan bantların büyüklükleri)



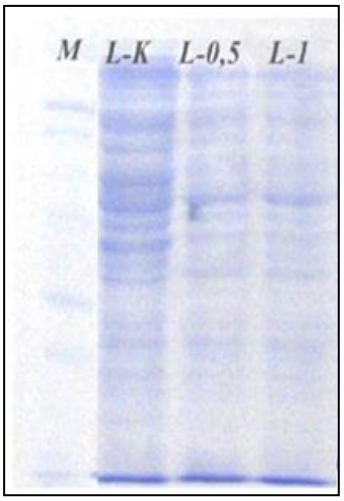
Şekil 3.10 3 saat inkübe edilen LppX protein örneklerinin SDS-PAGE görüntüsü (M: protein marker, L-K: IPTG eklenmeyen kültür, L-I: IPTG ile indüklenmiş kültür lizatı)

İnkübasyon süresi 2 saat sonra 100 ml ekim alınıp çöktürülerek, geriye kalan ekim 2 saat olmak üzere toplamda 4 saat bekletilip IPTG mikarı 0,5 mM olarak deney tekrarlandı. Jelde görüntüleme sonucunda indüklenmenin iyi olmadığı gözlemlendi (Şekil 3.11).



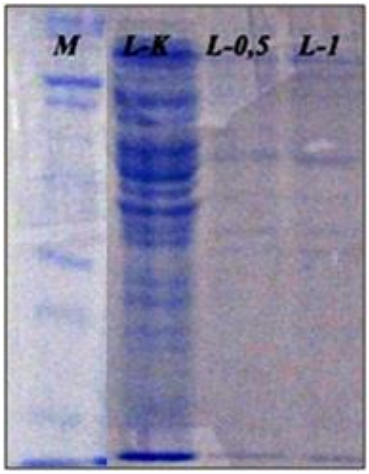
Şekil 3.11 2-4 saat inkübasyon ve 0.5 mM IPTG kullanılan deneyin SDS-PAGE görüntüsü(M: protein marker, L-K: IPTG eklenmeyen LppX kültürü, L2: 2 saat, L4: 4 saat inkübe edilen ve 0,5 mM IPTG ile indüklenmiş LppX kültür lizatı)

İnkübasyon sıcaklığı 30^{c} ve IPTG miktarı 1 mM, 0,5 mM şekilde tekrarlandı. Jelde görüntüleme sonucunda protein indüklenmesinin yine iyi olmadığı gözlemlenlendi (Şekil 3.12).



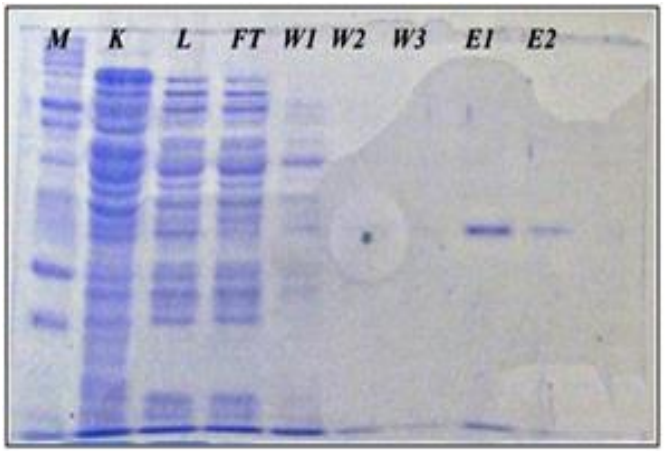
Şekil 3.12 1 mM ve 0.5 mM IPTG indüklemesi deneyinin SDS-PAGE görüntüsü(M: marker, L-K: IPTG ile indüklenmeyen LppX kültürü, L-0,5: 0,5 mM IPTG, L-1: 1 mM IPTG ile indüklenmiş LppX kültür lizatı)

Beta-merkaptoetanol kullanılarak deney tekrarlandı. Jelde görüntüleme sonucunda yeterli miktarda protein çıkmadığı gözlemlendi (Şekil 3.13).



Şekil 3.13 Beta-merkaptoetanol uygulamasının SDS-PAGE görüntüsü(M: marker, L-K: IPTG ile indüklenmeyen LppX kültürü, L-0,5: 0,5 mM IPTG, L-1: 1 mM IPTG ile indüklenmiş LppX kültür lizatı)

Bakteri kültür hacmi artırılmasına gidildi. Jel görüntüsü sonucunda saflaştırılan proteinin yoğunluğunda bir miktar artış oldu fakat yine de istenen yoğunlukta olmadığı gözlemlendi (Şekil 3.14).



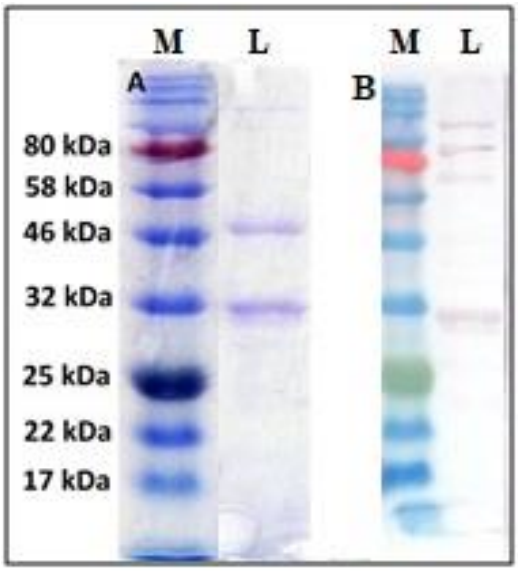
Şekil 3.14 Kültür hacmini artırma uygulaması SDS-PAGE görüntüsü(M: protein marker, K: IPTG eklenmemiş kültür, L: IPTG eklenen kültür lizatı, F: flow-through, W: yıkama, E: elüsyon)

Protein yoğunluğunun filtre yöntemiyle artırılması tekniği kullanıldı. Filtre tekniğinden sonra protein yoğunluğu kantitatif olarak Bradford yöntemi ile ölçüldü. Proteinin beklenilen yoğunlukta olduğu gözlemlemlenerek 1 mg/mL konsantrasyona ayarlandı.

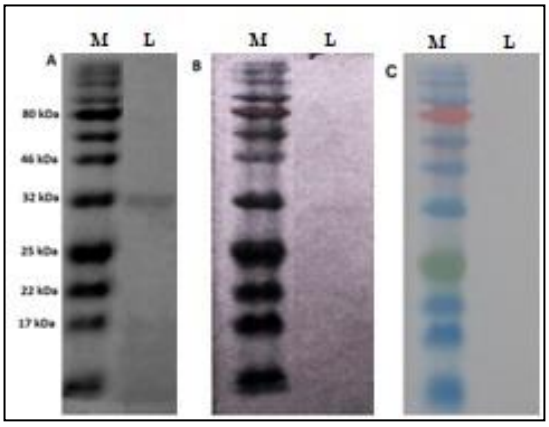
3.9. Western Blot

LppX proteinin Expasy biyoinformatik programında hesaplanan (uçlarına eklenen 6 histidinle beraber) moleküler ağırlığı 25 kDa şeklindedir. Proteinin SDS-PAGE analizi sonucu gözlemlenen moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 31 kDa'dur (Şekil 3.15-A). Ancak, proteinin dimer oluşturma ihtimallerinden veya katlanmalarından dolayı farklı moleküler ağırlıkta bantlar da gözlenebilmektedir. Bu nedenle, rekombinant proteinlere özgü antikorların primer antikor olarak kullanıldığı Western blot analizi sonucunda yukarıda sayılan ana bantlara ek olarak başka bantlar da gözlemlendi (Şekil 3.15-B).

Primer antikor olarak BCG'ye özgü antikor kullanıldığında ana bantlara çapraz reaksiyon verdiği gözlemlemlendi, adjuvana karşı oluşan antikor proteini tanımadı (Şekil 3.16). Yalnız, MTB antijenini BCG'ye özgü antikorlar zayıf tanıdığından bantlar net olarak görüntülenemedi. Deney tekrarlanmış ancak daha iyi bir görüntü elde edilemedi.



