

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MYCOBACTERIUM BOVIS ANTİJENLERİNİN ESCHERICHIA COLI'DE
REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ İLE ÜRETİMİ VE ALT BİRİM AŞI
GELİŞTİRİLMESİ

Ecz. Özgün Fırat DÜZENLİ

Farmasötik Biyoteknoloji Programı
DOKTORA TEZİ

ANKARA
2021

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MYCOBACTERIUM BOVIS ANTİJENLERİNİN ESCHERICHIA COLI'DE
REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ İLE ÜRETİMİ VE ALT BİRİM AŞI
GELİŞTİRİLMESİ**

Ecz. Özgün Fırat DÜZENLİ

Farmasötik Biyoteknoloji Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Ayşe Filiz ÖNER

İKİNCİ DANIŞMAN

Doç. Dr. Sezer OKAY

ANKARA

2021

ONAY SAYFASI**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ****SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ*****Mycobacterium bovis* Antijenlerinin *Escherichia coli*'de Rekombinant DNA****Teknolojisi ile Üretimi ve Alt Birim Aşı Geliştirilmesi****Ecz. Özgün Fırat DÜZENLİ****Danışman: Prof. Dr. Ayşe Filiz ÖNER****İkinci Danışman: Doç. Dr. Sezer OKAY**

Bu tez çalışması 24 Haziran 2021 tarihinde jürimiz tarafından "Farmasötik Biyoteknoloji Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Türkan ELDEM *(Hacettepe Üniversitesi)*

Üye: Prof. Dr. Ayşe Gülten KANTARCI *(Ege Üniversitesi)*

Üye: Prof. Dr. Kamer KILINÇ *(TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi)*

Üye: Prof. Dr. İmran VURAL *(Hacettepe Üniversitesi)*

Üye: Prof. Dr. Samiye YABANOĞLU ÇİFTÇİ *(Hacettepe Üniversitesi)*

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

08 Temmuz 2021

*Prof. Dr. Diclehan ORHAN***Enstitü Müdürü**

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açıktır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

Ecz. Özgün Fırat DÜZENLİ

¹“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Ayşe Filiz ÖNER'in danışmanlığında ve Doç. Dr. Sezer OKAY'ın ikinci danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Ecz. Özgün Fırat DÜZENLİ

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgisini ve tecrübesini benden esirgemeyen, karşılaştığım zorluklarda yol gösteren ve desteğini daima hissettiren değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Ayşe Filiz ÖNER'e,

Çalışmalarım boyunca bilgisi ve deneyimi ile bana destek olan, beraber çalışmaktan memnuniyet duyduğum hocam ve tez ikinci danışmanım Doç. Dr. Sezer OKAY'a,

Tez çalışmalarım sırasında bana özgür ve rahat bir çalışma ortamı yaratarak üniversitemizin mevcut laboratuvar altyapılarını kullanabilmem için her türlü imkanı sağlayan, eğitimim süresince bilgisini, desteğini ve yardımlarını asla esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanı'mız Prof. Dr. Türkan ELDEM'e,

Tez çalışmalarımda verdikleri proje desteği (Proje No: TDK-2017-16102 ve Proje No: THD-2017-15688) için Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Tez çalışmasında kullanılan *M. bovis* BCG genomik DNA'sının temini noktasında yardımını esirgemeyen Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Alpaslan ALP'e,

Doktora eğitimim sırasında maddi ve manevi desteği ile bana büyük yardımı olan, güler yüzü ve neşesi ile moral bulduğum değerli hocam Prof. Dr. Sibel PEHLİVAN'a,

Hacettepe serüvenimde dostluklarını tüm samimiyetleriyle hissettiren Eren AYTEKİN, Halime SERİNÇAY ve Saharnaz BARGH başta olmak üzere adını buraya yazamadığım tüm arkadaşlarıma,

2009 yılında geldiğim Ankara'da bana ailemden uzakta olduğumu hissettirmeyen, beni asla yalnız bırakmayarak bu şehirdeki ailem olan teyzem Olcay ERÇOLAK, eniştem Murat ERÇOLAK ile kuzenlerim Evren ve Ata Furkan'a,

Büyük emek ve fedakarlık ile bu günlere gelmemi sağlayan, sevgileri ile her zaman bana destek olan sevgili anneme, babama, ablama, anneanneme ve dedeme, ayrıca süreç boyunca verdikleri moral için enişteme ve yeğenim Demirhan'a,

Saygı, sevgi ve minnetlerimi sunarım.

ÖZET

Düzenli, Ö.F., *Mycobacterium bovis* Antijenlerinin *Escherichia coli*'de Rekombinant DNA Teknolojisi ile Üretimi ve Alt Birim Aşı Geliştirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Biyoteknoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2021. Tüberküloz, uzun yıllardan beri hala önlenememiş en yaygın bulaşıcı hastalıklardan birisidir. Hastalığın yayılmasının önlenmesi amacıyla insanlarda kullanımı onaylanmış tek aşı BCG aşısıdır. Ancak BCG aşısının koruyuculuğunun kişiler arasında değişkenlik göstermesi, enfeksiyonu önleyememesi gibi sorunları çözmek üzere arayışlar devam etmektedir. Bu bağlamda bu tez çalışmasında *M. tuberculosis* ve *M. bovis*'in virülansında önemli rol oynayan AhpC ve LprG proteinlerinin hem kendi başlarına hem de BCG ile prime aşılamanın ardından booster aşı antijeni olarak uygulanmaları ile hümmoral ve hüccresel bağışıklık yanıt üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla AhpC proteinini kodlayan *ahpC* ve LprG proteinlerini kodlayan *lprG* geni *M. bovis* genomundan polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılmış, bakteriyel ifadeleme vektörüne klonlanmış ve *E.coli*'de rekombinant olarak üretilmiştir. Rekombinant proteinler afinite kromatografisi ile saflaştırılmış, elektroforez ve immünoblotlama yöntemleriyle karakterize edilmiştir. Ardından, rekombinant AhpC ve LprG proteinlerinin yağ bazlı emülsiyon yapıda bir adjuvan olan Montanide ISA 61VG ile formülasyonları hazırlanmıştır. Aşılar farelere uygulandıktan sonra gelişen hümmoral ve hüccresel bağışıklık yanıtları ELISA yöntemine dayanan deneylerle araştırılmıştır. Fare serumlarında IgG ölçümüne dayanan hümmoral yanıt ve IL-12 ölçümüne dayanan hüccresel yanıt değerlendirmeleri her iki proteinin de aşı antijeni olarak etkili olduğunu göstermiştir. AhpC aşısının iyi bir booster aşı adayı olabileceği, LprG aşısının ise tek başına daha etkili olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Tüberküloz, prime-boost bağışıklama, alt birim aşı, LprG, AhpC.

Destekleyen Kurum: Hacettepe Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Lisansüstü Tez Projesi (TDK-2017-16102) ve Hızlı Destek Projesi (THD-2017-15688), Hacettepe Üniversitesi.

ABSTRACT

Duzenli, O.F., Production of *Mycobacterium bovis* Antigens in *Escherichia coli* by Recombinant DNA Technology and Subunit Vaccine Development, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Pharmaceutical Biotechnology Programme PhD Thesis, Ankara, 2021. Tuberculosis is one of the most common infectious diseases that has not been prevented for many years. BCG vaccine is the only vaccine approved for use in humans to prevent spread of the disease. However, the searches continue to solve problems such as protection of BCG vaccine variations between individuals, and inability to prevent infection. In this context, evaluation of the effects of AhpC and LprG proteins playing an important role in the virulence of *M. tuberculosis* and *M. bovis*, on the humoral and cellular immune responses, alone or as a booster vaccine antigen after BCG prime vaccination was aimed in this thesis study. In order to achieve this goal, the *ahpC* and the *lprG* genes encoding the AhpC and the LprG proteins, respectively were amplified from the *M. bovis* genome by polymerase chain reaction, cloned into the bacterial expression vector, and recombinantly produced in *E.coli*. The recombinant proteins were purified by affinity chromatography and characterized by electrophoresis and immunoblotting methods. Subsequently, recombinant AhpC and LprG proteins were formulated with Montanide ISA 61VG, an oil-based emulsion adjuvant. The humoral and cellular immune responses were investigated by using ELISA method. Evaluation of humoral response based on IgG measurement and cellular response based on IL-12 measurement in mice sera showed that both proteins are effective as vaccine antigens. It was concluded that AhpC vaccine can be a good booster vaccine candidate, and LprG vaccine may be more effective when administered alone.

Keywords: Tuberculosis, prime-boost immunization, subunit vaccine, LprG, AhpC.

Supporting Institution: Hacettepe Scientific Research Projects Coordination Unit
Graduate Thesis Project (TDK-2017-16102) and Short Term
R&D Funding (THD-2017-15688), Hacettepe University.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tüberküloz Hastalığının Tarihçesi	3
2.2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Taksonomisi	4
2.3. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> 'in Bakteriyolojik Özellikleri	4
2.4. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Kültürü	6
2.5. Tüberküloz Epidemiyolojisi	8
2.6. Klinik Olgularda Tüberküloz Türleri	9
2.6.1. Akciğer Tüberkülozu	9
2.6.2. Akciğer Dışı Tüberküloz	9
2.6.3. Zoonotik Tüberküloz	9
2.7. Tüberkülozun Tanısı	10
2.8. Tüberkülozun Tedavisi	11
2.8.1. Latent Tüberkülozun Tedavisi	11
2.8.2. Aktif Tüberkülozun Tedavisi	11
2.9. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> 'in Patogenezi ve Virülans Faktörleri	12
2.9.1. Mikobakteriyel Hücre Duvarı Proteini: LprG	12
2.9.2. Mikobakteriyel AhpC Proteini	14
2.10. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> 'in Konakçı Bağışıklık Sisteminden Kaçışı	14

2.11. Aşılamanın Bağışıklama Prensipleri	17
2.12. Aşı Tipleri	19
2.12.1. Tüm-Patojen Aşılar	20
2.12.2. Altbirim (Aselüler) Aşılar	22
2.12.3. Nükleik Asit Aşılar	23
2.13. Aşı Adjuvanları	25
2.14. BCG Aşısı	28
2.15. Tüberküloza Karşı Yeni İlaç ve Aşı Geliştirme Çalışmaları	29
2.16. Prime – Boost Stratejisi	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM	32
3.1. Kullanılan Maddeler, Cihazlar ve Yazılımlar	32
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	32
3.1.2. Kullanılan Hücreler, Biyolojik Maddeler ve Kitler	34
3.1.3. Kullanılan Cihazlar	34
3.1.4. Kullanılan Yazılımlar	35
3.2. Rekombinant Protein Üretimi İçin Uygulanan Ortak Yöntemler	35
3.2.1. Kompetan Hücrelerin Hazırlanması	35
3.2.2. Transformasyon	36
3.3. <i>ahpC</i> ve <i>lprG</i> Genleri İçin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	36
3.4. Plazmit Yapılarının Oluşturulması	39
3.4.1. <i>ahpC</i> ve <i>lprG</i> Genlerinin pGEMT Plazmitine Ligasyonu ve Çoğaltılması	39
3.4.2. pET- <i>ahpC</i> ve pET- <i>lprG</i> Plazmitlerinin Oluşturulması	41
3.5. AhpC ve LprG Proteinlerinin Rekombinant Üretimi İçin Üstakım İşlemler	46
3.5.1. Bakterilerde Protein Üretiminin İndüklenmesi ve İnkübasyon	46
3.6. AhpC ve LprG Proteinlerinin Rekombinant Üretimi İçin Altakım İşlemler	46
3.6.1. Bakterilerin Toplanması	46
3.6.2. Toplanan Bakterilerin Lize Edilmesi	47
3.6.3. Proteinlerin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması	47
3.6.4. Proteinlerin Karakterizasyonu	47
3.6.5. Proteinlerin Miktar Tayini	48

3.7. Aşı Formülasyonları	49
3.8. <i>in vivo</i> Çalışmalar	50
3.8.1. Farelere Aşı Uygulaması ile İlgili Deney Planı	50
3.8.2. Hümorale Bağışıklık Yanıtının Tayini	54
3.8.3. Hücresel Bağışıklık Yanıtının Tayini	56
3.9. İstatistiksel Değerlendirme Yöntemleri	57
4. BULGULAR	58
4.1. <i>ahpC</i> ve <i>lprG</i> Genlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması	58
4.2. Plazmit Yapılarının Oluşturulması	59
4.2.1. <i>ahpC</i> ve <i>lprG</i> Genlerinin pGEMT Plazmitine Ligasyonu	59
4.2.2. <i>ahpC</i> ve <i>lprG</i> Genlerinin pET-28a-c(+) Plazmitine Ligasyonu	60
4.3. Rekombinant AhpC ve LprG Proteinlerinin Üretimi İçin Üstakım İşlemler	66
4.3.1. pET- <i>ahpC</i> ve pET- <i>lprG</i> Plazmitlerinin <i>E.coli</i> BL21(DE3) Suşuna Transformasyonu ve Kolonilerin Taranması	67
4.3.2. Rekombinant AhpC ve LprG Proteinlerinin Üretimi	70
4.4. Altakım İşlemler	71
4.4.1. Proteinlerin Saflaştırılması	71
4.4.2. rAhpC ve rLprG Proteinlerinin Karakterizasyonu	71
4.4.3. Saflaştırılan rAhpC ve rLprG Proteinlerinin Miktar Tayinleri	73
4.5. <i>in vivo</i> Hayvan Deneylerinde Aşı Antijenlerinin İndüklediği Hümorale Bağışıklığın Tayini	74
4.5.1. Western Blot	74
4.5.2. Total İmmünoglobulin G (IgG) Tayini	79
4.6. <i>in vivo</i> Hayvan Deneylerinde Aşı Antijenlerinin İndüklediği Hücresel Bağışıklığın Tayini	81
4.6.1. rAhpC Antijeni ile Oluşan Hücresel Bağışıklık Yanıtının Tayini	82
4.6.2. LprG Antijeni ile Oluşan Hücresel Bağışıklık Yanıtının Tayini	83
5. TARTIŞMA	84
5.1. Rekombinant Protein Üretimi İçin Kompetan Hücre Hazırlanması	86

5.2. <i>ahpC</i> ve <i>lprG</i> Genlerinin Biyolojik Kaynaktan Elde Edilmesi ve pGEM-T Plazmiti ile Çoğaltılması	87
5.3. <i>ahpC</i> ve <i>lprG</i> Genlerinin pET-28a-c(+) Plazmitine Ligasyonu	89
5.4. pET- <i>ahpC</i> ve pET- <i>lprG</i> Plazmitlerinin Doğrulanması	90
5.5. AhpC ve LprG Proteinlerinin Üretimi, Saflaştırılması ve Miktar Tayini	91
5.6. <i>in vivo</i> Çalışmalar ile Hümmoral Bağışıklık Yanıtının Gösterilmesi	95
5.6.1. Western Blot	96
5.6.2. ELISA Testi Çalışmaları	97
5.7. <i>in vivo</i> Çalışmalar ile Hümmoral Bağışıklık Yanıtının Tayini	104
5.7.1. rAhpC ile Aşılama Gruplarında Hümmoral Yanıtın IL-12 Miktarı ile Tayini	104
5.7.2. rLprG ile Aşılama Gruplarında Hümmoral Yanıtın IL-12 Miktarı ile Tayini	107
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	111
7. KAYNAKLAR	114
8. EKLER	130
EK-1: Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu Onay Belgesi (No: 2020/08-16).	131
EK-2: Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası	132
Ek-3: Tez Çalışması Orijinallik Raporu	134
EK-4: Turnitin Dijital Makbuz	135
9. ÖZGEÇMİŞ	136

SİMGELER VE KISALTMALAR

a/a	: Ağırlık/ağırlık
a/h	: Ağırlık/hacim
AhpC	: Alkil hidroksipeorsit redüktaz C
AP	: Alkalen fosfataz
ASH	: Antijen sunan hücreler
BCG	: Bacillus Calmette–Guérin
BSA	: Sığır serum albümini
DC-SIGN	: Dendritic-cell-specific intercellular adhesion molecule-3- grabbing non-integrin
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
ELISA	: Enzim Bağlı İmmünosorbent Ölçüm (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)
h/h	: Hacim/hacim
IgG	: İmmüoglobulin G
IL-12	: İnterlökin-12
IPTG	: İzopropil β -D-tiyogalaktozit
ISCOM	: Bağışıklık uyarıcı kompleks
İGST	: İnterferon gama salım testi
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
LAM	: Lipoarabinomannan
LB	: Luria Bertani
LEW	: Lisis-Dengeleme-Yıkama Tamponu (Lysis-Equilibration-Wash buffer)
LJ	: Löwenstein-Jensen ortamı
LM	: Lipomannan
LprG	: Lipoarabinomannan taşıyıcı protein G

LTBE	: Latent tüberküloz enfeksiyonu
mAGP	: Mikolik arabinogalaktan peptidoglikan
MHC-II	: Majör histokompatibilite kompleks – Sınıf II
RNA	: Ribonükleik asit
MTBK	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> kompleksi
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NIAID	: Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Alerji ve Bulaşıcı Hastalıklar Enstitüsü (National Institute of Allergy and Infectious Diseases)
NOX2	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PDIM/DIM	: Fitiyoserol dimikoserolat
PGL	: Fenolik glikolipit
PIM	: Fosfotidilinozitol mannozit
Prx	: Peroksiredoksin
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RNI	: Reaktif nitrojen ara ürünleri
ROI	: Reaktif oksijen ara ürünleri
ROS	: Reaktif oksijen türevleri
SL	: Sülfolipitler
STE	: Sükroz-Tris-EDTA tamponu
TBS	: Tris tamponlu salin
TBS-T	: TBS-tween
TDM	: Tüberküloz dışı mikobakteriler
TDT	: Tüberkülin deri testi
T_h	: Yardımcı T hücreleri
TLR2	: Toll like receptor-2
WB	: Western blot
X-gal	: 5-brom-4-klor-3-indoil β-D-galaktopiranozid

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Mikobakterilerin hücre duvarı yapısı.	6
2.2. Bulaşıcı hastalıklardan korunmada önemli bağışıklık ürünleri.	18
2.3. Aşı uygulamasından sonra bağışıklık yanıtlarının oluşumunda gerçekleşen adımların şematik gösterimi.	19
3.1. pET-28a plazmitinin klonlama bölgeleri.	41
3.2. <i>in vivo</i> hayvan deneyleri için oluşturulan hayvan grupları ve deneyler tasarımının şematik gösterimi.	53
3.3. Membran, jel ve filtre kağıdının sandviç yöntemiyle hazırlanması ve transfer aparatına yerleştirilmesi.	55
4.1. <i>Mycobacterium bovis</i> genomik DNA'sından PZR ile çoğaltılan (A) <i>ahpC</i> ve (B) <i>lprG</i> genleri.	58
4.2. pGEMT vektörlerinden restriksiyon enzimleri ile kesilerek çıkartılan <i>ahpC</i> ve <i>lprG</i> genlerinin agaroz jel görüntüleri	59
4.3. Restriksiyon enzimleri ile kesilmiş boş pET28a plazmitinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü.	60
4.4. pET- <i>ahpC</i> ligasyonlarının transforme edildiği <i>E.coli</i> DH5α suşlarından manuel plazmit izolasyonu ile elde edilen plazmitlerin agaroz jeldeki görüntüleri.	61
4.5. pET- <i>ahpC</i> ligasyonlarının transforme edildiği <i>E.coli</i> DH5α kolonilerinden seçilen kolonide pET- <i>ahpC</i> plazmitinin varlığının <i>BamHI-HindIII</i> enzim kesimi ile doğrulanması.	62
4.6. 4 numaralı <i>E.coli</i> DH5α kolonisinden elde edilen pET- <i>ahpC</i> plazmiti ile yapılan PZR'dan elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü.	63
4.7. pET- <i>lprG</i> ligasyonlarının transforme edildiği <i>E.coli</i> DH5α suşlarından yapılan manuel plazmit izolasyonu ile elde edilen plazmitlerin agaroz jelde görüntüsü.	64
4.8. pET- <i>lprG</i> ligasyonlarının transforme edildiği <i>E.coli</i> DH5α kolonilerinden seçilen 2 ve 6 numaralı kolonilerde pET- <i>lprG</i> plazmiti varlığının <i>EcoRI-HindIII</i> enzim kesimi ile doğrulanması.	65
4.9. pET- <i>lprG</i> ligasyonlarının transforme edildiği <i>E.coli</i> DH5α kolonilerinden seçilen 2 ve 6 numaralı kolonilerde pET- <i>lprG</i> plazmitinin varlığının PZR ile doğrulanması.	66
4.10. pET- <i>ahpC</i> ligasyonlarının transforme edildiği <i>E.coli</i> BL21(DE3) kolonilerinden manuel izolasyon ile elde edilen plazmitlerin agaroz jeldeki görüntüsü.	67

4.11.	pET- <i>lprG</i> ligasyonlarının transforme edildiği <i>E.coli</i> BL21(DE3) suşlarından manuel plazmit izolasyonu ile elde edilen plazmitlerin agaroz jeldeki görüntüsü.	68
4.12.	<i>E.coli</i> BL21(DE3) suşlarında bulunan pET- <i>ahpC</i> ve pET- <i>lprG</i> plazmitlerinin PZR ile doğrulanması.	69
4.13.	AhpC ve LprG proteinlerinin bakteride üretim ortamının SDS-PAGE görüntüleri.	70
4.14.	rAhpC proteininin SDS-PAGE görüntüsü.	71
4.15.	rLprG proteininin SDS-PAGE görüntüsü.	72
4.16.	Bradford yöntemin ile miktar tayini için çizilen kalibrasyon doğrusu.	74
4.17.	Grup D (rAhpC): rAhpC – ISA 61VG grubuna ait serumlarda AhpC'ye karşı oluşan antikorların kalitatif analizi.	75
4.18.	“Grup B: BCG prime – PBS boost”, “Grup E (rAhpC): BCG Prime – rAhpC Boost” ve “Grup A: PBS – ISA 61VG” gruplarına ait 60. gün serumlarında rAhpC'ye karşı oluşan antikorların kalitatif analizi.	76
4.19.	rLprG'ye karşı oluşan antikorların western blot analizi.	77
4.20.	“Grup E (rLprG): BCG Prime – rLprG Boost”, “Grup B: BCG Prime – PBS Boost”, “Grup A: PBS – ISA 61VG” gruplarına ait 60. gün serumlarında rLprG'ye karşı oluşan antikorların kalitatif analizi.	78
4.21.	rAhpC ile <i>in vivo</i> aşılama gruplarındaki farelerin serum IgG düzeyleri.	79
4.22.	rLprG ile <i>in vivo</i> aşılama gruplarındaki farelerin serum IgG düzeyleri.	81
4.23.	rAhpC ile <i>in vivo</i> aşılama gruplarındaki farelerin serum IL-12 seviyeleri.	82
4.24.	rLprG ile <i>in vivo</i> aşılama gruplarındaki farelerin serum IL-12 seviyeleri.	83

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. İnsanlarda kullanılmasına izin verilen adjuvanlar ile hazırlanmış ticari aşılar.	27
2.2. Klinik çalışmaları devam eden TB aşıları.	30
3.1. Polimeraz zincir reaksiyonu için tasarlanan ileri ve geri primerler.	37
3.2. PZR çalışması için hazırlanan çözeltilerin bileşenleri ve derişimleri.	37
3.3. Polimeraz zincir reaksiyonu çalışmasında uygulanan deney koşulları.	38
3.4. <i>ahpC</i> ve <i>lprG</i> genlerinin pGEM-T Easy vektöre ligasyonu için oluşturulan reaksiyon ortamları.	39
3.5. pGEMT- <i>ahpC</i> ve pGEMT- <i>lprG</i> plazmitlerinden <i>ahpC</i> ve <i>lprG</i> genlerinin kesilerek çıkartılması için oluşturulan reaksiyon ortamları.	41
3.6. pET-28a plazmitinin enzimlerle kesimi için oluşturulan reaksiyon ortamı.	42
3.7. Agaroz jelden izole edilmiş, kesilmiş boş pET-28a plazmitlerinin alkale fosfataz ile muamelesi için oluşturulan reaksiyon ortamı.	43
3.8. <i>ahpC</i> ve <i>lprG</i> genlerinin pET-28a plazmitlerine ligasyonu.	44
3.9. Enzimatik kesim yöntemi ile plazmitlerin doğrulanması.	45
3.10. SDS-PAGE deneyinde kullanılan jelleri sıkıştırma ve ayırma jellerinin bileşenleri ve miktarları.	49
3.11. <i>in vivo</i> çalışmalar sırasında farelere uygulanacak aşı formülasyonlarına ait bilgiler	50
3.12. rLprG ve rAhpC rekombinant protein altbirim aşıları ile yapılan bağışıklama çalışmasına dair bilgiler.	51
3.13. rLprG ve rAhpC altbirim protein aşıları ile yapılan prime-boost bağışıklama çalışmasının planı.	52
4.1. Çözelti Konsantrasyonları ve Absorbanslar.	73
4.2. rAhpC ve rLprG protein çözeltilerinin konsantrasyonları.	74
4.3. <i>in vivo</i> aşılama çalışmalarında kullanılan farelerin serumlarındaki rAhpC spesifik antikor seviyelerinin varyans analizi.	80
4.4. <i>in vivo</i> aşılama çalışmalarında kullanılan farelerin serumlarındaki rLprG spesifik antikor seviyelerinin varyans analizi.	81
4.5. rAhpC ile <i>in vivo</i> aşılama gruplarında bulunan farelerin serumlarındaki IL-12 seviyelerinin varyans analizi.	82
4.6. rLprG ile <i>in vivo</i> aşılama gruplarında bulunan farelerin serumlarındaki IL- 12 seviyelerinin varyans analizi.	83

1. GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre küresel çapta 10 milyondan fazla insanın aktif ve 2 milyar insanın da latent formda tüberküloz (TB) hastası olduğu tahmin edilmektedir. Bu nedenle DSÖ'nün '2030 yılına kadar TB hastalığının dünyadan eradike edilmesi' hedefi doğrultusunda yeni veya yenilikçi ilaç tedavilerinin, tanı araçlarının ve korunma yöntemlerinin geliştirilmesi temelinde bir kombine strateji uygulanmaktadır. Bu stratejide özellikle yeni TB aşılarının geliştirilmesi büyük önem taşımakta ve buna yönelik pre-klinik ve klinik çalışmalar devam etmektedir. Bu aşı çalışmalarında inaktif mikobakteri suşlarından canlı mikobakteri suşlarına, tüm hücre lizatlarının kullanıldığı aşılarından viral vektör ile hazırlanan aşılarla, nükleik asit temelli yaklaşımlardan protein antijenlere kadar pek çok farklı teknolojidenden yararlanılmaktadır.

Genetik özellikleri birbirlerine çok yakın olan *Mycobacterium tuberculosis*, *M. canettii*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis*, *M. caprae* ile *M. pinnipedii* suşlarının oluşturduğu *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi (MTBK) hem insanlarda hem de hayvanlarda TB hastalığına sebep olmaktadır. Etiyolojik olarak incelendiğinde *M. tuberculosis* temel olarak insanları enfekte etmektedir. Kompleksin konakçı enfeksiyonu açısından en geniş spektruma sahip üyesi olan *M. bovis* ise başta sığır ve keçiler olmak üzere hem hayvanları hem de insanları enfekte etmektedir.

TB, temel olarak TB hastası bir kaynaktan çıkan ve havada saatlerce asılı kalabilen, basil içeren damlacıkların solunum yolu ile akciğerlere ulaşmasıyla bulaşmaktadır. Bu basiller bazı kişilerde kısa sürede hastalık ortaya çıkartırken, bazı kişilerde ise hastalık oluşturmaksızın uyku halinde kalabilmektedir. İkinci durumda TB enfeksiyonu kişinin bağışıklık sisteminin zayıflamasıyla ortaya çıkmaktadır. Hastalığın bir diğer formu olan zoonotik TB ise hasta hayvan veya hayvana ait et ürünleri ile temas, pastörize edilmemiş süt ve süt ürünlerinin tüketilmesi gibi yollar ile hayvandan insana bulaşmaktadır. TB hastalığı vücutta en çok akciğerlerde görülmekle birlikte (akciğer tüberkülozu), akciğer dışı organlarda da (akciğer dışı tüberküloz) oluşabilmektedir. TB, önlenilebilir ve tedavi edilebilir bir hastalık olmasına rağmen tüm dünyada morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenlerinden birisidir. Fransız

bilim insanları Albert Calmette and Camille Guérin tarafından laboratuvarında üretilerek izole edilen ve *M.bovis* var Bacillus Calmette–Guérin (BCG) olarak bilinen mutant *M.bovis* suşu bugün TB profilaksisi için erken çocukluk döneminde uygulanan tek onaylı aşı olma özelliği taşımaktadır. Ancak bu aşının koruyuculuğu bireyler arası değişkenlik göstermekte ve TB epidemisini önlemekte yetersiz kalmaktadır. TB bugün hala çözüm gerektiren önemli bir halk sağlığı problemi olarak karşımıza çıkmaktadır.

Bu tez kapsamında bu problemin çözümüne yönelik olarak gerçekleştirilen aşı geliştirme çalışmalarına katkı sağlayabilmek amacıyla yenilikçi bir aşı çalışması planlanmıştır. Yapısı ve immünojenik karakteri iyi tanımlanmış antijenleri içeren, enjeksiyon bölgesinde istenmeyen yan etkileri ihmal edilebilir düzeyde olan, en güvenli aşı grubunu oluşturan ve gerektiğinde büyük ölçekte üretimi daha hızlı ve kolay olan rekombinant protein içeren altbirim aşı geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda MTBK virulansında etkili olduğu bilinen alkil hidroperoksit redüktaz C (AhpC) ve lipoarabinomannan taşıyıcı protein G (LprG) proteinleri rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak bakteriyel ifadeleme sisteminde üretilmiş, saflaştırılmış ve adjuvan içeren aşı formülasyonları geliştirilmiştir. Geliştirilen aşı formülasyonlarının kendi immünojenik etkinlikleri ve BCG ile prime aşılansız farelerde booster aşı etkinlikleri *in vivo* deneyler ile araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tüberküloz Hastalığının Tarihçesi

Tüberküloz (TB) hastalığı insanlık tarihi kadar eski bir hastalıktır. Antik çağlara ait ilk tarihsel kayıtlarda yapılan incelemelerde MÖ 2400'lere ait Mısır mumyalarının TB'ye özgü iskelet bozuklukları sergilediği bildirilmiştir. MS 174'te Yunan Clarissimus Galen TB semptomlarını ateş, terleme, öksürme ve kanlı balgam olarak belirlemiş, tedavi olarak temiz hava, süt ve deniz yolculuklarını önermiştir. Tarih boyunca pek çok farklı isimle anılan bu hastalık için, "tüberküloz" terimi ilk defa 19. yy'ın ortalarında Johann Lukas Schölein tarafından kullanılmıştır (1). Ülkemizde ise TB hastalığı için halk arasında "verem" ve "ince hastalık" ifadeleri kullanılmaktadır (2).

1877'de, Theodor Albrecht Klebs ilk defa TB'ye sebep olan patojeni kültür ortamında canlı olarak tutmayı başarmış ve laboratuvar hayvanlarında hastalık oluşturabilmiştir. Fakat bu çalışmada mikroorganizma tanımlanamamıştır (3). TB tarihi, Alman hekim Hermann Heinrich Robert Koch tarafından 24 Mart 1882'de Berlin'de, Berlin Fizyoloji Derneği'nde yapılan "Die Aetiologie der Tuberculose – Tüberküloz Etiyolojisi" sunumu ile değişmiştir. Bu sunumda Koch sadece tanımladığı tüberkül basilini değil, aynı zamanda basilin bulaşıcı etiyojisinin gösterilmesi için standartların ne olduğunu da açıklamıştır. Koch'un TB etiyojisi ile bakteriyolojiye yaptığı katkılar, 1905'te Tıp ve Fizyoloji alanındaki Nobel Ödülü'nü kendisine kazandırmıştır. Devamında gelen çalışmalarda, 1921 yılında Calmette ve Guerin tarafından *M.bovis* BCG aşısı bulunmuştur (4). 1939'da Florence Seibert ve John T. Glenn tarafından TB enfeksiyonunun diagnozu için saflaştırılmış protein türevi deri testi uygulanmaya başlanmıştır. 1944 yılında Selman Waksman'ın streptomisini keşfetmesiyle TB hastalarında antibiyotik tedavisine başlanmıştır. Bu tedavinin ardından 1946'da para-aminosalisilik asit, 1952'de izoniazid, 1954 yılında pirazinamid, 1962 yılında etambutol, 1966 yılında rifampisin TB tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (5).

2.2. *Mycobacterium tuberculosis* Taksonomisi

M. tuberculosis bakterisinin taksonomik sınıflandırması:

Alem: Bakteri,

Şube (Phylum): Actinobacteria,

Sınıf (Class): Actinobacteria,

Altsınıf (Subclass): Actinobacteridae,

Takım (Order): Actinomycetales,

Aile (Family): Mycobacteriaceae,

Cins (Genus): Mycobacterium,

Tür (Species): *M. tuberculosis*, şeklindedir (6).

2.3. *Mycobacterium tuberculosis*'in Bakteriyolojik Özellikleri

M. tuberculosis yavaş büyüyen, organik maddeleri aerobik veya anaerobik solunum ile ayrıştırarak enerji üreten (kemoorganotrofik), hareketsiz, spor oluşturmeyen, 1-10 µm uzunluğunda ve 0.2-0.6 µm eninde, hafif kırımlı veya düz biçimli, aerobik bir basildir. Optimal laboratuvar şartlarında agar plaklarda 37 °C sıcaklıkta her 24 saatte bir sayısı iki katına çıkmakta ve taba rengi koloni oluşturması yaklaşık 3 hafta sürmektedir. Ziehl-Neelsen asit hızlı boyama tekniği ile görüntülenmektedir. Pozitif niasin üretimi ve nitrat indirgeme gibi biyokimyasal testler *M. tuberculosis*'i diğer mikobakterilerden ayırmak için kullanılmaktadır. Ancak günümüzde bu testlerin yerini çoğunlukla polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) temelli testler almıştır (7).

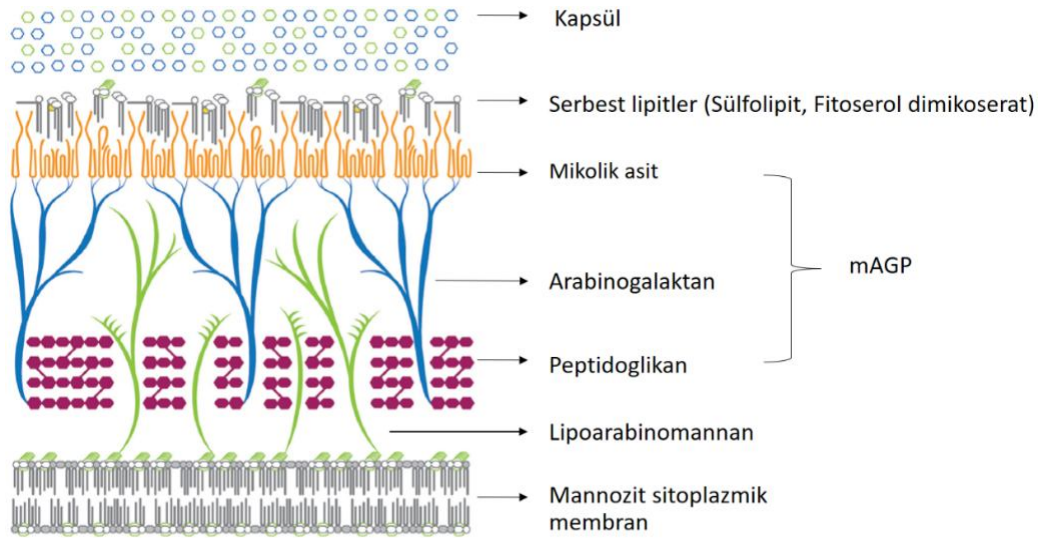
Bakteriyolojik ve genomik benzerlik gösteren mikobakteriler *M. tuberculosis* Kompleksi (MTBK) adı verilen bir grup altında toplanmıştır. MTBK içerisindeki mikobakteri gurubu nükleotit seviyesinde %99 üzerinde benzerlik göstermelerine ve 16S ribozomal ribonükleik asit (rRNA) sekanslarının aynı olmasına karşılık, konakçı spesifiteleri, fenotipleri ve patojenisiteleri açısından büyük ölçüde farklılık göstermektedir (8, 9). Ortak bir atadan türemiş olduğu varsayılan kompleks üyeleri enfekte ettikleri konakçıların değişkenlik göstermesiyle birbirinden ayrılmaktadır. Bu kompleksin üyeleri arasında *M. tuberculosis*, *M. canetti*, *M. africanum*, *M. microti*, *M.*

bovis, *M. caprae* ve *M. pinnipedii* bakterileri bulunmaktadır. Bu türler arasında *M. tuberculosis*, kompleksin en iyi bilinen üyesidir ve dünya üzerindeki insan nüfusunun üçte birinden fazlasını enfekte ettiği düşünülmektedir. Ayrıca insanlarla temas halindeki hayvanları enfekte ettiği de bildirilmiştir. *M. tuberculosis* ile yakın ilişkili olan *M. canettii* ve *M. africanum*, genellikle Afrikalı TB hastalarından izole edilmektedir. Kompleksin bir diğer üyesi olan *M. bovis* enfeksiyon spektrumunu en geniş olan türdür. Bu türün enfekte ettiği bildirilen konakçılar arasında insanlar, evcil veya yabani sığırlar ve keçiler yer almaktadır. *M. caprae* sadece keçilerden izole edilmiştir. Bir kemirgen patojeni olan *M. microti*, genel olarak tarla farelerinden izole edilmiştir, bu türün bağışıklık sistemi baskılanmış insanlarda da hastalık oluşturduğu bilinmektedir (10, 11). Son olarak *M.pinnipedii*'nin fok balıklarını enfekte ettiği bildirilmiştir (12).

MTBK'nin yanı sıra Tüberküloz Dışı Mikobakteriler (TDM) olarak adlandırılan bir grup daha bulunmaktadır. Bu grupta toplanmış bakteriler arasında *M. avium kompleksi* (*M. avium intracellulare*), *M. sucrofulaceum*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. simiae*, *M. szulgai*, *M. fortuitum kompleksi* (*M. fortuitum-chelonei*), *M. chelonae*, *M. malmoense*, *M. haemophilum* bulunmaktadır (13, 14). TDM'nin sebep olduğu hastalıklarda en yaygın risk faktörü akciğer savunmasındaki yetersizliktir. Bronşektazi, geçirilmiş TB, silikoz, kistik fibroz ve kronik obstirüktif akciğer hastalığı diğer risk faktörleridir (15). Bu bakterilerin insanlar arası bulaşı nadir olduğundan tedavisi ve bildiriimi zorunlu değildir (16).

Neredeyse tüm bakterilerde olduğu gibi mikobakterilerin de membranı hücre bileşimini koruyan, hücreye mekanik destek sağlayan ve bakterinin karakteristik şeklinden sorumlu olan bir hücre duvarı ile çevrilmiştir. Ancak mikobakterilerin sahip olduğu hücre duvarı kompleksi Gram negatif ve pozitif bakterilerde bulunan hücre duvarlarından farklılık göstermektedir. Kompleksin en iç kısmı diğer bakterilerde de var olan plazma membranından oluşmaktadır. Orta tabakadaki çekirdek yapıyı ve duvar iskeletini mikolik arabinogalaktan peptidoglikan (mAGP) adı verilen yapı oluşturur. Bu yapı arabinogalaktan ve peptidoglikan polimerlerin mikolik asit esterlerinden meydana gelmiştir (17). Bakteride bulunan mikolik asitler türe özgü düzenlenmekte olup türlerin tanımlanmasında kullanılmaktadır. Mikolik asitlerinin

bahsi geçen yapılarla kovalent bağlanması mikomembran olarak ifade edilen ve oldukça düşük akışkanlık sergileyen hidrofobik bir katman oluşturur (18). Mikomembranın dış kısmında fitiyoserol dimikoserosat (PDIM/DIM), fenolik glikolipitler (PGL), trehaloz içeren glikolipitler ve sülfolipitler (SL) gibi bir dizi serbest yağ asitleri bulunmaktadır. Fosfotidil-miyoinozitol mannozidler, lipomannan (LM) ve lipoarabinomannan (LAM) gibi bazı glikolipitler plazma membranına bağlı haldedir (19). Mikolik asitler ile etkileşimde olan bu lipidlerin pekçoğu mikobakterilere özgü olarak bilinir. Mikobakterinin en dış katmanı genellikle kapsül olarak adlandırılır ve temel olarak glukoz ve arabinomannan polisakaritleri barındırmaktadır (18). *M. tuberculosis*'in hücre duvarı sentezi izoniazid, etambutol, etiyonamid gibi anti-TB ilaçların hedefidir ve *M. tuberculosis* hücre duvarının şematik gösterimi Şekil 2.1'de verilmiştir (20).



Şekil 2.1. Mikobakterilerin hücre duvarı yapısı. (Gordon ve Perish'den (20) değiştirilerek)

2.4. *Mycobacterium tuberculosis* Kültürü

Normal olarak bakterilerin bölünmesi dakikalar ile ölçülmekteyken bu süre *M. tuberculosis* için 18-24 saattir. *M. tuberculosis*'in yavaş büyümesi sebebiyle genel bakteriyolojik teknikler bu suş için kolay uygulanamamaktadır. Ayrıca,

M.tuberculosis'in büyüme gereksinimleri primer izolasyondan sonra kimyasal olarak tanımlanmış ortamda büyümesini engellemektedir. Bu bakımdan bakterinin rahat büyümesine izin veren ortamlar katı ve sıvı ortamlar olarak ikiye ayrılmaktadır. Katı ortamlar, yumurta ile zenginleştirilmiş gliserol ve asparajin içeren ortamlar ve serum veya sığır albümini ile desteklenen agar ortamlarıdır. Katı ve sıvı ortamlar spesifik olmayan bakteri üremesini engellemek üzere antibiyotikler ile desteklenebilmektedir. Katı ortamların sıvı ortamlara göre, karışık kültür kolonileri ve kontaminantların gözlemlenebilir olması gibi bir üstünlüğü vardır ancak mikobakterilerin sıvı ortamda daha hızlı büyüdüğü bilinmektedir. Ortam seçimi temel olarak örnek tipine bağlıdır. Seçici olmayan ortamlar kemik iliği, doku biyopsi örnekleri, serebrospinal sıvı, vücut sıvıları gibi steril bölgelerden alınan örnekler için uygun bulunurken, antimikrobiyal ajan içeren seçici ortamlar genellikle balgam, apse içerikleri, bronşiyal yıkamalar, mide yıkama sıvısı, idrar gibi kontamine örnekler için tavsiye edilmektedir (7).

En sık kullanılan seçici-olmayan ortamlar:

- Yumurta temelli ortamlar: Löwenstein-Jensen (LJ) ortamı ve Ogawa ortamı
- Agar-temelli ortamlar: Middlebrook 7H10 ve Middlebrook 7H11
- Sıvı ortam: Middlebrook 7H9 besi yeri

Bazı ülkelerde mevcut olan ve yaygın kullanılan seçici ortamlar:

- Yumurta-temelli ortamlar: Gruft modifiye LJ (seçici ajan olarak malahit yeşili, penisilin ve nalidiksik asit içerir) ve Mycobactosel LJ (seçici ajan olarak malahit yeşili, penisilin, linomisin ve nalidiksik asit içerir)
- Agar-temelli ortamlar: Seçici ajan olarak karbenisilin, amfoterisin B, polimiksin B ve trimetoprim içeren 7H11 (Mitchison's medium) ortamı
- Sıvı ortamlar: Genellikle modifiye Middlebrook 7H9 broth ve antibiyotik karışımı içeren ortamlardır (7).

Bunların yanında, ticari olarak geliştirilmiş ve sıvı ortamda hızlı şekilde mikobakteri tespiti sağlayan otomatize sistemler de bulunmaktadır. Söz konusu sistemlere örnek olarak BACTEC MGIT 960 system (BD Diagnostic Systems), ESP

Culture System II (Trek Diagnostic Systems) ve MB/BacT (bioMérieux) gösterilebilir (7).

