

TEKNOFEST

HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ

BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI

PROJE DETAY RAPORU

TAKIM ADI

BAR_CoVAC

PROJE ADI

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Vebasına İnovatif (Yenilikçi) Yerli

Kombine Aşı

BAŞVURU ID

#68939

KATEGORİ

FİKİR KATEGORİSİ ÜNİVERSİTE VE ÜZERİ SEVİYESİ

İçindekiler:

1. Proje Özeti (Proje Tanımı)	3
2. Problem/Sorun:.....	3
A- KKKA'nın Hayvanlar Üzerindeki Etkileri	3
B- KKKA'nın İnsanlar Üzerindeki Etkileri:	4
C- KKKA'nın Ülke Ekonomisi Üzerindeki Etkileri:	4
3. Çözüm	4-5
4. Yöntem.....	6
4.1. Hedef Genin Seçilmesi	6
4.2. Proteinlerin pTOLT Vektörüne Klonlanması.....	6
4.3. Transformasyon ve Klonlama İşleminin Doğrulama Testleri	6
4.4. Bm95, Bm91 ve ATAQ Proteinlerin Ekspresyonu	7
4.5. Bm95, Bm91 ve ATAQ Proteinlerin Saflaştırılması.....	7
4.6. Saflaştırılan Bm95, Bm91 ve ATAQ Proteinlerin Aktivitesi.....	8
4.7. Protein Kombinasyonlarının Oluşturulması.....	8
5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü.....	8
6. Uygulanabilirlik	9
7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması	10-11
8. Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar):	12
9. Riskler	12
10. Proje Ekibi	12
11. Kaynakça.....	13-14
12. EK.1.....	15
13. EK 2.....	16

1. PROJE ÖZETİ (PROJE TANIMI):

Dünya genelinde enfeksiyon hastalıklarının vektörle bulaşma oranı %17'ye tekabül etmektedir. Bu oran yüksek bir oran olup dünya için tehdit oluşturmaktadır. Küçük bir ısırıkla büyük tehlike oluşturan bu vektörlerden bazı kene türleri, Kırım Kongo Kanamalı Ateşi virüsü (KKKAV) taşımaktadır. Bu virüs vakalarda Kırım Kongo Kanamalı Ateşi hastalığına sebebiyet vermektedir. KKKA yüksek ateş, halsizlik, ishal, kusma, baş ağrısı gibi semptomlarla başlayıp ileri seviyede çoğu bireylerde ölümlere sebep olmaktadır. KKKA virüsü, kenenin ısırmasıyla insanlara doğrudan, en çok da enfekte olmuş sığırlardan dolayı yollarla bulaşabilmektedir. Bu bağlamda virüsün hayvanlardan insanlara bulaşının önlenmesi kritik önem arz etmektedir. Bu enfeksiyon hastalığının aşı çalışmaları günümüzde hala sürdürülmekte olup kesin çözüm yaratacak bir aşısı bulunmamıştır. Şu anda ülkemizin İç ve Doğu Anadolu Bölgelerinin kuzeyi ile Karadeniz Bölgesinin güney kesimleri arasında geniş bir coğrafi alanda KKKA virüsünü taşıyan keneler kendilerini göstermektedir. Bu projenin temel amacı, Hyalomma kenelerinin ısırıldığı sığırlara enfekte olmuş virüsü kaynağında yok etmeyi hedeflemektir. Bu sayede KKKA hastalığının başta çiftlik çalışanları olmak üzere veteriner, mezbaşa gibi kurumlarda çalışan bireyler, hayatları tehlike altında olmadan çalışabileceklerdir. Günümüzde hala gelişmekte olan ve geniş çaplı bir terim olan rekombinant DNA teknolojisi (RDT) kullanılarak BM91+BM95, BM95+ATAQ, BM91+ATAQ ve BM95+BM91+ATAQ kombinasyonlarından aktivitesi en yüksek olan kombinasyon ile aşı çalışması yapılabilecektir. Bu aşı kombinasyonlarının aktivitesi ilk defa bu proje fikri kapsamında ülkemizde gerçekleştirilecektir.

2. PROBLEM/SORUN:

Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA), Bunyaviridae ailesine bağlı Nairovirüs grubunda bulunan RNA virüsünün keneler aracılığıyla taşınması ile oluşan zoonotik bir enfeksiyon hastalığıdır (1-3). Bu virüs 50'den fazla Asya, Avrupa ve Afrika ülkesinde salgın olarak tespit edilmiştir (4). Türkiye'de ilk vaka 2002 yılında tespit edilmiştir. T.C. Halk Sağlığı Kurumu'nun 2002- 2015 yılları arasındaki belirtilen verilere göre hastalık ülkemizde 9637 kişiyi etkilemiş, 463 (%4,85) kişinin ölümüne yol açmıştır (5). Kırım Kongo Kanamalı Ateşi virüsünün yeniden ortaya çıkması ve insanlarda büyük salgınlara neden olma potansiyeli sebebiyle Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından araştırma ve geliştirme için öncelikli hastalık olarak belirlenmiştir (6). Ayrıca KKKA viral hastalık grubunda yer almaktadır. Bilindiği üzere, viral hastalıklarda en önemli sorun mutasyonların meydana gelmesidir. KKKA'nın, iklim değişiklikleri ve bitki örtüsünden kaynaklanan faktörler ile epidemiyeye neden olabileceğine dikkat çekilmektedir. Bu bağlamda, KKKA virüsünde meydana gelen mutasyonlar dış zarf proteinlerine yapılan aşı çalışmaları yetersiz kalmasına neden olmuştur (7). Bu vebanın şu anda kesin bir tedavisi bulunmamaktadır.

KKKA virüsünü taşıyan birçok kene çeşidi bulunmaktadır. *Hyalomma* ve *Boophilus annulatus* keneleri virüsü en çok bulaştırıcılarda öncelikli ve en sık bulunan kene türleri arasındadır (8). Keneler KKKA virüsü için vektör görevi görmektedir. İnsanlara bulaşma özellikle *Hyalomma* türüne ait keneler aracılığıyla, keneler tarafından ısırılma, kenelerin ezilmesi ve enfekte kan veya dokularla doğrudan temas edilmesi ile gelişir (9). Gözlemler sonucunda KKKA, kenelerin doğrudan insanları ısırması ya da virüsün enfekte olduğu sığıra temas sonucu bulaşmaktadır. Ayrıca KKKA virüsünün, enfekte sığırın pastörize edilmemiş süt ve süt ürünleri tüketildiğinde, aerosol iletimi ile; kan, doku, vücut sıvıları ve cinsel yol gibi birçok şekilde bulaşabilmesinden dolayı oldukça bulaşıcı bir enfeksiyon hastalığıdır (10). Kanıtlanan diğer bulaşma yöntemleri arasında Rusya'daki bir araştırma sonucunda bir anneden çocuğuna yatay aktarımında da virüsün yer aldığı gözlemlenmiştir (11). Bu koşullar süregelen bir durumu tetikleyerek vakalarda artışlara neden olabilmektedir. Bu araştırmalar sonucunda virüsün insan vücuduna kolay nüfus edebildiği kanıtlanmaktadır. Ayrıca enfekte virüs sığırlarda semptom göstermediği için kolay yayılma göstermektedir. Bu şartlar ulusal ve uluslararası alanda insan sağlığı için büyük sorun teşkil etmektedir.

