

T.C  
GENELKURMAY BAŐKANLIĐI  
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MİKROBİYOLOĞI VE KLİNİK MİKROBİYOLOĞI  
ANABİLİM DALI  
VİROLOĞI BİLİMDALI BAŐKANLIĐI

# HEPATİT B VIRUS YÜZEY ANTİJENİNİN BACULOVİRUS SİSTEMİ İLE BÖCEK (*TRICHOPLUSIA NI*) HÜCRE KÜLTÜRÜNDE EKSPRESYONU

T.C. YÜKSEKÖĐRETİM KURUMLARI  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

DOKTORA TEZİ

Mehmet YAPAR  
Hv.Tbp.Kd.Yzb.

81977

ANKARA - 2000

## ÖNSÖZ

Bu tez konusu, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğünün 4 Aralık 1998 gün ve 127 sayılı oturumunda kabul edilmiş ve Yüksek Lisans Doktora Merkezinin YÜK.LIS.DOK.MRK. : 0530-81-98/107 Sayılı emri ile başlatılmıştır.

Bütün dünyada yaygın olarak görülen hepatit B virusuna bağlı akut hepatitin ortalama %5'inin kronikleştiği ve bunların önemli bir bölümünün siroza dönüştüğü; sirozlu olgularda da hepatosellüler karsinoma gelişme riskinin yüksek olduğu bilinen bir gerçektir (37). Halen en önemli korunma yolu ise aşılama'dır.

Hepatit B virusunun bulaşması başlıca parenteral, cinsel, maternal ve horizontal yolla olmaktadır. Enfeksiyonun önceden tanımlanması ve korunulması önemlidir. Bu nedenle tanı amaçlı olarak bir çok kit hazırlanmış, korunma için de çeşitli aşılar yapılmıştır.

Bu tezin çalışılmasındaki amacımız, Hepatit B yüzey antijeninin kendi laboratuvarımızda elde edilebilmesini sağlamaktır. Bunun için bir çok yöntem bulunmaktadır. Biz, bunlar içinde hücre kültürü sistemini seçerek doğala en yakın antijen formunu elde etmeyi hedefledik. Böylece elde edilecek bu antijenin, daha ileri çalışmalarla hepatit B aşısı hazırlanmasında veya tanı kitlerinin yapılmasında da kullanılabilmesini amaçladık.

Doktora eğitimim süresince yardımlarını gördüğüm tüm öğretim üyeleri ve laboratuvar personeline teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

I.GİRİŞ.....	1
II.GENEL BİLGİLER .....	3
A.HEPATİT B VİRUSU.....	3
1.VİRİYON YAPISI .....	3
2.VİRAL GENOM .....	3
B.ÖKARYOTİK HÜCRELERDE PROTEİN EKSPRESYONU.....	5
C.MAYA KÜLTÜR SİSTEMLERİ.....	7
D.DİĞER MAYA SİSTEMLERİ.....	7
1.SACCHAROMYCES CEREVISIAE EKSPRESYON SİSTEMİ.....	7
2.HBsAg'nin MAYADA EKSPRESYONU.....	7
E.MEMELİ HÜCRE KÜLTÜR SİSTEMLERİ .....	8
F. BACULOVİRUS BİYOLOJİSİ .....	9
G.BÖCEK HÜCRE KÜLTÜRÜ EKSPRESYON SİSTEMİ.....	10
H.LAHANA KELEBEĞİ (Trichoplusia ni) .....	11
İ.BACULOVİRUS TRANSFER VEKTÖR .....	15
J.BACULOVİRUS SİSTEMİNDE KARŞILAŞILAN PROBLEMLER .....	14
K. BAC-N-BLUE DNA TRANSFEKSİYON KİTİ .....	15
L.HIGH FIVE HÜCRELERİN ÖZELLİKLERİ.....	17
III. GEREÇ VE YÖNTEM.....	18
A.HBsAg PCR ÜRÜNÜNÜN HAZIRLANMASI .....	18
B.pCR+HBsAg VEKTÖRÜNÜN E.COLI'YE TRANSFORMASYONU .....	20
1.REKOMBİNE BAKTERİLERİN SEÇİMİ .....	21
C.REKOMBİNE pCR+HBsAg PLAZMİDİN PÜRİFİKASYONU .....	22
D.HBsAg İNSERTİ ELDE EDİLMESİ .....	23
E.HBsAg İNSERTİNİN pMelBac VEKTÖRÜ İLE REKOMBİNASYONU...	24
F.TRİCHİPLUSIA Nİ HÜCRE KÜLTÜRÜNE TRANSFEKSİYON İŞLEMİ.	25
G.POSTTRANSFEKSİYON İŞLEMİ .....	26
H.PLAK TESTİ .....	26
1.HÜCRELERİN HAZIRLANMASI .....	26
2.VİRUS DİLÜSYONU .....	27
3.VİRAL İNFEKSİYON VE AGARÖZ KAPLAMA İŞLEMİ .....	27
IV. BULGULAR .....	28
V. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	34
VI. ÖZET.....	37
VII. İNGİLİZCE ÖZET.....	38
VIII. KAYNAKLAR .....	39

## GİRİŞ

Hepatit B infeksiyonları morbidite ve mortalite yönünden şimdiye kadar çözümlenememiş önemli bir halk sağlığı sorunudur. Tüm dünyada 400 milyondan fazla taşıyıcı olduğu, akut hepatit B olgularının %5'inin kronikleştiği ve bunların da önemli bir bölümünün siroza dönüştüğü; sirozlu vakalarda da hepatosellüler kanser gelişme riskinin oldukça yüksek olduğu gözönüne alınırsa gerek hepatit B infeksiyonlarının önceden tanımlanmasının gerekse profilaktik olarak immünizasyonun önemi ortadadır (5,32).

Medikal tedavisi kısıtlı olan hepatit B infeksiyonlarının tanınmasında veya immünizasyonunda kullanılacak antijenin hazırlanması amacıyla Hepatit B virusunun (HBV) üretilmesi mümkün olmadığından, daha basit ve ucuz yolla elde edilmesi için çeşitli metodlar geliştirilmiştir. Söz konusu yöntemlerden en önemlisi rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak, Hepatit B virusu yüzey antijeninin (HBsAg) çeşitli sistemlerde ekspresyon yoluyla bol miktarlarda elde edilmesidir (1,15,17,18,19,20,24,27). Bu amaçla ilk olarak Escherichia coli (E.coli) olmak üzere prokaryotik hücreler sık kullanılmıştır (18,27). Ancak bu şekilde elde edilen antijen tanısal amaçlar için uygun olsa bile aşı hazırlanmasında uygun bulunmamıştır. Çünkü ökaryotik metabolizmalarda yapılan proteinler sentez sonrası da bazı değişikliklere uğramaktadırlar (7,25). Bu değişiklikler de proteinin fonksiyonları, antijenitesi, stabilitesi gibi bazı özelliklerini etkilemektedir. Bu nedenle özellikle terapötik amaçlı ürün elde edilmesinde, prokaryotik sistemler yerine mayalar ve hücre kültürleri gibi ökaryotik sistemlerde ekspresyon çalışmaları yapılmıştır. Ökaryotik sistemlerden elde edilen HBsAg'nin konak hücrelerde viral infeksiyon sırasında yapılan HBsAg'ye daha yakın olduğu görülmüş ve elde edilen ürün aşı yapımında kullanılmıştır (11). Günümüzde bu yöntemle üretilen birkaç aşı çeşidi vardır (29).

Bu çalışmada, HBV pozitif hasta serumundan Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) tekniği ile HBsAg gen bölgesi amplifiye edilerek, E.coli klonlama vektörü, pMelBac transfeksiyon plazmidi ve baculovirus transfeksiyon sistemi kullanılmış böylece Trichoplusia ni'den elde edilen ovarium hücre kültüründe rekombinant olarak HBsAg elde edilmesi amaçlanmıştır.

Kullanılan yöntemlerin bir çoğunun moleküler biyolojik teknikler olduğu gözönüne alınırsa, çalışmanın iki yönden de; hem hastanemiz Mikrobiyoloji Laboratuvarlarına moleküler tekniklerin yerleştirilmesi hem de diğer bir çok proteinin rekombinasyon yoluyla elde edilebilmesi konusunda önemli katkılar sağlayacağı kanısındayız.



## GENEL BİLGİLER

### HEPATİT B VİRUSU

Hepatit B virusu hepadnaviridae grubundandır. Bu grupta yer alan diğer viruslar, dağ sıçanı hepatit virusu (woodchuck hepatitis virus), yer sincabı hepatit virusu (ground squirrel hepatitis virus) ve ördek hepatit B virusu (duck hepatitis B virus) dur (5).

Hepatit B infeksiyonu özellikle Uzak Doğu Asya'da ve tropikal Afrika'da olmak üzere tüm Dünya'da epidemiyolojik önemini sürdürmektedir. Anılan bölgelerde popülasyonun yaklaşık %10'nunun veya daha fazlasının kronik taşıyıcı olduğu tahmin edilmektedir. Tüm dünyada 400 milyondan fazla HBV taşıyıcısı olduğu tahmin edilmektedir (32).

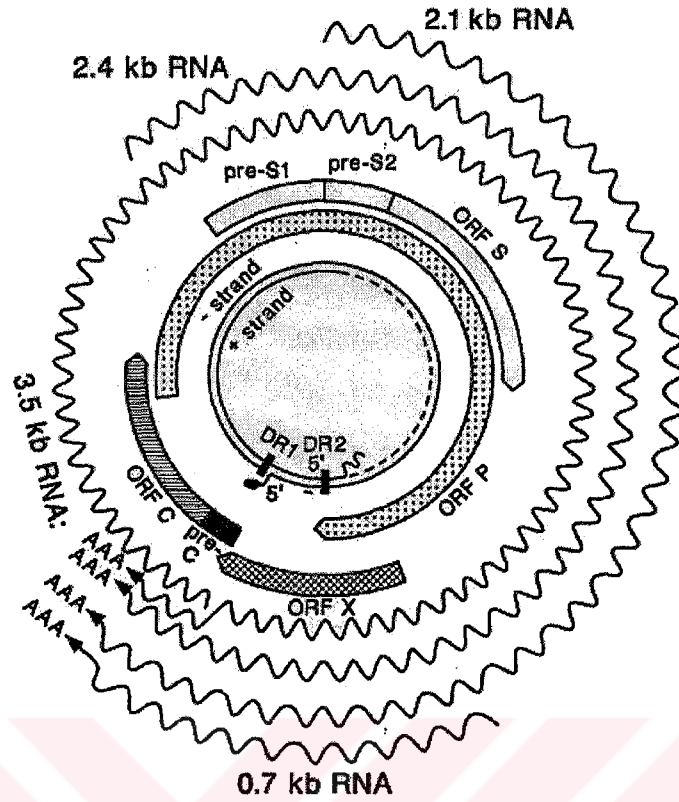
Günümüzde de henüz etkin bir tedavi ajanının olmaması nedeniyle hepatit B'den aşı ile korunma yolu önemini korumaktadır. Rekombinant DNA teknolojisi ile geliştirilen aşilar halen başarıyla uygulanmakta ve yeterli koruma sağlamaktadır (29).

**VİRYON YAPISI:** Hepatit B virusu infeksiyonu sırasında farklı partiküller oluşturan nadir viruslardandır. Elektron mikroskop çalışmaları sonucu elde edilen verilere göre üç farklı tipte partikül gözlenmektedir.

- a) Dane partikülü olarak adlandırılan çift kabuklu partiküller. Bunlar 42-47 nm çapındadırlar (34).
- b) 20 nm çapındaki küresel partiküller (5).
- c) 20 nm çapındaki filamentöz partiküller (5).

Bunlardan Dane partikülü HBV'nin infeksiyöz viryon formudur.

**VİRAL GENOM:** Hepatit B virusu, 3.2 kilobaz (kb) büyüklüğünde kısmen çift sarmallı bir DNA'ya sahiptir (Şekil-1). Negatif uzun zincirin 5'ucunda bir protein bulunmaktadır. Pozitif zincir daha kısa olup bunun da 5'ucunda oligoribonükleotid vardır (21). Ayrıca her iki zincirin 5'uçlarında 10-12 nükleotidlik kısa diziler şeklinde tekrarlayan bölgeler (Direct repeats-DR1 ve DR2) bulunur. Viral DNA'nın bütünlüğü bu bölgelerinden birbirlerine koheziv tutunmaları ile sağlanır (5,32)



Şekil-1: Hepatit B virusu genomik yapısı (5,33)

Hepatit B virus DNA'sında dört adet gen okuma bölgesi (ORF) vardır. ORF'lerin transkripsiyonu en az dört promoter ve iki güçlendirici (enhancer) dizi ile kontrol edilmektedir (4,5,6,32). Bu genlerin organizasyonu oldukça kompakt yapıda olup birbirleri içine girmişlerdir. P geni viral polimerazı ve negatif zincirin ucunda bulunan terminal proteini kodlar; C geni nükleokapsidin yapısal proteinini kodlar; S geni yüzeyel glikoproteinleri kodlar; X geni ise fonksiyonu henüz tam anlamıyla ortaya konulamamış olan X proteinini kodlar (33).

