ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MYCOBACTERİUM TUBERCULOSİS ERP PROTEİNİNİN REKOMBİNANT OLARAK SAFLAŞTIRILMASI VE BAĞIŞIKLIK YANITIN PREKLİNİK DÜZEYDE İNCELENMESİ

Rukiye ÇETİN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2017

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Rukiye ÇETİN tarafından hazırlanan **"*Mycobacterium tuberculosis* Erp proteininin rekombinant olarak saflaştırılması ve bağışıklık yanıtın preklinik düzeyde incelenmesi"** adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman **:** Doç. Dr. Sezer OKAY

Jüri Üyeleri

Başkan **:** Prof. Dr. Sedef TUNCA GEDİK

Üye **:** Doç. Dr. Sezer OKAY

Üye **:** Yrd. Doç. Dr. Şinasi AŞKAR

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Doç. Dr. Tamer KEÇELİ

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MYCOBACTERİUM TUBERCULOSİS ERP PROTEİNİNİN REKOMBİNANT OLARAK SAFLAŞTIRILMASI VE BAĞIŞIKLIK YANITIN PREKLİNİK DÜZEYDE İNCELENMESİ

Rukiye ÇETİN

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Sezer OKAY

Günümüzde, tüberküloz hastalığına karşı kullanılan tek lisanslı aşı BCG aşısıdır. Bu aşının erişkinlerde koruyuculuğu yetersiz olduğu için etkin yeni tüberküloz aşılarının geliştirilmesi için çalışmalar başlatılmıştır. Bu tez çalışmasında ülkemizdeki bir verem hastasından izole edilmiş olan *Mycobacterium tuberculosis* suşundan *erp* geni çoğaltılarak önce pGEM-T sonra pET28-a vektörüne klonlandı. Daha sonra *E. coli* BL21 suşuna aktarıldı ve *E. coli*'de ifade edilen his-tag'lı rekombinant Erp proteini nikel kolonlar kullanılarak saflaştırıldı. Saflaştırılan protein yağ bazlı bir adjuvan olan Montanide ISA 720 VG ile 7:3 oranında karıştırılarak aşı formülasyonu hazırlandı. Rekombinant proteinin antijenik özellikleri Western blot deneyi ile kalitatif olarak analiz edildi. Rekombinant proteine ve BCG aşısına özgün serum kullanıldığında beklenen büyüklükte bantlar gözlenirken, sadece adjuvana özgün serum kullanıldığında bant gözlenmedi. Bununla birlikte Erp'nin hümoral ve hücresel bağışıklığı tetikleme kapasiteside değerlendirildi. Aşılama öncesi ve sonrası IgG değerleri karşılaştırıldığında, hazırlanan aşı formülasyonunun hümoral bağışıklık yanıtını anlamlı düzeyde uyardığı belirlendi. Bu formülasyonun hücresel bağışıklığı tetikleme kapasiteleri serum interferon-gama (IFN-γ) ve interlökin-12 (IL-12) düzeyleri ile ölçüldü. Erp formülasyonunun IFN-γ düzeyini artırmada BCG kadar etkin olduğu gözlendi ve 15. ve 30. günlerde BCG'den daha yüksek IL-12 düzeyi sağladığı tespit edildi. Elde edilen bulgular doğrultusunda, rekombinant Erp'nin altünite tüberküloz aşısı geliştirmede kullanılabileceği düşünülmektedir.

2017, 80 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: İnterferon gama, interlökin 12, tüberküloz, BCG, rekombinant aşı

ABSTRACT

MSc. Thesis

PURPOSE OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* ERP PROTEIN AS A RECOMBINANT AND PREVALENCE OF AN IMMUNITY RESPONSE ANALYSIS

Rukiye ÇETİN

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Sezer OKAY

BCG is the only vaccine against tuberculosis caused by *Mycobacterium tuberculosis* bacteria. Effective new tuberculosis vaccines need to be developed because this vaccine is insufficient in adults. In this thesis, *erp* gene from *Mycobacterium tuberculosis* strain isolated from a tuberculosis patient in Turkey was cloned into pGEM-T, followed by pET28-a vector and transferred to *E. coli* BL21 strain. His-tagged recombinant Erp protein expressed in *E. coli* was purified using nickel columns and the vaccine formulations were prepared by mixing 7: 3 with Montanide ISA 720 VG, an oil-based adjuvant. The antigenic properties of the recombinant protein were qualitatively visualized by Western blotting. When using recombinant protein and BCG vaccine-specific serum, the expected large bands were observed, but no band was observed when only adjuvant-specific serum was used. Simultaneously, the humoral and cellular immunity triggering capacity of the recombinant protein was assessed. When comparing pre- and post-immunization IgG values, it was determined that the prepared vaccine formulation significantly increased the humoral immune response. The cellular immunity triggering capacities of this formulation were measured by serum interferon-gamma (IFN-γ) and interleukin-12 (IL-12) levels. Erp formulation was found to be as effective as BCG in increasing IFN-γ levels. Erp formulation was found to provide higher levels of IL-12 than BCG on days 15 and 30. It is thought that recombinant ERP can be used to develop the subtype tuberculosis vaccine in the direction of the obtained findings.

2017, 80 pages

KEYWORDS: Interferon gamma, interleukin 12, tuberculosis, BCG, recombinant vaccine.

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

"*Mycobacterium tuberculosis* Erp Proteininin Rekombinant Olarak Saflaştırılması ve Bağışıklık Yanıtın Preklinik Düzeyde İncelenmesi'' adlı bu çalışma 2017 yılında hazırlanarak Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak sunulmuştur. Bu çalışmanın amacı, tüberküloz hastalığına dair rekombinant Erp'nin immünojenik etkisini belirlemek ve ticari BCG aşısı ile karşılaştırmaktır.

Öncelikle beni bu aşamalara kadar getiren, herzaman arkamda olan, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve bana sonsuz güvenen annem Hatice, babam Seyfettin, abim Ahmet ve ablam Funda'ya tüm kalbimle teşekkürlerimi sunuyorum. Bana bu deneyimi kazandıran ve akademik hayatta daha ileri gidebilmem için fırsat veren, her türlü destek ve yardımı gösteren, daima yol gösterici olan, geçen bütün zamanda birçok doğru ve yanlışlarımı gösteren ve son olarak bu zamanı tüm güzellikleriyle yaşamama imkan sağlayan danışman hocam Doç. Dr. Sezer OKAY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

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

Rukiye ÇETİN
Çankırı, Mayıs 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET ii
ABSTRACT iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR iv
SİMGELER DİZİNİ vii
ŞEKİLLER DİZİNİ viii
ÇİZELGELER DİZİNİ x
1. GİRİŞ 1
2. KURAMSAL TEMELLER 3
2.1 Tüberküloz 3
2.1.1 Etiyoloji 4
2.1.2 Tanı 6
2.1.3 Kontrol 7
2.2 *Mycobacterium tuberculosis* 8
2.3 Virülans Faktörleri 15
2.4 Erp (Exported repetitive protein) 18
2.5 Aşı Geliştirme ve Aşı Tipleri 19
3. MATERYAL VE YÖNTEM 28
3.1 Bakteri ve Plazmitler 28
3.2 Primer Dizayn 29
3.3 *Mycobacterium tuberculosis* Genomik DNA'sının Saflaştırılması 30
3.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) 31
3.5 Jel Ekstraksiyon 32
3.6 pGEM-T Ligasyon Reaksiyonu 32
3.7 pET28-a (+) Ligasyon Reaksiyonu 33
3.8 *E. coli* DH5α Hücrelerine Transformasyon 33
3.9 Plazmit İzolasyonu 34
3.10 Restriksiyon Enzim Kesimi 35
3.11 *E. coli* BL21 Hücrelerine Transformasyon 35
3.12 His-tag Proteinlerin Saflaştırılması 35
3.13 Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamit Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) 36
3.14 Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi 37
3.15 Fare Deneyleri (Aşılama) 38
3.16 Western Blot 39
3.17 IgG (İmmunoglobulin G) ELISA 40
3.18 IFN-ɣ (İnterferon-gama) ELISA 41
3.19 IL-12 (İnterlökin 12) ELISA 42
4. BULGULAR 43
4.1 *Mycobacterium tuberculosis* Genomik DNA'sından *16S rRNA* Analizi ve *erp* Geninin Klonlanması 43
4.2 pET28-a (+) Vektörüne Klonlama 49
4.3 *erp* Geninin *E. coli* BL21 Hücrelerinde Ekspresyonu ve Rekombinant Proteinin Saflaştırılması 51
4.4 Protein Konsantrasyonun Ölçülmesi ve Aşı Formülasyonunun Hazırlanması 53
4.5 Western Blot 53

4.6 Rekombinant Proteinin Bağışıklık Tepkileri 56
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 59
KAYNAKLAR 64
Ek-1 Plazmitler ve Boyut Belirteçleri 70
Ek-2 Kültür Ortamlarının Hazırlanması 72
Ek-3 Solüsyon ve Tamponlar 73
Ek-4 Kullanılan Kimyasal ve Enzimler 79
ÖZGEÇMİŞ 80

SİMGELER DİZİNİ

°C	Celcius
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
mM	Milimolar
mg	Miligram
mL	Mililitre
ng	Nanogram
nm	Nanometre

Kısaltmalar

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
Ala	Alanin
AMP	Adenozin Mono Fosfat
Arg	Arjinin
BCG	Bacille Calmette Guerin
Bp	Base pair
CFU	Colony Forming Unit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Gly	Glisin
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IFN	İnterferon
IgG	İmmunoglobulinG
IL	İnterlökin
kb	Kilo baz
kDa	Kilo dalton
OD	Optical Dencity
Orf	Open reading frame
Pro	Prolin
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rpm	Revolutions per minute
rRNA	Ribozomal Ribo Nükleik Asit
UV	Ultraviolet

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 *M. tuberculosis* elektron mikroskop görüntüsü (Todar 2008) 10
Şekil 2.2 *M. tuberculosis* koloni yapısı (Kubica *et al.* 2006)..... 10
Şekil 2.3 *M. tuberculosis* genom yapısı (Cole *et al.* 1998)..... 11
Şekil 2.4 Gram (+), gram (-) ve mikobakteri hücre duvar yapıları şematik gösterimi (Matee 2011)..... 14
Şekil 2.5 *M. tuberculosis* hücre duvarı yapısı (Brennan *et al.* 2003)..... 14
Şekil 2.6 *M. tuberculosis* hücre duvarı yapısında bulunan hücre yüzey proteinlerinin şematik gösterimi (Forrellad *et al.* 2012) 17
Şekil 2.7 BCG aşısını keşfeden bilim adamları (https://ucsopblog.com) 24
Şekil 3.1 Protein konsantrasyonların hesaplanması için kalibrasyon eğrisi 38
Şekil 3.2 BALB/c fareler için aşılama ve kan alma zamanları 39
Şekil 3.3 Western blot deneyinde izlenen transfer işlem sırası..... 40
Şekil 4.1 *M. tuberculosis* genomik DNA izolasyonu agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: 50 bp marker, 1: 6 µL DNA, 2: 12 µL DNA) 43
Şekil 4.2 *16S rRNA* geni PZR agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: 50 bp marker, 1-2: PZR ürünü, 3: negatif kontrol) 44
Şekil 4.3 *erp* geni PZR agaroz jel elektroforez görüntüsü (1: *erp* PZR ürünü, 2: negatif kontrol, M: 50 bp marker) 44
Şekil 4.4 Nükleotit dizisi BLAST sonucu uyumluluk oranları 45
Şekil 4.5 *Mycobacterium tuberculosis* izolatının *16S rRNA* gen dizisi (Gen Bankası erişim numarası KY810766) 46
Şekil 4.6 Jel ekstraksiyon sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: 50 bp marker, 1: *erp*) 46
Şekil 4.7 pGEM-T-*erp* mavi-beyaz koloni oluşumu görüntüsü 47
Şekil 4.8 pGEM-T-*erp* plazmit izolasyonu agaroz jel elektroforez görüntüsü (1,2,4,5: başarısız klonlama, 3,6: başarılı klonlama, K: mavi koloni kontrol) 47
Şekil 4.9 pGEM-T-*erp* restirksiyon enzim kesimi agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: 50 bp marker, 1: pGEM-T-*erp*)..... 48
Şekil 4.10 *Mycobacterium tuberculosis* izolatının *erp* gen dizisi (Gen Bankası erişim numarası KY848243). 48
Şekil 4.11 pET28-a plazmitinin *Bam*HI restriksiyon enzimi ile kesiminin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: 1 kb marker, 1-2: pET-*Bam*HI)..... 49
Şekil 4.12 pET28a-*erp* plazmit izolasyonu agaroz jel elektroforez görüntüsü (K: pet28a kontrol, 1-2-5: başarısız plazmitler, 3-4: başarılı plazmitler)..... 50
Şekil 4.13 pET28a-*erp Eco*RI restriksiyon enzim kesimi agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: 50 bp marker, 1-2: *erp*)..... 50
Şekil 4.14 BL21 agaroz jel görüntüsü (K: pET28-a-*erp*, 1-2-3-4: BL21'e klonlanmış rekombinant plazmitler). 52
Şekil 4.15 A) Rekombinant proteinin doğal koşullardaki nikel kolon uygulamasının SDS-PAGE görüntüsü (M: protein marker, K: IPTG eklenmemiş kontrol, L: IPTG eklenen kültür lizatı, F: kolona bağlanmayanlar, W: yıkama, E: elüsyon). B) Protein markerda bulunan bantların büyüklükleri 52
Şekil 4.16 A) Rekombinant proteinin denatüre koşullardaki nikel kolon uygulamasının SDS-PAGE görüntüsü (M: protein marker, K: IPTG eklenmemiş kontrol, L:

IPTG eklenen kültür lizatı, F: kolona bağlanmayanlar, W: yıkama, E: elüsyon). B) Protein markerda bulunan bantların büyüklükleri. 53
Şekil 4.17 Saflaştırılan Erp proteinine ait A) SDS-PAGE görüntüsü B) Western Blot görüntüsü (M: Prestained marker 1: Erp). 54
Şekil 4.18 Erp antijenine karşı BCG antikorunun çapraz reaksiyonunu gösteren Western blot deneyi (A: SDS-PAGE görüntüsü, B: Western blot görüntüsü, C: Bantların bulunduğu yerlerin çizgisel gösterimi. M: prestained marker, 1: Erp) 55
Şekil 4.19 Adjuvana karşı oluşan antikorların çapraz reaksiyonunu gösteren Western blot deneyi (M: prestained marker, 1: Erp) 55
Şekil 4.20 Montanide ISA 720 VG adjuvanı ile hazırlanmış Erp'ye ait aşı formülasyonlarının BALB/c farelerdeki hümoral bağışıklık (total IgG) yanıtı. Serumların 1:800 seyreltme değerleri kullanılmıştır (***: p<0,001). 56
Şekil 4.21 Montanide ISA 720 VG adjuvanı ile hazırlanmış Erp'ye ait aşı formülasyonun BALB/c farelerdeki serum IL-12 seviyesi 57
Şekil 4.22 Montanide ISA 720 VG adjuvanı ile hazırlanmış Erp'ye ait aşı formülasyonlarının BALB/c farelerdeki serum IFN-ɣ seviyesi. 58
Şekil 1 pGEM-T® Easy klonlama vektörü (Promega #A1360) 70
Şekil 2 pET-28a(+) His-tag ekspresyon vektörü (Novagen #69864-3) 71
Şekil 3 A) PageRuler™ Plus Prestained protein marker (Fermentas), B) Unstained protein moleküler ağırlık marker (Fermentas) 71
Şekil 4 GeneRuler 50 bp DNA marker (Thermo) 71

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Tüberküloz enfeksiyonu ve tüberküloz hastalığı arasındaki benzerlikler ve farklılıklar (Todar 2008) 4
Çizelge 2.2 *M. tuberculosis* genlerinin işlevlerine göre dağılımı (Brosch *et al.* 2000) .. 12
Çizelge 2.3 *M. tuberculosis*'te deneysel olarak tanımlanmış bazı virülans faktörleri (Pym and Small 2006) 17
Çizelge 2.4 *M. tuberculosis* virülans faktörleri (Smith 2003) 18
Çizelge 2.5 Erp'nin özellikleri (de Mendonça-Lima *et al.* 2001) 19
Çizelge 2.6 BCG'nin eksikliklerine önerilen çözümler (Agger and Andersen 2001) 25
Çizelge 3.1 Kullanılan bakteri suşlarının özellikleri 28
Çizelge 3.2 Klonlama ve ekspresyonda kullanılan plazmitler 29
Çizelge 3.3 PZR'de kullanılan ileri ve geri primer özellikleri 29
Çizelge 3.4 Kullanılan primerler ve PZR programı 32
Çizelge 3.5 SDS-poliakrilamit jellerin hazırlanması 36
Çizelge 3.6 Aşılama deneyindeki gruplar ve uygulamalar 38
Çizelge 4.1 Farklı aşı gruplarının BALB/c farelerdeki serum IL-12 düzeylerinin tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey's testi ile karşılaştırılması 58
Çizelge 4.2 Farklı aşı gruplarının BALB/c farelerdeki serum IFN-γ düzeylerinin tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey's testi ile karşılaştırılması 58

1. GİRİŞ

Tüberküloz, insanlık tarihi kadar eski bir geçmişe sahip ve tarih öncesi çağlardan bu yana bilinen bir hastalıktır (Nikiforuk *et al.* 2000). Tüberküloz diğer adıyla verem, çoğunlukla *Mycobacterium tuberculosis* bakterisinin neden olduğu bulaşıcı bir hastalıktır. Tipik olarak akciğerleri etkilemekte (pulmoner) olup bazen diğer bölgeleri de etkileyebilmektedir (ekstrapulmoner) (Dünya Sağlık Örgütü, 2017). Tüberküloz eski çağlardan beri varlığını sürdüren bir hastalıktır. Mısır'daki mumyalarda (M.Ö. 2050–500) basil gözlenmiş olup M.Ö. 4000-2000 yıllarına ait Çin ve Hint kaynaklarında tüberkülozdan bahsedilmekte ve hastalığın geçmişi Neolitik çağa (M.Ö. 7000) kadar uzanmaktadır (Smith 2003). 1940-1950'lerde birçok antibiyotiğin keşfedilmesiyle, özellikle gelişmiş ülkelerde tüberküloz hastalığında azalma meydana gelmiştir ancak son dönemde fakirlik, nüfus yoğunluğu ve HIV'in yayılmasıyla tüberkülozdan dolayı milyonlarca kişi ölmüştür (Ehebauer and Wilmanns 2011).

Türkiye'de veremle mücadelenin öncü kuruluşu olan "Veremle Mücadele Osmanlı Cemiyeti" 1918 yılında Prof. Dr. Besim Ömer Paşa tarafından kurulmuştur. Ardından, 1923 yılında Dr. Behçet Uz tarafından "İzmir Veremle Mücadele Cemiyeti Hayriyesi" ve "Balıkesir Veremle Mücadele Cemiyeti" kurulmuştur. 1950'li yıllara kadar veremle savaşmak için ülkemizde dispanserler ve sanatoryumlar açılmıştır. Günümüzde ise veremle savaş, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu bünyesindeki Bulaşıcı Hastalıklar Kontrol Programları Başkan Yardımcılığı altında Tüberküloz Daire Başkanlığı tarafından yürütülmektedir (Türkiye Halk Sağlığı Kurumu 2017).

Türkiye'de tüberkülozun 2015 yılındaki mortalite ve insidans oranları (HIV dahil) sırasıyla 100.000 kişide 0,96 ve 18,12'dir. Ülkemizin Asya ve Afrika'dan gelen göçmenlerin geçiş yeri olması ve yetersiz raporlamalar göz önüne alındığında bu oranların daha yüksek olduğu düşünülmektedir. Dünya Sağlık Örgütü 2016 küresel tüberküloz raporuna göre, 2015 yılında yaklaşık 10,4 milyon (5,9 milyon erkek, 3,5 milyon kadın, 1 milyon çocuk) yeni tüberküloz vakası tespit edilmiştir. Ayrıca 2016 raporunda 2016-2035 dönemi için "The End TB Strategy" yani tüberkülozu

sonlandırma stratejisini açıklamıştır. Bu hedefe hazırlanmak için 2020-2025 döneminde 2015 oranlarına göre tüberküloz ölümlerini %35, insidansını da %20 azaltma hedeflenmiştir. 2035 yılına kadar ise (2015'e kıyasla) tüberküloz ölümlerini %95, insidansı ise %90 azaltma hedefi belirtilmiştir (Dünya Sağlık Örgütü 2017). Bu hedefe ulaşmak için yeni tüberküloz tanı yöntemleri, ilaç ve aşıların geliştirilmesi hayati derecede önemlidir.

Şu an dünyada tüberküloza karşı kullanılan tek aşı Albert Calmette ve Camille Guérin isimli iki Fransız araştırmacının 1920'li yıllarda, sığır tipi tüberküloz basilini (*M. bovis*) zayıflatarak hazırladıkları Bacille-Calmette-Guérin (BCG) aşısıdır. Koruyuculuğu son derece değişkendir. Erişkinlerde BCG aşısının koruyuculuğu düşüktür. Dolayısıyla, tüberküloza karşı geliştirilmiş yeni aşılara ihtiyaç vardır (Zhao *et al.*2012).

Bu tez çalışmasında, Türkiye'deki bir hastadan izole edilmiş olan *M. tuberculosis*'e ait Erp proteinin rekombinant bir tüberküloz aşısı geliştirmede kullanılabilirliği araştırıldı. *M. tuberculosis* izolatından klonlanarak *E. coli*'de ifade edilen ve daha sonra saflaştırılan rekombinant protein yağ bazlı bir adjuvan olan Montanide ISA 720 VG ile formülize edildi. Aşı formülasyonun, yalnızca adjuvanın ve ticari BCG aşısının BALB/c farelerde bağışıklık yanıtı oluşturabilme kapasitesi serumdaki immunoglobulin G, interferon-gama ve interlökin-12 düzeyi ELISA yöntemiyle ölçülerek sonuçlar istatistiksel olarak birbiriyle karşılaştırıldı. Elde edilen veriler, Erp'nin yeni tüberküloz aşı geliştirme stratejisinde yer alabilecek bir antijen olduğunu göstermektedir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Tüberküloz

Tüberküloz, *Mycobacterium tuberculosis* olarak tanımlanan bir mikobakteri türünün neden olduğu, değişik klinik görünümlere sahip kronik ve nekrotizan bir enfeksiyondur. Tüberküloz, %80 oranında akciğerlerde (pulmoner) olmak üzere diğer organlarda da (ekstrapulmoner) görülebilmektedir (Stead *et al.* 1996). Tüberküloz basilini içeren aerosollerin solunması yoluyla hastalık bulaşmaktadır. Damlacık şeklindeki 5 mikrondan küçük aerosollerin havada asılı kalması nedeniyle etken kolayca alveollere ulaşabilir. Enfeksiyon sonucu organlarda ciddi patolojik lezyonlar ortaya çıkmaktadır (Nikiforuk *et al.* 2000).

Tüberküloz, iskelet sisteminde de deformasyonlara neden olmaktadır. Bu nedenle 4000 yıl önceki kemik kalıntılarında tüberküloz varlığı saptanmıştır. Antik Mısır'da ortaya çıkarılan deforme olmuş iskeletler o zamanlarda bu hastalığın nüfus arasında yaygın olduğunu göstermektedir. İtalya, Danimarka gibi ülkelerde ve Ortadoğu'da 4000 yıl öncesine kadar benzer vakaların olduğu ortaya çıkmıştır. Geçmiş tarihte Asurlular hasta insanlarını tanımlamak için kil tabletler üzerine kan öksüren insan figürleri çizmişlerdir. Aynı zamanda Hipokrat, M.Ö 5. yy'da insanların göğüs ağrısı, öksürük ile kan atılması gibi vakaları yazmıştır (Smith 2003).

Tüberküloz enfeksiyonu patojenin vücutta olduğu anlamına gelmektedir fakat bağışıklık sistemi bakteriyi kontrol altında tutmaktadır. Bağışıklık sistemi makrofajlar üreterek tüberküloz basilini çevreler. Hücreler basili kontrol altında tutan sert bir kabuk oluşturur. Tüberküloz enfeksiyonu olan insanların çoğu yapılan tüberkülin deri testinde pozitif sonuç verirler, diğer insanlara enfeksiyonu bulaştıramaz ve tüberküloz hastası olarak kabul edilmezler. Tüberküloz enfeksiyonu ve tüberküloz hastalığı arasındaki başlıca benzerlikler ve farklılıklar Çizelge 2.1'de verilmiştir (Todar 2008).

Çizelge 2.1 Tüberküloz enfeksiyonu ve tüberküloz hastalığı arasındaki benzerlikler ve farklılıklar (Todar 2008)

Tüberküloz Enfeksiyonu	**Tüberküloz Hastalığı**
Patojen mevcut	Patojen mevcut
Tüberkülin deri testi pozitif	Tüberkülin deri testi pozitif
Akciğer göğüs grafisi normal	Akciğer lezyonlarını mevcut
Balgam yayma kültürleri negatif	Balgam yayma kültürleri pozitif
Belirti yok	Öksürük, ateş, kilo kaybı gibi belirtiler
Bulaşıcı değil	Tedaviden önce bulaşıcı
Tüberküloz olgusu olarak tanımlanmaz	Tüberküloz olgusu olarak kabul edilir

Tüberküloz enfeksiyonunda primer ve sekonder olmak üzere iki faz vardır. Primer enfeksiyon, genellikle hafif ve belirtisiz olan konağın ilk enfeksiyonudur. Son zamanlarda mikobakteri ile enfekte olan sağlıklı bir kişi grip benzeri belirtiler gösterebilir ve tüberkülozdan şüphelenme gibi bir neden oluşturmamaktadır. Sekonder enfeksiyon ise bağışıklık sistemi zayıf olan insanlarda hızlı bir şekilde sekonder tüberküloz gelişebilir. Sağlıklı veya tedavi edilmiş insanlarda ise yıllarca gizli kalabilir. Bazı insanlarda enfeksiyon tüberküloz haline dönüşmeyebilir (Engleberg *et al.* 2013).
Her yıl Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün yayımlamış olduğu Küresel Tüberküloz Raporları ile tüberküloz hastalığına ait tüm veriler dünyada bölgeler ve ülkeler bazında ortaya koyulmaktadır. Tüberküloza ait verilerin birçok ülkede kayıt altına alındığı bilinse de bu veriler çeşitli sebeplerle ülkeden ülkeye derecesi değişmek üzere eksik ya da doğru tespit edilmeyen bilgiler içermektedir. DSÖ'nün her yıl yayımladığı veriler tahmini bilimsel bulgulardır (Rieder 1999).