A- KKKA'nın Hayvanlar Üzerinde Etkileri:

Hyalomma cinsi kenelerin ısırması ile virüs, vahşi ve evcil hayvanlarda enfeksiyona neden olarak kene-omurgalı döngüsünü oluşturur. Virüs, sığır, at, koyun, keçi gibi evcil, yabani hayvan ve kemiricinin kan dolaşımına girer. Böylece antikor gelişir, buna karşın virüs hayvanlarda hastalığa yol açmaz. İnsanlara bulaştığında ise hafif klinik bulguların yanı sıra şok ve çoklu organ yetmezlikleri gibi ölümlere sonuçlanabilen

etkilere yol açar (12-14).

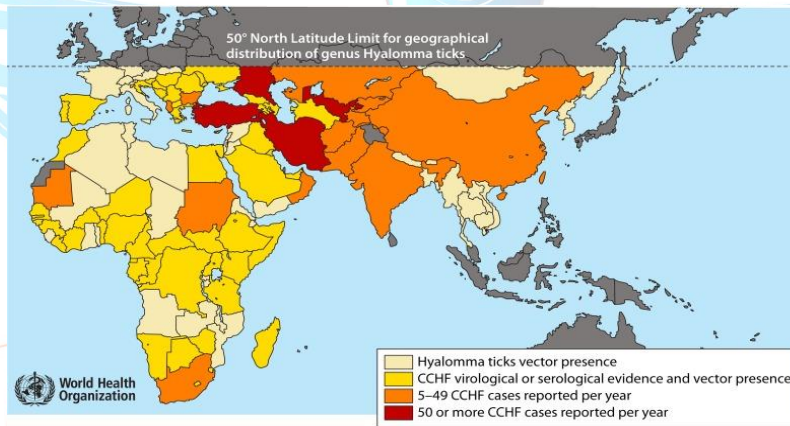
B- KKKA'nın İnsanlar Üzerinde Etkileri:

Keneler tarafından ısırılma, kenelerin ezilmesi ve enfekte kan veya dokularla doğrudan temas edilmesi ile insanlarda hastalık gelişir (9). KKKA hastalığı açısından çiftçiler, mezbahada çalışan işçiler, askerler ve veterinerler en yüksek risk altında olan gruptur (15,16). Veriler, ülkemizdeki salgında vakaların %90'ının çiftçiler olduğunu göstermiştir (17,18). Bir diğer önemli grup sağlık çalışanlarıdır. KKKA'nın tanınması, tedavisi sırasında sağlık çalışanları, ciddi risk altındadırlar. Bu bağlamda; Güney Afrika'da yapılan bir çalışmada, salgın nedeniyle sağlık çalışanlarının %8,7'sinde bulaş tespit edildiği, bunların %33'ünde KKKA bulgularının saptandığı bildirilmiştir (19).

Hastalık, kısa bir kuluçka döneminden sonra yaklaşık bir hafta sonunda ateş, halsizlik, kas ağrısı, bulantı, kusma ve ishal gibi sistemik enfeksiyon belirtileriyle kendini göstermeye başlar. Bu viral enfeksiyonun başlıca hücresel hedefleri mononükleer fagositler, endotelial hücreler ve hepatositlerdir (9,20). Hastalığın son safhalarında yaygın damar içi pıhtılaşma, şok, solunum yetmezliği, böbrek yetmezliği, karaciğer yetmezliği ve çoklu organ yetmezliği gibi ciddi sorunlar gelişerek %5-30 oranında ölümle sonuçlanabilir (4,21).

C- KKKA'nın Ülke Ekonomisi Üzerinde Etkileri:

Hayvanlar ve hayvansal ürünlerde KKKA'nın tespiti, diğer ülkelere yapılan ihracata engel olabilir; ülke içinde ise insanların et ürünlerinden korkmasına ve satışların düşmesine neden olabilir. Bunlara ek olarak, KKKA'nın geniş çapta görüldüğü bölgelerde turist kaybı yaşanabilir, tüm bunlar birçok ekonomik sorunu da beraberinde getirmektedir (22). Aşağıda (Şekil:1) dünyadaki KKKAV taşıyan kenelerin risk haritası hakkında bilgilendirilme verilmiştir.



Şekil 1: Dünyada Kırım Kongo virüsü taşıyan kenelerin risk haritası. (Susan Madison-Antenucci, ve ark., (2020))

3. ÇÖZÜM:

Ulusal ve uluslararası alanda KKKA virüsüne karşı birtakım önlemler alınmıştır fakat bu önlemler etkisini tam olarak gösterememiştir. Aşılama, uygun maliyetli olma avantajını sağlayan, çevresel kirlenmeyi önleyen ve tekrarlanan akarisit uygulamalarından kaynaklanan ilaca dirençli kenelerin seçimini önlemektedir. Ayrıca kene istilalarını kontrol altına almak için alternatif olarak ortaya çıkmıştır (23). Bazı kene aşılannın (Bm95, Bm91 ve Bm86) korunma kabiliyeti eksik kalmıştır. Bu durum, antikorların stabilitesi, yapısı ve aktivitesindeki sorunlardan kaynaklanmaktadır. Bu nedenle deneme aşılarda bir sınırdaki aktivitelerini gösterememiştir. Hedeflediğimiz bu projede tek başına aktivitesini yüksek oranda gösteremeyen aşılarda kombinasyon yöntemi ile performanslarında maksimum artışı elde etmektedir.

KKKA virüsünü taşıyan *Boophilus annulatus* kenesi için rekombinant Bm86 üretim çalışmalarını *Hyalomma* ve diğer kene türleri üzerinde etkisini gösterememiştir. Bu durum virüsün insanlara bulaştırılmasına olumsuz etki etmiştir. Bu nedenle virüsü taşıyan kene türleri için kesin bir aşı veya tedavi bulunmamaktadır (24).

Kombinasyonda kullanılacak hedef antijen Bm95'tir. BM95 ile yapılan çalışmalar, *Hyalomma* kenesi hariç diğer kene türlerinin bir kısmına karşı koruma sağladığı göstermektedir. Bu bilgi ışığında BM95'in farklı coğrafi alanlardan *R. microplus* suşlarının istilasına karşı evrensel bir antijen

olabileceğini düşündürmektedir (25). Destekleyici antijen olarak kullanılacak olan Bm91, tek başına veya diğer aşı adayları antijenler ile kombinasyon halinde sığırlarda **bağışıklama rejimini optimize** etmektedir (24). Bu projede ilk hedef, Bm91 antijenini Bm95+Bm91 kombinasyonunda kullanarak sığırlarda kenelere karşı bağışıklık kazandırılmasıdır.

Diğer bir antijen ise Bm86 homoloğu olan ve yüksek benzerliğe sahip ATAQ antijenidir. ATAQ antijeni kullanıldığında **güçlü koruma niteliği** sağlamaktadır. Rekombinant ATAQ proteinlerinin kene istilasına karşı aşı etkinliği **daha önce değerlendirilmemiştir**. Bu nedenle ATAQ proteinleri, çoklu antijenik bir aşı geliştirmek için yeni denemelerde antijen olarak kullanılabilmesi düşünülmektedir (25).

