

**ŞAP VİRÜSÜNÜN HÜCREYE GİRİŞİNDE SİNDEKAN  
1'İN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATING THE ROLE OF SYNDECAN 1 IN THE  
CELL ENTRY OF FOOT AND MOUTH DISEASE VIRUS**

**ABDURRAHMAN KURT**

**DOÇ. DR. AYSUN KILIÇ SÜLOĞLU**

**Tez Danışmanı**

**DR. ŞÜKRAN YILMAZ**

**Eş Danışman**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır



## ÖZET

### ŞAP VİRÜSÜNÜN HÜCREYE GİRİŞİNDE SİNDEKAN 1'İN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

**Abdurrahman KURT**

**Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Aysun KILIÇ SÜLOĞLU**

**Eş Danışman: Dr. Şükran YILMAZ**

**Haziran 2022, 63 sayfa**

Şap hastalığı, Türkiye’de dahil olmak üzere birçok ülkede salgınlara ve önemli ekonomik kayıplara neden olan, çift tırnaklı hayvanların akut ve oldukça bulaşıcı viral bir hastalığıdır. Hastalığın etkeni olan şap virüsünün 7 serotipi ve birçok varyantı bulunur. Şap hastalığı ile mücadelede aşılama en etkili çözüm olmaya devam etmektedir.

Virüsler, duyarlı konakçı hücrelerin hücre yüzeylerinde yer alan spesifik reseptörlere bağlanarak enfeksiyon işlemi başlatırlar. Şap virüsünün saha izolatları konak hücreye giriş sağlamak için integrin  $\alpha\beta1$ ,  $\alpha\beta3$ ,  $\alpha\beta6$  ve  $\alpha\beta8$  reseptörlerini kullanırlar.

Şap virüsü de dahil olmak üzere birçok virüste heparan sülfatların konak hücre yüzeyine bağlanmada rol aldığı görülmüş fakat şap virüsü için bu aileden hangisinin rol aldığı bilgisine literatürde rastlanmamıştır. Literatürdeki bu eksikliğe katkı sunmak amacıyla bu tez çalışmasında heparan sülfat proteoglikan ailesinde yer alan Sindekan 1’in rolü araştırılmıştır.

Bu tez çalışmasında, şap virüsüne duyarlı olmayan insan kolon karsinom hücresine (SW480) insan Sindekan 1 (SDC1) geni içeren plasmidin transfeksiyonu ve ifadesi

sonrası şap virüsüne duyarlı hale geldiği gösterilmektedir. Şap virüsü için reseptör olduğu bilinen integrin  $\alpha\beta6$  pozitif kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Heparan sülfatın hücre kültürüne adaptasyonu aşamasında O serotipini tercih etmesi nedeniyle duyarlı yavru hamster böbrek hücresinde (BHK-21) adapte edilmiş OTUR/17 virüs suşu kullanılmıştır. Çalışmaların ilk aşamasında, hücrelerin sterilite testleri yapılmış, üreme eğrileri çıkarılmış, hücre stokları hazırlanmış ve karşılaştırmalı olarak SW480 ve BHK-21 hücrelerinin şap virüsüne duyarlılığı kontrol edilmiştir. İkinci aşamasında, SDC1, integrin  $\beta6$  ve kontrol plasmidleri kompetan bakteriye ayrı ayrı transforme edilmiştir. Transforme bakteriler çoğaltılmış, plasmid DNA'lar tekrar izole edilmiş ve konsantrasyonları ölçülerek stoklanmıştır. Üçüncü aşamada, transfeksiyon uygulama dozu belirlenmiş, transfeksiyon işlemleri gerçekleştirilmiş ve RNA izolasyonları yapılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile gen ifadeleri ölçülmüştür. Çalışmanın son aşamasında, transfekte edilen hücrelere virüs ekimi yapılarak duyarlılıkları incelenmiştir. Transfeksiyon işlemlerinin sonucunda gen ifadelerinde beklenen düzeyde artış görülmüştür. Transfekte edilmiş hücrelerin şap virüsü ile inkübasyonu sonucunda  $\beta6$  geni ile transfekte olan gözlerde daha fazla olmak üzere  $\beta6$  ve SDC1 ile transfekte gözlerde kademeli olarak sitopatik etki (CPE) sonucu hücrelerde dökülme gözlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Şap virüsü, sindekan 1, SW480, transformasyon, transfeksiyon, RT-PZR

## **ABSTRACT**

### **INVESTIGATING THE ROLE OF SYNDECAN 1 IN THE CELL ENTRY OF FOOT AND MOUTH DISEASE VIRUS**

**Abdurrahman KURT**

**Master of Science, Department of BIOLOGY**

**Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Aysun KILIÇ SÜLOĞLU**

**Co-Supervisor: Ph. D. Şükran YILMAZ**

**June 2022, 63 pages**

Foot and mouth disease is an acute and highly contagious viral disease of hoofed that causes epidemics and significant economic losses in many countries, including Turkey. There are 7 serotypes and many variants of the foot-and-mouth disease virus (FMDV), which is the causative agent of the disease. Vaccination remains the most effective solution in the fight against FMDV.

Viruses initiate the infection process by binding to specific receptors located on the cell surfaces of susceptible host cells. Field isolates of the FMDV use integrin  $\alpha\beta 1$ ,  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 6$ , and  $\alpha\beta 8$  receptors for entry into the host cell.

It has been observed that heparan sulfate proteoglycans have a role in binding to the host cell surface in many viruses, including the foot-and-mouth disease virus, but the

information on which of this family plays a role for the FMDV has not been found in the literature. In order to contribute to this deficiency in the literature, the role of Syndecan 1 (SDC1), which is in the heparan sulfate proteoglycan family, was investigated in this thesis study.

In this thesis, it is shown that human colon carcinoma cell (SW480) which is not susceptible to FMDV becomes susceptible to FMDV after transfection and expression of the plasmid containing the human syndecan 1 (SDC1) gene. Integrin  $\alpha\beta 6$ , which is known to be a receptor for the FMDV, was used as a positive control group. OTUR/17 virus strain adapted in susceptible baby hamster kidney cell (BHK-21) was used because heparan sulfate prefers the O serotype during the adaptation to cell culture. In the first phase of the studies, sterility tests of cells were performed, growth curves were drawn, cell stocks were prepared and the susceptibility of SW480 and BHK-21 cells to FMDV was checked comparatively. In the second step, SDC1, integrin  $\beta 6$  and control plasmids were individually transformed into competent bacteria. Transformed bacteria were propagated, plasmid DNAs were re-isolated and stored by measuring their concentrations. In the third step, the transfection application dose was determined, transfection procedures were performed, and RNA isolations were made and gene expressions were measured by polymerase chain reaction (PCR). At the last stage of the study, the susceptibility of the transfected cells was examined by inoculating the virus.

As a result of transfection processes, an increase in gene expressions was observed at the expected level. As a consequence of the incubation of the transfected cells with the FMDV, cell shedding was observed as a result of a gradual cytopathic effect in the wells transfected with  $\beta 6$  and SDC1, more so in the wells transfected with the  $\beta 6$  gene.

**Keywords:** foot-and-mouth disease virus, syndecan 1, SW480, transformation, transfection, RT-PCR

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenciliğime başladığım andan itibaren tüm süreç boyunca bana yol gösteren, bilgi ve deneyimlerini paylaşan, sabır ve vaktini esirgemeyen ve beni daima motive eden değerli danışman hocam Doç. Dr. Aysun KILIÇ SÜLOĞLU'na,

Yüksek lisans eğitimine başlamam konusunda bana inanan ve teşvik eden, tüm süreç boyunca değerli vaktini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerini paylaşan, düşüncelerime daima değer veren ve özgür bırakan, tez çalışmamın her aşamasında büyük emeği olan değerli şefim ve eş danışmanım Dr. Şükran YILMAZ'a,

Tez çalışmam boyunca bilimsel bilgi ve deneyimlerini aktaran, çalışmalarımın yürütülmesi ve değerlendirilmesi sürecinde bana destek olan değerli hocam Prof. Dr. Çağatay KARAASLAN'a,

Tez çalışmama FYL-2020-18649 numaralı Yüksek Lisans Tez Projesi kapsamında maddi destek sağlayan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Tez çalışmamda enstitüsü olanaklarını ve maddi desteklerini esirgemeyen Şap Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Tez çalışmalarım boyunca bilimsel bilgi ve deneyimlerini paylaşan, laboratuvar çalışmalarımın yürütülmesi ve değerlendirilmesi sürecinde büyük emeği olan, yardımına ihtiyacım olduğunda vaktini esirgemeyen, ilgiyle sorularımı cevaplayan değerli hocam Dr. Arş. Gör. Hayriye AKEL BİLGİÇ'e,

Çalışmalarım sırasında ihtiyaç duyduğumda yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Elif KARACAOĞLU'na, Bil. Uz. Selen SANİN'e ve Berfin KOÇKAYA'ya,

Tez çalışmam sırasında gerek bilimsel bilgi ve tecrübeleriyle gerek laboratuvar çalışmalarımın gerçekleştirilmesi aşamalarında bana yardımcı olan Şap Enstitüsü Müdürlüğü'nden çalışma arkadaşlarım Dr. Can ÇOKÇALIŞKAN, Dr. Ünal PARLAK, Ömer ŞİŞMAN, Banu BAYRİ ÖZBİLGE, Yasemin GÜLTEKİN, Pelin KARA ve birlikte çalışmaktan çok keyif aldığım hücre bankası bölümü değerli mesai arkadaşlarım Fethi YAVUZER, Hilal PARLAK ve Nimet DİKİLİTAŞ'a,

Tüm eğitim ve öğretim hayatım boyunca desteklerini yanımda hissettiğim, bana güvenen, çıktığım her yolda yanımda olan, bugünlere gelmemde en büyük katkıları olan kıymetli annem İraz KURT, babam Ahmet KURT ve kardeşim İbrahim KURT'a, İçtenlikle teşekkür eder, sevgi ve selamlarımı sunarım.



# İÇİNDEKİLER

ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER .....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Şap Hastalığı ve Etkeni.....	3
2.2. Şap Virüsünün Genel Özellikleri, Yapısı ve Replikasyon Döngüsü .....	4
2.3. Şap Virüsünün Hücresel Reseptörleri.....	7
2.3.1. İntegrinler.....	7
2.3.2. Heparan Sülfat Proteoglikanlar (HSPG).....	8
2.4. Moleküler Biyolojik Uygulamalar .....	11
2.4.1 Transformasyon .....	11
2.4.2 Transfeksiyon.....	11
2.5. Hücre Kültürü Karakterizasyon Testleri.....	16
2.5.1. Üreme Eğrisi ve İnkübe Zamanı.....	16
2.5.2. Sterilite Testleri.....	18
2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	20
2.7. Plak Test .....	22
2.8. İnsan Kolon Karsinom Hücre Hattı (SW480).....	23
2.9. Yavru Hamster Böbrek Hücre Hattı (BHK-21).....	23
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	25
3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler .....	25

3.2. SW480 ve BHK-21 Hücrelerinin Dondurulması, Çözdürülmesi ve Pasajlanması .....	25
3.3. SW480 ve BHK-21 Hücrelerinin Sterilite ve Mikoplazma Testlerinin Yapılması.....	27
3.4. SW480 ve BHK-21 Hücrelerinin Üreme Eğrisinin Çıkarılması ve İnkilenme Zamanının Hesaplanması .....	29
3.5. SW480 ve BHK-21 Hücrelerinin Plak Test Yöntemi ile Şap Virüsüne Duyarlılığının Belirlenmesi .....	29
3.6. Plasmid vektörlerinin Transfeksiyon İçin Hazırlanması.....	30
3.6.1. Plasmid Vektörlerin E.coli Stbl3 Suşuna Transformasyonu ve Çoğaltılması .....	30
3.6.2. Plasmidlerin İzolasyonu .....	32
3.6.3. İzole Edilen Plasmidlerin Spektrofotometre ile Konsantrasyonlarının Ölçülmesi ve Boyutunun Agaroz Jel ile Kontrolü .....	32
3.7. Transfeksiyon .....	33
3.7.1. Transfeksiyon Uygulama Dozunun Belirlenmesi .....	33
3.7.2. Plasmid Vektörlerinin SW480 Hücrelerine Transfeksiyonu .....	34
3.7.3. Transfeksiyon Sonrası Genlerin İfadesinin Ölçülmesi.....	34
3.8. Transfeksiyon Sonrası Plak Test Yöntemi ile Şap Virüsüne Duyarlılığının Belirlenmesi.....	38
3.9. İstatiksel analiz.....	39
4. SONUÇLAR .....	40
4.1. SW480 ve BHK-21 Hücrelerinin Sterilite ve Mikoplazma Testlerinin Sonuçları.....	40
4.2. SW480 ve BHK-21 Hücrelerinin Üreme Eğrisinin Çıkarılması ve İnkilenme Zamanı .....	41
4.3. SW480 ve BHK-21 Hücrelerinin Plak Test Yöntemi ile Şap Virüsüne Duyarlılığının Sonuçları .....	42
4.4. İzole Edilen Plasmidlerin Spektrofotometre ile Konsantrasyonlarının Ölçülmesi ve Agaroz Jel Elektroforez Sonuçları .....	43
4.5. Transfeksiyon Uygulama Dozunun Belirlenmesi Sonucu .....	46
4.6. Plasmid Vektörlerinin SW480 Hücrelerine Transfeksiyon Sonuçları .....	46

4.7. Transfeksiyon Sonrası Genlerin İfadesinin Ölçüm Sonuçları .....	47
4.8. Transfeksiyon Sonrası Plak Test Yöntemi ile Şap Virüsüne Duyarlılığının Belirlenmesi Sonuçları .....	48
5. TARTIŞMA .....	50
6. YORUM .....	55
6. KAYNAKLAR .....	56
ÖZGEÇMİŞ .....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (OIE/WOAH) Şap Hastalığı Durum Haritası, Mayıs 2022 (OIE/WOAH,2022). .....	4
Şekil 2.2. A) Şap virüsünün kapsidini oluşturan yapısal proteinleri (Han ve ark.,2015) .....	5
B) Şap virüsünün kapsid yapısı (Jamal ve Belsham, 2013). .....	5
Şekil 2.3. Şap virüsünün yapısal ve yapısal olmayan proteinleri kodlayan genom dizisi (Jamal ve Belsham, 2013). .....	5
Şekil 2.4. Klatrin ve kaveola aracılı endositoz (Han ve ark.,2015). .....	6
Şekil 2.5. Şap virüsünün konakçı hücrede yaşam döngüsü (Gao ve ark., 2016). .....	6
Şekil 2.6. İntegrinin $\alpha$ ve $\beta$ alt ünitelerinin şematik gösterimi (Mezu-Ndubuisi ve Maheshwari, 2021). .....	8
Şekil 2.7. Konumlarına göre heparan sülfat proteoglikanlar; perlekan, agrin, sindekan ve glipikan (Rhiner ve Hengartner, 2006). .....	9
Şekil 2.8. a) Kalıcı transfeksiyon, b) Geçici transfeksiyon (Kim ve Eberwine,2010). .....	13
Şekil 2.9. Büyüme eğrisi grafiği (Freshney, 2010). .....	17
Şekil 2.10. Polimeraz Zincir Reaksiyon Döngüsü. ....	21
Şekil 3.1. Hücre sayımı için kullanılan Bürker lamı. ....	27
Şekil 3.2. Hücre sayımı için kullanılan Bürker lamı mikroskop görüntüsü. ....	27
Şekil 3.3. SDC1 geni içeren plasmid haritası. ....	31
Şekil 3.4. İntegrin $\beta 6$ geni içeren plasmid haritası. ....	31
Şekil 3.5. Boş kontrol plasmid haritası. ....	32
Şekil 4.1. İverted mikroskop görüntüsü a) SW480 hücresi b) BHK-21 hücresi. ....	40
Şekil 4.2. DAPI boyaması floresan mikroskop görüntüsü (uyarma/emisyon maks: 358/461 nm) a) SW480 hücre hattı 200X büyütme b) BHK-21 hücre hattı 200X büyütme. ....	40
Şekil 4.3. SW480 hücresinin büyüme eğrisi grafiği. ....	41
Şekil 4.4. BHK-21 hücresinin büyüme eğrisi grafiği. ....	41
Şekil 4.5. Şap virüsü A,0 ve Asia1 serotiplerinin SW480 hücre hattı ve kontrol grubu BHK-21 An31 hücre hattındaki plak morfolojileri. ....	42
Şekil 4.6. Transforme edilen bakterinin ampicillin içeren LB agarda üreme görüntüsü. ....	43
Şekil 4.7. Transforme edilen bakterinin LB broth besiyerinde üreme görüntüsü. ....	43
Şekil 4.8. İzole edilen plasmidlerin agaroz jel görüntüsü (kontrol plasmid 6.6 kb, SDC1 plasmid 7.5 kb ve integrin $\beta 6$ 8.9 kb). ....	45
Şekil 4.9. İzole edilen plasmidlerin PZR sonrası agaroz jel görüntüsü (SDC1 142bç, integrin $\beta 6$ 144bç). .....	45
Şekil 4.10. Transfeksiyon uygulama dozunun belirlenmesi GFP ışımalarının fotoğrafları. ....	46
Şekil 4.11. Transfeksiyondan 48 saat sonra kontrol plasmid, SDC1, integrin $\beta 6$ plasmidlerinde GFP ışımalarının fotoğrafları. ....	47

Şekil 4.12. SDC1, integrin  $\beta 6$  ve kontrol plasmid ile transfekte SW480 hücrelerinde uyarılmamış SW480'e oranla ifade miktarları, A: SDC1 geni, B: integrin  $\beta 6$  geni, C: integrin  $\alpha v$  geni (n: 3; p: > 0,5 (ns), 0,0461 (\*)).....48

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. HSPG'leri reseptör olarak kullanan virüsler (Cheudjeu, 2021). .....	9
Çizelge 2.2. Geçici ve Kalıcı Transfeksiyon Arasındaki Farklar (Sheikh ve ark.,2017). .....	12
Çizelge 2.3. Transfeksiyon metodları (Sheikh ve ark.,2017; Kim ve Eberwine,2010). .....	13
Çizelge 2.4. Yaygın olarak kullanılan antibiyotik ve antimiyotik tedavileri (Langdon, 2004). .....	19
Çizelge 3.1. Transfeksiyon doz denemesi oranları.....	33
Çizelge 3.2. RNA primer karışımı.....	36
Çizelge 3.3. Ters transkripsiyon karışımı.....	36
Çizelge 3.4. Primer dizileri.....	37
Çizelge 3.5. PZR reaksiyon karışımı.....	37
Çizelge 3.6. PZR ısı döngü süreleri. ....	38
Çizelge 4.1. SDC1 ve kontrol plasmidinin spektrofotometre ölçüm değerleri.....	44

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$^{\circ}C$	Celsius derece
$\mu$	Mikron

### Kısaltmalar

BHK-21	Yavru Hamster Böbrek Hücre Hattı
cDNA	Komplementer DNA
CPE	Sitopatik Etki
EGDMA	Etilen Glikol Dimetakrilat
DAPI	4',6-diamidino-2-fenil-indole
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPBS	Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
EDTA	Etilendiaminotetraasetik asit
FMD	Şap hastalığı
FMDV	Şap hastalığı virüsü
FSS	Fötal Sığır Serummu
FTM	Fluid thioglycollate medium
GAG	Glikozaminoglikanlar
GFP	Yeşil Floresan Protein

HSPG	Heparan Sülfat Proteoglikanlar
mRNA	Mesajcı RNA
OIE	Dünya hayvan sağlığı örgütü
ORF	Açık okuma dizisi
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
pDNA	Plasmid DNA
PDT	Popülasyon ikiye katlanma süresi
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RGD	Arginin-Glisin-Aspartat
RT-PZR	Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDC1	Sindekan 1
SW480	İnsan kolon karsinom hücre hattı
TSB	Tryptone soya broth
TUR	Türkiye
VP1-4	Viral Kapsid Protein 1-4





# 1. GİRİŞ

Şap hastalığı, dünyadaki ekonomik açıdan en önemli hayvan virüsü hastalığı olarak kabul edilmektedir. Hayvan ve hayvansal ürünlerin ticaretini kısıtladığından önlenmesi, kontrolü ve nihai eradikasyonu, tüm büyük hayvan sağlığı programlarının ana hedefi olarak kabul edilmektedir. Şap virüsünün teşhisi, izolasyonu, serotiplendirilmesi ve aşı üretilmesi, salgınların yayılmasını durdurmada kritik öneme sahiptir. Şap virüsünün farklı serotipleri ve bunların alttıpleri enfeksiyon sırasında farklı reseptör etkinliğine sahiptir (Duque ve Baxt, 2003). Bu reseptörlerin tanımlanması ve şap virüsü (FMDV foot-and-mouth disease virüsü) patogenezisindeki fonksiyonları teşhis ve aşı üretimi için yol göstericidir, bu da şap hastalığı ile mücadelede önemlidir. Bu tez çalışmasının amacı, şap virüsünün özellikle hücre kültürüne adaptasyonunda reseptör olarak kullandığı bilinen heparan sülfat proteoglikanların (HSPG) hangi tipinin burada görev aldığını açıklığa kavuşturmadır. Literatürdeki bu eksikliğin giderilmesi, şap virüsünün çoklu hücre bağlanma mekanizmalarına ilişkin hücre kültürü adaptasyonundaki öneminin anlaşılmasına katkı sağlayacaktır. Ayrıca, Şap hastalığı ile mücadelede aşı üretiminin kilit basamağı olan sahadan izole edilen şap virüsünün yeni aşı suşu haline getirilmesinde önemli katkı sağlayacaktır. En etkili aşular, yeni aşı suşlarının periyodik gelişimini gerektirdiği için sahadan yeni izole edilen suşun hücreye adaptasyonu önemlidir. Virüsün izolasyonundan aşı üretimine kadar olan sürecin uzaması aşılama programının uygulanmasını geciktirecektir, bu da salgının kontrol altına alınmasında önemlidir. Çalışma kapsamında aday reseptör olarak seçtiğimiz sindekan 1 (SDC1)'in hücre kültürüne adapte olmuş suşlardaki rolü araştırılacaktır. Literatürde, şap virüsünün hücreye girişinde rol oynayan integrin alt tiplerinin ( $\alpha\beta 1$ ,  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 6$  ve  $\alpha\beta 8$ ) reseptör olduğu belirlenmiş ancak heparan sülfatların virüs-hücre etkileşiminde rolleri açıklık kazanmamıştır. Bu tez kapsamında, heparan sülfatlardan aday reseptör olarak sindekan 1 (SDC1) seçilmiştir. Şap virüsüne duyarlı olmayan insan kolon karsinom hücre hattına (SW480), SDC1 ve integrin  $\beta 6$  geni içeren plasmid transfekte edilerek yeşil floresan protein (GFP) ışması ile transfeksiyon verimliliği ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile gen ifadesindeki artış belirlenmiştir. Transfeksiyon sonrası plak test yöntemi ile virüs inoküle edilerek duyarlılığındaki değişimler incelenmiştir.

Tez kapsamında yapılan hücre kültürü çalışmaları Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Hücre Biyolojisi laboratuvarı ve Şap Enstitüsü Müdürlüğü laboratuvarlarında,

transformasyon, transfeksiyon ve PZR alışmaları Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında, virüs çalışmaları şap Enstitüsü Müdürlüğü laboratuvarlarında yapılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Şap Hastalığı ve Etkeni

Şap hastalığı, sığır, domuz, koyun, keçi gibi evcil ve birçok yabani tür dahil olmak üzere çift tırnaklı hayvanları etkileyen dünya genelinde etkisini gösteren oldukça bulaşıcı viral bir hastalıktır (Şekil 2.1). Hastalık ateş, iştahsızlık, topallık ve ağız, ayak, burun ve meme başlarında veziküler lezyonların ortaya çıkması ile karakterizedir (Grubman ve Baxt, 2004).