Mikobakteriler besiyerlerinde aerobik ortamda, %5-10 CO₂ varlığında, 35-37 °C'de ortalama 21 güne kadar inkübe edilir ve kültür sürelerinin 6-8 hafta olduğu bilinmektedir (21).

2.5. Tüberküloz Epidemiyolojisi

Dünya Sağlık Örgütü tarafından yayınlanan "Küresel Tüberküloz Raporu"nda 2018 yılında küresel ölçekte, 10 milyon insanın aktif TB hastası olduğu, HIV-negatif 1.2 milyon kişinin ve HIV-pozitif 251.000 kişinin TB sebebiyle hayatını kaybettiği, tüm TB enfeksiyonlarının %57'sinin yaşı 15'ten büyük erkeklerden, %32'sininin yaşı 15'ten büyük kadınlardan ve %11'inin 15 yaş altı çocuklardan oluştuğu, tüm TB vakalarının %8.6'sının HIV-pozitif kişilerden oluştuğu bildirilmiştir. TB hastalığının coğrafi dağılımı incelendiğinde en yüksek vakadan en düşük vakaya doğru sıralama Güney-Doğu Asya (%44), Afrika (24%), Batı Pasifik (18%), Doğu Akdeniz (8%), Kuzey-Güney Amerika (3%) ve Avrupa (3%) şeklindedir. Ayrıca, Hindistan (27%), Çin (9%), Endonezya (8%), Filipinler (6%), Pakistan (6%), Nijerya (4%), Bangladeş (4%) ve Güney Afrika (3%) küresel TB olgularının üçte ikisinden sorumlu ülkeler olarak bildirilmiştir. İlaç-dirençli TB günümüzde halk sağlığını tehdit eden önemli bir konudur. 2018 yılında yarım milyon yeni olguda rifampisin direnci belirlenmiştir, rifampisin direnci çoklu ilaç dirençli TB olgularının %78'ini oluşturmaktadır. İlaç dirençli TB vakalarında Hindistan (27%), Çin (14%) ve Rusya Federasyonu (9%) başta gelen ülkelerdir. Küresel olarak yeni TB olgularının %3.4'ü ve önceki olguların %18'i çoklu ilaç dirençli veya rifampisin-dirençli TB hastasıdır (22).

2.6. Klinik Olgularda Tüberküloz Türleri

TB hastalığının klinik olgularda sıklıkla karşılaşılan farklı formları bu bölümde anlatılmıştır.

2.6.1. Akciğer Tüberkülozu

Akciğer parankimini tutan TB'yi ifade eder. Hastanın tıbbi öyküsü, fizik bulguları ve akciğer filmi birlikte değerlendirilir. Kesin tanısı bakteriyolojik yöntemlerle olup, kimi zaman histopatolojik yöntemler de uygulanabilmektedir (2).

2.6.2. Akciğer Dışı Tüberküloz

Akciğer dışındaki organ ya da organların TB etkeni ile enfeksiyonudur. Bu hastalık ülkemizde en yaygın görülenden başlayarak en az rastlanılana doğru sıralandığında plevra (plörezi), toraks dışı ve içi lenfadenit, periton/gastrointestinal sistem, genitoüriner sistem, omurga dışı kemik-eklem, omurga kemik-eklemi, miliyer TB, menenjit TB, santral sinir sistemi tüberkülozu (menenjit dışı) ve diğer organlarda görülen TB şeklindedir.

2.6.3. Zoonotik Tüberküloz

MTBK üyelerinden *M. bovis* ve *M. caprae* suşları hayvanlarda TB oluşturan başlıca patojenlerdir. Bu patojenlerin oluşturduğu TB'nin klinik özellikleri *M. tuberculosis* tarafından oluşturulan TB'den ayırdedilememekle birlikte genellikle akciğer dışı organların tutulduğu görülmektedir. Zoonotik TB durumunda, hastalık önce ve sıklıkla büyük baş hayvanlarda ortaya çıkmaktadır. Yabani hayvanlarda da görülen zoonotik TB ekonomik ve ticari açıdan ciddi kayıplara sebep olmaktadır (23). Zoonotik TB insanlara pastörize edilmemiş süt ve süt ürünleri gibi besinlerin kullanımı, hastalıklı hayvanla veya bu hayvanın ürünleriyle temas veya hastalıklı hayvanın damlacıklarına maruz kalma yoluyla bulaşır (24).

M. tuberculosis ile *M. bovis* ve *M. caprae*'nin yaygın kullanılan laboratuvar teknikleri ile ayrımını yapmak çok zor olmakta, bu ayrım için spoligotiplendirme yöntemi kullanılması önerilmektedir (25). MTBK üyelerinden *M. tuberculosis* ve *M.*

M. bovis genomları %99'un üzerinde bir benzerlik göstermelerine rağmen, *M. bovis*'in daha küçük bir genom taşıdığını ve kendine özgü genler barındırmadığı gösterilmiştir (26, 27). Enfeksiyon oluşturdıkları ana konakçılar iki tür arasındaki ana farklılıktır. *M. tuberculosis* temel olarak insanları enfekte ederken, *M. bovis*'in *Bovidae* ailesinin üyelerinde oluşan TB enfeksiyonunun primer kaynağı olduğu bilinmektedir (28). Bununla birlikte, *M. bovis*'in sahip olduğu zoonotik karakter dolayısıyla insanlarda tüberküloz oluşturabildiği bilinmektedir (29). Pastörize edilmemiş veya kontamine süt ürünlerinin tüketimi ve basil içeren aerosollerin solunumu *M. bovis*'in insanlara bulaşmasındaki temel yollar olarak bilinmektedir (30). Bununla birlikte insandan insana bulaş da rapor edilmiştir (31, 32). Amerika Birleşik Devletlerinde 1994-2005 (33) ve 2003-2011 (34) dönemlerini kapsayan çalışmalarda, çocuklar, yetişkinler ve yaşlılar arasında *M. bovis* kaynaklı TB insidansının arttığı gözlenmiştir. Benzer şekilde, 2016 yılında *M. bovis* kaynaklı zoonotik TB yaklaşık 147.000 yeni olguya ve 12.500 kişinin de ölümüne sebep olmuştur. *M. bovis*-temelli raporlar göz önüne alındığında 2019 yılı için tahmini 140.000 yeni zoonotik TB olgusu beklenmektedir (22, 35, 36).

Ülkemizde hayvan tüberkülozu ile mücadele için Gıda, Tarım ve Hayvancılık ve Sağlık Bakanlıklarının hazırladığı; 1986 Tarih ve 3285 sayılı Hayvan Sağlığı Zabıtası Komisyonu Kanunu, 1989 Tarih ve 2645 Sayılı Hayvan Sağlığı Yönetmeliği, 2009 Tarih ve 27188 sayılı Sığır Tüberküloz Yönetmeliği ile 2010 Tarih ve 5996 sayılı Veteriner Hizmetleri, Bitki Sağlığı, Gıda ve Yem Kanunu gibi yasal düzenlemelerle yükümlülükler belirlenmiştir (2).

2.7. Tüberkülozun Tanısı

TB hastalığında doğru tanı koymak için, öncelikle uygun örnek toplanması ve toplanan örneklerin uygun şartlarda laboratuvara naklinin sağlanması gerekmektedir. Pulmoner TB hastalığının bakteriyolojik tanısı için balgam, gastrik aspirasyon materyali (açlık mide sıvısı), balgam indüksiyonu, akciğer biyopsi materyali ve bronkoskopik örnekler (yıkama, fırçalama, biyopsi) toplanabilir. Ekstrapulmoner tüberküloz enfeksiyonunun tanısı için ise, tüberkülozun bulunduğu anatomik lokalizasyona göre idrar, kan, abse materyali, beyin omurilik sıvısı, biyopsi materyali,

sinovyal sıvı, kemik iliği, doku biyopsileri, plevral sıvı ve diğer vücut sıvıları toplanabilmektedir (37). TB tanısında mikroskopik incelemeler, kültür temelli yöntemler, immünolojik yöntemler ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır (38).

Latent TB enfeksiyonu (LTBE) tanısı için yapılan taramada amaç, aktif TB gelişimi riski bulunan ve LTBE tedavisinden yarar sağlayabilecek kişilerin belirlenmesidir. Ek olarak, bu tanı testleri çocukluk dönemi ve akciğer dışı tüberküloz hastalıklarının tanısı için de yardımcı testler olarak kullanılabilir. LTBE tanısı tarama sıklıkla tüberkülin deri testi (TDT) ve interferon gama salım testi (İGST) ile yapılmaktadır. Bu testler TB etkenine karşı gelişmiş hücresel bağışıklık yanıtını ölçmektedir ve birbirinden belirgin üstünlükleri bulunmamaktadır. Bu testlerin sonucu aktif ve/veya latent TB hastalarında pozitif çıktığından, hastadaki enfeksiyonun aktif mi yoksa latent mi olduğu ayırımı yapılamamaktadır (2, 39).

2.8. Tüberkülozun Tedavisi

2.8.1. Latent Tüberkülozun Tedavisi

LTBE’de uygulanan koruyucu ilaç tedavisinde (kemoprofilaksi) izoniyazid, rifampisin ve rifapentin gibi antibiyotikler farklı sürelerde ve kombinasyonlarda kullanılmaktadır (40).

2.8.2. Aktif Tüberkülozun Tedavisi

Ülkemizde uygulanan TB tedavisinde, kısa süreli standart tedavi rejimlerinin seçilerek, doğrudan gözetimli tedavi ile ilaçların hastalar tarafından düzenli ve yeterli süre kullanılması sağlanır. İlaçlar TB tedavisindeki en önemli araçlardır. Diğer hastalıkların tedavisine katkısı olan dinlenme, beslenme ve iklim gibi faktörlerin, TB hastalığında herhangi bir etkisi bulunmamaktadır (41). TB tedavisinde kullanılan başlıca ilaçlar izoniyazid, rifampisin, pirazinamid, etambutol, rifabutin ve streptomisindir. Bunlarla birlikte, aminoglikozidler (streptomisin, amikasin, kanamisin), kapreomisin, ofloksasin, levofloksasin, moksifloksasin, tiyonamidler (etyonamid, protiyonamid), sikloserin, para-amino salisilik asit, klofazimin, linezolid, bedakuilin, delamanid ilaçları da kullanılmaktadır (2). *M. bovis*, TB’nin standart

tedavisinde kullanılan pirazinamide karşı dirençli iken, *M. caprae* bu ilaca duyarlıdır (25).

2.9. *Mycobacterium tuberculosis*'in Patogenezi ve Virülans Faktörleri

Virülans, bir patojenin hastalığa neden olma yeteneğini gösterir. Mikobakteri virülansı temel olarak konakçı hücrede kalış ve makrofajların mikrobisidal mekanizmalarından kaçış kabiliyetine bağlıdır. MTBK'nin virulan mekanizmalarının daha iyi anlaşılması için virulan geninin tanımlanması gerekmektedir (42).

Mikobakterinin hücre duvarındaki glikolipitleri, salgı sistemi ile ilgili proteinleri, prolin-glutamik asit proteinlerini, lipoproteinleri ve bağışıklık sistemi ile etkileşimde görev alan enzimleri kodlayan genler bakterinin virülansına katkı sağlamaktadır (42). Virülans genler bakterinin konakçıdaki kolonizasyonunu, konakçı bağışıklık sisteminden kaçmasını ve makrofaj hücreleri içerisinde sağ kalmasını sağlar. Mikobakteri virülansı bakterinin, konakçının bağışıklık yanıtının karşısında sağ kalabilme, akciğer hasarı oluşturma ve yeni bir konakçıyı enfekte etme yetenekleri ile ölçülebilmektedir (43).

2.9.1. Mikobakteriyel Hücre Duvarı Proteini: LprG

DeneySEL çalışmalar veya biyoinformatik araçlar kullanılarak mikobakteri genomunda kodlanmış pek çok lipoprotein tanımlanmıştır. Bu lipoproteinler, konakçı bağışıklık sistemi ile alakalı farklı fonksiyonları aracılığıyla mikobakterilerin virülansına katkı sağlamaktadır (44). Mikobakteri lipoproteinlerinin hümoral ve hücreSEL bağışıklık yanıtlarını güçlü biçimde indüklediği bilinmektedir (45). *lprG* (*Rv1411c*) geni tarafından kodlanan lipoarabinomannan (LAM) taşıyıcı protein G, P27 lipoprotein veya *Rv1411c* olarak da bilinen LprG proteini ilk olarak Bigi ve ark. (46) tarafından tanımlanmıştır. 27 kDa moleküler ağırlığa sahip olan protein, mikobakteriyel hücre duvarında yer alan integral bir membran proteiniDir. Bu protein mikobakterinin lipid metabolizmasında ve büyümesinde rol oynayan triaçilgliserit moleküllerinin mikobakteri iç hücre zarından periplazmaya taşınmasında görev almaktadır (47).

Drage ve ark. (48)'ın yaptığı çalışmada mikobakteri hücre duvarına glikolipit taşınmasının bakteri virülansında etkili olduğu gözlenmiştir. Ayrıca insan ve fareler üzerinde yapılan deneylerde toll benzeri reseptör-2 (TLR2) ligandı olduğu bulunmuştur (49). LprG proteininin lipit taşıyan ve taşımayan formlarının her ikisinin de TLR2 ligandı olma özelliği gösterdiği fakat lipit içeren formun daha etkin bir protein olduğu bildirilmiştir (48). LprG proteini, TLR2'ye afinite gösteren lipomannan (LM), LAM ve fosfotidilinozitol mannozitolere (PIM) bağlanmasını sağlayacak bir kaviteye sahiptir. Bu sayede bu moleküllerin TLR2 tarafından tanınmasını sağlamaktadır (48, 50). Gehring ve ark. (51) mikobakterinin bağışıklık sisteminden kaçma başarısında LprG'nin TLR2 ligand fonksiyonu ile primer insan makrofajlarında majör histokompatibilite kompleks – Sınıf II (MHC-II) aracılı antijen işleme sürecini inhibe ettiğini ve böylelikle enfekte olan makrofajların CD4+ T hücreleri tarafından tanınma olasılığını azalttığını bildirmiştir. TLR2 spesifitesine ek olarak Carrol ve ark. (52), mikobakterinin insan dendritik hücrelerine ve makrofajlarına tutunması sırasında LprG ile DC-SIGN (CD209, dendritic-cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin) proteinleri arasındaki proteoglikan etkileşimlerinin rolü olduğunu bildirmiştir. Diğer yandan LprG'nin lipoglikan bağlama kapasitesine sahip olması mikobakteri hücre duvarının modifikasyonunu sağlamakta ve makrofajlar içerisinde oluşan fagozom-lizozom füzyonunu inhibe ederek mikobakteri sağ kalımına imkan vermektedir (50, 53). Benzer olarak, Vázquez ve ark. (54) tarafından LprG proteininin sığır makrofajlarında fagozom olgunlaşmasını durdurduğu gözlenmiştir. Bunların yanında Hovav ve ark (55), LprG'nin bağışıklık yanıtları baskılayarak mikobakteriye karşı duyarlılığın artmasında rol oynadığı bildirmiştir. LprG ile ilgili çalışmalardan elde edilen veriler doğrultusunda, bu proteinin mikobakterinin yaşam döngüsü ve virülansı üzerinde hayati bir rol oynadığı görülmektedir. Bu özellikleri LprG proteinini ilaç ve aşı geliştirme çalışmaları için potansiyel bir hedef haline getirmektedir.

2.9.2. Mikobakteriyel AhpC Proteini

Alkil hidroksipeoroksit redüktaz C, Rv2428 veya AhpC adlarıyla bilinen bu protein hidroperoksitleri, organik peroksitleri ve peroksinitritleri daha az reaktif olan türevlere detoksifiye eden peroksiredoksin (Prx) ailesinin bir üyesidir. AhpE, AhpC, TPx, Bcp ve BcpB enzimleri *M. tuberculosis*'te tanımlanan beş Prx enzimidir (56). AhpC proteini mikobakteriyi oksidatif ve nitrözatif stresten korumaktadır. Peroksitlerin, mikobakterinin lipit yapılı hücre bileşenleri ile tepkimeye girmesi oldukça reaktif alkil hidroperoksitlerin oluşumuna yol açar. AhpC proteini organik peroksitleri, alkil hidroperoksitleri alkol türevlerine dönüştürürken, peroksinitrit gibi reaktif nitrojen türevlerini de nitrite indirgemektedir (56, 57). AhpC kristallerinin peroksinitrit redüktaz etkinliği *in vitro* çalışmalarla gösterilmiştir (58, 59). Ek olarak, Master ve ark. (60) AhpC mutanı *M. tuberculosis* suşunda, yabancı tip ile kıyaslandığında peroksinitrite karşı duyarlılığın arttığı ve makrofajlardaki sağ kalımının azaldığı görülmüştür. Bu çalışma ile enfeksiyonunun erken safhalarında, makrofajlar içerisinde oluşan oksidatif ortama karşı mikobakterinin kendisini korumak amacıyla geliştirdiği dirençte AhpC'nin spesifik antioksidan etkinliği gösterilmiştir. Yabancı-tip ve mutant *M. bovis* suşları kullanarak yapılan *in vivo* deneylerde AhpC ifadenmesi ve virülansın devamlılığı arasındaki pozitif ilişki gösterilmiştir. Ayrıca AhpC proteininin mikobakteride gelişen izoniazid direncinde önemli bir rol oynadığı anlaşılmıştır (61, 62). Mikobakterilerde bulunan AhpC proteininin, peroksinitrit redüktaz etkinliğinin yanı sıra, nikotinamid adenin dinükleotid (NADH) bağımlı peroksidaz aktivitesi oluşturarak bakteriyi, konakçı bağışıklık sisteminin ürettiği reaktif nitrojen ara ürünlerinden ve oksidatif stresten koruduğu da bilinmektedir (63, 64).

2.10. *Mycobacterium tuberculosis*'in Konakçı Bağışıklık Sisteminden Kaçışı

M. tuberculosis bağışıklık hücrelerini enfekte ederek bu hücrelere yerleşir. İmmün sistemin önemli bir yapıtaşı olan makrofajlar enfeksiyon boyunca patojenleri yutarak yok etmek, bağışıklık sisteminin diğer hücrelerini bağışıklık yanıtı oluşturma süreçlerine dahil etmek ve patojene ait antijenleri edinilmiş bağışık sistem hücrelerine sunmakla görevlidir. *M. tuberculosis*, makrofajlar tarafından yutulduktan

sonra fagozom şartlarında canlı kalmak, makrofaj işlevlerini sekteye uğratmak ve edinilmiş bağışıklık yanıtının patojene vereceği cevabı bozmak amacıyla; fagozom oluşum sürecini engellemek, konakçının toksik bileşenlerine karşı direnç oluşturmak ve apoptoz indüksiyonunu önlemek, gibi farklı stratejiler uygulamaktadır.

Fagozom Oluşum Sürecini Engellemek

Patojenik mikroorganizmaların öldürülebildiği hücrel kompartmanlar olan fagozomlar, sitoplazmada lizozomlar ile birleşerek fagolizozom adı verilen oldukça asidik ve yükseltgeyici bir ortam oluşturur. Mikobakteri tarafından konakçı hücrelerinde sağ kalmak ve çoğalmak için ortaya çıkarılan temel mekanizmalardan biri fagozom oluşumunun önlenmesidir. Bu sebeple fagozomal kompartman ile etkileşen mikobakteriyel bileşenlerin tanımlanması tüberküloz ile mücadelede önemli bir değer taşımaktadır (65). *M.tuberculosis* genomunda kodlanan PtpA (66), SapM (67), Ndk (68), PknG (69), PE_PGRS30 (70) gibi proteinlerin fagozom olgunlaşmasının inhibisyonu, fagozom-lizozom füzyonunun önlenmesi ve asidifikasyonunun engellenmesi gibi süreçlerde etkin rol aldığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.

Konakçının Toksik Bileşenlerine Karşı Direnci Artırmak

Makrofaj aracılı ölüme karşı koyabilmek *M. tuberculosis*'in virülansı için hayati bir işlevdir. Mikobakteriyi fagosite eden makrofajlar nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz (NOX2) enzimi aracılığıyla antimikrobiyal reaktif oksijen türevleri (ROS) ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) enzimi aracılığıyla antimikrobiyal reaktif nitrojen türevleri (NOS) üretmektedir. Bu reaktif oksijen ve nitrojen ara ürünleri (ROI/RNI) nükleik asitler, proteinler, lipitler ve karbonhidratlar gibi çeşitli moleküller ile tepkimeye girerek bakteri metabolizmasını bozmaktadır (65).

M. tuberculosis DosS ve DosT komponent proteinlerini oksijen, nitrik oksit ve karbon monoksit seviyelerindeki değişimleri algılamak için kullanırken, WhiB3 ve anti-sigma faktörü RsrA proteinlerini hücre içi redoks durumundaki değişimleri izlemek

için kullanılmaktadır. *M.tuberculosis* bu tür redoks sensörlerinin yardımıyla metabolik yollarını yeniden uyarlayarak enfekte bölgeler veya granülomalar içerisindeki besin yetersizliği, asidik, oksidatif, nitrözatif ve hipoksik koşullarda hayatta kalabilmektedir (71, 72). Ayrıca, *M.tuberculosis*'te bulunan mikotiyol ve tiyoredoksin sistemleri oksidatif strese maruziyet anlarında indirgeyici hücre ortamının sağlanmasına yardımcı olur (56). *M.tuberculosis*, hidroperoksitleri organik peroksit ve peroksinitrit türlerine dönüştürerek detoksifiye etmek için peroksiredoksinleri (Prx: AhpE, TPx, AhpC, Bcp, BcpB) (56), H₂O₂ ve organik peroksitlerin bozunması için katalaz enzimini (KatG) (73) üretmektedir. Ek olarak, *M.tuberculosis*'in kodladığı süperoksit dismutaz (Sod: SodA ve SodC) enzimleri serbest oksijeni moleküler oksijen ve hidrojen perokside dönüştürerek ROS'u detoksifiye eder (74). *M.tuberculosis* yapısında bulunan Mel2 (75), Acr1 (16 k-Da α -crystallin veya HspX olarak da adlandırılmaktadır) (76), Rv2136c, Rv2224c ve PonA2 (77) gibi proteinlerin de oksidatif, nitrözatif stres durumlarında RNI ve ROS'ların hücreye girişine engel teşkil eden bir bariyer gibi davranarak koruyuculuk sağladığı bildirilmiştir.

Apoptozu Önlemek

TB enfeksiyonu sırasında nekroptoz, apoptoz ve otofaji gibi biyolojik olaylar gözlenmektedir. Ökaryotik hücrelerin patojenlere karşı oluşturduğu doğuştan bağışıklık yanıtının temel mekanizmalarından biri olan apoptoz, konakçının bakteriyel büyüme nişini ortadan kaldırmasını sağlamaktadır. Bu süreçte konakçı enfekte hücreleri öldürme pahasına enfeksiyonu kontrol etmekte ve antijen çapraz sunumu yoluyla sitotoksik T hücrelerinin hazırlamasını desteklemektedir (78). Ek olarak, enfekte makrofajların apoptoza uğramasıyla bakteriyel antijenleri içeren veziküller oluşmakta ve bu veziküller daha sonra dendritik hücreler tarafından yutularak antijen-spesifik T hücrelerinin uyarılmasını sağlamaktadır (79). Bu nedenle apoptoz, doğuştan olan bağışıklıktan ayrı olarak edinilmiş bağışıklık yanıtının indüksiyonunu desteklemektedir. Apoptoz mikobakteriyel türlerin canlılığını azaltan bir süreçtir (80-

82). *M. tuberculosis* enfeksiyonun temel olarak nekroz ile sonuçlandığı, fakat BCG ve H37Ra gibi zayıflatılmış suşların daha çok apoptoz indüklediği gözlenmiştir (83).

Konakçıya ait mikrosidal yanıtlardan korunmak amacıyla patojenler tarafından anti-apoptotik stratejiler geliştirilir öyle ki yapılan çalışmalarda bakteriyel virülans ile apoptozu indükleme kapasitesi arasında negatif bir ilişki bulunmuştur (80, 84).

Fagozomlarda oluşan ROS ve NOS apoptoza sebep olduğundan, bakteriyel redoks hemostazında görev alan moleküllerin anti-apoptotik moleküller olarak da değerlendirilebileceği görüşü mevcuttur. *M.tuberculosis* redoks hemostazına ek olarak enfekte haldeki makrofajların yüzeylerinde protein ifadenmesinin modifiye edilmesi ve hücre membranının onarımının bozulması gibi stratejilerle apoptotik zarfın tamamlanmasını önlemekte ve nekrotik hücre ölümünü kolaylaştırmaktadır (85, 86).

M.tuberculosis genomunda bulunan pknE (87), Ndk (88), nuoG, katG, sodA/secA2, pknE and Rv3654c/Rv3655c genleri (89) anti-apoptotik genler olarak tanımlanmıştır. Bu proteinlerin yanı sıra MBTK üyelerinin sahip olduğu protein kinazlar, proteazlar, metal taşıyıcı proteinler, gen ifadenmesini düzenleyiciler ve işlevleri henüz aydınlatılmamış pek çok protein bu grup üyelerinin virulansında etkin rol oynamaktadır (65).

2.11. Aşılamanın Bağışıklama Prensipleri

Doğal bir enfeksiyon oluştuğunda bağışıklık sistemi patojene karşı spesifik bir tepki vermektedir. İdeal şartlarda, hastalıktan kurtulduktan sonra da oluşan bu bağışıklık yanıtının kişiyi koruması beklenmektedir. Spesifik bağışıklık olarak adlandırılan bu olgu dolaşımdaki antikolar, sitotoksik hücreler ve bellek hücreleri tarafından oluşturulmaktadır. Bellek hücreleri benzer tipteki antijenle tekrar karşılaşma durumunda aktif hale gelmektedir. İlk enfeksiyondan sonra oluşan primer cevabın aksine, tekrarlayan enfeksiyonların sebep olduğu yanıt oldukça hızlı gelişir ve genellikle hastalığın tekrar oluşmasını engelleyecek kadar güçlüdür (90). Konakçı hastalık etkenine karşı bağışıklık yanıtları aracılığı ile direnç oluşturduğundan, aşılama aynı zamanda etkin bağışıklama olarak da isimlendirilmektedir. Etkin bağışıklama

dışında konakçıda kısa süreli koruma sağlayacak spesifik antikorların uygulanması da mümkündür. Bu durum edilgen bağışıklama olarak adlandırılmaktadır (91).

Antijen spesifik bağışık belleğin oluşturulmasında rol oynayan edinilmiş bağışıklık sistemi hüморal ve hücresele olarak ikiye ayrılır (Şekil 2.2) Temel olarak hüморal bağışıklık yanıtları antikor oluşumu (bu yanıtlarda hücre aracılı olaylar da rol oynamaktadır), hücresele bağışıklık yanıtları ise sitotoksik hücre oluşumu ile alakalı süreçleri kapsamaktadır (91).

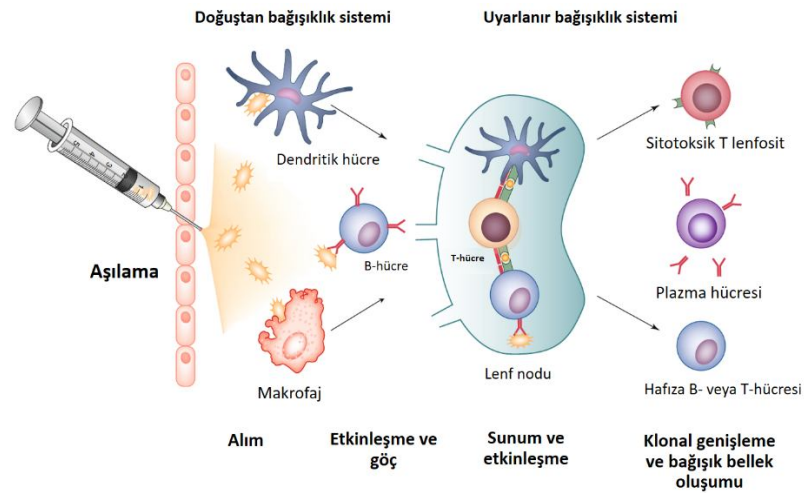


Şekil 2.2. Bulaşıcı hastalıklardan korunmada önemli bağışıklık ürünleri (Jiskoot ve ark. (91)'dan değiştirilerek).

Aşılamanın paradigması, antikorlar veya sitotoksik T hücrelerinin geliştirilmesi yoluyla antijen(ler)e karşı uzun süreli bağışıklığın oluşturulmasıdır. Bu süreç, antijenlerin ve adjuvanların antijen sunan hücreler (ASH) tarafından alımı, ASH olgunlaşması ve antijen spesifik B ve T hücrelerinin antikor ve sitotoksik T hücrelerinin üretimi için uyarımı şeklinde üç adımda özetlenebilir (92). Aşılama sonrasında, aşı formülasyonunda bulunan antijenler ve adjuvanlar olgunlaşmamış ASH veya B hücreler tarafından alınır. ASH'de oluşan sinyal uyarımı sonunda olgun fenotipe farklılaşma gelişir. Ardından bu sinyal sitotoksik T hücrelerine, yardımcı T hücrelerine ve B hücrelerine iletilir. Başarılı bir aşılanmanın son noktası ise, antijen spesifik antikorların ve sitotoksik T hücrelerin oluşturulmasıdır (Şekil 2.3) (91).

T lenfositleri sitokinlerin ana kaynağıdır. Bu hücreler yüzeylerinde antijen spesifik reseptörler barındırır ve böylece yabancı patojenlerin tanınmasına imkan sağlar. Temel olarak 2 ana T lenfosit alt kümesi bulunmaktadır. Bu alt kümeler yüzeylerinde bulunan, CD4 ve CD8 olarak bilinen moleküllerin varlığı ile birbirinden

ayrılmaktadır. CD4 ifadeleyen T lenfositler, yardımcı T hücreleri (T_h) olarak bilinen en üretken sitokin kaynaklarıdır. Bu altküme de kendi içinde T_{h1} ve T_{h2} olarak ikiye bölünür ve ürettikleri sitokinler de sırasıyla T_{h1} -tip sitokinler ve T_{h2} -tip sitokinler olarak adlandırılır. T_{h1} -tip sitokinler hücre içi patojenlerin yok edilmesi ve otoimmün tepkilerin devamlılığından sorumlu proinflamatuvar sitokinleri üretir. T_{h2} -tip sitokinler IgE üretimi ve anti-inflamatuvar yanıtlardan sorumludur (93).



Şekil 2.3. Aşı uygulamasından sonra bağışıklık yanıtının oluşumunda gerçekleşen adımların şematik gösterimi (Jiskoot ve ark. (91)'dan değiştirilerek).

T_{h1} hücreler IL-2, IFN- γ ve IL-12 salımını sağlarken, T_{h2} hücreler IL-4, IL-5 ve IL-10 salımına neden olur (94). T_{h1} hücreler temel olarak hücre aracılı bağışıklık yanıtının oluşumunda rol alır ve hücre içi patojenlerin yok edilmesini sağlar, T_{h2} hücreler ise daha çok hücre dışı patojenlere karşı koruma sağlayan humoral bağışıklıkta rol alır. Bu noktada IL-12 (T_{h1} yanıtı) ve IL-4 (T_{h2} yanıtı) arasındaki denge bağışıklık yanıtının şeklini belirlemektedir (95).

2.12. Aşı Tipleri

Aşılama, 1798'de Edward Jenner tarafından belgelendiği tarihten bu yana bulaşıcı hastalıkların önlenmesindeki en etkin yöntemdir. Günümüzde uyuşturucu bağımlılığı (kokain, nikotin), allerji, kanser ve Alzheimer gibi patolojilere yönelik aşı

uygulamaları da söz konusudur (91). İdeal bir aşı her yaşta %100 etkinlik göstermeli, tek doz ile yaşam boyu koruma sağlamalı, yan etki oluşturmamalı, çevresel koşullara dayanıklı, uygulaması kolay ve tercihen oral yol ile olmalı, üretimi kolay ve ucuz olmalıdır (91).

Hastalık etkeni olan patojenler ve onların konakçıları arasındaki karmaşık etkileşimlerin anlaşılmasına yönelik bilimsel çalışmalar ve laboratuvar tekniklerindeki ilerlemeler farklı tiplerdeki aşuların geliştirilmesine öncülük etmiştir. Günümüzde var olan ve/veya yeni ortaya çıkan her türlü bulaşıcı hastalığa karşı yeni aşı stratejileri geliştirilmesi üzerine çalışmalar devam etmektedir. Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Allerji ve Bulaşıcı Hastalıklar Enstitüsü (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIAID) tarafından yapılan sınıflandırmaya göre aşı çeşitleri tüm-patojen aşular (inaktive aşular, canlı-zayıflatılmış aşular ve şimerik aşular), altbirim aşular (polisakkarit aşular, konjuge aşular, toksoid aşular, rekombinant protein aşular ve virüs benzeri partiküller) ve nükleik asit aşular (plazmit DNA aşular, mRNA aşular, rekombinant vektör aşular) olarak sınıflandırılmıştır (96).

2.12.1. Tüm-Patojen Aşular

Geleneksel aşular hastalığa sebep olmayacak şekilde öldürülmüş veya zayıflatılmış patojenin kullanılmasıyla oluşturulmaktadır. Bu tür tüm-patojen aşular güçlü ve koruyucu bağışıklık yanıtları oluşturabilmektedir. Tüm-patojen aşular inaktive aşular ve canlı-zayıflatılmış aşular olarak gruplandırılabilir. Bakteriyel veya viral zayıflatma, patojen virülansının ortadan kaldırılması veya büyük ölçüde azaltılması yoluyla olur. Patojenik bir bakterinin aşı olarak uygulanabilmesini sağlayan öldürme veya inaktivasyon işlemi sıcaklık, formaldehit, aseton, fenol veya fenol-sıcaklık veya propiyolakton ile muamele şeklinde yapılmaktadır (90).

Aşı olarak kullanılmak üzere tasarlanan viral partiküller genellikle uygun hayvan hücre kültürü sistemlerinde üretilmektedir. Hücre kültürlerinin yanı sıra döllenen yumurta ve civciv embriyo dokusu da bu amaçla kullanılmaktadır. Bu grup viral aşuların örneği olan kabakulak aşuları canlı zayıflatılmış *Paramyxovirus parotitidis*

suşlarını içermektedir. Kızamık, kabakulak ve kızamıkçık aşı kombinasyonunun bileşeni olarak tüm dünyada çocukların aşılınması için kullanılmaktadır (90).

İnaktive Aşılar

İnaktive edilmiş veya öldürülmüş bir mikrobun bağışıklığı indüklediği ilk defa 19. yy'da gösterilmiştir. Bu tipteki aşılar örnek olarak her ikisi de formaldehit içerisinde inaktive edilmiş, alum adsorbe aşilar olan Hepatit A virüsü aşısı Havrix® ve Vaqta® verilebilir (97). Koronavirüs pandemisine karşı Sinovac firması tarafından geliştirilen CoronaVac aşısı da inaktive SARS-CoV-2 virüsü içeren bir aşıdır (98) .

Canlı-Zayıflatılmış Aşılar

Doku kültürü tekniklerinde kaydedilen ilerlemeler canlı-zayıflatılmış aşıların geliştirilmesine yardımcı olmuştur. Bu tür aşilar laboratuvar ortamında zayıflatılmış canlı mikrobu içeren aşılardır. Kızamık, kabakulak ve kızamıkçık (KKK, MMR) aşısı bu tür aşıya bir örnek olarak verilebilir. Canlı-zayıflatılmış aşilar, sadece bir veya iki doz aşılanmanın ardından ömür boyu bağışıklık sağlayan güçlü yanıtlar oluşturmaktadır. Rotavirüsün doku kültüründe çoklu pasajları yapılarak zayıflatılmasıyla geliştirilmiş olan Rotarix™ (GlaxoSmithKline Immunotherapeutics, Need-ham, MA) bu gruba örnek olarak verilebilecek rotavirüs aşısıdır (99). Diğer yandan *M.bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) aşısı da canlı-zayıflatılmış bakteriyel aşı olarak bu gruba bir örnek olarak verilebilir (100).

Şimerik Aşilar

Modern genetik mühendislik teknikleri, farklı virüslerin biyolojik özelliklerini ve genetik bilgilerini yapısında barındıran şimerik virüslerin oluşturulmasını mümkün kılmaktadır. Dengvaxia (CYD-TDV) veya bir diğer adıyla ChimeriVax (Sanofi Pasteur) şimerik bir tetra-antijenli aşıdır. Bu aşıda, sarıhumma 17D aşısı (YFV 17D) omurgasını oluşturan vektör genetik olarak modifiye edilerek deng humması virüsü (DENV) serotiplerinin (1 ve 4 arası) pre-membran ve zarf protein genlerini taşımaktadır. CYD-

TDV'de kullanılan suşların YFV 17D'deki suşlardan genetik ve fenotipik olarak daha stabil, non-hepatotropik ve daha az nörovirülan olduğu bildirilmiştir (101).

2.12.2. Altbirim (Aselüler) Aşılar

Altbirim (aselüler) aşılar patojenin tümü yerine sadece bağışıklık sistemini en iyi uyuracak bileşen(ler)ini içeren aşılardır. Bu aşılar daha güvenli ve üretimlerinin daha kolay olmasına rağmen antijenler tek başlarına kullanıldıklarında yeterli süre etki edecek bağışıklığı sağlamak için yeterli olamamaktadır. Bu nedenle güçlü bir koruyucu bağışıklık yanıtının ortaya çıkması için adjuvanlar ile formüle edilmeleri gerekmektedir. Boğmaca aşısının geliştirilmesi bu duruma örnek olarak verilebilir. İnaktive edilmiş *Bordetella pertussis* bakterisini içeren ilk boğmaca aşıları 1940'larda tanıtılmıştır. Etkinliklerine rağmen, tüm-hücre boğmaca aşıları enjeksiyon bölgesinde şişlik ve ateş gibi yan etkiler oluşturmuştur. Bu durum pek çok insanın aşıdan uzak durmasına ve 1970'lerde enfeksiyonların artışına yol açmıştır. Aşı üzerinde yapılan çalışmalar neticesinde hücre içermeyen (aselüler), saflaştırılmış *B. pertussis* bileşenlerini içeren boğmaca aşıları geliştirilmiştir. Bu aşıların tüm-hücre aşılarına benzer etki ve daha az yan etki profiline sahip olduğu görülmüştür (96).

Polisakkarit Aşılar

Polisakkarit aşılar patojenin yapısında bulunan polisakkaritlerle oluşturulan aşılardır. *Streptococcus pneumoniae* patojeninin immünojenik 23 polisakkaritinden oluşan Pneumovax®23 (Merck Sharp & Dohme) bu grup aşılar için örnek olarak verilebilir (102).

Konjuge Aşılar

Polisakkarit aşı antijenleri ve proteinlerin konjuge edilmesi ile bağışıklık yanıtlarının seviyelerinde artış gözlenmesi sonucu polisakkarit konjuge aşı çalışmaları hız kazanmıştır (103). *Haemophilus influenzae* tip b'ye karşı geliştirilmiş Act-HIB® (Sanofi Pasteur) aşısı 10 µg *H. influenzae* tip b polisakkaritinin 24 µg tetanus toksoidine konjuge edildiği bir aşıdır (104).

Toksoid Aşılar

Bu grup aşılar genellikle düşük konsantrasyonda (% 0.2-0.6) formaldehite karşı yedi gün veya daha uzun süre 30 °C sıcaklıkta diyalizlenmesiyle inaktive edilmiş toksinlerden oluşturulan aşılardır (105). Difteri ve tetanoz aşıları bugün oldukça yaygın kullanılan toksoid-temelli aşılardır. Difteri aşısı *Corynebacterium diphtheriae*, tetanoz aşısı ise *Clostridium tetani* toksinlerinden hazırlanmaktadır (90).

Rekombinant Protein Aşılar

Rekombinant protein aşılar, antijenik proteini kodlayan genlerin hücresel ifadeleme sistemlerinde büyük miktarlarda üretimi, saflaştırılması ve formülasyonu ile oluşturulan aşılardır. Rekombinant protein aşılarının en bilinen ve yaygın kullanılan örneği Hepatit B aşılarıdır. Bu aşı, maya hücre hattı (Engerix-B, GSK; Recombivax-HB, MSD), memeli hücre hattı (GenHevac-B, Pasteur-Merieux Avantis) (106) veya mantar hücre hattı (Shanvac-B; Shantha Biotechnic) (107) kullanılarak üretilmiş Hepatit B yüzey antijenini (HBsAg) içermektedir.

Virüs Benzeri Partiküller (VLPs)

Human papillomavirus (HPV)'nin dış kabuğunda bulunan proteinlerin virüse çok benzeyen partiküller oluşturduğu görülmüş ve bu yapılara virüs benzeri partiküller (virus-like particles, VLP) adı verilmiştir. Yapılan çalışmalarda VLP'lerin doğal virüsün oluşturduğu bağışıklık yanıtına benzer bir yanıt oluşturduğu anlaşıldıktan sonra bu sistemlerin aşı olarak kullanılması başlamıştır. HPV enfeksiyonlarına karşı geliştirilen Cervarix™ (GlaxoSmithKline) aşısı HPV16 ve HPV18 virüslerine ait başlıca kapsit proteini olan L1-VLP'nin ASO4 adjuvanı içerisinde formülasyonu ile oluşturulmuş bir VLP aşısıdır (108).

2.12.3. Nükleik Asit Aşılar

Aşılama alanındaki bir diğer araştırma konusu istenen bir bağışıklık yanıtını oluşturacak antijen veya antijenleri kodlayan genetik materyalin canlıya verilmesi ve antijenin vücudun kendi hücrelerinin bu genetik materyali kullanarak üretilmesidir.

Plazmit DNA Aşılar

Plazmit DNA aşılar, içerdikleri plazmit yapısında prokaryotik ve ökaryotik bölgeler bulunduran aşılardır (109). Halkasal yapıdaki plazmitte bulunan prokaryotik bölgede bakteri hücrelerinde çoğalma ve seçim sağlayan genetik elemanlar, ökaryotik bölgede ise organizmada bağışıklık yanıtı oluşturması istenen antijen(ler) ve ilgili genetik elemanlar bulunmaktadır (110). Günümüzde insanda kullanım için ruhsatlanmış bir DNA aşı bulunmamakla birlikte veteriner alanda kullanımları onaylanmış plazmit DNA aşıları bulunmaktadır. Bu aşılar atlarda Batı Nil Virüsü tedavisi için (Fort Dodge laboratories) somon balıklarında enfeksiyöz hematopoietik nekroz virüsüne karşı (Apex-IHN, Novartis Animal Health), köpeklerde melanoma tedavisi için (Oncept, Merial) ve domuzlarda büyüme hormonu salıveren hormon (GHRH) tedavisi içindir (LifeTide SW 5, VGX Animal Health) (111).

mRNA Aşılar

Mesajcı RNA (mRNA), DNA ve protein arasındaki bir aracıdır. mRNA 5' – uç, 5' çevrilmemiş bölge (untranslated region, UTR), stop sinyali ve ilgili genetik kodu içeren bölge, 3' – UTR ve bir poli(A) kuyruğu içermektedir. Hücre sitoplazmasına geçen bu molekül, ribozomda translasyona uğrayacak bir kalıp teşkil etmektedir. mRNA temelli farmasötikler ile ilgili çalışmalar kanserlerde immünoterapi, bulaşıcı hastalıklara karşı aşı geliştirilmesi, alerji tedavisi, protein replasmanı, genom mühendisliği ve genetik yeniden programlama alanlarında devam etmektedir (112). Koronavirüs pandemisine karşı kullanılmasına izin verilmiş iki mRNA temelli aşı vardır. Moderna ilaç firması (mRNA-1273) ve BioNTech/Pfizer firmalarının (BNT162b2) geliştirdiği aşılar mRNA temelli aşılardır (113).

