

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KIRKLARELİ İLİNDEN ELDE EDİLEN
Dobrava-Belgrade Orthohantavirus İZOLATININ
YENİ NESİL DİZİLEME İLE TÜM GENOM
DİZİLEMESİ VE GENETİK
KARAKTERİZASYONU**

MERT ERDİN

**MİKROBİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

İZMİR-2020

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2017970061

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KIRKLARELİ İLİNDEN ELDE EDİLEN
Dobrava-Belgrade Orthohantavirus İZOLATININ
YENİ NESİL DİZİLEME İLE TÜM GENOM
DİZİLEMESİ VE GENETİK
KARAKTERİZASYONU**

**MİKROBİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

MERT ERDİN

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. İ. Mehmet Ali ÖKTEM

Bu araştırma Avrupa Mikrobiyoloji Toplulukları Federasyonu (Federation of European Microbiological Societies – FEMS) tarafından desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2017970061

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikrobiyoloji Yüksek Lisans programı öğrencisi Mert ERDİN “Kırklareli ilinden elde edilen *Dobrava-Belgrade orthohantavirus* izolatının yeni nesil dizileme ile tüm genom dizilemesi ve genetik karakterizasyonu” konulu Yüksek Lisans tezini 30/10/2020 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

Prof. Dr. İ. Mehmet Ali ÖKTEM

BAŞKAN

(Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi)

Doç. Dr. Özgen Alpay ÖZBEK

ASİL ÜYE

(Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi)

Dr. Öğr. Üyesi Ceylan POLAT

ASİL ÜYE

(Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi)

Prof. Dr. Mustafa SÖZEN

YEDEK ÜYE

(Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi

Fen-Edebiyat Fakültesi)

Doç. Dr. Mahmut Cem ERGON

YEDEK ÜYE

(Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi)

İÇİNDEKİLER

ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. Orthohantavirus	7
2.1.1. Tarihçe	7
2.1.2. Sınıflandırma	7
2.1.3. Genom Organizasyonu	8
2.1.4. Orthohantavirüslerin Yaşam Döngüsü	9
2.1.5. <i>Dobrava-Belgrade</i> orthohantavirus Rezervuarları ve Bulaş Yolları	13
2.1.6. Klinik	15
2.1.7. Epidemiyoloji	16
2.1.8. Laboratuvar Tanısı, Tedavi ve Korunma	19
2.2. Yeni Nesil Dizileme	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1. Araştırmanın Tipi.....	27
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	27
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi	27
3.4. Çalışma Materyali	27
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	28
3.6. Veri Toplama Araçları	28
3.6.1. Laboratuvar Çalışmaları	31
3.6.1.1. RNA İzolasyonu	31
3.6.1.2. Komplementer DNA Sentezi	32
3.6.1.3. Kütüphane Hazırlığı	33

3.6.1.4. Yeni Nesil Dizileme ve Biyoinformatik Analiz	43
3.6.1.5. Polimeraz Zincir Tepkimesi ve Sanger dizileme.....	45
3.6.1.6. Filogenetik ve Genetik Analiz.....	50
3.7. Araştırma Planı.....	52
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi.....	52
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları.....	53
3.10. Etik Kurul Onayı.....	53
4. BULGULAR.....	54
5. TARTIŞMA.....	62
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	67
7. KAYNAKLAR.....	69
8. EKLER.....	76

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. DOBV’ün etiyolojik etken olduğu RSKA dönemleri, süreleri ve klinik semptomları.....	16
Tablo 2. Orthohantaviral enfeksiyonlara karşı kullanılabilecek potansiyel terapötik ajanlar ve stratejileri.....	21
Tablo 3. Orthohantavirüslere karşı klinik denemeleri ve olgu-kontrol çalışmaları olan aşılar.	23
Tablo 4. Çalışma sırasında kullanılan cihaz, kimyasal ve sarf malzemelere ait bilgiler	28
Tablo 5. Adaptör ligasyonlu DNA’nın PZT zenginleştirmesinde kullanılan inkübasyon koşulları.	40
Tablo 6. Yeni nesil dizileme ile elde edilen dizilerdeki boşlukların PZT ve Sanger dizileme yöntemleri ile doldurulması için tasarlanan öncüller.....	45
Tablo 7. PZT yöntemi için hazırlanan tepkime karışımının içeriği ve konsantrasyonu.....	47
Tablo 8. PZT yönteminde S segmentte bulunan boşlukların doldurulması için kullanılan tepkime koşulları.....	47
Tablo 9. PZT yönteminde M segmentte bulunan boşlukların ve L segmentte bulunan birinci boşluğun doldurulması için kullanılan tepkime koşulları.	48
Tablo 10. PZT yönteminde L segmentte bulunan ikinci, dördüncü ve beşinci boşlukların doldurulması için kullanılan tepkime koşulları.	48
Tablo 11. PZT yönteminde L segmentte bulunan üçüncü boşluğun doldurulması için kullanılan tepkime koşulları.....	49
Tablo 12. Araştırma Takvimi ve Planı.....	52
Tablo 13. Çalışma kapsamında elde edilen DOBV tüm genom dizilerinin bilgileri.....	54
Tablo 14. Dizilerde bulunan AOD’lerinin segmentlere göre bilgileri.....	54
Tablo 15. Yerel DOBV izolatının en çok yakınlık gösterdiği Yunanistan DOBV izolatı ile benzerlik oranları.	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Orthohantavirus genom organizasyonu	8
Şekil 2. Viral genomun replikasyon ve transkripsiyon aşamaları	11
Şekil 3. Orthohantavirus yaşam döngüsü	12
Şekil 4. Virüsün bulaşında etkili olan çevresel kaynaklı, kemirici kaynaklı ve insan kaynaklı faktörler	14
Şekil 5. Avrupa kıtasında DOBV ve soylarının bildirildiği ülkeler	18
Şekil 6. Türkiye’de DOBV ve soylarının bildirildiği iller	19
Şekil 7. İğneada, Kırklareli ilinde elde edilen DOBV izolatının S segmentine ait filogenetik ağaç analizinin görüntüsü	55
Şekil 8. İğneada, Kırklareli ilinden elde edilen DOBV izolatının M segmentine ait filogenetik ağaç analizinin görüntüsü	56
Şekil 9. İğneada, Kırklareli ilinden elde edilen DOBV izolatının L segmentine ait filogenetik ağaç analizinin görüntüsü	57
Şekil 10. Yerel DOBV izolatının L segmentinin diğer DOBV izolatları ile SimPlot analizinde karşılaştırılmasını gösteren grafik.	59
Şekil 11. Yerel DOBV izolatının M segmentinin diğer DOBV izolatları ile SimPlot analizinde karşılaştırılmasını gösteren grafik.	60
Şekil 12. Yerel DOBV izolatının S segmentinin diğer DOBV izolatları ile SimPlot analizinde karşılaştırılmasını gösteren grafik.	61

KISALTMALAR

TGD	Tüm genom dizileme
PZT	Polimeraz zincir tepkimesi
cDNA	Komplementer deoksiribo nükleik asit
HPS	Hantavirüs pulmoner sendromu
RSKA	Renal sendromlu kanamalı ateşi
EN	Epidemik nefropati
PUUV	<i>Puumala orthohantavirus</i>
DOBV	<i>Dobrava-belgrad orthohantavirus</i>
TULV	<i>Tula orthohantavirus</i>
SEOV	<i>Seoul orthohantavirus</i>
PZT	Polimeraz zincir tepkimesi
YND	Yeni nesil dizileme
HTNV	<i>Hantaan orthohantavirus</i>
NCR	Kodlanmayan bölge
RdRp	RNA bağımlı RNA polimeraz
CCV	Klatrin kaplı vezikül
ANDV	<i>Andes orthohantavirus</i>
ER	Endoplazmik retikulum
ERGIC	Er-golgi aracılı bölge
RNP	Ribonükleoproteion
vRNA	Viral ribonükleik asit
cRNA	Komplementer ribonükleik asit
pppG	Trifosforillenmiş guanin
SAAV	<i>Saaremaa virus</i>
IgM	İmmünglobülin M
IgG	İmmünglobulin G
ELISA	Enzyme linked İmmunosorbent assay
RT-PZT	Reverse (ters) transkriptaz polimeraz zincir tepkimesi

KISALTMALAR

BIC	Bayesian information criterion
TAE	Tris asetat-edta
AOB	Açık okuma bölgesi



TEŐEKKÖR

Eğitim sürecim boyunca gelişmemde büyük katkısı olan ve bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde bana her türlü desteği veren danışman hocam Prof. Dr. İ. Mehmet Ali Öktem'e, çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Tarja Sironen ve Dr. Öğr. Üyesi Ceylan Polat'a, ayrıca yetişmemde de emeği geçen tüm hocalarıma, aileme ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Mert Erđin



KIRKLARELİ İLİNDEN ELDE EDİLEN *Dobrava-Belgrade* Orthohantavirus İZOLATININ YENİ NESİL DİZİLEME İLE TÜM GENOM DİZİLEMESİ VE GENETİK KARAKTERİZASYONU

Mert Erdin

Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı

ÖZET

Ortohantavirüsler insanlara çoğunlukla, bu virüslerin taşıyıcıları da olan, küçük memeliler aracılığı ile bulaşmaktadır. Orthohantavirüsler bulundukları bölgelere göre genetik çeşitlilik gösterdikleri için, bu virüslerin tüm genom dizileme (TGD) ile genetik karakterizasyonlarının yapılması, olası enfeksiyon etkeni orthohantavirüsün tam anlamıyla belirlenmesinde büyük önem taşımaktadır.

Daha önce ekibimiz tarafından İğneada, Kırklareli ilinden toplanan kemiricilerden 8 tanesinde *Dobrava-Belgrade orthohantavirus* (DOBV) pozitifliği belirlenmiştir. Bu pozitiflikler, kemiricilerin akciğer dokularından yapılan yapılan polimeraz zincir tepkimesi (PZT) ve sanger dizileme ile saptanmıştır.

Bu çalışma kapsamında, DOBV'ün her üç segmentinin de tüm genom dizilemesinin yapılması hedeflenmiştir. Bu kapsamda, ribozomal RNA eliminasyon ve RNA kütüphane hazırlık kitleri ile kütüphane hazırlığı yapılmıştır. Oluşturulan kütüphaneler Illumina MiSeq sistemine alınarak dizileme işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen dizilerin farklı izolatlar ile filogenetik analizleri yapılmıştır ve DOBV İğneada izolatının farklılıkları ortaya konmuştur.

Bu çalışma sonucunda, Türkiye'den ilk defa DOBV tüm genom dizileri elde edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen diziler direkt taşıyıcı konak dokusundan elde edilmiştir ve böylece, L segment için ilk defa hücre kültürü yapılmadan diziler elde edilmiştir. Bununla birlikte, elde edilen dizilerin filogenetik analizleri sonucunda, Türkiye'de Kırklareli ilinde bulunan DOBV izolatı Yunanistan'ın DOBV Ano-Poroia suşu ile en yakın ilişkili olarak bulunmuştur. Aynı

zamanda, yapılan “SimPlot” analizleri sayesinde yerel DOBV izolatının Balkanlarda hangi izolatlar ile benzerlik gösterdiği ortaya konmuştur.

Anahtar Kelime: Dobrava-Belgrade Orthohantavirus; Yeni Nesil Dizileme; Tüm Genom Dizileme; Genetik Karakterizasyon



WHOLE GENOME SEQUENCING AND GENETIC CHARACTERIZATION OF *Dobrava-Belgrade Orthohantavirus* ISOLATE FROM KIRKLARELI PROVINCE WITH NEXT GENERATION SEQUENCING

Mert Erdin

Dokuz Eylul University, Institute of Health Sciences, Department of Microbiology and Clinical Microbiology

ABSTRACT

Orthohantaviruses are transmitted to humans mostly through small mammals, which are also carriers of these viruses. Because orthohantaviruses show great genetic variability through regions, it is of great importance to determine of genetic characterization with whole genome sequencing.

Dobrava-Belgrade orthohantavirus (DOBV) positivity has been shown in 8 rodents which were from İğneada region, Kırklareli province, with the previous work of our team. These positivity has been detected by performing PCR and Sanger sequencing from the lung tissues of the rodents.

The aim of this study is the whole genome sequencing of all three segments of DOBV. Therefore, rRNA depletion kit and RNA library preparation kit were used to prepare the libraries for whole genome sequencing. After that, Illumina MiSeq system was used for sequencing of libraries. Finally, phylogenetic trees of the sequences were constructed with the sequences of different DOBV strains to determine the differences of DOBV İğneada strain.

As a result, whole genome sequences of DOBV were obtained from Turkey for the very first time. The complete sequences of all three segments were obtained directly from lung tissue and thus, complete L segment sequence became the only sequence that has this unique property for DOBV on NCBI GenBank database. The phylogenetic analysis has shown that there is a

close relation between DOBV Igneada strain from Kırklareli province from Turkey and DOBV Ano-Poroia strain from Greece. SimPlot analysis has shown the similarities between DOBV Igneada strain and other DOBV strains from the Balkans.

Keywords: *Dobrava-Belgrade Orthohantavirus*; Next Generation Sequencing; Whole Genome Sequencing; Genetic Characterization



1. GİRİŞ VE AMAC

Hantaviridae ailesinin bir üyesi olan Orthohantavirüsler, zarflı, negatif polariteli, tek iplikli ve üç segmentten oluşan RNA virüsleridir. Bu virüslerin asıl konakları kemiriciler ve küçük memeliler iken, insanlar tesadüfi konaklardır. İnsanlar taşıyıcıların salgılarına maruz kalmalarıyla viral partiküllerin solunması ya da taşıyıcı konak ile temas sonucunda enfekte olmaktadır (1).

Orthohantavirüslerin epidemiyolojik bakımdan dağılımları, taşıyıcı konağın coğrafik olarak dağılımına göre değişmektedir. Bu sebeple, Orthohantavirüsler temel olarak iki gruba ayrılmaktadırlar: Yeni Dünya Orthohantavirüsleri ve Eski Dünya Orthohantavirüsleri. Yeni Dünya Orthohantavirüsleri, Kuzey ve Güney Amerika kıtalarında görülür ve bu virüsler insanlarda Hantavirüs Pulmoner Sendromuna (HPS) sebep olmaktadır (2). Eski Dünya Orthohantavirüsleri, Avrupa, Asya ve Afrika kıtalarında dağılım göstermektedir ve insanlarda Renal Sendromlu Kanamalı Ateşi (RSKA) etkenidirler. Bunlara ek olarak, Eski Dünya Orthohantavirüsleri grubunda yer alan *Puumala orthohantavirus* (PUUV), insanlarda epidemik nefropati (EN) adı verilen, hafif bir klinik tabloya sebep olan, enfeksiyona neden olmaktadır (2).

Orthohantavirüslerin alt türlerinden PUUV, *Dobrava-Belgrad orthohantavirus* (DOBV), *Tula orthohantavirus* (TULV) ve *Seoul orthohantavirus* (SEOV) taşıyıcıları olan kemirici türlerinden *Myodes glareolus*, *Apodemus flavicollis*, *Apodemus agrarius*, *Microtus arvalis* ve *Rattus norvegicus* ülkemizde de dağılım göstermektedir (3-6). Bu kapsamda, daha önce yapılan çalışmalarda, 2009 yılında Zonguldak ve çevresinde RSKA vakalarının bildirildiği bir salgın, 2010 yılında Batı Karadeniz bölgesinde Giresun ilinde serolojik olarak iki hasta DOBV tanısı aldığı ve 2011 yılında İstanbul ilinin Avrupa kısmında DOBV enfeksiyonunun görüldüğü bir vaka bildirilmiştir. İleriki çalışmalarda da Kırklareli ve Erzurum illerinden toplanan kemiricilerde moleküler temelli yöntemler ile DOBV ve TULV pozitiflikleri gösterilmiştir (7-12).

Geçmiş yıllarda ekibimiz tarafından yapılan çalışmalar sonucunda Kırklareli ilinde bulunan pozitiflikler, bu bölgeyi orthohantavirüslerin varlığı bakımından önemli hale getirmiştir. Bu çalışma sonucunda hem serolojik olarak hem de moleküler olarak pozitiflikler bulunmuş ve bulunan bu pozitifliklerin DOBV olduğu doğrulanmıştır. S-, M- ve L-segmentlerin kısmi olarak dizileri Sanger dizileme ile elde edilmiş ve yapılan filogenetik analizler sonucunda, bu bölgeden elde edilen DOBV izolatlarının Balkan ve Avrupa

izolatlarıyla benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Fakat, bu bölge çeşitli coğrafik özellikleri barındırması ve konumu dolayısıyla Avrupa ile Asya arasında bir bariyer görevi görmektedir. Bundan dolayı da burada bulunan orthohantavirüs türlerinde her iki kıtada görülen orthohantavirüslerin genetik özellikleri bir arada görülebilmektedir (11). Bu sebeple; Kırklareli ilinde bulunan DOBV pozitifliklerinin tüm genom dizisinin elde edilmesi ile tam anlamıyla bir genetik karakterizasyonunun yapılması ve tüm segment dizileri üzerinden filogenetik analizlerin yapılmasıyla, virüs kökeninin Avrupa ve Asya suşlarından farklılıklarının ve benzerliklerinin daha net bir şekilde ortaya konması hedeflenmiştir. Ayrıca, M- segment üzerinden kodlanan viral zarf glikoproteinlerindeki aminoasit değişikliklerinin tüm genom üzerinden belirlenmesi sonucunda, antijenik farklılıklar veya benzerlikler ortaya konması amaçlanmaktadır. Bu sayede, ileride meydana gelebilecek potansiyel DOBV salgınlarında kullanılabilecek, özgüllüğü ve duyarlılığı DOBV yerel izolatı için çok daha yüksek olan moleküler ve serolojik kit tasarımını hedefleyen projeler ile bu enfeksiyonların patogeneze yönelik genetik ön veriler elde edilmiş olacaktır.

Yeni nesil dizileme (YND) için kullanılabilecek çok fazla sayıda sistem ve yöntem bulunmaktadır. Kemiriciler ve küçük memeliler gibi birçok önemli zoonoz etkenine taşıyıcılık yapan konakçıdan viral zoonoz etkeninin belirlenmesi oldukça zorlayıcı olabilmekle beraber, ikinci nesil dizileme yöntemi olan Illumina sistemleriyle tüm genom dizilerini elde etmek günümüzde mümkün hale gelmiştir. (13) Bu sistemlerle RNA virüsünün tüm genom dizisi elde edilmek isteniyorsa, RNA kullanımıyla hazırlanan kütüphane hazırlık kitlerinin kullanılması gerekmektedir. Bunun sebebi ise, RNA virüslerinin 5' ve 3' uçlarında kodlanmayan bölgelerin (NCR) bulunmasıdır ve bu bölgeler, cDNA sentezi sırasında kaybedilmektedir. Tam anlamıyla tüm genom dizilerinin elde edilmesi isteniyorsa, RNA üzerinden YND işlemlerinin gerçekleştirilmesi gerekmektedir (13-14). Bu bağlamda, ekibimiz tarafından daha önce yapılan çalışma kapsamında toplanan kemiricilerin akciğer dokularından, toplam RNA izolasyonu yapılmış ve daha önce elde edilen bu RNA'lar bu çalışmada kullanılmıştır. DOBV pozitif RNA'lar ile Illumina MiSeq sistemlerinin kullanılmasıyla YND işleminin gerçekleştirilmesi ve ardından elde edilen ham verilerin de biyoinformatik analizlerle işlenip, DOBV'nün tüm genom dizisinin elde edilmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Orthohantavirus*

2.1.1. Tarihçe

Orthohantavirüslerin tıp dünyasında gündeme ilk olarak geldikleri olay, 1950-1953 yılları arasında gerçekleşen Kore Savaşı sırasında 3000 Birleşmiş Milletler askerinin “Kore Kanamalı Ateşi” olarak adlandırılan Hantavirüs enfeksiyonuna maruz kalmasıyla olmuştur (15-16).