2.1.1Etiyoloji

Tüberküloz, insanlığın var olduğu zamandan bu yana insan sağlığını tehdit eden bir hastalıktır (Rieder 1999). Tüberküloz 1650'de tüketim olarak adlandırılmış ve mortalitenin önde gelen nedenleri arasında yer almıştır. 1882'de Robert Koch tarafından yeni bir boyama tekniği ile tüberküloz etmeni bakteriler belirlemiştir (Engleberg *et al.*

2013). Tüberküloz, bir mikobakteri türü olan *M. tuberculosis* olarak isimlendirilen mikroorganizmanın neden olduğu değişik klinik görünümlere sahip kronik ve nekrotizan bir enfeksiyon hastalığıdır (Stead *et al.* 1996).

Tüberküloz basilinin genomları içinde gerçekleşen delesyon olaylarından kaynaklanan değişkenlikler sonucunda tüberküloz kompleksi ortaya çıkmıştır. Bu kompleks, *M. tuberculosis* kompleksi olarak adlandırılmaktadır. Kompleks içine, *M. tuberculosis, M. africanum, M. bovis* ve *M. microti* patojenleri dahildir (Brosch *et al.* 2002). Bu türler genetik olarak birbirine %85-100 olarak benzerdir fakat bunların epidomiyolojisi farklıdır. *M. tuberculosis* insanlarda ve hayvanlarda temas sonucunda hastalığa neden olur. *M. africanum* Afrika insanlarında tüberküloza neden olur. *M. microti* tarla farelerinde hastalığa neden olurken *M. bovis* evcil ve yabani hayvanlarda hastalık oluşturmada geniş bir yelpazeye sahiptir (Frothingham *et al.* 1994).

Mycobacterium africanum

M. africanum ekvatoral Afrika'daki insanlardan izole edilmiş *M. tuberculosis* kompleks üyesidir. *M. africanum* tarafından oluşturulan hastalık *M. tuberculosis* ve *M. bovis* ile oluşturulan hastalığa benzerdir. *M. tuberculosis* gibi bu patojende aerosol iletim yoluyla bulaşmaktadır. *M. africanum'*un insan tüberkülozuna neden olduğu Avrupa'da bildirilmiştir (Desmond *et al.* 2004). *M. africanum* en sık Batı Afrika ülkelerinde bulunan, tüberküloz vakalarının dörtte birini oluşturan bir patojendir. Sadece insanları etkilemekte olup hastalığa açık kişiler arasında hava yolu ile bulaşmaktadır. *M. tuberculosis*'e benzer enfeksiyon ilerleme derecesi vardır fakat bağışıklık sistemi hastalığın ilerlemesinde daha az görev yapmaktadır. Dolayısıyla *M. africanum* endemik bir patojendir ve HIV ile enfekte olmuş kişilerde oluşma durumu daha olasıdır (Skerman *et al.* 1980).

Mycobacterium bovis

M. bovis, M. tuberculosis kompleks üyeleri içinde en geniş konak aralığına sahip olup hayvanları bazen de insanları enfekte etmektedir. Kompleksin diğer üyelerine kıyasla *M. bovis*'in tanımlanması net bir farklılıkla fenotipik ve biyokimyasal özelliklerine dayalı olmuştur (Kubica *et al.* 2006). *M. bovis'in* insanlar için en önemli bulaşma kaynağı kontamine, pastörize edilmemiş süt tüketimi olmakla birlikte enfekte hayvanlar ile direkt temas veya hasta çiftlik hayvanlarının çıkarttığı enfeksiyöz aerosollerin solunmasıdır. İnsandan insana geçiş çok nadir olmakla birlikte, özelikle bağışıklık sistemi baskılanmış kişiler arasında geçiş olduğu doğrulanmıştır. Birçok olguda *M.bovis'in* klinik ve patolojik özellikleri *M. tuberculosis* enfeksiyonundan ayırt edilememektedir. Bu nedenle bu hastalarda *M. bovis'in* insidansı bilinmemekte, koruma ve tedavi stratejileri de şekillenememektedir (Aslan vd. 2009).

Mycobacterium microti

M. microti M. tuberculosis kompleks üyesidir. Bu tür aslında küçük kemirgenler ve kır farelerinde patojen olarak tanımlanmaktadır. Grup içinde kromozomal DNA'sında silinen spesifik bir bölgenin yokluğu ile tanımlanmaktadır (Smith *et al.* 2009). Bu patojene lama, domuz, gelincik gibi bazı memeli hayvanlarda da rastlanmıştır. Son zamanlarda yapılan çalışmalara dayanarak patojene insanlarda da rastlanmıştır. *M. microti* ilk kez 1930'larda tarla farelerinden izole edilmiş ve aşı kökeni olarak da kullanılmıştır (Gutierrez *et al.* 2005).

2.1.2Tanı

Tüberküloz tanısında dünya çapında en yaygın yöntem, balgam örneklerinde bakterinin mikroskop altında incelenmesine dayanan, 100 yıl önce geliştirilmiş olan balgam yayma mikroskopisidir. Son yıllarda tüberküloz tanı teknolojilerindeki gelişmeyle birlikte, hızlı moleküler tüberküloz tanı testleri kullanılmaya başlanmıştır. Gelişmiş laboratuvar kapasitesi olan ülkelerde kültür metotlarıyla da tüberküloz tanısı yapılabilmektedir

(Dünya Sağlık Örgütü, 2017). Tüberküloz hastalığına yakalanan bireylerin kesin tanısı alınan örneklerde tüberküloz basilinin teşhisi ile ortaya konulmaktadır. Bu tanı geçmiş yıllardan beri mikroskopla inceleme ve kültüre dayandırılmıştır. Kültür ile yapılan incelemelerde 2 ile 6 haftada sonuç alınması, mikroskopla yapılan incelemelerin duyarlılığının düşük olması sebebi ile araştırmacılar yıllardır tüberküloz tanısı için hızlı ve daha duyarlı yeni teşhis yöntemleri geliştirmeye çalışmışlardır (Lisby 1999). Tüberkülozun ilk tanısı saflaştırılmış protein türevi kullanılan tüberkülin deri testidir. Test 48-72 saat içinde okunur ve enjeksiyon yerinde 10 mikrometre çapından büyük yuvarlak, sert yumru gelişirse testin pozitif olduğu anlaşılır. Bağışıklık sistemi zayıf olan özellikle AIDS hastalarında ortaya çıkabilir. Pozitif testin ardından daha kesin sonuçlar elde edebilmek için göğüs röntgeni, kültür büyümesi ve serum muayenesi yapılabilmektedir (Frothingham *et al.* 1994). Kültür büyüme kesin bir test olarak kullanılırken serum muayenesi bakteri varlığını her zaman göstermemektedir. Kültür büyüme testindeki en büyük sorun organizmanın yavaş büyümesidir. Tüberküloz tedavisinde sık kullanılan ilaçlar, izoniazid, rifampisin ve streptomisin sayılabilir. Bakterinin giderek ilaca dayanıklı olması sebebi ile birkaç ilaç birlikte kullanılabilir (Engleberg *et al.* 2013).

2.1.3Kontrol

Bilim adamları hastalıkla mücadele için hedefler belirlemiş fakat hastaları tedavi edecek araçlara sahip değillerdi. Enfeksiyonun yayılmasını engellemek için hastalıklı insanları toplumdan izole etmişlerdir. 1940 yılında antibiyotiklerin üretimi hekimler tarafından hastalığın tedavisinde etkin bir şekilde kullanılmıştır. Tüberküloz tüm dünya da hala erişkinlerde önemli bir ölüm nedeni olmaya devam etmektedir ancak gelişmiş ülkelerde bu sorun en aza indirilmiştir (Todar 2008). Yaşam standartları, tıbbi tedbirler ve tanı yöntemlerinin iyileştirilmesi durumunda tüberküloz etkeninin yayılması kontrol edilebilir. Tüberkülozun yayılmasını önlemek için anahtar etken erken tedavidir. Tedavinin ilk aşamalarında yayılmayı önlemek için temas halinden kaçınılması gerekmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde hastalığın kontrol edilmesi daha zordur (Nikiforuk *et al.* 2000). Tüberküloz ve yayılmasını önlemek için uygun eğitimlerin

yapılamaması ve yüksek maliyetli ilaçların alınamaması durumunda hastalığın önüne geçilmesi zordur. Bacille Calmette-Guerin (BCG) aşısı sığır enfekte eden zayıflatılmış bir *M. bovis* aşısıdır. BCG hastalığı mutlak olarak engellemez fakat akciğer hasarlarının şiddetini azaltır. Aşı tüberküloz görülen çoğu ülkede kullanılmasına rağmen Amerika Birleşik Devletleri'nde kullanılmamaktadır. BCG aşısı uygulanan insanlarda bir süre sonra yeniden tüberkülin deri testi uygulanmaktadır (Engleberg *et al.* 2013). Avrupa ülkelerinde 18. ve 19. yüzyıllarda ağır salgınlara ve ölümlere yol açan hastalık 20. Yüzyılın başından bu zamana kadar kemoterapiden bağımsız olarak azalmaya başlamıştır. Az gelişmiş ülkelerde ise bu hastalık 20. yüzyılda yayılmaya başlamış ve salgın tepe noktasına yeni ulaşmıştır. Bu salgınla karşılaşan ülkelerde yoksulluk, tüberküloz kontrol programlarının etkili uygulanamaması ve özellikle Afrika ve Güney Doğu Asya ülkelerindeki HIV/AIDS salgını tüberküloz hastalığının kontrol altına alınmasını zorlaştırmıştır (Rieder 1999).

2.2 *Mycobacterium tuberculosis*

Prokaryot aleminden, Firmicutes bölümünden, Actinobacteria sınıfından, Actinomycetales takımından, *Mycobacteriaceae* ailesinden, *Mycobacterium* cinsinden, *M. tuberculsosis* (Zopf, 1883) türüdür.

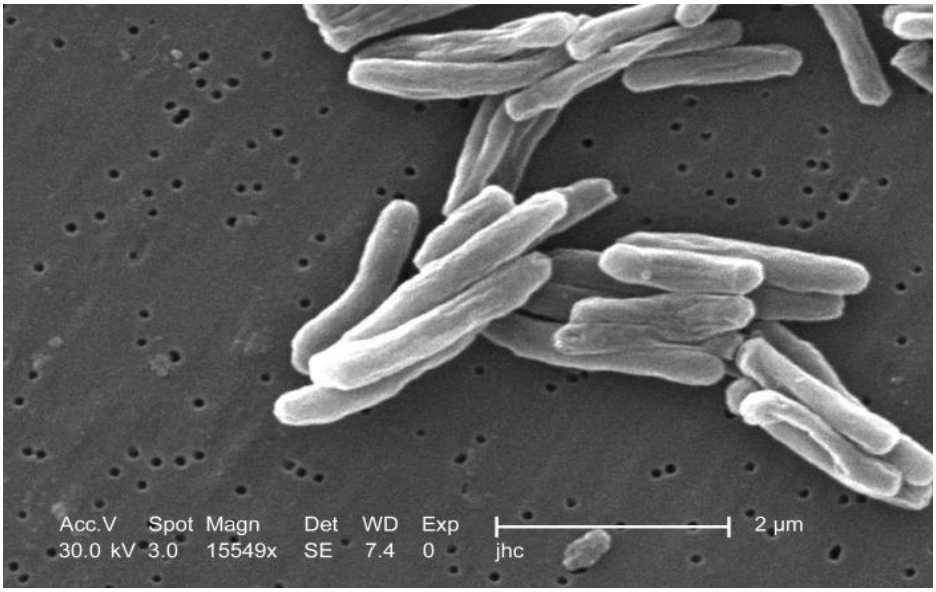
Mycobacterium cinsi, çok eskiden tanımlanan insan ve hayvanları etkileyen patojenlerdir. Mikobakterileri tanımlamak için kullanılan özellikleri, hareketsiz olmaları, hafif kavisli ve çubuk şeklindeki morfolojisi ve aside dirençliliği başta olmak üzere gram pozitif, sporsuz, kapsülsüz mikroorganizmalardır (Rastogi *et al.* 2001). Bilindiği üzere mikroorganizmalarda kapsül bulunmamasına rağmen hücre duvarlarında çok kompleks lipitler bulunmaktadır. Bu madde mikroorganizmayı hem çevresel koşulların etkisinden korur hem de normal boyalarla boyanamama özelliğini de meydana getirir (Griffith 1999). Actinomycetales takımından *Mycobacteriaceae* ailesinde tek cins *Mycobacterium* cinsidir. *M. tuberculosis*, insanlarda etkilidir.

Köpek gibi bazı ev hayvanlarına da insanlardan geçebilen bu etken tüberküloz hastalığına neden olur. *M. bovis* sığırların tüberküloz etkenidir. İnsanlardaki tüberkülozun da ikinci derecede sorumlusudur. *M. avium* kanatlıların tüberküloz etkenidir (Rastogi *et al.* 2001). *M. paratuberculosis* sığırlarda paratüberküloz etkendir. *M. lepra* insanlarda cüzzam hastalığına neden olur. *M. marinum* balıkların tüberküloz etkenidir. İnsanlara bulaşması halinde tüberkülozun deri formuna neden olur. *M. tuberculosis* dışında kalan tüm mikobakterler tüberküloz dışı mikobakterler olarak bilinir (Griffith 1999).

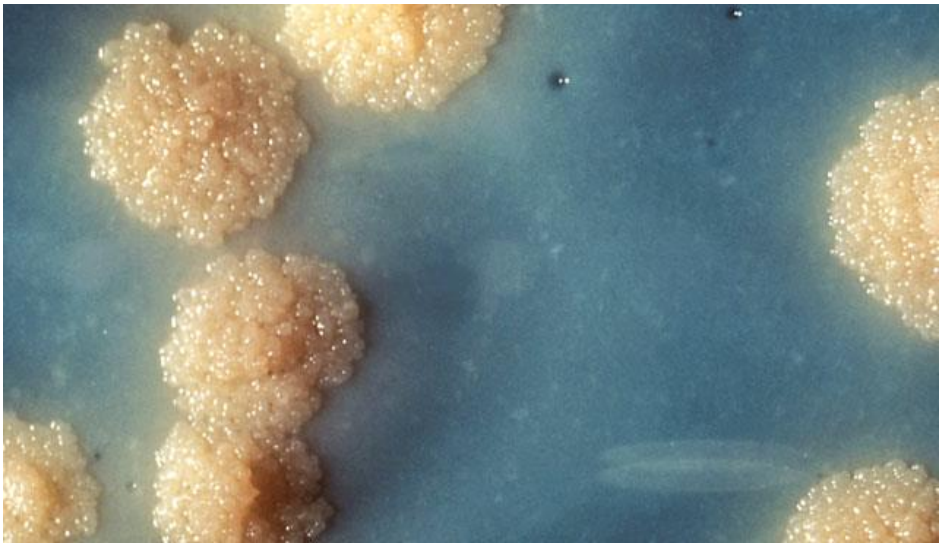
M. tuberculosis, gram pozitif, 1-4 µm uzunluğunda 0.3 – 0.6 µm eninde, ince ve bazen hafifçe kıvrık, hareketsiz, sporsuz, kapsülsüz çomak şeklinde bir bakteridir (Şekil 2.1). Yavaş büyüyen, zorunlu aerob, olumsuz koşullara oldukça dayanıklı ve uzun süre canlılığını koruyabilen bir bakteridir. Asit ve bazlara karşı dirençlidir ve gram boyası ile boyanmazlar. Aynı zamanda dormansi özelliği gösterirler ve hücre içi patojendir. Patojenin ikiye bölünme süresi ortalama 18 saattir. Bu nedenle katı besiyerlerinde kolonileri ancak 2-3 haftada görünür hale gelmektedir. Kolonilerin kenarları düzensiz, yüzeyi pürüzlü ve kurudur (Şekil 2.2) (Cole *et al.* 1998). *M. tuberculosis* uzaktan *Actinomycetes*'lerle ilişkilidir. Birçok patojenik olmayan mikobakteriler insan florasının normal bileşenleridir. *M. tuberculosis* akciğerlerin iyi havalandırılmış üst loblarında bulunur. *M. tuberculosis* büyümesi için, yumurta bazlı agar besiyeri ve Löwenstein-Jensen besiyeri kullanılmaktadır. *M. tuberculosis* her iki ortamda da büyütüldüğünde küçük ve devetüyü renginde koloniler oluşturmaktadır. Koloniler iki ortamda da yaklaşık 4-6 haftada oluşmaktadır (Todar 2008).

Hastalık etkeni *M. tuberculosis*, hücre içinde ve makrofajlar içinde çoğalabilir. Yetersiz sterilizasyon sonucunda lokal doku ve hücre içi ortamını değiştirerek kazeöz nekroz ve granuloma oluşumuna neden olmaktadır. Çeşitli mikobakteri türü enfeksiyonları, makrofajlar içerisinde siklik AMP (cAMP) patlamasına neden olarak hücre içi sinyal iletimini etkiler. Bakteriyel patojenler, konak hücrede çoğalmak için enfeksiyon sırasında son derece spesifik mekanizmalar geliştirmiştir. Genel bir stratejiye göre enfeksiyon etmeninin konak hücreye girmesiyle cAMP gibi modüle enzimlerin sinyal iletimlerini alt üst ettiği söylenmektedir. *M. tuberculosis*, hücre içinde hayatta

kalabilmek için çeşitli mekanizmaları kullanarak konak canlının fagozom oluşumunu engeller (Agarwal *et al.* 2009).



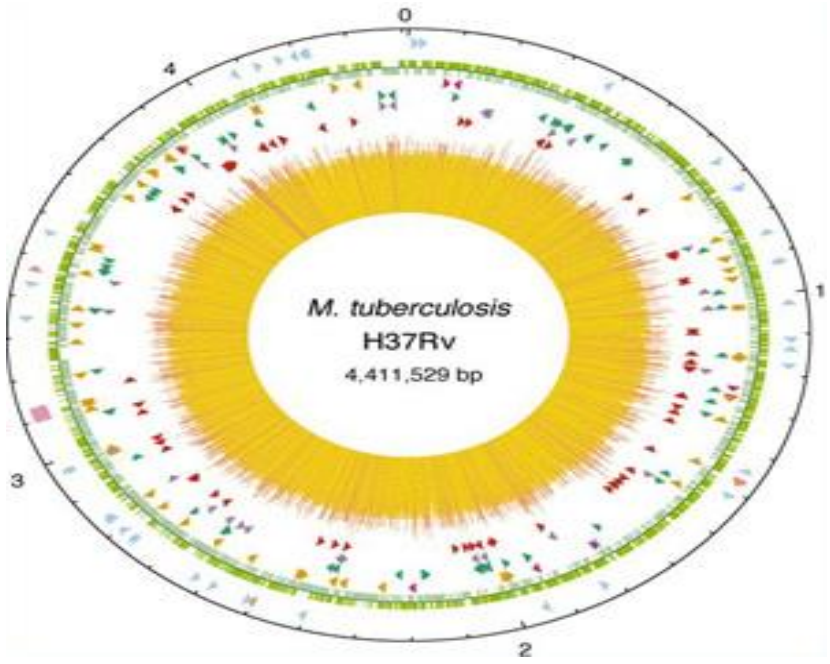
Şekil 2.1 *M. tuberculosis* elektron mikroskop görüntüsü (Todar 2008)



Şekil 2.2 *M. tuberculosis* koloni yapısı (Kubica *et al.* 2006)

Genomik dizi analizi tamamlanan ilk *M. tuberculosis* suşu H37Rv'dir. *M. tuberculosis* H37Rv'nin genomu 4,411,532 baz çiftinden (bp) ve yaklaşık 4000 genden oluşmaktadır (Şekil 2.3).

Kromozom halkasal yapıda ve *Escherichia coli* genomuyla yaklaşık aynı büyüklüktedir. *M. tuberculosis*'in genomu yaklaşık 7 milyon bp'lik kromozomu olan *M. smegmatis* gibi hızlı üreyen çevresel mikobakteri türlerinden daha kısadır. Bu durum hücre içi ortamdaki genetik izolasyona ve hücre içi ortamda gereksiz olan genlerin kaybına bağlanmaktadır (Brosch *et al.* 2000).



Şekil 2.3 *M. tuberculosis* genom yapısı (Cole *et al.* 1998)

M. tuberculosis genomunun ortalama G-C içeriği %65,6'dir. Genomundaki yüksek G-C içeriğini yansıtacak şekilde *M. tuberculosis* Gly, Ala, Pro ve Arg'den zengin proteinler içerirken, A-T'den zengin kodonların kodladığı Lys ve Asn amino asitleri düşük oranlarda bulunmaktadır. Yüksek G-C içeriği bakterinin aerobik yaşam şekliyle ilişkilidir. Buna karşın, *M. tuberculosis* anaerobik ortamlara da uyum sağlayabilecek metabolik potansiyele sahiptir (Brosch *et al.* 2000). *M. tuberculosis* kodlama kapasitesi, çok büyük bir bölümü lipogenez ve lipolizde görev alan enzimlerin üretimi için ayrılmıştır. Glisin açısından zengin proteinler, tekrarlayan yapısı ile antijenik varyasyon kaynağını temsil edebilir.

Genom içinde 3,924 açık okuma çerçeveleri ve kodlama kapasitesi %91 olarak tanımlanmıştır. Genom G-C içeriğince zengin olduğu için başlama kodonu GTG'dir.

Genelde translasyon ATG ile başlarken *M. tuberculosis* (%35), *B. subtilis* (%9) ve *E. coli* (%14) GTG ile başlamaktadır. (Cole *et al.* 1998). *M. tuberculosis* genomunda yaklaşık 4.000 gen mevcuttur. Bu genlerin 525'i hücre duvarı ve hücre süreçlerine katılmaktadır. 188 gen ise düzenleyici proteinleri kodlamaktadır. 91 gen virülans, detoksifikasyon ve adaptasyonda görev almaktadır. 200'den fazla gen yağ asitleri metabolizmasında görevli enzimleri kodlamaktadır. Bu genler doğrudan ya da dolaylı olarak virülansta görev alabilir (Todar 2008).

M. tuberculosis bilindiği kadarıyla diğer bakterilerden daha geniş bir protein ailesine sahiptir. Bu protein ailelerinin en göze çarpan biyolojik etkileri arasında lipit metabolizması, transport ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi sayılabilir (Çizelge 2.2). Günümüzde *M. tuberculosis* açık okuma çerçevelerinin (orf) ancak yarısının işlevleri tam olarak belirlenebilmiştir. PE ve PPE proteinleri başta olmak üzere bazı protein ailelerinin görevleri henüz tam olarak bilinmemektedir. *M. tuberculosis* genomunun 1/3'ünden fazlası eriyik madde ve transport sistemlerinin de içinde bulunduğu hücre duvarı komponentlerinin sentezine, ara metabolizmaya ve solunuma ayrılmıştır.

Çizelge 2.2 *M. tuberculosis* genlerinin işlevlerine göre dağılımı (Brosch *et al.* 2000)

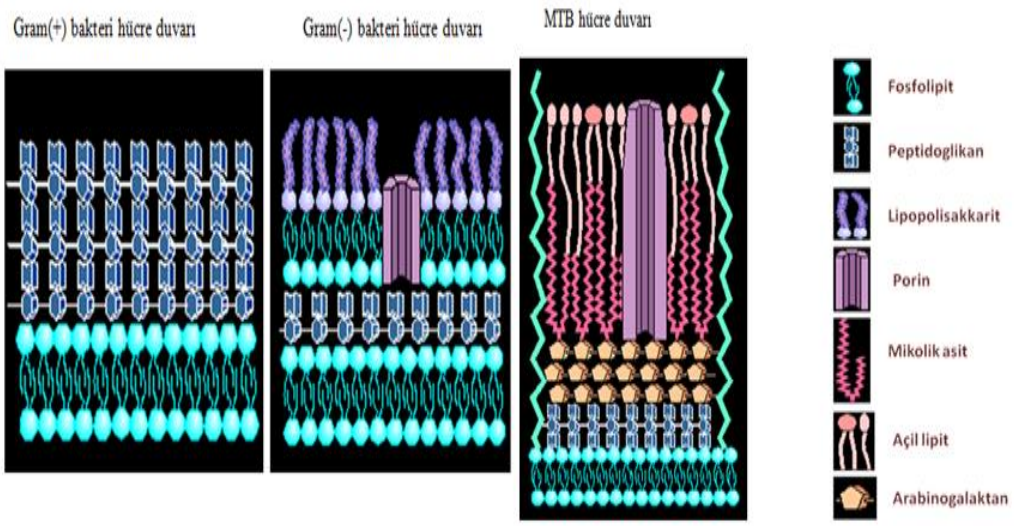
İşlev	**%**
Ara metabolizma ve solunum	22
Hücre duvarı, hücre işlemleri	17
Lipit metabolizması	6
Düzenleyici proteinler	5
Virülans ve adaptasyon	2

Genom dizisi yönünden bakıldığında, tüberküloz basili ihtiyaç duyduğu esansiyel amino asitleri, vitaminleri ve enzim kofaktörlerini sentezleme potansiyeline sahiptir (Brosch *et al.* 2000). *M. tuberculosis*'in hücre duvarında bol miktarda lipit bulunur. Çok az sayıda mikroorganizma *M. tuberculosis*'te ki gibi farklı lipofilik molekülleri üretebilecek lipit metabolizmasına sahiptir. Tüberküloz basillerinde bilinen ürünlerden daha fazla sayıda potansiyel lipit biyosentezi aktivitesini kodlayan gen bulunmaktadır (Pym and Small

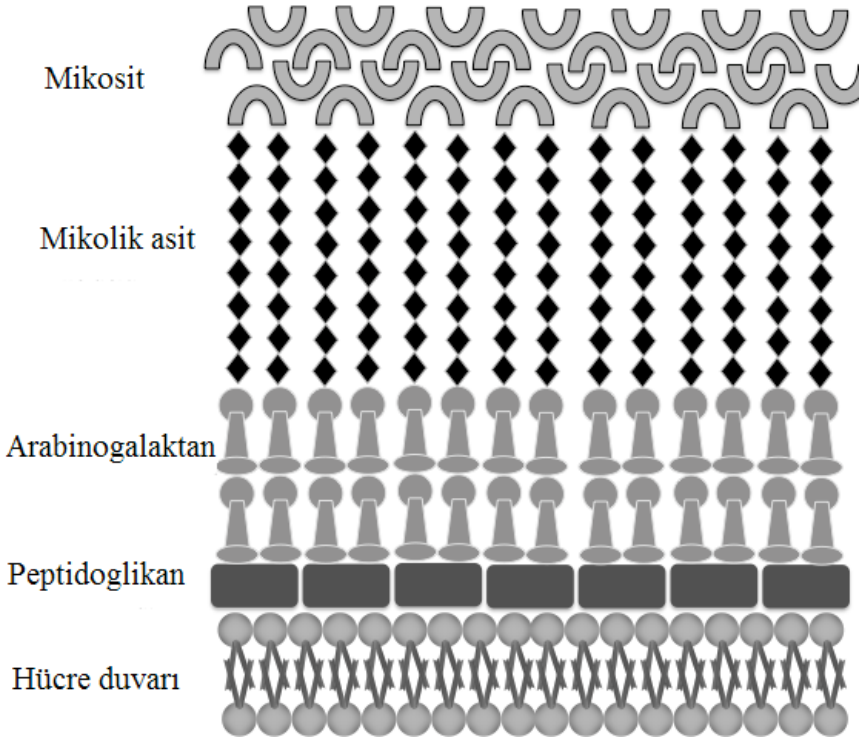
2006). *M. tuberculosis* birçok antibiyotiğe doğal olarak dirençlidir ve buda tedaviyi zor hale getirmektedir. Bu direnç, esas olarak geçirgenlik bariyeri görevi olan son derece hidrofobik hücre zarından kaynaklanmaktadır. Ancak birçok potansiyel direnç belirleyiciler genomda kodlanmıştır. Bu direnç mekanizmaları hakkında mevcut olan bilgiler sayesinde ilaçların daha iyi kullanımı ve yeni tedavilerin geliştirilmesi sağlanmaktadır (Cole *et al.* 1998).