Rekombinant Vektör Aşılar

Vektör aşılar, canlı aşılar ve altbirim aşıların sahip olduğu avantajları yapısında birleştiren aşılardır. Bu tür aşılar, patojene ait antijenik genleri ifadeleyen fakat kendisi patojenik olmayan enfeksiyöz virüslerinden oluşur. Retrovirüs, herpes simplex virüs, adenovirüs veya poxvirüslerinden türevlendirilen viral vektörler sıklıkla

enfeksiyon hastalıklarına karşı aşı geliştirilmesi amacıyla klinik ve klinik öncesi aşamalarda değerlendirilmektedir. Bu türdeki aşuların kullanımını kısıtlayan temel faktörler hastada daha önceden bu vektörlere karşı var olan nötralizan antikörlerin varlığıdır (114). AstraZeneca firması ve Oxford Üniversitesi tarafından geliştirilen ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) aşısı, SARS-CoV-2 yapısal yüzey glikoprotein antijenini (spike protein; nCoV-19) içeren replike olmayan şempanze adenoviral vektöründen (ChAdOx1) oluşmaktadır (115). Benzer olarak, Johnson & Johnson ilaç firmasının geliştirdiği koronavirüs aşısı JNJ-78436735 (Ad26.COV2eS) bir viral vektör aşısıdır (116).

2.13. Aşı Adjuvanları

Bağışıklamanın başarısı sadece immünojenik bileşenlere değil, aynı zamanda bunların sunuluş biçimine de bağlıdır. Bu sebeple modern aşı geliştirme yaklaşımında etkin ve kabul edilebilir adjuvanların kullanımı önemli bir yer tutar. Adjuvan, bir antijene karşı uyarılan hücresel ve/veya hümorale bağışıklık yanıtlarını artıran madde olarak tanımlanmaktadır. Adjuvanlar beraberinde uygulandıkları antijene karşı daha erken, güçlü ve uzun süren bağışıklama oluşmasını sağlamaktadır. Bu etkiyi depo etki göstererek yavaş antijen salımı ve uzatılmış antijen sunumu sağlayarak gerçekleştirirler. Ayrıca bölgesel doku hasarıyla ASH'leri uyarır ve bu hücrelerin yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanırlar. Adjuvanlar, antijenlerin ASH'ler tarafından alınmasını, taşınmasını ve sunumunu artırarak antijenlerin bölgesel lenf nodlarına taşınmasını sağlar (117). Canlı zayıflatılmış aşular aktif olarak çoğalabildiklerinden ve kendiliğinden artan bağışıklık yanıtı oluşturabildiklerinden genellikle adjuvanlara gerek duyulmaz. Ancak alt birim aşular bir patojende bulunan bileşenlerin hepsini içermediklerinden adjuvan ile formülasyona ihtiyaç duyulmaktadır (118). Ek olarak adjuvanların doz başına kullanılan antijen miktarını düşürebildikleri ve adjuvan üretiminin aşı antijeni üretiminden daha ucuz olduğu göz önüne alınırsa adjuvan kullanımının daha ekonomik olabileceği söylenebilir (90). İdeal bir adjuvanın güvenli olması (kabul edilmeyen lokal/sistemik yanıtlar oluşturmaması), zayıf immünojenlere karşı dahi koruyucu bağışıklık yanıtlarının oluşumunu sağlaması, non-pirojenik olması, kimyasal yapısının belirli olması, bebeklerde ve çocuklarda etkili

olması, antijenler ile stabil formülasyonlar oluşturması ve biyobozunabilir olması beklenmektedir (90).

Aşı ürünlerinde kullanılmasına izin verilmiş bazı aşı adjuvanları, özellikleri ve kullanıldıkları aşı ürünleri Tablo 2.1’de özetlenmiştir. Bu tabloda özetlenen antijenler dışında sitokin, lipozom, bağışıklık uyarıcı kompleks (ISCOM), muramil dipeptit ve virozom temelli adjuvanlar kullanılarak hazırlanan aşı formülasyonlarında antijen spesifik bağışıklık yanıtlarında iyileşme görüldüğünü bildiren pek çok çalışma mevcuttur (119, 120).

Tez çalışması sırasında kullanılan aşı adjuvanı Montanide ISA 61 VG (SEPPIC, Fransa), dış faz yağ-iç faz su (w/o) tipi emülsiyon formülasyonları için kullanıma hazır aşı adjuvanıdır. Düşük viskoziteli stabil aşı formülasyonları üretir, güçlü ve uzun-sürelili bağışıklık yanıtları oluşturur. Güçlü hücreli bağışıklık yanıtının uyarılmasını sağlar. Genel olarak, parenteral uygulama için önerilmektedir. T_H1 tipi bağışıklık yanıtlarının artırılması için tasarlanmıştır. Kullanım alanı veteriner aşı formülasyonları olup, hedef türler sığır ve küçükbaş geviş getiren türler için kullanımı uygundur (121).

Adjuvan içermeyen etkili aşı formülasyonları da mevcuttur. *Haemophilus influenzae* tip B (ActHIB, Sanofi), canlı zona aşısı (Zostavax, Merck), kızamık, kabakulak ve kızamıkçık (M-M-R®II, Merck), meningokok (Menveo, GlaxoSmithKline), rotavirus (Rotarix, GlaxoSmithKline), polio (Ipol, Sanofi), sarı humma (YF-Vax, Sanofi) aşılardan bazıları gibi bazı aşılarda adjuvan içermeyen formülasyonlardan oluşmaktadır (122, 123).

Tablo 2.1. İnsanlarda kullanılmasına izin verilen adjuvanlar ile hazırlanmış ticari aşılar.

Adjuvan Türü	Adjuvan Yapısı	Adjuvanı İçeren Aşı Ürününün Adı	Aşı Ürününün Ticari isim Aşı Türü	Ref.
Mineral tuzlar	Kalsiyum ve alüminyum tuzları	Diphtheria & Tetanus Toxoids & Acellular Pertussis Vaccine	Infanrix , Toksoid Aşı	(124)
		Hepatitis B (recombinant) and Inactivated Poliovirus Vaccine Combined	Pediarix, Kombine (Toksoit, rekombinant, inaktive)	
Lipit A ve türevleri	Bakteri endotoksini lipopolisakkarit türevleri	Human Papillomavirus Bivalent (Types 16, 18) Vaccine, Recombinant	Cervarix, Rekombinant	(118, 122, 124)
		Zoster Vaccine Recombinant	SHINGRIX, Rekombinant	
Emülsiyonlar	Yağ içinde su (o/w) ve su içinde yağ (w/o) emülsiyonları - MF59 - AS03	Influenza Vaccine	FLUAD, Inaktive	(124, 125).
		Egg-derived H1N1 influenza	Pandemrix Inaktive Pumarix Inaktive	
Saponinler	Bitkisel triterpen glikozitlerdir	Zoster Vaccine Recombinant	SHINGRIX Rekombinant	(91, 122)
CpG	Sitozin fosfoguanozin oligonükleotitler (CpG ODN)	Hepatitis B Vaccine (Recombinant)	HEPLISAV-B Rekombinant	(124)

2.14. BCG Aşısı

İnsanlarda TB hastalığında kullanılmak üzere onaylanmış tek aşı TB hastası ineklerden izole edilmiş olan *M. bovis*'ten geliştirilmiştir. İzole edilen bu suşun zayıflatılmış formunun ilk güvenilirlik ve etkililik çalışmaları sığır ve diğer hayvanlarda yapılmıştır. Daha sonra 1921 senesinde ilk defa bir bebek, oral yoldan bu suşun zayıflatılmış türevi ile aşılanmıştır. Söz konusu zayıflatılmış suş Fransız bilim insanları Albert Calmette ve Camille Guérin tarafından geliştirilen *M. bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) suşu olup, bugün erken çocukluk döneminden itibaren tüberküloz hastalığının önlenmesi için kullanılan tek aşı olma özelliğini taşımaktadır (10).

1921'den bu yana milyonlarca insan BCG aşısı ile aşılanmıştır (126). Literatürde BCG'nin etkinliği üzerine yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar bildirilmiştir. Ancak, aşının erişkinlerdeki bağışıklaması oldukça farklı olup, %0-80 aralığında değişmektedir (127). Erişkin bireylerde BCG ile aşılanmanın enfeksiyonu, latent tüberküloz gelişimini veya latent hastalığın yeniden aktivasyonunu güvenilir olarak önlemediğini gösteren bazı çalışmalar mevcuttur (128). Ancak bebeklerde BCG aşılanmasının, çocuklukta TB menenjitinden koruma sağladığı bilinmektedir (129). BCG aşısının koruyuculuk süresini inceleyen çalışmalarda, bebeklikte yapılan BCG koruyuculuğu için 15 yıl (130) ve 50-60 yıl (131) olduğunu bildiren çalışmalar yayınlanmıştır. Okul çağı çocukları üzerindeki araştırmalarda ise BCG koruyuculuğunun 20 yıla kadar sürebildiği bildirilmiştir (132). Tekrarlayan BCG aşılarının ise ekstra koruma sağlamadığı düşünülmektedir. TB'nin önlenmesi amacıyla BCG aşılanması yaklaşık 100 yıldır insanlarda ve sınırlı olarak da hayvanlarda yapılmaktadır (133).

Hayvanların TB'den korunması amacıyla yapılan BCG aşılama çalışmalarında tilki kuskusu (134), geyik (135), porsuk (136) gibi hayvanlarda aşının etkin olduğu gösterilmiştir. BCG aşısı günümüzde TB ile mücadele kapsamında evcil ve vahşi hayvanların aşılanması için kullanılan tek aşıdır. BCG'nin koruyuculuğu üzerine yapılan çalışmalarda bu aşının sığır (137), dağ gelinciği (138), yaban domuzu (139) üzerinde etkin olduğunu ortaya çıkmıştır. Son yıllardaki çalışmalar, sığırlarda BCG aşısı ile yapılan çalışmalar sığırlarda TB hastalığının kontrolünde bu aşının önemini ortaya

koymaktadır. Ancak BCG ile tam bir koruma sağlanamasa da sığırların TB'den korunmasında henüz BCG'den daha etkin bir aşının varlığı gösterilmemiştir (140).

Ülkemizde Sağlık Bakanlığı Genişletilmiş Bağışıklama Programı çerçevesinde (Sağlık Bakanlığı, Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü'nün 13.03.2009 tarihli ve 17 sayılı genelgesi, 17.10.2011 güncellemesi) doğumlarından 2 ay kadar sonra bebeklerin BCG ile aşılması önerilmektedir. BCG ile aşılanmamış 3 ay ve daha büyük çocukların 6 yaşına gelene kadar TDT yaptırması ve sonucun 0-5 mm arasında çıkması durumunda BCG ile aşılanması yapılmaktadır. Altı yaşından sonra BCG aşısının yapılması önerilmemektedir (2).

2.15. Tüberküloza Karşı Yeni İlaç ve Aşı Geliştirme Çalışmaları

DSÖ tarafından hazırlanan küresel TB raporunda güncel olarak ilaca duyarlı, çoklu ilaç dirençli veya gizli TB enfeksiyonlarında kullanılması amacıyla 22 ilaç adayının Faz I, II ve III çalışmalarında denendiği bildirilmiştir. 2020 yılı itibariyle 14 aşı adayı klinik denemelere alınmıştır. Bunlardan 3 tanesi Faz-I, 9 tanesi Faz-II ve 2 tanesi Faz-III aşamasındadır (141).

Onaylı tek TB aşısı olan BCG, çocukluk çağı aşılama programlarının büyük kısmında uygulanmasına rağmen küresel TB insidansındaki düşüşün yavaş olması nedeniyle tüm yaş gruplarında tüm TB formlarına karşı güvenli koruma sağlayacak daha etkin bir aşıya ihtiyaç duyulmaktadır. 2020 yılı itibariyle klinik değerlendirmede olan TB aşıları Tablo 2.2'de sunulmuştur (141).

2.16. Prime – Boost Stratejisi

Prime-boost aşılama stratejisi, aynı antijenle primer ve booster olarak aşılanma veya birbirinden farklı antijenler ile primer ve booster aşılanma olarak tanımlanmaktadır (142). Bu stratejinin amacı, ilgili immünojenin organizmada daha güçlü immün yanıtlar uyarmasını sağlamaktır. DNA aşılar, viral vektörler, rekombinant proteinler ve peptitler günümüzde tüberküloz ve diğer bulaşıcı hastalıklara karşı geliştirilmeye çalışılan prime-boost stratejisinde değerlendirilmektedir (143).

Tablo 2.2. Klinik çalışmaları devam eden TB aşuları (141).

FAZ	AŞI ADAYI	AÇIKLAMA
FAZ-I	AEC/BC02 (Anhui Zhifei Longcom)	AEC/BC02. Mikobakteri tüm hücrelerini veya özütünü içeren bir aşıdır. AEC/BC02 aşısı Ag85 ve ESAT6-CFP10 füzyon proteinini ifadeleyen, CpG ve alum adjuvan içeren, liyofilize rekombinant bir aşıdır.
	Ad5 Ag85A (McMaster, CanSino)	Ad5 Ag85A. Ag85A ifadeleyen adenovirus serotip 5 vektör aşısıdır. Güvenilirliği ve immünojenitesi BCG ile bağışıklanmamış ve bağışıklanmış sağlıklı gönüllülerde test edilmektedir.
	ChAdOx185A – MVA85A (ID/IM/Aerosol) University of Oxford	ChAdOx185A maymun (simian, şempanze, primat) adenovirüs aşısıdır. MVA85A ise rekombinant pox virüsüdür. Her iki aşı da antijen 85A ifadelemektedir. Bu aşı adayları müşterek heterolog prime-boost rejimi oluşturma amacıyla geliştirilmiş olup sistemik ve mukozal yollar ile uygulanmaktadır.
FAZ-IIa	ID93 + GLA-SE (IDRI, Wellcome trust, IAVI)	ID93 + GLA-SE. Protein/adjuvanttan oluşmuş alt birim aşıdır. Aşı <i>M. tuberculosis</i> 'in virülansı (Rv2608, Rv3619 and Rv3620) veya latensi (Rv1813) ile ilgili dört antijenden ve GLA-SE adjuvanından oluşmaktadır.
	MTBVAC (Biofabri, TBVI, Zaragoza)	Canlı <i>M.tuberculosis</i> aşısıdır. Suş <i>phoP</i> ve <i>fadD26</i> genleri silinerek zayıflatılmıştır. Aşının birincil hedef popülasyonu yenidoğanlar olup aşının BCG yerine kullanımı hedeflenmektedir. İkincil hedef popülasyonu adolesan ve yetişkinlerden oluşmaktadır. Bu yaş grubu için booster aşı olarak düşünülmektedir.
	GamTBvac (Rusya Federasyonu Sağlık Bakanlığı)	GamTBvac rekombinant alt birim aşıdır. Dextran bağlayıcı birimi modifiye edilmiş Ag85 ve ESAT6- CFP10 MTB antigenleri ile CpG ODN adjuvanından oluşmakta olup, formülasyonlarında dekstranlar kullanılmıştır. BCG booster aşısı olarak kullanımı amaçlanmaktadır.
	TB/FLU-04L (RIBSP)	TB/FLU-04L. Mukozal vektör aşıdır. Ag85A ve ESAT-6 antijenlerini ifadeleyen, çoğalamayan zayıflatılmış influenza virüs vektörü temelinde oluşturulmuştur. Bebeklerde, adolesanlarda ve yetişkinlerde profilaktik boost aşı olarak tasarlanmıştır.

Tablo 2.2. (Devam) Klinik çalışmaları devam eden TB aşıları (141).

FAZ	AŞI ADAYI	AÇIKLAMA
FAZ-IIb	BCG yeniden aşılama (Gates MRI)	Gates MRI-TBV01-201. Çalışma BCG ile yeniden aşılanmanın <i>M.tuberculosis</i> enfeksiyonuna karşı koruma sağladığının gösterilmesi amacıyla yapılmaktadır. Bill ve Melinda Gates Medikal Araştırma Enstitüsü tarafından desteklenmektedir. Yeniden aşılamadan 48 ay sonra koruma süresinin değerlendirilmesi, <i>M.tuberculosis</i> enfeksiyon riski ile ilişkili biyomarkerların tanımlanması, validasyonu veya enfeksiyona karşı koruyuculuğu değerlendirilmektedir.
	DAR-901 booster (Dartmouth, GHIT)	Bu aşı sıcaklıkla inaktive edilmiş, non-tuberculosis tüm hücre içeren mikobakteriyel aşı boosterıdır.
	H56:IC31 (SSI, Valneva, IAVI)	IC31c adjuvanı ile formüle edilmiş üç <i>M.tuberculosis</i> antijeninden (Ag85B, ESAT-6 ve Rv2660c) oluşan bir altbirim aşısıdır.
	M72/AS01E (GSK, Gates MRI)	İki <i>M. tuberculosis</i> antijenin (32A ve 39A) AS01E adjuvanı ile formülasyonu ile hazırlanmış bir aşısıdır.
	RUTI (Archivel Farma, S.L)	Canlı olmayan, <i>M.tuberculosis</i> 'in hücre duvarı fragmentlerinden oluşturulmuş poliantijenik bir aşısıdır. Kısa süreli fakat yoğun antibiyotik tedavisi ile birlikte terapörük aşı olarak kullanımı düşünülmektedir. Aşının temel hedefi çoklu ilaç direnci bulunan TB hastalarıdır.
FAZ-III	MIP/Immuvac (ICMR, Cadilla Pharmaceuticals)	Isı ile inaktive edilmiş <i>M. indicus pranii</i> aşısıdır. Hindistan ve FDA tarafından immünoterapötik ve immünoprofilaktik olarak multibasiller cüzzam hastalarının tedavisinde standart çoklu ilaç tedavisine ek olarak kullanılmak ve aynı zamanda, cüzzam hastalarıyla yakın irtibat halindeki kişileri cüzzamdan korunmasında kullanımı için onaylanmıştır.
	VPM1002 (SIPL, Cadilla Pharmaceuticals)	Canlı rekombinant aşısıdır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Maddeler, Cihazlar ve Yazılımlar

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Madde	Marka
2-merkaptoetanol	Sigma-Aldrich, ABD
Agaroz	Sigma-Aldrich, ABD
Akrilamit	Sigma-Aldrich, ABD
Amonyum persülfat	Sigma-Aldrich, ABD
Ampisilin	Sigma-Aldrich, ABD
Bradford Reagent	Fermentas, ABD
Brom fenol mavisi	Sigma-Aldrich, ABD
Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrich, ABD
Coomassie blue G-250	Sigma-Aldrich, ABD
Disodyum EDTA	Sigma-Aldrich, ABD
DNA ladder (1 kb)	Thermo Scientific, ABD
DNA ladder (100 bp)	Thermo Scientific, ABD
dNTP karışımı	Thermo Scientific, ABD
DTT	Sigma-Aldrich, ABD
Etanol	Merck, ABD
Etidyum bromür	Sigma-Aldrich, ABD
Glasiyel asetik asit	Sigma-Aldrich, ABD
Gliserol	Sigma-Aldrich, ABD
Glisin	Sigma-Aldrich, ABD
Glisin	Sigma-Aldrich, ABD
HCl	Merck, ABD
HRP-konjuge Antimouse IgG antikor	Sigma-Aldrich, ABD
IPTG	Invitrogen, ABD
İnsülin iğnesi	BD Biosciences, ABD
İzopropanol	Sigma-Aldrich, ABD

Kalsiyum klorür dihidrat	Sigma-Aldrich, ABD
Kanamisin	Sigma-Aldrich, ABD
LB-Broth (Miller)	Sigma-Aldrich, ABD
LB-Broth (Miller)-agar	Sigma-Aldrich, ABD
Metanol	Sigma-Aldrich, ABD
MgCl ₂	Thermo Scientific, ABD
Montanide™ ISA 61VG (w/o)	Seppic, Fransa
N,N'-metilenbis(akrilamit)	Sigma-Aldrich, ABD
Nitroselüloz membran	BioRad, ABD
pGEM-T Easy Vektör Kit	Promega, ABD
pET-28a-c(+)	Novagen, ABD
Potasyum Asetat	Sigma-Aldrich, ABD
Potasyum fosfat monobazik	Merck, ABD
Potasyum klorür	Merck, ABD
PZR primerleri	SenteBiogen, Türkiye
Siğır serum albumini	Sigma-Aldrich, ABD
Sodyum bikarbonat	Sigma-Aldrich, ABD
Sodyum dodesil sülfat	Sigma-Aldrich, ABD
Sodyum fosfat dibazik	Merck, ABD
Sodyum hidroksit	Merck, ABD
Sodyum karbonat	Sigma-Aldrich, ABD
Sodyum klorür	Merck, ABD
Sükroz	Sigma-Aldrich, ABD
TEMED	Sigma-Aldrich, ABD
Tris HCl	Sigma-Aldrich, ABD
Trizma Baz	Sigma-Aldrich, ABD
Tween-20	Sigma-Aldrich, ABD
Whatmann Kağıdı	BioRad, ABD
X-gal	Sigma-Aldrich, ABD
Yağsız süt tozu	Merck, ABD

3.1.2. Kullanılan Hücreler, Biyolojik Maddeler ve Kitler

Hücre/Biyolojik Madde/Kit	Marka
Alkalen fosfataz	Roche, ABD
<i>Bam</i> HI	Thermo Scientific, ABD
<i>Bgl</i> II	Thermo Scientific, ABD
<i>E.coli</i> BL21(DE3)	Thermo Scientific, ABD
<i>E.coli</i> DH5 α	Thermo Scientific, ABD
Fare IL-12 ELISA Kit	Invitrogen, ABD
GeneJET Gel Extraction Kit	Thermo Scientific, ABD
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific, ABD
<i>M.bovis</i> BCG (ATCC 35743) genomik DNA	Doç. Dr. Alpaslan Alp, Hacettepe Ü. Tıp F. Tıbbi Mikrobiyoloji AD
T4 DNA ligaz	Thermo Scientific, ABD
<i>Taq</i> DNA polimeraz	Thermo Scientific, ABD

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

Cihaz	Marka
- 80 °C dondurucu	ESCO, ABD
Biyogüvenlik kabini (Class 2)	ESCO, ABD
Buzdolabı (4 °C, - 20 °C kabinli)	Arçelik, Türkiye
Çalkalamalı inkübatör	Lab Companion, ABD
Çalkalayıcı	Lab-Line, Hindistan
Çalkalayıcılı inkübatör	Lab. Companion, ABD
Saf su cihazı	Elga, İngiltere
Elektroforez tankı, Midicell EC350	BioRad, ABD
Elektroforez tankı, Mini-Protean Tetracell	BioRad, ABD
Güç ünitesi, PowerPac	BioRad, ABD
Hassas terazi	Sartorius, Almanya
Isıtıcılı inkübatör	VELP, İtalya
Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	Isotex, ABD

Laminar akış kabini	ESCO, ABD
Mikroplaka okuyucu	Molecular Devices, ABD
Mikrospin cihazı	Isolab, Almanya
Otoklav, Hiclave	HMC Europe, Almanya
pH metre	Sartorius, Almanya
PZR cihazı	Techne, İngiltere
Santrifüj	Hettich, Almanya
Soğutma-ısıtma kabini	Biolab, Türkiye
Soğutmalı Santrifüj	Centurion, İngiltere
Spektrofotometre, NanoDrop 2200c	Thermo Scientific, ABD
Su banyosu	Labor teknik, Türkiye
Transillüminator	Alpha Inn. Corp., ABD
Vorteks	VELP, İtalya

3.1.4. Kullanılan Yazılımlar

Yazılım	Marka
GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc., ABD

3.2. Rekombinant Protein Üretimi İçin Uygulanan Ortak Yöntemler

3.2.1. Kompetan Hücrelerin Hazırlanması

Bakteri inkübasyonu ve kompetan hücre hazırlanması sırasında kullanılan çözeltiler ve çalışma ortamı sterilize edilmiştir. Kompetan hücre hazırlama işlemleri buz üzerinde yapılmıştır. İnkübasyon işleminde antibiyotik içermeyen Luria Bertani (LB)-agar-Miller (Sigma: 15 g/L agar, 10 g/L NaCl, 10 g/L Trypton, 5 g/L maya özütü) içerisindeki *E.coli* DH5 α ve *E.coli* BL21(DE3) suşlarından steril bir pipet ucu yardımıyla bir miktar alınmış ve 5 mL Miller LB (Sigma, 10 g/L NaCl, 10 g/L Trypton, 5 g/L maya özütü) ortamına aktararak 37 °C'de 200 rpm hızda karıştırıcılı inkübatörde 16 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra kültür 200 mL antibiyotiksiz LB ortam bulunan erlene aktarılmış ve 37 °C'de 200 rpm hızda inkübe edilmiştir. OD₆₀₀ değeri 0.4-0.6'ya ulaştığında erlenler buz üzerinde 15 dakika bekletilmiş ve 4 °C'de 3500 rpm hızda 5

dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernatant atılmış ve pellet 20 mL soğuk CaCl₂ (10 mM) çözeltisinde buz içinde süspansiyon edilmiştir. Devamında hücreler 4 °C'de 3500 rpm hızda 5 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant atılmıştır. Elde edilen hücre pelleti % 15 (h/h) gliserol içeren 75 mM CaCl₂ çözeltisi içinde yeniden süspansiyon edilmiş ve 100'er µL'lik hacimlere ayrılarak 15-30 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra sıvı azot içerisinde dondurularak - 80 °C'de saklanmıştır (144).

3.2.2. Transformasyon

Tüm transformasyon işlemlerinde steril ekipman, çözelti ve ortam kullanılmıştır. pGEMT ve pET-28a plazmitlerine klonlanan genlerin kompetan *E.coli* DH5α ve kompetan *E.coli* BL21(DE3) suşlarına transformasyonu için - 80 °C'deki gliserol stoklarından alınan kompetan *E.coli* suşları buz üzerinde çözündürülmüş ve 100 µL bakteri süspansiyonu steril bir ependorf tüpe aktarılmıştır. Bakteri üzerine 10 µL ligasyon ürünü yavaşça pipetlenerek ilave edilmiştir. Tüp 20 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra 60-90 saniye 42 °C'deki su banyosunda tutulmuştur. Daha sonra tekrar 5 dakika buz üzerinde bekletilmiş ve devamında üzerine 500 µL steril LB-Broth ilave edilerek 37 °C'de 250 rpm hızdaki karıştırıcılı inkübatörde 80 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon tamamlandığında tüp oda sıcaklığında, 5000 rpm hızda, 2 dakika santrifüjlenmiş ve 500 µL süpernatant atılmıştır. Transformasyon edilen hücreler ampisilin (100 µg/mL) veya kanamisin (30 µg/mL) içeren seçici ortama ekilmiştir. *ahpC* veya *lprG* genleri ile ligasyon yapılan pGEM-T vektörleri, transformasyon sonrasındaki mavi-beyaz koloni seçimi için 80 mg/mL 5-brom-4-klor-3-indoil β-D-galaktopiranozid (X-gal; ThermoScientific), 0.5 mM izopropil β-D-tiyogalaktozid (IPTG; Bio-Rad) ve 100 µg/mL ampisilin içeren LB-agar ortamına ekilmiştir.

3.3. *ahpC* ve *lprG* Genleri İçin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

ahpC ve *lprG* genlerinin PZR ile çoğaltılması sırasında kalıp olarak kullanılan DNA, *M. bovis* BCG (ATCC 35743, GeneBank CP003494.1) suşundan izole edilerek saflaştırılan genomik DNA olup, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Sayın Alpaslan ALP tarafından sağlanmıştır. Genlerinin PZR ile çoğaltılması sırasında kullanılacak primerlerin tasarımında NCBI Gen Bankası veritabanı (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=>) kullanılmıştır. <http://www.restrictionmapper.org/> web tabanlı biyoinformatik aracı ile yapılan kontrollerde ilgili enzimlerin *ahpC* geninin *Bam*HI ve *Hind*III; *lprG* geninin *Eco*RI ve *Hind*III kesim enzimleri ile non-spesifik olarak kesilmediği gözlenmiştir. Bu sebeple PZR primerleri, *ahpC* geninin 5' ucunda *Bam*HI ve 3' ucunda *Hind*III enzim kesim bölgesi, *lprG* geninin 5' ucunda *Eco*RI ve 3' ucunda *Hind*III enzim kesim bölgesi olacak şekilde tasarlanmıştır. PZR deneylerinde kullanılacak ileri ve geri primerlere ait bilgiler Tablo 3.1'de sunulmuştur.

Tablo 3.1. Polimeraz zincir reaksiyonu için tasarlanan ileri ve geri primerler.

Gen Ürününün Uzunluğu (bp)	Primer Adı	Nükleotid Dizisi	G-C oranı (%)	Tm (°C)
588	<i>ahpC</i> - F	5'- ggatcc atgccactgctaaccattg-3'	39.4	59.32
	<i>ahpC</i> - R	5'- aagctt ggccgaagccttgag-3'	44.4	56.31
711	<i>lprG</i> - F	5'- gaattc atgctggacccccaga-3'	44.8	58.56
	<i>lprG</i> - R	5'- aagctt gctcaccggggctt-3'	48.1	58.26

Yeşil BamHI; Kırmızı EcoRI ve Turuncu HindIII enzimlerinin kesim bölgeleridir.

lprG ve *ahpC* genlerinin çoğaltılması için oluşturulan PZR karışımının bileşenleri ve toplam 25 µL'lik reaksiyon karışımındaki son derişimleri Tablo 3.2'de verilmiştir. PZR çalışmasında negatif kontrol olarak kullanılan karışıma kalıp DNA haricindeki bileşenler ilave edilmiştir.

Tablo 3.2. PZR çalışması için hazırlanan çözeltilerin bileşenleri ve derişimleri.

PZR Bileşenleri	Reaksiyondaki derişimleri
10X <i>Taq</i> Buffer	1X derişim
MgCl ₂	2.5 mM
dNTP	0.6 mM
İleri Primer (F-Primer)	0.2 mM
Geri Primer (R-Primer)	0.2 mM
<i>Taq</i> Polimeraz	1 U/µL
Kalıp DNA	5 ng

PZR deneyleri için uygulanan basamaklar, sıcaklıklar, süre ve döngü sayılarına ait veriler Tablo 3.3'te sunulmuştur.

Tablo 3.3. PZR çalışmasında uygulanan deney koşulları.

Basamaklar	<i>ahpC</i>	<i>lprG</i>
Başlangıç denatürasyonu	94 °C – 10 dakika	94 °C – 10 dakika
*Denatürasyon	94 °C – 1 dakika	94 °C – 1 dakika
*Annealing (Primer Eşleşmesi)	52 °C – 30 saniye	52 °C – 30 saniye
*Elongation (Primer Uzaması)	72 °C – 1 dakika	72 °C – 1 dakika
Final Extention (Son Uzama)	72 °C – 10 dakika	72 °C – 10 dakika

*Denatürasyon, annealing ve elongation basamakları toplamda 30 döngü olarak uygulanmıştır.

PZR deneyi sonrasında reaksiyon ortamları %1 (a/h) agaroz jelde 90V elektrik akımında yürütülmüştür. Elde edilen PZR ürünlerinin agaroz jelden ekstraksiyonu için Thermo GeneJET Gel Extraction Kit (K0692, ABD) kiti, üretici tarafından verilen protokole uygun olarak kullanılmıştır. Tüm saflaştırma işlemleri oda sıcaklığında yapılmıştır. Santrifüj işlemleri oda sıcaklığında ve 12.000 xg hızda yapılmıştır. Kullanılacak DNA parçası bistüri yardımıyla agaroz jelden kesilerek çıkartılmış, 2 mL'lik temiz mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve jel parçasının ağırlığı ölçülmüştür. Jel parçasının ağırlığına göre 1:1 (a/h) oranında bağlama tamponu ilave edilmiş ve karışım 50-60 °C su banyosunda 10 dakika bekletilerek jelin tamamen erimesi sağlanmıştır. Eriyik vortekslenmiş ve GeneJET saflaştırma kolonuna aktarılmıştır. Kolonlar 1 dakika santrifüjlendikten sonra elüt uzaklaştırılmıştır. Daha sonra kolona 700 µL yıkama tamponu ilave edilmiş ve bir dakika daha santrifüj işlemi uygulanarak kolon tamponla yıkanmıştır. Bir dakika daha santrifüj yapılarak bir önceki basamaktan kalan rezidüel yıkama tamponunun kolondan atılması sağlanmıştır. Devamında GeneJET saflaştırma kolonu temiz bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiş ve üzerine 25 µL elüsyon tamponu ilave edilerek bir dakika santrifüjlenmiştir. DNA ürününün kolondan elüsyonu için işlem iki defa tekrarlanmış ve elde edilen DNA - 20 °C'de saklanmıştır.

3.4. Plazmit Yapılarının Oluşturulması

3.4.1. *ahpC* ve *lprG* Genlerinin pGEMT Plazmitine Ligasyonu ve Çoğaltılması

M.bovis genomik DNA'sından PZR ile çoğaltılan *ahpC* ve *lprG* genlerinin pGEM-T Easy vektörüne ligasyonu Tablo 3.4'te verilen ortamlar ve gösterilen hacimlerdeki kit bileşenleri kullanılarak 4 °C'de 16 saat inkübasyon ile yapılmıştır. İnkübasyonun ardından ligasyon ürünleri hazırlanan *E.coli* DH5α suşuna transforme edilmiştir.

Tablo 3.4. *ahpC* ve *lprG* genlerinin pGEM-T Easy vektöre ligasyonu için oluşturulan reaksiyon ortamları.

Bileşen	<i>ahpC</i> için miktarlar (µL)		<i>lprG</i> için miktarlar (µL)	
	Reaksiyon-1	Reaksiyon-2	Reaksiyon-1	Reaksiyon-2
pGEM®-T Vector (50ng/µl)	1	0,5	1	0,5
İnsert (PZR ürünü)	3	3,5	3	3,5
2X Rapid Ligation Buffer	5	5	5	5
T4 DNA Ligaz	1	1	1	1
TOPLAM	10	10	10	10

ahpC veya *lprG* genleri ile ligasyon yapılan pGEM-T vektörleri, farklı kompetan *E.coli* DH5α suşlarına transforme edilmiş ve transformasyon sonrasındaki mavi-beyaz koloni seçimi için 80 mg/mL X-gal (ThermoScientific), 0.5 mM IPTG (Bio-Rad) ve 100 µg/mL ampisilin (Sigma) içeren LB-agar ortamına ekilmiştir. 37 °C'de 16 saat inkübasyon sonrası mavi-beyaz koloni oluşumu izlenmiş ve oluşan beyaz kolonilerin tekrar ampisilinli LB-agara çizgi ekimleri yapılmıştır. Çizgi ekim işleminin tamamlanmasının ardından agar petripler 37 °C'de 16 saat inkübe edilmiştir. Doğru plazmiti taşıdığı düşünülen bakteriler, 5 mL ampisilinli LB ortamına ekilmiş ve 37 °C'de 250 rpm hızda 16 saat inkübe edilmiştir. Bakterilerden plazmit izolasyonu GeneJET Plasmid MiniPrep Kit (Thermo Scientific) kullanılarak, üretici protokolüne göre yapılmıştır. Plazmit saflaştırma işlemlerinin tamamı oda sıcaklığında yapılmış ve kit

bileşenlerinin kullanıldığı tüm santrifüj işlemleri 12.000 *xg* hızında gerçekleştirilmiştir. Ticari kit ile plazmit saflaştırmanın hemen öncesinde, pGEMT-*ahpC* ve pGEMT-*lprG* plazmitlerini taşıdığı düşünülen *E.coli* DH5 α kültürleri oda sıcaklığında 4.000 *xg* hızda 5 dakika boyunca santrifüjlenerek çöktürülmüştür. Çöktürülen hücre pelletlerinin üzerine 250 μ L resüspanسیون çözeltisi ilave edilmiş ve pelletler vorteksenerek süspansiyon edilmiştir. Daha sonra tüplere 250 μ L lizis çözeltisi ilave edilmiş ve tüpler 4-6 defa ters düz edilerek viskoz bir karışımın oluşması sağlanmıştır. Karışım üzerine 350 μ L nötralizasyon çözeltisi ilave edilmiş ve tekrar 4-6 defa ters düz edilerek karıştırıldıktan sonra 5 dakika 12.000 *xg* hızda santrifüjlenmiştir. İşlem sonunda oluşan süpernatant GeneJET kolonlara aktarılmış ve 1 dakika santrifüjlenmiştir. Kolon altında kalan süzüntü uzaklaştırıldıktan sonra üzerine 500 μ L yıkama çözeltisi ilavesi yapılmış ve 1 dakika santrifüjlenmiştir. Yıkama basamağı bir defa daha tekrarlanmış ve süzüntü uzaklaştırılmıştır. Kolonda kalan artık yıkama çözeltisinin uzaklaştırılması için 1 dakika daha santrifüj yapılmış ve işlem sonunda spin kolon temiz bir santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Daha sonra kolon üzerine 25 μ L elüsyon tamponu ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 2 dakika bekletildikten sonra 2 dakika santrifüjlenmiştir. Elüsyon basamağı 2 defa uygulanmıştır.

ahpC geni *Bam*HI ve *Eco*RI; *lprG* geni ise *Eco*RI ve *Hind*III restriksiyon enzim kesim bölgeleri taşımaktadır (bkz. Tablo 3.1). Bu nedenle çoğaltılan pGEMT-*ahpC* plazmiti *Bam*HI ve *Eco*RI ile kesilerek *ahpC* geni; çoğaltılan pGEMT-*lprG* plazmiti ise *Eco*RI ve *Hind*III enzimleri ile kesilerek *lprG* geni çıkartılmıştır.

Plazmitlerin enzimatik kesimleri sırasında kullanılan enzimler ve tamponlar Tablo 3.5'te gösterilmiştir. Kesim reaksiyonu için oluşturulan reaksiyon ortamlarını içeren tüpler 37 °C sıcaklıkta 150 dakika inkübe edilmiştir. Reaksiyonun tamamlanmasının ardından örnekler %1 (a/h) agaroz jelde 90V gerilim altında yürütülmüştür. Agaroz jeldeki *ahpC* ve *lprG* genleri GeneJET (Thermo Scientific) ticari kit ile jelden alınmış ve pET-28a vektörüne ligasyonu yapılmak üzere - 20 °C'de saklanmıştır.

pET-28a-c(+) Plazmitinin Kesilmesi:

ahpC geni *Bam*HI ve *Eco*RI; *lprG* geni ise *Eco*RI ve *Hind*III restriksiyon enzim kesim bölgeleri arasında yer almaktadır (bkz. Tablo 3.1). *ahpC* geninin pET-28a plazmitine ligasyonunun yapılabilmesi için boş pET28a plazmiti öncelikle *Bam*HI ve *Eco*RI restriksiyon enzim çifti ile kesilmiştir. Benzer biçimde *lprG* geninin pET-28a plazmitine ligasyonunun yapılabilmesi için boş pET28a plazmitinin öncelikle *Eco*RI ve *Hind*III restriksiyon enzim çifti ile kesilmiştir. Boş pET-28a plazmitlerinin *ahpC* ve *lprG* genlerinin ligasyonu için uygun enzim çiftleriyle kesimi amacıyla oluşturulan reaksiyon ortamları Tablo 3.6'da sunulmuştur. pET-28a plazmitlerinin enzimatik kesimi için oluşturulan reaksiyon ortamı 37 °C sıcaklıkta 150 dakika inkübe edilmiştir.

Tablo 3.6. pET-28a plazmitinin enzimlerle kesimi için oluşturulan reaksiyon ortamı.

İşlem	Bileşen	Miktar (µL)
Boş pET-28a plazmitinin <i>Bam</i> HI ve <i>Hind</i> III enzimleri ile kesilmesi	pET-28a	10
	<i>Bam</i> HI	1
	<i>Hind</i> III	1
	Tango Buffer	2
	Nükleaz içermeyen su	2
	TOPLAM	20
Boş pET-28a plazmitinin <i>Eco</i> RI ve <i>Hind</i> III enzimleri ile kesilmesi	pET-28a	10
	<i>Eco</i> RI	1
	<i>Hind</i> III	1
	Tango Buffer	2
	Nükleaz içermeyen su	2
	TOPLAM	20

Enzim kesim reaksiyonu sonrasında plazmitler %1'lik (a/h) agaroz jelde 90V gerilim ile yürütülmüştür. Agaroz jelde uygun şekilde kesilen plazmitler GeneJET (Thermo Scientific) kiti kullanılarak jelden alınmış ve ligasyon reaksiyonu sırasında plazmitin kendi kendine ligasyon yapmasını önlemek amacıyla alkalen fosfataz (AP) ile muamele edilmiştir. Bunun için rAPid Alkaline Phosphatase kit (Roche) kullanılmış ve üretici yönergeleri doğrultusunda Tablo 3.7'de belirtilen reaksiyon ortamları oluşturulmuştur. Defosforilasyon reaksiyonu için hazırlanan ortamlar 37 °C'deki su banyosunda 10 dakika bekletilmiş ve reaksiyonun sonlandırılması için karışım 2 dakika

75 °C'deki su banyosunda tutulmuştur. Deney bitiminde reaksiyon tüpleri - 20 °C'de saklanmıştır.

Tablo 3.7. Agaroz jelden izole edilmiş, kesilmiş boş pET-28a plazmitlerinin alkale fosfataz ile muamelesi için oluşturulan reaksiyon ortamı.

Bileşen	Miktar (µL)
pET-28a (kesilmiş)	17
Alkale fosfataz	1
Alkale fosfataz tamponu	2
TOPLAM	20

pET-28a-c(+) Plazmitine *ahpC* ve *lprG* Genlerinin Ligasyonu:

ahpC ve *lprG* genlerinin pET-28a plazmitlerine ligasyonu için vektör:insert oranı (h/h) 1:3 ve 1:7 olmak üzere iki farklı reaksiyon yapılmıştır. Tepkime bileşenleri ve miktarları Tablo 3.8'de gösterilmiştir. Ligasyon sırasında T4 DNA ligaz enzimi ve tamponu (Thermo Scientific, ABD) kullanılmış ve reaksiyon tüpleri 4 °C'de 16 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyonun tamamlanmasının ardından elde edilen ligasyon ürünleri kompetan *E.coli* DH5α suşlarına transforme edilmiş ve bakteriler kanamisinli LB-agar ortamına yayma ekim yapılarak, 37 °C'de 16 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda oluşan koloniler, steril pipet ucu ile alınmış ve kanamisinli-LB agara çizgi ekim yapılmıştır. Çizgi ekim yapılan kolonilerde ligasyon ürünlerinin (pET-*ahpC* veya pET-*lprG*) oluşup oluşmadığını kontrol etmek için manuel plazmit izolasyonu yapılmıştır. Manuel plazmit izolasyonu için öncelikle steril mikrosantrifüj tüplerine 100 µL STE tamponu (%10.3 Sükroz, a/h; 25 mM Tris HCl; 25 mM EDTA; pH 8.0) eklenmiştir. Daha sonra çizgi ekim yapılan her bir koloniden steril bir pipet ucu kadar bakteri alınarak içine STE tamponu bulunan tüplere bırakılmış ve kısa süre vortekslenmiştir. Mikrotüpler buz üzerinde 20 dakika bekletildikten sonra üzerlerine 60 µL Lizis Tamponu (0.3 M NaOH; %2 SDS, a/h) ilave edilmiş ve tekrar kısa süreli vortekslenmiştir. Mikrotüpler oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakılmış ve ardından 70 °C'de su banyosunda 10 dakika bekletilmiştir. Ardından 12.000 xg hızda 10 dakika oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. İşlem sonunda süpernatandan bir miktar alınarak %1 (a/h) agaroz jele yüklenmiş 90V gerilim ile yürütülmüştür. Agaroz

jel görüntüsüne göre, pET-*ahpC* ve pET-*lprG* plazmitlerini taşıdığı düşünülen koloniler seçilmiştir.

Tablo 3.8. *ahpC* ve *lprG* genlerinin pET-28a plazmitlerine ligasyonu.

İşlem	Bileşen	Birinci Tüp Miktarları (µL, 1:3 h/h)	İkinci Tüp Miktarları (µL, 1:7 h/h)
<i>ahpC</i> geninin pET-28a plazmitine ligasyonu	<i>Bam</i> HI ve <i>Hind</i> III enzimleri ile kesilmiş pET 28a (vektör)	2	1
	<i>ahpC</i> (insert)	6	7
	T4 DNA Ligaz	1	1
	Ligasyon Tamponu	1	1
	TOPLAM	10	10
<i>lprG</i> geninin pET-28a plazmitine ligasyonu	<i>Eco</i> RI ve <i>Hind</i> III enzimleri ile kesilmiş pET-28a (vektör)	2	1
	<i>lprG</i> (insert)	6	7
	T4 DNA Ligaz	1	1
	Ligasyon Tamponu	1	1
	TOPLAM	10	10

pET-*ahpC* ve pET-*lprG* Plazmitlerinin Doğrulanması:

Ligasyon deneylerinde seçilen kolonilerin taşıdığı plazmitlerin pET-*ahpC* ve pET-*lprG* olup olmadığının kontrolü ise hem enzimatik kesim hem de PZR yöntemleri ile yapılmıştır. Bunun için öncelikle seçilen koloniler 5 mL kanamisinli LB ortamına ekilmiş ve 37 °C'de 250 rpm hızda 16 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra bu kolonilerde bulunan plazmitler GeneJET (Thermo Scientific) ticari kit kullanılarak saflaştırılmıştır.

