

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI
2022-DR-015

AŞI ADAYI NOROVİRÜS ANTİJENLERİNİN KLONLANMASI VE
İMMÜNOJENİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

DEMET YALÇIN BİNGÜL

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Gazme BAŞBÜLBÜL

AYDIN-2022

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

**AŞI ADAYI NOROVİRÜS ANTİJENLERİNİN KLONLANMASI
VE İMMÜNOJENİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DEMET YALÇIN BİNGÜL
DOKTORA TEZİ

Danışman
Prof. Dr. Gamze BAŞBÜLBÜL

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından FEF-21016 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2022

KABUL VE ONAY

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Demet YALÇIN BİNGÜL tarafından hazırlanan “AŞI ADAYI NOROVİRÜS ANTİJENLERİNİN KLONLANMASI VE İMMÜNOJENİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 29/08/2022

	Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan :	Prof. Dr. Gamze BAŞBÜLBÜL	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	
Üye :	Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	
Üye :	Prof. Dr. Hacı Halil BIYIK	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	
Üye :	Prof. Dr. Hatice GÜNEŞ	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	
Üye :	Prof. Dr. Reşat ÜNAL	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Fen Bilimleri Enstitüsünün tarih ve sayılı oturumunda alınan numaralı Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Gönül AYDIN
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bilgisiyle, tecrübesiyle, verdiği güvenle bir danışmandan fazlası olan ve desteğini her daim hissettiğim değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Gamze BAŞBÜLBÜL' e,

Önerileriyle bana yol gösteren ve laboratuvar olanaklarından sonuna kadar faydalanmamı sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN' a,

Tezime olan katkılarından dolayı sevgili hocam Prof. Dr. Hacı Halil BIYIK' a,

Hiçbir sorumu yanıtızsız bırakmayan, deney hayvanları konusunda tecrübesiyle bana yol gösteren ve yardımlarını esirgemeyen sevgili hocam Prof. Dr. İlknur DABANOĞLU' na,

Deney hayvanları aşamasındaki yardımları için sevgili Öğr. Gör. Asude Gülçe ORYAŞIN' a

Desteği sayesinde doktora tezime yeniden başlamama vesile olan sevgili arkadaşım Dr. Öğr. Üyesi Esra ÖRENLİLİ YAYLAGÜL' e,

REDPROM Laboratuvarını paylaştığım tüm arkadaşlarıma özellikle desteğini hissettiğim sevgili arkadaşım Melis YALÇIN' a,

Çalışkanlığıyla bana her zaman örnek olan sevgili aileme, buralara gelmemde yol gösterici olan ablam Dilek YALÇIN' a ve kardeşim Ahmet YALÇIN' a,

Doktora sürecimi kolaylaştıran ve anlayışlı davranan sevgili eşim Niyazi BİNGÜL ve oğlum Toprak BİNGÜL' e,

FEF-21016 numaralı 'Aşı Adayı Norovirüs Antijenlerinin Klonlanması ve İmmünojenitelerinin Araştırılması' adlı proje kapsamında yapmış olduğum tezi desteklemelerinden dolayı Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeler Birimi'ne,

Teşekkür ederim.

Demet YALÇIN BİNGÜL

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
RESİMLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xiv
1 . GİRİŞ.....	1
1.1 . İnsan Norovirüslerinin (HuNoV) Sınıflandırılması ve Yapısı.....	3
1.2 . HuNoV Yapısal Proteinlerinin Fonksiyonları	5
1.2.1 . VP1	5
1.2.2 . VP2.....	9
1.3 . HuNoV' un Yapısal Olmayan Proteinlerinin İşlevleri	9
1.3.1 . p48 ya da N-terminal Protein.....	9
1.3.2 . NTPaz.....	10
1.3.3 . p22	11
1.3.4 . VPg.....	11
1.3.5 . Proteaz.....	12
1.3.6 . Polimeraz.....	12
1.4 . HuNov' a Konağın Duyarlılığı	12
1.5 . HuNoV Replikasyonu	13

1.6 . HuNoV' a Karşı İmmün Cevap	17
1.7 . Rekombinant DNA Teknolojisi	20
1.8 . Rekombinant Proteinlerin Saflaştırılması	21
1.9 . ELISA.....	24
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	25
3 . MATERYAL VE YÖNTEM.....	29
3.1. Materyal.....	29
3.1.1 . Kimyasallar	29
3.1.2 . Klonlama Vektörleri ve Kompetan Hücre	29
3.1.3 . Besiyerleri.....	30
3.1.4 . Çözeltiler ve Ayıraçlar.....	31
3.2. Yöntem	39
3.2.1 . Norovirüs Antijenik Bölgelerin Temini	39
3.2.2 . Norovirüs Antijenlerinin Klonlanması	49
3.2.2.1 . pEX-A258 ve pEX-A128 Plazmidlerinin İzolasyonu.....	49
3.2.2.2 . pEX-A258 ve pEX-A128 Plazmidlerinin Restriksiyonu.....	50
3.2.2.3 . Hedeflenen Gen Bölgelerinin PCR ile Çoğaltılması.....	50
3.2.2.4 . Ekspresyon Vektörü pET30-a' nın İzolasyonu.....	52
3.2.2.5 . pET30-a Plazmidi ve Klonlanacak Genleri İçeren Amplikonların Restriksiyonu	52
3.2.2.6 . Saflaştırılan Restriksiyon Ürünlerinin Ligasyonu	53
3.2.2.7 . Ligandın <i>E. coli</i> BL21 Suşuna Transformasyonu.....	53
3.2.2.8 . Seçilen Kolonilerin PCR ile doğrulanması	54
3.2.2.9 . Sekans Analizi.....	54
3.2.3 . Rekombinant Proteinlerin Üretimi ve Saflaştırılması.....	54

3.2.3.1 . Rekombinant Protein Üretimi	55
3.2.3.2 . Protein Tayini	56
3.2.3.3 . SDS-PAGE Yöntemi ile Proteinlerin Elektroforezi	57
3.2.3.4 . Immobilize Metal Afinite Kromatografi Kolonu ile Saflaştırma	58
3.2.3.5 . Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz.....	58
3.2.4 . Rekombinant Proteinlerin Deney Hayvanlarına Uygulanması	59
3.2.5 . Antikor Düzeyinin ELISA ile Belirlenmesi.....	59
4 . BULGULAR	61
4.1 . VP1, VP2, p22 ve EP123 Genlerinin Klonlanması.....	61
4.1.1.pEX-A258+VP1, pEX-A128+VP2 ve pEX-A128+p22 Plazmidlerinin Restriksiyonları	61
4.1.2 . Rekombinant Plazmidlerdeki İnsertlerin PCR ile Doğrulanması	62
4.1.3 . Transformasyon Sonucu Oluşan Rekombinant Koloniler	63
4.1.4 . Koloni PCR Sonuçları	65
4.2 . VP1, VP2, p22 ve EP123 Dizilerinin Sekans Analiz Sonuçları.....	67
4.3 . VP1, VP2, p22 ve EP123 Proteinlerinin Saflaştırılması	69
4.3.1 . VP1 Rekombinant Proteinlerin Saflaştırma Sonuçları	69
4.3.2 . VP2 Rekombinant Proteinlerin Saflaştırma Sonuçları	71
4.3.3 . p22 Rekombinant Proteinlerin Saflaştırma Sonuçları	71
4.3.4 . EP123 Rekombinant Proteinlerin Saflaştırma Sonuçları	72
4.4 . VP1, VP2, p22 ve EP123 Rekombinant Proteinlerinin İmmünojenite Düzeyleri	74
5 . TARTIŞMA	75
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	79
KAYNAKLAR.....	80
EKLER	104

Ek 1 (ADÜ-HADYEK)	104
Ek 2 (Amonyum Sülfat Prespitasyon Tablosu)	105
BİLİMSEL ETİK BEYANI	106
ÖZGEÇMİŞ.....	107

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

APS	: Amonyum Persülfat
BSA	: Sığır Serum Albumin
BV	: Bakulovirüs
dk	: Dakika
dNTP	: DeoksiNükleotid Trifosfat
EDTA	: EtilenDiamin Tetraasetik Asit
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
g	: Gram
HBGA	: Doku-Kan Grubu Antijenleri
Ig	: İmmünoglobulin
İMAK	: İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi
IPTG	: İzopropil β -D-1 Tiyogalaktopiranosid
kb	: Kilobaz
kDa	: KiloDalton
L	: Litre
mM	: Milimolar
μL	: Mikrolitre
NoV	: Norovirüs
nm	: Nanometre
NTA	: Nitriilo Triasetik Asit
$^{\circ}$C	: Santigrat
ORF	: Açık Okuma Çerçevesi
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz

PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RdRp	: RNA Bağımlı RNA Polimeraz
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
sn	: Saniye
TBE	: Tris- Borat- EDTA
TE	: Tris- EDTA
TSA	: Tripton Soya Agarı
TSB	: Tripton Soya Broth
VLP	: Virüs Benzeri Parça
VP1	: Majör Kapsid Protein
VP2	: Minör Kapsid Protein

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 HuNoV moleküler yapısı	4
Şekil 1.2 Norovirüs kapsidin üç boyutlu yapısı	6
Şekil 1.3 VP1 (GI.1)' in yapısı.....	6
Şekil 1.4 Norovirüsün immün elektron mikroskop görüntüsü	7
Şekil 1.5 HuNoV replikasyon döngüsü ve proteinlerinin işlevi.....	16
Şekil 1.6 İmmobilize metal iyon şelatör ligandlarından üç tipinin yapısı.....	22
Şekil 3.1 VP1' e ait olası epitop bölgeleri ve dizileri.....	45
Şekil 3.2 VP2' ye ait olası epitop bölgeleri ve dizileri.....	45
Şekil 3.3 p22' ye ait olası epitop bölgeleri ve dizileri.....	46
Şekil 3.4 Epitoplardan oluşan polipeptid (EP123) yapısı	46
Şekil 3.5 Standart vektör içine yerleştirilen VP1, VP2, p22 ve EP123' e ait sentetik DNA' lar	49
Şekil 3.6 Protein standart grafiği	56
Şekil 4.1 VP1, VP2, p22 ve EP123' ün İmmünojenitelerinin Değerlendirilmesi	74

RESİMLER DİZİNİ

Resim 4.1 Restriksiyon sonrası VP1, VP2 ve p22' ye ait agaroz jel görüntüleri	61
Resim 4.2 EP123 amplikonlarının jel ekstraksiyonuyla pürifiye edilmesi	62
Resim 4.3 Gen fragmanlarının (VP1, VP2, p22 ve EP123) ve ekspresyon vektörünün (pET-30a) EcoRI ve HindIII enzimleriyle kesimi.....	63
Resim 4.4 pET-30a ve pET+p22 içeren kolonilerin kanamisinli besiyerindeki görüntüleri .	63
Resim 4.5 pET-30a ve pET+VP1 içeren kolonilerin kanamisinli besiyerindeki görüntüleri	64
Resim 4.6 pET-30a ve pET+VP2 içeren kolonilerin kanamisinli besiyerindeki görüntüleri	64
Resim 4.7 pET-30a ve pET+EP123 içeren kolonilerin kanamisinli besiyerindeki görüntüleri	64
Resim 4.8 VP1, VP2, p22 ve EP123 için gene özgü primerler ile yapılan koloni PCR sonuçları	65
Resim 4.9 Klonların restriksiyon analiz sonuçları	66
Resim 4.10 Rekombinant VP1 dizisine ait sekans sonucu	67
Resim 4.11 Rekombinant VP2 dizisine ait sekans sonucu	68
Resim 4.12 Rekombinant p22 dizisine ait sekans sonucu.....	68
Resim 4.13 Rekombinant EP123 dizisine ait sekans sonucu	69
Resim 4.14 İmidazol gradiyenti uygulaması ile elde edilen VP1 proteini.....	70
Resim 4.15 VP1'in 40 mM imidazollü yıkama ve 250 mM imidazollü elüsyon tamponuyla kısmi saflaştırılması.....	71
Resim 4.16 Amonyum Sülfat çöktürmesi sonucu VP2 proteinine ait jel görüntüleri	71
Resim 4.17 AIMAC uygulaması sonucu p22 rekombinant proteinin SDS jel görüntüleri.....	72

Resim 4.17B p22' nin Amonyum Sülfatla çöktürülmesi	72
Resim 4.18A IMAC uygulaması sonucu EP123 rekombinant proteinin SDS jel görüntüleri	73
Resim 4.18B EP123' ün Amonyum Sülfatla çöktürülmesi	73

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 HuNoV proteinlerinin görevleri.....	4
Çizelge 3.1 Restriksiyon kesim bölgeleri eklenmiş VP1, VP2, p22 ve EP123 primerleri.....	51
Çizelge 3.2 PCR karışımının içeriği.....	51
Çizelge 3.3 VP1, VP2, p22 ve EP123 geninin amplifikasyonundaki ısıl döngü ve süre.....	52
Çizelge 3.4 Rekombinant antijenlerin deney hayvanlarına uygulanması	59
Çizelge 4.1 Desalt işleminden önce ve sonra protein miktarları	73
Çizelge 4.2 Indirekt ELISA sonuçları	74

ÖZET

AŞI ADAYI NOROVİRÜS ANTİJENLERİNİN KLONLANMASI VE İMMÜNOJENİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Yalçın Bingül D. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Programı, Doktora Tezi, Aydın, 2022.

Amaç: Bu araştırma Norovirüs' e ait aşı adayı olabilecek antijenik proteinlerin rekombinant olarak elde edilmesi ve oluşabilecek immün yanıtın hayvan denemeleri ile araştırılması amacıyla yapılmıştır.

Materyal ve Yöntem: Nöroviruse ait VP1, VP2, p22 ve polipeptid (EP123) dizileri spesifik primerlerle PCR' da çoğaltılmıştır. Amplikonlar, pET-30a (+) ekspresyon vektörüne yerleştirildikten sonra *E. coli* BL21 suşuna transformasyonla aktarılmıştır. Rekombinant olarak üretilen proteinler, His-tag kuyruğu yardımıyla ve amonyum sülfatla kısmi olarak saflaştırıldıktan sonra immünizasyon için antijen olarak kullanılmıştır. Aşılanan farelerin serum örneklerinden Norovirüse karşı oluşan antikor cevabı indirekt ELISA yöntemiyle saptanmıştır.

Bulgular: *E. coli*' ye transformasyonla aktarılan genlerin varlığı sekans analizi ile doğrulanmıştır. His-tag kuyruğu ve amonyum sülfatla çöktürme işlemi proteinlerin kısmi olarak saflaştırılması için yeterli olmuştur. Sadece VP1 proteini yeterli düzeyde immün yanıt oluşturmuştur.

Sonuç: Bu tez kapsamında, VP1 ve VP2 proteinlerine ek olarak, önceki Nörovirüs aşı çalışmalarından farklı, ilk defa epitoplardan oluşan bir polipeptit ve Norovirüsün yapısal olmayan bir geni (p22) rekombinant olarak üretilmiş ve immünojenitesi araştırılmıştır. VP1 dışındaki rekombinant proteinlerde yeterli immünojenik yanıtın oluşmamasının, kullanılan doz, bağışıklama sayısı veya adjuvan uygulaması ile ilgili olabileceği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Norovirüs, *Escherichia coli*, Rekombinant Protein Üretimi, Klonlama, İmmün yanıt

ABSTRACT

CLONING OF VACCINE CANDIDATES NOROVIRUS ANTIGENS AND INVESTIGATION OF THEIR IMMUNOGENITIES

Yalçın Bingül D.Aydın Adnan Menderes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Biology Program, Doctorate Thesis, Aydın, 2022.

Objective: This research was carried out in order to obtain recombinant antigenic proteins that can be vaccine candidates of Norovirus and to investigate the immune response that may occur with animal experiments.

Material and Methods: The VP1, VP2, p22 and polypeptide (EP123) sequences of the norovirus were amplified in PCR with specific primers. Amplicons were transformed into *E. coli* BL21 strain after insertion into the pET-30a (+) expression vector. Recombinantly produced proteins were used as antigens for immunization after partial purification with the help of His-tag tail and ammonium sulfate. Antibody response to Norovirus from serum samples of vaccinated mice was determined by indirect ELISA method.

Results: The presence of genes transferred by transformation into *E. coli* was confirmed by sequence analysis. His-tag tail and precipitation with ammonium sulfate were sufficient for partial purification of the proteins. Only the VP1 protein elicited an adequate immune response.

Conclusion: In this thesis, in addition to VP1 and VP2 proteins, a polypeptide consisting of epitopes different from previous Norovirus vaccine studies, and a non-structural gene (p22) of Norovirus were produced recombinantly and its immunogenicity was investigated. It was thought that the lack of adequate immunogenic response in recombinant proteins other than VP1 may be related to the dose used, the number of immunizations or the adjuvant administration.

Key Words: Norovirus, *Escherichia coli*, Recombinant Protein Production, Cloning, Immune response

1. GİRİŞ

Norovirüsün prototipi olan Norwalk virüsü ilk olarak 1968’ de Norwalk (ABD) şehrindeki bir ilkokulda akut gastroenterit salgınından sorumlu ajan olarak tanımlanmıştır (Kapikian, 2000). Norovirüsler (NoV) gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde gastroenteritlerin başlıca sebebi olarak kabul edilmektedirler (Glass vd. 2009, Hall vd. 2013). Hastalığın salgınlar halinde yayılması özellikle yolcu gemileri, hastane, bakımevi ve okul gibi kapalı alanlarda sık rastlanan bir durumdur. Bunun nedeni norovirüsün kişiden kişiye çok kolay bulaşması ve virüsün kontamine olmuş yerlerde birkaç güne kadar hayatta kalabilmesidir. Norovirüs enfekte kişi ile veya virüsle kontamine olmuş yüzeylere, nesnelere temas edildiğinde ya da kontamine olmuş yiyecekler ve su tüketildiğinde bulaşabilir (Fankhauser vd. 2002, Lopman vd. 2003). Ayrıca iyileşme döneminde de atılmaya devam etmektedir. Koruyucu bağışıklığı kısa ömürlüdür. Tüm yaş grupları, özellikle bebekler, yaşlılar ve bağışıklığı baskılanmış hastalar insan norovirüslerine (HuNoV) karşı hassastır. Küresel olarak, HuNoV her yıl tahmini 699 milyon hastalık vakasına ve 219.000 ölüme neden olmakta ve bu da 4 milyar doların üzerinde doğrudan tıbbi maliyet ve 60 milyar doların üzerinde dolaylı tıbbi maliyetle sonuçlanmaktadır (Halowell vd. 2019, Zhang vd. 2021).

Norovirüsler, organizmaya sindirim sistemi yoluyla girerler. Zarfsız olmaları nedeniyle mide asiditesine oldukça dirençlidirler. Bağırsak epitelinin yaklaşık %1’ ini oluşturan duyuşal ve endokrin fonksiyonları olan enteroendokrin hücreler aktif norovirüs replikasyonu ile ilişkili bir epitel hücre tipi olarak tanımlanmıştır. Bu keşif, semptomların genellikle şiddetli kusma ve ishal ile akut bir başlangıç yaptığı insan norovirüsünün patogenezi hakkında fikir verebilir (Green vd. 2020). Bağırsak epitel bariyerini geçmek için M hücrelerini kullanan Norovirüsler jejenum mukozasında replike olurlar ve enterositlerdeki karbonhidrat reseptörlerine bağlanırlar. Karbonhidrat reseptörleri genetik olarak tayin edilen ve kişiye özgü yapıda olduğundan, kişilerin Norovirüse duyarlılıkları farklıdır. Örneğin, Norovirüs enfeksiyonlarına; kan grubu O olanlar daha az, B grubu olanlar daha fazla duyarlıdır (Karst ve Tibbetts, 2016).

Norovirüsler, RNA’ ya bağımlı RNA polimerazın (RdRp-NS7) yüksek oranda korunmuş bölgelerinin veya VP1 kapsid proteininin korunmuş aminoasit bölgelerinin benzerliğine göre

sınıflandırılır (Cannon vd. 2009). Buna göre, Norovirusler 10 farklı genogruba (GI–GX) ayrılmışlardır. Sadece GI, GII ve GIV insanlarda hastalık oluşturur ve akut gastroenterit nedenidir (Chhabra vd. 2019). HuNoV genogruları ise, seçim baskısı veya mutasyonlara dayalı olarak kendi aralarında farklı genotiplere bölünmüştür (Vinje vd. 1997, Cannon vd. 2009). Bu mutasyonlar, aynı genotipin farklı varyantlarını veya suşlarını üretir. Örneğin, GII.4 genotipi içinde, Sydney ve New Orleans dünya çapında en yaygın varyantlardır (Tamminen vd. 2019). Bu varyantlar rekombinasyonla pandemik GII.P16 – GII.4 Sydney suşu dahil olmak üzere yeni suşların ortaya çıkmasına neden olur (Lindesmith vd. 2017).

HuNoV enfeksiyonlarını önlemek için ticari aşular veya spesifik antiviraller mevcut değildir. Klinik öncesi çalışmalar yapmak için hastalığı taklit eden küçük hayvan modellerinin bulunmaması, bu virüslere karşı aşuların veya önleyici tedavilerin geliştirilmesini daha da zorlaştırmaktadır. Son zamanlarda, farklı HuNoV suşlarının, özellikle GII.4 – Sydney HuNoV replikatlarının insan B hücrelerinde çoğaltılması için *in-vitro* kültür modelleri geliştirilmiştir (Jones vd. 2015). Etteyabi vd. (2016) yaptıkları çalışmada, insan kök hücresi türevli enteroidlerde Norovirüs üretebildiklerini bildirmişlerdir. Zebra balığı larvalarında GI ve GII HuNoV genogruları için bir *in-vivo* replikasyon modeli de geliştirilmiştir (Van Dycke vd. 2019). Bununla birlikte, virüsün replikasyon döngüsü ve HuNoV' a karşı bağışıklık tepkisiyle ilgili sınırlı bilgi mevcuttur.

Virüs-konak etkileşiminde, tanı ve aşı geliştirme çalışmalarında rekombinant viral antijenlerin uygulanması önemli bir yaklaşım olmuştur. Virüs benzeri partiküller (VLPs) doğal virüslerin organizasyonunu ve konformasyonunu taklit eden ancak viral genomdan yoksun, potansiyel olarak daha güvenli ve daha ucuz aşı adayları sağlayan yapılardır. VLP' ler antijenik olarak viral partiküle benzerdir ve herhangi bir enfeksiyon riski olmaksızın hem enteral hem de parenteral yollarla uygulandığında spesifik bir antikor yanıtı başlatabilir (Richardson vd. 2013). NoV majör kapsid proteini (VP1) rekombinant bakulovirüs (BV) ekspresyon sistemi kullanılarak eksprese edilir ve bu, VLP' lerin başarılı bir şekilde kendi kendine bir araya gelmesini (montajını) sağlar (Jiang vd. 1992, Estes ve Kapikian, 2007). NoV için spesifik reseptörler tam olarak bilinmemektedir, fakat VLP' leri kullanan çalışmalar, konakçı mukozal hücreleri üzerinde eksprese edilen doku-kan grubu antijenlerinin (HBGA' ların) NoV' lerin bağlanma ve giriş sürecinde yer aldığını göstermiştir (Donato vd. 2012, Ward, 2009, Choi vd.

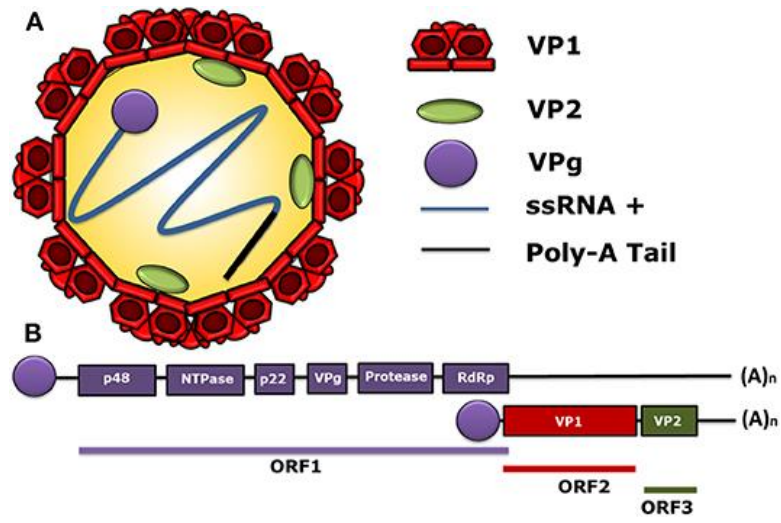
2002). Prokaryotik ekspresyon sistemleri kullanılarak üretilen VP1' in reseptör bağlayıcı domaini olan P partiküllerin VLP' lerle bir dizi yüzey özelliğini paylaştığı, bu nedenle konak/patojen etkileşiminin karakterizasyonunda VLP' ler için faydalı bir ikame olabileceği kanıtlanmıştır. VLP' ler sadece daha karmaşık ve zaman alıcı olan ökaryotik ekspresyon sistemlerinde üretilebilirken P partiküllerinin *E. coli*' de üretilmesi daha düşük maliyetlidir ve çok daha kolaydır (Tan ve Jiang, 2005, Tan vd. 2006, Tan vd. 2008). Bir simülasyon modelinde, 12 ay boyunca %50 koruyucu etkinlik sağlayan bir NoV aşısının 1,0 – 2,2 milyon NoV gastroenterit vakasını önleyebileceğini ve Amerika Birleşik Devletleri' ndeki ilişkili ekonomik yükte 2,1 milyar dolara kadar tasarruf sağlayabileceğini ileri sürmüştür (Halowell vd. 2019, Zhang vd. 2021). Bu çalışmaların bulgularına ve ekonomik değerlendirmelere dayanarak, araştırmacılar günümüzde P partikül aşılarının daha fazla çalışılması gerektiğini belirtmektedirler. Huo vd. (2018) kullandıkları soğuk şok ekspresyon sisteminin *E. coli*' de NoV VLP' leri üretmek için yeni bir yaklaşım olduğunu ve bu sistemin gelecekte düşük maliyetli NoV aşısı geliştirmek için güvenli bir araç olduğunu göstermişlerdir.

Azim vd. (2019) immünoinformatik yaklaşımları kullanarak insan norovirüsüne karşı VP1 ve VP2' nin epitoplarından oluşan bir multi- epitop yapılı aşı tasarlamışlardır. Ancak bu aşının etkinliğini deneysel olarak kanıtlamamışlardır. Başka bir çalışmada Ahmad vd. (2020) bütün proteomu tarayarak VP1, VP2 ve proteazdan oluşturdukları multi- epitop aşı adayının etkinliğini *in-silico* ortamda test etmişlerdir. Bu çalışmada geliştirilen aşı adayının, hastalığa karşı etkinliğini sağlamak için deneysel doğrulama şarttır. Bugüne kadar üzerinde az sayıda çalışma yapılmış olan p22 proteininin ve VP1, VP2 ve p22' nin epitoplarından oluşan multi-epitopun kullanılması hazırlanan tezin özgün yanını oluşturmaktadır. Özellikle multi-epitop aşı yaklaşımının laboratuvar ortamında test edilmesi oldukça önemlidir. Elde edilen veriler doğrultusunda, rekombinant olarak üretilen aşı adaylarının etkinliklerinin birbirleriyle karşılaştırılması da mümkün olmuştur.

1.1. İnsan Norovirüslerinin (HuNoV) Sınıflandırılması ve Yapısı

Norovirüsler, yaklaşık 7,5 kb uzunluğunda tek sarmallı bir RNA (ssRNA+) genomuna sahip zarfsız virüslerdir. RNA genomu 5'- ucunda bir viral proteine (VPg) kovalent olarak bağlanır ve genomun 3'- ucu poliadenile edilir. Çoğu norovirüsün genomu, dördüncü bir ORF (Open Reading Frame) içeren murin norovirüsleri hariç, üç ORF halinde düzenlenmiştir. ORF1,

altı yapısal olmayan (NS) proteinden oluşan 200 kDa moleküler ağırlığa sahip bir poliproteini kodlar. 5' ucundan başlayarak sırasıyla, yapısal olmayan proteinleri; p48, nükleozid trifosfataz (NTPaz), p22, VPg, proteaz ve RNA bağımlı RNA polimerazdır (RdRp). ORF2, kabuk (S) ve çıkıntılı (P) alanları olan ana yapısal proteini (VP1) kodlar. ORF3, virüs partikülünün içinde yer alan ve virionun konakçı hücreye girişinde rol oynadığı öne sürülen küçük bir yapısal proteini (VP2) kodlar (May vd. 2014, Thorne ve Goodfellow, 2014, Conley vd. 2019) HuNoV'un yapısal ve genomik özellikleri Şekil 1.1' de gösterilmiştir. Viral proteinlerin adlandırılması ve görevleri ise Çizelge 1.1' de yer almaktadır.



Şekil 1.1 HuNoV moleküler yapısı (Campillay-Véliz vd. 2020)

Çizelge 1.1 HuNoV proteinlerinin görevleri

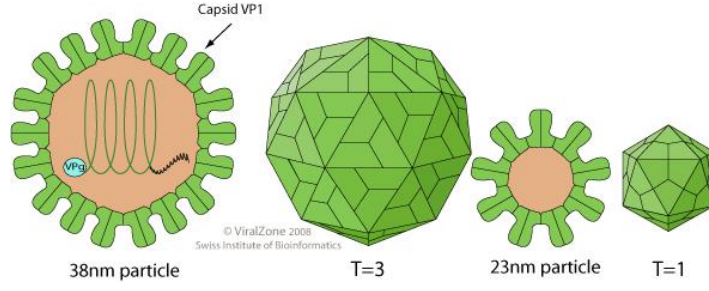
Proteinler	Adlandırma	Görevi	Referanslar
NS ^{1/2}	<ul style="list-style-type: none"> p48 N-terminal 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Viral polimerazın (RdRp) aktivitesini düzenler, ○ İmmün sistemi uyarır, ○ Hücre salgı yollarını taklit eder, 	Lateef vd. 2017, Etteyabi ve Hardly, 2003, Huang vd. 2005
NS3	<ul style="list-style-type: none"> NTPaz p41 (p40) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Helikaza benzer aktivite, ○ Nükleozit trifosfatların birleşmesi ve hidrolizi, ○ <i>In-vitro</i> RNA setezine yardımcı olur, 	Pfister ve Wimmer, 2001, Bull vd. 2005, Thorne ve Goodfellow, 2014

NS4	<ul style="list-style-type: none"> • p22 (p20) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Granüllü Endoplazmik Retikulum' dan (RER) COPII ile kaplanmış veziküller için bir dışa aktarma sinyalini taklit eder. ○ Golgi aygıtı ile veziküllerin birleşmesini engeller, ○ Golgi aygıtının demontajını sağlar, ○ Golgi aygıtına bağlı proteinlerin salgılanmasının antagonistik aktivitesi, 	Bull vd. 2005, Roth ve Karst, 2016, Sharp vd. 2010
NS5	<ul style="list-style-type: none"> • VPg • Virüs proteini, genomaya bağlı 	<ul style="list-style-type: none"> ○ eIF3 gibi başlatma faktörleriyle etkileşim halindedir, ○ Viral proteinlerin sentezini yönlendirir, 	Bull vd. 2005
NS6	<ul style="list-style-type: none"> • Proteaz • Pro • 3CLpro • NS6^{pro} 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Viral poliprotein işlenmesinden sorumludur, 	Bull vd. 2005
NS7	<ul style="list-style-type: none"> • Polimeraz • Pol • RdRp • NS7^{pol} 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Viral RNA'nın transkripsiyonundan sorumludur, 	Bull vd. 2005, Belliot vd. 2005
VP1	<ul style="list-style-type: none"> • Viral protein 1 • Viral kapsidin majör proteini 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Yapısal protein, ○ Virüsün HBGA'ya bağlanması, ○ Bağışıklıktan kaçış, 	Cortes vd. 2017, Mallory vd. 2019
VP2	<ul style="list-style-type: none"> • Viral protein 2 • Viral kapsidin minör proteini 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Yapısal protein, ○ Viral kapsidin stabilitesi, 	Vongpunsawad vd. 2013

1.2. HuNoV Yapısal Proteinlerinin Fonksiyonları

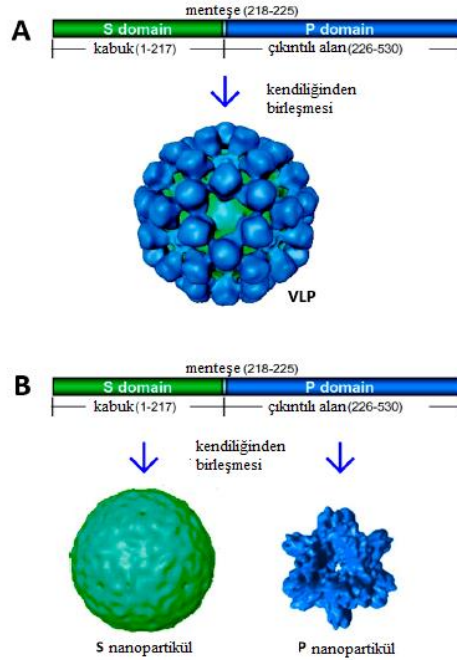
1.2.1. VP1

VP1, HuNoV' lerin majör kapsid proteinidir ve 58-60 kDa moleküler ağırlığa sahiptir (Jiang vd. 1992). Majör kapsid yaklaşık 38-40 nm çapında olup T=3 ikozahedral simetriye sahiptir ve 180 VP1 proteininden oluşur. Küçük boş viryonların çapı ise 23 nm' dir ve T=1 ikosahedral simetrik 60 VP1 proteini ihtiva eder (Prasad vd. 1994) (Şekil 1.2).



Şekil 1.2 Norovirüs kapsidin üç boyutlu yapısı (<https://viralzone.expasy.org/194>)

X- ışını kristalografisi NoV kapsidin, esnek bir menteşe ile bağlanan iki farklı alt yapıya, kabuk (S) ve çıkıntılı (P) alana sahip olduğu göstermiştir (Şekil 1.3). NoV VP1' in N- terminal ucundan 225. aminoasite kadar olan S alanı, virüsün ikozahedral kabuğu ile uyumludur ve farklı HuNoV virüsleri arasında korunan bir “Pro- Pro- Gly” sekansına sahiptir (Prasad vd. 1999). Bu alan, düzgün bir VLP katmanının geliştirilmesi ile ilişkilendirilmiştir. P alanı ekspresyonundan yoksun NoV VLP' ler, 30 nm' den biraz daha küçük bir çapa sahiptir; bu da S alanının HuNoV kapsid düzenine başlatmak için gerekli bileşenlere sahip olduğunu gösterir (Bertolotti- Ciarlet vd. 2002). Ayrıca S, aynı genogrubun genotipleri arasında korunan bir alan olduğu için norovirüs genogruplarının tanımlanmasında kullanılır (Prasad vd. 1999).

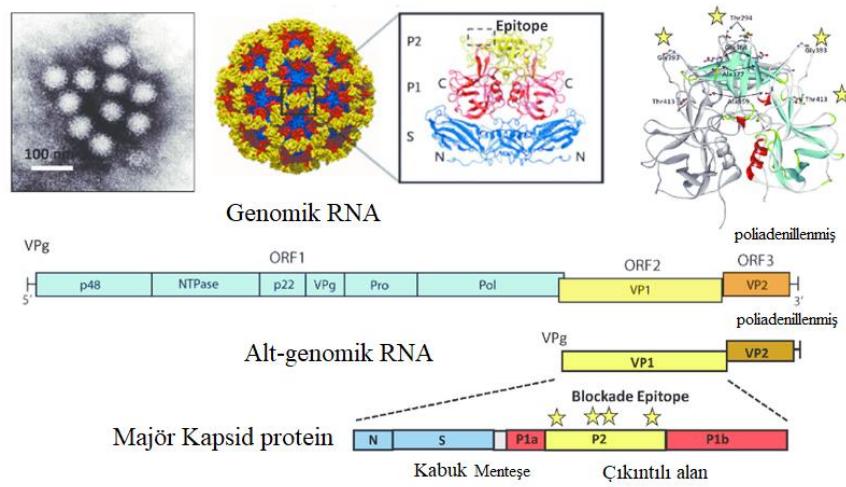


Şekil 1.3 VP1 (GI.1)' in yapısı. (A) Bir ökaryotik ekspresyon sistemi aracılığıyla tam uzunlukta norovirüs VP1' lerin üretimi, VLP' ler halinde kendi kendine birleşir. (B) *E. coli*

ekspresyon sistemi aracılığıyla S veya P domainin üretimi, S veya P nanopartiküller halinde kendi kendine birleşir (Tan ve Jiang, 2019).

NoV VP1' in P alanı, kapsidin kabuğundan çıkıntı yapan alandır. P alanı, dimerik VP1 alt birimleri arasında moleküller arası temaslar kurduğu için HuNoV kapsid boyutunun ve stabilitesinin kontrolüne katkıda bulunur (Bertolotti- Ciarlet vd. 2002). Ayrıca, P alanlarının VLP' ler oluşturmadığı da gözlenmiştir. P alanı, doğal viral kapsid ile aynı modelleri kullanarak doku-kan grubu antijenlerine (HBGA) bağlanabilir (Tan vd. 2004). Bu alan ayrıca P1 ve P2 olmak üzere iki alt alana bölünmüştür (Prasad vd. 1999).

P1 alt alanı, P alanının 226- 278 ve 406- 520 residülerinden oluşur. P2 alt alanı, P1 alanına eklenen 127 aminoasit uzunluğundaki (278- 406) residülerden oluşur (Prasad vd. 1999). P alanının en değişken bölgesi, S alanından kapsidin dışına uzanan ve VP1' in orta kısmında yer alan P2 alt alanıdır (Allen vd. 2008, Vongpunsawad vd. 2013). HuNoV VP1 ile ilgili bir çalışmanın sonuçları, P2 bölgesinde yer alan iki bölgedeki aminoasit değişikliğinin salgınlarla ilişkili varyantların oluşumunda rol oynadığını göstermiştir. VP1, S ve P alanlarına yönelik antikorlar için hedef proteindir. P2 alt alanı oldukça değişkendir, majör nötralizasyon epitoplarını barındırır (Şekil 1.4) ve HBGA' lar ile etkileşime girer (Lindesmith vd. 2008, Lindesmith vd. 2012).



