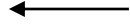


Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak.



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**HAZARA VİRÜSÜN KIRIM-KONGO KANAMALI ATEŞİ
VİRÜSÜ İÇİN MODEL ORGANİZMA
OLARAK ARAŞTIRILMASI**

MERVE YAZICI

**DANIŞMAN
PROF. DR. Ş. ÜMİT ZEYBEK
EŞ DANIŞMAN
PROF. DR. MEHMET ZİYA DOYMAZ**

**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP DOKTORA PROGRAMI**

İSTANBUL-2021

TEZ ONAYI

(Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir.)



İTHAF

Ailem'e ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam süresince tüm tecrübelerini ve bilgilerini paylaşan ve çalışmamın her aşamasında büyük bir titizlikle yardımcı ve destek olan, bana bilim sevgisini aşılayan danışman hocalarım Prof. Dr. Ş. Ümit ZEYBEK ve Prof. Dr. Mehmet Ziya DOYMAZ’a teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince hiçbir yardımı esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Nesibe Selma ÇETİN, Dr. Elif KARAASLAN, Sevde HASANOĞLU, Filiz GÜNEY, Esmahan AVCI, Burcu Nur AYDIN, Sercan KESKİN ve Mesut DİLBER’e teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca beni her koşulda destekleyen, yalnız bırakmayan aileme ve daima destekleyen eşime içtenlikle teşekkür ederim.

Bu çalışma, Bezmilaem Vakıf Üniversitesi BAP birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 6.2017/27 ve 4.2019/12

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ii
BEYAN.....	iii
İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xiv
ÖZET	xvii
ABSTRACT.....	xviii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	19
2. GENEL BİLGİLER	22
2.1.1. KKKAV ve HAZV'nin keşfi	22
2.1.2. KKKAV ve HAZV'nin sınıflandırılması.....	23
2.1.3. Bulaş yolları, vektörler ve konakçılar	23
2.1.4. KKKAV'nin epidemiyolojisi ve coğrafi dağılımı	26
2.1.5. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Teşhisi	27
2.1.6. Klinik Belirtiler ve Tedavi Seçenekleri	28
2.2. Virüs.....	30
2.2.1. Virüsün Yapısı	30
2.3. Viral Genom Yapısı	30
2.4. Virüs Tarafından Kodlanan Proteinler	31
2.4.1. S segment	31
2.4.1.1. HAZV ve KKKAV Nükleokapsid Proteinleri	31
2.4.1.2. HAZV NP ve KKAV NP'nin ek rolleri	33
2.4.1.3. Antijenik benzerlik açısından HAZV NP ve KKKAV NP	35
2.5. M segment.....	36
2.5.1.1. GPP'nin işlenmesi.....	37
2.6. L segment.....	38
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	41

3.1. Çözeltiler ve Tamponlar	41
3.1.1. 0,1 M Sodyum Klorid	41
3.1.2. 2 M Potasyum Klorid.....	41
3.1.3. 1 M Magnezyum Sülfat.....	41
3.1.4. 1 M pH:8 Tris-HCl Çözeltisi	41
3.1.5. 1 M Etilendiamintetraasetikasit Çözeltisi	41
3.1.6. %50 Glukoz Çözeltisi	41
3.1.7. Kanamisin Stok Çözeltisi.....	41
3.1.8. Luria-Bertani (LB) Sıvı Besiyeri	41
3.1.9. Kanamisin İçeren LB Sıvı Besiyeri	42
3.1.10. %30 Gliserollü Luria-Bertani Sıvı Besiyeri.....	42
3.1.11. LB Broth Agar	42
3.1.12. Kanamisin İçeren LB Broth Agar	42
3.1.13. SOC Sıvı Besiyeri	42
3.1.14. Tris-EDTA Çözeltisi	43
3.1.15. TNE çözeltisi.....	43
3.1.16. %20 Sükroz Çözeltisi TNE	43
3.1.17. Karboksimetilselüloz çözeltisi (CMC).....	44
3.1.18. 0.5 M Kalsiyum Klorid Çözeltisi.....	44
3.1.19. %15 Gliserol İçeren 0.1 M Kalsiyum Klorid Çözeltisi.....	44
3.1.20. 5x TBE Çözeltisi.....	44
3.1.21. PBS Çözeltisi	44
3.1.22. 1 M IPTG Çözeltisi	45
3.1.23. 0,5 M Tris pH 6,8.....	45
3.1.24. Akrilamid/BİS	45
3.1.25. %20 SDS Çözeltisi.....	45
3.1.26. 1,5 M Tris-HCl pH 8,8.....	45
3.1.27. %1 Bromofenol Mavisi	45
3.1.28. SDS Yükleme Tamponu	45
3.1.29. 10x SDS Yürütme Tamponu.....	46
3.1.30. %10 APS	46
3.1.31. Coomasie Boyama Tamponu	46
3.1.32. Coomasie Uzaklaştırma Tamponu	46

3.1.33. Denatüre Parçalama Çözeltilisi	46
3.1.34. Denatüre Yıkama Çözeltilisi	47
3.1.35. Denatüre Elüsyon Çözeltilisi.....	47
3.1.36. Western Blot Transfer Çözeltilisi.....	47
3.1.37. Western Blot Yıkama Çözeltilisi (TBST)	48
3.1.38. Western Blot Antikor Hazırlama Tamponu	48
3.1.39. EİA için Karbonat Tamponu.....	48
3.1.40. EİA Yıkama Çözeltilisi (PBST).....	48
3.1.41. EİA Antikor Hazırlama Tamponu.....	48
3.2. Kullanılan Biyolojik Materyaller	48
3.2.1. Vektörler	48
3.2.2. Bakteri suşları	49
3.2.3. Memeli hücre hatları	49
3.2.4. Hazara virüs suşu	49
3.3. Cihaz ve Sarf Malzeme Listesi	49
3.4. Yöntemler	50
3.4.1. Hazara JC280 Nükleoprotein Sekansının Belirlenmesi	50
3.4.2. Hedef Genin Eldesi ve Klonlanması.....	50
3.4.2.1. Hazara JC280 Virüsün Hücre Kültüründe Üretimi.....	52
3.4.2.2. Virüs titresinin belirlenmesi (Plaque Assay).....	52
3.4.2.3. Hazara Virüsün Saflaştırılması	52
3.4.2.4. RNA izolasyonu	53
3.4.2.5. cDNA Sentezi.....	53
3.4.3. Klonlama Stratejilerinin Belirlenmesi	53
3.4.3.1. Klonlamada Kullanılan Primerlerin Tasarlanması.....	54
3.4.3.2. Hedef Genin PZR ile Çoğaltılması	54
3.4.3.3. PZR'da çoğaltılan hedef genin temizlenmesi	55
3.4.3.4. Klonlamada kullanılacak vektörün eldesi	55
3.4.3.5. Agaroze Jel Elektroforez.....	55
3.4.3.6. Agaroze Jelden DNA Ekstraksiyonu	56
3.4.3.7. Ligasyon Reaksiyonu	56
3.4.3.8. Bakterilerin Kompetan Hâle Getirilmesi	56
3.4.3.9. Transformasyon.....	57

3.4.3.10. Pozitif Koloni Seçimi	57
3.4.3.11. Bakteri Stoklanması	57
3.4.3.12. Plazmid İzolasyonu	57
3.4.3.13. Bakteriyel Ekspresyon	58
3.4.3.14. Ekspresyon Analizi	58
3.4.3.15. SDS-PAGE İçin Örnek Hazırlama	58
3.4.3.16. SDS-PAGE Jel Elektroferezi İçin Örneklerin Hazırlanması	59
3.4.3.17. SDS-PAGE’te Örneklerin Yürütülmesi	59
3.4.3.18. Jellerin Coomassie Boya ile Boyanması	59
3.4.3.19. Bakteri Parçalanması (Denatüre Koşullarda).....	60
3.4.3.20. Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi İle Protein Pürifikasyonu	60
3.4.3.21. Diyaliz	61
3.4.3.22. Western Blotlama.....	61
3.4.3.23. EİA	62
3.4.3.24. KKKAV (+) ve KKKAV (-) İnsan Serumları.....	62
3.4.3.25. Anti-KKKAV NP fare, anti-KKKAV Fare ve Tavşan Serumları.....	62
3.4.3.26. Etik Kurul Onayı	63
3.4.3.27. İstatistiksel Analiz	63
4. BULGULAR.....	64
4.1.1. Hazara JC280 Virüsün Üretilmesi	64
4.1.1.1. Hazara JC280 Virüsün Hücre Kültüründe Üretimi	64
4.1.1.2. Virüs Titresinin Plak Deneyi ile Belirlenmesi	64
4.1.1.3. Hazara Virüsün Saflaştırılması	65
4.1.2. HAZV ve KKKAV Arasındaki Çapraz Tepkimenin Saf HAZV Kullanılarak Gösterilmesi	66
4.1.2.1. KKKA Konvalesan İnsan Serumu ile Enzim İmmüno Assay (EIA)	66
4.1.2.2. KKKAV ile İmmünize Tavşan Serumu ile Enzim İmmüno Assay (EIA) ..	67
4.1.2.3. KKKAV ile İmmünize Fare Serumu ile Enzim İmmüno Assay (EIA)	68
4.1.3. HAZV JC280 suşu Nükleoprotein Üretilmesi	69
4.1.3.1. HAZV JC280 suşu Nükleoprotein Klonlanması.....	69
4.1.3.2. Klonlama Kullanılacak Vektörün Eldesi	70
4.1.3.3. HAZV NP’sini Kodlayan DNA Sekansının pET-30b(+) Vektörüne Klonlanması	71

4.1.3.4. HAZV NP'nin Bakteride Üretimi	73
4.1.3.5. HAZV NP'nin Saflaştırılması	73
4.1.4. KKKAV NP Üretimi ve Saflaştırılması	75
4.1.5. HAZV ve KKKAV Arasındaki Çapraz Tepkimenin HAZV NP ve KKKAV NP Kullanılarak Gösterilmesi	75
4.1.5.1. KKKA Konvalesan İnsan Serumı ile Enzim İmmüno Assay (EIA)	75
4.1.5.2. KKKAV ile bağışıklanmış tavşan ve fare serumu ile çapraz tepkimenin gösterilmesi	77
4.1.5.3. KKKAV NP ile bağışıklanmış fare serumu ile çapraz tepkimenin gösterilmesi	79
4.1.6. Çapraz Tepkimenin Western Blotlama İle Gösterilmesi	80
5. TARTIŞMA	82
KAYNAKLAR	85
HAM VERİLER	92
FORMLAR	93
ETİK KURUL KARARI	94
PATENT HAKKI İZNİ	97
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	98
ÖZGEÇMİŞ	99

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1: Tez çalışmasında kullanılan cihaz, ekipman ve sarf malzeme	49
Tablo 2: Hazara JC280 Nükleoproteini Kodlayan Aminoasit Sekansı.....	51
Tablo 3: Hazara JC280 Nükleoproteini Kodlayan Genin Nükleotid Sekansı	51
Tablo 4: Klonlama için tasarlanan primerler	54
Tablo 5: HAZV NP genini çoğaltmak için PZR koşulları.....	54
Tablo 6: SDS-PAGE Jel Elektroferezi İçin Jel Hazırlanması.....	59



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.2-1: HAZV orthonairovirus (HAZV) ve Kırım-Kongo kanamalı ateş orthonairovirus (KKKAV)nin <i>Bunyavirales</i> takımı içinde sınıflandırılması.	24
Şekil 2.2-2: <i>Hyalomma</i> türlerinin tam yaşam döngüsü.....	25
Şekil 2.2-3: Kırım-Kongo kanamalı ateş virüsünün coğrafik yayılımı.	26
Şekil 2.2-1: A) HAZV ve KKKAV viryonunun şematik temsili	31
Şekil 2.3-1: HAZV NP ve KKKAV NP'nin kristal yapısının karşılaştırılması.....	33
Şekil 2.4-1 KKKAV glikoprotein prekürsörünün hücrel proteazlar tarafından işlenmesi.	37
Şekil 2.5-1: L-proteinlerindeki fonksiyonel alanlar.....	38
Şekil 3.4-1: Hazara virüs titresinin plak deneyi ile belirlenmesi.	65
Şekil 3.4-2: HAZV, HiTrap Capto Core 700 kolonu kullanılarak saflaştırılmıştır.	65
Şekil 3.4-3: Saf HAZV ve KKKA konvalesan sera kullanılarak çapraz tepkimenin EIA yöntemiyle gösterilmesi.	67
Şekil 3.4-4: Saf HAZV ve KKKAV ile bağışıklanmış tavşan serumu kullanılarak çapraz tepkimenin EIA yöntemiyle gösterilmesi.	68
Şekil 3.4-5: Saf HAZV ve KKKAV ile bağışıklanmış fare serumu kullanılarak çapraz tepkimenin EIA yöntemiyle gösterilmesi.	69
Şekil 3.4-6: HAZV NP gen sekansının eldesinin agaroz jelde analizi.	70
Şekil 3.4-7: pET-30b (+) vektörünün agaroz jelde görüntülenmesi.	71
Şekil 3.4-8: Pozitif transformant kolonilerin <i>NdeI</i> ve <i>XhoI</i> kesiminin agaroz jelde analizi.....	72
Şekil 3.4-9: pET-30b (+) vektörüne klonlanmış HAZV NP geni haritası.	72
Şekil 3.4-10: BL21(DE3) ve C43(DE3)'e transforme edilen pET-30b (+) HAZV NP pilot ekspresyonunun SDS-PAGE Jel elektroforezi ile analizi.	73
Şekil 3.4-11: AKTA Pure cihazı yardımıyla nikel afinite kromatografisine dayalı HisTrap Excel kolonu ile His-Tag barındıran HAZV NP protein pürifikasyonu fraksiyonlarının SDS-PAGE ile analizi.	74
Şekil 3.4-12: AktaPure HAZV NP pürifikasyon grafiği.....	74
Şekil 3.4-13: Saf HAZV NP ve KKKA konvalesan sera kullanılarak çapraz tepkimenin EIA yöntemiyle gösterilmesi.	76

Şekil 3.4-14: Saf KKKAV NP ve KKKA konvalesan sera kullanılarak çapraz tepkimenin kontrolü.....	77
Şekil 3.4-15: HAZV NP ve KKKAV NP arasındaki antijenik benzerliğin KKKAV ile immünize tavşan serumu ile gösterilmesi.....	78
Şekil 3.4-16: HAZV NP ve KKKAV NP arasındaki antijenik benzerliğin KKKAV ile immünize fare serumu ile gösterilmesi.....	78
Şekil 3.4-17: KKKAV NP ile immunize fare serumu ile titrasyon EIA.....	79
Şekil 3.4-18: KKKAV NP ile immunize fare serumu ile titrasyon EIA.....	80
Şekil 3.4-19: Çapraz tepkimenin western blotlama ile gösterilmesi.....	81



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

KKKAV	: Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü
KKKA	: Kırım Kongo Kanamalı Ateşi
HAZV	: Hazara Virüs
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention
BSL	: Biyogüvenlik Seviyesi
Gn	: Glikoprotein n
Gc	: Glikoprotein c
S	: Small
M	: Medium
L	: Large
EIA	: Enzim İmmüno Analiz
IL-6	: İnterlökin-6
TNF- α	: Tümör Nekroz Faktör- α
EIA	: Enzim İmmuno Assay
IgM	: İmmünglobulin-M
IgG	: İmmünglobulin-G
RT-PCR	: Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
IFA	: İmmünofloresan analizi
RNA	: Ribonükleik Asit
IFNAR	: İnterferon α/β Reseptör Knock-Out
MVA	: Modifiye Vaksinya Ankara
ORF	: Açık Okuma Çerçevesi
LdRp	: RNA-Bağımlı RNA Polimeraz
NP	: Nükleoprotein
UTR	: Untranslated Region
NTR	: Non-Translated Region
RTP	: Ribavirin Trifosfat

VRP	: Virüs Replikon Partikülü
vRNA	: Viral RNA
LACV	: La Crosse Virüsü
KUPV	: Kupe Virüs
ERVEV	: Erve Virüs
PARP	: Poli (ADP-riboz)
BUNV	: Bunyamvera virüs
RVFV	: Rift Vadisi Ateşi Virüsü
TSWV	: Domates lekeli solgunluk tospovirüsü
CMC	:Karboksimetil Selüloz
BHK-21	: Baby Hamster Kidney -21 hücre hattı
SW-13	: İnsan adrenal korteks hücre hattı
RNP	: Ribonükleoproteinler
SKI-1/S1P	: Subtilisin Kexine Isoenzyme-1 / Site-1- Protease
MLD	: Mucin Like Domain
OTU	: Ovarian Tümör
RIG-I	: Retinoic Acid-Inducible Gene 1
NSs	: Yapısal Olmayan Protein S
NSm	: Yapısal Olmayan Protein M
SFTSV	: Severe Fever With Thrombocytopenia Virus
RVFV	: Rift Valley Fever Virus
I-CLiPs	: Intramembrane cleaving proteases
IRF-3	: Interferon Regulatory Factor 3
NaCl	:Sodyum Klorid
KCl	:Potasyum Klorid
MgSO4	: Magnezyum Sülfat
CaCl2	: Kalsiyum Klorid
Na2HPO4	: Sodyum Fosfat Dibazik
KH2PO4	: Potasyum Fosfat Monobazik
NaH2PO4	: Sodyum Fosfat Monobazik

Na ₂ CO ₃	: Sodyum Karbonat
NaHCO ₃	: Sodyum Bikarbonat
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
TBE	: Tris Borik Asit EDTA
IPTG	: İzopropil -D-1- Tiyogalaktopiranozid
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
APS	: Amonyum Persülfat
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PBST	: Phosphate Buffered Saline with Tween 20
LB	: Luria-Bertani
SOC	: Super Optimal Catabolite
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
PCR	: Polimeraz Chain Reaction
MGW	: Molecular Grade Water
MCS	: Multiple Cloning Site
F	: Forward
R	: Reverz
SDS-PAGE	: Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis
TEMED	: Tetrametiletilen Diamin

ÖZET

Yazıcı, Merve. (2021). Hazara Virüsün Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü İçin Model Organizma Olarak Araştırılması. Moleküler Tıp ABD. Doktora Tezi. İstanbul

Hazara virüsü (HAZV), *Bunyavirales* sınıfının *Nairoviridae* ailesinin *Orthonairovirus* cinsinden olup Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü (KKKAV) ile aynı cinse mensuptur. KKKAV'nin neden olduğu Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) hastalığı için herhangi bir koruyucu veya terapötik tedavi olmaması virüsü yüksek risk grubuna sokup biyogüvenlik seviyesi (BSL) 4'te çalışılmasını gerektirmektedir. Öte yandan, aynı serogrubun bir üyesi olan HAZV, insanlar için bir patojen olarak rapor edilmemiştir. Bu sebeple HAZV, KKKAV için model teşkil etmekte ve BSL-2'de çalışılmaya izin vermektedir.

KKKAV ve HAZV S segmentlerinin kodladıkları NP'ler birbirlerine aminoasit düzeyinde %59 oranında benzerlik göstermektedir. KKKAV gibi pek çok bunyavirüste NP, yüksek immun cevap oluşturmakta ve virüse karşı oluşan antikorların tespitinde kullanılmaktadır. HAZV ve KKKAV arasındaki benzerlikleri karakterize etmek ve HAZV'yi KKKAV enfeksiyonuna model olarak kullanabilmek için tüm virüsün ve HAZV NP'sinin çalışılması önem arz etmektedir.

Bu çalışmada, iki virüsün insan, fare ve tavşanda oluşturduğu humoral immun yanıt benzerlikleri araştırılmıştır. Bu amaçla, virüslere ve NP proteinlerine karşı oluşan antikorlar enzim immunoassay (EIA) ve western blot yöntemleriyle karşılaştırılmıştır. Negatif kontrol olarak ise immünize edilmemiş fare ve tavşan serumları ya da sağlıklı insan serumları kullanılmıştır. Enzim immunoassay ve western blot testleri HAZV ve KKKAV'ye karşı oluşan antikor yanıtında yüksek oranda bir çapraz tepkimenin varlığını ortaya konmuştur. Bu sonuçlar, HAZV ve KKKAV NP'lerinin ve tüm virüsün humoral immün yanıtta önemli benzerlikler paylaştığını ve HAZV'nin KKKAV için bir model olarak kullanılma olasılığının altını çizmektedir.

Anahtar Kelimeler: KKKAV, HAZV, nükleoprotein, çapraz tepkime humoral immünite.

Bu çalışma, Bezmialem Vakıf Üniversitesi BAP birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 6.2017/27 ve 4.2019/12

ABSTRACT

Yazıcı, Merve. (2021). Investigation of Hazara Virus as a Model for Crimean Congo Hemorrhagic Fever Virus. İstanbul University, Institute of Health Science, Institute of Experimental Medical Research, Department of Molecular Medicine. PhD Thesis. İstanbul.

Hazara virus (HAZV) is a member *Nairoviridae* family and belongs to the same serogroup as Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV), which is considered a severe public health threat. The absence of any preventive or therapeutic treatment against the CCHF disease places the virus in the high-risk group and required to study at biosafety level (BSL) 4. On the other hand, HAZV, a member of the same serogroup, has not been reported as a pathogen for humans. For this reason, HAZV constitutes a model for CCHFV, taking into account it's serological and phylogenetic similarity to CCHFV, and allows it studied in BSL-2.

The NPs encoded by CCHFV and HAZV S segments are 59% similar to each other. In many *bunyaviruses* such as CCHFV, NP creates a high immune response and is used to detect antibodies against the virus. It is worthwhile to study the whole virus and HAZV NP to characterize the similarities between HAZV and CCHFV and utilize HAZV as a model for CCHFV infection.

In this study, antigenic similarities between the two viruses were demonstrated by antibodies produced in different species (mouse and rabbit) against whole CCHFV and CCHFV NP, as well as CCHF convalescent human sera. For this purpose, whole virus HAZV and HAZV NP and as positive control CCHFV NP were used as antigens to conduct enzyme immunoassays (EIA) and western blotting with the above-mentioned antibodies. As a negative control, non-immunized rabbit or healthy human sera were used. As a result of the tests performed, a strong cross-reaction between HAZV and KKKAV was revealed. These results have drawn the preference for HAZV and CCHFV NP' and the whole virus for significant similarities in humoral immune response and that HAZV can be used as a model for CCHFV. These results underlined that HAZV and CCHFV NPs and the whole virus share important similarities in humoral immune response and that HAZV can be used as a model for CCHFV.

Key words: KKKAV, HAZV, nucleoprotein, cross-reaction, humoral immunity

This work was funded by Bezmialem Vakif University Research Council (BAP). Proje No: 6.2017/27 ve 4.2019/12

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kırım-Kongo kanamalı ateş virüsü (KKKAV) negatif sarmallı bir RNA virüsü olup *Bunyavirales* sınıfının *Nairoviridae* ailesine mensuptur. Tarihte ilk tespit edilen Kırım-Kongo ateşi (KKKA) hastalığı salgını, 1944 yazında, Kırım yarımadasının Alman işgali altındaki bölgelerini yeniden işgal eden Sovyet birliklerinin, yüksek kanama ve şok insidansı ile akut ateşli bir hastalık geçirmesiyle gerçekleşmiştir [1-4]. Yaklaşık 200 askeri personel hastaneye kaldırılmış ve bunların %10'u ölmüştür. 1960'ların sonlarında, Kırım'daki bu hemorajik hastalık etkeninin Belçika Kongosu'ndaki (Demokratik Kongo Cumhuriyeti) hemorajik hastalığın etkenine benzer olduğu keşfedilmiş ve bu patojene Kırım-Kongo kanamalı ateş virüsü adı verilmiştir [5]. Doğada *Ixodid* türü keneler aracılığıyla taşınmakta olan KKKAV, Türkiye, Balkanlar, Güney-Doğu Avrupa, Ortadoğu, Afrika ve Asya'da endemiktir. KKKA en sık, infekte bir kenenin ısırmasıyla tarım işçileri arasında ve daha az ölçüde infekte hayvanların kanına ve dokularına maruz kalan mezbaha çalışanlarında, ya da infekte hastaların vücut sıvılarıyla temas sonrası sağlık personeli arasında görülmektedir. KKKA, hafif, non-spesifik ateşli bir sendromdan vasküler sızıntı, çoklu organ yetmezliği, şok ve kanamaya kadar ilerleyebilen şiddet spektrumuna sahiptir. Vaka ölüm oranları salgınlar arasında farklılık gösterirken tipik olarak %5 ile %30 arasında değişmektedir [6, 7]. Hastalığa karşı henüz koruyucu ya da önleyici bir tedavinin bulunmaması, KKKAV'nin ancak biyogüvenlik seviyesi (BSL) 4 olan laboratuvarlarda çalışılmasını zorunlu kılmakta ve virüsün çalışılmasını kısıtlamaktadır. Aynı zamanda virüsün asıl tehdit oluşturduğu ülkelerin gelişmekte olan ülkeler olması, virüsle alakalı çalışmaların yavaş ilerlemesine sebep olmaktadır.

Hazara virüs (HAZV), *Bunyavirales* sınıfının *Nairoviridae* ailesinin *Orthonairovirus* cinsinden olup KKKAV ile aynı serogruprandır. Çalışılması için yüksek biyogüvenlik seviyesi gerektiren ve en önemli insan patojenlerinden biri olan KKKAV'nin [8] aksine HAZV'nin, insanda ya da hayvanlarda hastalık yaptığı raporlanmamıştır. İlk defa, 1964 yılında Pakistan'ın Hazara bölgesindeki *Ixodes redikorzevi* türü kenelerden izole edilen HAZV'nin dünya çapındaki dağılımı geniş çapta incelenmemiştir. Ancak HAZV'ye karşı antikorlar yabani kemirgen serumlarında tanımlanmıştır [4, 9, 10]. Daha az kısıtlayıcı BSL 2 koşullarında çalışılabilen HAZV,

KKKAV'ye serolojik ve filogenetik benzerliği göz önünde bulundurularak KKKAV için model olabileceği ifade edilmektedir. HAZV, KKKAV için potansiyel bir model olmasına rağmen, virüsün biyolojisi ve immünolojisi derinlemesine incelenmemiştir [11, 12]. HAZV ve KKKAV dâhil olmak üzere birkaç *Nairovirus* arasındaki antijenik benzerlikler kırk yıl önce ele alınmış; fakat bu bilgiler daha sonraları doğrulayıcı çalışmalarla desteklenmemiştir. Casal ve arkadaşlarının 1980 yılında yaptığı bir çalışmada nairovirüslerin yapısal özellikleri incelenmiştir. Bu çalışmada, nötralizasyon ve hemagglütinasyon inhibisyonu yoluyla KKKAV ve HAZV arasındaki çapraz tepkimenin varlığı ifade edilmiştir [10]. 1980'de Foulke ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada, HAZV'nin KKKAV için çapraz koruma sağladığı ifade edilmiş, ancak bu bilgi de yayınlanmamış bir gözlem olarak kalmıştır [13]. Bu raporlardan on yıl sonra, iki virüsün nükleoproteinlerini (NP) kodlayan DNA sekansı arasındaki benzerlik ve zayıf bir antijenik çapraz reaksiyon varlığı, Marriot ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada gösterilmiştir [14]. Yakın tarihli bir çalışmada, KKKAV ve HAZV'nin bağışıklığı zayıflamış farelerde benzer patoloji gösterdiği ve her iki virüsün de embriyolu tavuk yumurtalarını ölümcül etkilediği ortaya konmuştur [15]. Bildirilen çalışmalar oldukça sınırlıdır ve HAZV ve KKKAV'nin bireysel protein seviyelerinde antijenik benzerlikler paylaştığını ve ayrıca HAZV'nin KKKAV için kapsamlı bir model olarak hizmet edebileceğini kesin olarak belgelemek için yeterli değildir.

Bu çalışmada, söz konusu çalışmalardan hareketle, HAZV'nin KKKAV için model olma potansiyeli tüm virüslerin ve virüslerin kodladığı NP'lerin oluşturduğu sıvısal immun cevaplar arasındaki benzerlikler üzerinden adreslenmiştir. Bu amaçla HAZV, memeli hücre hattında çoğaltılmış ve ardından titresini belirlenerek saflaştırılmıştır. Saflaştırılan virüs, EIA'da yakalayıcı antijen olarak kullanılmış ve KKKAV geçiren hasta serumlarına ek olarak KKKAV ile bağışıklanmış fare ve tavşan serumlarındaki KKKAV'ye özgü antikorlarla çapraz tepkime varlığı ortaya konmuştur. Aynı şekilde Hazara JC 280 suşu NP'si *E. coli*'de üretilmiş ve ardından saflaştırılmıştır. Enzim immün analizlerde, KKKAV-NP'ye karşı geliştirilmiş poliklonal fare antiserumu ve KKKAV'ye karşı geliştirilmiş tavşan ve fare poliklonal antiserumu kullanılmış ve iki virüsün anti-NP humoral immün yanıtlarındaki güçlü antijenik benzerlikler gösterilmiştir. Ayrıca antijen olarak HAZV ile enfekte olmuş hücre lizatı western blotlamada antijen olarak kullanılmış ve HAZV-NP, KKKAV'ye karşı geliştirilmiş

tavşan ve fare poliklonal antiserumu ile tepkime vermiştir. Böylelikle, HAZV ile infekte hücrelerde üretilen otantik HAZV NP ile KKKAV NP arasındaki çapraz tepkimenin varlığı ortaya konmuştur. Bu sonuçlar, HAZV ve KKKAV NP'lerinin değişik türlerde oluşturduğu sıvısal bağışık yanıtlar arasında önemli benzerlikler bulunduğu ve HAZV'nin KKKAV için bir model olma potansiyelini göstermektedir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1.1. KKKAV ve HAZV'nin keşfi

1944-1945 yılları arasında, Kırım Yarımada'sında yaklaşık 200 Sovyet askeri personel arasında ciddi kanamalarla seyreden salgın bir hastalığa, Kırım kanamalı ateşi (KKA) hastalığı adı verilmiştir. Pirojenik tedavi gerektiren psikiyatrik hastalarda, Kırım kanamalı ateş virüsü olarak adlandırılan, KKA hastalarından izole edilen filtrelenebilir bir ajanla infeksiyonun ardından indüklenen KKA benzeri klinik semptomların gözlenmesiyle bir viral etiyoloji belirlenmiştir [8]. Viral ajan ilk defa 1967'de Astrahan'da, KKA hastalarından alınan örneklerin yeni-doğan beyaz fare beynine inokulasyonu ile izole edilmiştir. İzole edilen suş (Drozdov) serolojik çalışmaları ve çeşitli coğrafi bölgelerdeki farklı salgınlardan izole edilen virüslerin karşılaştırılmasını mümkün kılacak antikor ve antijenlerin geliştirilmesine izin vermiştir [9]. M.P. Chumakov ve Jordi Casals arasındaki işbirliği, 1945'te Kırım'da izole edilen virüsün 1956'da Kongo ve Uganda'da hastalardan elde edilen üç Kongo virüs suşundan antijenik olarak ayırt edilemez olması, virüsün Kırım-Kongo kanamalı ateş virüsü (KKKAV) olarak tekrar adlandırılmasıyla sonuçlanmıştır [4]. Viral ajan, benzer zamanlarda *Hyalomma plumbeum* (*Hyalomma marginatum*), kenelerinden elde edilen suspensiyonlarda tespit edilmiş ve virüsün vektörünün keneler olduğu belirlenmiştir [9].