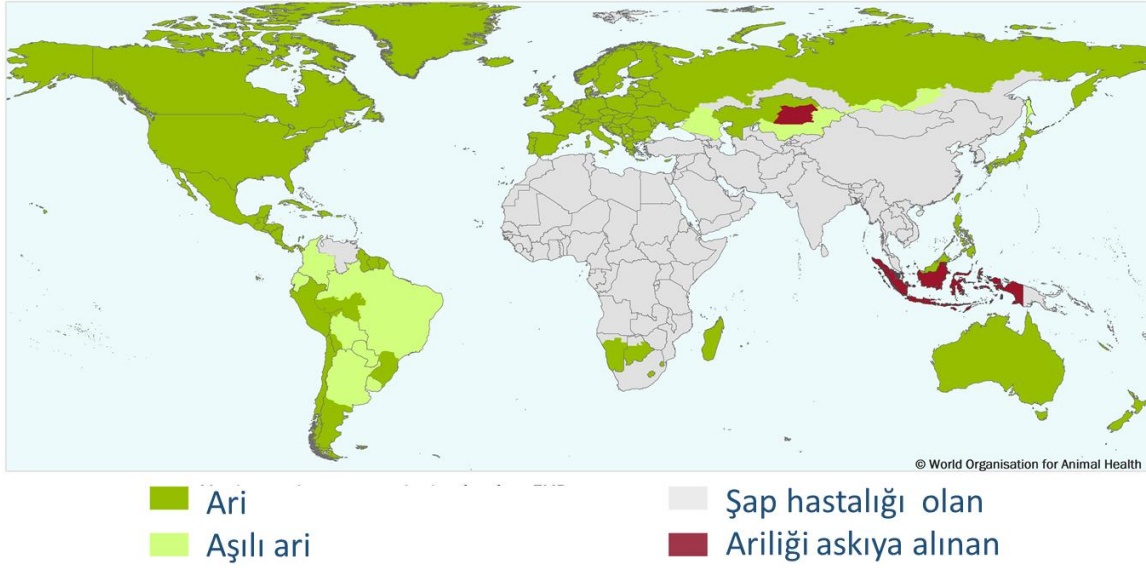
Tarihçesi oldukça eski olan şap hastalığı, ilk yazılı kayıtları 1546'da İtalya'nın Verona yakınlarındaki sığırlarda meydana gelen bir salgını tanımlayan İtalyan hekim Girolamo Fracastoro (Latin: Hieronymus Fracastorius)'nun hastalığı tanımına kadar uzanmaktadır (Fracastorius, 1546; Mahy, 2005). Friedrich Loeffler ve Paul Frosch, 1897'de şap hastalığının neden olduğu veziküllerden elde ettikleri lenf sıvısında bir etkenin hastalığa neden olduğunu gösterdiler (Loeffler ve Frosch, 1898). Osmanlı'da "humma-i kulâi" halk arasında ise "dabak" olarak bilinen şap hastalığı vakası, ilk defa 1914 yılında kayıtlara geçmiştir (Sütçü,1986).

Hastalığın akut evresinde hayvanlar ciddi rahatsızlık çekerler, genellikle mortalite düşüktür ancak ölüm, virüsün kalbi etkileyebildiği genç hayvanlarda yüksek olabilir. Hava yolu ile yayılma sonucu yüksek bulaşıcılığa bağlı olarak morbidite yüksektir bu da hayvanların ve ürünlerinin uluslararası ticaretini engelleyerek ciddi ekonomik sonuçlara neden olur (Grubman ve Baxt, 2004; Diaz-San Segundo ve ark., 2017). Buna ek olarak, küresel pazarların hızla genişlemesi ve terör saldırılarının sayısındaki artış, şap hastalığının bir biyolojik silah olarak kullanılması konusunda dikkati artırmıştır (Hietela ve Ardans, 2003).

Şap hastalığının etkeni olan şap virüsü (*Foot-and-mouth disease virus* FMDV), *Picornaviridae* ailesinin aside dayanıksız olan *Aphthovirus* cinsinde yer alan bir türdür. Şap virüsü pH 6.8'in altında ve pH 9'un üzerinde stabil değildir. Virion, yaklaşık 30nm, zarfsız, ikozahedral yapıda kapsidin içerisinde yaklaşık 8400 bazlık pozitif anlamlı tek iplikli RNA'ya (+ssRNA) sahiptir (Mahy, 2005). Bugüne kadar yedi serotip (A, O, C, Asya 1 ve Güney Afrika Bölgesi 1, 2 ve 3) serolojik olarak ve her serotip içinde birçok alt tipler tanımlanmıştır (Bachrach, 1968). Serotipler birbirlerine karşı çapraz bağışıklık oluşturmaz (Grubman ve Baxt, 2004).

### WOAH Members' official FMD status map

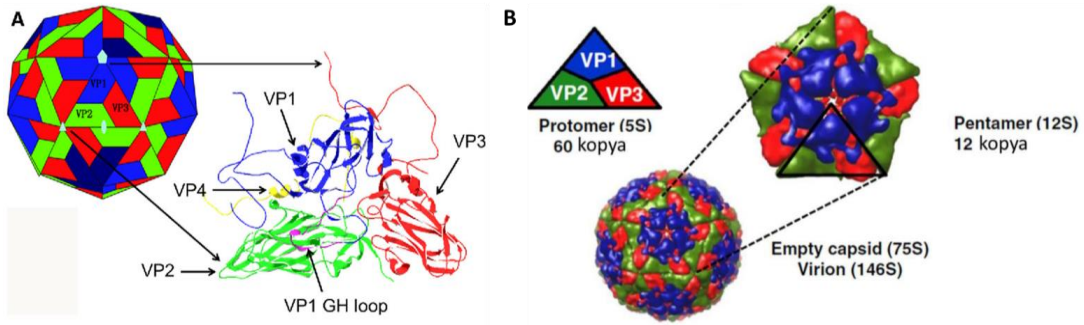
Last update May 2022



Şekil 2.1. Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (OIE/WOAH) Şap Hastalığı Durum Haritası, Mayıs 2022 (OIE/WOAH,2022).

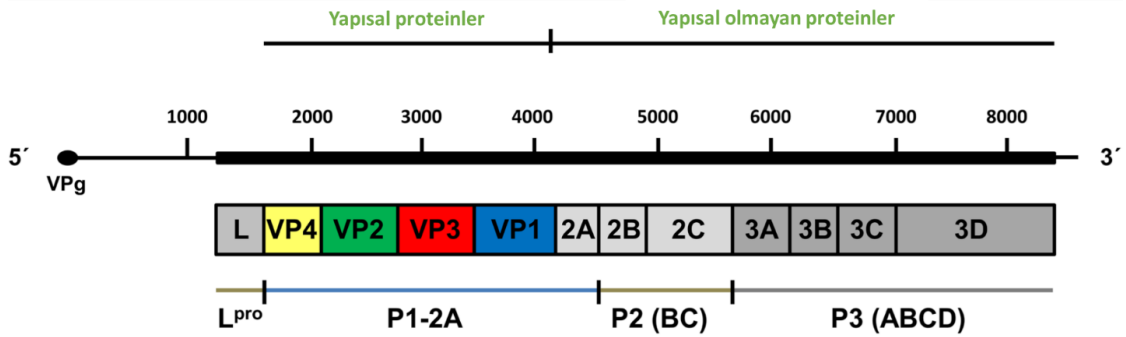
## 2.2. Şap Virüsünün Genel Özellikleri, Yapısı ve Replikasyon Döngüsü

Şap virüsü VP1,VP2,VP3 ve VP4 (1D, 1B, 1C ve 1A olarak da bilinir) olarak adlandırılan dört yapısal kapsid proteininden oluşur (Şekil 2.2a ve Şekil 2.3). Bu dört kapsid proteini bir araya gelerek protomeri, beş protomer bir pentameri ve oniki pentamer (Şekil 2.2b) bir araya gelerek tam bir kapsidi oluşturur (Wang ve ark.,2015). VP1,VP2,VP3 kapsidin dış yüzeyinde yer alırken, VP4 ise iç yüzeyinde yer alır (Jackson ve ark., 1996). VP4 dışındaki, diğer kapsid proteinleri antijenite ile ilişkilidir. VP1’de yer alan G-H ilmiği yedi serotipin tümü arasında yüksek oranda korunmuş arginin-glisin-aspartat (Arg-Gly-Asp, RGD) dizisi içerir. Bu dizi hücre adsorbsiyonunun önemli bir bileşenidir ve viral enfeksiyonun başlamasına aracılık eder (Jackson ve ark.,1996; Wang ve ark.,2015).



Şekil 2.2. A) Şap virüsünün kapsidini oluşturan yapısal proteinleri (Han ve ark.,2015)

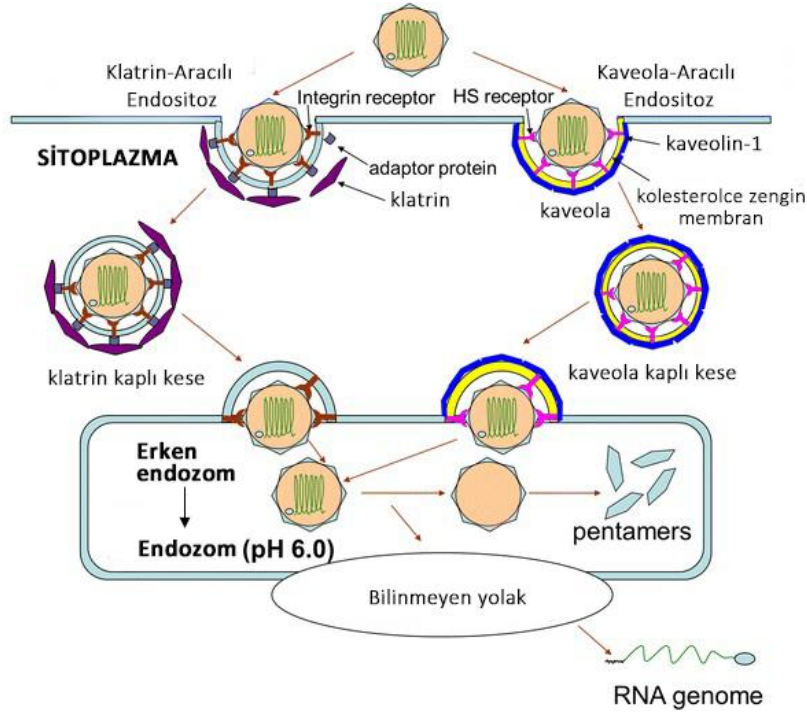
B) Şap virüsünün kapsid yapısı (Jamal ve Belsham, 2013).



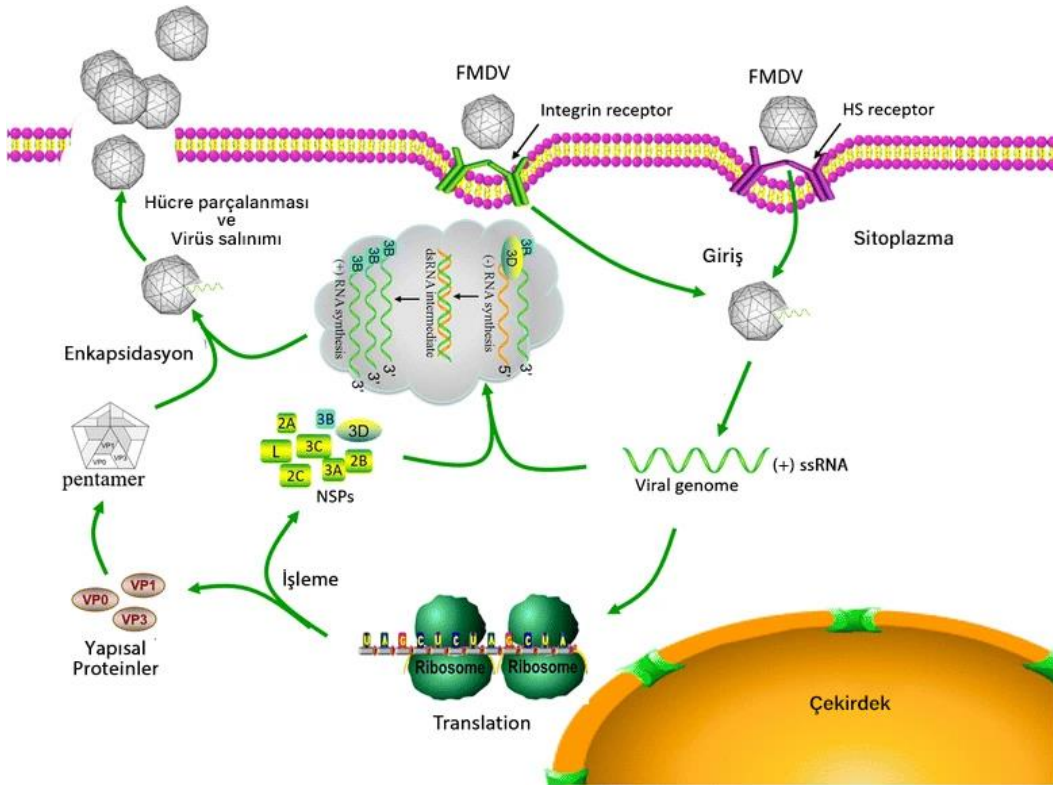
Şekil 2.3. Şap virüsünün yapısal ve yapısal olmayan proteinleri kodlayan genom dizisi (Jamal ve Belsham, 2013).

Şap virüsünün duyarlı konakçı hücreyi enfekte edebilmesi için ilk önce spesifik reseptörlere tutunması gereklidir (Wang ve ark.,2015). Tutunmayı takiben reseptör aracılı endositoz ile hücreye girer (penetrasyon). İntegrin reseptörlerini kullanan virüsler kltrin aracılı endositoz aracılığıyla, heparan sülfata bağlanan virüsler ise kaveola aracılı endositozisi kullanarak hücreye girer (Şekil 2.4) (O'Donnell ve ark.,2005; O'Donnell ve ark.,2008). Reseptörler, viral patogenez ve doku tropizmi için sorumlu temel faktörlerdir (Zahid, 2016). Virüsün hücreye girişinden sonra kapsidin parçalanması ile dışarı çıkan tek iplikli RNA mesajcı RNA (mRNA) olarak işlev görür ve viral RNA sentezi ve translasyonda rol oynar. Şap virüsü yapısal olmayan proteinleri ve kodlanmayan bölgeleri sayesinde konak translasyon mekanizmasını baskılar, sinyal iletimi ve bağışıklık tepkisi ile bağlantılı hücresel proteinleri parçalar. İfade olan yapısal proteinler zayıf kimyasal bağların etkileşimi yoluyla protomeri, protomerler pentamerleri, pentamerler ise kapsidi

oluşturmak için bir araya gelerek olgun virionları oluşturur. Olgun virüsler konak hücreyi parçalamak suretiyle dışarı salınır (Şekil 2.5) (Han ve ark., 2015; Gao ve ark., 2016).



Şekil 2.4. Klatrin ve kaveola aracılı endositoz (Han ve ark.,2015).



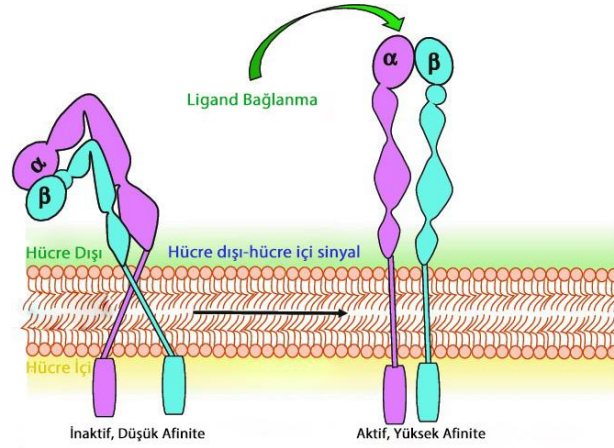
Şekil 2.5. Şap virüsünün konakçı hücrede yaşam döngüsü (Gao ve ark., 2016).

## 2.3. Şap Virüsünün Hücresel Reseptörleri

### 2.3.1. İntegrinler

İntegrinler  $\alpha$  ve  $\beta$  iki alt birimin heterodimer oluşturması ile meydana gelen hücre yüzeyine bağlı tip 1 transmembran proteinlerdir (Şekil 2.6). İntegrinler adezyonda, hücre dışı madde ile ilişki kurmada ve bağlanmada önemlidir (Zahid, 2016). İntegrin heterodimerleri büyük bir hücre dışı (ektodomain) bölge, transmembran bölge ve genellikle kısa hücre içi sitoplazmik kuyruklardan oluşur (Kadry ve Calderwood, 2020). İlk şap virüsü reseptörü olarak integrin  $\alpha\beta3$ , anti- $\alpha\beta3$  monoklonal antikörünün (MAb) bağlanmayı engellendiği gösterilerek keşfedilmiştir (Berinstein ve ark.,1995). Başka bir çalışmada, şap virüsüne duyarlı olmayan SW480 hücresine  $\beta6$  geni transfekte edilerek  $\alpha\beta6$ 'nın hücre yüzeyinde ifadesi sonucu duyarlı hale geldiği, ayrıca anti- $\alpha\beta6$  MAb kullanılarak virüs bağlanmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (Jackson ve ark., 2000). Diğer bir integrin olan  $\alpha\beta1$ , CHO hücrelerinde ifade edilerek virüs bağlanması için reseptör olduğu gösterilmiştir (Jackson ve ark., 2002). Bir diğer çalışmada ise, yine duyarlı olmayan SW480 hücresine tranfeksiyon yapılarak  $\alpha\beta8$ 'in şap virüsü reseptörü olduğu kanıtlanmıştır (Jackson ve ark., 2004).

Şap virüsünün yüksek derecede korunmuş RGD dizisi ile integrin proteinleri arasında EDTA'ya dirençli son derece stabil bir kompleks oluşturduğu kanıtlanmıştır (Wang ve ark.,2015). Yukarıda tanımlanan dört integrinin her biri de, bir RGD motifine bağlanarak ligandları tanımlar (Han ve ark., 2015). Şap virüsünün enfeksiyon sırasında hücreye bağlanırken bu integrinlerden birden fazlasını reseptör olarak kullanabildiği gösterilmiştir (Duque ve Baxt, 2003). Şap virüsleri hücreleri enfekte ederken integrinleri farklı etkinliklerde kullandıkları da saptanmıştır. "A serotipi"  $\alpha\beta3$  ve  $\alpha\beta6$ 'yı yüksek etkinlikte kullanırken, "O serotipi"  $\alpha\beta6$  ve  $\alpha\beta1$ 'i,  $\alpha\beta3$ 'e göre daha yüksek etkinlikte kullandığı tespit edilmiştir (Duque ve Baxt, 2003). Şap virüsü, Picornaviridae familyasında dört farklı integrin proteinini ( $\alpha\beta1$ ,  $\alpha\beta3$ ,  $\beta6$  ve  $\alpha\beta8$ ) reseptör olarak kullanabilen tek virüstür (Wang ve ark.,2015). Ancak, reseptörlerin rolleri, hangi yolağı izledikleri henüz tam olarak anlaşılamamıştır (Zahid,2016).

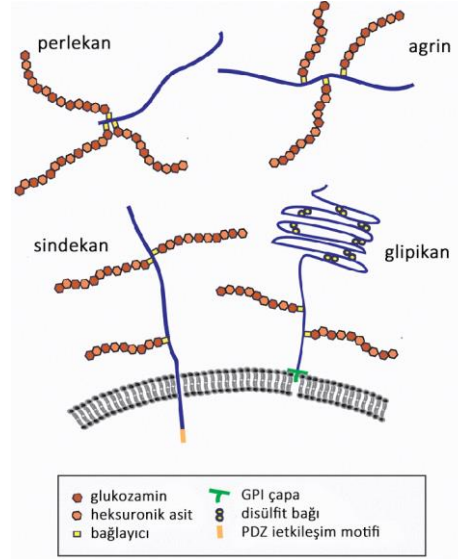


Şekil 2.6. İntegrinin  $\alpha$  ve  $\beta$  alt ünitelerinin şematik gösterimi (Mezu-Ndubuisi ve Maheshwari, 2021).

### 2.3.2. Heparan Sülfat Proteoglikanlar (HSPG)

Heparan sülfat proteoglikanları (HSPG), hücre yüzeyinde ve hücre dışı maddede bulunan bir veya daha fazla kovalent olarak bağlanmış heparan sülfat zinciri ve bir tür glikozaminoglikan (GAG) içeren glikoproteinlerdir. Konumlarına göre; HSPG'ler hücre membranına bağlı, sindekanlar ve glipikanlar; hücre dışı maddeye salınan agrin, perlekan ve tip XVIII kollajen; salgı vezikülü proteoglikanı, serglisin olarak gruplandırılmaktadır (Şekil 2.7) (Sarrazin ve ark., 2011). Sindekanlar tip 1 transmembran glikoprotein olan tek gruptur. Sindekan-1 lökositlerde bulunur ve birçok epitelde zengindir, sindekan-2 endotelde ve fibroblastlarda, sindekan-3 nöral dokularda ve sindekan-4 çoğu dokuda bulunur (Gondelaud ve Ricard-Blum, 2019). Sindekanlar reseptör veya yardımcı reseptör olarak ve hücrede birçok görevde rol alırlar (Gondelaud ve Ricard-Blum, 2019).





Şekil 2.7. Konumlarına göre heparan sülfat proteoglikanlar; perlekan, agrin, sindekan ve glipikan (Rhiner ve Hengartner, 2006).

Virüsler de dahil olmak üzere birçok enfeksiyöz ajan, bağlanma için konakçı hücrelerin yüzeyindeki özellikle glikozaminoglikanlar (GAG'lar) ve heparan sülfat proteoglikanlar ile etkileşime girer (Jinno ve ark.,2015; Cagno ve ark.,2019). Sülfatlanmış polisakkarit grubu HSPG'lere negatif yük sağlar ve bu da virüslerle etkileşime girme özelliği kazandırır (Wang ve ark.,2015). HSPG'lerin şap virüsü de dahil olmak üzere birçok farklı virüsün hücre yüzeyine ilk bağlanmasına aracılık etmede reseptör olarak görev yapmaktadır (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. HSPG'leri reseptör olarak kullanan virüsler (Cheudjeu, 2021).

Virüs	Reseptör	Referans
FMDV: Şap virüsü	HSPG	Jackson ve ark.,1996; Sa-Carvalho ve ark.,1997
HVC: hepatitis C virüsü	Sindekan 1	Shi ve ark., 2013
HPV-16:İnsan papillomavirüs tip 16	Sindekan 1	Surviladze ve ark., 2015
HSV-1: herpes simpleks virüs tip 1	Sindekan 1 ve 2	Bacsa ve ark., 2011
SARS-CoV-2: Şiddetli akut solunum yolu sendromu koronavirüsü 2 (Covid 19)	Sindekan 1ve 4	Bermejo-Jambrina ve ark., 2020; Hudak ve ark., 2020

DENV: Dang virüsü	Sindekan 2	Okamoto ve ark., 2012
HIV-1: İnsan immün yetmezlik virüsü tip 1	Sindekanlar	Saphire ve ark., 2001
HVB: hepatitis B virüsü HVB: hepatitis D virüsü	Glipikan-5	Verrier ve ark., 2016
SARS-CoV: Şiddetli akut solunum yolu sendromu koronavirüsü	HSPG	Lang ve ark., 2011
HCoV-NL63: İnsan koronavirüs NL63	HSPG	Milewska ve ark., 2014
HTLV-1: İnsan T-lenfotropik virüs tip 1	HSPG	Jones ve ark., 2005

Yapılan bir çalışmada, “O tipi” şap virüsünün hücreye girişinin karmaşık olduğu, heparan sülfat aracılığıyla ilk temasın nasıl olduğu ve şap virüsü için afiniteye sahip olduğu üç yolla doğrulanmıştır. İlki trombosit faktör 4 ile HSPG ve heparine bağlanması inhibe edilerek; ikincisi, HSPG’da bulunan glikozidik bağı parçalayan heparinaz I ve III enzimi ile bağlanma engellenerek; üçüncüsü, GAG biyosentezinde eksik olan mutant CHO hücre hatları oluşturularak gösterilmiştir (Jackson ve ark., 1996). Diğer bir çalışmada, hücre kültürüne adapte olmuş şap virüsü suşlarının HSPG’a affiniteleri integrine göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Sa-Carvalho ve ark., 1997). Bir diğer çalışmada şap virüsünün RGD dizisi ile HS bağlanma bölgesinin yaklaşık 15A° ile oldukça yakın olduğu belirlenmiştir (Logan ve ark., 1993). Picornaviridae ailesi üyelerinden olan şap virüsü de hücre kültürüne adaptasyonundan sonra kapsid içindeki pozitif yüklü amino asitler sayesinde HSPG’ye bağlanabilmektedir (Cagno ve ark., 2019).