Şekil 3.15 Saflaştırılan proteine ait (A) SDS-PAGE ve (B) Western blot görüntüsü(M: Prestained marker (New England Biolabs P7712), L: LppX)

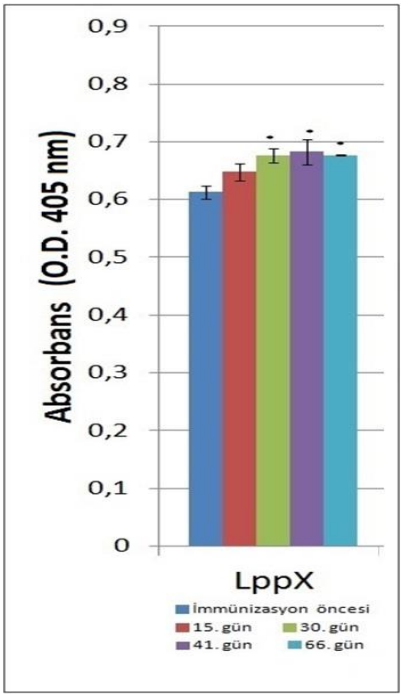


Şekil 3.16 LppX antijenine karşı BCG antikorunun ve adjuvana karşı oluşan antikorun çapraz reaksiyonunu gösteren Western blot deneyi(A:SDS-PAGE görüntüsü, B: anti-BCG Western blot görüntüsü, C: anti-adjuvan Western blot görüntüsü M: prestained marker, L: LppX)

3.10.Total IgG Miktarı

Rekombinant LppX proteininin Balb/c farelerinde uyardığı hümoral bağışıklık düzeyi kantitatif olarak total IgG ELISA deneyi ile belirlendi. Pre-immünizasyon değeri ile

immünizasyon sonrası değeri GraphPad Prism 5 programında tek yönlü varyans analizi ve Dunnett testi yapılarak karşılaştırıldı (Şekil 3.17). Pre-immünizasyonun kontrol grubu olarak bazalındığı istatistiki anlam değerlerine bakıldığında LppX aşı formülasyonunun ilk aşılamadan sonra anlamlı bir artış sergilemediği fakat ikinci aşılamadan sonra ise 66. güne kadar %95 güvenilirlikte IgG değerinde artış gösterdiği belirlendi. Western blot tekniğinde de LppX'e ait bantın zayıf olması bu formülasyonun tetiklediği spesifik IgG miktarının düşük düzeyde kaldığını gösterdi. Western blot tekniği için bahsedilen (protein izolasyonu ile ilgili) sebepten dolayı BCG ve adjuvan grubu için IgG ELISA deneyi yapılmadı.

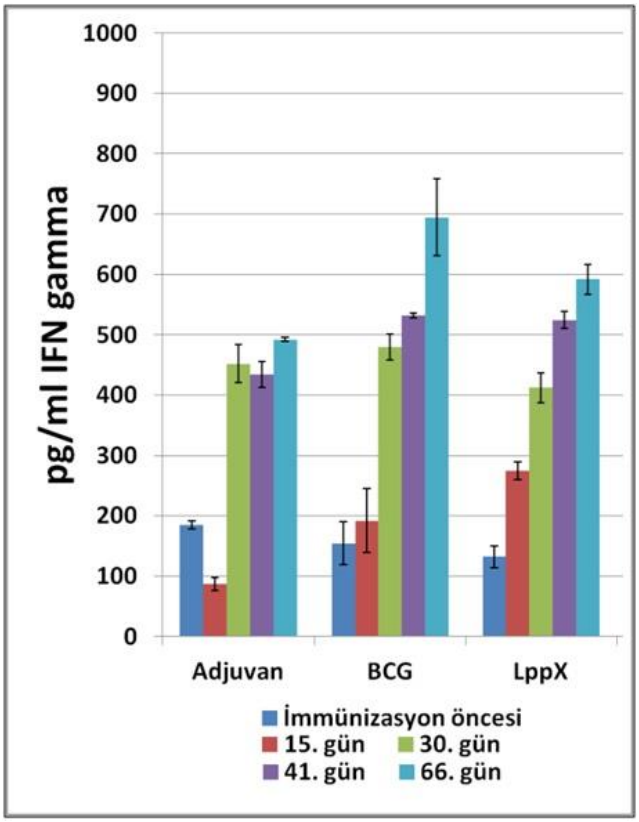


Şekil 3.17 Montanide ISA 720 VG adjuvanı ile hazırlanmış LppX proteinine ait aşı formülasyonunun Balb/c farelerdeki hümoral bağışıklık (total IgG) yanıtıSerumların 1:800 seyreltme değerleri kullanıldı. *: $p<0,05$.

3.11. İnterferon-gama (IFN-γ) Miktarı

Rekombinant LppX proteini aşı formülasyonunun, ticari BCG aşısı ve sadece Montanide ISA 720 VG adjuvanın Balb/c farelerinde uyardıkları hücresel bağışıklık düzeyi kantitatif olarak IFN-γ ELISA deneyi ile belirlendi (Şekil 3.18). Farklı aşı gruplarına ait değerler birbirleri ile GraphPad Prism 5 programında tek yönlü varyans

analizi ve Tukey's testi yapılarak karşılaştırıldı (Çizelge 3.1). 15. ve 41. günde LppX formülasyonu adjuvana göre serum IFN-γ düzeyini artırdığı görüldü. LppX formülasyonunun uyardığı serum IFN-γ düzeyi ile BCG aşı formülasyonunun uyardığı arasında istatistiksel anlamda bir fark bulunmadı. Yani, LppX formülasyonunun IFN-γ düzeyini artırmada BCG kadar etkin olduğu gözlemlendi.



Şekil 3.18 Farklı aşı gruplarının Balb/c farelerde tetikledikleri serum IFN- γdüzeyleri

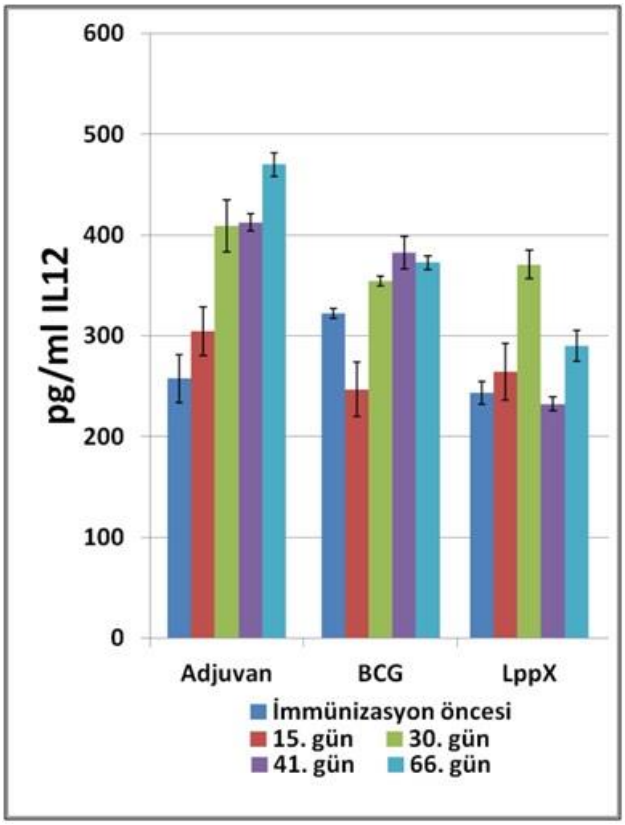
Çizelge 3.1 Farklı aşı gruplarının Balb/c farelerdeki serum IFN-γ düzeylerinin tek yönlü varyans analizi ve Turkey's testi ile karşılaştırılması