Restriksiyon Enzim Kesimi ile Plazmit Doğrulama

ahpC geni 5'- ucunda *Bam*HI ve 3'- ucunda *Hind*III enzim kesim bölgeleri taşıdığından belirlenen *E.coli* DH5α kolonilerinden ticari kit ile saflaştırılan pET-*ahpC*'nin kesimi için *Bam*HI ve *Hind*III enzimleri kullanılmıştır. *lprG* geni ise 5'- ucunda *Eco*RI, 3'- ucunda *Hind*III enzim kesim bölgeleri taşıdığından belirlenen *E.coli* DH5α kolonilerinden ticari kit ile saflaştırılan pET-*lprG*'nin kesimi için *Eco*RI ve *Hind*III

enzimleri kullanılmıştır. Enzimatik kesim reaksiyonu için oluşturulan koşullar Tablo 3.9'da sunulmuştur. Plazmitlerin enzimatik kesimi için oluşturulan reaksiyon ortamı 37 °C sıcaklıkta 150 dakika inkübe edilmiştir.

Tablo 3.9. Enzimatik kesim yöntemi ile plazmitlerin doğrulanması.

İşlem	Bileşen	Miktar (µL)
pET- <i>ahpC</i> plazmitinin <i>Bam</i> HI ve <i>Hind</i> III enzimleri ile kesilmesi	pET- <i>ahpC</i>	16
	<i>Bam</i> HI	1
	<i>Hind</i> III	1
	Tango Buffer	2
	TOPLAM	20
pET- <i>lprG</i> plazmitinin <i>Eco</i> RI ve <i>Hind</i> III enzimleri ile kesimi	pET- <i>lprG</i>	16
	<i>Eco</i> RI	1
	<i>Hind</i> III	1
	Tango Buffer	2
	TOPLAM	20

PZR Yöntemi ile Plazmit Doğrulama

Kolonilerden elde edilen pET-*ahpC* ve pET-*lprG* plazmitlerinin PZR ile doğrulanması işleminde, *M.bovis* genomik DNA'sından *ahpC* ve *lprG* genlerini elde etmek için Tablo 3.1'de kullanılan ileri ve geri primerler kullanılmış ve Tablo 3.2'de belirtilen çalışma ortamları ile Tablo 3.3'te verilen PZR koşulları uygulanmıştır. PZR deneyi sonrasında reaksiyon ortamları %1 (a/h) agaroz jelde 90V elektrik akımında yürütülmüş ve elde edilen PZR ürünleri jelde görüntülenmiştir.

Doğrulama deneyleri sonrasında pET-*ahpC* ve pET-*lprG* plazmitlerini taşıdığı belirlenen *E.coli* DH5α suşları seçilmiş ve her birinin %50 (a/h) gliserol stokları oluşturulmuş ve -80 °C'de saklanmıştır. *E.coli* DH5α suşu plazmit çoğaltmak için, *E.coli* BL21 (DE3) suşu ise rekombinant protein üreimi için kullanılmıştır. Bu bakımdan, buraya kadar yapılan deneyler ile doğrulanan pET-*ahpC* ve pET-*lprG* plazmitleri sırasıyla AhpC ve LprG proteinlerinin rekombinant üretimi için *E.coli* BL21(DE3)

suşlarına transforme edilmiş ve transformasyondan sonra tekrar plazmit doğrulama işlemleri yapılmıştır. *E.coli* BL21(DE3) suşunda doğrulama işlemleri PZR yöntemi ile yapılmıştır.

3.5. AhpC ve LprG Proteinlerinin Rekombinant Üretimi İçin Üstakım İşlemler

3.5.1. Bakterilerde Protein Üretimini İndüklenmesi ve İnkübasyon

pET-*ahpC* ve pET-*lprG* plazmitlerinin transforme edildiği *E.coli* BL21(DE3) suşları - 80 °C'de saklanan gliserol stoklarından alınmış, buz üzerinde çözülmesi sağlanmış ve kanamisin içeren LB-agara ekilerek 16 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında, büyüyen bakterilerden steril bir öze ucu kadar alınarak 5 mL'lik kanamisinli LB (Miller) besiyerine ekilmiş ve 37 °C'deki 250 rpm hızda çalışan çalkalayıcı inkübatörde 16 saat inkübe edilmiştir. Üreyen bakteriler kanamisin içeren 50 mL LB (Miller) Broth ortamına aktarılmış ve 37 °C'deki 250 rpm hızda çalışan çalkalayıcı inkübatörde bakteri süspansiyonunun OD₆₀₀ değeri 0.4-0.6 aralığına geldiğinde, besiyerine son konsantrasyon 1 mM olacak şekilde IPTG ilave edilerek rekombinant protein üretimi indüklenmiştir. IPTG ilavesinden önce ve eklendikten 2 ve 4 saat sonra inkübasyon durdurularak bakteri lizatları elde edilmiş ve protein üretimi Laemmli sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile görüntülenmiştir (146).

3.6. AhpC ve LprG Proteinlerinin Rekombinant Üretimi İçin Altakım İşlemler

3.6.1. Bakterilerin Toplanması

İnkübasyon tamamlandığında bakteri süspansiyonunu içeren erlenler 15 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. Daha sonra bakteri süspansiyonları 4 °C'de, 3000 xg hızda 10 dakika santrifüjlenerak çöktürülmüştür.

3.6.2. Toplanan Bakterilerin Lize Edilmesi

Bir gram hücre pelleti başına 8M üre içeren 2-5 mL LEW tamponu (Lysis-Equilibration-Wash buffer: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8.0) ilave edilmiş ve hücreler vortekslenerek süspansiyon haline getirilmiştir. Ardından hücreler ultrasonik prob kullanılarak (%60 kuvvette) buz üzerinde parçalanmıştır. Homojenizasyon sırasında 10 saniye ultrasonikasyon ve 30 saniye buz üzerinde bekletme döngüleri 6 defa uygulanmıştır (147). Ultrasonikasyon işlemi tamamlandığında oluşan lizat 10.000 xg'de 4 °C'de 30 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant steril bir tüpe alınmıştır.

3.6.3. Proteinlerin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması

pET-28a plazmitine klonlanan AhpC ve LprG proteinleri N-terminallerinde 6xHis-Tag eklenmiş şekilde üretilmiştir (bkz. Şekil 3.1). Histidin aminoasitleri nikel iyonuna afinite gösterdiklerinden, his-tag içeren proteinlerin saflaştırılmaları sırasında nikel kolonların kullanımı büyük bir kolaylık ve avantaj sağlamaktadır. Bu sebeple, tez kapsamında üretilen his-tag içeren antijenik proteinler afinite kromatografisi uygulanarak nikel içeren kolonlardan geçirilerek saflaştırılmıştır. Bu amaçla Protino® Ni-TED (Macherey-Nagel, Almanya) his-tag protein saflaştırma kiti kullanılmıştır.

Ni-TED kolon 4 mL LEW tamponu ile dengelenmiştir. Ardından protein çözeltisi kolondan geçirilerek his-taglı olarak üretilen proteinlerin kolondaki nikel iyonlara bağlanması sağlanmıştır. Kolondan geçen ilk fraksiyon toplanmıştır. Daha sonra kolon 3 defa 4 mL LEW tamponu ile yıkanmış ve her bir yıkama sonrasında elüentler ayrı ayrı toplanmıştır. Yıkama işlemi tamamlandığında kolondan elüsyon tamponu (Elution Buffer: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol, pH 8.0) geçirilmiş ve protein içeren elüentler toplanmıştır.

3.6.4. Proteinlerin Karakterizasyonu

Protino® Ni-TED ile yapılan saflaştırma işlemlerinde elde edilen fraksiyonların analizi için Laemmli SDS-PAGE kullanılmıştır (146). Hazırlanan jellerin içerikleri Tablo 3.10'da gösterilmiştir. SDS-PAGE analizi için, 15 µL örnek, %5 (h/h) β-merkaptoetanol

içeren örnek yükleme çözeltisi (3.55 mL deiyonize su; 1.25 mL 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8; 2.5 mL gliserol; 2.0 mL %10 (a/h) SDS; 0.2 mL %0.5 (a/h) bromfenol mavisi) ile 1:1 (h/h) oranında karıştırılmış ve 5 dakika 95 °C'de bekletilmiştir. Hazırlanan örnekler jele yüklendikten sonra Mini-Protean (Bio-Rad) elektroforez tankına yerleştirilmiş ve 1X yürütme tamponu (1000 mL'lik çözeltide 3.03 g Tris-baz, 14.4 g glisin, 1 g SDS, pH 8.3) ile 100V gerilim altında yürütülmüştür. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel 1 saat fiksasyon çözeltisi (hacimce 50:40:10 oranlarında etanol:su:asetik asit çözeltisi) içerisinde bekletilmiş ve sonra boyama çözeltisi (% 0.1 (a/h) Coomassie Blue R-250, %20 (h/h) metanol, %10 (h/h) asetik asit) içerisine aktararak oda sıcaklığında 20 dakika süresince boyanmıştır. Süre sonunda boyama çözeltisi uzaklaştırılmış ve jel boya yıkama çözeltisi (hacimce 50:40:10 oranlarında metanol:su:asetik asit çözeltisi) ile bantlar belirginleşene kadar yıkanmıştır.

3.6.5. Proteinlerin Miktar Tayini

Saflaştırılan rAhpC ve rLprG proteinleri daha sonra ultrafiltrasyon santrifüj tüpleri (Amicon Ultra 0.5 mL, MWCO 10 kDa, Sigma) kullanılarak konsantre edilmiştir. Konsantrasyon işlemi sırasında proteinler steril fosfat tamponlu salin (PBS: 137 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4) ile yıkanarak PBS içerisine alınmıştır. Macherey Nagel kolon ile saflaştırılan rAhpC ve rLprG proteinlerinin miktar tayini Bradford yöntemi (148) ile 96 kuyucuklu plak kullanılarak yapılmıştır.

Standart Çözeltilerin ve Kör Çözeltisinin Hazırlanması

Protein kalibrasyon doğrusunun çizilebilmesi için siğir serum albümini (BSA) çözeltisinin 5 µg/mL, 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL ve 2000 µg/mL derişimlerde standart çözeltiler hazırlanmıştır. Deney sırasında standart, kör ve örnek çözeltileri ile üç tekrarlı (n=3) olacak şekilde çalışılmıştır. 96 kuyucuklu plaktaki üzerine kör çözelti olarak kullanılmak üzere 5 µL ultrasaf su kullanılmıştır. Hazırlanan BSA standartlarından 5'er µL alınarak

kuyucuklara ilave edilmiştir. Aynı şekilde rAhpC ve rLprG çözeltilerinden alınan 5'er µL örnekler de kuyucuklara eklenmiştir. Bu işlemlerin ardından tüm kuyucuklara 245 µL Bradford reaktif boyası (Fermentas, ABD) eklenmiştir. Çok kanallı pipet yardımıyla yapılan pipetaj sonrasında plak oda sıcaklığındaki karanlık br ortamda 20 dakika bekletilmiştir. Ardından 595 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmış ve standart grafiği çizilmiştir. Bu grafikten elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi kullanılarak rAhpC ve rLprG çözeltilerindeki protein konsantrasyonu belirlenmiştir.

Tablo 3.10. SDS-PAGE deneyinde kullanılan jelleri yükleme ve ayırma jellerinin bileşenlerinin miktarları.

İçerik	Yükleme Jeli (Stacking Gel) %4	Ayırma Jeli (Resolving Gel) %12
Deiyonize Su (mL)	6.1	3.4
Akrilamit/Bis akrilamit (mL)	1.3	4.0
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 (mL)	2.5	-
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 (mL)	-	2.5
%10 (a/h) SDS (mL)	0.1	0.1
%10 (a/h) APS (µL)	50	50
TEMED (µL)	10	5
TOPLAM (mL)	10	10

3.7. Aşı Formülasyonları

Antijenlerin aşı olarak formüle edilmesi için adjuvan eklenmiştir. Aşı adjuvanı olarak Montanide ISA 61 VG (SEPPIC, Fransa) yağ içerisinde su (S/Y) tipi emülsiyon formunda kullanıma hazır aşı adjuvanı kullanılmıştır (121). Aşı formülasyonlarında antijen ve adjuvan bileşenleri aseptik şartlarda, 60:40 h/h (adjuvan:antijen) oranında karıştırılmış ve 10 dakika vortekslenerek emülsifiye edilmiştir (149). Hazırlanan aşı formülasyonlarının sterilitesi antibiyotik içermeyen LB-agar üzerinde 37 °C'de 16

saatlik inkübasyon ile test edilmiştir. *in vivo* çalışmalarda uygulanan aşı formülasyonlarına ait bilgiler Tablo 3.11’de görülmektedir.

Tablo 3.11. *in vivo* çalışmalar sırasında farelere uygulanacak aşı formülasyonlarına ait bilgiler

Formülasyon	İçerik
1	LprG + Montanide ISA 61 VG
2	AhpC + Montanide ISA 61 VG
3	PBS + Montanide ISA 61 VG
4	Ticari BCG aşısı (Indian Serum Institute, Hindistan)

3.8. *in vivo* Çalışmalar

in vivo hayvan deneyleri 6-8 haftalık, dişi Balb/C fareler üzerinde yapılmış ve tüm deneyler Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından onaylanmış deney protokolüne uygun olarak yürütülmüştür (No: 2020/08-16).

3.8.1. Farelere Aşı Uygulaması ile İlgili Deney Planı

in vivo Çalışmalarda Kullanılacak Farelerin Gruplara Ayrılması

Çalışmalar sırasında rAhpC aşı antijeninin oluşturduğu etkiyi gözlemlemek adına fareler;

Grup A: PBS – Adjuvan;

Grup B: BCG prime – PBS boost;

Grup C: BCG Prime – Adjuvan Boost;

Grup D (rAhpC): rAhpC – Adjuvan;

Grup E (rAhpC): BCG Prime – rAhpC Boost, şeklinde gruplandırılmıştır.

rLprG aşı antijeninin oluşturduğu etkiyi gözlemlemek adına fareler;

Grup A: PBS – Adjuvan;

Grup B: BCG prime – PBS boost;

Grup C: BCG Prime – Adjuvan Boost;

Grup D (rLprG): rLprG – Adjuvan;

Grup E (rLprG): BCG Prime – rLprG Boost, şeklinde gruplandırılmıştır.

Grup A, B ve C'den elde edilen serumlara ait ölçümler, AhpC ve LprG grupları ile karşılaştırma için kullanılmıştır.

rAhpC ve rLprG antijenlerinin Montanide ISA 61 VG adjuvanı ile hazırlanan protein altbirim aşı formülasyonlarının hümmoral ve hüccresel bağışıklık yanıtları üzerindeki etkileri hem kendi başlarına, hem de BCG aşısı ile prime aşılanmış BALB/c farelerde booster aşı olarak uygulanarak değęerlendirilmiştir.

Aşı formülasyonlarının kendi başlarına bağışıklık yanıtı oluşturma etkinliklerinin *in vivo* değęerlendirilmesi için oluşturulan hayvan gruplarında yapılacak aşılama Tablo 3.12'de gösterilmiştir.

Tablo 3.12. rLprG ve rAhpC rekombinant protein altbirim aşıları ile yapılan bağışıklama çalışmasına dair bilgiler.

GRUP ve FARE SAYISI	UYGULANACAK FORMÜLASYON	DOZ	VERİLİŞ YOLU	VERİLİŞ SIKLIĞI
Grup A (n=6)	PBS + Montanide 61 VG	250 µL enjeksiyon (2:3, h/h, PBS:adjuvan)	s.c.	2 defa (1. ve 15. gün)
Grup B (n=6)	BCG Aşısı	0,1 mL steril PBS içerisinde 1x10 ⁵ CFU BCG	s.c.	1 defa (1. gün)
Grup D (rAhpC) (n=6)	AhpC proteini + Montanide 61 VG	0,1 mg AhpC/250 µL enjeksiyon (2:3, h/h, antijen:adjuvan)	s.c.	2 defa (1. ve 15. gün)
Grup D (rLprG) (n=6)	LprG proteini + Montanide 61 VG	0,1 mg LprG/250 µL enjeksiyon (2:3, h/h, antijen:adjuvan)	s.c.	2 defa (1. ve 15. gün)
Grup A: PBS – ISA 61VG; Grup B: BCG prime – PBS boost; Grup C: BCG Prime – ISA 61VG Boost; Grup D (rAhpC): rAhpC – ISA 61VG; Grup D (rLprG): rLprG – ISA 61VG				

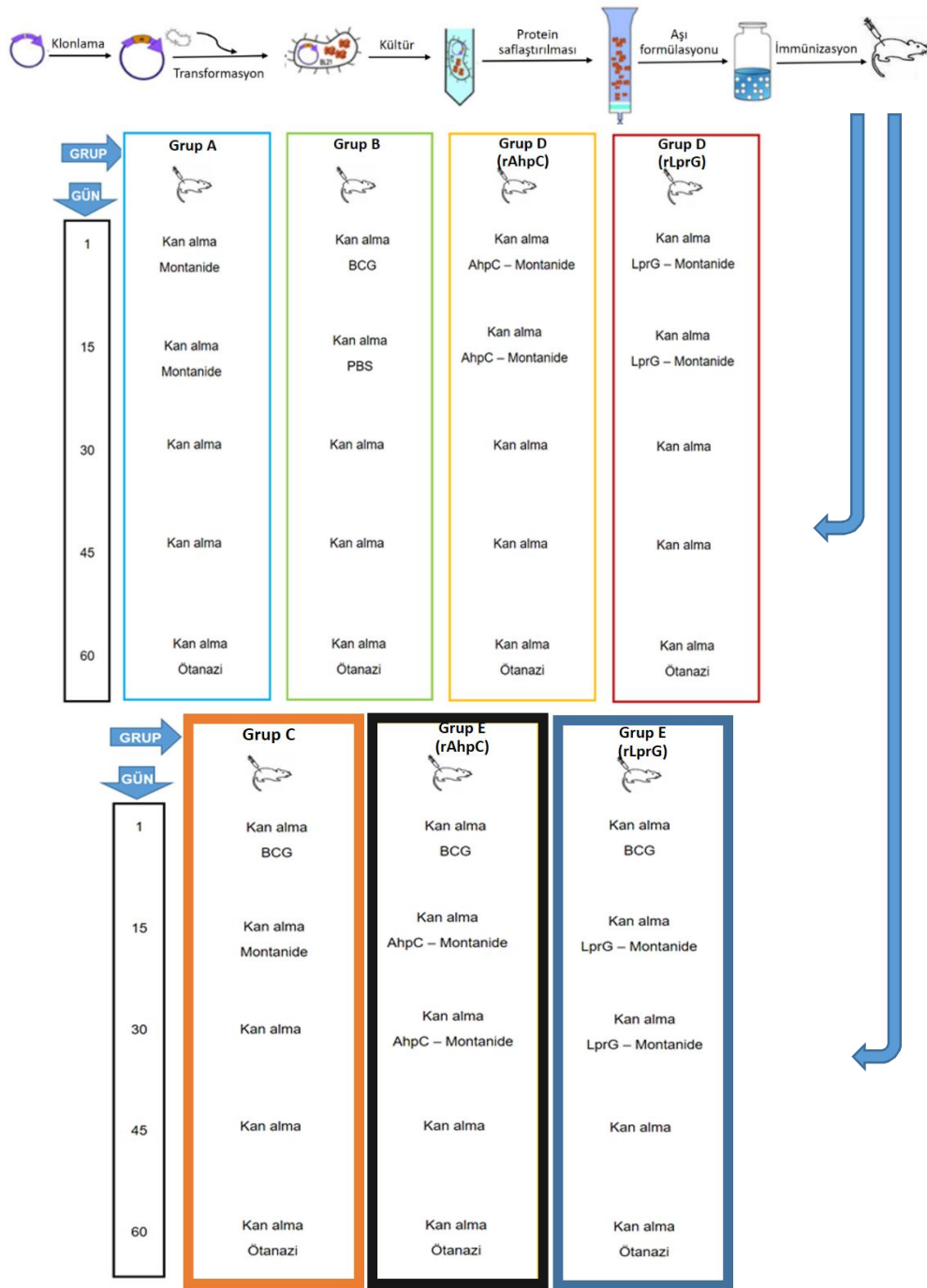
Hazırlanan aşı formülasyonlarının BCG aşısı ile prime aşılanmış farelerde booster aşı olarak kullanılabilirliğini değęerlendirmek için prime-aşılama 2 hafta sonra ilk booster aşılama ve bundan 2 hafta sonra da ikinci booster aşılama uygulanmıştır. Aşı formülasyonlarının booster etkinliği için deney sırasında kullanılacak fare grupları, farelere uygulanacak aşı formülasyonları, bu aşılama dozu, uygulama yolu ve sıklığı Tablo 3.13'te gösterilmiştir.

Tablo 3.13. rLprG ve rAhpC altbirim protein aşıları ile yapılan prime-boost bağışıklama çalışmasının planı.

GRUP ve FARE SAYISI	PRİME AŞILAMA	DOZU VE VERİLİŞ YOLU	VERİLİŞ SIKLIĞI	BOOST AŞILAMA	DOZU VE VERİLİŞ YOLU	VERİLİŞ SIKLIĞI
Grup E (rLprG) (n=6)	BCG	0,1 mL steril PBS içerisinde 1×10^5 CFU BCG s.c.	1 defa (1. gün)	LprG proteini + Montanide 61VG	0,1 mg LprG/250 μ L enjeksiyon (2:3, h/h), s.c.	2 defa (15. ve 30. gün)
Grup E (rAhpC) (n=6)				AhpC proteini + Montanide 61VG	0,1 mg AhpC/250 μ L enjeksiyon (2:3, h/h), s.c.	2 defa (15. ve 30. gün)
Grup C (n=6)				PBS + Montanide 61VG	250 μ L enjeksiyon (2:3, h/h), s.c.	2 defa (15. ve 30. gün)

Grup C: BCG Prime – ISA 61VG Boost; Grup E (rAhpC): BCG Prime – AhpC Boost; Grup E (rLprG): BCG Prime – rLprG Boost, şeklinde gruplandırılmıştır.

Tablo 3.12 ve Tablo 3.13'te belirtilen aşılarda ve bu aşılarda ile yapılacak bağışıklama çalışması için deney tasarımı Şekil 3.2'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.2. *in vivo* hayvan deneyleri için oluşturulan hayvan grupları ve deneyler tasarımının şematik gösterimi.

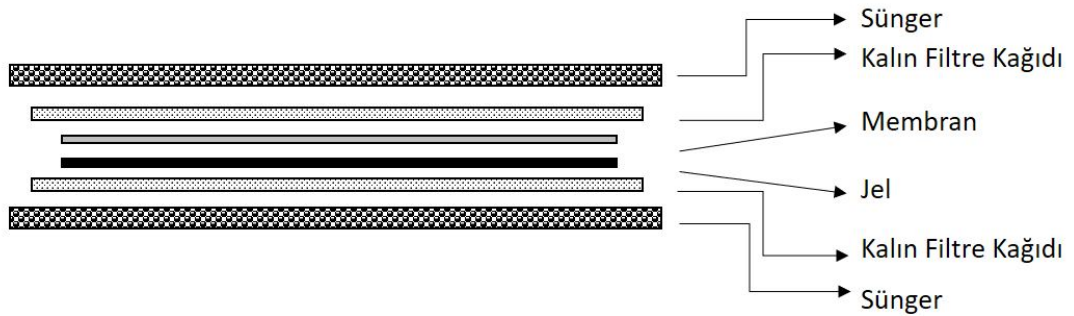
Grup A: PBS – ISA 61VG; Grup B: BCG prime – PBS boost; Grup C: BCG Prime – ISA 61VG Boost; Grup D (rAhpC): rAhpC – ISA 61VG; Grup D (rLprG): rLprG – ISA 61VG; Grup E (rAhpC): BCG Prime – rAhpC Boost, Grup E (rLprG): BCG Prime – rLprG Boost.

3.8.2. Hümorale Bağışıklık Yanıtının Tayini

Hümorale Bağışıklık Yanıtının Western Blot ile Tayini

in vivo çalışma gruplarında kullanılan tüm BALB/c farelerde, rekombinant AhpC ve LprG proteinlerine karşı spesifik antikor üretiminin kalitatif olarak görüntülenmesi amacıyla Western blot (WB) yöntemi kullanılmıştır (150). Bunun için rAhpC ve rLprG protein örnekleri önce sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile yürütülmüştür. SDS-PAGE ile ikişer jel yürütülmüş ve jellerin birisi Coomassie Brilliant Blue ile boyanmış, diğeri ise WB deneyi için kullanılmıştır. WB deneylerinde primer antikor olarak *in vivo* deneylerden elde edilen 60. gün serumları kullanılmıştır. WB deneyi için, süngerler, kalın Whatman® kağıtları, jel boyutuna uygun olarak kesilmiş nitroselüloz membranlar (Bio-Rad, Hercules, CA) ve jeller 1X transfer tamponunda (25 mM Tris bazı, 192 mM glisin, %20 (v/v) metanol, % 0.025-0.1 SDS [%0.04, a/h], pH 8.3) ıslatılarak Şekil 3.3'te gösterildiği gibi oluşturulan sandviç yapı Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) western blot transfer aparatına yerleştirilmiştir. Daha sonra 4 °C'de 1X transfer tamponu içerisinde 100 volt gerilim uygulanarak 1 saat transfer işlemi gerçekleştirilmiştir. Transfer işlemi tamamlandığında membran WB aparatından çıkartılmış ve %0.1 (h/h) Tween-20 içeren 1X TBS çözeltisi (20 mM Tris-baz, 150 mM NaCl, pH 7.5) (TBS-T) içerisinde yıkanmıştır. Daha sonra bloklama çözeltisi (%5, a/h yağsız süt tozu içeren 1X TBS çözeltisi) içerisinde 37 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon tamamlandığında 1X TBS-T ile 10'ar dakikalık uygulamalar ile 3 defa yıkanmıştır. Daha sonra membran üzerine bloklama tamponu ile 1:400 oranında seyreltilmiş primer antikor çözeltisi eklenmiş oda sıcaklığında 60 rpm hızda yatay çalkalayıcı üzerinde 1 saat bekletilmiştir. Süre bitiminde membran tekrar 1X TBS-T ile 5'er dakika 4 defa yıkanmıştır. Yıkama işleminin hemen ardından bloklama çözeltisi ile 1:20.000 (h/h) oranında seyreltilmiş sekonder antikor (anti-mouse IgG, Sigma) ile oda sıcaklığında 1 saat bekletilmiştir. Süre sonunda tekrar 1X TBS-T ile 5'er dakika 4 defa yıkama yapılmıştır. Yıkama işleminden sonra membran, bantlar görülene kadar alkalin fosfat konjuge substrat kiti (Bio-Rad, Hercules, CA) ile hazırlanan çözelti

içerisinde karanlık ortamda bekletilmiş ve oluşan bantlar görüntülenmiştir. Bantların belirmesinin ardından membran saf su ile yıkanarak substratın uzaklaşması sağlanmıştır. Deney sonunda membranlar görüntülenmiştir.



Şekil 3.3. Membran, jel ve filtre kağıdının sandviç yöntemiyle hazırlanması ve transfer aparatına yerleştirilmesi.

Hümorale Bağışıklık Yanıtının ELISA Temelli Total İmmüoglobulin G (IgG)

Ölçümü İle Tayini

BALB/c farelerde, rAhpC ve rLprG proteinleri ile hazırlanan aşı formülasyonlarının uyardığı hümorale bağışıklık yanıtın seviyesinin (toplam IgG) kantitatif ölçümü ELISA deneyi ile yapılmıştır. Bunun için öncelikle ELISA plakları kuyucuk başına 1 µg rAhpC veya rLprG proteini gelecek şekilde kaplanmıştır. Kaplama işlemi için rekombinant proteinlerin karbonat tamponundaki (% 0.159 a/h Na₂CO₃; %0.388 g, a/h, NaHCO₃; pH 9.6) çözeltileri kullanılmıştır. Plaklar parafilmle kaplanmış ve bir gece 4 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda plaklar yıkama çözeltisi (%0.8, a/h, NaCl; %0.02, a/h, KCl; %0.144, a/h, Na₂HPO₄; %0.024, a/h, KH₂PO₄; %0.1, h/h, Tween-20, pH 7.2) ile 3 defa yıkanmış, 50 µL bloklama çözeltisi (%2, a/h, BSA içeren yıkama çözeltisi) kuyucuklara eklenmiş ve plaklar 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Bağışıklanmış farelerden toplanan serum 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 ve 1:3200 oranlarında bloklama çözeltisi ile seyreltilerek primer antikor çözeltisi olarak kullanılmış ve 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda plaklar 4 defa yıkama çözeltisi ile yıkanmıştır. Daha sonra kuyucuklara bloklama çözeltisi içinde 1:1000 (h/h) oranında seyreltilmiş alkalen fosfat konjuge anti-

mouse IgG sekonder antikor (Sigma) ilave edilmiş ve plaklar 1 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon tamamlandığında plaklar yıkama çözeltisi ile 4 defa yıkanmıştır. ELISA deneyleri için alkalin fosfataz konjuge sekonder antikor substrat kiti (Bio-Rad) kolorimetrik substrat ajanı olarak kullanılmıştır. Kit bileşeni olan AP 25x renk oluşturma tamponundan 0.4 mL alınmış ve üzerine 9.6 mL deiyonize su ilave edilerek 1X'e seyreltilmiştir. Daha sonra kit bileşeni olan AP colour reagent A ve B çözeltilerinden 100'er µL alınarak hazırlanan 1X tampona ilave edilmiş ve kısa süre vortekslenmiştir. Hazırlanan karışım kuyucuk başına 100 µL olacak şekilde dağıtılmış ve plaklar 30 dakika oda sıcaklığında karanlık bir yerde inkübe edilmiştir. ELISA plak okuyucu yardımıyla 405 nm dalga boyunda optik dansite ölçülmüştür.

3.8.3. Hücresel Bağışıklık Yanıtının Tayini

in vivo deneylerde kullanılan Balb/c farelerinde oluşan hücresel bağışıklık yanıtının düzeyi (üretilen IL-12 miktarı) kantitatif olarak ELISA testi ile belirlenmiştir. Farelerin serum IL-12 seviyelerinin belirlenmesi için Mouse IL-12 ELISA Kit (Invitrogen) kullanılmıştır. Deney sırasında her örnek, standart ve kör çözeltileri için ikişer test yapılmıştır. Plaklar 400 µL yıkama tamponu (%1 a/h Tween-20 içeren PBS çözeltisi) ile 3 defa yıkanmıştır. Plakta standart çözelti için ayrılan kuyucuklara 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5 ve 31.3 pg/mL konsantrasyonlarda standart çözelti ilave edilmiştir. Standart ve kör çözeltilerinin bulunduğu kuyucuklara 100 µL Tayin Tamponu (1X) (%10 a/h BSA ve %1 a/h Tween-20 içeren PBS çözeltisi) ilave edilmiştir. Numuneler için ayrılmış kuyucuklara ise 50 µL Assay Buffer (1X) ve 50 µL farelerden alınan serum örnekleri ilave edilmiştir. Daha sonra, kit bileşeni olan 'biotin konjuge anti-mouse IL-12 monoklonal antikor' çözeltisi Assay Buffer (1X) ile 1:100 (h/h) oranında seyreltilmiş ve bu çözeltiden her bir kuyucuğa 50 µL ilave edilmiştir. ELISA plağının yüzeyi film ile kapatılmış ve plak 25 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon tamamlandığında kuyucuklardaki çözelti dökülmüş ve 400 µL yıkama çözeltisi ile 5 defa yıkanmıştır. Kit bileşeni olan Streptavidin-HRP çözeltisi Tayin Tamponu (1X) ile 1:100 (h/h) oranında seyreltilmiş ve her bir kuyucuğa 100 µL ilave edilmiştir. Plak yüzeyi film ile kapatılmış ve 25 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon tamamlandığında, kuyucuklardaki

çözelti dökülmüş ve 400 µL yıkama çözeltisi ile 5 defa yıkanmıştır. Yıkama bittiğinde, tüm kuyucuklara 100 µL substrat çözeltisi (TMB, tetrametil benzidin) ilave edilmiş ve plak 25 °C'de karanlık bir ortamda 10 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda kuyucuklara 100 µL durdurma çözeltisi (1M fosforik asit) ilave edilmiş ve plak 450 nm'de absorbans ölçülmüştür. İkili kuyucuk ölçümlerinin ortalama absorbans değeri alınmıştır. Standart kuyucuklarının verileri kullanılarak konsantrasyon – absorbans standart eğrisi çizilmiştir. Numune çözeltilerinin bulunduğu kuyucuklara 50 µL numune ve 50 µL Assay Buffer (1x) ilave edildiğinden 1:2 oranında bir seyreltme söz konusu olacak ve deneydeki seyreltme faktörü 2 olarak hesaplanacaktır. Bu nedenle numune ölçümleri için standart eğride okunan değerler 2 ile çarpılmıştır.

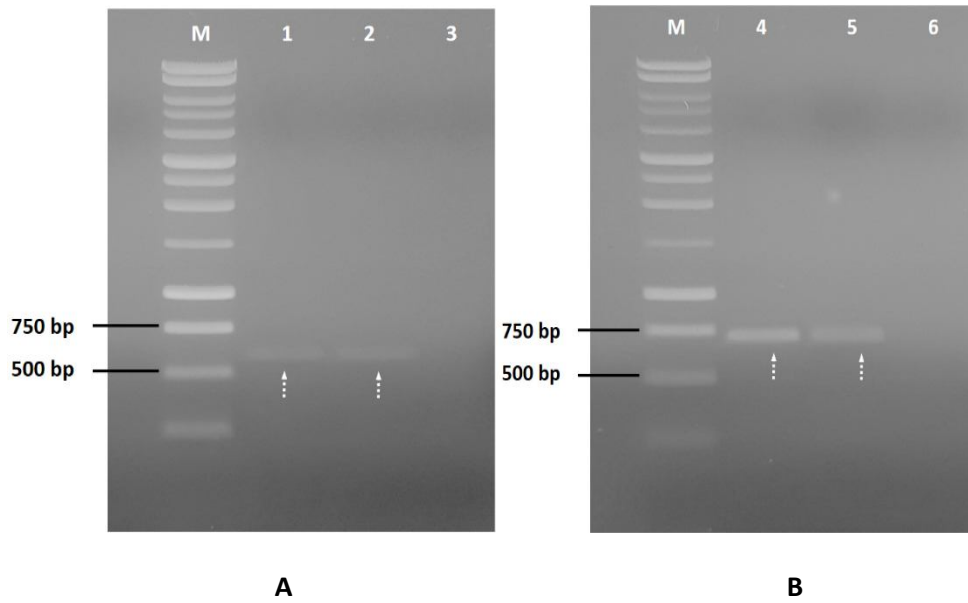
3.9. İstatistiksel Değerlendirme Yöntemleri

ELISA deneylerinden elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., CA, ABD) yazılım destek programı yardımıyla çift yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post-hoc test (Tukey's test) kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. *ahpC* ve *lprG* Genlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması

rAhpC proteinini kodlayan *ahpC* geni ve rLprG proteinini kodlayan *lprG* genleri bölüm 3.3'te belirtildiği gibi gerçekleştirilen PZR deneyi ile *M.bovis* genomik DNA'sından çoğaltılmıştır. Elde edilen PZR ürünlerinin %1 (a/h) agaroz jeldeki görüntüleri Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. *Mycobacterium bovis* genomik DNA'sından PZR ile çoğaltılan (A) *ahpC* ve (B) *lprG* genleri.

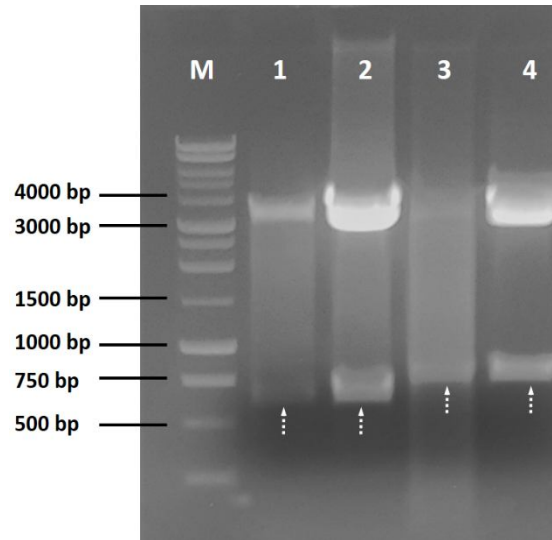
M: 1 kb DNA marker (G571A, Promega); 1,2: *ahpC* PZR; 3: *ahpC* PZR negatif kontrol; 4,5: *lprG* PZR; 6: *lprG* PZR negatif kontrol. *ahpC*: 588 bp; *lprG*: 711 bp.

4.2. Plazmit Yapılarının Oluşturulması

4.2.1. *ahpC* ve *lprG* Genlerinin pGEMT Plazmitine Ligasyonu

PZR deneyi ile 5' ucunda *Bam*HI ve 3' ucunda *Hind*III enzim kesim bölgesi olacak şekilde çoğaltılan *ahpC* geni ve 5' ucunda *Eco*RI ve 3' ucunda *Hind*III enzim kesim bölgesi olacak şekilde çoğaltılan *lprG* geninin (bkz. Tablo 3.1) pGEMT vektörüne ligasyonu bölüm 3.4.1.'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. İşlem ve inkübasyon sonunda beyaz koloni oluşturan bakterilerden manuel plazmit izolasyonu yapılmıştır. pGEMT-*ahpC* taramasında söz konusu bakterilerden 1 ve 3 numaralılar ve pGEMT-*lprG* taramasındaki bakterilerden 7 ve 13 numaralı olanlar seçilmiştir. Daha sonra bu koloniler sıvı LB ortamında büyütülerek taşıdıkları plazmitler GeneJET (Thermo Scientific) ticari kit ile izole edilmiştir.

1 ve 3 numaralı kolonilerden izole edilen pGEMT-*ahpC* plazmitleri *Bam*HI ve *Hind*III, 7 ve 13 numaralı kolonilerden izole edilen pGEMT-*lprG* plazmitleri *Eco*RI ve *Hind*III enzimleri ile kesilmiş ve kesim ürünleri %1'lik agaroz jelde 90V gerilim ile yürütülmüştür. Deney sonunda elde edilen agaroz jelin görüntüsü Şekil 4.2'de sunulmuştur.

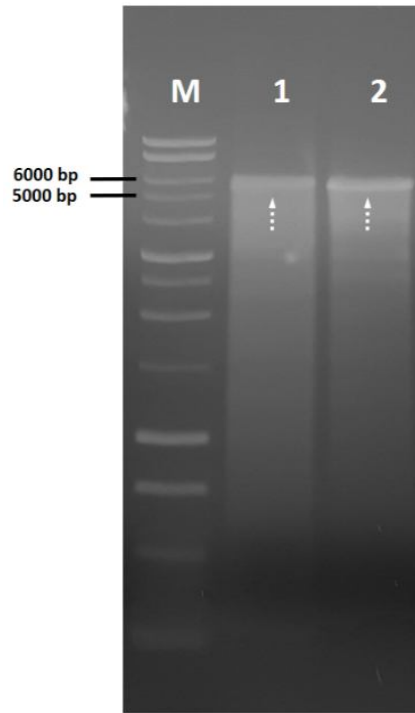


Şekil 4.2. pGEMT vektörlerinden restriksiyon enzimleri ile kesilerek çıkartılan *ahpC* ve *lprG* genlerinin agaroz jel görüntüleri

M: marker; 1-2: Sırasıyla 1 ve 3 numaralı koloniden izole edilen ve *Bam*HI-*Hind*III enzimleri ile kesilen pGEMT-*ahpC* plazmitleri; 3-4: Sırasıyla 7 ve 13 numaralı koloniden izole edilen ve *Eco*RI-*Hind*III enzimleri ile kesilen pGEMT-*lprG* plazmiti. pGEM-T: 3000 bp; *ahpC*: 588 bp; *lprG*: 711 bp

4.2.2. *ahpC* ve *lprG* Genlerinin pET-28a-c(+) Plazmitine Ligasyonu

Rekombinant protein üretimi için, proteinleri kodlayan genler pGEMT plazmitinden kesilerek ikinci bir plazmite (pET-28a plazmiti) klonlanmıştır. Bu amaçla boş pET plazmitleri, pET-*ahpC* plazmitinin oluşturulması için *Bam*HI ve *Hind*III enzimleri ile ve pET-*lprG* plazmitinin oluşturulması için *Eco*RI ve *Hind*III enzimleri ile bölüm 3.4.2’de anlatıldığı gibi kesilmiş ve kesim ürünleri %1 (a/h) agaroz jelde yürütülmüştür. Elde edilen agaroz jel görüntüsü Şekil 4.3’te sunulmuştur.

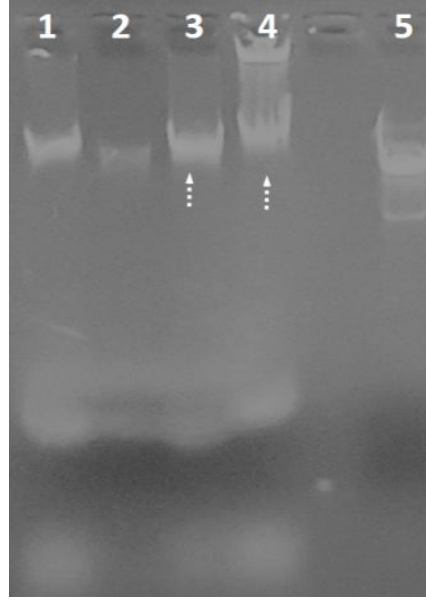


Şekil 4.3. Restriksiyon enzimleri ile kesilmiş boş pET28a plazmitinin %1’lik agaroz jeldeki görüntüsü.

M: 1 kb DNA marker (G571A, Promega); 1: *Bam*HI ve *Hind*III enzimleri ile kesilen boş pET-28a plazmiti; 2: *Eco*RI ve *Hind*III enzimleri ile kesilen boş pET-28a plazmiti (~5.4 kb). Kesilen pET plazmitleri pET-*ahpC* ve pET-*lprG* yapılarının oluşturulması için kullanılmıştır.

pET-*ahpC* Plazmitinin Oluşturulması ve Doğrulanması

Kesilmiş pET-28a plazmiti ve *ahpC* geninin ligasyonu için oluşturulan reaksiyon ortamı (bkz. Tablo 3.8) *E.coli* DH5 α suşlarına transforme edilmiş ve bakteriler kanamisinli-agar ortamında inkübe edilmiştir. Daha sonra oluşan kolonilerden manuel plazmit izolasyonu yapılmış ve bu plazmitler %1 (a/h) agaroz jelde yürütölmüştür (şekil 4.4).



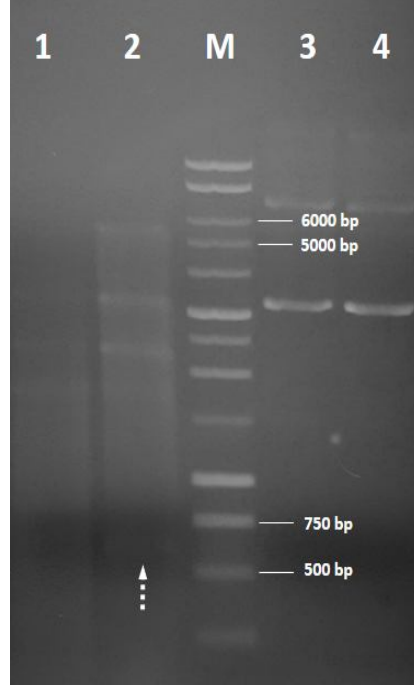
şekil 4.4. pET-*ahpC* ligasyonlarının transforme edildiği *E.coli* DH5 α suşlarından manuel plazmit izolasyonu ile elde edilen plazmitlerin agaroz jeldeki göröntüleri.