Şap virüsünün farklı serotipleri ve bunların alttipleri enfeksiyon sırasında farklı reseptör etkinliğine sahiptir. İntegrinler ve HSPG’ler dışında şap virüsü için üçüncü grup alternatif reseptörlere yönelik çalışmalar da devam etmektedir. Gerek saha suşlarının gerekse hücre kültürüne adapte olmuş şap virüsü suşlarının hücre reseptörleri ve diğer enfeksiyon altında yatan mekanizmaların araştırılması şap hastalığının önlenmesi için yeni görüşler ve yöntemler sunmaktadır. Şap virüsü ligand-reseptör ilişkisine yönelik çalışmalar hem virüslerin yayılma yollarını, yöntemlerini, patojenik özelliklerini hem de enfeksiyon yollarını, replikasyon aşamalarını, patogenezi ve konak tropizmini açıklamada yardımcı olur (Wang ve ark.,2015).

## **2.4. Moleküler Biyolojik Uygulamalar**

### **2.4.1 Transformasyon**

Yatay gen transfer süreçlerinden biri olan transformasyon, kendi hücrelerine yabancı olan eksojen DNA'nın hücre içerisine alınması ve alıcı hücrede fonksiyonel ifadesini içerir. Bakteriyel transformasyon, yabancı DNA'nın (Örn: plazmid) bakterilere aktarımını tanımlamada kullanılır. DNA, polar olmayan ve büyük boyutta hidrofilik bir molekül olduğu için bakterilerin hücre zarlarından doğrudan geçemez. Bu nedenle, transformasyonu sağlamak için konakçı bakteri hücreleri DNA'ya geçirgen hale getirilir ve böylece yabancı DNA'yı alma etkinlikleri artar. Çeşitli yöntemlerle geçirgen hale getirilen bu hücrelere kompetan/yetkin bakteri denir ( Masoodi ve ark.,2020).

Kompetan özelliği hücrelere yaygın olarak iki farklı şekilde kazandırılabilir. Yöntemlerden biri, kimyasal katyonlar (kalsiyum klorür, rubidyum klorür ) kullanılarak yapılan kimyasal transformasyon yöntemidir. Bu yöntemde yabancı DNA ve bakteri hücresi kalsiyum klorür ile muamele edilir. Kalsiyum klorür tuzunun ürettiği  $Ca^{2+}$  katyonu, hücre zarını deler ve negatif yüklü DNA molekülleri ile kompleks oluşturur. Fakat bu işlem makromolekül olan DNA'nın hücre zarını geçebilmesi için yeterli değildir, kısa bir ısı şokuna ihtiyaç vardır. Bunun için önce buz üzerinde inkübasyonun ardından uygulanan  $42^{\circ}C$  ısı şoku, kalsiyum klorür ile muamele edilmiş hücrelerin hücre zarını güçlü bir şekilde depolarize eder ve DNA'nın hücre içine alınması sağlanır. Buzda son kez inkübasyon ile zar yapısı eski haline çevrilir (Mandel ve Higa, 1970; Masoodi ve ark.,2020).

Bakterilerin transformasyonu için diğer bir yöntem olan elektroporasyon yönteminde, bakteri hücresi yabancı DNA ile karıştırılır ve elektrik akımı uygulayarak hücre zarında gözenekler oluşturulur. Bu şekilde oluşturulan gözenekler, DNA'nın hücrelere girmesine neden olur (McIntyre ve Harlander, 1989).

### **2.4.2 Transfeksiyon**

Transfeksiyon, bir gen transferi şeklidir ve nükleik asit materyalinin (DNA veya RNA) hücre içine yerleştirilmesi olarak tanımlanabilir. Memeli hücrelerine transfekte edilebilen genetik materyaller arasında DNA, RNA, mRNA, siRNA, miRNA ve shRNA bulunur.

Transfeksiyon, hücrelerde genlerin ve gen ürünlerinin işlevinin incelenmesini sağlayan güçlü bir analitik araçtır. Transfeksiyonun temel amacı, hücrelerde belirli gen ifadesini artırarak veya inhibe (miRNA, shRNA veya siRNA ile gen susturma) ederek genlerin veya gen ürünlerinin işlevini incelemek ve memeli hücrelerinde rekombinant proteinler üretmektir (Sheikh ve ark.,2017).

Transfekte edilmiş nükleik asitler, transfeksiyon yöntemine bağlı olarak hücrede geçici veya kalıcı olarak kalabilir. Bunların birbirine göre farklılıkları bulunur (Çizelge 2.2).

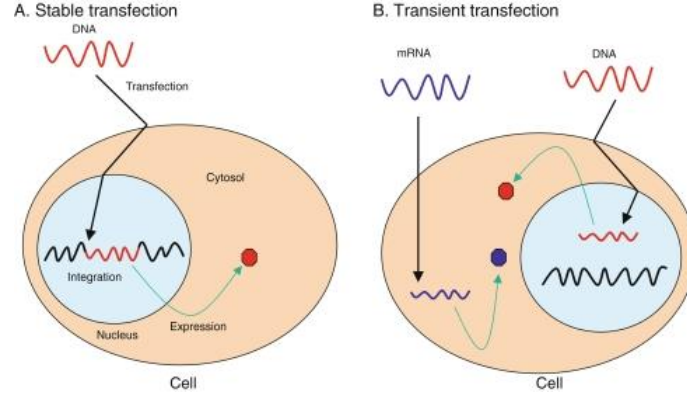
Çizelge 2.2. Geçici ve Kalıcı Transfeksiyon Arasındaki Farklar (Sheikh ve ark.,2017).

<b>Geçici Transfeksiyon</b>	<b>Kalıcı Transfeksiyon</b>
Kimyasal veya fiziksel metodlar	Biyolojik veya fiziksel metodlar
Kısa süre ekspresyon	Uzun süre ekspresyon
Genoma entegre olmaz	Genoma entegre olur

Kalıcı transfeksiyon, transfekte DNA'nın ya konakçı hücrenin kromozomal DNA'sına entegre edildiği ya da epizomal formda tutulduğu bir transfeksiyondur (Şekil2.6). Dolayısıyla konakçı hücreler çoğaldıktan sonra da transgen ifadesini sürdürürler. Daha sonra ilgili genetik materyali içeren hücreleri seçmek ve ilgili geni kalıcı olarak eksprese eden bir hücre hattı oluşturmak için antibiyotik direnç geni gibi bir seçim markeri kullanılabilir. Belirli bir antibiyotiğe direnci kodlayan bir gen, transfeksiyon amacıyla bir plazmid içine dahil edildiğinde hücrelerin belirli bir antibiyotik varlığında büyümelerine izin verir. Bu şekilde hücreler, antibiyotik varlığında büyüyerek seçilebilir (Sheikh ve ark.,2017).

Geçici transfeksiyon, değiştirilmiş gen veya protein ifadesinin kısa süreli etkisini araştırmak için kullanılabilir. Geçici olarak transfekte edilen yabancı DNA genomla bütünleşmez, genler sınırlı bir süre (24-96 saat) için eksprese olur (Şekil 2.8). Geçici olarak transfekte edilen genetik materyaller çevresel faktörler ve hücre bölünmesi sırasında kaybolur. Bu şekilde hücrelere aktarılan DNA'nın çekirdeğe yerleştirildiği gösterilmiştir. Transkripsiyonel gen aktivitesi üzerindeki etkisi transfeksiyondan 24-48-96 saat sonra görülebilmektedir. Transfekte RNA ise transfeksiyondan sonra 24-72 saat

boyunca ölçülebilen optimal hedef etkileri ile sitoplazmada bulunur (Sheikh ve ark.,2017; Kim ve Eberwine, 2010).



Şekil 2.8. a) Kalıcı transfeksiyon, b) Geçici transfeksiyon (Kim ve Eberwine,2010).

Birçok transfeksiyon yöntemi geliştirilmiştir. Temel prensip, negatif yüklü genetik materyali negatif yüklü bir hücre zarına aktarmaktır. DNA veya RNA'nın negatif yükünü nötralize edebilen kimyasal yöntemlerle, genetik materyalin hücreye geçişine izin vermek için plazma zarının geçici olarak bozulmasına neden olabilecek fiziksel yöntemler veya nükleik asit transferine aracılık eden virüsleri kullanan biyolojik yöntemler altında çeşitli metodlar (Çizelge 2.3) ile gerçekleştirilebilir (Sheikh ve ark., 2017).

Her yöntem, hücre tipine ve deneyin amacına bağlı olarak dikkate alınması gereken farklı yaklaşımlar kullanılır. İdeal yöntem yüksek transfeksiyon verimine, düşük hücre toksisitesine, normal fizyoloji üzerinde minimum etkiye sahip olmalı ve kullanımı kolay ve tekrarlanabilir olmalıdır (Kim ve Eberwine,2010). Her yöntemin kendine özgü avantajları ve dezavantajları vardır, bu nedenle optimum yöntem deneysel tasarıma ve amaca bağlıdır.

Çizelge 2.3. Transfeksiyon metodları (Sheikh ve ark.,2017; Kim ve Eberwine,2010).

Sınıf	Metod	Avantaj	Dezavantaj	Örnek
<b>Biyolojik</b>	<i>Virüs aracılı</i>	Yüksek transfeksiyon verimliliği Transfeksiyonu zor hücrelerde etkili	BSL2 laboratuvar gerekli Mutagenез riski Sınırlı boyutta DNA	Retrovirüsler Lentivirüsler HSV, Adeno Virüs

			İmmünojenisite	
<b>Kimyasal</b>	<i>Katyonik polimer</i>	Nispeten kolay uygulanabilir Nispeten ucuz Uzun genomlara uygun	Değişken transfeksiyon etkinliği Bazı hücrelerde toksik	Dietilaminoetil (DEAE)-dekstran polibren, polietilenimin
	<i>Kalsiyum fosfat</i>			
	<i>Katyonik lipid</i>			lipofectamin
<b>Fiziksel</b>	<i>Mikroenjeksiyon</i>	Transfeksiyonu zor hücrelerde etkili	Tekniğe özgü cihaz ve kullanıcı gerekli	Micro-needle AFM tip
	<i>Biyolistik parçacık iletimi</i>	Tek hücre transfeksiyonuna izin verir	Hücrelere hasar verebilir	Gene Gun Amaxa Nucleofector
	<i>Elektroporasyon</i>			
	<i>Lazerfeksiyon</i>	Vektör gerekli değil		

#### 2.4.2.1. Biyolojik Yöntemler

Virüsler, nükleik asit materyali için taşıyıcılar olarak kullanılabilir ve virüs aracılı gen transferi, transdüksiyon olarak da adlandırılabilir. Bu teknik oldukça etkilidir ve virüsün konakçı genomuna entegrasyonu viral doğası nedeniyle *in vivo* sürdürülebilir transgen ifadesi elde etmek için uygundur (Kim ve Eberwine,2010). Genellikle antibiyotik direncine dayanıklı gen, lusiferaz veya yeşil floresan protein (GFP) ifadesi ile seçilebilir bir işaretleyici gen, ilgili nükleik asit materyalinin yanına eklenir ve başarıyla transfekte edilmiş hücrelerin seçilimine izin verir (Stepanenko ve Heng, 2017). Yaygın olarak kullanılan viral vektörler, adenovirüsleri veya adeno-ilişkili virüsleri, retrovirüsleri ve lentivirüsleri içerir, bunların hepsi nispeten büyük DNA uzunluğuna (7,5-9 kb) izin verir. Örneğin retrovirüs murin lösemi virüsü (MLV), insanlarda sürdürülebilir transgen ifadesini oluşturmak için viral bir vektör olarak kullanılmıştır (Sheikh ve ark.,2017).

Virüs aracılı transfeksiyonun en büyük dezavantajları immünojenite ve sitotoksitedir. Viral bir vektörün eklenmesi, enflamatuar reaksiyona ve kalıcı bir mutasyona neden olabilir, çünkü viral vektörler, konakçı genomuna rastgele entegre olurlar, bu da tümör baskılayıcı genleri bozabilir, onkogenleri aktive edebilir veya esansiyel genleri kesebilir

(Kim ve Eberwine,2010). Bunların yanı sıra nispeten yoğun emek gerektirmesi ve çoğu virüs için “Biyogüvenlik Seviye 2 (BSL2)” çalışma ortamı gerektirmesi bu yöntemin diğer dezavantajlarından. Bu nedenlerden, virüs aracılı transfeksiyon oldukça etkili olmasına rağmen viral olmayan transfeksiyon yöntemlerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalara ağırlık verilmiştir (Sheikh ve ark., 2017).

#### **2.4.2.2. Kimyasal Yöntemler**

Memeli hücrelerinde ilk başarılı transfeksiyon kimyasal yöntemlerle oluşturulmuştur ve halen yaygın olarak kullanılmaktadır. Kalsiyum fosfat veya katyonik lipid gibi katyonik polimerler kullanılan teknikler benzer prensiplere sahiptirler; negatif yüklü nükleik asit ve katyonik kimyasalın kompleks oluşturması, hedef hücre tarafından endositoz veya fagositoz yoluyla alınmasında negatif yüklü hücre zarı ile yakın bir ilişkiye girmesini sağlar (Sheikh ve ark.,2017; Kim ve Eberwine,2010).

Kalsiyum fosfat transfeksiyon yöntemi DNA: kalsiyum fosfat (1:1) ko-çökeltisinin oluşumuna dayanır. DNA kalsiyum klorür ile karıştırılır ve daha sonra karışım, bir çökelti oluşturan kontrollü bir şekilde tamponlu tuz / fosfat çözeltisine ilave edilir. Çökelti daha sonra kültürlenmiş hücrelere dağıtılır ve endositoz veya fagositoz yoluyla alınır. Bu yöntemin çok yönlü olduğu gösterilmiştir ve hem geçici hem de kalıcı transfeksiyon için bir dizi farklı hücrede kullanılabilir. Ancak pH'deki küçük değişiklikler (+/- 0.1 pH) yöntemin verimliliğini önemli ölçüde düşürebilir (Sheikh ve ark.,2017).

Katyonik lipidler veya lipozomlar, yüksek transfeksiyon verimi ve nispi kullanım kolaylıkları göz önüne alındığında, günümüzde kullanılan en popüler transfeksiyon yöntemleri arasındadır. Lipozomal teknikler hem geçici hem de stabil transfeksiyonlar için kullanılabilir. Lipid moleküllerinin katyonik kısmı, negatif yüklü nükleik asitlerle etkileşime girebilir ve bu da toplam net pozitif yüklü bir kompleks ile sonuçlanır. Hücrelere girmenin ya endositoz ya da lipozomun plazma zarı ile füzyonu ile olduğu düşünülmektedir (Sheikh ve ark.,2017; Kim ve Eberwine,2010).

Kimyasal yöntemlerin transfeksiyon verimliliği büyük ölçüde nükleik asit / kimyasal oranı, çözelti pH'si ve hücre zarı koşulları gibi faktörlere bağlıdır, bu nedenle işlem, virüs aracılı yöntemlere kıyasla özellikle *in vivo* düşük transfeksiyon verimi ile sonuçlanır. Bununla birlikte, bu yöntemler nispeten düşük sitotoksite gösterir, mutajenez oluşturmaz, ekstra DNA taşımaz ve paketlenmiş nükleik asit üzerinde boyut sınırlaması

yoktur. Kimyasal transfeksiyon verimi, hücre tipine bağı olarak da değişir (Kim ve Eberwine,2010).

### **2.4.2.3. Fiziksel Yöntemler**

Nükleik asidi hücrelere aktarmak için çeşitli fiziksel yöntemler kullanılabilir ve bunlar etkili olmalarına rağmen özel alet ve ekipman gerektirirler (Kim ve Eberwine,2010).

Doğrudan mikroenjeksiyon, ince bir iğne ile doğrudan enjeksiyon yoluyla hücrelere nükleik asit iletir. Bu teknik, tek tek hücrelerin sitoplazmasına veya çekirdeğine hassas bir şekilde verilmesine izin verse de özellikle çok fazla kullanıcı deneyimi ve beceri gerektiren bir tekniktir. Sıklıkla hücre ölümüne de neden olur (Sheikh ve ark.,2017; Kim ve Eberwine,2010).

Elektroporasyon belki de en yaygın kullanılan fiziksel yöntemdir. Gözenekleri oluşturmak üzere hücre zarını geçici olarak dengesizleştirmek için hücrelere elektriksel darbeler uygulanır. Bu gözenekler, nükleik asit materyalinin hücrelere geçmesine izin verir. Elektroporasyon kullanılarak çok sayıda hücre transfekte edilebilse de, toksisite diğer yöntemlere göre nispeten yüksektir ve başlangıç için daha fazla hücre gereklidir (Çizelge 2.3) (Sheikh ve ark.,2017; Kim ve Eberwine,2010).

Optoporasyon veya fototransfeksiyon olarak da bilinen lazer aracılı transfeksiyonda, nükleik asit materyalini aktarmak için hücreleri geçici olarak geçirgen hale getirmek için bir darbe lazeri kullanılır. Bu yöntem çok verimli olabilir ve özel bir avantajı, çok küçük hücrelerin transfekte edilmesine izin vermesidir. Dezavantajı, kullanımı pahalı bir lazerdir, mikroskop sistemi gerektirir (Sheikh ve ark., 2017).

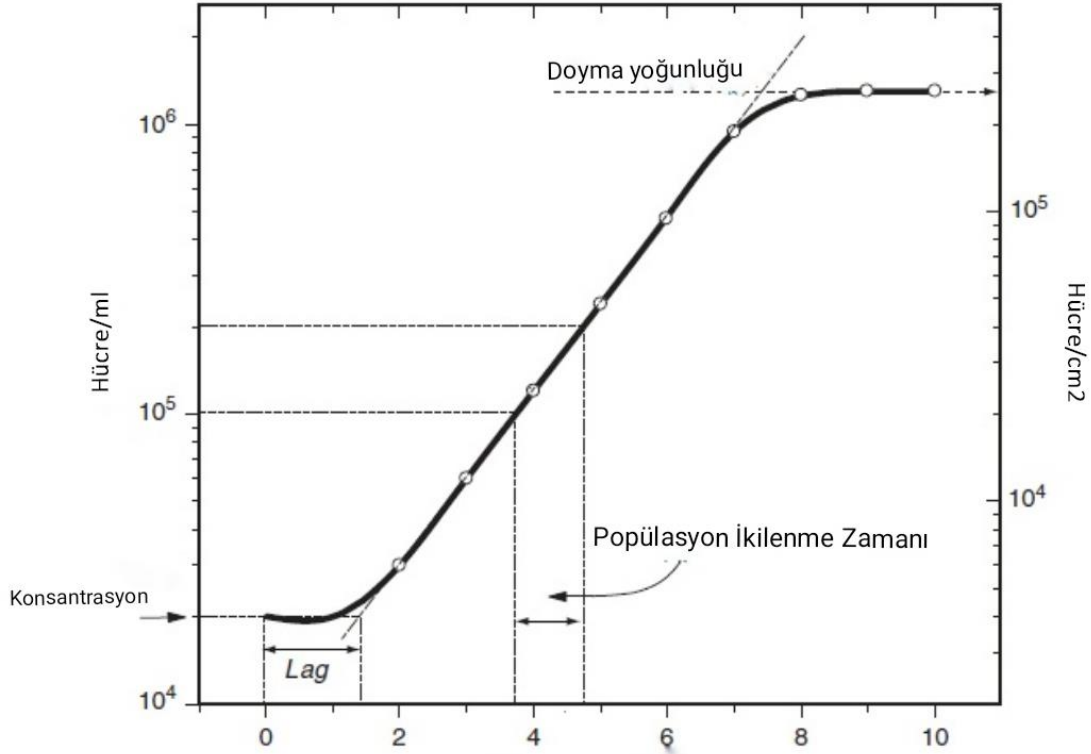
## **2.5. Hücre Kültürü Karakterizasyon Testleri**

### **2.5.1. Üreme Eğrisi ve İkilenme Zamanı**

Hücre kültürü, bir hayvan veya bitkiden izole edilen hücrelerin uygun bir *in vitro* ortamda büyütülmesi anlamına gelir. Hücresel ve moleküler biyoloji deneylerinde kullanılan başlıca metotlardan biridir. Hücre kültürü deneylerinde kültürün büyüme durumu ve popülasyonun ikilenme zamanı oldukça önemlidir. Hücre kültürleri adaptasyon fazı (Lag



fazı), üstel büyüme fazı (Log fazı) ve durağan faz (Plato fazı) olmak üzere her alt kültürlendiğinde (pasaj) yeni bir büyüme döngüsü başlar (Şekil 2.9).  $\text{cm}^2$



Şekil 2.9. Büyüme eğrisi grafiği (Freshney, 2010).

Bu fazlar her hücre hattı için karakteristiktir fakat süreleri farklılık gösterir (Freshney, 2010).

Log ve plato fazları, hücre kültürünün üstel (eksponansiyel) büyüme sırasında popülasyonun ikiye katlanma süresini (PDT) ve plato fazında elde edilen maksimum hücre yoğunluğu hakkında önemli bilgiler verir. PDT ölçümü, bir deneyin başlangıcında ve örnekleme sırasında kültürün durumunu öğrenmek, yeni bir pasajlama için gerekli olan hücre miktarı ve seyreltme oranının hesaplanmasını sağlar. Aynı zamanda hücrelerin besin kullanım konsantrasyonları, hormonal etkiler, toksik etki gösteren ilaçlar gibi farklı inhibitör veya uyarıcıların kültür koşullarına tepkisini ölçmek için kullanılır. Bu nedenle, hücrenin çoğalıp çoğalmadığı ve çoğalıyorsa popülasyonun ikiye katlanma süresini ve hücre döngü süresini belirleyerek deneyler sırasında bu bilgiyi dikkate almak önemlidir. Hücrenin büyüme eğri grafiğinden elde edilen popülasyonun ikiye katlanma süresi, zaman zaman hücre döngüsü ile karıştırılabilmektedir. PDT, tüm hücre kültürü

popülasyonu içinde sıfır oranı da dahil çok sayıda net sonucu olan bölünme oranlarının ortalama bir rakamını ifade ederken, hücre döngüsü süresi, hücre döngüsündeki bir noktadan hücrenin tekrar aynı noktaya ulaşmasına kadar geçen süredir ve yalnızca popülasyondaki bölünen hücreler dikkate alınırken, PDT hücre ölümü ve bölünmeyen hücreler de dikkate alınır (Freshney, 2010).

### **2.5.2. Sterilite Testleri**

Başta mikoplazma türleri olmak üzere, diğer bakteri türleri, virüsler, mayalar, mantarlar, küfler, bazen de protozoa türleri memeli hücre kültürlerinde kontaminasyona neden olabilmektedir. Kontaminasyon, araştırma-geliştirme ve üretimde zaman, para ve emek kaybına neden olan önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Bu bakımdan gerek hücre kültürü laboratuvarlarında gerekse diğer araştırma laboratuvarlarında sterilite oldukça yüksek öneme sahiptir.

Bir kontaminasyon kaynağı olarak personel, laboratuvardaki potansiyel olarak en büyük tehlikedir. Sağlıklı bir laboratuvar personelin ağız florasında bulunan mikroorganizmalar nedeniyle sadece konuşmak bile potansiyel kirletici aerosoller üretecektir, enfeksiyonlu bir personel, çok daha yüksek bir kontaminasyon riski kaynağı teşkil edecektir. Laboratuvara giren malzeme, personel, drenajlar, havalandırma ızgaraları yoluyla girerek havada asılı kalan mikroorganizmalar kaçınılmaz olarak laboratuvar yüzeylerinde birikecek ve nemli alanlarda çoğalacak olan sürekli bir taze kontaminasyon kaynağı sağlayacaktır. Laboratuvara gelen malzemelerin fiziksel kontrolü ve temizliği, laboratuvar temizliği ve rutin dezenfeksiyonu ve aseptik teknik, hücre kültürlerini kontaminasyondan uzak tutmaya yardımcı olacak önemli faaliyetler olacaktır (Stacey, 2011).

Genellikle hızla çoğalan kontaminantlar daha az risklidir. Çünkü bu tür mikroorganizmalar genelde gözle veya mikroskop altında kolayca tespit edilir ve imha etmek suretiyle kalıcı çözüm sağlanır. Ayrıca kültür çalışılan ortamların dezenfeksiyon ve sterilizasyonunu sağlamak, kontaminantla temas eden kültür ortamı ve diğer kimyasalların imhası çözümün kalıcılığı açısından önemlidir. Sık sık tekrar eden belirli bir enfeksiyon türünü izole ederek identifikasyon yöntemleriyle tanımlamak ve kontaminasyonun kaynağını bularak kalıcı tedbirler almak faydalı olacaktır. Çalışmanız

veya koleksiyonunuz için değerli bir hücre kültüründe kontaminasyonla karşılaştığınızda Çizelge 2.4' te yer alan uygun antibiyotik tedavisine başlanmalıdır (Freshney, 2010).