Şekil 1.4 Norovirüsün immün elektron mikroskop görüntüsü, epitop bölgeleri ve genomik RNA'nın düzenlenişi (Glass vd. 2009). (Doku-kan grubu antijenlerinin

karbonhidratları ile etkileşime giren VP1' in epitop bölgesi, noktalı kareler olarak gösterilmiştir; Norovirüs Sydney suşu ve epitop bölgelerinin üç boyutlu yapısı yıldızlar ile gösterilmiştir).

NoV VP1, bakulovirüs sistemi kullanılarak böcek hücrelerinde eksprese edildiğinde virüs kapsidinin doğal yapısı ile benzer boyut ve görünümde VLP' ler oluşturarak kendi kendine birleşebilir (Jiang vd. 1992). Ayrıca, insan ve hayvan hücre hatlarında VLP bağlanma deneylerinde, NoV VLP' lerin hücre membranlarına bağlandığı gözlenmiştir. Bunun yanı sıra, bir monoklonal antikor olan NV8812' nin, NoV VLP' lerin bu hücrelere bağlanmasını bloke ettiği gözlenmiştir. Aynı antikor, NoV VP1' in 300- 384. aminoasitleri arasındaki C- terminal bölgesine spesifik olarak bağlanmış ve bu bölgenin VLP-hücre bağlanmasında rol oynayabileceğini düşündürmüştür (White vd. 1996).

VP1 proteininin aminoasit dizisi, HuNoV' leri genetik olarak şu şekilde gruplamak için kullanılır:

- < %14.3 farklılık var ise suşlar aynıdır,
- %14,3- %43,8 arasında farklılık var ise suşlar aynı genotipte,
- %45- %61,4 arasındaki farklılık var ise suşlar aynı genogrupta sınıflandırılır (Zheng vd. 2006).

GII.4 genotipi, antijenisitesindeki ve ligand bağlanma modellerindeki değişiklikler nedeniyle her 2- 5 yılda bir ortaya çıkan yeni varyantlarıyla hem dünyadaki en yaygın hem de en büyük değişkenliğe sahip olan HuNoV' dur (Shanker vd. 2011). Gerçekte, viral antijenisitedeki bu değişiklikler oluştuğunda sürü bağışıklığından kaçış teşvik edilir ve bu da popülasyonda yeni HuNoV salgınlarına neden olur (Donaldson vd. 2010).

VP1, HuNoV' lerin konak ile hücre arasındaki etkileşiminde temel bir rol oynadığı ve bu virüslerin sınıflandırılması için gerekli olan, kapsidin yapısal bir proteindir.

1.2.2. VP2

Viral protein 2 (VP2), viral kapsidin içinde yer alır ve 29 kDa moleküler ağırlığına sahiptir. VP2, VP1'e göre daha az çalışılmış HuNoV proteinlerinden biridir. VP2' nin özellikle VP1' in kabuk (S) alanı ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Bazı çalışmalar, VP2' nin VLP' lerin oluşumu için gerekli olmadığını bildirmiştir (Bertolotti- Ciarlet vd. 2002). Diğer çalışmalar ise bu proteinin VLP' lerin oluşumunu stabilize ettiğini ve koordine ettiğini ileri sürmüştür (Vongpunsawad vd. 2013, Lin vd. 2014). *İn-vitro* çalışmalar, memeli hücrelerinde NoV VP1 ekspresyonunun VP2 varlığında arttığını göstermiştir. Ayrıca birlikte eksprese olmaları NoV VP1' in yarı ömrünü iki kat arttırmıştır. Bu etki, yapısal olmayan proteinlerinin varlığından bağımsız olarak gerçekleşir (Fernandez-Vega vd. 2004). HuNoV ORF3' te tahmin edilen bir spesifik nükleer lokalizasyon sinyali rapor edilmiştir, bu da VP2' nin bu protein kompleksini çekirdeğe yönlendiren bir VP1 yardımcı proteini olarak da hizmet edebileceğini düşündürmüştür. Başka bir *in-vitro* çalışma, VP2' nin HuNoV RdRp' nin aktivitesini negatif olarak düzenlediğini göstermiş ve bu yapısal proteinin HuNoV replikasyonunda bir rolü olduğunu ortaya koymuştur. RdRp düzenleme aktivitesi VP1, p48 ve VP2 proteinleri tarafından paylaşılan bir özelliktir (Subba-Reddy vd. 2011). HuNoV VP2 ve Murin Norovirüs (MNV) VP2 proteini ile yapılan çalışmalara dayalı olarak VP2' nin konağın bağışıklık tepkisini modüle etmek gibi bir role sahip olabileceği söylenebilir. Ancak bu olasılık HuNoV için henüz kanıtlanmamıştır (Roth ve Karst, 2016). Bu nedenle, VP2, HuNoV' un replikasyon döngüsünde ve patogenezinde birçok farklı fonksiyona sahip olabilen çok yönlü bir yapısal protein gibi görünmektedir.

1.3. HuNoV' un Yapısal Olmayan Proteinlerinin İşlevleri

1.3.1. P48 ya da N-terminal Proteini

N- terminal olarak da bilinen p48 proteini, poliproteinin N- terminal ucunda bulunan Norovirus cinsinin karakteristik bir proteindir. Viral proteaz tarafından işlendiğinde, olgunlaşmamış NS1- 2 proteini oluşur. GI.1' de bu protein 398 aminoasitten oluşur (Fernandez-Vega vd. 2004, Hardly vd. 2002) ve 37 kDa moleküler ağırlığa sahiptir (Liu vd. 1996). GII p48' in uzunluğu GI.1' inkiyle aynıdır ancak ağırlığı 45- 48 kDa arasında değişir (Belliot vd. 2003). NoV p48 proteinini taşıyan plazmid ile transfekte edilmiş HeLa hücre hattının konfokal

mikroskop analizi, bu proteinin trans-Golgi ađ protein markörleri ile birlikte lokalize olabildiğini ve bu hüresel organelin ayrı agregatlar içinde ayrılmasını indüklediğini ortaya koymuştur (Fernandez- Vega vd. 2004). Bunun yanı sıra, p48' in maymun böbrek (COS-7) hücre hattında bir füzyon proteini olarak ekspresyonu, bu proteinin, trans-Golgi ağında ve endoplazmik retikulum (ER) zarlarında bulunan vezikülle ilişkili zar proteinleri (VAP-A) ile bağlantılı protein A' ya bağlandığını ortaya çıkarmıştır. p48 proteini, ER' nin vezikül membranlarında, trans-Golgi ağı ve endozomlarda lokalizedir. p48' in VAP-A ile etkileşiminin, replikasyon komplekslerinin montajı için bir iskele görevi görebileceğini düşündürmektedir (Ettayebi ve Hardly, 2003, Fernandez-Vega vd. 2004). Murin monositlerinde eksprese edilen HuNoV p48 proteininin transkriptomik analizi, bunun birçok hücre içi yola müdahale edebileceğini ortaya çıkarmıştır. Ayrıca, HuNoV p48' in apoptoza, Toll benzeri reseptörler (TLR) gibi sinyal yollarına, kemokin ve sitokin üretimine müdahale ettiği gösterilmiştir (Lateef vd. 2017). p48 proteini, hüresel sinyal yollarının normal fonksiyonunun yanı sıra viral enfeksiyon tarafından indüklenen bağışıklık tepkisinin aktivasyonunu engelleyerek HuNoV replikasyon döngüsünde önemli bir rol oynayabilir.

1.3.2. NTPaz

NS3 olarak da adlandırılan NTPaz proteini, poliproteinin 331-696 aminoasitleri (aa) arasındadır. Viral proteaz tarafından işlenir ve olgun hali 366 aa uzunluğa ve 40 kDa moleküler ağırlığa sahiptir (Belliot vd. 2003). NoV NTPaz, viral replikasyonda önemli bir rol oynayan temel enzimatik aktivitelere sahiptir. Bunlar; (a) RNA sarmallarının açılması için NTP' ye bağlı helikaz aktivitesi, (b) RNA yapısının yeniden şekillenmesi ve RNA zincirlerinin bağlanmasını kolaylaştırmak için NTP' den bağımsız şaperon aktivitesi, (c) NS7 tarafından gerçekteşirilen RNA sentezine yardımcı olmaktır (Li vd. 2018). Yen vd. (2018) tarafından GII.4 NTPaz proteininin hücre sitoplazmasında veziküler ve veziküler olmayan yapılar oluşturabileceği belirlenmiştir. Veziküler olmayan NTPaz formu, ER' de veya mitokondrinin zarında bulunabilir. Öte yandan, mitokondriyal lokalizasyon için, (N-terminal NTPaz bölgesi tamamen çıkarıldığında bile) GII' nin NTPaz C- terminal bölgesi önemli bir rol oynar. Ancak bu aktivite GI virüslerinde (NoV) gözlenmez; bu nedenle, NTPaz mitokondriyal konumu HuNoV genogrupları arasında farklılık gösterir (Yen vd. 2018). Ayrıca HuNoV GII.4 NTPaz' ın hüresel salgı yolunda farklı hücre zarı kompartımanlarında yer aldığı ve hücre içi lipidlerin depolanması ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Doerflinger vd. 2017). p48 ve p22 proteinlerin

NTPaz ile birlikte ekspresyonu, HuNoV NTPaz (Yen vd. 2018) tarafından indüklenen apoptotik aktiviteyi artırır. Böylece, HuNoV NTPaz proteini, virüsün replikasyonu ve patogenezinde önemli bir rol oynayabilir.

1.3.3 P22

p20 (NS4) olarak da adlandırılan p22, viral proteaz tarafından poliproteinden kesildiğinde, genogruba bağlı olarak 20- 22 kDa' lık olgun protein ile sonuçlanır (Belliot vd. 2003, Sharp vd. 2010). NoV p22, ER' den göç eden COPII (Coat Protein Complex II) ile kaplanmış veziküller için bir dışa aktarma sinyalini taklit eder. Bu kaplanmış veziküllerin trans-Golgi ağı ile birleşmesini önleyen bir YX Φ ESDG motifi taşıdığı bulunmuştur. Böylece p22, protein salgılanmasına ve translasyon sonrası modifikasyon yollarına müdahale eder. Ayrıca bu motif GI ve GII genogrularının farklı genotipleri arasında yüksek oranda korunmaktadır (Sharp vd. 2010). Veziküler ve tübüler membranların farklı bir şekilde yeniden düzenlenmeleri, RNA(+) virüslerinde viral replikatif komplekslerin gelişiminde kritik bir rol oynar. İnsan karaciğer (Huh7) hücre hattının kullanıldığı *in-vitro* bir çalışmada, bireysel olarak ifade edildiğinde GII p22' nin, p48 ve NTPaz ile birlikte hücre içinde membran değişikliklerine katkıda bulunarak tek membranlı ve çift membranlı veziküller oluşturabileceği gösterilmiştir (Doerflinger vd. 2017).

HuNoV p22' nin, trans-Golgi ağının ayrılmasını indüklediği bilinmekle birlikte tam etki mekanizması açıklığa kavuşturulmamıştır (Sharp vd. 2010). Ayrıca, p22' nin golgiye bağlı protein salgılanmasında antagonist olarak çalıştığı, viral enfeksiyondan sonra interferon ve diğer sitokin sinyal yollarını değiştirerek bağışıklık tepkisinin bir antagonisti olarak görev yaptığı da bilinmektedir (Sharp vd. 2010, Roth ve Karst, 2016). Böylece, HuNoV p22 proteini, konakçı hücrenin normal fonksiyonlarını ve bağışıklık tepkisinin aktivasyonunu bozarak bu virüslerin patogenezinde ve replikasyonunda çok önemli bir rol oynayabilir.

1.3.4. VPg

HuNoV VPg (NS5), viral RNA genomunun 5' ucuna kovalent olarak bağlanan yapısal olmayan proteinidir. HuNoV proteaz tarafından bölünen olgun VPg proteini, 132 aminoasitten

oluşur ve 15.8 kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahiptir (Belliot vd. 2003). NV VPg ile “çekirdek stres granül bileşeni” (G3BP1) arasındaki etkileşimin viral protein sentezi ve replikasyonu için önemli olduğu, çünkü bu kompleksin ribozom alt birimi olan 40S'ye bağlandığı ve konak hücre RNA'larına göre rekabetçi bir avantaj sağladığı açıklanmıştır (Hosmillo vd. 2019). Yapılan çalışmalardan elde edilen bulgulara göre; VPg'nin N-terminal ucunun, G1/G0'daki hücre döngüsünü durdurmak için gerekli olduğu ve HuNoV replikasyonunu desteklediğini göstermektedir (McSweeney vd. 2019). Bu nedenle, VPg'nin RdRp ve konağın hücresel bileşenleri ile etkileşimleri, viral replikatif döngüde ve HuNoV'nin patogenezinde önemli bir rol oynar.

1.3.5. Proteaz

Proteaz, genomun replikasyonunda, virüsün patogenezinde ve konağın hücresel faktörleriyle etkileşimde yer alan proteinleri parçalayarak viral aktivitelere temel bir rol oynar. 3CL Pro (NS6) olarak da adlandırılan HuNoV proteazı, yapısal olmayan proteinleri viral poliproteinden ayırmakla görevlidir (Belliot vd. 2003). Yaklaşık 19,4 kDa moleküler ağırlığa sahiptir (Nakamura vd. 2005). Ayrıca, HuNoV proteazı, kimotripsin benzeri bir enzim olarak karakterize edilmiştir (Belliot vd. 2003). Proteolitik aktivitesi için optimum pH ve sıcaklık sırasıyla 8.6 ve 37°C civarındadır (Someya vd. 2005).

HuNoV proteaz, ORF1 tarafından kodlanan poliproteini kısmen işleyen, proteaz ve polimeraz aktivitelere sahip olduğu bilinen ProPol adı verilen hücre içi bir öncü formuna sahiptir (Belliot vd. 2005, Scheffler vd. 2007). ProPol, viral proteazdan daha yüksek pH aralığında (8,6- 9,0) optimum aktivite gösterir. Ayrıca, pH 6,8 civarına düştüğünde ProPol olgun proteazdan (%34) daha yüksek aktiviteye (% 64) sahiptir. Ayrıca, her iki enzim de NaCl, KCl, MgCl ve MnCl₂'ye maruz kaldığında inhibe edilir (May vd. 2013).

1.3.6. Polimeraz

Pol (NS7) olarak da adlandırılan HuNoV polimeraz proteininin (RdRp) temel işlevi viral genomun replikasyonudur. HuNoV proteaz tarafından bölünen RdRp, 509 aminoasitten oluşur ve 56,8 kDa moleküler ağırlığa sahiptir (Belliot vd. 2003). Yapılan çalışmalardan elde edilen

sonuçlara göre, HuNoV GII' nin Pol bölgesinin birkaç aminoasit değişikliği ile hızlı bir evrime sahip olduğunu ve evrim mekanizmasının her genotip için farklı olabileceğini düşündürmektedir (Ozaki vd. 2018). Bu nedenle, HuNoV polimeraz sadece virüs replikasyonu ve transkripsiyon prosesleri için önemli bir protein değil, aynı zamanda Norovirus cinsinin sınıflandırılması için faydalı bir yapısal olmayan proteindir.

1.4. HuNoV'a Konağın Duyarlılığı

Hücreye girmeden önce HuNoV' lerin HBGA tarafından tanınması ve HBGA' lara bağlanması gerekir (Mallagary vd. 2019). HBGA' lar, eritrositlerin yüzeyinde veya bazı dokuların epitel hücrelerinde bulunan polimorfik glukanlardır (de Graaf vd. 2016). HuNoV' da, HBGA bağlanma bölgeleri, VP1' in P bölgesinin P2 alt ünitesinde bulunmaktadır (Tan vd. 2004, Liu vd. 2019). Bu bağlanma bölgesi, farklı norovirüs genogruplarında değişmektedir. Bunun nedeni, her HuNoV genogrup/genotipinin farklı HBGA' lara bağlanmasıdır (Huang vd. 2005, Cao vd. 2007, Cannon vd. 2009). *In-vitro* bir çalışma, HuNoV' un HBGA ile etkileşiminin düşük afiniteye sahip olduğunu ve VP1' de önemli bir yapısal yeniden düzenlemeye neden olmadığını göstermiştir (Hansman vd. 2012).

Bazı insanların HuNoV enfeksiyonuna karşı dirençli olduğunu gösteren duyarlılık çalışmaları yapılmıştır (Lindesmith vd. 2003). HBGA oluşumuna, *fut2* geni tarafından kodlanan fukosiltransferaz 2 (FUT2) enzimi aracılık eder. Bu fonksiyonel geni sunan kişilere “sekretuar” denir ve HuNoV enfeksiyonuna karşı hassastır. Buna karşılık, bu fonksiyonel gene sahip olmayanlara “nonsekretuar” denir ve HuNoV enfeksiyonuna dirençlidirler (de Graaf vd. 2016). HBGA, bireylerin virüs enfeksiyonuna duyarlılığında önemli bir faktör olarak, rotavirüs gibi diğer enterik virüslerde de bildirilmiştir. Sekretuar (FUT2+) bireylerin, nonsekretuar bireylere göre rotavirüs tarafından enfekte olma olasılığının 26,6 kat daha fazla olduğu bulunmuştur (Bull vd. 2007, Hemming vd. 2013, Ramani ve Giri, 2019).

HBGA değişkenliği ve HuNoV enfeksiyonu arasındaki ilk bağlantı, virüsün belirli bir HBGA grubunu tanıdığına gösterildiği, NoV ile enfekte gönüllülerin klinik çalışmalarından elde edilmiştir (Marionneau vd. 2002). Tükürük donörlerinin ABO, sekretuar ve Lewis kan

tiplerine dayalı olarak HuNoV suşlarının en az dört spesifik bağlanma modeli vardır (Huang vd. 2003).

1.5. HuNoV Replikasyonu

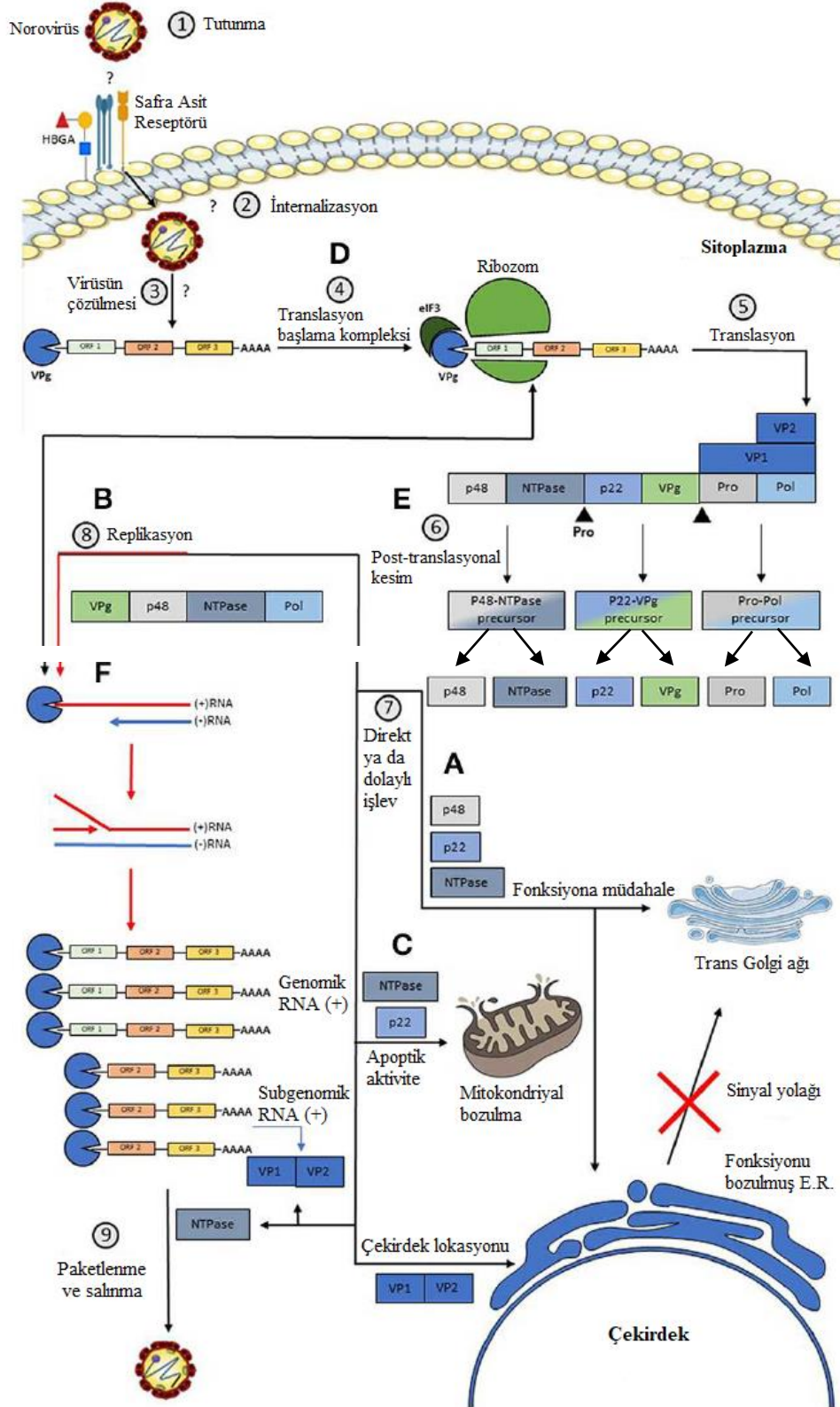
Replikasyon döngüsü, spesifik reseptörlerin ve bazı durumlarda diğer hücrel bileşenlerin tanınması yoluyla virüsün hedef hücre ile etkileşimiyle başlar. HuNoV söz konusu olduğunda, ana reseptör hala bilinmemektedir. HBGA ve safra asitleri dahil olmak üzere bazı ko-reseptörler ve hücre bağlama faktörleri bildirilmiştir (Marionneau vd. 2002).

VP1' in hücre reseptörleri ile etkileşiminden sonra, virüsün hücre içine girer ve ardından viral kapsid ayrılır, RNA hücre sitoplazmasına bırakılır. Bu iki işlemin kesin mekanizma henüz açıklanmamıştır (Campillay-Véliz vd. 2020). Viral genom serbest bırakıldığında, viral genomun 5' ucunda kovalent olarak bağlanan VPg proteini, eIF3 gibi hücrel translasyon başlatma faktörleri ile etkileşime girerek bir translasyon kompleksi oluşturur (Daughenbaugh vd. 2003). Bu aktivitenin birkaç Calicivirüste daha tanımlanması fonksiyonun yüksek oranda korunduğunu göstermiştir (Daughenbaugh vd. 2003, Shirato vd. 2008). Takiben, büyük ve küçük ribozomal alt birimler bir araya gelir, bu da virüsün yapısal olmayan poliprotein translasyonu ile sonuçlanır (Daughenbaugh vd. 2003, Hosmillo vd. 2019). HuNoV' un yapısal olmayan poliproteini oluşturulduktan sonra, proteaz otomatik olarak bölünür. Daha sonra, proteaz translasyon sonrası poliprotein geri kalanını bölerek üç protein öncüsü oluşturur: p48/NTPaz, p22/VPg ve Pro/Pol (Belliot vd. 2003-2005, Huang vd. 2005). ProPol öncüsünün proteaz ve polimeraz aktiviteleri olmak üzere iki işlevi vardır. ProPol kompleksinin her iki proteinin ayrı ayrı aktivitesine kıyasla daha yüksek bir enzimatik aktivesi söz konudur (May vd. 2013, Medvedev vd. 2017, Viskovska vd. 2019). ProPol kompleksinin etkisiyle bu üç öncü ayrılır ve kendi kendine bölünür. Sonuç olarak altı ayrı yapısal olmayan proteini üretir.

Replikasyon işlemi Pol, VPg ve NTPaz proteinlerinin etkisiyle gerçekleştirilir. NTPaz' ın üç aktivitesi vardır: helikaz, NTP hidrolaz ve şaperon (Pfister ve Wimmer, 2001, Li vd. 2018). Daha sonra, p48 proteini, Pol aktivitesini artıracak olan bu sürece dahil edilir (Subba-Reddy vd. 2011). Viral genomun ve alt genomların, 5' uçlarına kovalent olarak bağlı VPg proteini ile sentezi gerçekleşir. Böylece tüm genom, NTPaz proteininin şaperon aktivitesi ile

mobilize edilir (Shirato vd. 2008, Li vd. 2018). Viral genomun translasyonundan bir viral polipeptid ve alt genomlardan VP1 ve VP2 proteinleri üretilir (Cao vd. 2007, Thorne ve Goodfellow, 2014).

Bu süreç gerçekleşirken, p48 proteini endoplazmik retikulum ve trans-Golgi ağına göç eder ve konağın bağışıklık tepkisi için önemli olan NF κ B, MAPK ve PI3K-Akt sinyal yollarına müdahale eder (Ettayebi ve Hardy, 2003, Lateef vd. 2017). p48, SNARE-aracılı veziküller taşınmaya katılan ve hücre protein taşınmasında bir tıkanmaya neden olan VAP-A ile ilişkili protein A' ya bağlanır (Ettayebi ve Hardy, 2003, Roth ve Karst, 2016). p48' in neden olduğu etkiye (trans-Golgi ağının çözülmesine) p22' nin hareketi de katkıda bulunur. P22, ayrıca ER' den gelen bir dışa aktarma sinyaline benzer motife sahip olduğu için COPII kaplı veziküllerin trafiğini de bloke eder (Sharp vd. 2010). p22 ve NTPaz, hücrenin proapoptotik aktivitesini destekler ve HuNoV viryonlarının konakçı hücreden salınmasını kolaylaştırır (Hutson vd. 2002, Cao vd. 2007, Thorne ve Goodfellow, 2014). İnsan enterositlerinde HuNoV replikasyon döngüsünün bir modeli Şekil 1.5' te şematize edilmiştir.



Şekil 1.5 HuNoV replikasyon döngüsü ve proteinlerinin işlevi (Campillay-Véliz vd. 2020).

1.6. HuNoV' a Karşı İmmün Cevap

HuNoV' a karşı kısa süreli bağışıklık kanıtlanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda doğal bağışıklık ve edinilmiş bağışıklık ile ilgili çeşitli yanıtlar elde edilmiştir. Fakat bu yanıtların arkasındaki kesin moleküler mekanizma açıklığa kavuşturulmamıştır.

Doğuştan gelen bağışıklık sisteminin iki ana hücre yolu vardır. Viral replikasyonu kontrol eden tip I ve III interferon (IFN) sistemleri HuNoV gibi RNA virüsleriyle karşılaştığında bağışıklık sistemi tarafından yükseltilir (Jensen ve Thomsen, 2012, Lee ve Baldrigde, 2017). Özellikle, RNA virüsleri Toll-benzeri reseptör (TLR) ve patern tanıma reseptörleri (PRR' ler) tarafından tespit edilir. TLR3; hem makrofajlarda, B lenfositlerinde, dendritik hücrelerin (DCs) içinde hem de doğal katil (NK) hücrelerin, epitel hücrelerin ve fibroblastların yüzeylerinde bulunur. Ayrıca RNA virüslerinin temel sensörlerinden biri olarak karakterize edilmiştir. RLR (retinoik asit ile indüklenebilen reseptörler) ailesine ait olan RIG-I ve melanom farklılaşması ile ilişkili antijen 5 (MDA5) de aynı şekilde hücre içi RNA virüslerini tespit eden sitoplazmik sensörlerdir. Mevcut anlayış, TLR3' ün endozom bölümlerindeki herhangi bir çift zincirli RNA (dsRNA)' yı tanıdığını, MDA5' in ise uzun dsRNA' yı tanıdığını ve RIG-I' nin sitoplazmada dsRNA içeren trifosfatı algıladığını göstermektedir (Jensen ve Thomsen, 2012).

IFN- α ' nın Huh-7 hücrelerinde ve hamster böbrek (BHK21) hücrelerinde HuNoV replikasyonunun kontrol edilmesinde spesifik olarak, rol oynadığı rapor edilmiştir. Bu da IFN üretiminin HuNoV enfeksiyonunu kontrol etmede konakçı antiviral mekanizmalardan biri olabileceğini düşündürmektedir (Chang vd. 2006). Ayrıca, bazı, tip I ve III IFN sistemlerinin HuNoV enfeksiyonlarının kontrolünde önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir; bir GII.4 suşu ile aşılanmış domuzların bağırsak içeriklerinde ve serumunda yüksek IFN- α sitokin üretimi tespit edilmiştir (Souza vd. 2007); Murin Norovirüs-1 (MNV-1)' in replikasyonunun, hem *in-vivo* hem de *in-vitro* tip I ve III IFN sistemlerine duyarlı olduğu bulunmuştur. (Karst vd. 2003, Wobus vd. 2004).

Dang vd. (2018) bir HuNoV replikon sistemi kullanarak, farklı IFN türlerinin antiviral aktivitelerini değerlendirmişlerdir. Bu çalışma HuNoV replikasyonunun üç tip IFN' ye duyarlı olduğunu göstermiştir: tip I IFN (IFN α), tip II IFN (IFN γ) ve tip III IFN (IFN λ 1 ve 3). Ek

olarak, RIG-I ve MDA-5 ile transkripsiyon faktörü IRF-1' in, tip I ve III IFN' ler ile tedavi edilen HuNoV replikon (HG23) hücrelerinde indüklendiği bulunmuştur. İlginç bir şekilde, bu araştırmacılar, farklı IFN sistemlerinin sinerjik bir etkisinin olduğunu göstermiştir. Bu interferon ile uyarılan genlerin, HuNoV replikasyonunu etkin bir şekilde kontrol etmede üç IFN sistemi tarafından koordineli olarak indüklendiği gözlemlenmiştir. NoV' nin bu farklı IFN tipleri tarafından indüklenen antiviral yanıtı engellemediği de bulunmuştur (Dang vd. 2018). Bu, HuNoV replikasyonunu inhibe etmek için üç IFN sisteminde yer alan anahtar molekülleri gösteren ilk rapordur.

HuNoV' a karşı adaptif bağışıklık tepkisi tam olarak anlaşılammıştır. Fakat yapılan bazı çalışmalar, insanlarda bu virüslere karşı hümorale ve hücresele bağışıklık tepkilerinin nasıl ortaya çıktığına dair bilgiler sağlamıştır. GII.4 HuNoV gibi hızla gelişen RNA virüslere, önceki maruziyetle ilişkili karmaşık hümorale tepkiler ortaya çıkarmaktadır. Literatürdeki pek çok çalışma, yetişkinlerde NoV' ye karşı yüksek serum antikor düzeylerinin, bu virüsün (GI.1) gelecekteki enfeksiyonlarına karşı koruma ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Johnson vd. 1990, Okhuysen vd. 1995). Yetişkin gönüllülerde yürütölen bir çalışmaya göre, enfeksiyondan önce NoV için spesifik antikorların yüksek serum veya fekal titrelerinin varlığının, önceden mevcut antikorların düşük titrelerine sahip gönüllülere kıyasla bu virüs tarafından enfekte olma olasılığını azalttığını ortaya koymuştur (Baron vd. 1984, Johnson vd. 1990, Gray vd. 1994). Ayrıca, çocuklarda yüksek serum antikor seviyeleri, kısa süreli bağışıklık ve bu virüslere yakın zamanda maruz kalma nedeniyle koruma ile ilişkili görünmektedir (Lew vd. 1994, Chacku vd. 2008). Yapılan çalışmalar, HuNoV' a sık maruz kalmanın HuNoV' un neden olduğu hastalıklara karşı direnci uyarabileceğini göstermektedir (Johnson vd. 1990, Okhuysen vd. 1995). Bu gözlemlerin arkasındaki olası mekanizmalardan biri, HuNoV' a bir defadan fazla maruz kalmanın, virüslere karşı kısa süreli bağışıklık korumasında rol oynadığı bilinen IgA antikor üretimini de indükleyebilmesidir (Wyatt vd. 1974). Agus vd. (1973) bu görüşü desteklemek için, NoV ile enfekte gönüllülerin ince bağırsak dokularında mukozal IgA' nın üretildiğini göstermişlerdir. HuNoV' a karşı kısa süreli bağışıklığın arkasındaki mekanizmayı tam olarak aydınlatmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Bu virüsler için uzun süreli koruyucu bağışıklık kanıtlanmamıştır. Bir NoV enfeksiyonundan sonra hastalanan bazı gönüllüler, 6-14 hafta sonra yeniden maruziyet

durumunda hastalığa karşı kısmi bağışıklık göstermişlerdir. Ancak bu kısmi bağışıklık koruması 2- 3 yıl sonra tamamen kaybolmuştur (Parrino vd. 1977). Uzun vadeli koruyucu bağışıklık tepkisi, dünyanın farklı bölgelerinden gelen ve yeni GII.4 suşlarının ortaya çıkmasıyla ilişkili olan “yüksek norovirüs aktivitesi” dönemlerini gösteren çok sayıda epidemiyolojik rapordan kanıtlanabilir (Adamson vd. 2007, Okada vd. 2007, Johansen vd. 2008, Reuter vd. 2008, Tu vd. 2008). Popülasyonda GII.4 HuNoV enfeksiyonlarına karşı koruma sağlayan bir sürü bağışıklığını düşündüren, azaltılmış sayıda HuNoV salgınlarının olduğu bir dönem takip eder. (Siebenga vd. 2007, Lindesmith vd. 2008). Fakat, GII.4’ ün yeni bir suşu ortaya çıkarsa, bireylerin hastalığa yeniden duyarlı hale gelebileceğini göz ardı etmemek gerekir.

Nötralize edici antikor titreleriyle gelecekteki enfeksiyonlara karşı koruma arasındaki ilişki belirsizdir. Gönüllülerdeki serum antikorlarının, NoV VLP’ lerin HBGA’ lara bağlanmasını bloke edebildiği gösterilmiştir. Anti-NoV antikorlarına sahip kişilerin sadece %20- 30’ unun önceden mevcut bloke edici antikor titrelerine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, bu gönüllülerin % 90- 100’ ünün NoV ile mücadeleden sonra bloke edici antikor titreleri ürettiği bulunmuştur (Reeck vd. 2010, Lindesmith vd. 2010). Yapılan çalışmaların hiçbirinde, bloke edici antikor titreleri ile klinik sonuçlar arasında bir korelasyon test edilmemiştir. Başka bir çalışmada, su kaynaklı bir akut gastroenterit salgını sırasında enfekte olmamış çocukların serumunda GII.4 VLP’ lerin HBGA H tip 3’ e bağlanmasını bloke etmede yüksek bir aktivite gösterdiği bulunmuştur. Bu da güçlü bloke etme aktivitesinin HuNoV’ a karşı koruma ile ilişkili olduğunu düşündürmüştür (Rockx vd. 2005, Nurminen vd. 2011).

HuNoV’ a karşı ortaya çıkan bağışıklık tepkisini anlamaya yönelik yapılan çalışmaların çoğu, antikor aracılı tepkiye odaklanmıştır (Lindesmith vd. 2003, Hutson vd. 2005). HuNoV’ a karşı adaptif bağışıklığı incelemek için uygun küçük bir hayvan modeli yoktur. Bu nedenle, bu virüslere karşı hücrel bağışıklık tepkisi ile ilgili sınırlı bilgi mevcuttur. Fakat HuNoV’ a karşı özel bir hücrel bağışıklık tepkisinin arttığına dair kanıtlar vardır. G1.1 ile enfekte olmuş sağlıklı gönüllülerin serum örneklerinde, hücrel bağışıklık tepkisi sırasında üretilen diğer sitokinler arasında interlökin (IL)-10 ve IL-12p70’ in yanı sıra artan IFN- γ seviyeleri bulunmuştur (Newman vd. 2015).

Hızla gelişen RNA virüslerinden biri olan HuNoV' ların neden olduğu bağışıklık tepkisinin elde edilmesi zordur. HuNoV' a karşı hümmoral ve hüccresel bağışıklık tepkilerinin tam olarak anlaşılması hala aydınlatılmayı beklemektedir. Öte yandan HuNoV enfeksiyonlarını önlemeye yönelik aşu adaylarının geliştirilmesi ile ilgili çalışmalar devam etmektedir.

Bu çalışmada aşu adayı olabilecek Norovirüs antijenik proteinleri *E. coli*' de rekombinant olarak üretilmiş ve elde edilen proteinler saflaştırılarak indirekt ELISA yöntemiyle bunların immünojeniteleri araştırılmıştır. Tez kapsamında izlenen yol haritası ve literatüre ilişkin bilgiler aşağıda kısaca açıklanmıştır.

1.7. Rekombinant DNA Teknolojisi

Rekombinant DNA teknolojisi farklı disiplinlerin kullanımına girmiş olup giderek yaygınlaşan bir teknoloji alanıdır. Yabancı DNA parçasının bir DNA içine yerleştirilmesi, ilk kez 1972 yılında Paul Berg tarafından başarılmıştır. Berg SV40 virüsünü restriksiyon enzimiyle keserek içerisine bakteriyofaj genlerini eklemiştir. Bu başarısı 1980 yılında Nobel ödülü ile onurlandırılmıştır. Boyer ve Cohen ise plazmid içerisine DNA fragmanı ekleyip bakterilere aktararak aktarılan genin kodladığı proteinin sentezinin mümkün olduğunu 1973' te göstermişlerdir. Boyer genetik teknoloji alanında Genentech adıyla ilk şirketi kurmuş ve Rekombinant DNA teknolojisinin ticari anlamda kullanımı 1978 yılında bu şirketin Humalin adı altında insülini *E. coli*' de sentezlemeleri ve pazarlamalarıyla başlamıştır (Russo, 2003).

Rekombinant DNA teknolojisi, rekombinant DNA molekülü oluşturabilmek için kullanılan yöntemler serisi olup; bir gen parçasının klonlanması ve klonlanan genden protein ekspresyonu işlemidir. Gen klonlama sistemi DNA'yı taşıyan ve kendini eşleyip, çoğalabilmesini sağlayan bir ekspresyon vektörü ve vektörün kendini eşleyip, çoğalabildiği ekspresyon sisteminden (konakçı hücreden) oluşmaktadır. Bakterilerin rekombinant protein sentezi için kullanımları oldukça yaygındır. Genetik değişiklik oluşturularak bakterilerin biyofabrika işlevi görmeleri sağlanabilmiştir. Rekombinant teknolojinin kullanıldığı alanlar arasında; moleküler tanı, ikame tedavisi, tedavi, ticari ürünler, aşu, biyoremediasyon, biyodegradasyon, alkol ve enerji üretimi yer almaktadır.