1-Bu projede ilk olarak Bm95, Bm91 ve ATAQ proteinlerin rekombinant yerli üretimi gerçekleştirilecektir.

2-Bm91+Bm95+ATAQ rekombinant proteinleri ile;

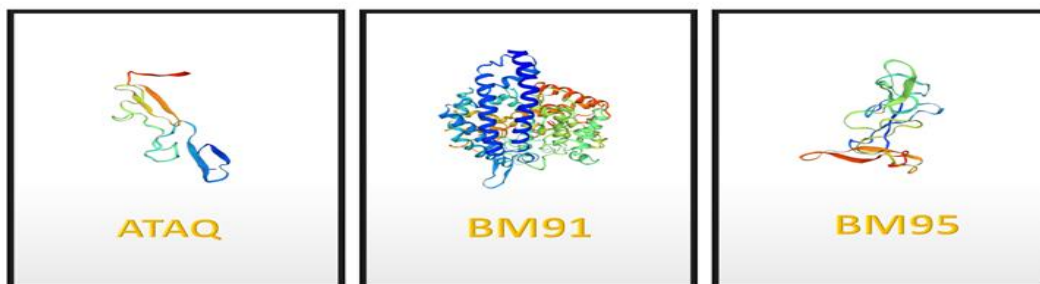
Tablo 1: Denenmiş ve Denenecek Kombinasyonlar.

	Kombinasyonlar	Açıklama
1	Bm86+Bm91	Daha önce denenmiş
2	Bm95+Bm91	İlk kez denenecek
3	Bm91+ATAQ	İlk kez denenecek
4	Bm95+ATAQ	İlk kez denenecek
5	Bm91+Bm95+ATAQ	İlk kez denenecek

Elde edilen ve denenecek kombinasyonlar tabloda verilmiştir. Yukarıdaki 2,3,4 ve 5 kombinasyonları sırasıyla denenecektir. Aktivitesi en yüksek olan kombinasyon fikri BAR_CoVAC olacaktır. Bm91+Bm86 daha önce denenmiş fakat virüsü öldürme bakımından tam olarak etkisini gösterememiştir. Bu bağlamda KKKA vebasının önüne geçilememiştir. Bu projede düşünülen ATAQ ve Bm95 proteinleri kombinasyonda **ilk kez** denenecektir. Araştırmalar ışığında ATAQ ve Bm95 proteinlerinin BAR_CoVAC aşısına yüksek aktivite göstermesi beklenmektedir. Bu projenin en özgün yanı ATAQ ve Bm95 proteinlerinin kombinasyonda ilk kez denenecek olmasıdır.

Beklenen sonuçlar:

- 1- Bu aşı kombinasyonları ile virüsün sığırlardan insanlara enfekte riskleri azalacak ve sığır sürüsü içerisinde virüsün yayılımı da azaltılmış olacaktır.
- 2- Hayvanlarda KKKA virüsün etkileri yok edilecektir. Bu sayede KKKA virüsü taşımayan keneler enfekte olmuş sığırı ısırıldığında virüsü bünyesinde taşımayacaktır. Sonucunda virüsün yayılma tehlikesi en aza indirgenmiş olacaktır.
- 3- Tarım, kasap, hayvancılık ve sağlık sektöründe çalışanların sağlığı güvenceye alınacaktır.
- 4- Özellikle başta ülkemiz, sonra dünyadaki ölüm oranlarında azalma gerçekleşecektir.



Şekil 2: ATAQ, BM91 ve BM95 Proteinlerinin 3D yapısı.

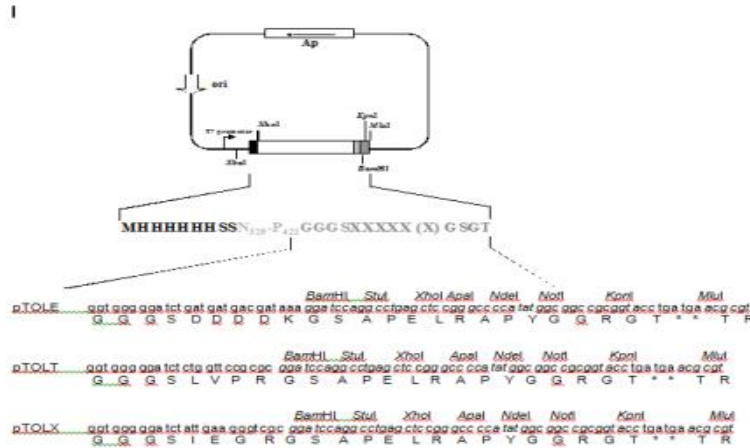
Tablo 2: Üretilecek Proteinlerin Uniport Sitesi Gen Sekansları.

	Protein Çeşidi	Uniport Gen Sekansları
1	Bm95	Q9Y0V1-1
2	Bm91	Q17248-1
3	ATAQ	A0A223PJ19-1

4. YÖNTEM:

4.1. Hedef Genin Seçilmesi:

BM95, BM91 ve ATAQ proteinlerini kodlayan gen dizisi gerekli literatür taraması yapılarak Uniport adlı veri tabanından elde edilecektir. Belirlenen genomik dizi yapay olarak sipariş edilecektir. Laboratuvarında klonlama amaçlı kullanılan pTOL T (Şekil: 1) vektörleri seçilecektir. Biyoinformatik yöntemler kullanılarak uygun restriksiyon enzimleri diziyeye eklenecektir.



Şekil 3: pTOLT ekspresyon vektörü ve çoklu klonlama bölgesi (Anderluh ve ark., 2003).

4.2. Proteinlerin pTOLT Vektörüne Klonlanması:

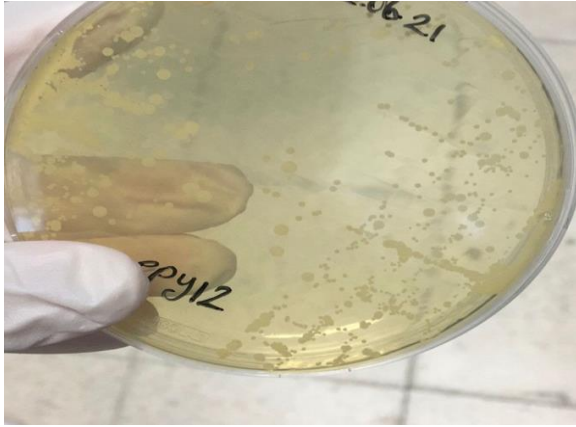
Proteinlerin genlerini taşıyan plazmitler elimize ulaştıktan sonra plazmitleri çoğaltmak için *E. coli* DH5 α hücrelerine aktarılacaktır. *E. coli* DH5 α hücrelerine transforme edilen plazmitler uygun antibiyotik içeren besiyerlerine yayma ekim yapıldıktan sonra 37 C'de bir gece inkübasyona bırakılacaktır. İnkübasyondan sonra elde edilen kolonilerden uygun antibiyotigi içeren 4 ml'lik sıvı besiyerine konularak 37 C'de bir gece inkübasyona bırakılacaktır. Büyüme gözlemlenen tüpler plazmit DNA saflaştırma kiti kullanılarak saflaştırılacaktır. Elde edilen plazmitler uygun restriksiyon enzimleriyle kesilecek ve agaroz jelde koşulacaktır. Jelden proteinlerin genleri olduğu görülen bölgeler kesilerek alınır ve jelden DNA saflaştırma kiti ile saflaştırma işlemi yapılacaktır.