Aşı grupları	İmmünizasyon öncesi	15. gün	30. gün	41. gün	66. gün
Adj - BCG	AD	AD	AD	*	*
Adj - LppX	AD	**	AD	*	AD
BCG - LppX	AD	AD	AD	AD	AD

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

3.12. İnterlökin 12 (IL-12) Miktarı

Rekombinant LppX proteini aşı formülasyonu, ticari BCG aşısı ve sadece Montanide ISA 720 VG adjuvanın Balb/c farelerinde uyardıkları hücresel bağışıklık düzeyi IFN-γ'ya ek olarakkantitatif IL-12 ELISA deneyi ile belirlendi (Şekil 3.19). Farklı aşı gruplarına ait değerler birbirleri ile GraphPad Prism 5 programında tek yönlü varyans analizi ve Tukey's testi yapılarak karşılaştırıldı(Tablo 17). Sadece adjuvan 41. güne kadar BCG kadar IL-12 düzeyini tetiklerken 66. günde BCG'den daha fazla artışa neden oldu. Adjuvan ve LppX arasında 41. güne kadar anlamlı bir fark bulunmazken 41. ve 66. günlerde adjuvan LppX formülasyonundan daha fazla IL-12 artışı sağladı. BCG aşısı da 41. ve 66. günlerde LppX formülasyonundan daha fazla IL-12 artışı sağladı. Buna göre, LppX formülasyonu IL-12 düzeyini artırmada başarılı bulunmadı.



Şekil 3.19 Farklı aşı gruplarının Balb/c farelerde tetikledikleri serum IL-12 düzeyleri

Çizelge 3.2 Farklı aşı gruplarının Balb/c farelerdeki serum IL-12 düzeylerinin tek yönlü varyans analizi ve Turkey's testi ile karşılaştırılması

Aşı grupları	**İmmünizasyon öncesi**	**15. gün**	**30. gün**	**41. gün**	**66. gün**
Adj - BCG	*	AD	AD	AD	**
Adj - LppX	AD	AD	AD	***	***
BCG - LppX	**	AD	AD	***	**

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

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Tüberküloz (TB) hastalığı yıllar içerisinde milyonlarca kişinin ölümüne sebep olmaktadır. TB hastalığına karşı günümüzde kullanılan tek aşı olan BCG aşısıdır. Çocuklarda tüberküloz menenjitine karşı bir yere kadar koruma sağlarken yetişkinlerdeki koruyuculuğu değişkenlik göstermektedir. İmmün yetersizliği olan kişilerde ise kullanımının güvenli olmadığı bildirilmektedir (Dai et al.2016). Bu nedenle, son zamanlarda tüberküloz hastalığına karşı aşı geliştirme çalışmalarında artış gözlenmektedir. Aşı geliştirme çalışmaları arasında rekombinant aşı çalışması azımsanmayacak düzeydedir.

Bazı çalışmalar DNA aşısı geliştirme üzerinde durmaktadır. Neonatal farelerde *ag85b* ile hazırlanan DNA aşısı intradermal yoldan uygulandığında ve intranazal yoldan boost edildiğinde akciğer ve dalak IFN-γ, IL-2 ve TNF-α düzeylerinde artış gözlenmiştir (Dai et al. 2016). Liang et al. (2017) *rv2190c* veya *ag85a* genleri ile hazırlanmış DNA aşıları ile bağışıklanan farelerde kontrol grubuna göre IFN-γ düzeylerinin arttığını, akciğer ve dalakta tutunan MTB miktarında düşüş gözlendiğini rapor etmiştir. Skeiky et al. (2004) MTB'ye ait 72 kDa'luk bir poliproteinin hem DNA hem de protein aşısı şeklinde farelerde ve kobaylarda koruyucu olduğunu rapor etmiştir. MTB'ye ait ESAT-6, MPT-64, KatG'nin doku plazminojen aktivatör (TPA) sinyal dizisi ile füzyonundan oluşan DNA aşılarının farelerde koruyucu olduğu gösterilmiştir (Li et al. 1999). Delogu ve Brennan (2001) DNA aşısı çalışmalarında hücre yüzey proteinlerini kodlayan PE ve PE_PGRS genlerinin farelerde koruyucu olduğunu gösterdi. Hsp65 ve IL-12 kombinasyonu ile elde edilmiş DNA aşısının farelerde BCG'den daha fazla etkin olduğu raporlanmıştır (Yoshida et al. 2006). Kimerik Ag85A/B DNA aşısının MTB ile enfekte olmuş farelerde tedavi edici özelliği gösterilmiştir (Liang et al. 2012). Bunun yanı sıra, Lee et al. (2014) RpfB DNA aşısının farelerde MTB'ye spesifik çok fonksiyonlu T hücresi cevabını tetiklediğini bildirmiştir.

Çalışmaların bir kısmı ise BCG ile bağlantılı aşılar geliştirme üzerinedir. Tsukamoto et al. (2016), prolin (P), glutamik asit (E), serin (S) ve treonin (T) amino asitlerinden oluşan PEST sinyal dizisi ve HSP70-majör membran protein-II ile elde ettikleri MMPII-PEST füzyon genini *ureC*-geni bozulmuş rekombinant (r) BCG'ye aktararak BCG-

PEST'i elde etmişlerdir. BCG-PEST ile s.c. aşılanmış C57BL/6 farelerinde rBCG ile aşılananlara göre daha fazla IFN-γ düzeyi ve daha düşük sayıda akciğere tutunan MTB sayısı rapor edilmiştir.Norrby vd. (2017), İsveç ve Finlandiya'da BCG ile aşılanmış sağlıklı bireyleri (n=106), farklı dozlarda H4 antijeni (5, 15, 50, 150 μg) ve IC31 adjuvanıyla (0, 100, 500 nmol) hazırladıkları H4:IC31 aşısı ile aşılamışlardır. H4:IC31 aşısının son aşılamadan 18 hafta sonra antijene özgü $CD4^+$ T hücresi çoğalması ve sitokin (IFN-γ, IL-2 ve TNF-α) üretimini tetiklediği bildirilmiştir. Pathan et al. (2007) BCG aşısı olmuş kişilerde MTB'ye ait Ag85A'yı ekspres eden Modifiye Vaccinia Ankara (MVA85A) ile artırmak bağışıklığı tetiklediğini göstermiştir. Benzer şekilde, Ag85A'yı ekspres eden murin sitomegalovirüs (MCMV) fareleri enfeksiyonuna karşı korumuştur (Beverley et al. 2014).

Birden fazla proteinin füzyonu ile elde edilen aşılar da denenmektedir. Rv3615c, Mtb10.4 ve Rv2660c antijenlerinden oluşan TFP846 üçlü füzyonunu ifade eden veziküler stomatit virüsü (VSV-846) ile intranazal bağışıklanan farelerde kontrol gruba göre BCG enfeksiyonunda yaklaşık 10 kat azalma görülmüştür. Ayrıca, boş vektör ile aşılan farelere göre VSV-846 ile aşılanan farelerde daha yüksek antijene özgü IFN-γ düzeyi tespit edilmiştir (Zhang et al. 2017). MTB antijenleri 85A, 85B ve TB10.4 ile hazırlanan AERAS-402 aşısının Faz I denemelerinde aşılanan bireylerin güçlü IFN-γ cevabı gösterdiği ancak antijene özgü T hücrelerinin genellikle MTB ile enfekte olmuş hücreleri tanımadığı bildirilmiştir (Nyendak et al. 2016). Langermans et al. (2005)'nin çalışmasında MTB'ye ait Ag85B ve ESAT-6 proteinlerinden oluşan füzyonun makakları koruduğu rapor edilmiştir. Ag85B ve ESAT6-CFP10 füzyonu ile BCG CpG ve alum adjuvan sisteminden oluşan AEC/BC02 aşısı farelerde bağışıklığı tetiklemiş, kobaylarda da koruma sağlamıştır (Lu et al. 2015). Orr et al. (2014) de 84 aday MTB proteini arasında iki füzyon proteininin farelerde güçlü bir şekilde koruyucu özelliği olduğunu göstermiştir. Li et al. (2014) CFP10, ESAT6, Ag85A ve Ag85B'yi ekspres eden rekombinant adenovirüsün farelerde güçlü bir antijen-spesifik bağışıklık yanıtı oluşturduğunu rapor etmiştir. Ag85A, Ag85B ve TB10.4 antijenlerini ekspres eden adenovirüs ile oluşturulmuş AERAS-402 aşısının makaklarda güçlü bir hücresel bağışıklık yanıtı ortaya çıkardığı ancak yüksek dozdaki MTB'ye karşı korumadığı bildirilmiştir (Darrah et al. 2014). Bennekov et al. (2006) ise Ag85B ve ESAT-6

proteinlerinin farklı epitoplarının bağışıklık yanıtın belirlenmesindeki rolünü ortaya koymuştur.