1.8. Rekombinant Proteinlerin Saflaştırılması

Rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen proteinler de diğer (rekombinant olmayan) proteinlerin saflaştırılması için geliştirilmiş olan ayrıştırma teknikleri ile saflaştırılabilirler. Pratikte ise genellikle, rekombinant proteinlerin saflaştırılması, hedef proteinin yüksek düzeylerde ekspresyonunun sağlanabilir olması nedeni ile daha az sayıda basamak içeren saflaştırma protokolleri ile gerçekleştirilebilmektedir. Hedef rekombinant proteinin ekspresyon düzeyinin yüksek olması, ham protein özütü içerisindeki hedef proteinin oranının, kirleticilere oranla daha yüksek olmasına yol açmaktadır. Bu nedenle, saflaştırma protokolünün ilk aşamalarında uygulanan yöntemler, ham protein özütlerinin yoğunlaştırılması için gereken adımları azaltacak ya da tamamen ortadan kaldıracaktır (Tuncer, 2008).

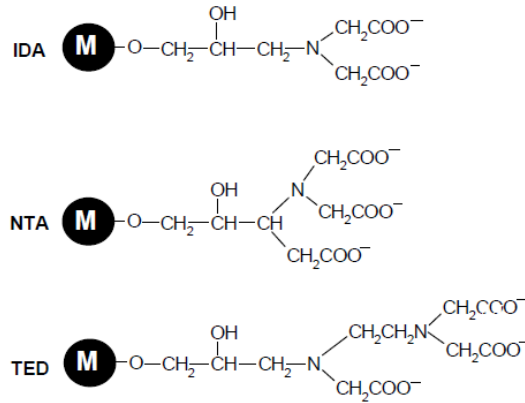
Günümüzde gen mühendisliği sayesinde hedef rekombinant proteine, özgül peptid veya protein etiketlerinin eklenmesi de mümkün olmaktadır. Hedef proteine eklenecek olan etiket, etiketin eklenmiş olduğu rekombinant hibrit proteinin saflaştırılmasında kolaylık sağlayan bazı fizikokimyasal özellikler taşıyacak şekilde seçilmektedir. Etiket eklenmiş hibrit bir molekülün sentezi, etiketin sentezinden sorumlu olan DNA dizisinin, hedef proteinin sentezinden sorumlu olan DNA dizisinin bir ucuna eklenmesi ile başarılmaktadır.

Affinite kromatografisinde saflaştırılacak olan biyomoleküllerin biyolojik fonksiyonlarından veya kendilerine özgü kimyasal yapılarından yararlanılmaktadır. Ayrıştırılacak olan biyomolekül, kolon materyaline kovalent olarak bağlanarak tutuklanmış bir bağlama materyaline komplementer olarak, özgül ve geri dönüşümlü bir şekilde adsorbe edilmektedir. Saflaştırma ise genellikle tek bir adımda birkaç bin kat artırılmakta ve saflaştırılmak istenen molekülün geri kazanımı ise oldukça yüksek verimlilikte olmaktadır. Affinite kromatografisi aynı zamanda, çok fazla hacimlerdeki örneklerin kolona yüklenmesine izin vermesi nedeni ile yoğunlaştırma etkisi de göstermektedir.

Başlangıçta enzimlerin saflaştırılması için geliştirilmiş olan affinite kromatografisi, daha sonraları antikorların, antijenlerin, nükleotidlerin, nükleik asitlerin, DNA bağlayıcı proteinlerin, immüoglobulinlerin, membran reseptörlerinin ve hatta hücrelerin ve hücre fragmentlerinin saflaştırılmasında kullanılmaya başlanmıştır.

İlk defa 1975 yılında Porath ve arkadaşları tarafından uygulanan “metal şelat affinite kromatografisi”, protein saflaştırma tekniklerinden birisi olarak kullanılmaktadır. Cu^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} veya Cd^{2+} gibi immobilize edilmiş metal iyonlarının ya da Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} veya Mn^{2+} gibi geçiş metal iyonlarının, histidin kalıntılarının imidazol gruplarıyla, sistein kalıntılarının sülfidril gruplarıyla veya triptofan kalıntılarının indol gruplarıyla oluşturduğu reaksiyonlarla, proteinleri ve peptidleri seçici olarak tutuklu metal liganda bağlamak için kullanılan özel bir affinite kromatografisi şeklindedir. Bu kromatografi şekli, özellikle poli-histidin, poli-sistein veya poli-triptofan füzyonları oluşturulmuş olan rekombinant proteinlerin saflaştırılmasında oldukça önemlidir. Metal şelat affinite kromatografisi ile ayrıştırılması gerçekleştirilen proteinler arasında fibrinojen, süperoksit dismutaz ve histon olmayan nüklear proteinleri içeren bir grup protein sayılabilir.

Genellikle, bir iminodiasetat (IDA), tris (karboksimetil)-etilendiamin (TED) veya nitrilo triasetik asitin (NTA) kovalent olarak bağlandığı agaroz matrisleri, metal ligandların tutuklanmasında yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Şekil 6). Metal şelat affinite kromatografisi için gerekli olan kolon materyalleri ise hem HPLC (HiTrap Chelating ve Chelating Superose) hem de LPLC (Chelating Sepharose) için bulunmaktadır.



Şekil 1.6 İmmobilize metal iyon şelatör ligandlarından üç tipinin yapısı. IDA, iminodiasetat; NTA nitrilo triasetik asit; TED tris (karboksimetil)- etilendiamin.

Ticari olarak temin edilen kolon materyalleri şelatlanmış metal içermediklerinden, bu matrisler kullanılmadan önce arzu edilen metal iyonu ile yüklenmelidirler. Kolon materyalinin

metal iyonları ile yüklenmesi ise genellikle, 50 mM uygun metal tuzunu ($ZnCl_2$, $CuSO_4$ v.b.) içeren su ile kolonun yıkanması şeklinde gerçekleştirilir. Metal iyonları ile yüklenmiş olan matriks ise örnek materyalinin yüklenmesinden önce, fazla metal iyonlarının kolondan uzaklaştırılması için başlangıç tamponu ile yıkanmalıdır. Ayrıca, zayıf olarak bağlanmış metal iyonlarının aktif olarak kolondan uzaklaştırılması gerektiği durumlarda ise 1-10 mM imidazol veya 500 mM glisin gibi zayıf kompleks oluşturan ajanlarla kolonun yıkanması gerekebilir.

Örnek materyal kolona yüklenirken başlangıç tamponu içinde çözünmelidir. İyi bir bağlanmanın elde edilmesi için ise nötral veya hafif alkali pH' daki tamponların kullanılması gerekmektedir. Bu amaçla kullanılacak tamponlar ise tris asetat (50 mM), sodyum fosfat (20–50 mM) ve Tris–HCl (20–50 mM)' dir. Tris–HCl, bağlanmayı azaltma eğiliminde olduğundan bu tampon, sadece metal–protein affinitesinin oldukça yüksek olduğu durumlarda kullanılmalıdır. Başlangıç tamponunda yüksek derişimlerde tuz veya deterjanların bulunması, normalde proteinlerin bağlanmasını etkilemez. Bu nedenle, yüksek tuz derişimleri istenmeyen iyon-değişimi etkisinin önlenmesi için yüksek iyonik gücün oluşturulmasına katkıda bulunurlar.

Proteinin kolon içerisindeki tutuklanması, proteinin liganda tutturulmasına izin vermeye yetecek kadar ve liganda bağlanmamış kontaminatların elüsyonu sırasında ise proteinin kolonda alıkonmasını sağlayacak kadar kararlı, ortak bir bağın oluşturulması ile sağlanır. Kirleticilerin kolondan yıkanmasından sonra, metal-liganda bağlanan proteinin elüsyonu, birkaç yolla sağlanabilir. Bu yolların hepsinde de iyonik etkileşimlerin baskılanmasını sağlamak amacı ile elüsyon tamponu 0,5–1 M NaCl içermelidir.

Bağlı moleküllerin özgül elüsyonu, ya hedef molekül ile ya da ligand ile yarışmacı olan ajanların gradient şeklinde kolona uygulanması ile sağlanabilir. Amonyum klorid (0–150 mM), imidazol (0–50 mM) veya histamin ve glisin gibi, şelatlanmış metal için affinitesi olan diğer maddelerin artan derişimlerdeki gradientleri de kullanılabilir.

Moleküllerin bağlama bölgelerindeki yüklü grupların iyonizasyon derecesi ise pH tarafından kontrol edildiği için, bağlı moleküllerin özgül-olmayan elüsyonu, pH gradienti ile

sağlanabilir. Dolayısıyla, protein-metal kompleksinin zayıflatılmasıyla ya da elüsyon tamponunun iyonik gücünün artırılması ile proteinlerin elüsyonu gerçekleştirilebilir. pH değişimi ile bağlı moleküllerin ligandan ayrılması, pH'nın lineer gradient ya da basamaklı olarak düşürülmesi ile sağlanabilir. Proteinlerin çoğunun elüsyonu, pH 6,0 ile 4,2 arasında gerçekleştiğinden, pH gradientinin 7,0–4,0 arasında uygulanması normal bir sonuç vermektedir (Tuncer, 2008).

1.9. ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Antijen-antikor ilişkisini araştırmak için, antikora bağlanmış bir enzimin aktivitesini tayin etmeye yönelik kantitatif bir ölçüm yöntemidir. Antijene karşı antikor ya da antikora karşı antijen aramak mümkündür. Virüs ve parazit enfeksiyonlarında kullanılan bir tanı yöntemidir.

Antikor aramak için Mikro-Elisa sisteminde antijen ile kuyucukların yüzeyi kaplanır. Bu antijenle bağışıklanmış hayvanların kanından elde edilen serum kuyucuklara aktarılır. Bir süre beklendikten sonra yıkanır. Eğer serumda uygun antikor varsa antijenle birleşir. Bir enzim ile işaretlenmiş sekonder antikor eklenir. Bir süre beklenir ve yıkanır. İncelenmekte olan serumda antijene uygun antikor var ise antijene bağlanmış olacağından bu son eklenen enzim ile işaretlenmiş ilgili proteini de bağlayacak ve yıkama ile uzaklaştırılmayacaktır. Enzime uygun bir kromojen substrat eklenir. Sisteme bağlanmış enzim bu substratı parçaladığında ortaya çıkan renk, yapılacak kolorimetrik yöntemlerle ölçülerek bağlanmış olan enzim dolayısıyla bağlanmış olan antikor hakkında fikir verecektir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

NoV' ün neden olduğu bir gastroenterit salgınının epidemiyolojik özellikleri üzerine yapılan çalışmalar, patojenlerin gıda kaynaklı maruziyet, gıda işleme, kişiden kişiye temas ve kontamine su yolu ile bulaşmasını içerir (Burch, 2019). Birçok araştırmada NoV' ün 5 yaşından küçük çocuklarda akut gastroenteritin önde gelen nedenlerinden biri olduğu bildirilmiştir (Chhabra vd. 2013). NoV, gelişmekte olan ülkelerde morbidite, ekonomik maliyetler ve mortalite açısından insan refahı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. NoV' ler on genogruba (GI–GX) ayrılır, ancak yalnızca GI, GII ve GIV' ün insanları enfekte ettiği bilinmektedir. Kırk sekiz farklı HuNoV genotipi tanımlanmış olmasına rağmen (Chhabra vd. 2019), GII.4 küresel gastroenterit pandemileri ile ilişkili tek genotiptir (Tu vd. 2008, Sienbenga vd. 2009). GII.4 virüsleri, son yirmi yılda altı ana NoV pandemisinin tümüne neden olmuştur. Bu altı pandemik GII.4 varyantı, 1990' ların sonunda bir pandemiye neden olan US 96 (Noel vd. 1999, White vd. 2002) Farmington Hills 2002 (Loopman vd. 2004, Widdowson vd. 2004), Hunter 2004 (Bull vd. 2006), Den Haag 2006b (Tu vd. 2008, Eden vd. 2010), New Orleans 2009 (Yen vd. 2011) ve son olarak Sydney 2012 (Eden vd. 2013-2014)' dir. Altı pandemik GII.4 varyantından, ilk dördü muhtemelen önceki GII.4 virüslerinden kapsid P alanı (antijenik sürüklenme) içindeki mutasyonlar yoluyla evrimleşmiştir (Bull vd. 2010, Donaldson vd. 2010, Debbink vd. 2012). Bununla birlikte, en son iki GII.4 pandemik varyantı, New Orleans 2009 ve Sydney 2012, ORF1-ORF2 örtüşmesinde (overlap) hem antijenik kapsid varyasyonunu hem de GII.4 genotipi içindeki rekombinasyonunu (antijenik sürüklenmeyi ve antijenik kaymayı) gösterir. (Eden vd. 2013). Son yıllarda ülkemizden de Norovirüs vakaları bildirilmeye başlamıştır. 2018 yılında Sakarya' nın Karasu ilçesinde altı günde 4.500 kişi, 2019 yılında Burdur' un Bucak ilçesinde 3.366 kişi ve Aydın' ın Çine ilçesinde 2.500 kişi ishal ve kusma şikayeti ile hastaneye başvurmuştur.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2016 yılında bir HuNoV aşısı geliştirmenin mutlak bir öncelik olması gerektiğini belirtmiş olsa da, ne yazık ki şu anda lisanslı bir HuNoV aşısı bulunmamaktadır. Etkili bir HuNoV aşısının geliştirilmesinin önündeki en büyük engel, sağlam ve tekrarlanabilir *in-vivo* ve *in-vitro* enfeksiyon modellerinin olmamasıdır. HuNoV' un *in-vivo* ve *in-vitro* kültür sistemlerinin geliştirilmesine yönelik araştırmalarla, HuNoV' un B hücrelerini (Jones vd. 2005-2014, Kolawole vd. 2016) ve insan bağırsak enteroidlerini (Etteyabi vd. 2016,

Constantini vd. 2018, Alvarado vd. 2018) *in-vitro* olarak verimli bir şekilde enfekte edebildiği bildirilmiştir. Hayvan modelleri ile ilgili olarak, at kuyruklu makak şu anda HuNoV için en umut verici insan dışı primat enfeksiyon modelidir (Subekti vd. 2002). Bununla birlikte, yetişkin ve emziren fareler, yavru kediler, kobaylar veya tavşanlar gibi hayvan modellerinde birçok HuNoV enfeksiyonu denemesi yapılmasına rağmen, hiçbiri başarılı olmamıştır (Wyatt vd. 1978, Todd ve Tripp, 2019). Bugüne kadar, yalnızca rekombinasyon aktivasyon geni ve yaygın gama zinciri eksikliği (Rag^{-/-}γc^{-/-}) olan mutant BALB/c faresinin, intraperitoneal enfeksiyon yoluyla GII HuNoV replikasyonunu desteklediği gösterilmiştir (Taube vd. 2013). Zebra balığı ve pluripotent kök hücre kaynaklı organoidler, HuNoV replikasyonu için yeni modeller olarak rapor edilmiştir (Van Dycke vd. 2019, Sato vd. 2019).

Tanı ve aşı geliştirme çalışmalarında rekombinant viral antijenlerin uygulanması önemli bir yaklaşım olmuştur. Yapısal ve işlevsel özellikleri nedeniyle VLP' lere veya P partiküllere dayalı olarak bir dizi HuNoV aşısı tasarlanmıştır. VLP' ler doğal virüslerin organizasyonunu ve konformasyonunu taklit eden ancak viral genomdan yoksun, potansiyel olarak daha güvenli ve daha ucuz aşı adayları sağlayan yapılardır. VLP' ler antijenik olarak viral partiküle benzerdir ve herhangi bir enfeksiyon riski olmaksızın hem enteral hem de parenteral yollarla uygulandığında spesifik bir antikor yanıtı uyandırabilir (Richardson vd. 2013). NoV için spesifik reseptörler tam olarak bilinmemektedir, fakat VLP' leri kullanan çalışmalar, konakçı mukozal hücreleri üzerinde eksprese edilen HBGA' ların NoV' lerin bağlanma ve giriş sürecinde yer aldığını göstermiştir (Choi vd. 2002, Ward, 2009, Donato vd. 2012).

Klinik öncesi çalışmalar parenteral, oral veya intranasal aşilar olarak farelere uygulanan VLP' lerin yüksek oranda immünojenik olduğunu göstermiştir (Periwal vd. 2003). Gönüllüler arasında, transgenik bitkilerde eksprese edilen ve oral olarak verilen rekombinant VLP' ler ile bakulovirüs içinde eksprese edilen ve oral olarak verilen VLP' ler hem güvenli hem de immünojenik olmuştur (Ball vd. 1999, Tacket, 2003). Transgenik patateslerde üretilen GII.4 VLP aşısını tüketen gönüllülerin %95' i, kontrol grubuna göre daha yüksek sayıda spesifik IgA salgılamıştır, deneklerin %20' si spesifik serum IgG ve %30' u spesifik dışkı IgA geliştirmiştir (Tacket vd. 2000). Tütün mozaik virüsü (TMV) türevli geçici ekspresyon sistemi kullanılarak *Nicotiana benthamiana*' da bitki bazlı HuNoV VLP aşısı üretilmiştir. Tütün türevli HuNoV VLP' ler farelerde sistemik ve mukozal immün yanıtları indüklemiştir (Santi vd. 2008). Başka

bir *Nicotiana benthamiana* tarafından üretilen HuNoV GII.4 VLP, intranazal olarak aşılanmış farelerde 56 gün boyunca VLP' ye özgü serum IgG' yi indüklemiştir (Mathew vd. 2014).

HuNoV GII.4 VLP' leri eksprese eden bir rekombinant adenovirüs aşısı, Çin Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi tarafından geliştirilmiştir. Rekombinant adenovirüs tarafından eksprese edilen HuNoV GII.4 VLP' lerin intranazal uygulaması, farelerde spesifik hücresel, hümmoral ve mukozal immün yanıtları uyarmıştır (Guo vd. 2008). Adenovirüs eksprese eden HuNoV GII.4 VLP' leri kullanan bir aşı hazırlanmış ve rekombinant adenovirüs aşısı tarafından geliştirilmiş korumanın indüklenip indüklenemeyeceği test edilmiştir. Rekombinant adenovirüsün tatmin edici sonuçlarına dayanarak Vaxart Şirketi, NoV GII.4 ve GI.1' i kullanarak oral aşı tableti geliştirmiştir. Faz Ib denemesi, bu oral bivalent norovirüs aşısının güvenliğini, immünojenitesini ve immün etkileşimini değerlendirmek için tasarlanmıştır. Bu aşının hem HuNoV GI.1 hem de GII.4 bileşeni, bağışıklanmayan deneklerin çoğunda güçlü mukozal bağışıklık tepkilerini indüklemiştir (Vaxart, 2019). Vaxart Şirketi tarafından geliştirilen bu oral HuNoV bivalan aşı adayını umut verici bir aşı adayını olmuştur.

Tekada İlaç Firması intranazal yoldan verilen bir GI.1 VLP bazlı aşı üzerinde insan denemeleri gerçekleştirmiştir (El-Kamary, 2010, Atmar vd. 2011). Faz 1 çalışmalarındaki tüm katılımcıların, 100 µg VLP aşı adayını ile aşılandığında IgA ve IgG hafıza B-hücre cevaplarında önemli artış olduğu bulunmuştur (Ramirez vd. 2012). Çalışmanın bir sonraki aşamasında katılımcılara 3 hafta arayla 2 doz aşı uygulanmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar aşılanmış grupta hem gastrointestinal hastalığın hem de NoV enfeksiyonunun kontrol grubuna göre sırasıyla %47 ve %26 oranında azaldığını göstermiştir (Atmar vd. 2011).

Takeda firmasının başka bir çalışmasında ise, GI.1/GII.4c genotipli divalent VLP bazlı bir norovirüs aşı adayını geliştirmişlerdir (TAK-214). Adjuvan olarak alüminyum hidroksit (Al(OH)₃ - 0,5 mg) ile birlikte verilen TAK-214, HBGA' ya karşı inhibitör antikörlerin geliştirilmesine dayanan tek dozluk intramüsküler bir aşı adayınıdır. Klinik deneyler, TAK-214 aday formülasyonunun sağlıklı yetişkinlerde güvenli, iyi tolere edilen ve immünojenik olduğunu göstermiştir (Atmar vd. 2016, Leroux-Roels vd. 2018, Sherwood vd. 2020). Aynı aşı adayını, 1-8 yaş aralığındaki sağlıklı çocuklara da uygulamıştır. TAK-214' ün uygulanan tüm dozajları, 1-8 yaşındaki çocuklarda kabul edilebilir reaktogenite sergilemiştir ve bir dozdan

sonra, iki dozdan sonra daha da artan, güçlü bağışıklık tepkileri sergilemiştir (Vesikari vd. 2022).

Prokaryotik ekspresyon sistemleri kullanılarak üretilen P partiküllerin VLP' lerle bir dizi yüzey özelliğini paylaştığı, bu nedenle konak/patojen etkileşiminin karakterizasyonunda VLP' ler için faydalı bir ikame olabileceği kanıtlanmıştır. VLP' ler sadece daha karmaşık ve zaman alıcı olan ökaryotik ekspresyon sistemlerinde üretilebilirken P partiküllerinin *E. coli*' de üretilmesi daha düşük maliyetli ve çok daha kolaydır (Tan ve Jiang, 2005, Tan vd. 2006, Tan vd. 2008).

P parçacıkları, NoV kapsid proteininin çıkıntı yapan (P) alanının kopyalarından oluşan nanoparçacıklardır. Viral reseptörlerle etkileşime girmek için gerekli tüm öğeleri içerirler. Sonuç olarak, yüksek oranda immünojeniktirler ve hem doğuştan hem de uyarılabilir bağışıklık sistemini aktive ederek humoral ve hücrel bağışıklığı ortaya çıkarırlar. Dahası, kararlıdırlar ve kolaylıkla *E. coli*' de üretilebilirler. Tüm bu nedenlerden dolayı, potansiyel olarak etkili aşı adayları olarak kabul edilirler. GII.4 VA387 suşundan üretilen VLP' lerin ve P partiküllerinin intranasal preparatını alan bir grup yeni doğan hayvanın ve daha önce aynı virüsle enfekte olmuş bir grup kontrolün kullanıldığı karşılaştırmalı bir çalışma Kocher vd. (2014) tarafından yayınlanmıştır. GII.4 ile tekrar karşılaşma durumunda, aşılanmış hayvanlarda diyare riskinin, doğal enfeksiyonu olanlara göre (% 82,9) daha düşük olduğunu ortaya çıkarmıştır. Ayrıca, P partiküllerinin kullanılması, diğer virüslerden türetilen antijenleri de içeren aşuların hazırlanmasına yol açabilir ve aşuların çoklu potansiyel enfeksiyonları hedeflemesine izin verir. Klinik öncesi denemelerdeki bir dizi HuNoV aşısı, yalnızca HuNoV' a değil aynı zamanda rotavirüs (RV), enterovirüs 71, hepatit E virüsü veya astrovirüs gibi diğer virüslere karşı koruma sağlamak için çok değerli aşular olarak tasarlanmıştır. RV VP8' in NoV VP1 P alanına dahil edilmesinin farelerde her iki virüse karşı potansiyel olarak koruyucu antikoru indükleyebildiği bulunmuştur (Tan vd. 2008). İnfluenza M2e geni NoV VP1 P alanına eklendiğinde benzer pozitif sonuçlar bulunmuştur (Xia vd. 2011). Huo vd. (2018) kullandıkları soğuk şok ekspresyon sisteminin *E.coli*' de NoV VLP' leri üretmek için yeni bir yaklaşım olduğunu ve bu sistemin gelecekte düşük maliyetli NoV aşısı geliştirmek için güvenli bir araç olduğunu göstermişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Trypto-Casein Soy Broth (TSB) (Biokar), Trypto-Casein Soy Agar (TSA) (Biokar), Agar-Agar (Condolab), Ampisilin (Penbisin), Kanamisin (Kanovet), Tripton (Condalab), Yeast Extract (Maya Özü) (Biokar), NaCl (AppliChem), Skim-milk (Oxoid, ABD), EDTA (AppliChem), Tris Base (Merck), Borik asit (Bioshop), Tris-HCl (Bioshop), Agaroz (Sigma), SafeView (A.B.M, Kanada), İzopropil β -D-1 Tiyogalaktopiranosid (IPTG) (Thermo Scientific), Fenol-Kloroform-İzoamilalkol (Fluka), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma), Gliserol (Merck), Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (Merck), Amonyum Persülfat (Merck), Akrilamid (AppliChem), N,N'-Metilen-Bis-Akrilamid (AppliChem), β -Merkaptoetanol (Merck), Bromfenol blue (Merck), Glisin (Biorad), TEMED (Fluka), Coomasie Blue (Merck), Etil Alkol (Tekkim), Fosforik Asit (H_3PO_4) (Tekkim), Sığır Serum Albumin (BSA) (Biotium), Glasiyel Asetik Asit (Tekkim), İsopropil Alkol (Tekkim), Sodyum Hidroksit (Merck), Hidroklorik Asit (Merck), Monosodyum Fosfat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Sigma), İmidazol (Sigma), Amonyum Sülfat (Merck), Sükroz (Carlo-Erba), Fosfat Tamponlu Tuz (PBS) (Biomatik), Tween-20 (Sigma), Kazein (Sigma), Taq Polimeraz, dNTP, MgCl_2 , PCR Tamponu (Thermo Scientific), FastDigest HindIII, FastDigest EcoRI, FastDigest BamHI, FastDigest NotI, FastDigest XhoI ve FastDigest XbaI, FastDigest Tamponu, T4 DNA Ligaz ve T4 DNA Ligaz Tamponu (Thermo Scientific)

3.1.2. Klonlama Vektörleri ve Kompetan Hücre

Klonlamada kullanılmak üzere pET30-a (+) ekspresyon vektörü ile kompetan hücre olarak *Escherichia coli DH10B* ve *BL21* kullanılmıştır.

3.1.3. Besiyerleri

Trypto-Casein Soy Broth (TSB)

Tripton	17 g/L
Soya pepton	3,0 g/L
Glukoz	2,5 g/L
K ₂ HPO ₄	2,5 g/L
NaCl	5,0 g/L

40 g ortam 1 L distile suda çözülür. 121°C' de, 1 atm basınç altında, 15 dakika otoklavlanır. Bakteri kültürünün geliştirilmesinde kullanılmıştır.

Trypto- Casein Soy Agar (TSA)

Tripton	15 g/L
Soya pepton	5,0 g/L
NaCl	5,0 g/L
Agar	15 g/L

40 g ortam 1 L distile suda çözülür. 121 °C' de, 1 atm basınç altında, 15 dakika otoklavlanır. 45 °C' ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülür. Bakteri kültürünün geliştirilmesinde kullanılmıştır.

AXI Seçici Besiyeri

Önceden hazırlanmış TSA besiyeri 50 °C' ye kadar soğutulduktan sonra final konsantrasyonu ampisilin (100 µg/mL), IPTG (1 mM) (Thermo Scientific, ABD), X-Gal (50 µg/mL) (Thermo Scientific, ABD) olacak şekilde ampisilin, IPTG ve X-Gal eklenmiştir. İyice karıştırıldıktan sonra steril petrilere 20-25' şer mL olacak şekilde dökülmüştür. Mavi-beyaz koloniler için seçici besiyeri olarak kullanılmıştır.

Kanamisin Seçici Besiyeri

TSA' dan 12 g tartılıp 300 mL distile suda çözüldükten sonra 121 °C' de, 1 atm basınç altında, 15 dakika otoklavlanır. 50 °C' ye kadar soğutulduktan sonra 300 µL 50 mg/mL'lik kanamisin

solüsyonundan eklenir ve homojenize edilir. Steril petrilere 20-25' şer mL olacak şekilde dökülür. Rekombinant kolonilerin görüntülenmesi ve izolasyonunda kullanılmıştır.

2X YT Ortamı

Tripton	16 g
Maya özütü	10 g
NaCl	5 g

Besiyeri içeriğindeki maddeler, 1 L distile suda çözülür. 121°C' de, 1 atm basınç altında, 15 dakika otoklavlanır. Protein üretim denemelerinde bakterilerin üretilmesi amacıyla kullanılmıştır.

3.1.4. Çözeltiler ve Ayıraçlar

Skim milk çözeltisi

Skim milk tozu distile su içerisinde %10' luk bir karışım olarak hazırlanır. Hazırlanan çözelti 110 °C' de 5 dakika süreyle otoklavda steril edilir. İzolatların -20 ve -80 °C' de muhafaza edilmesinde kullanılır.

EDTA (0,5M)

186,1 g disodyum EDTA üzerine 800 mL distile su eklenerek manyetik karıştırıcıda çözülene kadar karıştırılır. NaOH ile pH 8' e ayarlandıktan sonra 1000 mL' ye tamamlanıp 121 °C' de 15 dakika otoklavlanır.

Tris (1M)

121 g Tris Base 800 mL distile suda eritilip, HCl asit ilave edilerek pH:7,4' e ayarlanarak karışım 1000 mL' ye tamamlanır. 121 °C' de 15 dakika otoklavlanır.

NaCl (5M)

146,1 g NaCl tartılıp 450 mL distile suda çözülür. Son hacim 500 mL' ye tamamlanır.

TBE (Tris-Borik Asit-EDTA, pH:8) Tamponu (10x)

Tris Base	121,1 g
Borik Asit	61,83 g
EDTA	5,84 g

Tris base, Borik asit ve EDTA tartılarak üzerine 800 mL distile su eklenir. Manyetik karıştırıcıda çözünen karışımın pH' sı 8' e ayarlanır ve üzeri 1000 mL' ye tamamlanır. 121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilir. Agaroz jel elektroforezinde 20 kat sulandırılarak kullanılır.

Agaroz jel (%1)

Agaroz	1 g
0.5XTBE tamponu	100 mL
Safeview	10 µL

1 g agaroz üzerine 100 mL 0.5X TBE tamponu eklenerek mikrodalga fırında çözülmesi için kaynatılır. 50-60 °C' ye kadar soğutulduktan sonra, içerisine 10 µL Safeview eklenir, jel tablasına dökülür. Genomik/ plazmid DNA ve amplikonun görüntülenmesinde kullanılır.

Marker

Marker olarak PstI enzimi ile kesilmiş lambda faj DNA'sı kullanılmıştır.

PstI Enzimi ile Kesilmiş Lambda Faj DNA'sının Hazırlanışı:

λ DNA (Fermentas)	30 µL
10X Buffer	30 µL
PstI enzimi (Fermentas)	4 µL
Enjeksiyonlu distile su	236 µL

Karışım, 1 saat 37 °C' de bekledikten sonra 30 µL loading dye eklenir. Her elektroforez reaksiyonu için 5 µL kullanılır (Anderesson, 2009).

Tris-EDTA (TE) Tamponu (10mM Tris+ 1mM EDTA)

Tris-HCl (1 M, pH:8)	0.5 mL
EDTA (0,5 M, pH:8)	0,1 mL
Distile su	49,4 mL

Tris-EDTA tamponu, 45 mL distile su üzerine stoktan alınan Tris ve EDTA çözeltileri eklendikten sonra 50 mL' ye tamamlanır. 121 °C' de, 1 atm basınç altında 15 dakika otoklavlanır. TE tamponu, izolasyonun son aşamasında DNA veya RNA' yı çözdürmek için kullanılır.

IPTG Stok Çözeltisi (0.1M)

1,2 g IPTG tartılarak üzerine son hacim 50 mL olana kadar distile su ilave edilir. Karışım tamamen çözüldürüldükten sonra 0.22 µm por çaplı filtreden süzülerek, 4 °C' de saklanır. Rekombinant protein üretiminin indüklenmesi için ve AXI besiyeri içeriğinde kullanılır.

CaCl₂ Stok Çözeltisi (1M)

CaCl ₂ .2H ₂ O	58,8 g
Distile su	500 mL

Karışımın çözünmesi sağlandıktan sonra 121 °C' de 15 dakika otoklavlanır. 0.1mM konsantrasyonunda seyreltilerek kimyasal transformasyon için kullanılır.

MgCl₂ Stok Çözeltisi (1M)

MgCl ₂ .6H ₂ O	101,65 g
Distile su	500 mL

Karışımın çözünmesi sağlandıktan sonra 121 °C' de 15 dakika otoklavlanır. 0,1mM konsantrasyonunda seyreltilerek kimyasal transformasyon için kullanılır.

Gliserol Çözeltisi (%10)

Gliserol	100 mL
Distile su	900 mL

Karışımın çözünmesi sağlandıktan sonra 121 °C' de 15 dakika otoklavlanır. Kimyasal transformasyon için kullanılır.

SDS-PAGE Ayırma jeli tamponu (1,5M Tris- HCl)

Tris- baz	9,085 g
Distile su	50 mL

9,085 g Tris 45 mL saf suda çözülür ve pH' sı 8,8' e ayarlanır. Hacmi 50 mL' ye tamamlanır ve +4 °C' de saklanır. SDS-PAGE elektroforezinde ayırma jelinin hazırlanmasında kullanılır.

SDS-PAGE Yoğunlaştırma jeli tamponu (1M Tris-HCl)

Tris-HCl	6,057 g
Distile su	50 mL

6,057 g Tris 45 mL saf suda çözülür ve pH' sı 6,8' e ayarlanır. Hacmi 50 mL' ye tamamlanır ve +4 °C' de saklanır. SDS-PAGE elektroforezinde yoğunlaştırma jelinin hazırlanmasında kullanılır.

SDS Stok Çözeltisi (%10)

SDS	1 g
Distile su	10 mL

1 g SDS tartılıp 10 mL distile su içerisinde çözülür. pH' sı 6,6 olacak şekilde ayarlanır. SDS-PAGE elektroforezinde ayırma (separation) ve yoğunlaştırma (stacking) jeline kullanılır.

APS (%10)

APS	1 g
Distile su	10 mL

1 g APS tartılıp 10 mL distile suda çözülür. SDS-PAGE elektroforezinde ayırma (separation) ve yoğunlaştırma (stacking) jelinde kullanılır.

Akrilamid/ Bisakrilamid (%30)

Akrilamid	29,2 g
N,N'-metilen-bis-akrilamid	0,8 g

Akrilamid az miktar distile suda çözülür. Akrilamid tamamen çözüldükten sonra, bisakrilamid eklenir, çözülmesi sağlanır ve son hacim 100 mL' ye tamamlanır. Çözelti filtre kağıdından süzülür. SDS-PAGE yönteminde ayırma ve yoğunlaştırma jelinin hazırlanmasında kullanılır.

Gliserol Çözeltisi (%80)

Gliserol	80 mL
Distile su	20 mL

80 mL gliserolün hacmi 100 mL' ye tamamlanır. SDS-PAGE yükleme çözeltisinde kullanılır.

2X Laemmlı Örnek Yükleme Tamponu

1 M Tris-HCl (pH 6,8)	1.25 mL
%10 SDS	4.0 mL
Gliserol	2.0 mL
β -merkaptoetanol (14,3M)	0.2 mL
Bromfenol blue	4 mg

Son hacim 10 mL'ye tamamlanır. SDS-PAGE elektroforezlerinde örnek tamponu olarak kullanılmıştır.

Örnek Yürütme Tamponu

Glisin	7,2 gr
Tris	1,5 gr
%10 SDS	10 mL

7,2 g glisin ve 1,5 g Tris yaklaşık 480 mL saf suda çözüldükten sonra üzerine 10 mL SDS (%10) çözeltisi ilave edilir. pH 8,3' e ayarlanır ve çözeltinin hacmi 500 mL' ye tamamlanır.

SDS-PAGE Ayırma Jeli İçeriği (6 mL) (%12,5)

Distile su	2455 µL
Ayırma jeli tamponu	1500 µL
Akrilamid/Bisakrilamid (%30)	1875 µL
SDS (%10)	60 µL
TEMED	10 µL
Amonyum per sülfat (%10)	100 µL

Tablodaki çözeltiler sırayla eklenerek Falcon tüpte karıştırılır. En son TEMED ve amonyum per sülfat eklenir. SDS-PAGE elektroforezinde (alt jel) ayırma jeli olarak kullanılmıştır.

SDS-PAGE Yoğunlaştırma jeli içeriği (4 ml) (%4)

Distile su	2422 µL
Yoğunlaştırma jeli tamponu	1000 µL
Akrilamid/Bisakrilamid (%30)	488 µL
SDS (%10)	40 µL
TEMED	10 µL
Amonyum per sülfat (%10)	40 µL

Tablodaki çözeltiler sırayla eklenerek Falcon tüpte karıştırılır. En son TEMED ve amonyum per sülfat eklenir. SDS-PAGE elektroforezinde (üst jel) yoğunlaştırma jeli olarak kullanılmıştır.

Coomassie Brilliant Blue G250 çözeltisi

Coomassie Brilliant Blue G250	100 mg
% 95'lik etil alkol	50 mL
%85'lik fosforik asit	100 mL

100 mg Coomassie Brilliant Blue G250 50 mL % 95' lik etil alkolde çözülür. Çözelti daha sonra 100 mL % 85' lik fosforik asitle karıştırılır ve hacmi distile su ile 1 L' ye tamamlanır. Boya çözeltisi daha sonra filtre kağıdından süzülür. % 0,025 konsantrasyonda olacak şekilde seyreltilerek protein tayininde bantların boyanması için kullanılmıştır.

Protein standartlarının hazırlanışı

Protein standardı olarak BSA (Bovine Serum Albumin) kullanılmıştır. BSA' nın 10 mg/mL' lik stok çözeltisi hazırlanarak, standart çözeltiler bu stoktan 0,05-1 mg/mL olacak şekilde ultra saf su ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

SDS-PAGE Boya giderme (destaining) çözeltisi

Asetik asit	100 mL
Distile su	900 mL

SDS-PAGE elektroforezinden sonra, jellerdeki boyanın giderilmesi için %10' luk asetik asit çözeltisi kullanılmıştır.

NaH₂PO₄ (1M)

13,799 g NaH₂PO₄ 90 mL distile suda çözülür. Son hacmi 100 mL' ye tamamlanır. Protein saflaştırma çalışmalarında kullanılmıştır.

İmidazol (5M)

17 g imidazol tartılıp 40 mL distile suda çözülür. Üzeri 50 mL' ye tamamlanır. Protein saflaştırma çalışmalarında kullanılmıştır.

IMAC Liziz tamponu

NaCl (5M)	6 mL (300mM)
NaH ₂ PO ₄ (1M)	5 mL (50mM)
İmidazol (5M)	100 µL (5mM)

Tablodaki çözeltiler 80 mL distile suya eklendikten sonra pH:8' e ayarlanır. Son hacmi 100 mL' ye tamamlanır. Protein saflaştırma çalışmalarında kullanılmıştır.