Çizelge 2.4. Yaygın olarak kullanılan antibiyotik ve antimiyotik tedavileri (Langdon, 2004).

Antibiyotik	Konsantrasyon	Bakteri	Maya	Mantar	Mikoplazma
Amphotericin B	2.5 mg/L	+	-	+	-
Ampicillin	100 mg/L	+	-	-	-
Dihydrostreptomycin	100 mg/L	+	-	-	-
Erythromycin	100 mg/L	+	-	-	-
Gentamycin sulfate	50 mg/L	+	-	-	+
Kanamycin sulfate	100 mg/L	+	-	-	+
Neomycin sulfate	50 mg/L	+	-	-	-
Nystatin	100,000 U/L	-	+	+	-
Penicillin G	100,000 U/L	+	-	-	-
Polymyxin B sulfate	50 mg/L	+	-	-	-
Streptomycin sulfate	100 mg/L	+	-	-	-
Tetracycline hydrochloride	10 mg/L	+	-	-	-
Tylosin tartrate	10 mg/L	+	-	-	+

Mikoplazma hücre kültürlerinde sık görülen bir kontaminanttır ve önemli fenotipik etkiye neden olabilir. En olası kontaminasyon kaynağı olarak laboratuvar personeli, sığır serumu ve diğer enfekte hücre kültürleri görülmektedir. Mikoplazmalar, küçük boyutları ve hücre duvarının yerine esnek bir membran yapısına sahip olmaları nedeniyle 0,45 µm filtrelerden geçebilir, bu nedenle filtre ile sterilizasyon her zaman etkili değildir. Mikoplazma ile enfekte hücre hatları belirgin bir enfeksiyon belirtisi göstermeyebileceğinden (örneğin; bulanıklık, büyüme hızında veya canlılıkta azalma veya görünür sitopatik etki vb.) enfeksiyon genellikle sinsidir (Drexler ve Uphoff, 2003). Hücre metabolizması ve davranışındaki değişiklikler bir süre anlaşılamayacağından zaman, para ve diğer hücre hatlarının mikoplazma kontaminasyonu ile sonuçlanabilir. Bu nedenle hücre kültürü laboratuvarında mikoplazma enfeksiyonunun önlenmesi büyük önem taşımaktadır. Hücre hattında mikoplazma tespit edildiğinde, ya direkt atılmalıdır ya da temiz hattan mevcutta yoksa antibiyotik tedavisi ile koleksiyona tekrar kazandırılmalıdır. Diğer hücre hatlarına çapraz kontaminasyonu önlemek için kapsamlı temizlik ve sterilizasyon yapılmalıdır (Sung ve Hawkins, 2020).

Mikoplazma enfeksiyonların tespiti kültürdeki bozulma belirtileri olsa da mikroskop ile görülemez ve floresan boyama, PZR, ELISA testi, immün boyama veya mikrobiyolojik test gerektirir. Hoechst 33258 ve DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) boyaları DNA'nın floresan boyanmasını sağlayarak mikoplazmanın tespitinde en kolay ve güvenilir yöntemlerden biridir. Mikoplazma aranan hücre hattının çekirdekleri de DNA içerdiği için parlak boyanır ve böylece boyama protokolü için pozitif kontrol görevi görür, mikoplazma ise sitoplazma üzerinde küçük noktalar veya ipliksi/ağsı şeklinde görünür. Floresan boyama yöntemi her ne kadar kolay uygulanabilir olsa da özellikle mikrokok türü ve az miktardaki mikroorganizmalar da boyanacağı için değerlendirmede dikkatli olunmalıdır (Freshney, 2010).

## **2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)**

Polimeraz zincir reaksiyonu veya PZR, 1980'lerde Dr. Kary Mullis tarafından geliştirilmiştir. Bir numunede bulunan DNA miktarını artırmak için verimli ve etkili bir yöntemdir. Belirli bir DNA dizisini tanıma ve yüksek sayıda kopyayı hızlı ve doğru bir şekilde sentezleme yeteneği nedeniyle bir moleküler fotokopi makinesine benzetilmektedir. 20. yüzyılın en büyük bilimsel keşiflerinden biri olarak kabul edilen PZR, moleküler biyolojide ve özellikle genetik uygulamalarda, genetik ve bulaşıcı hastalıkların teşhisinde, genotiplendirilmesinde, gen ifadelerinin ölçülmesinde ve adli tıpta devrim yaratmıştır. PZR, geliştirildiği tarihteki orjinal yöntemiyle kalmamış bugüne kadar geliştirmiştir. Kantitatif PZR (qPZR) olarak da bilinen gerçek zamanlı PZR, DNA amplifikasyonunu ve değerlendirmeyi tek bir reaksiyonda yapar ve virgülden sonra yüzde bir hassasiyetle sonuç verir. Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) olarak geliştirilen başka bir teknik, nükleik asit başlangıç kalıp olarak DNA yerine RNA'yı kullanır (Jalali ve ark., 2017).

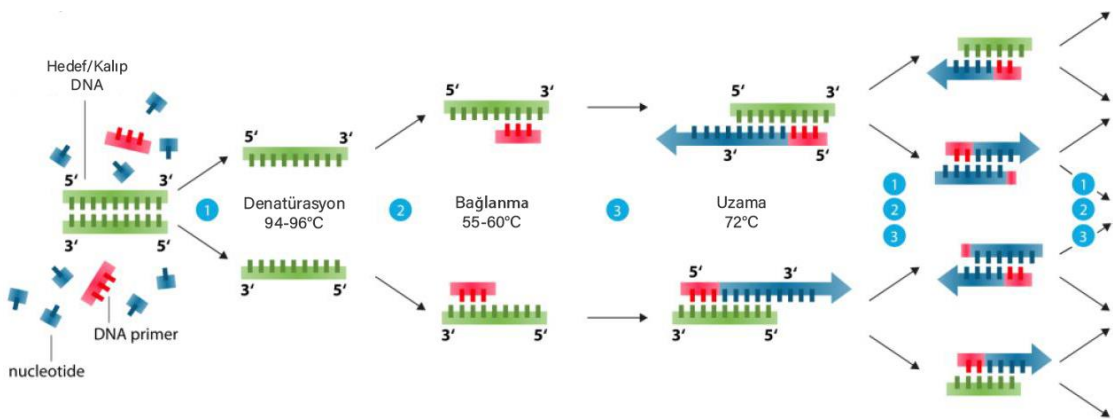
PZR, çalışma prensibi olarak, tüm canlı organizmalarda hücre bölünmesinden önce gerçekleşmesi gereken genetik materyallerini kopyalamak için kullanılan fizyolojik bir süreç olan DNA replikasyonunun *in vitro* olarak gerçekleştirilmesidir. PZR işlemi; kalıp DNA, DNA polimeraz enzimi, primer çifti (ileri ve geri) ve nükleotidlerden (ATGC) oluşan bir reaksiyon karışımının ısı döngü cihazında tekrarlanan ısıtma ve soğutma döngülerinden oluşur (Şekil 2.8). Kalıp DNA, hedef diziyi içeren DNA'dır. DNA

polimeraz enzimi, mevcut bir DNA zinciri üzerinde tamamlayıcı bir DNA zinciri üretme yeteneğine sahiptir. Primerler, ilgili spesifik hedef DNA'ya tamamlayıcı baz eşleşmesi yoluyla bağlanan kısa nükleotid zincirleridir. Yeni tamamlayıcı DNA zincirini oluşturmak için DNA polimeraz enzimine yol gösterici bir başlangıç noktası görevi görürler.

Her PZR döngüsü üç adımdan oluşur (Şekil 2.10):

- Denatürasyon—DNA'nın çift sarmalını hidrojen bağlarını parçalayarak çözmek için reaksiyon karışımı 90°C'nin üzerinde ısıya çıkarılır
- Primer bağlanma—Primer çiftinin bağlanmasına izin vermek için reaksiyon karışımı 55– 60°C'ye soğutulur. İleri ve geri primerler, tamamlayıcı baz eşleşmesi yoluyla DNA'nın karşıt zincirlerine bağlanır. Kalıp DNA'nın karşı sarmalının 3' uçlarına tamamlayıcı olmalıdırlar.
- Uzama—Reaksiyon karışımı, DNA polimeraz enzim aktivitesi için optimum sıcaklığı olan 72°C'ye ısıtılır. Polimeraz, primer kalıp DNA kompleksine bağlanır ve daha sonra reaksiyon karışımındaki serbest nükleotidleri kullanarak yeni bir tamamlayıcı karşı zinciri oluşturur.

Bu reaksiyon döngüsü tekrar başa döner, PZR devam eder. Her döngü, DNA miktarını yaklaşık olarak iki katına çıkarır, çünkü yeni üretilen DNA dizisi de müteakip döngüde amplifikasyon için bir kalıp görevi görür. Bu, DNA miktarında üstel bir artışa neden olur. Örneğin; 1 adet kalıp DNA 6 döngüden sonra  $2^n=2^6=64$  kopya oluşur. Kalıp DNA miktarı ve PZR reaksiyon verimine bağlı olarak toplam 25-40 PZR döngüsü gerçekleştirilir (Jalali ve ark., 2017).



Şekil 2.10. Polimeraz Zincir Reaksiyon Döngüsü.

## 2.7. Plak Test

Plak test, canlı virüslerin izolasyonu, enfektivite tayini ve miktarının belirlenmesinde virolojide günümüze kadar sıklıkla kullanılmaya devam etmektedir. Test 1952’de ilk ortaya çıkışından sonra geliştirilerek hayvan virüs enfektif titrelerinin nicel ve nitel olarak hesaplamak için geliştirilmiştir (Cooper,1961). O zamandan beri immünolojik testler, floresan ve transmisyon elektron mikroskobu, ayarlanabilir dirençli darbe algılama (TRPS), akış sitometrisi (flowsitometri), rekombinant tespit sistemleri ve kantitatif ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR) gibi viral niceleme için alternatif araçlar geliştirilmiş ve uyarlanmış. Fakat bu yöntemler replike olabilen enfeksiyöz virionları tanımlayamamakta ve miktarını belirleyememektedir (Baer ve Kehn-Hall, 2014). Gelişen teknolojik tekniklere rağmen plak test, enfeksiyöz virüslerin viral konsantrasyonların belirlenmesinde günümüzde sıklıkla tercih edilen bir test olmaya devam etmektedir (Baer ve Kehn-Hall, 2014; Harvey ve ark.,2022).

Plak test genel olarak, tek tabaka duyarlı hücre ile tam kaplanmış doku kültürü plakalarına 5-100 virion arasında, seri olarak seyreltilmiş bilinmeyen bir konsantrasyonda canlı bir virüs ile enfekte edilir. Virüsün duyarlı hücreye adsorbe olabilmesi için bir süre uygun ortamda inkübasyona bırakılır. Enfekte edilmiş plakalar daha sonra viral enfeksiyon sırasında sıvı ortamın mekanik akışı yoluyla dağınık yayılmasını önlemek için hareketsizleştirici bir kaplama ortamı ile kaplanır. Bu sayede virüsün serbest yayılması engellenmiş, adsorbe olduğu hücreden başlayarak etrafındaki hücreleri enfekte etmesi sağlanacaktır. Enfekte hücreler, replikasyon-lizis-enfeksiyon döngüsüne devam edecek ve etraftaki hücreleri de parçalayacak, giderek daha belirgin plaklara neden olacaktır. Kullanılan virüsün büyüme kinetiğine ve duyarlı hücreye bağlı olarak, normalde 2-14 gün içinde görünür bir plak oluşacaktır. Değerlendirme için plaklar mikroskop altında sayılabilir veya plakları çıplak gözle kolayca tanımlamak için nötr kırmızı veya kristal viyole ile boyanabilir. Kristal viyole çok küçük plakların tanımlanmasına olanak sağlayan hızlı ve belirgin bir kontrast sağlar (Baer ve Kehn-Hall, 2014).

Bir seyreltme için ortalama plak sayısını ve toplam seyreltme faktörünü dikkate alarak viral örneğinin titresi aşağıdaki formüle göre hesaplanır (Baer ve Kehn-Hall, 2014);

$$\text{Pfu/ml} = \text{Ort/DxV}$$

Pfu: Plak oluşturan ünite(Pfu/ml)

Ort: Bir dilüsyondaki ortalama plak sayısı

D: Dilüsyon

V: Plakaya eklenen dilüe virüs miktarı(ml)

## **2.8. İnsan Kolon Karsinom Hücre Hattı (SW480)**

SW480 hücre hattı 51 yaşında Kafkasya kökenli Homo sapiens (insan) erkek bireyin orta derecede farklılaşmış bir kolon adenokarsinomundan (Derece 4, Duke sınıf B) izole edilmiştir. İlk kültürler, küçük epitelyal hücre adacıkları ve bipolar hücrelerin bir karışımını içeriyordu, ancak daha sonra epitelyal hücreler baskınlaşmıştır ve yüzeye tutunarak monolayer karakterde çoğalırlar. Elektron mikroskopunda bakıldığında genellikle serbest yüzeylerinde mikrovilluslara sahiptir (Leibovitz ve ark., 1976). Popülasyon ikilenme zamanı yaklaşık olarak 33 saat olan SW480 hücre hattı, Leibovitz's L-15 % 10 fetal sığır serumu (FSS) içeren vasatta, 37°C %0-5 CO<sub>2</sub> inkübatör koşullarında çoğalmaktadır. Kolon kanseri üzerine bir dizi biyokimyasal, immünolojik ve genetik çalışmalarda, protein ifadesi amacıyla kalıcı ve geçici transfeksiyon çalışmalarında kullanılmaktadır.

## **2.9. Yavru Hamster Böbrek Hücre Hattı (BHK-21)**

Bebek hamster böbrek (BHK) hücreleri, virüslerin enfeksiyon ve transfeksiyon yoluyla yayılması için kullanılan birçok farklı omurgalı hücre tipinden biridir. BHK-21 hücre hattı, Mart 1961 yılında 21 numaralı yavruhamaya ait 5 Suriye hamsterinin (*Mesocricetus auratus* türüne aittir ve genellikle Suriye altın hamsterleri olarak bilinirler) böbreklerinden primer kültür oluşturulmuştur. BHK-21 olarak adlandırılan bu orijinal kültür Polyoma virüsü ile transforme edilerek BHK-21/C13 veya C13 olarak adlandırılan devamlı hücre hattı haline getirilmiştir (Stoker ve Macpherson, 1962; Stoker ve Macpherson, 1964). Gliserol veya dimetil sülfoksit içeren ortamda stoklanan hücreler, -70°C veya -196°C'de uzun süreler sonrasında yüksek canlılık ile yeniden canlandırılabilmiştir. Birbirine paralel olarak tek tabaka halde üreyen fibroblast görünümlü bu hücre hattının ikilenme süresi ortalama 12 saat, kromozom sayısı 2n=44'tür (Stoker ve Macpherson, 1964). O zamandan beri, bu hücre dizisi sayısız

virüsün çoğaltılması ve birçok biyolojik sürecin incelenmesi için bir laboratuvar standardı olmuştur (Hernandez ve Brown, 2010).

Bu hücrelerin şap hastalığına duyarlı olduğu keşfedilmesiyle aşı üretimi için potansiyel bir substrat olarak birçok çalışmada kullanılmaktadır. Bugün üretilen şap aşısının büyük bir bölümünün üretimi için kullanılan temel substrat olmaya devam etmektedir (Radlett ve ark., 1987; Hernandez ve Brown, 2010).



### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

#### 3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler

Hücre kültürü çalışmalarında besiyeri olarak Leibovitz's L-15 Medium (Sartorius 01-1151A) ve Glasgow's Modified Eagle's Medium (GMEM) (AppliChem A1321,9010), fetal sığır serumu (FSS) (Himedia AL066G), tripsin/EDTA (%0,05 tripsin, 0,53mM EDTA) (Multicell 325-542-EL), dimetil sülfoksit (DMSO) (AppliChem A3006), tripan mavisi (Biochrom L6323), 25 cm<sup>2</sup> doku kültürü flaskı (TPP 90025), 75 cm<sup>2</sup> doku kültürü flaskı (TPP 90075), 48 gözlü doku kültürü plakası (Greiner 677180), 6 gözlü doku kültürü plakası (Costar 3516) kullanılmıştır.

Sterilite deneylerinde kullanılmak üzere mikoplazma aranması için DAPI boyası (Sigma D9542), Tryptone Soya Broth (TSB) (Laborant LQ187X), Fluid Thioglycollate Medium (FTM) (Laborant LQ026X), sterilite kontrolü için kültür şişesi (BD BACTEC 442023) BD BACTEC FX40 cihazında inkübe edilmiştir.

Transformasyon ve transfeksiyon işlemlerinde kompetan bakteri one shot stb13 (İnvitrogen C737303), boş kontrol plasmid (Origene PS100010), SDC1 plasmid (Origene RG200419), integrin β6 plasmid (Origene RG217387), LB agar (Sigma L3022), LB broth (Sigma L2897), ampicillin (BioShop AMP201.59), 50ml falkon (Jetbiofil CFT011500), 15ml falkon (Jetbiofil CFT011150), plasmid izolasyon kiti (İnvitrogen K0503), lipofektamin 3000 (İnvitrogen L3000), optimum medium (Gibco 31985-062), transfeksiyon sonrası GFP ışımalarını görüntülemek için Olympus IX71 floresan mikroskopu kullanılmıştır.

RNA izolasyonu ve polimeraz zincir reaksiyonu işlemlerinde; RNA izolasyon kiti (İnvitrogen 12183018A), CDNA sentez kiti (İnvitrogen K1621), PZR master mix (İnvitrogen 4367659), 96 gözlü PZR plakası (İnvitrogen 4346907), yapışkan film (İnvitrogen 4360954), PZR reaksiyonu için Applied Biosystems 7500 Fast gerçek zamanlı PZR cihazı kullanılmıştır.

#### 3.2. SW480 ve BHK-21 Hücrelerinin Dondurulması, Çözdürülmesi ve Pasajlanması

SW480 hücresi Leibovitz's L-15 Medium (With L-Glutamine), %10 fetal sığır serum (FSS) kullanılarak, BHK-21 hücresi Glasgow's Minimum Essential Medium (GMEM), %10 fetal sığır serum (FSS) kullanılarak üretilmiştir.

Uzun süre canlılığını koruması için -196 °C sıvı nitrojen tankında, kriyotüp içerisinde saklanan hücreler deneylerde kullanılmak üzere çıkarılmış ve süratle çözdürme adımlarına geçilmiştir. Önceden 37 °C sıcaklığa ayarlanmış su banyosunda birkaç dakika bekletilerek çözünmesi sağlanmıştır. Ardından 5 dakika, 800 rpm hızda santrifüj edilmiştir. Kriyotüpteki süpernatant uzaklaştırılmış ve dipte kalan hücre peleti önceden hazırlanmış ve 37 °C sıcaklığa getirilmiş bir miktar besiyeri ile resüspanse edilmiştir. Yapışmış hücrelerin pipetasyon işlemi ile tek tek açılması sağlanmıştır. Süspanse hücre yüzeye tutunarak çoğalabilmesine olanak sağlayan T25 doku kültürü flaskına alınmış kapakları gevşetilerek %5 CO<sub>2</sub> ve 37 °C etüvde inkübasyona alınmıştır.

Etüvde çoğalarak %70-%90 kaplama oranına ulaşmış hücreler alt kültüre (pasaj) edilmiştir. Bunun için öncelikle hücrelerin besiyerleri uzaklaştırılmıştır. Ardından 2 ml Tripsin/EDTA eklenerek yıkama amaçlı birinci tripsinizasyon ile kalan besiyeri ve FSS uzaklaştırılması sağlanmıştır. Tekrar 2 ml Tripsin/EDTA eklenerek ikinci tripsinizasyon işlemi uygulanmış, yaklaşık 0,5 ml Tripsin/EDTA'dan fazla kısım uzaklaştırılmıştır. Tripsin enziminin aktive olması ve hücrelerin adezyon proteinlerini parçalamak yoluyla hücreleri tutundukları doku kültürü flaskından ayırmak için 37 °C etüvde 3-5 dakika inkübe edilmiştir. İşlemin sonunda mikroskop altında tüm hücrelerin süspanse hale geldiği gözlemlenmiştir. Vakit kaybetmeden tripsinizasyon reaksiyonun durdurmak için FSS içeren besiyeri eklenmiş ve pipetasyon işlemi ile tek tek açılması sağlanmıştır.

Bu aşamada hücre sayımı için 900 µl hücre alınmış ve üzerine 100 µl tripan mavisi eklenerek bürker lamı (Şekil 3.1) ile hücre sayımı yapılmıştır. Işık mikroskopu altında bürker lamınının 16 küçük karesinde (Şekil 3.1, Şekil 3.2) yer alan hücreler tek tek sayılmıştır. Çıkan sayı aşağıdaki formülde yerine yazılarak mililitresindeki hücre sayısı hesaplanmıştır.

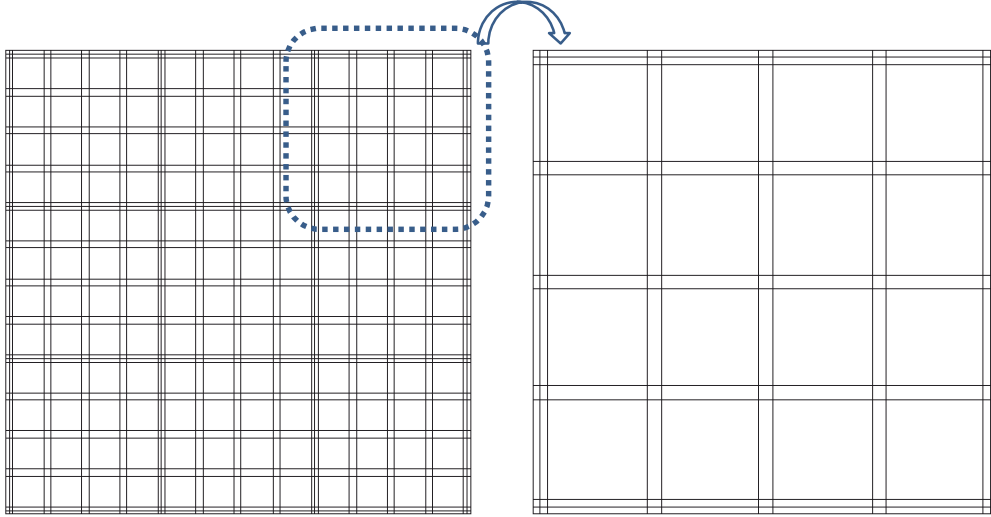
$$16 \text{ karede sayılan hücre sayısı} \times 10^4 = \text{hücre sayısı (h/ml)}$$

Hesapladığımız mililitresindeki hücre sayısı kullanılarak aşağıdaki formüle göre yeni pasaj veya deney için gerekli hücre miktarı hesaplanmıştır.

$$\text{Gerekli hücre miktarı (ml)} = \frac{\text{istenilen hücre sayısı} \times \text{istenilen hacim(ml)}}{\text{mevcut hücre sayısı(h/ml)}}$$



Şekil 3.1. Hücre sayımı için kullanılan Bürker lamı.



Şekil 3.2. Hücre sayımı için kullanılan Bürker lamı mikroskop görüntüsü.

Gerekli hesaplamalar yapıldıktan sonra hücreler pasaj yapılmış, deneye başlanılmış veya hücre dondurulmuştur.

Dondurma işlemi için süspansiyon hücre santrifüj tüpüne aktarılmış ve 5 dakika, 800 rpm hızda santrifüj edilerek hücrelerin çöktürülmesi sağlanmıştır. Diğer taraftan dondurma karışımı olarak %90 FSS + %10 DMSO karışımı hazırlanmıştır. Santrifüj işleminin ardından süpernatant uzaklaştırılmış, hücre peleti dondurma karışımı ile resüspansiyon edilmiştir. Hücreler 1ml kriyotüplere dağıtılmış ve uzun süre saklanmak üzere -196 °C sıvı nitrojen tankına kaldırılmıştır.

### 3.3. SW480 ve BHK-21 Hücrelerinin Sterilite ve Mikoplazma Testlerinin Yapılması

Hücre kültürleri bakteriler, mayalar, mantarlar ve mikoplazmalar tarafından kontamine olabilir. Mikoplazmalar, DNA'ya bağlanan DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole,

dihydrochloride) (Sigma, ABD) direkt floresan boyama yöntemi ile diğer kontaminantlar ise tryptic soy broth (TSB) ve fluid thioglycollate medium (FTM) besi yerleri ve BD Bactec FX40 cihazı kullanılarak steriliteleri kontrolleri yapılmıştır (Avrupa Farmakopisi, 2019).