Benzer antijenlerin kullanıldığı bu çalışmaların yanı sıra, TB aşısı geliştirmek için yeni antijen ve formülasyon adayları da araştırılmaktadır. Xue et al. (2012), MTB'ye ait RpfE proteini rekombinant olarak saflaştırarak farelerde bağışıklık yanıtını tetiklediğini bildirmiştir. MTB'ye özgü dormansi survi regülatör regülon (DosR)'undan hipotetik bir nitroredüktaz olan Rv3131 ile hazırlanan aşının fare akciğer ve dalağında antijene özgü TNF-α, IFN-γ ve IL-2 düzeylerini artırdığı ve bakteri sayısını azalttığı rapor edilmiştir (Kwon et al. 2017). Larrouy-Maumus et al. (2017), diaçile sülfoglikolipit (Ac_2SGL) ve fosfatidil-*myo*-inozitol dimannozit (PIM_2) olmak üzere saflaştırdıkları iki mikobakteriyel lipit antijenleri biyofiziksel olarak karakterize ettikleri dimetil-dioktadesil-amonyum (DDA) ve sentetik trehaloz 6,6'-dibehenat (TDB) yapısındaki lipozomlar ile formüle ettiler. Bu aşı formülasyonlarının kobaylarda aşılanmamış kontrol gruplarına göre dalakta MTB'ye karşı koruyuculuğunun yüksek olduğu ancak akciğerlerde istatistiksel bir fark olmadığını gösterdiler.

Bu çalışmada, MTB'ye ait LppX virülans faktörü rekombinant olarak saflaştırılıp, bu proteinin immünojenik kapasiteleri ilk defa araştırıldı. Daha önceki çalışmalarda bu proteinlerin MTB virülansında rol oynadığı bildirilmiş ancak rekombinant alt ünite protein aşısı için kullanılabilirlikleri gösterilmemiştir. Bell et al. (2012)'nin çalışmasında, bir lipoprotein olan LppX, kültür filtre proteinleri arasında zengin miktarda bulunmuştur. *M. bovis* BCG'ye ait LppX ile %98 benzerliği olan bir proteini kodlayan gen, DNA aşısı olarak denenmiş ancak başarılı bir sonuç elde edilememiştir (Lefèvre et al. 2000). Lipoproteinlerin kuvvetli antijenik özellikleri göz önüne alındığında (Bell et al. 2012), yerel bir MTB izolatından rekombinant olarak saflaştırılmış LppX proteininin uygun bir adjuvanla birlikte antijenik kapasitesinin değerlendirilmesinin faydalı olacağı düşünülmüştür. Bu çalışmada, rekombinant LppX proteini ve Montanide ISA 720 adjuvanı ile oluşturulan formülasyonunun Balb/c farelerdeki hücresel bağışıklığı tetikleme kapasiteleri serum interferon-gama (IFN-γ) ve interlökin-12 (IL-12) düzeyleri ile ölçüldü. LppX formülasyonunun IFN-γ düzeyini

artırmada BCG kadar etkin olduğu gözlendi. Bu formülasyonun serum IL-12 düzeyini artırmada ise yetersiz olduğu belirlendi.

Tüberküloza karşı aşı geliştirme çalışmalarının çoğunda hücresel bağışıklık yanıtı üzerinde durulsa da Prados-Rosales et al. (2017)'nin çalışmasında mikobakteriyel kapsüler arabinomannan ve Ag85b ile elde edilmiş polisakkarit konjügatın farelerde antikor (IgG) cevabında artış sağladığı, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında akciğer ve dalakta tutunan MTB sayısında düşüş gözlendiği ve yaşam süresinin arttığı gösterilmiştir. Bu çalışmada da rekombinant LppX proteini ve Montanide ISA 720 adjuvanı ile oluşturulan formülasyonun Balb/c farelerde antikor düzeyini artırdığı gözlenmiştir.

Sonuç olarak, bu projede, Türkiye'deki bir hastadan izole edilmiş MTB suşundan klonlanarak*E. coli*'de ifade edilen, saflaştırılıp Montanide ISA 720 VG adjuvanı ile formülize edilen rekombinant LppX proteininin Balb/c farelerde tetikledikleri hümoral ve hücresel bağışıklık yanıtı incelendi. Bu formülasyonun antikor düzeyini artırmada başarılı olduğu, serum IFN-γ ve IL-12 düzeyini artırmada değişkenlik gösterdiği belirlendi. İleriki çalışmalarda, farklı immünojenik proteinlerle oluşturulacak ikili veya üçlü füzyonların daha etkili olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, CpG oligonükleotitleri gibi hücresel yanıtı artıran farklı adjuvanlar da kullanılabilir. Bunun yanı sıra, bu formülasyonun akciğerde ve dalakta MTB tutunmasını nasıl etkiledikleri ile ilgili koruyucu etki çalışmalarının da yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

Akşit, S. 2012. Aşılarla ilgili genel kurallar. Klinik Gelişim Dergisi, 25, 4-11. İzmir

Alaşan, F. 2015. Anti Tümor Nekrozis Faktör Alfa Tedavisinde İzoniazid Kemoprofilaksisinin Etkinliği. Tıpta Uzmanlık Tezi. Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları ve Tüberküloz Anabilim Dalı.

Anonim 1: http://www.mikrobiyoloji.org

Anonim 2: http://www.ncbi.nlm.nih.gov

Arbues A. Lugo-Villarino G. Neyrolles O. Guilhot C. Astarie-Dequeker C. 2014. Playing hide-and-seek with host macrophages through the use of mycobacterial cell envelope phthiocerol dimycocerosates and phenolic glycolipids. Front. Cell. Infection Microbiol. 4:173.

Bell, C., Smith, G. T., Sweredoski, M. J. and Hess, S. 2012. Characterization of the Mycobacterium tuberculosis proteome by liquid chromatography mass spectrometry-based proteomics techniques: a comprehensive resource for tuberculosis research, Journal of Proteome Research, 11 (1), 119-130.

Bell, C., Smith, G. T., Sweredoski, M. J., Hess, S. 2012. "Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* proteome by liquid chromatography mass spectrometry-based proteomics techniques: a comprehensive resource for tuberculosis research", Journal of Proteome Research, 11 (1), 119-130.

Bennekov, T., Dietrich, J., Rosenkrands, I., Stryhn, A., Doherty, T. M., Andersen, P. 2006. "Alteration of epitope recognition pattern in Ag85B and ESAT-6 has a profound influence on vaccine-induced protection against *Mycobacterium tuberculosis*", European Journal of Immunology, 36 (12), 3346-3355.

Beverley, P. C., Ruzsics, Z., Hey, A., Hutchings, C., Boos, S., Bolinger, B., Marchi, E., O'Hara, G., Klenerman, P., Koszinowski, U. H., Tchilian, E. Z. 2014. "A novel murine cytomegalovirus vaccine vector protects against *Mycobacterium tuberculosis*", Journal of Immunology, 193 (5), 2306-2316.

Bradford, M. M. 1976. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", Analitical Biochemistry, 72, 248–254.

Büyüktanır, Ö. Günümüzde Biyoteknolojik Bakteriyel Aşılar Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.5 (2): 97-105, 2010. Samsun children following neonatal BCG vaccination. J Trop Pediatr. 46: 51-2.

Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V. 1998. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence, Nature, 393 (6685), 537-544.

Çetin, R. 2017. *mycobacterium tuberculosis* erp proteininin rekombinant olarak saflaştırılması ve bağışıklık yanıtın preklinik düzeyde incelenmesi. Yüksak Lisans Tezi. Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri enstitüsü.

Dai, G., Rady, H. F., Huang, W., Shellito, J. E., Mason, C., Ramsay, A. J. 2016. "Gene-based neonatal immune priming potentiates a mucosal adenoviral vaccine encoding mycobacterial Ag85B", Vaccine, 34 (50), 6267-6275.

Darrah, P. A., Bolton, D. L., Lackner, A. A., Kaushal, D., Aye, P. P., Mehra, S., vd. 2014. "Aerosol vaccination with AERAS-402 elicits robust cellular immune responses in the lungs of rhesus macaques but fails to protect against high-dose

Mycobacterium tuberculosis challenge", Journal of Immunology, 193 (4), 1799-1811.

Delogu, G., Brennan, M. J. 2001. "Comparative immune response to PE and PE_PGRS antigens of *Mycobacterium tuberculosis*", Infection and Immunity, 69 (9), 5606-5611.

Dünya Sağlık Örgütü, 2018. World Health Organization Global Tuberculosis Report, 2018. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en. Son erişim tarihi: 15.12.2018

Gökçay, G., Partalci, A., Bas, F. and Neyzi, O. 2000. Tuberculin reactivity in young

Junqueira-Kipnis, A. P., Marques Neto, L. M., Kipnis, A. 2014."Role of Fused *Mycobacterium tuberculosis* immunogens and adjuvants in modern tuberculosis vaccines", Frontiers in Immunology, 5, 188.

Karabulut, F. 2017. Rekombinant *mycobacterıum tuberculosıs* ompa proteininin antijenik etkisinin araştırılması. Yüksak Lisans Tezi. Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri enstitüsü.

Kılıç, B. Dalgıç, N. Bayraktar, B. Gencer,H. *Complication of BCG Vaccination: BCG-itis* .2011

Kılıçaslan, Z. Dünyada ve Türkiye'de Tüberküloz İstanbul Tıp Fakültesi, Gögüs hastalıkları anabilim dalı İstanbul Ankem Derg. 2007;21:76-80

Kubica, T., Agzamova, R., Wright, A., Rakishev, G., Rüsch-Gerdes, S. and Niemann S. 2006. *Mycobacterium bovis* Isolates with *M. tuberculosis* Specific Characteristics. Emerging Infectious Diseases, 12 (5); 763-765.

Kwon, K. W., Kim, W. S., Kim, H., Han, S. J., Hahn, M. Y., Lee, J. S., Nam, K. T., Cho, S. N., Shin, S. J. 2017. "Novel vaccine potential of Rv3131, a DosR regulon-encoded putative nitroreductase, against hypervirulent *Mycobacterium tuberculosis* strain K", Scientific Reports, 7, 44151.

Laemmli, U. K. 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", Nature, 227, 680–685.

Langermans, J. A., Doherty, T. M., Vervenne, R. A., van der Laan, T., Lyashchenko, K., Greenwald, R., vd. 2005. "Protection of macaques against *Mycobacterium tuberculosis* infection by a subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85B and ESAT-6", Vaccine, 23 (21), 2740-2750.

Larrouy-Maumus, G., Layre, E., Clark, S., Prandi, J., Rayner, E., Lepore, M., de Libero, G., Williams, A., Puzo, G., Gilleron, M. 2017."Protective efficacy of a lipid antigen vaccine in a guinea pig model of tuberculosis", Vaccine, 35 (10), 1395-1402.

Lee, J., Kim, J., Lee, J., Shin, S. J., Shin, E. C. 2014. "DNA immunization of *Mycobacterium tuberculosis* resuscitation-promoting factor B elicits polyfunctional CD 8(+) T cell responses", Clinical and Experimental Vaccine Research, 3 (2), 235-243.

Lefèvre, P., Denis, O., De Wit, L., Tanghe, A., Vandenbussche, P., Content, J., Huygen, K. 2000. "Cloning of the gene encoding a 22-kilodalton cell surface antigen of *Mycobacterium bovis* BCG and analysis of its potential for DNA vaccination against tuberculosis", Infection and Immunity, 68 (3), 1040-1047.

Li, W., Deng, G., Li, M., Zeng, J., Zhao, L., Liu, X., Wang, Y. 2014. "A recombinant adenovirus expressing CFP10, ESAT6, Ag85A and Ag85B of *Mycobacterium tuberculosis* elicits strong antigen-specific immune responses in mice", Molecular Immunology, 62 (1), 86-95.

Li, Z., Howard, A., Kelley, C., Delogu, G., Collins, F., Morris, S. 1999."Immunogenicity of DNA vaccines expressing tuberculosis proteins fused to tissue plasminogen activator signal sequences", Infection and Immunity, 67 (9), 4780-4786.

Liang, Y., Wu, X., Zhang, J., Xiao, L., Yang, Y., Bai, X., vd. 2012. "Immunogenicity and therapeutic effects of Ag85A/B chimeric DNA vaccine in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*", FEMS Immunology and Medical Microbiology, 66 (3), 419-426.

Liang, Y., Zhang, X., Bai, X., Xiao, L., Wang, X., Zhang, J., Yang, Y., Song, J., Wang, L., Wu, X. 2017. "Immunogenicity and therapeutic effects of a *Mycobacterium tuberculosis* rv2190c DNA vaccine in mice", BMC Immunology, 18 (1), 11.

Lu, J. B., Chen, B. W., Wang, G. Z., Fu, L. L., Shen, X. B., vd. 2015. "Recombinant tuberculosis vaccine AEC/BC02 induces antigen-specific cellular responses in mice and protects guinea pigs in a model of latent infection", Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 48, 597-603.

Mergen, H. Mergen, B. Tavlı, T. Öngel, K. Tavlı, V. Lipoprotein metabolizması hastalıkları ve tedavisine yaklaşım Turk Aile Hek. Derg. 2010; 14(1): 38-45

Mutiso, J. M., Macharia, J. C., Taracha, E., Gicheru, M. M. 2012. "*Leishmania donovani* whole cell antigen delivered with adjuvants protects against visceral leishmaniasis in vervet monkeys (Chlorocebus aethiops)", Journal of Biomedical Research, 26 (1), 8-16.

Mycobacterium tuberculosis H37Rv complete genome. 20.05.2019 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed.

Norrby, M., Vesikari, T., Lindqvist, L., Maeurer, M., Ahmed, R., Mahdavifar, S., vd. 2017. "Safety and immunogenicity of the novel H4:IC31 tuberculosis vaccine candidate in BCG-vaccinated adults: Two phase I dose escalation trials", Vaccine, 35 (12), 1652-1661.

Nyendak, M., Swarbrick, G. M., Duncan, A., Cansler, M., Huff, E. W., Hokey, D. 2016. "Adenovirally-induced polyfunctional T cells do not necessarily recognize the infected target: Lessons from a phase I trial of the AERAS-402 vaccine", Scientific Reports, 6, 36355.

Okay, S. 2011. Development of recombinant vaccines composed of PlpE and OmpH from Pasteurella multocida A:3. Doktora Tezi. Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

Orr, M. T., Ireton, G. C., Beebe, E. A., Huang, P. W., Reese, V. A, Argilla, D., Coler, R. N., Reed, S. G. 2014. "Immune subdominant antigens as vaccine candidates against *Mycobacterium tuberculosis*", Journal of Immunology, 193 (6), 2911-2918.

Özkara, Ş. Aktaş, Z. Özkan, S. Ecevit, H. 2003 Türkiye'de Tüberkülozun Kontrolü İçin Başvuru Kitabı, Ankara.