1-4: *E.coli* DH5 α kolonisinden manuel izolasyonla elde edilen plazmiler; 5: Boş pET-28a plazmiti.

Deneyler sonunda 3 ve 4 numaralı kolonilerde pET-*ahpC* plazmiti olduğu gözlenmiş ve kolonilerden GeneJET kit ile plazmitler izole edilmiş ve hem enzimatik kesim hem de PZR deneyleri ile doğrulama yapılmıştır.

pET-*ahpC* Plazmitinin Restriksiyon Enzim Kesimi ile Doğrulanması

Seçilen 3 ve 4 numaralı kolonilerden izole edilen plazmitler *Bam*HI ve *Hind*III enzimleri ile Tablo 3.9'da belirtilen reaksiyon koşullarında kesilmiş ve ardından %1 (a/h) agaroz jelde yürütülmüştür (Şekil 4.5).

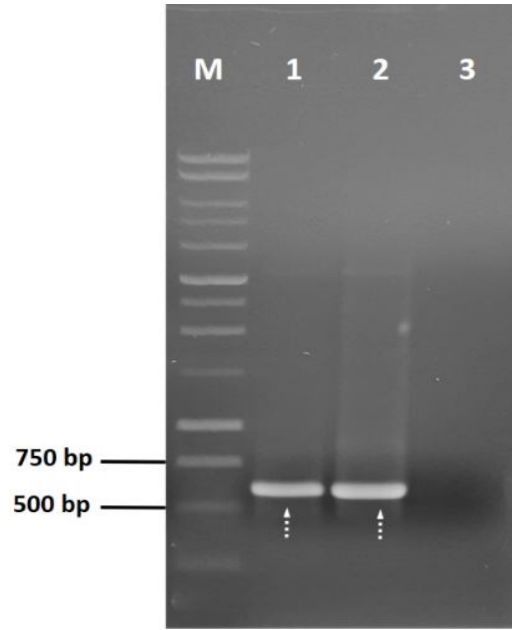


Şekil 4.5. pET-*ahpC* ligasyonlarının transforme edildiği *E.coli* DH5α kolonilerinden seçilen kolonide pET-*ahpC* plazmitinin varlığının *Bam*HI-*Hind*III enzim kesimi ile doğrulanması.

M: 1 kb DNA marker; 1 ve 2: Sırasıyla 3 ve 4 numaralı *E.coli* DH5α kolonisinden izole edilen plazmitin *Bam*HI-*Hind*III enzimleri ile kesimi sonucu elde edilen bantlar; 3 ve 4: Boş pET-28a plazmitine ait bantlar. *ahpC*: 588 bp; pET-28a:~5400 bp.

pET-*ahpC* Plazmitinin PZR ile Doğrulaması

Enzimatik kesim reaksiyonu, agaroz jel ile görüntülediğinde 4 numaralı koloninin pET-*ahpC* plazmitini taşıdığı anlaşılmıştır. Ancak doğrulama işlemi için bir de PZR deneyi yapılmasına karar verilmiştir. Bunun için Tablo 3.3 ve Tablo 3.4'te belirtilen koşullarda PZR deneyi yapılmıştır. PZR sonucu elde edilen gen ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü Şekil. 4.6'da verilmiştir.



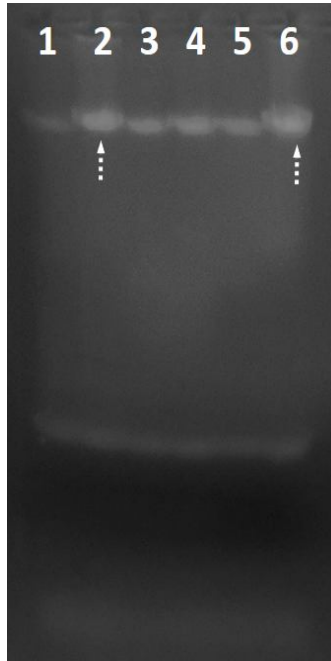
Şekil 4.6. 4 numaralı *E.coli* DH5 α kolonisinden elde edilen pET-*ahpC* plazmiti ile yapılan PZR'den elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü.

M: 1 kb DNA marker; 1 ve 2: 4 numaralı *E.coli* DH5 α kolonisinden izole edilen plazmit ile yapılan PZR'dan elde edilen bantlar; 3: Negatif kontrol. *ahpC*: 588 bp.

Enzimatik kesim ve PZR doğrulamaları sonucunda 4 numaralı *E.coli* DH5 α kolonisinin pET-*ahpC* plazmitini taşıdığı gösterilmiştir. Bu bakteriden GeneJET ticari kit ile izole edilen plazmit rekombinant protein üretimi amacıyla *E.coli* BL21(DE3) suşuna transforme edilmek üzere - 20 °C'de saklanmıştır.

pET-*lprG* Plazmitinin Oluşturulması ve Doğrulanması

Kesilmiş pET-28a plazmiti ve *lprG* geninin ligasyonu için oluşturulan reaksiyon ortamı (bkz. Tablo 3.8) *E.coli* DH5 α suşlarına transforme edilmiş ve bakteriler kanamisinli-agar ortamında inkübe edilmiştir. Daha sonra oluşan kolonilerden manuel plazmit izolasyonu yapılmış ve bu plazmitler %1 (a/h) agaroz jelde yürütölerek görüntölennmiştir (Şekil 4.7).



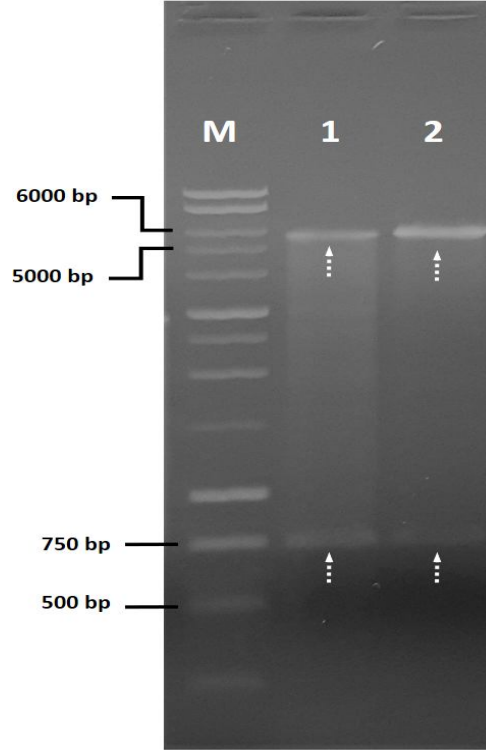
Şekil 4.7. pET-*lprG* ligasyonlarının transforme edildiği *E.coli* DH5 α suşlarından yapılan manuel plazmit izolasyonunun agaroz jel görüntüsü.

1: Boş pET-28a plazmiti; 2-6: pET-*lprG* ligasyonlarının transforme edildiği *E.coli* DH5 α suşlarından izole edilen plazmitler.

Agaroz jel elektroforez sonuçlarına göre 2 ve 6 numaralı kolonilerin pET-*lprG* plazmitini taşıdığı gözlenmiş ve kolonilerin taşıdığı plazmitler GeneJET ticari kit ile izole edilmiştir. Söz konusu plazmitler enzimatik kesim ve PZR deneyleri ile doğrulama yapılmıştır.

pET-*lprG* Plazmitinin Restriksiyon Enzim Kesimi ile Doğrulanması

Seçilen 2 ve 6 numaralı kolonilerden izole edilen plazmitler *EcoRI* ve *HindIII* enzimleri ile Tablo 3.9'da belirtilen reaksiyon koşullarında kesilmiş ve ardından %1 (a/h) agaroz jelde yürütülmüştür (Şekil 4.8).

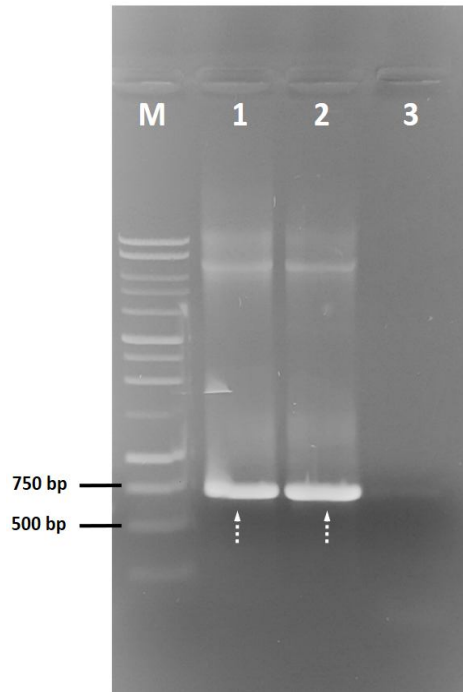


Şekil 4.8. pET-*lprG* ligasyonlarının transforme edildiği *E.coli* DH5α kolonilerinden seçilen 2 ve 6 numaralı kolonilerde pET-*lprG* plazmiti varlığının *EcoRI-HindIII* enzim kesimi ile doğrulanması.

M: 1 kb DNA marker; 1-2: Sırasıyla 2 ve 6 numaralı *E.coli* DH5α kolonilerinden izole edilen pET-*lprG* plazmitinin *EcoRI-HindIII* enzimleri ile kesimi sonucu elde edilen bantlar. *lprG*: 711 bp; pET-28a:~5400 bp.

pET-*lprG* Plazmitinin PZR ile Doğrulanması

Enzimatik kesim reaksiyonu agaroz jel ile görüntülediğinde 2 ve 6 numaralı kolonilerin pET-*lprG* plazmiti taşıdığı gözlenmiştir. Ancak doğrulama işlemi için bir de PZR deneyi yapılmasına karar verilmiştir. Bunun için Tablo 3.3 ve Tablo 3.4'te belirtilen koşullarda PZR deneyi yapılmıştır. PZR sonucu elde edilen gen ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü Şekil 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.9. pET-*lprG* ligasyonlarının transforme edildiği *E.coli* DH5α kolonilerinden seçilen 2 ve 6 numaralı kolonilerde pET-*lprG* plazmitinin varlığının PZR ile doğrulanması.

M: 1 kb DNA marker; 1-2: Sırasıyla 2 ve 6 numaralı *E.coli* DH5α kolonisinden izole edilen pET-*lprG* plazmiti için PZR sonuçları; 3: Negatif kontrol. *lprG*: 711 bp.

Enzimatik kesim ve PZR doğrulamaları sonucu 2 ve 6 numaralı *E.coli* DH5α kolonilerinin her ikisinin de pET-*lprG* plazmitini taşıdığı gösterilmiştir. Bu bakterilerden GeneJET ticari kit ile izole edilen plazmitler rekombinant protein üretimi amacıyla *E.coli* BL21(DE3) suşuna transforme edilmek üzere - 20 °C'de saklanmıştır.

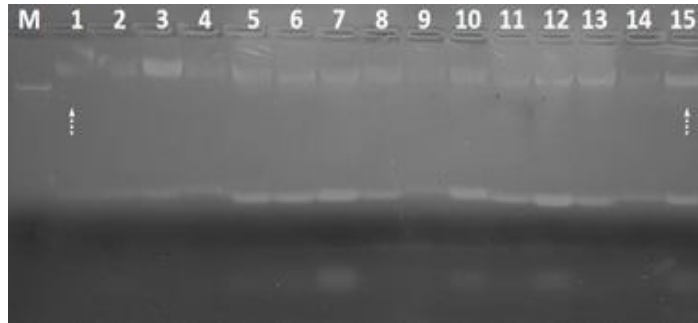
4.3. Rekombinant AhpC ve LprG Proteinlerinin Üretimi İçin Üstakım İşlemler

4.3.1. pET-*ahpC* ve pET-*lprG* Plazmitlerinin *E.coli* BL21(DE3) Suşuna Transformasyonu ve Kolonilerin Taranması

Oluşturulan pET-*ahpC* ve pET-*lprG* plazmitleri yapılarında kodladıkları proteinlerin üretimi için, rekombinant protein ifadeleme amacıyla kullanılan *E.coli* BL21(DE3) suşuna transforme edilmiştir.

pET-*ahpC* Plazmitinin *E.coli* BL21(DE3) Suşuna Transformasyonu

- 20 °C'de saklanan pET-*ahpC* plazmiti bölüm 3.2.2'de anlatıldığı şekilde *E.coli* BL21(DE3) suşuna transforme edilmiştir. Transformasyon ortamının inkübasyonu sonucunda oluşan kolonilerden manuel plazmit izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen izolatların agaroz jeldeki görüntüsü Şekil 4.10'da verilmiştir.



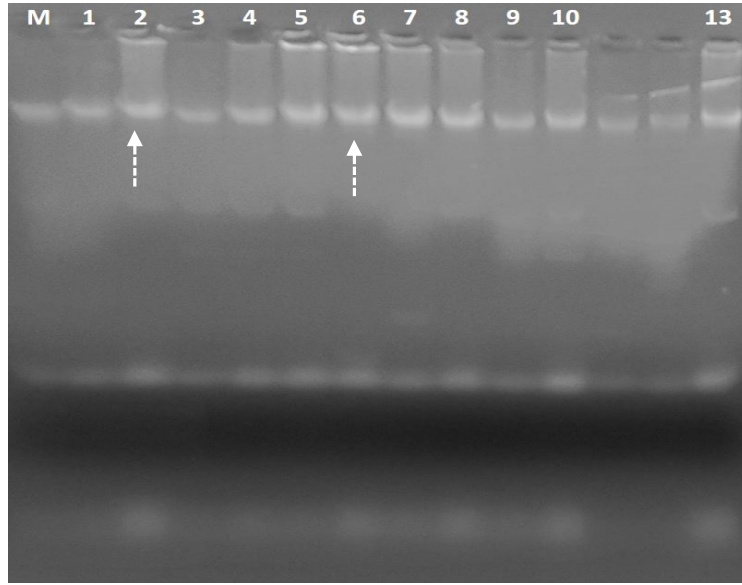
Şekil 4.10. pET-*ahpC* ligasyonlarının transforme edildiği *E.coli* BL21(DE3) kolonilerinden manuel izolasyon ile elde edilen plazmitlerin agaroz jeldeki görüntüsü.

M: Boş pET-28a plazmiti; 1-15: *E.coli* BL21(DE3) kolonilerinden izole edilen plazmitler.

Yapılan deney sonucunda 1 ve 15 numaralı *E.coli* BL21(DE3) kolonileri pET-*ahpC* plazmitini taşıyan koloniler olarak seçilmiş ve taşıdıkları plazmitler GeneJET kit ile izole edilerek PZR ile doğrulama için - 20 °C'de saklanmıştır.

pET-*lprG* Plazmitinin *E.coli* BL21(DE3) Suşuna Transformasyonu

- 20 °C'de saklanan pET-*lprG* plazmiti bölüm 3.2.2'de anlatıldığı şekilde *E.coli* BL21(DE3) suşuna transforme edilmiştir. Transformasyon ortamının inkübasyonu sonunda oluşan kolonilerden manuel plazmit izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen izolatların agaroz jeldeki görüntüsü Şekil 4.11'de verilmiştir.



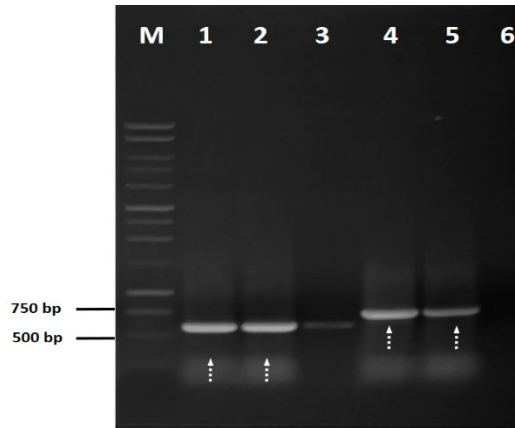
Şekil 4.11. pET-*lprG* ligasyonlarının transforme edildiği *E.coli* BL21(DE3) suşlarından manuel plazmit izolasyonu ile elde edilen plazmitlerin agaroz jeldeki görüntüsü.

M: Boş pET-28a plazmiti, 1-13: *E.coli* BL21(DE3) kolonisinden manuel izolasyonla elde edilen plazmitler.

Yapılan deney sonucunda 2 ve 6 numaralı *E.coli* BL21(DE3) kolonileri pET-*lprG* plazmitini taşıyan koloniler olarak seçilmiş ve taşıdıkları plazmitler GeneJET kit ile izole edilerek PZR ile doğrulama için - 20 °C'de saklanmıştır.

pET-*ahpC* ve pET-*lprG* plazmitlerinin PZR ile doğrulanması

pET-*ahpC* plazmitini taşıyan 1 ve 15 numaralı *E.coli* BL21(DE3) kolonileri ile pET-*lprG* plazmitini taşıyan 2 ve 6 numaralı *E.coli* BL21(DE3) kolonilerinden GeneJET kit ile izole edilen plazmitlerin doğrulanması için Tablo 3.2’de belirtilen ortam ve Tablo 3.3’te belirtilen koşullarda PZR deneyi yapılmış ve deney sonunda oluşan PZR ürünleri agaroz jelde yürütülmüştür (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. *E.coli* BL21(DE3) suşlarında bulunan pET-*ahpC* ve pET-*lprG* plazmitlerinin PZR ile doğrulanması.

M: 1 kb DNA marker;

1-2: Sırasıyla 1 ve 15 numaralı *E.coli* BL21(DE3) kolonilerinden izole edilen pET-*ahpC* plazmitleri ile yapılan PZR’den elde edilen bantlar;

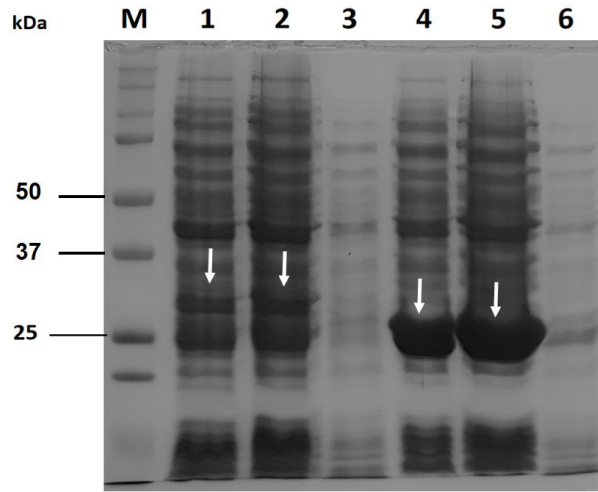
4 ve 5: Sırasıyla 2 ve 6 numaralı *E.coli* BL21(DE3) kolonilerinden izole edilen pET-*lprG* plazmitleri ile yapılan PZR’den elde edilen bantlar;

3 ve 6: Negatif kontrol.

PZR ile doğrulama deneylerinin ardından, rAhpC proteinin rekombinant olarak üretimi için 1 ve 15 numaralı *E.coli* BL21(DE3) kolonilerinin, rLprG proteinin rekombinant olarak üretimi için 2 ve 6 numaralı *E.coli* BL21(DE3) kolonilerinin kullanılabilceği anlaşılmıştır. Söz konusu bakterilerin %50 (a/h) gliserol stokları hazırlanmış ve suşlar rekombinant protein üretimine kadar - 80 °C’de saklanmıştır.

4.3.2. Rekombinant AhpC ve LprG Proteinlerinin Üretimi

Bölüm 3.5.1’de anlatıldığı gibi rekombinant protein üretimine başlamadan önce pET-*ahpC* ve pET-*lprG* plazmitlerini taşıyan *E.coli* BL21(DE3) suşlarının kültür ortamlarına 1 mM son konsantrasyonda IPTG eklenerek bakterilerde rekombinant protein üretimi indüklenmiştir. İnkübasyonun 2. ve 4. saatlerinde bakteriler hasat edilerek bakteri lizatları SDS-PAGE ile analiz edilmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. AhpC ve LprG proteinlerinin bakteride üretim ortamının SDS-PAGE görüntüleri.

M: Marker (Bio-Rad, 161-0377); 1: LprG (IPTG+, 2. saat); 2: LprG (IPTG+, 4. saat); 3: LprG (IPTG-, 4. saat); 4: AhpC (IPTG+, 2. saat); 5: AhpC (IPTG+, 4. saat); 6: AhpC (IPTG-, 4. saat). Oklar, rekombinant olarak üretilen LprG ve AhpC proteinlerini göstermektedir.

Rekombinant proteinlerin üretimi için bakteri kültürlerine IPTG eklendikten sonra kültürün 4 saat devam ettirilmesinin verim açısından uygun olduğu görülmüştür.

4.4. Altakım İşlemler

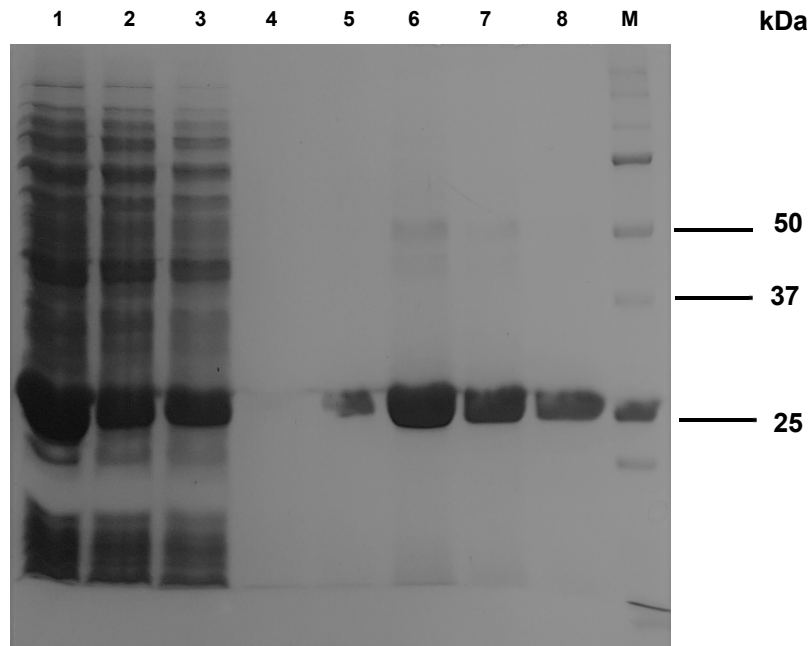
4.4.1. Proteinlerin Saflaştırılması

Üretilen proteinler üretim ortamından, afinite kromatografisi ile Protino Ni-TED kiti kullanılarak bölüm 3.6.3'te anlatıldığı şekilde saflaştırılmıştır.

4.4.2. rAhpC ve rLprG Proteinlerinin Karakterizasyonu

rAhpC ve rLprG proteinleri bölüm 3.6.4'te anlatıldığı gibi SDS-PAGE ile karakterize edilmiştir.

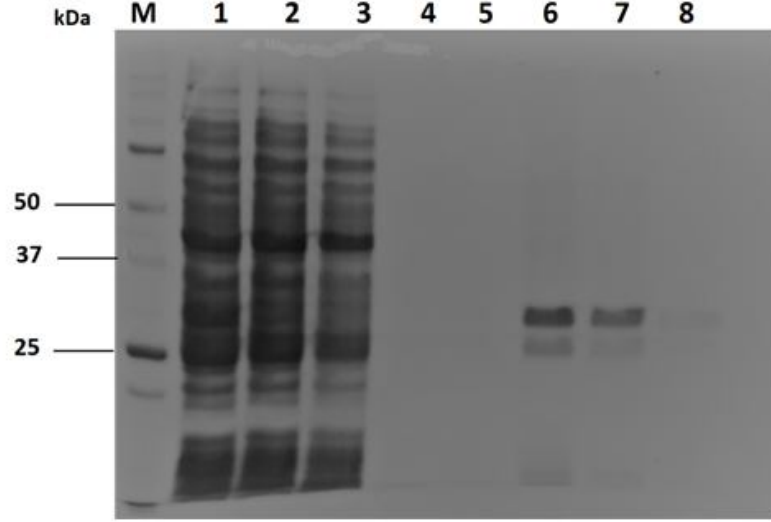
Protino Ni-TED Kit ile saflaştırılan rAhpC proteinine ait SDS-PAGE görüntüsü Şekil 4.14'te verilmiştir.



Şekil 4.14. rAhpC proteininin SDS-PAGE görüntüsü.

M: marker (BioRad, 161- 0374); 1: AhpC üreten *E.coli* BL21(DE3) lizati; 2: Ni-TED kolondan elüe olan ilk fraksiyon; 3, 4, 5: Sırasıyla 1., 2. ve 3. Yıkamalar; 6, 7, 8: Sırasıyla 1., 2. ve 3. elüsyonlar.

Protino Ni-TED Kit ile saflaştırılan rLprG proteinine ait SDS-PAGE görüntüsü Şekil 4.15'te verilmiştir.



Şekil 4.15. rLprG proteininin SDS-PAGE görüntüsü.

M: marker (BioRad, 161- 0374); 1: LprG üreten *E.coli* BL21(DE3) lizati; 2: Ni-TED kolondan elüe olan ilk fraksiyon; 3, 4, 5: Sırasıyla 1., 2. ve 3. Yıkamalar; 6, 7, 8: Sırasıyla 1., 2. ve 3. elüsyonlar.

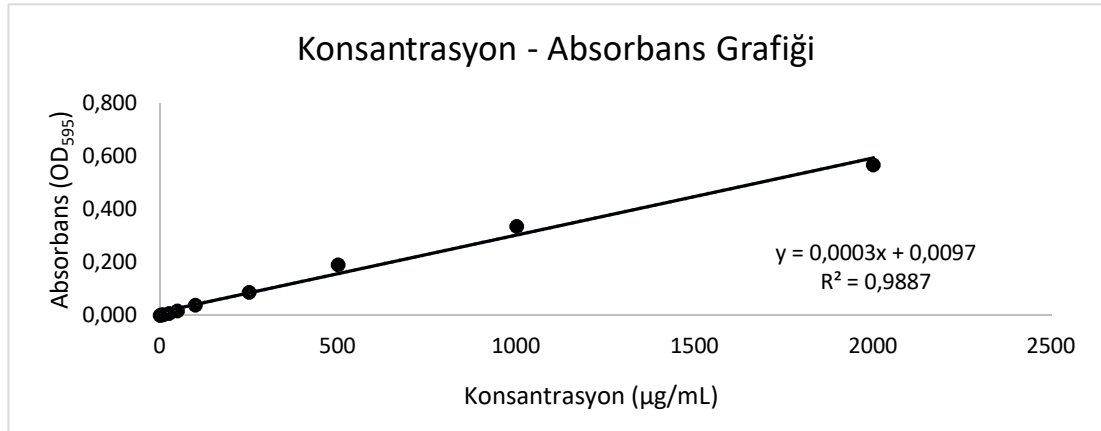
4.4.3. Safılaştırılan rAhpC ve rLprG Proteinlerinin Miktar Tayinleri

Safılaştırılan rAhpC ve rLprG proteinlerinin miktar tayinleri bölüm 3.6.5'te anlatıldığı şekilde yapılmıştır. SpectraMax® İd3 (Molecular Devices, ABD) mikropIaka okuyucu ile 595 nm'de yapılan standart çözelti absorbanlarının ölçümleri ile elde edilen sonuçlar Tablo 4.1' de sunulmuştur.

Tablo 4.1. Çözelti Konsantrasyonları ve Absorbanslar.

Çözelti	Çözeltilerdeki Protein Konsantrasyonu ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Ortalama absorbens OD ₅₉₅
Kör	0	0,000
STD-1	5	0,002
STD-2	10	0,003
STD-3	25	0,007
STD-4	50	0,016
STD-5	100	0,038
STD-6	250	0,086
STD-7	500	0,192
STD-8	1000	0,337
STD-9	2000	0,568
rAhpC	Bilinmiyor	0,435
rLprG	Bilinmiyor	0,510

Standart çözeltilerin protein konsantrasyonu ve spektrofotometrede okunan absorbans verileri kullanılarak kalibrasyon doğrusu çizilmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Bradford yöntemin ile miktar tayini için çizilen kalibrasyon doğrusu.

rAhpC ve rLprG protein çözeltilerinin, kalibrasyon denklemi kullanarak hesaplanan konsantrasyonları Tablo 4.2’de görülmektedir.

Tablo 4.2. rAhpC ve rLprG protein çözeltilerinin konsantrasyonları.

Protein Çözeltilisi	OD ₅₉₅	Protein Çözeltilisinin Konsantrasyonu (µg/mL)
AhpC	0,435	1417,67
LprG	0,510	1666,56

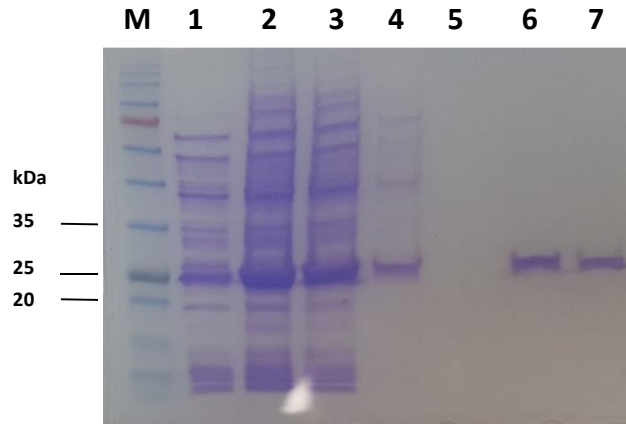
4.5. *in vivo* Hayvan Deneylelerinde Aşı Antijenlerinin İndüklediği Hümorale Bağışıklığın Tayini

4.5.1. Western Blot

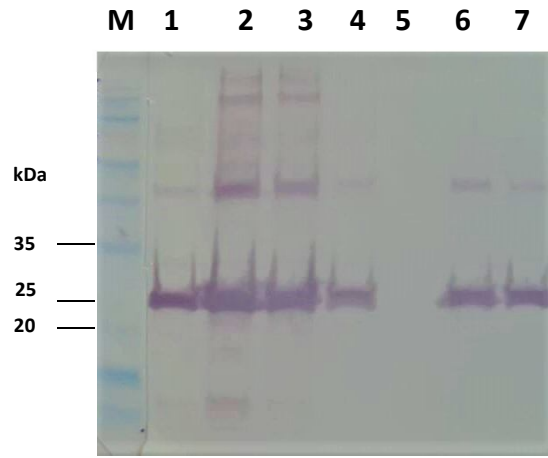
rAhpC ve rLprG ile aşılama gruplarının serumlarında oluşan antikorların rAhpC ve rLprG özgülüğünü tayin etmek için önce bölüm 3.8.2’de anlatıldığı gibi Western blot deneyi yapılmıştır.

AhpC Proteinin ile Yapılan Western Blot Çalışmaları

Primer antikor çözeltisi olarak Grup D (rAhpC): rAhpC – Adjuvan grubuna ait 60. gün serumunun kullanıldığı WB deneyinin bulguları Şekil 4.17’de sunulmuştur.



A

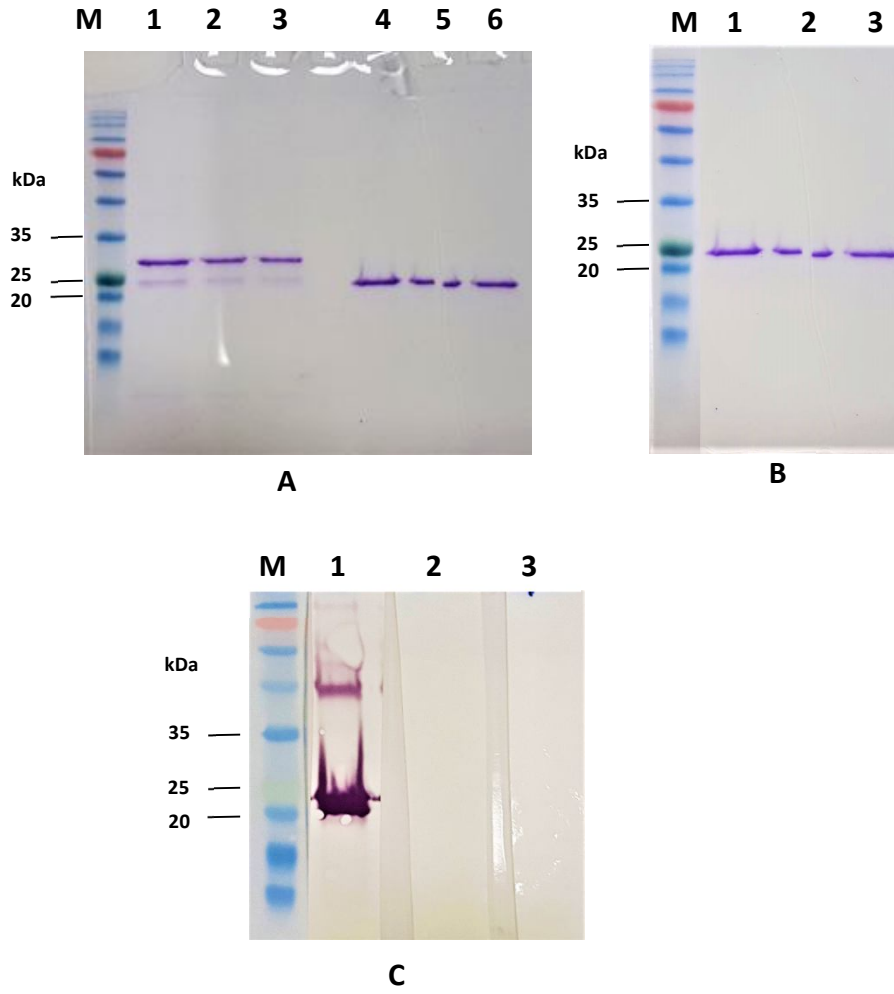


B

Şekil 4.17. Grup D (rAhpC): rAhpC – ISA 61VG grubuna ait serumlarda AhpC'ye karşı oluşan antikorların kalitatif analizi. AhpC proteinine ait (A) SDS-PAGE jel, (B) Western blot membran görüntüleri.

A ve B şekillerinin her ikisi için, 1: IPTG ile indüklenmemiş pET-*ahpC* taşıyan *E.coli* BL21(DE3) lizati; 2: IPTG ile indüklenmiş pET-*ahpC* taşıyan *E.coli* BL21(DE3) lizati; 3: Dengelenmiş nikel kolondan geçen ilk fraksiyon; 4, 5: Birinci ve ikinci yıkama; 6, 7: Birinci ve ikinci elüatlar. M:Marker (BLUeye Prestained).

rAhpC proteinine karşı üretilen özgül antikorların kalitatif analizi için; "A: PBS – Adjuvan", "B: BCG prime – PBS boost" ve "E (rAhpC): BCG Prime – rAhpC Boost" gruplarına ait 60. gün serumlarının primer antikor olarak kullanıldığı WB bulguları Şekil 4.18'de görülmektedir.

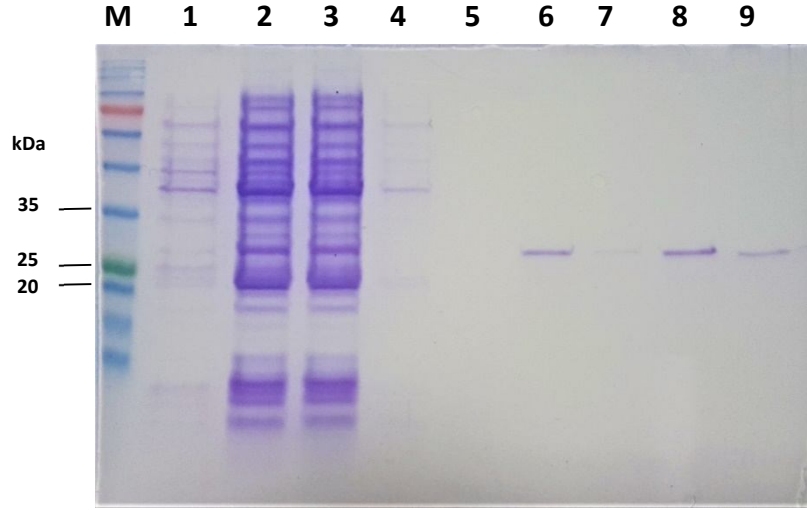


Şekil 4.18. “Grup B: BCG prime – PBS boost”, “Grup E (rAhpC): BCG Prime – rAhpC Boost” ve “Grup A: PBS – ISA 61VG” gruplarına ait 60. gün serumlarında rAhpC’ye karşı oluşan antikorların kalitatif analizi.

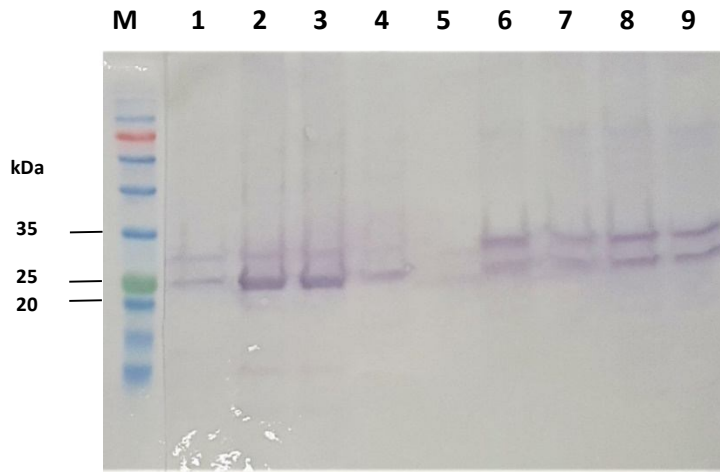
(A) rLprG ve rAhpC proteinlerinin SDS-PAGE görüntüsü, (B) rAhpC proteinlerinin marker ile yanyana yerleştirilmiş görüntüsü. (C) rAhpC proteininin western blot membranının görüntüsü. 1 numaralı sütunda “Grup E (rAhpC): BCG Prime – rAhpC Boost” grubundan alınan serum; 2 numaralı sütunda “Grup B: BCG prime – PBS boost” grubundan alınan serum; 3 numaralı sütunda “Grup A: PBS – ISA 61VG” grubundan alınan serum primer antikor olarak kullanılmıştır. M: Marker (BLUeye Prestained Protein Ladder, PM007-0500, Bio-Helix).

LprG Proteinini ile Yapılan Western Blot Çalışmaları

“D (rLprG): rLprG – Adjuvan” grubuna ait 60. gün serumunun primer antikor çözeltisi olarak kullanıldığı WB deneyinin bulguları Şekil 4.19’da sunulmuştur.



A

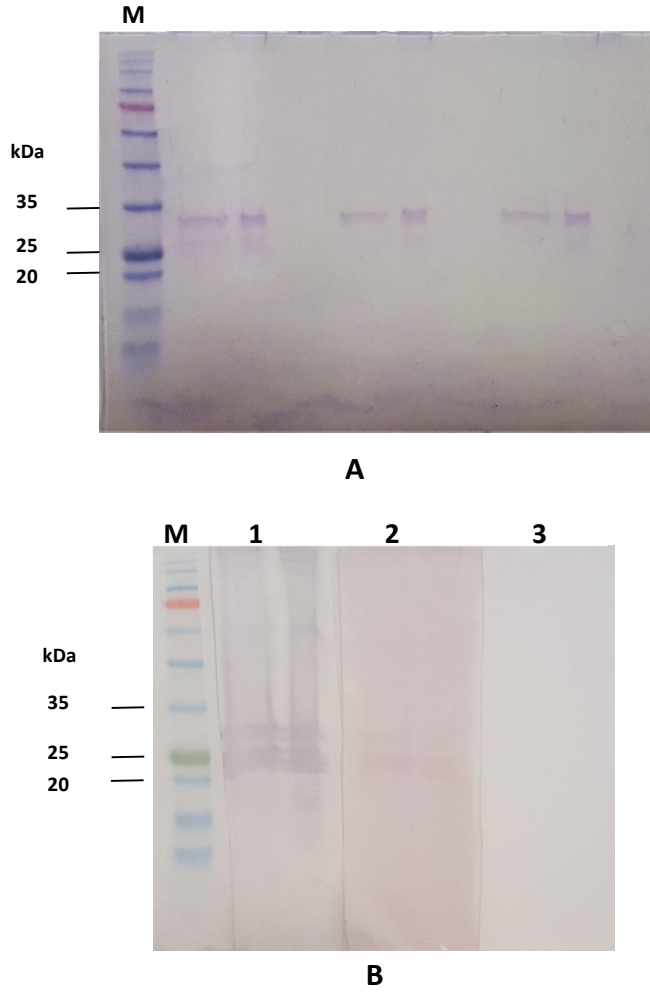


B

Şekil 4.19. rLprG’ye karşı oluşan antikorların western blot analizi. rLprG proteinine ait (A) SDS-PAGE jel görüntüsü, (B) Western blot membran görüntüsü. A ve B şekillerinin her ikisi için,

1: IPTG ile indüklenmemiş pET-*lprG* taşıyan *E.coli* BL21(DE3) lizati; 2: IPTG ile indüklenmiş pET-*lprG* taşıyan *E.coli* BL21(DE3) lizati; 3: Dengelenmiş nikel kolondan geçen ilk fraksiyon; 4, 5: Birinci ve ikinci yıkamalar; 6, 7: Birinci ve ikinci elüatlar. M: Marker (BLUeye Prestained Protein Ladder, PM007-0500, Bio-Helix)

rLprG proteinine karşı üretilen özgül antikorların kalitatif analizi için *in vivo* "A: PBS – Adjuvan", "B: BCG Prime – PBS Boost" ve "E (rLprG): BCG Prime – rLprG Boost" aşılama gruplarından toplanan 60. gün serumlarının primer antikor olarak kullanıldığı WB bulguları Şekil 4.20'de görülmektedir.



Şekil 4.20. "Grup E (rLprG): BCG Prime – rLprG Boost", "Grup B: BCG Prime – PBS Boost", "Grup A: PBS – ISA 61VG" gruplarına ait 60. gün serumlarında rLprG'ye karşı oluşan antikorların kalitatif analizi.

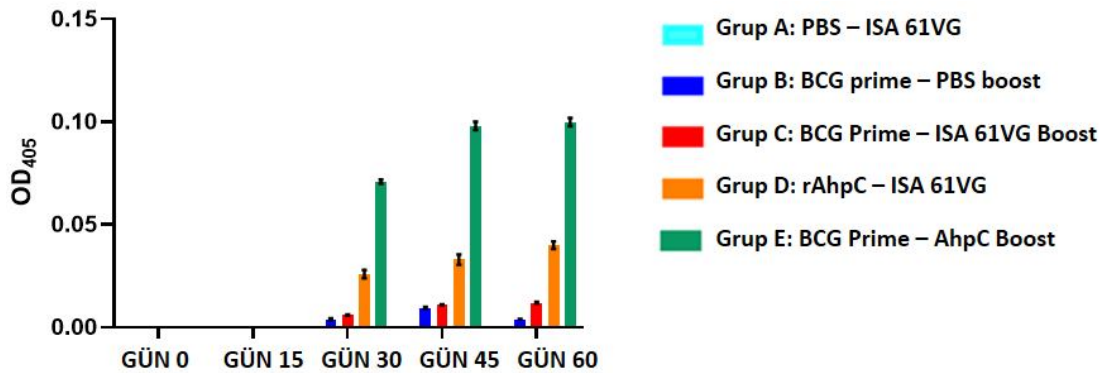
(A) LprG proteininin SDS-PAGE, (B) Western Blot membranının görüntüsü. 1 numaralı sütunda "Grup E (rLprG): BCG Prime – rLprG Boost" grubundan alınan serum; 2 numaralı sütunda "Grup B: BCG Prime – PBS Boost" gurubundan alınan serum; 3 numaralı sütunda "Grup A: PBS – ISA 61VG" gurubundan alınan serum primer antikor olarak kullanılmıştır. M: Marker (BLUeye Prestained)

4.5.2. Total İmmünoglobulin G (IgG) Tayini

in vivo aşılama çalışmalarında farelerden alınan 0., 15., 30., 45. ve 60. gün serum örneklerinde bulunan rAhpC ve rLprG spesifik antikorlar Bölüm 3.8.2’de anlatıldığı şekilde ELISA testi ile ölçülmüştür. Elde edilen veriler GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., CA, ABD) yazılım destek programı yardımıyla çift yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post-hoc test (Tukey’s test) ile istatistiksel açıdan analiz edilmiştir.

rAhpC Proteinine Karşı Oluşan Hümorale İmmünite

in vivo aşılama çalışmalarındaki “A: PBS – Adjuvan”; “B: BCG prime – PBS boost”; “C: BCG Prime – Adjuvan Boost”; “D: rAhpC – Adjuvan”; “E: BCG Prime – rAhpC Boost” gruplarından alınan 0., 15., 30., 45. ve 60. gün serum örneklerinde rAhpC proteinine karşı gelişen antikorların varlığı, rAhpC proteini ile kaplanmış 96 kuyucuklu plaklarda ELISA temelli yöntem ile analiz edilmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.21’de gösterilmiştir. Verilerin istatistiksel analizinin sonuçları Tablo 4.3’te verilmiştir.