Mikoplazma varlığının tespiti için yüzeye bağımlı SW480 ve BHK-21 hücre hattı, 25cm<sup>2</sup> (T25) hücre kültürü kabında %40-50 kaplama oranında hazırlanmıştır. Bunun için antibiyotiksiz, %10 FSS (Fötal Sığır Serum) içeren SW480 için Leibovitz's L-15, BHK-21 için GMEM besi ortamında 2x10<sup>5</sup> hücre/ml/5ml hücre süspansiyonu hazırlanmış ve 37 °C, %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda T25 hücre kültürü kabındaki vasat boşaltılmış, 3 ml DPBS (Dulbecco'nun *Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi*) ile hücrelerin yüzey yıkaması yapılarak 3 ml Carnoy's fiksatif (3:1, metanol:asetik asit) ile fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe ettikten sonra fiksatif boşaltılmış ve 10 dakika 37 °C'de kurumaya bırakılmıştır. DAPI boyama solüsyonu ışık almayan kap içerisinde, 100 µg/ml derişimde PBS ile hazırlanmıştır. Kuruma işleminin ardından kültür kabına 3ml DAPI boyama solüsyonu eklenmiş ve 15 dakika, karanlık oda ısında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda boyama solüsyonu boşaltılmış ve bağlanmayan boyaları uzaklaştırmak için 3 ml DPBS ile hücreler tekrar yıkanmıştır. Yıkama sonunda kültür kabı 37 °C'de 15 dakika kurumaya bırakılmış ve floresan mikroskopta uygun filtre (uyarma/emisyon maks: 358/461 nm) seçilerek incelenmiştir.

Deneylerde kullanılacak hücre hatlarının sterilitelerini kontrol etmek için pasajlama esnasında vasattan 0,5 ml TSB (tryptic soy broth) ve FTM (fluid thioglycollate medium) besiyerlerine ekim yapılmıştır. Mantar ve aerobik bakterilerin üremesine uygun ortam olan TSB 20-25°C'de, anaerobik ve aerobik bakterilerin üremesine uygun ortam olan FTM ise 30-35°C'de 14 gün inkübasyona bırakılmıştır (Avrupa Farmakopisi, 2019). Buna paralel olarak daha hızlı sonuç verebilen, otomatik bir sistem olan BD BACTEC FX40 cihazı ile hücre hatlarının mikrobiyolojik steriliteleri kontrol edilmiştir. Hücre pasajlama aşamasında toplanan kültür ortamından cihazın aerobik ve anaerobik kültür flakonlarına 8-10 ml inoküle edilerek 14 gün boyunca takipleri yapılmıştır.

### **3.4. SW480 ve BHK-21 Hücrelerinin Üreme Eğrisinin Çıkarılması ve İkilenme Zamanının Hesaplanması**

SW480 ve BHK-21 hücrelerinin büyüme eğrisinin çıkarılması ve popülasyon ikilenme zamanının hesaplanması için öncelikle  $5 \times 10^4$  hücre/ml olacak şekilde 40ml hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. 10 adet 6 gözlü hücre kültürü plakalarının ikişer gözüne hazırlanan hücre süspansiyonundan 2ml/göz taksim edilmiş ve plakalar 37 °C, %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan 2 saat sonra bir plaka alınmış, vasatı boşaltılmış ve hücreler 1 ml PBS ile yıkanmıştır. Ardından hücrelerin ayrılması için 1ml tripsin/EDTA solüsyonu eklenerek 37°C'ye kaldırılmıştır. Hücreler yüzeyden ayrılınca 2 gözün sayımları ayrı ayrı yapılmış ve ortalaması hesaplanmıştır. Bu şekilde 10 gün boyunca aynı saatte kalan plakaların da sayımları yapılmıştır. On gün boyunca yapılan sayımlar eşit koşullarda 3 kez daha tekrarlanmıştır (Freshney, 2010). Tüm sayımlar hata çubukları da eklenerek grafiğe aktarılmış ve popülasyon ikilenme zamanı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$PDT: \frac{\text{zaman} \times \log(2)}{\log C1 - \log C0}$$

### **3.5. SW480 ve BHK-21 Hücrelerinin Plak Test Yöntemi ile Şap Virüsüne Duyarlılığının Belirlenmesi**

Şap virüsü, hücreleri enfekte ettiğinde sitopatojenik etki oluşturur. Enfektivite, bir virionun tek tabaka oluşturmuş hücre kültürüne verildiğinde tek bir hücreye girmesi, çoğaldıktan sonra etrafındaki hücreleri de enfekte ederek bir sitopatojenik odak (plak) oluşturması esasına dayanır. Her plak bir enfektif virüs partikülü tarafından oluşturulur. Enfektif virüs partikülü sayısı plak oluşturan ünite (pfu) olarak ifade edilir.

SW480 hücresi ve kontrol grubu olarak şap virüsüne duyarlı BHK-21 (Yavru Hamster Böbrek Hücre Hattı) hücresinden 6 gözlü tek kullanımlık hücre kültürü plakalarına %90 kaplama oranında hazırlanmıştır. Şap virüsünün A, O ve Asia1 serotiplerinin 10 katlı dilüsyonları ( $10^{-1}$ - $10^{-6}$ ) hazırlanmıştır. SW480 ve BHK-21 An<sub>31</sub> hücrelerinin vasatları boşaltılmış ve A,O ve Asia1 tipi şap virüslerinin 6 dilüsyonundan 100µl/göz inoküle edilmiştir. Plakalar 37°C, %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 1 saat inkübe edilerek virüsün adsorbsiyonu sağlanmıştır. İnkübasyondan sonra, %1,3 gum vasatı ve 2X GMEM vasatının 1:2 oranında hazırlanan karışımdan her bir göze 2 ml eklenmiş ve plakalar 37°C, %5 CO<sub>2</sub>'li

etüvde 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun sonunda plakalardaki vasat karışımı boşaltılmış ve PBS ile hazırlanan %1'lik kristal viyole stok solüsyonundan alınarak hazırlanmış %2,5 kristal viyole ve %20 formol içeren boyama solüsyonundan 2ml her bir göze eklenmiştir. Oda ısısında 2 saat inkübasyonun ardından boya boşaltılıp musluk suyu altında dikkatlice yıkanmış ve kurumaya bırakılmıştır (Sütçü, 1986).

### **3.6. Plasmid vektörlerinin Transfeksiyon İçin Hazırlanması**

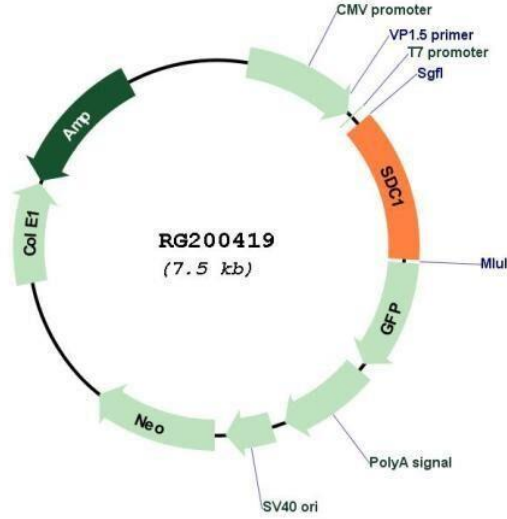
#### **3.6.1. Plazmid Vektörlerin E.coli Stbl3 Suşuna Transformasyonu ve Çoğaltılması**

Transformasyon işlemlerinde, HB101 E.coli suşundan türetilmiş One Shot Stbl3 (İnvitrogen) kompetan bakterisi plasmidin aktarılması ve çoğaltılması için kullanılmıştır. Plasmid olarak ise transforme bakteriyi diğer bakterilerden ayırmak için ampisillin direnç geni, transfeksiyon başarı oranını görüntülemek için yeşil floresan protein (Green fluorescent protein) geni ve insan SDC1 geni (Şekil 3.3), insan integrin  $\beta 6$  geni (Şekil 3.4) içeren ve boş kontrol plasmidi (Şekil 3.5) Origene firmasından satın alınmıştır.

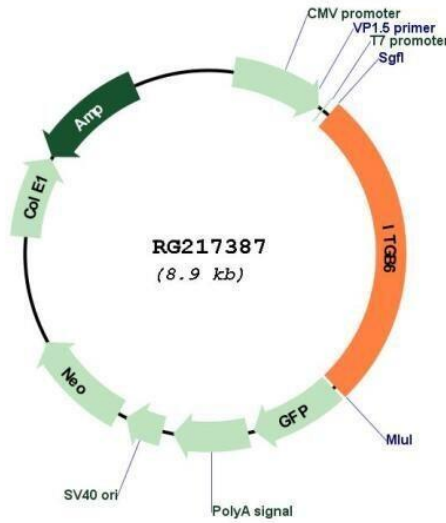
Plasmidi kompetan bakteriye transforme etmeden önce LB agar ve LB broth (Lysogeny broth, Lennox broth, Luria-Bertani besiyeri) besi yerleri hazırlanması gerekmektedir. Bunun için 3,5 g LB agar/100 ml ve 2 g LB broth/100 ml deiyonize suda çözdürülmüş ve 121°C 15' otoklav edilmiştir. Otoklavdan sonra agar donmayacak kadar soğuduğunda steril koşullar altında 0,1 ml (son konsantrasyon 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ampisillin antibiyotiği eklenmiş ve ardından tek kullanımlık steril petri kaplarına 18-20 ml dağıtılmıştır. LB broth ise 50 ml'lik falkon tüplere 5-10 ml dağıtılmıştır. İşlemler sırasında herhangi bir kontaminasyon durumunda LB agar ve LB broth besi yerlerinde üreme olacaktır, steriliterini kontrol etmek için LB agar ve LB broth 37°C etüvde bir gece inkübe edilmiştir. Ertesi gün herhangi bir üreme olmadığı için transformasyon işlemlerine başlanmıştır.

Transformasyon adımları One Shot Stbl3 kompetan bakteri protokolüne göre yapılmıştır. Bir tüp One Shot Stbl3 buz üzerinde çözdürülmüştür. Liyofilize halde gelen 10  $\mu\text{g}$  plasmidi 0,1 ml steril su ile sulandırdıktan sonra içerisine 1  $\mu\text{l}$  (100 ng) plasmid eklenmiş, yavaşça karıştırılmış ve buz üzerinde 30 dakika inkübe edilmiştir. Önceden 42°C' ye sabitlenmiş benmari içerisinde 45 saniye tutarak ısı şoku uygulanmış ve ardından tekrar buz üzerinde 2 dakika inkübe edilmiştir. Ardından tüpe 250  $\mu\text{l}$  SOC medium eklenmiş ve çalkalayıcı bir etüvde 37 °C'de 1 saat 225 rpm'de yatay olarak inkübe edilmiştir. Bir saatin

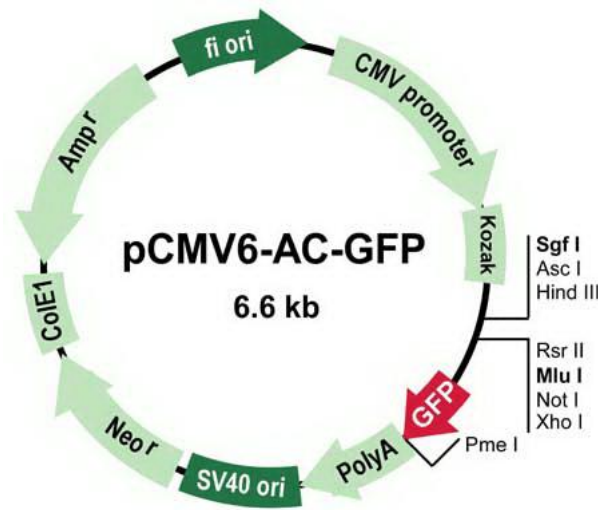
sonunda trasnforme olmuş bakteriden daha önce hazırlanan ampicillinli LB agar dökülmüş petriye 20 µl ekilmiş ve yayılmıştır. Petri ters çevrilerek 37 °C etüvde bir gün inkübe edilmiştir. Ertesi gün çoğalan ampicilline dirençli transforme bakterilerden bir koloni LB broth besi yerine ekilmiş ve 37 °C’de 12-16 saat inkübasyona bırakılmıştır.



Şekil 3.3. SDC1 geni içeren plasmid haritası.



Şekil 3.4. İntegrin β6 geni içeren plasmid haritası.



Şekil 3.5. Boş kontrol plazmid haritası.

### 3.6.2. Plazmidlerin İzolasyonu

İnkübasyonun en geç 16. saatinde plazmid DNA izolasyonu GeneJET Plazmid Miniprep (İnvitrogen, K0503) kiti protokolüne göre yapılmıştır. LB broth besi yerinde çoğalan bakteri kültürü 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pellete 250 µl solüsyon A eklenmiş, pipetleyerek karıştırılmış, sonra üzerine 250 µl solüsyon B eklenmiş, 5 kez ters düz çevirerek dikkatlice karıştırılmış, daha sonra üzerine 250 µl solüsyon C eklenmiş ve 4-6 kez ters düz çevirerek dikkatlice karıştırılmıştır. 12000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant dikkatlice toplanmış ve döndürme kolonuna aktarılmış ve 1 dakika inkübe edilmiştir. 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Filtrat atılmış, 750 µl yıkama solüsyonu eklenmiştir. 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Filtrat atılmış, kurutma için 12000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Son olarak plazmid DNA'yı elüe etmek için döndürme kolonuna 50 µl elüsyon çözeltisi eklenmiş, 1 dakika inkübasyonun ardından 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj ederek izolasyon işlemi tamamlanmıştır.

### 3.6.3. İzole Edilen Plazmidlerin Spektrofotometre ile Konsantrasyonlarının Ölçülmesi ve Boyutunun Agaroz Jel ile Kontrolü

İzole edilen plazmid DNA'ların konsantrasyon ve saflık oranlarını ölçmek için spektrofotometre cihazında 260nm dalga boyunda, cihazın protokolüne göre ölçüm yapılmıştır. Spektrofotometrik ölçüm işlemlerinde adsorbsiyon ölçümü yalnız hedef



molekölün değil tüm çözeltilinin spektrumu ölçölür. İlk olarak izolasyon aşamasında kullandığımız 1µl elüsyon çözeltilisi cihazın ölçüm yuvasına yerleştirilerek dara alma (blank, kör) işlemi yapılmıştır. Daha sonra ölçüm yuvasına sırayla 1µl örnekler eklenerek ölçümler yapılmıştır.

İzole edilen plasmid DNA'ların boyutlarını (kontrol plasmid 6.6 kb, sdc1 plasmid 7.5 kb (orf 930bç) ve integrin β6 8.9 kb(orf 2364bç)) teyit etmek amacıyla %1 agaroz jel hazırlanmıştır. 100ml 1X TBE içerisinde 1 gram agaroz mikrodalga fırında ısı uygulanarak çözdürülmüştür. İçerisine 5ul etidyum bromür eklenmiş, karıştırılmıştır. Hazırlanan karışım jel kalıbına dökülmüş, tarak takılmıştır. Karışım soğuduktan sonra jel haline gelmesi beklenmiştir. Daha sonra taraklar çıkarılmış, tarakların oluşturduğu gözlere 2µl yükleme boyası ile 2µl plasmid DNA karışımı yüklenmiştir. Bir göze de belirteç olarak 1µl 1000bp DNA marker eklenmiştir. Agaroz jel tankı güç kaynağına doğru elektrot girişlerine dikkat ederek bağlanmış, 90V 1,5 saat akım verilmiştir. Sürenin sonunda jel görüntüleme cihazında ultraviyole (UV) ışığında inceleme yapılmıştır. İzole edilen plasmid DNA'ların doğruluğunun kontrol etmek için ise bölüm 3.7.3.3' de tarif edildiği gibi primerler kullanılarak PZR reaksiyonu yapılmış, çıkan ürün agaroz jelde yürütülmüştür.

### **3.7. Transfeksiyon**

#### **3.7.1. Transfeksiyon Uygulama Dozunun Belirlenmesi**

İzole edilen plasmid DNA'ların SW480 hücrelerine transfeksiyonunda Lipofectamin 3000 (İnvitrogen, L3000001), Opti-MEM (Gibco, 31985062) ve izole ettiğimiz SDC1, integrin β6 ve kontrol plasmidi kullanılmıştır. Yüksek transfeksiyon oranını elde edebilmek için kontrol plasmid ile doz denemesi yapılmıştır.

Transfekte edilecek SW480 hücresi 24 gözlü plakalara ekilmiştir. Ertesi gün %70-%90 kaplama oranına ulaştığında aşağıdaki transfeksiyon adımları takip edilmiştir.

Hücrenin vasatı boşaltılarak tutunmayan hücreler ortamdan uzaklaştırılmış ve yeni 500ul antibiyotiksiz vasat eklenmiştir. Her bir göz için; 50ul Opti-MEM+DNA ve 50ul Opti-MEM+Lipofektamin Çizelge 3.1'de yer alan doz denemesi oranlarında hazırlanmıştır.

Çizelge 3.1. Transfeksiyon doz denemesi oranları.

400ng/ $\mu$ l DNA 1,5 $\mu$ l lipofektamin	400ng/ $\mu$ l DNA 3 $\mu$ l lipofektamin
600ng/ $\mu$ l DNA 1,5 $\mu$ l lipofektamin	600ng/ $\mu$ l DNA 3 $\mu$ l lipofektamin
800ng/ $\mu$ l DNA 1,5 $\mu$ l lipofektamin	800ng/ $\mu$ l DNA 3 $\mu$ l lipofektamin
1000ng/ $\mu$ l DNA 1,5 $\mu$ l lipofektamin	1000ng/ $\mu$ l DNA 3 $\mu$ l lipofektamin

Hazırlanan bu karışımlar karıştırılmış ve 15-20 dakika oda ısında inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonunda ilgili gözdeki hücrelerin üzerine 100ul karışım eklenmiştir.

Hücreler 37°C %5 CO<sub>2</sub> etüvde inkübasyona alınmıştır. 24 ve 48. Saat sonra floresan mikroskopunda GFP ışması gözlenmiştir. (GFP: uyarma/ emisyon max = 482/ 502 nm)

### 3.7.2. Plasmid Vektörlerinin SW480 Hücrelerine Transfeksiyonu

İzole edilen plasmid DNA'ların SW480 hücrelerine transfeksiyonu işleminde belirlenen plazmid DNA-lipofektamin (600ng/ $\mu$ l DNA+3 $\mu$ l lipofektamin) oranı kullanılmıştır. Buna göre SDC1, integrin  $\beta$ 6 ve kontrol plasmidin SW480 hücrelerine transfeksiyon işlemi “3.7.1. Transfeksiyon Uygulama Dozunun Belirlenmesi” bölümünde anlatıldığı basamaklar izlenerek yapılmıştır.

### 3.7.3. Transfeksiyon Sonrası Genlerin İfadesinin Ölçülmesi

#### 3.7.3.1. RNA İzolasyonu

SW480 hücrelerinden RNA izolasyonu için, Purelink RNA Mini Kit (Thermo, 12183020) RNA izolasyon kiti kullanılmıştır.

SW480 hücrelerine transfeksiyon işlemi uygulandıktan sonra transfekte olan ve olmayan hücreler RNA izolasyon kiti protokolüne göre aşağıdaki adımlar izlenerek izolasyon sağlanmıştır;

-Lizis tamponu, 1ml lizis tamponu için 10uL 2-merkaptotanol(betamerkaptoetanol) eklenerek her  $\leq 1 \times 10^6$  hücre için 0,3ml lizis tamponu taze olarak hazırlanmıştır.

-Hücresinin vasatı boşaltılmış ve buz üzerine alınarak lizis tamponu eklenmiştir.

RNaz içermeyen mikro santrifüj tüpüne hücre lizatı aktarılmış ve üzerine 1 hacim %70 etanol eklenmiştir.

-Etanol eklendikten sonra oluşabilecek çökeltiyi engellemek için vorteksleyerek iyice karıştırılmıştır.

-Karışımdan 700µl döndürme kartuşuna aktarılmıştır.

-Oda ısısında 12000xg'de 15sn santrifüj edilmiş, alttaki atık atılmış ve kartuş tekrar toplama tüpüne yerleştirilmiştir.

-Döndürme kartuşuna 700 µL yıkama tamponu I eklenmiştir.

-Oda ısısında 12000xg'de 15sn santrifüj edilmiş, atık ve toplama tüpü atılmış yerine yenisi takılmıştır.

-Döndürme kartuşuna 500 µL yıkama tamponu II etanol ile eklenmiştir.

-Oda ısısında 12000xg'de 15sn santrifüj edilmiş, alttaki atık atılmış ve kartuş tekrar toplama tüpüne yerleştirilmiştir.

-Döndürme kartuşuna tekrar 500 µL yıkama tamponu II etanol ile eklenmiştir.

-Döndürme kartuşunu toplama tüpüyle birlikte oda ısısında 1 dakika boyunca 12.000 × g'de santrifüjlenmiştir.

-Toplama tüpünü atılmış ve döndürme kartuşu yeni bir mikro santrifüj tüpüne yerleştirilmiştir.

-Döndürme kartuşunun ortasına 30 µL - 100 µL RNaz içermeyen su eklenmiştir.

-Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilmiş ve oda ısısında 2 dakika boyunca 12.000 × g'de santrifüjlenmiştir.

-Döndürme kartuşu atılır altta kalan mikro santrifüj tüpünde kalan izole RNA'dır.

-Spektrofotometre ile RNA konsantrasyon (ng/ µL) ve 260/230 oranı ile RNA'nın kirlilik miktarına bakılmıştır.

-Saflaştırılmış RNA daha sonra kullanılmak üzere -80 ° C'de muhafaza edilmiştir.

### 3.7.3.2. cDNA Sentezi

RNA'dan cDNA sentezi için Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (İnvitrogen, K1621) kullanılmıştır.

İlk olarak Çizelge 3.2'de yer alan karışım hazırlanmış ve GC den zengin olan veya katlanarak dimer oluşturan RNA'yı açmak için 65°C'de 5 dakika ısı döngü cihazında inkübe edilmiştir.

Çizelge 3.2. RNA primer karışımı.

	1 reaksiyon için
RNA	450ng
oligo (dT) <sub>18</sub> primer	1µl
RNaz içermeyen dH <sub>2</sub> O	değişken
Toplam hacim	12µl

Ardından 1 dakika buz üzerinde bekletilir ve Çizelge 3.3' de yer alan ters transkripsiyon karışımı hazırlanmıştır.

Çizelge 3.3. Ters transkripsiyon karışımı.

	1 reaksiyon için
5X Reaksiyon buffer	4µl
RNaz inhibitör	1µl
DNTP mix	2µl
RT enzimi	1µl
toplam	8µl

İlk hazırladığımız 12 µl karışımın üzerine hazırladığımız 8 µl ters transkripsiyon karışımı eklenmiştir.

Karışım ısı döngü cihazında 42°C 60 dakika, ardından 70°C 5 dakika inkübe edilmiştir.

Spektrofotometre ile cDNA konsantrasyon (ng/ µL) ve 260/230 oranı ile DNA'nın kirlilik miktarına bakılmıştır.

İnkübasyonun sonunda hazır olan cDNA gerçek zamanlı PZR için -20°C de saklanmıştır.

### 3.7.3.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Primer olarak, İntegrin  $\beta 6$  ve SDC1 için Origene markasına ait primer dizisi, internal kontrol olarak referans Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz (GAPDH) genine ait primer dizisi belirlenmiş (Çizelge 3.4) ve özel firmadan hizmet alımı yoluyla üretilip kullanılmıştır. RNA'dan cDNA sentezi için Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, PZR reaksiyonu için Thermo Power SYBR® Green PCR Master Mix kiti, Gerçek zamanlı PZR cihazı olarak Applied Biosystems 7500 Fast qPCR cihazı kullanılmıştır. Moleküler analizler H.Ü. Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nda yapılmıştır.

Çizelge 3.4. Primer dizileri.