Bu gelişmeye rağmen, virüs uzun bir süre belirlenememiştir. İlk kez 1978 yılında etken virüs, Dr Lee ve ark. tarafından, *Apodemus agrarius*’un akciğer dokularından izole edilmiştir ve *Hantaan virus* (HTNV) olarak adlandırılmıştır (17). Bunlara ek olarak, kanamalı ateşin hafif formu olan EN ilk olarak 1930’lu yıllarda adından söz ettirse de etiyolojik ajan PUUV, 1980 yılında Finlandiya’da *Myodes glareolus* adlı kemiricide belirlenmiştir (18). Asya ve Avrupa kıtalarının farklı bölgelerinden hantavirüslerin bildirilmesi sonucunda, 1983 yılında Dünya Sağlık Örgütü bu virüslerin sebep olduğu hastalığa Renal Sendromlu Kanamalı Ateşi adını vermiştir (19).

Hantavirüs enfeksiyonlarının tıp dünyasında adlarından söz ettirmelerine sebep olan diğer bir olay ise, 1993 yılında Amerika Birleşik Devletleri’nin dört bir köşesinde salgınların meydana gelmesidir. Bu salgınlar sonucunda oluşan hastalığa, HPS adı verilmiştir (20). Bunu takiben, HPS etkeni olan *Sin Nombre virus* (SNV) ve *Andes virus*’un da dahil olduğu diğer patojenik virüsler, 1993 yılında Kuzey ve Güney Amerika’dan bildirilmiştir (21).

1997 yılında Dokuz Eylül Üniversitesi’nde hantavirüslerle ilgili serolojik bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda bulunan seropozitif örnekler, Türkiye’den bildirilen ilk hantavirüs pozitiflikleri olma özelliğini taşımaktadır (22). 2009 yılında Karadeniz bölgesinde Hantavirüs insan salgını meydana gelmiştir (23). Bu gelişmeler sonucunda, Türkiye’deki Hantavirüs çalışmaları artış ve hızlanma göstermiştir.

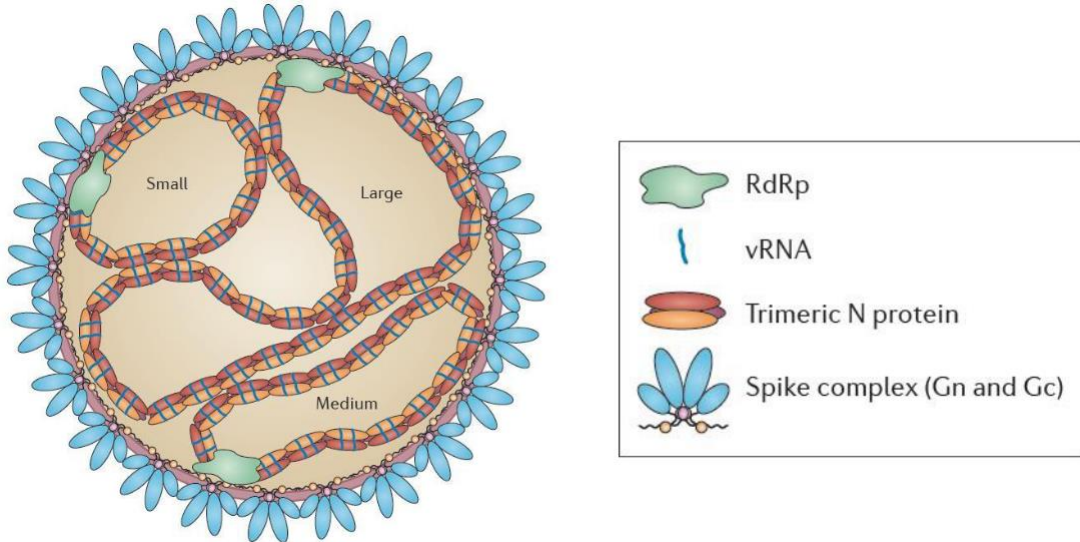
2.1.2. Sınıflandırma

Adından sürekli Hantavirüs olarak bahsedilen RSKA ve HPS etkeni olan ajanların adlandırması ve sınıflandırması, Uluslararası Viral Taksonomi Komitesi’nin 2018 kararına göre değişmiştir. Bu karar sonucunda, *Hantavirus* olarak anılan virüslerin isimlendirmesi *Orthohantavirus* olarak değiştirilmiştir ve sınıflandırmasında ise, *Hantavirus* Bunyavirales takımında yer alan bir aile olarak kabul edilerek Hantaviridae olmuştur.

Orthohantavirüsler aynı zamanda taşıyıcısı olan kemiricilerin üyesi oldukları alt ailelere göre sınıflandırılmaktadırlar. Buna göre; Murinae ve Arvicolinae alt ailelerinde yer alan kemiriciler RSKA ve EN etkeni olan virüsleri taşıırken, Neotominae ve Sigmodontinae alt ailelerinde yer alan kemiriciler HPS etkeni olan orthohantavirüsleri taşımaktadır (24).

2.1.3. Genom Organizasyonu

Orthohantavirüsler, üç segmentten oluşan, negatif polariteli, tek iplikli RNA içeren virüslerdir (25). Her segment 3' ve 5' uçlarında kodlanmayan bölgeler (NCR, “non-coding region”) içerirken, bu kodlanmayan bölgelerin ortasında ise açık okuma dizileri (AOB) bulunmaktadır. Bunun yanında, virüsün genom büyüklüğü 12 kb'dır. Orthohantavirüs genomunu oluşturan üç segment küçük (S), orta (M) ve büyük (L) şeklinde isimlendirilmektedir (26). (Şekil 1)



Şekil 1: Orthohantavirus genom organizasyonu (2)

S segment, büyüklüğü 1.67 – 2.06 kb arasında değişen bir segmenttir ve viral nükleokapsidi oluşturan bir protein olan N proteinini kodlamaktadır. Bunun yanında, bu segment, yapısal olmayan bazı proteinleri de kodlamaktadır ve bu proteinler zayıf interferon inhibitörü özelliği göstermelerinin yanında, tam anlaşılamamış olsa da bir takım diğer görevleri de mevcuttur. S segment tarafından kodlanan bu yapısal olmayan proteinler, *Hantaviridae* ailesinde yaygın olarak görülür ve interferon antagonizmi ile bağlantılıdır (2, 27).

M segment, büyüklüğü 3.62 – 3.70 kb arasında değişen bir segmenttir ve glikoprotein öncüllerini kodlamaktadır. Bu glikoprotein öncülleri, zarf glikoproteinlerini oluşturmak üzere Gn ve Gc (eski bilinen adıyla G1 ve G2 glikoproteinleri) adı verilen glikoproteinleri oluşturur. Bu zarf glikoproteinleri de, zarf yapısının üzerinde bulunan, dört-katlı katlanma simetrisi

gösteren ve her bir glikoproteinden dört adet bulunan başak komplekslerini oluşturmaktadır. Bu başak kompleksleri, virüsün hücreye bağlanması ve hücre içerisine aktarılmasında görev almaktadır (2, 27).

L segment, büyüklüğü 6.35 – 6.56 kb arasında değişen bir segmenttir ve bu segmentten, viral replikasyonda görev alan RNA-bağımlı RNA polimeraz (RdRp) enzimi kodlanmaktadır. Bu enzim polimeraz aktivitesi sayesinde viral replikasyonda yer almasının yanında, helikaz, endonükleaz ve transkriptaz aktiviteleri ile de viral yaşam döngüsünün çeşitli aşamalarında rol oynamaktadır (2, 27).

Orthohantavirüslerin genom organizasyonlarında görülen en önemli özelliklerinden birisi, her bir segmentte bulunan NCR'ların "Tava Sapı Yapısı" adı verilen özel bir yapı oluşturmalarıdır. Bu oluşum, viral replikasyon ve transkripsiyonun başlatılmasında rol oynamaktadır. Aynı zamanda, kapsidasyon aşamasının başlamasında da görev aldığı bildirilmiştir (2, 27).

2.1.4. Orthohantavirüslerin Yaşam Döngüsü

Orthohantavirüsler, pulmoner endotel hücrelerini, monositleri ve makrofajları enfekte etmektedirler. Sahip oldukları viral glikoproteinler (G_n ve G_c) ile konağın hücre yüzey reseptörlerine (integrinler ve adezyon molekülleri) tutunmaktadırlar. Patojenik orthohantavirüs tipleri, hücreye girişte $\beta 3$ integrinleri reseptör olarak tercih ederken, patojenik olmayan orthohantavirüs tipleri $\beta 1$ integrinleri kullanmaktadırlar (27).

Orthohantavirüslerin yaşam döngüsü, virionun hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak hücre içerisine alınmasıyla başlamaktadır. Bu olay iki şekilde gerçekleşebilmektedir: Klatrin Bağımlı alım ve Klatrin Bağımsız alım mekanizmaları (2).

Klatrin bağımlı alımın mekanizması temelde hücrenin virion yapısını bir kılıf ile sararak hücre içerisine almasıdır. Virion enfeksiyonu gerçekleştirirken, konak hücre yüzeyinde klatrin kaplı bir çukur oluşur ve virion bu bölgeye tutunarak hücreye giriş yapar. Sonuçta, virion konak hücreye klatrin kaplı vezikül (CCV) aracılığı ile alınır. Bir Eski Dünya orthohantavirüsü olan HTNV, yaşam döngüsünde CCV aracılığı ile hücreye giriş mekanizmasını kullanmaktadır (2).

Klatrin bağımsız alımda ise, herhangi bir klatrin kaplı vezikül kullanılmamaktadır. Bunun yerine, virion doğrudan konak hücre reseptörleri ile etkileşime geçerek reseptörlere

bağlanmakta ve ardından, virion endositoz yoluyla hücre içerisine alınmaktadır. Yeni Dünya orthohantavirüsü olan *Andes orthohantavirus* (ANDV) yaşam döngüsünün hücreye girişi aşamasında klatrin bağımsız alınımlar mekanizmalarını kullanmaktadır (2).

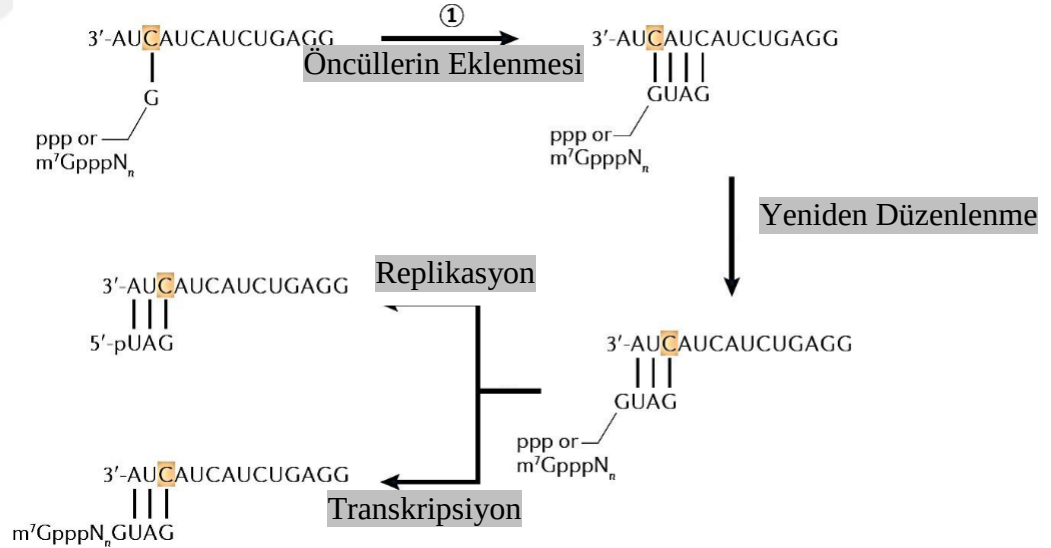
Alınımın ardından, virionlar önce erken endozoma alınırlar ve ardından geç endozoma dönüşüm gerçekleşir. Bu endozom evresinde virion, düşük pH (erken endozomda pH 6.0 – 6.5 iken, geç endozomda ise pH 5.0 – 6.0) nedeni ile hücresel reseptörlerden ayrılır. Bu düşük pH konsantrasyonu G_c glikoproteininde konformasyonel değişikliğe neden olmaktadır ve bu durum da, G_c füzyon halkasının endozomal membrana bağlanmasını sağlamaktadır. G_c füzyon halkasının endozomal membrana bağlanmasının ardından, genetik materyalin sitoplazmaya salınmasıyla transkripsiyon ve replikasyon aşamaları başlar (2).

Orthohantavirüs genomundan viral RNA'ların sentezi, transkripsiyonu ve replikasyonu içermektedir. Bu işlemlerin ikisi de RdRp enzimi tarafından gerçekleştirilir. Negatif polariteli, segmentli RNA virüslerinin transkripsiyonunda, viral mRNA transkripsiyonunun başlaması için “Kep hırsızlığı” adı verilen işlemin gerçekleşmesi gerekmektedir. Bu süreç, viral proteinlerin sitoplazmik süreç bölgelerine (P cisimcikleri) yerleşmesini içerir ve bu bölgede, viral proteinler konak mRNA'larının kep bölgelerine bağlanarak bu konak mRNA'larını degradasyona sürüklerler. Bu işlemler bütününe sonucunda da iki farklı mekanizma meydana gelebilir. Bunlardan ilki, N- veya RdRp bağlı mRNA öncüllerinin viral replikasyonun gerçekleşeceği bölgeye transferidir. Viral replikasyonun gerçekleşeceği bölge ise, endoplazmik retikulum (ER) ile golgi arasında yer alıp, ER-Golgi aracılı bölge (ERGIC) adını almaktadır. Bir diğer alternatif ise, viral RNA sentezinin gerçekleştiği sitoplazmik süreç bölgelerinin ve oluşturulan ribonükleoproteinlerin (RNP) viral birleşme bölgelerine aktarılmasıdır. Bu taşıma N proteinleri ve konak hücre aktin ve mikrotübülleri arasında oluşan etkileşim aracılığı ile gerçekleşmektedir. “Klatrin bağımlı alım” bu mekanizmayı kullanmaktadır (2, 27).

Konak hücre mRNA'sı viral kullanım için RdRp'ın endonükleaz aktivitesi sayesinde replikasyon bölgesinde işlenir. Bu işleme, viral RNA'nın transkripsiyonu için 10-15 bazlık keplenmiş öncüllerinin eklenmesini içermektedir. Bu işlemlerin başka bir alternatif yolu ise, sitoplazmik süreç bölgelerinde yer alan hücresel endonükleazların konak hücre mRNA'sından keplenmiş öncüllerini oluşturabilmeleridir. Konak hücreden kökenlenen öncüllerler 3' ucunda bir guanin (G) rezidüsüne sahiptirler ve bu rezidü, viral RNA'nın terminusundaki AUC tekrarının sitozini (C) ile eşleşmektedir. Bazılar başarılı bir şekilde viral RNA'ya eklendikten

sonra, yeni oluşan RNA birkaç baz geri kayar ve viral RNA'nın 3' ucundaki komplementer nükleotidler yeniden sıralanırlar. "Başlangıç ve Yeniden Sıralanma" döngülerinin tekrarlanması, yeni oluşturulan mRNA'da, vRNA'nın tekrarlanan terminal dizilerin oluşumuna yol açar (27-28).

Replikasyonda, vRNA'nın ilk olarak komplementer RNA'ya (cRNA) çevrilmesi gerekmektedir. Bu çevrimin ardından cRNA çoğaltma işlemi için kalıp olarak kullanılabilir. cRNA, viral mRNA'dan en önemli iki özelliği ile farklılık göstermektedir. Bunlardan ilki, cRNA sentezinin keplenmiş öncüllere ihtiyaç duyulmaksızın gerçekleştiği düşünülmektedir. Bir diğeri ise, viral mRNA N proteini ile kaplanmış şekilde bulunmaz iken; cRNA, vRNA gibi N proteini ile kaplanmış şekilde bulunmaktadır. cRNA'nın sentezinde de, "Başlangıç ve Yeniden Düzenlenme" mekanizması kullanılmaktadır. Bu durumda, vRNA'nın C rezidüsüne bir trifosforillenmiş G'nin (pppG) başlangıç için bağlanmasından sonra, pppG RdRp'a bağlı kalması ve ardından pppG'nin kesilmesi ile, cRNA'nın monofosforillenmiş 5' ucu oluşturulmuş olur ve bu durumda cRNA, vRNA'nın replikasyonu için kullanılır. Diğer taraftan, pppG'nin RdRp'a bağlı kalmaması ve kesilmemesi sonucunda ise, pppG bağlı cRNA transkripsiyon işlemlerinin gerçekleştirilmesi için kullanılır (2, 27-28). (Şekil 2)



Şekil 2: Viral genomun replikasyon ve transkripsiyon aşamaları (2)

Viral genom replike edildikten sonra N proteini ile kaplanır. vRNA ve cRNA'nın kaplanması, trimerik N proteininin oluşumunda amino- ve karboksi-terminal rezidüleri arasındaki etkileşim ile başlar. Bu oluşan trimerik N proteininin, vRNA'da NCR'ların oluşturduğu tencere sapı yapısını spesifik olarak tanınması ile vRNA'nın kaplandığı

2.1.5. Dobrava-Belgrade orthohantavirus Rezervuarları ve Bulaş Yolları

Geçmiş yıllara kadar orthohantavirüs taşıyıcılarının sadece kemiriciler olduğu düşünülmese de, son yıllarda yapılan çalışmaları göstermiştir ki, orthohantavirüsler küçük memeliler olarak adlandırılan gruba dahil olan böcekçiller, köstebekler ve hatta yarasalar ile de taşınmaktadır (30).

Eski Dünya orthohantavirüsleri Avrupa ve Asya kıtalarında yayılım gösteren taşıyıcılarla dağılım göstermektedir. Bu taşıyıcılar da genel anlamda dört kemirici cinsi ve iki böcekçil ailesi ile sınırlıdır. Bu dört tür *Myodes* spp., *Microtus* spp. *Apodemus* spp. ve *Rattus* spp. şeklindeyken, Soridae ve Talpidae böcekçil aileleri ile taşınım görülmektedir (26).