Saf olarak elde edilen proteinlerin genleri, pTOLT vektörü restriksiyon enzimleriyle kesilecek ve ligasyona işlemine maruz bırakılacaktır.

4.3. Transformasyon ve Klonlama İşleminin Doğrulama Testleri:

E. coli hücreleri kompetent (yeterli) hale getirilecek ve transformasyon işlemi gerçekleştirilecektir. Transformasyon işleminden sonra hücre uygun antibiyotikli besi ortamına yayma ekim yapılacaktır (Şekil 4). Transformasyon işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştirilip gerçekleştirilmediğini anlamak için petride büyüyen hücreler sıvı kültüre alınarak çoğaltılarak ve bu hücrelerden plazmit DNA saflaştırılması gerçekleştirilecektir (Şekil 5). Saflaştırılan plazmitler restriksiyon kesimine bırakılıp ve agaroz jelde koşulacaktır.

Agaroz jel analizi sonucu pozitif olduğu düşünülen plazmitler DNA dizilemeye gönderilmek için hazırlanacaktır.



Şekil 4: Bartın Üni. Rekombinant Protein Lab. Hücre Ekimi.



Şekil 5: Bartın Üni. Rekombinant Protein Lab. Sıvı Besiyeri.

4.4. Bm95, Bm91 ve ATAQ Proteinlerin Ekspresyonu:

DNA dizileme sonucu pozitif gelirse bu işleme başlanılacaktır. *E. coli* BL21 pLysE suşu kullanılacaktır. Kompetent hale getirilen hücrelere transformasyon işlemi yapılarak uygun antibiyotikli ortamda büyümeleri sağlanacaktır. Büyüyen hücrelerden alınarak daha yüksek oranda hücre elde etmek için sıvı besiyere inoküle edilecektir. 37 oC'de 1 gece inkübasyondan sonra sıvı kültürden örnekler alınarak spektrofotometrede ölçümler yapılacaktır. Yapılan ölçümler de O.D değeri yaklaşık 0,7'ye ulaştığı zaman 1 M IPTG ilave edilerek indükleme işlemi yapılacak ve besiyerleri 37 oC'de 3-4 saat inkübasyona bırakılacaktır. Besiyeri ortamı hücreler için uygun koşulların (Oksijen, asit, baz vb.) optimize olmasını sağlayan Biyoreaktör cihazında gerçekleştirilecektir (Şekil 6).



Şekil 6: Bartın Üniversitesi. Rekombinant Protein Üretim Lab. Biyoreaktör Cihazı.

4.5. Bm95, Bm91 ve ATAQ Proteinlerin Saflaştırılması:

Santrifüjle toplanan hücreler, fosfat tamponu (pH: 8.00) içerisinde çözülerek sonikatörle parçalanacaktır. Ardından ultrasantrifüjle 30000 rpm de 1 saat santrifüjlenerek, karışımdaki hidrofobik proteinler ve diğer hidrofobik hücre materyalleri çöktürülecektir. Sonrasında süpernatant kısımdan afinite kromatografisi ile proteinlerin saflaştırılması gerçekleştirilecektir. Afinite kromatografisinde kolon dolgu maddesi olarak NiNTA agaroz rezin ve kolondan elüsyon için imidazol içeren Tris/HCl tamponu kullanılacaktır. Kolondan elüe edilen her fraksiyondan alınan numuneler SDS -PAGE'de analiz edilecektir (Şekil 8).



Şekil 7: Bartın Üniversitesi, Rekombinant Üretim Lab. FPLC Cihazı Şekil 8: Bartın Üniversitesi, Rekombinant Protein Üretim Lab.

4.6. Saflaştırılan Bm95, Bm91 ve ATAQ Proteinlerin Spektroskopik Analizleri

Saflaştırılan proteinlere Kütle Spektroskopisi ve CD Spektroskopisi analizleri hizmet alımı yöntemiyle yaptırılacaktır.

4.7. Protein Kombinasyonlarının Oluşturulması

Proteinlerin spektroskopik analizleriyle birlikte BCA ve A_{280} yöntemiyle protein konsantrasyonları belirlenerek bu üç proteinin aynı oranda birleştirilmesiyle kombinasyonları denenecektir. Daha sonrasında projenin danışmanı olan ve doktora çalışmasında polimerik nanopartikül temelli taşıyıcı ajan sentezi gerçekleştiren Dr. Rizvan İMAMOĞLU'nun tezi kapsamında üretmiş olduğu taşıyıcı sistem denenecek taşıyıcı ajanın protein tutma kapasiteleri belirlenecektir. Son olarak iş fikrinin desteklenmesi durumunda proteinlerin ve kombinasyonlarının immün yanıt oluşturma testleri gerçekleştirilecektir.

5. YENİLİKÇİ (İNOVATİF) YÖNÜ:

Geçtiğimiz yüzyılda, rekombinant DNA teknolojisi, sadece hedef genlerin ifadelerini kontrol ederek canlı bedenlerde istenen özelliklerin geliştirilebileceği hayaliydi. Bununla birlikte, son dönemde, bu alan insan yaşamında ilerleme sağlamada benzersiz etkiler göstermiştir. Bu teknoloji sayesinde, sağlık sorunları ve beslenme amaçları için gerekli olan önemli proteinler, güvenli, ekonomik ve yeterli bir şekilde üretilebilir. Bu teknolojinin çok disiplinli uygulamaları ve yaşamın önemli yönleriyle başa çıkma potansiyeli vardır, örneğin sağlığı iyileştirmek, gıda kaynaklarını geliştirmek ve farklı olumsuz çevresel etkilere karşı direnç. Özellikle tarımda, genetiği değiştirilmiş bitkiler zararlı maddelere karşı artırılmış dirence, ürün verimini artırdı ve daha iyi hayatta kalma için artan uyarlanabilirliğe sahiptir. Dahası, rekombinant farmasötikler artık güvenle ve hızla ticari onaylar olarak kullanılmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisi teknikleri, gen terapisi ve genetik modifikasyonlar da biyoremediasyon ve ciddi hastalıkları tedavi etmek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisi, yeni aşılarda ve ilaçlar geliştirerek sağlık koşullarının iyileştirilmesinde hayati bir rol oynamaktadır. Kısaca Rekombinant DNA teknolojisi alanındaki muazzam ilerleme ve geniş uygulama yelpazesi ile **yenilikçi** unsurdur (28).