M. tuberculosis hücre duvarı prokaryotlar arasında benzersiz bir yapıya sahiptir ve virülans özelliğinde büyük rol oynamaktadır (Todar 2008). Tüberküloz basilinin hücre duvarı diğer bakterilere göre çok daha kalındır ve yüksek oranda lipit içerir. Hücre duvarının dış kısmı mikolik asit denen, 60- 90 karbonlu, uzun ve dallı yağ asitlerinden oluşur (Brennan 2003). Hücre duvarının %50'sini oluştururlar. Mikolik asit hücre yüzeyindeki geçirgenliği kontrol eden ve organizma etrafında lipit kabuk oluşturan hidrofobik moleküllerdir. Muhtemelen organizmayı fagositik, lizozim ve oksijen radikalleri gibi saldırılardan korumaktadır (Todar 2008). Mikobakterilerin hücre duvar yapısı gram (+) ve gram (-) bakteri türlerinin hücre duvarı yapısından oldukça farklı kompleks bir yapıdadır (Şekil 2.4). Bu komplekste en iç tabaka diğer bakterilerde de görülen plazma membranıdır. Orta tabaka, peptidoglikan, arabinogalaktan ve mikolik asit esterlerinden oluşmaktadır. Dış tabaka ise hücre duvar yapısının %60'ını oluşturan ve lipitleri içeren mikozid tabakadır (Bhamidi 2009)

Mikolik asitler arabinogalaktan molekülleri aracılığıyla daha iç kısımdaki peptidoglikan tabakasına bağlanırlar. Hücre duvarının iç kısmını oluşturan peptidoglikan tabakası, tüberküloz basilinin şeklini veren ana yapı olmanın yanı sıra, yapısal bütünlüğün korunmasında da önemlidir. Dıştan içe doğru mikolik asit, arabinogalaktan ve peptidoglikandan oluşan bu sağlam yapı, bir zırh gibi mikobakteri hücresini çevreler. Bu yapının sağlamlığı, lipoarabinomannan, mannofosfoinositid, serbest lipit ve polipeptidlerin de katılımıyla, daha da artar. Arabinogalaktan tabakası, mikolik asitlerle peptidoglikan arasında köprü görevi gören dallanmış bir polisakkarittir (Şekil 2.5) (Brennan *et al.* 2003).



Şekil 2.4 Gram (+), gram (-) ve mikobakteri hücre duvar yapıları şematik gösterimi (Matee 2011)



Şekil 2.5 *M. tuberculosis* hücre duvarı yapısı (Brennan *et al.* 2003)

Mum kıvamındaki bu kalın hücre duvarı birçok ilaç molekülünün hücre içine girişini engelleyerek doğal bir direnç oluşturur. *M. tuberculosis*'e etkili olacak ilaçlar öncelikle bu tabakadan kolayca geçebiliyor olmalıdır (Ryll *et al.* 2001). Bunun yanı sıra lipitçe

zengin bu kalın hücre duvarı, mikroskobik inceleme amacıyla uygulanan birçok boyanın hücre içine geçişine de engel olur. Bu nedenle mikobakterilerin boyanabilmesi amacıyla diğer bakteriler için kullanılan boyama yöntemlerinden daha farklı boyama yöntemleri kullanılır (Van-Deun *et al.* 2008).

M. tuberculosis hücre duvarındaki yüksek lipit konsantrasyonu bakteriye, boyalara karşı geçirgenlik, antibiyotiklere, öldürücü asit ve bazlara ve ozmotik lizise karşı direnç kazandırmaktadır (Todar 2008). Zengin lipit içerikli hücre duvarı, tüberküloz basilini diğer bakterilerden farklı kılan ve kendine has bir bakteri türü olmasına katkıda bulunan bir özelliktir. Hücre duvarındaki lipit oranının yüksek olması tüberküloz basilini yapısal olarak farklı kılmasının yanı sıra, üreme ve hastalık oluşturma mekanizmalarını da etkilemektedir (Gao *et. al* 2004). Tüberküloz basilinin kendine has özellikleri olan yavaş üreme hızı ve bilinen birçok ilaca dirençli olmasının temelinde, hücre duvarı geçirgenliğinin az olması yatmaktadır. Geçirgenliğin az olmasında zengin lipit içeriğinin yanı sıra, hücre duvarında bulunan geçiş kanallarının diğer bakterilere göre daha az olması da rol oynamaktadır (Niederweis 2003).

2.3 Virülans Faktörleri

Bilinen en önemli insan patojenlerinden biri olmasına karşın *M. tuberculosis*'in patojenitesi hakkında çok az şey bilinmektedir. 1890'larda Robert Koch tüberküloz basilinin toksin üretmediğini göstermiştir. Bugün artık hastalığın patolojisinin tümüyle olmasa bile daha çok konağın bakteriyel antijenlere karşı oluşturduğu abartılı hücre aracılı immün ve inflamatuar yanıt sonucunda oluştuğu bilinmektedir (Pym ve Small 2006).

M. tuberculosis virülansı olağanüstü karışık ve çok yönlüdür. Organizma doğal olarak toksin üretmemesine rağmen yapısal olarak büyük virülans repertuarına sahiptir. *M. tuberculosis* virülansına katkıda bulunan genel özellikleri;
Hücre girişi için özel mekanizmalar; hücre duvarında makrofajlar üzerindeki reseptörlere doğrudan ya da dolaylı bağlanabilen glikolipitlerdir. Hücre içi büyüme; *M. tuberculosis* hücre içi büyür. Bu bağışıklık sisteminden kaçmada etkili bir araçtır. Özel

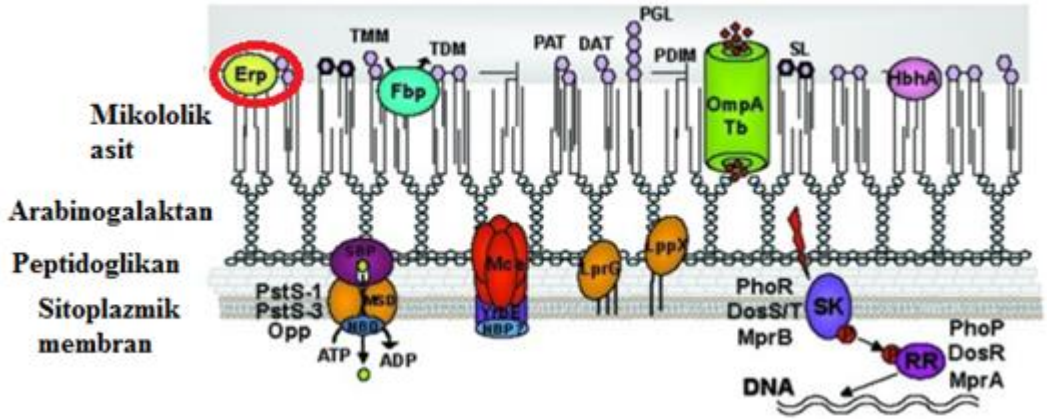
olarak antikorlar ve komplementler etkisizdir. *M. tuberculosis* fagozom membranını değiştirebilen bir protein salgılayarak fagozom-lizozom füzyonunu inhibe edebilir (Todar 2008). Oksijen radikallerinin detoksifikasyonu; *M. tuberculosis* gerçekleştirdiği üç mekanizma ile fagositoz süresince üretilen oksijen radikallerinin toksik etkilerine karşı mücadele edebilir; glikolipit içeren bileşikler oksidatif sitotoksik mekanizmayı düzenler. Kompleman reseptörleri üzerinden makrofaj alımını atlayabilir. Oksidatif patlama katalaz üretimi ve süperoksit dismutaz enzimi tarafından etkisiz hale getirilebilir. Antijen kompleksi; bu kompleks *M. tuberculosis* tarafından salgılanan bir protein grubudur. Bu proteinler bakterinin hastalık oluşturma mekanizmasına katkıda bulunur (Cole *et al.* 1998).

Kültür filtre proteinleri; *M. tuberculosis* kültür filtre proteinleri, bakterinin büyütüldüğü kültür ortamına bıraktığı bileşiklerdir. Yaklaşık 200 tane olan bu proteinlerin salgılanma mekanizması bilinmemektedir. Birçok tüberküloz hastasının serumunda bu proteinlerden bazıları tanımlanmıştır. Kültür filtre proteinleri konak canlının bağışıklık mekanizmasını teşvik etmektedir. Enfeksiyon sırasında bakterinin yaşamı için önemli enzimler kültür filtre proteinleri arasında bulunurlar (Smith 2003).

Yavaş büyüme; *M. tuberculosis* yavaş büyümesinden dolayı bağışıklık sistemi bakteriyi kolayca tanımayabilir ve ortadan kaldırmak için yeterince tepki göstermeyebilir. Hücre duvarının yüksek lipit konsantrasyonu; antimikrobiyal ajanlara karşı dayanıklılık, geçirgenlik, hücre içi ve hücre dışı ortamda asidik ve alkali bileşiklerin öldürücü etkisine karşı dirençlilik ve lizozomların osmotik lizisine karşı dirençlilik sağlamaktadır (Niederweis 2003). Kord faktörü (trehaloz 6, 6' dimikolat), *M. tuberculosis* virulansı ile ilişkili, memeli hücrelerde toksik ve inhibitör olarak görev yapan glikolipitdir (Todar 2008). Son yıllarda *M. tuberculosis*'in virülansı ve patojenitesiyle ilişkili çok sayıda gen bildirilmiştir (Çizelge 2.3). *M. tuberculosis*'te virülansla ilişkili genler hayvan modellerinde genin inaktivasyonunun virülans kaybına, genin tamamlanmasının ise vahşi virülan fenotipin oluşmasına yol açtığı gösterilmektedir (Pym ve Small 2006).
Hücre yüzey bileşenleri; mikobakteriyel hücre duvarı ve hücre zarı birçok protein, lipit ve karbonhidrat içeren karmaşık bir yapıdır. Bu alt bileşenler mikobakteriye özgünlük ve virülans özelliği kazandırmaktadır (Şekil 2.6) (Smith 2003)

Çizelge 2.3 *M. tuberculosis*'te deneysel olarak tanımlanmış bazı virülans faktörleri (Pym and Small 2006)

Kategori	**Gen adı**	**Protein fonksiyonu**
Protein	*erp*	Dışarıya salgılanan tekrar proteini
Lipit sentezi	*pks12*	Poliketit sentaz
Hücre-hücre etkileşimi	*pknG*	Protein kinaz
Metabolizma	*glnAl*	Glutamin sentezi
Protein sekresyonu	*esat6*	Erken salgılanan antijen
Gen regülasyonu	*furA*	Transkripsiyonel regülatör



Şekil 2.6 *M. tuberculosis* hücre duvarı yapısında bulunan hücre yüzey proteinlerinin şematik gösterimi (Forrellad *et al.* 2012)

Virülans ile ilişkili olarak ilk enfeksiyondan sonra konak canlı içinde bulunan bakteri sayısıda önemli olmaktadır. *M. tuberculosis* bir hücre içi patojeni olduğundan ve genelde makrofaj hücrelerini enfekte ettiğinden dolayı fagositik hücreler *M. tuberculosis* patojenitesini analiz etmek için kullanılabilir. İnsan makrofajlarını elde etmek zor olduğundan bu tür çalışmalarda model organizmaların makrofajları kullanılmaktadır. *M. tuberculosis* virülans faktörleri, proteinlerin bilinen veya tahmin edilen işlevlerine göre gruplandırılmıştır (Çizelge 2.4) (Smith 2003).

Çizelge 2.4 *M. tuberculosis* virülans faktörleri (Smith 2003)

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

2.4 Erp (Exported repetitive protein)

Erp, mikobakteri türlerinin hücre dışı protein ailesinin özel bir üyesidir (Kocincova *et al.* 2004). *erp, Mycobacterium leprae*'de bulunan 28 kDa'lık antijen kodlayan *irg* (iron regulatory gene) ile benzer bir sekansa sahiptir (Berthert *et al.* 1995). Erp, *M. tuberculosis*'in in-vivo olarak yaşayabilmesi ve çoğalmasındaki rolüyle bilindiği üzere, virülans ile ilişkili önemli bir faktördür (Ganaie *et al.* 2016). 855 bç'lik *erp* geni 284 aminoasit uzunluğunda ve 28 kDa moleküler ağırlığında bir protein kodlamaktadır. Erp hücre duvarında, hücre büyümesi ve çoğalmasında fonksiyon gösteren bir yüzey proteinidir. Bunlara ek olarak hastalık oluşturma mekanizmasında da rol oynamaktadır (Çizelge 2.5) (de Mendonça-Lima *et al.* 2001).

Erp ayrıca P36, PirG ve Rv3810 olarak da bilinen, bir *Mycobacterium* hücre dışı protein ailesinin spesifik bir üyesidir. Mikobakterilerde çoğu virülans genleri hücre duvarı yapısı ve fonksiyonuna katılan proteinleri kodlamaktadır. Bu proteinlerden biri olan Erp'nin bağışıklık baskılayıcı bir antijen olduğu ve birçok hastalık oluşturma mekanizmasında rol aldığı belirlenmiştir (Berthet *et al.* 1998). Erp'nin üç alandan oluşan kompozit bir yapısı vardır. Amino (-N) ve karboksi (-C) terminal alanlar korunurken merkezi alan yüksek düzeyde değişkendir. Merkezi bölgeler, tüberküloz

kompleks üyeleri arasında aynı olurken diğer iki alan (amino ve karboksi terminali) türler arasında oldukça korunmuştur. Amino terminal bölgesi kanonik (doğrulanmış) bir sinyal sekansı içerir. Karboksi terminalinde ise prolin ve alanin bakımından zengin hidrofobik bölge bulunur (Kocincova *et al.* 2004).

Bu tür yapısal özellikler, gram pozitif bakterilerin hücre duvarı ile ilişkili olan yüzey proteinlerini anımsatmaktadır (Berthert *et al.* 1995). Hidrofobik bölgenin Erp proteinini basil yüzeyinde sabitleyebileceği ve dolayısıyla proteinin işlevinde rol oynayabileceği hipotezi ileri sürülmüştür (Kocincova *et al.* 2004). Erp'nin mikobakterilerdeki hastalık oluşturma rolünü daha iyi açıklayabilmek için *M. tuberculosis*'e genetik olarak en yakın olan *M. marinum erp* homoloğunda bir mutasyon çalışması yapılmıştır. *erp* geninin mutasyona uğraması sonucunda bakterinin patojenitesin de bir azalma olduğu görülmüştür (Cosma *et al.* 2006).

Çizelge 2.5 Erp'nin özellikleri (de Mendonça-Lima *et al.* 2001)

Gen adı	*erp*
Rv numarası	Rv3810
Benzeri	*pirG, P36*
Tip	CDS (coding DNA sequence)
Fonksiyon	Yüzey proteini, hücre büyümesi, virülans
Moleküler kütlesi	28.4 kDa
İzoelektrik noktası	4.10
Gen uzunluğu	855 bp
Polipeptid uzunluğu	284
Fonksiyonel kategori	Hücre duvarı işlemleri

2.5 Aşı Geliştirme ve Aşı Tipleri

İnsan ve hayvanlarda hümoral ve hücresel yoldan aktif bağışıklığı uyararak infeksiyonlara karşı koruma sağlayan biyolojik maddelere aşı denir (Kocagöz 2014).

Aşılama, enfeksiyon hastalıklarının önlenmesi ve bu hastalıklardan kaynaklanan kalıcı hasar veya ölümlerin azaltılmasında en etkili, en başarılı ve en güvenilir yoldur. Aşıların bağışıklamada kullanılmasıyla her yıl milyonlarca yaşam kurtarılmaktadır (Matthias *et al.* 2007). Vücudun bağışıklık tepkisinin uyarılması aşılamanın temelidir. Aşılar, doğuştan gelen bağışıklık tepkisini uyararak ve antijen hücrelerini aktive ederek patojene karşı koruyucu bir bağışıklık oluşturur (Di Pasquale 2015). Aşılar bulaşıcı hastalıklar buna bağlı sakatlık ve ölümlerin azaltılması ve en önemlisi uzun vadede hastalık etmeninin eradikasyonu açısından insan ve toplum sağlığını korumada vazgeçilmez bir öneme sahiptir (Kocagöz 2014).

Aşılamanın amaçları; aşılanan kişiyi korumak, insandan insana bulaşan hastalıklarda hastalığın toplumda kontrol altına alınmasını sağlamak ve poliomyelit ve çiçek gibi bazı hastalıklarda eradikasyonu sağlamaktır. Aşılar etkili olmalı, uzun süre bağışıklık vermeli, uzun süre dayanmalı, muhafaza edilebilmeli, tek bir dozun oluşturduğu bağışıklık yeterli olmalı, yan ve toksik etkileri olmamalı, ucuz olmalı, kolay bulunmalı, güvenilir olmalı, infeksiyon oluşturmamalı (Klegerman 1992).

Adjuvanlar, yetersiz bağışıklık tepkisi uyaran insan aşılarında doksan yıldan fazla bir sürede kullanılan yüksek oranda saflaştırılmış antijenlerin immünojenisitesini arttırmak için aşılara eklenen maddelerdir. Adjuvanlar, antijenler tarafından indüklenen doğal bağışıklık yanıtının başlamasına katkıda bulunur. Doğru antijen ve adjuvan eşleşmesi, uyarılan bağışıklık tepkilerini belirli bir yönde güçlendirebilir ve yeni etkili aşıların geliştirilmesini sağlar (Di Pasquale 2015). Saf, tanımlanmış proteinler ile birlikte kullanıldığında hümoral ve hücresel bağışıklık yanıtlarını indüklemede etkilidirler (Baldwin *et al.* 2012). Tüberküloza karşı dirençte Th1 tipi hücresel bağışıklık, özellikle de interferon gamma (IFN-γ) ve interlökin 12 (IL-12) sitokinleri önemli rol oynamaktadır (Junqueira-Kipnis *et al.* 2014). Adjuvanlar, zorlu patojenlere karşı yeni aşılar aramada ve geleneksel aşılara kötü cevap veren savunmasız popülasyonlara yönelik en ileri teknolojidir (Di Pasquale 2015). Adjuvanlar iki sınıfa ayrılabilir, aşının bağışıklık etkinliğini artırmak için uzun bir süre antijenleri depo ederek bağışıklık sistemini etkiler ve antijenlere karşı bağışıklık tepkisini artırır. Bir adjuvan, ektin bir aşıda kullanıldığı zaman sağlam ve kalıcı bir immün yanıt üretilmesini destekleyici

kapasiteye sahip olmalıdır. Birkaç adjuvan insan aşılarında kullanılmak üzere lisans almıştır ve bunların çoğu hücresel bağışıklık yanıtı için zayıf kalmaktadır. Son yıllarda yeni adjuvan geliştirmek için çalışmalar başlatılmıştır (Junqueira-Kipnis *et al*. 2014).

Canlı aşılar

Canlı (atenüe) aşılar, bir virüs ya da bakterinin hastalık yapma özelliğinin ortadan kaldırılması ancak vücutta çoğalma ve bağışıklık oluşturma yeteneğinin korunmasına dayanır (kızamık, kızamıkçık, kabakulak, suçiçeği, BCG aşıları gibi). Bu aşılar vücuda verildiklerinde, ürer, yayılır ve immun sistemi (lenfoid ve miyeloid hücreleri) uyarırlar. Bu uyarımın, derecesi, vücuda giren patojenin antijenik yapısına, virülansına, miktarına, giriş yoluna ve konakçının bağışıklık durumuna, yaşına, cinsine ve duyarlılığına göre değişebilir (Akşit 2012). Canlı zayıflatılmış aşılar en geniş ve farklı bağışıklık cevaplarını tetikleme potansiyeline sahiptir. Bu bağışıklık yanıtla bir sonraki enfeksiyona karşı korumada bunu kontrol etmekte ve temizlemede etkin olabilir. Bulaşıcı hastalıkları kontrol etmek amacıyla geliştirilen lisanslı veteriner aşıların çoğu Edvard Jenner tarafından deneysel olarak tanıtılmış ve canlı mikroorganizmalar aşı olarak 1796'da kullanılmaya başlanmıştır. (Ada 2003). Çok küçük bir olasılık da olsa, aşı içindeki canlı organizmanın hastalığa neden olan virülan bir forma dönme olasılığı vardır. Bağışıklık sistemi zayıf olan kişilere canlı aşı uygulanmamalıdır (Abbas and Litchman 2003).

İnaktif aşılar

İnaktif aşılar, virüs ya da bakterinin tamamı veya bir kısmı kullanılarak hazırlanırlar. Virülansı yüksek suşların çeşitli yöntemlerle (fiziksel ve kimyasal) inaktive edilmesi sonucu hazırlanırlar. İnaktivasyonda kullanılan inaktivanlar patojenlerin antijenik yapılarına zarar vererek veya değiştirerek, vücutta oluşturduğu yanıtta farklılık meydana getirebilir ve virulant suşlara karşı koruma gücünde azalma yaratabilir. Etkili olabilmeleri için birden fazla dozda uygulanmaları gerekir. İlk doz genellikle koruyucu bağışıklık sağlamaz, bağışıklık sistemini hazırlar (Topal 2013). Luis Pasteur inaktive

edilmiş (öldürülmüş) mikroorganizmaların aşı olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Adams *et al.* 2011). Zayıflatılmış aşılara göre bu aşılar önemli ölçüde yüksek dozlar halinde ve daha sık uygulama gerektirmektedir (Ada 2003).

Alt ünite aşılar

Yeni nesil aşıların temel hedefi, hastalık etkenlerine karşı hücre içi ve hücre dışı enfeksiyonları engelleyecek şekilde antikor oluşturabilmektir. Bu antikorları tanıyabilen bir birkaç bileşen mikroorganizmada protein ya da karbonhidrat benzeri yapılarda bulunmaktadır. (Ada 2003). Alt ünite aşılar, ya protein ya da polisakkarit temele dayanırlar. Patojenin antijenik alt birimleri (protein, pilus, toksin vb) aşı olarak kullanılır (Akşit 2012). Bu tür bileşenlerin mikroorganizmalardan özel laboratuar koşullarında izole edilmesi alt ünite aşıların oluşturulmasına zemin hazırlamıştır (Arnon 2011). Alt ünite aşı, patojenin genomunun veya proteomunun, vücudun patojene bağışıklık geliştirmesini sağlayacak parçalarının aşı olarak kullanılmasıdır. Bu sayede üretilen aşı geleneksel aşı tiplerinin yan etkilerini ve risklerini taşımamaktadır (Akşit 2012).

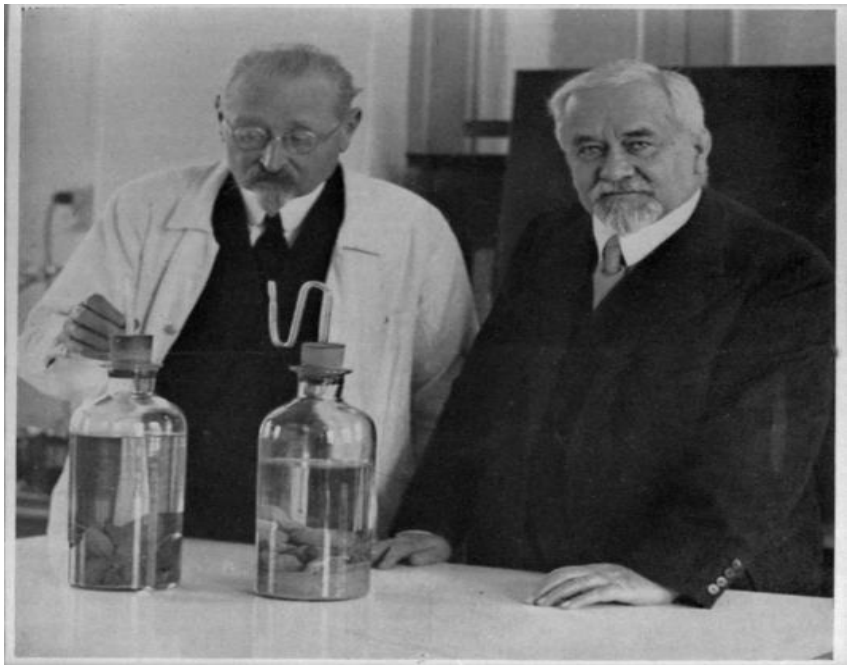
Alt ünite aşılarda bağışıklık büyük ölçüde arttırılmıştır. Genetik mühendisliği ile yapılan aşı döneminde antijen kodlayan genlerin (DNA) maya hücrelerine transferi ile önemli bir ilerleme meydana gelmiştir. Alt ünite aşılar yetişkinlerde bağışıklık yanıtını %17 kadar artırmıştır (Ada 2003). Alt ünite aşılar üç grup altında incelenmektedir; alt ünite protein aşıları, toksoid aşılar ve rekombinant aşılar (Akşit 2012).

Genel olarak aşı maddesinde bulunan bağışıklık kazandırıcı patojen bileşeni hastalık oluşturmaz ve patojenin kendisi olmadığı için diğer aşılara oranla daha güvenlidir ve yan etkisi yoktur. Alt birim aşılar genelde patojenin bağışıklık kazandıran proteinlerinden hazırlanmaktadır (Arnon 2011). Alt birim aşılar genel olarak düşük immünojenik yanıt oluşturdukları için adjuvana gereksinim duyulmaktadır (Abbas and Litchman 2003).