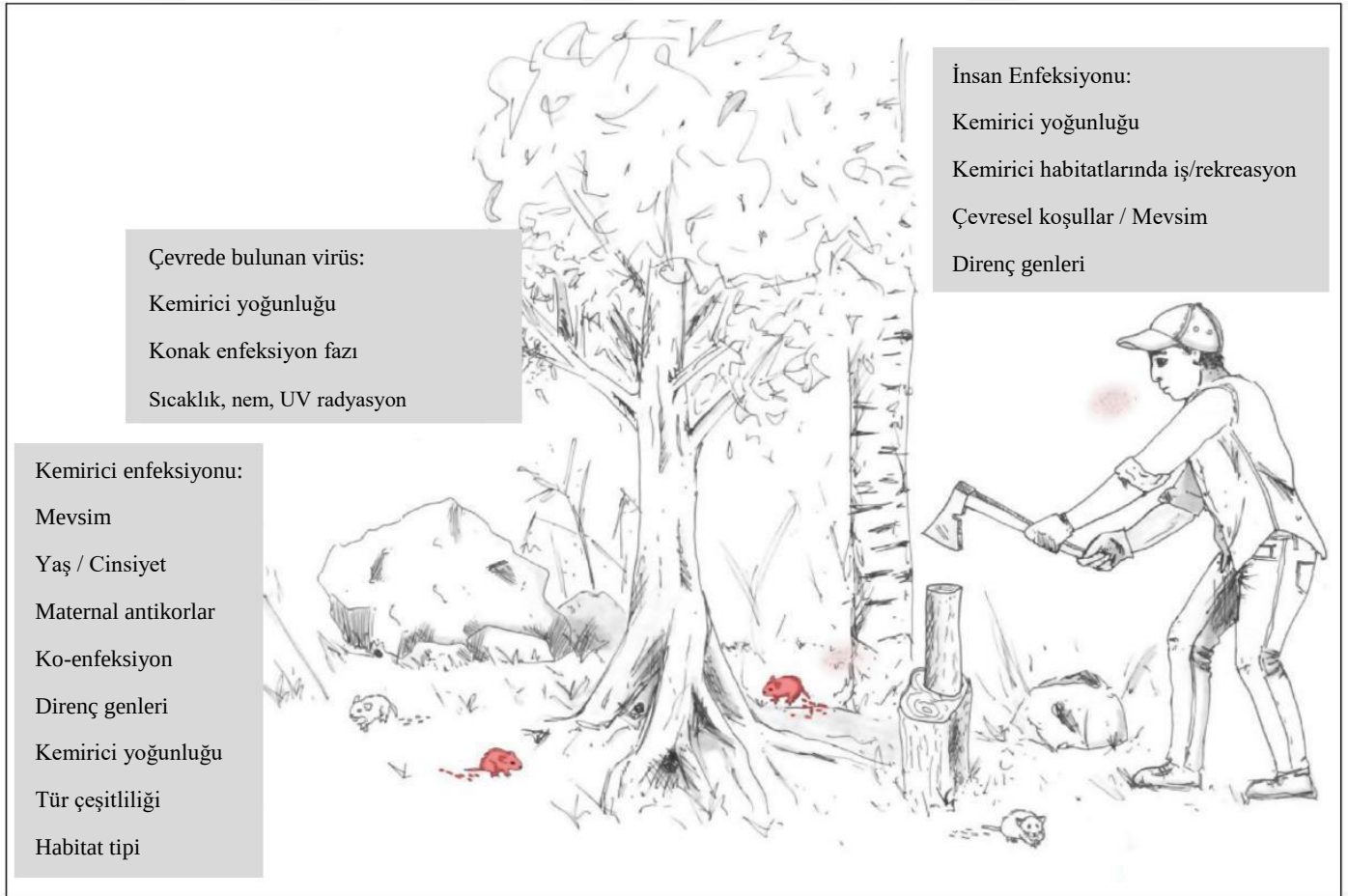
Bu taşıyıcılardan *Apodemus* spp. Avrupa kıtasında geniş yayılım gösteren, değişken bir ekolojiye ve evrime sahiptir. Bu kemirici türü RSKA'nin yüksek mortalite oranıyla sert bir formuna sebep olan DOBV için ana rezervuar olarak gösterilmiştir (26). Bunun yanında, 1950 yıllarında yüksek mortalite oranına sahip, ağır seyreden RSKA olguları bildirilmiştir ve ardından, 1992 yılında Slovenya'da Dobrava köyünde yakalanan *Apodemus flavicollis* türünde etiyolojik etken belirlenmiştir. Devamında karakterizasyonu yapılan bu etkene, bulunduğu yere ithafen *Dobrava virus* adı verilmiştir (31). Bu çalışma sayesinde, DOBV için ana rezervuarın *Apodemus flavicollis* olduğu düşünülse de devamında yapılan çalışmalar sonucunda, sadece *Apodemus flavicollis* türünün değil *Apodemus* spp. türlerinin de DOBV için taşıyıcı olduğu gösterilmiştir (26).

DOBV taşıyıcısı olarak *Apodemus agrarius*'un gösterilmesi, Rusya'nın Avrupa kıtasındaki topraklarında bulunan Tula bölgesinde gerçekleştirilen bir çalışma sonucunda olmuştur. Bu çalışma kapsamında, bu bölgeden toplanan *Apodemus agrarius* türü kemiricilerde DOBV taranmış, ardından yapılan moleküler ve filogenetik analizler sonucunda yeni bir DOBV soyu belirlenmiştir (32). Bu çalışmanın ardından, bu DOBV soyunun Orta Avrupa bölgesinde dağılım gösteren *A. agrarius* türü kemiricilerde bulunduğu ve daha önceki DOBV soyundan farklı olarak, RSKA'nin nispeten daha ılımlı bir tipine sebep olduğu gösterilmiştir. Bunun sonucunda, *A. flavicollis* türü kemiricide belirlenen DOBV soyuna DOBV-Af, *A. agrarius* türü kemiricide belirlenen DOBV soyuna ise DOBVAA adı verilmiştir (33-34).

Bu iki DOBV soyunun üzerine, Estonya'nın Saaremaa adasından toplanan *A. agrarius* türü kemiricilerde DOBV taraması yapılmış ve sonucunda, DOBV-benzeri bir virüs belirlenmiştir. Yapılan moleküler ve filogenetik analizler sonucunda, bu soy yeni bir virüs

olarak belirlenmiş ve adına da *Saaremaa virus* (SAAV) adı verilmiştir. Ayrıca bu virüsün, Orta Avrupa’da yapılan serolojik çalışmalar sonucunda, üç kişideki RSKA’da etken olarak belirlenmiştir (35-37). Bir diğer DOBV soyu ise Rusya’nın Sochi bölgesinde yürütülen bir çalışmada, *A. ponticus* türü kemiricide bulunmuştur (38).

Orthohantavirüsler konakçının salya, idrar ve dışkıları sayesinde oluşan aerosoller ile çevreye saçılmaktadır. Bu aerosollerdeki viral partiküllerin insanlar tarafından inhalasyonu sonucunda enfeksiyon gerçekleşebilmekle beraber, konakçı kemirici ile direkt temas, kemirici ısırması ve yemek kaynaklarının paylaşılması ile de insanlara bulaş söz konusudur (39-40). Konakçılarda ve insanlarda meydana gelen orthohantavirüs enfeksiyonları çeşitli sebeplere bağlı olabilmekle beraber, farklı faktörlere bağlı olarak da değişebilmektedir (41). (Şekil 4)



Şekil 4: Virüsün bulaşında etkili olan çevresel kaynaklı, kemirici kaynaklı ve insan kaynaklı faktörler. Enfekte olan kemiricilerin (kırmızı ile işaretli) salyaları ve vücut sekresyonları sonucunda oluşan aerosoller çevreye dağılmakta ve ardından diğer kemiricilerin ve insanların bu aerosollerdeki viral partikülleri solunum yoluyla alması sonucunda enfeksiyon döngüsü tekrardan başlamaktadır (41).

2.1.6. Klinik

Orthohantavirüsler RSKA ve HPS olmak üzere iki farklı klinik tabloya sebep olmaktadır. HPS Yeni Dünya orthohantavirüsleri tarafından oluşturulurken, RSKA Eski Dünya orthohantavirüsleri tarafından oluşturulmaktadır. Orthohantavirüslerin sebep olduğu bu klinik tablolar arasındaki farklılık temelde farklı vasküler yatakların etkilenmesinden kaynaklanmaktadır. RSKA tablosunda renal medulla kapilleri etkilenirken, HPS tablosunda pulmoner kapilleri etkilenmektedir. Bunun yanında, her iki tablonunda başlangıç semptomları benzerlik göstermektedir. Genel olarak tüm orthohantavirüs enfeksiyonlarının başlangıç semptomları aniden başlayan yüksek ateş, halsizlik ve kırgınlık, miyalji ve grip benzeri semptomlar şeklindedir. İki tablo arasındaki diğer yaygın semptomlar ise, vasküler geçirgenliğin artışı sonucu oluşan hipotansiyon, trombositopeni ve lökositoz olarak belirtilmektedir (42-44).

RSKA'nın kliniği etiyolojik etkenin tipine göre az belirgin, hafif veya ılımlı ve ağır olmak üzere farklı şekillerde olabilmektedir. HTNV veya DOBV gibi etkenler %5-15 mortalite oranıyla ağır bir kliniğe sebep olurken, SEOV oldukça hafif ve PUUV ile SAAV %1'den az olan mortalite oranıyla ılımlı bir kliniğe sebep olurlar. Bu kliniklerin tipleri, aynı zamanda virüsün farklı bölgelerdeki soylarına göre de değişiklik gösterebilmektedir. Örneğin PUUV'ün bazı soyları ağır tipte kliniklere de sebep olabilmektedir (27, 45-46).

Tipik bir RSKA tablosu beş dönemden oluşmaktadır ve dönemlere geçiş 2 – 4 hafta süren inkübasyonun ardından görülmektedir. Bu dönemler; ateşli dönem, hipotansif dönem, oligürik dönem, diüretik dönem ve konvalesan dönem şeklindedir. (Tablo 1) Bu dönemlerden sonuncusu olan konvalesan dönem yaklaşık olarak 6 ay sürmektedir ve orthohantavirüs enfeksiyonlarında tam anlamıyla iyileşme uzun vadede mümkündür. Bu dönemler geçirildikten sonra, konvalesan dönemi takiben görülebilecek olan semptomlar oldukça nadir olmakla beraber, belirli durumlarda renal yetmezlik ve hipertansiyon geliştiği bildirilmiştir. RSKA kliniği yetişkin bireylerde oldukça ağır seyrederken, çocuk hastalarda kliniğin daha hafif ilerlediği ve iyileşme dönemine geçişin daha hızlı olduğu görülmüştür (46-49).

Tablo 1: DOBV'ün etiyolojik etken olduğu RSKA dönemleri, süreleri ve klinik semptomlar (26).

DÖNEM	SÜRE	BELİRTİLER
Ateşli Dönem	3 – 7 gün	Yüksek ateş, üşüme, baş ağrısı, bel ağrısı, abdominal ağrı, bulantı, kusma, uyku hali, görme bozuklukları, konjunktival hemoraji, eritematöz döküntü
Hipotansif dönem	1 – 2 gün	Hipotansiyon, şok, trombositopeni, lökositoz, hemorajik hastalık başlangıcı (deri ve mukozada döküntü, deride çürükler, konjunktival sufüzyon, kan kusma, epistaksis, hematüri, intrakraniyal hemoraji)
Oligürik Dönem	3 – 7 gün	Böbrek fonksiyonlarında azalma, oligüri, anüri, proteinüri, üriner sediment anormalliği, mikroskobik hematüri, azotemi
Diüretik Dönem	Birkaç gün – 2 hafta	Hipotansiyon, elektrolit bozukluğu, visceral hemoraji, akciğer ve santral sinir sistemi tutulumu
Konvalesan Dönemi	3 – 6 hafta	Kas güçsüzlüğü, hipostenüri ve oligüri

2.1.7. Epidemiyoloji

Günümüzde, RSKA ile bağlantılı olduğu bilinen 7 orthohantavirüs türü mevcuttur. Asya kıtasında RSKA'nin ağır tipine sebep olan etken HTNV'tür ve mortalite oranı %15'tir. Bunun yanı sıra, %1-2'lik fatalite oranıyla RSKA'nin daha ılımlı bir versiyonuna sebep olan SEOV enfeksiyonlarına da rastlanmaktadır. Asya kıtasından her yıl 40 000-60 000 olgu bildirilirken, bunların %99'u Çin'den bildirilmektedir (27, 50-51).

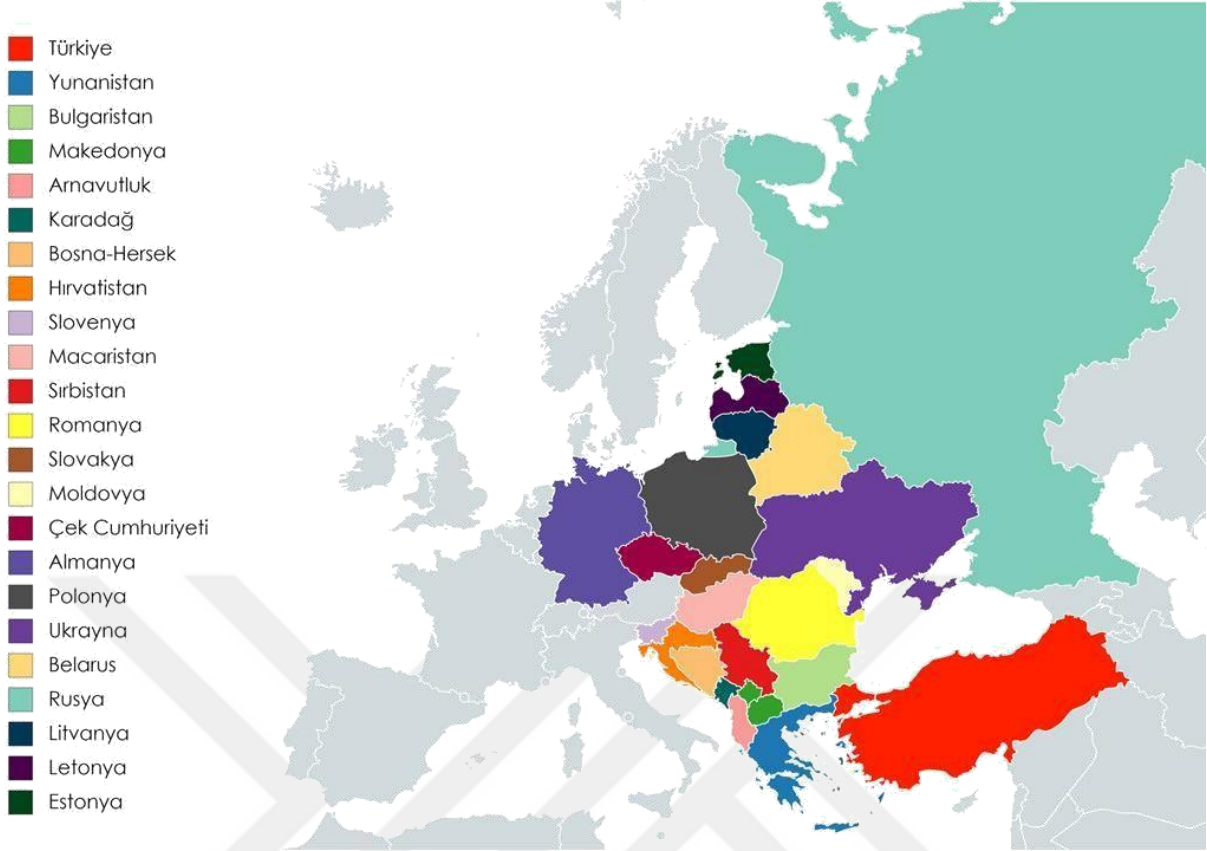
Avrupa'da her yıl 9000 RSKA olgusu bildirilmektedir ve PUUV bu olgularda çoğunlukla etken olarak belirlenmektedir. PUUV enfeksiyonları çoğunlukla *Myodes glareolus* ile insanlara geçmekte olup, bulaş sonucunda RSKA'nin hafif bir formu olan EN'ye sebep olmaktadır. PUUV enfeksiyonları çoğunlukla Rusya'nın Avrupa bölgesi, Finlandiya ve İsveç'ten bildirilmekle beraber, son yıllarda Belçika, Almanya, Fransa, Norveç, Macaristan, Avusturya ve Slovenya'dan da bildirilmektedir (21, 52-53).

RSKA'nin ağır formuna sebep olan DOBV ana taşıyıcısı *Apodemus flavicollis*'in coğrafik dağılımı oldukça fazla olmasına rağmen, DOBV enfeksiyonları genellikle Balkan

lkelerinden bildirilmektedir (54-58). Bunlara ek olarak, DOBVn bir soyu olan SAAV (veya DOBV-Aa) RSKAnin ılımlı bir formuna sebep olmakla birlikte Rusya, Almanya ve Slovakyadan bildirilmektedir (59-62).

Orthohantavirüslerin Avrupadaki sero-epidemiyojik durumunu belirlemek için yapılan çalışmalar da mevcuttur. Bu alışmalar, moleküler olarak belirlenen orthohantavirüslerin yanında, kemiricilerdeki seroprevalansı belirlemek için oldukça önemlidir. Bu alışmalar da göstermiştir ki; İtalya, Moldova, İspanya ve Birleşik Krallık gibi ülkelerde bulunan kemiricilerde seropozitiflik mevcutken; Letonya ve Litvanyada hem kemiricilerde hem de insanlarda pozitiflik bildirilmiştir (63-68).

Tüm bunlara ek olarak, günümüze kadar yapılan çalışmalar göstermiştir ki, DOBV epidemiyolojisi başlangıçta sadece Balkan lkelerinde dağılım gösterirken, moleküler epidemiyolojik ve sero-epidemiyolojik yöntemlerin geliştirilmesiyle yeni DOBV soyları keşfedilmiştir. Bu verilerle de, DOBVn Avrupadaki dağılımının hem kemiriciler hem de insan olguları göze alındığında çok daha geniş bölgelere dağılım gösterdiği belirlenmiştir (69). (şekil 5)



Şekil 5: Avrupa Kıtasında DOBV ve soylarının bildirildiği ülkeler. Günümüze kadar gerçekleştirilen hem serolojik hem de moleküler çalışmalar sonucunda, insanlarda veya rezervuarlarda DOBV ve soylarının pozitiflikleri haritada gösterilen ülkelere bildirilmiştir (69).