PRİMER ADI	DİZİ 5'-3'	Ürün (bç)
Sindekan-1 F (ileri)	TCCTGGACAGGAAAGAGGTGCT	142
Sindekan-1 R (geri)	TGTTTCGGCTCCTCCAAGGAGT	
İntegrin $\beta 6$ F (ileri)	TGCTTATTGGACCTCAGTGTG	144
İntegrin $\beta 6$ R (geri)	CTACTTGGGAGACAGGGTTTTTC	
İntegrin $\alpha v$ F (ileri)	AGCGGGACCATCTCATCACT	79
İntegrin $\alpha v$ R (geri)	TGAGCAACTCCACAACCCAAA	
GAPDH F (ileri)	CCCTTCATTGACCTCAACTACA	101
GAPDH R (geri)	ATGACAAGCTTCCCGTTCTC	

PZR reaksiyonu için Thermo Power SYBR® Green PCR Master Mix kiti kullanılmıştır. İlk olarak kit protokolünde tarif edildiği gibi Çizelge 3.5'te yer alan PZR reaksiyon karışımı hazırlanmıştır.

Çizelge 3.5. PZR reaksiyon karışımı.

	1 reaksiyon için
2X reaksiyon mix	5 $\mu$ l
İleri Primer	0,1 $\mu$ l
Geri Primer	0,1 $\mu$ l
dH2O	1,8 $\mu$ l

cDNA	3µl
Toplam	10µl

Hazırlanan her bir 10µl'lik reaksiyon karışımı MicroAmp™ Fast Optical 96 gözlü reaksiyon plakalarına eklenmiştir.

Plakanın üzeri MicroAmp™ Optical yapışkan film ile kapatılmıştır.

Reaksiyon karışımının dibe çökmesi ve baloncukların patlaması için plakalara hafifçe çırpma hareketi yapılmıştır.

Çizelge 3.6'de yer alan PZR ısı döngü koşullarına göre reaksiyon başlatılmıştır.

Çizelge 3.6. PZR ısı döngü süreleri.

Döngü	Sıcaklık	Zaman
1	95°C	10dakika
40	95°C	15sn
	60°C	1 dakika

### **3.8. Transfeksiyon Sonrası Plak Test Yöntemi ile Şap Virüsüne Duyarlılığının Belirlenmesi**

SW480 hücrelerinin transfeksiyondan sonra şap virüsüne karşı duyarlılığını tespit etmek amacıyla hücreler transfekte edilmiş, ilgili gözlere virüs ekilmiş ve sitopatojenik etki incelenmiştir.

SW480 hücrelerine Sindekan1, integrin β6 ve kontrol plasmidin transfeksiyon işlemi "3.7.2. Plasmid Vektörlerinin SW480 Hücrelerine Transfeksiyonu" bölümünde tarif edildiği gibi yapılmıştır. Transfeksiyondan sonra GFP ışımalarına bakılarak transfeksiyonu en verimli orana ulaştığı 48. saate virüs ekimi işlemlerine başlanmıştır. Öncelikle 2 defa serumsuz vasat ekleme ve uzaklaştırma işlemi ile tutunmayan hücreler uzaklaştırılmıştır. Böylece hücrenin tek tabaka olması sağlanır ve serum içerisinde virüsün bağlanmasını engelleyebilecek protein yapıdaki maddeler uzaklaştırılmış olur. Ardından uygun miktarda virüs ilgili gözlere ekilmiş ve virüsün adsorbe olabilmesi için 37°C, %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 1 saat inkübe edilmiştir. Adsorbsiyonun sonunda %1,3 gum vasatı ve 2X GMEM vasatının 1:2 oranında hazırlanan karışımdan her bir göze eklenmiş ve plakalar

37°C, %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresince plakalar kesinlikle hareket ettirilmemiştir. Sürenin sonunda plakalardaki vasat boşaltılmış ve PBS ile hazırlanan %2,5 kristal viyole ve %20 formol içeren boyama solüsyonundan her bir göze eklenmiştir. Oda ısısında 30 dakika inkübasyonun ardından boya boşaltılıp musluk suyu altında dikkatlice yıkanmış ve kurumaya bırakılmıştır.

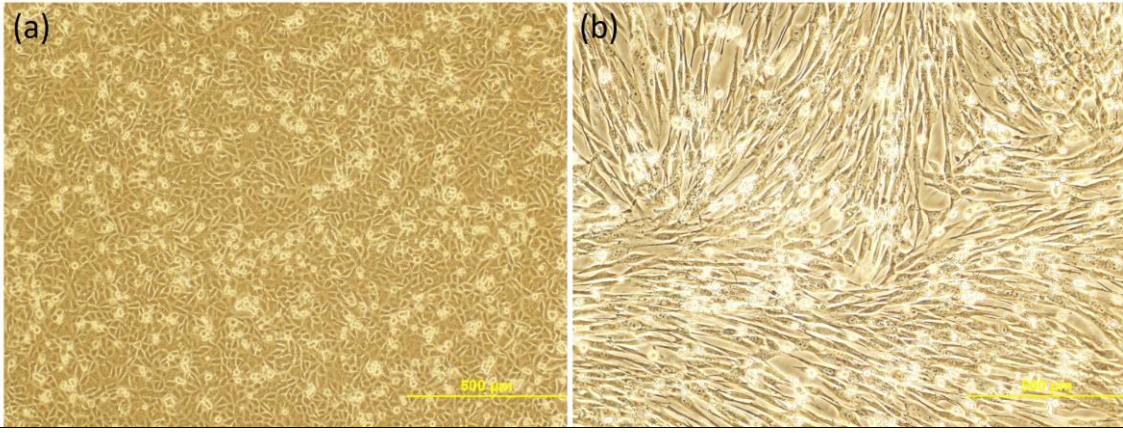
### **3.9. İstatiksel analiz**

Deney sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesinde GraphPad Prism 7 programı kullanılmıştır. Veriler tekrarlı ölçüm yapılan analizler için ortalama  $\pm$  standart sapma değerleri ile belirtilmiştir. Farklı grupların istatistiksel olarak karşılaştırılmasında ikiden fazla grup karşılaştırması için tek yönlü ANOVA ve Dunnett's post hoc testi kullanılmıştır. İstatiksel değerlendirme sonucunda deney grupları arasındaki farkı gösteren sayısal değer (p); p değeri 0,05 altındaki ( $p < 0,05$ ) değerler önem derecesinde anlamlı olarak kabul edilmiş, p değeri 0,05 üzerindeki ( $p > 0,05$ ) değerler ise anlamlı bir fark göstermediği kabul edilmiştir.

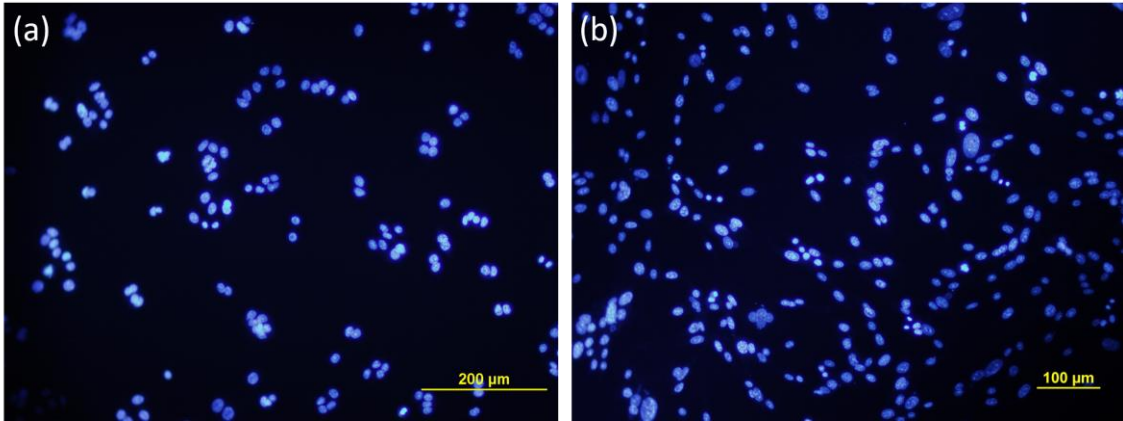
## 4. SONUÇLAR

### 4.1. SW480 ve BHK-21 Hücrelerinin Sterilite ve Mikoplazma Testlerinin Sonuçları

SW480 ve BHK-21 hücrelerinin pasajlanmaları sırasında mikrobiyolojik sterilite kontrolü için FTM ve TSB besiyerlerine ve BACTEC cihazı aerobik-anaerobik flakonlarına yapılan ekimlerin, 14 günlük inkübasyonları sonucunda herhangi bir üreme gözlenmemiştir. SW480 hücre hattının inverted mikroskop görüntüsü fotoğraflanmıştır (Şekil 4.1). Mikoplazma testi için yapılan DAPI floresan boyaması sonucu negatif bulunmuştur (Şekil 4.2).



Şekil 4.1. Inverted mikroskop görüntüsü a) SW480 hücresi b) BHK-21 hücresi.

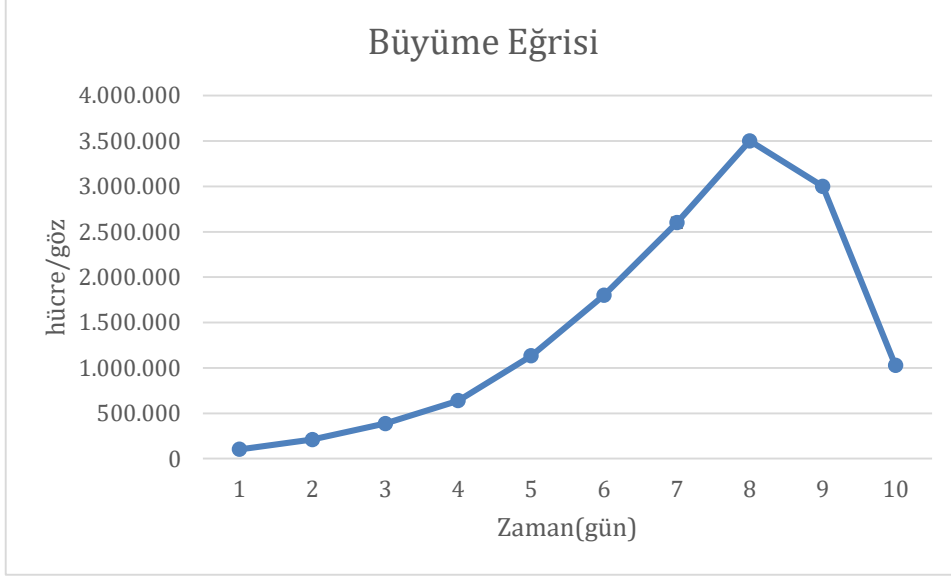


Şekil 4.2. DAPI boyaması floresan mikroskop görüntüsü (uyarma/emisyon maks: 358/461 nm) a) SW480 hücre hattı 200X büyütme b) BHK-21 hücre hattı 200X büyütme.

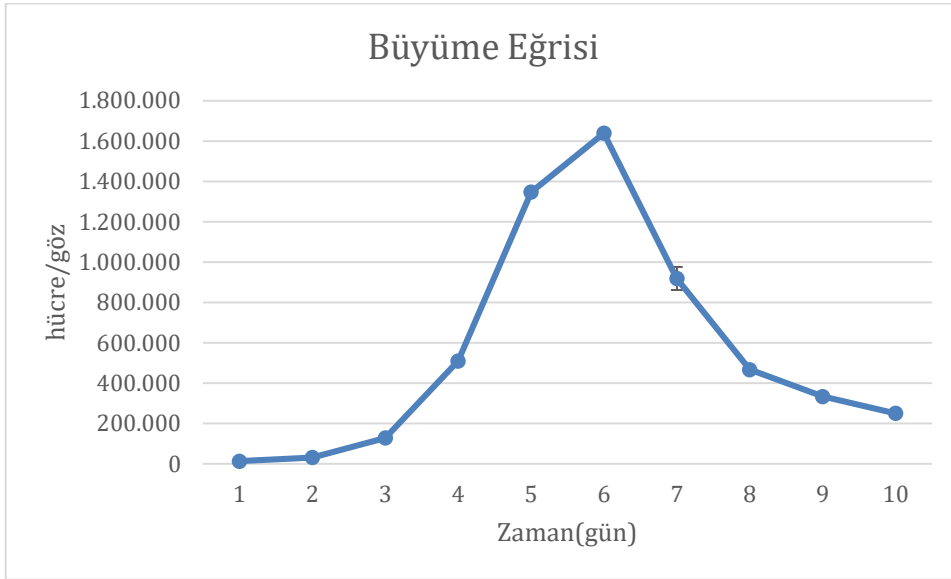


## 4.2. SW480 ve BHK-21 Hücrelerinin Üreme Eğrisinin Çıkarılması ve İkilene Zamanı

SW480 ve BHK-21 hücrelerinin 10 gün boyunca yapılan sayımlardan üreme eğrisi grafiği çizilmiştir (Şekil 4.3, Şekil 4.4). Büyüme eğrisine göre hesaplanan formülle popülasyon ikilenme zamanı SW480 hücrelerinin 33 saat, BHK-21 hücrelerinin 11.5 saat bulunmuştur.



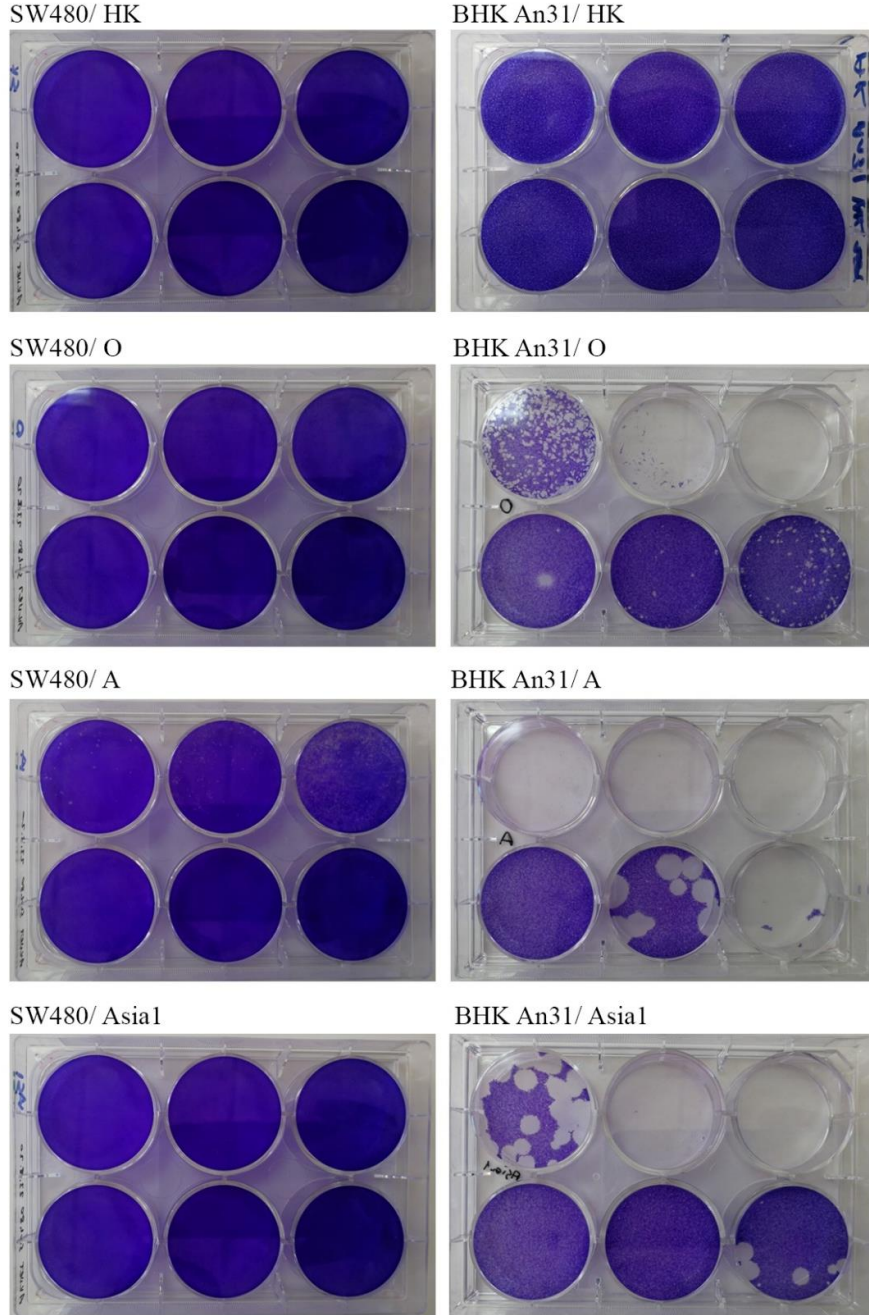
Şekil 4.3. SW480 hücrelerinin büyüme eğrisi grafiği.



Şekil 4.4. BHK-21 hücrelerinin büyüme eğrisi grafiği.

#### 4.3. SW480 ve BHK-21 Hücrelerinin Plak Test Yöntemi ile Şap Virüsüne Duyarlılığının Sonuçları

Plak test yönteminde, şap virüsü olarak BHK-21 An<sub>31</sub> tek tabaka hücre kültürüne adapte olmuş AIRN/11, OTUR/17 ve ASIA1/11 laboratuvar suşları kullanılmıştır. SW480 ve kontrol olarak BHK-21 An<sub>31</sub> hücresinin 3 farklı serotipe karşı plak testi sonucu verilmiştir (Şekil 4.5).

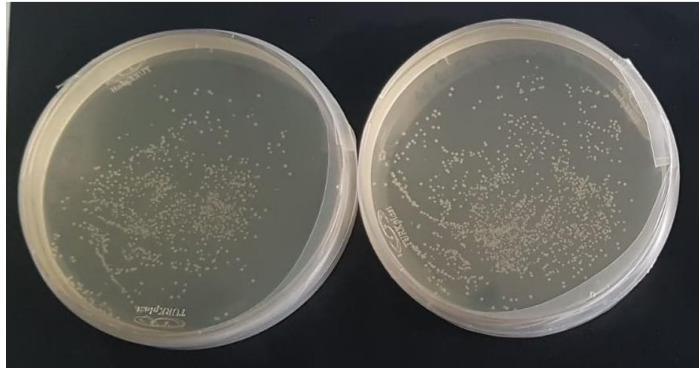


Şekil 4.5. Şap virüsü A,O ve Asia1 serotiplerinin SW480 hücre hattı ve kontrol grubu BHK-21 An<sub>31</sub> hücre hattındaki plak morfolojileri.

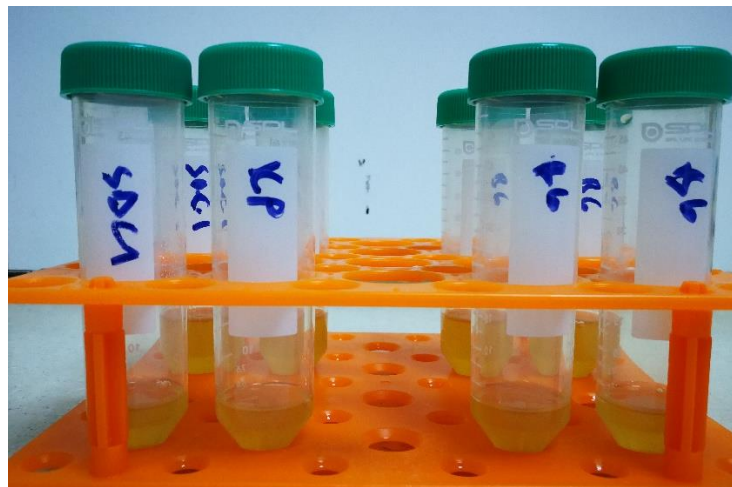
Buna göre her iki grubun hücre kontrollerinde plak gözlenmezken, kontrol grubu BHK-21 An<sub>31</sub> hücresinde şap virüsünün 3 serotipinde plaklar gözlenmiş, SW480 hücresinde A serotipinin 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> dilüsyonlarında az miktarda plaklar gözlenmiş, O ve Asia1 serotiplerinde ise plak gözlenmemiştir.

#### 4.4. İzole Edilen Plazmidlerin Spektrofotometre ile Konsantrasyonlarının Ölçülmesi ve Agaroz Jel Elektroforez Sonuçları

SDC1, integrin β6 ve kontrol plazmidinin, One Shot Stbl3 kompetan bakterisine aktarıldıktan sonra, LB agar (Şekil 4.6) ve LB broth (Şekil 4.7) besi yerlerinde çoğalma görülmüştür. Çoğalan plazmid DNA'ların izolasyonu da başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.6. Transforme edilen bakterinin ampisillin içeren LB agarda üreme görüntüsü.



Şekil 4.7. Transforme edilen bakterinin LB broth besiyerinde üreme görüntüsü.

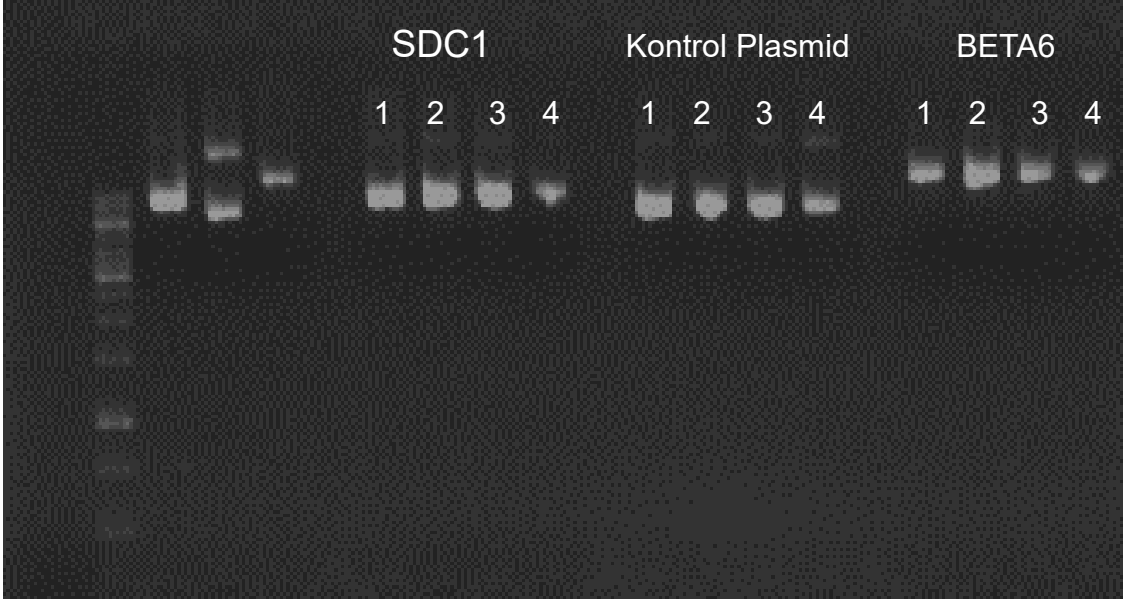
İzole edilen pDNA'nın spektrofotometrede konsantrasyonu ve saflık oranı (260/230 nm oranı) ölçülmüş ve değerler tabloya aktarılmıştır (Çizelge 4.1). Nükleotidler, (ssDNA, dsDNA ve RNA) 260 nm'de absorbe edildiğinden elde edeceğimiz ürünün izolasyon işlemlerinin iyi yapılması oldukça önemlidir. 260 nm ve 280 nm'de (260/280) absorbans oranı, DNA ve RNA'nın saflığını değerlendirmek için kullanılır. Yaklaşık 1.8'lik bir oran genellikle DNA için saf olarak kabul edilirken yaklaşık 2.0 oranı genellikle RNA için saf olarak kabul edilir. DNA ve RNA için 1.8 ve 2.0 oranları genel olarak kabul görmektedir. Gerçek oran, nükleik asidin bileşimine bağlı olacaktır. Timine kıyasla daha yüksek Urasil oranı (Guanin: 1.15, Adenin: 4.50, Sitozin: 1.51, Urasil: 4.00 Timin: 1.47) nedeniyle RNA tipik olarak daha yüksek bir 260/280 oranına sahiptir. 260 nm ve 230 nm'de (260/230) absorbans oranı ise nükleik asit saflığını gösteren ikinci bir değer olarak kullanılır. Saf nükleik asit için beklenen değer 260/230 oranının 260/280 oranından daha yüksek olduğu değerlerdir. Beklenen 260/230 oranı genellikle 2.0-2.2 aralığındadır (Stephenson, 2010). Buna göre yapılan izolasyon işlemleri başarılı ve elde edilen sonuçlar beklenen değerlerin içerisinde. Transfeksiyon için gerekli plasmid miktarı da Çizelge.4.1'de belirtilen plasmid konsantrasyonlarına göre hesaplanmıştır.

Çizelge 4.1. SDC1 ve kontrol plasmidinin spektrofotometre ölçüm değerleri.