Pathan, A. A., Sander, C. R., Fletcher, H. A., Poulton, I., Alder, N. C., ve diğ. 2007. "Boosting BCG with recombinant Modified Vaccinia Ankara expressing antigen 85A: different boosting intervals and implications for efficacy trials", PLoS ONE, 2 (10), e1052.

Prados-Rosales, R., Carreño, L., Cheng, T., Blanc, C., Weinrick, B., Malek, A., vd. 2017. "Enhanced control of *Mycobacterium tuberculosis* extrapulmonary dissemination in mice by anarabinomannan-protein conjugate vaccine", PLoS Pathogens, 13 (3), e1006250.

Prados-Rosales, R., Carreño, L., Cheng, T., Blanc, C., Weinrick, B., Malek, A., vd. 2017. “Enhanced control of *Mycobacterium tuberculosis* extrapulmonary dissemination in mice by anarabinomannan-protein conjugate vaccine”, PLoS Pathogens, 13 (3), e1006250.

Scalzo, A. A., Elliott, S. L., Cox, J., Gardner, J., Moss, D. J., Suhrbier, A. 1995. “Induction of protective cytotoxic T cells to murine cytomegalovirus by using a nonapeptide and a human-compatible adjuvant (Montanide ISA 720)”, Journal of Virology, 69 (2), 1306-1309.

Skeiky, Y. A., Alderson, M. R., Ovendale, P. J., Guderian, J. A., Brandt, L., Dillon, D. C., vd. 2004. "Differential immune responses and protective efficacy induced by components of a tuberculosis polyprotein vaccine, Mtb72F, delivered as naked DNA or recombinant protein" Journal of Immunology, 172 (12), 7618-7628.

Smith, I. 2003. Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and molecular determinants of virulence, Clinical Microbiology Reviews, 16 (3), 463.

Sulzenbacher, G. Canaan,S. Bordat,Y. Neyrolles,O. Stadthagen,G. Zamboni,R. Rauzier, J. Maurin, D. Laval,F. Daffe, M. Cambillau, C. Gicquel, B. Jackson, M. 2006. LppX is a lipoprotein required for the translocation of phthiocerol dimycocerosates to the surface of Mycobacterium tuberculosis, (2006) 25, 1436–1444

Taylor, G. M., Stewart, G. R. and Cooke, M. 2003. Koch’s bacillus a look at the fi rst isolate of Mycobacterium tuberculosis from a modern perspective. Microbiology. 149: 3213-20.

Todar, K. 2008. Todar’s online textbook of bacteriology.

Topal, O.M. 2013. Aşılar, aşıların üretimi ve ülkemizdeki mevcut durum. İstanbul.

Tsukamoto, Y., Maeda, Y., Tamura, T., Mukai, T., Mitarai, S., Yamamoto, S., Makino, M. 2016. “Enhanced protective efficacy against tuberculosis provided by a recombinant urease deficient BCG expressing heat shock protein 70-major membrane protein-II having PEST sequence”, Vaccine, 34 (50), 6301-6308.

Viral aşılar, 14.11.2015. http://www.mikrobiyoloji.org. Prof. Dr. Mustafa Arda. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Temel Mikrobiyoloji.

Xue, Y., Bai, Y., Gao, X., Jiang, H., Wang, L., Gao, H., Xu, Z. 2012. "Expression, purification and characterization of *Mycobacterium tuberculosis* RpfE protein", Journal of Biomedical Research, 26 (1), 17-23.

Yoshida, S., Tanaka, T., Kita, Y., Kuwayama, S., Kanamaru, N., Muraki, Y., Hashimoto, S., Inoue, Y., Sakatani, M., Kobayashi, E., Kaneda, Y., Okada, M. 2006. "DNA vaccine using hemagglutinating virus of Japan-liposome encapsulating combination encoding mycobacterial heat shock protein 65 and interleukin-12 confers protection against Mycobacterium tuberculosis by T cell activation", Vaccine, 24 (8), 1191-1204.

Zhang, M., Dong, C., Xiong, S. 2017. “Vesicular stomatitis virus-vectored multi-antigen tuberculosis vaccine limits bacterial proliferation in mice following a single intranasal dose”, Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 7, 34.

EK-1 KÜLTÜR ORTAMLARININ HAZIRLANMASI

1. Luria Broth (LB)

Distile su 1000 mL
Luria Broth 25 g
Steril olmasını sağlamak için 20 dakika 121 °C'de otoklavlandı.

2. Luria Agar (LA)

Distile su 1000 mL
Luria Agar 40 g
Steril olmasını sağlamak için 20 dakika 121 °C'de otoklavlandı.

EK-2 ÇÖZELTİLER VE TAMPONLAR

1. Agaroz Jel Elektroforezi

TAE Tamponu (50X)

Tris-baz242 g
Glasiyal asetik asit 57.1 mL
EDTA (0.5 M, pH 8.0) 100 mL
Distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

Yükleme Tamponu (10X)

Bromofenol mavisi (w/v) % 0.25
Ksilen siyanol FF (w/v) % 0.25
Sükroz (w/v) % 40

2. SDS-Poliakrilamit Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Akrilamit/Bis

Akrilamit 146 g
N.N'-Metilen bis akrilamit 4 g
Distile su ile 500 mL'ye tamamlandı. Filtrelendi, ışıktan korundu ve +4°C'de saklandı.

Tris HCl (1.5 M)

Tris-baz54,45 g
Distile su 150 mL
pH 8.8' e ayarlandıve toplam hacim 300 mL'ye distile su ile tamamlandı. +4°C'de muhafaza edildi.

Tris HCl (0.5 M)

Tris-baz6 g
Distile su 60 mL
pH 6.8'e ayarlanarak toplam hacim 100 mL'ye distile su ile tamamlandı. +4°C'de muhafaza edildi.

Koşturma Tamponu (10X)

Tris- baz30 g
Glisin 144 g
SDS 10 g
Distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

Örnek Yükleme Tamponu(4X)

Tris- HCl (1 M, pH 6.8) 2 mL
EDTA (0.5 M) 1 mL
Gliserol 4 mL
SDS 0.8 g
β-merkaptoetanol 0.4 mL
Bromofenol mavisi 0.008 g
Distile su ile 10 mL'ye tamamlandı.

Coomassie Mavi R-250 Boyası

Coomassie Mavi R-250 0.25 g
Metanol 125 mL
Glasiyal asetik asit 25 mL
Distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Boya Uzaklaştırma Tamponu

Metanol	100 mL
Glasiyal asetik asit	100 mL

Distile su ile 800 mL'ye tamamlandı.

3. Western Blot

Transfer Tamponu(1X)

Metanol	200 mL
Tris-baz3.63 g	
Glisin	14.4 g
SDS	0.37 g

Distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

Tris Tamponlu Tuz Çözeltisi (TBS 1X)

Tris-baz2.42 g	
NaCl	29.2 g

Distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

4. Protein Saflaştırma

LEW (Lizis-Elüsyon-Yıkama) Tamponu (pH 8.0)

Üre	8 M
NaCl	300 mM
$NaH_2PO_4$50 mM	

Elüsyon Buffer (1x)

LEW buffer 20 mL

imidazol (250 mM) 0,34 g
pH 8,0'e ayarlandı.

Bradford Çözeltisi

%95 etanol 25 mL
Coomassie Blue G-250 50 mg
fosforik asit 50 mL
500 mL'ye kadar distile su ile tamamlandı.

5. *E. coli* Kompetan Hücre Tamponu

Tampon1

RuCl	100 mM
KAc	30 mM
$CaCl_2$	10 mM
Gliserol	%15

pH 5.8'e ayarlanıp filtre edildi.

Tampon 2

$CaCl_2$	75 mM
RuCl	10 mM
MOPS	10 mM
Gliserol	%15

pH 6.5'e ayarlanıp filtre edildi.

6. Koloni Seçimi

IPTG

IPTG	100 mg
Distile su	1 mL

Filtre ile steril edildikten sonra -20°C'de muhafaza edildi.