Alt ünite rekombinant aşılar, mikroorganizmaların antijenik komponentleri çıkarıldıktan sonra alıcı bir hücreye transferi (bakteri, maya), burada gen ürünü antijenik proteinin ekspresyonunun sağlanması, hücrelerde biriken proteinlerin elde edilmesi ve bunların deneme hayvanlarına verilerek bağışıklık kazandırılması amaçlanır. Bu teknikle bazı bakteri, virüs ve parazitlere karşı aşılar hazırlanmıştır (Öner ve Eratalay 2001). Rekombinant aşılar iki gruba ayrılmaktadır. Bunlar, protein aşıları ve DNA aşılarıdır. Bir patojene ait çok sayıda antijen bulunmasına karşın ancak bunların bir kısmı koruyucu immün yanıt oluşturma özelliğine sahiptir. İmmünolojik tekniklerle belirlenen potansiyel aşı antijenlerinin mümkün olan en yüksek saflıkta elde edilmeleri kritik bir basamağı oluşturur (Akşit 2012).

BCG aşısı

1908 yılında Camille Guerin ve Albert Calmette, virülan sığır suşundan anti-tüberküloz aşısı üretme girişimlerini başlatmıştır. Yaklaşık 230 alt kültür yaparak on üç yıl süre sonrasında çeşitli hayvan modellerinde aşamalı olarak deneyerek tüberküloz oluşturmayan zayıflatılmış bir basil geliştirmişlerdir. Çalışmalar sonucunda 1921'de ilk başarılı insan BCG aşısını bulmuşlardır (Sakula 1983). BCG (Bacille Calmette-Guérin) aşısı, tüberküloz basilinin yapısal özelliklerini taşıyan ancak hastalık oluşturma yeteneği yok edilmiş bir *M. bovis* suşudur. Bovis tipi basilin besiyerinde üretilmesi, ilk kez 1908 yılında Fransa'nın Lille şehrindeki Pasteur Enstitüsü'nde çalışan Albert Calmette adlı bir bakterioloji uzmanı ile asistanı Camille Guérin tarafından gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.7). BCG aşısı, bugüne kadar yaklaşık üç milyardan fazla insanda güvenle kullanılan ucuz bir aşı olmuştur. *M. bovis*'den türetilen ilk Pasteur suşu halen uluslararası referans suş kabul edilmektedir. Ancak zamanla, farklı coğrafya ve toplumlarda ve değişik kültür ortamlarında birçok farklı teknikler ile üretildiği için BCG aşı suşlarının orijinal genetik yapıları değişmiştir (Grange *et al.* 1983).



Şekil 2.7 BCG aşısını keşfeden bilim adamları (https://ucsopblog.com)

BCG aşısı, tüberküloz basilinin yaptığı gibi T lenfositleri ve buna bağlı olarak makrofajları aktive ederek tüberküloza karşı bir immün yanıt geliştirirler. BCG aşısı olan şahıslarda yine de reenfeksiyon olabilmektedir. Ancak daha önce aşının oluşturduğu immün yanıt nedeniyle bu basiller akciğerlerde sınırlanmaktadır. BCG aşısı, bebekleri %80-90 oranında korurken erişkinlerde bu oran %50'dir. Aşının erişkinlerde tam koruması yoktur fakat hastalığın vücuda yayılmasını engellemektedir (Gökçay vd. 2000). İlk kullanımından beri BCG aşısının etkinliği sorgulanmış ve aşı performansını analiz etmek için çok sayıda çalışma yapılmıştır (Çizelge 2.6)

Aşı etkinliğinde büyük farklılıklar bulunmasına rağmen, bu araştırmalardan elde edilen en önemli sonuç, BCG'nin pulmoner tüberkülozun önlenmesindeki etkinliğinin sınırlı olmasıdır. Bu nedenle, BCG aşılamasının 15 yıllık takip denemesi sonucunda BCG'nin yetişkinlerde pulmoner tüberküloza karşı koruma sağlayamadığı ortaya konulmuştur (Agger and Andersen 2001). BCG aşısı ısı ve ışığa çok dayanıksızdır. Deri içine uygulanır. Aşı, kanla ve lenfatik sitemle patojen basilin yayılmasını engeller. Bu sayede hayatı tehdit eden miliyer tüberküloz, tüberküloz menenjit gibi durumların ortaya çıkışını azaltır. Akciğer tüberkülozunu önlemede meta analizlerde %50 etkili

bulunmuştur (Kıter ve Uçan 2001). BCG aşısının sağlamış olduğu bağışıklık süresi belli değildir. İlerleyen yaşlarda korumanın azaldığı, aşılamanın ardından bağışıklığın 20 yıl gibi bir zaman zarfında kaybolduğu tespit edilmiştir. Diğer bir çalışmada ise BCG aşısının tek doz olarak alınımı sonrası koruyuculuk etkisinin %52 olduğu tespit edilmiştir (Aronson *et al.* 2004).

Çizelge 2.6 BCG'nin eksikliklerine önerilen çözümler (Agger and Andersen 2001)

Eksiklikler	**Çözümler**
BCG'nin önemli antijenlere sahip olmaması	Koruyucu antijenleri ifade eden rekombinant BCG'nin oluşturulması (*M. tuberculosis* inaktif aşıları, *M. tuberculosis*'e özgü antijenlere dayanan aşılar)
BCG'nin önemli T hücre alt gruplarını indükleyememesi	DNA ve viral vektörler gibi yeni aşı teknolojileri (Listerolizini ifade eden rekombinant BCG)
Çevresel mikobakterilerin BCG ile etkileşimi	Alt birim veya DNA / viral vektör aşıları
BCG'nin etkinliğinin zamanla azalması	Alt birim veya DNA / viral vektör aşı ile yardımcı aşılama

BCG aşısı, virülan basilin oluşturduğu infeksiyondaki gibi T lenfositleri ve makrofajları aktive ederek tüberküloza karşı savunmada immün yanıt mekanizmasını geliştirir. Aşıdan sonra görülen komplikasyonlar, aşının dozuna, aşılama yeri ve derinliğine, aşılanan kişinin yaşına, bağışıklık sistemini özelliğine bağlı olarak gelişmektedir (Kıter ve Uçan 2001). Yapılan yeni aşı çalışmalarındaki hedefler belirli başlıklar altında toplanmıştır. Bunların başında BCG'den daha etkili ve uzun süreli bağışıklık sağlanması, adölesan ve erişkinlerde akciğer tüberküloz gelişimini engellemesi, enfekte olmuş kişilerde de hastalık gelişimini engellemesi, etkili bir immünoterapotik aşı geliştirerek tedavi uygulamalarında azalma sağlanması, BCG ile aşılı kişilerin de yeni

aşı ile korunabilmesi, HIV'le enfekte kişilerde de emniyetle kullanılması gelmektedir (Martin 2005).

Hala BCG'nin yerini alabilecek veya BCG ile birlikte kullanılabilecek aşı çalışmaları devam etmektedir. Bunlar, canlı olmayan ve canlı aşılardır. Canlı olmayan aşılar, altbirim aşıları, DNA aşıları iken canlı aşılar, attenue *M. tuberculosis,* rekombinant BCG'dir (Lin and Ottenhoff 2008). Bulaşıcı hastalıkların kontrol edilmesinde en iyi stratejinin alt birim aşılar olduğu bilinmektedir. Tüberküloz için BCG aşısı, hastalığı ortadan kaldırmak için yeterli değildir. Tüberküloz hala AIDS'den sonra gelen ölümcül bir hastalık olmaya devam etmektedir. Bu nedenle, enfeksiyon kapasitesini engellemek, hastalık formlarından birisini önlemek, bağışıklık kaybına uğramış bireyler arasında çok daha fazla hücre tarafından koruyucu bir bağışıklık tepkisi ortaya çıkarma yeteneğine sahip BCG aşısının yerine daha iyi bir aşı geliştirmek veya BCG aşısını geliştirmek için çalışmalar başlatılmıştır (Brennan *et al.* 2007).

Çoğu patojenin aksine, *M. tuberculosis'*in immüno-dominant epitoplarının birçoğu saflaştırma amacı ile çalışılmaktadır. *M. tuberculosis'*in seçilen proteinlere karşı insan bağışıklık yanıtının indüklenebileceği düşünülmektedir. Bunun aşı gelişimine olan etkisi ise doğal enfeksiyon sırasında zayıf olarak tanınan antijenlere karşı güçlü bir T hücre yanıtlarının oluşturulması ve aşı etkinliğinin artırılması olarak gösterilmiştir (Orr *et al.* 2014). 1950-1975 yılları arasında tüberküloz hastalığına karşı yapılan aşı çalışmalarında, *M. tuberculosis*'in çeşitli hücre duvarı ya da inaktive edilmiş bileşenleri kullanılmış olup birçok çalışmada BCG'ye eşdeğer veya BCG'den daha iyi koruma potansiyeli olduğu belirtilmiştir. Ancak, bazı çalışmalardaki spesifik olmayan bir enflamasyon cevabından dolayı bu aşı adaylarının uzun süreli koruma potansiyelleri sorgulanmıştır (Agger and Andersen 2001).

En ümit vaat eden stratejiler arasında alt birim protein aşıları bulunmaktadır. Mevcut aşılara göre, spesifiklik, güvenlik ve kolay elde edilebilirlik gibi özellikleri vardır. Protein alt birim aşıların öncelikle tüberküloza karşı koruma ile ilgili bir immün yanıt teşvik ettiği belirlenmiştir. Bu özelliklerinden dolayı protein alt birim aşıları birçok

klinik çalışmalarda kullanılmaktadır. Protein alt birim aşılarında, mikroorganizmaların hangi moleküllerinin bağışıklık tepkisi ortaya çıkardığı bilinmeli ve buna göre proteinler seçilmelidir (Junqueira-Kipnis *et al*. 2014). Alt birim aşılar bugünkü tüberküloz aşısı araştırma ve geliştirilmesinin bir başka kolunu temsil etmektedir. Alt birim aşılar, bağışıklık yanıtını uyaran rekombinant *M. tuberculosis* antijenlerini içermektedir. Alt birim aşıların T hücre bağışıklık tepkileri uyarılma için kullanılan adjuvana bağlı olmaktadır (Tang *et al.* 2016). Alt ünite protein aşıları spesifik ve güvenli olduğundan dolayı tüberküloza karşı oldukça umut vericidir. Uygun epitopların seçilmesiyle bu aşılar ile bağışıklığın belirli bir tarafa yönlendirilmesine de imkan tanınmaktadır (Junqueira-Kipnis *et al*. 2014).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Bakteri ve Plazmitler

Tez kapsamında Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Süheyla Sürücüoğlu tarafından Türkiye'deki bir hastadan izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* izolatı kullanıldı. Bakteri izolatı (GeneXpert) GenoType MTBC (Hain Lifescience, Almanya) ve 16S rRNA analizleriyle tanımlandı. Bakteri suşlarının özellikleri ve kaynakları Çizelge 3.1'de, klonlama deneylerinde kullanılan plazmitler Çizelge 3.2'de verildi. Plazmit vektörleri ve boyut belirteçleri Ek 1'de sunuldu. Kültür ortamlarının bileşimi ve hazırlanışı Ek 2'de, solüsyon/tamponların bileşimi ve hazırlanışı Ek 3'te, kullanılan kimyasal ve enzimler Ek 4'te sunuldu.

Çizelge 3.1 Kullanılan bakteri suşlarının özellikleri

Suş	**Karakteristik**	**Kaynak**
M. tuberculosis 14/1649	Hasta izolatı	Prof. Dr. Süheyla Sürücüoğlu
E. coli DH5α	F^- Φ80*lac*ZΔM15 Δ(*lac*ZYA-*arg*F) U169 *rec*A1 *end*A1 *hsd*R17	Amerikan tip Kültür koleksiyonu
E. coli BL21	*fhuA2 [lon] ompT gal [dcm] ΔhsdS*	Novagen, Merck (Almanya)

Büyütme ve Saklama Koşulları

Lowenstein-Jensen Medium Slant BBL™ besiyeri *Mycobacterium tuberculosis* için, Luria Broth (LB, Ek 2) sıvı besiyeri *E. coli* BL21 ve *E. coli* DH5α suşlarının büyümesi için, Luria Agar (LA, Ek 2) katı besiyeri ise bakteri örneklerinin saklanması için kullanıldı. Büyütülen bakteri kültürleri +4°C'de muhafaza edildi ve aylık alt kültürler

yapılarak canlılıkları devam ettirildi. Bakteri kültürlerinin uzun süreli canlılıklarını korumak amacı ile %50 gliserol içiren LB içerisinde -80°C'de depolandı. LB ve LA besiyerlerine ampisilin 100 µg/ml, kanamisin 30 µg/ml konsantrasyonda eklendi.

Çizelge 3.2 Klonlama ve ekspresyonda kullanılan plazmitler

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

3.2 Primer Dizayn

PZR'de kullanılacak primerler, NCBI Gen Bankası'ndaki diziler kullanılarak Primer 3 ve BLAST programları aracılığı ile belirlendi (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3 PZR'de kullanılan ileri ve geri primer özellikleri

Gen adı	**Primer adı**	**Nükleotit sekansı**	**Gen uzunluğu (bp)**	**G-C içeriği (%)**	**Tm (°C)**
erp	erpF	5'-agatcttcatgccatgcactcgcga-3'	855	52	65
erp	erpR	5'-agatctagcaatgaccgacgccttg-3'	855	52	65
16S rRNA	16SF	5'-agagtttgatcatggctcag-3'	1300	45	46,4
16S rRNA	16SR	5'-ggttaccttgttacgactt-3'	1300	42,1	40,7

3.3 *Mycobacterium tuberculosis* Genomik DNA'sının Saflaştırılması

M. tuberculosis genomik DNA'sı Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit ile saflaştırıldı.

Gram-pozitif bakteri genomik DNA saflaştırmasına başlamadan önce, Gram-pozitif lizis tampon hazırlandı. 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 mM EDTA, %1.2 Triton X-100 ve kullanımdan hemen önce tampona 20 mg/mL lizozim eklendi. $2x10^9$ CFU/mL'ye kadar büyütülen bakteri kültürü mikrosantrifüj tüplerinde 10 dakika 5000xg.'de oda sıcaklığında santrifüj edildi. Üstteki sıvı faz atıldı ve pellet üzerine 180 µL manuel olarak hazırlanmış Gram-pozitif lizis tampon eklendi. 30 dakika 37°C'de inkübe edildi. Ardından 200 µL lizis solüsyon ve 20 µL proteinaz K eklendi. Homojen bir süspansiyon elde etmek için vortekslendi. 56°C'de su banyosunda hücreler parçalanana kadar yaklaşık 30 dakika inkübe edildi. 20 µL RNaz A solüsyonu eklenerek vortekslendi. 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra 400 µL %50 etanol eklenerek vortekslendi. Hazırlanan hücre lizatı GeneJET genomik DNA purifikasyon kolonuna transfer edildi. 1 dakika 6000xg.'de oda sıcaklığında santrifüj edildi. Sıvı kısmı içeren toplama tüpü atıldı ve kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. Ardından 500 µL yıkama tamponu eklendi. 1 dakika 8000xg.'de oda sıcaklığında santrifüj edildi. Sıvı faz atılarak kolon toplama tüpüne geri yerleştirildi. Tekrar 500 µL yıkama tamponu purifikasyon kolonuna eklendi. 3 dakika yüksek hızda (12000xg.) oda sıcaklığında santrifüj edildi. Toplama tüpü atılarak kolon yeni steril mikrosantrifüj tüpüne alındı. 100 µL elüsyon tamponu kolon membranının merkezine eklenerek 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 1 dakika 8000xg.'de oda sıcaklığında santrifüj edildi. Purifikasyon kolonu atıldı ve saflaştırılan DNA kullanılmak üzere -20°C deposuna kaldırıldı.

Agaroz jel elektroforezi

Elektroforez işlemi agaroz jel düzeneğinde (Thermo Scientific) yatay olarak gerçekleştirildi. Genomik DNA için %0.8'lik jel, TAE (Ek 3) tamponunda hazırlandı.

DNA örnekleri 6X DNA yükleme boyası (Thermo Scientific) ile birlikte jele yüklendi. DNA bantlarının moleküler ağırlıkları 50 bp DNA cetveli (Thermo Scientific, Ek 1) kullanılarak belirlendi. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra 90 Volt elektrik akımında 60 dakika yürütüldü. Yürütme işleminin ardından agaroz jel etidyum bromür çözeltisi (0,5 µg/mL, TAE tamponu) ile boyandı. DNA bantları UV lambası (Vilber Lourmat) ile görüntülendi.

3.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

M. tuberculosis izolatının moleküler olarak tür doğrulamasını yapmak için *16S rRNA* geni PZR ile çoğaltıldı. PZR karışımı, 1X PZR tamponu (Fermantas), 25 mM $MgCl_2$ (Fermantas), 10 mM dNTP karışımı (Fermantas), 0,4 mM ileri ve geri primer, 1 U/µL *Taq* DNA polimeraz (Fermantas) ve 10 ng kalıp DNA ile hazırlandı. Karışımın toplam hacmi dH_2O ile 50 µL'ye tamamlandı. *erp,* G-C oranı yüksek bir gen olduğu için PZR'de başlangıç aşamasında dimetilsülfoksit (DMSO) kullanıldı. DMSO, G-C oranı yüksek olan genlerin denatürasyon aşamasını kolaylaştırmaktadır.

Başlangıç denatürasyon aşaması süresi 10 dakikadan 30 dakikaya yükseltildi. 30 dakika 94°C'de enzim aktivitesi düşeceğinden dolayı ilk aşamada 2 µL kalıp DNA, 33 µL dH2O ve 1 µL DMSO eklendi. 30 dakika sonunda 1µL dNTP, 1'er µL primerler, 1 µL *Taq* DNA polimeraz ve 5 µL polimeraz tamponu ile 5 µL $MgCl_2$ karıştırılıp tüplere eklendi. *16S rRNA* geni için yapılan PZR'de DMSO hariç diğer karışımlar aynı miktarlarda eklendi.

PZR'de kullanılan primerler ve ürün boyutu Çizelge 3.3'te gösterilmişti. İlgili genlerin (*erp, 16S rRNA*) çoğaltılması için kullanılan primerler ve PZR koşulları Çizelge 3.4'te gösterildi. PZR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütüldü.

Çizelge 3.4 Kullanılan primerler ve PZR programı

PZR ürünü	**Kullanılan primer**	**PZR koşulları (35 döngü)**
erp	erpF ve erpR	Başlangıç denatürasyonu: 94°C'de 30 dakika Denatürasyon: 94°C'de 1 dakika Primer bağlanma: 62°C'de 30 saniye Uzama: 72°C'de 1 dakika Son uzama: 72°C'de 10 dakika
16S rRNA	16SF ve 16SR	Başlangıç denatürasyonu: 94°C'de 10 dakika Denatürasyon: 94°C'de 1 dakika Primer bağlanma: 43°C'de 30 saniye Uzama: 72°C'de 1 dakika Son uzama: 72°C'de 10 dakika

3.5 Jel Ekstraksiyon

İstenen DNA bantları agaroz jelden Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit ile ekstrakte edildi. Jel kesitine 1:1 oranında bağlayıcı tampon eklenip jel tamamen çözünene kadar 50-60 °C'de su banyosunda inkübe edildi. Jel çözeltisi GeneJET purifikasyon kolonuna eklendi ve 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Purifikasyon kolonuna 700 µL yıkama tamponu eklendi ve 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolon yeni steril ependorf tüpüne alındı. Kolonun merkezine toplam 50 µL elüsyon tamponu iki seferde eklendi ve 1 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Saflaştırılmış DNA -20 °C'de saklandı. Jel ekstraksiyon işlemi bittikten sonra ürünler %0,8'lik agaroz jelde 90 voltta 60 dakika yürütüldü.

3.6 pGEM-T Ligasyon Reaksiyonu

Jel ekstraksiyon ürününün pGEM-T Easy (Promega) vektöre klonlanması için 1 µL pGEM-T Easy vektör, 8 µL jel ekstraksiyon ürünü, 5 µL 2X ligaz tamponu ve 1 µL T4

DNA ligaz ile +4 °C'de bir gece inkübasyonda ligasyon yapıldı. pGEM-T'ye klonlanan genin Sanger dizileme işlemi BGI Europe şirketinde yaptırıldı.

3.7 pET28-a (+) Ligasyon Reaksiyonu

Ligasyonda kullanılmak üzere *Bgl*II restriksiyon enzimi ile kesilmiş pGEM-T-*erp* rekombinant plazmiti (insert) için *Bam*HI restriksiyon enzimi ile kesilmiş pET28-a vektörü kullanıldı. Ligasyon reaksiyonu için 7 µL insert, 1 µL vektör, 1 µL 10X T4 ligaz tampon (Promega), 1 µL 5 U/µL T4 ligaz (Promega) kullanıldı. İlk olarak vektör ve insert karıştırıldı ve 65 °C'de su banyosunda 5 dakika bekletildi. 5 dakika sonunda buza alındı ve daha sonra tampon ve enzim eklenip 16°C'de 16 saat inkübe edildi.

3.8 *E. coli* DH5α Hücrelerine Transformasyon

Transformasyon işlemi için kompetan hale getirilen bakteri kültürü *E.coli* DH5α suşudur. Sıvı besiyerine (LB) ekilen ve bir gece 37°C 'de büyütülen kültür 200 mL steril edilmiş LB'ye aktarıldı. OD_{600} 0,4-0,6'ya ulaşana kadar 37 °C'de 200 rpm'de çalkalayıcı inkübatörde büyütüldü. Kültürün OD_{600} değeri spektrofotometre (Shimadzu UV-1601) ile ölçüldü ve 0,4-0,6'ya ulaştığı zaman 10 dakika buzda bekletildi. Kültür steril falkon tüplere aktarılarak 4500 rpm'de 5 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda pellet üzerine filtre ile streil hale getirilen 20 mL birinci kompetan tamponu (Ek 3) eklendi ve 4500 rpm'de 5 dakika +4 °C'de santrifüj edildi. Son olarak pellet üzerine yine filtre ile steril hale getirilen 8 mL ikinci kompetan tamponu (Ek 3) eklendi ve buz içersinde pellet çözündürüldü. Steril ependorf tüplere paylaştırıldı ve -80°C'de saklandı.

Kompetan hücreler buz üzerinde 15 dakika bekletildi. 10 µL ligasyon ürünü için 100 µL kompetan hücre kullanıldı. Hücre ve ligasyon ürün karışımı 30 dakika buz üzerinde bekletildi. Süre sonunda hücreler su banyosunda 42°C'de 90 saniye ısı şokuna uğratıldı. Isı şokunun ardından hücreler hızlı bir şekilde buz üzerine alındı ve 5 dakika bekletildi. 5 dakika sonunda antibiyotik içermeyen 700 µL LB eklendi. Karışım 37°C'de 100

rpm'de çalkayacı inkübatörde 80 dakika inkübe edildi. Hücreler 6000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek 100 µL LB içinde bakteri pelleti çözündürüldü. Hücreler 100 µg/mL ampisilin içeren seçici besiyerine ekildi. Mavi-beyaz koloni seçimi için 80 mg/mL X-gal (Ek 3), 0,5 mM IPTG (Ek 3) ile LA yüzeyi kaplandı. Ekimler 37°C'de bir gece inkübe edildi.

3.9 Plazmit İzolasyonu

E. coli plazmit DNA izolasyonu Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit kullanılarak yapıldı. Bakteri kültürü 100 µg/mL ampisilin içeren LB'de bir gece 37°C'de büyütüldü. Bakteri kültürü 12000 rpm'de 1 dakika çöktürüldü. Pellet üzerine 250 µL süspansiyon solüsyonu eklendi ve pellet kalıntısı kalmayana kadar pipetleme yapıldı. Karışıma 250 µL lizis solüsyon eklendi ve tüpler 4-6 kez ters çevrilerek karıştırıldı. Karışıma 350 µL nötralizasyon solüsyonu eklendi. Tüpler beyaz bir çökelti oluşana kadar ters çevrilerek karıştırıldı. Hücre lizatı 12000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve santrifüj sonunda sıvı faz GeneJET spin kolona alındı. 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek kolona iki seferde 500 µL yıkama solüsyonu eklendi ve 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolon yeni bir ependorf tüpe yerleştirildi. Kolonun merkezine iki seferde toplam 50 µL elüsyon tamponu eklendi. 12000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi ve plazmit DNA -20 °C'de saklandı.

pET28-a ligasyonu ile yapılan transformasyon sonucu çıkan kolonilerin taranması manuel plazmit izolasyonuyla yapıldı. Bir gece önceden LA+ kan'a çizim ekim yapılan bakteri kolonileri steril ortamda pipet ucu ile kazınarak eppendorf tüplere alındı. Tüplere 100 µL STE tampon (Ek 3) eklendi ve çözünene kadar vortekslendi. Tüpler buz üzerinde 20 dakika bekletildi, 60 µL lizis tampon (Ek 3) eklendi ve vortekslendi. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakıldı ve ardından tüpler 70°C'de su banyosunda 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra, tüpler soğuk suya tutuldu ve 12000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. İşlem sonunda süpernatan jele yüklendi.

3.10 Restriksiyon Enzim Kesimi

İnsert için rekombinant plazmit kesimi yapıldı.12 µL pGEM-T *erp* rekombinant plazmit DNA, 2 µL 1X *Bgl*II tampon, 1 µL *Bgl*II, 5 µL dH_2O ile karışım hazırlandı. Karışım 37 °C'de 2 saat inkübe edildi. Vektör kesim işlemi için 17 µL pET28-a plazmit, 2 µL *Bam*HI tampon, 1 µL *Bam*HI enzimi ile karışım hazırlandı ve 37°C'de 90 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası karışım agaroz jelde yürütüldü ve jel ekstraksiyon yapıldı. Oluşturulan rekombinant plazmitin doğrulanması için restriksiyon enzim kesimi yapıldı. Enzim kesimi 6 µL pET28-a plazmit DNA, 4 µL 10X Tango tampon, 1 µL *Bam*HI-*Bgl*II ve 8 µL dH_2O ile yapıldı. Karışım 90 dakika 37°C'de inkübe edildi.

3.11 *E. coli* BL21 Hücrelerine Transformasyon

Oluşturulan rekombinant plazmit kompetan hale getirilen *E. coli* BL21 suşuna ısı şoku ile transforme edildi. Rekombinant koloniler kanamisin direncine göre seçildi. -80°C'de depolanan kompetan hücreler buz üzerinde 15 dakika bekletildi ve ardından 1 µL hedef geni taşıyan rekombinant plazmit 100 µL kompetan hücre içine eklendi. 30 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edilerek su banyosunda 42°C'de 90 saniye ısı şokuna uğratıldı. Isı şokunun ardından hücreler hızlıca buz üzerine alındı ve 5 dakika bekletildi. Süre sonunda 500 µL antibiyotik içermeyen LB eklenerek 37°C'de 100 rpm'de çalkayacı inkübatörde 80 dakika inkübasyona bırakıldı. Hücreler 6000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi ve santrifüj sonunda bakteri çökeltisi 100 µL LB içersinde çözündürüldü. Hücre çözeltisi 30 µg/mL konsantrasyonda kanamisin içeren LA'ya yayılarak ekimi yapıldı ve 37°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı.