KKKAV'nin identifikasyonu ve karakterizasyonu son 50 yılda gerçekleşmesine rağmen, KKKA benzeri semptomlar 12. yüzyıla kadar uzanan bir tarihte Tacikistan bölgesinde belgelendirilmiştir. Belirtiler idrar, kusmuk, balgam, rektum ve karın boşluğunda kanamayı kapsamakta ve sert, küçük eklem bacaklılar hastalığının yayılımından sorumlu tutulmaktadır [10]. Çok yakın geçmişte dek, KKKA Özbekistan'ın güneyindeki yerli yöre halkı tarafından üç farklı isimle tanınmıştır. Bu da şunu göstermektedir ki KKKAV, üzerinde yapılan son çalışmalara ve elde edilen tüm bilgilere rağmen, yüzyıllardır insan kanamalı ateşinden sorumlu önemli ajanlardan biridir [4].

Hazara *orthonairovirus* (HAZV) ilk defa 1970 yılında Batı Pakistan'ın Hazara bölgesinin Kağan Vadisi'ndeki yarı arktik arazide yaşayan *Alticola roylei* türü tarla faresinden toplanan kenelerden izole edilmiştir. Erken serolojik testler, bu ajanın KKKAV ile bağlantılı fakat farklı bir virüs olduğunu göstermiştir [11]. KKKAV

infeksiyonu ile uyumlu olarak, HAZV infeksiyonu yeni doğan farelerde beyin içi virüs inokulasyonu sonrası ölümcül bir hastalıkla sonuçlanmış ve karaciğer ve beyin dokusunda yüksek miktarda viral yük tespit edilmiştir [12]. Ancak, HAZV'nin insanda infesiyona ya da hastalığa neden olduğuna dair hiçbir kanıt bulunmamaktadır ve coğrafi dağılımına ait yeterli bilgi mevcut değildir.

2.1.2. KKKAV ve HAZV'nin sınıflandırılması

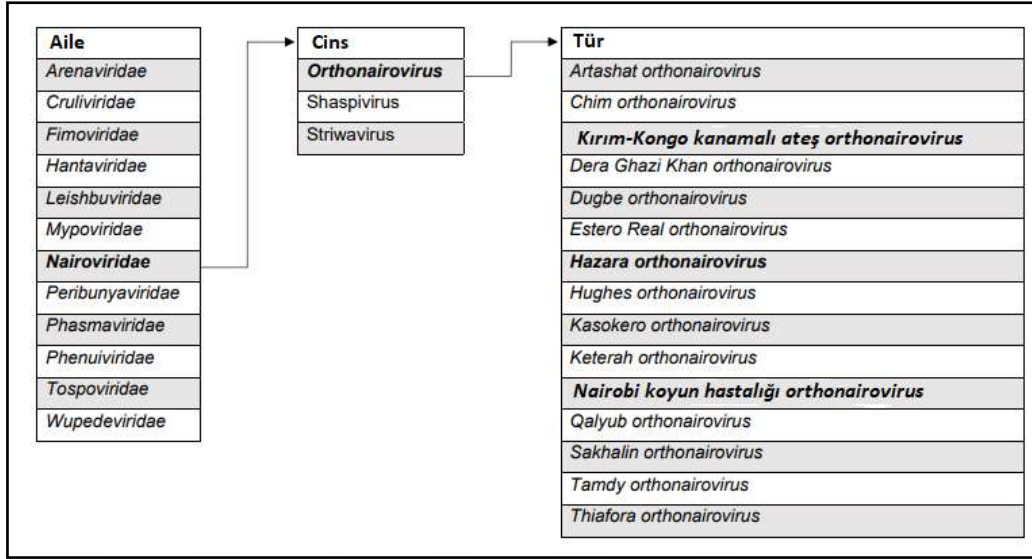
KKKAV ve HAZV, 2017 yılında doğrusal, tek sarmallı, negatif ya da ambisens RNA genomunda sahip virüsleri tanzim etmek için oluşturulmuş olan Bunyavirales sınıfının üyeleridir [13]. Başlangıçta, 9 aile tanımlanmıştır, ancak yeni keşfedilen türlerin verimli bir şekilde sınıflandırılmasına izin vermek adına en son Leishbuvidae ve Tospoviridae ailelerinin de eklenmesiyle bu sayı 2019 yılında 12'ye çıkarılmıştır [14]. Şu anda bu sınıfta *Bunyavirales* sınıfını en geniş taksonomik grup olmasını sağlayan 287'si belirlenmiş yaklaşık 500 isimlendirilmiş izolat bulunmaktadır. *Bunyavirales* sınıfının oluşturulmasından önce bunyavirüsler, 5 cinsten oluşan *Bunyaviridae* ailesi içinde sınıflandırılmıştır (*Nairovirus*, *Orthobunyavirus*, *Hantavirus*, *Phlebovirus* and *Tospovirus*).

Hem KKKAV hem de HAZV, *Nairoviridae* ailesinin üyeleridir ve ayrıca 13 farklı virüsle birlikte *orthonairovirus* cinsinde sınıflandırılmıştır (Şekil 2.1-1). Bu cins içerisinde dikkate değer örnekler arasında, cinsin bir türü olan Dugbe *orthonairovirus* ve koyun ve keçilerde % 90 ölüm oranına ve önemli ekonomik bozulmaya neden olan Nairobi Koyun Hastalığı *orthonairovirusu* bulunmaktadır [15].

2.1.3. Bulaş yolları, vektörler ve konakçılar

KKKAV çeşitli *Ixodid* (sert) türü keneler aracılığıyla anneden yavrularına (transovarian) ve larvadan nimf ve erişkin formlara (transstadiyal) olarak bulaşan zoonotik bir infeksiyon ajanıdır. KKKAV, tatarcık sineği gibi diğer eklem bacaklılardan da izole edilmiş olsa da, bunun infekte bir memeliden yakın zamanda beslenme kaynaklı olduğu düşünülmektedir [16]. KKKAV, yumuşak kenelerde muhafaza edilmemektedir. Deneysel infeksiyon, bu tür kenelerin virüsü dokulara yaymadığını veya virüsün transstadiyal formda muhafaza edildiğini göstermektedir [17, 18]. Virüs kenelerin, bahar ve yaz ayları boyunca küçük ya da büyük memeli konakçılardan sağladığı kan öğünlerinde çoğalır. *Ixodid* türü keneler, KKKAV'nin tüm yaşam döngüsünün her seviyesinde ev sahipliği yapmaktadır. İnsanlar geçici olarak

KKKAV'nin devamını sağlamaktadır. Ancak insan, virüs için zorunlu olmayan ve 'nihai-son-dead-end' konaktır [7].

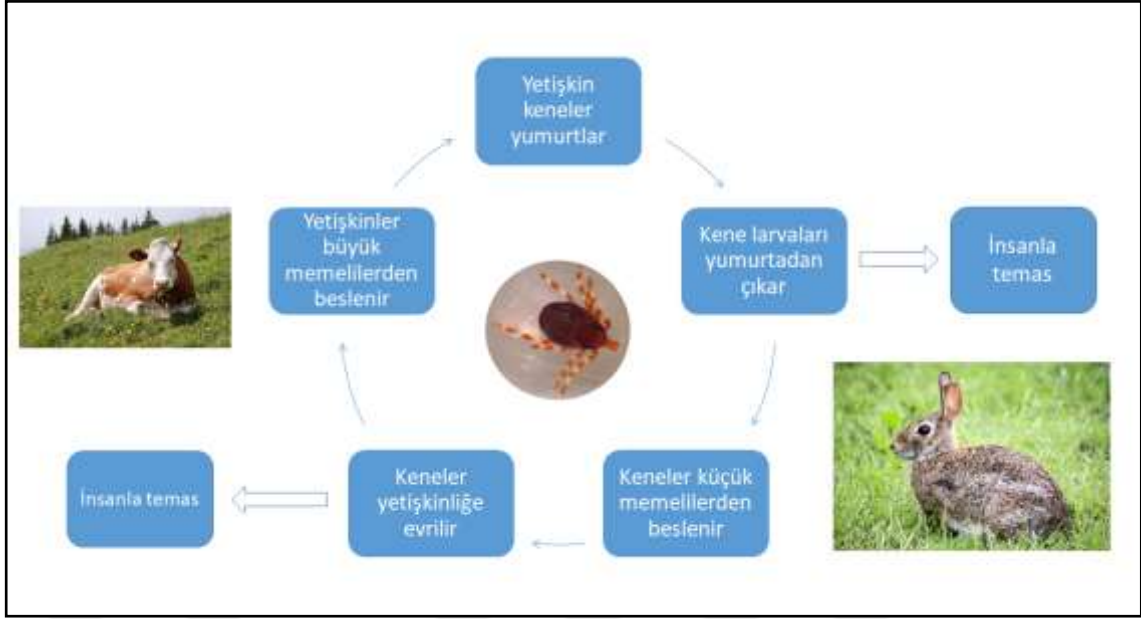


Şekil 2.2-1: HAZV orthonairovirus (HAZV) ve Kırım-Kongo kanamalı ateş orthonairovirus (KKKAV)nin Bunyavirales takımı içinde sınıflandırılması.

Şekilde görüldüğü gibi HAZV ve KKKAV *Bunyavirales* takımı, *Nairoviridae* ailesi ve *Orthonairovirus* cinsinde sınıflandırılmaktadır. *Orthonairovirus* cinsine mensup tüm türler listelenmiştir.

Kenede ilk enfeksiyon, infekte bir konaktan kan emildiğinde gerçekleşmektedir. KKKAV kenenin ilk önce midgut duvarındaki hücreleri infekte edip burada çoğalmaktadır [19]. Virüs miktarının en yüksek olduğu tükürük bezleri ve üreme organları dâhil olmak üzere birden fazla dokuya yayılım daha sonra gerçekleşmektedir.

İnfekte dişiler virüsü transovaryal bulaş yoluyla yavrulara taşıyabilirler. *Hyalomma* türü kene larvaları yumurtadan çıktıktan sonra ilk kan öğünlerini küçük memeliler ya da kuşlardan sağlarlar. İlk beslenmenin ardından, nimf bu küçük konağı bırakır ve deri değiştirerek yetişkin formuna dönüşür. Yetişkin keneler besinlerini daha büyük bir konakçı hayvandan sağlar ve beslenme süresinde çiftleşir. Dişi keneler daha sonra düşer ve yumurtlama için uygun bir yer bulur ve bu döngü tekrar eder [20]. *Hyalomma* türlerinin şematik yaşam döngüsü şekil 2.1-2'de gösterilmiştir. Konak enfeksiyonu serolojik testlerle belirlenebilir. Bu yöntem, KKKAV'nin dolaşımında olduğu bölgelerde oldukça faydalıdır. Pek çok yabani ve evcil hayvan türünde, at, eşek, koyun, sığır ve devekuşlarında çok düşük seviyede viral replikasyon tespit edilmiştir [17, 21-23].



Şekil 2.2-2: *Hyalomma* türlerinin tam yaşam döngüsü.

Hyalomma türlerinin tam yaşam döngüsü için büyük ve küçükbaş konakçılar gereklidir. KKKAV ile infekte bir kene virüsü tüm yaşam döngüsü boyunca taşır ve virüsü dikey olarak yavrulara geçirilebilir. İnsanlar, yaşam döngüsünün herhangi bir aşamasında infekte olmuş bir kene tarafından ısırılma sonucu infekte olurlar, ancak yetişkin *Hyalomma* türlerinin çoğu insan infeksiyonundan sorumlu olduğu düşünülmektedir.

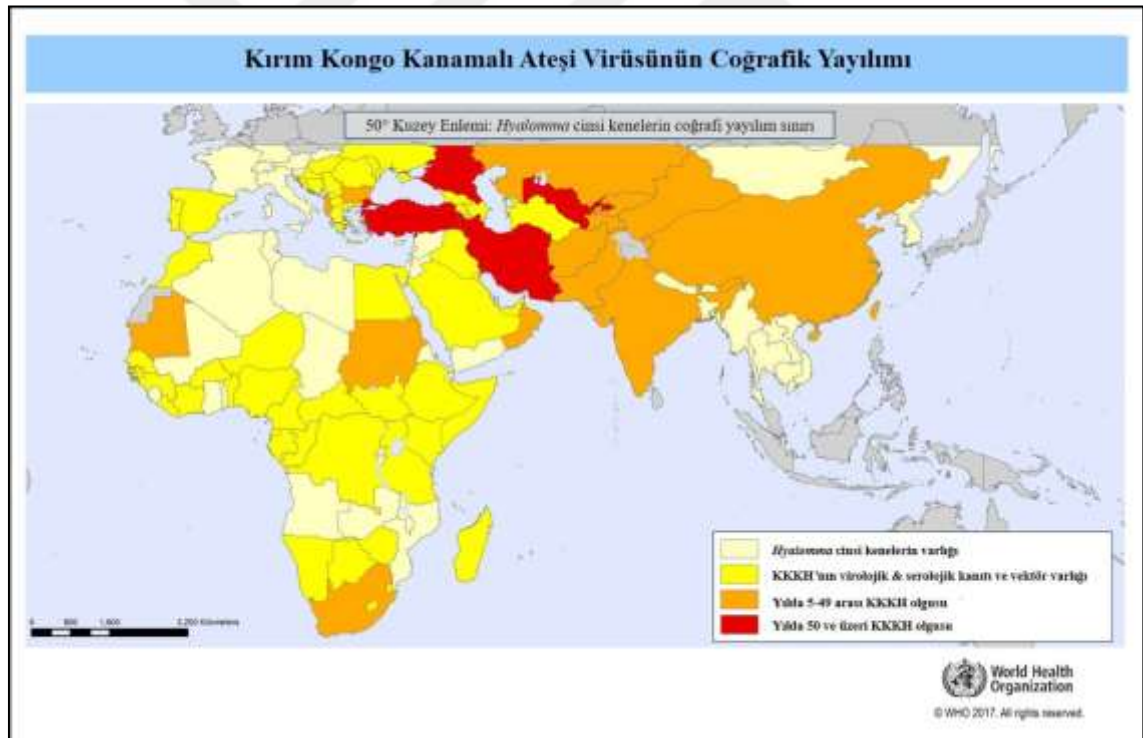
Kuşların, *Hyalomma* türü larva ve nimfler için muhtemel infekte kan kaynağı olabileceği düşünülmektedir. Ancak, infekte kene ile teması sonrası kuşların viremik hâle geldiğine dair kanıt bulunmamıştır. Kuşlardan izole edilen kenelerin KKKAV pozitif olduğu ortaya konmuştur. Ancak, kuşların kendilerinin viral replikasyon için konakçı olduğu düşünülmemektedir [4]. Dolayısıyla, KKKAV'nin bulaşında kuşların olası rolünün KKKAV pozitif kenelerin küresel dağılımını arttırmak olduğu söylenebilir.

İnsanlara bulaş, virüsle infekte keneler tarafından insanların ısırılmasıyla meydana gelir. *Hyalomma* türü kenelerin iki konaklı yaşam döngüsü artan KKKA vakalarından sorumlu olabilir. *Hyalomma* türü keneler için hem küçük hem de büyükbaş memeli konakçılar nerede bol ise insandaki infeksiyon oranı o kadar düşüktür. Ancak küçük konakçılara kıyasla büyükbaş konakçı sayısındaki dengesizlik insan vakalarını arttırmaktadır. Kırım'daki Sovyet askeri personeli arasında ortaya çıkan salgın sebebinin bu olduğu varsayılmaktadır. Son dönemlerde yabani tavşan popülasyonları çoğalmasına rağmen çiftlik hayvanlarının sayısı keskin bir şekilde

azalmıştır. Bu da *Hyalomma* türü kenelerin besleneceği insan harici büyük memeli konakçı sayısının eksilmesi anlamına gelmektedir. Orduda görülen KKKA vakalarındaki ani artış *Hyalomma* türü kenelerin insanları alternatif besin kaynağı olarak kullanmasının sonucu gibi görülmektedir. Kene ısırıklarına ek olarak, insana bulaş hastalığın ilk 7-10 günlük evresinde enfekte bir hastanın kan ya da vücut sıvısıyla doğrudan temas yoluyla da gerçekleşebilmektedir.

2.1.4. KKKAV'nin epidemiyolojisi ve coğrafi dağılımı

KKKAV, keşfinde bu yana 140'tan fazla salgından ve 6000'den fazla vakadan sorumlu olan Dang (Dengue) humması virüsünden sonra tıbbi açıdan en yaygın ve en önemli ikinci arbovirüstür [24]. Salgınlar, Çin'den Afrika'ya kadar geniş bir coğrafi alandan meydana gelmiştir ve son dönemde Hindistan, Avrupa ve Orta Doğu'da da vakalar rapor edilmiştir (Şekil 2.1-3) [4, 25-27].



Şekil 2.2-3: Kırım-Kongo kanamalı ateş virüsünün coğrafi yayılımı.

Soluk sarı renkli ülkeler *Hyalomma* cinsi kenelerin varlığı bildirilen bölgelerdir. Sarı renkli ülkelerde KKKA vakaları raporlanmamıştır ancak KKKAV kenelerden ve hayvanlardan izole edilmiştir ya da serolojik çalışmalar KKKAV varlığını ortaya koymaktadır. Turuncu ülkeler yıllık 4-49 KKKA vakası raporlamaktadır. Kırmızı ülkeler ise yıllık 50'den fazla KKKA vakası bildirmektedir. Gri renkli ülkelerin üstündeki yatay çizgi, *Hyalomma* cinsi kenelerin en kuzeydeki dağılım sınırını göstermektedir. Resim DSÖ tarafından 2017 yılındaki rapordan adapte edilmiştir.

(https://www.who.int/health-topics/crimean-congo-haemorrhagic-fever/#tab=tab_1)

Bununla birlikte, KKKAV'nin gerçek coğrafi dağılımı muhtemelen s rveyans sistemlerinin olmaması nedeniyle mevcut tahminlerin önerdiğinden daha geniştir. Virüs veya insan KKKA vakalarına ilişkin ilk raporlar, bilinenden daha geniş dağılımı destekleyen ve günümüzde uygulanan s rveyans sistemleri ile uyumludur [28]. Buna ek olarak, endemik ülkelerdeki vakalar yıldıan yıla artmaktadır. 2016 ve 2018 yılları arasında Afganistan'daki KKKA vakaları üzerine yapılan bir araştırma, 2016'da 163, 2017'de 245 ve 2018'de 483 vaka ile vakaların yıldıan yıla arttığını bildirilmiştir [29] .

Avrupa Hastalık  nleme Merkezi tarafından İngiltere ve Norveç'te ilk kez *Hyalomma* keneleri tespit edilmesiyle birlikte daha önce virüsten etkilenmeyen ülkelerde de yeni vakalar bildirilmesi kene vektörünün artan coğrafi dağılımının bir sonucu olabilir [30, 31]. Buna ilaveten, bazı ülkeler endemik bölgelere seyahat eden ve bu bölgelerden ziyarete gelen KKKA hastaları raporlamıştır. Birleşik Krallık, biri 2012 yılında Afganistan'dan diğeri ise 2014 yılında Bulgaristan'dan dönen iki KKKA vakası bildirmiştir [32, 33]. Modern  ağda, uluslararası seyahatin kolaylığı göz önüne alındığında, ilk vakalarını bildiren ülkelerin sayısının artması kaçınılmazdır.

2.1.5. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Teşhisi

Ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR), immünofloresan analizi (IFA), antikör ve antijen yakalayıcı EIA ve virüs izolasyonu dahil olmak üzere birçok KKKA teşhisi yöntemi mevcuttur. KKKAV'nin BSL 4'te çalışılması zorunluluğu sebebiyle, virüs izolasyonu nadiren bir teşhis aracı olarak kullanılmaktadır. Teşhiste  ncelikli tercih edilen bir yöntem, infeksiyonu en erken ve en yüksek seviyede algılama hassasiyetine sahip olduğu için RT-PZR'dir [34]. Bununla birlikte, KKKA'nın RT-PZR ile teşhisine yönelik zorluklar, KKKAV'nin tüm suşlarını kapsayan korunmuş bir gen dizisinin belirlenmemiş olmasından kaynaklanmaktadır [35, 36]. Bu sebeple önerilen tanı yöntemi, RT-PZR gibi bir nükleik asit amplifikasyon testi ile birlikte EIA gibi bir immünolojik testin bir kombinasyonudur [36, 37]. Hem nükleik asit amplifikasyonu hem de immunolojik yaklaşımlar, KKKA salgın bölgelerinde genel olarak bulunmayan orta veya yüksek düzeyde biyolojik muhafaza altyapısı gerektirmektedir. Bu nedenle hızlı tanı testleri, salgın bölgesinde ilk tarama için bir seçenek sunmaktadır. Hızlı tanı testleri, nükleik asit amplifikasyonu ve immünolojik temelli testler ile benzer prensipleri kullanmasına rağmen genellikle bir saat içinde çok

daha hızlı tanı sağlayan bir akış formatı kullanmaktadır. Hızlı tanı testlerinin dezavantajı, ciddi ve ölümcül KKKA vakalarında gözlenen düşük serolojik yanıt nedeniyle düşük duyarlılık göstermeleridir [38].

2.1.6. Klinik Belirtiler ve Tedavi Seçenekleri

İnsanlar genellikle kene ısırması ya da kontamine hayvan ile temas sonrası KKKAV ile infekte olurlar. Aynı zamanda hastane infeksiyonları da yaygındır ve Avrupa, Asya ve Afrika'dan sağlık çalışanlarının KKKA'ya yakalandığı belgelenmiştir [39, 40]. KKKA infeksiyonu genellikle ölümcüldür ve bildirilen vakaların %3-30'u ölümle sonuçlanır. Ancak izole salgınlarda %70 gibi önemli ölçüde yüksek ölüm oranları da görülmüştür [4, 41, 42].

KKKA'nın klinik ilerlemesi 4 farklı evrede kategorize edilmektedir; kuluçka, pre-hemorajik evre, hemorajik dönem ve nekahat dönemi. Bu aşamaların süresi, infeksiyonun kaynağına bağlı olarak değişmektedir; kene ısırığı yoluyla bulaşta en kısa kuluçka süresi (2-3 gün) gözlenirken, infekte hayvan kanıyla (5 gün) veya insanla (5-6 gün) temas yoluyla bulaşta bu süre değişkenlik göstermektedir [21]. Pre-hemorajik evre ortalama 3 gün sürmektedir. Ancak, bu süreç 1 ila 7 gün arasında değişkenlik göstermektedir [4]. Pre-hemorajik evre sırasında ateş, baş ağrısı, kas ağrısı ve baş dönmesi semptomları yaygındır ve bazı vakalarda ishal, bulantı ve kusma da görülmektedir [21, 41, 43, 44]. Hemorajik faz hızla gelişir ve 2 ila 3 gün sürer ve deri altı kanama kaynaklı peteşi semptomları ile mukozada ve ciltte hematoma görünümü, hemorajik faz ile ilişkilidir. Burun, gastrointestinal sistem, rahim ve idrar yolundan kanama da yaygın olmakla birlikte vajinal, diş eti ve beyin kanaması da belgelenmiştir [21, 45]. Nekahat dönemi, hastalığın ilk belirtilerinden yaklaşık 10 ila 20 gün sonra hayatta kalanlarda meydana gelmektedir. Bununla birlikte, bu fazdaki semptomlar arasında taşikardi, kararsız nabız, iştme ve hafıza kaybı, polinörit ve geçici tam saç kaybı görülmesine ilave olarak semptomlar bunlarla sınırlı değildir.

KKKA'nın ilk tanımını ve daha sonra neden olarak KKKAV ile ilişkisini takip eden yaklaşık 80 yıl zarfında, destekleyici bakım KKKA hastaları için tedavinin temel dayanağı olarak kullanılmıştır. Günümüzde KKKA'ya özgü lisanslı aşı ya da herhangi bir terapötik tedavi bulunmamaktadır. Ancak etkinliği tartışılrsa da ribavirin potansiyel bir anti-viral ajan olarak gösterilmiştir ve genel destekleyici bakım sırasında kullanımı DSÖ tarafından tavsiye edilmektedir. Ribavirin, hedef hücre içinde ribavirin-trifosfata

(RTP) dönüşerek fosforilasyona uğrayan bir guanozin analogudur [46]. RTP daha sonra viral RNA'ya bağlı RNA polimeraz (RdRp) tarafından replike RNA zincirine dahil edilmektedir. Başlangıçta poliovirüs ile gösterildiği gibi zincir uzamasının veya zincir sonlandırmasının inhibisyonuna neden olan ribavirin, uzun bir zaman Hepatit C virüsünün tedavisinde kullanılmıştır [47, 48]. Bir süre önce STAT-1 nakavt fare modelinde, enfeksiyonun erken aşamalarında düşük viral titrelerle uygulandığında ribavirin'in KKKAV çalenç sonrası koruyucu bir rolü olduğu gösterilmiştir [49]. Bununla birlikte, interferon (IFN) nakavt fare modelinde, ribavirin ve T-705 olarak da bilinen başka bir nükleotid analogu favipiravirin uygulandığında KKKAV ile çalenç sonrası hayatta kalan fare sayısının oldukça düşük olduğu gözlenmiş ve ribavirinin klinik olarak anlamlı bir etkiye sahip olmadığı belirtilmiştir [50]. Bu çalışmada, favipiravirinin, enfeksiyonun erken evresinde kullanılsa bile hastaların küçük bir yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı klinik yarara sahip olduğu gösterilmiştir.

Günümüzde dünya çapında onaylanmış bir aşı olmamasına rağmen, potansiyel bir KKKA aşı adayı Bulgaristan'da üretilmiştir. Yenidoğan fare beyinlerinde çoğaltılan virüs, kloroform muamelesi ve 58°C'de ısıtılarak inaktive edilmektedir ve ardından alüminyum hidroksit ile absorbe edilmektedir [51]. 1953 ve 1974 yılları arasında Bulgaristan'da %17'lik bir ölüm oranıyla 1105 KKKA vakası rapor edilmiştir. 1974'te uygulanan bir bağışıklama programının ardından, aynı dönemde (1974'ten 1996'ya) vaka sayısı %11,4'lük bir ölüm oranıyla 279'a düşmüştür ve yıllık vakalar nispeten düşük sayıda kalmıştır (yılda <20 vaka) [52, 53]. Bununla birlikte, bu aşı yalnızca geliştirildiği Bulgaristan'da kullanım iznine sahiptir. Güvenlik endişeleri ve üretim maliyetleri nedeniyle risk altındaki nüfusa sahip diğer ülkelerde onay standartlarını karşılamadığı belirtilmektedir. Potansiyel aşı adaylarına dair çalışmalar hâlen devam etmektedir. En umut verici adaylardan biri, IbAr10200 suşunun tam uzunluktaki S ve L genom segmentlerini içeren ancak M segmentinin dâhil olmadığı plazmid aracılı transfeksiyon sistemiyle üretilen viral replikon partikülüdür (VRP). İnterferon α/β -reseptör nakavt (IFNAR-/-) farelerin kullanıldığı çalışmada, VRP'nin tek bir dozunun uygulanmasının ardından gerçekleştirilen birden fazla KKKAV suşu (IbAr10200, Umman-97 ve Türkiye) ile çalenç sonrası farelerin %100'ünün hiçbir klinik belirti olmaksızın virüs tehdidinden kurtulduğu gösterilmiştir [54]. Önceki diğer çalışmalarda, IFNAR-/- farelerde KKKAV çalenç sonrası tam koruma gösterilse de bunun için birden fazla doz gerekmiş ve birden fazla suşa karşı tam koruma sağlanamamıştır [55-58].

KKKAV'ye karşı üretilmiş bir diğer aşı ise hücre kültürü tabanlı üretilmiş ve formalin ile inaktive edilmiştir. Bu inaktif aşının bağışıklanmış farelerde fare beyni tabanlı üretilmiş olan virüsten saha güçlü ve sağlam bir bağışık yanıtının yanı sıra yüksek titede nötralizan antikor oluşumunu sağladığı ortaya konmuştur. Bu aşının (IFNAR-/-) farelerde %80 oranında koruyuculuğa sahip olduğu gösterilmiştir

2.2. Virüs

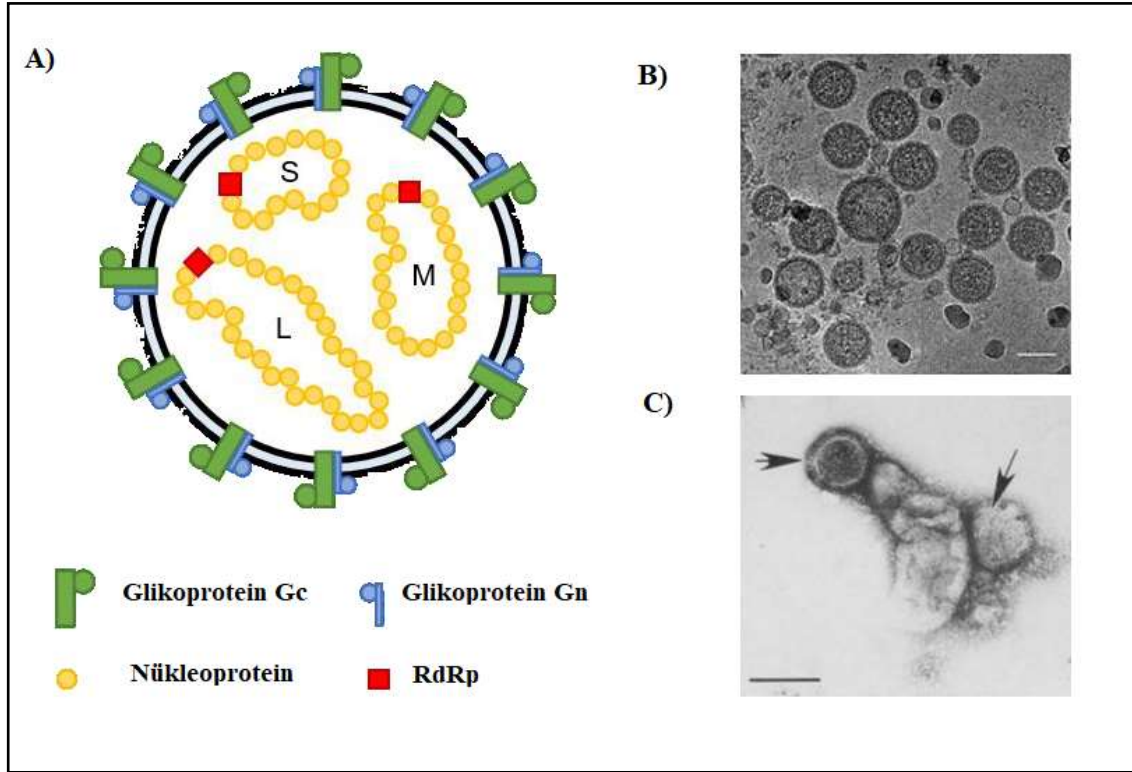
2.2.1. Virüsün Yapısı

KKKAV ve HAZV, konakçı kaynaklı bir zara sahiptir ve yaklaşık 80 ila 100 nm çapında geniş küresel viriyonlardır [59]. Yapısal glikoproteinler Gn ve Gc, yüzeyden 5 ila 10 nm uzayarak zardan çıkıntı yapar ve giriş fazı sırasında hücrel reseptörlere bağlanmadan sorumludur [60]. Viriyon içinde, viral genom segmentleri, viral nükleoprotein (NP) ve RdRp içinde kapsüllenmektedir. HAZV viriyonunun bir şeması ve KKKAV ve HAZV'nin elektron mikrografları, virüslerin küresel yapısını ve göreceli boyutlarını detaylandırarak Şekil 2.2-1'de gösterilmiştir.