DOBV'nin Türkiye'de ilk olarak belirlenmesi 2009 yılında Karadeniz bölgesindeki Bartın ve Zonguldak illerinde çıkan bir salgınla olmuştur (70). Ardından, İstanbul ilinde bir RSKA olgusu belirlenmiş ve etkenin yine DOBV olduğu ortaya konmuştur (71). Bunu takiben, Doğu Karadeniz Bölgesinde bulunan Giresun ilinde bir salgın meydana gelmiş ve bu salgının etkenlerinden birisinin yine DOBV olduğu belirlenmiştir (72). 2018 yılında yapılan bir çalışmada ise, Kırklareli ilinden toplanan kemiricilerde DOBV moleküler yöntemlerle belirlenmiş ve Trakya bölgesinde DOBV varlığı gösterilmiştir (11). (Şekil 6)



Şekil 6: Türkiye’de DOBV ve soylarının bildirildiği iller. Zonguldak, Bartın ve Giresun illerinde meydana gelen RSKA salgınları sonucunda yapılan çalışmalarda etkenin DOBV olduğu belirlenmiştir. İstanbul ilinde RSKA belirtileri gösteren bir hastada DOBV pozitifliği bildirilmiştir. Kırklareli ilinde kemiricilerde gerçekleştirilen çalışma sonucunda, bu kemiricilerde DOBV pozitiflikleri bildirilmiştir (11, 70-72).

2.1.8. Laboratuvar Tanısı, Tedavi ve Korunma

RSKA ve HPS’nın ilk tanısı kliniğe başvuran hastalarda görülen semptomlarla ve hastanın öyküsüyle olmaktadır. Orthohantavirüslerde insandan insana bulaş görülmediği için hastadan alınacak öykü büyük önem taşımaktadır. Fakat, orthohantavirus enfeksiyonlarını sadece semptomlara ve hasta öyküsüne göre koymak neredeyse imkansızdır. Bu sebeple, orthohantavirüslerin tanısında laboratuvar tanısının büyük önemi vardır (21, 50).

Orthohantavirüslerin laboratuvar tanısında önerilen altın standart yöntem plak nötralizasyon testidir. Bu test, viral hücre kültüründe yapılmakta olup, orthohantavirüslere karşı tam bir sonuç verebilmektedir. Diğer yandan, bu test viral hücre kültürünün gereksiniminden dolayı zahmetli ve biyogüvenlik düzey 3 laboratuvara ihtiyaç duyduğu için günümüz laboratuvarlarında kolaylıkla kullanılabilen bir yöntem değildir (27).

İnsanlarda meydana gelen orthohantavirus enfeksiyonlarına karşı immünglobulin M (IgM) ve immünglobülin G (IgG) bağışıklık sistemi tarafından üretilmektedir. Bu antikorlar virüsün kapsid yapısında bulunan N proteinine karşı üretilmektedir. Bu antikorları temel alan serolojik testlerin kullanılmasıyla laboratuvar tanısı konabilmektedir. Orthohantavirüslerin

tanısında kullanılan en yaygın serolojik test indirekt IgM ve IgG ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) testleri kullanılmaktadır. Buna ek olarak, indirekt ELISA'dan daha yüksek özgüllüğe sahip olan IgM yakalayan ELISA'da yaygın olarak kullanılmaktadır. İndirekt immunfloresans testi de rutin olarak kullanılmaktadır fakat özgüllüğü düşük bir test olduğu için güvenilirliği çok yüksek değildir (47, 73).

Orthohantavirüslerin tanısında kullanılan bir diğer teknik ise moleküler yöntemlerin kullanılmasıdır. Kanda veya serumda orthohantavirus genomunu ters (reverse) transkriptaz polimeraz zincir tepkimesi (RT-PZT) ile belirlemek mümkündür. Hem geleneksel hem de kantitatif RT-PZT yöntemleriyle insandaki viremiyi belirlemek mümkündür (74-76). Hastadan enfeksiyonun akut fazında örneğin alınmasıyla, viremi varlığı değişkenlik gösterse bile viral RNA saptanabilmektedir. Fakat, ağır seyreden orthohantavirus enfeksiyonlarında vireminin yüksek olmasından dolayı saptama daha kolay olurken, hafif veya ılımlı bir tabloya sebep olan orthohantavirüs türlerinde vireminin düşük olmasından dolayı moleküler saptamada zorluklar yaşanabilmektedir (77-79). Bunların yanında, insan enfeksiyonlarında viremi oldukça kısa sürmektedir ve bu durum da moleküler testlerle viral RNA'yı saptamayı neredeyse imkansız hale getirmektedir (27). Bunlara ek olarak, antikorlar daha oluşmadan moleküler yöntemler ile orthohantavirüs genomunun belirlenmesi hem doğru teşhis imkanını arttırmaktadır hem de erken tanıyı sağlayarak hızla tedavi girişimlerinin başlanmasına olanak sağlamaktadır (77).

Orthohantavirüsler temelde konakçıda bulunan çeşitli organlardaki endotel hücrelerinin kapilerini enfekte etmektedirler. Bu enfeksiyonlar özellikle akciğer ve böbreklerde görülmekle beraber, enfeksiyon sırasında güçlü bir bağışık yanıt oluşturmaktadır. Patogenezin en temel özelliklerinin başında gelen vasküler geçirgenlik, hem Eski Dünya orthohantavirüslerinin sebep olduğu RSKA'da hem de Yeni Dünya orthohantavirüslerinin sebep olduğu HPS'de çok ciddi bir şekilde artmaktadır ve bu durumda, hem viral enfeksiyonun yoğun bir şekilde olmasından hem de enfeksiyon sonucunda çok güçlü bir bağışık yanıt oluşmasından kaynaklanmaktadır. Bu tablolar göz önüne alınarak antiviral etkinlik çalışmaları yapılsa da günümüzde, orthohantavirüslere karşı onaylanmış bir ilaç bulunmamaktadır. Orthohantavirüs enfeksiyonlarında kullanılan tedaviler geniş çeşitlilik gösteren terapötik stratejileri içermektedir. Bu stratejiler ise, viral yaşam döngüsünü hedefleyenler ve konak bağışıklık faktörlerine yönelik veya hasta klinik semptomlarına yönelik kullanılan terapötik ajanların kullanılmasıdır (80). (Tablo 2)

Tablo 2: Orthohantaviral enfeksiyonlara karşı kullanılabilecek potansiyel terapötik ajanlar ve stratejileri (80).

AMAÇ	İLAC	HEDEF	HASTALIK
Viral Giriş İnhibisyonu	Mab Fab 4G2 ve 1C9	Gc glikoproteini	RSKA
	Anti-SR fare serumu	Viral glikoprotein	RSKA
	Laktoferrin	Viral glikoprotein / monosit ve doğal öldürücü hücreler	RSKA
	Domain III ve kök peptidler	Gc glikoproteini	RSKA ve HPS
	012-0652, C481-1256 ve G319-0078	Konak reseptörü	RSKA ve HPS
	Fivapiravir	RdRp enzimi	HPS
Viral Replikasyon İnhibisyonu	Ribavirin	RdRp enzimi	RSKA ve HPS
	ETAR	RdRp enzimi	RSKA ve HPS
	Arbidol	Belirsiz	RSKA
	siRNA ve 3G1-C _K -tP	S-, M-, ve L- segmentleri	RSKA
Vasküler Fonksiyonun İyileştirilmesi	Ang-1 ve S1P	Vasküler Fonksiyon	RSKA ve HPS
	İkatibant	BK tip 2 reseptör	RSKA
	Vandetanib	Vasküler Fonksiyon	HPS
Bağışık Homeostazis Sağlanması	Klofilium fosfat	Alveolar makrofajlar	HPS
	Kortikoidler ve metilprednisolon	İmmunoterapi	RSKA ve HPS

Klasik antiviral ilaçları, antikorları ve yeni küçük molekülleri içeren, virüs-hedefleyen antiviraller grubunun hem laboratuvar hem de klinik çalışmaları yapılmıştır. Bu tip ilaçlar genel olarak orthohantavirüsün hücreye girişini veya viral replikasyonu engellemektedirler. Bunların

yanında, hem *in-vitro* hem de *in-vivo* deneyler sonucunda, bu gruptaki bazı ilaçların koruyucu etkilerinin olduğu gösterilse de klinik uygulamalar için henüz uygun olmadıkları ve bu uygulamalarda bazı problemlerin çıkabilmesinden dolayı tam bir sonuca varılamamıştır (78-80).

Konak-hedefleyen ilaçların birincil hedefi, vasküler geçirgenliğin artması sonucu oluşan semptomların ortadan kalkması için vasküler fonksiyon düzenlenmesini sağlamaktır. Bunun yanında, ikincil hedef ise enfeksiyon sırasında oluşan aşırı bağışık yanıtın düzenlenmesinde görev alan bağışık yanıt homeostazis mekanizmasının tekrardan oluşturulması üzerinedir. Bu tablolara özgü kullanılan ilaçlar etkin sonuç verse de sağaltımın yapılması ve enfekte bireyler için sağlıklı olup olmamaları üzerine şüphe duyulmakta, bu ilaçlar üzerine tartışmalar devam etmekte ve bu alanla ilgili çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bunlara ek olarak, enfekte bireye yönelik uygulanan tedaviler, enfeksiyon sonucunda oluşan semptomların giderilmesi ve bu bireylerin genel sağlık durumlarına göre destekleyici tedavi uygulanması şeklindedir (60, 66, 80).

Orthohantavirüslere karşı bazı aşılar geliştirilmiştir ve çeşitli aşı çalışmaları halen daha devam etmektedir. Fakat, henüz lisanslı bir aşı bulunmamaktadır. Bunun yanında, Çin ve Kore’de inaktif hantavirüs aşıları kullanım için onaylansa da bu aşıların lisansları, Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri tarafından tanınmamaktadır (80). Bunların dışında günümüze kadar, RSKA’ya karşı oluşturulan moleküler aşı adaylarından iki tanesi insanlarda test edilmiştir. Bunlardan ilki, HNTV’ün M segmentinden oluşturulan rekombinant aşı – vektörlü aşı karışımı şeklindedir. İkincisi ise, plazmid DNA’sı ile oluşturulan bir aşıdır (81-82). Bunlara ek olarak, başta HNTV ve PUUV olmak üzere birçok farklı *Orthohaantavirus* türüne karşı aşı çalışmaları farklı fazlarda olacak şekilde devam etmektedir (80). (Tablo 3)

Tablo 3: Orthohantavirüslere karşı klinik denemeleri ve olgu-kontrol çalışmaları olan aşılar (80).

Klinik Tablo	İçerik	Tip / Aşama	Yaş	Uygulanan Kişi Sayısı	Durum
RSKA	Hantavax	Olgu-Kontrol Çalışması	20-22	129	Tamamlandı
RSKA	Hantavax	Olgu-Kontrol Çalışması	20-30	100	Tamamlandı
RSKA	İnaktif Hantavirus Aşısı	Faz 4	16-60	143	Tamamlandı
RSKA	RSKA İnaktif aşı [HNTV (tip I) ve SEOV (tip II) karışımı]	Olgu-Kontrol Çalışması	16-60	100	Tamamlandı
RSKA	HNTV/PUUV DNA aşısı/antikor karışımı	Faz 1	18-49	31	Tamamlandı
RSKA	HNTV/PUUV DNA aşısı	Faz 2a	18-49	132	Aktif, uygulamaya başlanmadı
HPS	Andes virus DNA aşısı	Faz 1	18-49	48	Uygulanmakta
RSKA	HNTV aşısı PUUV aşısı HNTV/PUUV aşısı	Faz 1	18-49	72	Henüz uygulanmaya başlanmadı

Orthohantavirus enfeksiyonunun gerçekleşmesinin en önemli sebeplerinden birisi ormanlık alanlarda yaşamak ve bu alanlardaki evlerin ya da kulübelerin etrafını temizleyip, ormanı tahrip etmektir. Bu bağlamda, inşaat ve orman çalışanları, çiftçiler ve askerler risk grubunu oluşturmaktadırlar (83-84). Korunma için en temel önlemlerin başında rezervuar kontrolü gelmektedir. Bunun yanında, kemirici yuvalarının ve risk bölgesinde bulunan evlerin etrafındaki gıda kaynaklarının azaltılması korunma için etkindir. Evlerin içerisinde bulunan kemiricilerin ev ortamından uzaklaştırılması ve kontamine bölgelerle temasın ortadan kaldırılması da korunmada yapılması gerekenler içerisinde yer almaktadır. Kısacası, korunma için potansiyel rezervuarlarla hem direkt hem de endirekt olarak temasın ortadan kaldırılması gerekmektedir. Bu korunma önlemleri alındığı takdirde, orthohantavirüslerin neden olduğu enfeksiyonların meydana gelme ihtimali yok denecek kadar azdır (83-84).

2.2. Yeni Nesil Dizileme

Yeni nesil dizileme (YND) virolojide farklı alanlarda oldukça uzun süredir uygulanmaktadır. Virom metagenomiği, tüm genom dizileme, virüs yayılımının takip edilmesi, terapötik ajanların geliştirilmesi ve potansiyel patojenlerin tanımlanması gibi virolojide çok farklı alanlarda YND teknikleri yer almaktadır (14). TGD, yeni görülen virüslerin insanlarda sağlığı tehdit etme potansiyellerinin ortaya konması için, tanımlanma ve karakterizasyonlarının yapılmasında sıklıkla kullanılmaktadır (13).

YND için günümüze kadar üretilmiş olan birçok farklı sistem bulunmaktadır. 454 dizileme, SOLiD dizileme, Illumina dizileme, Helicos dizileme, PacBio dizileme, İyon torrent gibi günümüzde farklı alanlarda kullanılan değişik özellikte YND teknikleri bulunmaktadır. Bu sistemlerden hangisinin kullanılacağı, yapılacak olan çalışmanın içeriğine göre değişmektedir. Dizileme işlemi yapılacak olan örneğin büyüklüğü, Guanin ve Sitozin içeriği, genom eldesinde istenen kapsam ve doğruluk platform seçiminde rol oynayan önemli faktörlerdendir. Aynı zamanda, bu platformların maliyeti, iş süresi ve elde edilen ham verilerin işlenmesi için gerekli bilgisayar temelli araçların ulaşılabilirliği de platform seçiminde göz önünde bulundurulmalıdır. Bu bakımdan, virüslerin ve özellikle RNA virüslerinin dizileme işlemlerinin yapılması için en uygun olan ve günümüzde en çok tercih edilen yöntem Illumina dizileme platformudur ve bu platforma ek olarak, SOLiD dizileme de yaygın olarak kullanılmaktadır (14).

Illumina dizileme platformu “köprü amplifikasyonu” olarak adlandırılan bir yöntemle gerçekleştirilmektedir. Bu teknikte, dizileme işlemi öncesinde hazırlanan örnek kütüphanelerinde kullanılan kalıp DNA’ya adaptörler bağlanır. Bu adaptörler DNA dizisinin her iki ucuna da bağlanmaktadır. DNA’ya bağlı bu adaptörler, amplifikasyon sentez reaksiyonları sırasında substrat görevi görmektedir. Bu adaptörler, dizileme işlemi için kullanılan plakların yüzeylerinde bulunan oligonükleotidlere komplementerdir. Bu sayede kalıp DNA’nın, dizileme reaksiyonunun gerçekleşeceği plak yüzeyine bağlanması sağlanır. İlk bağlanmadan sonra, kalıp DNA’nın amplifikasyonu gerçekleşir ve bu çoğaltma işlemi sırasında kullanılan her bir nükleotidin kendine ait floresans özelliği ile dizi çıkartılır. Ardından kalıp DNA yıkama işlemiyle ortamdan uzaklaştırılırken, kopya DNA yüzeydeki oligonükleotide bağlanır. Bu bağlanmadan sonra, DNA’nın bağlı olmayan serbest ucu da yandaki diğer komplementer oligonükleotide bağlanır ve bu sayede köprü yapısı oluşturulmuş olur. Bu köprü modelinde amplifikasyon reaksiyonları gerçekleştirildikten sonra, bağlı olan uçlar ayrılır ve sonuçta, bir “ileri” (forward) bir tane de “geri” (reverse) DNA zinciri elde edilmiş olur. Bu işlem ile de çift-uçlu dizilime (paired-end sequencing) işlemi gerçekleştirilir. Bu işlemlerin ardından sentez, köprü modeli ve çift-uçlu dizileme işlemleri tekrarlanarak sürekli yeni kopya üretimi sağlanmış olur. Bu dizileme işlemi sırasında kullanılan nükleotidler aynı zamanda reaksiyonu sonlandırıcı etki de gösterebilirler. Bu nükleotidlerin bloke olması durumunda bir sonraki sentez gerçekleşmez ve nihayetinde reaksiyon sonlanmış olur. Illumina dizileme platformunda meydana gelen her bir reaksiyon 300 kez veya daha fazla sayıda tekrarlanabilir. Bu durumda, dizileme sırasında çok fazla kopyanın üretilmesine ve buna bağlı olarak da çok fazla sayıda DNA dizi çıktısı elde edilmesi sağlanır (85).

YND tekniklerinin kullanıldığı çalışmalarda, en zorlayıcı kısım informatik alanıdır. Bu informatik alanının, biyolojik bilimlerde kullanılmasıyla adı biyoinformatik olmaktadır. Biyoinformatik analizler eğer etkili bir şekilde kullanılabilirlerse, elde edilen ham verilerdeki dizileri doğru şekilde oluşturmak oldukça kolaydır (14). Geçmiş yıllarda hem YND tekniklerinin yokluğu hem de biyoinformatik alanının eksikliğinden dolayı, virüslerin genomlarını çıkartmak oldukça zor ve zahmetli bir işken, günümüzde özellikle biyoinformatik alanının popüler olması ve gelişmesiyle, bu işlemler çok daha kolay hale gelmiştir. Biyoinformatik analizler için kullanılabilecek bilgisayar temelli çok çeşitli araçlar bulunmaktadır. Bu araçlar, dizileme platformlarına göre farklılık gösterse de yapılan çalışmanın tipine göre seçim yapılabilmektedir. Biyoinformatik işlemlerinin virüs genomu çıkartmak için

kullanılmasında farklı aşamalar ve seçenekler mevcuttur. Biyoinformatik işlemlerin en başında, elde edilen dizilerin kalitesinin kontrol edilmesi ve istenmeyen dizilerin (ortamda kalan adaptörler, metagenomik çalışma ise sadece hedef etkenin dizilerinin seçilmesi v.b.) temizliği gelmektedir. Bu aşamaların ardından, eğer referans dizi mevcut ise, elde edilen ham veriler bu referansa göre basitçe haritalanabilmektedir. Eğer referans dizi mevcut değil ise, elde edilen diziler ile anlamlı ve doğru birleştirmelerin yapılması gerekmektedir. Referansın olmadığı, elde edilen dizilerin birleştirilmesiyle bir referans oluşturulmak istenirse, “*de novo*” birleştirme olarak adlandırılan bir teknik kullanılabilir. Bu teknik ile elde edilen dizinin doğruluğunun kontrolü çok önemlidir. Bunu sağlamak için de “*de novo*” birleştirme sonucunda elde edilen dizi, referans dizi olarak kabul edilir ve ilk başta elde edilen ham verilerle direkt olarak haritalama yapılır. Eğer uygun eşleşmeler yakalanıyor ise, yapılan birleştirme işlemi doğru bir şekilde meydana gelebilmiştir. Tüm bu birleştirme işlemlerinin ardından, dizisi çıkartılmak istenen etkenin daha önceden elde edilen dizileri var ise, GenBank’ın “BLAST” aracı kullanılarak, diğer dizilerle karşılaştırılması elde edilen dizinin doğruluğunun sağlanması için gereklidir (86).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

“Kırklareli ilinden elde edilen *Dobrava-Belgrade orthohantavirus* izolatının yeni nesil dizileme ile tüm genom dizilemesi ve genetik karakterizasyonu” adlı tez çalışması, deneysel niteliktedir.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Tez çalışması, Temmuz 2018 tarihinde literatür taraması ile başlayıp Ekim 2020 tarihinde tez savunması ile son bulmuştur. Tez çalışması, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında ve Helsinki Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Viroloji Bölümü laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Bu tez çalışması, insana ait bir örnek içermemektedir. Bunun yanında, tez çalışmasının insan deneyi de bulunmamaktadır. Bu sebeplerden dolayı, araştırmanın evreni ve örnekleme bulunmamaktadır.