3.12 His-tag Proteinlerin Saflaştırılması

pET28-*erp* taşıyan rekombinant *E. coli* BL21 hücreleri 30 µg/mL kanamisin içeren LB'de büyütüldü. Hücre kültürü 1 L yeni LB'ye eklenerek 37°C'de OD_{600} 0,6 ulaşıncaya kadar inkübe edildi. Protein ekspresyonunu indüklemek için 1 mM izopropil-

ß-D-galaktopiranosit (IPTG, Sigma) eklendi ve 37°C'de 5 saat 165 rpm'de çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler 4500 rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Pellet üzerine 5 mL 1X LEW-U (8M üre) tampon (Ek 3) eklenerek tamamen çözünene kadar vortekslendi. Hücreler sonikatör (Bandelin-Sonopuls) kullanılarak 6x10 saniyede %60 şiddetle parçalandı. Hücre atıklarından kurtulmak için 15000 rpm'de 15 dakika santrfifüj edildi. Protein saflaştırılması için Protino® Ni-TED 2000 Packed Columns (Macherey-Nagel, Almanya) protein purifikasyon kiti kullanıldı. Rekombinant proteini içeren sıvı faz protein purifikasyon kolonlarından geçirildi. Saflaştırılan proteinler sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile tespit edildi.

3.13 Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamit Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) jelleri Laemmli (1970)'e göre hazırlandı (Çizelge 3.5). SDS-PAGE için, Mini-PROTEAN® Tetra Cell Handcasting accessory kit kullanıldı. İlk olarak %12 ayrıma jeli daha sonra %4 istifleme jeli hazırlandı. Jeller yürütme sistemine yerleştirildi ve örnekler yükleme boyası (Ek 3) ile birlikte jele yüklendi. Jelin üzerine 1X yürütme tamponu (Ek 3) eklendi. 150 voltta 90 dakika yürütüldü.

Çizelge 3.5 SDS-poliakrilamit jellerin hazırlanması

%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

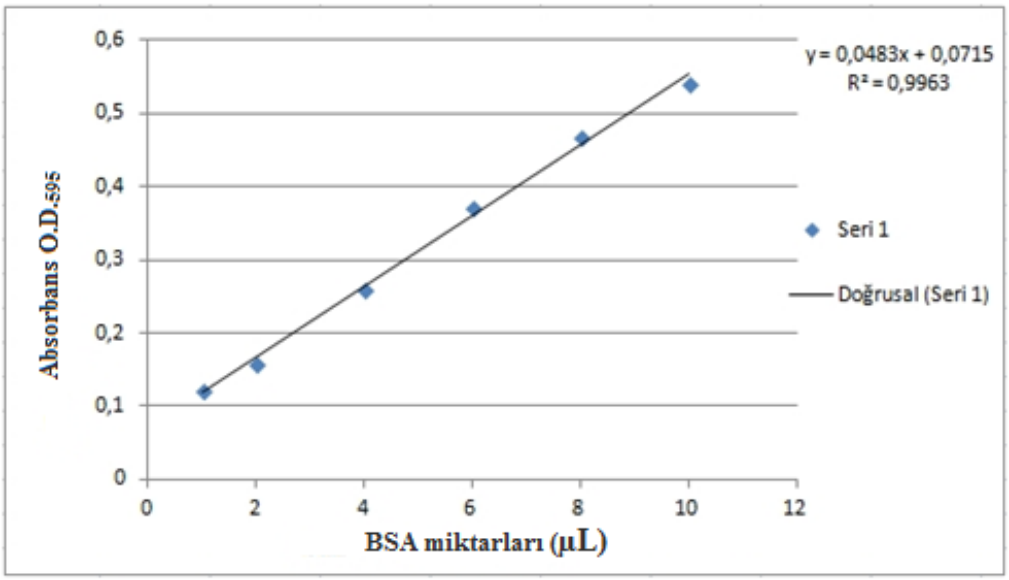
Poliakrilamit jellerin Coomassie Blue R-250 ile boyanması

SDS-PAGE'den sonra jeller oda sıcaklığında yeni hazırlanmış Coomassie Blue R-250 boya tamponu (Ek 3) içinde yaklaşık 5 dakika süre ile boyandı. Jeller daha sonra en az 1 saat boyunca boya uzaklaştırma çözeltisinde (Ek 3) tutularak boyadan arındırıldı.

3.14 Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Rekombinant proteinlerin yoğunluklarını artırmak, üre ve imidazol gibi kimyasallardan arındırmak için elde edilen elüsyon ürünlerine Amicon® Ultra-0.5 Centrifugal Filter 10 kDa (Millipore) filtre uygulaması yapıldı. Bu filtre, karışımdaki tuzları ve 10 kDa'nun altındaki proteinleri süzmektedir. Filtreye 500 µL elüsyon eklendi ve 13000 rpm'de 7 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda filtreden geçmeyen kısım falkon tüplerde toplandı.

Protein konsantrasyonu Bradford yöntemi (1976) ile ölçüldü. Coomassie Brillant Blue G-250 asidik çözeltisinin proteine bağlanabilmesi için 595 nm absorbans değerinde ölçüldü. Test reaktifi 100 mg Coomassie Blue G-250 boyasının 50 mL %95'lik etanol içinde eritildikten sonra 100 mL %85'lik fosforik asit ile karıştırılarak toplam hacmin saf su ile 1000 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlandı. Karışım daha sonra filtreden geçirildi. Protein kalibrasyon eğrisinin oluşturulması için standart olarak sığır serum albumini (BSA) kullanıldı. BSA (1 mg/mL) hacimleri 2, 4, 6, 8 ve 10 µL olacak şekilde ayarlandı ve saf su ile 100 µL'ye tamamlandı. Blank için sadece100 µL saf su kullanıldı. Hazırlanan test reaktifi 900 µL olarak kullanıldı. Örnekler spektrofotometre (Shimadzu UV-1601) ile 595 nm'de absorbansta ölçüldü. Standartlar kullanılarak kalibrasyon eğrisi oluşturuldu ve eğri denklemleri ile protein miktarı hesaplandı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Protein konsantrasyonların hesaplanması için kalibrasyon eğrisi

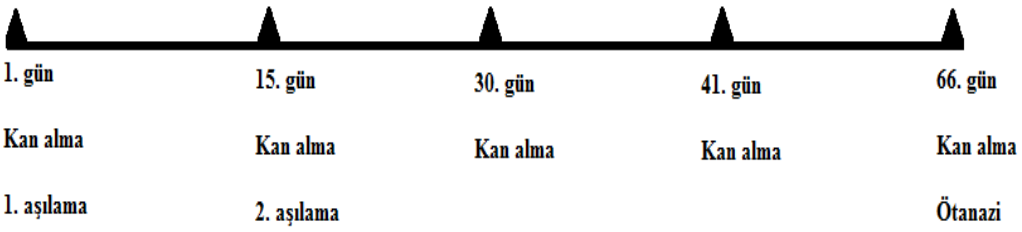
3.15 Fare Deneyleri (Aşılama)

GenoType MTBC (Hain Lifescience, Almanya) analizi ile doğrulanan *M. tuberculosis* izolatından klonlanan ve *E. coli* BL21'de ifade edilerek saflaştırılan Erp proteininden 1 mg/ml konsantrasyonda stok hazırlandı. Montanide ISA 720 VG (Seppic) adjuvan:antijen 7:3 oranında karıştırılarak aşı formülasyonu hazırlandı. Formülasyon 1 dakika vortekslendikten sonra 4°C'de bir gece inkübe edildi. Aşı formülasyonun 0,1 mL'si LA'ya ekim yapılarak 37°C'de bir gece inkübe edilerek aşıların steril oldukları doğrulandı. Aşılama için 6-8 haftalık dişi BALB/c fareler kullanıldı. Beşerli 3 gruba ayrılan farelere yapılan enjeksiyonlar Çizelge 3.6'da gösterildi.

Çizelge 3.6 Aşılama deneyindeki gruplar ve uygulamalar

Grup No.	Enjeksiyon içeriği	BALB/c fare sayısı	Enjeksiyon sayısı ve yolu
1	0,1 mg Erp+0,23 mL adjuvan	5	2x subkutan
2	0,1 mL PBS+0,23 mL adjuvan	5	2x subkutan
3	0,1 mL steril PBS içerisinde $1x10^5$ CFU BCG	5	2x subkutan

İlk aşılamadan önce farelerden toplamda yaklaşık 0,1 mL kuyruk kanı alındı ve ardından 1. aşılama (0,33 ml aşı veya adjuvan) yapıldı. 2 hafta sonra tekrar kuyruk kanı alınıp ardından 2. aşılama yapıldı. Devamında 30., 41. ve 66. günlerde de kan alınarak serumlar toplandı ve farelere ötanazi işlemi uygulandı. Serumlar kullanılana kadar -20°C'de saklandı. Enjeksiyon ve kan alma zamanları Şekil 3.2'de gösterildi.

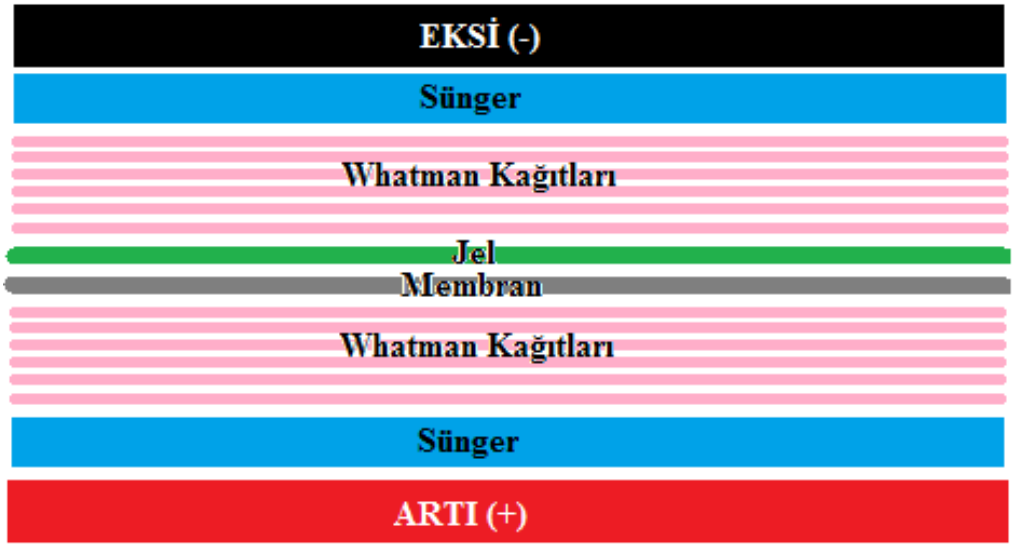


Şekil 3.2 BALB/c fareler için aşılama ve kan alma zamanları

3.16 Western Blot

Rekombinant Erp proteinin BALB/c farelerde spesifik antikor üretimini kalitatif olarak görüntülemek için ve Erp antijenini BCG'ye özgü antikorun tanıyıp tanımadığını anlayabilmek için Western blot (Towbin, 1979) deneyi yapıldı. 1 mg/mL konsantrasyonda olan protein örneği yükleme boyası ve prestained (önceden boyanmış) (New England Biolabs P7712) marker ile birlikte 2 adet SDS-PAGE'de yürütüldü. Jelin bir tanesi Coomassie Brilliant Blue ile boyandı. İkinci jel ise altışar adet 3 MM Whatman® kağıtları ve 0,2 µm nitroselüloz membran (Bio-Rad, Hercules, CA), 1X transfer tamponu (Ek 3) ile ıslatılarak Şekil 3.3'teki sıraya göre dizildi ve ardından Bio-Rad Mini Trans-Blot® Cell kullanılarak 100 voltta 350 mA'da 1 saat manyetik karıştırıcı üzerinde buz içerisinde transfer gerçekleştirildi. Proteine özgü serumun kullanıldığı deneyde, membranda prestained markerin konumu göz önünde tutularak proteinin bulunduğu yer belirlendi. Transfer işleminin ardından 1X TBS (Tris-buffer Saline) (Ek 3) ile hazırlanmış %10 süttozu içerisinde 37°C'de 2 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 1X TTBS (%0,5 Tween 20, 1X TBS) ile 10 dakika boyunca yıkandı. Daha sonra membran %5 süttozu ile 1:400 seyreltilmiş primer antikor (proteine veya BCG'ye spesifik fare antikoru) içerisinde oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Tekrar

membran 1X TTBS ile 10 dakika yıkandı. Yıkama işleminin hemen ardından %5 süttozu ile 6 µL: 100 mL seyreltilmiş sekonder antikor (antimouse IgG, Sigma) ile oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Yeniden 1X TTBS ile 10 dakika yıkama yapıldı. Son olarak membran, bantlar görülene kadar AP konjugat substrat kiti (Bio-Rad, Hercules, CA) ile hazırlanan solüsyon içerisinde karanlık ortamda bekletildi. Bantlar görüldükten sonra substrattan uzaklaştırmak için membran saf su ile yıkandı.



Şekil 3.3 Western blot deneyinde izlenen transfer işlem sırası

3.17 IgG (İmmunoglobulin G) ELISA

Rekombinant Erp proteinin BALB/c farelerinde uyardıkları hümoral bağışıklık (toplam IgG) seviyesi kantitatif olarak ELISA deneyi ile belirlendi. 96 kuyucuklu ELISA plağına 0,05 M karbonat tamponu (Ek 3) içerisinde kuyucuk başına 1 µg konsantrasyonda olacak şekilde saflaştırılmış protein eklendi. Plağın üstü parafilm ile kapatılarak 4°C'de bir gece bekletildi. Bir gece sonunda plak 3 defa yıkama solüsyonu (Ek 3) ile yıkandı. Daha sonra kuyucuklara 50 µL bloklama solüsyonu (Ek 3) eklenerek 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Aşılama deneyi sonucu Erp proteinine özgü serum bloklama solüsyonu içerisinde 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 ve 1:3200 seyreltmelerle primer antikor olarak kuyucuklara eklendi ve yeniden 37°C'de 1 saat

inkübe edildi. Daha sonra plak 4 defa yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra kuyucuklara bloklama çözeltisi içerisinde 1:1000 seyreltilmiş tavşandan izole edilen alkalin fosfataz bağlı anti-fare IgG (Sigma) sekonder antikor olarak eklendi ve 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Plak tekrar 4 defa yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra AP konjugat substrat kiti (Bio-Rad) kullanılarak kolorimetrik bir substrat hazırlandı (10 mL dH_2O içerisinde 400 µL gelişim tamponu, 100 µL A ve B solüsyonu). Hazırlanan substrattan her kuyucuğa 100 µL eklendi ve plak karanlık ortamda yaklaşık 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Reaksiyonu durdurmak için 50 µL 1 M NaOH kullanıldı. Reaksiyon sonucunda optik yoğunluk Rayto RT-2100C ELISA plak okuyucuda 405 nm'de ölçüldü.

3.18 IFN-ɣ (İnterferon-gama) ELISA

Rekombinant Erp proteinin BALB/c farelerinde uyardıkları hücresel bağışıklık (IFN-ɣ) seviyesi kantitatif olarak ELISA deneyi ile belirlendi. Serum IFN-γ seviyelerinin belirlenmesi için Mouse IFN-ɣ ELISA Total Kit (Thermo) kullanıldı. 96 kuyucuklu ELISA plakasında kuyucuk başına 50 µL serum örneği ve 50 µL 3:1 oranında seyreltilmiş 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 inkübe edildi. İnkübasyon sonunda plaka kapağı çıkarıldı. Plaka üç kez 1X yıkama tamponu ile yıkandı. Hazırlanan streptavidin-HRP (12 mL Streptavidin-HRP tamponu'na 30µL Streptavidin-HRP konsantresi) çözeltisi her bir kuyucuğa 100 µL olarak eklendi. Yeni bir yapışkan plaka kapağı ile plaka kapatıldı ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda plaka kapağı çıkarılarak 1X yıkama tamponu ile üç kez yıkandı. Ardından her kuyucuğa 100 µL TMB substrat çözeltisi eklendi. Numuneler karanlık bir ortamda oda sıcaklığında 30 dakika boyunca renk reaksiyonu oluşması için inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her kuyucuğa 100 µL reaksiyon durdurma solüsyonu eklendi. 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.

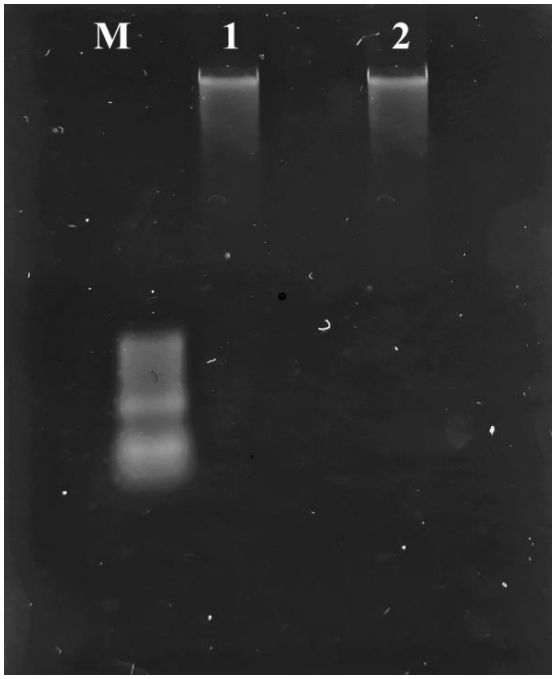
3.19 IL-12 (İnterlökin 12) ELISA

Rekombinant Erp proteinin BALB/c farelerinde uyardıkları hücresel bağışıklık (IL-12) seviyesi kantitatif olarak ELISA deneyi ile belirlendi. Serum IL-12 seviyelerinin belirlenmesi için Mouse IL-12 ELISA Total Kit (Thermo) kullanıldı. 96 kuyucuklu ELISA plağına her kuyucuga çift olarak 50 µL dilüent standart (12,5 µL serum ile 37,5 µL standart) eklendi. Ardından 50 µL 2:1 oranında seyreltilmiş standartlar (3000:1500:750:375:188:94:47:0 pg/mL) eklendi. Plaka dikkatli bir şekilde yapışkan plaka kapağı ile örtülerek oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda plaka kapağı çıkarılarak üç kez yıkama tamponu (30X yıkama tamponu (50 mL), 1,5 L distile su) ile yıkandı. Numune veya standartları içeren her kuyucuğa 100 µL biyotinlenmiş antikor reaktifi eklendi. Biyotinlenmiş antikor reaktifini eklerken pipet ucu ile numunelere dokundurmamaya özen gösterildi. Plakanın üzeri dikkatli bir şekilde yapışkan plaka kapağı ile örtülerek oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda plaka kapağı çıkarılarak üç kez yıkama tamponu ile yıkandı. Hazırlanan streptavidin-HRP (12 mL Streptavidin-HRP tamponu'na 30µL Streptavidin-HRP konsantresi) çözeltisi her bir kuyucuğa 100 µL olarak eklendi. Yeni bir yapışkan plaka kapağı ile plaka kapatıldı ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda plaka kapağı çıkarılarak yıkama tamponu ile üç kez yıkandı. Ardından her kuyucuğa 100 µL TMB substrat çözeltisi eklendi. Numuneler karanlık bir ortamda oda sıcaklığında 30 dakika boyunca renk reaksiyonu oluşması için inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her kuyucuğa 100 µL reaksiyon durdurma solüsyonu eklendi. Reaksiyonu durdurulduktan 30 dakika sonra optik yoğunluk Rayto RT-2100C ELISA plak okuyucuda 405 nm'de ölçüldü. 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.

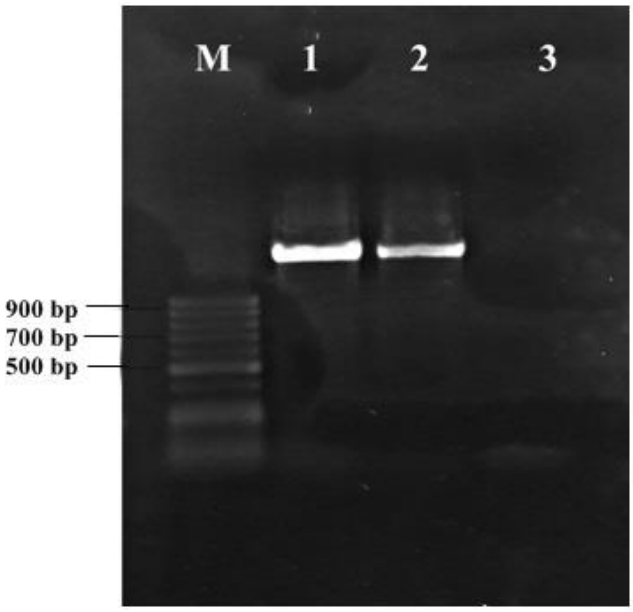
4. BULGULAR

4.1 *Mycobacterium tuberculosis* Genomik DNA'sından *16S rRNA* Analizi ve *erp* Geninin Klonlanması

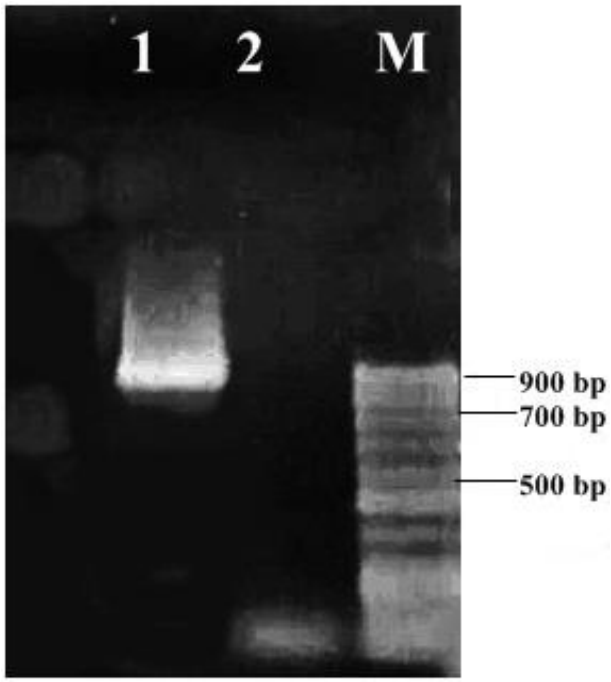
Mycobacterium tuberculosis hasta izolatının (14/1649) genomik DNA'sı saflaştırılmıştır (Şekil 4.1). Saflaştırılan DNA *M. tuberculosis* izolatının tür düzeyinde tanımlanması için *16S rRNA* geninin (Şekil 4.2) ve *erp* geninin (Şekil 4.3) PZR ile çoğaltılması için kullanılmıştır.



Şekil 4.1 *M. tuberculosis* genomik DNA izolasyonu agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: 50 bp marker, 1: 6 µL DNA, 2: 12 µL DNA)



Şekil 4.2 *16S rRNA* geni PZR agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: 50 bp marker, 1-2: PZR ürünü, 3: negatif kontrol)



Şekil 4.3 *erp* geni PZR agaroz jel elektroforez görüntüsü (1: *erp* PZR ürünü, 2: negatif kontrol, M: 50 bp marker)

M. tuberculosis izolatının tür düzeyinde tanımlanması için elde edilen bantlardan jel ekstraksiyon yapılarak nükleotit dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Nükleotit dizisi BLAST

(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) analizi sonucunda *M. tuberculosis* ile %100 uyum göstermiştir (Şekil 4.4) Elde edilen nükleotit dizisi şekil 4.5'te gösterilmiştir.

PZR ürünü pGEM-T ligasyonda kullanılmak üzere agaroz jelden kesilerek ekstrakte edilmiştir (Şekil 4.6). Daha sonra ligasyon ürünü kompetan hale getirilmiş *E. coli* DH5α hücrelerine transforme edilmiştir. İstenilen koloniler ampisilin direncine ve *lacZ* geninin aktivitesine göre tespit edilmiştir. Klonlamak istediğimiz gen pGEM-T plazmitte bulunan *lacZ* geni içerisine entegre olmuşsa *lacZ* geni inaktif olacağından dolayı bakteri X-gali parçalayamamakta ve beyaz koloniler oluşmaktadır. İstediğimiz gen *lacZ* genine entegre olamamışsa bakteri X-gali parçalamakta ve mavi koloniler oluşmaktadır (Şekil 4.7). Beyaz koloniler seçilerek plazmit izolasyonu yapılmış (Şekil 4.8) ve restriksiyon enzim kesimi ile doğrulanmıştır (Şekil 4.9).