IMAC Yıkama tamponu

NaCl (300mM)	24 mL
NaH ₂ PO ₄ (50mM)	20 mL

Tablodaki çözeltiler 350 mL distile suya eklendikten sonra pH:8' e ayarlanır. Son hacmi 400 mL' ye tamamlanır. Protein saflaştırma çalışmalarında kullanılmıştır.

IMAC Elüsyon tamponu

NaCl (300 mM)	12 mL
NaH ₂ PO ₄ (50 mM)	10 mL
İmidazol (500 mM)	20 mL

Tablodaki çözeltiler 150 mL distile suya eklendikten sonra pH:8' e ayarlanır. Son hacmi 200 mL' ye tamamlanır. Protein saflaştırma çalışmalarında kullanılmıştır.

Fosfat Tamponu (20mM)

Na ₂ HPO ₄	1,52 g
NaH ₂ PO ₄	1,12 g

Tablodaki miktarlardaki kimyasallar tartılıp 850 mL distile suda çözülür. pH:7' ye ayarlandıktan sonra son hacmi 1 L' ye tamamlanır. 121 °C' de 15 dakika otoklavlanır. Diyaliz işlemi için kullanılmıştır.

PBS (pH:7,4)

10 adet PBS tableti 1L disitile su içerisinde çözülerek pH' sı 7,4' e ayarlanır. 121 °C' de 15 dakika otoklavlanır. İmmünoanalizlerde (ELISA), protein pH' ını korumak, proteinleri ve peptit numunelerini çözmek için kullanılmıştır.

PBS- Tween 20 (%0,05 v/v) (PBS-T)

Tween-20	0.25 mL
PBS	500 mL

İmmünoanalizlerde (ELISA) yıkama amaçlı kullanılmıştır.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Norovirüs Antijenik Bölgelerin Temini

Norovirus yapısal proteinlerinden Viral Protein-1 (VP1), Viral Protein-2 (VP2) ve yapısal olmayan proteinin (p22) aminoasit dizilerine <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> sitesinden GU445325.2 numarasıyla ulaşılmıştır. Norovirüs genomu üzerindeki p22' nin aminoasit dizisi yeşil, VP1'in sarı ve VP2' nin mavi renk ile gösterilmiştir.

Norovirus Hu/GII.4/New Orleans1805/2009/USA, Complete Genome

GenBank: GU445325.2

```
LOCUS      GU445325          7559 bp    RNA      linear    VRL 18-AUG-2011
DEFINITION Norovirus Hu/GII.4/New Orleans1805/2009/USA, complete genome.
ACCESSION  GU445325
VERSION    GU445325.2
SOURCE     Norovirus Hu/GII.4/New Orleans1805/2009/USA
  ORGANISM Norovirus Hu/GII.4/New Orleans1805/2009/USA
            Viruses; Riboviria; Orthornavirae; Pisuviricota;
            Pisoniviricetes; Picornavirales; Caliciviridae; Norovirus.
FEATURES             Location/Qualifiers
     source            1..7559
                       /organism="Norovirus Hu/GII.4/New
                       Orleans1805/2009/USA"
                       /mol_type="genomic RNA"
                       /strain="Hu/GII.4/New Orleans1805/2009/USA"
                       /isolation_source="stool"
```

5' UTR 1..4
CDS 5..5104
/codon_start=1
/product="non-structural polyprotein"
/protein_id="ADD10374.2"

/translation="MKMASNDASAAAVANSNDDTAKSSSDGVLSSMAVTFKRALGARP
KQPPPREKPKQPPRPPTPELVKNI PPPPPNGEDEIVVSYSVKDGVSGLPDLSTVRQPE
ESNTAFSVPPLNQRENRAKEPLTGTILEMWDGEIYHYGLYVERGLVLGVHKPPAAIS
LAKVELAPLSLYWRPVYTPQYLISPDTLKKLSGETFPYTAFDNNCYAFCCWVLDLND
WLSRRMIQRTTGFFRPYQDWRKPLPTMDDSKI KKVANIFLCALSSLFTRPIKDIIGK
IRPLNILNILASCDWTFAGIVESLILLAE LFGVFWTPPDVSAMIAPLLGDYELQGPED
LAVELVPVVMGGIGLVGFTKEKIGKMLSSAASTLRACKDLGAYGLEILKLVMKWFFP
KKEEANELAIVRSIEDAVLDLEAIENNHMTLLKDKDSLATYMR TLDLEEEKARKLST
KSASPDIVGTINALLARIAAARSLVHRAKEELSSRPRPVLMISGRPGIGK'THLAREV
AKRIAASLTGDQRVGLIPRNGVDHWDAYKGERVVLWDDYGMSNPIHDALRLQELADTC
PLTLNCDRIENKGVFSDSVIIITTNLANPAPLDYVNF EACSRRIDFLVYAEAPEVEK
AKRDFPGQPMWKNAFSSDFSHIKLALAPQGGFDKNGNTPHGKGV MKTLTTGSLIARA
SGLLHERLDEFELQGPALTTFNDRNKVLAFRQLAAENKYGLIDTMRV GKQLKDVRTM
PELKQALKNVSIKKCQIVYSGCTYILESDGKGNVKVDRIQSAAVQTNNELAGALHHLR
CARIRYYVKCVQEALYSIQIAGAAFVTRITKRMNIQDLWSK PQVENTEETTSKDG
PKPKDDEEFVISSDDIKTEGKKGKNKTGRGKKHTAFSSKGLSDEEYDEYKRIREERN
KYSIEEYLQDRDKYEEVAIARATEEDFCEEEEEAKIRQRIFRPTRKQRKEERASLGLV
TGSEIRKRNPDDFKPKGKLWADDDRSVDYNEKLSFEAPPSIWSRIVNFGSGWGFVWSP
SLFITSTHVI PQGAKEFFGVPIKQIQVHKSGEFCRLRFPKPIRTDVTGMILEGAPEG
TVVTLLIK RSTGELMPLAARMGTHATMKIQGR TVGGQMGMLLTGSNAKSMDLGTTPGD
CGCPYIYKRGNDYV VIGVHTAAARGNTVICATQ GSEGEATLEGGDNKGT YCGAPILG
PGSAPTLSTKTKFWRSSSTASLPPGTYEPAYLGGKDP RVKGGPSLQQVMREQLKPFTEP
RGKPPKPSVLEAAKKTIIINVLEQTIDPPEKWSFAQACASLDKTTSSGHPHMRKND CW
NGESFTGKLADQASKANLMFEEGKNMTPVYTAALKDELVKTDKIYGKIKRLLWGS DL
ATMIRCARA FGLMDELKAHCVTLP IRVGMNMNEDGPIIFERHSRYTYHYDADYSRWD
STQQRAVLAAA LEIMVKFSPEPHLAQVVAEDLLSPSVVDVGDFTISINEGLPSGVPCT
SQWNSIAHWLLTLCALSEVTNLS PDTIQANSLSFSYGDDEIVSTDIKLDPEKLTAKLR
EYGLKPTRPKTEGPLVISED LNGLTFLRRTVTRDPAGWFGKLEQSSILRQMYWTRGP
NHGDPSETMIPHSQRPIQLMSLLGEAALHGPAFYSKISKLVIAELKEGGMDFYVPRQE
PMFRWMRFS DLSTWEGDRNLAPS FVNEDGVE"

CDS 5085..6707
/note="VP1"
/codon_start=1
/product="major capsid protein"

/protein_id="ADD10375.1"

/translation="MKMASSDANPSDGSTANLVPEVNNEVMALEPVVGAAIAAPVAGQ
QNVIDPWIRNNEVQAPGGFEFTVSPRNAPGEILWSAPLGPDLNPYLSHLARMYNGYAGG
FEVQVILAGNAFTAGKIIFAAVPPNFPTEGLSPSQVTMFPHIIVDVRQLEPVLIPLPD
VRNNFYHYNQSNDSSTIKLIAMLYTPLRANNAGDDVFTVSCRVLTRSPDFDFIFLVPP
TVESRTKPFVSVPLTVEEMTNSRFPIPLEKLEFTGPSSAFVVQPQNGRCTTDGVLLGTT
QLSPVNICFRGDVTHIPGSRNYTMNLASQNWNSYDPTEEIPAPLGTPDFVVGKIQGVL
TQTRTNGSTRGHKATVYTGSADEFSPKLGRVQFATDNDNFETNQNTKFTPVGVIQDG
STTPRNEPQQWVLPSSYGRNIHNVHLAPAVAPTFFGEQLLFFRSTMPGCSGYPNMDLD
CLLPQEWVQYFYQEAAAPAQSDVALLRFVNPDTGRVLFECKLHKSGYVTVAHGQHDLV
IIPNGYFRFDSWVNQFYTLAPMGNGTGRRRAL"

CDS 6707..7513
/note="VP2"
/codon_start=1
/product="minor capsid protein"
/protein_id="ADD10376.1"

/translation="MAGAFFAGLASDVLGSGGLGSLINAGAGAINQKVEFENNRKLQQA
SFQFSSNLQOASFQHDKEMLQAQIEATKKLQOEMMRVKQAMLLEGGFSETDAARGAIN
APMTKTLDWSGTRYWAPDARTTTYNAGRFSTPQPSGALPGRANLRATVPARGSSSTSS
NSSIATSVNSNQTTSTRLGSTAGSGTSVSSPPSTARTRSWVEDQNRNLSPFMRGAHNI
SFVTPPSSRSSSQGTVSTVPKEVLDSWTGAFNTRRQPLFAHIRKRGESRV"

3'UTR 7514..7559

Bu aminoasit dizilerinden yola çıkarak proteinleri kodlayan nükleik asit dizileri belirlenmiştir.

ORIGIN

```
1 gtgaatgaag atggcgtcta acgacgcttc cgctgccgct gttgctaaca gcaacgacga
61 caccgcaaaa tcttcaagtg acggagtgct ttctagcatg gctgtcactt tcaaacgagc
121 cctcggggcg cggcctaaac agcctcccc gagggaaaaa ccacaaagac cccacgacc
181 acctactcca gaactggtta aaaatattcc ccctccccca cccaacggag aggatgaat
241 agtggtttct tatagtgtca aagatggtgt ttccggcttg cctgacctt ccaccgtcag
301 gcaaccggaa gaatctaaca cggcctcag tgcctcca ctcaatcaga gggagaatag
361 agatgctaag gagccactta ctggaacaat tctggaaatg tgggacggg aaatctacca
421 ttatggcctg tatgtggagc gaggtctgt attaggtgtg cataaaccac cagctgcat
481 cagcctcgct aaggttgagc tagcaccact ctcttgtagc tggagacctg tgtactcc
541 tcagtacctc atctctccag aactctcaa gaaattatcc ggagaaacgt tcccctacac
601 agcctttgac aacaactgtt atgcctttg ttgctgggtc ctggacctaa atgactcgtg
661 gctgagcagg agaatgatcc agagaacaac tggtttcttc aggcctacc aagattggaa
721 taggaaaccc cttcccacta tggatgactc caaaataaag aaggtagcta acatattcct
781 gtgtgctctg tcctcgctgt tcaccagacc cataaaagat ataataggga agataaggcc
841 tcttaacatc ctcaacatct tagcctcatg tgattggact tttgcaggca tagtggagtc
901 cctgatactc ttggcagaac tctttggagt tttctggaca ccccagatg tgtctgcat
```

961 gattgcccc ttacttgggtg actacgagct acaaggacct gaggaccttg cagtggagct
 1021 cgtccccgtg gtgatggggg gaattggttt ggtgctagga ttcaccaaag agaagattgg
 1081 gaaaatgttg tcatctgctg cgtccacctt gagagcttgt aaagaccttg gtgcatatgg
 1141 gctagagatc ctaaagtgtg tcatgaagtg gttcttcccg aagaaggagg aggcaaatga
 1201 gctggctata gtgaggtcta tcgaggatgc agtcctggat ctcgaggcaa ttgaaaacia
 1261 ccatatgacc accttgctca aagacaaaga cagcctggca acctatatga gaacacttga
 1321 ccttgaggag gagaaaagcca ggaaactctc aaccaagtct gcctcaccgg acatcgtggg
 1381 cacaatcaac gccctcctgg cgagaatcgc tgccgcacgt tctctgggtg atcgagcgaa
 1441 ggaggagctt tccagcagac caagacctgt ggtgttgatg atatcaggca ggccagggaat
 1501 aggggaagacc cacctcgcta ggggaagtggc taagagaatc gcagcctccc ttacaggaga
 1561 ccagcgtgtg ggctcatcc cacgcaatgg cgtcgacat tgggatgctg acaaggggga
 1621 gagggctgct ctatgggacg attatggaat gagcaacctt attcacgatg ccctcaggct
 1681 gcaagaactc gctgacactt gccccctcac tctaaactgt gacaggattg aaaataaagg
 1741 aaaggtcttt gacagcgtatg tcatcattat caccactaat ctggccaacc cagcaccact
 1801 ggactatgtc aactttgaag catgctcgag gcgcatcgac ttctctgtgt atgcagaagc
 1861 ccctgaagtc gaaaaggcga agcgtgactt cccaggccag cctgacatgt ggaagaacgc
 1921 tttcagttct gattttctcac acataaaact agcactggcc ccacagggtg gtttcgacia
 1981 gaacgggaac accccacacg gaaagggcgt catgaagact ctcaccactg gctcccttat
 2041 tgccccgggca tcagggctac tccatgagag gttagatgaa tttgaactac agggcccagc
 2101 tctcaccacc ttcaatttctg atcgcaataa agtgcttgcc tttagacagc ttgctgctga
 2161 aaataaatat gggttgatag acacaatgag agttgggaaa cagctcaagg atgtcagaac
 2221 catgccagaa ctcaaaacaag cactcaagaa tgtctcaatc aagaagtgcc aaatagtgtg
 2281 tagtggttgc acctacatac ttgagtctga tggcaagggc aatgtgaaag ttgacagaat
 2341 ccaaagcgcc gccgtgcaga ccaacaatga gctggctggt gccctgcacc atttgagggtg
 2401 cgccagaatc agatactacg tcaagtgtgt ccaggaggcc ctgtattcca tcattcaaat
 2461 tgctggggct gcatttctca ccacgcgat taccaagcgc atgaacatac aagacctatg
 2521 gtccaagcca caagtggaaa acacagagga gactaccagc aaggacgggt gcccaaaacc
 2581 taaggatgat gaggagtttg tcatttcatc cgacgacatc aaaactgagg gtaagaaagg
 2641 gaagaacaaa actggccgcg gcaagaagca cacagcattt tcaagcaaag gcctcagtga
 2701 tgaagagtac gatgagtaca agaggattag agaagaaagg aatggcaagt actccataga
 2761 agagtacctt caggacaggg acaaatacta tgaggaggtg gccattgcca gggcgactga
 2821 ggaagacttc tgtgaagagg aggaggccaa gatccggcaa aggatcttta ggccaacaag
 2881 gaaacaacgc aaggaggaaa gagcctctct cggctctggtc acaggctctg aaattagga
 2941 aagaaaccca gatgacttca aaccaaggg gaaattgtgg gctgacgatg acaggagtgt
 3001 ggactacaat gagaaactca gttttgaggc cccaccaagc atctggtcga gaatagtcaa
 3061 ctttggttca ggctggggat tctgggtctc ccccagtctg ttcataacat caaccatgt
 3121 cataccccag ggcgcaaagg agttctttg agtccccatc aaacaatac aggtacacia
 3181 gtcaggcgag ttctgtcgct tgagattccc aaaccaatc aggactgatg tgacgggcat
 3241 gatcttagaa gaaggcgcac ctgagggcac cgtggtcaca ctactcatca aaaggtccac
 3301 tggggaactc atgccctag cagctaggat ggggacccat gcgacatga agatccaagg
 3361 gcgcaactgt ggaggccaga tgggcatgct tctgacagga tccaacgcca agagcatgga
 3421 cctgggtact acaccagggtg attgtggctg cccctatatc tacaagagag gcaatgacta
 3481 tgtggtcatt ggagtccaca cggctgccgc acgtggggga aacctgtca tatgtgccac
 3541 ccaggggagt gaaggagagg ctacacttga aggtggtgac aacaagggga cactactgtg

3601 tgcaccaatc ctaggcccag ggagtgcccc aacacttagc accaagacca aattctggag
3661 atcgtccaca gcatcactcc cacctggcac ctatgaacca gcctatcttg gtggcaagga
3721 ccctagagtc aagggtggcc cttcactgca gcaagtcatg agggaacagt tgaagccatt
3781 cacagagcca aggggcaagc caccaaaacc aagtgtatta gaagctgcca agaagaccat
3841 catcaatgtc cttgagcaaa caattgatcc acctgagaaa tggtcgttcg cacaagcttg
3901 cgcgtccctt gacaagacca cttccagtgg tcatccgcac cacatgcgga aaaacgactg
3961 ctggaacggg gagtccttca caggcaagct ggagaccag gcttccaagg ccaacctgat
4021 gtttgaagaa ggaagaaca tgaccccagt ctacacagct gcgctcaagg atgagttagt
4081 taaaactgac aaaatttatg gtaagatcaa gaagaggctt ctctggggct cggacttggc
4141 gaccatgatc cgggtgtgctc gggcattcgg aggcctaag gatgaactca aagcacactg
4201 tgtcacactt cccattagag ttggcatgaa tatgaatgag gatggcccca tcatcttoga
4261 gaggcattcc aggtacacat atcactatga tgctgattac tctcgatggg attcaacaca
4321 acagagagcc gtgttggcag cagctctgga aatcatggtt aaattctccc cagaaccaca
4381 tttggctcag gtagtcgcgg aagaccttct ttctcctagc gtgggtggagc tgggagactt
4441 cacaatatca atcaacgagg gtcttccctc tggggtgccc tgtacctccc aatggaactc
4501 catgcccac tggcttctca ctctctgtgc gctctctgaa gtcacaaacc tatcccctga
4561 taccatacag gctaactccc tcttctcttt ttatgggtgat gatgaaattg ttagcacaga
4621 cataaaattg gaccagaga aattgacagc aaagctcaga gaatatgggt taaaaccaac
4681 ccgcccagc aaaactgaag gacccttgt catctctgaa gacctgaatg gcctaacttt
4741 cctgaggaga actgtgaccg gcgaccagc tgggttggttt ggaaaactgg agcagagttc
4801 aatactcagg caaatgtact ggactagggg tccaacat ggagaccat ctgaacaat
4861 gattccacac tcccaaagac ccatacaatt gatgtcccta ctgggggagg ccgctctcca
4921 cggcccagca ttttacagta aaatcagcaa attggtcatt gcagagctaa agaaggtgg
4981 catggatttt tacgtgcccga gacaagagcc aatgttcaga tggatgagat tctcagatct
5041 gagcacgtgg gagggcgatc gcaatctggc tcccagtttt gtgaatgaag atggcgtcga
5101 gtgacgcaa cccatctgat ggtccacag ccaacctcgt ccagaggtc aacaatgagg
5161 ttatggcttt ggagccgta gttggtgccc ccattgcggc acctgtagcg ggccaacaaa
5221 atgtaattga cccctggatt agaaacaatt ttgtacaagc ccctggtgga gagtttacag
5281 tatcccctag aaacgctcca ggtgaaatac tatggagcgc gcccttaggc cctgatttga
5341 atccctacct ttcccatttg gccagaatgt acaatggta tgcaggtggg tttgaagtgc
5401 aggtaatcct cgcggggaac gcgttcaccg ccgggaaaat catatttgca gcagtccac
5461 caaatttccc aactgaaggt ttgagcccca gccaaagtcac tatgttcccc cacataatag
5521 tagatgttag gcaattggaa cctgtgttga tccccttacc cgatgttagg aataatttct
5581 accattataa tcaatcaaat gactccacca tcaattgat agcaatgttg tacacaccac
5641 ttagggctaa taatgccggg gacgatgtct tcacagtttc ttgtcgagtt ctcacgagac
5701 catccccoga ttttgatttc atatttttg tgccaccac agttgatca agaactaaac
5761 cattctctgt cccagtttta actgttgagg agatgaccaa ttcaaggttc ccatttctt
5821 tggaaaagtt gttcacgggc cccagtagtg cttttgtgt tcaaccacaa aacggcaggt
5881 gcacgactga tggcgtgctc ctaggtaacta cccaactgct tctgtcaac atctgcacct
5941 tcagagggga tgtcacccat attccaggca gtctgtaacta cacaatgaat ttggcctccc
6001 aaaattggaa cagttacgat ccaacagaag aaatcccagc ccctctagga actccagatt
6061 tcgtggggaa gattcaaggt gtgctcacc aaaccacaag gacaaatggc tcgaccgagc
6121 gccacaaagc tacagtgtac actgggagcg ccgacttttc tccaaaactg ggtagagttc
6181 aatttgccac tgacacagac aatgattttg aaactaacca aacacaaaag ttcaccccag

```
6241 tcggtggttat ccaggatggt agtactaccc cccgaaatga accccaacaa tgggtgctcc
6301 caagttactc aggcagaaac attcataatg tgcacctggc ccccgctgta gccccactt
6361 tcccggggcga gcagctcctc ttcttcagat ctactatgcc cggatgcagc ggtacccca
6421 acatggactt ggactgtctg ctccccagg aatgggtgca gtacttctac caggaggcag
6481 ccccagcaca atctgatgtg gctctgttaa gatttgtgaa tccagacaca ggtagggttt
6541 tgtttgagtg taagcttcat aaatcaggct atgttacagt ggctcacact ggccaacatg
6601 acttggttat ccccccaat ggttatttta gatttgattc ctgggtcaac cagttctaca
6661 cacttgcccc catgggaaat gggacggggc gtagacgtgc attataatgg ctggagcttt
6721 ctttgctgga ttggcatctg acgtccttgg ctctggactt ggttcctaa tcaatgctgg
6781 ggctggggcc atcaaccaa aagttgaatt tgaaaataac agaaaattgc aacaagcttc
6841 cttccaattt agtagcaatc tacaacaggc ttctttcaa catgacaaag agatgctcca
6901 agcacaaatt gaggccacca aaaagttgca acaggaaatg atgagagtta aacaagcaat
6961 gctcctagag ggtggattct ctgagacaga tgcagcccgt ggagcaatca acgccccat
7021 gacaaaaact ttggactgga gcgggacaag gtactgggct cccgatgcta ggactacaac
7081 atataatgca ggccgctttt ccaccctca accctcgggg gcactaccag gaagagccaa
7141 tcttagggct actgtccccg cccggggttc ctctagcacg tcttctaact cttctattgc
7201 tacttctgtg aattcaaatc aaaccacctc aacgagactt ggttctacag ctggttctgg
7261 taccagtgtc tcgagcccc cgtaactgc aaggactagg agctgggttg aggatcaaaa
7321 taggaatttg tcacctttta tgaggggggc ccacaacatc tcgtttgca cccaccatc
7381 tagcagatcc tctagccaag gcacagtctc aaccgtgcc aaagaagttt tggactcctg
7441 gactggcgct ttcaacacgc gcaggcagcc tctcttcgct cacattcgca agcgagggga
7501 gtcacgggtg taatgtgaaa agacaaaatt gattatcttt cttttcttca gtgtctttc
```



//

VP1, VP2 ve p22 genleri <http://sysbio.unl.edu/SVMTriP/result.php> online programı kullanılarak analiz edildikten sonra proteinlerin epitop haritaları elde edilmiştir (Şekil 3.1, 3.2 ve 3.3).

Protein sequence used for prediction:

MKMASSDANPSDGSSTANLVPEVNNEVMALEPVVGAIAAPVAGQQNVIDP
WIRNNFVQAPGGEFTVSPRNAPGEILWSAPLGPDLNPYLSHLARMYNGYA
GGFEVQVILAGNAFTAGKIIFAAVPPNFPTEGLSPSQVTMFPHIIVDVRQ
LEPVLIPLPDVRNNFYHYNQSNDSSTIKLIAMLYTPLRANAGDDVFTVSC
RVLTRPSPDFDFIFLVPPTVESRTKPFVSVPLTVEEMTNSRFPIPLEKLF
TGPSSAFVQPQNGRCTTDGVLGTTQLSPVNICTFRGDVTHIPGSRNYT
MNLASQNWNSYDPTTEIPAPLGTPDFVVGKIQGVLTQTTRTNGSTRGHKAT
VYTGSADFSKPLGRVQFATDNDNFETNQNTKFTVGVVIQDGSTTPRNEP
QQWVLPYSYSGRNIHNHVLAPAVAPTFFGEQLLFFRSTMPGCSGYPNMDLD
CLLPQEWVQYFYQEAAPAQSDVALLRFVNPDTGRVLFECKLHKSGYVIVA
HTGQHDLVIPPNGYFRFDSWVNQFYTLAPMGNGTGRRRAL

Epitope predicted inside protein below:

Rank	Location	Epitope	Score	Recommend*
1	191 - 210	AGDDVFTVSCRVLTRPSPDF	1.000	
2	474 - 493	LLRFVNPDTGRVLFECKLHK	0.989	
3	372 - 391	DNDFETNQNTKFTVGVVIQD	0.266	
4	312 - 331	DPTEEIPAPLGTPDFVVGKIQ	0.252	
5	16 - 35	ANLVPEVNNEVMALEPVVGA	0.226	


* The epitopes recommended are labeled by the flags

Şekil 3.1 VP1' e ait olası epitop bölgeleri ve dizileri

Protein sequence used for prediction:

MAGAFFAGLASDVLGSGGLGSLINAGAGAINQKVEFENNRKLOQASFOFSS
NLQOASFQHDKEMLQAQIEATKKLQOEMMRVKQAMLLGEGFSETDAARGA
INAPMTKTLDWSGTRYWAPDARTTTYNAGRSTFPQPSGALPGRANLRATV
PARGSSSTSSNSSIATSVNSNQTSTRLGSTAGSGTSVSSPSTARTRSW
VEDQNRNLSPFMRGAHNISFVTPPSSRSSSQGTVSTVPKEVLDSWTGAFN
TRRQPLFAHIRKRGESRV

Epitope predicted inside protein below:

Rank	Location	Epitope	Score	Recommend*
1	105 - 124	MTKTLDWSGTRYWAPDARTT	1.000	
2	237 - 256	VPKEVLDSWTGAFNTRRQPL	0.647	
3	204 - 223	QNRNLSPFMRGAHNISFVTP	0.591	


* The epitopes recommended are labeled by the flags

Şekil 3.2 VP2' ye ait olası epitop bölgeleri ve dizileri

Protein sequence used for prediction:

MGPALTTFNFRNKVLAFRQLAAENKYGLIDTMRVGKQLKDVRTMPPELQK
ALKNVSIKKCQIVYSGCTYILESDGKGNVKVDRIQSAAVQTNNELAGALH
HLRCARIRYYVKCVQEALYSIIQIAGAAFVTTTRITKRMNIQDLWSKPQVE
NTEETTSKDGCPKPKDDEEFVISSDDIKTE

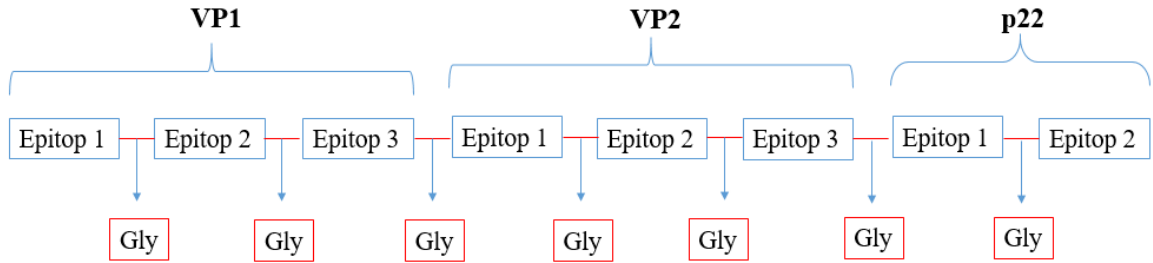
Epitope predicted inside protein below:

Rank	Location	Epitope	Score	Recommend*
1	108 - 127	RYYVKCVQEALYSIIQIAGA	1.000	
2	79 - 98	VKVDRIQSAAVQTNNELAGA	0.923	

* The epitopes recommended are labeled by the flags

Şekil 3.3 p22' ye ait olası epitop bölgeleri ve dizileri

VP1 ve VP2 için üç (en fazla skorlandıktan başlamak üzere ilk üç epitop), p22 için iki epitop bölgesi alınarak bir polipeptid dizisi oluşturulmuştur. Her epitop bölgesi arasına glisin kodlayacak 10 aminoasitlik bir bölge eklenmiştir (Şekil 3.4). Böylece iki protein (VP1 ve VP2) için her bir epitop 20' şer aminoasit olmak üzere üç epitopun toplam aminoasit sayısı $2 \times 20 \times 3 = 120$ ' dir. Diğer protein (p22) için iki epitop 20' şer aminoasitlik olmak üzere $2 \times 20 = 40$ aminoasit toplamda $160 \times 3 = 480$ bazlık bir bölge tasarlanmıştır. Her epitop arasına 10 aminoasitlik glisin bağı eklendiğinden $10 \times 7 = 70$ aminoasit yani sekansı $70 \times 3 = 210$ baz olup toplamda en az $480 + 210 = 690$ bazlık bir fragman *E.coli*' ye göre kodon optimizasyonu yapılmış haliyle sentezlenmek üzere hizmet alımı yapılmıştır. Sentezlenen bu fragman başlangıç kodonu içermektedir ve fragmanın sonuna stop kodonu eklenmiştir.



Şekil 3.4 Epitoplardan oluşan polipeptid (EP123) yapısı

EP123 protein dizisi;

MAGDDVFTVSCRVLTRPSPDFGGGGGGGGGGLLRVFNPDTRVLFECKLHKGGGG
GGGGGGDNDFETNQNTKFTPVGVIQDGGGGGGGGGGMTKLDWSGTRYWAPDAR
TTGGGGGGGGGGVPKEVLDSTWTFANTRRQPLGGGGGGGGGGQNRNLSPFMRGA
HNISFVTPGGGGGGGGGRYYVKCVQEALYSIIQIAGAGGGGGGGGGGGVGVKVDRIQS
AAVQTNNELAGA*

Bu gen dizileri *E. coli* türüne göre kodon optimizasyonu yapılmıştır.

VP1 Optimize Dizisi (Optimize dizi uzunluğu:1623, %GC:58.81)

ATGAAGATGGCGAGCAGCGA TGCGAACCCGAGCGATGGTAGCACC CGAACCTGGTTCCGGAAGTGAACAACGAG
GTGATGGCGCTGGAACCGGTGGTTGGTGCGCGATTGCGGCGCCGGTTGCGGGTCAGCAAAACGTGATCGACCCG
TGGATTTCGTAACAACCTTTGTTCAAGCGCCGGGTGGTGAATTTACCGTGAGCCCGCGTAACGCGCCGGGTGAAATC
CTGTGGAGCGCGCCGCTGGGTCCGACCTGAACCCGTACCTGAGCCACCTGGCGCGTATGTACAACGGCTATGCG
GGTGGCTTCGAAGTGCAGGTTATCCTGGCGGGTAACGCGTTCACCGCGGGTAAAAATCATTTTTGGCGCGGTGCCG
CCGAACCTTCCGACCGAAGTCTGAGCCCGAGCCAGGTTACCATGTTTCCGCACATCATTGTGGATGTTTCGTCAG
CTGGAACCGATGATTCGCTGCGGATGTTTCGTAACAACCTTCTACCCTACAACCAAAGCAACGACAGCACC
ATTAAGCTGATCGCGATGCTGTACACCCCGCTGCGTGCGAACAACGCGGGTATGACGTGTTTACCGTTAGCTGC
CGTGTTCGACCCGCTCCGAGCCCGGACTTTGACTTCATCTTTCTGGTTCCGCCGACCGTGGAAAAGCCGTACCAAG
CCGTTTACCGTTCCGTTTTCGACCGTTGAAGAGATGACCAACAGCCGTTTTCCGATTCCGCTGGAAAAGCTGTTT
ACCGTCCGAGCAGCGCTTCGTGGTTTCAGCCGAAAACCGTTCGTTGCACCACCGACCGTGTCTGCTGGGCACC
ACCAACTGAGCCCGTTAACATCTGCACCTTCCGTGGTATGTGACCCACATCCCGGGTAGCCGTAACCTACACC
ATGAACCTGGCGAGCCAAAACCTGGAACAGCTACGATCCGACCGAAGAGATCCCGGCGCCGCTGGGCACCCCGGAT
TTTGTGGCGAAGATCCAGGGTGTGCTGACCCAGACCCCGTACCAACCGTAGCACCCTGGTCAACAAGCCGACC
GTGTATACCGGTAGCGCGGACTTCAGCCCGAAAACCTGGTTCGTGTTCAATTTGCGACCGATACCGACAACGATTC
GAGACCAACCAGAACACCAAGTTCACCCCGTTGGTGTGATCCAGGATGGTAGCACCACCCCGCTAACGAACCG
CAGCAATGGGTTCTGCCGAGCTATAGCGGTTCGTAACATCCACAACGTTACCTGGCGCCGCGGTTGCGCCGACC
TTTCCGGGTGAACAACCTGCTGTTCTTCCGTAGCACCATGCCGGGTTGCAGCGGTTACCCGAACATGGACCTGGAT
TGCCTGCTGCCGAGGAATGGGTGCAATACTTCTACCAAGAAGCGGCGCCGCGCAAAGCGATGTGGCGCTGCTG
CGTTTCGTAACCCGGATACCGGTTCGTGTTCTGTTTCGAATGCAAGCTGCACAAAAGCGGCTACGTGACCGTTGCG
CACACCGGTCAACACGATCTGGTATCCCGCGAACCGCTACTTCCGTTTCGACAGCTGGGTTAACCAATTCTAC
ACCCTGGCGCCGATGGGCAACGGCACCGGTCGTCGTCGTCGCTG TAA

VP2 Optimize Dizisi (Optimize dizi uzunluğu: 807, %GC:61.61)

ATGGCGGGTGCGTTTTTCCGCGGGTCTGGCGAGCGATGTTCTGGGCAGCGGTTGCGGTAGCCTGATCAACGCGGGT
GCGGGCGGATCAACCAGAAAGGTTGAGTTCGAGAACAACCGTAAACTGCAACAGGCGAGCTTTCAGTTTCAGCAGC
AACCTGCAGCAAGCGAGCTTCCAGCAGACAAGGAAATGCTGCAGGCGCAAATGAGGCGACCAAAAAGCTGCAA
CAGGAGATGATGCGTGTGAAGCAAGCGATGCTGCTGGAAGTTGGCTTTAGCGAAACCGACGCGCGCGTGGTGGC
ATTAACGCGCCGATGACCAAAACCTGGACTGGAGCGGCACCCGTTATTTGGGCGCCGACGCGCGTACCACCACC
TACAACGCGGGTCTTTTTAGCACCCCGCAACCGAGCGGTGCGCTGCCGGTTCGTGCGAACCTGCGTGCACCGGTT
CCGGCGCGTGGTAGCAGCAGCACCAGCAGCAACAGCAGCATCGCGACCAGCGTTAACAGCAACCAGACCACCAGC
ACCCGCTGCGGTAGCACCCGCGGTAGCGGCACCAGCGTTAGCAGCCCGCCGAGCACCCGCGCTACCCGTAGCTGG
GTTGAGGATCAGAACCGTAACCTGAGCCCGTTTATGCGTGGTGCACACAACATTAGCTTCGTTACCCCGCCGAGC
AGCCGTAGCAGCAGCCAGGGCACCGTTAGCACCGTTCCGAAGGAAGTGTGGATAGCTGGACCGGTGCGTTCAAC
ACCCGCTGTC AACCGCTGTTTGGCGACATCCGTAAGCGTGGCGAAAAGCCGTT TAA

p22 Optimize Dizisi (Optimize dizi uzunluğu: 543, GC%:54.56)

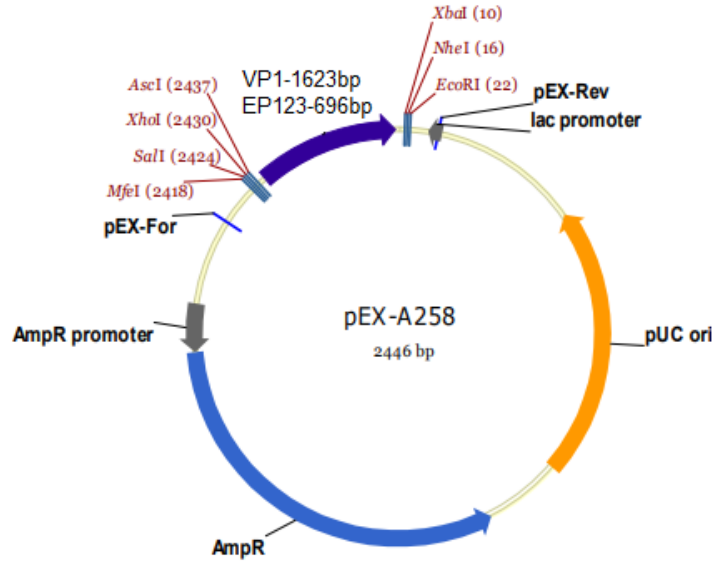
ATGGGCCCGCGCTGACCACCTTCAACTTTGACCGTAACAAGGTTCTGGCGTTTCGTCAGCTGGCGCGGAAAAC
AAGTACGGTCTGATCGATAACATGCGTGTGGTAAACAGCTGAAAGACGTGCGTACCATGCCGAACTGAAACAG
GCGCTGAAGAACGTGAGCATCAAAAAGTGCCAGATCGTGTACAGCGGTTGCACCTACATCCTGGAAAAGCGATGGT
AAAGGCAACGTGAAGGTTGACCGTATCCAAAAGCGCGCGGTTTCAGACCAACAACGAGCTGGCGGGTGCCTGCAC
CACCTCGTTGCGCGCTATCCGTTACTATGTGAAGTGCCTTCAAGAGCGCTGTACAGCATCATTAGATCGCG
GGTGGCGGCTTCGTTACCAACCCGATACCAAGCGTATGAACATCCAGGATCTGTGGAGCAACCCGAGGTTGAG
AACACCGAAGAGACCACCAGCAAAAGCGGTTGCCCGAAAACCGAAGGATGACGAAGAGTTCGTGATCAGCAGCGAT

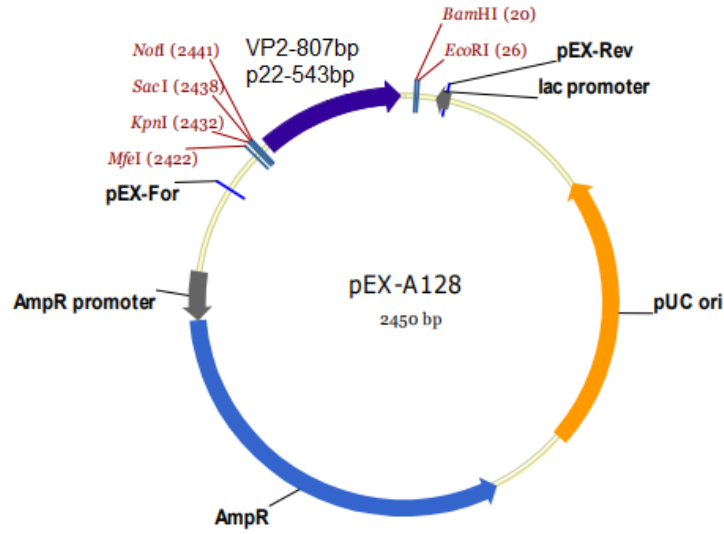
GACATCAAGACCGAGTAA

EP123 Optimize Dizisi (Optimize dizi uzunluğu: 696, GC%:65.18)

ATGGCGGGTGACGATGTGTT CACCGTTAGCTGCCGTGTTCTGACCCGTCGAGCCCGGACTTTGGTGGCGGGCGGT
GGTGGCGGGCGGTGGCGGTCTGCTGCGTTTCGTTAACCCGGACACCGGTGCTGTGCTGTTTGAGTGCAAGCTGCAC
AAAGGTGGCGGGCGGGCGGTGGCGGTGGCGGTGATAACGACTTCGAGACCAACCAGAACACCAAATTCACCCCG
GTGGCGGTTATTCAGGACCGTGGCGGTGGTGGTGGTGGTGGCGGTATGACCAAGACCCCTGGACTGGAGCGGC
ACCCGTTACTGGGCGCCGGATGCGCGTACCACCGCGGTGGCGGGCGGTGGTGGTGGCGGTGGTGGTGGCGGGCGC
GTGCTGGACAGCTGGACCGTGCCTTTAACACCCGTCGTCACCGCTGGGTGGCGGTGGTGGCGGTGGCGGGCGC
GGTCAGAACCGTAACCTGAGCCCGTTTATGCGTGGCGCGCACAAATTAGCTTTGTGACCCCGGGTGGTGGCGGC
GGTGGTGGCGGTGGCGGTGCTTACTATGTTAAGTGCCTGCAAGAAGCGCTGTATAGCATTATCCAGATCGCGGGT
GCGGGCGGGCGGTGGCGGGCGCGGTGGTGGTGGCGTGAAGGTTGATCGTATCCAGAGCGCGGGCGGTTCCAGACCAAC
AACGAACTGGCGGGTGGCTAA

Optimize edilmiş gen dizilerini gösteren kısımlar yukarıda belirtilmiştir. Start kodonu olan ATG yeşil, stop kodonu TAA kırmızı ve primer dizileri için kullanılan bölgeler sarı renk ile gösterilmiştir. Oluşturulan final DNA dizileri “Triogen Biyoteknoloji” firmasına sentezletirilmiştir. Norovirüs (HuNoV/ GII.4) antijenlerinden VP1 ve EP123’ e ait DNA dizileri pEX- A258 vektörü içinde, VP2 ve p22’ ye ait DNA dizileri ise pEX- A128 vektöründe temin edilmiştir (Şekil 3.5).