Bm95, Bm91 ve ATAQ proteinlerinin yurt dışında rekombinant olarak üretimine yönelik çalışmalar yer almaktadır. Bm86+Bm91 kombinasyonu denenmiş fakat olumlu sonuçlar elde edilememiş bir kombinasyon çalışmasıdır. Ülkemizde daha önce bu proteinlerin yerli üretimi yapılmamıştır. Bu projede yeni ve literatür taramaları ışığında ATAQ ve Bm95 proteinleri kullanılacaktır. Bm86+Bm91 kombinasyonundan farklı olarak BAR_CoVAC, yeni ve **daha önce denenmemiş** tabloda verilen kombinasyonların birinden oluşacaktır. Sonucunda:

- 1- Etkisinde yetersiz kalmış aşı çalışmasına nazaran, BAR_CoVAC kombinasyon aşısı çalışması ile **yüksek aktivite** sonucu beklenmektedir.
- 2- Önerilen proje kapsamında üretilmesi hedeflenen proteinlerin laboratuvarımızda kullanılan patentli vektör sisteminde **ilk defa** üretimine yönelik çalışma içerecektir.
- 3- Çalışmamız laboratuvarlarda kullandığımız enzimlerin yerel olarak üretimi konusunda emsal teşkil edecek laboratuvarlarda ve endüstriyel alanda sıkça kullanılan enzimlerin yerel olarak üretimi konusunda

ülkemizdeki bilim insanlarını teşvik ederek ülkemizin enzim üretimi konusunda **tüketicilikten üreticiliğe** geçişini hızlandıracaktır.

4- Üretilen enzimler, yurt dışı kaynaklı enzimlere göre daha düşük maliyet gerektirecektir ve bunun sonucunda da ulusal pazarda çok daha **düşük maliyetle** kullanıma sunulacaktır.

5- KKKA virüsünü içeren keneler üzerinde aktivitesi en yüksek kombinasyonda olumlu etkiler gözlemlendiğinde diğer kene türleri ve hastalıkları için **prototip etki** sağlayacaktır.

6. UYGULANABİLİRLİK:

BAR_CoVAC aşısı prototip ürüne dönüştürülebilecek bir çalışmadır. Daha önce herhangi bir platformda üretimi gerçekleştirilmemiştir. İlk kez ülkemizde denenecektir. Gelişmekte olan Rekombinant DNA Teknolojisi (RDT) yöntemi kullanılarak henüz çalışılmamış Bm91, Bm95 ve ATAQ proteinlerinden 2li ve 3lü kombinasyonları ve yerli üretimleri yapılacaktır. BAR_CoVAC aşısı için ilk olarak BM91, Bm95 ve ATAQ genleri bir defaya mahsus yurt dışından sipariş edilecektir. Gelen genler rekombinant DNA teknolojisini metodu ile vektörel çalışmalara başlanacaktır. Gelen plazmitlerin çoğaltılması ve agaroz jelden saflaştırılması gerçekleştirilecektir. Sırasıyla DNA klonlaması, transformasyon ve klonlama işleminin yapılması, doğrulanması, Bm91, Bm95 ve ATAQ proteinlerinin ekspresyonu ve saflaştırılması yapılarak son olarak yerli kombine aşının aktivite tayini yapılacaktır. Sonucunda BAR_CoVAC aşısı, ülke ekonomisine katma değer katan yenilikçi yerli ticari ürün olacaktır.

Bu proje Bartın Üniversitesi Rekombinant protein üretimi laboratuvarında gerçekleştirilecektir. Gereken tüm cihazlar laboratuvarında bulunmaktadır. BAR_CoVAC danışmanı Dr. Rizvan İmamoğlu, Bartın Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoteknoloji Bölümü, Rekombinant enzim ve tıbbi tanı kiti üretimi üzerine çalışmalar yapmaktadır. Takım kaptanı Buket Yıldırım'ın 2209-B- Sanayiye Yönelik Lisans Araştırma Projeleri Desteği Programı tarafından "Kovid-19 Pandemisine Yönelik İnhibitör Denemeleri için ACE2 Proteininin Rekombinant Olarak Üretilmesi, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu" adlı projesi desteklenmeye hak kazanmıştır. Takım üyesi İslim Esra Yılmaz, 2209-A- Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destekleme Programı tarafından "NRF2 Proteininin Rekombinant Olarak Üretilmesi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu ve Gümüş Nanopartiküllerle İnhibisyonunun Çalışılması" adlı projesi desteklenmeye hak kazanmıştır. Takım üyesi Boran Çelik, "Crimean Congo Hemorrhagic Fever And Biosensor Usage" adlı projede çalışmalarını sürdürmektedir.

KKKA vebasına yönelik tasarlanan prototip aşı fikri aşağıda verilmiştir (Şekil 9).



Şekil 9: Kırım Kongo Kanamalı Ateşi BAR_CoVAC Prototip Aşı

7. TAHMİNİ MALİYET VE PROJE ZAMAN PLANLAMASI:

Projeyi başarılı bir şekilde gerçekleştirebilmek için gerekli laboratuvar ekipmanları ve sarflar tablo 3'de belirtilmiştir.

Tablo 3: BAR_CoVAC Malzeme ve Maliyet Tablosu.

Kullanılacaklar Listesi	Kullanım Amacı	Laboratuvarımızda Bulunma Durumu	Fiyat (ABD Doları)	
BM95 Geni	Üretilecek proteinlerin geni	YOK	500	
BM91 Geni	Üretilecek proteinlerin geni	YOK	500	
ATAQ Geni	Üretilecek proteinlerin geni	YOK	500	
Buzdolabı	Genel laboratuvar kullanımı.	VAR	500	
Çalkalayıcı İnkübatör	Bakteri büyüme işleminde kullanılacaktır.	VAR	2.250	
Elektroforez	Protein ve DNA elektroforez işlemlerinde kullanılacaktır	VAR	3.400	
Etüv	Hücrelerin büyütülmesi için gerekli ortam amaçlı kullanılacaktır.	VAR	2.750	
Isıtıcı-Magnetik Karıştırıcı	Genel laboratuvar kullanımı.	VAR	500	
Jel Görüntüleme Sistemi	Elektroforez işlemleri sonucunu analiz etmek için kullanılacaktır.	VAR	7.812	
Mikrodalga Fırın	Genel laboratuvar kullanımı.	VAR	500	
Otoklav	Sterilizasyon işlemi için kullanılacaktır.	VAR	5.000	
PCR Makinesi	Klonlama işlemleri için kullanılacaktır	VAR	6.875	
Yüksek Hızlı Santrifüj	Çöktürme işleminde kullanılacaktır.	VAR	20.000	
Sonikatör	Hücrelerin parçalanmasında kullanılacaktır.	VAR	3.750	
Ultrasantrifüj	Genel laboratuvar kullanımı	VAR	2.300	
UV/VIS Spektrofotometresi	Genel laboratuvar kullanımı	VAR	5.000	
FPLC	Protein saflaştırma işlemleri için kullanılacaktır.	VAR	13.990	
		TOPLAM	80.750	
Kullanılacak Kimyasallar	Kullanım Amacı	Laboratuvarımızda Bulunma Durumu	Miktarı	Fiyat (ABD Doları)
Agar	Besiyeri hazırlamada kullanılacaktır.	VAR	1000 gr	82,5
Agaroz	DNA moleküllerini ayırmada kullanılacaktır	VAR	1000 gr	745
Akrilamid	SDS-PAGE için kullanılacaktır	VAR	1000 gr	73,75
APS (Amonyumpersülfat)	SDS-PAGE için kullanılacaktır	VAR	1000 gr	6,25
BSA (Sığır (Bovine) Serum Albümini	Tampon bileşeni	VAR	1000 mg	1.410
DMSO	Hücreleri korumak için kullanılacaktır.	VAR	1000 ml	75,65
<i>E.coli</i> DNA ligaz ve <i>E.coli</i> DNA ligaz tamponu	Ligasyon işlemi için kullanılacaktır	VAR		150
Etanol	Genel laboratuvar kullanımı	VAR	1000 ml	50,2