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

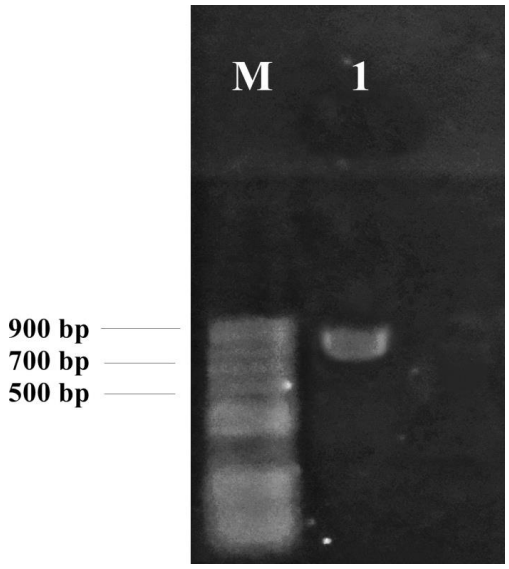
Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Mycobacterium tuberculosis strain MTB1, complete genome	2567	2567	100%	0.0	100%	CP020381.2
Mycobacterium tuberculosis strain 14/1649 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2567	2567	100%	0.0	100%	KY810766.1
Mycobacterium tuberculosis TRS10 genome	2567	2567	100%	0.0	100%	CP009195.1
Mycobacterium tuberculosis TRS2 genome	2567	2567	100%	0.0	100%	CP009186.1
Mycobacterium tuberculosis 1821ADB45 genome	2567	2567	100%	0.0	100%	CP009206.1
Mycobacterium tuberculosis 1821ADB40 genome	2567	2567	100%	0.0	100%	CP009202.1
Mycobacterium tuberculosis TRS26 genome	2567	2567	100%	0.0	100%	CP009193.1
Mycobacterium tuberculosis TRS25 genome	2567	2567	100%	0.0	100%	CP009192.1
Mycobacterium tuberculosis TRS24 genome	2567	2567	100%	0.0	100%	CP009191.1
Mycobacterium tuberculosis TRS27 genome	2567	2567	100%	0.0	100%	CP009190.1
Mycobacterium tuberculosis TRS8 genome	2567	2567	100%	0.0	100%	CP009196.1
Mycobacterium tuberculosis TRS28 genome	2567	2567	100%	0.0	100%	CP009194.1
Mycobacterium tuberculosis TRS4 genome	2567	2567	100%	0.0	100%	CP009189.1

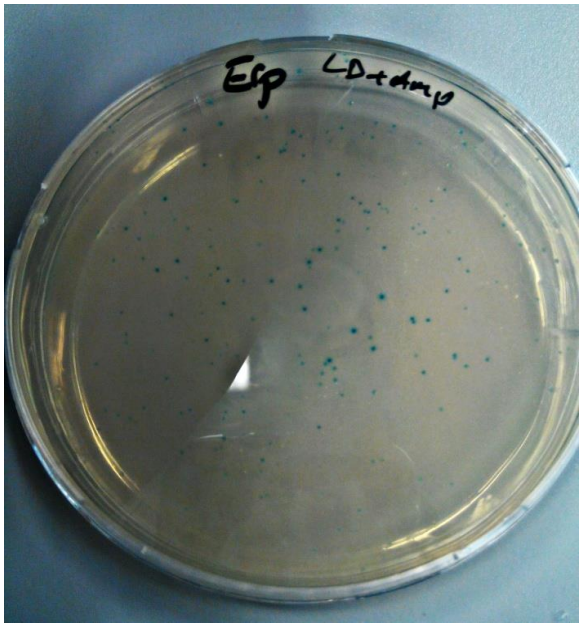
Şekil 4.4 Nükleotit dizisi BLAST sonucu uyumluluk oranları

AGTCGAACGGAAAGGTCTCTTCGGAGATACTCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAAC
ACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATAC
CGGATAGGACCACGGGATGCATGTCTTGTGGTGGAAAGCGCTTTAGCGGTGTGGG
ATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGACGGCCTACCAAGGCGACGA
CGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTCCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCCA
GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGAT
GCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCACCAT
CGACGAAGGTCCGGGTTCTCTCGGATTGACGGTAGGTGGAGAAGAAGCACCGGC
CAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATT
ACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGTTTGTCGCGTTGTTCGTGAAATCTCACGG
CTTAACTGTGAGCGTGCGGGCGATACGGGCAGACTAGAGTACTGCAGGGGAGAC
TGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGG
CGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGC
GAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGTACTAGGTGTG
GGTTTCCTTCCTTGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGTACCCCGCCTGGG
GAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCG
GCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACA
TGCACAGGACGCGTCTAGAGATAGGCGTTCCCTTGTGGCCTGTGTGCAGGTGGTG
CATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG
CAACCCTTGTCTCATGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTCGTGAGAGACTGCC
GGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTC
CAGGGCTTCACACATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCGATGCCGCGAGG
TTAAGCGAATCCTTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACC
CCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGT
TCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAACACCCGAAG
CCAGTGGCCTAACCCTCGGGAGGG

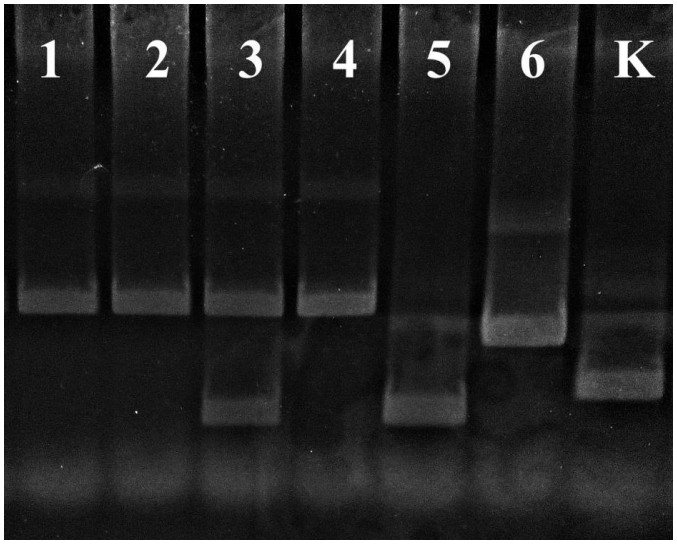
Şekil 4.5 *Mycobacterium tuberculosis* izolatının *16S rRNA* gen dizisi (Gen Bankası erişim numarası KY810766)



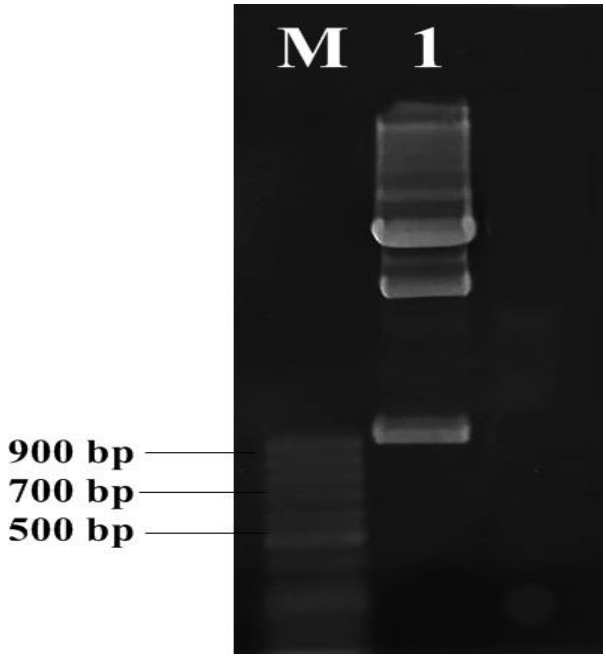
Şekil 4.6 Jel ekstraksiyon sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: 50 bp marker, 1: *erp*)



Şekil 4.7 pGEM-T-*erp* mavi-beyaz koloni oluşumu görüntüsü



Şekil 4.8 pGEM-T-*erp* plazmit izolasyonu agaroz jel elektroforez görüntüsü (1,2,4,5: başarısız klonlama, 3,6: başarılı klonlama, K: mavi koloni kontrol)



Şekil 4.9 pGEM-T-*erp* restirksiyon enzim kesimi agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: 50 bp marker, 1: pGEM-T-*erp*)

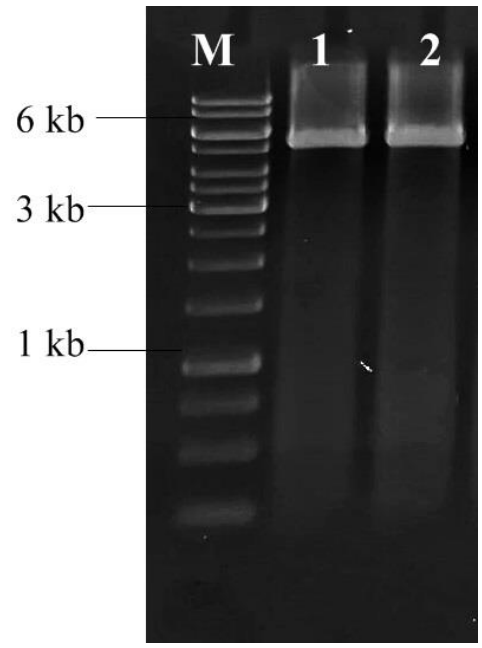
Başarılı olunan pGEM-T-*erp* rekombinantının Sanger dizileme işlemi BGI Europe şirketinde yaptırılmıştır. Dizileme sonucunda klonlanan genin *erp* geni olduğu doğrulanmıştır (Şekil 4.10).

GTGCCGAACCGACGCCGACGCAAGCTCTCGACAGCCATGAGCGCGGTCGCCGCC
CTGGCAGTTGCAAGTCCTTGTGCATATTTTCTTGTCTACGAATCAACCGAAACGAC
CGAGCGGCCCGAGCACCATGAATTCAAGCAGGCGGCGGTGTTGACCGACCTGCC
CGGCGAGCTGATGTCCGCGCTATCGCAGGGGTTGTCCCAGTTCGGGATCAACATA
CCGCCGGTGCCCAGCCTGACCGGGAGCGGCGATGCCAGCACGGGTCTAACCGGT
CCTGGCCTGACTAGTCCGGGATTGACCAGCCCGGGATTGACCAGCCCGGGCCTC
ACCGACCCTGCCCTTACCAGTCCGGGCCTGACGCCAACCCTGCCCGGATCACTC
GCCGCGCCCGGCACCACCCTGGCGCCAACGCCCGGCGTGGGGGCCAATCCGGC
GCTCACCAACCCCGCGCTGACCAGCCCGACCGGGGCGACGCCGGGATTGACCAG
CCCGACGGGTTTGGATCCCGCGCTGGGCGGCGCCAACGAAATCCCGATTACGAC
GCCGGTCGGATTGGATCCCGGGGCTGACGGCACCTATCCGATCCTCGGTGATCCA
ACACTGGGGACCATACCGAGCAGCCCCGCCACCACCTCCACCGGCGGCGGCGGT
CTCGTCAACGACGTGATGCAGGTGGCCAACGAGTTGGGCGCCAGTCAGGCTATCG
ACCCGCTAAAAGGTGTGCTAATGCCGTCGATTATGCAGGCCGTCCAGAATGGCGG
CGCGGCCGCGCCGGCAGCCAGCCCGCCGGTCCCGCCCATCCCCGCGGCCGCGG
CGGTGCCACCGACGGACCCAATCACCGTGCCGGTCGCCTAA

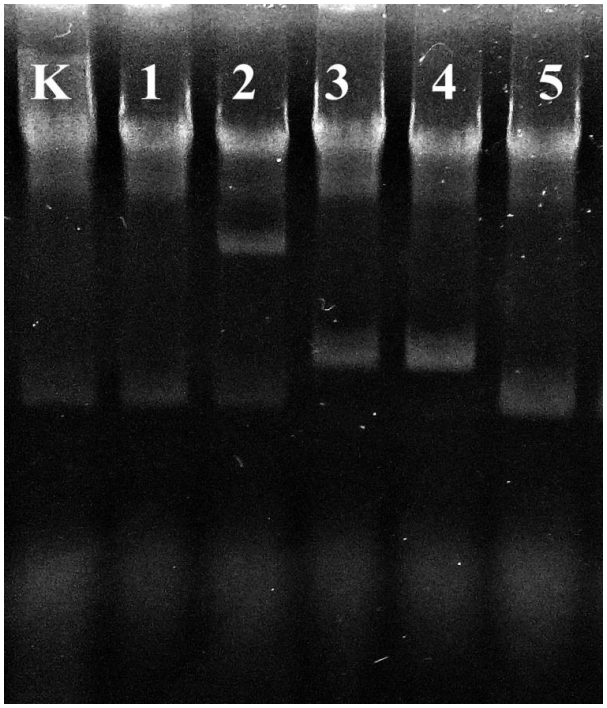
Şekil 4.10 *Mycobacterium tuberculosis* izolatının *erp* gen dizisi (Gen Bankası erişim numarası KY848243).

4.2 pET28-a (+) Vektörüne Klonlama

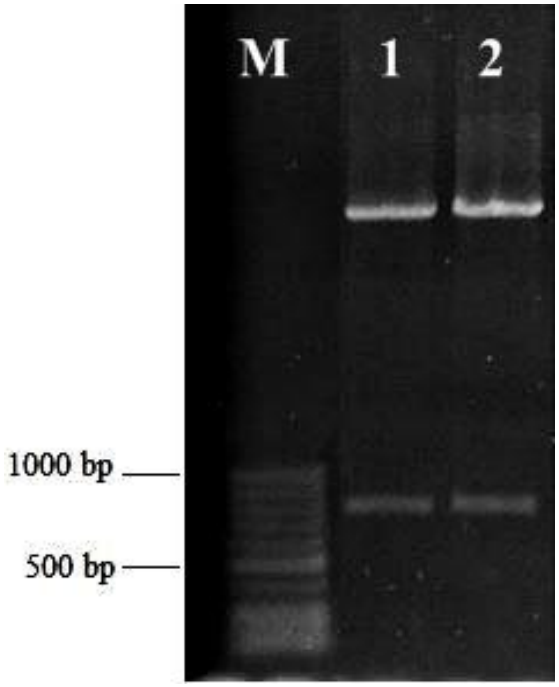
erp genini pET28-a vektörüne klonlamak için plazmit *Bam*HI restriksiyon enzimi ile kesilmiştir (Şekil 4.11). *Bgl*II enzimi ile kesilen pGEM-T-*erp* plazmitinden elde edilen *erp* geni ve *Bam*HI ile kesilen pET28a vektörü ligasyon amaçlı kullanılmıştır. *erp* geni için toplamda 15 kez pET28a ligasyonu yapılmıştır. Transformasyon sonucunda yaklaşık 1000 koloni oluşmuş ve kolonilerin yaklaşık 850 tanesi manuel plazmit izolasyonu ile taranmıştır. Tarama sonucunda 2 olumlu sonuç alınmıştır (Şekil 4.12). Kit ile izole edilen plazmitler *Eco*RI ile kesilerek agaroz jelde yürütülmüştür. Jel sonucunda 2 örnek beklenen büyüklükte bant vermiştir (Şekil 4.13). Böylece pET28a-*erp* rekombinantı başarılı bir şekilde oluşturulmuştur.



Şekil 4.11 pET28-a plazmitinin *Bam*HI restriksiyon enzimi ile kesiminin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: 1 kb marker, 1-2: pET-*Bam*HI)



Şekil 4.12 pET28a-*erp* plazmit izolasyonu agaroz jel elektroforez görüntüsü (K: pet28a kontrol, 1-2-5: başarısız plazmitler, 3-4: başarılı plazmitler).



Şekil 4.13 pET28a-*erp* *Eco*RI restriksiyon enzim kesimi agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: 50 bp marker, 1-2: *erp*).

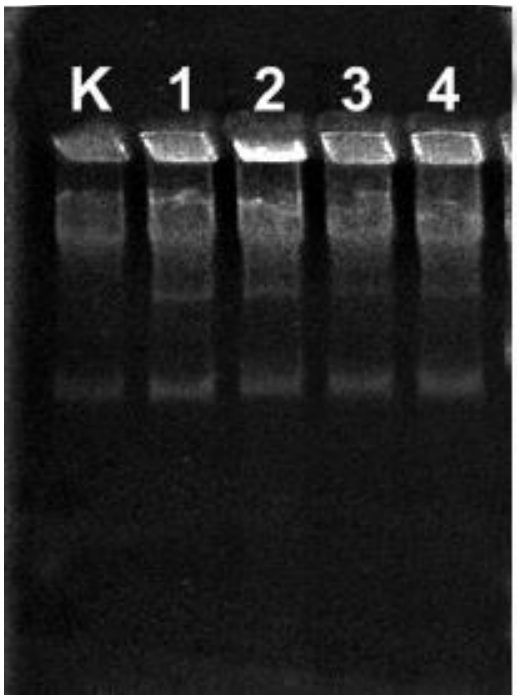
4.3 *erp* Geninin *E. coli* BL21 Hücrelerinde Ekspresyonu ve Rekombinant Proteinin Saflaştırılması

E. coli'de gen ekspresyonu ve rekombinant protein saflaştırması için, *E. coli* DH5α kullanılarak pET28a-*erp* rekombinant plazmiti elde edilmiştir. Rekombinant proteinin üretimi için rekombinant plazmit (pET28-a-*erp*) kompetan hale getirilmiş *E.* coli BL21 hücrelerine transforme edilmiştir. Rekombinant koloniler kanamisin direncine göre seçilmiştir. Plazmit izolasyonları agaroz jelde yürütülmüş ve kontrol olarak *erp* genini taşıyan pET28a vektörü kullanılmıştır. Jel sonucunda BL21'den ve DH5α'dan izole edilen rekombinant pET28a-*erp* plazmitleri aynı hizada bant vermiştir (Şekil 4.14).

pET28a vektörüne klonlanan *erp* geni *E. coli* BL21 suşunda ifade olurken uçlarına 6 tane histidin eklenmektedir. Histidin amino asidinin nikel iyonlarına karşı afinitesi bulunmaktadır. Bu özellikten faydalanılarak histidinli proteinler nikel içeren kolonlardan afinite kromatografi tekniğiyle saflaştırılmıştır. Aşı formülasyonunda kullanılacak daha fazla miktarda protein elde etmek için Ni-TED (Macherey-Nagel) kolonları kullanılmıştır. İlk olarak proteinin saflaştırılması için doğal koşullar uygulanmıştır. Kontrol (uyarılmamış) ve IPTG ile indüklenen hücreler, üre içermeyen ve LEW tamponda çözündürülmüştür. Lizatlar santrifüje tabi tutulmuş ve indüklenmiş kültüre ait süpernatanlar Ni-TED kolonları kullanılarak nikel afinite kolon kromatografisinden sonra, SDS-poliakrilamid jel üzerinde taranmıştır. Sonuç olarak uyarılmamış ve indüklenen numuneler arasında bir fark gözlenmemiştir (Şekil 4.15).

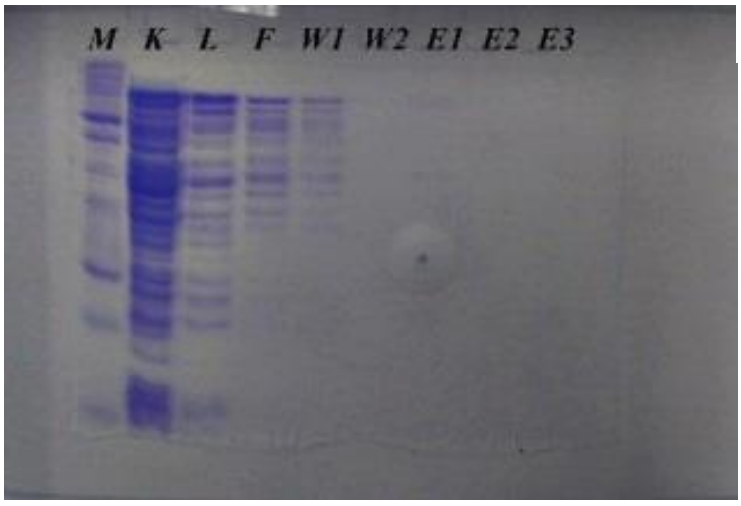
Daha sonra saflaştırma üzerinde ürenin etkisini araştırmak için Ni-TED kolonları kullanılarak tekrar protein saflaştırması yapılmıştır. Konrol ve IPTG ile indüklenen kültürler santrifüje tabi tutulmuş ve 8 M üre içeren LEW tampon içinde yeniden çözündürülmüştür. Hücreler sonikasyona tabi tutularak santrifüjlenmiştir. Proteinler SDS-PAGE üzerinde taranmıştır. Sonuç olarak, His etiketli erp proteinin aşı formülasyonlarında kullanılmak üzere Ni-TED kolonları kullanılarak denatüre edici koşullar altında saflaştırılmasına karar verilmiştir. Jel sonucunda denatüre edici koşulda

elde edilen 28-30 kDa büyüklüğündeki rekombinant Erp proteinin ekspresyonu ve saflaştırılması başarılı olmuştur (Şekil 4.16).

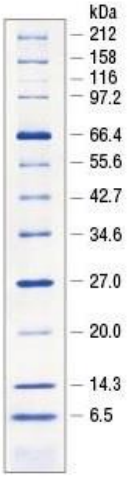


Şekil 4.14 BL21 agaroz jel görüntüsü (K: pET28-a-*erp*, 1-2-3-4: BL21'e klonlanmış rekombinant plazmitler).

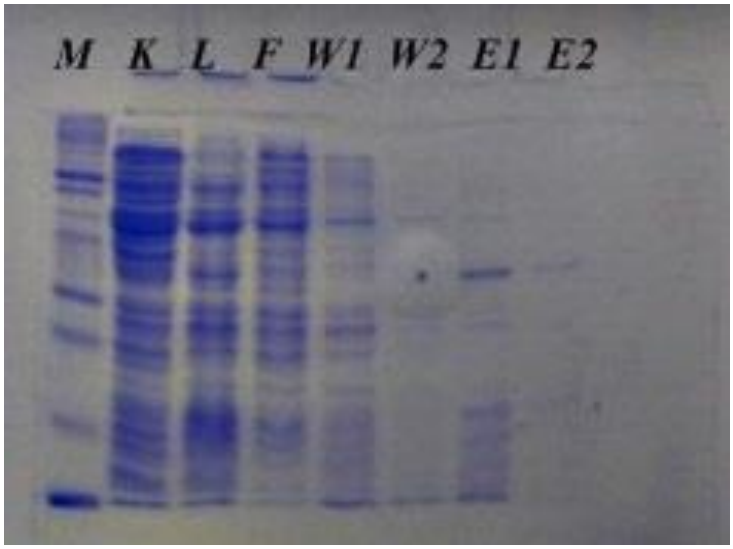
A)

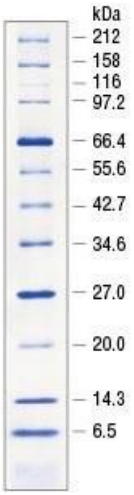


B)



Şekil 4.15 A) Rekombinant proteinin doğal koşullardaki nikel kolon uygulamasının SDS-PAGE görüntüsü (M: protein marker, K: IPTG eklenmemiş kontrol, L: IPTG eklenen kültür lizatı, F: kolona bağlanmayanlar, W: yıkama, E: elüsyon). B) Protein markerda bulunan bantların büyüklükleri

A) 

B) 

Şekil 4.16 A) Rekombinant proteinin denatüre koşullardaki nikel kolon uygulamasının SDS-PAGE görüntüsü (M: protein marker, K: IPTG eklenmemiş kontrol, L: IPTG eklenen kültür lizatı, F: kolona bağlanmayanlar, W: yıkama, E: elüsyon). B) Protein markerda bulunan bantların büyüklükleri.

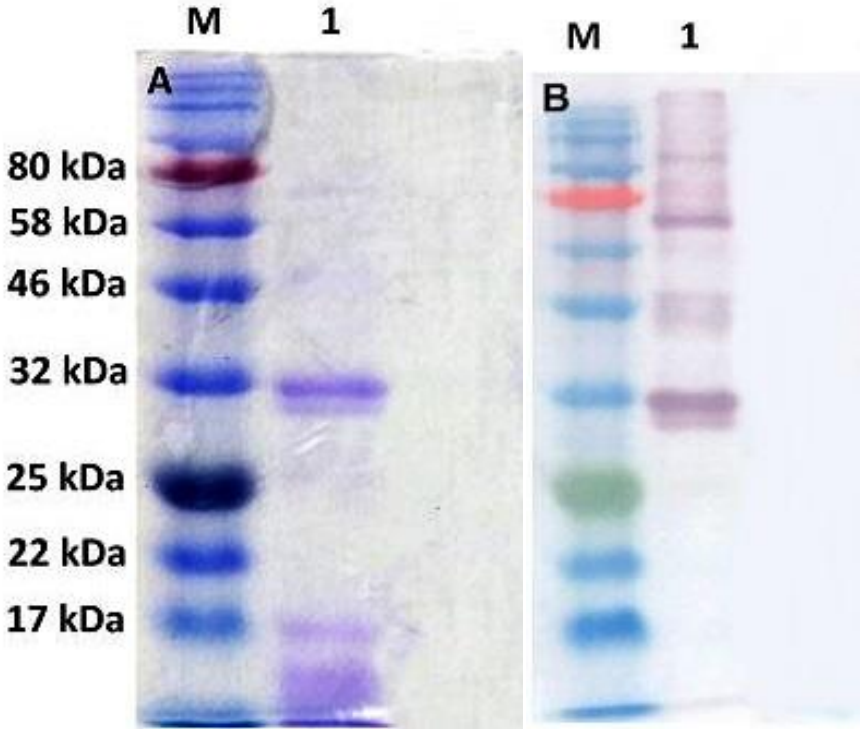
4.4 Protein Konsantrasyonun Ölçülmesi ve Aşı Formülasyonunun Hazırlanması

Saflaştırılan rekombinant Erp proteininin konsantrasyonu kantitatif olarak Bradford yöntemiyle ölçülmüştür. Rekombinant proteinin konsantrasyonu 1 mg/mL olarak ayarlanmıştır. GenoType MTBC (Hain Lifescience, Almanya) testi ile doğrulanan *M. tuberculosis* hasta izolatından klonlanan ve *E. coli*'de ifade edilip saflaştırılmış olan Erp proteininden 1 mg/mL konsantrasyonda stok hazırlanmıştır. 7:3 oranında Montanide ISA 720 VG adjuvan:antijen karıştırılarak aşı formülasyonu hazırlanmıştır. Aşı formülasyonu Luria Agar besiyerine ekim yapılarak aşıların steril oldukları doğrulanmıştır.

4.5 Western Blot

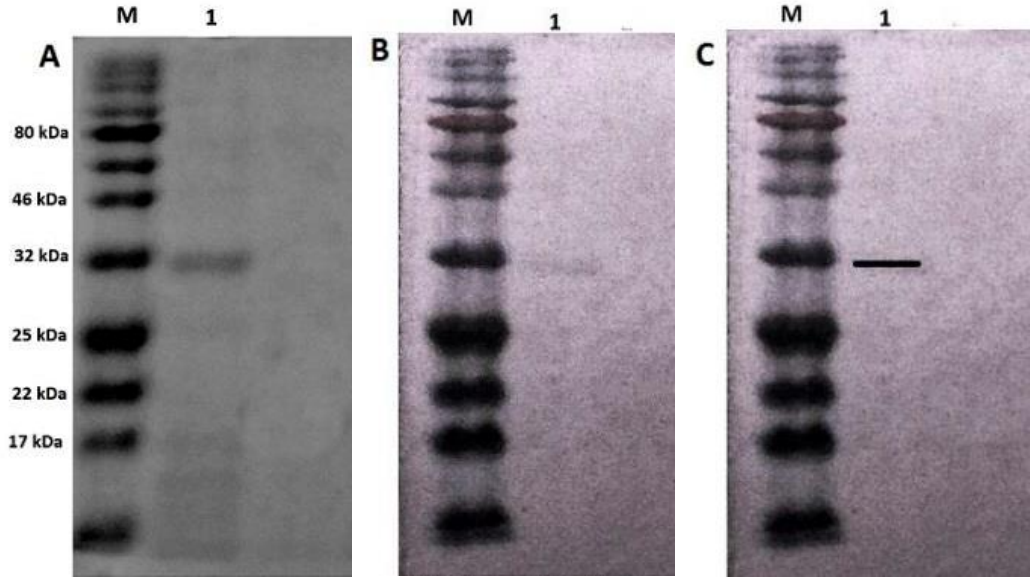
Rekombinant Erp proteinin BALB/c farelerde spesifik antikor üretimini kalitatif olarak analiz etmek için Western blot deneyi yapılmıştır. Expasy biyoinformatik programında hesaplanan (uçlarına eklenen 6 histidinle beraber) Erp proteinin moleküler ağırlığı 28,5 kDa olarak hesaplanmıştır. Erp proteinin SDS-PAGE analizi sonucu gözlenen

moleküler ağırlığı ise yaklaşık olarak 31 kDa olarak gözlenmiştir (Şekil 4.17 A). Ancak, proteinin katlanmalarından veya dimer oluşturma ihtimallerinden dolayı farklı moleküler ağırlıkta bantlar da gözlenmiştir. Bu nedenle rekombinant proteine özgü antikorların primer antikor olarak kullanıldığı Western blot analizi sonucunda yukarıda sayılan ana bantlara ek olarak başka bantlar da gözlenmiştir (Şekil 4.17 B).