X-gal

X-gal	20 mg
Dimetilformamit	1mL

Işıktan korunması için aliminyum folyo ile sarıldı. -20°C'de muhafaza edildi.

7. Plazmit İzolasyonu

STE Tamponu

Sükroz (w/v)	%10.3
Tris-HCl (ph 8.0)	25 mM
EDTA (pH 8.0)	25 mM

Lizis Tamponu

NaOH	0.3 M
SDS (w/v)	%2

8. ELISA

Karbonat/Bikarbonat Tamponu (0.05 M)

Na_2CO_3 1.59 g

$NaHCO_3$3.88 g

Distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı. pH 9.6'ya ayarlanıp +4°C'de muhafaza edildi.

Yıkama Tamponu(1X PBS-%0.1 Tween-20)

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na_2HPO_4	1.44 g
KH_2PO_4	0.24 g
Tween-20	1 mL

Distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı. pH 7.2'ye ayarlanıp +4°C'de muhafaza edildi.

Bloklama Tamponu

1X PBS-%0.1 Tween-20 içine %2 (w/v) BSA

9. IFN-ɣ ELISA

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

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na_2HPO_4	1.44 g
KH_2PO_4	0.24 g
Tween-20	2 mL

Distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı. pH 7.4'e ayarlanıp +4°C'de muhafaza edildi.

EK-3 KULLANILAN KİMYASAL, ENZİMLER VE KİTLER

Agar (Oxoid)

Agaroz (Biomax-Prona)

Akrilamit (Sigma)

Ampisilin (Sigma)

*Bam*HI(Thermo)

Bovin-serum albumin (Merck)

Bromofenol mavisi (Merck)

Coomassie Mavi G-250 (Fluka)

Coomassie Mavi R-250 (Fluka)

Dimetilformaldehit (Merck)

*Eco*RI (Thermo)

EDTA (Sigma)

Etanol (Sigma)

Etidyum bromür (Sigma)

Fare IFN-γ Kiti (Thermo Scientific)

Fare IL-12 Kiti (Thermo Scientific)

Genomik DNA İzolasyon Kiti (Thermo Scientific)

Glasiyal asetik asit (Merck)

Gliserol (Sigma)

Glisin (Merck)

HCl (Merck)

IPTG (Sigma)

Jel Ekstraksiyon Kiti (Thermo Scientific)

Kanamisin (Sigma)

KCH_3CO_2 (Merck)

KCl (Merck)

KH_2PO_4 (Merck)

Luria Broth (Merck)

Merkaptoetanol (Merck)

Metanol (Sigma)

MOPS (Sigma)

N.N'Metilen-bis akrilamit (Sigma)

Na_2HPO_4 (Merck)

NaCl (Merck)

$NaHCO_3$ (Merck)

NaOH (Merck)

pGEMT Easy Vektör Kiti (Promega)

Plazmit İzolasyon Kiti (Thermo Scientific)

Protino Ni-TED 2000 Kolonları (Macherey-Nagel)

RuCl (Merck)

SDS (Sigma)

Sükroz (Sigma)

Süt tozu (Sigma)

T4 DNA ligaz (Thermo)

Taq DNA polimeraz (Thermo)

TEMED (Sigma)

Tris-baz (Merck)

Tris-HCl (Merck)

Tween-20 (Merck)

Üre (Merck)

X-gal (Sigma)

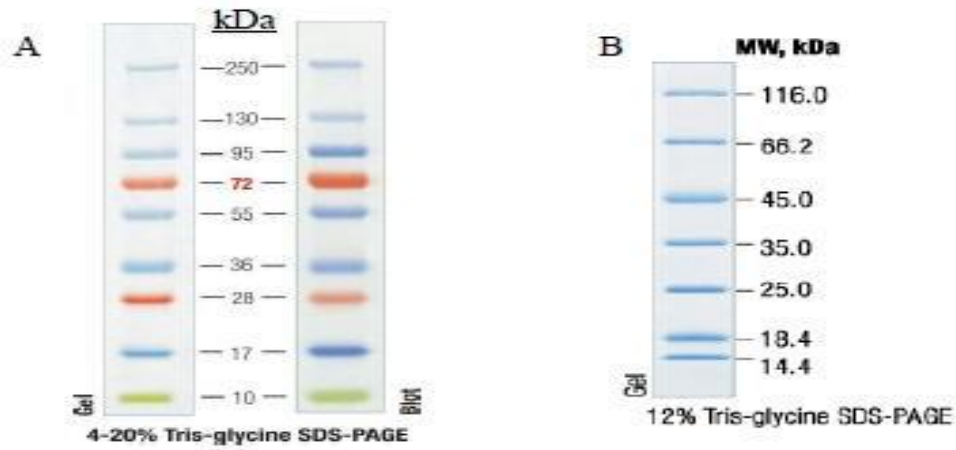
EK-4 NÜKLEOTİD DİZİ ANALİZLERİ, BOYUT BELİRTEÇLERİ VE PLAZMİTLER

Mycobacterium tuberculosis hasta izolatının *lppX* gen dizisi (Gen Bankası erişim numarası KY848245):

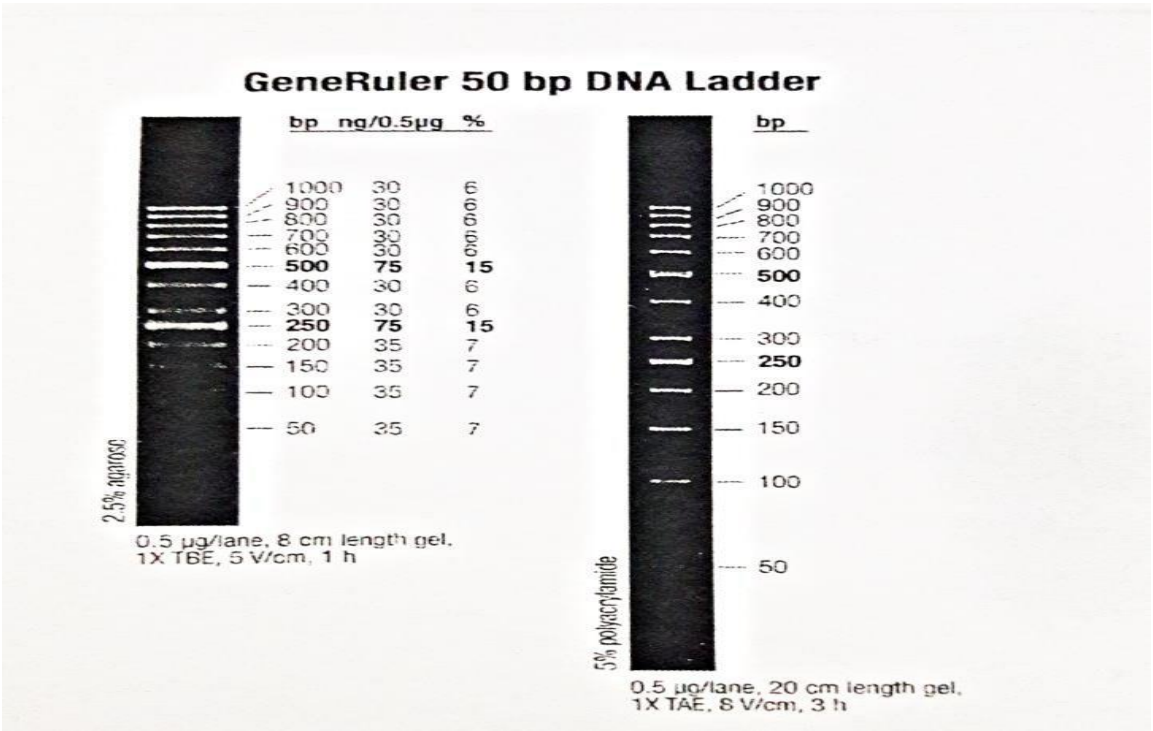
ATGAATGATGGAAAACGGGCGGTGACGTCCGCTGTTCTGGTGGTGCTAGGTGCCTGCCTGGCGT
TGTGGCTATCAGGATGTTCTTCGCCGAAACCTGATGCCGAGGAACAGGGTGTTCCCGTGAGCCC
GACGGCGTCCGACCCCGCGCTCCTCGCCGAGATCAGGCAGTCGCTTGATGCGACAAAAGGGTTG
ACCAGCGTGCACGTAGCGGTCCGAACAACCGGGAAAGTCGACAGCTTGCTGGGTATTACCAGTG
CCGATGTCGACGTCCGGGCCAATCCGCTCGCGGCAAAGGGCGTATGCACCTACAACGACGAGCA
GGGTGTCCCGTTTCGGGTACAAGGCGACAACATCTCGGTGAAACTGTTCGACGACTGGAGCAAT
CTCGGCTCGATTTCTGAACTGTCAACTTCACGCGTGCTCGATCCTGCCGCTGGGGTGACGCAGC
TGCTGTCCGGTGTCACGAACCTCCAAGCGCAAGGTACCGAAGTGATAGACGGAATTTCGACCAC
CAAAATCACCGGGACCATCCCCGCGAGCTCTGTCAAGATGCTTGATCCTGGCGCCAAGAGTGCA
AGGCCGGCGACCGTGTGGATTGCCCAGGACGGCTCGCACCACCTCGTCCGAGCGAGCATCGACC
TCGGATCCGGGTCGATTCAGCTCACGCAGTCGAAATGGAACGAGCCCGTCAACGTCGACTAG