Etidyum Bromür	Nükleik asit tespitinde kullanılacaktır.	VAR	1 gr	81,75
IPTG	Protein saflaştırma işleminde İndükleyici ajan	VAR	100 gr	1.230
İmidazol	Afinite kolon kromotografisinde kullanılacaktır.	VAR	100 gr	550
Ampilisın, Kanamisin ve Kloramfenilalkol Antibiyotiği	Antibiyotik seçilimi için kullanılacaktır.	VAR	100gr, 100gr, 100gr	100 100, 100
LB (Luria-Bertani) Broth Base	Besiyeri hazırlamada kullanılacaktır.	VAR	1000 ml	275,5
MgCl ₂	Genel laboratuvar kullanımı.	VAR	1000 gr	26,27
Restriksiyon Enzimleri	Plazmit kesimde kullanılacaktır.	VAR	10000 u	700
Ni-NTA agarozrezin	Afinite kolon kromotografisinde kullanılacaktır.	VAR	1000 ml	40,6
PMSF	Proteaz inhibitörü olarak kullanılacaktır.	VAR	10 ml	145
SDS (Sodyum dodesil sülfat)	Protein analizinde kullanılacaktır.	VAR	1000 gr	98,4
Tag DNA Polimeraz	PCR da kullanılacaktır	VAR	1000 u	188,5
TEMED (N,N,N'N' Tetrametilenetildiamin	SDS-PAGE için kullanılacaktır	VAR	100 ml	174
			TOPLAM	6.290,87

Tablo 4: İş ve Zaman Planı Tablosu.

İP No	İş Paketlerinin Adı ve Hedefleri	Kim(ler) Tarafından Gerçekleştirileceği	Zaman Aralığı (... Ay)	Başarı Ölçütü ve Projenin Başarısına Katkısı
1	Gelen plazmidlerin çoğaltılması ve agaroz jelden saflaştırılması	Boran Çelik+ Proje Danışmanı	1-3	Plazmidlerin DH5α hücrelerine başarılı şekilde transformasyonun yapılması ve restriksiyon kesimi sonucu jelden yüksek verim ile saflaştırılması (%10)
2	BM95, BM91 ve ATAQ proteinlerinin DNA' larının klonlanması	İslim Esra Yılmaz+ Proje Danışmanı	3-6	Ligasyon işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştirilmesi (%20)
3	Transformasyon ve klonlama işleminin yapılması, doğrulanması	Buket Yıldırım+ Proje Danışmanı	6-9	Ligasyon işlemi sonrası en az ladet pozitif (BM95, BM91 ve ATAQ genlerini içeren vektör) koloni olması (%30)
4	BM95, BM91 ve ATAQ proteinlerinin ekspresyonu, saflaştırılması, aktivitelerinin test edilmesi	BAR_CoVAC takımı üyeleri+ Proje Danışmanı	9-12	Saflaştırma işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştirilmesi ve proteinlerin aktif olması (%40)

8. PROJE FİKRİNİN HEDEF KİTLESİ (KULLANICILAR):

Dünya sığır nüfusunun %80'i (yaklaşık 1281 milyon), %80'i keneler ve kene kaynaklı hastalıklar için risk altındadır. Hayvancılıkta kene kontrolü, büyük ölçüde kimyasal akarisitlere dayanmaktadır. Fakat kene önleyici aşılarla kombinasyon halinde kullanımları ve kenelere karşı konakçı direncinin kullanılması, kimyasal kene kontrolüne bağımlılığı azaltmalıdır. Ayrıca kene kaynaklı hastalıklar ve bulaşmasındaki artışlar önemli halk sağlığı sorunlarıdır. Ortaya çıkan bu hastalıkları kontrol etme çabaları, kene popülasyonlarını kontrol etme ve ilettikleri patojenlerin neden olduğu enfeksiyonları tespit etme ve tedavi etme mücadelesi tarafından engellenmektedir (26). Bu nedenle kene kaynaklı hastalıklar veterinerler ve sağlık çalışanları için büyük sorun haline gelmiştir. Enfekte olmuş sığırlara ilk teknik müdahaleyi veterinerler yapmaktadır. Bu nedenle hedef kullanıcı özel veya devlet kurumu ayrımı yapılmaksızın veteriner klinikleri olacaktır. BAR_CoVAC aşısının sığırlara enjektesini veterinerler gerçekleştirebilir. Yerli aşı sayesinde KKKA virüsünden olumsuz etkilenen hayvanlar, insanlar ve ekonomik sıkıntıların önüne geçilmesi hedeflenmektedir.

9. RİSKLER:

No	En Büyük Riskler	Risk Yönetimi (B Planı)
1	Klonlama işleminin gerçekleştirilememesi	Farklı vektörler denenerek işlem tekrarlanacaktır.
2	Rekombinant olarak proteinler elde edilemeyebilir	Öncelikle saflaştırmada kullanılan tampon çözelti bileşenleri ve miktarları değiştirilerek optimizasyon işlemleri gerçekleştirilecektir (iyonik olmayan deterjan, gliserol ilavesi, NaCl miktarı ve yıkama çözeltilerindeki imidazol miktarının artırılması vb.). Optimizasyon çalışmalarına rağmen problem devam edilecek olursa, kobalt metal iyonunu içeren rezin kullanılacaktır. Kobalt kolona proteinlerin bağlanma verimi daha düşük olmasına rağmen Nikel kolon ile yapılan saflaştırmaya göre daha yüksek saflıkta protein elde edilmesini mümkün kılmaktadır. Ayrıca laboratuvarımızda mevcut olan <i>E. coli</i> protein kontaminantlarının minimize edilmesi için tasarlanmış Nico21 (DE3) hücreleri üretim konakçısı olarak kullanılarak üretim ve saflaştırmaya yönelik çalışmalar ile istenilen saflıkta proteinin elde edilmesi planlanmaktadır.
3	Proteinin inklüzyon cisimciği oluşturması	Öncelikle besiyeri, sıcaklık ve indükleyici ajan (IPTG) konsantrasyonlarının değiştirilerek şaperon sistemleriyle birlikte ekspresyonu ile bu sorunun üstesinden gelinmeye çalışılacaktır.