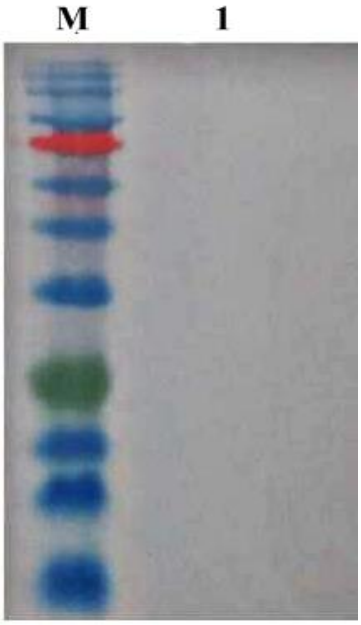


Şekil 4.17 Saflaştırılan Erp proteinine ait A) SDS-PAGE görüntüsü B) Western Blot görüntüsü (M: Prestained marker 1: Erp).

Primer antikor olarak BCG'ye özgü antikor kullanıldığında ana bantlara çapraz reaksiyon verdiği gözlenmiş (Şekil 4.18) ve adjuvana karşı oluşan antikorlar proteini tanımamıştır (Şekil 4.19). Fakat, *M. tuberculosis* Erp antijenini BCG'ye özgü antikorlar zayıf tanıdığından dolayı bantlar net olarak görüntülenememiştir.



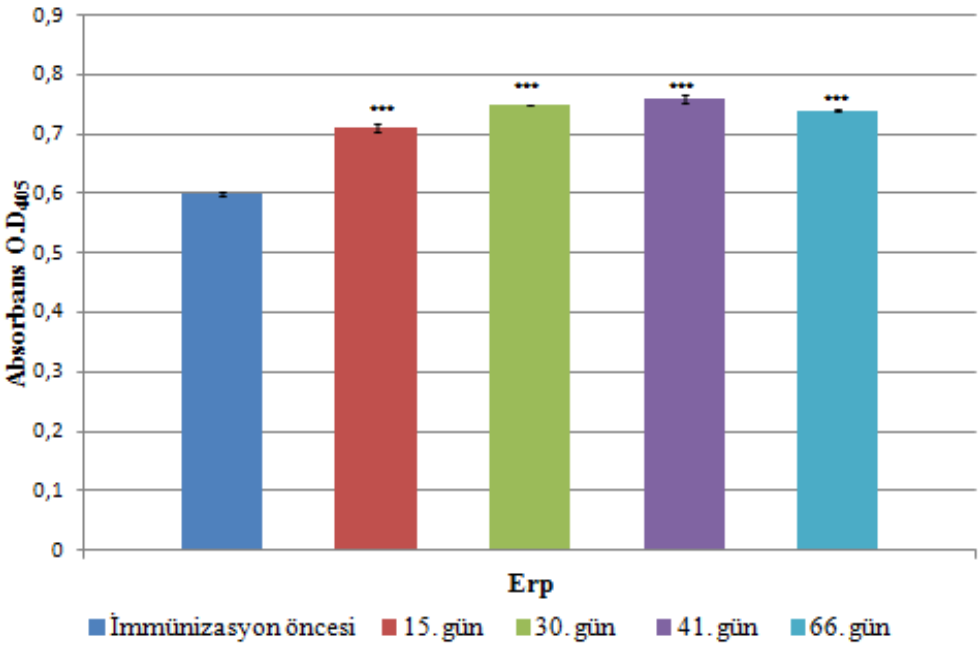
Şekil 4.18 Erp antijenine karşı BCG antikorunun çapraz reaksiyonunu gösteren Western blot deneyi (A: SDS-PAGE görüntüsü, B: Western blot görüntüsü, C: Bantların bulunduğu yerlerin çizgisel gösterimi. M: prestained marker, 1: Erp)



Şekil 4.19 Adjuvana karşı oluşan antikorların çapraz reaksiyonunu gösteren Western blot deneyi (M: prestained marker, 1: Erp)

4.6 Rekombinant Proteinin Bağışıklık Tepkileri

Rekombinant Erp'nin BALB/c farelerinde uyardığı hümoral bağışıklık (total IgG) ve hücresel bağışılık (IL-12, IFN-ɣ) düzeyi kantitatif olarak ELISA deneyi ile belirlenmiştir. İmmünizasyon öncesi değerleri ile immünizasyon sonrası değerler GraphPad Prism programında tek yönlü varyans analizi ve Dunnett testi yapılarak karşılaştırılmıştır. Total IgG seviyesinin belirlenmesi için kontrol grubu olarak immünizasyon öncesi değerleri kullanılmıştır. Elde edilen istatistiki anlam değerlerine göre ilk aşılama sonrası Erp tarafından %99,9 güvenilirlikte en iyi hümoral bağışıklık yanıtının tetiklendiği ve 66. güne kadar yüksek kaldığı görülmüştür (Şekil 4.20).

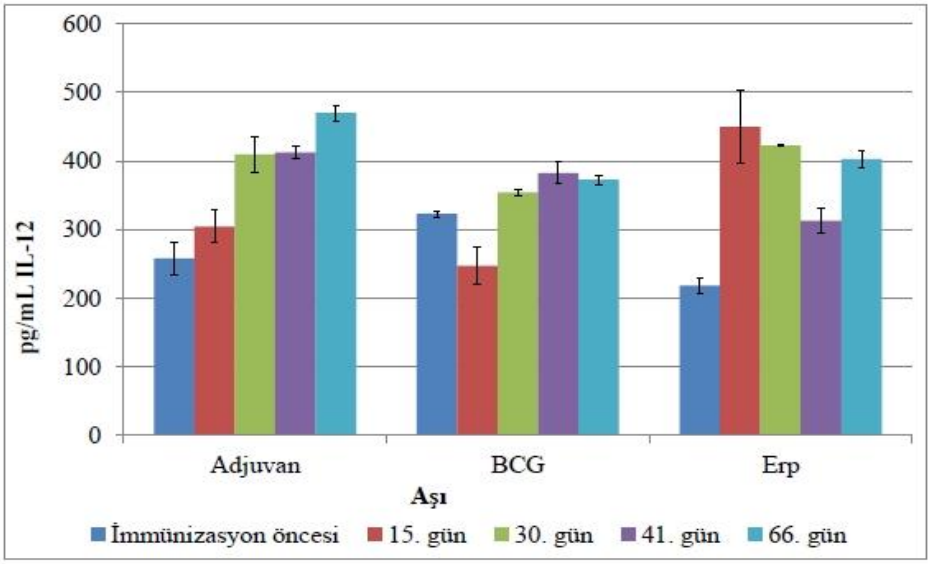


Şekil 4.20 Montanide ISA 720 VG adjuvanı ile hazırlanmış Erp'ye ait aşı formülasyonlarının BALB/c farelerdeki hümoral bağışıklık (total IgG) yanıtı. Serumların 1:800 seyreltme değerleri kullanılmıştır (***: $p<0,001$).

Farklı aşı gruplarına ait değerler birbirleri ile GraphPad Prism 5 programında tek yönlü varyans analizi ve Tukey's testi yapılarak karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.1, 4.2). Rekombinant Erp ile hazırlanan aşı formülasyonu ve ticari BCG aşısı ile Montanide ISA 720 VG adjuvanın BALB/c farelerinde uyardıkları hücresel bağışıklık düzeyi kantitatif olarak IL-12 ELISA deneyi ile analiz edilmiştir. Elde edilen istatistiki anlam

değerlerine göre adjuvan ve ticari BCG grubu arasında 15., 30., ve 41. günlerde anlamlı bir fark olmadığı ve son olarak 66. günde adjuvan grubunun ticari BCG grubuna kıyasla IL-12 seviyesini artırdığı görülmüştür. Adjuvan ve rekombinant Erp grubu arasında 15. ve 30. günlerde anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. 41. ve 66. günlerde adjuvanın IL-12 seviyesini Erp grubuna göre daha iyi artırdığı görülmüştür. Ticari BCG ve rekombinant Erp grubu arasında ise 15. ve 30. günlerde Erp'nin IL-12 seviyesinde artışa neden olduğu ve son olarak 41. günde IL-12 seviyesinin azaldığı ve ticari BCG grubunun altına düştüğü görülmüştür (Şekil 4.21).

Rekombinant Erp ile hazırlanan aşı formülasyonu ve ticari BCG aşısı ile Montanide ISA 720 VG adjuvanın BALB/c farelerinde uyardıkları hücresel bağışıklık düzeyi kantitatif olarak IFN-ɣ ELISA deneyi ile analiz edilmiştir Adjuvan ve ticari BCG grubu arasında 15. ve 30. günlerde anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. 41. ve 66. günlerde ise BCG grubunun IFN-ɣ seviyesini artırdığı görülmüştür. Adjuvan ve rekombinant Erp grubu arasında ise 30. ve 66. günlerde anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. 15. ve 41. günlerde ise Erp grubunun IFN-ɣ seviyesini artırdığı görülmüştür. Ticari BCG ve rekombinant Erp grupları arasında ise sadece 66. günde BCG'nin IFN-ɣ seviyesini artdırdığı görülmüştür. Diğer günlerde iki grup arsında anlamlı fark yoktur (Şekil 4.22).

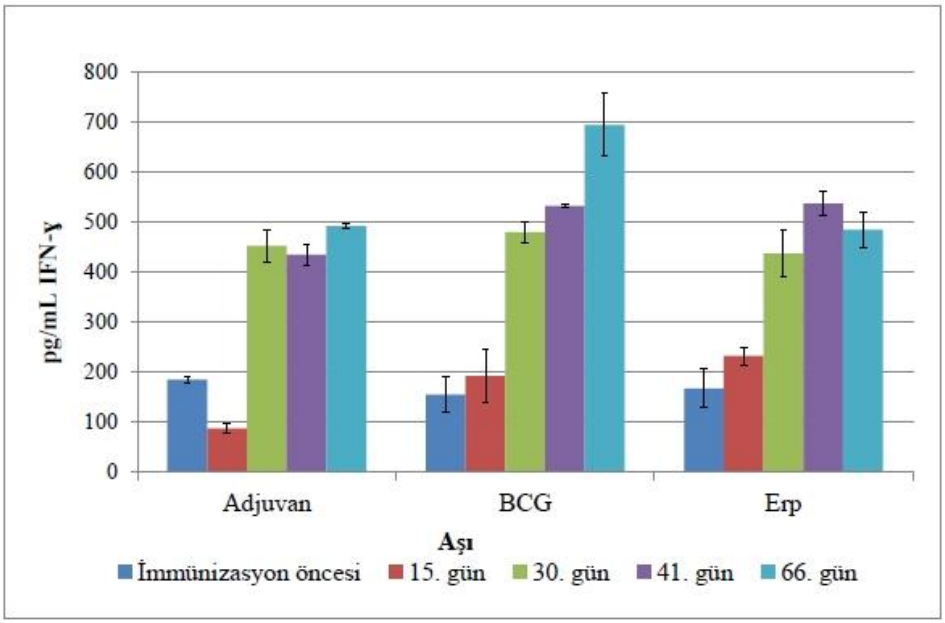


Şekil 4.21 Montanide ISA 720 VG adjuvanı ile hazırlanmış Erp'ye ait aşı formülasyonun BALB/c farelerdeki serum IL-12 seviyesi

Çizelge 4.1 Farklı aşı gruplarının BALB/c farelerdeki serum IL-12 düzeylerinin tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey's testi ile karşılaştırılması

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

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



Şekil 4.22 Montanide ISA 720 VG adjuvanı ile hazırlanmış Erp'ye ait aşı formülasyonlarının BALB/c farelerdeki serum IFN-ɣ seviyesi.

Çizelge 4.2 Farklı aşı gruplarının BALB/c farelerdeki serum IFN-γ düzeylerinin tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey's testi ile karşılaştırılması

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

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

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tüberküloz, *M. tuberculosis'*in neden olduğu enfeksiyondan kaynaklanan ve dünya çapında varlığını hala devam ettiren önemli bir hastalıktır (Taylor *et al.* 2003). *M. tuberculosis* enfeksiyonuna karşı sınırlı bir koruma sağlayan dünyadaki tek lisanslı tüberküloz aşısı *M. bovis* Bacillus Calmette Guerin (BCG)'dir (Li *et al.* 2014). Canlı zayıflatılmış ve rekombinant aşılar gibi birçok yeni tüberküloz aşı preparatı deneysel olarak araştırılmaktadır (Li *et al.* 1999). Tüberküloz hastalığını tüberküloz enfeksiyonundan ayırt edebilmek için yeni antijenleri tanımlamak gereklidir. Yakın zamanda tanımlanan bir *M. tuberculosis* proteini olan Erp (exported repetitive protein)'ye verilen hücresel ve hümoral bağışıklık yanıtları, insanlarda henüz araştırılmamıştır ve bunun için çalışmalar başlatılabilir (Martinez *et al.* 2007). Alt ünite tüberküloz aşısı geliştirilirken, koruyucu bir bağışıklık yanıtı elde etmek için etkin bir yardımcı madde (adjuvan) kullanılması gerekmektedir. Yağ bazlı bir adjuvan olan Montanide ISA 720 (SEPPIC, Paris, Fransa)'nin insan aşılarında kullanımı onaylanmış olup güçlü IFN-γ ve IL-12 cevabı oluşturmaktadır (Osorio *et al.* 2004).

Son yıllarda yapılan çalışmalar tüberküloza yeni aş geliştirme üzerine olmaktadır. Bu çalışmalar arasında rekombinant aşı çalışmalarıda bulunmaktadır. Bazı çalışmalar ise DNA aşısı geliştirme ve BCG ile birleştirilmiş aşılar üzerinedir. Bu çalışmalarda çoğunlukla proteinin füzyonu ile elde edilen aşılar denenmektedir. Bilinen antijenlerin kullanıldığı çalışmalar dışında tüberküloz aşısı geliştirmek için yeni antijen adayları da araştırılmaktadır.

erp geninin bozulması durumunda hem hücre kültürü deneylerinde in-vitro hem de enfeksiyon oluşturularak yapılan fare modelinde in-vivo büyümeyi düşürdüğü ve virülansta belirgin bir azalma ile sonuçlandığı rapor edilmiştir (de Mendonça-Lima *et al.* 2003). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda ise *erp* alelinin enfekte hayvanların akciğer lezyonlarının sayısını ve boyutunu güçlü bir şekilde etkilediği gösterilmiştir. Bu nedenle *erp*'nin kritik bir virülans faktörü olduğu belirtilmiştir (Kocincova *et al.* 2004). Berthert ve arkadaşları (1998) yaptıkları bir çalışmada *M. tuberculosis* ve *M. bovis erp*

geninin bozulması ile yapılan virulans çalışmalarında mutant bakterilerin büyümede zayıfladığını ortaya koymuştur. Aynı zamanda *erp* işlevinin *M. tuberculosis* ve *M. marinum*'un virülansına benzer şekilde gerekli olduğu rapor edilmiştir (Cosma *et al.* 2006). Solans ve arkadaşları (2014)'te *erp* geninin inaktivasyonu ile yapılan bir canlı aşı çalışmasında *erp*'nin *M. tuberculosis* hücre içi replikasyonunda rol alan bir virülans faktörü olduğunu belirtmiş ve aynı zamanda yapılan aşılamalarda BCG'ye kıyasla daha önemli bağışıklık yanıtı verdiğini rapor etmiştir. Aynı zamanda, Erp'nin insanlarda tübeküloz enfeksiyonu ile hastalığını ayırt etmede de kullanılabileceği gösterilmiştir (Martinez *et al.* 2007). Gurung ve arkadaşları (2014)'nın yaptıkları bir çalışmada *M. avium*'a karşı rekombinant aşı geliştirme çalışmalarında Montanide adjuvanının MAP2698c ve MAP3567 proteinleriyle birlikte kuvvetli bir IFN-γ cevabı oluşturduğunu göstermiştir.

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). Ag85A, Ag85B ve TB10.4 antijenlerini ifade eden adenovirüs ile oluşturulmuş AERAS-402 aşısının makaklarda güçlü bir hücresel bağışıklık yanıtı oluşturduğunu fakat yüksek dozdaki *M. tuberculosis*'e karşı koruyucu olmadığı bildirilmiştir (Darrah *et al.* 2014). *M. tuberculosis*'e ait Ag85B ve ESAT-6 proteinlerinden oluşan füzyonun makakları koruduğu ve koruyucu immün yanıtları indüklediği (IgG ve IFN-ɣ) rapor edilmiştir (Langermans *et al.* 2005). Li ve arkadaşları (2014),'ı *M. tuberculosis* antijenlerini (CFP10, ESAT6, Ag85A ve Ag85B) ifade eden rekombinant bir adenovirüs (Ad5-CEAB) oluşturmuşlardır. Ad5-CEAB'ın özellikle IgG, IFN-ɣ ve IL-12 ile karakterize edilen hümoral ve hücresel bağışıklık tepkisi ortaya çıkardığını göstermişlerdir. Zhao ve arkadaşları (2012) *M. tuberculosis*'e ait HBHA ile insan IL12 füzyonunu ekspres eden rekombinant *M. smegmatis* suşu oluşturmuşlardır. Kontrol grubuna kıyasla aşılanan grupların IFN-ɣ ve IL-12 seviyesinin önemli derecede artış gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Bununla birlikte aşılanmış farelerin *M. tuberculosis*'in büyümesini engellediğini rapor etmişlerdir. Lu ve arkadaşları (2014) Ag85B ve ESAT6-CFP10

füzyonu ile bacillus Calmette-Guerin CpG ve alum adjuvan sisteminden oluşan AEC/BC02 aşısının farelerde bağışıklığı tetiklediğini ve aynı zamanda kobaylarda da koruma sağladığını belirtmiştir. Aşının farklı zamanlarda farelerde antijen spesifik IFN-ɣ salgılayan T hücrelerinin yüksek bir frekansı ile karakterize edilen güçlü bir hücresel bağışıklık tepkisi uyandırdığını belirtmiştir.

M. tuberculosis'e ait ESAT-6, MPT-64, KatG ve HBHA'nın doku plazminojen aktivatör (TPA) sinyal dizisi ile füzyonundan oluşan bir DNA aşısı oluşturulmuştur. Dört antijenden yalnızca ESAT-6'nın kontroller ile karşılaştırıldığında enfeksiyonun yayılmasını engellediği görülmüştür. Aynı zamanda yüksek düzeyde hümoral ve koruyucu bağışıklık tepkileri verdiği rapor edilmiştir (Li *et al.* 1999). Delogu ve Brennan (2001) hücre yüzey proteinlerini kodlayan PE ve PE_PGRS genlerinin farelerde koruyuculuğunu denemek için DNA aşısı çalışmaları yapmışlardır. Aşının hümoral bağışıklık tepkisini serumdaki IgG seviyesi ile hücresel bağışıklık tepkisini serum IFN-ɣ seviyesi ile ölçmüşlerdir. Elde ettikleri verilere göre aşılanan farelerin güçlü bağışıklık yanıtı oluşturduğunu göstermişlerdir. IFN-ɣ seviyesini oldukça yüksek bulmuşlardır. Kita ve arkadaşları (2005) virüs lipozomunu kullanarak mikobakteriyel ısı şoku protein 65'i (Hsp65) ve interlökin-12'yi (IL-12) ifade eden bir DNA aşı kombinasyonunu ve 72f füzyon genini barındıran rekombinant bir BCG'yi (72f rBCG) içeren iki yeni tüberküloz aşısı geliştirmişlerdir. HSP65+IL-12 ve aynı zamanda 72f rBCG aşıları ile aşılama sonucunda BCG'ye göre bağışıklık yanıtlarının değerlendirilmesinde daha iyi koruyucu etkinlik sağladığını göstermiştir. Liang ve arkadaşları (2017) *rv2190c* veya *ag85a* genleri ile hazırlanmış olan DNA aşıları ile ilgili yaptıkları bir çalışmada aşılanan farelerin kontrol grubuna kıyasla IFN-γ seviyesinin arttığını, akciğer ve dalakta tutunan *M. tuberculosis* varlığında düşüş gözlendiğini rapor etmiştir. Kimerik Ag85A/B DNA aşısının *M. tuberculosis* ile enfekte olmuş farelerde tedavi edici olduğu gösterilmiştir (Liang *et al.* 2012). Bunun yanı sıra, Lee ve arkadşlarının (2014) yaptıkları bir çalışmada RpfB DNA aşısının farelerde *M. tuberculosis*'e spesifik T hücresi cevabını tetiklediğini bildirmiştir.

Marcus ve arkadaşları (2015) yaptıkları bir çalışmada tüberküloz ile ilgili problemleri çözmek için iki yeni canlı zayıflatılmış aşı adayı (*mosR ve echA7*) tasarlamıştır. Elde

edilen verilere göre BCG'ye kıyasla hem mosR hem de echA7 aşılarının daha güçlü bir şekilde CD4+IFN-ɣ bağışıklık tepkisi oluşturduğunu belirtmişlerdir. Horwitz ve arkadaşları (2006) yaptıkları bir çalışmada *M. tuberculosis*'e ait 30-kDa majör sekresyon proteinini ekspres eden rekombinant *M. bovis* BCG (rBCG30) suşunu kobay üzerinde denemişlerdir. 30-kDa majör proteinine karşı önemli derecede hücresel ve hümoral bağışıklık tepkilerinin oluştuğunu belirtmişlerdir. Orr ve arkadaşları (2014) yaptıkları bir çalışmada 84 rekombinant *M. tuberculosis* proteininin immunodominant hiyerarşisini tanımlamışlardır. Güçlü koruyucu etkisi olan iki protein füzyonu gerçekleştirmişler ve bu füzyon proteinlerini adjuvan ile birleştirdiklerinde sağlam bir Th1 yanıtının oluştuğunu gözlemlemişlerdir. Skeiky ve arkadaşları (2004) *M. tuberculosis*'e ait 72 kDa'luk bir poliproteinin hem DNA hem de protein aşısı şeklinde farelerde ve kobaylarda koruyucu olduğunu rapor etmiştir. Xue ve arkadaşları (2012), *M. tuberculosis*'e ait RpfE proteini rekombinant olarak saflaştırmış ve farelerde bağışıklık yanıtını tetiklediğini bildirmiştir.

Bu çalışmada rekombinant Erp'nin Montanide ISA 720 adjuvanı ile oluşturulan aşı formülasyonunun BALB/c farelerdeki hücresel bağışıklık yanıtı serum interferon-gama (IFN-ɣ) ve interlökin-12 (IL-12) seviyeleri ile ölçüldü. Erp aşı formülasyonunun IFN-ɣ seviyesini artırmada BCG kadar etkili olduğu görüldü. Bununla birlikte Erp formülasyonunun 15. ve 30. günlerde BCG'den daha yüksek IL-12 seviyesi sağladığı gözlendi. Aynı zamanda rekombinant Erp ve Montanide ISA 720 adjuvanı ile oluşturulan formülasyonun BALB/c farelerde antikor (IgG) seviyesini önemli derecede artırdığı gözlendi.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında, Türkiye'deki bir hastadan izole edilmiş *M. tuberculosis* suşundan klonlanarak *E. coli*'de ifade edilen, saflaştırılıp Montanide ISA 720 VG adjuvanı ile formülize edilen rekombinant Erp'nin BALB/c farelerde tetikledikleri hümoral ve hücresel bağışıklık yanıtı incelendi. Bu formülasyonun antikor düzeyini artırmada başarılı olduğu, serum IFN-γ ve IL-12 seviyesini artırmada değişkenlik gösterdiği belirlendi. IL-12 seviyesini IFN-γ seviyesine göre daha iyi uyardığı gözlendi. IFN-γ ve IL-12 seviyelerinin genel olarak ticari BCG aşısı ile aynı düzeyde olduğu ve Erp formülasyonunun hücresel bağışıklığı tetiklemede BCG aşısı

kadar etkili olduğu tespit edildi. Elde edilen bu verilere göre rekombinant Erp aşı formülasyonunun hücresel bağışıklıktan ziyade hümoral bağışıklığı daha iyi tetiklediği söylenebilir. Tüberküloza karşı aşı geliştirme çalışmalarının çoğunda hücresel bağışıklık yanıtı üzerinde durulmuştur. Fakat Prados-Rosales ve arkadaşları (2017)'nın yaptıkları çalışmada mikobakteriyel kapsüler arabinomannan (AM) ve Ag85b ile elde edilmiş polisakkarit konjügatın farelerde antikor (IgG) üretiminde artış sağladığı ve kontrol grubu ile kıyaslandığında akciğer ve dalakta bulunan *M. tuberculosis* sayısında düşüş gözlenmiştir. Bu çalışmada da rekombinant Erp ve Montanide ISA 720 adjuvanı ile oluşturulan formülasyonun BALB/c farelerde antikor düzeyini önemli miktarda artırdığı gözlenmiştir.

Bundan sonra yapılacak olan çalışmalarda, Erp ile birlikte hücresel ve hümoral bağışıklığı tetikleyen *M. tuberculosis* antijen proteinleri kullanılarak oluşturulacak ikili veya üçlü füzyonların daha etkili olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, hücresel yanıtı artırmak için farklı adjuvanlar da kullanılabilir. Bunun yanı sıra, bu aşı formülasyonunun fare dalak ve akciğerinde *M. tuberculosis* tutunmasını nasıl etkiledikleri ile ilgili koruyucu etki çalışmaları da yapılabilir.

KAYNAKLAR

Abbas, A.K. and Lıtchman, A.H. 2003. Cellular and Molecular Immunology. 5th Ed.USA: Elsevier.

Ada, G. 2003. Overview of vaccines. In: Vaccine protocols (2nd ed.). Edited by Robinson, A., Hudson, M.J., Cranage, M.P. Humana Press, New Jersey, USA. pp. 1-14.

Adams, L.G., Khare, S., Lawhon, S.D., Rosetti, C.A., Lewin, H.A., Lipton, M.S., Turse, J.E., Wylie, D.C., Bai, Y. and Drake, K.L. 2011. Enhancing the role of veterinary vaccines reducing zootonic diseases of humans: Linking systems biology with vaccine development. *Vaccine* doi: 10.1016/j.vaccine.2011.05.08.