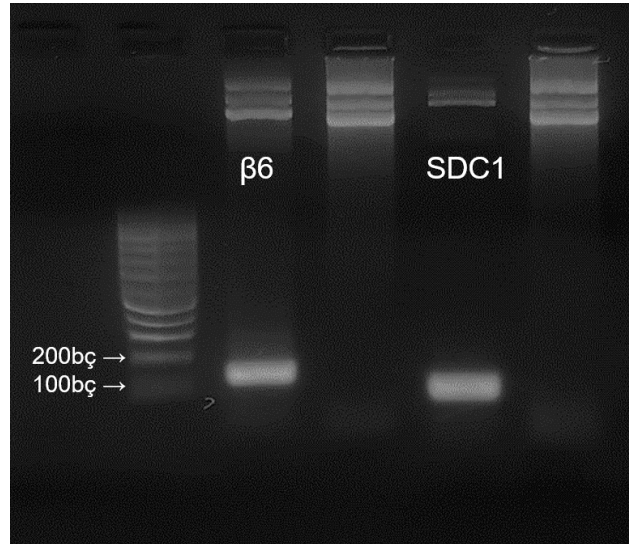
	Konsantrasyon (ng/μl)	260/280 nm	260/230 nm
SDC1 plasmid	188,95	1,90	1,86
Kontrol plasmid	180,59	1,91	1,85
B6 plasmid	123,98	1,84	1,93

Üretici firmanın belirttiği plasmid DNA boyutları; kontrol plasmid 6.6 kb, SDC1 plasmid 7.5 kb (orf 930bç) ve integrin β6 plasmid 8.9 kb (orf 2364bç) dir. İzole edilen plasmid boyutlarının doğruluğu yapılan agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir ve boyutları ile ters orantılı olarak en önde kontrol plasmid, sonra SDC1 plasmid, en geride integrin β6 plasmid (Şekil 4.8) yer alarak firmanın belirttiği boyutlarda olduğu görülmüştür.

İzole edilen plasmid DNA'ların doğruluğunu kontrol etmek için SDC1 ve integrin  $\beta 6$  primerleri kullanılarak yapılan PZR sonucunda ise SDC1 ve integrin  $\beta 6$ 'nın PZR ürünü oluşturduğu görülmüştür (Şekil 4.9).



Şekil 4.8. İzole edilen plasmidlerin agaroz jel görüntüsü (kontrol plasmid 6.6 kb, SDC1 plasmid 7.5 kb ve integrin  $\beta 6$  8.9 kb).

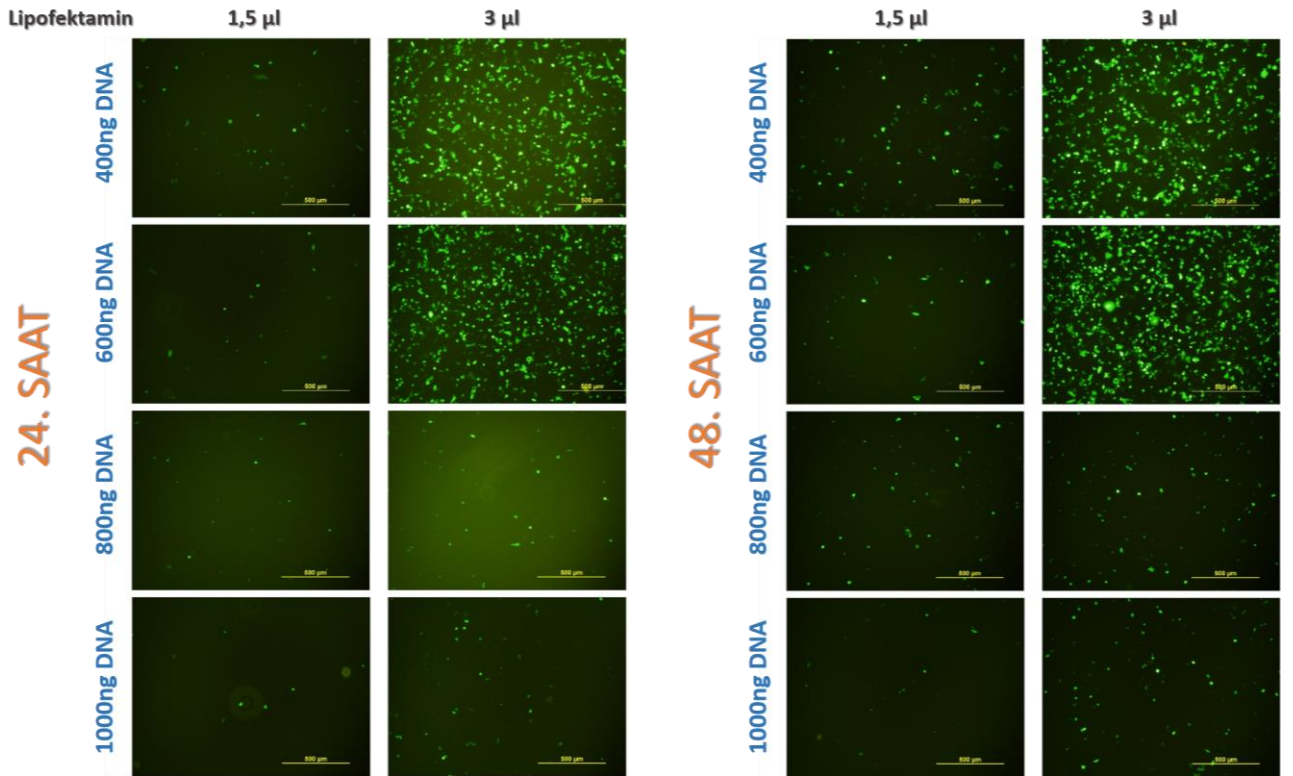


Şekil 4.9. İzole edilen plasmidlerin PZR sonrası agaroz jel görüntüsü (SDC1 142bç, integrin  $\beta 6$  144bç).

#### 4.5. Transfeksiyon Uygulama Dozunun Belirlenmesi Sonucu

Transfeksiyon işlemlerinde tüm hücrenin transfekte olan hücreye oranına transfeksiyon verimliliği denir. Transfeksiyon verimliliği ne kadar yüksekse aktardığımız genin konak hücrede ifade olma miktarı o derece yüksektir, bu da başarılı bir transfeksiyon yapıldığını gösterir. Plasmidlerde yer alan GFP geni sayesinde ifade olan GFP proteini floresan mikroskop altında ışığa vererek transfeksiyon işleminin gerçekleştiğini gösterir. Burada da GFP proteini uyarma/ emisyon max = 482/ 502 nm değerli filtre sayesinde floresan mikroskopta incelenmiştir.

Transfeksiyon doz denemesi ile, 48. Saatte 600 ng/μl DNA + 3μl Lipofektamin grubunda en iyi transfeksiyon verimliliği gözlemlenmiştir (Şekil 4.10).

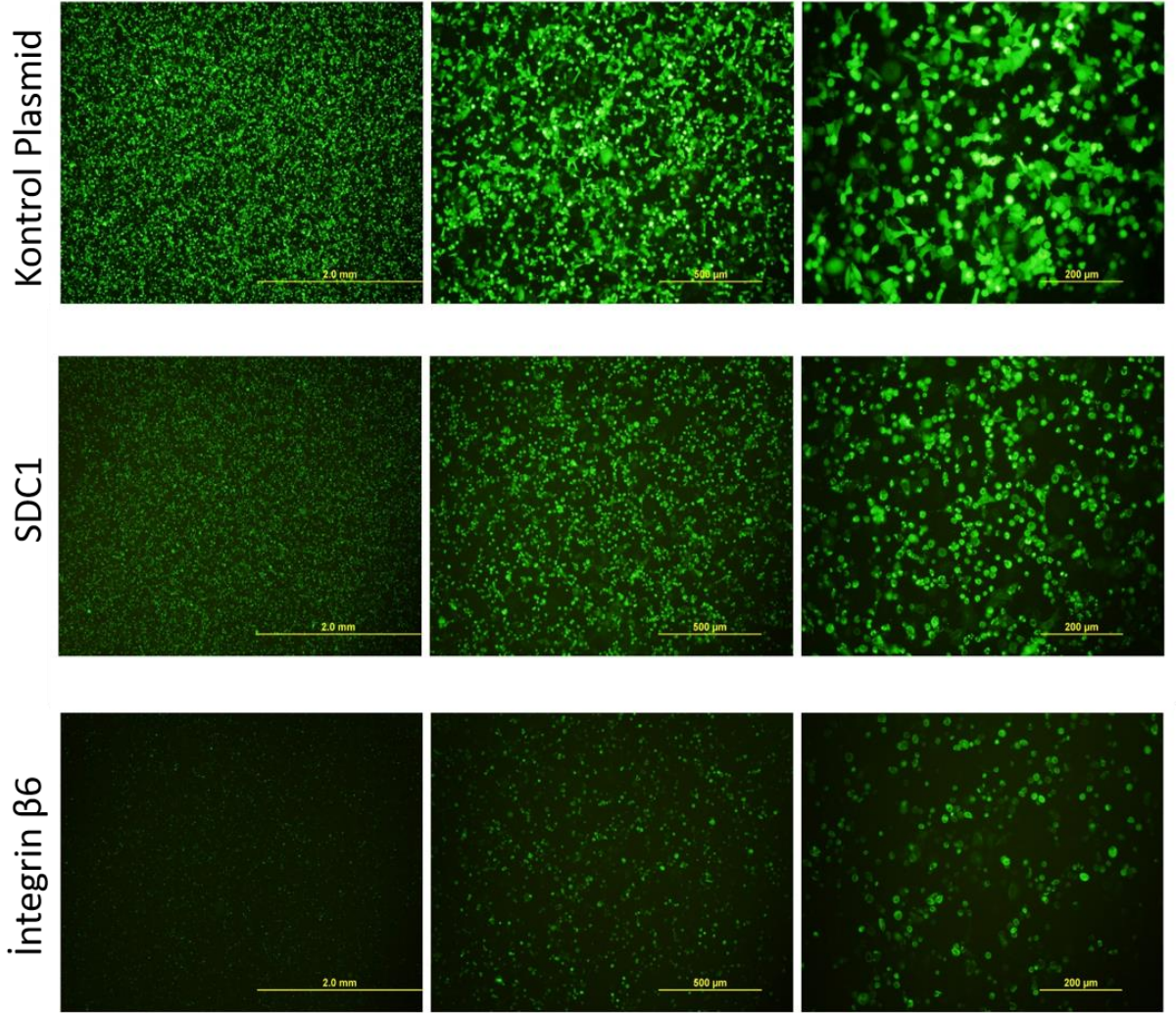


Şekil 4.10. Transfeksiyon uygulama dozunun belirlenmesi GFP ışımalarının fotoğrafları.

#### 4.6. Plasmid Vektörlerinin SW480 Hücresine Transfeksiyon Sonuçları

Transfeksiyon uygulama dozunun belirlenmesi sonucu elde edilen transfeksiyon verimliliğinin en yüksek olduğu koşul (48. Saatte 600ng/μl pDNA + 3μl Lipofektamin ) dikkate alınarak SDC1, integrin β6 ve kontrol plasmid transfeksiyon işlemleri daha önce

anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Transfeksiyondan 48 saat sonra floresan mikroskopta GFP ışımalarının fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 4.11).

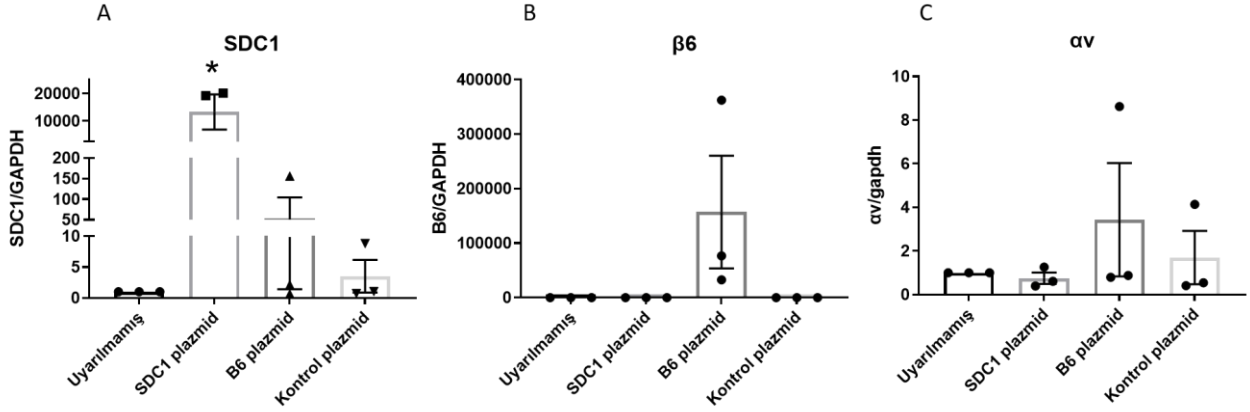


Şekil 4.11. Transfeksiyondan 48 saat sonra kontrol plasmid, SDC1, integrin  $\beta 6$  plasmidlerinde GFP ışımalarının fotoğrafları.

#### 4.7. Transfeksiyon Sonrası Genlerin İfadesinin Ölçüm Sonuçları

Çalışma kapsamında SW480 hücresinde yapılan SDC1, integrin  $\alpha v$ , integrin  $\beta 6$  ve kontrol plasmid transfeksiyon işlemlerinin ardından PZR reaksiyonu ile hedeflenen genlerdeki ifade artışlarına bakılmıştır. SDC1 transfekte SW480 hücresinin SDC1 gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ( $p=0,0461$ ).  $\beta 6$  transfekte SW480 hücresinin SDC1 gen ifadesinde, kontrol plasmid transfekte SW480 hücresinin SDC1 gen ifadesinde,  $\beta 6$  transfekte SW480 hücresinin  $\beta 6$  gen ifadesinde,  $\beta 6$  transfekte SW480

hücresinin  $\alpha v$  gen ifadesinde ve kontrol plazmid transfekte SW480 hücresinin  $\alpha v$  gen ifadesinde artış tespit edilmiştir. Analiz sonuçları Şekil 4.12’de gösterilmiştir.

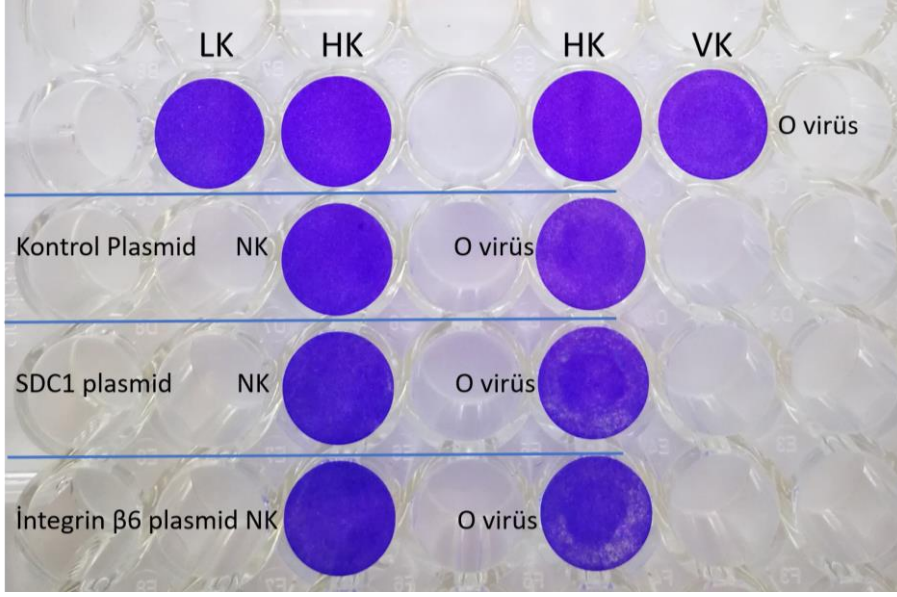


Şekil 4.12. SDC1, integrin  $\beta 6$  ve kontrol plazmid ile transfekte SW480 hücrelerinde uyarılmamış SW480’e oranla ifade miktarları, A: SDC1 geni, B: integrin  $\beta 6$  geni, C: integrin  $\alpha v$  geni (n: 3; p: > 0,5 (ns), 0,0461 (\*))

#### 4.8. Transfeksiyon Sonrası Plak Test Yöntemi ile Şap Virüsüne Duyarlılığının Belirlenmesi Sonuçları

SW480 hücresinde transfeksiyon ve virüs ekimi işlemlerinin ardından yapılan boyama sonucunda hücre kontrol, lipofektamin kontrol, virüs kontrol ve transfekte edilen hücrelerin virüs ekilmeyen negatif kontrol gruplarında toksik veya sitopatik etki sonucu dökülme görülmemiştir. Kontrol plazmid, SDC1 ve integrin  $\beta 6$  ile transfekte hücrelerin O serotipi virüs ekilen gözlerde kademeli olarak dökülme görülmüştür (Şekil 4.13).





Şekil 4.13. SW480 hücresinde transfeksiyon ve O serotip virüs ekimi boyama sonuçları (LK: lipofektamin kontrol, HK: hücre kontrol, VK: virüs kontrol, NK: negatif kontrol).

## 5. TARTIŞMA

Şap hastalığı, Sahra altı Afrika'nın çoğu, Asya ve Güney Amerika'nın büyük bölümleri, ve Türkiye'de dahil olmak üzere dünyanın birçok bölgesinde endemik olan, çift tırnaklı hayvanların akut ve oldukça bulaşıcı bir hastalığıdır. Çift tırnaklı çiftlik hayvanlarında görülen şap hastalığı, hayvan ve hayvansal ürünlerin uluslararası ticaretini ve gıda güvenliğini tehdit etmekte, hayvancılık sektörünü ciddi şekilde etkilemekte ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Endemik bölgelerdeki varlığının doğrudan ve dolaylı tahmini yıllık ekonomik etkisinin 6,5 ile 21 milyar ABD Doları arasında olduğu tahmin edilmektedir. Bu nedenle şap hastalığı ile mücadele, endemik ve endemik olmayan ülkelerin ana hedefleri arasındadır. Aşılama, endemik bölgelerde şap hastalığını kontrol etmek için en etkili çözüm olmayı sürdürmekte ve yılda yaklaşık 2,5 milyar doz aşı kullanılmaktadır (Knight-Jones ve Rushton, 2013).

Bir serotipe karşı aşılama diğer serotipe karşı etkili çapraz koruma sağlamamaktadır, hatta bazen aynı serotip içindeki farklı suşlara karşı da çapraz koruma yoktur (Duque ve Baxt, 2003). Sahada uygulanan aşı suşu ile salgın suşu arasında antijenik eşleşme olmadığı durumda, hızla salgın suşundan aşı tohum stoğu üretilmesi zorunlu hale gelir. Aşı üretiminin ve virüs çalışmalarının ilk adımı olan virüs izolasyonunda bazı saha suşlarının hücre kültürüne adaptasyonu zor olabilir. Bu durum zaman kaybına, düşük virüs miktarına ve yeni suşa karşı aşı üretiminin gecikmesi nedeniyle salgınların yayılmasına neden olabilir (Harvey ve ark.,2022).

Virüsler, duyarlı konakçı hücrelerin hücre yüzeylerinde yer alan spesifik reseptörlere bağlanarak enfeksiyon işlemini başlatırlar. Hücre kültürüne adapte olmamış şap virüsü, konak hücreye giriş sağlamak için  $\alpha\beta 1$ ,  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 6$  ve  $\alpha\beta 8$  integrin reseptörlerini kullanır (Neff ve ark., 1998; Jackson ve ark., 2000; Jackson ve ark., 2002; Jackson ve ark., 2004). Bu reseptörler, VP1 kapsid proteininin G-H ilmiğinde yer alan, yüksek oranda korunmuş RGD dizisi ile şap virüsüne bağlanır (Wang ve ark.,2015). Şap virüsünün hücre kültürü adaptasyonu aşamasında, özellikle adaptasyonu zor olan suşlarda ise enfeksiyon için ikincil reseptör olarak kabul edilen heparan sülfat proteoglikanları kullanılır (Jackson ve ark.,1996; Sa-Carvalho ve ark.,1997). Virüsün bağlanma bölgesi ise üç ana kapsid proteini olan VP1, VP2 ve VP3'ün birleştiği noktada bulunan virion yüzeyindeki bir çöküntüdür (Fry ve ark., 1999). Şap virüsü ligand ve hücresele reseptörlerine ilişkin çalışmalar, ligand-reseptör etkileşiminin yanı sıra, enfeksiyon

yollarını, replikasyon döngüsünü, patogenezi ve konak tropizmini açıklığa kavuşturmada yardımcı olacak, bu da sırasıyla virüs izolasyonu, teşhis, kontrol, genotipleme, ilaç ve aşı geliştirilmesi yoluyla hastalıkla mücadelede büyük yarar sağlayacaktır.

Heparan sülfatların farklı familyalara ait birçok virüste ve şap virüsü de dahil olmak üzere Picornaviridae familyası üyelerinin bazılarında hücre yüzeyine ilk bağlanmasına aracılık eden reseptör olarak gösterilmiş fakat heparan sülfat ailesinden hangisinin rol aldığı araştırılması konusunda literatürde çalışmaya rastlanmamıştır (Jackson ve ark., 1996, Sa-Carvalho ve ark.,1997; Cagno ve ark.,2019; Cheudjeu, 2021). Heparan sülfatlardan hücre membranına bağlı iki proteinden biri olan sindekanlar, tip 1 transmembran glikoprotein iken glipikanlar, hücre zarına sabitlenmiş yapıdadır (Sarrazin ve ark., 2011). Sindekanlar hücrede reseptör veya yardımcı reseptör olarak rol alırlar, birçok virüs için reseptör olarak rol aldığı da kanıtlanmıştır (Gondelaud ve Ricard-Blum, 2019; Cheudjeu, 2021). Sindekanların 4 tipinden biri olan Sindekan 1 (SDC1), hepatitis C virüsü (HVC), insan papillomavirüs tip 16 (HPV-16), herpes simpleks virüs tip 1 (HSV-1) ve günümüzde de COVID-19 olarak bilinen ve pandemiye neden olan şiddetli akut solunum yolu sendromu koronavirüsü 2 (SARS-CoV-2) gibi birçok virüsün hücreye girişte reseptör olarak rol aldığı kanıtlanmıştır (Cheudjeu, 2021). Sindekan 1 epitel hücrelerinde bol miktarda bulunur, sığır dil epitel ve fibroblast primer hücre hattında ifade olduğu ise yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (Yılmaz, 2019; Gondelaud ve Ricard-Blum, 2019). Ayrıca SDC1'in, şap virüsü reseptörlerinden olan integrin  $\alpha\beta 3$  ile doğrudan, integrin  $\beta 1$  ile dolaylı etkileşimlerinin olması bu proteinin de hücesel reseptör olarak rol alabileceği, aynı zamanda virüs hücre içine alındıktan sonraki mekanizmalarda da rolünün olabileceğini düşündürmektedir (Afratis ve ark., 2017).

Bu tez çalışmasında, şap virüsünün özellikle hücre kültürüne adaptasyonunda reseptör olarak kullandığı bilinen heparan sülfat proteoglikanlardan biri olan SDC1'in rolü araştırılmıştır. Yapılan bir çalışmada şap virüsüne duyarlı olmayan insan kolon karsinom hücrelerinin (SW480), tam uzunlukta insan integrin  $\beta 6$  alt birimi ile kalıcı transfeksiyonu ve  $\alpha\beta 6$ 'nın hücre yüzeyinde ifadesi sonucu enfeksiyona duyarlı hale geldiği gösterilmiştir (Jackson ve ark., 2000). Benzer prensiplere dayanan bu tez çalışmasında da duyarlı olmayan SW480 hücresi ve pozitif kontrol grubu olarak integrin  $\beta 6$  alt birimi kullanılmıştır.

Bu tez çalışmasında şap virüsü olarak BHK-21 hücresinde *in vitro* koşullara adapte edilmiş, Türkiye'de yayılış gösteren OTUR/17 suşu kullanılmıştır. Şap virüsünün A

serotipi, O serotipi ve Aisia1 serotipi ile SW480 hücre kültüründe tekrarlı virüs hassasiyet çalışmaları yapılmıştır. SW480 hücre hattı A serotipi ve Asia1 serotiplerine kısmen duyarlılık gösterirken, O serotipine karşı hiçbir duyarlılık göstermediğinden dolayı O serotipi kullanılmıştır. Ayrıca, O tipinin hücrelere girmesinin karmaşık bir işlem olduğunu ve hücre yüzeyi ile ilk temasın heparan sülfat aracılığıyla yapıldığını gösteren çalışmada oldukça etkili olmuştur (Jackson ve ark., 1996). Heparan sülfatların, integrinlerin aksine *in vitro* hücre kültürüne adapte O serotipi suşlarda tercih edildiğini gösteren çalışmada bunu desteklemiştir (Sa-Carvalho ve ark.,1997). Pozitif kontrol olarak kullanılan integrin  $\beta 6$ 'nın diğer serotiplere kıyasla O serotipine daha duyarlı olması da bu tercihimizle uyum göstermiştir (Duque ve Baxt, 2003). Ayrıca bu serotipin SW480 hücrelerine duyarlı olmadığı bu tez kapsamında doğrulanmıştır.