Şekil 4.21. rAhpC ile *in vivo* aşılama gruplarındaki farelerin serum IgG düzeyleri.

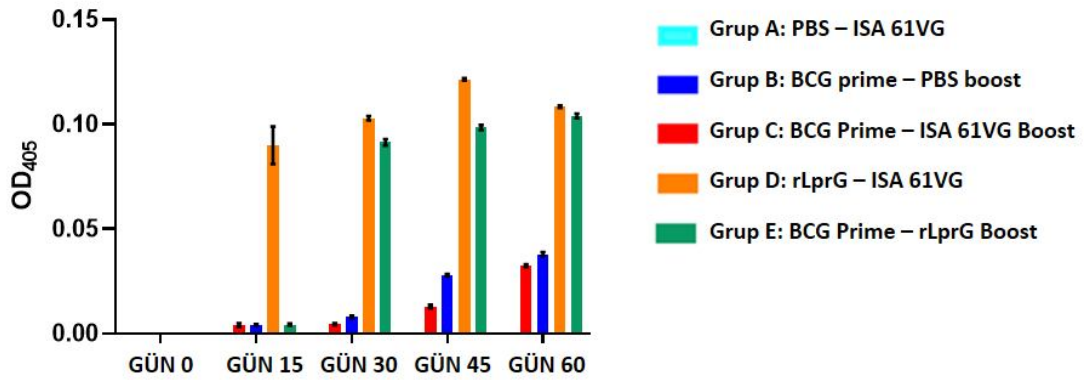
Tablo 4.3. *in vivo* aşılama çalışmalarında kullanılan farelerin serumlarındaki rAhpC spesifik antikor seviyelerinin varyans analizi.

AŞI GRUPLARI	İmmünizasyon Öncesi (0. gün)	15. gün	30. gün	45. gün	60. gün
GRUP A - GRUP B	AD	AD	*	***	****
GRUP A - GRUP C	AD	AD	**	****	****
GRUP A - GRUP D	AD	AD	**	**	***
GRUP A - GRUP E	AD	AD	****	****	****
GRUP B - GRUP C	AD	AD	*	*	***
GRUP B - GRUP D	AD	AD	**	*	**
GRUP B - GRUP E	AD	AD	****	****	****
GRUP C - GRUP D	AD	AD	**	*	**
GRUP C - GRUP E	AD	AD	****	****	****
GRUP D - GRUP E	AD	AD	***	****	****

Grup A: PBS – ISA 61VG; Grup B: BCG prime – PBS boost; Grup C: BCG Prime – ISA 61VG Boost; Grup D: rAhpC – ISA 61VG; Grup E: BCG Prime – AhpC Boost. *: p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,001; ****:p<0,0001; AD: Anlamalı değil.

LprG Proteinine Karşı Oluşan Hümorale İmmünite

in vivo aşılama çalışmalarındaki “A: PBS – Adjuvan”; “B: BCG prime – PBS boost”; “C: BCG Prime – Adjuvan Boost”; “D: rLprG – Adjuvan”; “E: BCG Prime – rLprG Boost” gruplarından alınan 0., 15., 30., 45. ve 60. gün serumlarında rLprG proteinine karşı gelişen antikorların varlığı rLprG proteini ile kaplanmış 96 kuyucuklu plaklarda ELISA temelli yöntem ile analiz edilmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.22’de gösterilmiştir. Elde edilen verilerin istatistiksel analizinin sonuçları Tablo 4.4’te verilmiştir.



Şekil 4.22. rLprG ile *in vivo* aşılama gruplarındaki farelerin serum IgG düzeyleri.

Tablo 4.4. *in vivo* aşılama çalışmalarında kullanılan farelerin serumlarındaki rLprG spesifik antikor seviyelerinin varyans analizi.

AŞI GRUPLARI	İmmünizasyon Öncesi (0. gün)	15. gün	30. gün	45. gün	60. gün
GRUP A - GRUP B	AD	*	**	**	****
GRUP A - GRUP C	AD	**	**	****	****
GRUP A - GRUP D	AD	*	****	****	****
GRUP A - GRUP E	AD	*	****	****	****
GRUP B - GRUP C	AD	AD	*	***	**
GRUP B - GRUP D	AD	*	****	****	****
GRUP B - GRUP E	AD	AD	****	****	****
GRUP C - GRUP D	AD	*	****	****	****
GRUP C - GRUP E	AD	AD	****	****	****
GRUP D - GRUP E	AD	*	**	***	*

Grup A: PBS – ISA 61VG; Grup B: BCG prime – PBS boost; Grup C: BCG Prime – ISA 61VG Boost; Grup D: rLprG – ISA 61VG; Grup E: BCG Prime – rLprG Boost

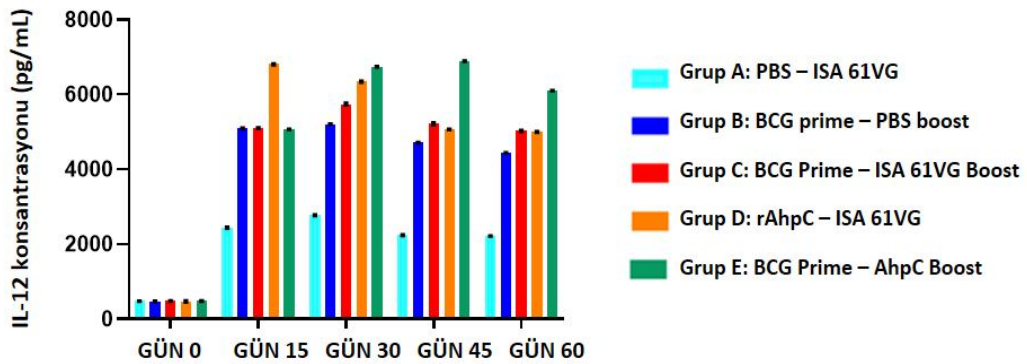
*: p<0.05; **:p<0.01; ***:p<0.001; ****:p<0.0001; AD: Anlamalı değil

4.6. *in vivo* Hayvan Deneylerinde Aşı Antijenlerinin İndüklediği Hücresel Bağışıklığın Tayini

Farelerde rAhpC veya rLprG proteinine karşı oluşan hücresel bağışıklık yanıtı serum IL-12 miktarı üzerinden tayin edilmiştir. Bunun için bölüm 3.8.3'te anlatıldığı gibi Mouse IL-12 ELISA Kit (Invitrogen) kullanılarak farelerden toplanan serum örnekleri ile ELISA testi yapılmıştır.

4.6.1. rAhpC Antijeni ile Oluşan Hücresel Bağışıklık Yanıtının Tayini

in vivo aşılama çalışmalarındaki “A: PBS – Adjuvan”; “B: BCG prime – PBS boost”; “C: BCG Prime – Adjuvan Boost”; “D: rAhpC – Adjuvan”; “E: BCG Prime – rAhpC Boost” gruplarından alınan 0., 15., 30., 45. ve 60. gün serumlarındaki IL-12 seviyelerini saptamak için yapılan ELISA deneyinin sonuçları Şekil 4.23’te gösterilmiştir. Verilerin istatistiksel analizinin sonuçları Tablo 4.5’te verilmiştir.



Şekil 4.23. rAhpC ile *in vivo* aşılama gruplarındaki farelerin serum IL-12 seviyeleri.

Tablo 4.5. rAhpC ile *in vivo* aşılama gruplarında bulunan farelerin serumlarındaki IL-12 seviyelerinin varyans analizi.

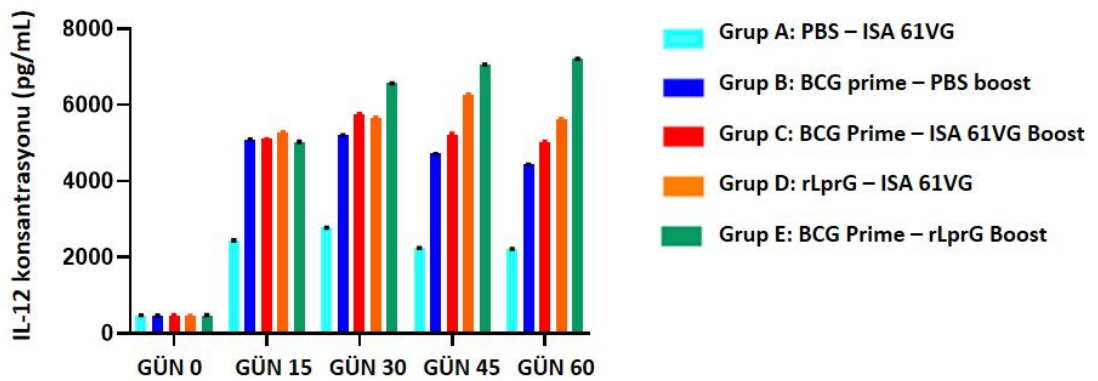
AŞI GRUPLARI	Bağışıklama Öncesi (0. gün)	15. gün	30. gün	45. gün	60. gün
GRUP A - GRUP B	AD	****	****	****	****
GRUP A - GRUP C	AD	****	****	****	****
GRUP A - GRUP D	AD	****	****	****	****
GRUP A - GRUP E	AD	****	****	****	****
GRUP B - GRUP C	AD	AD	**	**	****
GRUP B - GRUP D	AD	****	****	****	****
GRUP B - GRUP E	AD	AD	****	****	****
GRUP C - GRUP D	AD	****	**	*	AD
GRUP C - GRUP E	AD	AD	****	****	****
GRUP D - GRUP E	AD	****	**	****	****

Grup A: PBS – ISA 61VG; Grup B: BCG prime – PBS boost; Grup C: BCG Prime – ISA 61VG Boost; Grup D: rAhpC – ISA 61VG; Grup E: BCG Prime – rAhpC Boost

*: p<0.05; **:p<0.01; ***:p<0.001; ****:p<0.0001; AD: Anlamli değil

4.6.2. LprG Antijeni ile Oluşan Hücresel Bağışıklık Yanıtının Tayini

in vivo aşılama çalışmalarındaki “A: PBS – Adjuvan”; “B: BCG prime – PBS boost”; “C: BCG Prime – Adjuvan Boost”; “D: rLprG – Adjuvan”; “E: BCG Prime – rLprG Boost” gruplarından alınan 0., 15., 30., 45. ve 60. gün serumlarındaki IL-12 seviyelerini saptamak için yapılan ELISA deneyinin sonuçları Şekil 4.24’te gösterilmiştir. Verilerin istatistiksel analizinin sonuçları Tablo 4.6’te verilmiştir.



Şekil 4.24. rLprG ile *in vivo* aşılama gruplarındaki farelerin serum IL-12 seviyeleri.

Tablo 4.6. rLprG ile *in vivo* aşılama gruplarında bulunan farelerin serumlarındaki IL-12 seviyelerinin varyans analizi.

AŞI GRUPLARI	Aşılama Öncesi (0. gün)	15. gün	30. gün	45. gün	60. gün
GRUP A - GRUP B	AD	****	****	****	****
GRUP A - GRUP C	AD	****	****	****	****
GRUP A - GRUP D	AD	****	****	****	****
GRUP A - GRUP E	AD	****	****	****	****
GRUP B - GRUP C	AD	AD	**	**	****
GRUP B - GRUP D	AD	**	***	****	****
GRUP B - GRUP E	AD	AD	****	****	****
GRUP C - GRUP D	AD	**	AD	****	****
GRUP C - GRUP E	AD	AD	****	****	****
GRUP D - GRUP E	AD	**	****	****	****

Grup A: PBS – ISA 61VG; Grup B: BCG prime – PBS boost; Grup C: BCG Prime – ISA 61VG Boost; Grup D: rLprG – ISA 61VG; Grup E: BCG Prime – rLprG Boost

*: p<0.05; **:p<0.01; ***:p<0.001; ****:p<0.0001; AD: Anlamlı değil

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışması, “Sığır tüberkülozuna sebep olan ve insanlarda da zoonotik bir ajan olan *M. bovis*’in virulansında etkili olduğu bilinen LprG ve AhpC proteinlerinin rekombinant aşı geliştirmek üzere potansiyel aşı antijeni olarak kullanılabilir” hipotezi üzerine tasarlanmıştır.

Tüberküloz hastalığı, tarihi çok eski çağlara kadar uzanan, günümüzde yeniden artış gösteren, erişkin aşılmasında çok başarılı olunamayan ve halk sağlığı açısından ciddi bir sorun oluşturan bulaşıcı bir hastalıktır. Temel olarak *M. tuberculosis* basilini içeren damlacıklarla havayolu ile bulaşan bu hastalık klinikte akciğer tüberkülozu, akciğer dışı tüberküloz ve zoonotik tüberküloz endikasyonları ile aktif veya latent olarak görülebilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü’nün istatistiksel verilerine göre 2018 yılında küresel ölçekte 10 milyondan fazla aktif tüberküloz ve 2 milyara yakın latent tüberküloz hastası olduğu öngörülmektedir. Ayrıca, klinikte karşılaşılan ilaç drençli tüberküloz vakaları tedaviyi zorlaştırmakta ve halksağlığı açısından mevcut riski daha da artırmaktadır (22).

Yaşadığımız pandemi sürecinde de görüldüğü gibi bulaşıcı hastalıklar ile mücadelenin en etkin yolu, toplumda hastalığa neden olan patojene karşı bağışıklık oluşturulmasını sağlayan aşuların geliştirilmesidir. Tüberküloz hastalığına karşı bağışıklama amacıyla insanlarda kullanımına onay verilen tek aşı Fransız bilim insanları Albert Calmette ve Camille Guérin tarafından *M.bovis* suşundan geliştirilen *M. bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) aşısıdır. Bu aşı halen erken çocukluk döneminden itibaren tüberküloz hastalığının önlenmesi için kullanılan tek aşıdır (10). Neredeyse 100 yılı aşkın süredir kullanımda olan BCG aşısı en yaygın kullanılan ve en güvenli aşı olma özelliğini taşımasıyla birlikte (126) çözüm bekleyen bazı sorunlar devam etmektedir. Bunlar;

- Erişkin bireylerde koruyucu bağışıklık oluşturma etkinliğinin değişkenliği (%0-80 aralığında değişmektedir) (127),
- Koruyuculuk süresinin (15-60 yıl) (130, 131) değişkenliği,
- Erişkinlerde aşılamanın enfeksiyon, latent tüberküloz gelişimi veya latent hastalık aktivasyonunu önlemediğini gösteren çalışmaların bulunması (128),

- Çocukluk çağı aşılama programlarının büyük kısmında uygulanmasına rağmen küresel tüberküloz insidansındaki düşüşün yavaşlığı,

olarak sıralanabilir. Sıralanan bu sorunlar her yaş grubunda tüm tüberküloz formlarına karşı koruma sağlayacak daha etkin bir aşıya ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir. Bu ihtiyaç doğrultusunda bugün yeni tüberküloz aşılarının geliştirilmesi için yoğun olarak pre-klinik ve klinik çalışmalar sürmektedir (bkz. Tablo 2.2) (22).

BCG aşısının etkinliğinin bireylerde zamanla azalmasının altında yatan neden henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Bu konudaki varsayım BCG ile aşılama sonrası oluşan bağışık bellek hücrelerinin zamanla yok olmasıdır. Buna çözüm olarak BCG ile aşılanmış bireylere *M.tuberculosis* ile ilişkili bir booster aşı uygulanması önerilmekte ve bunun söz konusu bellek hücrelerini yenileyebileceği düşünülmektedir (151).

Hem BCG'ye alternatif, hem de BCG ile prime aşılanmış bireylerde booster aşı olarak uygulanacak yeni aşılarda keşfi ve geliştirilmesi tüberküloz ile küresel mücadele açısından büyük önem taşımaktadır. Yeni aşı teknolojileri bakımından rekombinant protein alt birim aşılarda diğerlerine göre üstünlükleri dikkat çekmektedir (152). Bu üstünlükleri şöyle özetleyebiliriz:

- Canlı organizma içermediklerinden patojenisite riski taşımamaları,
- İyi tanımlanabilen bir yapıya sahip olmaları,
- Çeşitli taşıyıcı sistemlerle formüle edilebilmeleri,
- Büyük ölçekli üretimlerinin kolay olması,
- Biyoinformatik ve moleküler araçlar ile mühendislik çalışmalarına imkan vermeleri.

Bu bilgilerin ışığında tamamlanan doktora tez çalışmasının amacı;

- (i) Tüberküloz patogenezi ile ilgili virülans faktörlerin rekombinant DNA teknolojisi ile bakteriyel ifadeleme sistemlerinde üretilmesi, saflaştırılması ve karakterizasyonu,
- (ii) Üretilen rekombinant proteinleri aşı adjuvanı ile formüle etmek,
- (iii) Geliştirilen alt birim aşılarda hem tek başlarına hem de BCG ile prime aşılanmış farelerde booster aşı olarak etkinliklerini araştırmak.

Bu amaç doğrultusunda tez çalışmamızda literatür verilerine göre aşı antijeni olma potansiyeli olan ancak bu amaçla daha önce üzerinde araştırma yapılmamış AhpC proteini rekombinant DNA teknolojisi ile üretilmiş ve aşı adayı olma potansiyeli farelerde hümmoral ve hüccresel yanıtlara bakılarak değęerlendirilmiştir. Aynı çalışmalar ikinci bir aşı adayı antijen olan rLprG proteini ile paralel olarak sürdürülmüştür. Daha öncesinde bir çalışmada (153) *M. tuberculosis* H37Rv genomundan çoğaltılmış olan rLprG proteininin ve tek başına, Ribi (monofosforil lipit A-trehaloz dikorinomikolat) adjuvanı ve dimetildioktadesilamonyum klorit (DDA) adjuvanı ile formülasyonları hazırlanmış ve TB aşı potansiyeli değęerlendirilmiştir. Bu çalışmamızda ise rLprG proteini *M.bovis* genomik DNA'sından çoğaltılmış ve emülsiyon tipi yağ bazlı Montanide® ISA 61VG adjuvanıyla formülasyonu yapılarak hüccresel ve hümmoral immün yanıtta etkisi araştırılmıştır.

5.1. Rekombinant Protein Üretimi İçin Kompetan Hücre Hazırlanması

Rekombinant protein üretiminin temel basamakları; proteini kodlayan ilgili genin (i) belirlenmesi, (ii) çoğaltılması, (iii) ekspresyon vektörlerine (plazmitlere) klonlanması, (iv) vektörün protein ifade edecek hücre sistemine (bakteriye) transformasyonu ve (v) üretilen proteinin ayrılması, saflaştırılması ve karakterizasyonu olarak özetleyebiliriz.

Bakteriyel transformasyon, klonlama sürecinin kritik bir aşamasıdır. Plazmit DNA hücre çeperini geçtikten sonra bakteri içerisinde dayanıklı olarak kalmalıdır. Hücreler katyonik maddelerle muamele, sıcaklık değışim şokları ve elektroporasyon gibi yöntemlerle yabancı DNA'nın alımı açısından elverişli (kompetan) hale getirilir (154).

Laboratuvar çalışmalarında bakteri suşlarını kompetan hale getirmek için Hanahan yöntemi (155), DMSO yöntemi (156), CaCl₂ yöntemi (157) ve elektroporasyon yöntemi (158) en sık kullanılan yöntemlerdir. İki değerlikli kalsiyum katyonları (Ca²⁺) tek veya kombinasyonlar halinde uygulanan çok etkili yöntemdir (154).

HMS174, HB101, JM109, DH5 α ve NovaBlue gibi *E.coli* K12 suşları klonlama işlemlerinde yaygın olarak kullanılan suşlardır (159). Rekombinant protein üretimi için sık tercih edilen *E.coli* suşları arasında ise BL21, BL21 (DE3), BL21 (DE3) pLysS, BL21 Star, Lemo21 (DE3), Tuner (DE3), Origami, SHuffle, Rosetta (BL21 CodonPlus), C41 (DE3) ve C43 (DE3) bulunmaktadır (160).

Bu tez kapsamında, plazmitlere gen klonlama işlemleri için *E.coli* DH5 α suşu kullanılırken, rekombinant protein üretimi için *E.coli* BL21(DE3) suşları kullanılmıştır. Bakterilerin kompetan hale getirilmesi için CaCl₂ ile muamele yöntemi tercih edilmiştir.

5.2. *ahpC* ve *lprG* Genlerinin Biyolojik Kaynaktan Elde Edilmesi ve pGEM-T Plazmiti ile Çoğaltılması

Tez çalışması kapsamında literatür taraması ile seçilen ve rekombinant alt birim aşı antijeni olarak üretilmesi planlanan AhpC ve LprG proteinlerine ait gen dizileri *M. bovis* genomik DNA'sından PZR yöntemi ile çoğaltılmıştır. Tasarlanan ileri ve geri primer çiftleri kullanılarak *ahpC* geni *Bam*HI ve *Hind*III; *lprG* geni ise *Eco*RI ve *Hind*III kesim enzimlerine spesifik gen bölgeleri arasında olacak şekilde PZR ile çoğaltılmış (bkz. Tablo 3.1) ve agaroz jelde analiz edilmiştir.

PZR deneyleri ile çoğaltılan *ahpC* ve *lprG* gen dizileri agaroz jelden saflaştırıldıktan sonra literatürde PZR (TA) klonlama olarak bilinen bir klonlama tekniği ile pGEM-T vektör sistemine klonlanmıştır. PZR klonlama tekniği, restriksiyon enzimleri ile kesim basamağına gerek duymaksızın PZR ürünü gen dizilerinin özel bir vektöre doğrudan klonlanmasına imkan veren bir tekniktir. TA klonlama veya PCR (TA) klonlama olarak adlandırılan teknik en sık kullanılan PZR klonlama yöntemi olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemde, PZR deneyinde kalıp DNA'dan ilgili gen bölgesinin çoğaltmak amacıyla kullanılan *Taq* polimeraz enziminin çoğalttığı DNA fragmentlerinin 3' uçlarına adenin (A) artıkları eklenmektedir (161). PZR (TA) klonlama için kullanılan pGEM-T Easy vektör sistemi doğrusal ve 3' uçlarında timidin (T) artığı taşıyan bir vektör sistemidir. Söz konusu timidin artıkları PZR deneyinde *Taq* polimeraz ile üretilen ve adenin artıkları taşıyan DNA dizilerinin kolaylıkla vektöre

tutunmasını sağlamaktadır (162). Literatürde bildirilen bu veriler doğrultusunda agaroz jelden GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo) ile saflaştırılan ve uçlarında adenin artıkları taşıyan PZR ürünleri 3' timin artıkları barındıran pGEM-T mekik vektörüne klonlanmıştır. Klonlanan pGEMT-*ahpC* ve pGEMT-*lprG* ligasyon ürünleri kompetan *E.coli DH5α* suşlarına transforme edilmiş ve mavi-beyaz tarama yapılmıştır.

Mavi-beyaz tarama, rekombinant bakterinin belirlenmesi için hızlı ve etkili bir teknik olup temeli *E.coli*'de laktozu, glukoz ve galaktoza parçalayan β-galaktozidaz aktivitesine dayanmaktadır. *E.coli*'nin bulunduğu ortamda laktoz varsa bakteride bulunan *lacZ* operonu ve buna bağlı olarak β-galaktozidaz aktivitesi uyarılmaktadır. β-galaktozidaz tetramerik bir enzim olup her bir monomer lacZ-alfa ve lacZ-omega şeklinde iki kısımdan oluşmaktadır. Eğer alfa fragment silinirse omega-fragment işlevsiz hale gelir. Alfa fragmentin işlevselliği bir plazmit ile sağlanabilmektedir (α-komplementasyon süreci). Pek çok *E.coli* suşu *lacZΔM15* delesyon mutasyonuna sahiptir ve pek çok plazmit vektörü lacZ alfa monomerine denk gelen 146 aminoasitlik kısa bir *lacZ* gen segmenti taşımaktadır. Böylece bu plazmitler mutasyonlu hücreler tarafından alındığında α-komplementasyon sürecinin bir sonucu olarak bakteri hücresinde β-galaktozidaz enzimi işlevsel formda üretilebilmektedir. Söz konusu α-komplementasyon süreci pGEM-T gibi plazmitlerin tercih edildiği rekombinasyon işlemlerinde belirteç olarak kullanılmaktadır. Bu tip klonlama vektörlerinde çoklu klonlama bölgeleri plazmitte *lacZ* gen bölgesinin içine yerleştirilmiştir. Bu bölge yabancı DNA parçalarının eklenmesi için restriksiyon enzimleri ile kesilebilmektedir. Yabancı bir DNA parçasını içeren bir vektör *E.coli* hücresi tarafından alındığında α-komplementasyon gerçekleşmez ve bu nedenle işlevsel bir β-galaktozidaz enzimi üretilemez. Ancak vektör yabancı DNA dizisi taşııyorsa veya çoklu klonlama bölgeleri dışında bir bölgede ise vektörde bulunan *lacZ* geni α-komplementasyon sürecini gerçekleştirecek ve işlevsel bir β-galaktozidaz üreten *E.coli* suşu oluşacaktır. Rekombinant DNA'yı taşıyan klonların taranması için X-gal olarak bilinen bir kromojenik substrat agar plağa eklenmektedir. Eğer bakteride üretilen β-galaktozidaz işlevsel ise X-gal substratını "5-bromo-4-kloro-indoksil" maddesine hidroliz eder. Bu madde daha sonra kendiliğinden dimerize olarak "5,5'-dibromo-4,4'-dikloro-indigo"

olarak bilinen ve çözünmeyen mavi bir ürüne dönüşür. Bu nedenle rekombinant geni içermeyen hücreler mavi renkte görünürken, içeren hücreler beyaz renkte görünmektedir. Bu şekilde istenen koloniler kolaylıkla seçilerek kültürü yapılabilmektedir. Mavi-beyaz tarama sürecinde X-gal ile birlikte İzopropil β -D-1-tiyogalaktopiranozit (IPTG)'de kullanılmaktadır. IPTG, galaktozun metabolize olmayan analogudur ve lacZ genini indüklemektedir. Bu sebeple görsel tarama için X-gal gibi bir kromojenik substrat gerekmektedir (163).

5.3. *ahpC* ve *lprG* Genlerinin pET-28a-c(+) Plazmitine Ligasyonu

Bir gen dizisinin spesifik bir konakçıda ifadelenebilmesi için, konakçıda bağımsız olarak çoğalabilen, uygun genetik elemanları (replikasyon orijini, seçici antibiyotik direç geni, promoter bölgesi, translasyon başlangıç bölgesi ve transkripsiyon-translasyon durdurucu bölgeler) içeren plazmitlere aktarılması gerekmektedir (164).

Klonlama ve plazmit çoğaltma işlemlerinde yaygın olarak kullanılan *E.coli* HMS174, HB101, JM109, NovaBlue ve DH5 α suşlarının, yüksek transformasyon etkinliği göstermeleri ve plazmit çoğaltma işlemlerindeki verimleri dolayısıyla pET vektör sistemi ile yapılan klonlanma ve çoğaltma işlemlerinde uygun oldukları bilinmektedir (159). Bu nedenlerle pET-*ahpC* ve pET-*lprG* plazmitlerinin çoğaltılması işlemleri *E.coli* DH5 α suşları kullanılarak yapılmıştır.

Tip II restriksiyon endonükleazlar ve DNA ligazların kullanıldığı klonlama yöntemleri zahmetli, zaman alıcı ve enzim çeşitlerinin az olması gibi olumsuzluklarına rağmen en yaygın kullanılan laboratuvar yöntemleridir. Bu tez çalışmasında da rekombinant pET plazmitinin oluşturulması amacıyla restriksiyon enzim kesimi ve ligasyonda dayalı klonlama yöntemi uygulanmıştır.

Ligasyon işlemlerinde en sık karşılaşılan problem kullanılan vektörün kendi kendine kapanması durumu olup self-ligasyon olarak adlandırılmaktadır. Bu nedenle optimum transformasyon etkinliği elde edebilmek için self-ligasyonun önlenmesi kritik önem taşır.

Self ligasyonun önlenmesi için literatürde (i) alkalin fosfataz ile muamele, (ii) kısmi doldurma (partial filling-in) ve (iii) deoksiriboz değiştirme olarak adlandırılan yöntemler kullanılmaktadır. DNA parçaları arasında oluşan fosfodiester bağları, DNA ligaz enzimi tarafından DNA'nın 5'-fosfat grupları (5'-P) ile 3'-hidroksil grupları (3'-OH) arasında oluşturulmaktadır (165). Alkalin fosfataz enzimi ile muamele edilmiş DNA'nın 5' uçları defosforile hale geleceğinden DNA molekülü self ligasyon yapamaz (166, 167). Ancak 5' ucu defosforillenmiş DNA, hala 3'-OH grupları taşıdığından, 5'-P grupları barındıran bir DNA parçası ile birleşebilmektedir. Kısmi doldurma (partial filling-in) adı verilen teknikte ise iki DNA ürünü 3'-resesif uçlar oluşturan farklı restriksiyon enzimleri ile kesilir ve resesif uçlar deoksiribonükleotitler (dNTP) yardımıyla Klenow DNA polimeraz kullanılarak doldurulur. Meydana gelen uçlar self ligasyon yapamazken, tamamlayıcı 5'-overhang sekanslarla ligasyon yapabilmektedir (168). Bir diğer teknikte ise DNA molekülünün 3' uçlarında bulunan 2'-deoksiriboz ile 2',3'-dideoksiriboz değiştirilmekte ve 3' uçlarındaki değişim ile self ligasyon önlenmektedir. 5' uçlarında fosfat grupları bulunduğu için 3' hidroksil ve 5' fosfat grupları taşıyan tamamlayıcı DNA fragmentiyle ligasyon yapılması mümkün kılınmaktadır (169). Plazmit kesimi sonrası gerçekleşebilecek olası self-ligasyonlar sebebiyle, ligasyon veriminin düşmesini engellemek amacıyla tez çalışmalarında pET-*ahpC* ve pET-*lprG* vektörlerini oluşturmak için sırasıyla *Bam*HI – *Hind*III ve *Eco*RI – *Hind*III restriksiyon enzim çiftleriyle kesilen boş pET vektörleri alkalin fosfataz ile muamele edilmiş ve ligasyon işlemi başarıyla yapılmıştır.

5.4. pET-*ahpC* ve pET-*lprG* Plazmitlerinin Doğrulanması

Çalışmalarımızda literatür ile uyumlu şekilde *E.coli* DH5α suşu klonlama ve plazmit çoğaltma, *E.coli* BL21(DE3) suşu ise rekombinant AhpC ve LprG proteinlerinin üretimi işlemlerinde konakçı hücre sistemi olarak seçilmiştir. Tez kapsamında oluşturulan pET-*ahpC* ve pET-*lprG* plazmitlerinin doğrulanması için yaygın olarak kullanılan restriksiyon enzim kesimi (170) ve PZR (171) yöntemleri uygulanmıştır.

Restriksiyon enzim kesimi yöntemi ile yapılan doğrulama işleminde kesilen DNA fraksiyonları tekrar agaroz jelde yürütülmüş ve 4 numaralı *E.coli* DH5α suşunun

pET-*ahpC* plazmitini taşıdığı gösterilmiştir (Şekil 4.5). Enzim kesimi ile belirlenen 4 numaralı koloninin taşıdığı plazmitin doğrulanması için bir PZR deneyi yürütülmüş ve PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsüyle (Şekil 4.5) birlikte 4 numaralı *E.coli* DH5 α kolonisinin pET-*ahpC* plazmitini taşıdığı gösterilmiştir. Bu bakteriden GeneJET ticari kit ile izole edilen plazmit rekombiant AhpC proteininin üretimi için *E.coli* BL21(DE3) suşuna transforme edilmek üzere - 20 °C’de saklanmıştır.

pET-*lprG* plazmitinin doğrulanması için de tekrar restriksiyon enzim kesimi ve PZR deneyleri yapılmıştır. Restriksiyon enzim kesimi yöntemi ile yapılan doğrulama işleminde kesilen DNA fraksiyonları agaroz jelde yürütülmüş ve 2 ve 6 numaralı *E.coli* DH5 α suşlarında pET-*lprG* plazmiti olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.9). Enzim kesimi ile belirlenen 2 ve 6 numaralı kolonilerde bulunan plazmitlerin doğrulanması için bir PZR deneyi yapılmış ve PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsüyle (Şekil 4.10) birlikte hem 2 hem de 6 numaralı *E.coli* DH5 α kolonilerinin pET-*lprG* plazmitini taşıdığı kanıtlanmıştır.

Rekombinant pET-*ahpC* ve rekombinant pET-*lprG* plazmitlerinin moleküler klonlama teknikleri kullanılarak başarıyla oluşturulduğu gösterildikten sonra, protein üretimi aşamasına geçebilmek için bu plazmitlerin rekombinant protein üretiminde yaygın olarak kullanılan *E.coli* BL21 (DE3) suşuna transformasyonu gerekmektedir. Söz konusu plazmitler üretim suşuna aktarıldıktan sonra plazmitlerde kodlanmış *ahpC* ve *lprG* genlerinin varlığını göstermek için PZR deneyi ile doğrulama yapılmıştır. Doğrulama sonunda 1 ve 15 numaralı *E.coli* BL21(DE3) kolonilerin pET-*ahpC* plazmitini taşıdığı, 2 ve 6 numaralı *E.coli* BL21(DE3) kolonilerinin pET-*lprG* plazmitini taşıdığı belirlenmiş ve bu koloniler rekombinant AhpC ve LprG proteinlerinin üretimi için kullanılmıştır (Şekil 4.12.).

5.5. AhpC ve LprG Proteinlerinin Üretimi, Saflaştırılması ve Miktar Tayini

Hücre hattının seçimi, rekombinant protein üretim sürecinde kritik işlem basamaklarından birisidir. Prokaryotik veya ökaryotik hücre hatları rekombinant protein üretimi bakımından kendilerine özgü avantaj ve dezavantajlara sahiptir ve

konakçı hücre seçimi sırasında hedef proteinin karakteristikleri ve hücre hatları ile ilgili avantaj ve dezavantajlar göz önüne alınmalıdır.

Genomik yapısının iyi bilinmesi, hızlı çoğalması, yüksek yoğunluklu hücre kültürü oluşturabilmesi, büyüme ortamlarının nispeten ucuz olması, kolay bulunabilmesi ve hızlı transforme olabilmesi gibi üstünlükleri *E.coli* bakterisini rekombinant protein üretimi açısından uygun kılmaktadır (172).

Rekombinant farmasötik üretiminde genellikle BL21, BL21 (DE3), BL21 (DE3) pLysS, BL21 Star, Lemo21 (DE3), Tuner (DE3), Origami, SHuffle, Rosetta (BL21 CodonPlus), C41 (DE3) ve C43 (DE3) gibi *E.coli* suşları tercih edilmektedir (160). Çalışma kapsamında rekombinant protein üretimi için *E.coli* BL21(DE3) suşu seçilmiştir.

pET, pHAT, pMAL, pGEX ve pSUMO gibi plazmitler de rekombinant protein üretiminde kullanılmak üzere yaygın olarak kullanılan vektörlerdir (160).

E.coli BL21(DE3) suşu *E.coli* B suşlarından türetilmiş rekombinant bir suştur. Genomunda bazı proteaz genleri silinmiş durumdadır (Lon proteaz ve OmpT proteaz) (160). Oldukça aktif bir enzim olan faj T7 RNA polimeraz enzimine ait gen dizisi (T7RNAP) *E.coli* BL21 (DE3) suşunun genomuna *LacUV5* promoter kontrolünde olacak şekilde entegre edilmiştir. *LacUV5* promoter laktoz veya laktozun hidrolize uğramayan analogu IPTG molekülü ile indüklenebilmektedir (173).

pET vektörlerde bulunan T7 promoter sistemi rekombinant protein üretimi açısından oldukça popüler bir sistemdir. T7 promoter T7RNAP tarafından spesifik olarak tanınan bir promoter olma özelliği taşımaktadır. pET vektör sisteminde rekombinant proteine ait gen dizisi T7 promoter altına klonlanmaktadır. Oluşturulan rekombinant pET vektör sistemini içeren DE3 lizojen *E.coli* suşlarında, büyüme ortamlarına IPTG ilavesi ile plazmitte bulunan rekombinant genin ifadenmesi artırılmaktadır (172).

Tez çalışması sırasında (i) plazmit yapısında yer alan bulunan T7 promoterın, *E.coli* BL21(DE3) suşunda bulunan T7RNAP enzimi ile uyumu, (ii) laboratuvar ölçekli rekombinant protein üretiminde etkinliğinin bilinmesi, (iii) çok sayıda restriksiyon enzim bölgesine klonlama yapılmasına izin vermesi, (iv) klonlanan rekombinant

proteinin ileri aşamalarda tanınmasını ve saflaştırılmasını kolaylaştıracak dizileri (saflaştırma için His-Tag) içermesi gibi üstünlüklerinden dolayı rekombinant protein üretimi için pET vektör sisteminin bir üyesi olan pET-28a-c plazmiti tercih edilmiştir (159).

pET plazmitlerinde bulunan *ahpC* veya *lprG* genlerinin kültür ortamına IPTG eklenmese bile bakterilerde ifadelendiği bulgularda gösterilmiştir (Şekil 4.17 ve Şekil 4.19). Bu durum literatürde “Leaky Expression” olarak bilinen ve T7promoter – T7RNA polimeraz sistemlerinde çok rastlanan bir olgudan kaynaklanmaktadır (174). T7RNA polimeraz geni uyarıcı olmaksızın bazal düzeyde ifadelenir ve T7RNAP enzimi üretilir. Üretilen serbest T7RNAP enzimi T7 promoter altına klonlanan rekombinant genin transkripsiyonunu başlatır (172).

AhpC proteinin SDS-PAGE bantları incelendiğinde (Şekil 4.17 ve Şekil 4.18) nikel kolondan saflaştırılmış protein çözeltilerinde yaklaşık 25 ve 50 kDa boyutlarında proteinlerin bulunduğu anlaşılmıştır. Bu bulgu O’Riordan ve ark. (175) çalışmalarında görülen bulgularla uyumludur. Moleküler ağırlığı yaklaşık 25 kDa olan AhpC proteini yapısında sistein birimleri içermektedir (59, 63). Bu sebeple SDS-PAGE jelinde görülen yaklaşık 50 kDa büyüklüğündeki protein bandı, söz konusu sistein artıklarındaki sülfhidril grupları aracılığıyla dimerize olması sonucu oluşmaktadır.

rLprG proteininin SDS-PAGE görüntülerinde (Şekil 4.19 ve Şekil 4.20) ise nikel kolondan saflaştırılmış protein çözeltilerinde birbirine yakın moleküler ağırlıklarda iki protein bulunduğu görülmektedir. Bu görüntüler Hovav ve ark. (153) çalışmasında bildirilen yaklaşık 27 ve 30 kDa büyüklüğündeki protein bantları ile uyum içerisindedir. Çalışmada söz konusu bantlar kütle spektroskopisi yöntemiyle analiz edildiğinde 27 kDa ağırlığındaki bandın olgun protein (mature form) ve 30 kDa ağırlığındaki bandın olgunlaşmamış protein (pre-mature form) olmak üzere aynı proteine ait olduklarını bildirmiştir. Bu proteinlerden 30 kDa büyüklüğündeki proteinin açillenmemiş, 27 kDa büyüklüğündeki proteinin ise açillenmiş bir kimyasal yapıya sahip olduğu gösterilmiştir.

Mikrobiyal hücrelerde bulunan hücre duvarını yıkmak zor olmakla birlikte, bu işlem geliştirilen yöntemler ile etkin olarak yapılabilmektedir. Hücre parçalama

yöntemleri kimyasal, fiziksel ve biyolojik olabilir (176). Kimyasal yöntemlerde bakteri hücreleri deterjanlar, antibiyotikler, çözücüler (aseton, toluen) veya kaotropik ajanlarla (üre, guanidin) lizise uğratılabilmektedir (177, 178). Fiziksel yöntemlerde ise hücre parçalamak için sonikasyon, homojenizasyon, dondurma-çözme döngüleri veya aşındırıcılar (cam bilye) kullanılmaktadır (179-181). Biyolojik yöntemlerde de lizozim enzimi ile hücre lizisi görülmektedir (182). Bu yöntemlerin tek tek kullanılmasının yanı sıra birlikte kullanımları da mümkündür (183). Bu tez çalışmasında kullandığımız *E.coli* BL21(DE3) hücreleri inkübasyon sonrasında santrifüjlenerek çöktürülmüştür. Elde edilen bakteri pelletleri kaotropik ajan olarak üre içeren tampon çözeltisinde, buz üzerinde ultrasonikasyon yöntemiyle parçalanmış ve saflaştırma basamağına geçilmiştir.

Proteinler sahip oldukları büyüklük, çözünürlük, yük ve spesifik bağlanma afinitesine göre birbirinden ayrılarak saflaştırılabilmektedir (184). Rekombinant üretilen proteinlerin saflaştırılması için genellikle iyon değiştirme kromatografisi (185), jel filtrasyon (büyüklük dışlama) kromatografisi (186), afinite kromatografisi (187), hidrofobik etkileşim kromatografisi (188), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (189) gibi farklı kromatografik yöntemler tek başlarına veya birlikte kullanılmaktadır.

Afinite kromatografisi esasına göre geliştirilmiş olan immobilize metal afinite kromatografisi (IMAC), çözeltideki proteinler ile katı bir desteğe sabitlenmiş geçiş metalleri iyonları arasındaki etkileşime dayanan bir protein ayırma yöntemidir (190). Ayırma işleminin özgüllüğü, protein yüzeyinde bulunan metallerle etkileşebilen artıklarla ve bunların pozisyonu ile belirlenmektedir. Histidin, yapısında bulunan imidazol grupları ile geçiş metallerine afinite göstermektedir. Bu tezde pET vektörüne klonlanan rAhpC ve rLprG proteinleri N-terminalinde 6 adet histidin amino asidi içerecek şekilde klonlanıp, üretilmiştir ve bu sayede proteinlerin saflaştırılması için kolay, hızlı ve verimli bir yöntem olan immobilize metal iyon afinite kromatografisi kullanılmıştır.

Rekombinant proteinlerin karakterizasyonu ve kalite özelliklerinin (yapı analizi, saflık, stabilite, biyoetkinlik vb.) belirlenmesi için çok sayıda analitik tayin yapılmaktadır. Bu amaçla kullanılan başlıca yöntemler diferansiyel taramalı

kalorimetri (DSC), sirküler dikroizm (CD), floresans spektroskopisi, Fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR), X-ışını kristalografisi, nükleer manyetik rezonans spektroskopisi, kütle spektroskopisi, blotlama teknikleri, elektroforetik teknikler, immünotayinler ve biyotayinler olarak özetleyebiliriz (191). Tez çalışmasında üretilen rekombinant AhpC ve LprG proteinlerinin karakterizasyonu amacıyla saflık ve molekül ağırlığı analizlerinde elektroforez temelli bir analitik yöntem olan sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) kullanılmıştır. SDS-PAGE analizi ile proteinlerin üretildikleri ve saflaştırılabildikleri gösterilmiştir (Şekil 4.17 ve Şekil 4.19). Saflaştırılmış proteinler SDS-PAGE ile görüntüledikten sonra protein çözeltileri santrifüj filtreleri (Amicon, Merck) kullanılarak yoğunlaştırılmış ve derişimleri belirlenmiştir.