2.3. Viral Genom Yapısı

KKKAV ve HAZV genomu, sırasıyla viral NP, glikoprotein prekürsörü-öncüsü-(GPP) ve RdRp'yi kodlayan küçük (S), orta (M) ve büyük (L) olarak adlandırılan üç tek sarmallı RNA (ssRNA) segmentinden oluşur. KKKAV S segmentinin, bir ambisense kodlama stratejisi kullanarak yapısal olmayan ek bir proteini (NS'ler) kodladığı bildirilmiştir [59]. Farklı coğrafi bölgelerden elde edilen KKKAV suşlar karşılaştırıldığında S, M ve L segmentler sırasıyla nükleotid sekansı bazında %20, %31 ve %22 oranında farklılık gözlenmektedir. Amino asit bazında bu farklılık sırasıyla %8, %27 ve %10'dur [60]. Her gen bölümünün açık okuma çerçevesi (ORF), 5' ve 3' terminallerinde kodlanmayan bölgeler (NTR) ile çevrilmiştir. Bu NTR'ler, viral RNA sentez aktiviteleri için promotör görevi gören *cis*-etkili sinyaller içermektedir [61, 62]. NTR dizilerinin ayrıca viral RNA'nın (vRNA) RNP oluşturmak üzere enkapsidasyonu ve bu RNP'lerin viriyonlara paketlenmesi dâhil olmak üzere viral yaşam döngüsünde ek rolere sahip olduğu varsayılmaktadır [63]. Her bir segmente özgü NTR'lerin uzunluğu değişkenlik göstermekte, ancak vRNA'nın 5' terminalindeki NTR'ler her zaman 3' NTR'lerden daha uzun nükleotid sekansına sahip olduğu belirtilmektedir. Her iki terminaldeki dokuz nükleotid dizisi (5'-UCUCAAGA ve 3'-AGAGUUUCU) segmentler arasında ve farklı nairovirüsler arasında tamamen korunmuştur. La Crosse

virüsü (LACV) gibi virüslerde promotor görevi yapmak üzere viral RdRp'ye



bağlanmayı sağlayan saç tokası görünümünü oluşturmaktadır [64].

Şekil 2.3-1: A) HAZV ve KKKAV viriyonunun şematik temsili

A) HAZV ve KKKAV viriyonunun şematik temsili. Glikoprotein içeren viral zar ve RNP yapısını oluşturan nükleoprotein, viral RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RdRp) ve RNA yapısındaki genlerin oluşturduğu üç genom segmenti gösterilmektedir. B) HAZV viriyonlarının Punch v.d., 2018 tarafından elde edilen elektron mikrosafı, ölçüm skalası 100 nm. C) KKKAV viriyonlarının Martin, Lindsey-Regnery v.d., 1985 tarafından bildirilen elektron mikrosafı. Şekil Punch ve ark., 2018'den adapte edilmiştir.

2.4. Virüs Tarafından Kodlanan Proteinler

2.4.1. S segment

HAZV ve KKKAV'nin S segmenti, viral nükleoproteini kodlarken; KKKAV'nin ayrıca yakın zamanda bir ambisense kodlama stratejisi kullandığı ve yapısal olmayan - non-structural – NSs'i kodladığı belirtilmiştir [59].

2.4.1.1. HAZV ve KKKAV Nükleokapsid Proteinleri

Hem KKKAV hem de HAZV NP'nin yapısı, birçok grup tarafından çalışılmıştır [65-68]. Hem KKKAV hem de HAZV NP, globüler ve arm-kol domaini olmak üzere

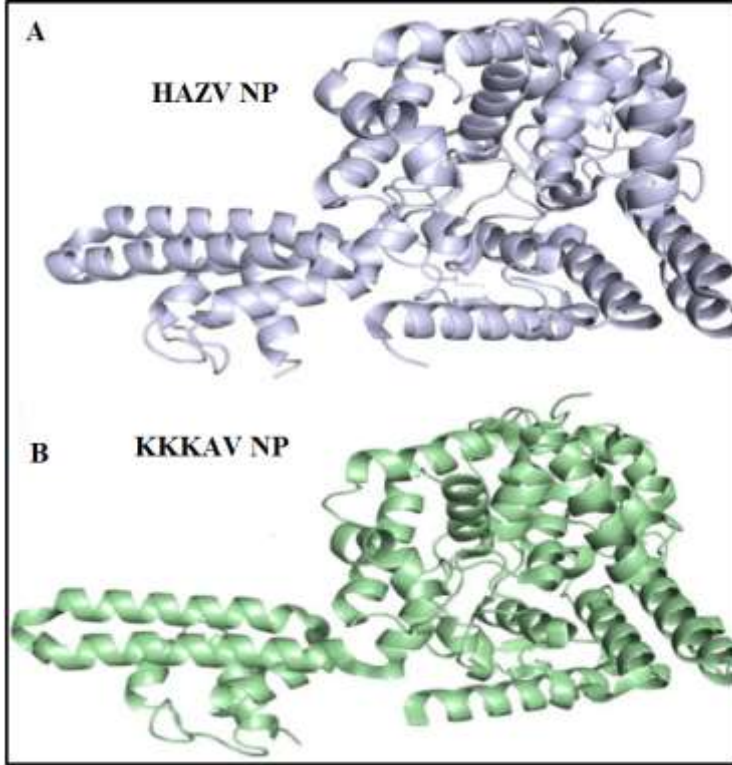
iki farklı domaine sahip olması nedeniyle büyük benzerlikler göstermektedir (Şekil 2.3-1).

Kol domaininin globüler domaine göre açısının, iki alan arasındaki esnek bir bağlayıcı bölge nedeniyle değişken olduğu düşünülmektedir. HAZV NP'de iki domain birbirine bir alfa sarmalı olan $\alpha 13$ ve 187 ila 196. rezidülerden oluşan halka ile bağlanmaktadır [68].

Kol domainin esnek doğası, belki de en açık şekilde KKKAV NP'nin kristal yapılarında gösterilmiştir; IbAr10200, Bağdat-12 ve YL04057 suşlarının kristal yapısı çözülmüş ve tümünün, kol domainin farklı bir yönelimde olduğu ortaya konulmuştur [65, 66, 69]. Bu değişken pozisyonların NP'nin RNA'ya bağlanma yeteneği gibi farklı fonksiyonel etkileri olabileceği bildirilmiştir.

RNP oluşumu sırasında, HAZV NP ve KKKAV NP monomerleri, oligomerleri oluşturmak üzere diğer monomerlerle etkileşime girmektedir. HAZV NP için, kol domaininde bu etkileşimde Leu279, Trp 263, Lys 275, Val271, Glu270 ve Phe216 olmak üzere 6 amino asidin ve global domain üzerinde ise Pro355 amino asidinin görev aldığı belirlenmiştir [68]. Global domaindeki prolin amino asidi, kol domainindeki 6 asidin oluşturduğu hidrofobik bir cep içinde bulunmaktadır. Kol ve küresel domainler arasındaki bu etkileşim tarzı, KKKAV NP oligomerlerinde de gözlenmektedir. Bu etkileşimin, NP'nin uzun sarmal zincirli oligomerlerinin oluşumundan sorumlu olabileceğini ve bunların RNP oluşumundaki rolleriyle işlevsel olarak ilgisi olabileceği düşünülmektedir [67]. NP'nin RNA'yı bağlayıp bağlamadığı veya RNP oluşumu sırasında ilk önce oligomerleri oluşturup oluşturmadığı bilinmemektedir. Hem HAZV NP hem de KKKAV NP'nin RNA bağlama potansiyeli ortaya konmuştur. HAZV NP'nin yüzey elektrostatik potansiyeli grafiğinin çizilmesiyle, herhangi bir RNA'nın bozulmasını engelleyen iki önemli alan ve birden fazla pozitif yük bölgesi tanımlanmıştır [68]. KKKAV ile yapılan karşılaştırmalar, platform ve cep bölgelerinin korunduğunu göstermektedir [65, 69]. Kolun esnek yapısı ve platformun kol alanına yakınlığı göz önüne alındığında, kolun esnekliğinin, RNA bağlanmasını ve RNP'lerin oluşumunu düzenleyen bir "geçit" mekanizması olarak hareket etmesi mümkündür. RNA'nın bağlanabileceği potansiyel bölgelerin tanımlanmıştır. Ancak, DNA/RNA:protein etkileşimlerini inceleyen bir elektroforetik mobilite deneyinde, KKKAV'nin 24 nükleotidlik bir ssRNA fragmentine bağlanmada zayıf afinite

gösterdiği belirlenmiştir [66]. Söz konusu çalışmada saflaştırılmış monomerik KKKAV NP kullanıldığı için KKKAV NP oligomerlerinin RNA'ya daha kolay bağlanması mümkündür. Ayrıca, 5' ve 3' uçlarındaki NTR'lerin birbirlerine komplementer olması vRNA'yı dairesel hale getiren bir dsRNA panhandle yapısının oluşumunu sağladığı da düşünülmektedir.



Şekil 2.4-1: HAZV NP ve KKKAV NP'nin kristal yapısının karşılaştırılması.

A) HAZV NP ve B) KKKAV NP 'nin kristal yapısı karşılaştırıldığında, hem kol hem de globüler domain yapısında iki molekül arasındaki yüksek oranda benzerlikler görülmektedir. Şekil Surtees ve ark., 2015'ten adapte edilmiştir.

KKKAV'nin bu dsRNA yapısına bağlanma yeteneğinin *in vitro* analizi, KKKAV NP'nin hem HAZV hem de KKKAV vRNA'ya bağlanabilmesi ancak *Hantavirus* cinsinden Andes virüs vRNA'sına bağlanamaması nedeniyle KKKAV NP'nin sap (stalk) domaini ile vRNA panhandle yapısı arasında yüksek bir etkileşimin olduğunu göstermiştir [70].

2.4.1.2. HAZV NP ve KKKAV NP'nin ek rolleri

RNP formasyonuna ek olarak, son yapılan çalışmalarda hem HAZV NP hem de CCHFV NP'nin iki sarmalı birbirine bağlayan kol domaininin ucunda yer alan sırasıyla

²⁶⁹DQVD²⁷² ve ²⁶⁶DEVD²⁶⁹ kaspaz-3 bölünme motifini eksprese eden bölgeler tanımlanmıştır. Bu motifin biyolojik rolü belirsiz olmasına rağmen, HAZV NP ya da KKKAV NP ile saflaştırılmış aktif kaspaz-3'ün *in vitro* analizi, NP'nin 20 ve 32 kDa ağırlığında iki ürüne ayrıldığını göstermektedir [65, 67, 68]. Bu nedenle NP'nin, çok sayıda kaspaz motifi ekspresyonu yoluyla kaspaz-3 bölünme seviyelerini azaltabilen ve böylece apoptozun ilerlemesini geciktirebilen Junin nükleoproteinine benzer bir şekilde bir substrat tuzağı olarak davranması beklenmektedir [71]. Pro-apoptotik tümör baskılayıcı p53'ün DNA virüsü SV40 tarafından inhibisyonu ve efektör kaspazların bakulovirüs p35 proteini tarafından doğrudan inhibisyonu apoptozu geciktiren virüslerin mekanizmalarına örnek olarak verilebilir [72, 73].

Konak hücre proteinleri ile etkileşime ek olarak, HAZV NP ve KKKAV NP'nin diğer *Bunyavirales* üyeleriyle birlikte hücresel nükleik asitlerle etkileşime girdiği gösterilmiştir. KKKAV NP'nin, hem tek hem de çift sarmallı DNA'da Mn^{2+} , Co^{2+} veya Mg^{2+} katyonlarının mevcudiyetinde spesifik olmayan bir dizide intrinsik nükleaz aktivite gösterdiği daha önceki çalışmalarda ortaya konmuştur. Bu nükleaz aktivitesi, tek veya çift sarmallı RNA'yı parçalayamaması sebebiyle DNA'ya özgüdür. Bu aktiviteden sorumlu amino asitler, bölgeye yönelik mutajenez yoluyla Y374, R384, E387, K411, H453 ve Q457 olarak tanımlanmış ve her birinin endonükleaz aktivitesi üzerinde değişken etkiye sahip olduğu gösterilmiştir [66]. Bu aminoasitler, KKKAV'nin küresel domainindeki pozitif yüklü bir cep içinde bulunmaktadır. HAZV, Kupe virüsü (KUPV) ve Erve virüsü (ERVEV) üzerindeki diğer yapısal analizlerin tümünde benzer pozitif yüklü cepler tanımlanmış; ancak ERVEV'de bir döngü bölgesinin cebe giriş üzerinde katlanmasıyla solvent erişimini engellediği görülmüştür. Bu yapısal blokaj, endonükleaz aktivitesi ile ilişkilidir. Çünkü hem KUPV hem de HAZV, KKKAV'ye benzer seviyelerde endonükleaz aktivitesi sergilerken, ERVEV önemli ölçüde daha düşük enzimatik aktivite göstermiştir [67].

Yapısal bir protein olan NP'ye ek olarak, KKKAV S segmentinin de yakın zamanda ikinci bir yapısal olmayan NS proteinini eksprese ettiği bildirilmiştir [59]. KKKAV NSs'lerin ORF'si, KKKAV NP'nin ORF'si ile örtüşen ve pozitif yönde kodlanmış 150 amino asitlik bir ürünü ifade etmektedir. KKKAV NSs'lerin ektopik ekspresyonu, aktif kaspaz 3/7 ve bölünmüş poli(ADP-riboz) (PARP) tespiti ile apoptotik yolların aktivasyonuna yol açmaktadır. NS'lerin Leu127 ve Leu13 amino

asitlerinin mutajenezi sonucu, membran potansiyelinin bozulması yoluyla apoptozun tetiklendiği, sitokrom c'nin sitoplazmaya salındığı görülmüştür. HAZV'de NSs ekspresyonu için böyle bir kanıt yoktur. Ancak benzer bir pozisyonda bir ORF mevcuttur. HAZV'de NSs ekspresyonuna yönelik bir çalışma, NSs'in bu virüsler arasında paylaşılan bir özellik olup olmadığını belirlemek açısından ilginç olabilir.

NSs'lerin ifadesi, *Bunyavirales*'lerde sadece KKKAV'ye özgü değildir. Ailenin türü olan *Bunyamvera* virüsünde (BUNV) NSs ekspresyonu, sivrisinek hücrelerinde BUNV replikasyonu için elzemdir [74]. BUNV NSs, ayrıca interferon düzenleyici faktör 3 aracılığıyla apoptozu geciktirmekte ve BUNV enfeksiyonunun erken evrelerinde hücre ölümünü önleyerek bağışıklık sistemini inhibe etmektedir [75]. Rift Vadisi Ateşi Virüsü (RVFV) NSs'i de aynı şekilde, transkripsiyon faktörü IIIH ile etkileşim yoluyla konakçı hücre transkripsiyonunu inhibe etmektedir [76]. İnsanları infekte etmeyen *Tospoviridae* ailesi üyeleri de NSs eksprese etmektedir. Bunyavirales ailesi içindeki Tospovirüslerden Tomato spotted wilt virus (TSWV), ambisense kodlama stratejisi kullanarak NSs kodlamakta ve NSs hem konukçı bitki hücrelerinde hem de böcek vektöründe bir virülans faktörü olarak tanımlanmaktadır [77, 78].

2.4.1.3. Antijenik benzerlik açısından HAZV NP ve KKKAV NP

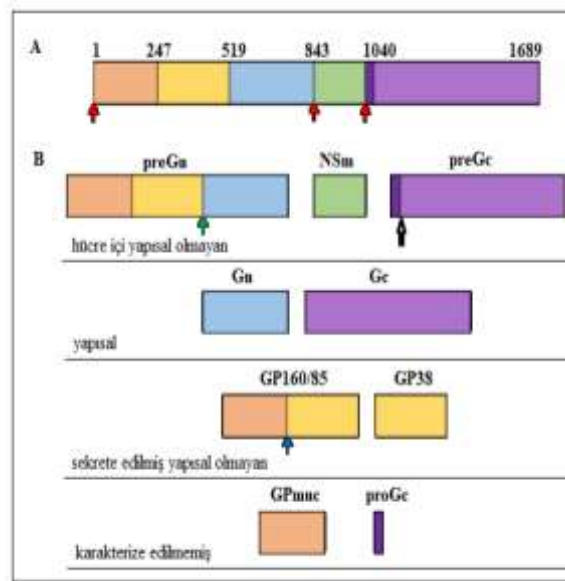
HAZV ve KKKAV dâhil olmak üzere birkaç *Nairovirus* arasındaki antijenik benzerlikler kırk yıl önce ele alınmış; fakat bu bilgiler daha sonraları doğrulayıcı çalışmalarla desteklenmemiştir. Casal ve arkadaşlarının 1980 yılında yaptığı bir çalışmada nairovirüslerin yapısal özellikleri incelenmiştir. Bu çalışmada, nötralizasyon ve hemagglütinasyon inhibisyonu yoluyla KKKAV ve HAZV arasındaki çapraz tepkimenin varlığı ifade edilmiştir [79]. 1980'de Foulke ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada, HAZV'nin KKKAV için çapraz koruma sağladığı ifade edilmiş, ancak bu bilgi de yayınlanmamış bir gözlem olarak kalmıştır [80]. Bu raporlardan on yıl sonra, iki virüsün nükleoproteinlerini (NP) kodlayan DNA sekansı arasındaki benzerlik ve zayıf bir antijenik çapraz reaksiyon varlığı, Marriot ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada gösterilmiştir [81]. Yakın tarihli bir çalışmada, KKKAV ve HAZV'nin bağışıklığı zayıflamış farelerde benzer patoloji gösterdiği ve her iki virüsün de embriyolu tavuk yumurtalarını ölümcül etkilediği ortaya konmuştur [82]. Bildirilen çalışmalar oldukça sınırlıdır ve HAZV ve KKKAV'nin bireysel protein seviyelerinde antijenik benzerlikler paylaştığını ve ayrıca HAZV'nin

KKKAV için kapsamlı bir model olarak hizmet edebileceğini kesin olarak belgelemek için yeterli değildir.

Söz konusu çalışmalardan hareketle bu tezimizde iki virüsün NP'leri arasındaki çapraz tepkimenin varlığı ve humoral immün yanıtındaki benzerlik adreslenmiş ve sonuçlarımız yayınlanmıştır [83]. Çalışmamızda, HAZV NP ve KKKAV NP *E. coli*'de üretilmiş ve KKKAV geçiren hasta serumlarının birincil antikor olarak kullanıldığı enzim aracılı immün assay (EIA) yönteminde yakalayıcı antijen olarak kullanılmıştır. Test sonucuna göre, yakalayıcı antijen olarak HAZV NP'nin kullanıldığı EIA'nın duyarlılığı %80 iken, KKKAV NP'nin kullanıldığı EIA'nın duyarlılığı %90 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, iki virüsün NP'leri arasında güçlü bir çapraz tepkimenin varlığını güncel yöntemlerle kanıtlamakta ve BSL-2 koşullarında çalışılabilen HAZV'nin KKKAV için kıymetli bir model olabileceği tezini güçlendirmektedir. İki virüsün NP'leri arasındaki çapraz tepkimenin varlığı son yapılan çalışmamızla ortaya konmasına rağmen, glikoproteinleri arasındaki antijenik benzerlik sorusu hâlen cevaplanmayı beklemektedir.

2.5. M segment

M segmenti, KKKAV özelinde Gn ve Gc yapısal glikoproteinleri ve GP160, GP85, GP38, NSm, GPmuc ve proGc olmak üzere yapısal olmayan glikoproteinleri karmaşık bir post-translasyonel modifikasyonlar yoluyla, 1689 amino asitli bir poliprotein olarak M segmentinden kodlamaktadır (Şekil 2.4-1) [84, 85].



Şekil 2.5-1 KKKAV glikoprotein prekürsörünün hücresel proteazlar tarafından işlenmesi.

A) KKKAV M segmenti, tüm yapısal ve yapısal olmayan glikoproteinlerin türetildiği 1689 amino asitlik bir poliprotein olarak ifade edilmektedir. GPP'nin birincil bölünmesi, iCLIP'ler ve sinyal peptidazlar (kırmızı oklar) aracılığıyla gerçekleşmektedir. **B)** Birincil bölünme ile, yapısal olmayan hücre içi preGn, NSm ve preGc proteinleri ortaya çıkmaktadır. SKI-1/S1P (yeşil ok), SKI-1/S1P benzeri (siyah ok) ve furin (mavi ok) ile bölünme, yapısal Gc ve Gn proteinlerini, yapısal olmayan sekrete proteinler GP160/85 ve GP38'i ve karakterize edilmemiş Gpmuc ve proGc proteinleri ortaya çıkarmaktadır. Şekil Bergeron ve ark., 2008'den adapte edilmiştir.

HAZV M segmentinin kodladığı yapısal glikoproteinlerin moleküler ağırlıkları 84, 45 ve 30 kDa olarak bildirilmiş, ancak bu veri doğrulanmamıştır [80].

2.5.1.1. GPP'nin işlenmesi

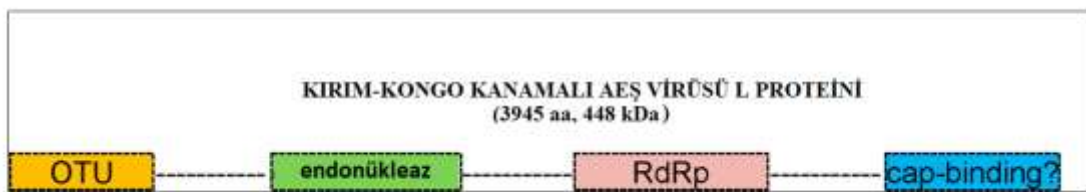
GPP, yapısal ve yapısal olmayan ürünleri oluşturmak üzere konakçı hücre proteazları tarafından bölünmeyi kolaylaştırmak için yoğun şekilde glikosile edilmektedir. Bu, serin proteazların proprotein dönüştürücü ailesi üyelerinin GPP'yi işlemesini sağlamaktadır [86]. GPP'nin N-terminal bölgesi, sentezi sekresyon yoluna yönlendiren bir sinyal peptidi içermektedir. Bu sinyal peptidinin tam sekansları suşa özgüdür ve sinyal aracılığıyla bölünmenin suşa bağlı olarak 21-27. amino asitler arasında meydana geldiği tahmin edilmektedir [84]. Sinyal peptidi, oldukça değişken bir müsin benzeri domain (MLD) içinde yer almaktadır. KKKAV'nin Matin suşu MLD'si, 1-248 amino asitleri tarafından kodlanmaktadır. Bu alanın (243-248) beş C-terminal amino asidi, %14.3 ila %37.2 arasındaki nükleotid değişkenliğinden kaynaklanan %23.8 ila %56.4 arasındaki aminoasit farklılığı ile M ORF'nin geri kalanına göre oldukça değişkenlik göstermektedir [84, 87]. Sinyal peptidinin 1 ila 24'üncü aminoasitler arasında olduğu ve sekresyon yolağında çıkarıldığı tahmin edilmektedir. KKKAV GPP'sinin tam işlenme süreci çoklu hücresel proteazlar ve kapsamlı co- ve post-translasyonel modifikasyonlar gerektirmektedir. GPP'nin diğer dizi analizleri, 5 adet transmembran domaini ve 3'ü Gc'de, 1'i Gn'de, 2'si GP38'de ve 4'ü de yukarıda anılan MLD'de de olmak üzere 10 adet N-bağlı glikozilasyon bölgesi ortaya çıkarmıştır [84].

GPP'ye yönelik bir dizi birincil kesim olayı, preGn, NSm ve preGc'yi oluşturmaktadır. Bu kesimlerin, 2. ve 4. transmembran domainine yakın bir yerde meydana geldiği ve intramembran kesim proteazlarının (iCLIP'ler) etkisine bağlı olduğu bildirilmektedir (Şekil 1-6, A) [84, 88]. preGn, NSm ve preGc'den oluşan bu ürünler, preGn'nin MLD'sinin O-glikozile olduğu Golgiye gitmekte ve ardından ya ER'de ya da cis-Golgi'ye giden yolda GP160/85 ve Gn'i de ortaya çıkaran belirli bir RRL

motifinden subtilisin kexin izozim 1/site-1 proteaz (SKI-1/S1P) tarafından erken sekresyon yolağında bölünmektedir (Şekil 1-6, B) [89]. PreGc'den olgun Gc'nin üretilmesiyle sonuçlanan bölünme olayından sorumlu proteaz bilinmemektedir. Ancak Guanarito arenavirüsünün SKI-1/S1P tarafından sorumlu bölünme bölgesi olan RKPL motifinin varlığı, KKKAV preGc'si üzerinde benzer bir proteazın etkili olabileceğini düşündürmektedir [90]. GP160/85, daha sonra GP38 ve MLD arasında bulunan bir RSKR motifinde furin tarafından *trans*-Golgi ağında işlenmektedir (Şekil 2.4-1) [84, 91]. Bunun yanı sıra, KKKAV'ye model olarak kullanılan HAZV'nin kodladığı glikoproteinler Foulke ve arkadaşları tarafından yapılan tek bir çalışmayla aydınlatılmaya çalışılmış ve bu konuda söz konusu verileri doğrulayan bağımsız çalışmalar gözlenmemiştir. İki virüsün M segmentinden kodlanan proteinlere karşı oluşan antikor yanıtı benzerliğinin var olup olmamasının ortaya çıkarılması, HAZV'nin KKKAV için model olma potansiyelini de ortaya koyacak bir diğer çalışma olacaktır.

2.6. L segment

HAZV ve KKKAV'nin L segmentlerinin her ikisi de yaklaşık 12 kb uzunluğundadır ve 11835 nükleotit ORF, 76 nükleotit 3' NTR ve 253 nükleotit 5' NTR içermektedir [92]. İki virüsün de ORF'si, yaklaşık 448 kDa'lık bir poliproteini kodlamakta, bu da onu diğer bunyavirüs L proteinlerinden önemli ölçüde daha büyük kılmaktadır (Şekil 2.5-1) [93]. L segmentin kodladığı RdRp'nin N terminal bölgesi, de-ubikitinasyon (DUB) ve immün kaçınmada ek rollere sahip, fonksiyonel bir yumurtalık tümörü (OTU) benzeri proteaz domainini kodlamaktadır [94]. Bu OTU domaininin bir minigenom sisteminde RNA replikasyonu için zorunlu olmadığı, ancak infeksiyöz virüsün eldesi açısından gerekli olduğu gösterilmiştir [95, 96]. Bu domainin daha sonra, RdRp'nin interferon uyarıcı gen (ISG) 15 ve ubiquitin (Ub)'ye bağlanarak bir IFN antagonisti olarak hareket ettiği ve hücresel bağışıklık yanıtını baskıladığı gösterilmiştir [97].



Şekil 2.6-1: L-proteinlerindeki fonksiyonel alanlar

Kırım-Kongo Kanamalı Ateş Virüsünün L-proteini (3945 aa, 448 kDa), N-terminalde bir OTU alanı içermektedir. KKKAV L proteini için yapısal bilgiler sınırlıdır ve noktalı kutular ve çizgilerle belirtilmiştir. İşlevsel alanların boyutları ölçekte gösterilmemiştir. Görsel Götte, M. 2020'den adapte edilmiştir.

Güncel bir çalışmada KKKAV'nin tam uzunluktaki L proteini böcek hücrelerinde, OTU domaini ise bakteride eksprese edilmiştir. Yapılan çalışmada, kromatografik yöntemlerle saflaştırılan tam uzunluktaki L proteinin ve OTU domainin, Lys48- ve Lys63-bağlı poli-ubikutin zincirlerini parçaladığı gösterilmiştir. Ayrıca, ubikuitin analogu CC.4, KKKAV ile ilişkili tam uzunluktaki L proteininin DUB aktivitesini benzer ölçüde inhibe etmektedir. DUB aktivitesinin inhibisyonu, RNA sentezinin uzamasını etkilememekte, RNA sentezinin inhibisyonu ise DUB aktivitesini etkilememektedir. Her iki bölge de birbirinden işlevsel olarak bağımsız görünmektedir [98].

Tam uzunluktaki Orthonairovirus L protein yapısı henüz x-ışını kristalografisi ile başarılı bir şekilde çözülmemiştir. Fakat bunyavirüslerden LACV'nin polimerazı, 5' ve 3' NTR'lerle kompleks halinde elektron mikroskop ve x-ışını kristalografisi ile çözülmüştür [64]. İlginç bir şekilde, 5' ve 3' NTR'lerin son 9 bazının komplementer doğasına rağmen bir kök halka yapısı oluşturduğunu ve daha önce influenza virüsü için tanımlanan şekilde 3' NTR'nin RdRp'ye bağlandığını göstermiştir [99]. 5' ve 3' NTR'ler arasında bir "pan-handle" yapısı oluşturmak için komplementer Watson-Crick baz eşleşmesini kullanmak yerine NTR'lerin polimeraza bu şekilde bağlanması, Bunyavirales özelinde RNP'lerin daireselleştirilmesi için alternatif bir mekanizma önermektedir. Bu çalışmalara ek olarak, Lassa ve Machupo arenavirüs polimerazlarının yapıları çözülmüş ve LACV ve influenza virüsü polimerazlarına benzer mimari sergilediği gösterilmiştir [100].