10. PROJE EKİBİ:

Takım Lideri: Buket Yıldırım

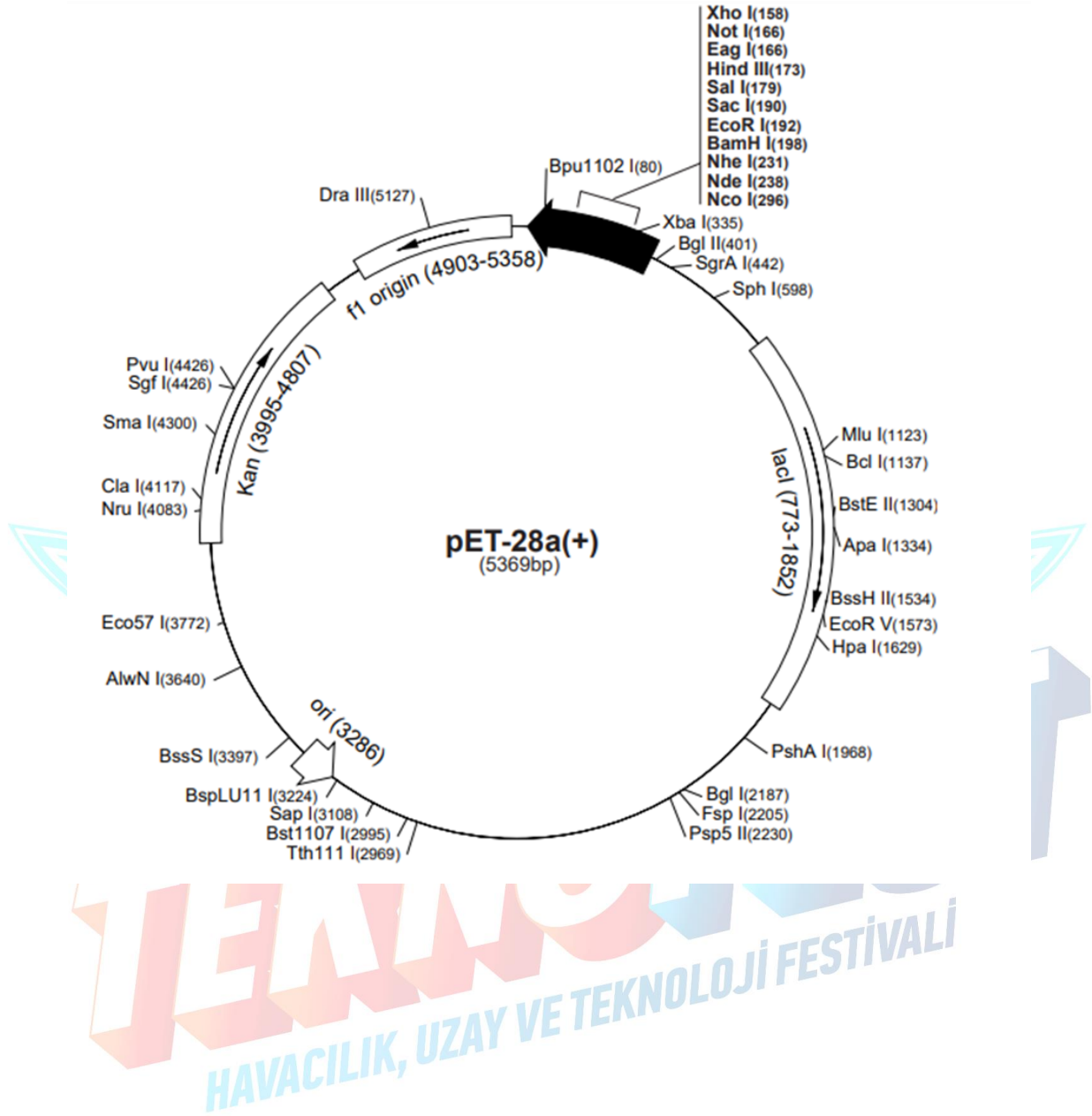
Adı Soyadı	Projedeki Görevi	Okul	Projeyle veya problemle ilgili tecrübesi
Buket Yıldırım	Yürütücü	Bartın Üniversitesi	Rekombinant üretim 1002 projesi bursiyeri.
İslim Esra Yılmaz	Araştırmacı	Bartın Üniversitesi	Rekombinant üretim 2209A proje yürütücüsü.
Boran Çelik	Araştırmacı	Atılım Üniversitesi	KKKA projesinde araştırmacı.
Dr. Rizvan İMAMOĞLU	Danışman	Bartın Üniversitesi	Rekombinant Enzim Üretimi üzerine 34 proje