Agarwal, N., Lamichhane, G., Gupta, R., Nolan, S. and Bishai, W. R. 2009. Cyclic ampintoxication of macrophages by a *Mycobacterium tuberculosis* adenylate cyclase, Nature, 460 (7251), 98-102.

Agger, E. M. and Andersen P. 2001. Tuberculosis subunit vaccine development: on the role of interferon-ɣ. Vaccine, 19; 2298-2302.

Akşit, S. 2012. Aşılarla İlgili Genel Kurallar. Klinik Gelişim Dergisi, 25: 4-11. İzmir.

Arnon, R. 2011. Overview of vaccine strategies. In: Vaccine design: innovative approaches and novel strategies. Edited by Rappuoli, R. and Bagnoli, F. Caister Academic Press, Norfolk, UK. pp. 1-17.

Aronson, N., Santosham, M. and Comstock, G. 2004. Long-term efficacy of BCG vaccine in American Indians and Alaska Natives: A 60-year follow-up study. JAMA, 291; 2086-2091.

Aslan, G., Kuyucu, N., Çalıkoğlu, M., Ersöz, G., Ülger, M., Günal, S. ve Emekdaş, G. 2009. Mycobacterıum Bovıs'in Etken Olduğu Tüberküloz Olguları. ANKEM Dergisi, 23(4); 182-187.

Baldwin, L. S., Bertholet, S., Reese, V. A., Ching, L. K., Reed, S. G. and Coler, R. N. 2012. The Importance of Adjuvant Formulation in the Development of a Tuberculosis Vaccine. J Immunol, 188; 2189-2197.

Berthert, F., Rauzier, J., Lim, E., Philipp, W., Gicquel, B. and Portnoi, D. 1995. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis erp* gene encoding a potential cell surface protein with repetitive structures. Microbiology, 141; 2123–2130.

Berthert, F., Lagranderie, M., Gounon, P., Laurent-Winter, C., Ensergueix, D., Chavarot, P., Thouron, F., Maranghi, E., Pelicic, V., Portnoi, D., Marchal, G. and Gicquel, B. 1998. Attenuation of virulence by disruption of the *Mycobacterium tuberculosis erp* gene. Science, 282; 759–762.

Bhamidi, S. 2009. Mycobacterial cell wall arabinogalactan. bacterial polysaccharides: current ınnovations and future trends. Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-45-5.

Brennan, P. 2003. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb); 83: 91-7.

Brennan, M. J., Fruth, U. and Milstien, J. 2007. Development of New Tuberculosis Vaccines: A Global Perspective on Regulatory Issues. PLoS Medicine, 4; 1299-1302.

Brosch, R., Gordon, S. and Eiglmeier, K. 2000. Genomics, biology, and evolution of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. In: Hatfull GF, Jacobs WR Jr; eds. Molecular Genetics of Mycobacteria. 1st ed. Washington, DC: ASM Press;: 19-36.

Brosch, R., Gordon, S., Marmiesse, M., Brodin,P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., Gutierrez,C., Hewinson, G., Kremer, K., Parsons, M., Pym, A., Samper,S., Soolingen, van D. and Cole, S. 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. PNAS, 99 (6); 3684-3689.

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

Cosma, C. L., Klein, K., Kim, R., Beery, D. and Ramakrishnan, L. 2006. Mycobacterium marinum Erp Is a Virulence Determinant Required for Cell Wall Integrity and Intracellular Survival. Infection and Immunity, 74 (6); 3125-3133.

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

de Mendonça-Lima, L., Picardeau, M., Raynaud, C., Rauzier, J., de la Salmoniere, Y., Barker, L., Bigi, F., Cataldi, A., Gicquel, B. and Reyrat, J. 2001. Erp, an extracellular protein family specific to mycobacteria. Microbiology, 147 (8); 2315-2320.

de Mendonça-Lima, L., Bordat, Y., Pivert, E., Recchi, C., Neyrolles, O., Maitournam, A., Gicquel, B., Reyrat, J. M. 2003. The allele encoding the mycobacterial Erp protein affects lung disease in mice. Cellular Microbiology, 5 (1); 65-73

Desmond, E., Ahmed, A. T., Probert, W. S., Ely, J., Jang, Y., Sanders, C. A., Lin, S. and Flood, J. 2004. *Mycobacterium africanum* Cases, California. Emerging Infectious Diseases, 10 (5); 921-923.

Di Pasquale, A., Preiss, S., Da Silva, F. T. and Garçon, N. 2015. Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. Vaccines (Basel), 3(2); 320-343.

Dünya Sağlık Örgütü, 2017. World Health Organization Global Tuberculosis Report, 2016. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en. Son erişim tarihi: 18.02.2017

Ehebauer, M. T. and Wilmanns, M. 2011. The progress made in determining the *Mycobacterium tuberculosis* structural proteome. Proteomics, 11, 3128–3133.

Engleberg, N. C., Dirita, V. J. and Dermody, T. S. 2013. Mechanisms of Microbial Disease 5th ed. Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, 257-269.

Forrellad, M., Klepp, L., Gioffre, A., Sabio y García, J., Morbidoni, H., de la Paz Santangelo, M., Cataldi, A. and Bigi, F. 2012. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex.Virulence, 4 (1); 3-66.

Frothingham, R., Hills, H. G. and Wilson K. H. 1994. Extensive DNA Sequence Conservation throughout the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. Journal of Clinical Microbiology, 32 (7); 1639-1643.

Ganaie, A. A.,Trivedi, G.,Kaur, A.,Jha, S. S.,Anand, S.,Rana, V.,Singh, A.,Kumar, S. and Sharma, C. 2016. Interaction of Erp Protein of *Mycobacterium tuberculosis* with Rv2212 Enhances Intracellular Survival of *Mycobacterium smegmatis*. J Bacteriol, 198(20); 2841-2852.

Gao, Q., Kripke, K. and Arinc., Z. 2004. Comparative expression studies of a complex phenotype: cord formation in *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb). 84: 188-96.

Gökçay, G., Partalci, A., Bas, F. and Neyzi, O. 2000. Tuberculin reactivity in young children following neonatal BCG vaccination. J Trop Pediatr. 46: 51-2.

Grange, J. M., Gibson, J. and Osborn, TW. 1983. What is BCG? Tubercle, 64; 129-139.

Griffith, D. 1999. Nontuberculosis Mycobacteria. D Armstrong, J Cohen (ed) Infectious Diseases, Mosby, London.

Gurung, R. B., Purdie, A. C., Whittington, R. J., Begg, D. J. 2014. "Cellular and humoral immune responses in sheep vaccinated with candidate antigens MAP2698c and MAP3567 from *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*", Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 4, 93.

Gutierrez, MC., Brisse, S. and Brosch, R. 2005. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS Pathog, 1 (5); 52-62.

Horwitz, M. A., Harth, G., Dillon, Barbara, J. and Maslesa-Galic, S. 2006. A novel live recombinant mycobacterial vaccine against bovine tuberculosis more potent than BCG. UC Los Angeles Postprints.

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

Kıter, G. ve Uçan, E.S. 2001. Tüberkülozdan korunma. Toraks Dergisi, 2(1):85-90.

Kita, Y., Tanaka, T., Yoshida, S., Ohara, N., Kaneda,Y., Kuwayama, S., Muraki, Y., Kanamaru, N., Hashimoto, S., Takai, H. and *et al.* 2005. Novel recombinant BCG and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. Vaccine, 2132-2135.

Klegerman, M.E. 1992. Vaccines. Pharmaceutical Biotechnology. Interpharm Press. p.:64-76

Kocagöz, S. 2014. Aşı teknolojileri ve aşı tipleri. Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi.

Kocincova, D., Sonden, B., Bordat, Y., Pivert, E., de Mendonca-Lima, L., Gicquel, B. and Reyra, J. M. 2004. The Hydrophobic Domain of the Mycobacterial Erp Protein Is Not Essential for the Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. Infectıon And Immunıty, 72 (4); 2379-2382.

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.

Langermans, J. A., Doherty, T. M., Vervenne, R. A., van der Laan, T., Lyashchenko, K., Greenwald, R., Agger, E. M., Aagaard, C., Weiler, H., van Soolingen, D., Dalemans, W., Thomas, A. W. and Andersen, P. 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.

Lee, J., Kim, J., Lee, J., Shin, S. J., Shin, E. C. 2014. DNA immunization of *Mycobacterium tuberculosis* resuscitation-promoting factor B elicits polyfunctional CD8(+) T cell responses. Clinical and Experimental Vaccine Research, 3 (2), 235-243.

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

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

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.

Lin, M. Y. and Ottenhoff, T.H. 2008. New insights into host-pathogen interactions identify new targets for vaccination against latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. Biol Chem, 389; 497-511.

Lisby, G. 1999. Application of nucleic acid amplifi cation in clinical microbiology. Mol Biotechnol, 12; 75-99.

Lu, J. B., Chen, B. W., Wang, G. Z., Fu, L. L., Shen, X. B., Su, C., Du, W. X., Yang, L. and Xu, M. 2014. 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, pii: S1684-1182(14)00060-7. doi: 10.1016/j.jmii.2014.03.005.

Marcus, S. A., Steinberga, H. and Talaat A. M. 2015. Protection by novel vaccine candidates, *Mycobacterium tuberculosis* mosR and echA7, against challenge with a *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain. Vaccine.

Martin, C. 2005. The dream of a vaccine against tuberculosis; new vaccines improving or replacing BCG? Eur Respir J. 26; 162-167.

Martinez, V., Carcelain, G., Badell, E., Jouan, M., Mauger, I., Sellier, P., Truffot, C., Bricaire, F., Arend, S. M., Ottenhoff, T., Autran, B. and Gicquel, B. 2007. T-cell and serological responses to Erp, an exported *Mycobacterium tuberculosis* protein, in tuberculosis patients and healthy individuals. BMC Infectious Diseases, 7;83.

Matthias, D. M., Garrıson, M. M., Nelson, C., Newland, S. and Robertson, J. (2007). Freezing temperatures in the vaccine cold chain: A systematic literature review. *Vaccine*, 25; 3980-3986.

Niederweis, M. 2003. Mycobacterial porins: new channel proteins in unique outer membranes. Mol Microbiol. 49; 1167-1177.

Nikiforuk, A. 2000. Mahşerin Dört Atlısı. İletişim Yayıncılık A.Ş. İstanbul; Sayfa: 49-66.

Orr, M. T., Ireton, G. C., Beebe, E. A., Huang, P. W., Reese, V. A, Argilla, D., Coler, R. N. and Reed, S. G. 2014. Immune subdominant antigens as vaccine candidates against *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Immunology, pii: 1401103.

Osorio, Y., Cohen, J., Ghiasi, H. 2004. "Improved protection from primary ocular HSV-1 infection and establishment of latency using multigenic DNA vaccines", Investigative Ophthalmology and Visual Science, 45 (2), 506-514.

Öner, F. ve Eratalay, A. 2001 Aşılar ve Adjuvanları. J. *Pharm. Sci.*, 25, 21-33.

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

Pym, A. and Small, P. 2006. Mycobacterial evolution: Insights from genomics and population genetics. In: Seifert HS, Dirita VJ; eds. Evolution of Microbial Pathogens. 1st ed. Washington, DC: ASM Press; 301-325.

Rastogi, N., Legrand, E. and Sola, C. 2001. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. Sci. Tech., 20 (1); 21-54.

Rieder H.L. 1999. Epidemiologic Basis of Tuberculosis. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. Paris.

Ryll, R., Kumazawa, Y. and Yano, I. 2001. Immunological properties of trehalose dimycolate (cord factor) and other mycolic acid-containing glycolipids review. Microbiol Immunol; 45: 801-11.

Sakula A. 1983. BCG: Who were Calmette and Guerin? Thorax, 38; 806–12.

Skerman, V., McGowan, V. and Sneath, P. 1980. Approved Lists of Bacterial Names. Int J Syst Bacteriol, 30 (1); 225–420.

Skeiky, Y. A., Alderson, M. R., Ovendale, P. J., Guderian, J. A., Brandt, L., Dillon, D. C., Campos-Neto, A., Lobet, Y., Dalemans, W., Orme, I. M. and Reed, S. G. 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.

Smith, N. H., Crawshaw, T., Parry, J. and Birtles, R. J. 2009. Mycobacterium microti: More Diverse than Previously Thought. Journal Of Clinical Microbiology, 47 (8); 2551-2559.

Solans, L., Uranga, S., Aguilo, N., Arnal, C., Gomez, A.B., Monzon, M., Badiola, J. J., Gicquel, B. and Martin, C. 2014. Hyper-attenuated MTBVAC *erp* mutant protects against tuberculosis in mice. Vaccine, 32(40); 5192-5197.

Stead, W. 1996. Epidemiology of the global distribution of tuberculosis. In: Koprowski H, Oldstone MBA. Eds. Microbe Hunters. Then and Now. Medi- Ed Pres; 23: 311- 317

Tang, J., Yam, W. C. and Chen, Z. 2016. *Mycobacterium tuberculosis* infection and vaccine development. Tuberculosis 98, 30-41.

Taylor, G. M., Stewart, GR. and Cooke, M. 2003. Koch's bacillus - a look at the fi rst isolate of *Mycobacterium tuberculosis* from a modern perspective. Microbiology, 149; 3213-3220.

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

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

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 2017. http://tuberkuloz.thsk.saglik.gov.tr. Son erişim tarihi: 18.02.2017.

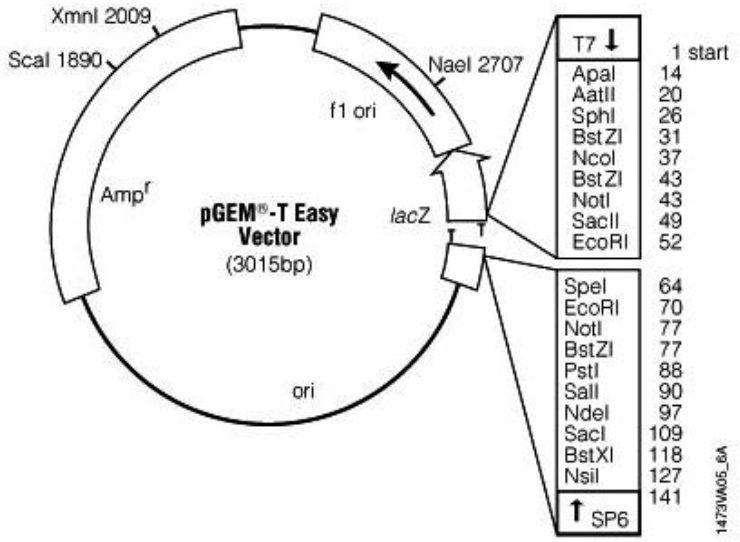
Van-Deun, A., Hossain, M. A., Gumusboga, M. and Rieder, H. L. 2008. Ziehl-Neelsen staining: theory and practice. Int J Tuberc Lung Dis. 12: 108-10.

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

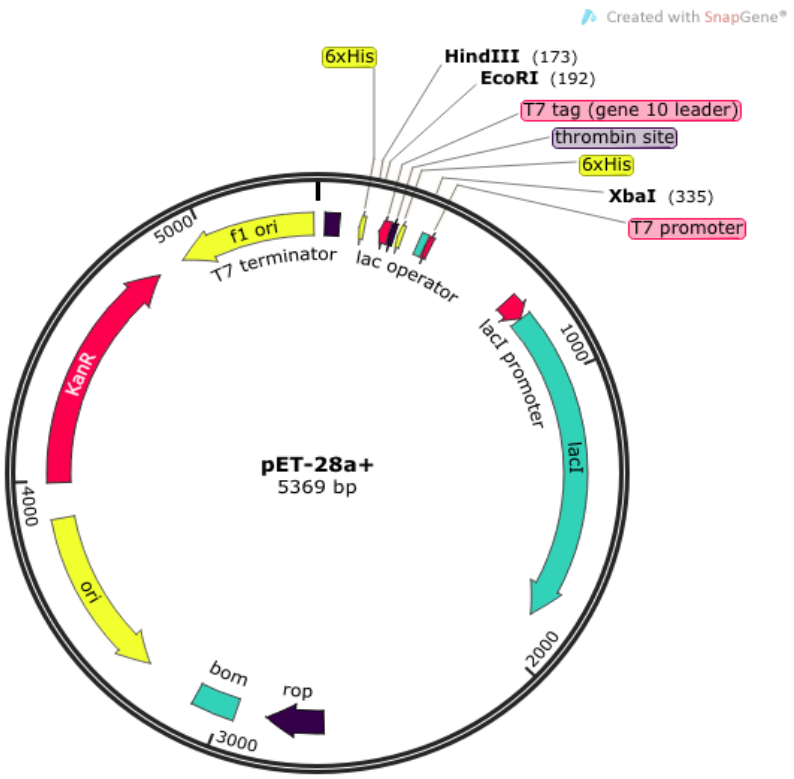
Zhang, M., Dong, C. and Xiong, S. 2017. Vesicular stomatitis virus-vectored multi-antigen tuberculosis vaccine limits bacterial proliferation in mice following a single intranasal dose. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 7, 34.

Zhao, S., Zhao, Y., Mao, F., Zhang, C., Bai, B. *et al.* 2012. Protective and therapeutic efficacy of *Mycobacterium smegmatis* expressing HBHA-hIL12 fusion protein against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. PLoS ONE, 7 (2); e31908.

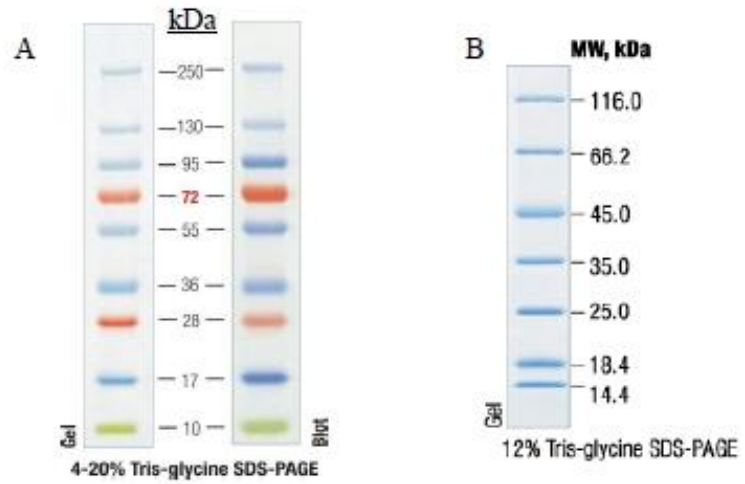
Ek-1 Plazmitler ve Boyut Belirteçleri



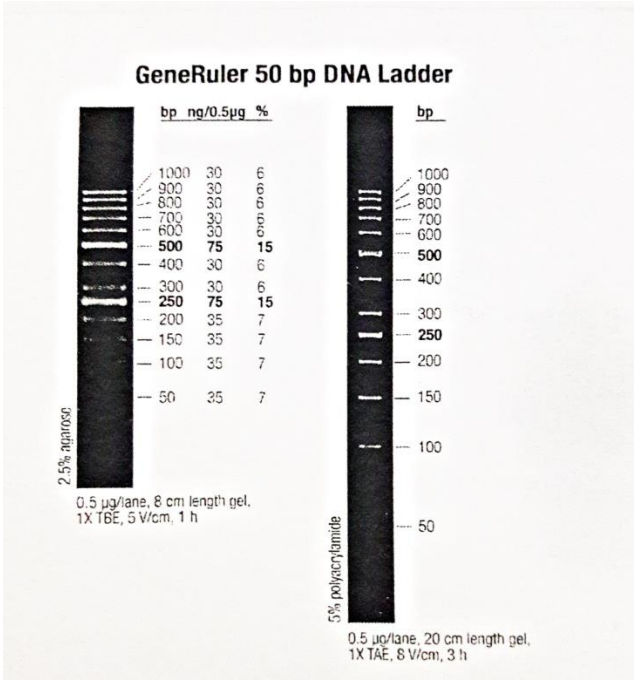
Şekil 1 pGEM-T® Easy klonlama vektörü (Promega #A1360)



Şekil 2 pET-28a(+) His-tag ekspresyon vektörü (Novagen #69864-3)



Şekil 3 A) PageRuler™ Plus Prestained protein marker (Fermentas), B) Unstained protein moleküler ağırlık marker (Fermentas)



Şekil 4 GeneRuler 50 bp DNA marker (Thermo)

Ek-2 Kültür Ortamlarının Hazırlanması

1. Luria Broth (LB)

Distile su	1000 mL
Luria Broth	25 g

Steril etmek için 121 °C'de 20 dakika

2. Luria Agar (LA)

Distile su	1000 mL
Luria Agar	40 g

Steril etmek için 121 °C'de 20 dakika

Ek-3 Solüsyon ve Tamponlar

1. Agaroz Jel Elektroforezi

TAE tampon (50X)

Tris-baz	242 g
Glasiyal asetik asit	57.1 mL
EDTA (0.5 M, pH 8.0)	100 mL
Distile su	1000 mL'ye tamamlanır

Yükleme tamponu (10X)

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

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

Akrilamit/Bis

Akrilamit	146 g
N.N'-Metilen bis akrilamit	4 g
Distile su	500 mL'ye tamamlanır

Filtrelenir, ışıktan korunur ve +4°C'de saklanır.

Tris HCl (1.5 M)

Tris-baz	54,45 g
Distile su	150 mL

pH 8.8'e ayarlanır ve toplam hacim 300 mL'ye distile su ile tamamlanır. +4°C'de saklanır.

Tris HCl (0.5 M)

Tris-baz	6 g
Distile su	60 mL

pH 6.8'e ayarlanır ve toplam hacim 100 mL'ye distile su ile tamamlanır. +4°C'de saklanır.

Koşturma tamponu (10X)

Tris- baz	30 g
Glisin	144 g
SDS	10 g
Distile su	1000 mL'ye tamamlanır

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	10 mL'ye tamamlanır

Coomassie Mavi R-250 Boyası

Coomassie Mavi R-250	0.25 g
Metanol	125 mL
Glasiyal asetik asit	25 mL
Distile su	100 mL

Boya uzaklaştırma solüsyonu

Metanol	100 mL
Glasiyal asetik asit	100 mL
Distile su	800 mL

3. Western Blot

Transfer tamponu (1X)

Metanol	200 mL
Tris-baz	3.63 g
Glisin	14.4 g
SDS	0.37 g
Distile su	1000 mL'ye tamamlanır

TBS (Tris buffer saline) (1X)

Tris-baz	2.42 g
NaCl	29.2 g
Distile su	1000 mL'ye tamamlanır

4. Protein Saflaştırma

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

Üre	8 M
NaCl	300 mM
NaH_2PO_4	50 mM

5. *E. coli* Kompetan Hücre Tamponu

Tampon 1

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

pH 5.8'e ayarlanır ve filtre edilir

Tampon 2

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

pH 6.5'e ayarlanır ve filtre edilir

6. Koloni Seçimi İçin IPTG

IPTG	100 mg
Distile su	1 mL

Filtre ile steril edilip -20°C'de saklanır

7. X-gal

X-gal	20 mg
Dimetilformamit	1mL

Işıktan korunur ve -20°C'de saklanır

8. 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

9. ELISA

Karbonat/Bikarbonat Tamponu (0.05 M)

Na_2CO_3	1.59 g
$NaHCO_3$	3.88 g
Distile su	1000 mL'ye tamamlanır

pH 9.6'ya ayarlanır ve +4°C'de saklanır

Yıkama solüsyonu (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	1000 mL'ye tamamlanır

pH 7.2'ye ayarlanır ve +4°C'de saklanır

Bloklama solüsyonu

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

10. ELISA IFN-ɣ

Yıkama solüsyonu (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	1000 mL'ye tamamlanır

pH 7.4'e ayarlanır ve +4°C'de saklanır

Ek-4 Kullanılan Kimyasal ve Enzimler

Akrilamit (Sigma)
Agar (Oxoid)
Agaroz (Biomax-Prona)
Ampisilin (Sigma)
*Bam*HI (Thermo)
*Bgl*II (Thermo)
Bovin-serum albumin (Merck)
Bromofenol mavisi (Merck)
Coomassie Mavi G-250 (Fluka)
Coomassie Mavi R-250 (Fluka)
Dimetilformaldehit (Merck)
EDTA (Sigma)
Etanol (Sigma)
Etidyum bromür (Sigma)
Glasiyal asetik asit (Merck)
Gliserol (Sigma)
Glisin (Merck)
HCl (Merck)
IPTG (Sigma)
Kanamisin (Sigma)
KCl (Merck)
KH_2PO_4 (Merck)
Luria Broth (Merck)
Metanol (Sigma)
MOPS (Sigma)
N.N'Metilen-bis akrilamit (Sigma)
Na_2HPO_4 (Merck)
NaCl (Merck)
$NaHCO_3$ (Merck)
NaOH (Merck)
KCH_3CO_2 (Merck)
RuCl (Merck)
SDS (Sigma)
Süt tozu (Sigma)
Sükroz (Sigma)
Taq DNA polimeraz (Thermo)
TEMED (Sigma)
Tris-baz (Merck)
Tris-HCl (Merck)
Tween-20 (Merck)
T4 DNA ligaz (Thermo)
Üre (Merck)
X-gal (Sigma)
Merkaptoetanol (Merck)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı:	Rukiye ÇETİN
Doğum Yeri:	Ankara
Doğum Tarihi:	04.10.1991
Medeni Hali:	Bekar
Yabancı Dili:	İngilizce
Adres:	Kırkevler Mah. Korgun Köprüsü Adası Küme Evleri Akyel Sitesi A Blok No/25 Merkez/ÇANKIRI
Tel:	0507127011
E-posta:	rukiyecetin09@gmail.com

Eğitim Durumu

Lise:	Çankırı Lisesi (2010)
Lisans:	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü(2014)
Yüksek Lisans:	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı (2017)

Staj

RefGen Gen Araştırma Merkezi (ODTÜ, 2013)

Çalıştığı Kurum

Korgun Ortaokulu (2017)
Kırmızı Kalem Etüt Merkezi (2017)

Tezler

Lisans Tezi: Haşhaş (*Papaver somniferum*) Bitkisinde *4-OMT* ve *7-OMT* Genlerinin Ekspresyon Seviyelerinin Analiz Edilmesi (2014), Modüler Gen Klonlama Teknolojileri (2014).

Yayınlar

Sezer Okay, Fatih Karabulut, **Rukiye Çetin**, Aslıhan Kurt Kızıldoğan, Süheyla Sürücüoğlu. *Mycobacterium tuberculosis'*in *erp, hspR, lppX, mmA4* ve *ompA* genlerinin *E. coli*'ye Klonlanması. 18. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, 18-19 Aralık 2015, Konya. (Poster)

Ödüller

Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Birinciliği (2014)