3.4. Çalışma Materyali

2009 yılında yapılan bir çalışma kapsamında Kırklareli ili İğneada bölgesinden “Sherman” tipi tuzak kapanlar kullanılarak 73 adet kemirici toplandı. 2009 yılında toplanan kemirici örnekleriyle yapılan ilk çalışmada, 8 adet *Apodemus flavicollis* türü kemiricide DOBV pozitifliği saptandı (11).

Bu çalışmada ise, 2009 yılında toplanan ve pozitiflikleri belirlenen arşiv materyali dokular kullanıldı. Kemiricilerden pozitiflik saptanan 8 tanesinden birisi seçildi ve virüsün tüm genom dizilemesi için çalışmaya dahil edildi. Pozitifliği bilinen kemiricilerin akciğer dokuları viral RNA ekstraksiyonu için kullanıldı.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Kemiricilere ait akciğer örneklerinde *Orthohantavirus* varlığı çalışmanın “bağımsız değişkeni” iken, *Orthohantavirus* genomuna ait dizilerin akciğer dokularında saptanması “bağımlı değişken” olarak değerlendirildi.

3.6. Veri Toplama Araçları

Tablo 4: Çalışma sırasında kullanılan cihaz, kimyasal ve sarf malzemelere ait bilgiler.

Malzeme Adı	Marka	Katalog No	Kullanıldığı Analiz
Bistüri ucu (22 numara)	PlusMED	-	Dokuların kesilmesi
RNAlater	Invitrogen	AM7021	Örnek dokuların saklanması
Paslanmaz çelik boncuklar (5 mm)	QIAGEN	69989	Dokuların homojenizasyonu
Ajitatör	Retsch	MM400	Dokuların homojenizasyonu
TRIzol Reagent	Invitrogen	15596018	Viral RNA izolasyonu
Kloroform	Merck	1.02445.2500	Viral RNA izolasyonu
İzopropanol	Smyras	1490100	Viral RNA izolasyonu
Etil Alkol	Sigma	32221	Viral RNA izolasyonu ve YND kütüphane hazırlığı
Vorteks	Stuart	SA8	RNA İzolasyonunda yıkanması
DNAz/RNAz içermeyen distile su	Invitrogen	10977035	Viral RNA izolasyonu
Ters transkripsiyon kiti	Thermo Scientific	EP0402	cDNAsentezi
dNTP mix (10 mM)	ThermoFisher Scientific	R0193	cDNA sentezi

SimpliAmp Thermal Cycler	ThermoFisher Scientific	A24811	cDNA sentezi ve Kütüphane zenginleştirme
1,5 mL'lik steril tüp	Greiner	616 201	Tüm testler
2 mL'lik steril tüp	Greiner	623 201	Tüm testler
0,2 mL'lik PZT tüpü	Axygen	PCR-02	cDNA sentezi
Filtreli Pipet Ucu (0,5-10, 10-100, 100-1000 µl)	SSIBIO	-	Tüm Testler
Pipet Seti	ThermoFisher Scientific	-	Tüm Testler
-86°C Derin Dondurucu	Nüve	DF490	Örnek saklama
-20°C Derin Dondurucu	Ariston	-	Malzemelerin ve cDNA'ların saklanması
+4°C Buzdolabı	Vestel	-	Malzemelerin ve reaktiflerin saklanması
Nitril eldiven	SeaSoul	-	Viral RNA izolasyonu ve kütüphane hazırlığı
Pudrasız eldiven	Tenty	-	cDNA sentezi
Su banyosu	Memmert	WNB45	Viral RNA izolasyonu
Soğutmalı santrifüj	Heraeus	Labofuge 400R	Viral RNA izolasyonu
Çeker ocak	Köttermann	2-453-GAND	Viral RNA izolasyonu
Manyetik Rak	ThermoFisher Scientific	MR02	Kütüphane hazırlığı
Nanodrop Spektrofotometre	Marshall Scientific	ND-1000	RNA miktar ve saflık ölçümü
Qubit 4 Florometre	ThermoFisher Scientific	Q33226	Kütüphane miktar ve saflık ölçümü
FastGene Plate Santrifüj	Nippon Genetics	NG040	Kütüphane hazırlığı

NEBNext Ultra II RNA Kütüphane Hazırlık Kiti (Illumina için)	New England BioLabs	E7775	Kütüphane Hazırlığı
NEBNext Multiplex Oligos, Illumina için (Index Primers Set 3)	New England BioLabs	E7710S/L	Kütüphane Hazırlığı
NEBNext rRNA Eliminasyon Kiti (İnsan/Fare/Sıçan)	New England BioLabs	#6350	Kütüphane Hazırlığı
SPRIselect, 5 mL	Beckman Coulter	B23317	Kütüphane Hazırlığı
AMPure XP, 60 mL	Beckman Coulter	A63881	Kütüphane Hazırlığı
Qubit RNA HS Assay Kit	ThermoFisher Scientific	Q32852	Kütüphane miktar ve saflık ölçümü
Qubit dsDNA HS Assay Kit	ThermoFisher Scientific	Q32851	Kütüphane miktar ve saflık ölçümü
Mx3000P qPCR System	Agilent	401420	Kütüphane miktar ölçümü
Agaroz	Applchem	A2114,0500	Agaroz jel elektroforezi
SafeView	ABM	G108	Agaroz jel elektroforezi
Elektroforez Tankı	ThermoFisher Scientific	ELED-B2	Agaroz jel elektroforezi
Güç Kaynağı	ThermoFisher Scientific	EC 3000 XL	Agaroz jel elektroforezi
Jel Görüntüleme Sistemi	Analytik Jena	97-0192-05	Agaroz jel elektroforezi
Mikrodalga fırın	Roda	RD-7017PA	Agaroz jel elektroforezi
MiSeq Sistemi	Illumina	SY-410-1003	Yeni Nesil Dizileme
MiSeq Reagent Kit	Illumina	MS-102-3003	Yeni Nesil Dizileme
Bilgisayar	HP	8MC21UA#ABA	Biyoinformatik analiz

3.6.1. Laboratuvar Çalışmaları

3.6.1.1. RNA İzolasyonu

Temmuz 2009 tarihinde toplanan, Polat ve ark. tarafından PZT ve senkans pozitifliği bildirilen doku örneklerinin RNA izolasyonunun gerçekleştirilebilmesi için, örnek dokularının homojenizasyonu yapıldı (11).

Homojenizasyonun yapılabilmesi için, bistüri ucu (PlusMED) yardımı ile dokudan parça kesildi. Kesilen doku parçası 500 µL TRIzol (Invitrogen) içerisine alındı. Dokunun parçalanabilmesi için, TRIzol içerisine 5 milimetrelık çapa sahip olan paslanmaz çelik boncuk (Qiagen) eklendi ve ardından, ajitator (Retsch) içerisinde 45 saniye çalkalanan dokuların parçalanması sağlandı. Elde edilen homojenizat steril 2 mL'lik tüp (Greiner) içerisine alındı. Homojenizatlardan RNA izolasyonu ise Chomczynski ve Sacchi tarafından bildirilen guanidin-tiyosiyanat-fenol-kloroform yöntemi ile gerçekleştirildi (87).

Elde edilen homojenizatlardan RNA izolasyonun yapılabilmesi için “Faz Ayrımı” ve “RNA İzolasyonu” olmak üzere iki aşama gerçekleştirildi. Faz ayrımı sayesinde homojenize edilen örnekten RNA ve DNA izolasyonlarının yapılabilmesi mümkün hale getirildi.

Faz ayrımı:

- ❖ Homojenize edilen örneklerin oda sıcaklığına gelebilmeleri için 5-8 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- ❖ Oda sıcaklığına erişen örnekler 100 µL kloroform (Merck) eklendi ve 10-15 saniye tüpler el ile yavaşça alt üst edilerek örneğin kloroform ile karışması sağlandı.
- ❖ Kloroform eklenen örnekler karıştırıldıktan sonra 2-3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- ❖ İnkübasyonun ardından örnekler 12000 x g'de 15 dakika 4°C'de santrifüj edilerek fazların ayrımı sağlandı.
- ❖ Faz ayrımı sonucunda tüplerdeki üstte kalan renksiz faz RNA izolasyonu için yeni bir tüpe alındı, altta kalan renkli faz ise daha sonra DNA izolasyonunda kullanılmak için -86°C'ye kaldırıldı.

RNA izolasyonu:

- ❖ Faz ayırımında RNA izolasyonu için yeni tüpe aktarılan renksiz fazın üzerine 250 µL izopropanol eklendi ve ardından yavaşça karıştırıldı.
- ❖ İzopropanol eklenen RNA içeren renksiz fazdaki RNA'nın çökmesinin sağlanması için 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyon gerçekleştirildikten sonra, 12000 x g'de 10 dakika 4°C'de santrifüj gerçekleştirildi.
- ❖ Santrifüj sonrasında RNA içermeyen süpernatant uzaklaştırıldı.
- ❖ Tüp içerisindeki pellete 500 µL %75 oranında hazırlanmış etil alkol eklendi.
- ❖ Yıkama işlemi için eklenen %75'lik etil alkol içeren tüpteki pelletin tam olarak yıkanması için vorteks (Stuart) kullanıldı ve ardından 7500 x g'de 5 dakika 4°C'de santrifüj yapılarak RNA'nın çökmesi sağlandı.
- ❖ Santrifüj sonucunda süpernatant uzaklaştırılırken, pellet üzerinde kalan etil alkolün tamamen uçması için tüpler kapakları açık olacak şekilde 5-10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- ❖ Fazla etil alkolün uçurulmasının ardından, çökeltilen RNA'nın süspanse hale gelebilmesi için pelletin üzerine 20 µL DNaz/RNaz içermeyen distile su eklenerek, su banyosunda 58°C'de 13 dakika inkübe edildi.
- ❖ Elde edilen RNA'nın komplementer DNA sentezi gerçekleştirildikten sonra, daha sonra kullanılmak üzere -86°C'de saklandı.

3.6.1.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

RNA izolasyonu ile elde edilen örneklerin RNA'larını komplementer DNA'ya çevrilmesi için RevertAid Ters Transkriptaz Kiti (Thermo Fischer Scientific) kullanıldı.

Komplementer DNA eldesi için reaksiyon, üretici firmanın yönlendirmelerine göre hazırlandı. Buna göre, reaksiyon başına 5 µl RNA'nın üzerine 1 µl random hexamer öncül olarak eklendi ve toplam hacim enjeksiyonluk su ile 12 µl'ye tamamlandı. Hazırlanan karışım 65°C'de 5 dakika inkübe edildikten sonra, buz içerisinde bekletildi. Ardından, 12 µl karışıma; 5x reaksiyon solüsyonundan 4 µl, RiboLock RNaz inhibitöründen 1 µl, 10 mM dNTP karışımından 2 µl, RevertAid Ters Transkriptaz enziminden de 1 µl eklenerek toplam hacim 20 µl'ye tamamlandı. Toplam hacmi 20 µl olan reaksiyon karışımı 25°C'de 5 dakika, 42°C'de 60 dakika ve 70°C'de 5 dakika bekletildi ve komplementer DNA eldesi için gereken inkübasyon gerçekleştirildi.

Reaksiyon sonucunda elde edilen komplementer DNA ürünleri, -86°C’de derin dondurucuya kaldırıldı ve daha sonra analizlerde kullanılmak üzere saklandı.

3.6.1.3. Kütüphane Hazırlığı

RNA izolasyonu safhasında kemiricilerin akciğer dokularından elde edilen RNA örnekleri kütüphane hazırlığında kullanıldı. Yeni nesil dizileme ile dizileme yapılması için çok önemli bir basamak olan kütüphane hazırlığı basamağında, örnek tiplerine uygun olarak NEBNext rRNA Eliminasyon Kiti (İnsan/Fare/Sıçan) (New England BioLabs) kullanıldı. Örneklerin kütüphane hazırlığı, üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi.

Kütüphane hazırlığına alınacak örneğin ilk olarak Nanodrop Spektrofotometre (Marshall Scientific) ile saflığı ve miktarı ölçüldü. Miktarı 1 µl’de 5 ng ile 1 µg arasında olan ve aynı zamanda DNA içermeyen örnek kütüphane hazırlığına alındı.

Taşıyıcı konaktan gelen ribozomol RNA’ların elimine edildiği ve direkt RNA’dan yapılan kütüphane hazırlığı çok çeşitli basamaklar içermektedir. Bu basamaklar; RNA ile prob hibridizasyonu, RNaz H parçalanması, DNaz parçalanması, RNA saflaştırması, RNA fragmentasyonu ve öncülleme, cDNA ilk iplik sentezi, cDNA ikinci iplik sentezi, çift iplikli cDNA saflaştırması, cDNA kütüphanesinin sonlandırılması, adaptör ligasyonu, adaptör ligasyonlu çift iplikli cDNA saflaştırması, adaptör ligasyonlu DNA’nın PZT zenginleştirilmesi, adaptör ligasyonlu DNA’nın saflaştırması, kütüphane miktar ve fragman büyüklüğü ölçümleri şeklindedir.

Kütüphane hazırlığında uygulanan her basamağın amacı şu şekildedir:

- ❖ RNA ile prob hibridizasyonu: RNA izolasyonu basamağında elde edilen, toplam RNA örneği içerisinde bulunan kemirici ribozomal RNA’sının prob ile hibridizasyonu sonucunda, rRNA’ların işaretlenmesi sağlanmıştır.
- ❖ RNaz H parçalanması: Bir önceki basamakta prob ile işaretlenmesi yapılan konak kemirici rRNA’larının RNaz H enzimi ile parçalanmasını sağlayan basamaktır.
- ❖ DNaz parçalanması: Toplam RNA örneği içerisinde kalan DNA’ların parçalanması için örneğin DNaz ile muamele edilmesini ve kontaminant DNA’ların uzaklaştırılmasını içeren basamaktır.
- ❖ RNA saflaştırması: Örnek RNA’nın kontaminant protein veya nükleik asitlerden arındırılması için yapılan basamaktır.

- ❖ RNA fragmentasyonu ve öncülleme: Örnek RNA'nın dizileme için uygun küçük parçalara ayrılmasını ve bu parçalara da cDNA sentezi için öncüllerin bağlanmasını sağlayan basamaktır.
- ❖ cDNA ilk iplik sentezi: Dizileme işleminin yapılabilmesi için RNA'nın cDNA'ya çevrimindeki ilk ipliğin sentezinin gerçekleştirildiği basamaktır.
- ❖ cDNA ikinci iplik sentezi: Dizileme işlemi için ilk iplik cDNA sentezi yapılan örneğin, çift iplikli DNA örneği haline gelmesini sağlamak amacıyla uygulanan basamaktır.
- ❖ cDNA saflaştırması: RNA'dan çift iplikli cDNA haline gelen örneğin bulunduğu ortamın temizlenmesi ve kontaminantlardan arındırılması için uygulanan basamaktır.
- ❖ cDNA kütüphanesinin sonlandırılması: İlk ve ikinci iplik sentezleri tamamlanan RNA örneğinin, dizilemeye hazır DNA haline getirilmesi için uygulanan basamaktır.
- ❖ Adaptör ligasyonu: Fragmentasyon basamağında küçük parçalara ayrılan ve ardından cDNA haline çevrilen DNA örneği parçalarının uçlarına adaptör takılmasını içeren basamaktır. Bu sayede, adaptörler aracılığı ile örnek parçalarının birbirleri ile birleştirilmesi sağlanmaktadır.
- ❖ Adaptör ligasyonlu çift iplikli cDNA saflaştırılması: Adaptör ligasyonu basamağında örnek DNA'ya bağlanmayan adaptör dizilerinin ortamdan uzaklaştırılması ve adaptör dimerine sebep olmaması için uygulanan basamaktır.
- ❖ Adaptör ligasyonlu DNA'nın PZT zenginleştirilmesi: Adaptör dizileri bağlı olan DNA parçalarının, dizileme esnasında daha rahat okunması için miktarının PZT yöntemi ile artırıldığı basamaktır.
- ❖ Adaptör ligasyonlu DNA'nın saflaştırılması: PZT zenginleştirilmesi yapılan örneğin içerisinde, bir önceki tepkimeden kalan kontaminant reaksiyon bileşenlerinin uzaklaştırılması için yapılan basamaktır.
- ❖ Kütüphane miktarı ve fragman büyüklüğü ölçümleri: Kütüphane hazırlığı tamamlanan örneğin, YND tekniği için uygun miktarda hazırlandığını doğrulamak ve aynı zamanda konsantrasyonlarının da hesaplanması için gerekli olan "ng" cinsinden miktarının belirlendiği basamaktır. Buna ek olarak, kütüphane hazırlığının

fragmentasyon basamağında oluşturulan örnek parçalarının, konsantrasyon hesabının yapılabilmesi için boyutlarının belirlendiği basamaktır.

RNA ile prob hibridizasyonu:

- ❖ 12 µl RNA'nın üzerine 1 µl NEBNext rRNA eliminasyon solüsyonu, 2 µl prob hibridizasyon tamponu eklendi ve toplam 15 µl hacim elde edildi.
- ❖ Örnek pipet ile karıştırıldı ve ardından plak santrifüjde çöktürüldü.
- ❖ Örnek, 95°C'de 2 dakika inkübe edildikten sonra, sıcaklık saniyede 0,1°C azalarak 22°C'ye düşürüldü. Devamında, 22°C'de 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda örnekler hızlı bir şekilde buza içerisine alındı.
- ❖ İnkübasyon sırasında cihazın kapak sıcaklığı 105°C'ye ayarlandı.

RNase H parçalanması:

- ❖ Toplam hacmi 15 µl olan karışımın üzerine 2 µl NEBNext RNase H, 2 µl NEBNext RNase H tepkime tamponu, 1 µl nükleaz içermeyen su eklendi.
- ❖ Son toplam hacmi 20 µl olan karışım 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.
- ❖ İnkübasyon sırasında cihaz kapak sıcaklığı 40°C olarak ayarlandı.
- ❖ İnkübasyonun ardından plak santrifüj kullanılarak karışım çöktürüldü ve ardından, örnek hızlı bir şekilde buz içerisine alındı.
- ❖ Bu işlemlerin ardından, spesifik olmayan RNA parçalanmasının önüne geçmek için hızlı bir şekilde DNase parçalanması basamağına geçildi.