S geni, büyüklüğü farklı üç adet protein kodlamaktadır (24). İlk ATG'nin başladığı bölge pre-S1 olarak adlandırılır ve 39 kilodalton (kd) ağırlığındaki L proteinini kodlar (38). İkinci ATG pre-S2 bölgesini başlatır ve buradan başlayan okuma ile 31 kd ağırlığındaki M proteini yapılıdır (26). Son okuma bölgesi ise klasik olarak bilinen HBsAg veya şimdilerde daha yaygın olarak S proteini diye bilinen 24 kd'luk proteini kodlamaktadır (30). Her iki pre-S bölgesinin kodladığı proteinler, dolaşımdaki S-ilişkili proteinlerin küçük bir kısmını oluşturmaktadır. L proteini %1-2, M proteini ise %15'lik bir oranda bulunur. L proteinin az bulunmasına karşın viral

birleşme ve infektivitede önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Fraksiyonel çalışmalar, serumda bulunan değişik HBV partiküllerinde farklı oranlarda zarf proteinlerinin bulunduğunu göstermiştir (36).

S genindeki organizasyonun benzeri öz (core) protein geninde de (C geni) bulunmaktadır. C kod bölgesinde de iki ATG başlangıç kodonu vardır. Klasik olarak bilinen Hepatit B core Antijeni (HBcAg) daha içteki başlangıç kodonundan kontrol edilir. İlk kodon pre-C bölgesini başlatır ve buradan yapılan protein ile Hepatit B e Antijeni (HBeAg) sentezlenir (5).

HBsAg'nin yapısında lizin, histidin, arginin, aspartik asid, treonin, serin, glutamik asid, prolin, glisin, alanin, sistein, valin, metyonin ve izolösin aminoasitleri bulunmaktadır. Antijenin yapısında kolesterol, non-polar lipidler ve tripolar lipidler de bulunmaktadır (5).

## ÖKARYOTİK HÜCRELERDE PROTEİN EKSPRESYONU

Prokaryotik sistemlerde heterolog rekombinant proteinler başarılı bir şekilde eksprese edilmektedir. Ancak bu sistemlerin bazı dezavantajlarından dolayı araştırmacılar ökaryotik ekspresyon sistemleri üzerine yönelmişlerdir. Bakterilerden elde edilen proteinlerden bazılarının stabilitesinin bazılarının da biyolojik aktivitelerinin olmaması veya proteinlerin izole edilmeleri sırasında bakteriyel pirojenik artıkların ürüne karışabilmesi gibi istenmeyen durumları engelleyebilmek için değişik ökaryotik sistemler geliştirilmiştir. Proteinlerin translasyon sonrası gerekli bazı modifikasyonları için de ökaryotik sistemlerde ekspresyon gerekli olmuştur. Ökaryot hücrelerde bir proteinin ekspresyonu sırasında çok sayıda modifikasyonlar görülebilmektedir. Bunlar;

1. Disülfid bağlarının oluşumu. Bu işlem disülfid izomeraz enzimiyle yapılır. Uygun şekilde katlanmayan proteinlerin stabilitesi ve aktivitesi bozuk olabilir.
2. Prekürsör proteinin uygun şekilde proteolitik bölünmesi.
3. Glikozilasyon. Proteinin stabilitesi ve belirgin özelliklerinin ortaya çıkması için gereklidir. En yaygın glikozilasyon iki şekilde görülmektedir.
  - a) O-ilişkili glikozilasyon. Serin ve threonin amino asitlerine bağlanma şeklinde olup en yaygın olan glikozilasyondur (25).

b) N-ilişkili glikozilasyon. Asparagine aminoasidine bağlanma şeklinde olur (12).

4. Proteinlere değişik grupların ilavesi. Bu modifikasyonlara örnek olarak fosforilasyon, asetilasyon, sülfasyon, acilasyon, karboksilasyon ve palmitasyon verilebilir.

Ökaryotik sistemlerin hepsinde yukarıda sayılan modifikasyonların tümünü birden yapabilme özelliği olmadığından spesifik modifikasyon gereken proteinler için uygun olan sistemin seçilmesi gereklidir.

Ökaryotik ekspresyonda kullanılmak üzere bir çok vektör hazırlanmıştır. Bu vektörlerde genel olarak şu özellikler bulunmaktadır (7).

1. Seçilebilir ökaryotik bir gen.
2. Ökaryotik kaynaklı promoter dizisi.
3. Ökaryotik transkripsiyon ve translasyon stop dizisi .
4. mRNA poliadenilasyon dizisi.

Vektör plazmidde uygun bakteri için uygun bir replikasyon orjini bulunur. Ayrıca konak kromozomuna entegre edilecekse konak kromozomal DNA'sına karşılık gelecek şekilde DNA dizileri bulunmalıdır.

Çeşitli şekillerde düzenlenmiş olan vektörler mayalarda, böcek hücrelerinde ve memeli hücrelerinde kullanılabilirler (7).

Bakteri veya memeli hücrelerine DNA sokma işlemine "transformasyon" denir. Ancak memeli hücreleri için transformasyon deyimiyle, daha çok üreme özelliklerindeki değişimler anlaşıldığından, ikisinin ayrımını yapmak için, memeli hücrelerine eksojen DNA sokulma işlemine "transfeksiyon" denilmektedir.

Mayaları transforme etmek için günümüzde başlıca üç teknik kullanılmaktadır (7).

1. Maya duvarını enzimatik veya kimyasal yollarla etkileyip protoplast oluşturulması.
2. Lityum asetat tekniği.
3. Elektroporasyon tekniği.

Kültüre edilmiş hayvan hücreleri ise iki şekilde transfekte edilmektedir.

1. Hücreler Ca-fosfat, DEAE dextran veya lipozom ve DNA karışımıyla presipite edilir (3).

## 2. Elektroporasyon yapılır.

Günümüzde sık kullanılan ökaryot hücre ekspresyon sistemleri şunlardır.

### **MAYA KÜLTÜR SİSTEMLERİ**

#### **SACCHAROMYCES CEREVISIAE (S.cerevisiae) EKSPRESYON SİSTEMİ:**

S.cerevisiae ekspresyon sistemi bir çok avantajlarından dolayı klonlanan genlerin ekspresyonu için yoğun bir şekilde kullanılmıştır (2,15,17,18,19). Mayanın genetik ve fizyolojik özellikleri çok iyi bilinmektedir. Küçük ve büyük kültür sistemlerinde kolaylıkla üretilmektedir. Güçlü promotör dizilerine sahiptirler. Ekspresyon vektörü olarak 2 mikron (2 $\mu$ ) adı verilen doğal bir plazmid kullanılmaktadır. S.cerevisiae bir çok posttranslasyonel modifikasyonları yapabilmektedir. Normalde ortama çok az istenmeyen protein sekrete ettiğinden eksprese edilen ürün daha saf olarak elde edilebilmektedir. Yıllardır hamur endüstrisinde kullanılmasından dolayı American Food and Drug Administration (FDA) tarafından "emniyetli organizma" (Generally Recognized As Safe=GRAS) olarak tanımlanmıştır. Bu nedenle ilaç veya farmasötiklerin üretilmesinde kontrole gerek kalmadan kullanılabilirler. Bir çok aşı, farmasötik ve diyagnostik ürünler S.cerevisiae ile üretilmektedir (7).

**DİĞER MAYA SİSTEMLERİ:** S.cerevisiae ekspresyon sisteminde bazı proteinler hariç elde edilen ürün miktarının az olması, proteinlerin hipoglikozile olması gibi bazı nedenlerden dolayı daha iyi sistemlerin geliştirilmesi için çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla diğer bazı mayalar kullanılmıştır. Kluyveromyces lactis, Schizosaccharomyces pombe, Yarrowia lipolytica, Pichia pastoris (P.pastoris) ve Hansenula polymorpha ekspresyon sistemleri diğer maya sistemlerine örnek olarak verilebilir (7).

**HBsAg'nin MAYADA EKSPRESYONU:** Metilotrofik bir maya olan P.pastoris, biyoreaktörlerde kolaylıkla ve ucuz bir şekilde üretilmektedir. Bu maya HBsAg üretimi için kullanılmış ayrıca bunun için entegrasyon vektörü de yapılmıştır. HBsAg geni, vektör üzerinde alkol oksidaz gen 1 (AOX1p) bölgesi ile aynı genin terminasyon ve adenilasyon dizisi (AOX1t) arasında yerleştirilmiştir. AOX1 geni P.pastoris'de metanol ile regüle edilmektedir. Ortamda metanol varsa

alkol oksidaz proteini oldukça yüksek oranlarda indüklenebilmektedir. Plazmid stabilitesini sağlamak için, hazırlanan vektör plazmidde 3'-AOX1 gen parçası da bulunur. Böylece çift çaprazlamayla (double crossover) plazmid DNA'sı ve kromozomal DNA AOX1p ve 3'-AOX1 bölgelerinden entegre olur (7).

Entegre mayaları ayırmak için, histidinol dehidrogenaz geni eksik olan mayalar (HIS4<sup>-</sup>) kullanılır. Sokulan gen üzerinde HIS4 geni bulunduğundan entegre olmuş P.pastoris'ler histidinsiz ortamda da üreyebilecektir. Diğer bir seçim yolu da metanollü ortamda yavaş üreyen mayaları tespit etmektir. Entegre olmuş mayalarda AOX1 geni bozulduğundan bunlar metanollü ortamda yavaş bir üreme karakteri gösterirler. Sonuçta entegre olmuş P.pastoris, histidinsiz ortamda da üreyebilen ve metanolla yavaş üreyen maya tipinde olacaktır (7).

Metanolla indükleme sonucu AOX1 promoteri aktive olur. Klonlanmış HBsAg, virusla infekte insan hücrelerindeki antijenle aynı subünit komplekslere sahiptir ve nötralizan antikorlarla reaksiyon verirler. İkiyüzkırk litrelik bir kültürden yaklaşık olarak  $9 \times 10^6$  doz aşı elde edilebilmektedir (7).

## **MEMELİ HÜCRE KÜLTÜR SİSTEMLERİ**

Memeli hücre ekspresyon sistemlerinde kullanılan vektörlerin bir çoğu önceleri SV40, polyomavirus, herpesvirus ve sığır papillomaviruslarından elde edilmiştir (25). Ancak bunlar bir çok proteinin eldesinde uygun olmadığından mayalar için kullanılan ekspresyon vektörleri ve baculovirus temelli sistemler geliştirilmiştir (8,16,20,23). İnsanlar için üretilen bazı kemoterapötik proteinler sadece memeli hücrelerinde sentezlenebildiğinden ve posttranslasyonel modifikasyonlar ancak bu tür hücrelerde yapılabildiğinden, memeli hücrelerinde ekspresyon sistemlerinin geliştirilmesi gerekli olmuştur (9,25) .

Human papova BK virusu (BKV), bir çok insan hücre kültürlerinde ekstrakromozomal olarak yüksek sayılarda kopyalanabilmektedir. BKV genomundan kapsid ve viral core proteinlerini kodlayan gen silinerek ve kalan kısım E.coli plazmidine klonlanarak çeşitli vektörler elde edilmiştir (7).

Bu vektör diğer iki genetik elemanla kombine edilmiştir.

1. SV40'dan alınan ve neomisin direnç genini kontrol eden promotör bölgesi (Neo<sup>r</sup>)
2. Mouse mammary tumor promotör (MMTP) bölgesi. Bu bölge, sitokrom P-450 dioxine responsive enhancer (DRE) dizisiyle kontrol edilir. DRE bölgesi promotörlerden ayrı bir bölge olup toksin dioksin varlığında mRNA sentezini artırır.