Şekil 3.5 Standart vektör içine yerleştirilen VP1, VP2, p22 ve EP123'e ait sentetik DNA'lar

3.2.2. Norovirüs antijenlerinin klonlanması

Liyofilize halde gelen Norovirüse ait gen dizilerinin her biri üretici firmanın talimatına göre TE (10mM) tamponunda çözülmüştür. DNA' nın 10 µL' si 100 µL *E. coli* DH10B kompetanı içerisinde nazikçe karıştırıldıktan sonra kompetan hücre/DNA karışımı 20-30 dakika buz üzerinde inkübasyona bırakılmıştır. Her bir transformasyon tüpü 1 dakika boyunca 42°C' lik su banyosuna alınarak ısı şokuna maruz bırakılmıştır (Sambrook vd. 2001) Süre bitiminde tüpler 2 dakika tekrar buz üzerine alınmıştır. Buzdan alınan tüplerin üzerine 900 mL TSB eklenerek homojenize edilmiş ve 37°C' de çalkalamalı inkübatörde 1 saat inkübe edilmiştir. 200 µL' si AXI besiyeri plakları üzerine yayma ekim yöntemiyle tüm yüzeye yayılmıştır. Plaklar 37°C' de gecelik inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.2.1. pEX-A258 ve pEX-A128 Plazmidlerinin İzolasyonu

E. coli DH10B suşuna aktarılan pEX-A258 ve pEX-A128 plazmid DNA' larını izole etmek için, bu plaklardan alınan bir koloni ampisilin içeren 5 mL TSB sıvı besiyerine ekilmiş ve 37 °C' de gecelik inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün GeneAll-Exprep™-Plazmid SV markalı plazmid ekstraksiyonu kiti ile üretici firmanın talimatına göre plazmid izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon için kısaca, 10 mL gecelik sıvı kültür oda sıcaklığında 10,000 x g' de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı atıldıktan sonra pellet, 250 µL S1 tamponu ile

homojenize edilmiştir. Homojenat yeni bir 1,5 mL mikrosantrifüj tüpüne alınarak üzerine 250 µL S2 tamponu eklenmiş ve 4 defa alt-üst edilmiştir. Karışımın üzerine 350 µL S3 tamponu ilave edilerek 6 kere alt-üst edilmiş ve homojen hale gelmesi sağlanmıştır. 13,000 x g' de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı dikkatli bir şekilde SV kolonuna yüklenmiştir. 13,000 x g' de 30 saniye santrifüj edilerek kolona tutunması sağlanmıştır. Kolonun altına geçen kısım atılmış, tekrar koleksiyon tüpüne yerleştirilen SV kolonuna 500 µL AW tamponu eklenmiş ve 13,000 x g' de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Kolonun altına geçen kısım uzaklaştırılmış ve SV kolonu koleksiyon tüpüne yeniden yerleştirilmiştir. 700 µL PW tamponu uygulanmış ve 13,000 x g' de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Kolondan alta geçen kısım atılmış ve SV kolonu koleksiyon tüpüne tekrar yerleştirilmiştir. Yıkama tamponundan gelen artıkları uzaklaştırmak için 13,000 x g' de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Kolon yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alınarak 50 µL EB tamponu eklenmiş ve 1 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre bitiminde 13,000 x g' de 1 dakika santrifüj edilerek plazmid DNA'sı mikrosantrifüj tüpünde toplanmıştır. Uzun süre saklamak için -20 °C' de muhafaza edilmiştir.

3.2.2.2. pEX-A258 ve pEX-A128 Plazmidlerinin Restriksiyonu

İzole edilen plazmidlerin içindeki gen fragmanlarının varlığını doğrulamak için restriksiyon işlemi uygulanmıştır. VP1 ve EP123 için; 10 µL plazmid DNA (pEX-A258), 6 µL distile su, 2 µL 10X FastDigest tamponu, 1 µL FastDigest XhoI ve 1 µL FastDigest XbaI enzimi kullanılarak reaksiyon kurulmuştur. VP2 ve p22 için; 10 µL plazmid DNA (pEX-A128), 6 µL distile su, 2 µL 10X FastDigest tamponu, 1 µL FastDigest BamHI ve 1 µL FastDigest NotI enzimi kullanılarak reaksiyon kurulmuştur. Kesim reaksiyonları 37 °C' de yaklaşık olarak 30 dakika inkübe edildikten sonra her birinden 5 µL alınarak %1 w/v'lik agaroz jelde incelenmiştir.

3.2.2.3. Hedeflenen Gen Bölgelerinin PCR ile Çoğaltılması

Klonlamada kullanılmak üzere restriksiyon kesim bölgeleri de eklenmiş primerler optimize gen dizilerinden yola çıkarak tasarlanmıştır (Çizelge 3.1). Klonlanması hedeflenen insert, izole edilen pEX-A258 ve pEX-A128 plazmidlerinin PCR' da kalıp DNA olarak ve tasarlanan primerlerin kullanılmasıyla çoğaltılmıştır. Restriksiyon kesim bölgeleri italik olarak yazılmıştır.

Çizelge 3.1 Restriksiyon kesim bölgeleri eklenmiş VP1, VP2, p22 ve EP123 primerleri

Primer adı	Sekansı	Referans
VP1F	5'-ATGAATTCATGAAGATGGCGAGCAGCGA-3'	Bu çalışma
VP1R	5'-ATAAAGCTTTTACAGCGCACGACGACGA-3'	Bu çalışma
VP2F	5'-ATGAATTCATGGCGGGTGCGTTTTTCGC-3'	Bu çalışma
VP2R	5'-ATAAAGCTTTTAAACACGGCTTTCGCCA-3'	Bu çalışma
p22F	5'-ATGAATTCATGGGCCCGGCGTGACCAC-3'	Bu çalışma
p22R	5'-ATAAAGCTTTTACTCGGTCTTGATGTCA-3'	Bu çalışma
EP123F	5'-ATGAATTCATGGCGGGTGACGATGTGTT-3'	Bu çalışma
EP123R	5'-ATAAAGCTTTTACGCACCCGCCAGTTCG-3'	Bu çalışma
T7-F	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	Addgene
T7-R	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'	Addgene

(GAATTC: EcoRI, AAGCTT: HindIII)

PCR reaksiyonlarında bir örnek için PCR amplifikasyonu 50 µL toplam hacimde, son konsantrasyon 10X Taq enzimi tampon çözeltisi 1X, dNTP 0,2 mM, primer (her biri için) 0,4 pmol, Taq DNA polymerase 0,3 µL/50 µL olacak şekilde reaksiyon kurulmuştur. Kullanılan malzemeler ve hacimleri Çizelge 3.2' de belirtilmiştir.

Çizelge 3.2 PCR karışımının içeriği

Malzeme (Konsantrasyon)	İstenen Son Konsantrasyon	1 örnek için (µL)
Deionize steril su		41,3 µL
Buffer with MgCl ₂ (10X)	1 X	5
dNTP (10 mM)	0,2 mM	1
Primer-F (100 pmol)	0,4 pmol	0,2
Primer-R (100 pmol)	0,4 pmol	0,2
Taq Polimeraz (5 U)	0,3 µL/ 50 µL	0,3
DNA		2
TOPLAM		50

PCR karışımının hazırlanmasının ardından 0,2 mL PCR tüpünde yer alan 50 µL PCR karışımı üzerine 2 µL DNA eklenmiş ve Termal Cyclus cihazına (LONGGENE A300) yerleştirilmiştir. PCR, Çizelge 3.3’ te verilen koşullarda gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri 1%’ lik agaroz jelde yürütüldü ve GeneMark™ Plus PCR Cleanup Kiti ile saflaştırılmıştır.

Çizelge 3.3 VP1, VP2, p22 ve EP123 geninin amplifikasyonundaki ısıl döngü ve süre diyagramı

PCR Döngüsü	Sıcaklık (°C)				Süre				Döngü
İlk denatürasyon	95				5 dk				1
Denatürasyon	95				30 sn				35
Bağlanma	VP1	VP2	P22	EP123	30 sn				
	60	57	53	60					
Uzama	72				VP1	VP2	P22	EP123	
					1,5dk	1dk	1dk	30sn	
Son uzama	72				10 dk				1

3.2.2.4. Ekspresyon Vektörü pET30-a’ nın İzolasyonu

PCR ile çoğaltılan genlerin klonlanması amacıyla ekspresyon vektörü olan pET30-a seçilmiştir. *E. coli* BL21 içerisinde yer alan pET30a plazmid, GeneAll-Expres™- Plasmid SV plazmid ekstraksiyon kiti kullanılarak daha önce anlatıldığı gibi izole edilmiştir.

3.2.2.5. pET30-a Plazmid ve Klonlanacak Genleri İçeren Amplikonların Restriksiyonu

PCR yöntemiyle çoğaltılan amplikonlar ve saflaştırılan vektör (pET30-a) ayrı tüplerde restriksiyona tabi tutulmuştur. Bu amaçla 10 µL DNA, 6 µL distile su, 2 µL 10X FastDigest tamponu 1 µL FastDigest EcoRI ve 1 µL FastDigest HindIII enzimi kullanılarak reaksiyon kurulmuş ve 37 °C’de 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda her bir örnekten 5’er µL alınarak agaroz jelde görüntüleme yapılmıştır. Kalan 15 µL ürüne 85 µL distile su eklenerek 100 µL’ye tamamlanmış ve üzerine 1:1 hacimsel oranı sağlayacak şekilde 100 µL Fenol-Kloroform-İzoamilalkol (25:24:1) eklenmiştir. Sonrasında hafifçe

vorteksenerek ve 13000 rpm'de 5 dakika +4 °C'de santrifüjlenmiştir. Üst fazlar yeni bir eppendorfa alınarak birleştirilmiş ve 10:1 hacimsel oranı sağlayacak şekilde 20 µL 3 M Sodyum Asetat (pH:5.2) eklenip karıştırıldıktan sonra 1:1 hacimsel oranı sağlayacak şekilde 200 µL saf etanol eklenerek karıştırıldıktan sonra -20 °C'de 30 dakika bekletilmiştir. İnkübasyondan sonra 30 dakika boyunca 15 000 rpm'de +4 °C'de santrifüjlenmiştir. Supernatant atılarak pellet üzerine 400 µL %70'lik etanol eklenmiş ve 5 dakika 15 000 rpm'de +4 °C'de santrifüjlenmiştir. Supernatant atılıp pellet kurutulduktan sonra 17 µL distile su ile çözülmüştür.

3.2.2.6. Saflaştırılan Restriksiyon Ürünlerinin Ligasyonu

Ligasyon reaksiyonu için 17 µL restriksiyon ürünlerinin üzerine 2 µL 10X T4 DNA ligaz tamponu ve 1 µL T4 DNA Ligaz (5 U/µL) eklenmiş ve gece boyu 22 °C'de inkübe edilmiştir. Ertesi gün, T4 DNA ligazın inaktivasyonu için ligand 70 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir.

3.2.2.7. Ligandın *E.coli* BL21 Suşuna Transformasyonu

Transformasyon işleminden önce *E. coli* BL21 suşu kompetan hale getirilmiştir. Bu amaçla Sambrook vd. (2001)' un geliştirdiği kimyasal transformasyon yöntemi kullanılmıştır. BL21 suşunun TSA besiyerine ekimi gerçekleştirilmiştir ve 37 °C'de gecelik inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün, TSA plakta büyüyen bakterilerden tek koloni alınmış ve 10 mL TSB besiyerine ekilerek gecelik inkübasyona bırakılmıştır. 10 mL besiyeri içerisinde 1 mL alınarak 50 mL TSB besiyerine ekimi gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin logaritmik büyüme (log) fazına ulaşması için yaklaşık 3 saat boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. Log fazına ulaşmış BL21 kültürü 30 dakika boyunca buzda bekletilmiş ve bu süre sonunda 5000 rpm'de 10 dakika +4 °C'de santrifüjlenmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış ve 10 mL soğuk distile su ile resüspanse edilmiştir. Tekrar su ile yıkamanın ardından elde edilen pellet 10 mL 10%'luk gliserollü su ile resüspanse edildikten sonra 5000 rpm'de 10 dakika +4 °C'de santrifüjlenmiştir. Süpernatant atılmış ve 30 mL 80 mM MgCl₂-20 mM CaCl₂ solüsyonu ile resüspansiyon yapılmıştır. Sonrasında, 5000 rpm'de 10 dakika +4 °C'de santrifüjlenmiştir. Pellet 1 mL 0,1M'lık CaCl₂ çözeltisinde resüspanse edilmiş ve 100'er µL olacak şekilde eppendorflara dağıtılmıştır. 100 µL kompetan hücre üzerine 10 µL ligand eklenmiş ve karıştırılmıştır. Kompetan hücre-ligand karışımı 20 dakika boyunca buzda bekletilmiştir. Süre bitiminde 1 dakika boyunca 42 °C'de tutulmuş ve sonrasında hemen buza alınıp 2 dakika boyunca buzda bekletilmiştir. 900 µL TSB

eklenip 37 °C’ de 250 rpm’ de çalkalanarak bir saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, kültürden 200 µL alınarak 50 µg/mL kanamisin içeren TSA besiyerine ekim yapılmıştır. Gece boyu 37 °C’ de inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün, büyüyen kolonilerden rastgele 16 koloni seçilmiştir.

3.2.2.8. Seçilen Kolonilerin PCR ile Doğrulanması

Seçilen kolonilere hem T7 primerleriyle hem de klonlama için kullanılan primerler (Çizelge 3.1) ile koloni PCR kurulmuştur. Amplikonlar %1,5’ luk agaroz jelde yürütülmüştür. T7 primerleri ile elde edilen amplikonlardan VP1’ in 1913 bp, VP2’ nin 1097 bp, p22’ nin 833 bp ve EP123’ ün 986 bp’ lik bant oluşturması beklenmiştir. PCR sonucunda pozitif olan koloniler 50 µg/mL kanamisin içeren seçici sıvı besi yerlerine inoküle edilmiştir. İnoküle edilen ve büyüyen transformantlardan plazmid ekstraksiyonu yapılarak, EcoRI ve HindIII endonükleaz enzimleri ile kesilmiştir. Elektroforez yapılarak, insert alan koloniler tespit edilmiştir. Kolonilerden kanamisinli seçici besi yerine ekim yapılarak, uzun süreli saklama için gliserol stokları hazırlanmış ve -20 °C’ de muhafaza edilmiştir.

3.2.2.9. Sekans Analizi

Kolonilerin doğrulanması yapıldıktan sonra elde edilen klonlardan ekspresyon vektörüne ait T7 primerleri ile PCR yapılmış ve sekans analizi için Medsantek firmasına (İstanbul) gönderilmiştir. Fasta formatında tarafımıza gönderilen sekanslar Gen Bankası veritabanında yer alan diziler ile karşılaştırılmıştır. Bunun için nucleotide-nucleotide BLAST programı kullanılmıştır.

3.2.3. Rekombinant Proteinlerin Üretimi ve Saflaştırılması

Antijenik genleri taşıdığı doğrulanan rekombinant kolonilerden ilgili proteinlerin üretimi ve saflaştırılması için yapılan işlemler sırasıyla aşağıda anlatıldığı gibidir.

3.2.3.1. Rekombinant Protein Üretimi

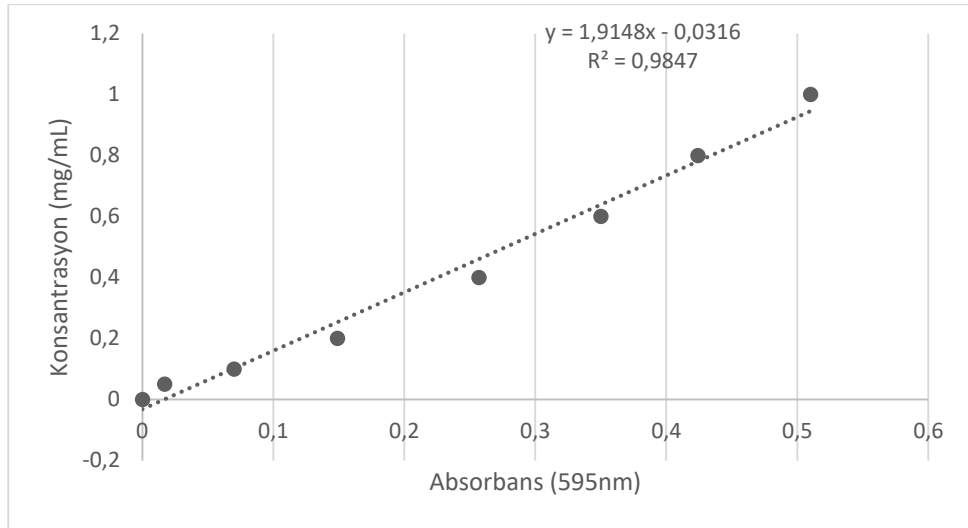
Büyük ölçekli protein üretimine geçmeden önce rekombinant protein tespiti yapılmıştır. Plazmid içeren her bir koloni (VP1, VP2, p22 ve EP123) 50 µg/mL Kanamisin içeren 10 mL 2X YT besiyerinde süspansiyon edildikten sonra 37 °C’ de gecelik inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi sabah gecelik kültürden 1:100 oranında 50 µg/mL Kanamisin içeren 30 mL taze 2X YT besiyerine transfer edilmiştir. 37 °C’ de geç logaritmik faza (OD₆₀₀ 0,8) gelene kadar (~6 saat) inkübe edilmiştir. 6 saatlik inkübasyon sonrası kültür içerisinde 1 mL eppendorf tüpüne alınmıştır. 2 dakika 15000 rpm’ de santrifüj yapılmıştır. Süpernatantı uzaklaştırılan pelletin üzerine 50 µL 1X PBS eklenerek +4°C’ ye kaldırılmıştır. Kalan kültür içerisinde son konsantrasyonu 0,5 mM olacak şekilde İzopropil β-D-1-tiyogalaktopiranosid (IPTG) eklenerek oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. IPTG eklendikten sonra 24, 36, 48, 60. saatlerde içerisinde 1 mL eppendorf tüpüne alınarak aynı koşullarda santrifüj edilmiştir. Pelletin üzerine 50 µL 1X PBS eklenerek +4 °C’ ye kaldırılmıştır. 0, 24, 36, 48, 60. saatlerde alınan örnekler süspansiyon edilerek üzerine 50 µL örnek tamponu eklenmiştir. Vortekslenen örnekler 100 °C’ de 10 dakika inkübe edilmiştir. Süre bitiminde örnekler buza alınarak soğutulmuştur. Ardından 15000 rpm’ de 2 dakika santrifüj edilerek hücre kalıntıları çöktürülmüştür. Üstte kalan sıvı çözünebilir denatüre proteinlerdir. Önceden hazırlanan SDS-PAGE jeline 20 µL üst sıvıdan alınarak yükleme yapılmıştır. SDS-PAGE jel görüntüsünden yola çıkarak ekspresyonun en yüksek olduğu saat belirlenmiştir (Crowe vd. 1994).

Büyük ölçekli üretim için rekombinant (VP1, VP2, P22 ve E123 genlerini taşıyan) plazmidleri içeren koloniler ilk basamaktaki gibi ekilerek kültürlenmiştir. 1:100 oranında 50 µg/mL Kanamisin içeren 1 L taze 2X YT besiyerine transfer edilmiştir. Hücreler geç logaritmik faza ulaşana kadar 37 °C’ de inkübe edilmiştir. Takiben içerisinde son konsantrasyonu 0,5 mM olacak şekilde IPTG eklenmiştir. Bakteri kültürü havalandırılmalı besiyerinde indüklemeyi takiben 24 saat boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler 5000 rpm’ de 10 dakika santrifüj edilerek toplanmıştır. Pelletin üzerine 1X PBS eklenerek hücreler bir kere yıkanmıştır ve -80 °C’ ye kaldırılmıştır.

3.2.3.2. Protein Tayini

Protein tayinleri Bradford yöntemi kullanılarak yapılmıştır (Bradford, 1976). Protein standardı olarak sığır serum albumini (BSA) kullanılmıştır. Bradford yöntemi Coomassie Brilliant Blue G250 boyasının proteinlere bağlanması esasına dayanan bir yöntemdir. BSA' nın 10 mg/mL' lik stok çözeltisi hazırlanarak, standart çözeltiler bu stoktan 0,05-1 mg/mL olacak şekilde ultra saf su ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

Hazırlanan standart çözeltilerden tüplere 100' er µL aktarılmış, köre ise 100 µL ultra saf su koyulmuştur. Bütün tüplere 5'er mL hazırlanan Coomassie Brilliant Blue G250 çözeltisinden eklenerek karıştırılmıştır. İki dakika sonra standartlar 595 nm dalga boyunda köre karşı okunmuş ve protein standart grafiği çizilmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 Protein standart grafiği

Protein tayini yapılacak örnekler, yukarıda belirtildiği şekilde Coomassie Blue ile karıştırıldıktan sonra, 2 dakika beklenmiş ve 595 nm'de absorbans ölçülmüştür. Bulunan değer formülde yerine konularak, protein miktarı mg/mL cinsinden hesaplanmıştır.

3.2.3.3. SDS-PAGE Yöntemi ile Proteinlerin Elektrofrez

Proteinlerin görüntülenmesi için SDS-PAGE jeli hazırlanmıştır. Örnekler yüklenerek proteinler jelde dikey elektroforez cihazıyla yürütülmüştür. Daha sonra jel boyanarak proteinler görüntülenmiştir.

Alkol ile iyice temizlenmiş iki cam (biri spacer özellikte) üst üste yerleştirilerek jel dökme düzeneğine yerleştirilmiştir. İlk olarak %12,5' luk ayırma jeli için karışım hazırlanarak iki cam arasına hava kabarcığı oluşturmamaya dikkat ederek pipetlenmiştir. Jelin üst kısmında düzgün bir yüzey oluşturmak ve hava ile temasını kesmek için üzerine 1 mL %70 etil alkol yavaşça pipetlenmiştir. Ayırma jeli polimerleştikten sonra üst kısımdaki etil alkol dikkatlice dökülmüş ve %4' lük yükleme jeli karışımı ayırma jeli üzerine pipetlenmiştir. Son olarak yükleme jelinin üst kısmına 1 mm tarak yerleştirilerek jel polimerleşmeye bırakılmıştır. Böylece kuyucukların oluşması sağlanmıştır.

Elektroforez işlemi için öncelikle hazırlanan jel dikey elektroforez tankı içerisine yerleştirilmiş ve jel kuyucuklarının üzerini kapatacak şekilde tankın içi yürütme tamponu ile doldurulmuştur. Mikropipet yardımı ile yürütme tamponu kuyucuktan alınıp bırakılarak jel kuyucukları yıkanmıştır. Yükleme işleminden önce hazırlanan proteinlerden 10 µL mikrosantrifüj tüpü içerisine alınarak üzerine 10 µL yükleme tamponu (2X) ilave edilmiştir ve ısıtıcıda 100 °C' de 10 dakika ısıtılmıştır. Poliakrilamid jelin ilk kuyucuğuna 4 µL protein marker (Opti-Protein XL Marker, G266), daha sonra diğer kuyucuklara sırasıyla örnekler yüklenmiştir. Örneklerin protein içeriği Bradford yöntemi ile tayin edilmiş ve hepsinin son konsantrasyonu 15 µg/kuyu olacak şekilde ayarlanarak kuyucuklara yüklenmiştir. Yükleme işleminin ardından dikey elektroforez tankının kapağı kapatılarak elektrotlar güç kaynağına doğru bir biçimde yerleştirilmiştir ve çalıştırılmıştır. Örnekler ayırma jeline geçene kadar (yaklaşık 30 dk) 100 V, ayırma jeline geçtikten sonra 200 V' da yaklaşık 45 dakika boyunca yürütülerek proteinlerin ayrılması sağlanmıştır. Yükleme boyalarının yürüme mesafesi kontrol edilerek jelin alt kısmına geldiklerinde yürütme işlemi sonlandırılmıştır (Laemmli, 1970).

Proteinleri görüntülemek için, jel dikkatlice boyama yapılacak küvete alınmıştır. Yükleme jeli kısmı uzaklaştırıldıktan sonra jel su ile yıkanmıştır. Jeli boyamak için, Commasie

blue boyası kap içerisindeki jel üzerine dökülmüş, kabın kapağı yarım kapatılarak, 1 dakika mikrodalga fırında yüksek derecede ısıya tabi tutulmuştur. Daha sonra 15-20 dakika çalkalayıcıda yavaşça inkübe edilmiştir. Boya geri toplanıp destaining solüsyonu jelin üstüne dökülmüştür ve mikrodalgada 1 dakika ısıtılıp sonra 20-30 dakika karıştırıcıda yavaşça inkübe edilmiştir. Bu son işlem bantlar net görünene kadar tekrar edilmiştir.

3.2.3.4. Immobilize Metal Afinite Kromatografi (IMAC) Kolonu ile Saflaştırma

Rekombinant proteinler (VP1, VP2, p22 ve EP123) vektörün (pET30a(+)) omurgasında yer alan His-tag kuyruğu içerdiği için öncelikle bu kuyruğu yakalayabilen Immobilize Metal Afinite Kromatografi (IMAC) kolonu ile saflaştırma yoluna gidilmiştir. Bio-Rad EconoFit IMAC Ni-NTA kolon saflaştırma protokolüne göre; -80°C' deki rekombinant protein örneklerinin önce buz üzerine alınarak kontrollü bir şekilde çözünmesi sağlanmıştır. Ardından ~5 gr pellet üzerine 15 mL IMAC Lizis Tamponu eklenerek süspanse edilmiştir. Hücreler prob-tip sonikatör ile 1 dk parçalanıp 1 dakika buzda bekletilmiştir. Aynı işlem 3 kere daha tekrar edilmiştir. 15000 rpm'de +4 °C' de 30 dakika santrifüj edilen örneklerin süpernatant kısmı 0.45 µ filtreden geçirilerek kolonda oluşabilecek tıkanıklık önlenmiştir.

Kromatografi kolonu yukarıda bahsedilen yıkama tamponuyla (25 mL =5 kolon hacmi) yıkanmış ve dengeleme yapılmıştır. Kolon hacminin 5 mL olmasından dolayı, 10 mL örnek kullanılarak iki kere yükleme yapılmıştır. Kolon ilk olarak imidazol olmadan, ardından 20 mM ve son olarak 40 mM imidazollü yıkama tamponuyla yıkanmıştır. Her bir uygulamada 250 mM imidazollü elüsyon tamponu kullanılmıştır. Elüsyon OD₂₈₀ ~0,1' e düşene kadar devam ettirilmiştir (Crowne vd. 1995).

3.2.3.5. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz

Sıvı kültürden elde edilen hücresiz üst fazlardaki proteinleri çöktürmek amacıyla amonyum sülfat çöktürmesi yapılmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesini optimize etmek amacıyla %20, %40, %60, %80 oranında doymuş amonyum sülfatla yarım saat boyunca (+4 °C), manyetik karıştırıcıda muamele edilen örnekler 5000 rpm'de (+4 °C) 30 dakika santrifüjlenmiştir. Oluşan pelletler fosfat tamponunda (20 mM, pH 7.0) çözülmüştür. Çökelti, 14000 Da'luk diyaliz membranı (Sigma-Aldrich, D9777-100FT) kullanılarak, aynı fosfat

tamponuna karşı +4 °C’de manyetik karıştırıcıda 24 saat boyunca diyaliz edilmiştir (Tuncer, 2008).

3.2.4. Rekombinant Proteinlerin Deney Hayvanlarına Uygulanması

Proteinler deney hayvanlarına uygulanmadan önce adjuvan (Sigma Adjuvan Sistemi-S6322) üretici firmanın talimatlarına uygun olarak PBS içinde çözülerek hazırlanmıştır. Tavsiye edilen antijen konsantrasyonu (0.05-0.25 mg/mL) göz önünde bulundurularak 50 µg/hayvan olacak şekilde antijen-adjuvan (1:1) karışımı 200 µL/hayvan uygulama yapılmıştır. 18 adet Balb/C faresinin kas içine 2’şer hafta aralıklarla 3 kere uygulama yapılmıştır. Kontrol grubuna sadece PBS uygulanmıştır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4 Rekombinant proteinlerin deney hayvanlarına uygulanması

Hayvan grupları	Hayvan Sayısı	Uygulanan Miktar
1. Grup (VP1)	4	200 µL/hayvan
2. Grup (VP2)	4	200 µL/hayvan
3. Grup (p22)	3	200 µL/hayvan
4. Grup (EP123)	4	200 µL/hayvan
5. Grup (Kontrol)	3	200 µL/hayvan

Deneysel aşamanın sonunda (son doz verildikten 2 hafta sonra) hayvanlar sakrifiye edilerek kalpten EDTA’ lı tüplere hayvanların tüm kanı alınmıştır. Daha sonra bu kanlardaki antikor miktarı ELISA yöntemiyle incelenmiştir (Xia vd. 2007, Huo vd. 2018).

3.2.5. Antikor Düzeyinin ELISA ile Belirlenmesi

Sakrifiye edilen farelerden alınan kanlardan serum elde edilmiştir. Serum örnekleri incelemeler yapılana kadar -20 °C’ de saklanmıştır. (Xia vd. 2007). Serum örnekleri IgG açısından test edilmiştir. ELISA plağına kaplanacak olan antijen çözeltisi, 10 µg/mL (VP1/PBS, VP2/PBS, p22/PBS ve EP123/PBS) olacak şekilde fosfat tamponunda (PBS, pH=7,4) hazırlanmıştır. 96 kuyuluk ELISA plakları 100 µL antijen çözeltisi ile kaplandıktan sonra gece boyu +4 °C’ de inkübe edilmiştir. Bağlanmayan antijenleri uzaklaştırmak için, plak 3 defa PBS-

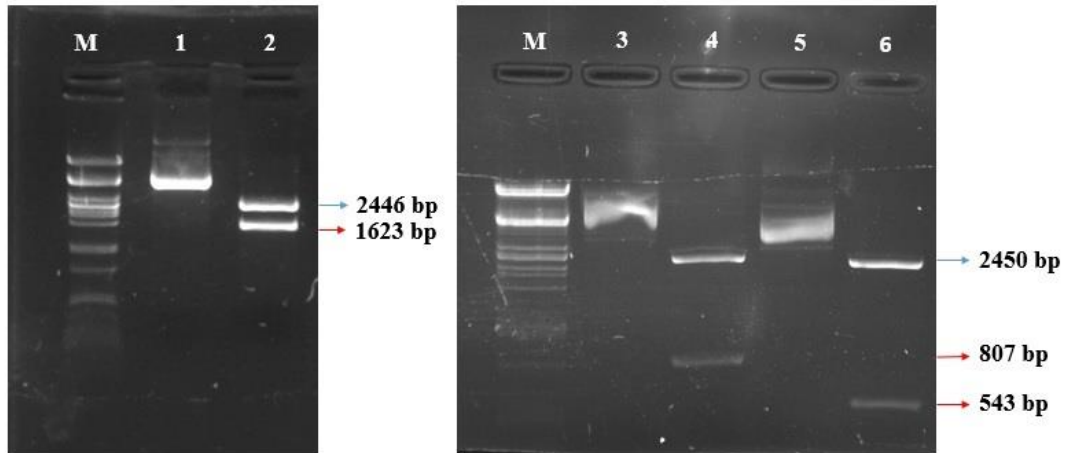
Tween 20 tamponu ile yıkanmıştır. % 0,2 derişimdeki kazein çözeltilisi her kuyuya 200 µL olacak şekilde eklenmiş ve 1 saat 37 °C' de bekletilmiştir. Plak kuyularındaki bağlanmayan kazein çözeltilisi dökülmüş ve kuyular 3 defa PBS-Tween 20 tamponu ile yıkanmıştır. Bağışıklanan fare serumları (primer antikorlar): 1/20, 1/80, 1/160 ve 1/320 oranlarında PBS içerisinde seyreltilerek, negatif kontrol için de bağışıklanmayan bir fareden alınan kan serumu da aynı şekilde hazırlanarak kuyulara 100 µL eklenmiş ve 1 saat 37 °C' de bekletilmiştir. Kompleks oluşturmadan kalan kısımlar dökülmüş ve plaklar yıkama tamponu ile 3 defa yıkanmıştır. 1/1.000 dilüsyonla seyreltilmiş anti-mouse IgG konjugatı (sekonder antikor) her kuyuya 100 µL olacak şekilde ilave edilmiş ve 1 saat 37 °C' de bekletilmiştir. 1 saat inkübasyondan sonra kuyular 6 defa yıkama tamponu ile yıkanmıştır. Substrat tamponu her kuyuya 100 µL olacak şekilde ilave edilmiş ve plak karanlık bir ortamda 30 dakika bekletilmiştir. Mikroplaklar ELISA okuyucuda 450 nm dalga boyunda negatif kontrole karşılık absorbens değerleri okunmuştur. Pozitif kontrol olarak enfekte olmuş fare serumu, negatif kontrol olarak ise kazein buffer kullanılmıştır. Pozitif (p) ve negatif (n) serum örneklerinin absorbens oranları (p/n) hesaplanmıştır. P/n oranı 2 ve 2'den büyük değerler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Savigny and Voller, 1980).

4. BULGULAR

4.1. VP1, VP2, p22 ve EP123 Genlerinin Klonlanması

4.1.1. pEX-A258+VP1, pEX-A128+VP2 ve pEX-A128+p22 Plazmidlerinin Restriksiyonları

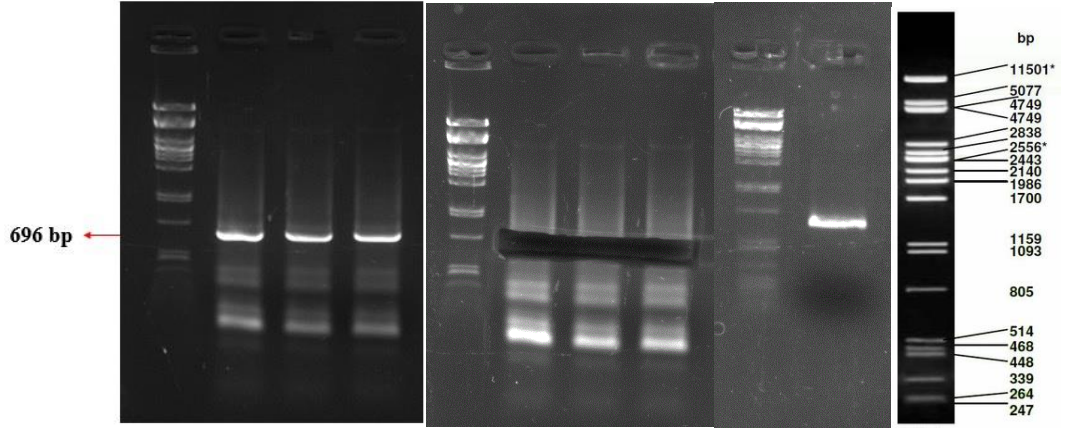
Hizmet alımı yoluyla standart vektör pEX-A258 ve pEX-A128 içinde temin edilen VP1, VP2, p22 ve EP123 gen dizileri *E.coli* DH10B' ye aktarılmış ve bakterilerden plazmid izolasyonu yapılmıştır. Bu plazmidlerin içindeki gen fragmanlarının varlığını doğrulamak amacıyla yapılan restriksiyon işlemlerinin sonuçları aşağıda verilmiştir (Resim 4.1). 1 numaralı kuyuda 4069 bp boyutundaki restriksiyon enzimleriyle kesilmemiş standart vektör pEX-A258+VP1 bulunmaktadır. 2 numaralı kuyuda ise XbaI ve XhoI enzimleriyle kesilmiş pEX-A258 ve VP1' in sırasıyla 2446 bp ve 1623 bp' lik iki ayrı bant oluşturduğu görülmektedir. 3 numaralı kuyuda enzimle kesilmemiş 3257 bp boyutundaki pEX-A128+VP2, 4 numaralı kuyuda ise BamHI ve NotI enzimleriyle kesilmiş 2450 bp' lik pEX-A128 ve 807 bp' lik VP2 bulunmaktadır. 5 numaralı kuyuda 2993 bp boyutundaki enzimle kesilmemiş pEX-A128+p22, 6 numaralı kuyuda BamHI ve NotI enzimleriyle kesilmiş 2450bp' lik pEX-A128 ve 543bp' lik p22 görülmektedir. Marker olarak λ -Pst kullanılmıştır. pEX-A258+EP123 plazmidinin XbaI ve XhoI enzimleriyle kesim reaksiyonu gerçekleşmediği için gösterilmemiştir.