11. KAYNAKLAR:

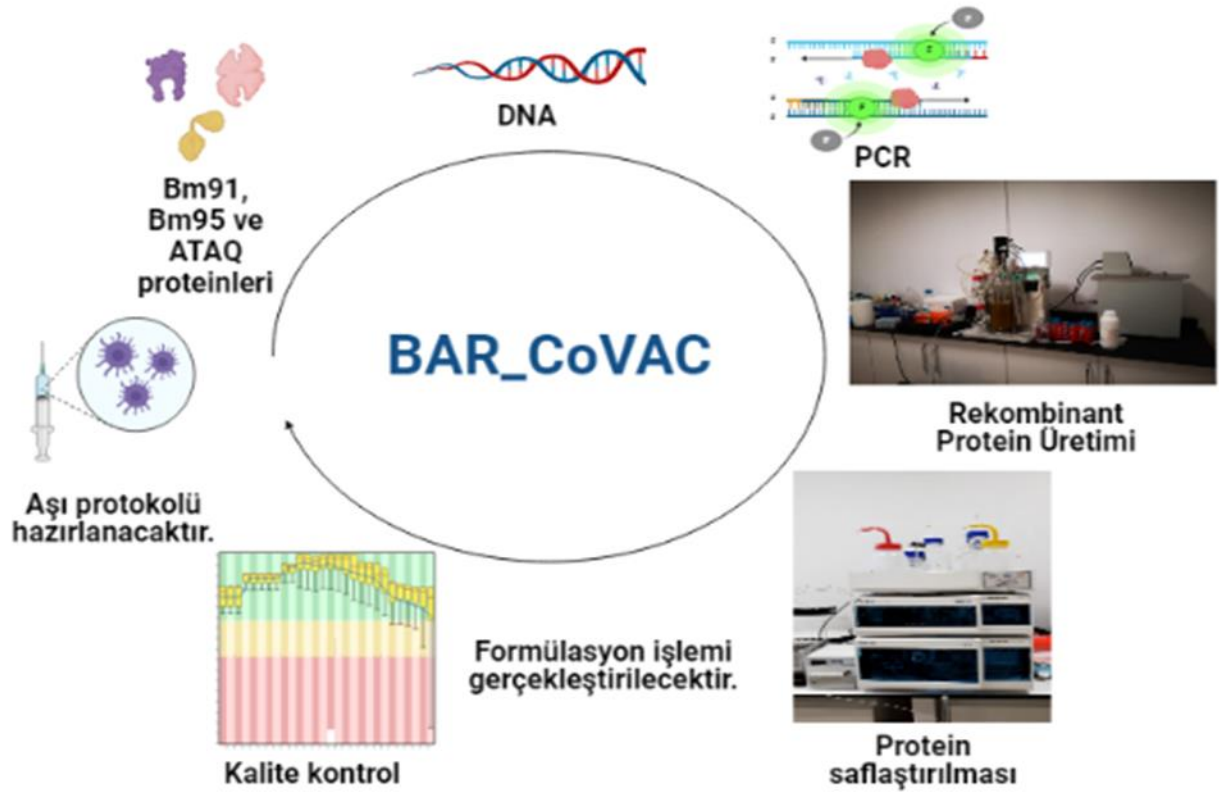
- Gök ŞE. (2016). Crimean-congo hemorrhagic fever. *Okmeydanı Tıp Dergisi / Medical Journal of Okmeydanı Training & Research Hospital*; 32: 13-19. DOI: 10.5222/otd.2016.013.
- Kuehnert PA, Stefan CP, Badger CV, Ricks K M (2021). Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV): A silent but widespread threat. *Current Tropical Medicine Reports*. <https://doi.org/10.1007/s40475-021-00235-4>
- Tipih T, Burt FJ. (2020). Crimean-congo hemorrhagic fever virus: Advances in vaccine development. *BioResearch Open Access*; 9(1): 137-150. <https://doi.org/10.1089/biores.2019.0057>
- Belobo JTE, Kenmoe S, Kengne-Nde C, Emoh CPD, Bowo-Ngandji A, Tchatchouang S, et al. (2021) Worldwide epidemiology of crimean-congo hemorrhagic fever virus in humans, ticks and other animal species, a systematic review and meta-analysis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*; 15(4): e0009299. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009299>
- TC Sağlık Bakanlığı THSK 2015 Faaliyet Raporu. http://www.klimik.org.tr/wp-content/uploads/2016/04/thsk_2015_faaliyet_raporu.pdf Erişim tarihi: 05.06.2021.
- Sweileh W M. (2017). Global research trends of World Health Organization's top eight emerging pathogens. *Globalization and Health*; 13(1): 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12992-017-0233-9>
- Şahin E. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü İçin Bir DNA Tabanlı Aşı Geliştirilmesi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Ankara, 2018.
- Atan P, Yıldız K. (2015). Ixodid kenelerle mücadelede kimyasal akaricidlere alternatif yollar. *Etilik Vet Mikrobiyol Derg*; 26 (1): 29-34.
- Kuehnert PA, Stefan CP, Badger CV, Ricks KM. (2021). Crimean-congo hemorrhagic fever virus (CCHFV): A silent but widespread threat. *Current Tropical Medicine Reports*; 8: 141-147. <https://doi.org/10.1007/s40475-021-00235-4>
- Appannanavar SB, Mishra B. (2011). An update on crimean congo hemorrhagic fever. *Symposium*; 3(3):285-292.
- Lwande O, Irura Z, Tigoi C, Chepkorir E, Orindi B, Musila L, Venter M, Jores-Fischer A, Sang R. (2012). Seroprevalence of Crimean Congo Hemorrhagic Fever Virus in Ijara District, Kenya. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*; 12: 727-32. 10.1089/vbz.2011.0914.
- Whitehouse CA. (2004). Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Antiviral Res*; 64:145. [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-3542\(04\)00163-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-3542(04)00163-9)
- Ergonul O. (2006). Crimean-Congo haemorrhagic fever: *Lancet Infect Dis*; 6(4): 203-14. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70435-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70435-2)
- Erbay A. Crimean-congo hemorrhagic fever virus' in 'manual of security sensitive microbes and toxins'. Chapter 5, Dongyou Liu (editör), CRC Press, pp. 37-52.
- Fillâtre P, Revest M, Tattevin P. (2019). Crimean-Congo hemorrhagic fever: An update. *Médecine et Maladies Infectieuses*; 49: 574–58.
- Hawman DW, Feldmann H. (2018). Recent advances in understanding Crimean–Congo hemorrhagic

- fever virüs. *F1000 Research*; 7(F1000 Faculty Rev):1715.
17. Yilmaz GR, Buzgan T, Irmak H, et al. (2009). The epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey, 2002- 2007. *Int J Infect Dis*;13(3):380-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2008.07.021>
 18. Tülek N. (2014). Kırım-kongo kanamalı ateşi: tanı ve tedavi. *Türkiye Klinikleri J Inf Dis-Special 26 Topics*; 7(2).
 19. Shepherd AJ, Swanepoel R, Shepherd SP, et al. (1985). A nosocomial outbreak of Crimean-Congo haemorrhagic fever at Tygerberg Hospital. Part V. Virological and serological observations. *S Afr Med J*; 68:733-6.
 20. Hasanoglu I, Guner R, Carhan AK, Tufan ZY, Caglayik D, Yilmaz GR, Tasyaran MA. (2018). Dynamics of viral load in Crimean Congo hemorrhagic fever. *Journal of Medical Virology*; 90(4): 639–643. <https://doi.org/10.1002/jmv.24990>
 21. Weidmann M, Avsic-Zupanc T, Bino S, Bouloy M, Burt F, Chinikar S, et al. (2016). Biosafety standards for working with crimean-congo hemorrhagic fever virus. *Journal of General Virology*; 97(11): 2799-2808. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000610>
 22. Hoek M, Fischer E, Hengel R, Backer J, Koeijer A. (2012). Workshop on A Risk Assessment of Crimean Congo Haemorrhagic Fever in Western Europe. Lelystad, Erişim adresi:https://www.wur.nl/upload_mm/4/9/5/69e7e2a1-3439-4ad1-913b-f89d6515fc7c_Report%20CCHF%2010102012.pdf Erişim tarihi: 05.06.2021.
 23. Canales, M., Almazán, C., Naranjo, V., Jongejan, F., & de la Fuente, J. (2009). Vaccination with recombinant *Boophilus annulatus* Bm86 ortholog protein, Ba86, protects cattle against *B. annulatus* and *B. microplus* infestations. *BMC Biotechnology*. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-9-29>
 24. Nijhof, A. M., Taoufik, A., de la Fuente, J., Kocan, K. M., de Vries, E., & Jongejan, F. (2007). Gene silencing of the tick protective antigens, Bm86, Bm91 and subolesin, in the one-host tick *Boophilus microplus* by RNA interference. *International Journal for Parasitology*. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.11.005>
 25. Merino, O., Alberdi, P., Pérez De La Lastra, J. M., & de la Fuente, J. (2013). Tick vaccines and the control of tick-borne pathogens. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 4, Issue JUL). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00030>
 26. Suarez, M., Rubi, J., Pérez, D., Cordova, V., Salazar, Y., Vielma, A., ... & Estrada, M. P. (2016). High impact and effectiveness of Gavac™ vaccine in the national program for control of bovine ticks *Rhipicephalus microplus* in Venezuela. *Livestock Science*, 187, 48-52.
 27. Şekil 1: Madison-Antenucci, S., Kramer, L. D., Gebhardt, L. L., & Kauffman, E. (2020). Emerging tick-borne diseases. *Clinical microbiology reviews*, 33(2).
 28. Khan, S., Ullah, M. W., Siddique, R., Nabi, G., Manan, S., Yousaf, M. ve Hou, H. (2016). Role of recombinant DNA technology to improve life. *International Journal of Genomics*. doi:10.1155/2016/2405954

EK 1.



EK 2.



TEKNOLOJİ
HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