2020 yılında yayımlanan bir çalışmada, HAZV OTU'nun kristal yapısı çözülmüş ve diğer nairoviral OTU-substrat kompleksleri ile karşılaştırıldığında HAZV OTU'nun ubikitine bağlanmasında bazı sürpriz farklılıklarla karşılaşılmıştır. KKKAV, DUGV, ERVEV ve KUPEV'in de dahil olduğu birçok nairovirüs OTU'su ubikitine (Ub) ya da ISG15'e bağlanmada genel olarak yüksek benzerlik gösterirken; HAZV OTU, Ub'ye farklı bir oryantasyonda bağlanmaktadır [101]. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar enfeksiyon boyunca OTU'nun rolünü daha iyi anlamak için HAZV'yi bir model sistem olarak kullanılabileceğini göstermektedir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çözeltiler ve Tamponlar

3.1.1. 0,1 M Sodyum Klorid

5,844 g sodyum klorid (NaCl 58,44 g/mol) tartılarak 100 ml deiyonize suda çözdürülerek hazırlanmıştır.

3.1.2. 2 M Potasyum Klorid

149,1 g potasyum klorid (KCl 74,55 g/mol) tartılarak 200 ml deiyonize suda çözdürülerek hazırlanmıştır.

3.1.3. 1 M Magnezyum Sülfat

120,366 g magnezyum sülfat ($MgSO_4$ 120,366 g/mol) tartılarak 1 litre deiyonize suda çözdürülerek hazırlanmıştır.

3.1.4. 1 M pH:8 Tris-HCl Çözeltisi

121,14 g Tris-HCl (121,14 g/mol) tartılarak 900 ml deiyonize su eklenerek manyetik balık yardımıyla çözdürülmüştür. Ardından HCl ile pH 8'e ayarlanmış ve hacim 1 litreye çıkarılmıştır.

3.1.5. 1 M Etilendiamintetraasetik asit Çözeltisi

29,2g Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) (292,24 g/mol) tartılarak 90 ml deiyonize su ile çözülmüştür. Ardından HCl ile pH 8'e ayarlanmış ve hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

3.1.6. %50 Glukoz Çözeltisi

25 g glukoz tartılarak 50 ml deiyonize su ile çözdürülmüştür. Ardından 0,45 µm'lik filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir.

3.1.7. Kanamisin Stok Çözeltisi

0,5 g kanamisin tartılarak 10 ml deiyonize suda çözdürülmüştür. 0,22 µm'lik filtreden geçirilen 50 mg/ml kanamisinporsiyonlar hâlinde -20 C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.8. Luria-Bertani (LB) Sıvı Besiyeri

Trypton

10 g/L

Maya ekstraktı	5 g/L
NaCl	10 g/L

Besiyerinden 0,5 litre hazırlamak üzere 12,5 g tartılmış ve 500 ml deiyonize suda çözdürülmüştür. Elde edilen besiyeri 121°C’de otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Soğuyan besiyeri +4 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.1.9. Kanamisin İçeren LB Sıvı Besiyeri

Hazırlanmış LB sıvı besiyerinin 50 ml’sine 50 µl 50 mg/ml kanamisin çözeltisinden eklenmiş ve kullanılabileceği kadar +4°C’de muhafaza edilmiştir.

3.1.10. %30 Gliserollü Luria-Bertani Sıvı Besiyeri

3.1.8’de açıklandığı üzere hazırlanan LB sıvı besiyerinin 10 ml’sine 3 ml gliserol eklenerek hazırlanmış ve +4°C’de muhafaza edilmiştir.

3.1.11. LB Broth Agar

Trypton	10 g/L
Maya ekstraktı	5 g/L
NaCl	10 g/L

Yukarıdaki kimyasalları karışım olarak içeren LB Broth’tan 12,5 g ve son konsantrasyonu %1,5 olacak şekilde 7,5 g bakteriyel agardan tartılarak karışım 500 ml deiyonize suda çözdürülmüştür. Elde edilen karışım 121°C’de otoklavlanmış ve donma sıcaklığına düşmeden petri kaplarına dağıtılmıştır. Katılaştıran LB agar katı besiyeri 37°C’de bir gün bekletilmiş ve kontaminasyon kontrolü yapılmıştır. Kontrolde geçen besiyerleri +4°C’de muhafaza edilmiştir.

3.1.12. Kanamisin İçeren LB Broth Agar

3.1.8’de tarif edildiği gibi hazırlanan besiyeri antibiyotik eklenebilecek kadar soğuduğunda ml’de 50 µg olacak şekilde kanamisin çözeltisinden eklenmiş ve petri kaplarına dağıtılmıştır. Agar katılaştıktan sonra besiyeri içeren petri kutuları 37°C’lik inkübatörde bir gece bekletilerek sterilit kontrolü yapılmış ve daha sonra +4°C’de saklanmıştır.

3.1.13. SOC Sıvı Besiyeri

Maya ekstraktı	5 g/L
----------------	-------

Trypton	20 g/L
1 M NaCl	10 ml/L
2,5 M KCl	1 ml/L
2 M MgSO ₄	20 ml/L

Yukarıdaki kimyasallar birleştirildikten sonra hacim 490 ml'ye deiyonize su ile tamamlanmış ve pH:7,5'e ayarlanmıştır. 121°C'de otoklavlanan besiyerine %20'lik steril glukoz çözeltisinden 10 ml eklenmiştir. 37°C'de bir gece bekletilen besiyerine sterilite kontrolü yapılmış ve ertesi gün porsiyonlanarak kullanılana kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.14. Tris-EDTA Çözeltisi

0,5 M Tris pH 8	10 ml/500 ml
1 M EDTA pH 8	2 ml/500 ml

250 ml Tris-EDTA çözeltisi hazırlamak için 5ml Tris ve 1 ml EDTA karıştırılarak deiyonize su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır. 121°C'de otoklavlanan çözelti oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

3.1.15. TNE çözeltisi

1 M Tris-HCl pH 7	10 ml/500 ml
1 M NaCl	50 ml
0,5 M EDTA pH 7	2 ml/500 ml

Tris-HCl, NaCl ve EDTA eklendikten sonra hacim 500 ml'ye tamamlanmış ve 0,45 µm'lik filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir.

3.1.16. %20 Sükroz Çözeltili TNE

20 g sükroz TNE çözeltisi ile 100 ml'ye tamamlanmış, çözdürülmüş ve 0,45 µm'lik filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir.

3.1.17. Karboksimetilselüloz çözeltisi (CMC)

%1,6 CMC çözeltisi hazırlamak amacıyla 1,6 g CMC bir beherde tartılıp otoklavlanmıştır. Aynı bir beherde 100 ml deiyonize su tartılmış ve otoklavlanmıştır. Su çeker ocak altında CMC'ye eklenmiş ve gece boyunca karıştırılmıştır.

3.1.18. 0.5 M Kalsiyum Klorid Çözeltisi

55,49 g kalsiyum klorid (CaCl_2 110,98 g/mol) tartılmış ve 500 ml deiyonize suda çözündürülmüştür. 121°C 'de otoklavlanan çözelti $+4^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.

3.1.19. %15 Gliserol İçeren 0.1 M Kalsiyum Klorid Çözeltisi

1,1 g CaCl_2 (110,98 g/mol) tartılmış ve 85 ml deiyonize suda çözündürülmüştür. 15 ml gliserol ile 100 ml'ye tamamlanan çözelti 121°C 'de steril edildikten sonra $+4^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.

3.1.20. 5x TBE Çözeltisi

Tris	54 g/L
Borik asit	27.5 g/L
0.5 M pH 8 EDTA	20 ml/L

Tüm bileşenler karıştırıldıktan sonra karışım 900 ml deiyonize suda çözündürülmüş ve ardından 1 litreye tamamlanmıştır.

3.1.21. PBS Çözeltisi

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Sodyum Fosfat Dibazik (Na_2HPO_4)	1,44 g
Potasyum Fosfat Monobazik (KH_2PO_4)	0,24 g

Tüm bileşenler 900 ml deiyonize suda çözündürüldükten sonra HCl ile pH 7,4'e ayarlanmıştır. Hacmi deiyonize su ile 1 litreye tamamlanan karışım 121°C 'de otoklavlandıktan sonra oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

3.1.22. 1 M IPTG Çözeltisi

1,19 g İzopropil -D-1- Tiyogalaktopiranozid (IPTG) (238,30 g/mol) tartılmış ve 50 ml deiyonize suda çözdürüldükten sonra kullanılmak üzere porsiyonlanarak -20°C’de muhafaza edilmiştir.

3.1.23. 0,5 M Tris pH 6,8

Tris	6 g/100 ml
------	------------

Tris 60 ml distile suda çözdürüldükten sonra hidroklorik asit ile pH:6,8 olacak şekilde ayarlanmış, ardından hacim 100 ml’ye tamamlanıp +4°C’de saklanmıştır.

3.1.24. Akrlamid/BİS

Akrilamid	43,8g/150 ml
N’-N’-bis-metilen-akrimalid	1,2 g/100 ml

Yukarıdaki kimyasallar belirtilen miktarlarda karıştırıldıktan sonra hacim 150 ml’ye tamamlanmış ve elde edilen çözelti +4°C’de muhafaza edilmiştir.

3.1.25. %20 SDS Çözeltisi

200 g sodyum dodesil sülfat (SDS) 800 ml deiyonize suda çözdürülmüş ve hacim 1 L’ye tamamlandıktan sonra oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

3.1.26. 1,5 M Tris-HCl pH 8,8

Tris-HCl	121,14 g
----------	----------

24,2 g Tris-HCl 250 ml deiyonize su ile çözdürülmüş ve ardından HCl ile pH:8,8’e ayarlanmıştır. Hacim deiyonize su ile 300 ml’ye tamamlanmış ve çözelti +4°C’de muhafaza edilmiştir.

3.1.27. %1 Bromofenol Mavisi

100 mg bromofenol mavisi tartılmış ve 10 ml deiyonize su ile çözülmüştür. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

3.1.28. SDS Yükleme Tamponu

1 M Tris pH 6,8	0,625 ml
Gliserol	2,5 ml
%5 SDS	4 ml

%1 Bromofenol Mavisi	0,4 ml
----------------------	--------

Tüm bileşenler 2,475 ml distile suda çözdürülmüş ve sonrasında oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Örnek hazırlama sırasında hazırlanan tampondan 475 µl 50 µl β-merkaptöetanol ile birleştirilmiş ve örnek ile 1:1 oranında karıştırılarak hazırlanmıştır.

3.1.29. 10x SDS Yürütme Tamponu

Tris	15.15 g
Glisin	72 g
SDS	5 g

Tüm bileşenler çözdürüldükten sonra karışımın hacmi deiyonize su ile 0,5 litreye tamamlanmıştır ve tampon çökelti olmaması için oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

3.1.30. %10 APS

50 mg amonyum persülfat (APS) 0,5 ml distile su ile çözdürülmüş ve hazırlanan karışım maksimum bir ay süre ile +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.31. Coomasie Boyama Tamponu

Metanol	20 ml/50 ml
Asetik asit	5ml/50 ml
Coomasie Mavisi R250	0,05 ml/50 ml

Tüm kimyasallar birleştirildikten sonra hacim deiyonize su ile 50ml'ye tamamlanmış ve +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.32. Coomasie Uzaklaştırma Tamponu

Metanol	80 ml/200 ml
Asetik asit	20 ml/200 ml

Tüm kimyasallar birleştirildikten sonra hacim deiyonize su ile 200 ml'ye tamamlanmış ve hazırlanan tampon ve +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.33. Denatüre Parçalama Çözeltisi

Sodyum fosfat monobazik (NaH ₂ PO ₄)	6 g/500 ml
---	------------

0,5 M pH 8 Tris	10 ml/500 ml
1 M NaCl	150 ml
Üre	240,24/500 ml
Tween 20	5 ml/500

Tüm kimyasallar birleştirildikten sonra çözelti 250 ml deiyonize suda çözündürülmüş ve pH 8,5'a ayarlanmıştır. Hacim distile su ile 500 ml'ye tamamlanmış ve 0,45 µm'lik filtreden geçirildikten sonra kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.1.34. Denatüre Yıkama Çözeltisi

NaH ₂ PO ₄	6 g/500 ml
0,5 M pH 8 Tris	10 ml/500 ml
1 M NaCl	150 ml
Üre	240,24/500 ml
Tween 20	5 ml/500 ml
İmidazol	0,68 g/500 ml

Tüm kimyasallar birleştirilir ve 250 ml distile su ile çözündürülür. pH 8,5'a ayarlanır ve hacim 500 ml'ye tamamlanır. Çözelti 0,45 µm'lik filtreden geçirilerek sterilize edilir ve oda sıcaklığında muhafaza edilir.

3.1.35. Denatüre Elüsyon Çözeltisi

İmidazol	8,51 g/500 ml
----------	---------------

3.1.34'de belirtilen İmidazol hariç tüm bileşenler 250 ml deiyonize suda çözündürülür. Yukarıda belirtilen miktarda imidazol eklendikten sonra pH 8,5'a ayarlanır ve hacim 500 ml'ye tamamlanır. Tampon 0,45 µm'lik filtreden geçirilir ve kullanıma hazır hâle gelir. Çözelti oda sıcaklığında muhafaza edilir.

3.1.36. Western Blot Transfer Çözeltisi

Tris	1,515 g/500 ml
Glisin	7,2 g/500 ml
Metanol	100 ml/500 ml

Tüm kimyasallar birleştirilmiş ve hacim deiyonize su ile 500 ml'ye tamamlanmıştır. Çözelti +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.37. Western Blot Yıkama Çözeltisi (TBST)

0,5 M Tris pH 7,4	40 ml/500 ml
NaCl	4,5 g/500 ml
Tween 20	1 ml/500 ml

Tüm kimyasallar birleştirilmiş ve hacim deiyonize su ile 500 ml'ye tamamlanmıştır. Tampon kullanılmak üzere +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.38. Western Blot Antikor Hazırlama Tamponu

3.1.37'de hazırlanan TBST çözeltisine son konsantrasyonu %5 olacak şekilde süt tozu eklenir ve her kullanımda taze hazırlanır.

3.1.39. EİA için Karbonat Tamponu

Sodyum Karbonat (Na_2CO_3)	0,795 g
Sodyum Bikarbonat (NaHCO_3)	1,465 g

Sodyum bikarbonat ve karbonat yukarıda belirtilen miktarlarda birleştirilmiş ve 400 ml deiyonize suda çözdürülmüştür. pH 9.6'ya ayarlandıktan sonra hacim 500 ml'ye tamamlanmış ve +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.40. EİA Yıkama Çözeltisi (PBST)

3.1.21'te tarif edildiği gibi hazırlanan PBS tamponuna litrede 500 µl olacak şekilde Tween 20 eklenir ve +4°C'de muhafaza edilir.

3.1.41. EİA Antikor Hazırlama Tamponu

3.1.41'de tarif edildiği gibi hazırlanmış PBST tamponuna son konsantrasyonu %5 olacak şekilde süt tozu eklenmiş ve iyice karıştırıldıktan hemen sonra kullanılmıştır. Her kullanım için taze hazırlanmıştır.

3.2. Kullanılan Biyolojik Materyaller

3.2.1. Vektörler

Hazara NP JC280 suşu nükleoproteinini kodlayan açık okuma çerçevesi pET-30b(+) [Addgene, Cambridge, MA, USA] vektörüne klonlanmıştır.

3.2.2. Bakteri suşları

Plazmid DNA yapıları, kompetan *Escherichia coli* (*E. coli*) hücreleri aracılığıyla çoğaltılmıştır. Kullanılan suşlar, pET-30b(+) HAZV NP içeren çalışma için *One Shot™ TOP10* (Invitrogen) veya BL21(DE3) suşlarıdır.

3.2.3. Memeli hücre hatları

İnsan adrenal korteks karsinoma hattından türetilen SW13 hücreleri ve bebek hamster böbrek hattından türetilen BHK-21 hücreleri deneysel prosedürlerde ve viral stokların hazırlanması için kullanılmıştır.

3.2.4. Hazara virüs suşu

Hazara virüs JC 280 suşu İngiltere Halk Sağlığı kurumundan temin edilmiştir.

3.3. Cihaz ve Sarf Malzeme Listesi

Tablo 1: Tez çalışmasında kullanılan cihaz, ekipman ve sarf malzeme

Kuruluştaki Bulunan Altyapı/Ekipman Türü, Modeli (Laboratuvar, Araç, Makine-Teçhizat, vb.)	Tezde Kullanım Amacı
Class II Biyolojik Güvenlik kabinleri	Hücre kültürü
Normal (Heratherm™ Compact Microbiological Incubators) ve CO2 Etüvler (Thermo Scientific™ Forma™ Series 3)	Bakteri ve hücre kültürü
AKTA™ pure Kromatografi sistemi	Rekombinant protein eldesi
Ultrafiltrasyon, diafiltrasyon sistemi	Rekombinant protein eldesi
Masaüstü, soğutmalı ve süper santrifüjler (Beckman, Avanti)	Rekombinant protein eldesi
Ultrasantrifüj (Beckman The Optima™ XPN)	Virüs saflaştırılması
Buzdolapları ve derin Dondurucular -20 , -80, -150 (Thermo Scientific™ Forma™ High-Performance Auto Defrost Lab Freezers, Thermo Scientific TSX Series Ultra-Low Freezers, Thermo Scientific™ ULT10140-9-D Cryogenic Chest Freezer)	DNA, RNA, suş ve ayaçların saklanması

Spektrofotometre	Optik dansite ölçümü
Nanodrop Spektrofotometresi (Thermo Scientific™ NanoDrop™ 8000)	DNA, RNA, protein miktar tayini
pH Metre	Çözelti hazırlama
Distile su cihazı	Mono ve bidistile su eldesi
PCR ve RT-PCR Cihazı	PCR çalışmaları
Yatay elektroforez sistemi	PCR sonucu görüntüleme
Dikey elektroforez sistemi	Protein ekspresyon analizi
Kemilüminesans görüntüleme sistemi (Fusion FX Solo S)	Western blot analizi
Jel görüntüleme sistemi (Biorad GelDoc XR+)	PCR sonucu görüntüleme
Pipet seti (20, 200, 1000 ul)	Genel
Vortex	Genel
Sonikatör	Rekombinant protein eldesi
Normal ve soğutmalı santrifüj	Genel
Hassas Terazı	Genel
Buz makinası	Klonlama
ELİSA Yıkayıcısı	Enzim İmmunoassay
ELİSA Okuyucusu	Enzim İmmunoassay
Normal ve İnverted Mikroskoplar	Hücre Kültürü

3.4. Yöntemler

3.4.1. Hazara JC280 Nükleoprotein Sekansının Belirlenmesi

Hazara virüs JC280 suşu S segmentini kodlayan gen sekansı yapılan çalışmalarda ortaya çıkarılmış ve NCBI Gen bankasına bildirilmiştir (Erişim Numarası: NC_038711). S segmentin kodladığı nükleoprotein ORF'si NCBI ORFFINDER web sayfası kullanılarak elde edilmiştir (Tablo 2 ve Tablo 3).

3.4.2. Hedef Genin Eldesi ve Klonlanması

Hazara JC280 Nükleoproteinini kodlayan gen sekansı direkt Hazara virüsten elde edilmiştir. Bu amaçla öncelikle Hazara virüs BHK-21 hücrelerinde üretilmiş, ardından infekte hücre lizatından RNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen RNA'lar

Revers Transkriptaz enzimi aracılığıyla cDNA'ya çevrilmiş ve ardından cDNA, klonlanacak hedef gene özgü primerlerle PZR yardımıyla çoğaltılmıştır.

Tablo 2: Hazara JC280 Nükleoproteini Kodlayan Aminoasit Sekansı

Hazara JC280 NP

MENKIVASTKEEFNTWYKQFAEKHKLNNKYTESASFCAEIPQLDTYKY
KMELASTDNERDAIYSSALIEATRFCAPIMECAWASCTGTVKRGLEWF
DKNKDSDTVKVWDANYQKLRTETPPAEALLAYQKAALNWRKDVGFS
IGEYTSILKKAVAAEYKVPGTVINNIKEMLSDMIRRRNRINGGSDDAP
KRGPVGREHLDWCREFASGKFLNAFNPPWGEINKAGKSGYPLLATGL
AKLVELEGKDVMDKAKASIAQLEGWVKENKDQVDQDKAEDLLKGV
RESYKTALALAKQSNAFRAQGAQIDTVFSSYYWLWKAGVTPVTFPSV
SQFLFELGKNPKGQKKMQKALINTPLKWGKRILFADNDFTENRIYM
HPCVLTSGRMSELGISFGAVPVTSPDDAAQSGHTKAVLNYKTKTEVG
NPCACIISSLFEIQKAGYDIESMDIVASEHLLHQSLVGKRSPFQNAAYLIK
GNATNINII

Tablo 3: Hazara JC280 Nükleoproteini Kodlayan Genin Nükleotid Sekansı

HAZV NP Native Sekans

ATGGAGAACAAGATTGTTGCCAGTACTAAGGAAGAGTTCAACACCTG
GTACAAGCAGTTTGTCTGAGAAACACAACTGAACAACAAGTACACGG
AATCTGCATCCTTTTGTGCCGAAATTCCTCAGCTCGACACCTACAAGT
ACAAGATGGAGCTAGCCAGCACGGACAATGAGAGGGACGCCATCTAC
AGCTCAGCACTCATTGAGGCCACCCGATTCTGTGCTCCTATCATGGAG
TGTGCATGGGCTTCCTGCACTGGGACAGTTAAAAGAGGTCTGGAATG
GTTTCGACAAAAACAAAGACTCTGACACCGTGAAGGTCTGGGATGCCA
ACTACCAAAAGCTAAGAACAGAGACACCGCCTGCTGAGGCATTACTG
GCATACCAGAAAGCCGCCCTCAACTGGAGAAAGGATGTCGGCTTCTC
CATTGGGGAGTACACCAGTATACTAAAAAAGGCAGTGGCGGCAGAGT
ATAAGGTGCCAGGGACAGTGATCAATAACATCAAAGAAATGCTCAGC
GATATGATTTCGACGCAGGAACAGGATCATCAACGGTGGCTCCGATGA
TGCGCCAAAGAGAGGGCCTGTTGGGCGTGAGCATCTTGACTGGTGCA
GAGAGTTTGCCTCAGGCAAAATTTTGAATGCTTTCAACCCTCCTTGGG
GAGAGATTAACAAGGCAGGTAAATCTGGGTACCCTCTCTTGGCCACG
GGATTAGCAAAGCTGGTTGAGCTAGAGGGGAAAGACGTGATGGACAA
GGCCAAGGCAAGCATTGCACAACCTGAAGGATGGGTCAAAGAGAACA
AAGACCAAGTCGACCAAGACAAGGCAGAAGACCTCCTAAAAGGGGT
GAGAGAAAGCTACAAGACTGCCCTGGCTCTGGCAAAGCAGTCGAACG
CCTTCCGTGCCCAGGGAGCTCAAATAGACACTGTGTTTCAGCAGCTACT
ACTGGCTTTGGAAGGCAGGAGTGACACCAGTCACCTTCCCATCTGTGT
CCCAATTCCTTTTCGAGCTGGGTAAAGAACCCCAAGGGACAGAAAAAA
ATGCAAAAGGCACTCATCAACACCCCTCTCAAATGGGGAAAAAGGCT
CATTGAACTGTTTGCTGATAACGACTTCACAGAGAACAGAATCTACAT
GCACCCCTGTGTGCTAACATCTGGAAGAATGTCCGAGCTTGGAATATC
GTTTGGAGCCGTGCCCGTCACCAAGTCCCGATGATGCCGCCCAAGGGTC
CGGGCACACAAAGGCAGTCCTCAACTATAAGACCAAGACCGAGGTCTG
GCAACCCGTGTGCCTGCATCATTTCAAGCCTCTTTGAGATCCAAAAAG
CAGGTTATGACATTGAGAGCATGGATATAGTCGCCTCTGAACATCTTC
TCCATCAATCTCTTGTGGGGAAGCGCTCGCCCTTCCAAAACGCCTACC
TCATTAAAGGCAATGCCACCAACATCAACATCATCTAG

3.4.2.1. Hazara JC280 Virüsün Hücre Kültüründe Üretimi

Bu amaçla, İngiltere Halk Sağlığı kurumundan temin edilen Hazara JC 280 suşu ile ilk olarak 10 ml hücre üretme vasatı içerisinde 10×10^6 adet BHK-21 hücreleri infekte edilmiştir. İnfeksiyondan üç gün sonra hücre kültür süpernatantı toplanarak 7000 RPM'de 7 dk boyunca sentrifüjlenmiş ve virüs hücreden uzaklaştırılmıştır. Virüs içeren üst sıvı $150000 \times g$ 'de 4h sentrifüjlenmiş ve elde edilen pelet 1ml PBS içerisinde çözündürülerek gelecek deneylerde kullanılacak stok virüsün eldesi için $-80^\circ C$ 'de muhafaza edilmiştir. Aynı zamanda infekte hücre lizatı da hedef genin eldesi amacıyla kullanılmak üzere $-80^\circ C$ 'de muhafaza edilmiştir.

3.4.2.2. Virüs titresinin belirlenmesi (Plaque Assay)

Bir adet T75 hücre kültür flaskına %10 FBS içeren DMEM içerisinde SW13 hücreleri ekilmiştir. Hücreler %90-100 yoğunluğa ulaştıktan sonra tripsinle kaldırılmış ve %10 FBS içeren DMEM içerisinde kuyu başı 300.000 olacak şekilde 6 kuyulu plakalara dağıtılmıştır. 24 saat sonra %90-100 yoğunluğa ulaşan 6 kuyulu plakalardaki SW13 hücreleri, serumsuz vasat içerisinde 10 kat seri dilüsyonla hazırlanan 1 ml virüs ($10^{-2} 10^{-6}$) ile infekte edilmiştir. İnfekte hücreler 15 dakikada bir öne arkaya ve sağa sola karıştırılarak 1 saat boyunca $37^\circ C$ 'de inkübe edilmiştir. Ardından virüs içeren vasat uzaklaştırılmış ve hücreler 2 defa PBS ile yıkanmıştır. %1,6 oranında dH₂O içerisinde hazırlanan karboksimetilselüloz (CMC) ile %20 FBS içeren $2 \times DMEM$ 1:1 oranında karıştırılmış ve her kuyucuğa 2'şer ml olacak şekilde 6 kuyulu plakalardaki kuyulara eklenmiştir. 6 gün sonra 6 kuyulu plakalardaki virüs hücre karışımı %3,7 formaldehit ile 2 saat boyunca oda sıcaklığında fikse edilmiş ve ardından %1 kristal violet ile boyanmıştır. Oluşan plak formları çıplak gözle sayılarak PFU birimindeki virüs titresini belirlenmiştir.

3.4.2.3. Hazara Virüsün Saflaştırılması

Virüsün saflaştırılması için şu adımlar izlenmiştir:

1) HAZV içeren infekte hücre süpernatantı %20 süktroz ile ultrasantrifüjde $150000 \times g$ 'de SW32Ti rotoru kullanılarak 4 saat santrifüjlenmiş ve yoğunlaştırılmıştır.

2) Yoğunlaştırılan HAZV, Hi Trap Capto™ Core 700 1ml (Cytiva) kolonundan GE Life Sciences AKTA Pure cihazı yardımıyla geçirerek saflaştırılmıştır.

Saflaştırılan ve UV ve Bradford yöntemi yardımıyla miktarı belirlenen virüs KKKAV ile HAZV arasındaki çapraz tepkime varlığını göstermek amacıyla EIA'da yakalayıcı antijen olarak kullanılmıştır.

3.4.2.4. RNA izolasyonu

Başlık 3.4.2.1'de elde edilen HAZV infekte hücre lizati 1 ml Trizol ile muamele edilmiş ve lizis için oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilmiştir. Ardından çeker ocak altında 500 µl kloroform eklenmiş ve vortekslendikten sonra 10000 rpm'de +4°C'de 10 dk santrifüjlenmiştir. RNA içeren üst sıvı 1:1 oranında bağlanma solüsyonu %96 saflıktaki etanol ile birleştirilmiştir ve oda sıcaklığında 1 dk inkübe edilmiştir. Elde edilen sıvı RNA bağlama kolonundan geçirilmiş ve ardından yıkama solüsyonlarıyla muamele edilmiştir. Son aşamada RNA 50 µl RNase/DNase içermeyen su ile elue edilmiştir. RNA, absorbansa dayalı saflık ve miktar tayini yapılmasının ardından -20°C'de muhafaza edilmiştir. Tüm aşamalarda Easy-spin™ (DNA free) Total RNA Extraction Kit ile (iNtRON Biotechnology Inc, Korea) tanımlanan protokol takip edilmiştir.

3.4.2.5. cDNA Sentezi

Başlık 3.4.2.4'te elde edilen RNA SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit kullanılarak tek iplikli cDNA'ya çevrilmiştir. Bu amaçla 1 µg RNA random primer ve revers transkriptaz enzimi aracılığıyla kitin belirlediği koşullarda cDNA'ya çevrilmiştir. Tüm aşamalarda RNA SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit'in (Bioline, UK) belirlediği protokol ve malzemeler kullanılmıştır. Elde edilen cDNA hedef geni PZR'da üretmek amacıyla kalıp olarak kullanılmış ve ya da -20°C'de muhafaza edilerek kullanılmıştır.

3.4.3. Klonlama Stratejilerinin Belirlenmesi

Hazara virüs JC280 suşu nükleoprotein üretilmesi amacıyla bakteriyel ekspresyon sisteminin kullanılması tercih edilmiştir. Bu amaçla 3' ucunda 6 adet Histidin (6×His) aminoasidi kodlayan pET-30b(+) vektörü kullanılmış ve hedef protein C terminalinde saflaştırılmayı sağlayacak 6×His barındırır halde *Escherichia coli*'de üretilmiştir. Bu klonlama stratejisinde vektördeki çoklu kesim bölgesini tanıyan restriksiyon kesim enzimleri kullanılmıştır. Bu amaçla hem hedef gen hem de vektör aynı enzimlerle kesilmiş ve ardından ligaz enzimi aracılığıyla iki parça birleştirilerek

pET-30b(+) HAZV NP vektörü elde edilmiştir. Klonlamada kullanılan enzimler *NdeI* ve *XhoI*'dir.

3.4.3.1. Klonlamada Kullanılan Primerlerin Tasarlanması

HAZV NP JC280 suşu nükleoproteinini kodlayan nükleotid sekansı göz önünde bulundurularak hedef geni PZR ile çoğaltmak amacıyla Forward (F) ve Revers (R) primerler tasarlanmıştır. Direksiyonel klonlamayı gerçekleştirmek için Forward primere *NdeI* kesim bölgesi, Revers primere ise *XhoI* kesim bölgesi primerlerle eklenmiştir. Primerler tasarlanırken primer çiftlerinin heterodimer oluşturma olasılıkları, G/C oranları ve erime sıcaklıkları (T_m) dikkate alınmıştır (Tablo 4).