İstenilen bir gen DRE-MMTP bölgesinin 3' ucuna klonlandığında ortama konulacak düşük miktardaki 2,3,7,8-tetrachlorodienzo-p-dioxin (TCDD) ile indüklenebilir. Ayrıca yine ortama konulacak neomisin derivativesi G418 ile de yüksek oranda vektör içeren hücrelerin seçimi yapılabilir. Bu şekilde hazırlanan vektörler insan hücrelerinde  $\beta$ 1-interferon ve Herpes simplex virus glikoprotein B sentezinde kullanılmıştır (7,23).

## BACULOVİRUS BİYOLOJİSİ

*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* (AcMNPV) Baculovirus familyasının prototip bir virusudur ve 30'dan fazla Lepidopteran böcek türünü infekte edebilmektedir. Yüzyirmisekiz kb büyüklüğünde çift zincirli, sirküler süpersarmal bir DNA'sı vardır (35). AcMNPV infeksiyonu sırasında ekstrasellüler partiküller ve oklüzyon partikülleri olmak üzere iki çeşit viral progeni meydana gelmektedir. Oklüzyon virus partikülleri polyhedra denilen protein içine gömülmüşlerdir. Polihedrin proteini 33.000 dalton ağırlığında bir proteindir (35). Infekte *Spodoptera frugiperda* hücre kültürlerinde polihedrin oldukça fazla miktarlarda birikmektedir (23,25,28).

Polihedrin proteinleri viral partikülleri dış çevre şartlarına karşı korumaktadır. Infekte larva öldüğünde bozulan dokulardan dış çevreye milyonlarca polihedra dağılmaktadır. Bunların bulaştığı bitkileri yiyen diğer larvalara da geçiş bu şekilde sağlanmış olur. Barsakta çözünen polihedralardan açığa çıkan viral DNA'lar endositoz veya füzyon yoluyla iç dokulara geçer. Viral DNA, hücre nükleusunda veya nükleus porlarında kılıfından ayrılır. Hücreye girdikten 10 saat sonra tomurcuklanmayla hücreden atılmalar başlar. Ekstrasellüler virus konsantrasyonu

infeksiyondan 36-48 saat sonra maksimuma ulaşır. Polihedrin proteinlerinin birikmesi 4-5 gün sürer. Hücre lizis olmaya başlayınca da durur (23,25).

Polihedrin geninin sekansı çıkarılmış ve haritası yapılmıştır. Viral replikasyon için gerekli olmaması ve güçlü bir promoteri bulunması nedeniyle ekspresyon vektörlerinin dizaynında kullanılmıştır (16,25).

## **BÖCEK HÜCRE KÜLTÜRÜ EKSPRESYON SİSTEMİ**

Baculoviruslar bir çok böcek hücrelerini infekte edebilmektedirler. Bu tür infeksiyonlar sırasında baculovirusların iki formu görülmektedir. Birinci form, infekte hücreler tarafından salınan ve diğer hücreleri de infekte edebilen viryonlar, ikinci form ise protein bir matriks içinde hapsedilmiş olan ve bir çok viryon içeren yapılardır. Bu matriks içindeki proteine polihedrin, hapsedilmiş olan viryonlara da polihedron denilmektedir. Bu türden bir çok paketlenmiş viryon konak hücrenin parçalanmasıyla birlikte dışarı salınırlar. Viryonlar, polihedrin içinde dış şartlara karşı korunurlar. Polihedron bir diğer organizma tarafından alındığında, polihedrin çözünür ve viryonlar serbest kalarak infeksiyon siklusunu başlatırlar. İnfeksiyon başladıktan sonra 36-48 saat içinde polihedrin sentezi başlar ve 4-5 gün boyunca sürer. İnfekte hücre lize olup organizma ölünce biter (25).

Polihedrin promoteri güçlü bir promoterdir. Ayrıca viral replüksiyon bu gene bağlı değildir. Buradan yola çıkarak, eğer polihedrin geni, heterolog bir protein geniyle değiştirilirse, istenen proteini büyük miktarlarda elde etmek mümkün olmaktadır (25). Bu temele dayanarak araştırmacılar baculovirus ekspresyon vektörlerini geliştirmişlerdir. Bu iş için en çok kullanılan viruslardan biri AcMNPV dir (20,25). *Autographa californica* ve 30'dan fazla böcek türü bu virus tarafından infekte edilebilmektedir. Bir çok böcek hücre kültüründe de üretilebilen AcMNPV için en sık kullanılan hücreler *Spodoptera frugiperda* kurtçuğundan elde edilmektedir (28,31). Bu hücrelerde polihedrin promoteri aşırı şekilde aktiftir. Orjinal baculovirus ile meydana gelen infeksiyonlarda, yüksek oranlarda polihedrin sentez edilebilir (25).

## **LAHANA KELEBEĞİ (Trichoplusia ni)**

Erişkin kelebeğin 3-4 cm kanat açıklığı olup üzerinde grimsi kahverengi benekler bulunmaktadır. Dişileri 10-12 günde bir 200-350 yumurta bırakırlar. Yumurtalar, toplu iğne başı büyüklüğünde, yuvarlak ve beyaz renklidir. Yumurtalardan 3-6 gün sonra larvalar çıkmaya başlar. Larvalar çıkar çıkmaz yaprakları yemeye başlarlar. Larvaların beslenmesi 2-4 hafta sürer. Yumurtaların ve larvaların gelişmesi serin aylarda daha uzun sürer (14).

Larvalar açık yeşil renkte olup üzerlerinde iki beyaz çizgi vardır. Genç larvaların boyları 1-2 mm kadardır. Olgun larvalar 3 cm uzunluğa kadar erişebilirler. Baş ve boyun kısımlarında üç adet silindirik ayaklar bulunur (14). Açık yeşil renkte olan genç pupalar olgunlaştıkça kahverengine dönerler. Etrafları koza ile çevrilidir. Tüm kış boyu pupa durumunda kalırlar (39).

## **BACULOVİRUS TRANSFER VEKTÖR**

Rekombinant baculovirus elde etmek için ilk adım transfer bir vektör oluşturmaktır. Bu plazmid, E.coli esaslı olmaktadır. Plazmid DNA'sında üç komponent bulunması gereklidir.

1. 5'-AcMNPV DNA parçası ve buna bitişik promoter bölgesi.
2. Dışardan sokulacak DNA için klonlama bölgesi.
3. Polihedrin terminasyon ve poliadenilasyon sinyal bölgesi ve buna bitişik AcMNPV DNA-3'bölgesi (23,25).

Polihedrin kodlama bölgesi, DNA segmentinden silinmiştir. Polihedrin promoter bölgesiyle terminasyon bölgesi arasında polihedrin geni yerine klonlanan DNA dizisi bulunur (7).

Elde edilen transfer vektör ile doğal AcMNPV, konak hücre içine transfekte edilir (cotransfection). Transfekte olan bazı hücrelerde çift çaprazlamayla transfer vektör ile AcMNPV arasında gen alışverişi gerçekleşir. Böylece, transfer vektördeki klonlanmış gen AcMNPV'ye geçer (7). Çaprazlama sonucu polihedrin genini kaybetmiş olan AcMNPV viryonları belirgin hücre lizis bölgeleri oluştururlar.

Oklüzyon-negatif bu plaklardan rekombinant baculoviruslar kolaylıkla izole edilebilmektedirler (9).

Rekombinant baculovirus ile infekte edilen konak hücrelerden 4-5 gün sonra ilgili proteinler elde edilebilmektedirler. Bu sistemle elde edilen proteinler hem miktar olarak çoktur hem de posttranslasyon modifikasyonlar doğala yakındır (23,25,28).

Hücre transfeksiyon metodunda bazı değişiklikler yapılarak işlem biraz daha basit hale getirilmiştir. Hücrelerin transfer vektör ve pürifiye baculovirusla kotransfeksiyonu yerine, önce baculovirusla infeksiyon ve ardından vektörle transfeksiyon yapılabilir. Böylece zaman alıcı bir işlem olan baculovirus pürifikasyonu basamağına gerek kalmaz (9). Ayrıca plak oluşumu yerine rekombinant baculovirusları saptamak için DNA hibridizasyonu kullanılabilir.

Baculovirus sistemiyle bir çok rekombinant protein elde edilebilmektedir. Bunlar tabloda görülmektedir (Tablo-I).

**Tablo-I :** Baculovirus vektörleriyle eksprese edilen genler (13,20,23).

A	B	C	D	E
AcMNPV polihedrin	genomik	1050	29	Fosforile,çekirdek lokalizasyonu
Bluetongue virus nötralizan antijeni	cDNA	2800	93	Antijenik,immünojen (VP2),nötralizan (VP3)
VP2,VP3	cDNA	2800	92,5	
Drosophila Krüppel gen ürünü	cDNA	-	72	Antijenik, fosforile, çekirdek lokalizasyonu
E.coli kloramfenikol asetil transferaz (CAT)	genomik	785	27	Aktif, antijenik
E.coli $\beta$ -galaktozidaz füzyon proteini	genomik	9200	120	Aktif
E.coli $\beta$ -galaktozidaz	genomik	3000	110	Aktif, antijenik
Hepatit B virus öz antijeni	cDNA	572	25/22	Antijenik
Hepatit B virus yüzey antijeni	cDNA	1236	29/25	Antijenik, glikozile, lipoprotein partikülleri şeklinde toplanma
İnsan c-myc proto onkogen	cDNA	-	64/61	Antijenik, fosforile, çekirdek lokalizasyonu
İnsan koloni stimüle edici faktör I	cDNA	-	34	Aktif, antijenik, glikozile, salgılanma, dimerik toplanma
İnsan $\alpha$ -interferon	-	-	19,5	Aktif, antijenik, sinyal peptid bölünmesi, salgılanma

A:gen, B:genin alındığı kaynak, C:genin base pair (bp) olarak büyüklüğü, D:genin kodladığı proteinin kilodalton (kd) olarak ağırlığı, E:proteinin biyolojik özelliklerini göstermektedir.

A	B	C	D	E
İnsan $\alpha$ -interferon	genomik	780	17/20,5	Aktif, sinyal peptid bölünmesi, glikozile, antijenik, salgılanma
Human Immundeficiency virus (HIV) env	cDNA	2700	150/120-130/41	Antijenik, glikozile, proteolitik işlem
HIV env	cDNA	-	160/120	Antijenik, immünojen, glikozile
HIV gag	cDNA	1818	55/40	Antijenik, proteolitik işlem
HIV gag-pol	cDNA	3114	24/55/40	Antijenik, proteolitik işlem
Human T-cell Leukemia Virus (HTLV)-I p40	cDNA	1750	40	HTLV-I LTR promoter trans-aktivasyonu, antijenik, fosforile, çekirdek lokalizasyonu
İnsan interlökin-2	cDNA	1000	16/15,5	Aktif, antijenik, sinyal peptid bölünmesi, salgılanma
Parainfluenza virus tip 3 hemagglütinin-nörominidaz	cDNA	1716	70	Hemagglütinasyon, hemadsorbsiyon, hemagglütinasyon-inhibisyon aktivitesi, antijenik, immünojenik, nötralizan, koruyucu, glikozile
Influenza polimeraz PA	cDNA	2200	87	Antijenik
Influenza polimeraz PB1	cDNA	2300	93	Antijenik, PB1-PB2 kompleks oluşumu
Influenza polimeraz PB2	cDNA	2300	85	Antijenik, PB1-PB2 kompleks oluşumu
Influenza (kuş vebası) hemagglütinin	cDNA	1750	-	Hemagglütinasyon, hemadsorbsiyon, hemolitik aktivite, antijenik, immünojenik, nötralizan, koruyucu, glikozile, proteolitik bölünme, hücre yüzeyi
Influenza (A/PR/8/34) virus hemagglütinin	cDNA	-	65	Hemagglütinasyon, hemadsorbsiyon aktivitesi, glikozile, proteolitik bölünme, hücre yüzeyi
Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) glikoprotein prekürsörü, GPC	cDNA	3300	72	Antijenik, glikozile, hücre yüzeyi
LCM arenavirus (LCMV) nükleoprotein	cDNA	3300	62	Antijenik
N.crassa aktivatör protein	genomik	2900	100	Özgül DNA bağlanması
Phaseolus vulgaris phaseolin	cDNA	1400	51/45	Antijenik, glikozile, salgılanma
Polyoma virus T antijen	cDNA	-	100	Antijenik, immünojenik, koruyucu, glikozile (O-ilişkili),
Punta Toro phlebovirus N	cDNA	1900	27	Antijenik, immünojenik, nötralizan
Punta Toro phlebovirus Ns	cDNA	1900	26	Antijenik, immünojenik
Simian rotavirus SA11 kapsid antijen VP6	cDNA	1397	41	Antijenik, immünojenik, oligomerik toplanma
SV40 T, t antijenleri	genomik	2707	19	Antijenik
Solanum tuberosum (patates) patatin	cDNA	1400	40	Lipid acil hidrolaz, acil transferaz aktivitesi, antijenik

A:gen, B:genin alındığı kaynak, C:genin base pair (bp) olarak büyüklüğü, D:genin kodladığı proteinin kilodalton (kd) olarak ağırlığı, E:proteinin biyolojik özelliklerini göstermektedir.