DNase parçalanması:

- ❖ DNase parçalanması basamağının gerçekleştirilmesi için, DNase master karışım hazırlandı. Bu karışım, 5 µl DNase I reaksiyon tamponu, 2.5 µl DNase I (RNase içermeyen), 22.5 µl nükleaz içermeyen su içerecek şekilde hazırlandı.
- ❖ 20 µl hacme sahip olan örneğin üzerine 30 µl olan DNase master karışım eklendi ve son toplam hacmin 50 µl olması sağlandı.
- ❖ Örnek, kapak sıcaklığı 40°C'ye ayarlı olan cihazda 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.
- ❖ İnkübasyonun ardından örnekler plak santrifüjünde çöktürüldü ve buza konuldu.

RNA saflaştırması:

- ❖ RNA örneğinin üzerine 110 µl RNA bağlayan manyetik boncuklardan eklendi. (AMPure XP, Beckman Coulter) En az 10 defa pipet ile al-ver yapılarak RNA örneği manyetik boncuklarla karıştırıldı.
- ❖ Manyetik boncuk içeren örnek, RNA'nın manyetik boncuklara tam olarak bağlanabilmesi için buzun içerisinde 15 dakika inkübe edildi.
- ❖ İnkübe edilen örnek, manyetik rak üzerine alındı ve süpernatantın şeffaf hale gelmesi sağlandı.
- ❖ RNA bağlı manyetik boncuklar manyetik rak etkisinden dolayı tüpün bir tarafında toplandı ve şeffaf hale gelen süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı.
- ❖ RNA bağlı manyetik boncukları içeren tüpe yıkama işlemi için, yeni hazırlanmış %80'lik etil alkol çözeltisinden 200 µl eklendi ve oda sıcaklığında 30 saniye inkübasyona bırakıldı. Ardından, RNA bağlı manyetik boncuklara değmeden süpernatant uzaklaştırıldı ve bu aşama toplamda 2 defa tekrarlandı.
- ❖ Etil alkol ile yıkama işleminin ardından manyetik boncukların üzerinde kalan etil alkolün uzaklaştırılması için, boncuklar oda sıcaklığında 2-5 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu aşamada yapılan inkübasyonda, boncukların tamamen kurumaması gerektiği için tam bir inkübasyon süresi belirlenmedi.
- ❖ Etil alkol tamamen uçurulduktan sonra, RNA bağlı manyetik boncukları içeren tüp manyetik raktan alındı ve üzerine 7 µl nükleaz içermeyen su eklendi. Örnek plak santrifüjde çöktürüldü ve ardından pipet ile iyice karıştırıldı.
- ❖ Örnek 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve tekrar manyetik raka yerleştirildi.
- ❖ Manyetik rakta bulunan örnek tüpünde, RNA bağlı olmayan boncuklar tüpün bir tarafında toplandı ve RNA içeren süpernatanttan 5 µl alınıp yeni bir tüpe aktarıldı.

RNA fragmentasyonu ve öncülleme:

- ❖ 5 µl örneğin üzerine, 4 µl NEBNext ilk iplik sentezi tepkime tamponu (5X) ve 1 µl rastgele öncüller eklendi.
- ❖ Toplam hacmi 10 µl olan karışım 94°C'de 7 dakika inkübe edildi.
- ❖ İnkübasyonun ardından örnek hızlı bir şekilde buzun içerisine alındı.

cDNA ilk iplik sentezi:

- ❖ Bu aşama için, örnek başına 8 µl nükleaz içermeyen su ve 2 µl NEBNext ilk iplik sentezi enzim karışımı içeren tepkime karışımı hazırlandı.
- ❖ Bu karışımdan 10 µl alındı ve bir önceki basamakta hacmi 10 µl olan örneğin üzerine eklendi. Böylece son hacmin 20 µl olması sağlandı.
- ❖ cDNA ilk iplik sentezi için gerekli enzimleri içeren örnek kapak sıcaklığı 80°C olan cihazda inkübasyona alındı.
- ❖ İnkübasyon 25°C'de 10 dakika, 42°C'de 15 dakika ve 70°C'de 15 dakika olacak şekilde gerçekleştirildi.
- ❖ İnkübasyon tamamlandıktan sonra, örnek bir süre 4°C'de bekletildi.

cDNA ikinci iplik sentezi:

- ❖ Bu aşama için, örnek başına 8 µl NEBNext ikinci iplik sentezi tepkime tamponu (10X), 4 µl NEBNext ikinci iplik sentezi enzim karışımı ve 48 µl nükleaz içermeyen su içeren tepkime karışımı hazırlandı.
- ❖ Bu aşamada hazırlanan karışımdan 60 µl alındı ve önceki basamakta toplam hacmi 20 µl olan örneğin üzerine eklendi. Böylece son hacim 80 µl oldu.
- ❖ cDNA ikinci iplik sentezi için gerekli enzimleri ve tamponları içeren örnek kapak sıcaklığı 40°C'ye ayarlı olan cihazda inkü edildi.
- ❖ İnkübasyon 16°C'de 1 saat olacak şekilde gerçekleştirildi.
- ❖ İnkübasyonun ardından örnek hızlı bir şekilde buzun içerisine alındı.

Çift iplikli cDNA saflaştırması:

- ❖ cDNA örneğinin üzerine 144 µl çift iplikli cDNA bağlayan manyetik boncuklardan eklendi. (SPRIselect, Beckman Coulter) En az 10 defa pipet ile al-ver yapılarak cDNA örneği manyetik boncuklarla karıştırıldı.
- ❖ Manyetik boncuk içeren örnek, cDNA'nın manyetik boncuklara tam olarak bağlanabilmesi için oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
- ❖ İnkübe edilen örnek, manyetik rak üzerine alındı ve süpernatantın seffaf hale gelmesi sağlandı.
- ❖ cDNA bağlı manyetik boncuklar manyetik rak etkisinden dolayı tüpün bir tarafında toplandı ve seffaf hale gelen süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı.

- ❖ cDNA bağı manyetik boncukları içeren tüpe yıkama işlemi için, yeni hazırlanmış %80'lik etil alkol çözeltisinden 200 µl eklendi ve oda sıcaklığında 30 saniye inkübasyona bırakıldı. Ardından, cDNA bağı manyetik boncuklara değmeden süpernatant uzaklaştırıldı ve bu aşama toplamda 2 defa tekrarlandı.
- ❖ Etil alkol ile yıkama işleminin ardından manyetik boncukların üzerinde kalan etil alkolün uzaklaştırılması için, boncuklar oda sıcaklığında 2-5 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu aşamada yapılan inkübasyonda, boncukların tamamen kurumaması gerektiği için tam bir inkübasyon süresi belirlenmedi.
- ❖ Etil alkol tamamen uçurulduktan sonra, cDNA bağı manyetik boncukları içeren tüp manyetik raktan alındı ve üzerine kullanılan kit tarafından sağlanan 0.1X TE tamponundan 53 µl eklendi.
- ❖ TE tamponu ve cDNA bağı manyetik boncuk içeren örnek 2 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Inkübasyonun ardından örnek manyetik raka yerleştirildi.
- ❖ Manyetik rakta bulunan örnekte, herhangi bir manyetik boncuk içermeyen ve saflaştırılmış cDNA'yı içeren süpernatanttan 50 µl alındı ve yeni bir tüpe aktarıldı.

cDNA kütüphanesinin sonlandırılması:

- ❖ Bu aşama için, örnek başına 7 µl NEBNext Ultra II son hazırlık tepkime tamponunu ve 3 µl NEBNext Ultra II son hazırlık enzim karışımını içeren bir tepkime karışımı hazırlandı.
- ❖ Hazırlanan karışımdan 10 µl alındı ve örneğin üzerine eklendi. Böylece, örneğin son hacmi 60 µl oldu.
- ❖ Gerekli enzimleri ve tamponları içeren örnek, kapak sıcaklığı 75°C olan cihazda inkübasyona alındı.
- ❖ Inkübasyon; 20°C'de 30 dakika, 65°C'de 30 dakika ve 4°C'de bekletilerek gerçekleştirildi.
- ❖ Inkübasyonun ardından DNA örneği hızlı bir şekilde buz içerisine alındı.

Adaptör ligasyonu:

- ❖ Bu aşama uygulanmadan önce kullanılacak olan adaptörler seyreltildi. Kütüphane hazırlığına alınan örnekteki RNA miktarı 100 ng üzerinde olduğu için, adaptör seyreltmesi 5-kat olacak şekilde gerçekleştirildi. Buna göre, 4 µl adaptör solüsyonundan alındı ve 16 µl nükleaz içermeyen su alınarak karıştırıldı.
- ❖ Bir önceki aşamadan elde edilen DNA örneğinin üzerine; 1 µl NEBNext ligasyon arttırıcı, 30 µl NEBNext Ultra II ligasyon ana karışımı ve 2.5 µl seyreltik adaptör eklendi. Böylece son hacim 93.5 µl oldu.
- ❖ Ön inkübasyon 20°C’de 15 dakika olacak şekilde gerçekleştirildi.
- ❖ İnkübasyonun ardından hızlı bir şekilde 3 µl USER enzimi örneği de içeren ligasyon karışımına eklendi ve son hacim 96.5 µl oldu.
- ❖ USER enzimi de içeren karışım, kapak sıcaklığı 45°C olan cihazda 37°C’de 15 dakika inkübe edildi.
- ❖ İnkübasyonun ardından örnek hızlı bir şekilde buz içerisine alındı.

Adaptör ligasyonlu çift iplikli cDNA saflaştırması:

- ❖ Adaptör ligasyonlu cDNA örneğinin üzerine 87 µl çift iplikli cDNA bağlayan manyetik boncuklardan eklendi. (SPRIselect, Beckman Coulter) En az 10 defa pipet ile al-ver yapılarak adaptör ligasyonlu cDNA örneği manyetik boncuklarla karıştırıldı.
- ❖ Manyetik boncuk içeren örnek, adaptör ligasyonlu cDNA’nın manyetik boncuklara tam olarak bağlanabilmesi için oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
- ❖ İnkübe edilen örnek, manyetik rak üzerine alındı ve süpernatantın seffaf hale gelmesi sağlandı.
- ❖ Adaptör ligasyonlu cDNA bağlı manyetik boncuklar manyetik rak etkisinden dolayı tüpün bir tarafında toplandı ve seffaf hale gelen süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı.
- ❖ Adaptör ligasyonlu cDNA bağlı manyetik boncukları içeren tüpe yıkama işlemi için, yeni hazırlanmış %80’lik etil alkol çözeltisinden 200 µl eklendi ve oda sıcaklığında 30 saniye inkübasyona bırakıldı. Ardından, cDNA bağlı manyetik boncuklara değmeden süpernatant uzaklaştırıldı ve bu aşama toplamda 2 defa tekrarlandı.

- ❖ Etil alkol ile yıkama işleminin ardından manyetik boncukların üzerinde kalan etil alkolün uzaklaştırılması için, boncuklar oda sıcaklığında 2-5 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu aşamada yapılan inkübasyonda, boncukların tamamen kurumaması gerektiği için tam bir inkübasyon süresi belirlenmedi.
- ❖ Etil alkol tamamen uçurulduktan sonra, cDNA bağlı manyetik boncukları içeren tüp manyetik raktan alındı ve üzerine kit tarafından sağlanan 0.1X TE tamponundan 17 µl eklendi.
- ❖ TE tamponu ve adaptör ligasyonlu cDNA bağlı manyetik boncuk içeren örnek 2 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından örnek manyetik raka yerleştirildi.
- ❖ Manyetik rakta bulunan örnekte, herhangi bir manyetik boncuk içermeyen ve adaptör ligasyonlu cDNA'yı içeren süpernatanttan 15 µl alındı ve yeni bir tüpe aktarıldı.

Adaptör ligasyonlu DNA'nın PZT zenginleştirilmesi:

- ❖ Adaptör ligasyonlu örneğin PZT zenginleştirilmesi için ana karışım hazırlandı.
- ❖ Bu ana karışım örnek başına; 15 µl adaptör ligasyonlu DNA örneği, 25 µl NEBNext Ultra II Q5 ana karışım, 10 µl evrensel öncül karışımı içerecek şekilde hazırlandı.
- ❖ Ana karışımın hazırlanmasından sonra, toplam hacmi 50 µl olan karışım, kapak sıcaklığı 105°C olan cihazda inkübasyona alındı.

Tablo 5: Adaptör ligasyonlu DNA'nın PZT zenginleştirmesinde kullanılan inkübasyon koşulları.

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	98°C	30 saniye	1
Denatürasyon	98°C	10 saniye	15
Bağlanma / Uzama	65°C	75 saniye	
Son Uzama	65°C	5 dakika	1
Bekletme	4°C	∞	-

Adaptör ligasyonlu DNA'nın saflaştırması:

- ❖ Adaptör ligasyonlu DNA örneğinin üzerine 45 µl DNA bağlayan manyetik boncuklardan (0.9X) eklendi. (SPRIselect, Beckman Coulter) En az 10 defa pipet ile al-ver yapılarak adaptör ligasyonlu DNA örneği manyetik boncuklarla karıştırıldı.
- ❖ Manyetik boncuk içeren örnek, adaptör ligasyonlu DNA'nın manyetik boncuklara tam olarak bağlanabilmesi için oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
- ❖ İnkübe edilen örnek, manyetik rak üzerine alındı ve süpernatantın seffaf hale gelmesi sağlandı.
- ❖ Adaptör ligasyonlu DNA bağlı manyetik boncuklar manyetik rak etkisinden dolayı tüpün bir tarafında toplandı ve şeffaf hale gelen süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı.
- ❖ Adaptör ligasyonlu DNA bağlı manyetik boncukları içeren tüpe yıkama işlemi için, yeni hazırlanmış %80'lik etil alkol çözeltisinden 200 µl eklendi ve oda sıcaklığında 30 saniye inkübasyona bırakıldı. Ardından, DNA bağlı manyetik boncuklara değmeden süpernatant uzaklaştırıldı ve bu aşama toplamda 2 defa tekrarlandı.
- ❖ Etil alkol ile yıkama işleminin ardından manyetik boncukların üzerinde kalan etil alkolün uzaklaştırılması için, boncuklar oda sıcaklığında 2-5 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu aşamada yapılan inkübasyonda, boncukların tamamen kurumaması gerektiği için tam bir inkübasyon süresi belirlenmedi.
- ❖ Etil alkol tamamen uçurulduktan sonra, DNA bağlı manyetik boncukları içeren tüp manyetik raktan alındı ve üzerine kit tarafından sağlanan 0.1X TE tamponundan 23 µl eklendi.
- ❖ TE tamponu ve adaptör ligasyonlu DNA bağlı manyetik boncuk içeren örnek 2 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından örnek manyetik raka yerleştirildi.
- ❖ Manyetik rakta bulunan örnekte, herhangi bir manyetik boncuk içermeyen ve adaptör ligasyonlu DNA'yı içeren süpernatanttan 20 µl alındı ve yeni bir tüpe aktarıldı.
- ❖ Bu basamakla birlikte kütüphane hazırlığı tamamlandı ve elde edilen kütüphanelerin miktar ölçümleri ve büyüklükleri için son basamağa geçildi.

Kütüphane miktar ve fragman büyüklüğü ölçümü:

- ❖ Kütüphane hazırlığı tamamlanan örneğin dizilemesi yapılmadan önce Qubit 4 florometre (ThermoFischer Scientific) cihazında miktarı ve agaroz jel elektroforezinde de fragman büyüklüğü ölçümü yapıldı.
- ❖ Qubit 4 florometre cihazındaki miktar ölçümü için çalışma karışımı hazırlandı. Bu çalışma karışımı 1 µl Qubit reaktifi ve 199 µl çift iplikli DNA tamponu içerecek şekilde hazırlandı.
- ❖ Çalışma karışımından toplamda 4 tüp hazırlandı. Bu tüplerden iki tanesi Qubit standartları ve diğer iki tanesi de örnekler için hazırlandı.
- ❖ Standartları içerecek olan tüplerden 10'ar µl ve örnekleri içerecek olan tüplerden 5'er µl atıldı.
- ❖ Standartlardan bir tanesi "Standart 1" olarak adlandırıldı, çalışma karışımına bu standarttan 10 µl aktarıldı ve bu standart 0 ng/µl olarak kayda alındı.
- ❖ Standartlardan diğeri "Standart 2" olarak adlandırıldı, çalışma karışımına bu standarttan 10 µl eklendi ve bu standartta 100 ng/µl olarak kayda alındı.
- ❖ Örnekleri içerecek olan tüplere ise, örneklerden 5 µl eklendi ve ardından ölçümleri yapıldı.
- ❖ Qubit 4 florometre cihazından ölçümleri yapılan ve ng/µl cinsinden miktarları belirlenen örneklerin fragman büyüklüklerinin belirlenebilmesi için Agaroz jel elektroforezi ile ölçümü gerçekleştirildi.
- ❖ Bunun için, 50 µl TAE içerisinde %2'lik Agaroz jel hazırlandı ve elektroforez tankı içerisinde donduruldu.
- ❖ Ardından örnekler 1 µl GelRed yükleme boyasından 5 µl örneğin üzerine eklendi ve örnek-boya karışımı agaroz jelinde bulunan kuyucuklara yüklendi. Devamında, yüklenen örnekler 80V akımda yürütüldü ve UV ışın altında görüntülendi.

3.6.1.4. Yeni Nesil Dizileme ve Biyoinformatik Analiz

Kütüphane hazırlığı tamamlanan, Qubit 4 florometre ölçümünde miktarı uygun bulunan ve Agaroz jel elektroforezinde istenilen boyutlarda gözlemlenen örnekler, dizileme işlemine alınmadan önce son basamak olan dizileme havuzu hazırlığına alındı. Bu son basamaktaki amaç; dizilemesi yapılacak olan tüm örneklerin tek bir tüpte toplanması, uygun konsantrasyonda olacak şekilde birleştirilmesi ve bunun sonucunda tek seferde birden fazla örneğin dizisinin elde edilmesi şeklinde belirlendi. Dizileme sonucunda havuz içerisinde bulunan örneklerin ayrımı, adaptör ligasyonlu DNA'nın PZT zenginleştirilmesi basamağında kullanılan evrensel öncüllerin kendilerine has içerdiği diziler ile yapıldı. Bu öncüller, her bir örnek için farklı olacak şekilde kullanıldı ve bunun sonucunda, dizileme sonunda elde edilen diziler Illumina MiSeq sistemi tarafından otomatik olarak birbirlerinden ayrıldı. Bu sayede, elde edilen dizilerin biyoinformatik analizleri yapılabildi ve istenilen örneğin dizileri elde edilebildi.