Tablo 4: Klonlama için tasarlanan primerler

pET-30b(+) primerleri	HAZV NP	T _m	G/C
Forward Primer	5' GGAATTCCATATGGAGAACAAGATTGTTGC 3'	60 °C	%40
Reverse Primer	5' CCGCTCGAGGATGATGTTGATGTTGGTG 3'	64 °C	%54

3.4.3.2. Hedef Genin PZR ile Çoğaltılması

Bu amaçla başlık 3.4.2.5 elde edilen cDNA yapılan PZR'da kalıp olarak kullanılmıştır ve hedef gen Tablo 3-4'te belirtilen primerler ve Tablo 3-5'te belirtilen koşullarda çoğaltılmıştır. Hedef geni çoğaltmak için 'proof reading' aktivitesine sahip RANGER DNA Polymerase (Bioline, UK) enzimi ve bileşenleri üreticinin talimatlarına uygun olarak kullanılmıştır.

Tablo 5: HAZV NP genini çoğaltmak için PZR koşulları

pET-30b(+) HAZV NP	
Denatürasyon 3'	95°C
Denatürasyon 10''	95°C
Bağlanma 30''	55°C
Uzama 2'	72°C
Son Uzama 10'	72°C

3.4.3.3. PZR'da çoğaltılan hedef genin temizlenmesi

PZR ile elde edilen hedef gen klonlamada kullanılmak üzere temizlenmesi IntronBio Fragment DNA Pürifikasyon Kiti (iNtRON Biotechnology Inc, Korea) ile üreticinin talimatlarına takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 50 µl'lik PZR reaksiyon ürününe 250 µl BNL tamponu eklenmiş ve karışım vortekslenmiştir. DNA bağlama kolonundan geçirilen karışım, kitte bulunan yıkama tamponlarıyla temizlenmiş ve son aşamada 50 µl moleküler dereceli su (MGW) kullanılarak elue edilmiştir. Absorbansa dayalı saflık ve miktar tayini yapılan hedef gen kullanılabilecek -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.4.3.4. Klonlamada kullanılacak vektörün eldesi

Klonlamada kullanılacak pET-30b (+) vektörü içerisinde başka bir gen bulunur hâlde ticari olarak Addgene, Cambridge, MA, USA firmasından temin edilmiştir. Elde edilen vektör TOP10 *E.coli* hücrelerine kanamisinli agar besiyerilerine transforme edilmiş ve pozitif transformantlardan tek koloni 5 ml kanamisinli sıvı besiyerinde 16 saat 250 rpm'de çalkalanarak büyütülmüştür. pET-30b(+) vektörü içeren büyümüş koloniye başlık 3.4.3.12'de tarif edildiği gibi plazmid DNA izolasyonu yapılmış, saflık ve miktar tayininin ardından klonlamada kullanılacak vektörü elde etmek üzere *NdeI* ve *XhoI* enzimleriyle kesime uğratılmıştır. Bu amaçla 3 µg plazmid DNA 100 µl reaksiyon tamponu içerisinde 1'er ünite enzim (New England Biolabs (UK), Inc.) ile üreticinin talimatına göre 37°C'de gece boyunca kesime uğratılmıştır. Klonlamada kullanılmak üzere linearize edilmiş vektör %0,7'lik hazırlanmış agaroz jelde kontrol edilmiş ve kontrolün ardından tüm reaksiyon hacmi tekrar jele yüklenerek jel elüsyonu başlık 3.4.3.6'da belirtildiği şekilde yapılmıştır. Jel elüsyon yapılarak elde edilen vektörün saflık ve miktar tayini yapılmış ve klonlamada kullanılmıştır.

3.4.3.5. Agaroz Jel Elektroforez

Başlık 3.1.20'de tarif edildiği şekilde 5XTBE, deiyonize su ile 1XTBE'ye düşürülür. İstenilen yüzdeliği hazırlamak üzere belirli miktarda agar tartılır ve 100 ml 1XTBE ile çözündürülür. Mikrodalga fırında 2 dk ısıtılır ve soğumaya bırakılır. Donmadan önce 3µl etidyum bromür (EtBr) eklenir ve karışım jel kalıbına dökülür. Tarak yerleştirildikten sonra donmaya bırakılır. Katılaştıran agar içerisinde 1XTBE bulunan jel yürütme tankına yerleştirilir ve tarak nazikçe agarı yırtmadan çıkarılır. 6X jel yürütme boyası örnek ile karıştırılır ve örnekten 10µl kuyuya yüklenir. Analiz edilen

DNA'nın boyutuna bağlı olarak örnek 120 voltta 40 dk yürütülür. Yürütülen jel ultraviyole ışını altında EtBr aracılığıyla görüntülenir.

3.4.3.6. Agaroz Jelden DNA Ekstraksiyonu

Klonlamada kullanılacak vektör ya da insert kesim sonrası agaroz jele yüklenir ve yürütülür. İstenilen büyüklüğe denk gelen DNA parçası ultraviyole ışın altında bistürü ile en az agaroz jel alınacak şekilde kesilir. Kesilen jel tartılır ve Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit yardımıyla üreticinin talimatlarına göre temizlenir. Safılık ve miktar tayinin yapılmasının ardından kullanılabilecek -20°C'de muhafaza edilir. Kesim sonrası jelden saflaştırılacak DNA fragmanları ultraviyole ışık altında temiz bistürü kullanılarak kesilir. IntronBio Fragment DNA Pürifikasyon Kiti üreticinin talimatları doğrultusunda kullanılarak DNA jelden saflaştırılır.

3.4.3.7. Ligasyon Reaksiyonu

NdeI ve *XhoI* enzimleriyle kesilen ve safsızlıktan arındırılan vektör ve insert 1:3 oranında ve toplam DNA miktarı 100 ng'ı aşmayacak şekilde ligasyon reaksiyonuna uğratılmıştır. 1 µl ligaz enzimi içerecek şekilde hazırlanan reaksiyon, 16 °C'de gece boyu inkübe edilmiştir. Reaksiyon sonrası ligaz enzimi 65°C'de 20 dk inkübe edilerek inaktive edilmiş ve reaksiyonun 5 µl'si transformasyon uğratılmıştır.

3.4.3.8. Bakterilerin Kompetan Hâle Getirilmesi

Kompetan bakteriler, transformasyonda kullanılmak üzere hazırlanmıştır. Bu amaçla -80°C'de muhafaza edilen bakteri stoğu antibiyotik içermeyen LB agar pleyte ekilir ve büyümek üzere 37°C'de gece boyu inkübe edilir. Ertesi gün büyüyen kolonilerden tek koloni seçilir 50 ml LB sıvı besiyerine ekilerek 37°C'de 250 rpm'de OD600 0,4-0,6 değerine ulaşana dek büyümeye bırakılır. OD600 0,4-0,6 ulaştığında hücreler alınır ve 10 dk buzda inkübe edilir. Soğutulan hücreler 10000 rpm'de 5 dk çöktürülür. Süpernatant (SN) dökülür ve çöktürülen hücreler 10 ml 100 mM kalsiyum klorid ile resuspense edilir. 20 dk buzda bekletildikten sonra hücreler tekrar 10000 rpm'de 5 dk santrifüj edilir ve SN dökülür. Çöktürülen hücreler %15 gliserol içeren 100 mM kalsiyum klorid ile çözündürülür ve önceden -80°C'de soğutulmuş mikrosantrifüj tüplerine 200'er µl porsiyonlanarak kullanılmak üzere -80°C'ye kaldırılır. Tüm deney boyunca kompetanlığı yitirmemesi için hücrelerin buzdan ayrılmamasına özenle dikkat edilir [102].

3.4.3.9. Transformasyon

Kompetan hücreler -80°C 'den direkt buza çıkarılır ve 10 dk erimeye bırakılır. 50 μl kompetan hücreye gerekli miktarda plazmid DNA'sı ya da ligasyon ürünü yavaşça eklenir ve 20 dk buzda inkübe edilir. Su banyosunda 42°C 'de 2 dk ısı şokuna uğrattılır ve buzda 5 dk bekletilir. DNA eklenen kompetan hücrelere SOC besiyerinden 250 μl eklenir ve hücreler 37°C 'de 250 rpm çalkalama hızında 1 saat büyümeye bırakılır. Bir saat sonra uygun direnç genini içeren LB agar pleyte 100-200 μl ekim yapılır ve 37°C 'de bir gece büyümeye bırakılır.

3.4.3.10. Pozitif Koloni Seçimi

Uygun antibiyotikli LB agar besiyerinde ertesi gün büyüyen kolonilerden hangisinin hedef geni içerdiğini belirlemek üzere iki yöntem uygulanır. İlk yöntem koloni PZR'dır ve ikinci yöntem ise kesim enzimleriyle doğrulamadır. Koloni PZR için istenilen sayıda koloni seçilir ve seçilen koloninin yarısı 50 μl MGW'de resuspende edilir. Çözelti 95°C 'de 5 dk kaynatılır ve 10000 rpm'de 1 dk santrifüjlenir. Plazmit DNA içeren üst sıvı PZR'da kalıp olarak kullanılır ve hedef geni çoğaltacak uygun primerlerle reaksiyona sokulur. Hedeflenen gene özgü bant agaroz jelde gösterildikten sonra PZR ile doğrulanan koloninin kalan diğer yarısı uygun antibiyotikli sıvı LB besiyerine alınır ve 37°C 'de 250 rpm'de gece boyu büyümeye bırakılır. Ertesi gün büyüyen koloniden plazmit DNA izolasyonu yapılır ve kesim ile analiz edilerek seçilen koloni ikinci bir yöntemle daha doğrulanmış olur.

3.4.3.11. Bakteri Stoklanması

Koloni PZR ve kesim reaksiyonu ile doğrulanan koloniler uygun antibiyotik içeren sıvı besiyerinde 37°C 'de 250 rpm'de gece boyu büyümeye bırakılır. Ertesi gün büyüyen koloni son konsantrasyonu %15 gliserol içerecek şekilde LB sıvı besiyerinde stoklanır ve -80°C 'de muhafaza edilir.

3.4.3.12. Plazmid İzolasyonu

Plazmid DNA izolasyonu IntronBio (iNtRON Biotechnology Inc, Korea) izolasyon kiti kullanılarak üreticinin talimatlarına göre gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla plazmit DNA izolasyonu yapılacak bakteri stoğu -80°C 'den ya da LB agar pleytteki tek koloniden öze yardımıyla alınacak ve uygun antibiyotik içeren LB sıvı besiyerine ekilecektir. 37°C 'de 250 rpm'de 16-18 saat inkübe edilen 5 ml'lik bakteri kültürü 10000

rpm’de 3 dk santrifüj edilerek çöktürülecek ve pelet RNase içeren 250 µl resüpsiyon solüsyonu ile iyice çözdürülecektir. Resüspende edilen pelete 250 µl parçalama solüsyonu eklenecek ve karışım 5-10 defa alt üst edilecektir. Oda sıcaklığında 3 dk inkübe edilen karışıma 350 µl nötralizasyon solüsyonu eklenecek ve karışım 5 dk buzda inkübe edilecektir. Karışım, 10 dk 13000 rpm’de ve +4°C’de çöktürülecek ve plazmit DNA içeren üst sıvı kit dâhilinde gelen kolonlardan geçirilecektir. Yıkama işlemlerinin ardından pelette biriken DNA kolona MGW eklenmesiyle elde edilecektir. Absorbansa dayalı saflık ve miktar tayini yapılan plazmit DNA deneylerde kullanılmak üzere -20°C’de muhafaza edilecektir.

3.4.3.13. Bakteriyel Ekspresyon

Hedef geni içerdği koloni PZR ve kesim enzimleriyle doğrulanan plazmitler ekspresyonun gerçekleştirileceği bakteri suşlarına transforme edilir. Pozitif transformantlar kesim enzimleriyle doğrulandıktan sonra hedef geni içeren plazmitler gliserol içeren LB sıvı besiyerinde stoklanır ve -80°C’ye kaldırılır. Ekspresyonu optimize etmek amacıyla -80°C’de stoklanan bakteriden öze yardımıyla bir miktar uygun antibiyotiği içeren LB sıvı besiyerine alınır ve primer bakteri kültürü olarak kullanılmak üzere 37°C’de 250 rpm’de gece boyu inkübe edilir. 16-18 saat sonra OD600 1-1,5 arasına ulaştığında primer kültür ekspresyon yapılacak LB sıvı besiyerinde 1:50 oranında seyreltilir ve 37°C’de 250 rpm’de inkübasyon ile kültür başlatılır. OD600 0,4-0,6 arasına ulaştığında, kültür son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde IPTG ile indüklenir. İndüklemeden 3 saat sonra kültür sonlandırılarak buz üzerine alınır. Kültür, SDS-PAGE ekspresyon seviyesini analiz etmek üzere +4 °C’de 10000 rpm’de 5 dk çöktürülür ve 2 defa soğuk 1XPBS ile yıkanır. Pelet ve SN ayrı analiz edilir.

3.4.3.14. Ekspresyon Analizi

Yapılan bakteri kültüründe hedef genin kodladığı hedef proteininin üretilip üretilmediği SDS-PAGE dikey jel elektroforezi, western blot ve enzim immunoassay (EIA) ile analiz edilir.

3.4.3.15. SDS-PAGE İçin Örnek Hazırlama

Hedeflenen proteinin 55 kDa olması sebebiyle yığıcı jelin (stacking) konsantrasyonu %8 ve ayırıcı jelin (resolving) konsantrasyonu ise %12’dir. Bu amaçla

aşağıda tabloda (Tablo 3-6) belirtilen oranlarda kimyasallar ile Bio-Rad SDS jel dökme sistemi (Bio-Rad Laboratories, Inc.) kullanılarak jel hazırlanır. Verilen miktarlar 10 ml hacim için geçerlidir.

Tablo 6: SDS-PAGE Jel Elektroferezi İçin Jel Hazırlanması

Jel %	Su (ml)	30% akrilamit (ml)	1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 (ml)	10% SDS (µL)	10% APS*(µL)	TEMED*(µL)
8%	4,6	2,6	2,6	100	100	10
12%	3,2	4,0	2,6	100	100	10
*APS ve TEMED en son eklenmek zorundadır.						

Yıgıcı jelde 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 yerine 0,5 M Tris-CI pH 6,8 kullanılır.

3.4.3.16. SDS-PAGE Jel Elektroferezi İçin Örneklerin Hazırlanması

Ekspresyon sonrası bakteri kültürü analiz edilmek üzere şu basamaklar izlenerek hazırlanmıştır. 50 µl SDS örnek hazırlama çözeltisi üzerine pipet ucu ile bakteri peleti eklenir ve iyice karıştırıldıktan sonra 10 dk 95°C’de kaynatılır. Kaynatılan örnekler 13000 rpm’de 1 dk çöktürülür ve üst sıvıdan 10 µl analiz için kullanılır. Hedef proteinin süpernatanta salındığı düşünülüyor ise bakteri kültürü çöktürülür ve üst sıvı 1:1 oranında SDS örnek hazırlama çözeltisi karıştırılır ve 95°C’de 5 dk kaynatılır. Kaynatılan örnekler santrifüjlenir ve 10 µl’si analiz için kullanılır.

3.4.3.17. SDS-PAGE’te Örneklerin Yürütülmesi

SDS-PAGE jel elektroferezi için örneklerin hazırlanmasının ardından jel yürütme için SDS-PAGE jel yürütme tankı (Bio-Rad Laboratories, Inc.) hazırlanır. SDS yürütme çözeltisi 1X’e seyreltilir ve karşılıklı iki jel tanka yerleştirilir. Ardından jellerdeki taraklar çıkarılır ve hazırlanan örneklerden 10’ar µl her bir kuyuya yüklenir. Protein büyüklüğünü görmek için ilk kuyuya 2,5 µl protein marker yüklenir. Tankın kapağı iletken kabloların yönüne dikkat ederek kapatılır ve güç kaynağı ilk önce 50V 20 dk’ya, ardından 200 V 40 dk’ya ayarlanır ve yürütme işlemi gerçekleştirilir.

3.4.3.18. Jellerin Coomassie Boya ile Boyanması

Yürütme sonrası jeller iki cam arasından dikkatlice çıkarılır ve ısıya dayanıklı bir kutuda üzerine yarım parmak kaplayacak şekilde Coomassie boyama tamponu

eklenir. Mikrodalga fırında düşük programda 1 dk kaynatılır ve 15 dk oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda inkübe edilir. Ardından Coomassie boyama tamponu uzaklaştırılır ve jeller 1 defa deiyonize su ile yıkanır. Yıkamanın ardından jellerin üzere Coomassie boya uzaklaştırma tamponu eklenir ve jeller ısıya dayanıklı bir kutuda tekrar 1dk düşük programda mikrodalga fırında ısıtılır. Isıtmanın ardından jellerin üzeri boyanın daha çabuk uzaklaşmasını sağlamak amacıyla peçeteyle kapatılır ve jeller 2 saat süreyle orbital çalkalayıcı üzerinde bekletilir. Boyanın uzaklaştırılmasının ardından jellere beyaz ışık üzerinde analiz edilir.

3.4.3.19. Bakteri Parçalanması (Denatüre Koşullarda)

Hedef protein ekspresyonunun SDS-PAGE’te analiz edilmesinin ardından bakteri kültür peletine parçalama tamponu eklenir ve iyice çözündürülür. 3 defa -80°C’de dondurup çözödürmenin ardından %50 güçle 3 defa 1 dk sonikasyona uğrattılır ve 1 dk buzda bekletilir. Pelet berraklaşınca dek yaklaşık 2 saat oda sıcaklığında tüp revolver yardımıyla inkübe edilir. Berraklaşan hücre peleti 50000×g’de 30 dk santrifüj edilir ve üst sıvı -20°C’de muhafaza edilir.

3.4.3.20. Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi İle Protein Pürifikasyonu

Bu amaçla, FPLC-AKTA PURE Sistemi (Global Life Sciences Solutions, USA) kullanılmıştır. 50000×g’de 30 dk santrifüj edilen parçalanmış hücre peleti saflaştırma prosedürü için hazır hâle getirilmiştir. 6XHis aracılığıyla pürifikasyon için HisTrap excel 1ml (Cytiva, USA) kolonu, virüs pürifikasyonu için HiTrap Capto Core 700 (Cytiva, USA) kolonu kullanılmıştır. Cihaz açılır ve tüm sistem (A1 ve B1) ddH₂O’dan geçirilir. Kolon sisteme bağlanır ve örnek hangi tamponun içerisindeyse kolon ve A1 sistemi aynı tamponla equilibre edilir. Örnek hangi tamponda elde edilecekse B1 sistemi o tampondan (elasyon tamponu) geçirilir. Sistem hazır olduktan sonra örnek pompasından kolona örnek geçişi 0.5 ml akışla geçirilir. Örnek bittikten sonra kolon equilibrasyon tamponuyla yıkanır ve ardından kolondan elasyon tamponu geçirilerek saf protein fraksiyonlanır. Her bir fraksiyon saflık derecesini analiz etmek üzere SDS-PAGE ile elektroforez edilir. Cihaz kapatılmadan önce kolon ve tüm sistem ddH₂O’dan geçirilir. Kolon ve sistem son olarak %20 etanolden geçirilir ve sistem kapatılır. Kolon +4°C’de muhafaza edilir.

3.4.3.21. Diyaliz

SDS-PAGE’de saflığı analiz edilen proteinler saflık oranlarına göre birleştirilir ve parçalama ve elüsyon solüsyonlarından kaynaklanan üre ve imidazolden uzaklaştırmak için PBS’e karşı diyaliz edilir. Bu amaçla her bir saflıktaki fraksiyon diyaliz tüpüne (SnakeSkin™ Dialysis Tubing, 10K MWCO, 22 mm, Thermo Fisher Scientific, USA) aktarılır. Her 12 saatte bir diyaliz tamponu PBS değiştirilir ve örnek 48 saat diyaliz edilir. Diyaliz sonrası proteinin absorbansa dayalı saflık ve miktar tayini yapılır ve aliquotlanarak -20 °C’de muhafaza edilir.

3.4.3.22. Western Blotlama

Analiz edilecek proteinler SDS-PAGE ile elektroforez edilir. Elektroforezin ardından jeller camdan dikkatlice alınır ve ddH₂O’da 5 dk çalkalanarak yıkanır. Jel, suyun ardından transfer tamponu ile 5 dk yıkanır. Transfer için jel boyutunda üste 5 kat ve alta 5 kat olmak üzere filtre kâğıdı kesilir. Aynı şekilde jeldeki proteinlerin aktarılacağı PVDF ya da nitroselüloz membran da jel boyutunda kesilir. 5 kat filtre kâğıdı transfer kasetin alınır ve transfer tamponu ile ıslatılır. Üzerine membran konulur ve membran da transfer tamponu ile ıslatılır. Jel, ıslatılan membran üzerine yerleştirilir ve üzerine 5 kat filtre kâğıdı konulur. Transfer kasetinin kapağı kapatılır ve 25 V’de 7 dk transfer edilir. Bu amaç için kullanılan cihaz Trans-Blot® Turbo™ Transfer sistemidir.

Transferin ardından membran ilk önce ddH₂O ile, ardından TBST ile 5 dk çalkalanarak yıkanır. Yıkamaların ardından membran bloklama tamponunda oda sıcaklığında 2 saat inkübe edilir. Birincil antikor bloklama tamponunda istenilen konsantrasyonda hazırlanır ve membran birincil antikor ile gece boyu +4°C inkübe edilir. Ertesi gün membran oda sıcaklığında 5 defa 5dk TBST ile yıkanır. Ardından bloklama tamponu içinde istenilen konsantrasyonda hazırlanan ikincil antikor ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilir. İnkübasyonun ardından membran 5 defa 5 dk TBST ile yıkanır. Görüntülemeye ikincil antikora konjuge edilmiş hâlde bulunan HRP (horseradish peroxidase) enziminden faydalanılır. HRP’nin, görüntüleme solüsyonunda bulunan luminol ile reaksiyonu kemilüminesans aracılı görüntülemeyi sağlamaktadır. Bu amaçla ECL Western Blot substratı (Thermo Fischer Scientific, USA) üreticinin talimatına göre kullanılmıştır. Görüntüleme Fusion FX Solo cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.4.3.23. EİA

Saflaştırılan protein EİA kaplama solüsyonu içerisinde istenilen konsantrasyonda hazırlanır ve 96 kuyulu plakaya kuyu başı 100 µl olarak dağıtılır. Gece boyu +40C’de inkübe edilen antijenler plakaya tutunur. Ertesi gün EİA bloklama tamponundan her kuyuya 200 µl eklenerek 2 saat oda sıcaklığında inkübasyon ile bloklama yapılır. Bloklama tamponu her bir kuyunun 3 defa 300 µl PBST ile yıkanmasıyla uzaklaştırılır ve birincil antikör EIA bloklama solüsyonu içerisinde istenilen konsantrasyonda hazırlanır. Hazırlanan antikordan duplike olarak kuyulara 100’er µl eklenmesiyle deney sürdürülür. Plakalar 37°C’de 1 saat inkübe edilir ve inkübasyonun ardından tabandaki antijene bağlanmayan antikörler plakaların 3 defa 300 µl PBST ile yıkanmasıyla uzaklaştırılır. İkincil antikör EIA bloklama solüsyonu içerisinde istenilen konsantrasyonda hazırlanır. İkincil antikordan her bir kuyuya 100’er µl eklenir ve plakalar 37°C’de 1 saat bekletilir. İnkübasyonun ardından plakalar 3 defa 300 µl PBST ile yıkanır. Yıkama sonrası ikincil antikorda bulunan HRP ile reaksiyona girecek TMB’den (tetrametil benzidin) her bir kuyuya 100’er µl eklenir. 10 dk sonra reaksiyon her kuyuya 2N H₂SO₄’ten 100 µl eklenmesiyle sonlandırılır ve reaksiyonun absorbansa dayalı ölçümü 450 nm dalga boyunda iMark™ Microplate Absorbance Reader cihazı kullanılarak yapılır.

3.4.3.24. KKKAV (+) ve KKKAV (-) İnsan Serumları

Çalışmada kullanılan Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü ile infekte, tanısı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu tarafından yapılan PZR ve laboratuvarımızca yapılan VectoBest KKKAV Antijen testi ile konulan hasta serumları pozitif kontrol, VectoBest Antijen testi sonucu Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü yönünden negatif olduğu teyit edilen serum örnekleri negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Yapılmış olan Western blotlama ve EIA deneylerinde daha önce Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastahanesi’ne çeşitli amaçlarla başvuran hastalardan elde edilmiş ve yapılan testlerden sonra elden çıkarılması planlanmış arşiv serum örneklerini kullanılmıştır.

3.4.3.25. Anti-KKKAV NP fare, anti-KKKAV Fare ve Tavşan Serumları

Anti-KKKAV fare serumu ve inaktif KKKAV Kelkit06 suşu Erciyes Üniversitesi’nden Prof. Dr. Aykut Özdamar tarafından sağlanmıştır. Anti-KKKAV tavşan ve anti-KKKAV NP fare serumu laboratuvarımızda gerçekleştirilen daha önceki çalışmalar sırasında elde edilmiştir (E. Karaaslan, N. S. Çetin, M. Kalkan-Yazıcı, S.

Hasanoğlu, F. Karakeçili, A. Özdarendeli, A. Kalkan, A. O. Kiliç, M. Z. Doymaz, yayına gönderilmiştir). Anti-KKKAV tavşan serumu 2 adet beyaz Yeni Zelanda yetişkin tavşanın inaktif KKKAV Kelkit06 suşu ile bağışıklanmasıyla elde edilirken; anti-KKKAV NP fare serumu 6-8 haftalık erkek Balb/ türü farenin KKKAV-NP ile bağışıklanmasıyla elde edilmiştir.

3.4.3.26. Etik Kurul Onayı

İnsan deneylerinin çalışma protokolleri, Bezmialem Vakıf Üniversitesi'nin Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu onayıyla gerçekleşmiştir (onay numaraları 08/137 ve 4.2019/12).

Söz konusu araştırmada Bezmialem Vakıf Üniversitesi Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji Enstitüsü bünyesindeki laboratuvar imkanlarından faydalanılmıştır.

3.4.3.27. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler GraphPad Prism 6 OS X versiyon 6.0.1 (GraphPad Software, San Diego, CA) programı kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arasındaki anlamlılık Wilcoxon, Mann-Whitney U testi ya da iki kuyruklu student t testi kullanılarak yapılmıştır. Tüm karşılaştırmalar için güvenilirlik aralığı %95 ve anlamlılık için p değeri <0.05 kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1.1. Hazara JC280 Virüsün Üretilmesi

4.1.1.1. Hazara JC280 Virüsün Hücre Kültüründe Üretimi

Bu amaçla, Public Health England'den temin edilen Hazara JC280 suşu ile ilk olarak 10 ml hücre üretme vasatı içerisinde 10×10^6 adet BHK-21 hücreleri infekte edilmiştir. İnfeksiyondan üç gün sonra hücre kültür süpernatantı toplanarak 7000 RPM'de 7 dk boyunca santrifüjlenmiş ve virüs hücreden uzaklaştırılmıştır. Virüs içeren üst sıvının bir kısmı gelecek deneylerde kullanılacak stok virüsü üretmek amacıyla -80°C'de muhafaza edilirken diğer kısmı ise $150000 \times g$ 'de 4h santrifüjlenerek yoğunlaştırılmıştır.

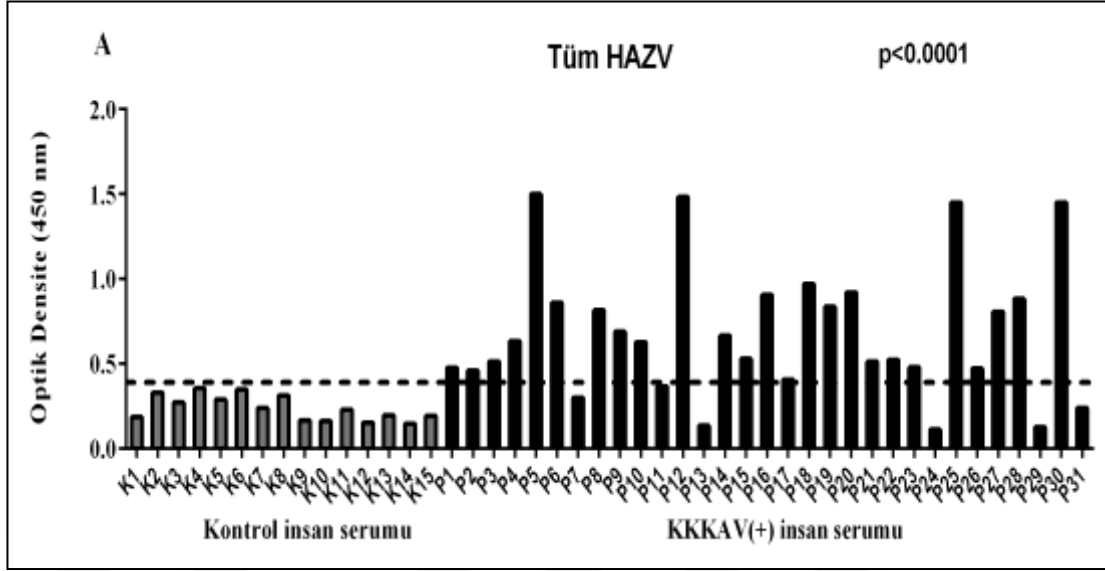
4.1.1.2. Virüs Titresinin Plak Deneyi ile Belirlenmesi

Bir adet T75 hücre kültür flaskına %10 FBS içeren DMEM içerisinde SW13 hücreleri ekilmiştir. Hücreler %90-100 yoğunluğa ulaştıktan sonra tripsinle kaldırılmış ve %10 FBS içeren DMEM içerisinde kuyu başı 400000 olacak şekilde 6 kuyulu plakalara dağıtılmıştır. Ertesi gün %70-80 yoğunluğa ulaşan 6 kuyulu plakalardaki SW13 hücreleri, serumsuz vasat içerisinde 10 kat dilüsyonla hazırlanan 1 ml virüs ile infekte edilmiştir. İnfekte hücreler 1 saat boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. Ardından virüs içeren vasat uzaklaştırılmış ve hücreler 2 defa PBS ile yıkanmıştır. %1.6 oranında karboksimetilselüloz (CMC), %20 FBS içeren 2XDMEM ile 1:1 oranında karıştırılmış ve 2'şer ml olacak şekilde 6 kuyulu plakalardaki her bir kuyuya eklenmiştir. 6 gün sonra 6 kuyulu plakalardaki virüs hücre karışımı %3,7 formaldehit ile 2 saat boyunca oda sıcaklığında fikse edilmiş ve ardından %1 kristal violet ile boyanmıştır. Oluşan plak formları gözle sayılarak PFU birimindeki virüs titresini belirlenmiştir (Şekil 3.4-1). Titresi belirlenen virüs gelecek deneylerde kullanılmak üzere -80°C'de muhafaza edilmiştir.