Bu yöntemle elde edilen proteinlerden *Pseudomonas aeruginosa*'ya (*P.aeruginosa*) karşı elde edilen fare antikoru, klinik uygulamada başarıyla kullanılmıştır. *P. aeruginosa* lipoprotein l'e karşı olan fare monoklonal antikoru hafif ve ağır zincirlerini kodlayan cDNA'lar transfer vektöre klonlanmıştır. Her iki bölge aynı vektör üzerinde bulunur ekspresyon yönleri terstir.

Bu şekildeki dizilimle daha etkili bir transkripsiyon sağlanmıştır. Rekombinant baculovirus elde edildikten sonra böcek hücrelerinin bunlarla infekte edilmesi sonucu aktif monoklonal antikorlar elde edilmekte ve elde edilen antikorlar özellikle immün sistemi bozuk, organ transplantasyonu yapılmış kişilerde *P. aeruginosa* infeksiyonlarını önlemek için kullanılmaktadır (7).

## **BACULOVİRUS SİSTEMİNDE KARŞILAŞILAN PROBLEMLER**

Baculoviruslar kültüre edilmiş böcek hücrelerini veya larvalarını kolaylıkla infekte edebildiklerinden, özellikle larvalar "ucuz protein fabrikaları" olarak kullanılabilir. Larvalarla çalışmak hücre kültürlerine göre daha kolay ve ucuz bir yöntemdir (23).

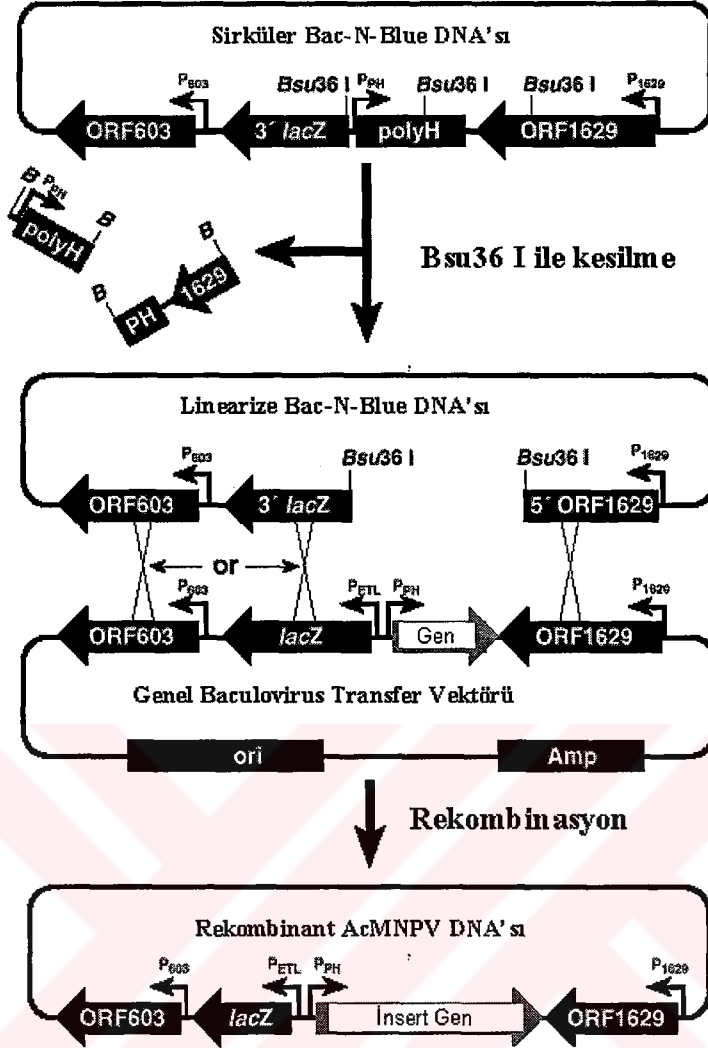
Baculovirus ekspresyon sistemlerinde hem hücreler hem de larvalar 4-5 gün gibi kısa ömürlüdür. Diğer taraftan ticari amaçlar için önemli olan üretimin devamlılığını sağlamak amacıyla iki biyoreaktör kullanılır. Birinci reaktörde hücreler üretilirken ikinci reaktörde infeksiyon ve ürün eldesi sağlanır (8).

Devamlı ürün elde etmenin bir diğer yolu da rekombinant geni konak hücre DNA'sına entegre etmektir. Burada seçilecek promoter önem kazanmaktadır. Bu amaçla hazırlanan bir sistemde baculovirus IE1P promoteri kullanılmıştır (16). Promoter ve terminatör (IE1p ve IE1t) bölgeleri arasına, klonlanmış gen sokularak konak hücre sadece bu DNA ile infekte edilir. Plazmidlerden bazıları konak hücre DNA'sına entegre olur ve bu hücreler yapısal olarak sürekli test proteinini üretirler. Bu şekilde hazırlanan sistemlerde özellikle, glikozilasyon isteyen proteinlerin sürekli olarak elde edilmesi mümkün olmaktadır. Ancak sistemden elde edilen protein miktarı önceki paragrafta anlatılan sisteme göre daha az olmaktadır (16).

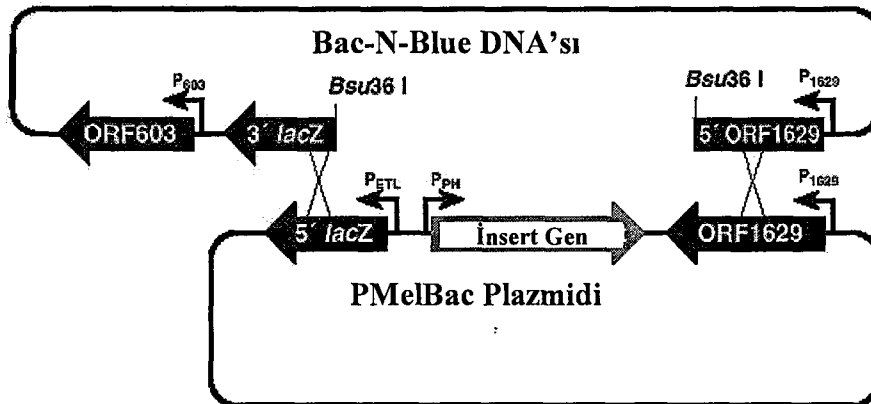
Çok yüksek düzeylerde ekspresyon elde edebilmek için *Spodoptera frugiperda* hücrelerinin %97'den fazlasının canlı olması ve üreme safhasında bulunması gereklidir. Üreme ortamındaki veya işlem basamaklarındaki en küçük değişiklikler bile polihedrine bağlı sistemlerde önemli derecede ekspresyon düşüklüğüne neden olabilmektedir (23).

## BAC-N-BLUE DNA TRANSFEKSİYON KİTİ

Bac-N-Blue Transfeksiyon Kiti (Invitrogen-Nederland) linearize edilmiş AcMNPV DNA'sı (Bac-N-Blue DNA) içermektedir (Şekil-2). Bac-N-Blue DNA'sında 3 adet Bsu36 I kesim yeri vardır. DNA üzerindeki ORF1629, viral üreme için bulunması zorunlu olan bir bölgedir. Bu bölgedeki bir eksiklik virus üremesini olumsuz etkiler. Bsu36 I ile kesme sırasında ORF1629'un 3' bölgesinden bir parça ayrılır. Viral üremenin kazanılması için kaybolan bu bölgenin vektörle tekrar geri kazanılması gereklidir. Rekombinasyon sırasında, transfer vektör ve linearize edilmiş DNA arasında ORF603 ve ORF1629 bölgelerinde meydana gelen çaprazlaşmalar sonucu, virus genomundaki eksik ORF1629 bölgesi tamamlanır ve üreyebilen rekombinant virus elde edilir. DNA üzerinde bulunan LacZ gen bölgesi, istenirse mavi renkli plaklar elde etmek için kullanılmaktadır (37). Bac-N-Blue DNA'sı ile vektör DNA'sı arasındaki rekombinasyon şekil-2 ve 3'de gösterildiği gibi ya ORF1629 ve ORF603 arasında veya ORF1629 ile LacZ genleri arasında olmak üzere iki bölgede görülebilir. LacZ dizilerindeki rekombinasyon sonucu aktif  $\beta$ -galaktozidaz üretimi sağlanmaktadır. Böylece ortamda X-gal varsa mavi renkli plaklar oluşmaktadır. Bu yolla rekombinant virusları izole etmek daha kolay olmaktadır (25).



Şekil-2: AcMNPV DNA'sının (Bac-N-Blue DNA) genel transfer vektörüyle rekombinasyonu.



Şekil-3: AcMNPV DNA'sının (Bac-N-Blue DNA) pMelBac transfer vektörüyle rekombinasyonu.

## HIGH FIVE HÜCRELERİN ÖZELLİKLERİ

Bac-N-Blue Transfeksiyon Kitinde kullanılan High five hücre dizisi (Invitrogen) ilk kez Boyce Thompson Enstitüsünde Trichoplusia ni (lahana kelebeği) yumurta hücrelerinden elde edilmiştir. Başlıca özellikleri şunlardır ;

1. İkiye bölünme süreleri 24 saat kadardır.
2. Monolayer şekilde ürerler.
3. Süspansiyon kültürlerinde ve serumsuz ortamlarda üreyebilirler.
4. Oldukça iyi sekresyon ekspresyonu sağlanabilmektedir.

Hücreler en iyi 27°C'de üremektedirler. 27°C'nin altında ve 30°C'nin üstünde üreme siklusları bozulur. 30°C'nin üstünde uzun süre kalan hücreler üreme yeteneklerini kaybetmektedirler.

Hücreler transfeksiyon ve plak testlerinden önce kültür plaklarının yüzeyine düzgün bir şekilde yayılmalıdır. Bunun için plaklar ileri geri hareketlerle sallanmalıdır. Yuvarlama hareketi yapılmamalıdır. Flasklardaki medium değiştirilirken de nazik olunmalıdır. Hücreler yüzeye zayıf tutunduğu için kolayca ayrılabilirler.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu tez çalışması, GATA Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Viroloji Bilim Dalı laboratuvarlarında 4 Aralık 1998-1 Şubat 2000 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir.

### HBsAg PCR ÜRÜNÜNÜN HAZIRLANMASI

#### Gereçler

Primer 1-HBVS1 (Operon Alameda)

Primer 2-HBVS2 (Operon Alameda)

deoksinükleozidtrifosfat-dNTP (Sigma Germany)

Taq Polimeraz (GATA Türkiye)

Taq Buffer (Sigma Germany)

MgCl<sub>2</sub> (Sigma Germany)

Termal Cycler (MJ Research USA)

Prep-A-Gene DNA Purification Systems (BioRad USA)

TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen Nederland)

#### TRIS-EDTA (TE) Buffer

10 mM Tris-HCl pH 8.0 (Sigma Germany)

1 mM EDTA pH 8.0 (Sigma Germany)

#### Yöntem

Klonlanacak HBsAg ürününü elde edebilmek amacıyla internetten Dünya Gen Bankasındaki mevcut HBV genomları alınmıştır. Bu genomlar üzerinde HBsAg bölgesini kodlayan bölümler tespit edilmiştir. Daha sonra bu veriler Viroloji Bilim Dalı'nda hazırlanan bilgisayar programına yüklenerek en uygun primer dizisini çıkartılmıştır.

Buna göre elde edilen HBsAg primerleri şunlardır.

Primer 1 (157.bazdan başlamaktadır)

5' GGATCCATGGAGAACATCACATCAGG 3'

Primer 2 (834.bazdan başlamaktadır)

5' GAATCCTTTGTTTTGTTAGGGTTTAA 3'

Birinci primerin 5' ucuna BamHI, 2. primerin 5' ucuna da EcoRI dizileri eklenmiştir. Böylece pMelBaC vektörüne doğru yönde bağlanma amaçlanmıştır. PCR reaksiyonu için aşağıdaki yöntem uygulanmıştır;

500 µl'lik ependorf tüpüne;

primer1..... 1 µl

primer2..... 1 µl

dNTP..... 1 µl

template..... 5 µl

MgCl<sub>2</sub>..... 1 µl

10XTaq buffer...5 µl

Taq polimeraz...1 µl

Distile su..... 35 µl konularak termal cycler 'de 20 siklüs yapılmıştır.