Örneklerin bir arada bulunduğu dizileme havuzunun hazırlığı için tüm örneklerin konsantrasyonları eşitlendi. Bunun için, “[Qubit ile belirlenen konsantrasyon (ng/μl) ÷ 660 x Kütüphane büyüklüğü] x 10⁶” formülü kullanılarak örnek konsantrasyonları “nM” cinsinden belirlendi. Ardından, tüm örnekler 4 nM konsantrasyona sahip olacak şekilde seyreltildi ve aynı konsantrasyonda olan diğer örnekler karıştırılarak dizileme havuzu hazırlandı.

Dizileme havuzu hazırlandıktan sonra, bu havuz kullanılarak -1 ile -5 arasında 10-katlı seyreltmeler hazırlandı. Bu seyreltmelerden -1 ve -2 seyreltmeler kullanılmadı ve atıldı. Diğer seyreltmeler (-3, -4 ve -5 seyreltmeler) konsantrasyon hesabı için Eş-Zamanlı PZT de inkübasyona alındı. Bu aşamada, konsantrasyonu bilinen 4 adet standart ve her dilüsyondan 3 adet kullanıldı. Eş-Zamanlı PZT sonucunda elde edilen verilerde dilüsyon konsantrasyonları istenilen düzeyde gözlemlendi. Dizileme için uygun konsantrasyona sahip olan dizileme havuzu, tüm bu işlemlerin ardından Illumina MiSeq sisteminde dizilemeye alındı.

Oluşturulan havuzun dizileme işlemi yapılırken Illumina MiSeq sisteminde uzun diziler elde etmek için kullanılan “MiSeq Reagent Kit” (600-Döngü) ile dizileme işlemi gerçekleştirildi. Dizileme işlemi sonucunda evrensel öncüllere göre Illumina sistemi tarafından otomatik olarak ayrılan örnekler “.fastq” formatında elde edildi. Dizileri içeren bu dosyaların biyoinformatik analizleri dizileme işleminden sonra gerçekleştirildi.

Dizileme sonucunda elde edilen dizilerin kütüphane hazırlığı toplam RNA izolasyonundan elde edilen RNA'dan yapıldığı için, bu dizilerin içerisinde DOBV dizileri dışında konak ve konak içerisinde bulunan diğer RNA dizileri de vardı. Konak dizilerini çıkarmak için Genbank aracılığı ile türü bilinen konağın dizilerini içeren bir veri seti oluşturuldu. Bu veri seti, elde edilen dizilerden konak dizilerini ayırmak için kullanıldı. Bu işlem için MİRA 5.0 aracının yem özelliği kullanıldı. Bu araç sayesinde, konak dizilerini içeren veri seti ile, örnek dizilerinde bu veri seti ile eşleşen diziler ayrıldı. Bu sayede örneklerden elde edilen dizilerde temizlik işlemi yapıldı ve konak kaynaklı diziler, örnek dizilerinden ayrıldı.

Temizleme işleminin ardından, elde edilen örnek dizilerinin “*de novo*” birleştirmesi yapıldı. Bu işlem, bir genom birleştirme aracı olarak çalışan MİRA 5.0 aracında gerçekleştirildi. Bu işlemin ardından, *de novo* birleştirilmesi gerçekleştirilen diziler elde edildi. Bu dizilerin uzunlukları, doğrulukları ve kapsamalarını ölçmek için dizi haritalaması gerçekleştirildi. Haritalama işlemi UGENE aracında gerçekleştirildi. Bu araçta gerçekleştirilen haritalama sonucunda, elde edilen dizilerin kapsamı, doğru bir şekilde elde edilip edilemediği ham veri üzerinden belirlendi. *De novo* birleştirme sonucunda elde edilen diziler referans sekans gibi kullanıldı ve ham veri üzerinden haritalaması yapılarak, elde edilen dizilerin eşleşmeleri gözlemlendi. Bu eşleşmeler ile, elde edilen diziler *de novo* birleştirme ile doğru bir şekilde elde edilebildi.

Bu işlemlerin ardından ileri biyoinformatik analizler gerçekleştirildi. Elde edilen dizilerde gerçekten DOBV dizilerinin varlığının kontrol edilmesi için, dizileme sonucunda elde edilen diziler Trimmomatic aracı ile düzenlendi. Bu düzenlemede; uzunluğu 25 baz çiftinin altında, kapsamı 20'nin altında ve kalite skoru 30'un altında olan diziler atıldı. Bu işlemin ardından, GenBank veritabanı üzerinden klinik önemi olan tüm virüslerin dizilerini içeren veri seti oluşturuldu. Trimmomatic aracı ile, düzenlenmesi yapılan diziler ile oluşturulan veri seti karşılaştırıldı. Virüs veri setindeki diziler ile eşleşen tüm örnek dizileri ayrıldı. Sadece virüs dizileriyle eşleşen örnek virüs dizilerini içeren yeni bir veri elde edilmiş oldu. Bu verinin yeniden *de novo* birleştirilmesi yapıldı. Bu birleştirme Megahit aracı ile yapıldı. Devamında, birleştirilen diziler Megahit aracılığıyla, Genbank veri tabanının “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) özelliği ile veri tabanında bulunan virüs dizilerinin hem nükleotid hem de protein dizileri ile karşılaştırıldı. Bu sayede, konak akciğer dokusunda bulunan ve klinik önemi olan tüm virüslerin dizileri belirlendi ve dizilerin içerisinde DOBV dizilerinin en yüksek oranda olduğu gözlemlendi.

De novo birleştirmesi yapılan ve doğruluğu kontrol edilen dizilerin tüm genom karşılık gelip gelmediğinin görüntülenmesi için, GenBank veri tabanı üzerinden DOBV tüm genom dizilerini içeren bir veri seti oluşturuldu. Özellikle GenBank veri tabanında bulunan DOBV referans dizisi göz önünde bulundurularak, MEGA 7.0 aracında bulunan ClustalW ile çoklu hizalama yapıldı. Bu hizalama işlemi sonucunda, örnek dizilerinin eksik olan bölgeleri ve elde edilen bölgeleri görüntüledi. Tüm genom dizisindeki eksik olan bölgeleri elde etmek için öncül tasarımı, PZT ve Sanger dizileme gerçekleştirildi.

3.6.1.5. Polimeraz Zincir Tepkimesi ve Sanger Dizileme

MEGA 7.0 aracında ClustalW ile elde edilen diziler GenBank veri tabanında bulunan DOBV referans dizisine göre hizalandı. Bu hizalama sonucunda, elde edilen dizilerde hangi nükleotid pozisyonlarının elde edildiği görüntüledi. Hizalama sonucunda elde edilemeyen boşlukların dizisinin çıkartılabilmesi için öncül tasarımı gerçekleştirildi.

Öncül tasarımında çoğaltılacak bölgelerin hem ileri hem de geri öncüllerinin ortalama 20-25 nükleotid uzunlukta olmasına dikkat edildi. Ayrıca, öncüller tasarlanırken bağlanma sıcaklıklarının (T_m) birbirine yakın olmasına özen gösterildi. Bunlara ek olarak, tasarlanan öncüllerin sekonder yapı oluşturmadaıkları da kontrol edildi.

Tablo 6. Yeni nesil dizileme ile elde edilen dizilerdeki boşlukların PZT ve Sanger dizileme yöntemleri ile doldurulması için tasarlanan öncüller.

Öncül Dizisi (5' → 3')	Polarite	Öncül Adı	Segment / Boşluk No.
ACA ACC ACG AAG GCC AAC TG	Sense	DOBV_G1_F	S / 1
TGT CCT GTA GTC TCA TCA ATG TC	Antisense	DOBV_G1_R	S / 1
GAT ATG AGG AAT ACC ATC ATG GC	Sense	DOBV_G2_F	S / 2
CCT AGT GCA AAT ACA TCC ACC AA	Antisense	DOBV_G2_R	S / 2
GAG ACA ACA TCA AGT GAG GTC AA	Sense	DOBV_G1_F	M / 1
GAA ACA ATC CTG GGC TAT AAA CG	Antisense	DOBV_G1_R	M / 1

GGT GTT ACC GGA CAT TAA ATC TC	Sense	DOBV_G2_F	M / 2
CAG GAT TAC AGC CCC AAC TG	Antisense	DOBV_G2_R	M / 2
GAG GGA TTG GTT ATC AAA AAG CC	Sense	DOBV_G1_F	L / 1
GTG GGT TCA CTT ATA TTG AGC TC	Antisense	DOBV_G1_R	L / 1
CGA AGT CTC AGG TTG TAG CTA A	Sense	DOBV_G2_F	L / 2
GTT CAA TAA AGC TCT CCC CAG A	Antisense	DOBV_G2_R	L / 2
GAA GGC TGT GCT GTA TCA ATA C	Sense	DOBV_G3_F	L / 3
TGC ATG TAA CCT AAA AGT GCC	Antisense	DOBV_G3_R	L / 3
GAG GTA ACT CAA GAA GAT CTT G	Sense	DOBV_G4_F	L / 4
GAA GGT CAC CTT CAT AGA GC	Antisense	DOBV_G4_R	L / 4
CCC CTG CTG CAT ACT CAT TAA	Sense	DOBV_G5_F	L / 5
CCT TTT TGA GAT ACC AGA AGC T	Antisense	DOBV_G5_R	L / 5

Dizilerde bulunan boşluklara uygun olarak öncüllerin tasarlanması ardından, PZT tekniğinin uygulanması için 25 µl hacime sahip olan tepkime karışımı hazırlandı. PZT yönteminde kullanılan tepkime karışımının içeriği ve tepkime koşulları aşağıda belirtilmiştir. (Tablo 7-11)

Tablo 7. PZT yöntemi için hazırlanan tepkime karışımının içeriği ve konsantrasyonu.

İçerik	Hacim
Enjeksiyonluk su	14,5 μ L
10X Tepkime Tamponu	2,5 μ L
MgCl ₂ (25 mM)	2 μ L
dNTP Karışımı (10 mM)	0,5 μ L
İleri Öncül (Sense / Forward) (20 μ M)	1 μ L
Geri Öncül (Antisense / Reverse) (20 μ M)	1 μ L
Taq DNA Polimeraz (5U/ μ L)	0,5 μ L
Kalıp cDNA	3
Toplam Hacim	25 μ L

Tablo 8. PZT yönteminde S segmentte bulunan boşlukların doldurulması için kullanılan tepkime koşulları.

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95°C	3 dakika	1
Denatürasyon	95°C	30 saniye	35
Bağlanma	54°C	45 saniye	
Uzama	72°C	1 dakika	
Son Uzama	72°C	10 dakika	1

Tablo 9. PZT yönteminde M segmentte bulunan boşlukların ve L segmentte bulunan birinci boşluğun doldurulması için kullanılan tepkime koşulları.

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95°C	3 dakika	1
Denatürasyon	95°C	30 saniye	35
Bağlanma	56°C	30 saniye	
Uzama	72°C	1 dakika	
Son Uzama	72°C	10 dakika	1

Tablo 10. PZT yönteminde L segmentte bulunan ikinci, dördüncü ve beşinci boşlukların doldurulması için kullanılan tepkime koşulları.

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95°C	3 dakika	1
Denatürasyon	95°C	30 saniye	35
Bağlanma	54°C	30 saniye	
Uzama	72°C	1 dakika	
Son Uzama	72°C	10 dakika	1

Tablo 11. PZT yönteminde L segmentte bulunan üçüncü boşluğun doldurulması için kullanılan tepkime koşulları.

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95°C	3 dakika	1
Denatürasyon	95°C	30 saniye	35
Bağlanma	53°C	30 saniye	
Uzama	72°C	1 dakika	
Son Uzama	72°C	10 dakika	1

PZT yöntemi ile istenilen bölgelerin çoğaltılması gerçekleştirildikten sonra, PZT ürünleri Agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi. Agaroz jel hazırlığı için 1X tris asetat-EDTA (TAE) tamponu hazırlandı. Bu tampondan 100 mL alındı ve içerisine 1.7 gr Agaroz (Applchem) eklendi. Bu işlemin devamında, agarozun tampon içerisinde tam olarak çözünmesi için solüsyon mikrodalga fırında ısıtıldı. Tampon içerisinde çözünen agarozun DNA'yı görünür hale getirmesi için, 5 µL SafeView (ABM) agaroz solüsyonunun içerisine eklendi. %1,7 olacak şekilde hazırlanan agaroz solüsyonu elektroforez tankına döküldü ve oda sıcaklığında inkübe edilerek katılaşması sağlandı.

Oda sıcaklığında katılaşan agaroz jelde bulunan kuyulara DNA yüklenerek görüntülendi. Bu yükleme, 5 µL örnek DNA'nın 1 µL yükleme boyası ile karıştırılarak DNA-boya karışımının kuyulara aktarılmasıyla gerçekleştirildi. Örnek DNA büyüklüklerinin tam olarak anlaşılması için de kuyulara "DNA ladder" yüklendi. Ardından, agaroz jele yüklenen DNA 120 volt'ta 1 saat yürütüldü. Yürütme işlemi sona erdikten sonra, agaroz jel görüntüleme sisteminde (Analytik Jena) örnek DNA'lar görüntülendi.

Agaroz jel elektroforezinin görüntülenmesiyle istenilen büyüklükte olduğu gözlemlenen DNA'ların dizilerinin elde edilmesi için Sanger dizileme gerçekleştirildi. Ticari bir şirketten hizmet alımı olarak yapılan Sanger dizilemede PZT ürünleri çift yönlü olarak okutuldu.

Sanger dizileme ile elde edilen dizilerin analizinde MEGA 7.0 aracı kullanıldı. Kromotogram üzerinden dizilemenin kalitesi kontrol edildi ve uygun olan diziler alındı. Ardından, YND ile elde edilen dizilerle birlikte hizalanan Sanger dizilerinin boşlukları doldurması sağlandı. Böylece, YND tekniği Sanger dizileme tekniği ile birlikte kullanılarak her segment için tüm genom dizilerinin elde edilmesi sağlandı.

Çalışmada YND öncesinde uygulanan kütüphane hazırlığı, kemiriciden elde edilen toplam RNA kullanılarak yapıldı. Bu aşamada kullanılan RNA yapı olarak çabuk parçalanmaya müsait olduğu için, kütüphane hazırlığında istenen miktarda RNA kütüphanesi hazırlanamadı. Bundan dolayı, YND sonucunda elde edilen dizilerde boşluklar meydana geldi. Fakat, dizilerde bulunan boşlukların doldurulması için yeni öncüller tasarlandı, PZT tekniği ile bu boşluklar çoğaltıldı ve Sanger dizileme yöntemiyle dolduruldu.

3.6.1.6. *Filogenetik ve Genetik Analiz*

Tüm genom dizisi elde edilen DOBV İğneada, Türkiye izolatının filogenetik analizlerinin yapılabilmesi için veri setleri oluşturuldu. Her üç segment için ayrı ayrı olacak şekilde, GenkBank veri tabanında bulunan tüm genom dizileri “.fasta” formatında kaydedilerek veri setleri oluşturuldu. Bu veri setlerine tüm genom dizisi elde edilen DOBV İğneada, Türkiye izolatının dizisi de eklendi. Bu veri setlerinin hizalama ve filogenetik ağaç analizleri MEGA 7.0 aracında yapıldı.

Veri seti içerisindeki diziler MEGA 7.0 aracında bulunan ClustalW ile “ikili hizalama” ve “çoklu hizalama” analizleriyle hizalandı. Bu işlem sonucunda, hizalaması yapılan dizilerde hataya sebep olan klon veya hücre kültürü dizileri veri setinden çıkartıldı. Hizalamada uygun hale getirilen dizilerin filogenetik analizleri yapıldı.

Filogenetik analizde hizalaması yapılan diziler kullanıldı. Bu dizilerle filogenetik ağaç oluşturulmasında kullanılması gereken en uygun model belirlendi. Bunun için, MEGA 7.0 aracında bulunan “en iyi DNA/Protein modelini bul” özelliği kullanılarak farklı modellerin istatistiki verileri elde edildi. Bu istatistik verilerinde en düşük “Bayesian Information Criterion” (BIC) değerine sahip olan model, filogenetik ağaç çiziminde kullanılan veri seti için en uygun model olarak belirlendi. Filogenetik ağacın oluşturulmasına hazır hale gelen diziler, “Maximum Likelihood” ağacı oluşturmak için analize alındı. Her segment için ayrı ayrı çizilen filogenetik ağaçlar kendilerine uygun olan modelle ve 1000 “bootstrap” olacak şekilde

oluşturuldu. Analiz sonucunda her segment için, orjinal ağaç ve “bootstrap” konsensüs ağacı olmak üzere iki farklı ağaç elde edildi. Bunlardan “bootstrap” konsensüs ağacı, toplamda 1000 kez çizilen tüm filogenetik ağaçlar ile oluşturuldu ve bu sebeple, doğru filogenetik ağaç olarak kabul edildi. Ayrıca, filogenetik ağaç üzerine diziler arasındaki genetik mesafeyi belirten istatistik verileri de eklendi.

Elde edilen dizilerdeki “Açık Okuma Dizisi” (AOB) GenBank veritabanında bulunan ORFfinder aracı kullanılarak belirlendi. Bunun için, elde edilen nükleotid dizileri bu araca yüklendi. Minimum AOB uzunluğu 75 nükleotid, genetik kod “Standart” ve AOB başlangıç kodunu “ATG” olacak şekilde ayarlandı. ORFfinder aracında her üç segmentin de analizi yapıldı ve analiz sonucunda segmentlerde bulunan AOB belirlendi. Ayrıca, bu AOB ile üretilen viral ürünler de GenBank veri tabanı üzerinden saptandı. AOB ile üretilen viral ürünler, ORFfinder aracı ile bağlantılı olarak çalışan “SmartBLAST” aracı kullanılarak saptandı ve istenilen AOB’nin elde edildiği görüldü. Elde ettiğimiz dizilerdeki AOB’nin belirlenmesiyle beraber, bu dizilerden kodlanan amino asitlerin analizleri için, aynı araç üzerinden protein dizileri oluşturuldu.

Filogenetik ağaçlarda yerleri gösterilen her bir segmentin hem nükleotid hem de protein dizileri üzerinden yüzde benzerliği hesaplandı. Her üç segment için hem nükleotid hem de protein dizilerini içeren veri setleri GenBank veri tabanı üzerinden oluşturuldu. Bu veri setleri, “Multiple Alignment Program for Amino acid or Nucleotide Sequences (MAFFT)” versiyon 7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/index.html>) aracında çoklu hizalama analizi için sisteme yüklendi. Hizalama sonucunda dizilerin birbirleri ile benzerlikleri yüzde olarak görüntülendi. Ardından, yüzde benzerlik oranları GenBank veri tabanında bulunan BLAST aracının nükleotid dizileri için “BLASTn” ve protein dizileri için de “BLASTp” özellikleri kullanılarak belirlendi. Bunun sonucunda, her iki aracın sonuçları karşılaştırılarak sonuçların birbirlerini desteklediği görüldü.