Bazı deneysel değişkenler transfeksiyon verimini etkilemektedir. Transfekte edilecek genlerin *in vitro* optimal ifadesi, hücre tipi, pasaj geçmişi, vektör yapısı, boyut ve saflık, promotorlar, plasmid DNA/transfeksiyon reaktifi kompleks oranı, inkübasyon süresi, antibiyotik ve serum varlığı gibi birçok faktörden etkilenir (Hunt ve ark.,2010). Bu çalışmada transfeksiyon uygulama dozunun belirlenmesi sonucu elde edilen en verimli oran, 2018 yılında SW480 hücrelerinde yapılan transfeksiyon optimizasyonu çalışması ile uyumlu bulunmuştur (Gray ve ark.,2018). İlgili çalışmada lipofektamin 2000 ürünü kullanılmıştır ancak bu çalışmada aynı üreticiye ait lipofektamin 3000 ürünü kullanılmıştır ve plasmid/lipofektamin oranı ve en yüksek transfeksiyon oranının elde edildiği süre büyük oranda benzerlik göstermiştir. Boş kontrol plasmidi, SDC1 geni ve integrin  $\beta 6$  geni içeren plasmidlerin transfeksiyon sonrası GFP floresan ışık şiddeti arasındaki kademeli farklılığın ise ifade genlerinin farklı boyutta olması (kontrol 6.6 kb, sdc1 7.5 kb,  $\beta 6$  8.9 kb) ve plasmid yerleşiminde GFP geninin SDC1 veya  $\beta 6$  genlerinin arkasında yer aldığı için en son ifade olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

PZR reaksiyonu ile transfekte edilmiş hücrelerde gen ifade profillerine bakıldığında, SDC1 gen ifadesinin transfekte olmayan hücreye kıyasla beklenildiği gibi yüksek oranda arttığı görülmüştür. Bu sonuç, SW480 hücrelerinde düşük düzeyde ifade olan SDC1 geninin transfeksiyonun ardından yüksek miktarda ifade olduğunu gösteren çalışma ile uyumlu bulunmuştur (Wang ve ark., 2019). İntegrin  $\beta 6$  geni, SW480 hücrelerinde ifade olmazken transfeksiyon sonrası beklenildiği gibi yüksek oranda ifade olduğu görülmüştür. Şap virüsü için duyarlı olmayan SW480 hücrelerinde integrin  $\beta 6$  transfeksiyonu sonrası yüksek oranda ifade olduğunu hem  $\beta 6$  zincirine hem de  $\alpha \nu \beta 6$

heterodimerine özgü monoklonal antikolar kullanılarak akış sitometrisi yöntemiyle gösterilen çalışma ile de sonuçlarımız uyumlu bulunmuştur (Jackson ve ark., 2004). İntegrin  $\beta 6$ 'nın heterodimeri olan integrin  $\alpha v$  geninin de ifadesine bakılmış ve integrin  $\beta 6$  ile transfekte olan hücrede integrin  $\alpha v$  ifadesinin beklentiler doğrultusunda daha fazla arttığı görülmüştür. Bunun nedeni,  $\beta 6$  ile transfekte edildiğinde, heterodimer  $\alpha v$  alt birimi ile eşleşme oluşur, böylece hücre yüzeyinde integrin  $\alpha v\beta 6$  heterodimeri fonksiyonel olarak ifade olur (Weinacker ve ark., 1994). Bu nedenle uyarılmamış, kontrol plasmid ile tranfekte ve SDC1 geni ile transfekte hücrelerde  $\alpha v$  ifade olsa da en fazla artış  $\beta 6$  ile transfekte olanda görülmüştür. Ayrıca kontrol plasmid ile transfekte olan hücrede integrin  $\alpha v$  ve SDC1 genleri beklentilerin aksine ifadelerinde artış görülmüştür. Nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte  $\alpha v$  ve SDC1 genlerinin ifade yollarının etkilendiği düşünülmektedir.

Transfekte edilmiş hücrelerin şap virüsü ile enfekte edilmesi sonucunda kontrol plasmid, SDC1 ve  $\beta 6$  geni ile transfekte olan gözlerde kademeli olarak sitopatik etki sonucu hücrelerde dökülme gözlenmiştir. Bir çalışmada, duyarlı olmayan SW480 hücresine integrin  $\beta 6$  transfeksiyonu yapıldıktan sonra virüs ekilmiş ve 48 saat inkübasyondan sonra kontrol plasmid grubunda dökülmeler olmuş gen aktarılmış grupta ise hücreler tamamen dökülmüştür (Jackson ve ark., 2000). Diğer çalışmada duyarlı olmayan SW480 hücresine integrin  $\beta 6$  ve  $\beta 8$  transfeksiyonu yapıldıktan sonra virüs ekilmiş ve 48 saat inkübasyondan sonra yine kontrol plasmid grubunda düşük miktar olmak üzere gen aktarılmış gruplarda daha fazla sitopatik etki görülmüştür (Jackson ve ark., 2004). Bu sonuçlarla karşılaştırdığımızda kontrol plasmid grubunda gerçekleşen dökülmenin benzer olduğunu, nedeninin kontrol plasmid grubunda ifade olan  $\alpha v$  ve SDC1 genlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Pozitif kontrol grubu olarak kullanılan, şap virüsü için reseptör olduğu ispatlanan integrin  $\beta 6$  hücresinde en fazla dökülmenin olması, aday olarak belirlediğimiz SDC1 geni ile transfekte hücrede nispeten az da olsa dökülmenin olması SDC1 geninin şap virüsü hücresel reseptör adaylığı için olumlu bir sonuç olarak değerlendirilmiştir.

Tez kapsamında elde edilen sonuçların planlanan ilave çalışmalar ile desteklenerek şap virüsünün hücre giriş yollarındaki mekanizmaları aydınlatmada önemli olduğu düşünülmektedir. Virüse duyarlı olan farklı hücre hatları ve farklı alt virüs suşları kullanılarak, ilişkili diğer gen profilleri çıkarılarak heparan sülfatların şap virüsünün hücreye giriş yollarının araştırılması önemli olacaktır. Ayrıca SDC1'in gen ifadesi

dışında hücre içersindeki protein düzeyindeki ifade değışikliklerinin de hücreyel immün boyamalar ile desteklenerek çalışmaya katkı sunması planlanmaktadır.

## 6. YORUM

1. Bu çalışma ile SW480 hücresinin SDC1 ve integrin  $\beta 6$  genleri ile başarılı bir transfeksiyon protokolü oluşturulmuş ve ortaya konulmuştur.
2. Heparan sülfat grubu proteinlerinden olan SDC1 geninin şap virüsü için potansiyel bir hücresel reseptör olabileceği yönünde olumlu sonuçlar ortaya konulmuştur.
3. SDC1 geninin şap virüsü için hücresel reseptör olabilmesini doğrulayabilmek amacıyla daha ileriki çalışmalar da önerilmektedir.
4. SDC1 geninin ifadesinin western blot yöntemi ile gösterilerek ikinci bir doğrulama yapılması anlamlı olacaktır.
5. SDC1 geni ile transfekte SW480 hücrelerinde O tipi şap virüsünün hücre içine alınmasının uygun olan bir yöntemle gösterilmesi planlanmaktadır.
6. SDC1 geni ile transfekte SW480 hücreleri ile O tipi şap virüsünün adaptasyon pasajları yapıldıktan sonra plak testinin tekrarları yapılacaktır.
7. SW480 hücresine SDC1 geninin kalıcı transfeksiyonu ile çalışmaların yapılması önerilmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

Afratis, N.A., Nikitovic, D., Multhaupt, H.A., Theocharis, A.D., Couchman, J.R., Karamanos, N.K., 2017. Syndecans—key regulators of cell signaling and biological functions. *The FEBS journal* 284(1), 27-41.

Bachrach, H.L., 1968. Foot-and-mouth disease. *Annual Reviews in Microbiology* 22(1), 201-244.

Bacsa, S., Karasneh, G., Dosa, S., Liu, J., Valyi-Nagy, T., Shukla, D., 2011. Syndecan-1 and syndecan-2 play key roles in herpes simplex virus type-1 infection. *The Journal of general virology* 92(Pt 4), 733.

Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C.M., Sevilla, N., Andreu, D., Beck, E., Domingo, E., 2000. Cell recognition by foot-and-mouth disease virus that lacks the RGD integrin-binding motif: flexibility in aphthovirus receptor usage. *Journal of virology* 74(4), 1641-1647.

Berinstein, A., Roivainen, M., Hovi, T., Mason, P., Baxt, B., 1995. Antibodies to the vitronectin receptor (integrin alpha V beta 3) inhibit binding and infection of foot-and-mouth disease virus to cultured cells. *Journal of virology* 69(4), 2664-2666.

Bermejo-Jambrina, M., Eder, J., Kaptein, T.M., van Hamme, J.L., Helgers, L.C., Vlaming, K.E., Brouwer, P.J., Vlaar, A.P., van Baarle, F.E., Spaargaren, M., 2020. SARS-CoV-2 infection and transmission depends on heparan sulfates and is blocked by low molecular weight heparins.

Berryman, S., Clark, S., Kakker, N.K., Silk, R., Seago, J., Wadsworth, J., Chamberlain, K., Knowles, N.J., Jackson, T., 2013. Positively charged residues at the five-fold symmetry axis of cell culture-adapted foot-and-mouth disease virus permit novel receptor interactions. *Journal of Virology* 87(15), 8735-8744.

Cagno, V., Tseligka, E.D., Jones, S.T., Tapparel, C., 2019. Heparan sulfate proteoglycans and viral attachment: true receptors or adaptation bias? *Viruses* 11(7), 596.

Capstick, P., Telling, R., Chapman, W., Stewart, D.L., 1962. Growth of a cloned strain of hamster kidney cells in suspended cultures and their susceptibility to the virus of foot-and-mouth disease. *Nature* 195(4847), 1163-1164.

Chamberlain, K., Fowler, V.L., Barnett, P.V., Gold, S., Wadsworth, J., Knowles, N.J., Jackson, T., 2015. Identification of a novel cell culture adaptation site on the capsid of



foot-and-mouth disease virus. *The Journal of general virology* 96(Pt 9), 2684.

Cheudjeu, A., 2021. Antiviral strategies should focus on stimulating the biosynthesis of heparan sulfates, not their inhibition. *Life Sciences* 277, 119508.

Cooper, P., 1962. The plaque assay of animal viruses. *Advances in virus research*, pp. 319-378. Elsevier.

Diaz-San Segundo, F., Medina, G.N., Stenfeldt, C., Arzt, J., de Los Santos, T., 2017. Foot-and-mouth disease vaccines. *Veterinary microbiology* 206, 102-112.

Dill, V., Eschbaumer, M., 2020. Cell culture propagation of foot-and-mouth disease virus: Adaptive amino acid substitutions in structural proteins and their functional implications. *Virus Genes* 56(1), 1-15.

Drexler, H.G., Uphoff, C.C., 2002. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology* 39(2), 75-90.

Duque, H., Baxt, B., 2003. Foot-and-mouth disease virus receptors: comparison of bovine  $\alpha v$  integrin utilization by type A and O viruses. *Journal of virology* 77(4), 2500-2511.

Fracastoro, G., *De sympathia et antipathia rerum liber unus. De contagione et contagiosis morbis et curatione libri III. Apud heredes Lucaeantonij Iuntae Florentini.*

Freshney, R.I., 2015. *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications.* John Wiley & Sons.

Fry, E.E., Lea, S.M., Jackson, T., Newman, J.W., Ellard, F.M., Blakemore, W.E., Abu-Ghazaleh, R., Samuel, A., King, A.M., Stuart, D.I., 1999. The structure and function of a foot-and-mouth disease virus–oligosaccharide receptor complex. *The EMBO journal* 18(3), 543-554.

Gao, Y., Sun, S.-Q., Guo, H.-C., 2016. Biological function of Foot-and-mouth disease virus non-structural proteins and non-coding elements. *Virology journal* 13(1), 1-17.

Gondelaud, F., Ricard-Blum, S., 2019. Structures and interactions of syndecans. *The FEBS journal* 286(15), 2994-3007.

Gray, Z., Douzandegan, Y., Tabarraei, A., Moradi, A., 2018. Optimization of SW480 Colon Cancer Cells Transfection with Lipofectamine 2000. *Medical Laboratory Journal* 12(4), 12-16.

- Grubman, M.J., Baxt, B., 2004. Foot-and-mouth disease. *Clinical microbiology reviews* 17(2), 465-493.
- Han, S.-C., Guo, H.-C., Sun, S.-Q., 2015. Three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus and its biological functions. *Archives of virology* 160(1), 1-16.
- Hietela, S.K., Ardans, A.A., 2003. Molecular weapons against agricultural vulnerability and the war on terror. *Journal of Veterinary Medical Education* 30(2), 155-156.
- Hudák, A., Letoha, A., Szilák, L., Letoha, T., 2021. Contribution of syndecans to the cellular entry of SARS-CoV-2. *International journal of molecular sciences* 22(10), 5336.
- Hunt, M.A., Currie, M.J., Robinson, B.A., Dachs, G.U., 2010. Optimizing transfection of primary human umbilical vein endothelial cells using commercially available chemical transfection reagents. *Journal of biomolecular techniques: JBT* 21(2), 66.
- Jackson, T., Clark, S., Berryman, S., Burman, A., Cambier, S., Mu, D., Nishimura, S., King, A.M., 2004. Integrin  $\alpha\beta 8$  functions as a receptor for foot-and-mouth disease virus: role of the  $\beta$ -chain cytodomain in integrin-mediated infection. *Journal of virology* 78(9), 4533-4540.
- Jackson, T., Ellard, F.M., Ghazaleh, R.A., Brookes, S.M., Blakemore, W.E., Corteyn, A.H., Stuart, D.I., Newman, J., King, A., 1996. Efficient infection of cells in culture by type O foot-and-mouth disease virus requires binding to cell surface heparan sulfate. *Journal of virology* 70(8), 5282-5287.
- Jackson, T., Mould, A.P., Sheppard, D., King, A.M., 2002. Integrin  $\alpha\beta 1$  is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *Journal of virology* 76(3), 935-941.
- Jackson, T., Sheppard, D., Denyer, M., Blakemore, W., King, A.M., 2000. The epithelial integrin  $\alpha\beta 6$  is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *Journal of virology* 74(11), 4949-4956.
- Jalali, M., Zaborowska, J., Jalali, M., 2017. The polymerase chain reaction: PCR, qPCR, and RT-PCR. *Basic science methods for clinical researchers*, pp. 1-18. Elsevier.
- Jamal, S.M., Belsham, G.J., 2013. Foot-and-mouth disease: past, present and future. *Veterinary research* 44(1), 1-14.
- Jinno, A., Park, P.W., 2015. Role of glycosaminoglycans in infectious disease. *Glycosaminoglycans*, pp. 567-585. Springer.

- Jones, K.S., Petrow-Sadowski, C., Bertolette, D.C., Huang, Y., Ruscetti, F.W., 2005. Heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of human T-cell leukemia virus type 1 virions into CD4+ T cells. *Journal of virology* 79(20), 12692-12702.
- Kadry, Y.A., Calderwood, D.A., 2020. Structural and signaling functions of integrins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1862(5), 183206.
- Kim, T.K., Eberwine, J.H., 2010. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and bioanalytical chemistry* 397(8), 3173-3178.
- Knight-Jones, T.J., Rushton, J., 2013. The economic impacts of foot and mouth disease—What are they, how big are they and where do they occur? *Preventive veterinary medicine* 112(3-4), 161-173.
- Knowles, N., Samuel, A., 2003. Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus. *Virus research* 91(1), 65-80.
- Lang, J., Yang, N., Deng, J., Liu, K., Yang, P., Zhang, G., Jiang, C., 2011. Inhibition of SARS pseudovirus cell entry by lactoferrin binding to heparan sulfate proteoglycans. *PloS one* 6(8), e23710.
- Langdon, S.P., 2004. Cell culture contamination. *Cancer cell culture*, 309-317.
- Leibovitz, A., Stinson, J.C., McCombs, W.B., McCoy, C.E., Mazur, K.C., Mabry, N.D., 1976. Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer research* 36(12), 4562-4569.
- Loeffler, F., 1898. Berichte der Kommission zur Erforschung der Maulundklauenseuche bei dem Institut Infektionskrankheiten in Berlin. *Zentralblatt Bakteriologie, Parasitenkunde Infektionskrankheiten, Abt. I* 23, 371-391.
- Logan, D., Abu-Ghazaleh, R., Blakemore, W., Curry, S., Jackson, T., King, A., Lea, S., Lewis, R., Newman, J., Parry, N., 1993. Structure of a major immunogenic site on foot-and-mouth disease virus. *Nature* 362(6420), 566-568.
- Macpherson, I., Stoker, M., 1962. Polyoma transformation of hamster cell clones—an investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology* 16(2), 147-151.
- Mahy, B.W., 2005. Introduction and history of foot-and-mouth disease virus. *Foot-and-Mouth Disease Virus*, 1-8.
- Mandel, M., Higa, A., 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal*

of molecular biology 53(1), 159-162.

Masoodi, K.Z., Lone, S.M., Rasool, R.S., 2020. Advanced Methods in Molecular Biology and Biotechnology: A Practical Lab Manual. Academic Press.

McINTYRE, D.A., Harlander, S.K., 1989. Genetic transformation of intact *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* by high-voltage electroporation. Applied and environmental microbiology 55(3), 604-610.

Mezu-Ndubuisi, O.J., Maheshwari, A., 2021. The role of integrins in inflammation and angiogenesis. Pediatric research 89(7), 1619-1626.

Milewska, A., Zarebski, M., Nowak, P., Stozek, K., Potempa, J., Pyrc, K., 2014. Human coronavirus NL63 utilizes heparan sulfate proteoglycans for attachment to target cells. Journal of virology 88(22), 13221-13230.

Mowat, G., Chapman, W., 1962. Growth of foot-and-mouth disease virus in a fibroblastic cell line derived from hamster kidneys. Nature 194(4825), 253-255.

Neff, S., Sá-Carvalho, D., Rieder, E., Mason, P.W., Blystone, S.D., Brown, E.J., Baxt, B., 1998. Foot-and-mouth disease virus virulent for cattle utilizes the integrin  $\alpha\beta 3$  as its receptor. Journal of virology 72(5), 3587-3594.

O'Donnell, V., LaRocco, M., Baxt, B., 2008. Heparan sulfate-binding foot-and-mouth disease virus enters cells via caveola-mediated endocytosis. Journal of virology 82(18), 9075-9085.

O'Donnell, V., LaRocco, M., Duque, H., Baxt, B., 2005. Analysis of foot-and-mouth disease virus internalization events in cultured cells. Journal of virology 79(13), 8506-8518.

OIE/WOAH, World Organization of Animal Health, <https://www.woah.org/app/uploads/2022/05/fmd-world-eng.png> (Erişim tarihi: 30 Mayıs 2022)

Okamoto, K., Kinoshita, H., del Carmen Parquet, M., Raekiansyah, M., Kimura, D., Yui, K., Islam, M.A., Hasebe, F., Morita, K., 2012. Dengue virus strain DEN2 16681 utilizes a specific glycochain of syndecan-2 proteoglycan as a receptor. Journal of General Virology 93(4), 761-770.

Özyörük, F., Şap Hastalığı Sürveyansı İçin Türdeş ve Doğrulayıcı Dıva Test

Geliştirilmesi ve Standardize Edilmesi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2016

Radlett, P., Pay, T., Garland, A., 1985. The use of BHK suspension cells for the commercial production of foot and mouth disease vaccines over a twenty year period. *Developments in biological standardization* 60, 163-170.

Rhiner, C., Hengartner, M.O., 2006. Sugar antennae for guidance signals: syndecans and glypicans integrate directional cues for navigating neurons. *TheScientificWorldJOURNAL* 6, 1024-1036.

Roper, J.A., Williamson, R.C., Bass, M.D., 2012. Syndecan and integrin interactomes: large complexes in small spaces. *Current opinion in structural biology* 22(5), 583-590.

Sa-Carvalho, D., Rieder, E., Baxt, B., Rodarte, R., Tanuri, A., Mason, P.W., 1997. Tissue culture adaptation of foot-and-mouth disease virus selects viruses that bind to heparin and are attenuated in cattle. *Journal of virology* 71(7), 5115-5123.

Saphire, A.C., Bobardt, M.D., Zhang, Z., David, G., Gallay, P.A., 2001. Syndecans serve as attachment receptors for human immunodeficiency virus type 1 on macrophages. *Journal of virology* 75(19), 9187-9200.

Sarrazin, S., Lamanna, W.C., Esko, J.D., 2011. Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3(7), a004952.

Sheikh, S., Coutts, A.S., La Thangue, N.B., 2017. Transfection. *Basic science methods for clinical researchers*, pp. 191-209. Elsevier.

Shi, Q., Jiang, J., Luo, G., 2013. Syndecan-1 serves as the major receptor for attachment of hepatitis C virus to the surfaces of hepatocytes. *Journal of virology* 87(12), 6866-6875.

Stacey, G.N., 2011. Cell culture contamination. *Cancer Cell Culture*, pp. 79-91. Springer.

Stepanenko, A.A., Heng, H.H., 2017. Transient and stable vector transfection: Pitfalls, off-target effects, artifacts. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 773, 91-103.

Stephenson, F.H., 2010. Chapter 5 - Nucleic acid quantification. In: Stephenson, F.H. (Ed.), *Calculations for Molecular Biology and Biotechnology (Second Edition)*, pp. 99-122. Academic Press, Boston.

Stoker, M., Macpherson, I., 1964. Syrian hamster fibroblast cell line BHK21 and its

derivatives. *Nature* 203(4952), 1355-1357.

Sung, J., Hawkins, J.R., 2020. A highly sensitive internally-controlled real-time PCR assay for mycoplasma detection in cell cultures. *Biologicals* 64, 58-72.

Surviladze, Z., Sterkand, R.T., Ozbun, M.A., 2015. Interaction of human papillomavirus type 16 particles with heparan sulfate and syndecan-1 molecules in the keratinocyte extracellular matrix plays an active role in infection. *The Journal of general virology* 96(Pt 8), 2232.

Sütçü, M., Şap Hastalığı, Şap Enstitüsü, Yayın No 2, Ogun Kardeşler Mat., Ankara, 1986

Verrier, E.R., Colpitts, C.C., Bach, C., Heydmann, L., Weiss, A., Renaud, M., Durand, S.C., Habersetzer, F., Durantel, D., Abou-Jaoudé, G., 2016. A targeted functional RNA interference screen uncovers glypican 5 as an entry factor for hepatitis B and D viruses. *Hepatology* 63(1), 35-48.

Wang, G., Wang, Y., Shang, Y., Zhang, Z., Liu, X., 2015. How foot-and-mouth disease virus receptor mediates foot-and-mouth disease virus infection. *Virology Journal* 12(1), 1-7.

Wang, S., Zhang, X., Wang, G., Cao, B., Yang, H., Jin, L., Cui, M., Mao, Y., 2019. Syndecan-1 suppresses cell growth and migration via blocking JAK1/STAT3 and Ras/Raf/MEK/ERK pathways in human colorectal carcinoma cells. *BMC cancer* 19(1), 1-10.

Weinacker, A., Chen, A., Agrez, M., Cone, R., Nishimura, S., Wayner, E., Pytela, R., Sheppard, D., 1994. Role of the integrin alpha v beta 6 in cell attachment to fibronectin. Heterologous expression of intact and secreted forms of the receptor. *Journal of Biological Chemistry* 269(9), 6940-6948.

Yılmaz, Ş., Şap Virüsü İzolasyonu ve Teşhisi için Fetal Sığır Dilinden Hücre Hattı Oluşturulması ve Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 2019

Zahid, M., 2016. Role of integrin proteins as receptors for foot and mouth disease virus. *Adv. Anim. Vet. Sci* 4(8), 416-419.