Mycobacterium tuberculosis hasta izolatının *16S rRNA* gen dizisi (Gen Bankası erişim numarası KY810766):

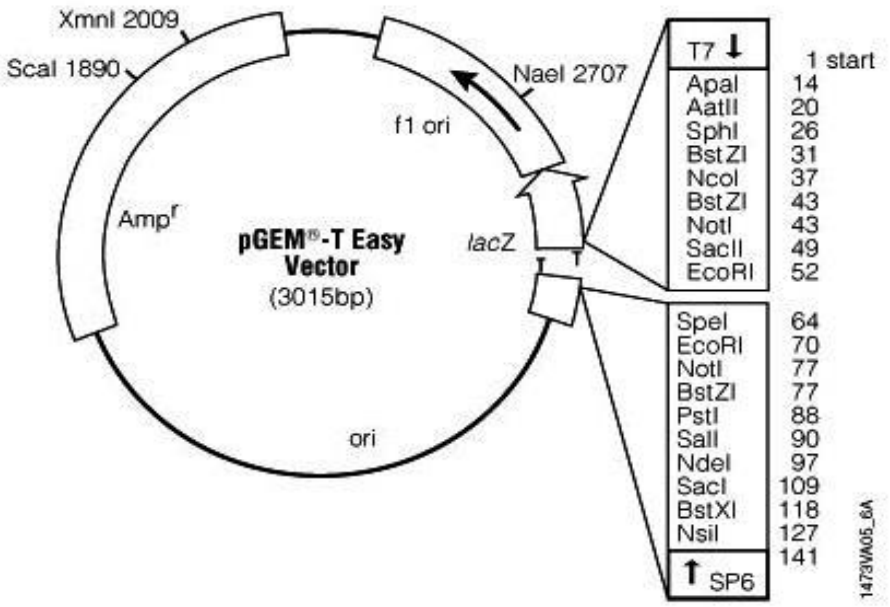
AGTCGAACGGAAAGGTCTCTTCGGAGATACTCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGA
TCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCACGGGATG
CATGTCTTGTGGTGGAAAGCGCTTTAGCGGTGTGGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGG
TGGGGTGACGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTCCGGCCACACTGG
GACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAA
GCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCACCATCG
ACGAAGGTCCGGGTTCTCTCGGATTGACGGTAGGTGGAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCC
AGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTA
GGTGGTTTGTCGCGTTGTTCGTGAAATCTCACGGCTTAACTGTGAGCGTGCGGGCGATACGGGC
AGACTAGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGG
AGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGG
GAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGTACTAGGTGTGGGTTT
CCTTCCTTGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAA
GGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGAT
GCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATGCACAGGACGCGTCTAGAGATAGGCGTTCCCT
TGTGGCCTGTGTGCAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGT
CCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTCATGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTCGTGAGAGAC
TGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCCAGGG
CTTCACACATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCGATGCCGCGAGGTTAAGCGAATCCTTA
AAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAA
TCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCA
TGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCAGTGGCCTAACCCTCGGGAGGG



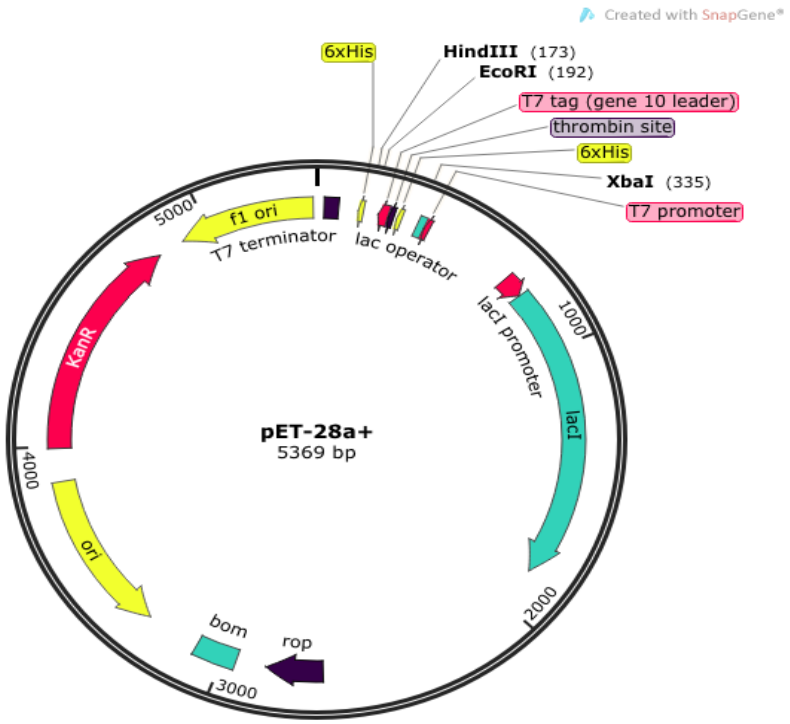
Şekil 1 PageRuler™ Plus Prestained protein marker(Fermentas) ve Unstained protein moleküler ağırlık marker (Fermentas)



Şekil 2 GeneRuler 50 bp DNA marker**(**Thermo)



Şekil 3pGEM-T® Easy klonlama vektörü(Promega #A1360)



Şekil4pET-28a(+) His-tag ekspresyon vektörü(Novagen #69864-3)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Cennet DOĞAN
Doğum Yeri : Polatlı
Doğum Tarihi:20.01.1992
Medeni Hali :Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
Adres : Mehmet Akif Mahallesi Okan Sokak No:23 Polatlı\ANKARA
Tel : 0542 474 75 35
E-posta : cennettdogan@gmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Ankara Polatlı Lisesi (2009)

Lisans : Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2014)

Yüksek Lisans :Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı (2019)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Polatlı Atatürk Anadolu Lisesi (2017)
Ankara Temelli Çok Programlı Anadolu Lisesi (2018)
Ankara Polatlı Belediyesi Destek Eğitim Merkezi (2019)

Staj

Ankara Polatlı Duatepe Devlet Hastanesi (2013)

Lisans Tezi

Tuz Stresi ve Fasulyede (*Phaseolus vulgaris L.*) Tuz Stresinin Etkileri (2014)
Buğdayda (*Triticum aestivum*) Biyotik Strese Karşı miR159'un Etkisi (2014)

Yayınlar

*Mycobacterium tuberculosis'*in *erp, hspR, lppX, mmA4* ve *ompA* genlerinin *E. coli*'ye Klonlanması. 18. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, 18-19 Aralık 2015, Konya. (Poster sunum)