Resim 4.1 Restriksiyon sonrası VP1, VP2, p22'ye ait agaroz jel görüntüleri

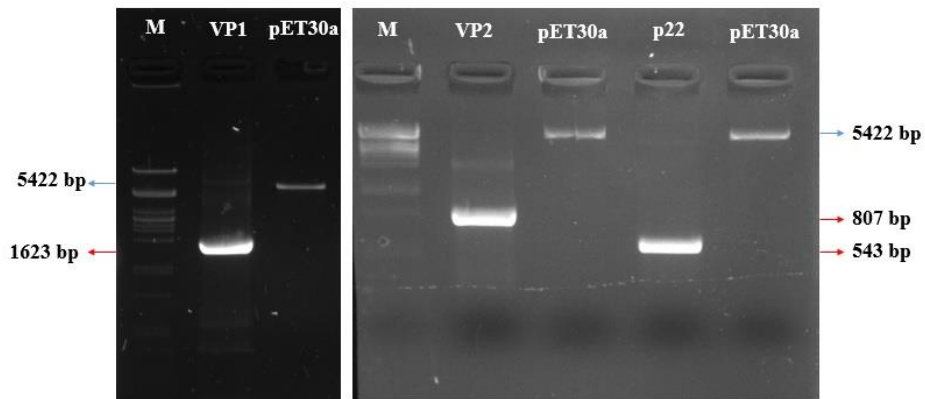
4.1.2. Rekombinant Plazmidlerdeki İnsertlerin PCR ile Doğrulanması

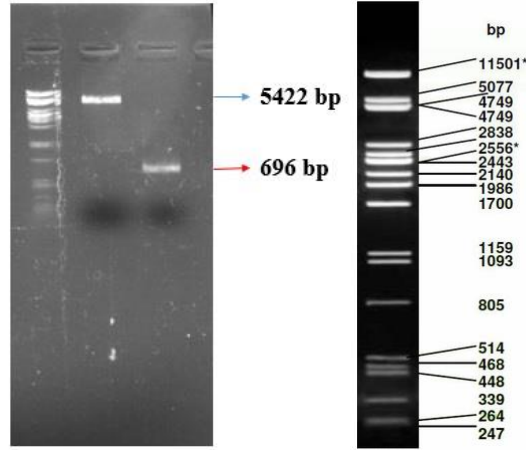
Plazmid DNA'larının kalıp olarak kullanıldığı, Çizelge 3.1' de bulunan her gene özgü spesifik primerlerle PCR reaksiyonu kurulmuştur. PCR ürünü olan ampliconlar, %1,5 agaroz jel elektroforeziyle görüntülenerek teyit edilmiştir. VP1, VP2 ve p22 ampliconları PCR-Clean-up kitiyle pürifiye edildikten sonra elde edilen temiz ve güçlü bantlar ile klonlama işlemine devam edilmiştir. Fakat EP123 ampliconlarındaki non-spesifik bantlar, PCR Clean-up Kit ile temizlenemediği için ampliconlar jelden ekstrakte edilmiştir (Resim 4.2). Sağdan ikinci resim pürifiye edilmiş EP123 ampliconuna aittir.



Resim 4.2 EP123 ampliconlarının jel ekstraksiyonuyla pürifiye edilmesi

EP123' ten elde edilen 696 bp' lik bu temiz bant ile klonlama işlemine geçilmiştir. Ampliconlar ve saflaştırılan vektörler aynı enzimlerle (EcoRI ve HindIII) kesilmiştir (Resim 4.3). Böylece vektörün sirküler yapısı linear hale gelmiştir.

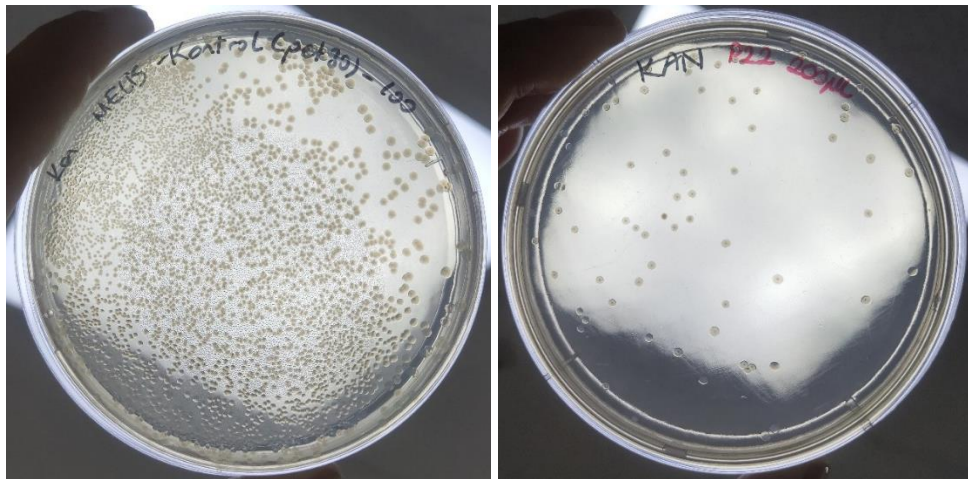




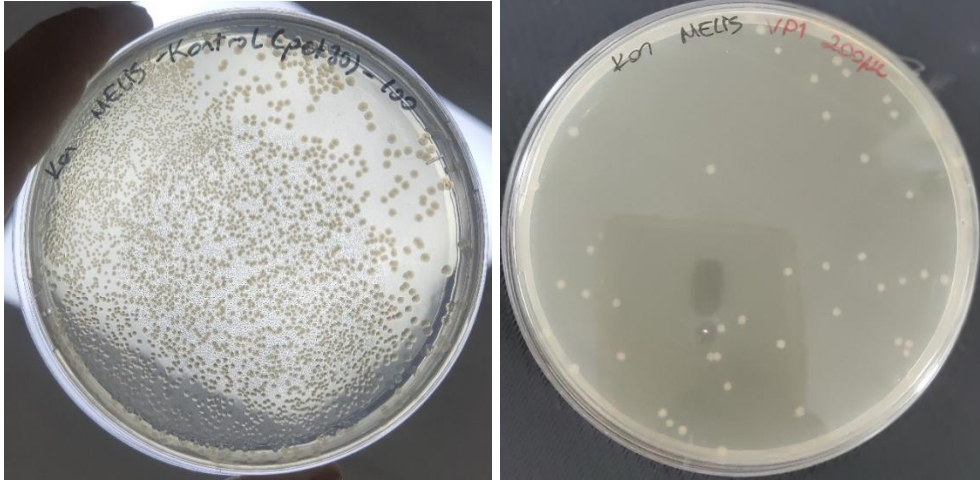
Resim 4.3 Gen fragmanlarının (VP1, VP2, p22 ve EP123) ve ekspresyon vektörünün (pET-30a) EcoRI ve HindIII enzimleriyle kesimi. M: λ -PstI Marker

4.1.3. Transformasyon Sonucu Oluşan Rekombinant Koloniler

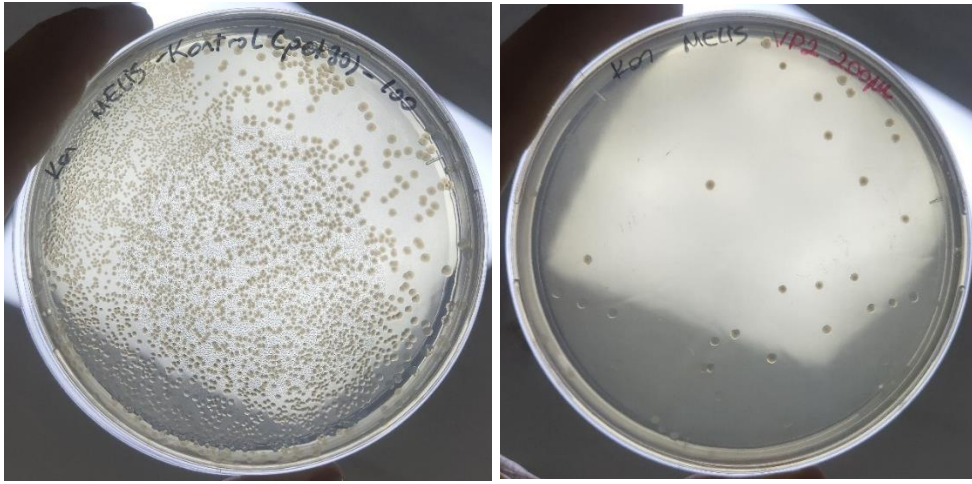
Restriksiyon işlemini takiben presipitasyon, ligasyon ve transformasyon işlemleri yapılmıştır. Transformasyonun ardından kanamisin içeren seçici besiyerlerine ekimler gerçekleştirilmiştir. Resim 4.4’ te p22’ nin, Resim 4.5’ te VP1’ in, Resim 4.6’ da VP2’ nin ve Resim 4.7’ de EP123’ ün klonlama sonrası kanamisin seçici besiyerindeki görüntüsü yer almaktadır.



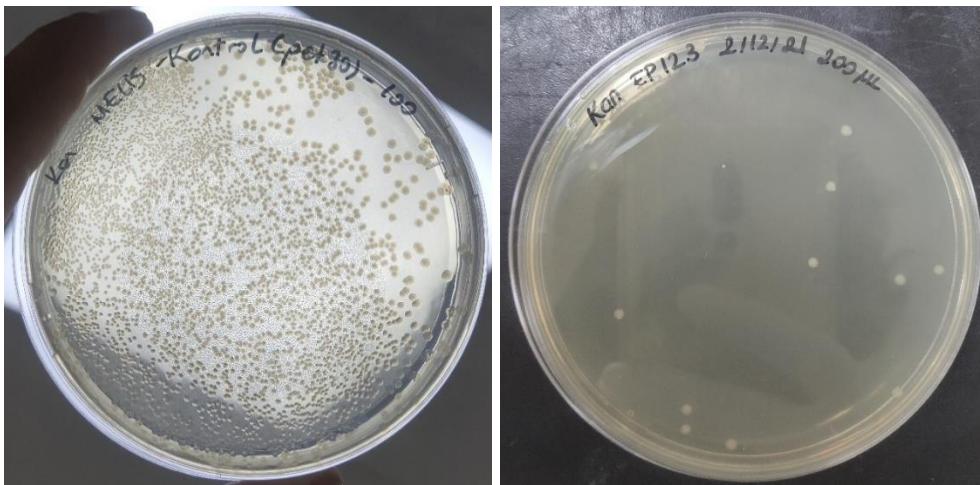
Resim 4.4 pET-30a ve pET+p22 içeren kolonilerin kanamisinli besiyerindeki görüntüleri



Resim 4.5 pET-30a ve pET30a+VP1 içeren kolonilerin kanamisinli besiyerindeki görüntüleri



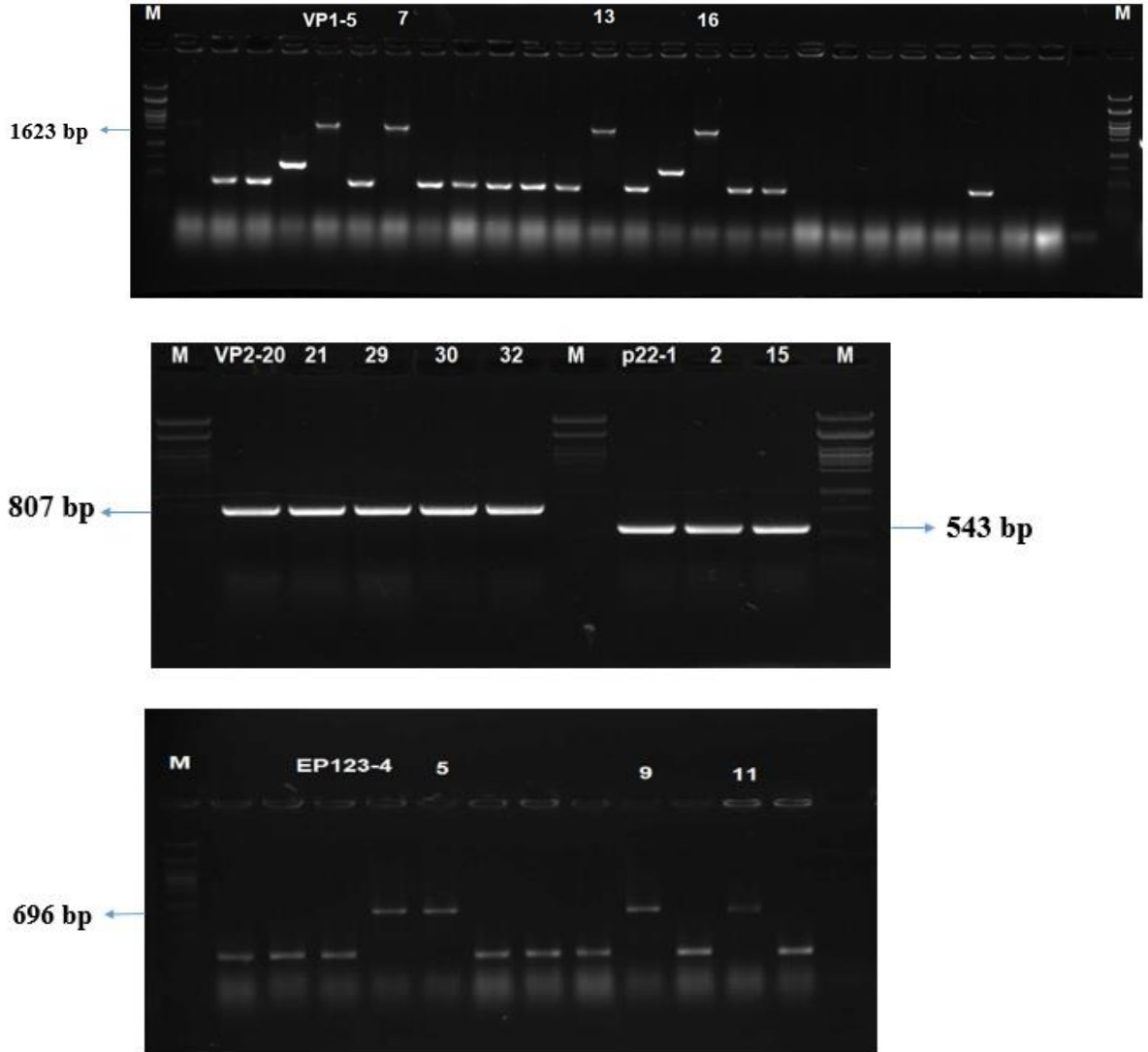
Resim 4.6 pET-30a ve pET30a+VP2 içeren kolonilerin kanamisinli besiyerindeki görüntüleri



Resim 4.7 pET-30a ve pET30a+EP123 içeren kolonilerin kanamisinli besiyerindeki görüntüleri

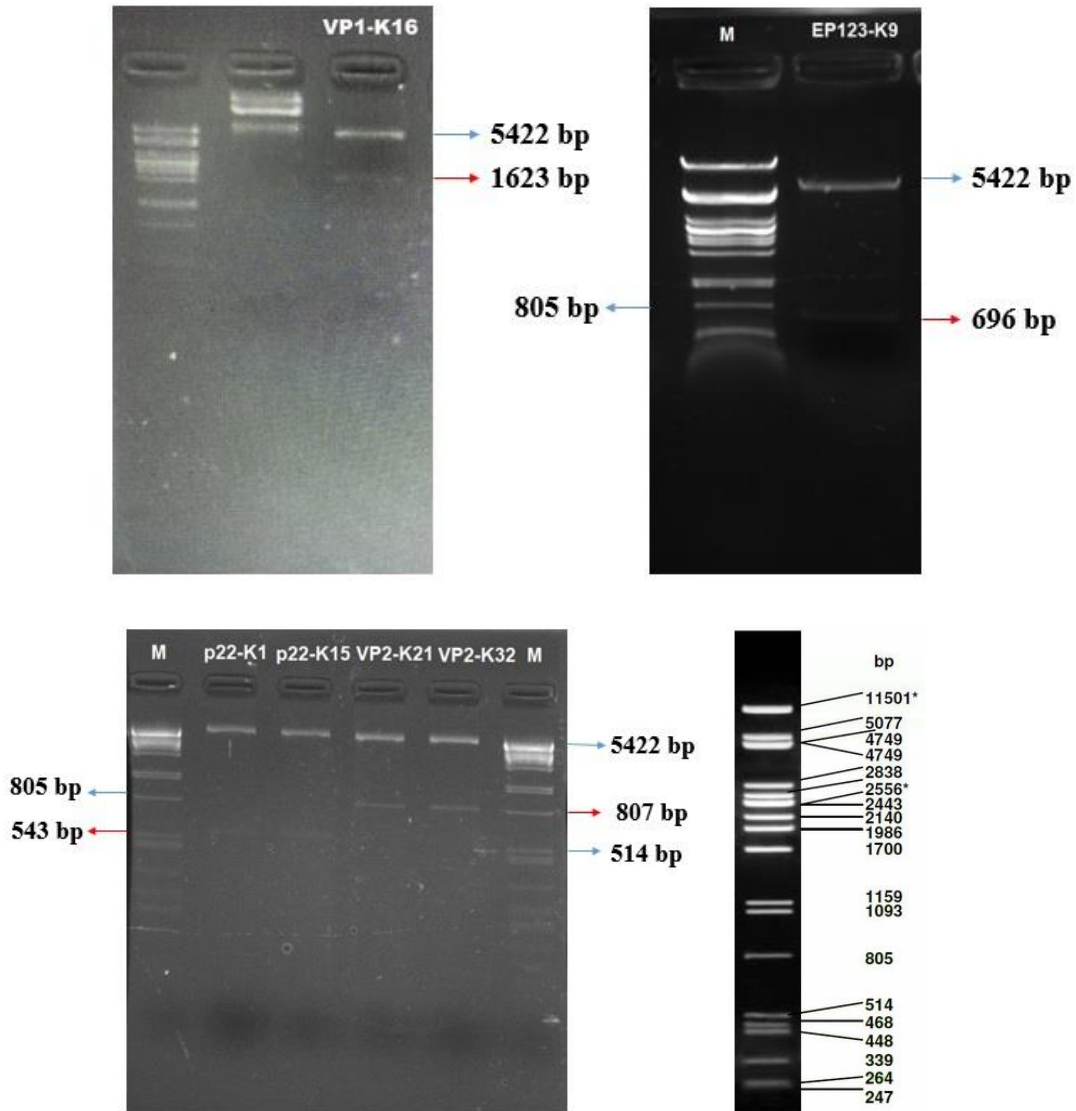
4.1.4. Koloni PCR Sonuçları

Transformasyonları doğrulamak amacıyla seçici besiyeri plaklarında üreyen transformantlardan rastgele koloniler seçilerek hem T7F&T7R primerleriyle hem de genlere özgü primerler (VP1; VP1F&VP1R, VP2; VP2F&VP2R, p22; p22F&p22R, EP123; EP123F&EP123R) ile koloni PCR işlemi yapılmıştır. PCR sonucunda pozitif olan koloniler, VP1 için 5, 7, 13 ve 16; VP2 için 20, 21, 29, 30 ve 32; p22 için 1, 2 ve 15; EP123 için 4, 5, 9 ve 11 numaralı koloniler seçilmiştir (Resim 4.8) Seçilen pozitif koloniler kanamisin içeren sıvı besiyerlerine inoküle edilmiştir.



Resim 4.8 VP1, VP2, p22 ve EP123 için gene özgü primerler ile yapılan koloni PCR sonuçları

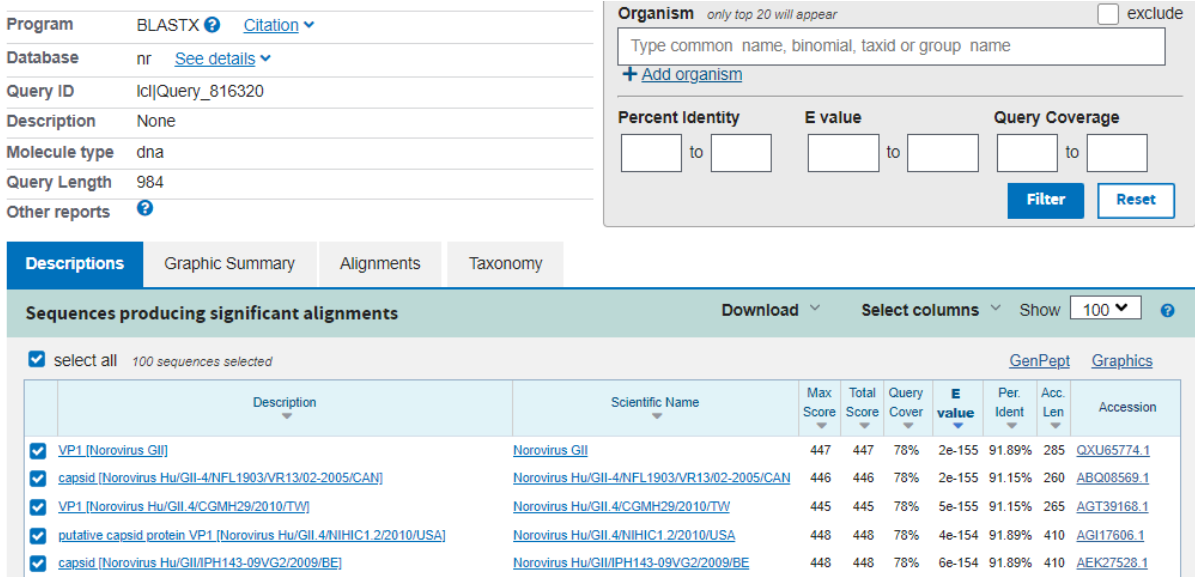
Gecelik inkübasyon sonucu büyüyen transformantlardan plazmid ekstraksiyonu yapılarak, plazmidler EcoRI ve HindIII endonükleaz enzimleri ile kesilmiştir. Elektroforez işlemiyle plazmid ve insertler görüntülenmiştir (Resim 4.9). Her iki yöntemle de doğrulanan transformantlardan elde edilen (VP1-5-7-13-16; VP2-21-32; p22-1-2-15; EP123-4-5-9-11) en güçlü bant seçilerek tekrar antibiyotikli sıvı besiyerine inoküle edilmiştir. Koloniler ileri çalışmalar için skim milk içerisinde stoğa alınmıştır ve -20°C’ de muhafaza edilmiştir.



Resim 4.9 Klonların restriksiyon analiz sonuçları. EcoRI ve HindIII enzimleriyle kesim sonucu 1623 bp’ lik VP1, 696 bp’ lik EP123, 543 bp’ lik p22, 807 bp’ lik VP2 ve 5422 bp’ lik pET30a vektörü iki ayrı bant görüntüsü oluşmuştur. M:λ-PstI Marker

4.2. VP1, VP2, p22 ve EP123 Gen Dizilerinin Sekans Analiz Sonuçları

Koloni PCR ve restriksiyon analizleri ile teyit edilen genlere ait birer adet ampikon doğrulama amacıyla Medsantek firmasına sekans analizi için gönderilmiştir. Fasta formatında tarafımıza gönderilen sekanslar gen bankası ile karşılaştırılmıştır. Bu amaçla Nucleotide BLAST programı kullanılarak VP1, VP2, p22 ve EP123 genlerine ait sekans sonrası değerlendirme sonuçları sırasıyla yer almaktadır. VP1 dizisi, VP1 (Norovirüs GII) QXU65775.1 türüne maksimum %91.89 benzerlik göstermiştir (Resim 4.10). VP2 dizisi, capsid protein VP2 (Norovirus Hu/Norwalk/10368/2010/VNM) AFX81251.1 türüne maksimum %95.52 benzerlik göstermiştir (Resim 4.11). p22 dizisi, non-structural polyprotein (Norovirus Hu/GII.4/New Orleans 1805/2009/USA) ADD10374.2 türüne maksimum %98.90 benzerlik göstermiştir (Resim 4.12). EP123 dizisi, repetitive protein BP68 (synthetic construct) ABR68643.1 türüne maksimum %85.11 benzerlik göstermiştir (Resim 4.13).



Program: BLASTX [Citation](#)

Database: nr [See details](#)

Query ID: Icl|Query_816320

Description: None

Molecule type: dna

Query Length: 984

Other reports: [?](#)

Organism: only top 20 will appear exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity: to

E value: to

Query Coverage: to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments [Download](#) [Select columns](#) Show 100 [?](#)

select all 100 sequences selected [GenPept](#) [Graphics](#)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	VP1 (Norovirus GII)	Norovirus GII	447	447	78%	2e-155	91.89%	285	QXU65774.1
<input checked="" type="checkbox"/>	capsid (Norovirus Hu/GII.4/NFL1903/VR13/02-2005/CAN)	Norovirus Hu/GII.4/NFL1903/VR13/02-2005/CAN	446	446	78%	2e-155	91.15%	260	ABQ08569.1
<input checked="" type="checkbox"/>	VP1 (Norovirus Hu/GII.4/CGMH29/2010/TW)	Norovirus Hu/GII.4/CGMH29/2010/TW	445	445	78%	5e-155	91.15%	265	AGT39168.1
<input checked="" type="checkbox"/>	putative capsid protein VP1 (Norovirus Hu/GII.4/NIHIC1.2/2010/USA)	Norovirus Hu/GII.4/NIHIC1.2/2010/USA	448	448	78%	4e-154	91.89%	410	AGI17806.1
<input checked="" type="checkbox"/>	capsid (Norovirus Hu/GII/IPH143-09VG2/2009/BE)	Norovirus Hu/GII/IPH143-09VG2/2009/BE	448	448	78%	6e-154	91.89%	410	AEK27528.1

Resim 4.10 Rekombinant VP1 dizisine ait sekans sonucu

Job Title **Nucleotide Sequence**

RID [SNMK3DAZ013](#) Search expires on 11-11 02:56 am [Download All](#) ▼

Program BLASTX [Citation](#) ▼

Database nr [See details](#) ▼

Query ID Icl|Query_3077

Description None

Molecule type dna

Query Length 1143

Other reports [?](#)

Filter Results

Organism only top 20 will appear exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity to E value to Query Coverage to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download [New](#) Select columns Show 100 [?](#)

select all 100 sequences selected [GenPept](#) [Graphics](#)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> capsid protein VP2 (Norovirus Hu/Norwalk/10368/2010/VNM)	Norovirus Hu/Norwalk/10368/2010/VNM	442	442	70%	5e-153	95.52%	268	AFX81251.1
<input checked="" type="checkbox"/> VP2 (Norovirus GII)	Norovirus GII	442	442	70%	7e-153	95.52%	268	AWQ36946.1
<input checked="" type="checkbox"/> capsid protein VP2 (Norovirus Hu/GII/10406/2010/VNM)	Norovirus Hu/GII/10406/2010/VNM	442	442	70%	7e-153	95.90%	268	AGE89446.1
<input checked="" type="checkbox"/> VP2 (Norovirus Hu/GII.4/Hiroshima5/2011/JP)	Norovirus Hu/GII.4/Hiroshima5/2011/JP	442	442	70%	7e-153	95.90%	268	BAS30342.1
<input checked="" type="checkbox"/> capsid protein VP2 (Norovirus Hu/GII/10405/2010/VNM)	Norovirus Hu/GII/10405/2010/VNM	442	442	70%	7e-153	95.90%	268	AGE89443.1

Resim 4.11 Rekombinant VP2 dizisine ait sekans sonucu

Job Title **Nucleotide Sequence**

RID [SNNM00W1016](#) Search expires on 11-11 03:13 am [Download All](#) ▼

Program BLASTX [Citation](#) ▼

Database nr [See details](#) ▼

Query ID Icl|Query_95939

Description None

Molecule type dna

Query Length 872

Other reports [?](#)

Filter Results

Organism only top 20 will appear exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity to E value to Query Coverage to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download [New](#) Select columns Show 100 [?](#)

select all 100 sequences selected [GenPept](#) [Graphics](#)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> p22 (Norwalk-like virus)	Norwalk-like virus	348	348	61%	1e-118	89.94%	179	YP_009238488.1
<input checked="" type="checkbox"/> polyprotein (Norovirus Hu/GII.4/Hiroshima1/2009/JP)	Norovirus Hu/GII.4/Hiroshima1/2009/JP	378	378	62%	3e-116	98.90%	1699	BAS30310.1
<input checked="" type="checkbox"/> non-structural polyprotein (Norovirus Hu/GII.4/New Orleans1805/2009/USA)	Norovirus Hu/GII.4/New Orleans1805/2009/USA	378	378	62%	3e-116	98.90%	1699	ADD10374.2
<input checked="" type="checkbox"/> non-structural polyprotein (Norovirus Hu/GII.4/CGMH23/2010/TW)	Norovirus Hu/GII.4/CGMH23/2010/TW	378	378	62%	3e-116	98.90%	1699	AFN09983.1
<input checked="" type="checkbox"/> non-structural polyprotein (Norovirus Hu/GII.4/GZ2010-L87/Guangzhou/CHN/2...)	Norovirus Hu/GII.4/GZ2010-L87/Guangzhou/C...	376	376	62%	2e-115	98.35%	1699	AGC96531.1

Resim 4.12 Rekombinant p22 dizisine ait sekans sonucu

Job Title **Nucleotide Sequence**

RID [FWBA1U12013](#) Search expires on 08-19 20:14 pm [Download All](#) ▼

Program BLASTX [Citation](#) ▼

Database nr [See details](#) ▼

Query ID Icd|Query_48404

Description None

Molecule type dna

Query Length 760

Other reports [?](#)

Filter Results

Organism *only top 20 will appear* exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity to

E value to

Query Coverage to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download ▼ Select columns ▼ Show 100 ▼ [?](#)

select all 100 sequences selected [GenPept](#) [Graphics](#)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Alginate lyase AlgAT5 from Polysaccharide Lyase family 7 (Defluviitalea)	Defluviitalea	92.0	92.0	25%	7e-18	70.59%	277	SZQI_A
<input checked="" type="checkbox"/> repetitive protein BP68 [synthetic construct]	synthetic construct	85.1	85.1	18%	9e-17	85.11%	111	ABR68643.1
<input checked="" type="checkbox"/> hypothetical protein [Salmonella enterica]	Salmonella ente...	83.2	83.2	25%	1e-16	68.75%	66	WP_253820407.1
<input checked="" type="checkbox"/> Mannosyl-3-phosphoglycerate synthase from Rubrobacter xylophilus [synthetic construct]	synthetic construct	88.6	88.6	18%	5e-16	89.36%	387	3F1Y_A
<input checked="" type="checkbox"/> Chain A, Ubiquitin-conjugating enzyme E2-25 kDa [Homo sapiens]	Homo sapiens	86.7	86.7	17%	5e-16	91.11%	253	3E46_A

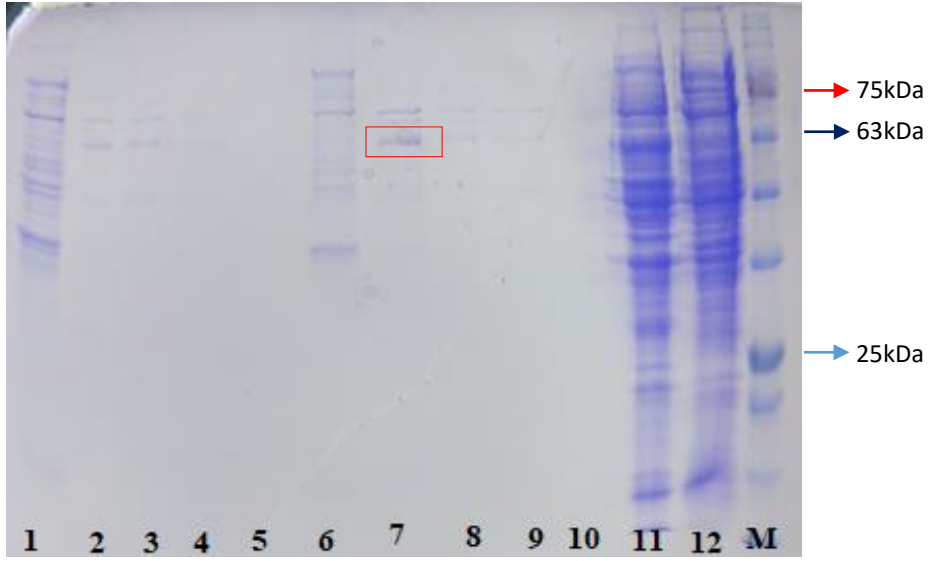
Resim 4.13 Rekombinant EP123 dizisine ait sekans sonucu

4.3. VP1, VP2, p22 ve EP123 Proteinlerinin Saflaştırılması

Sekans analizi sonuçları ile doğrulanan koloniler ileri çalışmalar için Skim milk içeren besiyerinde – 20 C° de saklanmıştır. SDS-PAGE analizi için her bir geni taşıyan koloniler, ayrı ayrı seçici besi yerlerine ekilmiştir. Üremenin ardından IPTG indüklemesi yapılmış ve total protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma aşamasında kullanılmak üzere ekilen kültür için inkübasyona süresi olarak 24 saatin yeterli olduğu görülmüştür. Rekombinant proteinlerin kısmi saflaştırma basamakları sırasıyla şu şekildedir;

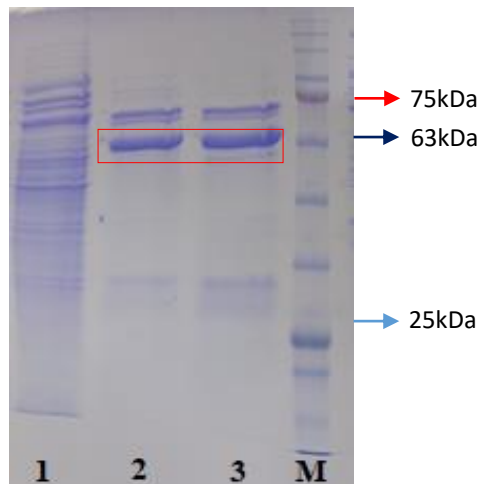
4.3.1. VP1 Rekombinant Proteinin Saflaştırma Sonuçları

VP1 rekombinant proteini, IMAC kolonuyla imidazol gradiyenti uygulaması sonucu tek adımda kısmi olarak elde edilmiştir (Resim 4.14).



Resim 4.14 İmidazol gradiyenti uygulaması ile elde edilen VP1 proteini. **1-5**; 20 mM imidazollü yıkama tamponu (**1**; örnek yükleme, **2-5**; elüsyon) ve 250 mM imidazollü elüsyon tamponu uygulaması. **6-10**; 40 mM imidazollü yıkama tamponu (**6**; örnek yükleme, **7-10**; elüsyon) ve 250 mM imidazollü elüsyon tamponu uygulaması. **11**; İndüklenmiş BL21 lizati, **12**; İndüklenmemiş BL21 lizatının SDS-PAGE görüntüsü

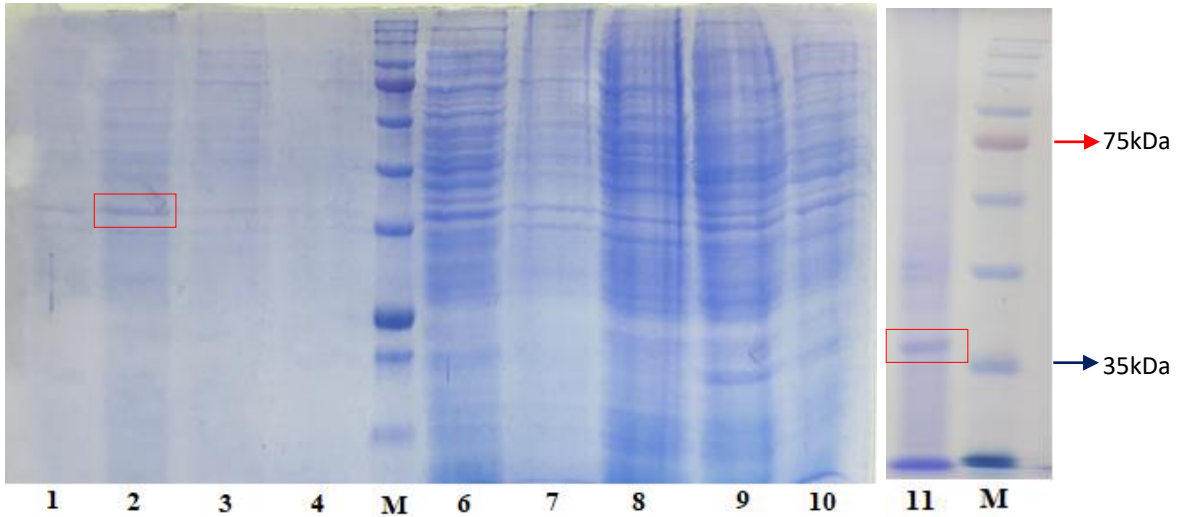
Uygun boyuttaki (64,8 kDa) rekombinant antijen VP1' e, imidazol gradiyenti uygulaması sırasında kolondan geçirilen 10 ml örneğin üç konsantrasyona (0, 20 ve 40 mM imidazol) bölüdüğü göz önünde bulundurulmuştur. En güçlü bant, 7 numaralı kuyuya yüklenmiş olan 40 mM imidazollü yıkama tamponu ve 250 mM elüsyon tamponundan geçirilen örnektir. Resim 4.14' te görülen örnek hacmi ~3 ml' dir. Bu nedenle az miktarda örneğin geçtiği düşünülerek 10 ml örneğin tamamı 40 mM imidazollü yıkama tamponundan geçirilmiştir. Elde edilen konsantre örneğin SDS-PAGE görüntüsü Resim 4.15' te verilmiştir.