PCR ürünü olarak 703 bp uzunluğunda bir HBsAg inserti elde edilmiştir (22). Elde edilen reaksiyon ürünü %2 agaroz jelde yürütülüp doğrulandıktan sonra "Prep-A-Gene DNA Purification Systems" Kiti kullanılarak aşağıda bildirildiği şekilde pürifiye edilmiştir.

1. PCR tüpündeki mineral oil alınmadan dikkatli bir şekilde alttaki aköz kısım temiz bir tüpe aktarılmıştır.
2. Tüp içine 180 µl Prep-A-Gene Binding Buffer ve 20 µl Matrix konarak iyice karıştırılmış ve 10 dakika oda ısısında bekletilmiştir.
3. Tüp 13.000 rpm'de 30 saniye santrifüjlenerek üstteki sıvı atılmıştır.
4. Pellet 500 µl Washing Buffer ile resüspanse edilerek tekrar santrifüjlenmiştir. Bu işlem iki kez tekrarlanmıştır.
5. Pelletin oda ısısında 10 dakika kuruması sağlanmış ve 20 µl TE buffer konularak tekrar resüspanse edilmiştir.
6. Tekrar santrifüjlenerek dikkatli bir şekilde sıvı kısım temiz bir tüpe aktarılmıştır.

Elde edilen pürifiye HBsAg gen bölgesini plazmide klonlamak için "TOPO TA Cloning Kit" kullanılmıştır. Bu amaçla;

PCR ürünü..... 4 µl

pCR-TOPÒ plazmid..... 2 µl

Steril distile su..... 4 µl karışımı hazırlanarak oda ısısında beş dakika bekletildikten sonra bir sonraki transformasyon basamağına kadar buzda muhafaza edilmiştir.

## **pCR+HBsAg VEKTÖRÜNÜN E.coli'ye TRANSFORMASYONU**

### **Gereçler**

#### **Luria Bertani (LB) broth**

Tryptone .....10 g (Difco USA)

Yeast extract.....5 g (Difco USA)

NaCl.....10 g (Sigma Germany)

distile su.....1000 ml

pH.....7.0

50 mM CaCl<sub>2</sub> (Sigma Germany)

Kompeten TOP10 F' E.coli (Invitrogen Nederland)

pUC18 plazmid (Invitrogen Nederland)

Fast-Link™ Ligation and Screening Kit" (Epicentre USA)

### **Yöntem**

Hazırlanan pCR+HBsAg vektörü, bol miktarda elde edilebilmesi ve saklanabilmesi amacıyla kompeten E.coli'ye transforme edilmiştir. Transformasyon için sırasıyla aşağıdaki işlemler yapılmıştır;

1. Bir gece önceden kompeten E.coli LB besiyerine ekildi ve 37°C'de inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur.
2. Ertesi gün bu besiyerinden 1 ml alınıp 50 ml LB içine ekildi ve 37°C'de çalkalamalı inkübasyona bırakılmıştır.
3. Üreme durumu sıklıkla kontrol edilerek optik dansite (OD<sub>600</sub>) 0.4 olana kadar beklenilmiştir.
4. Optik Dansite 0.4 olduğunda bakteri kültürü 4°C'de 5000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek pellet elde edilmiştir.
5. Elde edilen pelletin, 50 mM 10 ml soğuk CaCl<sub>2</sub> ilave edilerek iyice resüspanse olması sağlanmış ve 4°C'de 20 dakika bekletilmiştir.

6. Tekrar 4°C'de 5000 rpm'de 5 dakika santrifüje edilerek pellet toplanmıştır.
7. Pellet 50 mM 1 ml soğuk CaCl<sub>2</sub> ile iyice resüspanse edilerek kompeten hücreler hazırlanmıştır. Elde edilen kompeten hücreler kullanılabildiği kadar buzda bekletilmiştir.
8. Üç adet 750 µl'lik ependorf tüp alınarak buz kabına konulmuştur. Tüpler; 1.tüp negatif kontrol, 2.tüp pozitif kontrol ve 3.tüp pCR+HBsAg olmak üzere işaretlenmiştir.
9. Birinci tüpe 200 µl sadece hazırlanan kompeten hücre konulmuştur. İkinci tüpe 200 µl kompeten bakteri ve 10 µl pUC18 plazmid (200 µg/ml), üçüncü tüpe de 200 µl kompeten bakteri ve 10 µl pCR+HBsAg vektörü konulmuştur.
10. Hazırlanan tüpler daha önceden aşağıdaki şekilde programlanmış termal cycler'e konularak transformasyon işlemi tamamlanmıştır.
  - 0°C'de..... 20 dakika
  - 42°C'de..... 1.5 dakika
  - 0°C'de ..... 2 dakika
11. Tüplere 200 µl LB besiyeri ilave edilerek çalkalamalı olarak 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır.
12. Inkübasyon sonunda tüplerden 200 µl alınarak ampisilinli LB agara ekimler yapılmış ve plaklar 37°C'de bir gece bekletilmiştir.
13. Ertesi gün plaklar kontrol edildiğinde negatif plakta hiç üreme olmadığı görülmüştür. Pozitif kontrol plağında ve transformasyon plağında ise oldukça yoğun sayıda koloniler gözlenmiştir. pCR+HBsAg plaklarındaki kolonilerden randomize 14 tanesi seçilerek plazmid kontrolü için işleme alınmıştır.

**REKOMBİNE BAKTERİLERİN SEÇİMİ:** Elde edilen kolonilerden hangisinde aranan plazmidin bulunduğu belirlenebilmesi amacıyla hızlı yöntemle plazmid araştırılmıştır. Bu amaçla "Fast-Link™ Ligation and Screening Kit" kullanılarak;

1. Mikrofüj tüpleri işaretlenerek herbirine 15 µl Protoplast buffer konulmuştur.
2. Plaktan seçilen koloniler tek tek alınarak sırayla tüplerin içinde iyice karıştırılmıştır.
3. Protoplast oluşumunu sağlamak amacıyla tüpler oda ısısında 10 dakika bekletilmiştir .

4. Binde sekizlik (%0.8) agaroz jel hazırlanarak her bir kuyucuğa 8-10 µl lysis buffer konmuştur.
5. Tüplerden alınan protoplast buffer dikkatli bir şekilde jeldeki kuyucuklara ilave edilerek 10 dakika bekletilmiştir.
6. Jel 100 voltta 20 dakika yürütülerek çıkan plazmidler incelenmiştir. Daha ağır ilerleyen plazmidler rekombine plazmid olarak değerlendirilmiştir.

## REKOMBİNE pCR+HBsAg PLAZMİDİN PÜRİFİKASYONU

### Gereçler

#### LB Agar

- Tryptone ..... 10 g (Difco USA)  
Yeast extract..... 5 g (Difco USA)  
NaCl..... 10 g (Sigma Germany)  
Agar..... 15 g (Difco USA)  
distile su..... 1000 ml  
pH.....7.0

Prep-A-Gene DNA Purification Systems (BioRad)

Alkali lizis solüsyonu (%1 SDS, 0.2 M NaOH)

Potasyum asetat 2.5 M (pH 4.8)

TE buffer

### Yöntem

Uygun koloniden rekombine plazmidin bol miktarda elde edilmesi amacıyla ampisilinli LB agar plağına ekim yapılmıştır. Plak 37°C'de bir gece bekletilmiş ve aşağıdaki protokol uygulanarak plazmidler toplanmıştır. Bu işlem için "Prep-A-Gene DNA Purification Systems" kiti kullanılmıştır;

1. Plaktaki kolonilerden 4-5 tanesi alınarak 200 µl resüspanسیون buffer içeren mikrofuj tüpüne konmuş ve pelletin iyice resüspanse olması için vortekslenmiştir.
2. Tüpe 200 µl alkali lizis solüsyonu eklenmiş ve bir kaç kez altüst edilmiştir.
3. Tüpe 200 µl potasyum asetat eklenerek yine altüst edilmiştir.
4. Tüp oda ısısında 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek pelletin iyice çökmesi sağlanmıştır.

5. Üstteki sıvı dikkatli bir şekilde başka bir mikrofüj tüpüne aktarılmıştır.
6. Tüpe 300 µl DNA miniprep kit binding buffer konulmuştur.
7. Üzerine 60 µl Prep-A-Gene matrix eklenerek 10 dakika beklenmiştir. Bu arada tüp altüst edilerek matriksin karışması sağlanmıştır.
8. Temiz bir mikrofüj tüpüne filtre yerleştirilerek içine hazırlanan matriks konulmuştur ve 13.0000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilmiştir.
9. Filtre alınarak alttaki sıvı atılmıştır. Filtre tekrar yerleştirilip üzerine 500 µl Prep-A-Gene wash buffer konulmuş ve tekrar santrifüj edilmiştir. Bu işlem iki kez tekrarlanmıştır.
10. Pelletin 10 dakika havada kuruması beklenilmiş ve 100 µl TE buffer eklenerek santrifüj edilmiştir.
11. Bu işlem sonucunda yaklaşık 120 µg/ml konsantrasyonunda pCR+HBsAg plazmidi elde edilmiştir.

Bundan sonraki basamakta, elimizdeki plazmidden bol miktarda HBsAg inserti elde edilerek Bac-N-Blue DNA'sı ile rekombinasyon için pMelBac ekspresyon vektörüne klonlama yapılmıştır.

## **HBsAg İNİERTİ ELDE EDİLMESİ**

### **Gereçler**

- PMelBac plazmid (Invitrogen Germany)
- EcoR I (Boehringer Mannheim Germany)
- BamH I (Boehringer Mannheim Germany)
- SuRE-Cut buffer (Boehringer Mannheim Germany)

### **Yöntem**

pCR+HBsAg vektöründen HBsAg inserti elde etmek için aşağıda bildirilen yöntem takip edilmiştir.

1. Mikrofüj tüpüne ;
  - plazmid..... 20 µl
  - EcoRI..... 2 µl
  - BamHI..... 2 µl
  - SuRE/Cut Buffer..... 2,7 µl konularak 37°C'de bir gece bekletilmiştir.

2. Ertesi gün örnekten 2 µl alınarak %0.8 agaroz jelde yürütülmüş ve plazmidin kesilip kesilmediği kontrol edilmiştir.
3. Kalan örneğin tümü jele yüklenerek yürütülmüştür.
4. Jel üzerinde ayrılan HBsAg insertleri dikkatli bir şekilde jelden kesilerek alınmıştır.
5. Jelden HBsAg DNA parçalarını izole etmek için Prep-A-Gene DNA Purification Systems kiti kullanılmıştır. Bunun için aşağıda bildirilen yöntem takip edilmiştir.
  - a) Kesilen jel parçaları 1.5 ml'lik mikrofüj tüpüne konarak üzerine 600 µl Prep-A-Gene DNA Binding Buffer konulmuş ve 10 dakika oda ısısında bekletilmiştir.
  - b) Jel tamamen eriyince 20 µl Prep-A-Gene DNA Matrix konulmuş ve 5 dakika bekletilmiştir.
  - c) Tüp mikrofüje yerleştirilerek 13.000 rpm'de 30 saniye çevrilmiş ve üstteki sıvı pipetle atılmıştır.
  - d) Tüp içine 500 µl Wash Buffer konarak aynı şekilde santrifüje edilmiştir. Bu yıkama işlemi iki kez tekrarlanmış ve tüpte kalan pelletin kuruması için 10 dakika oda ısısında bekletilmiştir.
  - e) Pellet üzerine 20 µl TE buffer konulmuş ve tekrar santrifüje edilmiştir. Süpernatant dikkatli bir şekilde pipetlenerek temiz bir tüp içine alınmıştır.
  - f) İşlemler sonucu yaklaşık olarak 110 µg/ml yoğunluğunda HBsAg DNA'sı elde edilmiştir.