4.1.2. HAZV ve KKKAV Arasındaki Çapraz Tepkimenin Saf HAZV Kullanılarak Gösterilmesi

4.1.2.1. KKKK Konvalesan İnsan Serumuna ile Enzim İmmüno Assay (EIA)

Hazara JC280 suşu ile KKKAV arasında çapraz tepkime varlığı ya da yokluğu çoklu KKKAV ile infekte hasta serumları kullanılarak EIA yöntemiyle test edilmiştir. Bu amaçla 31 adet KKKAV ile infekte hasta serumu ve kontrol olarak KKKAV yönünden negatif olan 18 adet hasta serumu duplike çalışılmıştır. Birincil antikorlar insan serumlarının bloklama tamponunda 1:100 oranında seyreltilmesiyle hazırlanmış ve kuyu başı 100 µl olacak şekilde kullanılmıştır. HRP ile konjuge edilmiş anti-insan IgG-HRP ikincil antikor Abcam firmasının (ab81202) katalog numaralı antikorunun 1:1000 oranında bloklama tamponunda seyreltilmesiyle hazırlanmış ve kuyu başı 100 µl olacak şekilde kullanılmıştır. Reaksiyon abcam firmasının (ab171523) katalog numaralı TMB ELISA Substratı ile ortaya çıkarılmış ve 2N H₂SO₄ ile sonlandırılmıştır. Absorbansa dayalı reaksiyon ölçümü 450 nm dalgaboyunda yapılmıştır. Kontrol hastalarından 3 tanesi dışlanarak 15 sağlıklı insan verisi ile 2XSD cut-off değeri hesaplanmıştır. Bu amaçla 15 adet negatif kontrol optik dansite (OD) verilerinden standart sapma (SD) hesaplanmıştır: SD; 0,079. Tüm negatif kontrol OD verilerinin ortalaması alınmıştır; 0,239. Cut-off değeri 2XSD+ortalama formülüyle hesaplanmıştır. 2XSD cut-off: 0,398. 31 hastadan 25'i cut-off'un üstünde kalmıştır ve saf HAZV temelli EIA sensitivitesi %80, spesifitesi ise %83 olarak hesaplanmıştır. Yapılan EIA'nın ardından KKKAV pozitif hastalarının %80'i cut-off değerinin üzerinde kalmış ve iki virüs arasındaki çapraz tepkime varlığı EIA yardımıyla gösterilmiştir (Şekil 3.4-3). Her bir veri, optik değerlerin ortalaması alınarak hesaplanmış ve birbirinden bağımsız iki deney duplike olarak çalışılmıştır. Gruplandırılmış EIA verileri Mann-Whitney U testi kullanılarak karşılaştırılmış ve anlamlı bulunmuştur (p<0,0001).



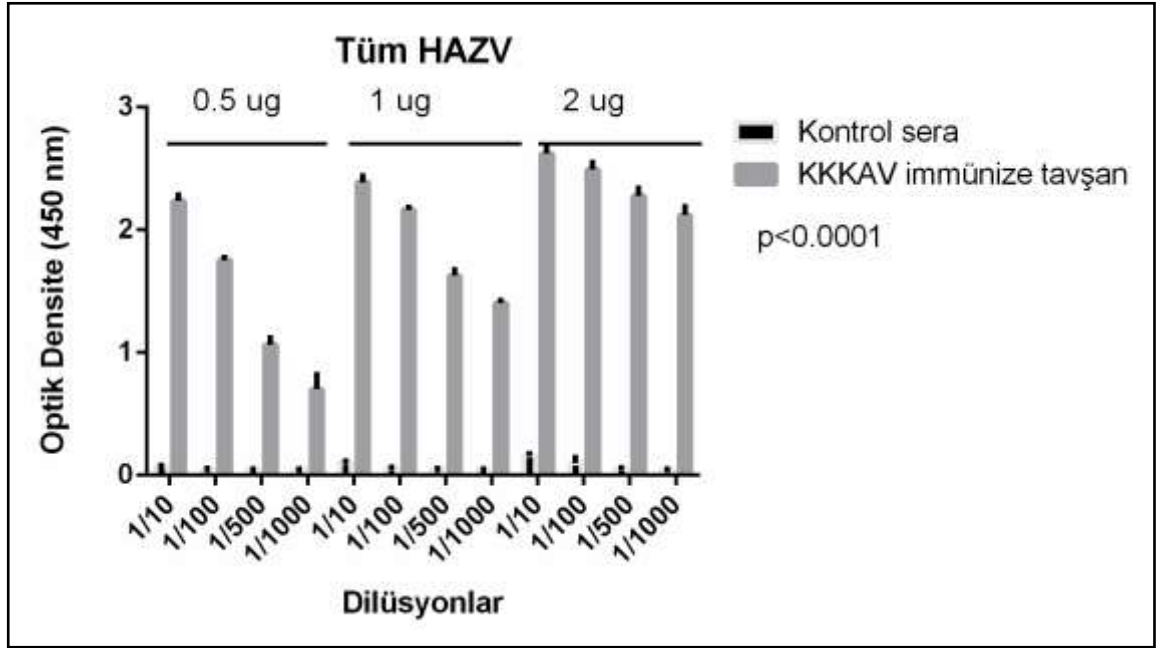
Şekil 3.4-3: Saf HAZV ve KKKAV konvalesan sera kullanılarak çapraz tepkimenin EIA yöntemiyle gösterilmesi.

96 kuyulu plaka kuyu başı 0,5 µg/kuyu ultra saf HAZV le kaplanmış ve KKKAV (+) insan ve kontrol olarak sağlıklı insan serumu ile test edilmiştir. Kullanılan 31 adet KKKAV konvalesan seradan 25'i cut-off üzerinde kalmıştır. 18 adet sağlıklı insan serumundan 3 adet serum dışlanmış 15 adet sağlıklı insan verisi ile SD ve 2XSD cut-off değeri hesaplanmıştır. Bu verilere göre yapılan EIA'nın sensitivite ve spesifitesi sırasıyla %80 ve %83'tür. EIA verileri istatistiksel olarak Mann-Whitney U testi ile karşılaştırılmış ve anlamlı bulunmuştur ($p<0,0001$).

4.1.2.2. KKKAV ile İmmünize Tavşan Serumuna ile Enzim İmmüno Assay (EIA)

Hazara JC280 suşu ile KKKAV arasında çapraz tepkime varlığı ya da yokluğu KKKAV ile bağışıklanmış ve kontrol olarak bağışıklanmamış tavşan serumları kullanılarak EIA yöntemiyle test edilmiştir (Şekil 3.4-4). Tavşan serumları ekibimiz tarafından daha önceki çalışmalarında kullanılmak üzere üretilmiştir. Bu amaçla 96 kuyulu plakalara farklı konsantrasyonlarda ultra saf HAZV kaplanmış ve KKKAV ile bağışıklanmış ve bağışıklanmamış tavşan serumları ile duplike olarak çalışılmıştır. Birincil antikor 1:100 oranında bloklama tamponu içinde hazırlanmış ve kuyu başı 100 µl duplike olarak kullanılmıştır. HRP ile konjuge edilmiş anti-fare IgG-HRP ikincil antikoruna Santa Cruz firmasının sc2030 katalog numaralı antikorunun 1:5000 oranında bloklama tamponunda seyreltilmesiyle hazırlanmış ve kuyu başı 100 µl olacak şekilde kullanılmıştır. Reaksiyon abcam firmasının (ab171523) katalog numaralı TMB ELISA Substratı ile ortaya çıkarılmış ve 2N H₂SO₄ ile sonlandırılmıştır. Absorbansa dayalı reaksiyon ölçümü 450 nm dalgaboyunda yapılmıştır. Tabanda 0,5 µg/kuyu antijen kullanıldığında SD değeri 0,012; ortalama 0,06 ve 2XSD cut-off değeri 0,081'dir.

Tabanda 1,0 µg/kuyu antijen kullanıldığında SD değeri 0,025; ortalama 0,068 ve 2XSD cut-off değeri 0,119'dur. Tabanda 2,0 µg/kuyu antijen kullanıldığında SD değeri 0,05; ortalama 0,092 ve 2XSD cut-off değeri 0,193'tür. EIA verileri üç farklı kombinasyon için de Mann-Whitney U testi kullanılarak karşılaştırılmış ve anlamlı bulunmuştur ($p<0,0001$).



Şekil 3.4-4: Saf HAZV ve KKKAV ile bağışıklanmış tavşan serumu kullanılarak çapraz tepkimenin EIA yöntemiyle gösterilmesi.

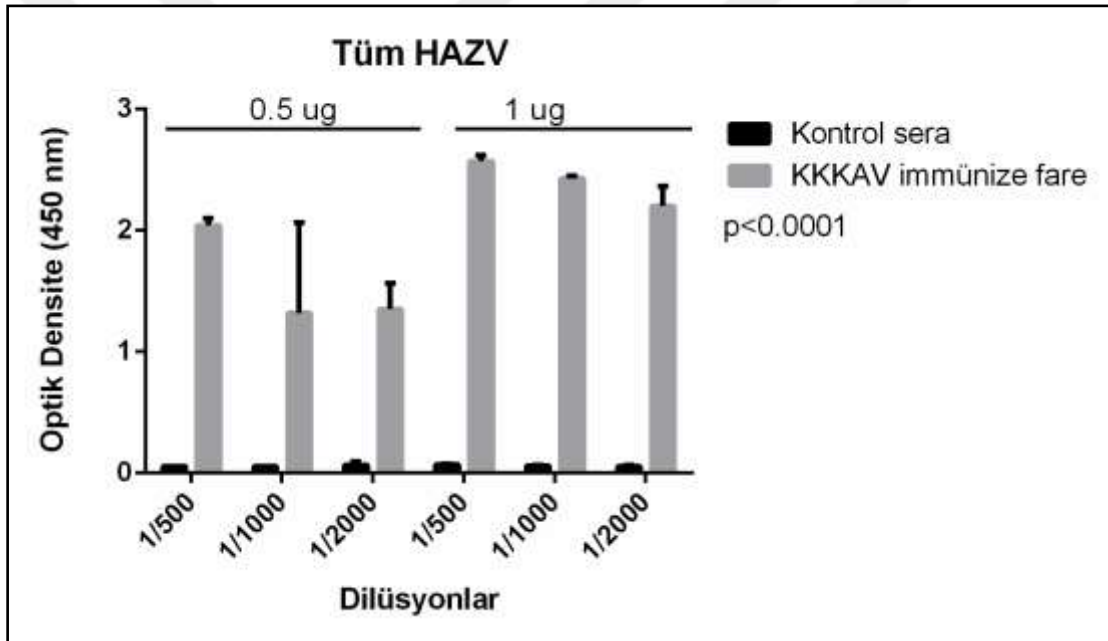
96 kuyulu plaka kuyu başı 0,5; 1,0 ve 2,0 µg/kuyu ultra saf HAZV ile kaplanmış ve KKKAV ile immünize ve kontrol olarak sağlıklı tavşan serumu kullanılarak test edilmiştir. EIA verileri istatistiksel olarak Mann-Whitney U testi ile karşılaştırılmış ve anlamlı bulunmuştur ($p<0,0001$).

4.1.2.3. KKKAV ile İmmünize Fare Serumu ile Enzim İmmüno Assay (EIA)

Hazara JC280 suşu ile KKKAV arasında çapraz tepkime varlığı ya da yokluğu KKKAV ile bağışıklanmış ve kontrol olarak bağışıklanmamış fare serumları kullanılarak EIA yöntemiyle test edilmiştir (Şekil 3.4-5). KKKAV ile bağışıklanmış fare serumu Erciyes Üniversitesi öğretim üyesi Prof. Dr. Aykut Özarendeli tarafından sağlanmıştır. Bu amaçla 96 kuyulu plakalara farklı konsantrasyonlarda ultra saf HAZV kaplanmış ve KKKAV ile bağışıklanmış ve bağışıklanmamış fare serumları ile duplike olarak çalışılmıştır. Birincil antikor 1:100 oranında blokama tamponu içinde hazırlanmış ve kuyu başı 100 µl duplike olarak kullanılmıştır. HRP ile konjuge edilmiş anti-fare IgG-HRP ikincil antikoru Santa Cruz firmasının sc2030 katalog numaralı

antikorumun 1:5000 oranında bloklama tamponunda seyreltilmesiyle hazırlanmış ve kuyu başı 100'er µl olacak şekilde kullanılmıştır. Reaksiyon abcam firmasının (ab171523) katalog numaralı TMB ELISA Substratı ile ortaya çıkarılmış ve 2N H₂SO₄ ile sonlandırılmıştır. Absorbansa dayalı reaksiyon ölçümü 450 nm dalgaboyunda yapılmıştır. Tabanda 0,5 µg/kuyu antijen kullanıldığında SD değeri 0,012; ortalama 0,058 ve 2XSD cut-off değeri 0,084'tür. Tabanda 1,0 µg/kuyu antijen kullanıldığında SD değeri 0,007; ortalama 0,06 ve 2XSD cut-off değeri 0,076'dır. EIA verileri iki farklı kombinasyon için de Mann-Whitney U testi kullanılarak karşılaştırılmış ve anlamlı bulunmuştur (p<0,0001).

Şekil 3.4-5: Saf HAZV ve KKKAV ile bağışıklanmış fare serumu kullanılarak çapraz



tepkimenin EIA yöntemiyle gösterilmesi.

96 kuyulu plaka kuyu başı 0,5 ve 1,0 µg/kuyu ultra saf HAZV ile kaplanmış ve KKKAV ile immünize ve kontrol olarak sağlıklı fare serumu kullanılarak test edilmiştir. EIA verileri istatistiksel olarak Mann-Whitney U testi ile karşılaştırılmış ve anlamlı bulunmuştur (p<0,0001).

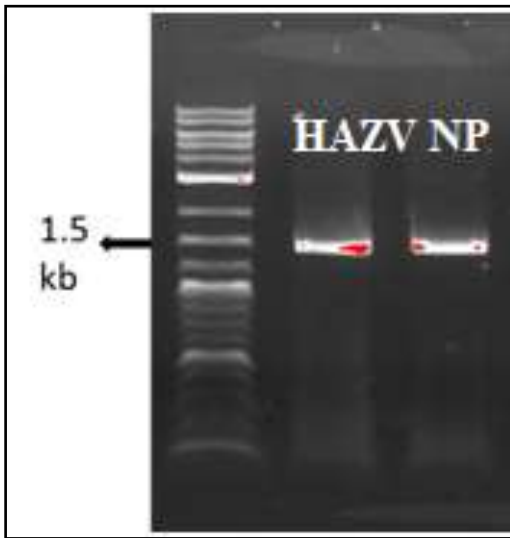
4.1.3. HAZV JC280 suşu Nükleoprotein Üretilmesi

HAZV JC280 suşu nükleoproteinini üretmek amacıyla proteine ait gen sekansının HAZV'den elde edilmesi hedeflenmiştir.

4.1.3.1. HAZV JC280 suşu Nükleoprotein Klonlanması

HAZV JC280 suşu nükleoproteinine (HAZV NP) ait gen sekansını HAZV'den elde etmek amacıyla BHK-21 hücreleri 1/1000 virüs/hücre oranında HAZV ile infekte

edilmiştir. İnfeksiyondan üç gün sonra infekte hücre lizatından RNA izolasyonu easy-spin™ (DNA free) Total RNA Extraction Kit (iNtRON Biotechnology Inc, Korea) kiti yardımıyla yapılmıştır. İzolasyon sonrası toplamda 2 µg RNA, SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit yardımıyla tek iplikli cDNA'ya çevrilmiştir. Elde edilen cDNA'nın 2 µl'si HAZV NP'nin 5 ve 3 terminal bölgelerine özgü primerlerin kullanıldığı PZR'da kalıp olarak kullanılmıştır. PZR sonucu HAZV NP'yi kodlayan DNA sekansı elde edilmiş ve %0.7'lik agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 3.4-6).



Şekil 3.4-6: PZR ile çoğaltılan HAZV NP geninin agaroz jelde analizi.

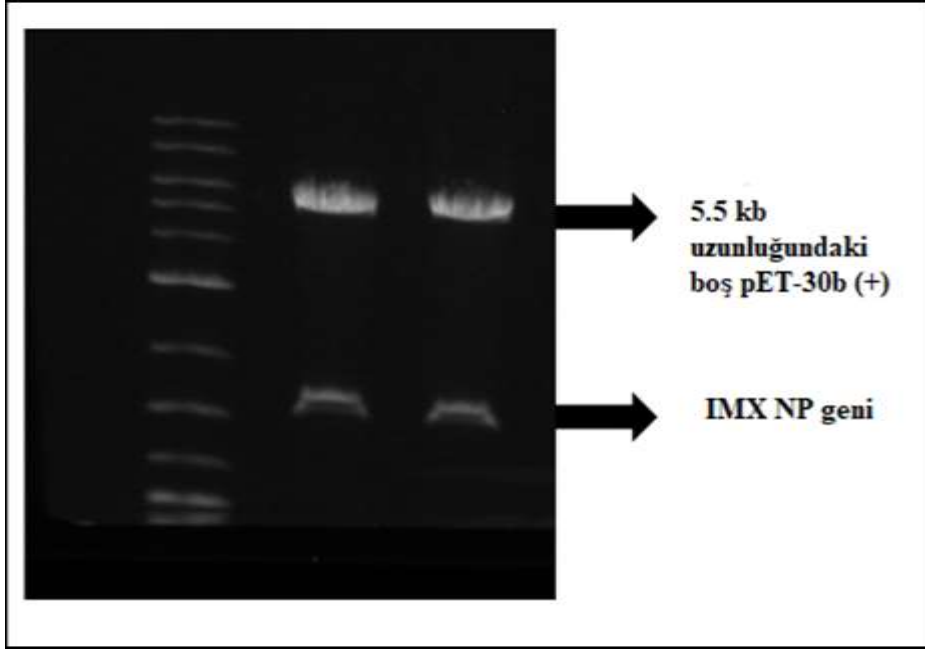
HAZV NP'yi kodlayan DNA sekansı NP'ye özgü primerlerle ve doğru okuma kapasitesine sahip polimeraz aracılığıyla çoğaltılmıştır. HAZV NP'yi kodlayan açık okuma çerçevesi 1455 baz çifti uzunluğundadır. Kullanılan marker Neb markasına ait Quick-Load® 1 kb Plus DNA Ladder'dir

PZR ile çoğaltılan ve agaroz jelde doğrulanan HAZV NP'yi kodlayan DNA sekansı IntronBio Fragment DNA Pürifikasyon Kiti (iNtRON Biotechnology Inc, Korea) yardımıyla temzilenmiş, miktar tayini yapılmış ve direksiyonel klonlamayı sağlayacak *NdeI* ve *XhoI* enzimleriyle kesilmiştir. Enzimler, kesimin ardından 65°C'de 20 dk inkübe edilerek ısı ile inhibe edilerek hedef gen klonlamaya hazır hâle getirilmiştir.

4.1.3.2. Klonlama Kullanılacak Vektörün Eldesi

Klonlamada bakteriyel ekspresyon plazmidi olan pET-30b(+) vektörü (Addgene, Cambridge, MA, USA) kullanılmıştır. Daha önceki çalışmalar için içinde başka bir genle satın alınmış olan vektör, HAZV NP'yi klonlamak üzere *NdeI* ve *XhoI*

enzimleriyle kesilmiş ve boş plazmid %0,7'lik agaroz jelden elde edilmiştir (Şekil 3.4-7).

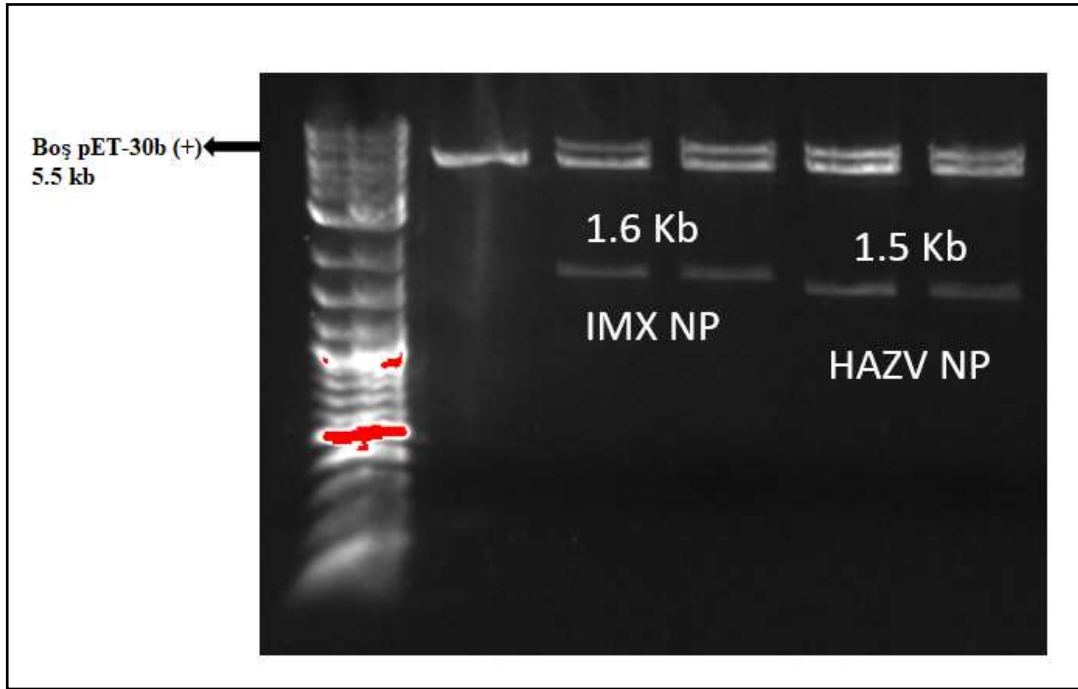


Şekil 3.4-7: pET-30b (+) vektörünün agaroz jelde görüntülenmesi.

Ticari olarak elde edilen pET-30b(+) vektörü *NdeI* ve *XhoI* enzimleriyle kesilmiş ve boş vektör jelden elde edilmiştir. Boş pET-30b (+) vektörü 5,5 kilobaz, IMX NP geni ise 1,6 kilobaz uzunluğundadır. Kullanılan marker Neb markasına ait Quick-Load® 1 kb Plus DNA Ladder'dir

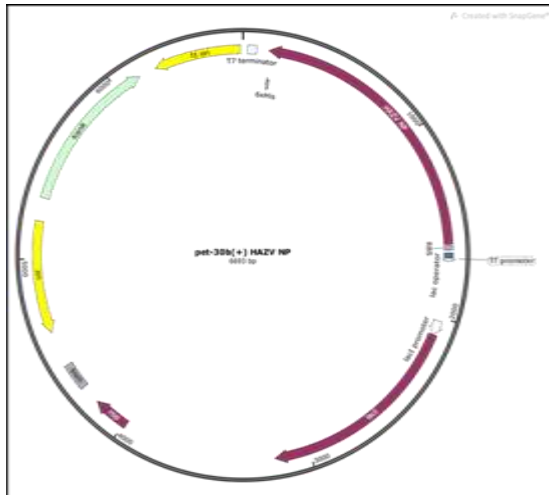
4.1.3.3. HAZV NP'sini Kodlayan DNA Sekansının pET-30b(+) Vektörüne Klonlanması

Uçlarında *NdeI* ve *XhoI* kesim enzimlerini kodlayan sekansların bulunduğu gene özgü primerlerle çoğaltılan HAZV NP'yi kodlayan ORF, uçlarında aynı enzim kesim bölgeleri bulunan pET-30b (+) vektör ile ligasyona uğratılmıştır. Ligasyon ürünü, eldesi hedeflenen HAZV NP'yi kodlayan DNA sekansını içeren pET-30b(+) plazmidini (HAZV NP pET-30b(+)) çoğaltmak amacıyla kompetan *E.coli* TOP10 hücrelerine transforme edilmiştir. İlk seçim 100 mikrogram/ml kanamisinli LB agar pleytlerinde yapılmış, aynı zamanda elde edilen kolonilerin HAZV NP genini içerip içermediği miniprep ürününün *NdeI-XhoI* enzimleriyle kesilmesiyle de gösterilmiştir (Şekil 3.4-8). pET-30 (+) vektörüne klonlanmış HAZV NP geni (pET-30b (+) HAZV NP) şekil 3.4-9'da gösterilmiştir.



Şekil 3.4-8: Pozitif transformant kolonilerin *NdeI* ve *XhoI* kesiminin agaroz jelde analizi.

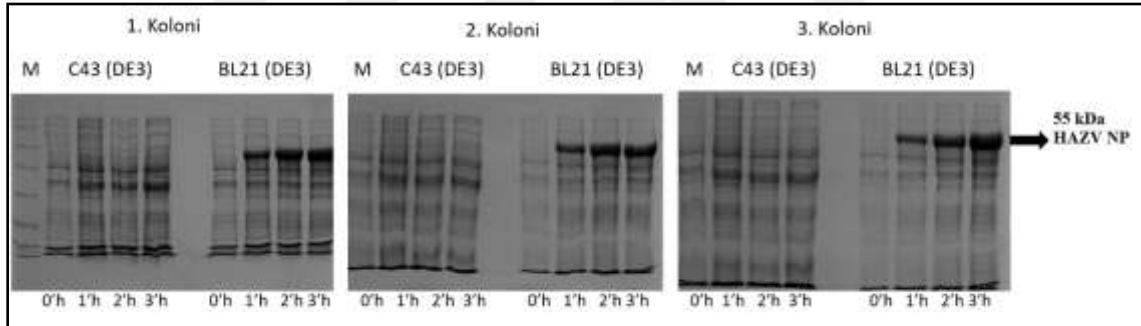
Elde edilen kolonilerden 4 tanesi kanamisinli LB sıvıbesiyerinde büyütülmüş ve miniprep yapılmıştır. Plazmid DNA'lar *NdeI* ve *XhoI* enzimleriyle kesilmiş ve iki koloninin kesilmeyen plazmit kaynaklı transformasyon sonucu IMX NP genini içerdiği, diğer iki koloninin ise HAZV NP genini içerdiği gen uzunluklarındaki boyut farkı aracılığıyla görülmüştür. IMX NP geni 1,6 kb, HAZV NP geni ise 1,45 kb uzunluğundadır. Kullanılan marker Neb markasına ait Quick-Load® 1 kb Plus DNA Ladder'dir.



Şekil 3.4-9: pET-30b (+) vektörüne klonlanmış HAZV NP geni haritası.

4.1.3.4. HAZV NP'nin Bakteride Üretimi

Hedef proteini *E. coli*'de açıklanmak ve saflaştırmak amacıyla *E. coli* TOP10'e klonlanmış pET-30b HAZV NP plazmidi, ekspresyon bakteri suşları olan C43(DE3) ve BL21(DE3) ekspresyon suşlarına transforme edilmiş ve ilk seçilim 100 mikrogram/ml kanamisinli LB agar pleytlerinde yapılmıştır. Her bir suştan 3'er adet koloni seçilmiş ve pilot ekspresyon yapılmıştır. 10 ml hacminde başlatılan kültürler, OD600 dalga boyunda absorbans değeri 0,4-0,6 değerleri arasına ulaştığında son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde IPTG ile indüklenmiştir ve analiz edilmek üzere birer saat arayla 1'er ml örnek alınmıştır. Ekspresyon indüklenme işleminden 3 saat sonra sonlandırılmış ve örnekler SDS-PAGE'de analiz edilmiştir (Şekil 3.4-10). Ekspresyon sonrası BL21(DE3) bakterilerinde yüksek seviye HAZV NP ekspresyonu görülmüş ve yüksek düzeyde protein elde edebilmek için pilot ekspresyon temel alınarak 900 ml kültür ile ekspresyon yapılmıştır.



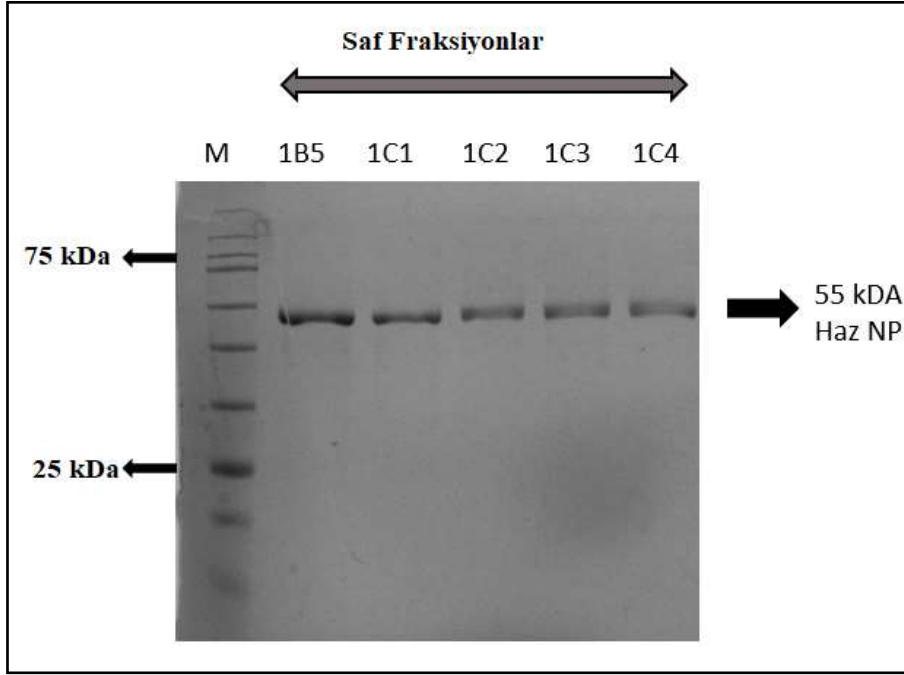
Şekil 3.4-10: BL21(DE3) ve C43(DE3)'e transforme edilen pET-30b (+) HAZV NP pilot ekspresyonunun SDS-PAGE Jel elektroforezi ile analizi.

Pilot ekspresyon 10 ml kültürde yapılmış ve IPTG indüklemesinin ardından örneklerden saat başı 1'er ml alınmıştır. 1 ml örnek 5000 rpm'de 3 dk santrifüjlenmiş ve pelet SDS-PAGE ile analiz edilmiştir. Analiz sonrası 55 kDa büyüklüğündeki HAZV NP hedef proteininin en fazla BL21(DE3) bakterilerinde eksprese edildiği görülmüştür. Marker olarak GangNam-STAIN™ Prestained Protein Ladder kullanılmıştır.