Protein miktar tayini amacıyla UV spektroskopisi (Near UV Absorbance (280 nm), Far UV Absorbance) yöntemi, Lowry yöntemi, bikinkoninik asit (BCA) yöntemi ve Bradford yöntemi gibi teknikler laboratuvarlarda en sık kullanılan tekniklerdir (192). Her yöntem kendine özgü üstünlükler ve sınırlamalar taşımaktadır. Bradford yönteminin esası kullanılan Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının 465 nm dalga boyunda maksimum olan absorpsiyonunun proteinlere bağlandığında 595 nm'ye kaymasına dayanmaktadır (148). Hızlı ve uygulaması kolay, hassas ve doğru sonuçlar üreten, pek çok tampon, tuz, indükleyici ajan ve şelat yapıcı ajan ile geçimli bir yöntemdir. Tez çalışmamızda üretilen ve saflaştırılan rekombinant proteinlerin miktar tayinleri Bradford Yöntemiyle yapılmıştır (bkz. Bölüm 4.4.3).

5.6. *in vivo* Çalışmalar ile Hümorale Bağışıklık Yanıtının Tayini

Tezin fareler üzerinde yapılan *in vivo* çalışmalar bölümünde farelerde oluşan hümorale bağışıklık yanıtı Western Blot ve ELISA temelli yöntemler ile belirlenmiştir (147).

5.6.1. Western Blot

Uygulanan aşılar ile farelerde oluşan antikorların rAhpC (Şekil 4.17 ve Şekil 4.18) veya rLprG (Şekil 4.19 ve Şekil 4.20) özgüllüğü Western blot yöntemiyle kalitatif olarak tayin edilmiştir (bkz. Bölüm 4.5.1).

Hayvan deneylerinde rAhpC ile bağışıklanan fare grupları;

- Grup A: PBS – Adjuvan
- Grup B: BCG prime – PBS boost
- Grup C: BCG Prime – Adjuvan Boost
- Grup D: rAhpC – Adjuvan
- Grup E: BCG Prime – rAhpC Boost, şeklinde oluşturulmuştur.

Hayvan deneylerinde rLprG ile aşılama için oluşturulan fare grupları ise benzer şekilde;

- Grup A: PBS – Adjuvan
- Grup B: BCG prime – PBS boost
- Grup C: BCG Prime – Adjuvan Boost
- Grup D: rLprG – Adjuvan
- Grup E: BCG Prime – rLprG Boost, olarak ayrılmıştır.

rAhpC bağışıklama çalışmasında A, B ve C gruplarında rAhpC proteinine karşı özgül antikor üretimi olmamıştır. Ancak D ve E gruplarında fare serumlarında rAhpC proteinine karşı özgül antikorlar gözlenmiştir. rAhpC mikobakteri türlerinde bulunan bir protein olmasına rağmen, WB deneylerinde BCG ile aşılanmış farelerin serumlarında bir bant görülmemiştir. Bunun nedenlerinden birisi WB membranında bulunan rAhpC protein miktarının ve/veya primer antikor olarak kullanılan fare serumundaki antikor miktarının düşük olması olabilir. Diğeri ise rAhpC proteininin işlevi ve *ahpC* geninin indüksiyonu ile ilgili olabilir. AhpC antioksidan bir enzimdir (193). Enfeksiyon sırasında organizma tarafından oluşturulan özel oksidan ortam şartlarında *ahpC* geni indüklenmektedir (60). Bu bilgiler göz önüne alındığında aşı olarak verilen BCG suşunun farelerde yeterli miktarda AhpC üretebileceği bir mikroçevre oluşmadığı söylenebilir.

Farelerde rLprG proteinine karşı oluşan antikorların özgüllüklerini tayin etmek amacıyla yapılan WB deneyinde A grubunda indüklenen antikorların rLprG'ye özgül olmadığı, B, D ve E gruplarına ait serumlardaki antikorların ise rLprG proteinine karşı özgül oldukları gözlenmiştir. BCG ile aşılama, rAhpC proteininin aksine, rLprG proteinine karşı açıkça görülebilen bir antikor üretimine yol açmıştır. Bu durumun sebebi rLprG proteininin bir membran proteini olması ve MTBK üyelerinde ifadelenmesidir. Söz konusu ifadelenme için rAhpC proteininde olduğu gibi özel koşullar gerekmemektedir (46). Bu nedenle BCG ile aşılanmanın, LprG'ye özgü antikor üretimini indüklediği sonucuna varılmıştır.

5.6.2. ELISA Testi Çalışmaları

rAhpC ile Aşılama Grubunda Total IgG Ölçümü ile Hümorale Yanıtın Tayini

rAhpC kaplı mikropklarda yapılan ELISA deneyleri ile fare serumlarındaki anti-rAhpC antikorlarının analizi ile elde edilen bulgular istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.21 ve Tablo 4.3). rAhpC'ye karşı oluşan total IgG yanıtları günlere göre değerlendirilmiştir.

Bağışıklama öncesinde (0. gün) farelerden alınan serumlarda rAhpC spesifik antikor bulunmaması beklenen bir durumdur.

15. gün verilerinin yorumlanması:

- A: PBS – Adjuvan grubunda rAhpC spesifik antikorların oluşmaması antijen içermediği için beklenen bir durumdur.
- BCG ile aşılama yapılan deney gruplarında (B: BCG prime – PBS boost; C: BCG Prime – Adjuvan Boost ve E: BCG Prime – rAhpC Boost) rAhpC spesifik antikor oluşmamıştır. Mikobakterilerde bulunan *ahpC* geni, makrofajlar içerisinde oluşan oksidatif ve nitrozatif strese indüklenerek, basilin makrofajlar içerisinde canlılığının devamını sağlamaktadır (60). rAhpC proteinine spesifik antikorların 15. günde tespit edilememesinin sebebi farelere verilen BCG suşlarının *ahpC* genini yeterli miktarda ifadeleyememesi ve AhpC proteininin bağışıklık sistemine uygun sunulmaması olarak açıklanabilir.

- D: rAhpC – Adjuvan deney gruplarında rAhpC spesifik antikörlerin oluşmamasının sebebi 100 µg'lık tek doz aşının yeterli miktarda IgG üretimini indükleyememesi olarak açıklanabilir.

30. gün verilerinin yorumlanması:

- A: PBS – Adjuvan grubunda rAhpC spesifik antikör oluşmaması beklenen bir durumdur.
- BCG ile aşılanan 'B: BCG prime – PBS boost, C: BCG Prime – Adjuvan Boost ve E: BCG Prime – rAhpC Boost gruplarında 15. günde tespit edilemeyen rAhpC spesifik antikörler 30. günde tespit edilebilmiştir. BCG suşunda *ahpC* geninin ifadenmesini sağlayan koşulların oluştuğu anlaşılmıştır.
- B: BCG prime – PBS boost ve Grup C: BCG Prime – Adjuvan Boost grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuş ve Grup C: BCG Prime – Adjuvan Boost grubunda daha fazla rAhpC spesifik antikör üretildiği görülmüştür. Bu fark booster olarak uygulanan ISA 61 VG adjuvanının hümorale bağışıklık yanıtını tetiklemesinden kaynaklanmıştır.
- D: rAhpC – Adjuvan grubunda 15. günde indüklenmeyen rAhpC spesifik antikörlerin 30. günde oluştuğu gözlenmiştir. Bu durumun ikinci doz olarak uygulanan 100 µg rAhpC proteini olduğu düşünülmektedir. rAhpC'nin zayıf antijenik karakterde bir alt birim rekombinant protein aşı olması nedeniyle ikinci 100 µg'lık doz uygulamasının hümorale bağışıklık yanıtı oluşumunu sağlayabileceği anlaşılmıştır.
- D: rAhpC – Adjuvan ve E: BCG Prime – rAhpC Boost grupları karşılaştırıldığında, rAhpC spesifik antikör üretiminin en fazla indüklendiği tespit edilen grubun E grubu olduğu saptanmıştır. E grubunda oluşan rAhpC spesifik antikörlerin hem BCG prime aşılardan hem de rAhpC ile yapılan booster aşılardan kaynaklandığı düşünülebilir. Bu doğrultuda, söz konusu farkın sebebini belirlemek amacıyla C: BCG Prime – Adjuvan Boost grubunun 30. gün verisi ile karşılaştırma yapılmış ve E grubunda oluşan antikörlerin rAhpC ile yapılan booster aşılardan kaynaklandığı sonucuna varılmıştır.

45. gün verilerinin yorumlanması:

- A: PBS – Adjuvan grubunda antikor oluşmaması beklenen bir durumdur.
- B: BCG prime – PBS boost ve C: BCG Prime – Adjuvan Boost aşılama gruplarının serumlarında, miktarı düşük olmakla birlikte rAhpC spesifik antikorlar bulunmaktadır.
- Benzer biçimde D: rAhpC – Adjuvan aşılmasıyla oluşan antikorların da hala serumda bulunduğu görülmektedir. Ancak E: BCG Prime – rAhpC Boost grubuna ait serum antikor değerleri ile karşılaştırıldığında, antikor miktarı düşüktür. Buna E: BCG Prime – rAhpC Boost grubunda booster aşı olarak uygulanan 2. doz rAhpC sebep olabilir.

60. gün verilerinin yorumlanması:

- A: PBS – Adjuvan ile aşılanmış fare grubu dışındaki tüm aşılama gruplarında 60. gün sonuna dek rAhpC spesifik antikorlar bulunmaktadır.
- B: BCG prime – PBS boost gurubu ile C: BCG Prime – Adjuvan Boost grubunun değerleri karşılaştırıldığında C: BCG Prime – Adjuvan Boost grubunun serum antikor değerlerinin yükselmesinde adjuvan ile yapılan booster aşılama etkisinin olduğu anlaşılmaktadır.
- D: rAhpC – Adjuvan aşılama grubunda üretilen rAhpC spesifik antikor seviyesi artmıştır.
- E: BCG Prime – rAhpC Boost grubunun serum antikor değerleri D: rAhpC – Adjuvan ile karşılaştırıldığında oldukça yüksek bulunmuştur.

60 günlük deney sürecinde takip edilen farelerde rAhpC proteinine karşı hümmoral yanıtın indüklenmesinde rAhpC proteininin kendi başına mı yoksa booster olarak mı daha etkili olduğunu araştırmak üzere D: rAhpC – Adjuvan ve E: BCG Prime – rAhpC Boost grupları karşılaştırıldığında, adjuvan ve rAhpC proteininden oluşan alt birim aşının kendi başına hümmoral bağışıklığı indüklemekte zayıf kaldığı, fakat 60. güne kadar kanda rAhpC spesifik antikor varlığını sürdürdüğü görülmüştür. Diğer yandan rAhpC-adjuvan formülasyonunun, BCG ile prime aşılamanın ardından booster aşı olarak uygulanmasıyla indüklenen hümmoral bağışıklık yanıtının çok daha güçlü olduğu

ve 60. gün sonuna dek yüksek seviyede kaldığı belirlenmiştir. Booster olarak uygulanan rAhpC aşılarının uygulamadan sonraki dördüncü haftaya (60. gün) kadar antikor düzeylerini en yüksek seviyede tuttukları görülmüştür. Bu bulgular O’Riordan ve ark. (175)’in çalışmalarında elde edilenlerle uyumlu bulunmuştur.

Aşı formülasyonlarında yer alan adjuvanların moleküler etki mekanizmalarının daha iyi anlaşılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır, fakat, yağ içinde su (y/s) tip emülsiyon bazlı adjuvanların lokal inflamasyonun indüklenmesi ve antijen sunan hücrelerin toplanarak etkinleştirilmesi yoluyla yardımcı etkiyi sağladığı düşünülmektedir (194). Emülsiyon yapıda yağ bazlı ISA 61 VG adjuvanının antikor cevaplarındaki artırıcı etkisi farklı çalışmalarda bildirilmiştir (195-197). Bu tezde adjuvanın etkisi B: BCG prime – PBS Boost ve C: BCG Prime – Adjuvan Boost gruplarının karşılaştırıldığı deneylerde gözlenmiştir. BCG ile prime aşılanmış farelerde uygulanan ilk ve ikinci doz ISA 61VG adjuvanları rAhpC spesifik IgG düzeylerini sırasıyla 30. ve 45. günlerde artırmıştır. Bağışıklamanın sonunda da (60. gün) C: BCG Prime – Adjuvan Boost, B: BCG prime – PBS boost grubundan yüksek bulunmuştur. Bu veriler doğrultusunda tez kapsamında geliştirilen rAhpC proteini ve yağ bazlı Montanide ISA 61 VG adjuvanı içeren altbirim aşının BCG ile indüklenen hümorale yanıtın devamlılığını önemli ölçüde artırabilen bir booster aşı adayı olma potansiyeli taşıdığı anlaşılmaktadır.

rLprG ile Aşılama Grubunda Total IgG Ölçümü ile Hümorale Yanıtın Tayini

rLprG kaplı mikroplaklarda yapılan ELISA deneyleri ile fare serumlarındaki anti-rLprG antikorlarının analizi ile elde edilen bulgular istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.22 ve Tablo 4.4). LprG’ye karşı oluşan total IgG yanıtları günlere göre değerlendirilmiştir.

- Beklendiği gibi aşılama öncesinde (0. gün) deney gruplarındaki farelerin serumlarında anti-rLprG antikor tespit edilmemiştir.

15. gün verilerinin yorumlanması;

- A: PBS – Adjuvan serumlarında rLprG spesifik antikor bulunmamıştır.
- B: BCG prime – PBS boost, C: BCG Prime – Adjuvan Boost, D: rLprG – Adjuvan ve E: BCG Prime – rLprG Boost gruplarının serumlarında rLprG spesifik antikorların olduğu görülmüştür.
- B: BCG prime – PBS boost, C: BCG Prime – Adjuvan Boost ve E: BCG Prime – rLprG Boost gruplarında BCG ile aşılınmış farelerde rLprG spesifik antikor üretiminin sebebi LprG'nin mikobakterilerde membran yapısına katılan bir protein olmasından kaynaklanmaktadır (153). LprG proteini temel yapısal bir protein olduğundan AhpC gibi özel stres koşulları altında değil, rutin koşullarda da ifadelenecek membran yapısına katılmaktadır. Bu nedenle aşı ile verilen BCG suşlarının membran yapısında LprG proteini mevcuttur. Bu protein, bağışıklık sistemi hücrelerine sunulurken LprG spesifik antikorların üretimini tetiklemiş olabilir.
- D: rLprG – Adjuvan grubunun serumundaki antikorların kaynağının aşı formülasyonunda bulunan rekombinant rLprG proteini olduğu açıktır. Bu doğrultuda 100 µg dozda verilen rLprG proteininin bağışıklık yanıtının oluşumu için yeterli olduğu düşünülmektedir.

30. gün verilerinin yorumlanması:

- A: PBS – Adjuvan grubunda rLprG spesifik antikorlar oluşmamıştır.
- B: BCG prime – PBS boost ve C: BCG Prime – Adjuvan Boost karşılaştırıldığında C grubundaki antikor miktarı az fakat istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek çıkmıştır. Bu durumun ISA 61 VG adjuvanı ile yapılan ilk booster uygulamadan kaynaklandığı söylenebilir.
- B: BCG prime – PBS boost grubunda oluşan antikor titreleri beklendiği gibi hem D: rLprG – Adjuvan hem de E: BCG Prime – rLprG Boost grupları ile oluşan antikor titrelerinden düşüktür. Bu durumun sebebi bahsedilen iki grupta rLprG antijeni ile yapılan aşılama değildir.

- D: rLprG – Adjuvan ve E: BCG Prime – rLprG Boost gruplarında indüklenen antikor titresi C: BCG Prime – Adjuvan Boost ile indüklenen rLprG spesifik antikor titrelerinden oldukça ($p<0,001$) yüksektir.
- D: rLprG – Adjuvan ve E: BCG Prime – rLprG Boost grupları karşılaştırıldığında, 2 doz rLprG ile indüklenen rLprG spesifik antikor seviyesinin BCG ve 1 doz booster rLprG aşısı ile indüklenen antikor seviyesinden yüksek olduğu görülmektedir.

45. gün verilerinin yorumlanması

- A: PBS – Adjuvan grubunda rLprG spesifik antikorların oluşmaması beklenen bir durumdur.
- B: BCG prime – PBS boost ile C: BCG Prime – Adjuvan Boost grupları karşılaştırıldığında C: BCG Prime – Adjuvan Boost grubundaki antikor miktarı, 30. günden çok daha yüksek ($p<0,01$) çıkmıştır. Bu durumun sebebi olarak ISA 61 VG adjuvanı ile yapılan ikinci booster aşılama gösterilebilir.
- B: BCG prime – PBS boost grubunda oluşan antikor titreleri beklendiği gibi D: rLprG – Adjuvan grubundan düşük çıkmıştır. Bunun nedeni 2. doz olarak uygulanan rLprG aşısının antikor yanıtının güçlü biçimde devam etmesidir.
- Benzer biçimde E: BCG Prime – rLprG Boost grubunda oluşan antikor titresi booster olarak kullanılan rLprG aşısının 2. dozunun verilmesi sebebiyle B: BCG prime – PBS boost grubunun oluşturduğu antikor titresinden yüksek çıkmıştır.
- D: rLprG – Adjuvan ve E: BCG Prime – rLprG Boost gruplarında indüklenen antikor düzeyi C: BCG Prime – Adjuvan Boost ile indüklenen antikor düzeyinden yüksektir ($p<0,05$ ve $p<0,001$). Bu durum rLprG proteininin antijenik karakterinden kaynaklanmaktadır.
- E: BCG Prime – rLprG Boost grubunda indüklenen rLprG spesifik antikor değerleri D: rLprG – Adjuvan grubundakilerden yüksektir.

60. gün verilerinin yorumlanması

- A: PBS – Adjuvan grubunda rLprG spesifik antikorların oluşmaması beklenen bir durumdur. Diğer tüm grupların serumlarında rLprG spesifik antikor tespit edilmiştir.
- E: BCG Prime – rLprG Boost grubunda oluşan antikor titresi booster olarak uygulanan rLprG aşısının devam eden etkisi sebebiyle 'Grup B: BCG prime – PBS boost' grubunda oluşan antikor titresinden yüksek çıkmıştır.
- D: rLprG – Adjuvan ve E: BCG Prime – rLprG Boost gruplarında saptanan antikor değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı olsa da sonuçlar birbirine oldukça yakın çıkmıştır. 60. gün sonunda farelerin serumlarında alt birim rLprG aşısının 2 doz uygulanması ile oluşan antikor düzeyleri, BCG aşısının ardından booster olarak uygulanan 2 doz rLprG aşısı ile oluşan düzeylerden hala yüksektir. Bu bulguya göre tek başına uygulanan rLprG aşısının, antikor üretimini indüklemesi bakımından booster olarak uygulanan rLprG aşısından daha etkin olduğu söylenebilir.

Deney gruplarındaki farelerin 60 günlük takibi sonrasında BCG ile aşılanmış tüm gruplarda rLprG spesifik IgG antikorları görülmüştür. Grupların antikor düzeylerinin ölçüldüğü deneylerin sonunda C: BCG Prime – Adjuvan Boost grubunun serum antikor seviyelerinin B: BCG prime – PBS boost grubunun seviyelerinden yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu farklılığın temel olarak aşılarda kullanılan yağ bazlı adjuvan ISA 61VG'den kaynaklandığı anlaşılmıştır. Kullanılan adjuvanın antikor üretimindeki artırıcı etkisini gösteren bu sonuçlar, literatürde bildirilen diğer çalışmalar ile tutarlı bulunmuştur (195, 196). Ek olarak BCG ile aşılanmış farelerin (Grup B, C ve D) serumlarında aşılamadan önce rLprG antijenine spesifik antikorların oluştuğu gözlenmiştir. Bu nedenle, BCG aşılamasının, rLprG'ye spesifik antikor üretimini tetiklediği söylenebilir. Bu bulgu daha önce Hovav ve ark. (153) tarafından sunulan verilerle tutarlı bulunmuştur. Diğer taraftan, rLprG'nin tek başına altbirim aşı olarak uygulandığı farelerin (Grup D) serum antikor seviyeleri, rLprG'nin BCG uygulamasının ardından booster olarak verilen farelerin (Grup E) serum antikor seviyelerinden yüksektir. Bu durumda, daha yüksek antikor cevabı elde

etmek için, rLprG alt birim aşısının BCG'nin ardından booster olarak uygulanmasından ziyade, tek başına alt birim aşı olarak uygulanması daha uygun görünmektedir.

5.7. *in vivo* Çalışmalar ile Hücresel Bağışıklık Yanıtının Tayini

M. tuberculosis gibi hücre içi patojenlere karşı bağışıklık oluşturmak için hücre-aracılı yanıtlar önemlidir (198). İnterferon- γ (IFN- γ), tümör nekroze edici faktör- α (TNF- α) ve interlökin-12 (IL-12) gibi sitokinler TB hastalığına karşı geliştirilen koruyucu hücresel bağışıklıkta büyük önem taşır (199). Bu nedenle *in vivo* aşılama çalışmalarında farelerde oluşan hücresel bağışıklık yanıtının değerlendirilmesi için IL-12 ELISA testi yapılmıştır.

5.7.1. rAhpC ile Aşılama Gruplarında Hücresel Yanıtın IL-12 Miktarı ile Tayini

Hümmoral immün yanıt günlere göre değerlendirilmiştir (Şekil 4.23 ve Tablo 4.5). Bağışıklama öncesi (0. gün) yapılan ölçümler ile hesaplanan IL-12 miktarı, farelerin serumlarında bazal olarak bulunan IL-12'den kaynaklanmaktadır ve beklenen bir durumdur.

15. gün verilerinin yorumlanması:

- Adjuvan, BCG ve rAhpC ile yapılan aşılamalardan sonra tüm deney gruplarında IL-12 miktarı artmıştır.
- Beklendiği gibi BCG ile aşılama yapılan B: BCG prime – PBS boost, C: BCG Prime – Adjuvan Boost, E: BCG Prime – rAhpC Boost gruplarının serum IL-12 miktarlarındaki arasındaki artışın farkları istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.
- D: rAhpC – Adjuvan grubundaki farelerin serum IL-12 miktarları diğer tüm deney gruplarından yüksek bulunmuştur.

30. gün verilerinin yorumlanması:

- Tüm deney gruplarının serum IL-12 miktarları 15. Güne göre artmıştır.
- B: BCG prime – PBS boost ve C: BCG Prime – Adjuvan grupları karşılaştırıldığında C grubunda indüklenen IL-12 miktarı daha yüksek bulunmuştur. Bunun hücresel bağışıklık yanıtını iyi uyaran bir adjuvan olan ISA 61 VG ile yapılan booster aşılama ile sağlandığı anlaşılmıştır.
- D: rAhpC – Adjuvan grubunun IL-12 miktarı ikinci doz aşı uygulaması ile düşmüştür, ancak bu değer, B: BCG prime – PBS boost ile karşılaştırıldığında daha yüksek bulunmuştur. İkinci doz rAhpC uygulaması sonrası IL-12 miktarındaki azalmanın antijenden mi yoksa adjuvandan mı kaynaklandığını anlamak için A: PBS – Adjuvan ve D: rAhpC – Adjuvan gruplarının değerleri karşılaştırılmış ve IL-12 düşüşünün rAhpC antijeninden kaynaklandığı anlaşılmıştır.
- E: BCG Prime – rAhpC Boost grubuna ait veriler B: BCG prime – PBS boost ve C: BCG Prime – Adjuvan Boost gruplarının değerleri karşılaştırılmış ve rAhpC antijeninin booster olarak uygulanması durumunda IL-12 seviyelerini belirgin biçimde artırdığı gözlenmiştir.
- D: rAhpC – Adjuvan ve E: BCG Prime – rAhpC Boost karşılaştırıldığı zaman, BCG prime aşılansmış farelere booster uygulanan tek doz rAhpC aşısının, 2 doz uygulanan rAhpC aşısına (Grup D) göre IL-12'yi daha fazla indüklediği görülmüştür.

45. gün verilerinin yorumlanması:

- A: PBS – Adjuvan grubunun serum IL-12 miktarında azalma olmuştur.
- B: BCG prime – PBS boost ve C: BCG Prime – Adjuvan Boost gruplarının serum IL-12 miktarlarında azalma olmuştur.
- D: rAhpC – Adjuvan grubundaki IL-12 miktarları düşerken, E: BCG Prime – rAhpC Boost grubunda booster olarak uygulanan 2. doz rAhpC ile serum IL-12 miktarı artmıştır.

60. gün verilerinin yorumlanması:

- Tüm deney gruplarının serum IL-12 miktarı düşmüştür.
- E: BCG Prime – rAhpC Boost grubunun serum IL-12 miktarı en yüksek olarak belirlenmiştir.

Hümmoral veya hüccresel bağışıklık yanıtları aşu formülasyonlarında kullanılan adjuvanların türüne bağlı olarak indüklenebileceğinden, uygun adjuvanın seçimi alt birim aşu formülasyonlarında kritik bir basamaktır. Montanide ISA 61 VG adjuvanı antikor yanıtlarını uyarmasının yanı sıra hüccresel bağışıklık yanıtları üzerinde de indükleyici bir etkiye sahiptir (200-202). Bu tez kapsamında, hüccresel immün yanıtların değerlendirilmesi için deney ve kontrol grupların serumlarındaki IL-12 seviyeleri ölçülmüştür. Farelerde hümmoral bağışıklık yanıtları 60. güne kadar artmış, ancak serum IL-12 seviyeleri için sabit bir artış gözlenmemiştir. İkinci booster rAhpC aşu uygulanmasından sonra D grubunda 30. günde, E grubu haricindeki grupların 45. gününde ve tüm grupların da 60. gününde serum IL-12 miktarlarında düşüş gözlenmiştir. Begg ve ark. (149) tarafından önerildiği biçimde, immüno-regülatör sitokinlerin salımı veya regülatör ve efektör T hücre alt kümeleri arasındaki dengesizlik ile indüklenen negatif bir geri-bildirim döngüsü (feedback loop) bu duruma yol açmış olabilir. Yine de ISA 61 VG adjuvanının hüccresel bağışıklık yanıtlarını arttırmadaki etkinliği A grubunun serum IL-12 miktarlarındaki artış ile açıklanabilir. Diğer yandan, B ve C gruplarının karşılaştırılması ile 30., 45. ve 60. günlerde daha yüksek olan C grubu serum IL-12 miktarı adjuvandan kaynaklanabilir. Yang ve ark. (203), BCG ile prime aşılanmış farelerde alt birim protein aşu ile yapılan booster bağışıklama stratejisinin, farelerde hüccresel bağışıklığı artırdığını göstermiştir. Bu tez kapsamında elde edilen sonuçlar da bu veriyle benzer bir sonucu işaret etmektedir. Böylelikle, BCG ile prime aşılanmanın ardından alt birim protein aşıların booster olarak uygulanmasının ümit vadeden bir yaklaşım olduğu söylenebilir.

Yapılan deneyler sonunda, rAhpC ve Montanide ISA 61 VG formülasyonunun hüccresel bağışıklığı BCG aşısına göre daha fazla uyardığı görülmüştür. Ancak bu uyarının uzun süreli olmadığı anlaşılmıştır. Diğer yandan BCG ile prime aşılanmış farelerde booster olarak uygulanan rAhpC ve Montanide ISA 61 VG formülasyonunun

serum IL-12 miktarını benzer derecelerde artırdığı, buna ek olarak bu uyarımın daha uzun süreli olduğu belirlenmiştir.

60 gün boyunca toplanan serumlar ile yapılan hümmoral ve hüccresel bağışıklık deneylerinde, rAhpC ve Montanide ISA 61 VG'den oluşan alt birim rekombinant protein aşısı formülasyonunun tek başına uygulanmasından ziyade, BCG ile yapılan prime aşılamanın ardından booster aşi şeklinde kullanılmasının hem hümmoral hem de hüccresel bağışıklık açasından daha uygun olacağı görülmüştür.

5.7.2. rLprG ile Aşılama Gruplarında Hüccresel Yanıtın IL-12 Miktarı ile Tayini

Hümmoral immün yanıt günlere göre değerlendirilmiştir (şekil 4.24 ve Tablo 4.6). Aşılama öncesi (0. gün) yapılan ölçümler ile hesaplanan IL-12 miktarı, farelerin serumlarında bazal olarak bulunan IL-12'den kaynaklanmakta olup beklenen bir durumdur.

15. gün verilerinin yorumlanması:

- Yapılan aşılamalarla tüm aşılama gruplarında serum IL-12 miktarları yükselmiştir.
- BCG aşısı ile aşılanan B: BCG prime – PBS boost, C: BCG Prime – Adjuvan Boost ve E: BCG Prime – rLprG Boost serum IL-12 miktarlar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.
- D: rLprG – Adjuvan ve A: PBS – Adjuvan grubu karşılaştırıldığında rLprG antijeninin 100 µg'lık tek doz uygulama ile hüccresel bağışıklığı uyarabildiği görülmüştür. Ayrıca D grubu ve BCG ile aşılama yapılan gruplar karşılaştırıldığında 'rLprG – Adjuvan' aşısının hüccresel bağışıklığı uyarabildiği görülmüştür.

30. gün verilerinin yorumlanması:

- Tüm aşılama gruplarının IL-12 miktarlarında 15. güne göre artış olmuştur.

- BCG aşısı ile aşılanan B: BCG prime – PBS boost ve C: BCG Prime – Adjuvan Boost grupları karşılaştırıldığında, ISA 61 VG adjuvanı ile yapılan booster uygulamanın hücresel bağışıklığı arttırdığı görülmüştür.
- D: rLprG – Adjuvan ve B: BCG prime – PBS boost grupları karşılaştırıldığında ikinci doz olarak uygulanan 100 µg rLprG ile hücresel bağışıklık yanıtının arttığı görülmüştür.
- C: BCG Prime – Adjuvan Boost ve D: rLprG – Adjuvan gruplarının ikisinde de serum IL-12 miktarları artmıştır, fakat artışlar arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır.
- D: rLprG – Adjuvan ve E: BCG Prime – rLprG Boost grupları karşılaştırıldığında BCG ile prime aşılanmanın ardından booster olarak uygulanan 100 µg rLprG ile hücresel yanıtın en yüksek olduğu görülmüştür.

45. gün verilerinin yorumlanması:

- A: PBS – Adjuvan, B: BCG prime – PBS boost ve C: BCG Prime – Adjuvan Boost gruplarının IL-12 miktarları artmamıştır.
- C: BCG Prime – Adjuvan Boost grubunda booster olarak ikinci doz adjuvan uygulamasının ardından IL-12 miktarları artmamıştır.
- B: BCG prime – PBS boost ve C: BCG Prime – Adjuvan Boost grupları karşılaştırıldığında booster olarak uygulanan ISA 61 VG adjuvanının BCG ile indüklenen IL-12 miktarlarını sürdürdüğü anlaşılmıştır.
- D: rLprG – Adjuvan ve E: BCG Prime – rLprG Boost gruplarının IL-12 miktarlarında artış saptanmıştır. Serumlarda E: BCG Prime – rLprG Boost grubunda IL-12 miktarı booster olarak uygulanan ikinci doz 100 µg rLprG aşısı, tek başına 2X100 µg uygulanan rLprG aşısından daha yüksek bulunmuştur.

60. gün verilerinin yorumlanması:

- Genel olarak tüm gruplarda serum IL-12 miktarlarında azalma gözlenirken, E: BCG Prime – rLprG Boost grubunda ikinci doz booster olarak uygulanan rLprG aşısı ile serum IL-12 miktarlarının devamlılığı sağlanmıştır.

Hücresel bağışıklığın, *Mycobacteria sp.*, *Leishmania sp.* vb. gibi hücre içi patojenlere karşı daha koruyucu olduğu bildirilmiştir (198). Interferon- γ (IFN- γ), interlökin 12 (IL-12) ve tümör nekroze edici faktör- α (TNF- α) gibi sitokinler hücresel bağışıklıkta rol oynayan başlıca biyomoleküllerdir (199). Tez çalışmasında geliştirilen aşılarda kullanılan emülsiyon yapıda yağ bazlı Montanide ISA 61 VG adjuvanının hem hücresel hem de hümmoral bağışıklığı artırıcı etkilerinin olduğu literatürde bildirilmiştir (200). rLprG aşısı ile yapılan çalışmalarda ISA 61VG adjuvanının bu etkisi B: BCG prime – PBS boost ve D: rLprG – Adjuvan gruplarının karşılaştırılması ile görülebilmektedir. Özellikle 45. gün verileri karşılaştırıldığında ISA 61VG adjuvanının ikinci dozu ile serum IL-12 miktarlarının belirgin biçimde arttığı görülmektedir. D: rLprG – Adjuvan grubunun sonuçlarının BCG ile aşılınmış (B, C ve E grupları) farelerinkilerle karşılaştırılması ile rLprG antijeninin tek başına alt birim aşı olarak uygulanmasının hücresel bağışıklığı daha uzun süre sağladığı anlaşılmaktadır. Buna karşılık, BCG ile prime aşılınmış farelerde rLprG aşısının booster olarak uygulanması ile serum IL-12 miktarı en yüksek değere ulaşmıştır.

Hem hücresel hem de hümmoral bağışıklık yanıtının sonuçları göz önüne alındığında rLprG proteini içeren formülasyonun umut vadeden bir alt birim aşı olduğu söylenebilir. Ayrıca, rLprG aşısının BCG ile yapılacak prime bağışıklamanın ardından booster aşı olarak uygulanabileceği de öngörülebilir. Fakat, literatürde Hovav ve ark (153) tarafından yapılan ve rLprG'nin hem rekombinant protein altbirim aşı hem de DNA aşı olarak değerlendirildiği bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada da, rLprG aşısının, hücre içi mikobakteriye karşı koruma sağlamaya yetecek kadar yüksek düzeylerde IgG ürettirdiği ve Th1 hücrelerini uyardığı gösterilmiştir. Fakat bununla birlikte, *M. tuberculosis* H37Rv veya *M. bovis* BCG suşları ile yapılan patojene maruziyet (challenge) çalışmalarında, aşılınmış farelerin dalaklarında kontrol gruplarına kıyasla oldukça fazla bakteri olduğu da bulunmuştur. Bunun yanında, BCG aşısı ile başlayan bağışıklık yanıtının rLprG uygulandıktan sonra ortadan kalktığı görülmüştür (153). Hovav ve ark (204) bu duruma bir açıklama yapmışlar ve LprG proteininin yapısındaki açılasyonun naif splenositlerin çoğalması için gerekli olduğu ve bu açılasyon aracılığıyla LprG'nin bir mitojen olarak davrandığını ileri sürmüşlerdir.

Mitojenlerin bağışıklık yanıtlarını ortadan kaldırması literatürde gösterilmiş olmasına rağmen (205), Hovav ve ark. (204)'ın araştırmalarında LprG'nin bu etkisinin mitojenik karakterden değil, polipeptit yapısından kaynaklandığı bildirilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Dünya üzerinde yaklaşık 10 milyondan fazla insanın aktif ve 2 milyar insanın da latent TB hastası olduğu tahmin edilmekte ve DSÖ'nün '2030 yılına kadar TB hastalığının dünyadan eradike edilmesi' hedefi doğrultusunda yeni veya yenilikçi ilaç tedavilerinin, tanı araçlarının ve korunma yöntemlerinin geliştirilmesi yönünde çalışmalar yapılmaktadır. Bu bağlamda yeni TB aşı adaylarının geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır.

Bugün TB profilaksisi için erken çocukluk döneminde uygulanan tek onaylı aşı Fransız bilim insanları Albert Calmette ve Camille Guérin tarafından laboratuvarda üretilerek izole edilen ve *M.bovis* var Bacillus Calmette–Guérin (BCG) olarak bilinen mutant *M.bovis* suşundan elde edilen aşıdır. Ancak bu aşı TB epidemisini önlemekte yetersiz kalmakta ve TB bugün hala çözüm gerektiren önemli bir halk sağlığı problemi olmaya devam etmektedir.

Bu tez çalışmasında tüberkülozu önlemek amacıyla yeni aşılarından rekombinant protein antijen içeren altbirim aşı geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda Mycobacterium tuberculosis kompleksi (MTBK) virulansında etkili olduğu bilinen alkil hidroksipeorsit redüktaz C (AhpC) ve lipoarabinomannan taşıyıcı protein G (LprG) antijenleri *M.bovis* suşunun genomundan çoğaltılmış, rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak *E.coli*'de üretilmiştir.

His-Tag ekleri ile üretilmek üzere klonlanan proteinler üretim ortamından ayrılmış ve afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır.

Saflaştırılan rAhpC ve rprG proteinleri immün sistem üzerindeki etkisi bilinen emülsiyon yapıda yağ bazlı bir adjuvanla formüle edilmiştir.

Geliştirilen aşı formülasyonları antijen içermeyen kontrol grupları ile karşılaştırmalı olacak şekilde farelere uygulanarak hümmoral ve hüccresel immün yanıtlar araştırılmış ve her ikisinin de uyarıldığı gösterilmiştir.

in vivo çalışmalarda aşılardan hem tek başlarına, hem de BCG ile prime aşılardan farelerde booster aşı olarak etkinlikleri değerlendirilmiştir.

Aşılardan oluşturduğu hümmoral bağışıklık serum IgG seviyeleri ile değerlendirilmiştir. 60 günlük deney süresince takip edilen farelerde, rAhpC içeren alt

birim rekombinant protein BCG ile prime aşılamanın ardından booster aşı olarak uygulandığı zaman, tek başına uygulandığı duruma göre çok daha güçlü bir hümmoral bağışıklık yanıtı indüklemiştir.

rAhpC aşısının hümmesel bağışıklık üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi serum IL-12 tayini ile yapılmıştır ve aşının hümmesel bağışıklığı BCG aşısına göre daha fazla ve daha kısa süreli uyardığı görülmüştür. Ancak BCG ile prime aşılanmış farelerde booster olarak uygulanan rAhpC aşısının hümmesel bağışıklığı daha uzun süreli uyardığı belirlenmiştir.

60 gün boyunca toplanan serumlar ile yapılan hümmoral ve hümmesel bağışıklık çalışmalarında, rAhpC aşısının BCG ile yapılan prime aşılamanın ardından booster aşı şeklinde kullanılması hem hümmoral hem de hümmesel bağışıklık açısından daha etkili bulunmuştur.

Tezde geliştirilen diğer aşı adayı rLprG proteini ile hazırlanan aşı formülasyonunun ise tek başına kullanıldığında, BCG uygulamasının ardından booster olarak uygulanmasına göre daha yüksek antikor seviyeleri oluşturduğu gözlenmiştir.

rLprG aşısının hümmesel bağışıklık üzerinde oluşturduğu etkilerinin değerlendirilmesi ELISA testi ile ölçülen serum IL-12 düzeyleri üzerinden yapılmıştır.

rLprG proteininin tek başına alt birim aşı olarak uygulanması ile uzun süreli hümmesel bağışıklık görülmüştür.

BCG ile prime aşılanmış farelerde rLprG aşısının booster olarak uygulanması ile en yüksek değerde serum IL-12 düzeyi ölçülmüştür.

Hem hümmesel hem de hümmoral bağışıklık yanıtlarıyla ilgili sonuçlar göz önüne alındığında rLprG proteini içeren formülasyonun umut vadeden bir alt birim aşı olduğu söylenebilir.

Tüm veriler göz önüne alındığında, rAhpC aşısının BCG ile prime aşılanmış farelerde iyi bir booster aşı adayı olabileceği, rLprG aşısının ise BCG aşısının ardından booster olarak uygulanmasından ziyade, tek başına alt birim aşı olarak uygun bir aday olabileceği öngörülmektedir.

rAhpC ve rLprG aşılarının oluşturduğu bağışıklık yanıtlarına ek olarak, aşıların patojenik mikobakteri suşlarına karşı koruyuculuğunu göstermek üzere bakteriyel maruziyet çalışmalarının yapılması önerilmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Barberis I, Bragazzi NL, Galluzzo L, Martini M. The history of tuberculosis: From the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. *J Prev Med Hyg.* 2017;58(1):E9-E12.
2. TC. Sağlık Bakanlığı (Tüberküloz Tanı ve Tedavi Rehberi) 2019 [internet]. 2019 [Erişim Tarihi 25 Mayıs 2021]. Erişim adresi: https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/tuberkuloz_db/dosya/rehbeler/Tuberkuloz_Tani_ve_Tedavi_Rehberi.pdf
3. Herzog H. History of Tuberculosis. *Respiration.*1998;65(1):5-15.
4. Daniel TM. The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine.* 2006;100(11):1862-1870.
5. Seber E. Tüberkülozun dünü. *ANKEM Derg.* 2010;24(Ek 2):52-60.
6. Palomino JC, Leão SC, Ritacco V. Tuberculosis 2007 From basic science to patient care. E-Book:TuberculosisTextbook.com; 2007.
7. European Centre for Disease Prevention and Control. Technical Report: Handbook on tuberculosis laboratory diagnostic methods in the European Union, Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control; 2018. 119.
8. Böddinghaus B, Rogall T, Flohr T, Blöcker H, Böttger EC. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *J Clin Microbiol.* 1990;28(8):1751-1759.
9. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS, ve ark. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci.* 1997;94(18):9869-9874.
10. Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, ve ark. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci.* 2002;99(6):3684-3689.
11. Niemann S, Richter E, Rüsç-Gerdes S. Differentiation among Members of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex by Molecular and Biochemical Features: Evidence for Two Pyrazinamide-Susceptible Subtypes of *M. bovis*. *J Clin Microbiol.* 2000;38(1):152-157.
12. Cousins DV, Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrone S, Dow S, ve ark. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003;53(5):1305-1314.
13. Falkinham JO^{3rd}. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev.* 1996.9(2):177-215.

14. Wolinsky E. Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. *Am Rev Respir Dis.* 1979;119(1):107-59.
15. Al-Houqani M, Jamieson F, Mehta M, Chedore P, May K, Marras TK. Aging, COPD, and other risk factors do not explain the increased prevalence of pulmonary *Mycobacterium avium* complex in Ontario. *Chest.* 2012;141(1):190-197.
16. Aitken ML, Limaye A, Pottinger P, Whimbey E, Goss CH, Tonelli MR, ve ark. Respiratory outbreak of *Mycobacterium abscessus* subspecies massiliense in a lung transplant and cystic fibrosis center. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;185(2):231-232.
17. Köksal F, Yaman A. Farklı Bir Bakteri Topluluğu Mikobakterilerde Hücre Duvar Yapısı. 21. Yüz yılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu; 11-14 Haziran 2003; Samsun. s. 35-42.
18. Abdallah AM, van Pittus NCG, Champion PAD, Cox J, Luirink J, Vandenbroucke-Grauls CMJE, ve ark. Type VII secretion—mycobacteria show the way. *Nat Rev Microbiol.* 2007;5(11):883-891.
19. Brennan PJ. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis.* 2003;83(1):91-97.
20. Gordon SV, Parish T. Microbe Profile: *Mycobacterium tuberculosis*: Humanity's deadly microbial foe. *Microbiology.* 2018;164(4):437-439.
21. Uzun M. Örneklerin işlenmesi ve kültür yöntemleri. 21. Yüz yılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu; 11-14 Haziran 2003; Samsun. s. 285-290.
22. World Health Organization. Global tuberculosis report 2019. Geneva: World Health Organization; 2019. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
23. Olea-Popelka F, Muwonge A, Perera A, Dean AS, Mumford E, Erlacher-Vindel E, ve ark. Zoonotic tuberculosis in human beings caused by *Mycobacterium bovis*—a call for action. *Lancet Infect Dis.* 2017; 17(1):e21-e25.
24. Thoen C, LoBue P, De Kantor I. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. *Vet Microbiol.* 2006;112(2-4):339-345.
25. Driscoll JR. Spoligotyping for molecular epidemiology of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Methods Mol Biol.* 2009;551:117-28.
26. Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, Medina N, Mansoor H, Pryor M, ve ark. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100(13):7877-7882.
27. Brites D, Loiseau C, Menardo F, Borrell S, Boniotti MB, Warren R, ve ark. A New Phylogenetic Framework for the Animal-Adapted *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *Front Microbiol.* 2018;9(2820).