## **HBsAg İNSERTİNİN pMeIBac VEKTÖRÜ İLE REKOMBİNASYONU**

### **Gereçler**

Fast-Link DNA Ligation Kit'i (Epicentre USA)

pMeIBac plazmid (Invitrogen Nederland)

### **Yöntem**

HBsAg DNA'sı, "Fast-Link DNA Ligation Kit"i kullanılarak, önceden EcoRI ve BamHI ile restrikte edilmiş pMeIBac vektörü ile rekombine edilmiştir. Bu amaçla

1. mikrofüj tüpüne;

10X Fast-Link Ligation Buffer.... 15 µl  
ATP 10 mM.....1,5 µl  
Fast-Link DNA Ligase.....1 µl  
pMelBac vektörü.....5 µl  
HBsAg inserti.....6 µl

konularak toplam 15 µl'lik bir ligasyon reaksiyonu sağlanmıştır.

2. Karışım beş dakika oda ısısında bekletildikten sonra örnekten 2 µl alınıp %0.8 agaroz jelde kontrol yapılmıştır.
3. Ligate olan pMelBac+HBsAg vektörünü bol miktarda elde edebilmek amacıyla pCR+HBsAg vektöründe yapılan TOP10F' E.coli'ye transforme işlemleri pMelBac+HBsAg için de tekrarlanmıştır.
4. Sonuçta elde edilen plazmid agaroz jelden tekrar pürifiye edilmiş ve elimizde çok miktarda saf pMelBac+HBsAg plazmidi bulunması sağlanmıştır.

Daha sonraki basamakta pMelBac+HBsAg plazmidi, Bac-N-Blue DNA'sı için transfer vektörü olarak kullanıma hazırlanmıştır.

## TRICHIPLUSIA NI HÜCRE KÜLTÜRÜNE TRANSFEKSİYON İŞLEMİ

### Gereçler

Bac-N-Blue DNA (Invitrogen Nederland)  
Grace's Insect Media (Invitrogen Nederland)  
Insectin plus lipozom (Invitrogen Nederland)  
THM-FH Media (Invitrogen Nederland)  
High Five Hücre (Invitrogen Nederland)  
ELISA (Organon USA)

### Yöntem

Bu amaçla Bac-N-Blue DNA'sı pMelBac+HBsAg plazmidi ve InsectinPlus lipozomları Grace's Insect Media içinde karıştırılıp yeni ekilmiş böcek hücreleriyle (High Five Cell) inkübe edilmiştir. Transfeksiyon işlemi için;

1. Mikrofüj tüpüne 10 µl (0.5 µg) Bac-N-Blue DNA'sı, 4 µl (4 µg) pMelBac+HBsAg plazmidi, 1 ml Grace's Insect Medium ve 20 µl InsectinPlus

lipozom konarak vortekslenmiş ve karışım oda ısısında 15 dakika bekletilmiştir.

2. Bu arada hücre kültürünün mediumu dikkatli bir şekilde uzaklaştırılarak yerine 2 ml Grace's Insect Media'sı ilave edilmiştir (suplementsiz veya FBS'siz). Bu şekilde, transfeksiyonu etkileyebilecek proteinler ortamdaki uzaklaştırılmıştır.
3. Kültürdeki medium tekrar atılarak yerine transfeksiyon karışımı konmuş ve plağın her yerine iyice yayılması sağlanmıştır.
4. Plaklar oda ısısında 2/dakika çalkalayarak 4 saat bekletilmiştir.
5. Dört saat sonunda plaklara 1 ml TNM-FH medium ilave edilmiş ve 27°C'de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır.

## **POSTTRANSFEKSİYON İŞLEMİ**

Yetmişiki saat sonunda üreyen viruslar ortama salınacağından süpernatant alınarak daha sonraki rekombinant plak deneylerinde kullanılmıştır.

Bunun için;

1. Pipetle her bir plaktan 2 ml medium alınıp, steril bir tüpe aktarılmıştır.
2. Plaklara 3 ml taze TNM-FH ilave edilerek 27°C'de 48 saatlik inkübasyona bırakılmıştır.
3. Transfeksiyon sonrası hücreler 4 gün kontrol edilerek transfeksiyonun başarılı olup olmadığı gözlenmiştir.

Transfeksiyon işleminin gerçekleştiği belirlendikten sonra rekombinant baculovirusların pürifiye edilmesi için plak testi yapılmıştır.

## **PLAK TESTİ**

Doğal virusların hücreleri, rekombinant viruslardan daha fazla infekte edebilme yeteneği olduğu için ayırımı yapılabilmesi amacıyla plak testi kullanılmıştır.

**HÜCRELERİN HAZIRLANMASI:** Plaklar TNM-FH ile ıslatılarak log fazındaki hücrelerden konulmuştur. Hücrelerin plağın her yerine yayılması amacıyla 10 dakika oda ısısında çalkalanarak (8/dakika) bekletilmiştir. Hücrelerin yapışması

için 30 dakika bekletilmiştir. Sonuçta plaklar incelenerek üremenin olduğu gözlenmiştir.

**VİRUS DİLÜSYONU:** Viral stok iyice vortekslenerek 10 kat dilüsyonlar hazırlanmıştır. Her bir plak için 1 ml'lik dilüe virus solüsyonları kullanılmıştır.

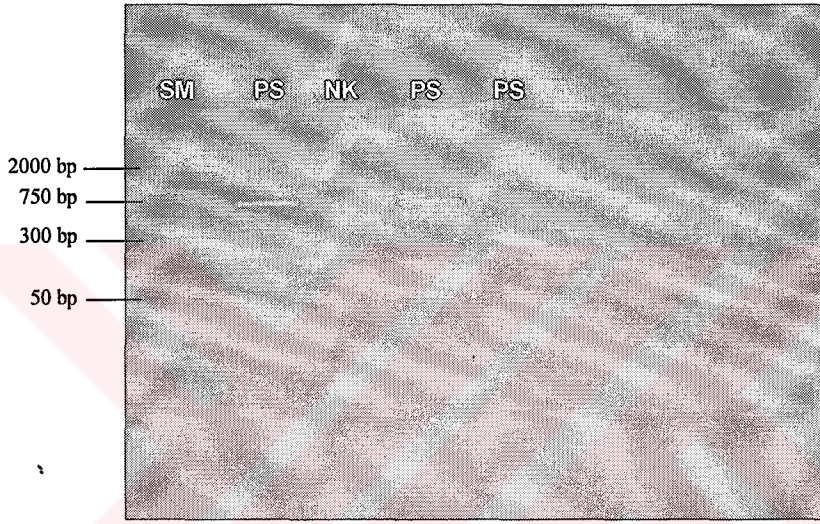
**VİRAL İNFEKSİYON VE AGARÖZ KAPLAMA İŞLEMİ:** Bu işlem için;

1. Hazırlanan hücre kültürlerinin üzerine 1 ml viral dilüsyondan konulmuştur.
2. Plaklar oda ısısında 2/dakika çalkalamayla 1 saat inkübe edilmiştir.
3. TNM FH solüsyonuyla hazırlanan %2,5'luk agaröz (150 µg/ml X-gal'li) 42°C'lik benmariye yerleştirilmiştir.
4. Kültür plaklarından medium tamamen aspire edilmiştir.
5. Steril bir pipetle benmarideki agarözden alınıp kültür plaklarının yüzeyine dikkatli bir şekilde yayılmıştır.
6. Plaklar 27°C'de 5-6 gün inkübe edilmiştir.
7. Inkübasyon sonunda mavi koloniler seçilmiştir.

Elde edilen kolonilerden daha sonra tekrar kültür pasajları yapılmıştır. Hücre kültür sıvısında ELISA ile HBsAg yönünden araştırılmış ve sonuçların pozitif olduğu gözlenmiştir.

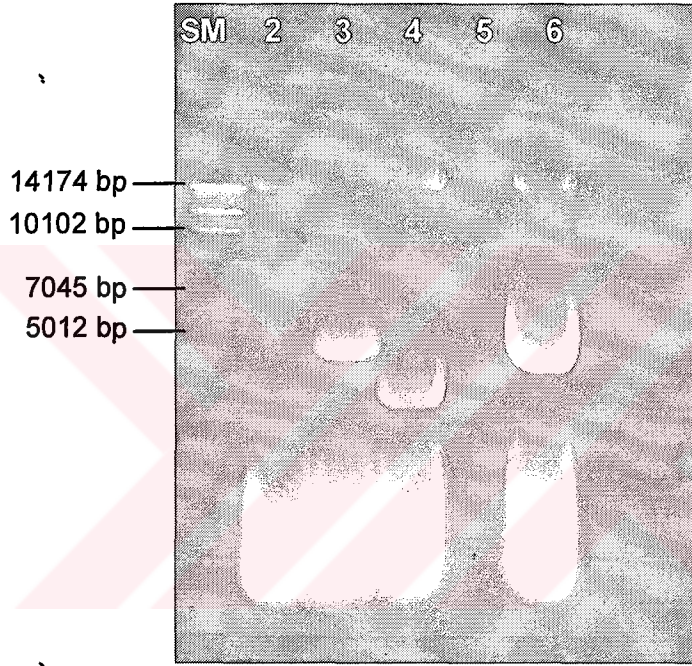
## BULGULAR

Hepatit B virusu S bölgesine klonlamak amacıyla hazırlanmış primerler kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen ürün fotoğrafı şekil-4'dedir. Burada 2, 4 ve 5. yollarda pozitif hasta serumu kullanılarak elde edilmiş ampliconlar net şekilde görülmektedir. Birinci yol PCR size marker (Sigma) yoludur. İkinci yol negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Pozitif serumların tümünden de markerle uyumlu olarak yaklaşık 700 bp uzunluğunda ürün elde edilmiştir.



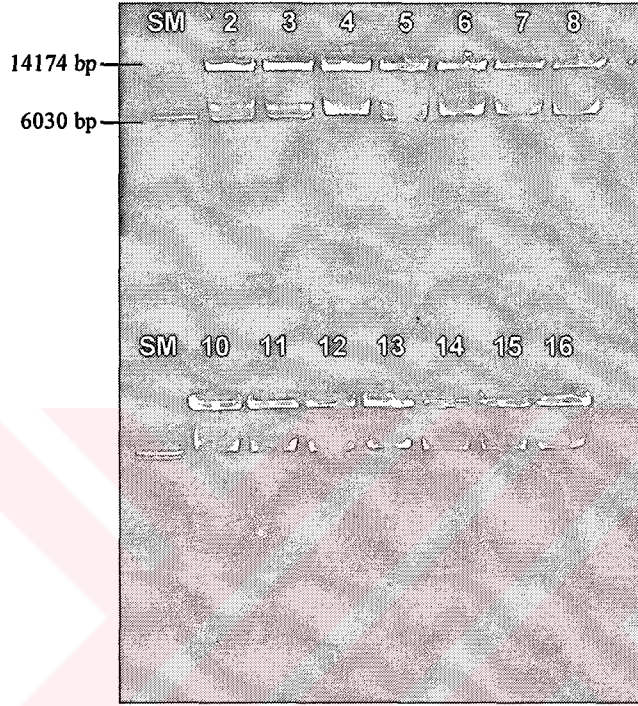
**Şekil-4:** P1 ve P2 kullanılarak yapılmış HBV S gen bölgesinin PCR ürünü jel fotoğrafı. SM:size marker; PS:pozitif serum; NK:negatif kontrol.

PCR ürünü HBsAg insertinin pCR-TOPO plazmidine klonlanarak kompeten E. coli'ye transformasyonu sonrasında elde edilen görüntüler Şekil-5'de görülmektedir. Burada 1. yol size markerdir. İkinci yol kompeten E.coli'nin (transforme olmamış E.coli'nin) plazmid profilini göstermektedir. Görüldüğü gibi kompeten bakteride plazmid bulunmamaktadır. Üçüncü yolda yaklaşık 4.6 kb büyüklüğündeki pCR+HBsAg plazmidi görülmektedir. Dördüncü yolda transformasyonda pozitif kontrol olarak kullanılan pUC18 plazmidi (2,6 kb) vardır. 6. yolda 3.9 kb büyüklüğündeki pCR-TOPO vektörü görülmektedir.