Resim 4.15 VP1' in 40 mM imidazollü yıkama ve 250 mM imidazollü elüsyon tamponuyla kısmi saflaştırılması (1-yıkama, 2-3 elüsyon)

4.3.2. VP2 Rekombinant Proteinin Saflaştırma Sonuçları

VP2 rekombinant proteini, IMAC kolonuyla imidazol gradiyenti uygulaması sonucu elde edilememiştir. Bu nedenle hem pellete hem de süpernatanta amonyum sülfat çöktürmesi uygulanmıştır. Rekombinant VP2 proteininin boyutu 34,4 kDa' dır. Süpernatantın %40 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile çöktürülmesi sonucu daha temiz bir bant elde edilmiştir. Bu yüzden VP2 proteini bu yöntemle daha büyük hacimde üretildiğinde daha yoğun bir görüntü elde edilmiştir (Resim 4.16). 20 mM fosfat tamponu içinde çözülmüş olan protein örneği gece boyu $+4^\circ\text{C}$ 'de aynı tampona karşı diyaliz edilmiştir.



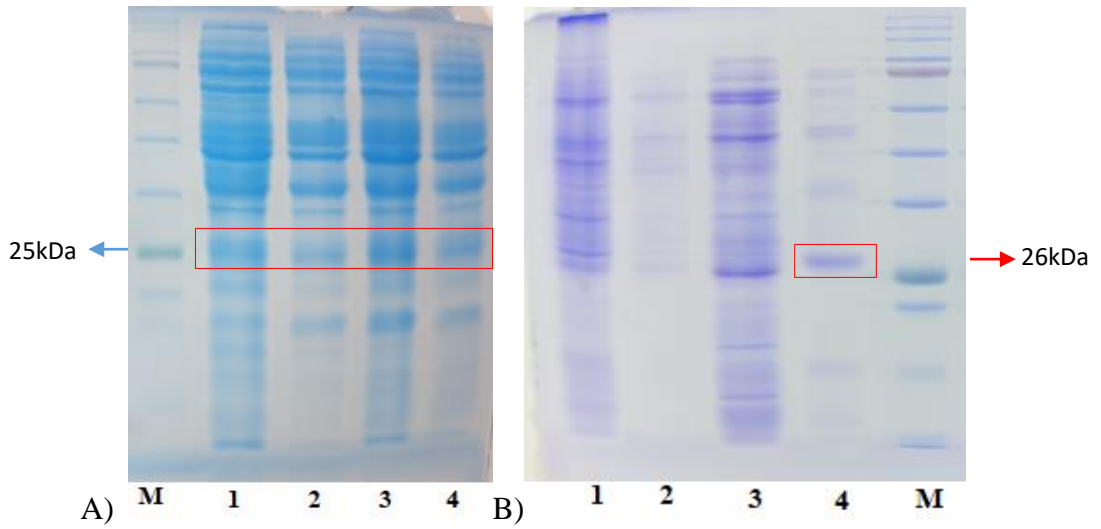
Resim 4.16 Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu VP2 proteinine ait jel görüntüleri . **1-4**; Sırasıyla süpernatantın %20, %40, %60, %80 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile çöktürülmesi. **6**; VP2 lizatı **7-10**; Sırasıyla pelletin %20, %40, %60, %80 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile çöktürülmesi. **11**; Yoğunlaştırılmış (500 mL) VP2 süpernatantının %40 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile çöktürülmesi.

4.3.3. p22 Rekombinant Proteinin Saflaştırma Sonuçları

p22 rekombinant proteini, iki aşamalı olarak elde edilmiştir. 26 kDa' lık rekombinant p22 proteini, ilk olarak IMAC kolonundan geçirilmiştir. Ardından amonyum sülfat çöktürmesi yapılmıştır (Resim 4.17). Rekombinant proteine imidazol gradiyenti uygulanması sonucu

imidazolsüz yıkama tamponu ve 250 mM imidazollü elüsyon tamponuyla muamele edildikten sonra uygun boyuttaki bant (26 kDa) SDS-PAGE ile görüntülenmiştir (Resim 4.17-A).

İkinci aşamada ise elüsyondan elde edilen proteinler toplanmış (10 mL) ve amonyum sülfatla çöktürme işlemi uygulanmıştır. %80 doygunluktaki $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile çöktürülen protein örneğinden elde edilen bant (Resim 4.17-B) ile ileri çalışma adımına geçilmiştir. 20 mM fosfat tamponu içinde çözülmüş olan rekombinant protein p22, gece boyu +4 °C’de aynı tampona karşı diyaliz edilmiştir.

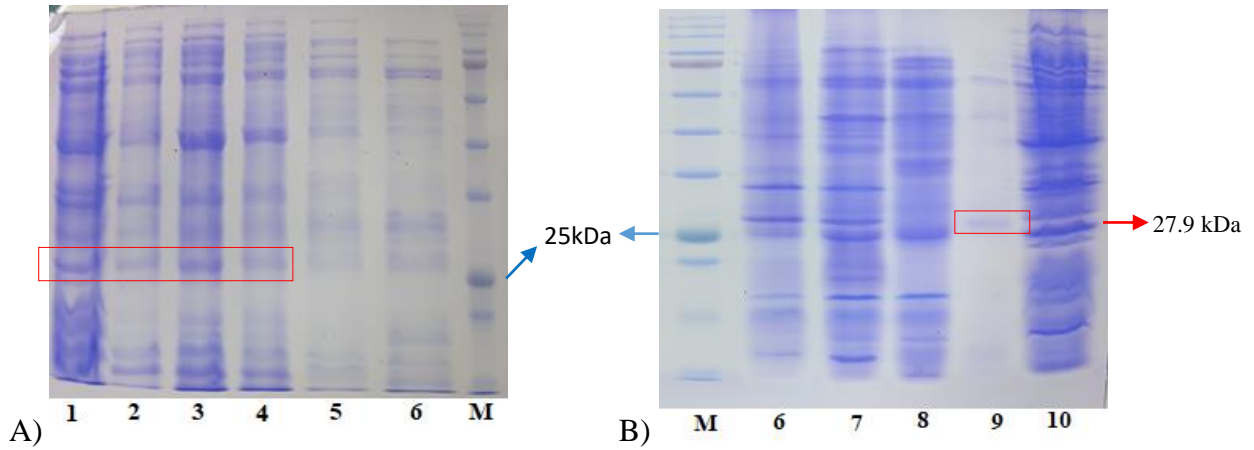


Resim 4.17 A) IMAC uygulaması sonucu p22 rekombinant proteinin SDS jel görüntüleri. İmidazolsüz yıkama (A1; lizat ve A2-A4; elüsyon) ve 250 mM imidazollü elüsyon tamponu ile eldesi. **B)** p22’ nin Amonyum Sülfatla çöktürülmesi. **1-4;** p22’ nin sırasıyla %20-%40-%60-%80 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile çöktürülmesi.

4.3.4. EP123 Rekombinant Proteinin Saflaştırma Sonuçları

EP123 rekombinant proteini, iki aşamalı olarak elde edilmiştir. Rekombinant protein, IMAC kolonundan geçirildikten sonra %80 doygunluktaki amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilmiştir (Resim 4.18). Rekombinant proteine imidazol gradiyenti uygulanması sonucu imidazolsüz yıkama tamponu ve 250 mM imidazollü elüsyon tamponuyla muamele edildikten sonra uygun boyuttaki bant (27,9 kDa) SDS-PAGE ile görüntülenmiştir (Resim 4.18-A).

İkinci aşamada ise elüsyondan elde edilen proteinler toplanmış (10 mL) ve amonyum sülfatla çöktürme işlemi uygulanmıştır. %80 doygunluktaki $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile çöktürülen protein örneğinden elde edilen bant (Resim 4.18-B) ile bir sonraki aşamaya geçilmiştir. 20 mM fosfat tamponu içinde çözülmüş olan EP123 proteini gece boyu +4 °C’ de aynı tampona karşı diyaliz edilmiştir.



Resim 4.18 A) IMAC uygulaması sonucu EP123 rekombinant proteinin SDS jel görüntüleri. imidazolsüz yıkama (A1; lizat, A2-A6; elüsyon) ve 250 mM imidazollü elüsyon tamponu ile eldesi. B) EP123’ün Amonyum Sülfatla çöktürülmesi. 1-4; EP123’ nin sırasıyla %20-%40-%60-%80 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile çöktürülmesi.

VP1, VP2, p22 ve EP123 proteinleri kısmi olarak saflaştırıldıktan sonra Bio-Rad EconoFit Desalting (2ml) Kolonu kullanılarak proteinlerin içinde bulunduğu tampon PBS (pH:7,4) ile yer değiştirmiştir. Protein miktarları desalt işleminden önce ve sonra Bradford yöntemiyle ölçülmüştür (Çizelge 4.1). Bu işlemden sonra VP2 hariç protein konsantrasyonunun düştüğü görülmektedir.

Çizelge 4.1 Desalt işleminden önce ve sonra proteinlerin miktarları

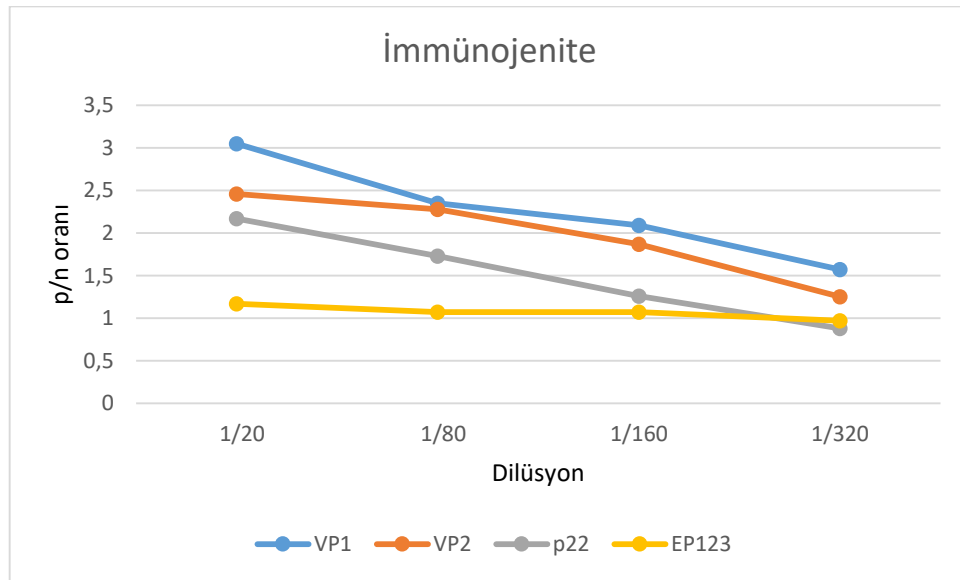
Rekombinant protein	Desalt işlemi öncesi protein miktarı (mg/mL)	Desalt işlemi sonrası protein miktarı (mg/mL)
VP1	0.911	0.195
VP2	0.347	0.341
p22	0.952	0.325
EP123	0.670	0.100

4.4. VP1, VP2, p22ve EP123 Rekombinant Proteinlerinin İmmünojenite Düzeyleri

İndirekt ELISA yöntemiyle, immünize edilen hayvanların IgG düzeylerine bakılmış ve immünojeniteleri değerlendirilmiştir (Çizelge 4.2). p/n oranı 2 ve 2'den büyük olan örneklerin pozitif olduğu göz önünde bulundurulduğunda VP1' in 1/160 seyreltmeye kadar (p/n= 2.09) immünojenik olduğu görülmektedir. VP2' nin 1/80 seyreltmeye kadar immünojenik (p/n= 2.28), p22' nin ise 1/20 seyreltmede immünojenik (p/n= 2.17) olduğu sonucuna varılmıştır. Epitoplardan oluşan polipeptit (EP123) ise hiçbir seyreltmede pozitif sonuç vermemiştir. Bir antijenin immünojen olarak değerlendirebilmesi için 1/160 seyreltmeye kadar pozitif olması gerekir (Shi vd. 2012). Bu sonuçlara göre sadece VP1 immünojen olarak değerlendirilebilir (Şekil 4.1).

Çizelge 4.2 İndirekt ELISA sonuçları (3 tekrarlı deney sonuçlarına göre)

	1/20	1/80	1/160	1/320	Kazein Buffer
VP1	0.315±0.008	0.243±0.027	0.216±0.012	0.162±0.014	0.103±0.003
VP2	0.232±0.010	0.215±0.015	0.176±0.024	0.118±0.018	0.094±0.028
p22	0.207±0.012	0.165±0.013	0.120±0.023	0.084±0.009	0.095±0.026
EP123	0.096±0.015	0.088±0.007	0.087±0.005	0.080±0.002	0.082±0.007



Şekil 4.1 VP1, VP2, p22 ve EP123' ün immünojenitelerinin değerlendirilmesi

5. TARTIŞMA

Dünya çapında milyonlarca insanı etkileyen akut, su kaynaklı gastroenterit salgınlarına neden olan Norovirüs enfeksiyonuna karşı tüm yaş grupları, özellikle bebekler, yaşlılar ve bağışıklığı baskılanmış hastalar oldukça hassastır. Küresel olarak, HuNoV her yıl tahmini 699 milyon hastalık vakasına ve 219.000 ölüme neden olmakta ve bu da 4 milyar doların üzerinde doğrudan tıbbi maliyet ve 60 milyar doların üzerinde dolaylı tıbbi maliyetle sonuçlanmaktadır (Halowell vd. 2019, Zhang vd. 2021). Son yıllarda ülkemizden de Norovirüs vakaları bildirilmeye başlamıştır. 2018 yılında Sakarya' nın Karasu ilçesinde altı günde 4.500 kişi, 2019 yılında Burdur' un Bucak ilçesinde 3.366 kişi ve Aydın' ın Çine ilçesinde 2.500 kişi ishal ve kusma şikayeti ile hastaneye başvurmuştur. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2016 yılında bir HuNoV aşısı geliştirmenin mutlak bir öncelik olması gerektiğini belirtmiş olsa da, henüz lisanslı bir HuNoV aşısı bulunmamaktadır. Etkili bir HuNoV aşısının geliştirilmesinin önündeki en büyük engel, sağlam ve tekrarlanabilir *in-vivo* ve *in-vitro* enfeksiyon modellerinin olmamasıdır.

Norovirüse ait majör kapsid proteini VP1, minör kapsid proteini VP2, yapısal olmayan proteini p22 ve VP1, VP2, p22' nin epitoplardan oluşan polipeptid (EP123) *Escherichia coli*' ye başarılı bir şekilde aktarılmıştır (Resim 4.9). Virüs-konak etkileşiminde, tanı ve aşı geliştirme çalışmalarında rekombinant viral antijenlerin uygulanması önemli bir yaklaşım olmuştur. Virüs benzeri partiküller (VLPs); viral genomdan yoksun, potansiyel olarak daha güvenli ve ucuz aşı adaylarıdır. VLP' ler antijenik olarak viral partiküle benzerdir ve herhangi bir enfeksiyon riski olmaksızın spesifik bir antikor yanıtı başlatabilir (Richardson vd. 2013). NoV aşısı adayı olarak özellikle VLP' leri oluşturan VP1 hem klinik öncesi hem de klinik çalışmalarda kullanılmıştır (Lucero vd. 2017). Bugüne kadar böcek hücreleri, *P. pastoris*, *N. benthamiana* ve *E. coli* de dahil olmak üzere çeşitli ekspresyon sistemleri kullanılarak NoV VLP' ler başarılı bir şekilde elde edilmiştir (Mason vd. 1996, Xia vd. 2007, Santi vd. 2008, Thorne&Goodfellow, 2014). NoV ile enfekte bir insan dışkı örneğinden VP1 klonlanmış ve bir bakulovirüs ekspresyon sistemi kullanılarak eksprese edilmiştir (Kim vd. 2015). *P. pastoris*' te eksprese edilen bir NoV rekombinant kapsid proteini (G II.4, VA387 suşu) diğer *in-vitro* sistemlerde eksprese edilenler gibi kendiliğinden VLP' ler oluşturmuştur (Xia vd. 2007). *N. benthamiana*' da NoV VLP (GI.4 ve GII.4-2006a' ya ait VP1) ve Rotavirüs VP6 proteini rekombinant olarak üretilmiş ve birlikte etkinlikleri değerlendirilmiştir (Malm vd. 2019). NoV

VP1 geni, bir prokaryotik ekspresyon vektörü olan soğuk şok ekspresyon vektörüne (pCold-III) klonlanmıştır (Huo vd. 2018). Ayrıca VP1 geninin bir parçası olan P partiküller de hem prokaryotik hem de ökaryotik ekspresyon sistemleri kullanılarak ifade edilmiştir.

Norovirüs proteinleri VP1, VP2, p22 ve EP123 HisTrap™ HP kolonuyla ve amonyum sülfat çöktürmesi ile kısmi olarak saflaştırılmıştır (Resim 4.15, 4.16, 4.17, 4.18). VP1 ve VP2 proteinleri tek adımda, p22 ve EP123 proteinleri ise iki adımda kısmen elde edilmişlerdir. *P. pastoris* tarafından NoV GII.4 suşunun P proteini ve majör kapsid proteini VP1 rekombinant olarak üretilmiş ve saflaştırılmıştır. P proteini, HisTrap ve iyon değişim kromatografisi kullanılarak doğrudan saflaştırılmıştır. Benzer şekilde, NoV kapsid proteini VP1' de HisTrap ve jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak yüksek saflıkla elde edilmiştir. Hem saflaştırılmış NoV P partikülleri hem de VP1, doku-kan grubu antijen bağlama kabiliyetini korumuştur. Taramalı Elektron Mikroskop (TEM) analizi ve bir tükürük bağlama deneyi, hem saflaştırılmış NoV P kompleksinin hem de NoV VLP' lerin stabiliteelerini ve biyolojik işlevlerini koruduğunu göstermiştir (Chen&Huang, 2020). Huo vd. (2018) bakteride ürettikleri VLP' leri, amonyum sülfatla çöktürme, boyuta bağlı kromatografi (SEC), amonyum sülfatla çöktürme yöntemlerini sırasıyla uygulayarak yüksek saflıkta elde etmişlerdir.

Rekombinant VP1, VP2, p22 ve EP123 proteinleri Ribi adjuvanla birlikte intramusküler olarak Balb/c farelerine uygulanmıştır. Farelerin serumlarındaki IgG düzeyleri incelendiğinde *E. coli*' de üretilen NoV proteinlerinden sadece VP1 proteini immünojenik özellik göstermiştir (Şekil 4.1). *E. coli*' ye ait soğuk şok ekspresyon vektörü pCold-III' te üretilmiş ve saflaştırılmış VLP' lerle, rekombinant bakulovirüs ekspresyon sisteminden saflaştırılan VLP' ler karşılaştırıldığında *E. coli*' den elde edilen VLP' nin daha yüksek IgG antikor titreleri ve bloke edici antikor titreleri sergilemiştir (Huo vd. 2018). Böcek hücrelerinden saflaştırılmış VLP' lerle immunize edilmiş fareler, GII.17' ye özgü serum üretmiş ve GII.17 VLP' lerin doku-kan grubu antijenlerine bağlanmasını etkili bir şekilde bloke etmiştir (Chen vd. 2020). VA387 rekombinant kapsid proteini içeren ham maya ekstraktları oral immünizasyon yoluyla farelere verildiğinde serumda IgG ve dışkıda IgA antikor yanıtlarının kinetiği incelenmiştir. Adjuvansız 0.1 mg VLP içeren maya hücresi lizatlarının oral yoldan verilmesi, farelerde sistemik ve mukozal bağışıklık tepkileri ile sonuçlanmıştır. Antijenden daha yüksek bir doz (1 mg/doz) alan farelerde önemli ölçüde daha yüksek ve daha erken tepkiler gözlenmiştir. NoV' lere karşı

bağışıklık tepkisinin, hayvanlara verilen aşının dozu ve bağışıklama sayıları ile ilişkili olduğu görülmüştür. Yüksek dozda aşı alan farelerde, aşının üç uygulamasından sonra önemli ölçüde yüksek bağışıklık tepkileri gözlemlenirken on kat daha düşük dozda aşı alan hayvanlar bile, beşinci bağışıklamayı takiben VA387' ye karşı serum ve dışkı antikoru geliştirmiştir. Hem serum hem de dışkı antikoru, VA387 VLP' nin doku-kan grubu antijen reseptörlerine bağlanmasını bloke etmiştir. (Xia vd. 2007).

Norovirüs proteinlerinin immünojenitelerini bireysel olarak değerlendirebilmek için deney hayvanları her bir rekombinant proteinle ayrı ayrı immunize edilmiştir. Yapılan aşı çalışmalarında genellikle etkili bir şekilde korunmak için bazı aşılar, bir patojenin çoklu antijenlerini veya farklı patojen serotipleri/serogruplarını kombinasyon halinde gerektirir (multivalan veya polivalan aşılar). Vaxart Şirketi, NoV GII.4 ve GI.1' i kullanarak oral aşı tableti geliştirmiştir. Bu aşının, deneklerin çoğunda güçlü mukozal bağışıklık tepkilerini indüklediği tespit edilmiştir (Vaxart, 2019). Takeda firması ise TAK-214 adıyla GI.1/GII.4c genotipli divalent VLP bazlı bir norovirüs aşı adayını geliştirmişlerdir. İntramüsküler olarak tez doz uygulanan bu aşı adayının sağlıklı yetişkinlerde güvenli, iyi tolere edilen ve immünojenik olduğunu göstermiştir. Aynı aşı adayını 1-8 yaşındaki çocuklarda kabul edilebilir reaktogenite ile birlikte güçlü bağışıklık tepkileri sergilemiştir (Sherwood vd. 2020, Vesikari vd. 2022). Çalışmamızda da immünojen özellik sergileyen VP1' in farklı kombinasyonları üzerine aşı çalışmaları yoğunluk kazanmıştır.

Norovirüs proteinlerden VP1, VP2 ve p22' nin epitoplarından sentezlenen bir polipeptid laboratuvar ortamında bugüne kadar test edilmemiştir. VP1 ve VP2' ye ait üçer adet ve p22' ye ait iki adet epitop kullanılarak multi-epitop aşı adayını belirlenmiştir (Şekil 3.4). İmmünoinformatik yöntemlerle *in-silico* ortamda norovirüs proteinlerinden multi-epitop aşı adayları tasarlanmıştır. Azim vd. (2019) immünoinformatik yaklaşımları kullanarak insan norovirüsüne karşı VP1 ve VP2' nin epitoplarından oluşan bir multi-epitop yapılı aşı tasarlamışlardır. Ancak bu aşının etkinliğini deneysel olarak kanıtlamamışlardır. Eltilib vd. (2020) bağışıklık sistemini uyaran, güvenli ve etkili aşı görevi gören kapsid VP1 proteinlerinin epitoplarını tespit etmek için yirmi bir norovirüs suşu taramışlardır. Farklı programlar kullanarak antijenik, alerjik ve toksik olmayan on yedi adet epitop belirlemişlerdir. Fakat diğer *in silico* çalışmalar gibi laboratuvar ortamında test etmemişlerdir. Başka bir çalışmada Ahmad

vd. (2020) bütün proteomu tarayarak VP1, VP2 ve proteazdan oluşturdıkları multi-epitop aşı adayının etkinliğini *in-silico* ortamda test etmişlerdir. Multi-epitop aşı yaklaşımı ile rekombinant olarak elde edilen EP123 immünojenik özellik göstermemiş olsa bile laboratuvar ortamında test edilmiş olması oldukça önemlidir.

Çalışmamızda NoV' e ait genler başarılı bir şekilde *E. coli*' ye klonlanmıştır ve sekans analiziyle doğrulanmıştır. IPTG ile indüklenen rekombinant proteinler farklı protein saflaştırma teknikleri kullanılarak kısmi olarak elde edilmişlerdir. İmmünojeniteyi belirlemeye yarayan ELISA yönteminde kullanılmak üzere immunize edilen farelerden serum elde edilmiştir. Adjuvanla birlikte verilen 50 µg/hayvan rekombinant antijen konsantrasyonunun literatüre göre yetersiz gelmiş olabileceği sonucuna varılmıştır. Sadece VP1' in immünojen özellik göstermesi yapılmış olan çalışmalarla tutarlıdır. VP1'in hücre-konak etkileşiminde ve HBGA' ya bağlanması sürecinde aktif rol aldığı için aşı çalışmaları bu protein üzerine yoğunlaşmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada HuNoV için aşı adayı epitoplardan oluşan bir polipeptit (EP123) tasarlamak ve *in-vivo* ortamda bu polipeptidin immünojen olduğu bilinen NoV antijenleri ile karşılaştırmalı olarak immünojenitesini araştırmak amaçlanmıştır. Çalışma sonucunda rekombinant olarak üretilen epitopun ve VP1 dışındaki proteinlerin immünojen olmadığı tespit edilmiştir. İleriki çalışmalarda aynı antijenler için aşı dozu ve bağışıklama sayısı arttırılabilir, adjuvan değiştirilebilir, saflaştırılmış rekombinant protein uygulanabilir. Multi-epitop aşı adayı tasarlanırken immünoinformatik yaklaşımlar göz önünde bulundurularak bir aday belirlenebilir. Bunun sonucunda en etkili aday laboratuvar ortamında test edilebilir. Bugüne kadar yapılan araştırmalardan, *E. coli* ekspresyon sistemleri kullanılarak elde edilen yapısal NoV proteinlerinin uygun immünojenik tepkiler ortaya çıkarabileceği açıktır.

NoV' lere karşı bağışıklık tepkisinin, hayvanlara verilen aşının dozuna ve bağışıklama sayısına bağlı olduğu açıkça gösterilmiştir. Epidemiyolojik ve immünolojik çalışmalar, hem GI hem de GII NoV içeren çok değerlikli aşıların, yeterince geniş koruma sağlamak için tek çözüm olduğunu göstermiştir. Basit, güvenli ve kolay uygulanabilir bir aşı, NoV gastroenteritinin kontrolü ve önlenmesi için anahtar olabilir.

KAYNAKLAR

- Adamson, WE., Gunson, RN., Maclean, A., Carman, WF. (2007). Emergence of a new norovirus variant in Scotland in 2006. *J Clin Microbiol.*, 45:4058-60. doi: 10.1128/JCM.01853-07
- Agus, SG., Dolin, R., Wyatt, RG., Tousimis, AJ., Northrup, RS. (1973). Acute infectious non-bacterial gastroenteritis: intestinal histopathology. Histologic and enzymatic alterations during illness produced by the Norwalk agent in man. *Ann Intern Med.*, 79:18–25. doi: 10.7326/0003-4819-79-1-18
- Allen, DJ., Gray, JJ., Gallimore, CI., Xerry, J., Iturriza-Gomara, M. (2008). Analysis of amino acid variation in the P2 domain of the GII-4 norovirus VP1 protein reveals putative variant-specific epitopes. *PLoS One.*, 3:e1485. doi: 10.1371/journal.pone.0001485
- Alvarado, G., Ettayebi, K., Atmar, RL., Bombardi, RG., Kose, N., Estes, MK., Crowe, JE. (2018). Jr. Human Monoclonal Antibodies That Neutralize Pandemic GII.4 Noroviruses. *Gastroenterology*, 155, 1898–1907.
- Ahmed, SM., Hall, AJ., Robinson, AE., Verhoef, L., Premkumar, P., Parashar, UD., et al. (2014). Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.*, 14, 725–730
- Anderesson, MD. (2022). DNA 6X Loading Dye. Cancer Center. Erişim Adresi: <http://www.mdanderesson.org/education-and-research/departments-programs-and-labs/labs/dent-laboratory/protocols/dna-6x-loading-dye.html> adresinden erişildi.
- Atmar, RL., Bernstein, DI., Harro, CD., et al. (2011). Norovirus vaccine against experimental human Norwalk virus illness. *N Engl J Med.*, 365: 2178–87

- Atmar, RL., Baehner, F., Cramer, JP., Song, E., Borkowski, A., Mendelman, PM., et al. (2016). Rapid responses to 2 virus-like particle norovirus vaccine candidate formulations in healthy adults: a randomized controlled trial. *J Infect Dis.*, 214:845–53.
- Ball, JM., Graham, DY., Opekun, AR., Gilger, MA., Guerrero, RA., Estes, MK. (1999). Recombinant Norwalk viruslike particles given orally to volunteers: phase I study. *Gastroenterology*, 117:40-48.
- Baron, RC., Greenberg, HB., Cukor, G., Blacklow, NR. (1984). Serological responses among teenagers after natural exposure to Norwalk virus. *J Infect Dis.*, 150:531–4. doi: 10.1093/infdis/150.4.531
- Belliot, G., Sosnovtsev, SV., Mitra, T., Hammer, C., Garfield, M., Green, KY. (2003). In vitro proteolytic processing of the MD145 norovirus ORF1 nonstructural polyprotein yields stable precursors and products similar to those detected in calicivirus-infected cells. *J Virol.*, 77:10957-74. doi: 10.1128/JVI.77.20.10957-10974.2003
- Belliot, G., Sosnovtsev, SV., Chang, KO., Babu, V., Uche, U., Arnold, JJ., et al. (2005). Norovirus proteinase-polymerase and polymerase are both active forms of RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol.*, 79:2393-403. doi: 10.1128/JVI.79.4.2393-2403.2005
- Bertolotti-Ciarlet, A., White, LJ., Chen, R., Prasad, BV., Estes, MK. (2002). Structural requirements for the assembly of Norwalk virus-like particles. *J Virol.*, 76:4044-55. doi: 10.1128/JVI.76.8.4044-4055.2002
- Bradford, MM. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, cilt 72, ss. 248-254, doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3

- Bull, RA., Hansman, GS., Clancy, LE., Tanaka, MM., Rawlinson, WD., White, PA. (2005). Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap. *Emerging Infect Dis.*, 11:1079. doi: 10.3201/eid1107.041273
- Bull, RA., Tu, ET., McIver, CJ., Rawlinson, WD., White, PA. (2006). Emergence of a new norovirus genotype GII.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis. *J Clin Microbiol*, 44, 327-333
- Bull, RA., Tanaka, MM., White, PA. (2007). Norovirus recombination. *J Gen Virol.*, 88:3347-59. doi: 10.1099/vir.0.83321-0
- Bull, RA., Eden JS., Rawlinson, WD., White, PA. (2010). Rapid evolution of pandemic noroviruses of the GII.4 lineage. *PLoS Pathog*, 6, p. e1000831
- Burch, T. (2019). Validation of Quantitative Microbial Risk Assessment Using Epidemiological Data from Outbreaks of Waterborne Gastrointestinal Disease. *Risk Anal.*, 39, 599–615
- Campillay-Véliz, CP., Carvajal, JJ., Avellaneda, AM., Escobar, D., Covián, C., Kalergis, AM., Lay, MK. (2020). Human Norovirus Proteins: Implications in the Replicative Cycle, Pathogenesis, and the Host Immune Response. *Front. Immunol.*, 11:961. doi: 10.3389/fimmu.2020.00961
- Cannon, JL., Lindesmith, LC., Donaldson, EF., Saxe, L., Baric, RS., Vinje, J. (2009). Herd immunity to GII.4 noroviruses is supported by outbreak patient sera. *J Virol.*, 83:5363-74. doi: 10.1128/JVI.02518-08

- Cao, S., Lou, Z., Tan, M., Chen, Y., Liu, Y., Zhang, Z., et al. (2007). Structural basis for the recognition of blood group trisaccharides by norovirus. *J Virol.*, 81:5949–57. doi: 10.1128/JVI.00219-07
- Chhabra, P., Payne, DC., Szilagyi, PG., Edwards, KM., Staat, MA., Shirley, SH., Wikswo, M., et al. (2013). Etiology of Viral Gastroenteritis in Children <5 years of age in the United States, 2008-2009. *J Infect Dis.*, 208(5):790-800. doi: 10.1093/infdis/jit254.
- Chaga, GS. (2001). Twenty-Five Years of Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography: Past, Present and Future (Palo Alto, USA), *Biochemical and Biophysical Methods*, 49, 313-334
- Chang, KO., Sosnovtsev, SV., Belliot, G., King, AD., Green, KY. (2006). Stable expression of a Norwalk virus RNA replicon in a human hepatoma cell line. *Virology*, 353:463–73. doi: 10.1016/j.virol.2006.06.006
- Chen, YL.& Huang CT. (2020). Establishment of a two-step purification scheme for tag-free recombinant Taiwan native norovirus P and VP1 proteins. *Journal of Chromatography B*, 1159 (2020) 122357, doi: 10.1016/j.jchromb.2020.122357
- Chen, W., Kang, T., Yuan, R., Shao, C., Jing, S. (2020). Immunogenicity and protective potency of Norovirus GII.17 virus-like particle-based vaccine. *Biotechnol Lett.*, 42:1211–1218 doi: 10.1007/s10529-020-02837-w
- Chhabra, P., de Graaf, M., Parra, GI., Chan, MC., Green, K., Martella, V., et al. (2019). Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *J Gen Virol.*, 100:1393–406. doi: 10.1099/jgv.0.001318
- Choi, AH., McNeal, MM., Basu, M., Flint, JA., Stone, SC., et al. (2002). Intranasal or oral immunization of inbred and outbred mice with murine or human rotavirus VP6 proteins

protects against viral shedding after challenge with murine rotaviruses. *Vaccine*, 20: 3310-3321. doi: 10.1016/S0264-410X(02)00315-8.

Conley, MJ., McElwee, M., Azmi, L., Gabrielsen, M., Byron, O., et al. (2019). Calicivirus VP2 forms a portal-like assembly following receptor engagement. *Nature*, 565:377-381.

Costantini, V., Morantz, EK., Browne, H., Ettayebi, K., Zeng, XL., Atmar, RL., Estes, MK., Vinje, J. (2018). Human Norovirus Replication in Human Intestinal Enteroids as Model to Evaluate Virus Inactivation. *Emerg. Infect. Dis.*, 24, 1453–1464.

Cortes-Penfield, NW., Ramani, S., Estes, MK., Atmar, RL. (2017). Prospects and challenges in the development of a norovirus vaccine. *Clin Ther.*, 39:1537-49. doi: 10.1016/j.clinthera.2017.07.002

Crowe, J., Dobeli, H., Genz, R., Hochuli, E., Stuber, D., Henco, K. (1994). 6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. *Methods Mol. Biol.*, 31, 371-387.

Crowne, J., Masone, BS., Ribbe, J. (1995). One-step purification of recombinant proteins with the 6xHis tag and Ni-NTA resin. *Mol. Biotechnol.*, Dec;4(3):27-58. Doi: 10.1007/BF02779018

Dang, W., Xu, L., Yin, Y., Chen, S., Wang, W., Hakim, MS., et al. (2018). IRF-1, RIG-I and MDA5 display potent antiviral activities against norovirus coordinately induced by different types of interferons. *Antiviral Res.*, 155:48-59. doi: 10.1016/j.antiviral.2018.05.004

Daughenbaugh, KF., Fraser, CS., Hershey, JW., Hardy, ME. (2003). The genomelinked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *EMBO J.*, 22:2852-9. doi: 10.1093/emboj/cdg251

- de Graaf, M., van Beek, J., Koopmans, MP. (2016). Human norovirus transmission and evolution in a changing world. *Nat Rev Microbiol.*, 14:421–33. doi: 10.1038/nrmicro.2016.48
- Debbink, K., Lindesmith, LC., Donaldson, EF., Baric, RS. (2012). Norovirus immunity and the great escape *PLoS Pathog*, 8, p. e1002921
- Doerflinger, SY., Cortese, M., Romero-Brey, I., Menne, Z., Tubiana, T., Schenk, C., et al. (2017). Membrane alterations induced by nonstructural proteins of human norovirus. *PLoS Pathog.*, 13:e1006705. doi: 10.1371/journal.ppat.1006705
- Donaldson, EF., Lindesmith, LC., LoBue, AD., Baric, RS. (2010). Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system. *Nat Rev Microbiol.*, 8, pp. 231-241
- Donato, CM., Ch'ng, LS., Boniface, KF., Crawford, NW., Buttery, JP., et al. (2012). Identification of strains of RotaTeq rotavirus vaccine in infants with gastroenteritis following routine vaccination. *J Infect Dis.*, 206:377-383. doi:10.1093/infdis/jis361
- Eden, J-S., Bull, RA., Tu, E., et al. (2010). Norovirus GII.4 variant 2006b caused epidemics of acute gastroenteritis in Australia during 2007 and 2008. *J Clin Virol.*, 49, 265-271.
- Eden, J-S., Tanaka, MM., Boni, MF., Rawlinson, WD., White, PA. (2013). Recombination within the pandemic norovirus GII.4 lineage. *J Virol.*, 87, 6270-6282
- Eden, J-S., Hewitt, J., Lim, KL., et al. (2014). The emergence and evolution of the novel epidemic norovirus GII.4 variant Sydney 2012. *Virology*, 450, 106-113.