4.1.3.5. HAZV NP'nin Saflaştırılması

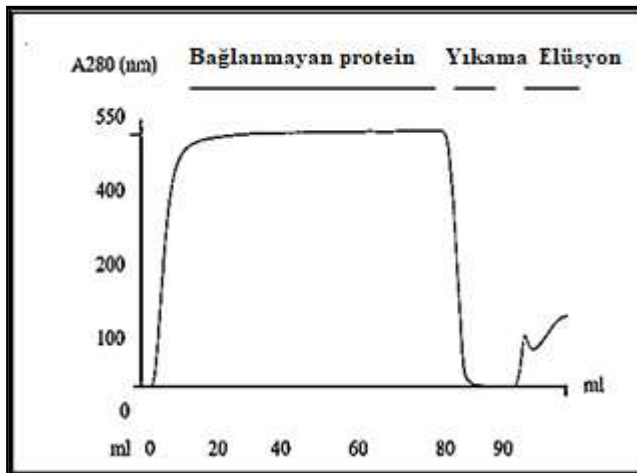
Ekspresyon sonrası kültür 7000 RPM'de 3 dk santrifüjlenerek üst sıvı uzaklaştırılmış ve HAZV NP içeren bakteri peleti 8M üre içeren lizis tampon ile resüspende edilmiştir. Elde edilen solüsyon üç defa dondurulup çözündürülmüş, %50 güç ile sonikasyona uğratılmış ve ardından oda sıcaklığında hafif çalkalama ile 2 saat inkübe edilmiştir. C Terminal 6XHis barındıran HAZV NP nikel iyonları aracılığıyla

saflaştırılmak üzere HisTrap excel 1ml (Cytiva, USA) kolonu GE Life Sciences AKTA Pure cihazı yardımıyla geçirilmiş ve saflaştırılmıştır. Saflaştırılan fragmentler SDS-PAGE ile analiz edilmiştir (Şekil 3.4-11). Saflaştırılan proteine özgü kromatogram şekil 3.4-12’de gösterilmiştir. Saflaştırılan protein, enzim immünoassay testinde yakalayıcı antijen olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.4-11: AKTA Pure cihazı yardımıyla nikel afinite kromatografisine dayalı HisTrap Excel kolonu ile His-Tag barındıran HAZV NP protein pürifikasyonu fraksiyonlarının SDS-PAGE ile analizi.

Analiz sonrası 55 kDa büyüklüğündeki HAZV NP hedef proteinine (1B5-1C4) ait saf fraksiyonlar görüntülenmiştir. Marker olarak GangNam-STAIN™ Prestained Protein Ladder kullanılmıştır.



Şekil 3.4-12: AktaPure HAZV NP pürifikasyon grafiği.

4.1.4. KKKAV NP Üretimi ve Saflaştırılması

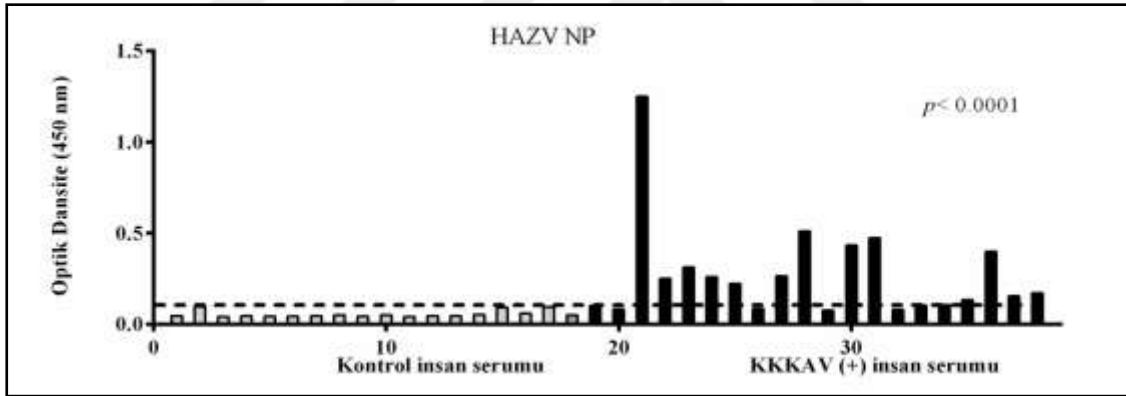
Söz konusu projede HAZV'nin KKKAV için model organizma olup olmayacağı tüm virüse ve iki virüsün nükleoproteinlerine (NP) yönelik hümmoral antikor yanıtı benzerliği üzerinden araştırılmıştır. İki virüsün NP'leri arasındaki antijenik benzerlik sorusunu tam olarak cevaplayabilmek için HAZV NP ile yapılan deneylerin KKKAV NP ile gerçekleştirilmesi icap etmektedir. Bu sebeple daha önceki projelerde kullanılmak üzere üretilmiş olan KKKAV NP, söz konusu çalışmalarda kullanılmıştır. KKKAV NP üretimi özetle şu şekilde gerçekleşmiştir: KKKAV NP üretimi için, GenBank'tan (erişim no. GQ337053) alınan KKKAV Kelkit06 NP'nin (1.449 bp) nükleotid dizisi bakteriyel ekspresyon için optimize edilmiş hâlde sentetik olarak sentezlenmiş ve pUC19'a (GenScript USA Inc., Nanjing, China) klonlanmıştır. KKKAV rNP, Gereç ve Yöntem'de tarif edildiği üzere HAZV rNP ile aynı koşullar altında eksprese edilmiş, saflaştırılmış, diyaliz edilmiş ve ve EIA için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Karaaslan ve vb, yayın aşamasında).

4.1.5. HAZV ve KKKAV Arasındaki Çapraz Tepkimenin HAZV NP ve KKKAV NP Kullanılarak Gösterilmesi

4.1.5.1. KKKA Konvalesan İnsan Serumı ile Enzim İmmüno Assay (EIA)

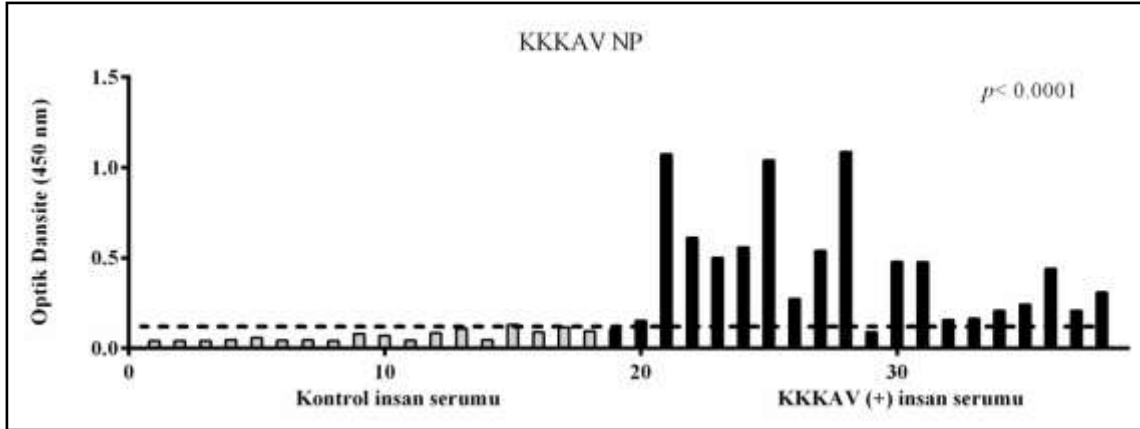
Hazara JC280 suşu NP'si ile KKKAV Kelkit06 NP'si arasında çapraz tepkime varlığı ya da yokluğu KKKA geçirmiş hasta serumları kullanılarak EIA yöntemiyle analiz edilmiştir. İki virüsün kodladığı NP'ler arasındaki antikor yanıtı benzerliğini ortaya çıkarmak üzere 96 kuyulu plakalar kuyu başı 0.1 µg/100 µl olacak şekilde HAZV NP ve KKKAV NP ile kaplanmıştır. Bu amaçla 20 adet KKKA konvalesan insan serumu ve kontrol olarak 20 adet KKKAV yönünden negatif insan serumu kullanılmıştır. Birincil antikorlar insan serumlarının bloklama tamponunda 1:100 oranında seyreltilmesiyle hazırlanmış ve kuyu başı 100 µl olacak şekilde kullanılmıştır. HRP ile konjuge edilmiş keçi anti-insan IgG-HRP ikincil antikor BioRad firmasının (5172-2504) katalog numaralı antikorunun 1:10000 oranında bloklama tamponunda seyreltilmesiyle hazırlanmış ve kuyu başı 100 µl olacak şekilde kullanılmıştır. Reaksiyon abcam firmasının (ab171523) katalog numaralı TMB ELISA Substratı ile ortaya çıkarılmış ve kuyu başı 100 µl 2N H₂SO₄ ile sonlandırılmıştır. Absorbansa dayalı reaksiyon ölçümü 450 nm dalgaboyunda yapılmıştır. Kontrol hastalarından 2 tanesi dışlanarak 18 sağlıklı insan verisi ile 2XSD cut-off değeri hesaplanmıştır. Bu amaçla 18 adet negatif kontrol optik dansite (OD) verisinden standart sapma (SD)

hesaplanmıştır: HAZV NP ve KKKAV NP temelli EIA için sırasıyla SD; 0,0181 ve 0,028'dir. Ortalama değer sırasıyla 0,055 ve 0,068'dir. Cut-off değeri $2XSD + \text{ortalama}$ formülüyle hesaplanmıştır ve HAZV NP ve KKKAV NP temelli EIA için sırasıyla cut-off değeri 0,091 ve 0,125'dir. HAZV NP temelli EIA sonucuna göre 20 KKKA hastasının 16'sı cut-off değerinin üzerinde kalırken, KKKAV NP temelli EIA verisine göre 20 KKKA hastasının 18'i cut-off değerinin üzerinde kalmıştır. Bu sonuçlara göre HAZV NP temelli EIA'nın sensitivite ve spesifitesi sırasıyla %80 ve %90 iken; KKKAV NP temelli EIA sensitivite ve spesifitesi %90'dır (Şekil 3.4-13 ve 3.4-14). Bu sonuçlar, KKKAV ve HAZV NP'leri arasında ikna edici seviyede çapraz tepkime varlığını ortaya koymaktadır. Her bir veri, optik değerlerin ortalaması alınarak hesaplanmış ve birbirinden bağımsız iki deney duplike olarak çalışılmıştır. Gruplandırılmış EIA verileri Mann-Whitney U testi kullanılarak karşılaştırılmış ve anlamlı bulunmuştur ($p < 0,0001$).



Şekil 3.4-13: Saf HAZV NP ve KKKA konvalesan sera kullanılarak çapraz tepkimenin EIA yöntemiyle gösterilmesi.

96 kuyulu plaka kuyu başı 0,1 µg/kuyu ultra saf HAZV NP ile kaplanmış ve KKKAV (+) insan ve kontrol olarak sağlıklı insan serumu ile test edilmiştir. Kullanılan 20 adet KKKA konvalesan seradan 16'sı cut-off üzerinde kalmıştır. 20 adet sağlıklı insan serumundan 2 adet serum dışlanmış 18 adet sağlıklı insan verisi ile SD ve $2XSD$ cut-off değeri hesaplanmıştır. Bu verilere göre yapılan EIA'nın sensitivite ve spesifitesi sırasıyla %80 ve %90'dır. EIA verileri istatistiksel olarak Mann-Whitney U testi ile karşılaştırılmış ve anlamlı bulunmuştur ($p < 0,0001$).

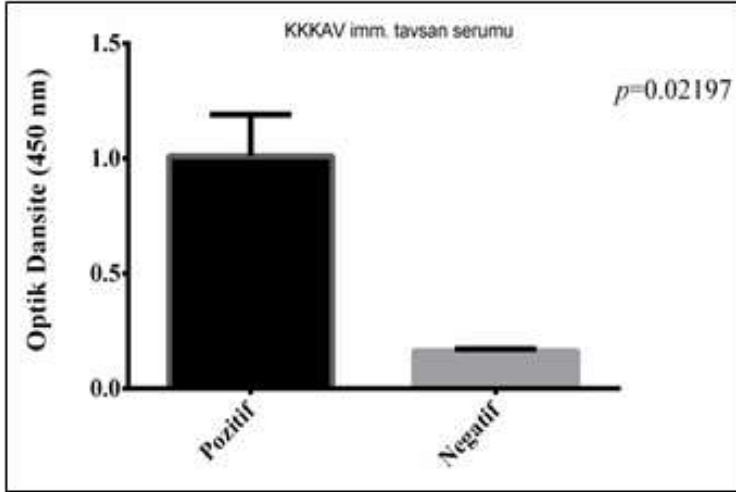


Şekil 3.4-14: Saf KKKAV NP ve KKKA konvalesan sera kullanılarak çapraz tepkimenin kontrolü.

96 kuyulu plaka kuyu başı 0,1 µg/kuyu ultra saf KKKAV NP ile kaplanmış ve KKKAV (+) insan ve kontrol olarak sağlıklı insan serumu ile test edilmiştir. Kullanılan 20 adet KKKA konvalesan seradan 18'i cut-off üzerinde kalmıştır. 20 adet sağlıklı insan serumundan 2 adet serum dışlanmış 18 adet sağlıklı insan verisi ile SD ve 2XSD cut-off değeri hesaplanmıştır. Bu verilere göre yapılan EIA'nın sensitivite ve spesifitesi %90'dır. EIA verileri istatistiksel olarak Mann-Whitney U testi ile karşılaştırılmış ve anlamlı bulunmuştur ($p < 0,0001$).

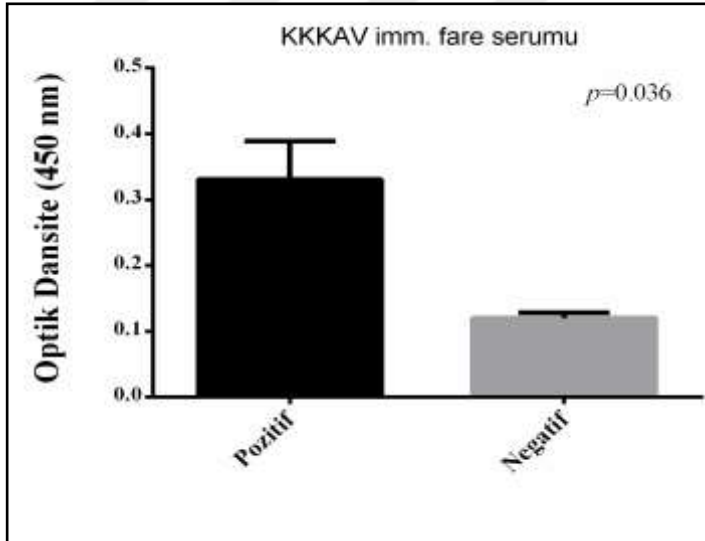
4.1.5.2. KKKAV ile bağışıklanmış tavşan ve fare serumu ile çapraz tepkimenin gösterilmesi

HAZV NP ve KKKAV NP arasındaki çapraz tepkimeyi göstermek amacıyla inaktif KKKAV ile bağışıklanmış tavşan (Şekil 3.4-15) ve fare (Şekil 3.4-16) serumu kullanılmıştır. Bu sebeple 96 kuyulu plakalar tavşan serumu için 10 µg/kuyu; fare serumu için 1µg/kuyu HAZV NP ile kaplanmışır. Tavşan serumu 1:200 oranında, fare serumu ise 1:100 oranında seyreltilerek primer antikor olarak kullanılmıştır. Tavşan serumu için HRP ile konjuge edilmiş 2030 katalog numaralı Santa CruzBiotechnology, Inc firmasına ait ikincil antikor 1:5000 oranında kullanılırken; fare serumu için HRP ile konjuge edilmiş 2005 katalog numaralı Santa CruzBiotechnology, Inc firmasına ait ikincil antikor 1:1000 oranında kullanılmıştır. . Reaksiyon abcam firmasının (ab171523) katalog numaralı TMB ELISA Substratı ile ortaya çıkarılmış ve kuyu başı 100 µl 2N H₂SO₄ ile sonlandırılmıştır. Absorbansa dayalı reaksiyon ölçümü 450 nm dalgaboyunda yapılmıştır. EIA verileri, iki kuyruklu eşleştirilmemiş t testi ile karşılaştırılmış ve anlamlı bulunmuştur.



Şekil 3.4-15: HAZV NP ve KKKAV NP arasındaki antijenik benzerliğin KKKAV ile immünize tavşan serumu ile gösterilmesi.

96 kuyulu plaka 10 µg/kuyu saf HAZV NP ile kaplanmış ve KKKAV ile bağışıklanmış tavşan serumlarına karşı EIA yöntemiyle test edilmiştir. Negatif kontrol olarak bağışıklanmamış tavşan serumu kullanılmıştır. Serum dilüsyonu 1:200'dür ve cut-off değeri 0,176 olarak hesaplanmıştır. EIA verileri, iki kuyuklu eşleştirilmemiş t testi ile karşılaştırılmış ve anlamlı bulunmuştur.

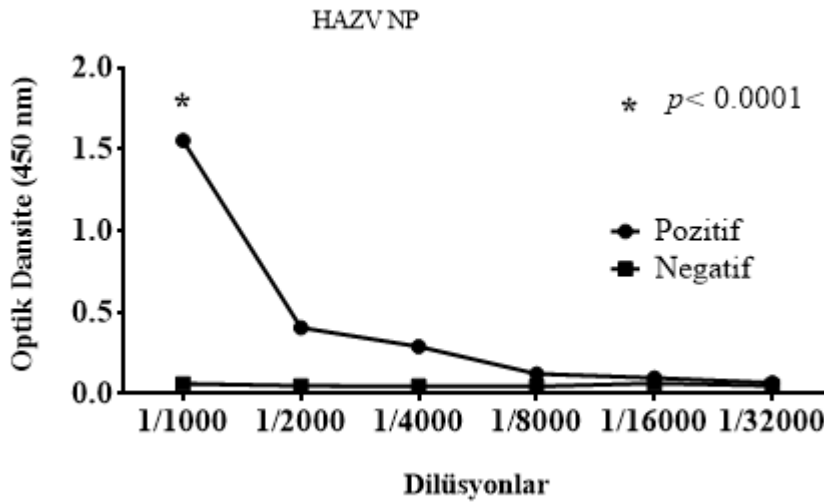


Şekil 3.4-16: HAZV NP ve KKKAV NP arasındaki antijenik benzerliğin KKKAV ile immünize fare serumu ile gösterilmesi.

96 kuyulu plaka 1 µg/kuyu saf HAZV NP ile kaplanmış ve KKKAV ile bağışıklanmış fare serumlarına karşı EIA yöntemiyle test edilmiştir. Negatif kontrol olarak bağışıklanmamış fare serumu kullanılmıştır. Serum dilüsyonu 1:100'dür ve cut-off değeri 0,131 olarak hesaplanmıştır. EIA verileri, iki kuyuklu eşleştirilmemiş t testi ile karşılaştırılmış ve anlamlı bulunmuştur.

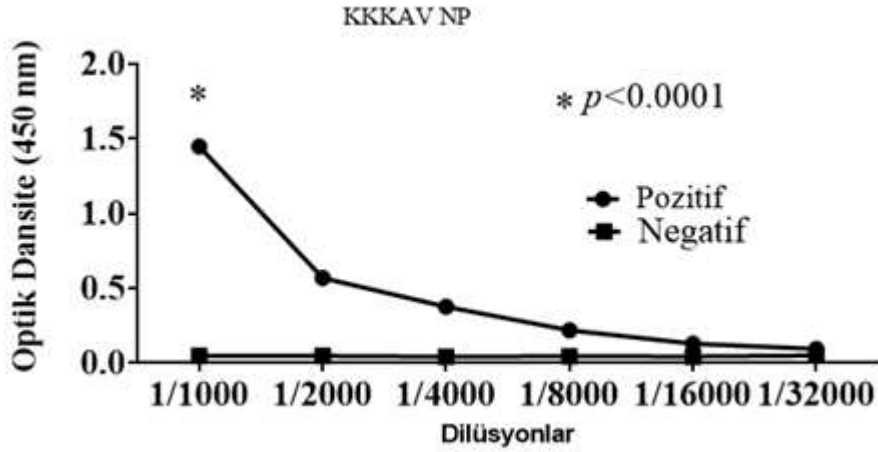
4.1.5.3. KKKAV NP ile bağışıklanmış fare serumu ile çapraz tepkimenin gösterilmesi

HAZV NP ve KKKAV NP arasındaki çapraz tepkimeyi göstermek amacıyla KKKAV NP ile bağışıklanmış fare serumu kullanılarak titrasyon EIA yöntemiyle test edilmiştir. Bu amaçla 96 kuyulu plakalar 1 µg/kuyu saf HAZV NP (Şekil 3.4-17) ve kontrol olarak aynı miktarda saf KKKAV NP (Şekil 4-18) ile kaplanmıştır. Pozitif ya da negatif serum örnekleri 1:1000 oranından başlayarak 1:32000'e kadar 2 kat seri olarak seyreltilmiştir. İkincil antikor olarak HRP ile konjuge edilmiş 2005 katalog numaralı Santa Cruz Biotechnology, Inc firmasına ait ticari antikor 1:1000 oranında kullanılmıştır. Reaksiyon abcam firmasının (ab171523) katalog numaralı TMB ELISA Substratı ile ortaya çıkarılmış ve kuyu başı 100 µl 2N H₂SO₄ ile sonlandırılmıştır. Absorbansa dayalı reaksiyon ölçümü 450 nm dalgaboyunda yapılmıştır. EIA verileri, iki kuyruklu eşleştirilmemiş t testi ile karşılaştırılmış ve anlamlı bulunmuştur.



Şekil 3.4-17: KKKAV NP ile immunize fare serumu ile titrasyon EIA.

96 kuyulu plakalar 1 µg/kuyu HAZV NP ile kaplanmış ve KKKAV NP ile bağışıklanmış fare serumuna karşı EIA ile test edilmiştir. Pozitif ve negative serumlar 2 kat seyreltme ile 1:1000'den başlayarak 1:32000'e kadar bloklama tampon içinde seyreltilmiştir. Serumlar duplike olarak çalışılmıştır. Anti-KKKAV NP fare serumu 1:32000 dilüsyonda dahi HAZV NP'yi yakalayabilmiştir. Cut-off değeri 0,069'dur ve her pozitif serumların OD değeri her br dilüsyonda cut-off değerinin üzerinde kalmıştır. İlk dilüsyondaki EIA verileri, iki kuyruklu eşleştirilmemiş t testi ile karşılaştırılmış ve anlamlı bulunmuştur.

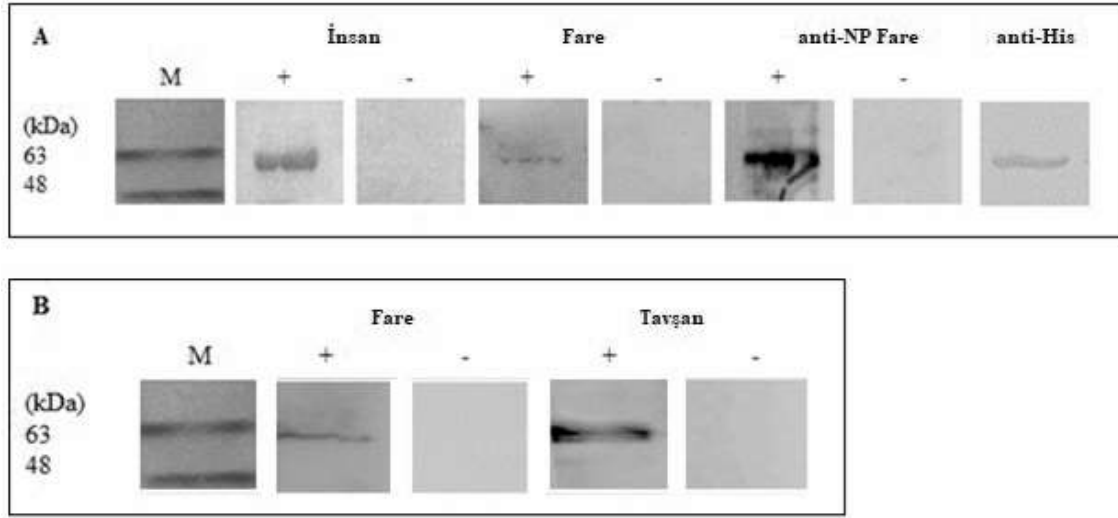


Şekil 3.4-18: KKKAV NP ile immunize fare serumu ile titrasyon EIA.

96 kuyulu plakalar kontrol olarak 1 µg/kuyu KKKAV NP ile kaplanmış ve KKKAV NP ile bağışıklanmış fare serumuna karşı EIA ile test edilmiştir. Pozitif ve negative serumlar 2 kat seyreltme ile 1:1000'den başlayarak 1:32000'e kadar bloklama tampon içinde seyreltilmiştir. Serumlar duplike olarak çalışılmıştır. Anti-KKKAV NP fare serumu 1:32000 dilüsyonda dahi HAZV NP'yi yakalayabilmiştir. Cut-off değeri 0,053'tür ve her pozitif serumların OD değeri her bir dilüsyonda cut-off değerinin üzerinde kalmıştır. İlk dilüsyondaki EIA verileri, iki kuyruklu eşleştirilmemiş t testi ile karşılaştırılmış ve anlamlı bulunmuştur.

4.1.6. Çapraz Tepkimenin Western Blotlama İle Gösterilmesi

KKKAV ve HAZV arasındaki antijenik ilişkiyi araştırmak için anti-KKKAV fare ve tavşan serumları; anti-KKKAV-NP fare serumları western blotlama birincil antikoru olarak kullanılmıştır (Şekil 4-19 A). Bu çalışmalarda HAZV ile infekte edilmiş hücre lizati ve negatif kontrol olarak infekte edilmemiş hücre lizati eşit konsantrasyonlarda antijen olarak kullanılmış ve iki virüsün NP'leri arasındaki çapraz tepkimeyi ortaya koyan 55 kDa büyüklüğündeki HAZV NP tüm pozitif serumlarda tespit edilmiştir (Şekil 3.4-19 B).



Şekil 3.4-19: Çapraz tepkimenin western blotlama ile gösterilmesi.

A) Saf HAZV NP SDS-PAGE'de yürütülmüş ve nitroselüloz membrana transfer edilmiştir. KKKAV ile bağışıklanmış/infekte olmuş fare ve insan serumları; KKKAV NP ile bağışıklanmış fare serumu ve anti-His tag antikoru ile işaretlenmiştir. (+) KKKAV ile infekte ya da immünize; (-) sağlıklı ya da naif. **B)** HAZV ile infekte ya da infekte olmamış hücre lizatı SDS-PAGE'de yürütülmüş ve nitroselüloz membrana transfer edilmiştir. KKKAV ile bağışıklanmış fare ya da tavşan serumları birincil antikor olarak kullanılmıştır. M: Marker: Marker olarak GangNam-STAIN™ Prestained Protein Ladder kullanılmıştır. (+); HAZV ile infekte hücre lizatı, (-); infekte olmamış hücre lizatı.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada sunulan veriler, farklı türlerdeki humoral immün yanıt aracılığıyla HAZV ve KKKAV arasındaki antijenik benzerlikleri inkâr edilemez bir şekilde ortaya çıkarmıştır. HAZV ve KKKAV NP'leri arasındaki güçlü çapraz tepkime varlığı tüm KKKAV ve KKKAV NP ile bağışıklanmış fare ve tavşan poliklonal serumlarının yanı sıra KKKAV konvalesan hasta serumları kullanılarak gösterilmiştir. İki virüsün NP'leri arasındaki çapraz tepkimenin doğrulanması yukarıda listelenen birincil antikorlarla HAZV NP'nin EIA ve western blotlamada antijen olarak kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, NP'nin antijenik otantitesi HAZV ile infekte hücre lizatının antijen olarak kullanıldığı western blotlamada inaktif KKKAV ve KKKAV NP ile bağışıklanmış fare serumlarının birincil antikor olarak kullanılmasıyla ortaya çıkarılmıştır. Bu sebeple söz konusu tez çalışması, iki virüs arasındaki anti-NP hümmoral immün yanıt benzerliğini kanıtlayan ilk rapor özelliğini taşımaktadır.

KKKA hastalığının yüksek ölüm oranı ve herhangi bir kabul edilmiş bir tedavisinin ya da aşısının olmaması, KKKAV'yi halk sağlığı adına ciddi bir tehdit hâline getirmiştir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), BSL-4 laboratuvarlarında çalışılması gereken KKKAV'yi, öncelikli çalışılması gereken patojenler listesine eklemiştir [103]. Bununla birlikte, genetik olarak KKKAV ile ilişkili olan HAZV insan patojeni değildir ve BSL2 koşullarında çalışılabilir. HAZV ilk defa 1964 yılında, Pakistan'ın Hazara bölgesinde bulunan *Ixodes redikorzevi* tipi kenelerden izole edilmiş ve KKKAV ile aynı serogrupta sınıflandırılmıştır [104]. Bu sebeple HAZV, KKKAV için potansiyel bir model olabilir. Buna rağmen HAZV'nin biyolojisi ve immünolojisine dair çalışmalar oldukça sınırlıdır [12, 105].

HAZV ve KKKAV de dâhil olmak üzere diğer nairovirüsler arasındaki antijenik benzerlikler 40 yıl önceki çalışmalarla adreslenmiş ve enteresan şekilde bu çalışmalar farklı araştırmalarla doğrulanmamıştır. Casal ve arkadaşları tarafından 1980 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada nairovirüslerin yapısal özellikleri ele alınmıştır [79]. Bu araştırmada KKKAV ve HAZV arasındaki çapraz tepkime varlığı nötralizasyon ve hemaglutinasyon inhibisyon deneyleriyle ortaya konmuştur. Foulke ve arkadaşları tarafından 1981'de gerçekleştirilen başka bir çalışmada HAZV'nin farelerde KKKAV'ye karşı çapraz koruma sağladığı gözlem olarak belirtilmiştir [80]. Bu

raporlardan 10 yıl sonra, iki virüsün S segmentleri arasında sekans benzerliği ve zayıf miktarda antijenik çapraz tepkime varlığı 1992 yılında Marriott ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırmayla gösterilmiştir [106]. Güncel bir araştırmada KKKAV ve HAZV'nin immün yetersiz farede benzer patoloji gösterdiği ve iki virüsün de embriyo tavuk yumurtasında ölümcül etki gösterdiği raporlanmıştır [82]. 2020 yılında HAZV ile yapılan bir çalışmada koyun ve sığırların HAZV ile infekte edilemediği söz konusu hayvanlarda herhangi bir klinik semptom, viremi ya da virüse özgü antikor oluşmaması yoluyla gösterilmiştir [107]. Bunun sebebi, yapılan çalışmada infeksiyonda yeterli miktarda infektif virüs kullanılmaması, uygulamanın yapıldığı bölge ya da kenelerin doğal infeksiyonda tükürükle beraber virüsü hayvana zerk etmesi ve bu tükürükte doğal infeksiyonu başlatacak faktörlerin olabilme ihtimali sayılmakla beraber tüm bu ihtimaller tamamıyla varsayımlardır. Bu sebeple bu tür çalışmaların farklı çalışmalar ve ekipler tarafından doğrulanması faydalı olacaktır. Söz konusu çalışmalardan ayrı olarak, HAZV'nin KKKAV'ye karşı potansiyel kullanımına dair ayrıntılı çalışmalar mevcut değildir. Raporlanan bu çalışmalar oldukça sınırlıdır ve HAZV ve KKKAV'nin protein seviyesinde antijenik benzerlikler paylaştığını ve HAZV'nin KKKAV için kapsamlı bir model olabileceğini kanıtlamaya yeterli değildir. Bu çalışma HAZV JC280 suşu NP'sini kullanarak bu noktayı adreslemeye yönelik gerçekleştirilmiştir.