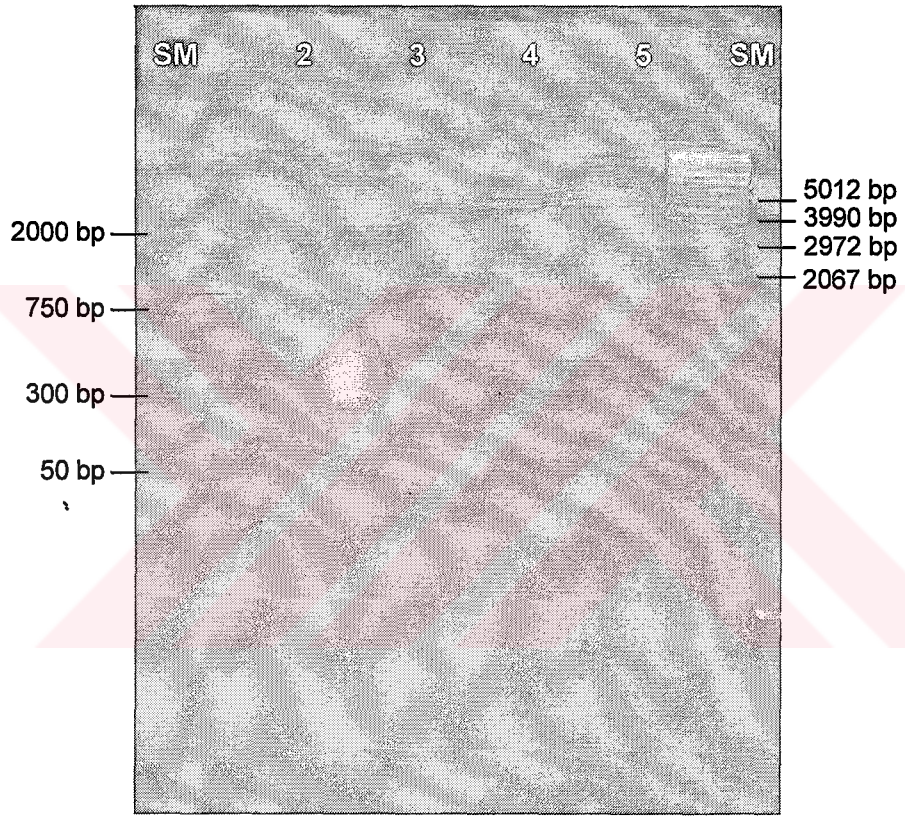
**Şekil-5:** HBsAg geninin pCR-TOPO'ya klonlandıktan sonra kompeten E.coli'ye transformasyon sonrası elde edilen plazmid jel görüntüleri. SM:size marker.

Transformasyon sonrası elde edilen kolonilerden seçilen 14'ünün plazmid profilleri şekil-6'da görüldüğü gibidir. Burada 1. yol supercoil size marker'dir. Şekilde görüldüğü gibi 2, 3 ve 5. yol haricindeki tüm kolonilerde HBsAg inserti pCR-TOPO'ya klonlanmıştır. İkinci, 3. ve 5. yoldaki kolonide muhtemelen insertsiz pCR bulunmaktadır.



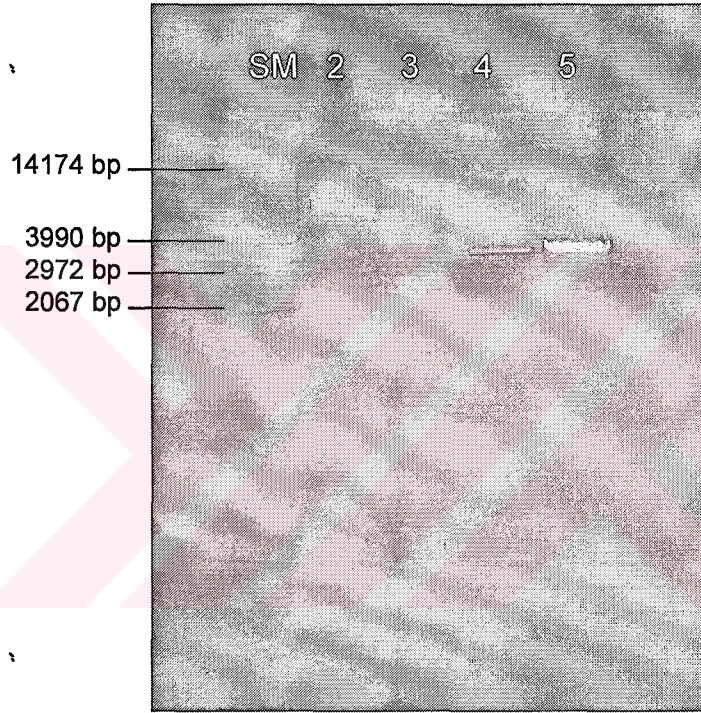
**Şekil-6:** pCR+HBsAg vektörünün E.coli'ye transformasyonu sonrası elde edilen kolonilerden yapılan plazmid izolasyonu sonrası çekilen agaroz jel fotoğrafı. SM:size marker.

pCR+HBsAg vektörünün enzimlerle kesilmesinden sonra elde edilen jel fotoğrafı şekil-7'de görüldüğü gibidir. Burada 1. yol PCR marker'i, 6. yol ise supercoil markeri göstermektedir. İkinci, 3. ve 5 yollarda çeşitli metodlarla elde edilmiş pCR+HBsAg plazmidi (4.6 kb) 4. yolda ise BamHI ve EcoRI ile kesilmiş pCR+HBsAg plazmidi görülmektedir. Enzimlerle kesim sonrası PCR markerin 700 bp'lik alanına uyumlu olarak HBsAg insertinin ayrıldığı 4. yolda açık şekilde görülmektedir.



**Şekil-7:** pCR+HBsAg vektörünün enzimlerle kesilmesinden sonra elde edilen jel fotoğrafı. SM: Size Marker

Şekil-8'de HBsAg insertinin pMelBac vektörüne klonlanması ve transformasyon sonrası elde edilen pMelBac+HBsAg plazmidinin enzimlerle restriksiyonu sonrası elde edilen jel bulguları görülmektedir. Burada 1.yolda supercoil size marker, 2. yolda rekombine olmuş 5.5 kb büyüklüğündeki pMelBac+HBsAg vektörü, 3. yolda HBsAg inserti, 4. yolda BamHI ve EcoRI ile restrikte edilmiş pMelBac+HBsAg vektörü görülmektedir. Şekilde de görüldüğü gibi enzimlerle restriksiyon sonrası plazmide sokulan HBsAg inserti ayrılmış ve önde gitmiştir. 5. yolda ise enzimlerle kesilen pMelBac bulunmaktadır.



**Şekil-8:** HBsAg geninin pMelBac plazmidine klonlanması ve enzimlerle restriksiyonu sonrası çekilen jel fotoğrafı. SM:size marker.

Şekil-9'daki fotoğrafta, high five hücrelerin Bac-N-Blue ve pMelBac+HBsAg ile transfeksiyonu sonrası yapılan plak testini göstermektedir. Plakta görülen mavi koloniler transfeksiyon işleminin başarı ile gerçekleştiği hücreleri göstermektedir.



**Şekil-9:** High five hücrelerin Bac-N-Blue ve pMelBac+HBsAg ile transfeksiyonu sonrası yapılan plak testi fotoğrafı.

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Prokaryotik ve ökaryotik çeşitli genlerin değişik sistemlerde ekspresyonu yönünde bir çok çalışma yapılmış ve halen de bu konudaki araştırmalar devam etmektedir. Özellikle Tıp alanında terapötik amaçlı heterolog proteinlerin yapımı konusunda bu sistemler ucuz ve bol protein elde edilebilen yöntemler olarak çok faydalı sonuçlar vermiştir. Başlangıç çalışmalarında Pumpen ve ark.ları HBsAg genini E.coli'de eksprese etmişler, Korec ve ark.ları da E. coli'de HBsAg genini klonlamayı ve ekspresyonunu başarmışlardır (18,27). Hepatit B yüzey antijeni, sadece bakteri hücresinin sitoplazmasında eksprese edilmiş ve ortama sekrete edilmemiştir. Diğer taraftan prokaryotik sistemlerde posttranslasyon modifikasyonların bir çoğunun mümkün olmaması ancak özellikle de terapötik amaçlı ürünlerin elde edilmesinde proteinin orjinal yapısının korunması istenmektedir. Bu nedenle ekspresyon için mayalar kullanılmıştır. Bir çok araştırmacı tarafından, çeşitli maya hücrelerinde başarılı bir şekilde HBsAg ekspresyonu gerçekleştirilmiştir (15,17,18,19).

Çeşitli proteinlerin üretilmesinde böcek larvalarının kullanılması hücre kültürlerine tercih edilmektedir. Bunun nedeni larvalardaki ekspresyon düzeylerinin kültürlerle oranla 10 kat daha fazla olabilmesidir. Yapılan bir çalışmada larvadan 3,6 mg polihedrin/insulin benzeri growth faktör II (IGF-II) elde edilirken hücre kültüründen 0.3 mg/ml protein elde edilebilmiştir (25).

Diğer taraftan memeli orjinli genlerin ekspresyonunda elde edilecek ürünün biyolojik olarak aktif olması da önem taşımaktadır (23). Ökaryotik proteinlerde biyolojik aktiviteyi etkileyen bir çok etmen tanımlanmıştır. Posttranslasyonel modifikasyonlar (glikozilasyon, proteolizis, fosforilasyon, ADP-ribozilasyon, acilasyon, sülfasyon gibi), tersiyer yapı (disülfid bağlarının oluşumu gibi) ve kuaterner yapı (oligomerizasyon veya kompleks oluşumları gibi) bu etmenlerden başlıcalarıdır (12,25).

Böcek hücreleri memeliye ait sinyal dizilerini tanımlayabilmekte ve bu proteinleri aynen memeli hücresinin yaptığı gibi endoplazmik retikulumda kesebilmektedir. İnsan alfa ve beta interferonları ve interlökin-2 (IL-2) ve interlökin-3 (IL-3) insan hücresindeki gibi tanınmakta ve kesilmektedir (25). Bu olay tüm

proteinlerde olmasa bile eksprese edilen çoğu protein için geçerlidir. Yine baculovirus kökenli üretilen proteinlerden bazılarında spesifik proteolitik kesmeler de gözlenmiştir. Örneğin Kurado ve ark.ları yaptıkları bir çalışmada influenza virusuna ait hemaglütinin proteininin kesildiğini göstermişlerdir. Hemaglütinin kesilmesi füzyon aktivitesi ve viral patogeneze açısından önemlidir. Benzer şekilde HIV zarf proteini de başarılı bir şekilde bölünmüştür (13,25).

Bir diğer önemli modifikasyon protein glikozilasyonudur. En sık rastlanan modifikasyon olan glikozilasyon, tüm proteinler için olmasa da bazı proteinlerin biyolojik aktivitesinde önemli rol oynamaktadır. Proteinin stabilizasyonu, hücresel etkileşimi ve intrasellüler protein lokalizasyonu için gereklidir. Endoplazmik retikulumda görülen bu olayda oligosakkarid, fosfolipid bir taşıyıcı aracılığıyla asparagine bağlanır. Yapılan bir çalışmada oligosakkaridin proteine bağlanma yerinin memeli hücresi ile böcek hücresinde aynı olmasına karşın oligosakkarid yapısının farklı olabildiği görülmüştür (12). Glikozilasyondaki bu farklılık proteinin biyolojik aktivitesinde değişiklik yapmamaktadır. İnterlökin-2 böcek hücrelerinde glikozile olmamaktadır. Bununla birlikte memeli hücrelerindeki glikozilasyon paternleri de farklılık göstermektedir. T hücre dizilerinden elde edilen IL-2'nin %40'ı glikozile olmamaktadır (25).

Yapılan çalışmalarda böcek hücrelerinden elde edilen proteinlerden fosforile olanların doğal konak hücrelerinden elde edilen proteinlerle aynı şekilde fosforile oldukları gözlenmiştir (7,25). Bir diğer çalışmada da sözkonusu sistemle sentez edilen HBsAg miktarının diğer sistemlerle karşılaştırıldığında çok daha fazla olduğu görülmüştür (20).

Bu çalışmada hedef olarak seçilen HBsAg ekspresyonunda elde edilmesi amaçlanan ürünün özellikle aşı çalışmalarında kullanılması amaçlandığından biyolojik aktivitesinin ve antijenitesinin bozulmaması, doğala yakın olması ve bol miktarda elde edilebilmesi önemlidir. Maliyetin ucuz olması da göz ardı edilmemelidir. Bu özellikler dikkate alındığında baculovirus-böcek hücre kültür sisteminin oldukça avantajlı bir sistem olduğu görülmektedir.