28. Rodriguez-Campos S, Smith NH, Boniotti MB, Aranaz A. Overview and phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: Implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis. *Res Vet Sci.* 2014;97:S5-S19.
29. Michel AL, Müller B, van Helden PD. *Mycobacterium bovis* at the animal–human interface: A problem, or not? *Vet Microbiol.* 2010;140(3):371-381.
30. Grange J. *Mycobacterium bovis* infection in human beings. *Tuberculosis.* 2001;81(1-2):71-77.
31. Sunder S, Lanotte P, Godreuil S, Martin C, Boschirolu ML, Besnier JM. Human-to-human transmission of tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in immunocompetent patients. *J Clin Microbiol.* 2009;47(4):1249-1251.
32. Evans JR, Smith EG, Banerjee A, Smith RMM, Dale J, Innes JA, ve ark. Cluster of human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*: evidence for person-to-person transmission in the UK. *Lancet.* 2007;369(9569):1270-1276.
33. Rodwell TC, Moore M, Moser KS, Brodine SK, Strathdee SA. Tuberculosis from *Mycobacterium bovis* in binational communities, United States. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(6):909-916.
34. Gallivan M, Shah N, Flood J. Epidemiology of human *Mycobacterium bovis* disease, California, USA, 2003-2011. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(3):435-43.
35. WHO, FAO, OIE. World Health Organization. Zoonotic Tuberculosis [İnternet]. 2017 [Erişim tarihi 25 Mayıs 2021]. Erişim adresi: <https://www.who.int/tb/areas-of-work/zoonotic-tb/ZoonoticTBfactsheet2017.pdf>
36. Kock R, Michel AL, Yeboah-Manu D, Azhar EI, Torrelles JB, Cadmus SI, Brunton L, Chakaya JM, Marais B, Mboera L, Rahim Z, Haider N, Zumla A. Zoonotic Tuberculosis - The Changing Landscape. *Int J Infect Dis.* 2021;10:S1201-9712(21)00177-6.
37. Ecevit İZ. Çocuklarda Tüberküloz Tanı Yöntemleri. Aslan AT, Kiper N, editörler. Çocuk Göğüs Hastalıklarında Tanı Yöntemleri. İstanbul: Probiz Ltd. Şti.; 2016.
38. Alp A. Tüberkülozun laboratuvar tanısında güncel durum. *Hacettepe Tıp Dergisi.* 2011;42:28-33.
39. Diel R, Loddenkemper R, Meywald-Walter K, Niemann S, Nienhaus A. Predictive value of a whole blood IFN- γ assay for the development of active tuberculosis disease after recent infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177(10):1164-1170.
40. Özkara Ş. , Tüberkülozda koruyucu tedavi. *Turkiye Klinikleri J Pulm Med-Special Topics.* 2015;8(3):71-79.
41. Fox W, Mitchison D. Short-course chemotherapy for pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis.* 1975;111(3):325-353.

42. Echeverria-Valencia G, Flores-Villalva S, Espitia CI. Virulence factors and pathogenicity of *Mycobacterium*. Ribon W, editör. *Mycobacterium-Research and Development*. Croatia: InTech;2018.
43. Coscolla M, Gagneux S. Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Semin Immunol*. 2014;26(6):431-44.
44. Kovacs-Simon A, Titball R, Michell SL. Lipoproteins of bacterial pathogens. *Infect Immun*. 2011;79(2):548-561.
45. Young D, Garbe T. Lipoprotein antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Res Microbiol*. 1991;142(1):55-65.
46. Bigi F, Espitia C, Alito A, Zumarraga M, Romano MI, Cravero S, ve ark. A novel 27 kDa lipoprotein antigen from *Mycobacterium bovis*. *Microbiology*. 1997;143(11):3599-3605.
47. Martinot AJ, Farrow M, Bai L, Layre E, Cheng TY, Tsai JH, ve ark. Mycobacterial metabolic syndrome: LprG and Rv1410 regulate triacylglyceride levels, growth rate and virulence in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog*. 2016;12(1):e1005351.
48. Drage MG, Tsai HC, Pecora ND, Cheng TY, Arida AR, Shukla S, ve ark. *Mycobacterium tuberculosis* lipoprotein LprG (Rv1411c) binds triacylated glycolipid agonists of Toll-like receptor 2. *Nat Struc Mol Biol*. 2010;17(9):1088.
49. Drage MG, Pecora ND, Hise AG, Febbraio M, Silverstein RL, Golenbock DT, ve ark. TLR2 and its co-receptors determine responses of macrophages and dendritic cells to lipoproteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Immunol*. 2009;258(1):29-37.
50. Shukla S, Richardson ET, Athman JJ, Shi L, Wearsch PA, McDonald D, ve ark. *Mycobacterium tuberculosis* Lipoprotein LprG Binds Lipoarabinomannan and Determines Its Cell Envelope Localization to Control Phagolysosomal Fusion. *PLoS Pathog*. 2014;10(10):e1004471.
51. Gehring AJ, Dobos KM, Belisle JT, Harding CV, Boom WH. *Mycobacterium tuberculosis* LprG (Rv1411c): a novel TLR-2 ligand that inhibits human macrophage class II MHC antigen processing. *J Immunol*. 2004;173(4):2660-2668.
52. Carroll MV, Sim RB, Bigi F, Jäkel A, Antrobus R, Mitchell RA. Identification of four novel DC-SIGN ligands on *Mycobacterium bovis* BCG. *Protein Cell*. 2010;1(9):859-870.
53. Gaur RL, Ren K, Blumenthal A, Bhamidi S, González-Nilo FD, Jackson M, ve ark. LprG-Mediated Surface Expression of Lipoarabinomannan Is Essential for Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog*. 2014;10(9):e1004376.
54. Vázquez CL, Bianco MV, Blanco FC, Forrellad MA, Gutierrez MG, Bigi F. *Mycobacterium bovis* requires P27 (LprG) to arrest phagosome maturation and replicate within bovine macrophages. *Infect Immun*. 2017;85(3):e00720-16.

55. Hovav AH, Mullerad J, Maly A, Davidovitch L, Fishman Y, Bercovier H. Aggravated infection in mice co-administered with *Mycobacterium tuberculosis* and the 27-kDa lipoprotein. *Microbes Infect.* 2006;8(7):1750-1757.
56. Trivedi A, Singh N, Bhat SA, Gupta P, Kumar A. Redox biology of tuberculosis pathogenesis. *Adv Microb Physiol.* 2012;60:263-324.
57. Silva MSN, Senna SG, Ribeiro MO, Valim ARM, Telles MA, Kritski A, et al. Mutations in katG, inhA, and ahpC genes of Brazilian isoniazid-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2003;41(9):4471-4474.
58. Chauhan R, Mande SC. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv alkyl hydroperoxidase AhpC points to the importance of ionic interactions in oligomerization and activity. *Biochem J.* 2001;354(1):209-215.
59. Hillas PJ, del Alba FS, Oyarzabal J, Wilks A, De Montellano PRO. The AhpC and AhpD antioxidant defense system of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem.* 2000;275(25):18801-18809.
60. Master SS, Springer B, Sander P, Boettger EC, Deretic V, Timmins GS. Oxidative stress response genes in *Mycobacterium tuberculosis*: role of ahpC in resistance to peroxynitrite and stage-specific survival in macrophages. *Microbiology.* 2002;148(10):3139-3144.
61. Wilson TM, Collins DM. ahpC, a gene involved in isoniazid resistance of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Mol Microbiol.* 1996;19(5):1025-1034.
62. Wilson T, de Lisle GW, Marcinkeviciene JA, Blanchardand JS, Collins DM. Antisense RNA to ahpC, an oxidative stress defence gene involved in isoniazid resistance, indicates that AhpC of *Mycobacterium bovis* has virulence properties. *Microbiology.* 1998;144(10):2687-2695.
63. Chauhan R, Mande SC. Site-directed mutagenesis reveals a novel catalytic mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* alkylhydroperoxidase C. *Biochem J.* 2002;367(Pt 1):255-61.
64. Bryk R, Lima CD, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Nathan C. Metabolic enzymes of mycobacteria linked to antioxidant defense by a thioredoxin-like protein. *Science.* 2002;295(5557):1073-7.
65. Forrellad MA, Klepp LI, Gioffré A, García JS, Morbidoni HR, de la Paz Santangelo M, et al. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence.* 2013;4(1):3-66.
66. Wong D, Bach H, Sun J, Hmama Z, Av-Gay Y. *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar-H⁺-ATPase to inhibit phagosome acidification. *Proc Natl Acad Sci.* 2011;108(48):19371-19376.
67. Puri RV, Reddy PV, Tyagi AK. Secreted acid phosphatase (SapM) of *Mycobacterium tuberculosis* is indispensable for arresting phagosomal

- maturation and growth of the pathogen in guinea pig tissues. *PloS One*. 2013;8(7):e70514.
68. Sun J, Wang X, Lau A, Liao TYA, Bucci C, Hmama Z. Mycobacterial nucleoside diphosphate kinase blocks phagosome maturation in murine RAW 264.7 macrophages. *PloS One*. 2010;5(1):e8769.
 69. Scherr N, Müller P, Perisa D, Combaluzier B, Jenö P, Pieters J. Survival of pathogenic mycobacteria in macrophages is mediated through autophosphorylation of protein kinase G. *J Bacteriol*. 2009;191(14):4546-4554.
 70. Iantomasi R, Sali M, Cascioferro A, Palucci I, Zumbo A, Soldini S, ve ark. PE_PGRS30 is required for the full virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Microbiol*. 2012;14(3):356-367.
 71. Kumar A, Toledo JC, Patel RP, Lancaster JR, Steyn AJC. *Mycobacterium tuberculosis* DosS is a redox sensor and DosT is a hypoxia sensor. *Proc Nat Acad Sci*. 2007;104(28):11568-11573.
 72. Bhat SA, Singh N, Trivedi A, Kansal P, Gupta P, Kumar A. The mechanism of redox sensing in *Mycobacterium tuberculosis*. *Free Radic Biol Med*. 2012;53(8):1625-1641.
 73. Ng VH, Cox JS, Sousa AO, MacMicking JD, McKinney JD. Role of KatG catalase-peroxidase in mycobacterial pathogenesis: countering the phagocyte oxidative burst. *Mol Microbiol*. 2004;52(5):1291-1302.
 74. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Review Biochem*. 1995;64(1):97-112.
 75. Cirillo SLG, Subbian S, Chen B, Weisbrod TR, Jacobs WR, Cirillo JD. Protection of *Mycobacterium tuberculosis* from reactive oxygen species conferred by the mel2 locus impacts persistence and dissemination. *Infect Immun*. 2009;77(6):2557-2567.
 76. Voskuil MI, Schnappinger D, Visconti KC, Harrell MI, Dolganov GM, Sherman DR, ve ark. Inhibition of respiration by nitric oxide induces a *Mycobacterium tuberculosis* dormancy program. *J Exp Med*. 2003;198(5):705-713.
 77. Rengarajan J, Murphy E, Park A, Krone CL, Hett EC, Bloom BR, ve ark. *Mycobacterium tuberculosis* Rv2224c modulates innate immune responses. *Proc Nat Acad Sci*. 2008;105(1):264-269.
 78. Schaible UE, Winau F, Sieling PA, Fischer K, Collins HL, Hagens K, ve ark. Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. *Nat Med*. 2003;9(8):1039-1046.
 79. Behar SM, Martin CJ, Nunes-Alves C, Divangahi M, Remold HG. Lipids, apoptosis, and cross-presentation: Links in the chain of host defense against *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect*. 2011;13(8-9):749-756.

80. Danelishvili L, McGarvey J, Li YJ, Bermudez LE. *Mycobacterium tuberculosis* infection causes different levels of apoptosis and necrosis in human macrophages and alveolar epithelial cells. *Cell Microbiol.* 2003;5(9):649-660.
81. Derrick SC, Morris SL. The ESAT6 protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression. *Cell Microbiol.* 2007;9(6):1547-1555.
82. Rojas M, Barrera LF, Puzo G, Garcia LF. Differential induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in resistant and susceptible murine macrophages: role of nitric oxide and mycobacterial products. *Journal Immunol.* 1997;159(3):1352-1361.
83. Divangahi M, Behar SM, Remold H. Dying to live: how the death modality of the infected macrophage affects immunity to tuberculosis. Divangahi M, editor. *The New Paradigm of Immunity to Tuberculosis.* New York: Springer; 2013.
84. Keane J, Remold HG, Kornfeld H. Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. *J Immunol.* 2000;164(4):2016-2020.
85. Gan H, Lee J, Ren F, Chen M, Kornfeld H, Remold HG. *Mycobacterium tuberculosis* blocks crosslinking of annexin-1 and apoptotic envelope formation on infected macrophages to maintain virulence. *Nat Immunol.* 2008;9(10):1189-1197.
86. Divangahi M, Chen M, Gan H, Desjardins D, Hickman TT, Lee DM, ve ark. *Mycobacterium tuberculosis* evades macrophage defenses by inhibiting plasma membrane repair. *Nat Immunol.* 2009;10(8):899-906.
87. Jayakumar D, Jacobs WR, Narayanan S. Protein kinase E of *Mycobacterium tuberculosis* has a role in the nitric oxide stress response and apoptosis in a human macrophage model of infection. *Cell Microbiol.* 2008;10(2):365-374.
88. Sun J, Singh V, Lau A, Stokes RW, Obregón-Henao A, Orme IM, ve ark. *Mycobacterium tuberculosis* nucleoside diphosphate kinase inactivates small GTPases leading to evasion of innate immunity. *PLoS Pathog.* 2013;9(7):e1003499.
89. Behar SM, Martin CJ, Booty MG, Nishimura T, Zhao X, Gan HX, ve ark. Apoptosis is an innate defense function of macrophages against *Mycobacterium tuberculosis*. *Mucosal Immunol.* 2011;4(3):279-287.
90. Walsh G. *Pharmaceutical Biotechnology Concepts and Applications.* Chichester: John Wiley and Sons Ltd; 2007. Chapter 13, Antibodies, vaccines and adjuvants; 371 - 395.
91. Jiskoot W, Kersten GFA, Mastrobattista E. *Vaccines.* Crommelin DJA, Sindelar RD, Meibohm B, editörler. 4th ed. *Pharmaceutical Biotechnology Fundamentals and Applications.* New York: Springer; 2013.

92. D'Amico C, Fontana F, Cheng R, Santos HA. Development of vaccine formulations: past, present, and future. *Drug Deliv Transl Res.* 2021;11(2):353-372.
93. Berger A. Th1 and Th2 responses: what are they? *BMJ.* 2000;321(7258):424-424.
94. Mosmann T, Coffman R. TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 1989;7(1):145-173.
95. Chehimi J, Trinchieri G. Interleukin-12: a bridge between innate resistance and adaptive immunity with a role in infection and acquired immunodeficiency. *J Clin Immunol.* 1994;14(3):149-161.
96. National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Vaccine Types [Internet]. 2020 [Erişim Tarihi 4 Ekim 2020]. Erişim adresi: <https://www.niaid.nih.gov/research/vaccine-types>.
97. Braconier JH, Wennerholm S, Norrby SR. Comparative immunogenicity and tolerance of Vaqta™ and Havrix™. *Vaccine.* 1999;17(17):2181-2184.
98. Wu Z, Hu Y, Xu M, Chen Z, Yang W, Jiang Z, ve ark. Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine (CoronaVac) in healthy adults aged 60 years and older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial. *Lancet Infect Dis.* 2021;S1473-3099(20)30987-7.
99. Bernstein DI. Live Attenuated Human Rotavirus Vaccine, Rotarix™. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2006;17(4):188-194.
100. Plotkin S. History of vaccination. *Proc Natl Acad Sci.* 2014.111(34):12283-12287.
101. Rosa BR, da Cunha AJLA, Medronho RA. Efficacy, immunogenicity and safety of a recombinant tetravalent dengue vaccine (CYD-TDV) in children aged 2-17 years: systematic review and meta-analysis. *BMJ Open.* 2019;9(3):e019368-e019368.
102. Smith K, Muther JJ, Duke AL, McKee E, Zheng NY, Wilson PC, ve ark. Fully human monoclonal antibodies from antibody secreting cells after vaccination with Pneumovax®23 are serotype specific and facilitate opsonophagocytosis. *Immunobiology.* 2013;218(5):745-754.
103. Pichichero ME. Protein carriers of conjugate vaccines: characteristics, development, and clinical trials. *Hum Vaccin Immunother.* 2013;9(12):2505-2523.
104. Neimert-Andersson T, Hällgren AC, Andersson M, Langebäck J, Zettergren L, Nilsen-Nygaard J, ve ark. Improved immune responses in mice using the novel chitosan adjuvant ViscoGel, with a Haemophilus influenzae type b glycoconjugate vaccine. *Vaccine.* 2011;29(48):8965-8973.

105. Jones RGA, Liu Y, Rigsby P, Sesardic D. An improved method for development of toxoid vaccines and antitoxins. *J Immunol Methods*. 2008;337(1):42-48.
106. Michel ML, Tiollais P. Hepatitis B vaccines: Protective efficacy and therapeutic potential. *Pathol Biol*. 2010;58(4):288-295.
107. Abraham P, Mistry FP, Bapat MR, Sharma G, Reddy GR, Prasad KS, ve ark. Evaluation of a new recombinant DNA hepatitis B vaccine (Shanvac-B). *Vaccine*. 1999;17(9):1125-1129.
108. Monie A, Hung CF, Roden R, Wu TC. Cervarix™: a vaccine for the prevention of HPV 16, 18-associated cervical cancer. *Biologics*. 2008;2(1):97-105.
109. Suschak JJ, Williams JA, Schmaljohn CS. Advancements in DNA vaccine vectors, non-mechanical delivery methods, and molecular adjuvants to increase immunogenicity. *Hum Vaccin Immunother*. 2017;13(12):2837-2848.
110. Williams JA. Vector Design for Improved DNA Vaccine Efficacy, Safety and Production. *Vaccines*. 2013;1(3):225-249.
111. Liu L, Morrow MP, Bagarazzi M. Clinical Use of DNA Vaccines. Miklavcic ED, editör. *Handbook of Electroporation*. Springer; 2017.
112. Şahin U, Karikó K, Türeci Ö. mRNA-based therapeutics — developing a new class of drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13(10):759-780.
113. Centers for Disease Control and Prevention. Covid-19 (Different COVID-19 Vaccines) [Internet].2021 [Erişim Tarihi 25 Mayıs 2021]. Erişim adresi: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/vaccines/different-vaccines.html>
114. Ramezanzpour B, Haan I, Osterhaus A, Claassen E. Vector-based genetically modified vaccines: Exploiting Jenner's legacy. *Vaccine*. 2016;34(50):6436-6448.
115. Voysey M, Clemens SAC, Madhi SA, Weckx LY, Folegatti PM, Aley PK, ve ark. Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. *Lancet*. 2020;397(10269):99-111.
116. Rab S, Afjal, Javaid M, Haleem A, Vaishya R. An update on the global vaccine development for coronavirus. *Diabetes Metab Syndrome*. 2020;14(6):2053-2055.
117. Guy B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(7):396-397.
118. Di Pasquale A, Preiss S, Da Silva FT, Garçon N. Vaccine adjuvants: from 1920 to 2015 and beyond. *Vaccines*. 2015;3(2):320-343.
119. Sivakumar SM, Safhi MM, Kannadasan M, Sukumaran N. Vaccine adjuvants - Current status and prospects on controlled release adjuvancity. *Saudi Pharm J*. 2011;19(4):197-206.

120. Aguilar J, Rodriguez E. Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine*. 2007;25(19):3752-3762.
121. Seppic. MontanideTM ISA - W/O [Internet]. [Erişim Tarihi 25 Mayıs 2021]. Erişim adresi: <https://www.seppic.com/en/montanide-isa-w-o>
122. Centers for Disease Control and Prevention. Vaccine Safety (Adjuvants and Vaccines) [Internet]. 2020 [Erişim Tarihi 25 Mayıs 2021]. Erişim adresi: <https://www.cdc.gov/vaccinesafety/concerns/adjuvants.html>
123. Centers for Disease Control and Prevention. Vaccines and Immunizations [Internet]. 2019 [Erişim Tarihi 25 Mayıs 2021]. Erişim adresi: <https://www.cdc.gov/vaccines/terms/usvaccines.html>
124. Shi S, Zhu H, Xia X, Liang Z, Ma X, Sun B. Vaccine adjuvants: Understanding the structure and mechanism of adjuvanticity. *Vaccine*. 2019;37(24):3167-3178.
125. Kaurav M, Madan J, Sudheesh MS, Pandey RS. Combined adjuvant-delivery system for new generation vaccine antigens: alliance has its own advantage. *Artif Cell Nanomed Biotechnol*. 2018;46(sup3):S818-S831.
126. Palmer MV, Thacker TC. Use of the Human Vaccine, *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guérin in Deer. *Front Vet Sci*. 2018;5:244.
127. Andersen P, Doherty TM. The success and failure of BCG — implications for a novel tuberculosis vaccine. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3(8):656-662.
128. Andersen P. Tuberculosis vaccines — an update. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(7):484-487.
129. Trunz BB, Fine PEM, Dye C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. *Lancet*. 2006;367(9517):1173-1180.
130. Abubakar I, Pimpin L, Ariti C, Beynon R, Mangtani P, Sterne JAC, ve ark. Systematic review and meta-analysis of the current evidence on the duration of protection by bacillus Calmette-Guérin vaccination against tuberculosis. *Health Technol Assess*. 2013;17(37):1-372.
131. Aronson NE, Santosham M, Comstock GW, Howard RS, Moulton LH, Rhoades ER, ve ark. Long-term efficacy of BCG vaccine in American Indians and Alaska Natives: a 60-year follow-up study. *JAMA*. 2004;291(17):2086-2091.
132. Mangtani P, Nguipdop-Djomo P, Keogh RH, Sterne JAC, Abubakar I, Smith PG, ve ark. The duration of protection of school-aged BCG vaccination in England: a population-based case-control study. *Int J Epidemiol*. 2017;47(1):193-201.
133. Marais BJ, Buddle BM, de Klerk-Lorist LM, Nguipdop-Djomo P, Quinn F, Greenblatt C. BCG vaccination for bovine tuberculosis; conclusions from the Jerusalem One Health workshop. *Transbound Emerg Dis*. 2019;66(2):1037-1043.
134. Aldwell FE, Keen DL, Parlane NA, Skinner MA, de Lisle GW, Buddle BM. Oral vaccination with *Mycobacterium bovis* BCG in a lipid formulation induces

- resistance to pulmonary tuberculosis in brushtail possums. *Vaccine*. 2003;22(1):70-76.
135. Nol P, Palmer MV, Waters WR, Aldwell FE, Buddle BM, Triantis JM, ve ark. Efficacy of oral and parenteral routes of mycobacterium bovis bacille calmette-guerin vaccination against experimental bovine tuberculosis in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*): a feasibility study. *J Wildl Dis*. 2008;44(2):247-259.
 136. Corner LAL, Costello E, O'Meara D, Lesellier S, Aldwell FE, Singh M, ve ark. Oral vaccination of badgers (*Meles meles*) with BCG and protective immunity against endobronchial challenge with *Mycobacterium bovis*. *Vaccine*. 2010;28(38):6265-6272.
 137. Buddle BM, de Lisle GW, Pfeiffer A, Aldwell FE. Immunological responses and protection against *Mycobacterium bovis* in calves vaccinated with a low dose of BCG. *Vaccine*. 1995;13(12):1123-1130.
 138. Qureshi T, Labes RE, Cross ML, Griffin JF, Mackintosh CG. Partial protection against oral challenge with *Mycobacterium bovis* in ferrets (*Mustela furo*) following oral vaccination with BCG. *Int J Tuberc Lung Dis*. 1999;3(11):1025-1033.
 139. Ballesteros C, Garrido JM, Vicente J, Romero B, Galindo RC, Minguijón E, ve ark. First data on Eurasian wild boar response to oral immunization with BCG and challenge with a *Mycobacterium bovis* field strain. *Vaccine*. 2009;27(48):6662-6668.
 140. Buddle BM, Vordermeier HM, Chambers MA, de Klerk-Lorist LM. Efficacy and Safety of BCG Vaccine for Control of Tuberculosis in Domestic Livestock and Wildlife. *Front Vet Sci*. 2018;5:259.
 141. World Health Organization. Global tuberculosis report 2020 Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
 142. Valdés I, Lazo L, Hermida L, Guillén G, Gil L. Can Complementary Prime-Boost Immunization Strategies Be an Alternative and Promising Vaccine Approach Against Dengue Virus? *Front Immunol*. 2019;10:1956.
 143. Kardani K, Bolhassani A, Shahbazi S. Prime-boost vaccine strategy against viral infections: Mechanisms and benefits. *Vaccine*. 2016;34(4):413-423.
 144. Ark M, Özdemir A, Şimay YD, İbişoğlu B. Plazmitlerin Transfromasyonu, Çoğaltılması, İzolasyonu ve Transfeksiyonu. Ark M, editör. Hücre Kültürü ve Temel Moleküler Biyoloji Protokolleri. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri Ltd Şti; 2017.
 145. Novagen. pET-28a-c(+) Vectors [İnternet]. [Erişim Tarihi 25 Mayıs 2021]. Erişim adresi: https://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/PEPF/pET_vectors/pET-28a-c_map.pdf

146. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-685.
147. Okay S, Çetin R, Karabulut F, Doğan C, Sürücüoğlu S, Kurt Kızıldoğan A. Immune responses elicited by the recombinant Erp, HspR, LppX, MmaA4, and OmpA proteins from *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2019;66(2):219-234.
148. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72(1):248-254.
149. Begg DJ, Dhuntyel O, Naddi A, Dhand NK, Plain KM, de Silva K, ve ark. The immunogenicity and tissue reactivity of *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis inactivated whole cell vaccine is dependent on the adjuvant used. *Heliyon*. 2019;5(6):e01911.
150. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci*. 1979;76(9):4350-4354.
151. Brooks JV, Frank AA, Keen MA, Bellisle JT, Orme IM. Boosting vaccine for tuberculosis. *Infect Immun*. 2001;69(4):2714-2717.
152. Hansson M, Nygren PA, Stahl S. Design and production of recombinant subunit vaccines. *Biotechnol Appl Biochem*. 2000;32(2):95-107.
153. Hovav AH, Mullerad J, Davidovitch L, Fishman Y, Bigi F, Cataldi A, ve ark. The *Mycobacterium tuberculosis* recombinant 27-kilodalton lipoprotein induces a strong Th1-type immune response deleterious to protection. *Infect Immun*. 2003;71(6):3146-3154.
154. Asif A, Mohsin H, Tanvir R, Rehman Y. Revisiting the Mechanisms Involved in Calcium Chloride Induced Bacterial Transformation. *Front Microbiol*. 2017;8:2169.
155. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*. 1983;166(4):557-580.
156. Chung C, Miller RH. A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16(8):3580.
157. Mandel M, Higa A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol*. 1970;53(1):159-162.
158. Sharma RC, Schimke RT. Preparation of electro-competent *E. coli* using salt-free growth medium. *Biotechniques*. 1996;20(1):42-44.
159. Mierendorf RC, Morris BB, Hammer B, Novy RE. Expression and Purification of Recombinant Proteins Using the pET System. Reischl U, editör. *Molecular Diagnosis of Infectious Diseases*. New Jersey: Humana Press; 1998.

160. Hayat SMG, Farahani N, Golichenari B, Sahebkar A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli* (*E. coli*): what we need to know. *Curr Pharm Des*. 2018;24(6):718-725.
161. Bertero A, Brown S, Vallier L. Methods of Cloning. Jalali M, Saldanha FYL, Jalali M, editörler. *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. Chennai: Academic Press; 2016.
162. Promega. pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems [Internet]. [Erişim Tarihi 25 Mayıs 2021]. Erişim adresi: <https://www.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Manuals/0/pGEM-T%20and%20pGEM-T%20Easy%20Vector%20Systems%20Protocol.pdf>
163. Sigma Aldrich. Blue-White Screening & Protocols for Colony Selection [Internet]. [Erişim Tarihi 25 Mayıs 2021]. Erişim adresi: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/blue-white-screening.html>
164. Jonasson P, Liljeqvist S, Nygren PA, Ståhl S. Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol Appl Biochem*. 2002;35(2):91-105.
165. Weiss B, Jacquemin-Sablon A, Live TR, Fareed GC, Richardson CC. Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4. *J Biol Chem*. 1968;243(17):4543-4555.
166. Ullrich A, Shine J, Chirgwin J, Pictet R, Tischer E, Rutter WJ, ve ark. Rat insulin genes: construction of plasmids containing the coding sequences. *Science*. 1977;196(4296):1313-1319.
167. Seeburg PH, Shine J, Martial JA, Baxter JD, Goodman HD. Nucleotide sequence and amplification in bacteria of structural gene for rat growth hormone. *Nature*, 1977;270(5637):486-494.
168. Zabarovsky ER, Allikmets RL. An improved technique for the efficient construction of gene libraries by partial filling-in of cohesive ends. *Gene*. 1986;42(1):119-123.
169. Ukai H, Ukai-Tadenuma M, Ogiu T, Tsuji H. A new technique to prevent self-ligation of DNA. *J Biotechnol*. 2002;97(3):233-242.
170. Chino A, Watanabe K, Moriya H. Plasmid construction using recombination activity in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS One*. 2010;5(3):e9652.
171. Chandra PK, Wikel SK. Analyzing ligation mixtures using a PCR based method. *Biol Proced Online*. 2005;7(1):93-100.
172. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol*. 2014;5:172.

173. Studier FW, Moffatt BA. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol.* 1986;189(1):113-130.
174. McCutcheon SR, Chiu KL, Lewis DD, Tan C. CRISPR-Cas Expands Dynamic Range of Gene Expression From T7RNAP Promoters. *Biotechnol J.* 2018;13(5):1700167.
175. O'Riordan AA, Morales VA, Mulligan L, Faheem N, Windle HJ, Kelleher DP. Alkyl hydroperoxide reductase: A candidate *Helicobacter pylori* vaccine. *Vaccine.* 2012;30(26):3876-3884.
176. Walsh G. *Pharmaceutical Biotechnology Concepts and Applications.* Chichester: John Wiley and Sons Ltd; 2007. Chapter 6, Downstream processing; 131-172.
177. Bimboim H, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979;7(6):1513-1523.
178. Sharma R, Dill BD, Chourey K, Shah M, VerBerkmoes NC, Hettich RL. Coupling a Detergent Lysis/Cleanup Methodology with Intact Protein Fractionation for Enhanced Proteome Characterization. *J Proteome Res.* 2012;11(12):6008-6018.
179. Johnson BH, Hecht MH. Recombinant proteins can be isolated from *E. coli* cells by repeated cycles of freezing and thawing. *Biotechnology (NY).* 1994;12(13):1357-60.
180. Capocelli M, Prisciandaro M, Lancia A, Musmarra D. Comparison between hydrodynamic and acoustic cavitation in microbial cell disruption. *Chem Eng Trans.* 2014;38:13-18.
181. Fonseca LP, Cabral JMS. Penicillin acylase release from *Escherichia coli* cells by mechanical cell disruption and permeabilization. *J Chem Technol Biotechnol.* 2002;77:159-167.
182. Salazar O, Asenjo JA. Enzymatic lysis of microbial cells. *Biotechnol Lett.* 2007;29(7):985-994.
183. Anand H, Balasundaram B, Pandit AB, Harrison STL. The effect of chemical pretreatment combined with mechanical disruption on the extent of disruption and release of intracellular protein from *E. coli*. *Biochem Eng J.* 2007;35(2):166-173.
184. Janson JC, Jonsson JA. *Introduction to Chromatography.* Janson JC, editor. *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications.* 3rd ed. New Jersey: John Wiley Sons; 2011.
185. Knudsen HL, Fahrner RL, Xu Y, Norling LA, Blank GS. Membrane ion-exchange chromatography for process-scale antibody purification. *J Chromatogr A.* 2001;907(1):145-154.

186. Rolland D, Gauthier M, Dugua JM, Fournier C, Delpech L, Watelet B, Letourneur O, Arnaud M, Jolivet M. Purification of recombinant HBc antigen expressed in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*: comparison of size-exclusion chromatography and ultracentrifugation. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2001;753(1):51-65.
187. Karakus C, Uslu M, Yazici D, Salih BA. Evaluation of immobilized metal affinity chromatography kits for the purification of histidine-tagged recombinant CagA protein. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2016;1021:182-187.
188. Shukla AA, Peterson J, Sorge L, Lewis P, Thomas S, Waugh S. Preparative Purification of a Recombinant Protein by Hydrophobic Interaction Chromatography: Modulation of Selectivity by the Use of Chaotropic Additives. *Biotechnol Prog.* 2002;18(3):556-564.
189. Jenkins MC, Fetterer R, Schares G, Björkman C, Wapenaar W, McAllister M, Dubey JP. HPLC purification of recombinant NcGRA6 antigen improves enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of bovine neosporosis. *Vet Parasitol.* 2005;131(3):227-234.
190. Hochuli E, Döbeli H, Schacher A. New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J Chromatogr A.* 1987;411:177-184.
191. Arakawa T, Philo JS. Biophysical and Biochemical Analysis of Recombinant Proteins. Crommelin DJA, Sindelar RD, Meibohm B, editörler. 4th ed. *Pharmaceutical Biotechnology Fundamentals and Applications.* New York: Springer; 2013.
192. Aitken A, Learmonth MP, Waterborg JH, Walker JM, Kruger NJ. Quantification of Proteins. Walker JM, editör. *The Protein Protocols Handbook.* 2nd ed. New Jersey: Humana Press; 2002.
193. Trivedi A, Singh N, Bhat SA, Gupta P, Kumar A. Redox biology of tuberculosis pathogenesis. *Adv Microb Physiol.* 2012;60:263-324.
194. Leroux-Roels G. Unmet needs in modern vaccinology: Adjuvants to improve the immune response. *Vaccine.* 2010;28:C25-C36.
195. İz SG, Sağlam Metiner P, Kımız I, Kayalı Ç, Deliloğlu Gürhan Sİ. Polyclonal antibody production against hapten-structured KDN molecule by using different adjuvants alternative to freund's adjuvant. *EurJTher.* 2018;24(2):106-111.
196. Chua BY, Sekiya T, Kobaisi MA, Short KR, Mainwaring DE, Jackson DC. A single dose biodegradable vaccine depot that induces persistently high levels of antibody over a year. *Biomaterials.* 2015;53:50-57.
197. Ruan BY, Yun Yao Y, Shuai-Yong Wang SY, Xiao-Qian Gong XQ, Xiao-Min Liu XM, Qi Wang Q, ve ark. Protective efficacy of a bivalent inactivated reassortant H1N1 influenza virus vaccine against European avian-like and classical swine influenza H1N1 viruses in mice. *Vet Microbiol.* 2020;246:108724.

198. McKee AS, Munks MW, Marrack P. How Do Adjuvants Work? Important Considerations for New Generation Adjuvants. *Immunity*. 2007;27(5):687-690.
199. Kaufmann SH, Parida SK. Tuberculosis in Africa: learning from pathogenesis for biomarker identification. *Cell Host Microbe*. 2008;4(3):219-28.
200. Ibrahim EES, Gamal WM, Hassan AI, Mahdy SED, Hegazy AZ, Abdel-Atty MM. Comparative study on the immunopotentiator effect of ISA 201, ISA 61, ISA 50, ISA 206 used in trivalent foot and mouth disease vaccine. *Vet World*. 2015;8(10):1189.
201. Thakur A, Andrea A, Mikkelsen H, Woodworth JS, Andersen P, Jungersen G, ve ark. Targeting the Mincle and TLR3 receptor using the dual agonist cationic adjuvant formulation 9 (CAF09) induces humoral and polyfunctional memory T cell responses in calves. *PLoS One*. 2018;13(7):e0201253.
202. Eskeland S, Stuen S, Crosby FL, Lybeck K, Barbet AF, Lindgren PE, ve ark. Assessing the clinical and bacteriological outcomes of vaccination with recombinant Asp14 and OmpA against *A. phagocytophilum* in sheep. *Vet Immunol Immunopathol*. 2019;218:109936.
203. Yang E, Gu J, Wang F, Wang H, Shen H, Chen ZW. Recombinant BCG prime and PPE protein boost provides potent protection against acute *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Microb Pathog*. 2016;93:1-7.
204. Hovav AH, Davidovitch L, Nussbaum G, Mullerad J, Fishman Y, Bercovier H. Mitogenicity of the recombinant mycobacterial 27-kilodalton lipoprotein is not connected to its antiprotective effect. *Infect Immunity*. 2004;72(6):3383-3390.
205. Gao W, Wortis HH, Pereira MA. The *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase is a T cell-independent B cell mitogen and an inducer of non-specific Ig secretion. *Int Immunol*. 2002;14(3):299-308.

8. EKLER

EK-1: Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu Onay Belgesi (No: 2020/08-16).



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 52338575 - 88

HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 23.09.2020 (ÇARŞAMBA)
TOPLANTI SAYISI	: 2020/08
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2020/19 (ONAY TARİHİ: 12.05.2020)
KARAR NUMARASI	: 2020/08- 16
ONAY BİTİŞ TARİHİ	: 12.05.2025
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Doç. Dr. Sezer OKAY
HAYVAN DENEYLERİNDE	: Ecz. Özgün Fırat DÜZENLİ(Doktora Tezi), Doç. Dr.
GÖREVLİ ARAŞTIRMACILAR	: Sezer OKAY, Dr. Ecz. İnci KAZKAYASI
DİĞER YARDIMCI	:
ARAŞTIRMACILAR	: Prof. Dr. A. Filiz ÖNER
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: 60 Adet Balb/c Fare (6-8 Haftalık)

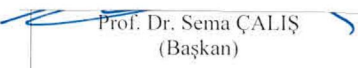
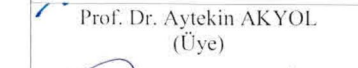

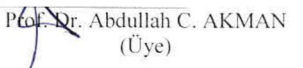
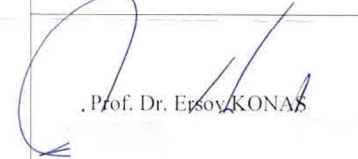
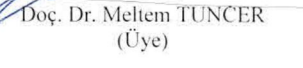

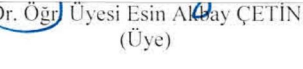
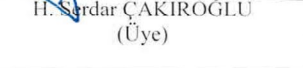
Kurulumuzun 12.05.2020 tarihli toplantısında 2020/19 kayıt numarasıyla onaylanmış olan Üniversitemiz Aşı Enstitüsü Aşı Teknolojisi Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Sezer OKAY'ın araştırma yürütücüsü olduğu "*E. Coli'de Rekombinant Mycobacterium bovis Alt Birim Antijenlerinin Üretimi ve Aşı Geliştirilmesi*" başlıklı proje için verilen 17.09.2020 tarihli protokol değişikliği dilekçeniz Kurulumuzun 23.09.2020 tarihli toplantısında görüşülerek **uygun bulunmuştur** ve kayıtlarımıza eklenmiştir.

Araştırma yürütücüsü en geç, onay bitiş tarihinden sonraki 1 ay içerisinde proje sonuç raporunu Kurulumuza teslim etmekle yükümlüdür.



Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
Etik Kurul Başkanı

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURULU İMZA SİRKÜLERİ

TOPLANTI TARİHİ VE SAATİ : 23.09.2020 (ÇARŞAMBA)
TOPLANTI SAATİ : 14.00
TOPLANTI SAYISI : 2020/08
PROJE NUMARASI : 2020/19 (ONAY TARİHİ : 12.05.2020)
KARAR NUMARASI : 2020/08-16

 Prof. Dr. Sema ÇALIŞ (Başkan)	Prof. Dr. Nüket Örnek BÜKEN (Üye)	(İZİNLİ) Prof. Dr. M. Yıldırım SARA (Üye)
 Prof. Dr. Aytekin AKYOL (Üye)	 Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI (Üye)	 Prof. Dr. Abdullah C. AKMAN (Üye)
 Prof. Dr. Ersoy KONAS	 Doç. Dr. Meltem TUNCER (Üye)	 Doç. Dr. H. S. YANBAŞILAR (Üye)
Dr. Öğr. Üyesi Banu Cahide TEL (Üye)	Doç. Dr. M. Alper ÇETİNKAYA (Üye)	 Dr. Öğr. Üyesi Esin Alay ÇETİN (Üye)
(İZİNLİ) Mevlüt ÖKSÜZOĞLU (Üye)	 H. Serdar ÇAKIROĞLU (Üye)	Avukat Yasemin ÖZSELÇUK (Üye)

EK-2: Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası

 HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU			
<h1>DENEY HAYVANLARI KULLANIM SERTİFİKASI</h1>			
<h2>ÖZGÜN FIRAT DÜZENLİ</h2>			
<p>ÇEVRE VE ORMAN BAKANLIĞI TARAFINDAN ONBEŞ ŞUBAT İKİBİNONDÖRT TARİHİNDE YAYIMLANAN "HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURULLARININ ÇALIŞMA USUL VE ESASLARINA DAİR YÖNETMELİK*" UYARINCA EĞİTİM ALMIŞ VE DENEY HAYVANI KULLANIM SERTİFİKASI ALMAYA HAK KAZANMIŞTIR.</p>			
SERTİFİKA SINIFI: B		BELGE NO: 352 TARİHİ: 27.08.2015	
PROF. DR. SEMA ÇALIŞ ETİK KURUL BAŞKANI		PROF. DR. A. MURAT TUNÇER REKTÖR	
<small>*YÖNETMELİK HUKUKLERİ ORMAN VE SU İŞLERİ BAKANLIĞI TARAFINDAN YÜRÜTÜLMEKTEDİR.</small>			



HACETTEPE UNIVERSITY
THE LOCAL ETHICS COMMITTEE FOR ANIMAL EXPERIMENTS



CERTIFICATE OF LABORATORY ANIMAL USE

THIS IS TO CERTIFY THAT **ÖZGÜN FIRAT DÜZENLİ** HAS BEEN ASSESSED
AS HAVING SATISFACTORILY COMPLETED ACCREDITED TRAINING FOR
LABORATORY ANIMAL USE UNDER "REGULATION ON WORKING PROCEDURES
AND PRINCIPLES OF ETHICS COMMITTEES FOR ANIMAL EXPERIMENTS**"
PUBLISHED BY THE REPUBLIC OF TURKEY MINISTRY OF ENVIRONMENT
AND FORESTRY AT FEBRUARY 15, 2014.

CLASS OF CERTIFICATE: B

PROF. DR. SEMA ÇALIŞ
CHAIR OF ETHICS COMMITTEE
FOR ANIMAL EXPERIMENTS

DOCUMENT NUMBER: 352
DATE: 27.08.2015

PROF. DR. A. MURAT TUNÇER
RECTOR

*PROVISIONS OF THE REGULATION ARE CARRIED OUT BY THE REPUBLIC OF TURKEY MINISTRY OF FORESTRY AND WATER AFFAIRS

Ek-3: Tez Çalışması Orijinallik Raporu

TEZİN TAM BAŞLIĞI: *Mycobacterium bovis* Antijenlerinin *Escherichia coli*'de Rekombinant DNA Teknolojisi ile Üretimi ve Alt Birim Aşı Geliştirilmesi

ÖĞRENCİNİN ADI SOYADI: Özgün Firat Düzenli

DOSYANIN TOPLAM SAYFA SAYISI: 114

ORJİNALLİK RAPORU			
%5	%4	%2	%2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
BİRİNCİL KAYNAKLAR			
1	hsgm.saglik.gov.tr İnternet Kaynağı		%1
2	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi		<%1
3	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı		<%1
4	www.scribd.com İnternet Kaynağı		<%1
5	eprints.ucl.ac.uk İnternet Kaynağı		<%1
6	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı		<%1
7	AKALIN, Yavuz, ÖZÇELİK, Abdurrahman, KÖSE, Nusret and SEBER, Sinan. "Erişkinlerde alt ekstremitenin rotasyonel dizilimi: diz osteoartritiyle ilişkisi ortaya konamamıştır", TÜBİTAK, 2011. Yayın		<%1
8	eprints.ibb.waw.pl İnternet Kaynağı		

EK-4: Turnitin Dijital Makbuz

Digital Receipt

This receipt acknowledges that Turnitin received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author: **Özgün Düzenli**
Assignment title: **Doktora Tezi**
Submission title: **Doktora Tezi**
File name: **DOKTORA_TEZI.docx**
File size: **8.45M**
Page count: **114**
Word count: **23,652**
Character count: **159,910**
Submission date: **07-Jul-2021 03:04PM (UTC+0300)**
Submission ID: **1616732033**



9. ÖZGEÇMİŞ