Birçok RNA virüsünde, viral NP'ler hümmoral ve hüccresel immün yanıtı stimule edebilirler [108]. RNA virüslerinde NP'ler birçok role sahip en baskın proteindir ve olgun virüste RNP yapısını oluşturmaktadır [109]. İki virüsün NP'lerinin kristal yapısı çözülmüş ve ikisinin de birbirine esnek bir bölgeyle bağlı bir globüler ve iki kol domaini taşıyarak birbiriyle çakıştığı ve yapısal ve kimyasal olarak birbirine benzer olduğu gösterilmiştir [68]. İki virüsün NP'si de virüs büyümesinde aktif rol oynayan ısı şoku protein 70 ile etkileşime girmektedir [110]. HAZV NP ile yapılan proteomik çalışmalar NP'nin hücre savunma mekanizması, hücre metabolizması ve morfolojisi gibi zorunlu hüccresel süreçlere ve dinamik hücre büyümesine katıldığını göstermiştir [111]. Ayrıca bunyavirüslerde NP, dominant antijen olarak tanındığı için T ve B hücre yanıtını tetiklemektedir. Ebola, Hanta, kızamık ve Rift Valley virüs gibi pek çok virüse karşı geliştirilen aşı formülasyonlarında NP antijenik hedef olarak seçilmiş ve koruyucu olduğu gösterilmiştir [112-114]. Söz konusu tez çalışmasında HAZV NP kullanıldığında %80 sensitivite ve %90 spesifiteye sahip; KKKAV NP kullanıldığında

ise %90 sensitivite ve spesifiteye sahip KKKAV ile indüklenmiş IgG'ye özgü EIA sistemi geliştirilmiştir. Bu çalışma KKKAV'den kurtulmuş hasta serumları aracılığıyla iki virüs arasında güçlü bir çapraz tepkime varlığını göstermektedir. KKKAV NP'ye karşı antikorların tespiti NP'yi tanıda kullanılabilecek kıymetli bir antijen hâline getirmektedir [115, 116]. Buna ilaveten, farklı türlerde humoral immün cevap yoluyla tespit edilen iki virüsün NP'leri arasındaki benzerlik bu proteinlerin benzer antijenik epitoplara sahip olduğunu ve B hücreleri için uygun antijenik yapılar taşıdığını göstermektedir. NP gibi birçok internal proteine karşı gelişen antikorlar nötralizan aktiviteye sahip olmayabilir fakat kompleman aracılı hücre lizisi, artmış dendritik hücre fonksiyonu ve düşmüş viral replikasyonu gibi enfeksiyona karşı immün yanıtta katkı sağlayacak yolları aktive edebilir [117]. Tüm bu sonuçlarla beraber, enfeksiyonun doğa süreci boyunca NP'ye özgü azımsanmayacak bir antikor yanıtı oluşmakta ve CD⁺ T hücreleri iki NP'yi de farklı türlerde tanıyabilmektedir. Bu veriler aynı zamanda HAZV'nin KKKAV'ye karşı gelişen hücre ve humoral immün yanıtı çalışmak için model olabileceğini düşündürmektedir. Diğer yandan söz konusu çıktılar HAZV'nin KKKAV için BSL2 şartlarında çalışılabilecek bir model olduğunu da göstermektedir.

Çalışmamızın sınırlamalarından biri antijenik proteinlerin epitopları ile ilgilidir. İlgili viral proteinlerin kesin epitoplarını haritalamak çalışmanın kapsamı açısından ideal olabilirdi. Bu veriler, antijenik benzerlikler açısından yapısal bir temel oluşturmaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışma ile, iki virüsün NP'leri ve tüm virüs arasındaki benzerliği humoral bağışıklık tepkisi açısından incelenmiştir. İki virüsün NP'lerinin tetiklediği adaptif immün yanıt yani T hücre yanıtı ileri çalışmalarla ele alınmalıdır ve KKKAV'ye karşı potansiyel aşı çalışmalarında HAZV NP'nin daha detaylı araştırmalara konu olması yararlı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Grashchenkov, N., *Investigations of etiology, pathogenesis, and clinical symptomatology of Crimean hemorrhagic fever [in Russian]*. 1944, Reports.
2. Chumakov, M.P., et al., *[Studies on factors influencing the effectiveness of immunization against tick-borne encephalitis. I. Effect of immunogenic properties of vaccines on the effectiveness of vaccination and revaccination]*. Vopr Virusol, 1965. **10**(2): p. 168-72.
3. Chumakov, M., *Contribution to 30 years of investigation of Crimean hemorrhagic fever*. Medical Virology Trudy Inst Polio Virus Entsef Akad Med Nauk SSSR, 1974. **22**: p. 518.
4. Hoogstraal, H., *The epidemiology of tick-borne Crimean-Congo hemorrhagic fever in Asia, Europe, and Africa*. J Med Entomol, 1979. **15**(4): p. 307-417.
5. Casals, J., *Antigenic similarity between the virus causing Crimean hemorrhagic fever and Congo virus*. Proc Soc Exp Biol Med, 1969. **131**(1): p. 233-6.
6. Ergonul, O., *Crimean–Congo hemorrhagic fever virus: new outbreaks, new discoveries*. Current Opinion in Virology, 2012. **2**(2): p. 215-220.
7. Bente, D.A., et al., *Crimean-Congo hemorrhagic fever: History, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity*. Antiviral Research, 2013. **100**(1): p. 159-189.
8. Chumakov, M.J.C.h.f.S., Moscow: Izd Otd Primorskoi Armii, *A new tick-borne virus disease—Crimean hemorrhagic fever*. 1945: p. 13-45.
9. Butenko, A., et al., *Isolation and Investigation of Astrakhan Strain ('Drozdov') of Crimean Hemorrhagic Fever Virus and Data on Serodiagnosis of this Infection*. 1968, NAVAL MEDICAL RESEARCH UNIT NO 3 FPO NEW YORK 09527.
10. Hoogstraal, H.J.A.R.o.E., *Ticks in relation to human diseases caused by viruses*. 1966. **11**(1): p. 261-308.
11. BEGUM, F., C. Wisseman Jr, and R.J.A.j.o.e. Traub, *TICK-BORNE VIRUSES OF WEST PAKISTAN: I. ISOLATION AND GENERAL CHARACTERISTICS*. 1970. **92**(3): p. 180-191.
12. Smirnova, S.E., et al., *Experimental Hazara Virus infection in mice*. Acta Virol, 1977. **21**(2): p. 128-32.
13. Maes, P., et al., *Taxonomy of the family Arenaviridae and the order Bunyavirales: update 2018*. 2018. **163**(8): p. 2295-2310.
14. Abudurexiti, A., et al., *Taxonomy of the order Bunyavirales: update 2019*. 2019. **164**(7): p. 1949-1965.
15. Lasecka, L. and M.D. Baron, *The molecular biology of nairoviruses, an emerging group of tick-borne arboviruses*. Archives of Virology, 2014. **159**(6): p. 1249-1265.
16. Causey, O.R., et al., *Congo virus from domestic livestock, African hedgehog, and arthropods in Nigeria*. 1970. **19**(5): p. 846-850.
17. Shepherd, A., et al., *Experimental studies on the replication and transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in some African tick species*. 1989. **40**(3): p. 326-331.
18. Durden, L.A., et al., *Experimental vector incompetence of a soft tick, Ornithodoros sonrai (Acari: Argasidae), for Crimean-Congo hemorrhagic fever virus*. 1993. **30**(2): p. 493-496.

19. Nuttall, P.A., et al., *Adaptations of arboviruses to ticks*. 1994. **31**(1): p. 1-9.
20. Estrada-Peña, A. and J.J.A.r. de la Fuente, *The ecology of ticks and epidemiology of tick-borne viral diseases*. 2014. **108**: p. 104-128.
21. Swanepoel, R., et al., *Epidemiologic and clinical features of Crimean-Congo hemorrhagic fever in southern Africa*. *Am J Trop Med Hyg*, 1987. **36**(1): p. 120-32.
22. Wilson, M.L., et al., *Distribution of Crimean-Congo hemorrhagic fever viral antibody in Senegal: environmental and vectorial correlates*. 1990. **43**(5): p. 557-566.
23. Zeller, H., J. Cornet, and J.J.R.i.v. Camicas, *Crimean-Congo haemorrhagic fever virus infection in birds: field investigations in Senegal*. 1994. **145**: p. 105-109.
24. Appannanavar, S.B. and B.J.J.o.g.i.d. Mishra, *An update on Crimean Congo hemorrhagic fever*. 2011. **3**(3): p. 285.
25. Celikbas, A.K., et al., *Crimean-Congo hemorrhagic fever among health care workers, Turkey*. 2014. **20**(3): p. 477.
26. Makwana, D., et al., *First confirmed case of Crimean-Congo haemorrhagic fever from Sirohi district in Rajasthan State, India*. 2015. **142**(4): p. 489.
27. Spengler, J.R., E. Bergeron, and P.E. Rollin, *Seroepidemiological Studies of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Domestic and Wild Animals*. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 2016. **10**(1).
28. Mamuchishvili, N., et al., *Notes From the Field: Increase in Reported Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Cases--Country of Georgia, 2014*. 2015. **64**(8): p. 228-229.
29. Sahak, M.N., F. Arifi, and S.A.J.I.J.o.I.D. Saeedzai, *Descriptive epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) in Afghanistan: reported cases to National Surveillance System, 2016–2018*. 2019. **88**: p. 135-140.
30. Jameson, L.J., et al., *Importation of Hyalomma marginatum, vector of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus, into the United Kingdom by migratory birds*. *Ticks Tick Borne Dis*, 2012. **3**(2): p. 95-9.
31. Hansford, K.M., et al., *Hyalomma rufipes on an untraveled horse: Is this the first evidence of Hyalomma nymphs successfully moulting in the United Kingdom?* *Ticks Tick Borne Dis*, 2019. **10**(3): p. 704-708.
32. Atkinson, B., et al., *Sequencing and phylogenetic characterisation of a fatal Crimean–Congo haemorrhagic fever case imported into the United Kingdom, October 2012*. 2012. **17**(48): p. 20327.
33. Lumley, S., et al., *Non-fatal case of Crimean-Congo haemorrhagic fever imported into the United Kingdom (ex Bulgaria), June 2014*. *Eurosurveillance*, 2014. **19**(30): p. 6-8.
34. Mazzola, L.T. and C. Kelly-Cirino, *Diagnostic tests for Crimean-Congo haemorrhagic fever: a widespread tickborne disease*. *Bmj Global Health*, 2019. **4**.
35. Vanhomwegen, J., et al., *Diagnostic assays for Crimean-Congo hemorrhagic fever*. 2012. **18**(12): p. 1958.
36. Tezer, H. and M.J.E.r.o.a.-i.t. Polat, *Diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever*. 2015. **13**(5): p. 555-566.
37. Fernandez-Garcia, M.D., et al., *European survey on laboratory preparedness, response and diagnostic capacity for Crimean-Congo haemorrhagic fever, 2012*. 2014. **19**(26): p. 20844.

38. Filippone, C., et al., *Molecular diagnostic and genetic characterization of highly pathogenic viruses: application during Crimean-Congo haemorrhagic fever virus outbreaks in Eastern Europe and the Middle East*. Clinical Microbiology and Infection, 2013. **19**(2): p. E118-E128.
39. Burney, M., et al., *Nosocomial Outbreak of viral Hemorrhagic fever caused by Crimean Hemorrhagic fever-Congo virus in Pakistan, January 1976*. 1980. **29**(5): p. 941-947.
40. Antoniadis, A., J.J.T.A.j.o.t.m. Casals, and hygiene, *Serological evidence of human infection with Congo-Crimean hemorrhagic fever virus in Greece*. 1982. **31**(5): p. 1066-1067.
41. Schwarz, T.F., H. Nsanze, and A.M. Ameen, *Clinical features of Crimean-Congo haemorrhagic fever in the United Arab Emirates*. Infection, 1997. **25**(6): p. 364-7.
42. Mardani, M., et al., *The efficacy of oral ribavirin in the treatment of crimean-congo hemorrhagic fever in Iran*. Clin Infect Dis, 2003. **36**(12): p. 1613-8.
43. Karti, S.S., et al., *Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey*. Emerg Infect Dis, 2004. **10**(8): p. 1379-84.
44. Bakir, M., et al., *Crimean-Congo haemorrhagic fever outbreak in Middle Anatolia: a multicentre study of clinical features and outcome measures*. J Med Microbiol, 2005. **54**(Pt 4): p. 385-389.
45. Ergönül, Ö.J.T.L.i.d., *Crimean-Congo haemorrhagic fever*. 2006. **6**(4): p. 203-214.
46. Wikowski, J., R. Robins, and R.J.J.M.C. Sidwell, *The design, synthesis and broad-spectrum antiviral activity of 1- β -d-ribofuranosyl-1, 2, 4-triazole-3-carboxamide and related nucleosides*. 1972. **15**: p. 1150-1154.
47. Crotty, S., et al., *The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen*. Nat Med, 2000. **6**(12): p. 1375-9.
48. Maag, D., et al., *Hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) as a mediator of the antiviral activity of ribavirin*. J Biol Chem, 2001. **276**(49): p. 46094-8.
49. Bente, D.A., et al., *Pathogenesis and Immune Response of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in a STAT-1 Knockout Mouse Model*. Journal of Virology, 2010. **84**(21): p. 11089-11100.
50. Hawman, D.W., et al., *Favipiravir (T-705) but not ribavirin is effective against two distinct strains of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in mice*. Antiviral Research, 2018. **157**: p. 18-26.
51. Vasilenko, S., *On the etiology, epidemiology and the specific immunoprevention of Crimean hemorrhagic fever in Bulgaria*, PhD Theses. NCIPD, Sofia. 1976.
52. Christova, I., et al., *Crimean-Congo hemorrhagic fever, southwestern Bulgaria*. Emerg Infect Dis, 2009. **15**(6): p. 983-5.
53. Maltezou, H., et al., *Crimean-Congo hemorrhagic fever in Europe: current situation calls for preparedness*. 2010. **15**(10): p. 19504.
54. Spengler, J.R., et al., *Heterologous protection against Crimean-Congo hemorrhagic fever in mice after a single dose of replicon particle vaccine*. Antiviral Res, 2019. **170**: p. 104573.
55. Buttigieg, K.R., et al., *A novel vaccine against Crimean-Congo Haemorrhagic Fever protects 100% of animals against lethal challenge in a mouse model*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e91516.

56. Hinkula, J., et al., *Immunization with DNA Plasmids Coding for Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Capsid and Envelope Proteins and/or Virus-Like Particles Induces Protection and Survival in Challenged Mice*. Journal of Virology, 2017. **91**(10).
57. Aligholipour Farzani, T., et al., *Immunological Analysis of a CCHFV mRNA Vaccine Candidate in Mouse Models*. Vaccines (Basel), 2019. **7**(3).
58. Rodriguez, S.E., et al., *Vesicular Stomatitis Virus-Based Vaccine Protects Mice against Crimean-Congo Hemorrhagic Fever*. Scientific Reports, 2019. **9**.
59. Barnwal, B., et al., *The Non-structural Protein of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Disrupts the Mitochondrial Membrane Potential and Induces Apoptosis*. Journal of Biological Chemistry, 2016. **291**(2): p. 582-592.
60. Deyde, V.M., et al., *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus genomics and global diversity*. J Virol, 2006. **80**(17): p. 8834-42.
61. Matsumoto, Y., et al., *A Minigenome Study of Hazara Nairovirus Genomic Promoters*. Journal of Virology, 2019. **93**(6).
62. Mega, D.F., et al., *Mutagenic Analysis of Hazara Nairovirus Nontranslated Regions during Single- and Multistep Growth Identifies both Attenuating and Functionally Critical Sequences for Virus Replication*. J Virol, 2020. **94**(17).
63. Kohl, A., et al., *Genetic elements regulating packaging of the Bunyamwera orthobunyavirus genome*. J Gen Virol, 2006. **87**(Pt 1): p. 177-187.
64. Gerlach, P., et al., *Structural Insights into Bunyavirus Replication and Its Regulation by the vRNA Promoter*. Cell, 2015. **161**(6): p. 1267-79.
65. Carter, S.D., et al., *Structure, Function, and Evolution of the Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Nucleocapsid Protein*. Journal of Virology, 2012. **86**(20): p. 10914-10923.
66. Guo, Y., et al., *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus nucleoprotein reveals endonuclease activity in bunyaviruses*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012. **109**(13): p. 5046-5051.
67. Wang, Y., et al., *Structure of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Nucleoprotein: Superhelical Homo-Oligomers and the Role of Caspase-3 Cleavage*. Journal of Virology, 2012. **86**(22): p. 12294-12303.
68. Surtees, R., et al., *The crystal structure of the Hazara virus nucleocapsid protein*. BMC Struct Biol, 2015. **15**: p. 24.
69. Wang, W.M., et al., *Structural and Functional Diversity of Nairovirus-Encoded Nucleoproteins*. Journal of Virology, 2015. **89**(23): p. 11740-11749.
70. Jeeva, S., et al., *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus nucleocapsid protein harbors distinct RNA-binding sites in the stalk and head domains*. J Biol Chem, 2019. **294**(13): p. 5023-5037.
71. Wolff, S., S. Becker, and A. Groseth, *Cleavage of the Junin virus nucleoprotein serves a decoy function to inhibit the induction of apoptosis during infection*. J Virol, 2013. **87**(1): p. 224-33.
72. Zhou, Q., et al., *Interaction of the baculovirus anti-apoptotic protein p35 with caspases. Specificity, kinetics, and characterization of the caspase/p35 complex*. Biochemistry, 1998. **37**(30): p. 10757-65.
73. Ali, S.H. and J.A. DeCaprio, *Cellular transformation by SV40 large T antigen: interaction with host proteins*. Semin Cancer Biol, 2001. **11**(1): p. 15-23.
74. Szemiel, A.M., A.B. Failloux, and R.M. Elliott, *Role of Bunyamwera Orthobunyavirus NSs protein in infection of mosquito cells*. PLoS Negl Trop Dis, 2012. **6**(9): p. e1823.

75. Kohl, A., et al., *Bunyamwera virus nonstructural protein NSs counteracts interferon regulatory factor 3-mediated induction of early cell death*. J Virol, 2003. **77**(14): p. 7999-8008.
76. Le May, N., et al., *TFIIH transcription factor, a target for the Rift Valley hemorrhagic fever virus*. Cell, 2004. **116**(4): p. 541-550.
77. Kormelink, R., et al., *The Nonstructural Protein (Nss) Encoded by the Ambisense-S Rna Segment of Tomato Spotted Wilt Virus Is Associated with Fibrous Structures in Infected-Plant Cells*. Virology, 1991. **181**(2): p. 459-468.
78. Nagata, T., et al., *Tissue tropism related to vector competence of Frankliniella occidentalis for tomato spotted wilt tospovirus*. J Gen Virol, 1999. **80** (Pt 2): p. 507-515.
79. Casals, J. and G.H. Tignor, *The Nairovirus Genus - Serological Relationships*. Intervirology, 1980. **14**(3-4): p. 144-147.
80. Foulke, R.S., R.R. Rosato, and G.R. French, *Structural polypeptides of Hazara virus*. J Gen Virol, 1981. **53**(Pt 1): p. 169-72.
81. Marriott, A.C. and P.A. Nuttall, *Comparison of the S-Rna Segments and Nucleoprotein Sequences of Crimean Congo Hemorrhagic-Fever, Hazara, and Dugbe Viruses*. Virology, 1992. **189**(2): p. 795-799.
82. Matsumoto, Y., K. Ohta, and M. Nishio, *Lethal infection of embryonated chicken eggs by Hazara virus, a model for Crimean-Congo hemorrhagic fever virus*. Arch Virol, 2018. **163**(1): p. 219-222.
83. Kalkan-Yazıcı, M., et al., *Cross-Reactive anti-Nucleocapsid Protein Immunity against Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus and Hazara Virus in Multiple Species*. p. JVI. 02156-20.
84. Sanchez, A.J., M.J. Vincent, and S.T. Nichol, *Characterization of the glycoproteins of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus*. J Virol, 2002. **76**(14): p. 7263-75.
85. Sanchez, A.J., et al., *Crimean-congo hemorrhagic fever virus glycoprotein precursor is cleaved by Furin-like and SKI-1 proteases to generate a novel 38-kilodalton glycoprotein*. J Virol, 2006. **80**(1): p. 514-25.
86. Bergeron, E., M.J. Vincent, and S.T. Nichol, *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus glycoprotein processing by the endoprotease SKI-1/S1P is critical for virus infectivity*. Journal of Virology, 2007. **81**(23): p. 13271-13276.
87. Papa, A., et al., *Genetic characterization of the M RNA segment of Crimean Congo hemorrhagic fever virus strains, China*. Emerging Infectious Diseases, 2002. **8**(1): p. 50-53.
88. Altamura, L.A., et al., *Identification of a novel C-terminal cleavage of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus PreG(N) that leads to generation of an NSM protein*. Journal of Virology, 2007. **81**(12): p. 6632-6642.
89. Vincent, M.J., et al., *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus glycoprotein proteolytic processing by subtilase SKI-1*. J Virol, 2003. **77**(16): p. 8640-9.
90. Rojek, J.M. and S. Kunz, *Cell entry by human pathogenic arenaviruses*. Cell Microbiol, 2008. **10**(4): p. 828-35.
91. Bergeron, E., et al., *Recovery of Recombinant Crimean Congo Hemorrhagic Fever Virus Reveals a Function for Non-structural Glycoproteins Cleavage by Furin*. Plos Pathogens, 2015. **11**(5).
92. Kinsella, E., et al., *Sequence determination of the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus L segment*. Virology, 2004. **321**(1): p. 23-8.

93. Honig, J.E., J.C. Osborne, and S.T.J.V. Nichol, *The high genetic variation of viruses of the genus Nairovirus reflects the diversity of their predominant tick hosts*. 2004. **318**(1): p. 10-16.
94. Frias-Staheli, N., et al., *Ovarian tumor domain-containing viral proteases evade ubiquitin- and ISG15-dependent innate immune responses*. Cell Host Microbe, 2007. **2**(6): p. 404-16.
95. Bergeron, E., et al., *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus-Encoded Ovarian Tumor Protease Activity Is Dispensable for Virus RNA Polymerase Function*. Journal of Virology, 2010. **84**(1): p. 216-226.
96. Scholte, F.E.M., et al., *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Suppresses Innate Immune Responses via a Ubiquitin and ISG15 Specific Protease*. Cell Reports, 2017. **20**(10): p. 2396-2407.
97. James, T.W., et al., *Structural basis for the removal of ubiquitin and interferon-stimulated gene 15 by a viral ovarian tumor domain-containing protease*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011. **108**(6): p. 2222-2227.
98. Tchesnokov, E.P., et al., *Independent inhibition of the polymerase and deubiquitinase activities of the Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus full-length L-protein*. Plos Neglected Tropical Diseases, 2020. **14**(6).
99. Pflug, A., et al., *Structure of influenza A polymerase bound to the viral RNA promoter*. Nature, 2014. **516**(7531): p. 355-60.
100. Peng, R., et al., *Structural insight into arenavirus replication machinery*. Nature, 2020. **579**(7800): p. 615-619.
101. Dzimianski, J.V., et al., *Flipping the substrate preference of Hazara virus ovarian tumour domain protease through structure-based mutagenesis*. Acta Crystallographica Section D-Structural Biology, 2020. **76**: p. 1114-1123.
102. Angela Chang, V.C., Julius Landas, Yvonne Pang, *PREPARATION OF CALCIUM COMPETENT ESCHERICHIA COLI AND HEAT-SHOCK TRANSFORMATION*. The Journal of Experimental Microbiology and Immunology, 2017. **1**.
103. World Health Organizations, *Introduction to Crimean-Congo Haemorrhagic Fever*. 2020.
104. Begum, F., C.L. Wisseman, Jr., and J. Casals, *Tick-borne viruses of West Pakistan. II. Hazara virus, a new agent isolated from Ixodes redikorzevi ticks from the Kaghan Valley, W. Pakistan*. Am J Epidemiol, 1970. **92**(3): p. 192-4.
105. Dowall, S.D., et al., *Hazara virus infection is lethal for adult type I interferon receptor-knockout mice and may act as a surrogate for infection with the human-pathogenic Crimean-Congo hemorrhagic fever virus*. Journal of General Virology, 2012. **93**: p. 560-564.
106. Marriott, A.C. and P.A. Nuttall, *Comparison of the S RNA segments and nucleoprotein sequences of Crimean-Congo hemorrhagic fever, Hazara, and Dugbe viruses*. Virology, 1992. **189**(2): p. 795-9.
107. Hartlaub, J., et al., *Sheep and Cattle Are Not Susceptible to Experimental Inoculation with Hazara Orthonairovirus, a Tick-Borne Arbovirus Closely Related to CCHFV*. Microorganisms, 2020. **8**(12).
108. Ding, B.B., Y.L. Qin, and M.Z. Chen, *Nucleocapsid proteins: roles beyond viral RNA packaging*. Wiley Interdisciplinary Reviews-Rna, 2016. **7**(2): p. 213-226.
109. Zhou, Z.R., et al., *Reassortment and migration analysis of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus*. Journal of General Virology, 2013. **94**: p. 2536-2548.

110. Surtees, R., et al., *Heat Shock Protein 70 Family Members Interact with Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus and Hazara Virus Nucleocapsid Proteins and Perform a Functional Role in the Nairovirus Replication Cycle*. J Virol, 2016. **90**(20): p. 9305-16.
111. Dowall, S.D., et al., *Hazara virus infection is lethal for adult type I interferon receptor-knockout mice and may act as a surrogate for infection with the human-pathogenic Crimean-Congo hemorrhagic fever virus*. J Gen Virol, 2012. **93**(Pt 3): p. 560-4.
112. Dowall, S.D., et al., *Protective effects of a Modified Vaccinia Ankara-based vaccine candidate against Crimean-Congo Haemorrhagic Fever virus require both cellular and humoral responses*. PLoS One, 2016. **11**(6): p. e0156637.
113. Boshra, H., et al., *A DNA vaccine encoding ubiquitinated Rift Valley fever virus nucleoprotein provides consistent immunity and protects IFNAR(-/-) mice upon lethal virus challenge*. Vaccine, 2011. **29**(27): p. 4469-75.
114. Zivcec, M., et al., *Nucleocapsid protein-based vaccine provides protection in mice against lethal Crimean-Congo hemorrhagic fever virus challenge*. PLoS Negl Trop Dis, 2018. **12**(7): p. e0006628.
115. Marriott, A.C., et al., *Detection of Human-Antibodies to Crimean-Congo Hemorrhagic-Fever Virus Using Expressed Viral Nucleocapsid Protein*. Journal of General Virology, 1994. **75**: p. 2157-2161.
116. Emmerich, P., et al., *Viral metagenomics, genetic and evolutionary characteristics of Crimean-Congo hemorrhagic fever orthonairovirus in humans, Kosovo*. Infection Genetics and Evolution, 2018. **65**: p. 6-11.
117. Yewdell, J.W., E. Frank, and W. Gerhard, *Expression of influenza A virus internal antigens on the surface of infected P815 cells*. J Immunol, 1981. **126**(5): p. 1814-9.

HAM VERİLER



FORMLAR

PATENT HAKKI İZİNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

HAZARA VİRÜSÜN KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ VİRÜSÜ İÇİN MODEL ORGANİZMA OLARAK ARAŞTIRILMASI

ORJİNAL RAPORU

%**4**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**3**

İNTERNET KAYNAKLARI

%**1**

YAYINLAR

%

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

nek.istanbul.edu.tr:4444

İnternet Kaynağı

%**1**

2

www.docstoc.com

İnternet Kaynağı

<%**1**

3

Merve Kalkan-Yazıcı, Elif Karaaslan, Nesibe Selma Çetin, Sevde Hasanoğlu, Filiz Güney, Ümit Zeybek, Mehmet Z. Doymaz. "Cross-Reactive Anti-Nucleocapsid Protein Immunity against Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus and Hazara Virus in Multiple Species", Journal of Virology, 2021

Yayın

<%**1**

4

www.sigmaaldrich.com

İnternet Kaynağı

<%**1**

5

etheses.whiterose.ac.uk

İnternet Kaynağı

<%**1**

6

docplayer.biz.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

s-space.snu.ac.kr

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

Uluslararası Yayınlar:

1. M. YAZICI, E. KARAASLAN, N. S. GÜLER, S. HASANOĞLU, F. GÜNEY, Ş. Ü. ZEYBEK & M. Z. DOYMAZ, Cross-Reactive anti-Nucleocapsid Protein Immunity against Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus and Hazara Virus in Multiple Species, Journal of Virology, 2021, 1098-5514, 95, 7, xxx-xxx.
2. M. K. YAZICI, M. M. KOC, N. S. CETİN, E. KARAASLAN, G. OKAY, B. DURDU, B. SUMBUL & M. Z. DOYMAZ, Discordance between Serum Neutralizing Antibody Titers and the Recovery from COVID-19, JOURNAL OF IMMUNOLOGY, 2020, 0022-1767, 205, 10, 2719-2725.
3. M. YAZICI, Ü. YILMAZ, N. YILMAZ, F. ÇELİK, E. G. IŞIKÖREN, B. ÇELİKEL, H. A. ERGEN, M. KESKİN & Ş. Ü. ZEYBEK, A case-control study on effects of the ATM, RAD51 and TP73 genetic variants on colorectal cancer risk, TURKISH JOURNAL OF BIOCHEMISTRY-TURK BIYOKIMYA DERGISI, 2019, 0250-4685.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler:

1. M. YAZICI & M. Z. DOYMAZ, Similarities in Antiviral Humoral Immune Response to Nucleocapsid Proteins of Hazara and Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus, Poster Sunumu, Novel Concepts in Virology-2020, 05 Şubat 2020, 07 Şubat 2020, 50, 1.
2. N. S. GÜLER, E. KARAASLAN, M. YAZICI, S. HASANOĞLU, A. KALKAN, A. O. KILIÇ, A. ÖZDARENDELİ & M. Z. DOYMAZ, Evaluation of CCHFV nucleoprotein as diagnostic tool in ELISA, Poster Sunumu, 2nd International Conference on Crimean-Congo Hemorrhagic Fever, 10 Eylül 2017, 12 Eylül 2017.