- El-Kamary, SS., Pasetti, MF., Mendelman, PM., et al. (2010). Adjuvanted intranasal Norwalk virus-like particle vaccine elicits antibodies and antibodysecretingcells that express homing receptors for mucosal and peripheral lymphoid tissues. *J Infect Dis.*, 202:1649-58
- Etilib, EEM., Almofti, YA., Abd-elrahman, KA., Nouri, MAA. (2020). Modeling and in Silico Analysis for Prediction of Epitopes Vaccine against Norwalk virus from Capsid Protein (VP1) through Reverse Vaccinology. *American Journal of Infectious Diseases and Microbiology*, Vol. 8, No. 1, 29-44.
- Estes, MK., Kapikian, AZ. (2007). Rotaviruses. In: D KnipeD GriffinR LambM MartinB Roizman. *Fields Virology*, Lippincott Williams &Wilkins. pp. 1917-1975.
- Ettayebi, K., Hardy, ME. (2003). Norwalk virus non-structural protein p48 forms a complex with the SNARE regulator VAP-A and prevents cell surface expression of vesicular stomatitis virus G protein. *J Virol.*, 77:11790-7. doi: 10.1128/JVI.77.21.11790-11797.2003
- Ettayebi, K., Crawford, SE., Murakami, K., Broughman, JR., Karandikar, U., et al. (2016). Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. *Science*, 353(6306): 1387-1393. doi: 10.1126/science.aaf5211.
- Fang, H., Tan, M., Xia, M., Wang, L., Jiang, X. (2013). Norovirus P Particle Efficiently Elicits Innate, Humoral and Cellular Immunity. *PLoS ONE*, 8(4): e63269. doi: 10.1371/journal.pone.0063269
- Fankhauser, RL., Monroe, SS., Noel, JS., Humphrey, CD., Bresee, JS., Parashar, UD., et al. (2002). Epidemiologic and molecular trends of “Norwalk-like viruses” associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis*, 186:1-7

- Fernandez-Vega, V., Sosnovtsev, SV., Belliot, G., King, AD., Mitra, T., Gorbalenya, A., et al. (2004). Norwalk virus N-terminal nonstructural protein is associated with disassembly of the Golgi complex in transfected cells. *J Virol.*, 78:4827-37. doi: 10.1128/JVI.78.9.4827-4837.2004
- Glass, RI., Parashar, UD., Estes, MK. (2009). Norovirus gastroenteritis. *N Engl J Med.*, 361, 1776–1785.
- Gray, J., Cunliffe, C., Ball, J., Graham, DY., Desselberger, U., Estes, MK. (1994). Detection of immunoglobulin M (IgM), IgA, and IgG Norwalk virus-specific antibodies by indirect enzyme-linked immunosorbent assay with baculovirus-expressed Norwalk virus capsid antigen in adult volunteers challenged with Norwalk virus. *J Clin Microbiol.*, 32:3059-63.
- Guo, L., Wang, J., Zhou, H., Si, H., Wang, M., Song, J., Han, B., Shu, Y., Ren, L., Qu, J., et al. (2008). Intranasal administration of a recombinant adenovirus expressing the norovirus capsid protein stimulates specific humoral, mucosal, and cellular immune responses in mice. *Vaccine*, 26, 460–468.
- Green, KY., Kaufman, SS., Nagata, BM., Chaimongkol, N., Kim, DY., Levenson, EA., Tin, CM., et al. (2020). Human norovirus targets enteroendocrine epithelial cells in the small intestine. *Nature Communications*, 11:2759, doi: 10.1038/s41467-020-16491-3
- Hall, AJ., Lopman, BA., Payne, DC., Patel, MM., Gastan˜ aduy, PA., Vinje´, J., Parashar, UD. (2013). Norovirus disease in the United States. *Emerg Infect Dis.* 19, 1198-1205.
- Hallowell, BD., Parashar, UD., Hall, AJ. (2019). Epidemiologic challenges in norovirus vaccine development. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 15, 1279-1283.

- Hansman, GS., Shahzad-Ul-Hussan, S., McLellan, JS., Chuang, GY., Georgiev, I., Shimoike, T., et al. (2012). Structural basis for norovirus inhibition and fucose mimicry by citrate. *J Virol.* 86:284-92. doi: 10.1128/JVI.05909-11
- Hardy, ME., Crone, TJ., Brower, JE., Ettayebi, K. (2002). Substrate specificity of the Norwalk virus 3C-like proteinase. *Virus Res.* 89:29–39. doi: 10.1016/S0168-1702(02)00114-4
- Hemming, M., Räsänen, S., Huhti, L., Paloniemi, M., Salminen, M., Vesikari, T. (2013). Major reduction of rotavirus, but not norovirus, gastroenteritis in children seen in hospital after the introduction of RotaTaq vaccine into the National Immunization Programme in Finland. *Eur J Pediatr.* 172:739-46. doi: 10.1007/s00431-013-1945-3
- Hosmillo, M., Lu, J., McAllaster, MR., Eaglesham, JB., Wang, X., Emmott, E., et al. (2019). Noroviruses subvert the core stress granule component G3BP1 to promote viral VPg-dependent translation. *Elife.*, 8:e46681. doi: 10.7554/eLife.46681
- Huang, P., Farkas, T., Marionneau, S., Zhong, W., Ruvoën-Clouet, N., Morrow, AL., et al. (2003). Noroviruses bind to human ABO, Lewis, and secretor histo-blood group antigens: identification of 4 distinct strain-specific patterns. *J Infect Dis.*, 188:19–31. doi: 10.1086/375742
- Huang, P., Farkas, T., Zhong, W., Tan, M., Thornton, S., Morrow, AL., et al. (2005). Norovirus and histo-blood group antigens: demonstration of a wide spectrum of strain specificities and classification of two major binding groups among multiple binding patterns. *J Virol.* 79:6714–22. doi: 10.1128/JVI.79.11.6714-6722.2005
- Huo, Y., Wan, X., Ling, T., Wu, J., Wang, W., Shen, S. (2018). Expression and purification of norovirus virüs like particles in *Escherichia coli* and their immunogenicity in mice. *Molecular Immunology*, 93, 278-284.

- Hutson, AM., Airaud, F., LePendou, J., Estes, MK., Atmar, RL. (2005). Norwalk virüs infection associates with secretor status genotyped from sera. *J Med Virol.*, 77:116–20. doi: 10.1002/jmv.20423
- Jensen, S., Thomsen, AR. (2012). Sensing of RNA viruses: a review of innate immune receptors involved in recognizing RNA virus invasion. *J Virol.*, 86:2900–10. doi:10.1128/JVI.05738-11
- Jiang, X., Wang, M., Graham, DY., Estes, MK. (1992). Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J Virol.*, 66:6527-32. doi: 10.1128/JVI.66.11.6527-6532.1992
- Johansen, K., Mannerqvist, K., Allard, A., Andersson, Y., Burman, LG., Dillner, L., et al. (2008). Norovirus strains belonging to the GII. 4 genotype dominate as a cause of nosocomial outbreaks of viral gastroenteritis in Sweden 1997–2005: Arrival of new variants is associated with large nation-wide epidemics. *J Clin Virol.*, 42:129–34. doi: 10.1016/j.jcv.2007.12.012
- Johnson, PC., Mathewson, JJ., DuPont, HL., Greenberg, HB. (1990). Multiple-challenge study of host susceptibility to Norwalk gastroenteritis in US adults. *J Infect Dis.*, 161:18-21. doi: 10.1093/infdis/161.1.18
- Jones, MK., Grau, KR., Costantini, V., Kolawole, AO., de Graaf, M., Freiden, P., et al. (2015). Human norovirus culture in B cells. *Nat Protoc.*, 10:1939–47. doi: 10.1038/nprot.2015.121
- Kapikian, AZ. (2000). The discovery of the 27-nm Norwalk 89onse: an historic perspective. *J Infect Dis.*, 181 (Suppl 2), S295–S302

- Karst, SM., Wobus, CE., Lay, M., Davidson, J., Virgin, HWt. (2003). STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science*, 299:1575–8. doi: 10.1126/science.1077905
- Karst, SM., Tibbetts, SA. (2016). Recent advances in understanding Norovirus pathogenesis. *Journal of Medical Virology*, 88(11). doi: 10.1002/jmv.24559
- Kim, J-W., Kong, Y-J., Kim, M-S., Lee, H-J., Lee, S-W., Kang, S-Y. (2015). Expression of human norovirus VP1 gene and VP1-specific monoclonal antibodies. *J Biomed Res* 2015; 16(3):109-114. doi: 10.12729/jbr.2015.16.3.109
- Kocher, J., Bui, T., Giri-Rachman, E., Wen, K., Li, G., Yang, X., et al. (2014). Intranasal P particle vaccine provided partial cross-variant protection against human GII.4 norovirus diarrhea in gnotobiotic pigs. *J Virol.*, 88:9728–43. doi: 10.1128/JVI.01249-14
- Kolawole, AO., Rocha-Pereira, J., Elftman, MD., Neyts, J., Wobus, CE. (2016). Inhibition of human norovirus by a viral polymerase inhibitor in the B cell culture system and in the mouse model. *Antivir. Res.*, 132, 46–49.
- Konak, Üİ., Turhan, İ., Certel, M. (2014). *Proteinlerin Kromatografik Yöntemlerle Saflaştırılması* (Antalya, Türkiye), Akademik Gıda, 12 (2), 79-87
- Laemmli, UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259): 680-685.
- Lateef, Z., Gimenez, G., Baker, ES., Ward, VK. (2017). Transcriptomic analysis of human norovirus NS1-2 protein highlights a multifunctional role in murine monocytes. *BMC Genomics*, 18:39. doi: 10.1186/s12864-016-3417-4

- Lee, S., Baldrige, MT. (2017). Interferon-lambda: a potent regulator of intestinal viral infections. *Front Immunol.*, 8:749. doi:10.3389/fimmu.2017.00749
- Leroux-Roels, G., Cramer, JP., Mendelman, PM., Sherwood, J., Clemens, R., Aerssens, A., et al. (2018). Safety and immunogenicity of different formulations of norovirus vaccine candidate in healthy adults: a randomized, controlled, double-blind clinical trial. *J Infect Dis.*, 217(4):597–607
- Li, TF., Hosmillo, M., Schwanke, H., Shu, T., Wang, Z., Yin, L., et al. (2018). Human norovirus NS3 has RNA helicase and chaperoning activities. *J Virol.*, 92:17. doi: 10.1128/JVI.01606-17
- Lin, Y., Fengling, L., Lianzhu, W., Yuxiu, Z., Yanhua, J. (2014). Function of VP2 protein in the stability of the secondary structure of virus-like particles of genogroup II norovirus at different pH levels: function of VP2 protein in the stability of NoV VLPs. *J Microbiol.*, 52:970–5. doi:10.1007/s12275-014-4323-6
- Lindesmith, L., Moe, C., Marionneau, S., Ruvoen, N., Jiang, X., Lindblad, L., et al. (2003). Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat Med.*, 9:548–53. doi: 10.1038/nm860
- Lindesmith, LC., Donaldson, EF., Lobue, AD., Cannon, JL., Zheng, DP., Vinje, J., et al. (2008). Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Med.*, 5:e31. doi: 10.1371/journal.pmed.0050031
- Lindesmith, LC., Donaldson, E., Leon, J., Moe, CL., Frelinger, JA., Johnston, RE., et al. (2010). Heterotypic humoral and cellular immune responses following Norwalk virus infection. *J Virol.*, 84:1800–15. doi: 10.1128/JVI.02179-09

- Lindesmith, LC., Debbink, K., Swanstrom, J., Vinje, J., Costantini, V., Baric, RS., et al. (2012). Monoclonal antibody- based antigenic mapping of norovirus GII.4-2002. *J Virol.*, 86:873–83. doi: 10.1128/JVI.06200-11
- Lindesmith, LC., Brewer-Jensen, PD., Mallory, ML., Debbink, K., Swann, EW., Vinjé, J., et al. (2017). Antigenic characterization of a novel recombinant GII. P16-GII. 4 Sydney norovirus strain with minor sequence variation leading to antibody escape. *J Infect Dis.*, 217:1145–52. doi: 10.1093/infdis/jix651
- Liu, B., Clarke, IN., Lambden, PR. (1996). Polyprotein processing in Southampton virus: identification of 3C-like protease cleavage sites by in vitro mutagenesis. *J Virol.*, 70:2605–10. doi: 10.1128/JVI.70.4.2605-2610.1996
- Liu, Z., Zhang, M., Shen, Z., Chen, H., Zhang, W., Xu, X., et al. (2019). The coordinating role of the human norovirus minor capsid protein VP2 is essential to functional change and nuclear localization of the major capsid protein VP1. *Arch Virol.*, 164:1173–80. doi: 10.1007/s00705-019-04192-2
- Lopman, BA., Reacher, MH., van Duynhoven, Y., Hanon, FX., Brown, D., Koopmans, M. (2003). Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995–2000. *Emerg Infect Dis.*, 9:90-96.
- Lopman, B., Vennema, H., Kohil, E., Pothier, P., et al. (2004). Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. *Lancet*, 363, pp. 682-688
- Lucero, Y., Vidal, R., O’Ryan, GM. (2017). Norovirus vaccines under development. *Vaccine*, doi: 10.1016/j.vaccine.2017.06.043

- Mallagaray, A., Creutzmacher, R., Dulfer, J., Mayer, PHO., Grimm, LL., Orduna, JM., et al. (2019). A post-translational modification of human Norovirus capsid protein attenuates glycan binding. *Nat Commun.*, 10:1320. doi: 10.1038/s41467-019-09251-5
- Mallory, ML., Lindesmith, LC., Graham, RL., Baric, RS. (2019). GII. 4 human norovirus: surveying the antigenic landscape. *Viruses*, 11:177. doi: 10.3390/v11020177
- Malm, M., Diessner, A., Tamminen, K., Liebscher, M., Vesikari, T., Blazevic, V. (2019). Rotavirus VP6 as an adjuvant for bivalent Norovirus vaccine produced in *Nicotiana benthamiana*. *Pharmaceutics*, 11, 229; doi: 10.3390/pharmaceutics11050229
- Marionneau, S., Ruvoen, N., Le Moullac-Vaidye, B., Clement, M., Cailleau-Thomas, A., Ruiz-Palacois, G., et al. (2002). Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology*, 122:1967–77. doi: 10.1053/gast.2002.33661
- Mason, HS., Ball, JM., Shi, JJ., Jiang, X., Estes, MK., Arntzen, CJ. (1996). Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:5335–5340.
- Mathew, LG., Herbst-Kralovetz, MM., Mason, HS. (2014). Norovirus Narita 104 virus-like particles expressed in *Nicotiana benthamiana* induce serum and mucosal immune responses. *BioMed Res. Int.*, 2014, 807539.
- May, J., Korba, B., Medvedev, A., Viswanathan, P. (2013). Enzyme kinetics of the human norovirus protease control virus polyprotein processing order. *Virology*, 444:218–24. doi: 10.1016/j.virol.2013.06.013

- May, J., Viswanathan, P., Ng, KK-S., Medvedev, A., Korba, B. (2014). The P4-P2' amino acids surrounding human norovirus polyprotein cleavage sites define the core sequence regulating self-processing order. *J Virol.*, 88:10738–47. doi: 10.1128/JVI.01357-14
- Medvedev, A., Viswanathan, P., May, J., Korba, B. (2017). Regulation of human norovirus VPg nucleotidylation by ProPol and nucleoside triphosphate binding by its amino terminal sequence in vitro. *Virology*, 503:37–45. doi: 10.1016/j.virol.2017.01.003
- Mulligan, RC., Howard, BH., Berg, P. (1979). Synthesis of rabbit β -globin in cultured monkey kidney cells following infection with a SV40 β -globin recombinant genome. *Nature*, 277, 108–114
- Nakamura, K., Someya, Y., Kumasaka, T., Ueno, G., Yamamoto, M., Sato, T., et al. (2005). A norovirus protease structure provides insights into active and substrate binding site integrity. *J Virol.*, 79:13685–93. doi: 10.1128/JVI.79.21.13685-13693.2005
- Newman, KL., Moe, CL., Kirby, AE., Flanders, WD., Parkos, CA., Leon, JS. (2015). Human norovirus infection and the acute serum cytokine response. *Clin Exp Immunol.*, 182:195–203. doi: 10.1111/cei.12681
- Noel, JS., Fankhauser, RL., Ando, T., Monroe, SS., Glass, RI. (1999). Identification of a distinct common strain of 'norwalk-like viruses' having a global distribution. *J Infect Dis.*, 179, pp. 1334-1344
- Odabaşı, M. (2014). *İmmobilize metal iyon afinite kromatografisi. Protein Kromatografisi ve Yeni Nesil Polimerik Sistemler*, (editör: Denizli, A.), Detay Copy Matbaa Yayıncılık, Bursa, 243-267

- Okada, M., Ogawa, T., Yoshizumi, H., Kubonoya, H., Shinozaki, K. (2007). Genetic variation of the norovirus GII-4 genotype associated with a large number of outbreaks in Chiba prefecture, Japan. *Arch Virol.*, 152:2249–52. doi: 10.1007/s00705-007-1028-8
- Okhuysen, PC., Jiang, X., Ye, L., Johnson, PC., Estes, MK. (1995). Viral shedding and fecal IgA response after Norwalk virus infection. *J Infect Dis.*, 171:566–9. doi: 10.1093/infdis/171.3.566
- Ozaki, K., Matsushima, Y., Nagasawa, K., Motoya, T., Ryo, A., Kuroda, M., et al. (2018). Molecular evolutionary analyses of the RNA-dependent RNA polymerase region in norovirus genogroup II. *Front Microbiol.*, 9:3070. doi: 10.3389/fmicb.2018.03070
- Parra, GI., Bok, K., Taylor, R., et al. (2012). Immunogenicity and specificity of norovirus consensus GII.4 virus-like particles in monovalent and bivalent vaccine formulations. *Vaccine*, 30:3580–6.
- Parrino, TA., Schreiber, DS., Trier, JS., Kapikian, AZ., Blacklow, NR. (1977). Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. *N Engl J Med.*, 297:86–9. doi:10.1056/NEJM197707142970204
- Periwal, SB., Kourie, KR., Ramachandaran, N., et al. (2003). A modified cholera holotoxin CT-E29H enhances systemic and mucosal immune responses to recombinant Norwalk virus-virus like particle vaccine. *Vaccine*, 21:376–385
- Pfister, T., Wimmer, E. (2001). Polypeptide p41 of a Norwalk-like virus is a nucleic acid-independent nucleoside triphosphatase. *J Virol.*, 75:1611–9. doi: 10.1128/JVI.75.4.1611-1619.2001

- Prasad, BV., Rothnagel, R., Jiang, X., Estes, MK. (1994). Three-dimensional structure of baculovirus-expressed Norwalk virus capsids. *J Virol.*, 68:5117–25. doi: 10.1128/JVI.68.8.5117-5125.1994
- Prasad, BV., Hardy, ME., Dokland, T., Bella, J., Rossmann, MG., Estes, MK. (1999). X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science*, 286:287–90. doi: 10.1126/science.286.5438.287
- Ramani, S., Giri, S. (2019). Influence of histo blood group antigen expression on susceptibility to enteric viruses and vaccines. *Curr Opin Infect Dis.*, 32:445–52. doi: 10.1097/QCO.0000000000000571
- Ramirez, K., Wahid, R., Richardson, C., et al. (2012). Intranasal vaccination with an adjuvanted Norwalk virus-like particle vaccine elicits antigen-specific B memory responses in human adult volunteers. *Clin Immunol.*, 144:98–108.
- Reeck, A., Kavanagh, O., Estes, MK., Opekun, AR., Gilger, MA., Graham, DY., et al. (2010). Serological correlate of protection against norovirus-induced gastroenteritis. *J Infect Dis.*, 202:1212–8. doi: 10.1086/656364
- Reuter, G., Pankovics, P., Szucs, G. (2008). Genetic drift of norovirus genotype GII-4 in seven consecutive epidemic seasons in Hungary. *J Clin Virol.*, 42:135–40. doi: 10.1016/j.jcv.2008.02.014
- Richardson, C., Bargatze, RF., Goodwin, R., Mendelman, PM. (2013). Norovirus virüs like particle vaccines for the prevention of acute gastroenteritis. *Expert Rev Vaccines*, 12:155–67. doi: 10.1586/erv.12.145
- Roth, AN., Karst, SM. (2016). Norovirus mechanisms of immune antagonism. *Curr Opin Virol.*, 16:24–30. doi: 10.1016/j.coviro.2015.11.005

- Russo, E. (2003). The birth of biotechnology. *Nature*, 421(6921):456-7. doi: 10.1038/nj6921-456a.
- Sambrook, J., Fritsch, EF., Maniatis, T. (2001). *Molecular cloning: A Laboratory Manual. Preparation and Transformation of Competent E. coli using Calcium Chloride*. Irwin N, Janssen K. A. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Santi, L., Batchelor, L., Huang, Z., Hjelm, B., Kilbourne, J., Arntzen, CJ., Chen, Q., Mason, HS. (2008). An efficient plant viral expression system generating orally immunogenic Norwalk virus-like particles. *Vaccine*, 26:1846-1854.
- Sato, S., Hisaie, K., Kurokawa, S., Suzuki, A., Sakon, N., Uchida, Y., Yuki, Y., Kiyono, H. (2019). Human Norovirus Propagation in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Intestinal Epithelial Cells. *Cell Mol. Gastroenterol. Hepatol.*, 7, 686–688.e685.
- Savigny, D. de & Voller, A. (1980). The Communication of ELISA Data from Laboratory to Clinician. *Journal of Immunoassay*, 1(1), 105–128.
- Scheffler, U., Rudolph, W., Gebhardt, J., Rohayem, J. (2007). Differential cleavage of the norovirus polyprotein precursor by two active forms of the viral protease. *J Gen Virol.*, 88:2013–8. doi:10.1099/vir.0.82797-0
- Shanker, S., Choi, JM., Sankaran, B., Atmar, RL., Estes, MK., Prasad, BV. (2011). Structural analysis of histo-blood group antigen binding specificity in a norovirus GII.4 epidemic variant: implications for epochal evolution. *J Virol.*, 85:8635–45. doi: 10.1128/JVI.00848-11
- Sharp, TM., Guix, S., Katayama, K., Crawford, SE., Estes, MK. (2010). Inhibition of cellular protein secretion by norwalk virus non-structural protein p22 requires a mimic of an

endoplasmic reticulum export signal. *PLoS One.*, 5:e13130. doi: 10.1371/journal.pone.0013130

Sherwood, J., Mendelman, P., Lloyd, E., Liu, M., Boslego, J., Borkowski, A., et al. (2020). Efficacy of an intramuscular bivalent norovirus GI. 1/GII. 4 virus-like particle vaccine candidate in healthy US adults. *Vaccine*, 38(41):6442–9.

Shi, L., Wang, J., Wang, P., Li, G., Gong, M., Yuan, W., Zhu, H. (2012). Development of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) assay based on a recombinant truncated VP2 (tVP2) protein for the detection of canine parvovirus antibodies. *Afr. J. Biotechnol.*, Vol. 11(93), pp. 16034-16039. DOI: 10.5897/AJB12.2446

Shirato, H., Ogawa, S., Ito, H., Sato, T., Kameyama, A., Narimatsu, H., et al. (2008). Noroviruses distinguish between type 1 and type 2 histo-blood group antigens for binding. *J Virol.*, 82:10756–67. doi: 10.1128/JVI.00802-08

Siebenga, JJ., Vennema, H., Renckens, B., de Bruin, E., van der Veer, B., Siezen, RJ., et al. (2007). Epochal evolution of GGII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *J Virol.*, 81:9932–41. doi: 10.1128/JVI.00674-07

Siebenga, J., Vennema, H., Zheng, D., et al. (2009). Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001–2007. *J Infect Dis.*, 200, pp. 802-812

Someya, Y., Takeda, N., Miyamura, T. (2005). Characterization of the norovirus 3C-like protease. *Virus Res.*, 110:91–7. doi: 10.1016/j.virusres.2005.02.002

Souza, M., Cheetham, SM., Azevedo, MS., Costantini, V., Saif, LJ. (2007). Cytokine and antibody responses in gnotobiotic pigs after infection with human norovirus genogroup II.4 (HS66 strain). *J Virol.*, 81:9183–92. doi: 10.1128/JVI.00558-07

- Subba-Reddy, CV., Goodfellow, I., Kao, CC. (2011). VPg-primed RNA synthesis of norovirus RNA-dependent RNA polymerases by using a novel cell-based assay. *J Virol.*, 85:13027–37. doi: 10.1128/JVI.06191-11
- Subekti, DS., Tjaniadi, P., Lesmana, M., McArdle, J., Iskandriati, D., Budiarsa, IN., Walujo, et al. (2002). Experimental infection of *Macaca nemestrina* with a Toronto Norwalk-like virus of epidemic viral gastroenteritis. *J. Med. Virol.*, 66, 400–406.
- Tacket, CO., Mason, HS., Losonsky, G., Estes, MK., Levine, MM., Arntzen, CJ. (2000). Human immune responses to a novel Norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes. *J. Infect. Dis.*, 182, 302–305.
- Tacket, CO., Sztein, MB., Losonsky, GA., Wasserman, SS., Estes, MK. (2003). Humoral, mucosal, and cellular immune responses to oral Norwalk virus-like particles in volunteers. *Clin Immunol.*, 108:241–247
- Tamminen, K., Malm, M., Vesikari, T., Blazevic, V. (2019). Immunological crossreactivity of an ancestral and the most recent pandemic norovirus GII.4 variant. *Viruses*, 11:91. doi: 10.3390/v11020091
- Tan, M., Hegde, RS., Jiang, X. (2004). The P domain of norovirus capsid protein forms dimer and binds to histo-blood group antigen receptors. *J Virol.*, 78:6233–42. doi: 10.1128/JVI.78.12.6233-6242.2004
- Tan, M., Meller, J., Jiang, X. (2006). C-terminal arginine cluster is essential for receptor binding of norovirus capsid protein. *J Virol.*, 80 (15), 7322–7331.

- Tan, M., Fang, P., Chachiyo, T., Xia, M., Huang, P., Fang, Z., Jiang, W., Jiang, X. (2008). Noroviral P particle: Structure, function and applications in virus–host interaction. *Virology*, 382, 115–123
- Tan, M., Jiang, X. (2005). The P Domain of Norovirus Capsid Protein Forms a Subviral Particle That Binds to Histo-Blood Group Antigen Receptors. *J Virol.*, 79, 22, 14017-14030
- Tan, M., Jiang, X. (2019). Norovirus Capsid Protein-Derived Nanoparticles and Polymers as Versatile Platforms for Antigen Presentation and Vaccine Development. *Pharmaceutics*, 11, 472; doi:10.3390/pharmaceutics11090472
- Taube, S., Kolawole, AO., Hohne, M., Wilkinson, JE., Handley, SA., Perry, JW., Thackray, LB., Akkina, R., Wobus, CE. (2013). A mouse model for human norovirus. *mBio*, 4.
- Thorne, LG., Goodfellow, IG. (2014). Norovirus gene expression and replication. *J. Gen. Virol.*, 95:278 –291.
- Todd, KV., Tripp, RA. (2019). Human Norovirus: Experimental Models of Infection. *Viruses*, 11, 151.
- Tu, ET-V., Bull, RA., Greening, GE., Hewitt, J., Lyon, MJ., Marshall, JA., et al. (2008). Epidemics of gastroenteritis during 2006 were associated with the spread of norovirus GII. 4 variants 2006a and 2006b. *Clin Infect Dis.*, 46:413–20. doi: 10.1086/525259
- Tuncer, M. (2008). Protein Saflaştırma-1 *Kromatografik Yöntemler*, Can Matbaacılık, Mersin
- Xia, M., Farkas, T., Jiang, X. (2007). Norovirus Capsid Protein Expressed in Yeast Forms Virus-like Particles and Stimulates Systemic and Mucosal Immunity in Mice Following an Oral Administration of Raw Yeast Extracts. *Journal of Medical Virology*, 79:74-83

- Xia, M., Tan, M., Wei, C., Zhong, W., Wang, L., McNeal, M., et al. (2011). A candidate dual vaccine against influenza and noroviruses. *Vaccine*, 29:7670–77. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.07.139
- Ward, R. (2009). Mechanisms of protection against rotavirus infection and disease. *Pediatr Infect Dis J*, 28: S57-S59. doi:10.1097/INF.0b013e3181826e5e.
- White, LJ., Ball, JM., Hardy, ME., Tanaka, TN., Kitamoto, N., Estes, MK. (1996). Attachment and entry of recombinant Norwalk virüs capsids to cultured human and animal cell lines. *J Virol.*, 70:6589–97. doi: 10.1128/JVI.70.10.6589-6597.1996
- White, PA., Hansman, GS., Li, A., et al. (2002). Norwalk-like virus 95/96-US strain is a major cause of gastroenteritis outbreaks in Australia. *J Med Virol.*, 68, pp. 113-118
- Wyatt, RG., Dolin, R., Blacklow, NR., DuPont, HL., Buscho, RF., Thornhill, TS., et al. (1974). Comparison of three agents of acute infectious non-bacterial gastroenteritis by cross-challenge in volunteers. *J Infect Dis.*, 129:709–14. doi: 10.1093/infdis/129.6.709
- Wyatt, RG., Greenberg, HB., Dalgard, DW., Allen, WP., Sly, DL., Thornhill, TS., Chanock, RM., Kapikian, AZ. (1978). Experimental infection of chimpanzees with the Norwalk agent of epidemic viral gastroenteritis. *J. Med. Virol.*, 2, 89–96.
- Widdowson, MA., Cramer EH., Hadley, L., et al. (2004). Outbreaks of acute gastroenteritis on cruise ships and on land: identification of a predominant circulating strain of norovirus-United States, 2002. *J Infect Dis.*, 190, pp. 27-36

- Van Dycke, J., Ny, A., Conceicao-Neto, N., Maes, J., Hosmillo, M., Cuvry, A., et al. (2019). A robust human norovirus replication model in zebrafish larvae. *PLoS Pathog.*, 15:e1008009. doi: 10.1371/journal.ppat.1008009
- Vaxart. (2019). Press Release Details. Vaxart to Present Clinical Data from Its Norovirus Phase 1b Study at Three Global Healthcare Conferences in October 2019. Erişim adresi: <https://investors.vaxart.com/news-releases/news-release-details/vaxartpresent-clinical-data-its-norovirus-phase-1b-study-three>
- Vesikari, T., Saez-Llorens, X., Blazevic, V., Lopez, P., Lopez, E., Masuda, T., et al. (2022). Immunogenicity of a bivalent virus-like particle norovirus vaccine in children from 1 to 8 years of age: A phase 2 randomized, double-blind study. *Vaccine*, 40, 3588–3596
- Vinje, J., Altena, SA., Koopmans, MP. (1997). The incidence and genetic variability of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in The Netherlands. *J Infect Dis.*, 176:1374–8. doi: 10.1086/517325
- Viskowska, MA., Zhao, B., Shanker, S., Choi, JM., Deng, L., Song, Y., et al. (2019). GII. 4 norovirus protease shows pH-sensitive proteolysis with a unique Arg-His pairing in the catalytic site. *J Virol.*, 93:e01479–18. doi: 10.1128/JVI.01479-18
- Vongpunsawad, S., Prasad, BV., Estes, MK. (2013). Norwalk virus minor capsid protein VP2 associates within the VP1 shell domain. *J Virol.*, 87:4818–25. doi: 10.1128/JVI.03508-12
- Yen, C., Wikswo, ME., Lopman, BA., Vinje, J., Parashar, UD., Hall, AJ. (2011). Impact of an emergent norovirus variant in 2009 on norovirus outbreak activity in the United States. *Clin Infect Dis.*, 53, 568-571

Yen, JB., Wei, LH., Chen, LW., Chen, LY., Hung, CH., Wang, SS., et al. (2018). Subcellular localization and functional characterization of GII.4 norovirus-encoded NTPase. *J Virol.*, 92:17. doi: 10.1128/JVI.01824-17

Zhang, M., Fu, M., Hu, Q. (2021). Advances in Human Norovirus Vaccine Research. *Vaccines*, 9, 732. doi: 10.3390/vaccines9070732

Zheng, DP., Ando, T., Fankhauser, RL., Beard, RS., Glass, RI., Monroe, SS. (2006). Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*, 346:312–23. doi: 10.1016/j.virol.2005.11.015

ViralZone (2022). Norovirüs. <https://viralzone.expasy.org/194> adresinden erişildi.

Ek 1: ADÜ-HADYEK



T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(AYDIN ADÜ-HADYEK)



Aydın, 18/03/2021

Oturum : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 2021 Yılı III. Oturum
Sayı : 64583101/2021/032
Proje Başlığı : Aşı Adayı Norovirüs Antijenlerinin Klonlanması ve İmmünojenitelerinin Araştırılması.
ProjeYürütücüsü : Gamze BAŞBÜLBÜL
Proje Ekibi : Döndü YALÇIN BİNGÜL

Bu çalışmanın hiçbir bölümünde:

İnsan embriyosu ve fötüsü kullanılması
İnsan embriyosu ve fötüsü dokularının kullanılması
Diğer insan doku ve hücrelerinin kullanılması

**Hayvan
Çalışması**

İnsanlarda araştırma
İnsan olmayan primatların kullanılması
Transgenik hayvanların kullanılması
Hayvanlarda genetik modifikasyon öngörülmemiştir.

Bu çalışmanın yapılmasında etik açıdan bir sakınca bulunmamaktadır.

Prof. Dr. Murat SARTERLER
Başkan

Prof. Dr. M. Dinçer BİLGİN
Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. Tarhan DOST
Üye

Prof. Dr. Işıl SÖNMEZ
Üye

Doç. Dr. Serkan BAKIRCI
Üye

Dr. Öğr. Üyesi solmaz KARAARSLAN
Üye

Dr. Öğr. Üyesi A. Önder
ÜSTÜNDAĞ
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Aysun KOÇ
Üye

Vet. Hek. Dr. Serdar AKTAŞ
Sor. Vet. Hek.
Üye

Hidayet YAMAN
Serbest Vet. Hek. Üye

Öğr. Gör. Dr. Asude Gülce
GÜLER Sor. Vet. Hek.
Üye

Mustafa ÇOBANOĞLU
Sıralı Üye

Şenay TEKİNBAŞ
HAYTAP Üye.

Bu rapor, sadece Adnan Menderes Üniversitesi'nde yapılacak çalışmalar için geçerlidir.

Ek 2: Amonyum Sülfat Presipitasyon Tablosu. 0°C’ da 1 l solüsyona eklenecek olan amonyum sülfat miktarı (g).

Başlangıç Derişimi (%)	Son derişim (%)																			
	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	27	55	84	113	144	176	208	242	277	314	351	390	430	472	516	561	608	657	708	761
5	0	27	56	85	115	146	179	212	246	282	319	357	397	439	481	526	572	621	671	723
10		0	28	57	86	117	149	182	216	251	287	325	364	405	447	491	537	584	634	685
15			0	28	58	88	119	151	185	219	255	292	331	371	413	456	501	548	596	647
20				0	29	59	89	121	154	188	223	260	298	337	378	421	465	511	559	609
25					0	29	60	91	123	157	191	227	265	304	344	386	429	475	522	571
30						0	30	61	92	126	160	195	232	270	309	351	393	438	485	533
35							0	30	62	94	128	163	199	236	275	316	358	402	447	495
40								0	31	63	96	130	166	202	241	281	322	365	410	457
45									0	31	64	97	132	169	206	245	286	329	373	419
50										0	32	65	99	135	172	210	250	292	335	381
55											0	33	66	101	138	175	215	256	298	343
60												0	33	67	103	140	179	219	261	305
65													0	34	69	105	143	183	224	266
70														0	34	70	107	146	186	228
75															0	35	72	110	149	190
80																0	36	73	112	152
85																	0	37	75	114
90																		0	37	76
95																			0	38
100																				0

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİLİMSEL ETİK BEYANI

“Aşı Adayı Norovirüs Antijenlerinin Klonlanması ve İmmünojenitelerinin Araştırılması” başlıklı Doktora tezindeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Demet YALÇIN BİNGÜL

22/08/2022

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : YALÇIN BİNGÜL Demet
Uyruk : T.C.
Doğum yeri ve tarihi : Denizli / 29.05.1986
Telefon : 0(541) 850 1801
E-mail : demetyalcin86@gmail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Doktora	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	2022
Y. Lisans	Ege Üniversitesi	2011
Lisans	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi	2008

BURSLAR ve ÖDÜLLER:

100/2000 YÖK Doktora Bursiyeri

AKADEMİK YAYINLAR

1. MAKALELER

Yalçın Bingül D, Demirel Z, Conk Dalay M. 2021. *Chlorella sorokiniana*'nın İzolasyonu, Moleküler Tanımlanması, Fototrofik, Miksotrofik ve Heterotrofik Üretimi. LimnoFish 7(2): 128-137. <https://doi.org/10.17216/limnofish.703234>

2. PROJELER

Aşı Adayı Norovirüs Antijenlerinin Klonlanması ve İmmünojenitelerinin Araştırılması, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi, FEF-21016, Doktora/Uzmanlık Tez Projesi

5-Fluorourasilin ve Resvaratolün Ko-enkapsilasyonu için Kitosan Kaplı Fenilboronik Asit ile Modifiye Edilmiş Manyetik Aljinat Partiküllerin Hazırlanması, İlaç Salım ve Antikanser Özelliklerinin İncelenmesi, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi, FEF-21017 (Araştırmacı)

3. ULUSAL TOPLANTILARDA SUNULMUŞ BİLDİRİLER

Streptococcus pyogenes Ekzotoksin A (*speA*) Geninin Klonlanması, **Döndü YALÇIN BİNGÜL**, Gamze BAŞBÜLBÜL, Bülent BOZDOĞAN; 5. Uluslararası Tarım, Çevre ve Sağlık Kongresi (Sözlü Bildiri), 18 Şubat 2022, Aydın/TÜRKİYE

Chlamydomonas reinhardtii'nin Kloramfenikol, Gentamisin ve Tetrasikline Karşı Duyarlılığının Belirlenmesi, **Döndü YALÇIN BİNGÜL**, Gamze BAŞBÜLBÜL, Bülent BOZDOĞAN; 2. Uluslararası Tarım, Çevre ve Sağlık Kongresi (Sözlü/Tam Metin Bildiri), 19 Ekim 2019, Aydın/TÜRKİYE

Ege Denizinden İzole Edilen *Chlorella sp.* 'nin Aksenik Kültür Eldesi ve Morfolojik ve Moleküler Tanımlanması, **Döndü YALÇIN BİNGÜL**, Müge İşleten HOŞOĞLU, Zeliha DEMİREL, Meltem Conk DALAY; 21. Ulusal Biyoloji Kongresi (Poster), 7 Eylül 2012, İzmir/TÜRKİYE

Eskişehir ve Hatay İllerinden Toplanan *Mesobuthus gibbosus* Türü Akrelerdeki Venom Varyasyonu; Lale ARAS, Sevcan DALKIRANOĞLU, **Döndü YALÇIN**, Ayfer TUZLA, Ferhan KORKMAZ, Figen ÇALIŞKAN; 15. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi (Poster), 29 Ağustos 2008, Gaziantep/TÜRKİYE