Özellikle aşı gibi tedavi amaçlı kullanılacak ürünlerde emniyet önemli bir faktördür. Ürünün kullanımı ile görülecek yan etkilerin minimum olması gerekir. Bu nedenle elde edilen proteinin mümkün olduğu kadar saf olması istenir. Memeli

hücre sisteminden elde edilen antijenin kullanımında potansiyel bir risk, ürünün eldesi sırasında rezidüel hücresel DNA ile kontamine olmasıdır. Baculovirus-böcek hücre sisteminde böyle bir risk bulunmamaktadır. Ayrıca baculovirusların vertebralılar için patojen olmaması sistemin diğer bir avantajıdır. Mayalardan elde edilen ürünler oldukça saf olmasına karşın rezidüel maya kontaminasyonları nedeniyle allerjik reaksiyonlar bildirilmiştir (10). Baculovirus sisteminde ise böyle bir olgu bildirilmemiştir.

Yapılan bu çalışmada bir diğer önemli unsur da rekombinant DNA teknolojisinin laboratuvar pratiğine sokulması olmuştur. Uygulanan prokaryot klonlama ve ökaryot ekspresyon teknikleri ile Bilim Dalımızda önemli teknolojik ilerlemeler gerçekleştirildiği kanısındayız. Bu çalışmaların devamı olacak şekilde bundan sonraki hedefimiz, üretilen HBsAg antijeni için uygun, ucuz ve kullanışlı bir protein pürifikasyon sisteminin laboratuvarımıza kazandırılması olacaktır.

Sonuç olarak denilebilir ki; baculovirus-böcek hücre kültürü sistemiyle rekombinant proteinlerin elde edilmesi, kullanışlı ve önemli avantajları olan bir yöntem olduğu gibi ürünlerin tedavi, immünizasyon veya tanısal amaçlı kullanılması için de uygundur.

## ÖZET

Bu çalışmada, Hepatit B virusu pozitif hastaların serumundan PCR metodu kullanılarak HBsAg gen bölgesi amplifiye edilmiş, bu ampliconlar önce E.coli klonlama vektörüne aktarılmış daha sonra bu vektörden alınan gen bölgesi baculovirus'lar için transfeksiyon vektörü olan pMelBac plazmidine klonlanmıştır. Elde edilen rekombinant vektör, böcek (*Trichoplusia ni*) hücre kültürüne (High Five Cell) transfekte edilmiştir. Daha sonra hücre kültürü içinden, rekombine olan hücreler ayrılmış ve yeterli şekilde HBsAg ürettikleri ELISA ile gösterilmiştir.

Çalışma sonucunda rekombinant DNA teknolojisinin Bilim Dalı laboratuvar pratiğine sokulması amacına da ulaşılmıştır.

İlave olarak baculovirus-böcek hücre kültür sistemi ile rekombinant proteinlerin elde edilmesinin diğer yöntemlere göre önemli avantajlar sağladığı da gösterilmiştir.

## **SUMMARY**

### **EXPRESSION OF HEPATITIS B VIRUS SURFACE ANTIGEN IN INSECT CELLS (TRICHOPLUSIA NI) WITH A BACULOVIRUS SYSTEM**

In this study, by using PCR method HBsAg gene was amplified from hepatitis B virus positive patients serum. These amplicons first transferred to E.coli cloning vector and then the gene taken from this vector was cloned to pMelBac transfection vector for baculovirus. *Trichoplusia ni*. The recombinant vector that was obtained, transfected to insect (*Trichoplusia ni*) cell culture (High Five cell). The recombinant cells were purified from cell culture and it was seen by ELISA that they produce HBsAg sufficiently.

By completing this thesis study, it was achieved that the application of recombinant DNA techniques has been a routine procedure in daily practice of our laboratory.

In addition, it was shown that obtaining the recombinant proteins by using Baculovirus-insect cell culture system has some advantages when compared with other procedures.

## KAYNAKLAR

1. Attanasio R, Lanford RE, Dilley D, Stunz GW, Notvall L, Henderson AB, Kennedy RC. Immunogenicity of Hepatitis B Surface Antigen Derived From The Baculovirus Expression Vector System : a mouse potency study. *Biologicals*. 19:347-353. 1991.
2. Bitter GA, Egan KM, Burnette WN, Samai B, Fieschko JC, Peterson DL, Downing MR, Wypych J, Langley KE. Hepatitis B Vaccine Produced in Yeast. *J Med Virol*. 25:123-140. 1988 .
3. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M. Lipofection: A Highly Efficient Lipid Mediated DNA Transfection Procedure. *Proc Natl Acad*. 84:7413-7417. 1987.
4. Fujiyama A, Miyanohara A, Nozaki C, Yoneyama T, Ohtomo N, Matsubara K. Cloning and Structural Analysis of Hepatitis B Virus DNAs. *Subtype Adr. Nuc Acid Res*. 11:4601-4609. 1983
5. Ganem D. Hepadnaviridae and Their Replication. *Fields Virology*. (Eds) Fields BN, Knipe DM, Howley PM. Third edition. Volume 2. New York, Lippincott-Raven 1996, 2703-2715.
6. Gerber MA, Thung S. The Pre-S Region of Hepatitis B Virus. More Question than Answers. *Hepatology*, 9:328-330. 1989.
7. Glick BR, Pasternak JJ. *Molecular Biotechnology Principles and Applications of Recombinant DNA*. ASM press, Washington DC, 1994, 100-150.
8. Gooijer CD, Lier FLJ, End EJ, Vlak JM, Tramper J. A Model of Baculovirus Production With Continuous insect Cell Cultures. *Appl Microbiol Biotech*. 30:497-501. 1989.
9. Goswami BB, Glazer RI. A Simplified Method For The Production of Recombinant Baculovirus. *Biotechniques*. 10:626-630. 1991.
10. Hammond GW, Parker J, Mimms L, Tate R, Sekla L, Minuk G. Comparison of Immunogenicity of Two Yeast-Derived Recombinant Hepatitis B Vaccines. *Vaccine*. 9:97-100. 1991.

11. Heerman KH, Goldman U, Schwartz W, Seyffarth T, Baumgarten H, Gerlich WH. Large Surface Proteins of Hepatitis B Virus Containing The Pre-S Sequence. *J Virol.* 52:396-402.1984.
12. Hsieh P, Robbins PW. Regulations of Asparagine-Linked Oligosaccharide Processing.*J.Biol.Chem.*259:2375-82.1984.
13. Hu S, Kowoski SG, Schaaf KF. Expression of Envelope Glycoprotein of Human Immunodeficiency Virus By An Insect Virus Vector. *J. Virol.* 61:3617-20.1987.
14. Hutchison WD, Hoch H, Bolin P, Hines R. Cabbage looper. University of Minnesota. [www.mes.umn.edu](http://www.mes.umn.edu). 1998.
15. Imamura T, Araki M, Miyanochara A, Nakao J, Yonemura H, Ohtomo N, Matsubara K. Expression of Hepatitis B Virus Middle and Large Surface Antigen Genes in *Saccharomyces Cerevisiae*. *J Virol.* 61:3543-3549. 1987.
16. Jarvis DL, Fleming JGW, Kovacs GR, Summers MD, Guarino LA. Use of Early Baculovirus Promoters For Continuous Expression and Efficient Processing of Foreign Gene Products in Stably Transformed Lepidopteran Cells. *Bio/Technology.* 8:950-955. 1990.
17. Kniskern PJ, Hagopian A, Montgomery DL, Burke P, Dunn NR, Hofmann KJ, Miller WJ, Ellis RW. Unusually High-Level Expression of A Foreign Gene (Hepatitis B Virus Core Antigen in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Gene.* 46:135-141. 1986.
18. Korec E, Korcova J, Palkova Z, Vondrejs V, Korinek V, Reinis M, Bichko VV, Hlozaneck I. Expression of Hepatitis B Virus Large Envelope Protein in *Escherichia Coli* and *Saccharomyces Cerevisiae*. *Folia Bio (Praha).* 35:315-327. 1989.
19. Kuroda S, Itoh Y, Miyazaki T, Imai So, Fujisawa Y, Efficient Expression of Genetically Engineered Hepatitis B Virus Surface Antigen P31 Proteins in Yeast. *Gene.* 78:297-308. 1989.
20. Lanford RE, Luckow V, Kennedy RC, Dreesman GR, Notwall L, Summers MD. Expression and Characterization of Hepatitis B Virus Surface Antigen Polypeptides in Insect Cells With A Baculovirus Expression System. *J Virol.* 63:1549-1557. 1989.

21. Lien JM, Aldrich CE, Mason WS. Evidence That A Capped Oligoribonucleotide Is The Primer for Duck Hepatitis B Virus Plus Strand DNA Synthesis. *J Virol.* 57:229-236. 1986.
22. Lorient M, Marcellin P, Bismuth E, Martinot M, Boyer N, Degott C, Erlinger S, Benhemou JP. Demonstration of Hepatitis B Virus DNA By Polymerase Chain Reaction in The Serum and The Liver After Spontaneous or Therapeutically Induced HBeAg to Anti-Hbe Or HBsAg to Anti-Hbs Seroconversion in Patients With Chronic Hepatitis B. *Hepatology.* 15:32-36. 1991.
23. Luckow VA, Summer MD. Trends in The Development of Baculovirus Expression Vectors. *Bio/Technology.* 6:47-55.1998.
24. McLachlan A, Milich DR, Raney AK, Riggs MG, Hughes JL, Sorge J, Chisari FV. Expression of Hepatitis B Virus Surface and Core Antigens: Influences of Pre-S and Precore Sequences. *J Virol.* 61:683-692. 1987.
25. Miller LK. Baculoviruses As Gene Expression Vectors. *Ann Rev Microbiol.* 42:177-199. 1988.
26. Persing DH, Varmus HE, Ganem D. The PreS1 Protein of Hepatitis B Virus Is Acylated At Its Amino Terminus With Myristic Acid. *J Virol.* 61:1672-1677. 1987.
27. Pumpen P, Kozlovskaya TM, Borisava GP, Bichko VV, Dishler A, Kalis J, Kukaine RA, Gren EJ. Expression of Hepatitis B Virus Surface Antigen Gene in Escherichia Coli. *Gene.* 30:201-210. 1984.
28. Putlitz J, Kubasek WL, Duchene M, Marget M, Specht Bu, Domdey H. Antibody Production in Baculovirus-Infected Insect Cells. *Bio/Technology.* 8:651-654. 1990.
29. Roels GL, Desombere I, Tollenaere GD, Petit MA, Desmons P, Hauser P, Delem A, Grave DD, Safary A. Hepatitis B Vaccine Containing Surface Antigen and Selected Pres1 and Pres2 Sequences. Safety and Immunogenicity in Young Healthy Adults. *Vaccine.* 15:1724-1731. 1997.
30. Stibbe W, Gerlich WH. Structural Relationships Between Minor and Major Proteins of Hepatitis B Surface Antigen. *J Virol.* 46:626-628. 1983.

31. Takehara K, Ireland D, Bishop DH. Co-Expression of Hepatitis B Surface and Core Antigens Using Baculovirus Multiple Expression Vectors. *J Gen Virol.* 69:2763-2777. 1988.
32. Taşyaran M. *Epidemiyoloji. Viral Hepatit* 98. (Derleyen) Kılıçturgay K. Deniz ofset. 1998, 94.
33. Tiollais P, Pourcel C, Dejean A. The Hepatitis B Virus. *Nature.* 317:489-495. 1985.
34. Valenzuela P, Gray P, Quiroga M, Zaldivar J, Goodman HM, Rutter WJ. Nucleotide Sequence of The Gene Coding For The Major Protein of Hepatitis B Virus Surface Antigen . *Nature.* 280:815-819. 1979.
35. Vlak JM, Klinkenberg FA, Zaal KJM, Geervliet BF, Roosien J, Vanlent JMV. Functional Studies On The P10 Gene of Autographa Californica Nuclear Polyhedrosis Virus Using A Recombinant Expressing A P10-B-Galactosidase Fusion Gene. *J Gen Virol.* 69:765-776. 1988.
36. Werner S, Wolfram H. Variable Protein Composition of Hepatitis B Surface Antigen From Different Donors. *Virology.* 123:436-442. 1982.
37. Williams GV, Rohel DZ, Kuzio J, Faulkner P. A Cytopathological Investigation of Autographa Californica Nuclear Polyhedrosis Virus P10 Gene Function Using Insertion/Deletion Mutants. *J Gen Virol.* 70:187-202. 1988.
38. Wong DT, Nath N, Sninsky JJ. Identification of Hepatitis B Virus Polypeptides Encoded By The Entire Pre-S Open Reading Frame. *J Virol.* 55:223-231. 1985.
39. WWW.oznet.ksu.edu. Cabbage Looper. Research and Extension. 1998.