Kırklareli ilinden elde edilen yerel *Dobrava-Belgrade orthohantavirus* izolatının her üç segmenti için de “SimPlot” analizi yapıldı. Bu analiz sayesinde, yerel izolat ile diğer izolatlar arasında bulunan nükleotid dizilerindeki pozisyon değişimleri belirlendi. Ayrıca, bu analiz sonucunda yerel izolata en çok yakınlık gösteren izolatlar belirlendi ve hem filogenetik ağaç hem de yüzde benzerlikler grafik üzerinde gösterilerek doğrulandı. SimPlot versiyon 3.5.1. kullanılarak analizler gerçekleştirildi. Analiz parametreleri; “GapStrip” açık, “Bootstrap” 1000,

model F84 “Maksimum Likelihood”, T/t: 2.0 olacak şekilde ayarlandı. Analiz tamamlandığında, yerel izolat ile diğer izolatlar arasındaki benzerlik oranları elde edildi. Bunun yanında, nükleotid değişimlerinin hangi pozisyonlarda olduğu da belirlendi.

3.7. Araştırma Planı

Tablo12. Araştırma Takvimi ve Planı

Tarih Aralığı	İş Planı
Temmuz – Kasım 2018	Literatür Tarama
Aralık 2018	Etik Kurul Onayı
Ocak – Mart 2019	Örneklerin seçilmesi
Nisan 2019	Seçilen örneklerin viral RNA zenginleştirme işlemlerinin yapılması
Mayıs – Haziran 2019	Yeni nesil dizileme reaksiyonlarının gerçekleştirilmesi
Temmuz 2019	Ham verilerin elde edilmesi
Temmuz – Eylül 2019	Verilerin yorumlanması ve analiz
Ekim – Aralık 2019	Dizilerin çıkartılması
Ocak – Haziran 2020	Filogenetik analizin yapılması
Temmuz – Ağustos 2020	Verilerin Değerlendirilmesi
Eylül – Ekim 2020	Tez Yazımı ve Tez Savunması

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Çalışmada kullanılan örneklerde DOBV pozitifliği daha önce serolojik ve moleküler olarak ekibimiz tarafından 2017 yılında belirlendi. Bu pozitiflikler göz önünde bulundurularak, temsili bir örnek seçildi ve YND tekniği ile seçilen örneğin tüm genom dizileri elde edildi. Elde edilen bu dizilerin ilk olarak filogenetik ağaçtaki yerleri gösterildi. Bunun ardından, yüzde benzerlik

oranları belirlendi ve böylece, yerel izolatın hangi izolatlarla benzerlik gösterdiği belirlendi. Tüm genom dizisi elde edilen örneğin nükleotid dizilerinde hangi pozisyonlarda değişiklik olduğunun görülmesi için “SimPlot” analizi yapıldı. Bu analiz sayesinde, yerel izolatın diğer izolatlardan hangi nükleotid pozisyonlarında değişiklik gösterdiği değerlendirildi.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

YND sonucunda elde edilen örneğin her üç segmentinde de 5’ ve 3’ uçlarında eksiklikler bulunmaktadır. Bu durum, AOB’nin elde edilmesini etkilememiştir. Ayrıca, genbank üzerinde bulunan birçok DOBV izolatında da bu uç bölgelerinde eksiklikler bulunduğu için, tam bir tüm genom üzerinden filogenetik ağaç oluşturulamamıştır. Ancak, bu uç kısımların atılmasıyla birlikte, DOBV için oldukça uzun nükleotid dizileri üzerinden filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur.

3.10. Etik Kurul Onayı

Çalışma planı, Dokuz Eylül Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Değerlendirme komisyonu tarafından 17/10/2017 tarihli ve 49/2018 protokol numaralı kararı ile onaylanmıştır. Ardından, 17/01/2020 tarihli ve 03/2020 protokol numaralı kararı ile çalışmanın içeriğinin ve başlığının değiştirilmesi uygun görülmüştür. Söz konusu onay belgeleri EK-I ve EK-II’de gösterilmiştir.

4. BULGULAR

YND tekniği ile dizisi çıkartılan ve ardından, Sanger dizileme ile dizilerdeki boşlukların doldurulmasıyla elde edilen tüm genom dizilerinin boyutları ve diğer detayları aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

Tablo 13. Çalışma kapsamında elde edilen DOBV tüm genom dizilerinin bilgileri.

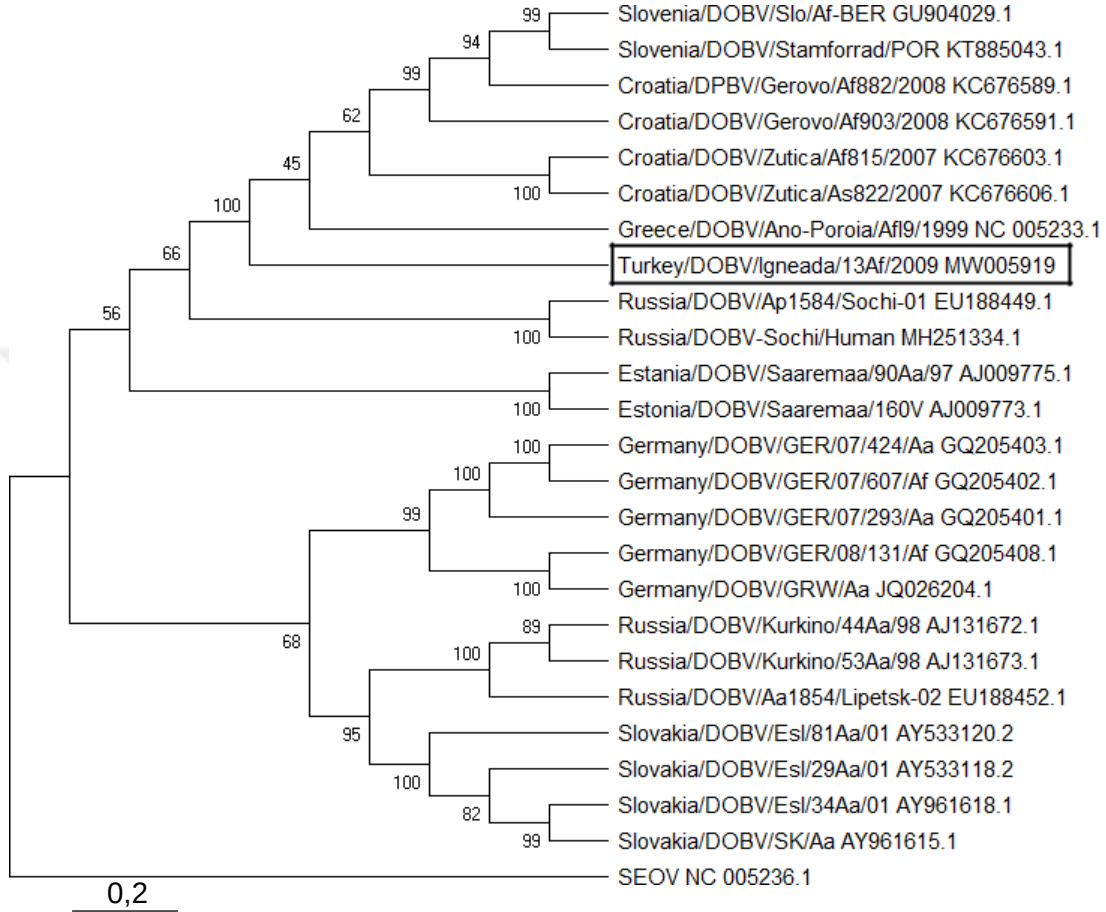
Segment	Büyükölük (nükleotid)	5' ucundaki eksik nükleotid sayısı	3' ucundaki eksik nükleotid sayısı	Erişim Numarası
S	1633	32	9	MW055919
M	3639	15	-	MW055918
L	6328	180	24	MW055917

Elde edilen dizilerdeki analizler sonucunda belirlenen AOB'lerin amino asit olarak büyükölükleri, başlangıç ve bitiş pozisyonları ve kodladıkları ürünler aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

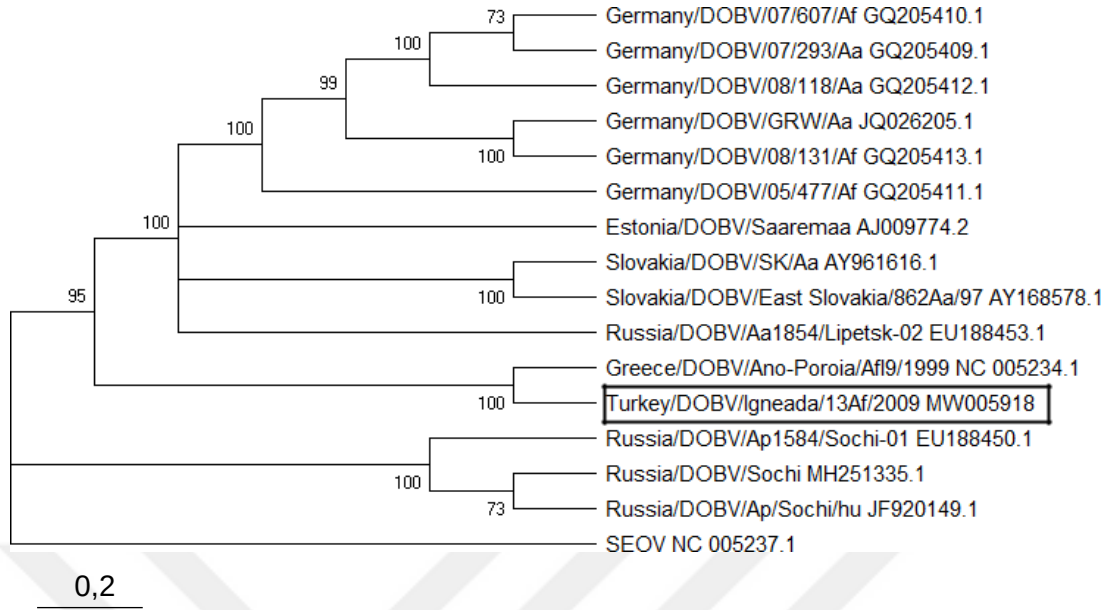
Tablo 14. Dizilerde bulunan AOB'lerinin segmentlere göre bilgileri.

Segment	Polarite	Başlangıç (Nükleotid)	Bitiş (Nükleotid)	Uzunluk (Amino asit)	Ürün
S	+	5	1294	429	Nükleokapsid Proteini
M	+	26	3433	1135	Gn ve Gc glikoprotein öncülleri
L	+	77	6313	2078	RNA bağımlı RNA polimeraz enzimi

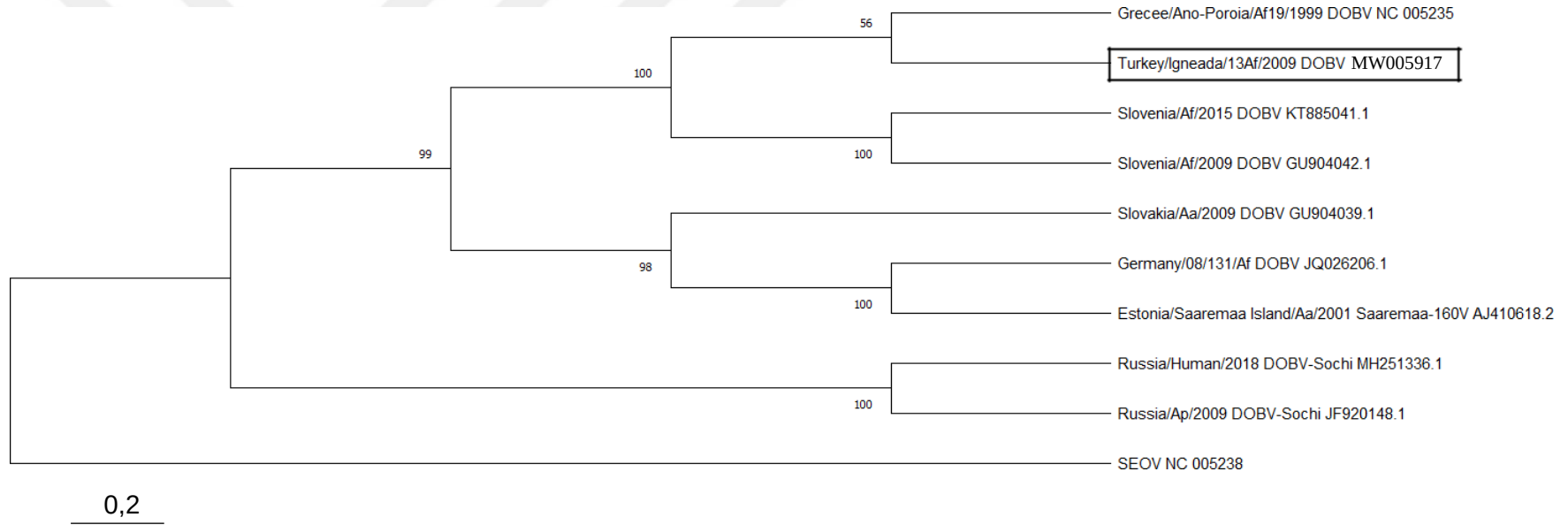
Nükleotid dizileri elde edilen ve AOB'leri belirlenen her üç segment için de filogenetik ağaç oluşturuldu. Oluşturulan bu ağaçlar S segment, M segment ve L segment için olmak üzere sırasıyla gösterilmiştir. (Şekil 7, Şekil 8 ve Şekil 9)



Şekil 7. İğneada, Kırklareli ilinden elde edilen DOBV izolatının S segmentine ait filogenetik ağaç analizinin görüntüsü. Filogenetik ağaç 1301 nükleotid içeren diziler ile oluşturuldu. Analizde “T92 + G + I” modelinde, “Bootstrap” 1000 olacak şekilde ve Maksimum Likelihood ağacı oluşturuldu. Ağaçta yerel DOBV izolatı; Slovenya (Slovenia), Hırvatistan (Croatia), Yunanistan (Greece), Rusya (Russia), Estonya (Estonia), Almanya (Germany) ve Slovakya (Slovakia) ülkelerinden farklı izolatlar ve izolatlar ile karşılaştırıldı.



Şekil 8. İgneada, Kırklareli ilinden elde edilen DOBV izolatının M segmentine ait filogenetik ağaç analizinin görüntüsü. Filogenetik ağaç 3432 nükleotid içeren diziler ile oluşturuldu. Analizde “GTR + G + I” modelinde, “Bootstrap” 1000 olacak şekilde ve Maksimum Likelihood ağacı oluşturuldu. Ağaçta yerel DOBV izolatı; Almanya (Germany), Estonya (Estonia), Slovakya (Slovakia), Rusya (Russia) ve Yunanistan (Greece) ülkelerinden farklı izolatlar ve izolatlar ile karşılaştırıldı.



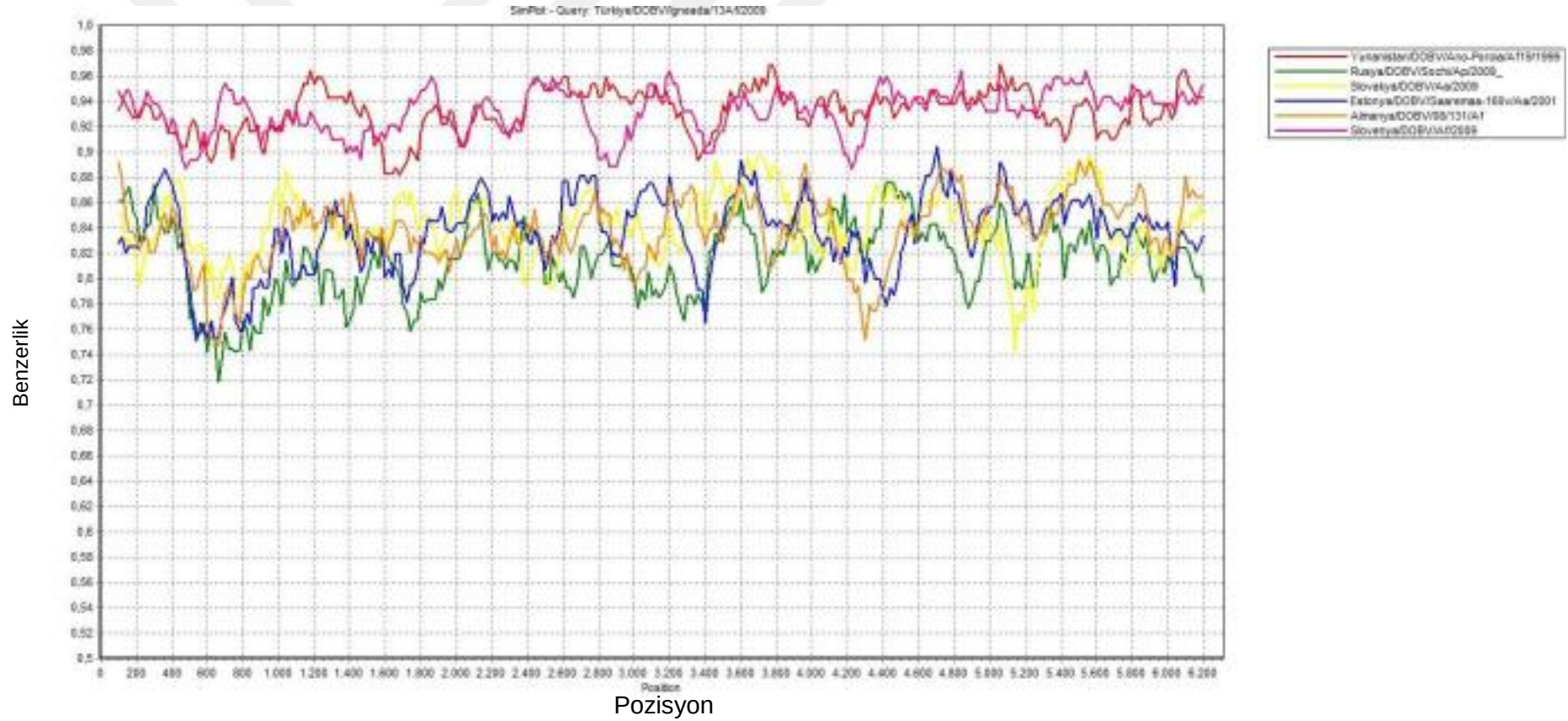
Şekil 9. İgneada, Kırklareli ilinden elde edilen DOBV izolatının L segmentine ait filogenetik ağaç analizinin görüntüsü. Filogenetik ağaç 6310 nükleotid içeren diziler ile oluşturuldu. Analizde “GTR + G + I” modelinde, “Bootstrap” 1000 olacak şekilde ve Maksimum Likelihood ağacı oluşturuldu. Ağaçta yerel DOBV izolatı; Yunanistan (Greece), Slovenya (Slovenia), Almanya (Germany), Estonya (Estonia) ve Rusya (Russia) ülkelerinden farklı izolatlar ve izolatlar ile karşılaştırıldı.

Yerel DOBV'ün her üç segmentinin de filogenetik ağaçtaki yerleri gösterildikten sonra, her segmentin MAAFT aracı, BLASTn ve BLASTp algoritmaları ile yüzde benzerlik oranları hesaplandı. Buna göre, her segmentin hem nükleotid hem de amino asit bakımından benzerlik oranları aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

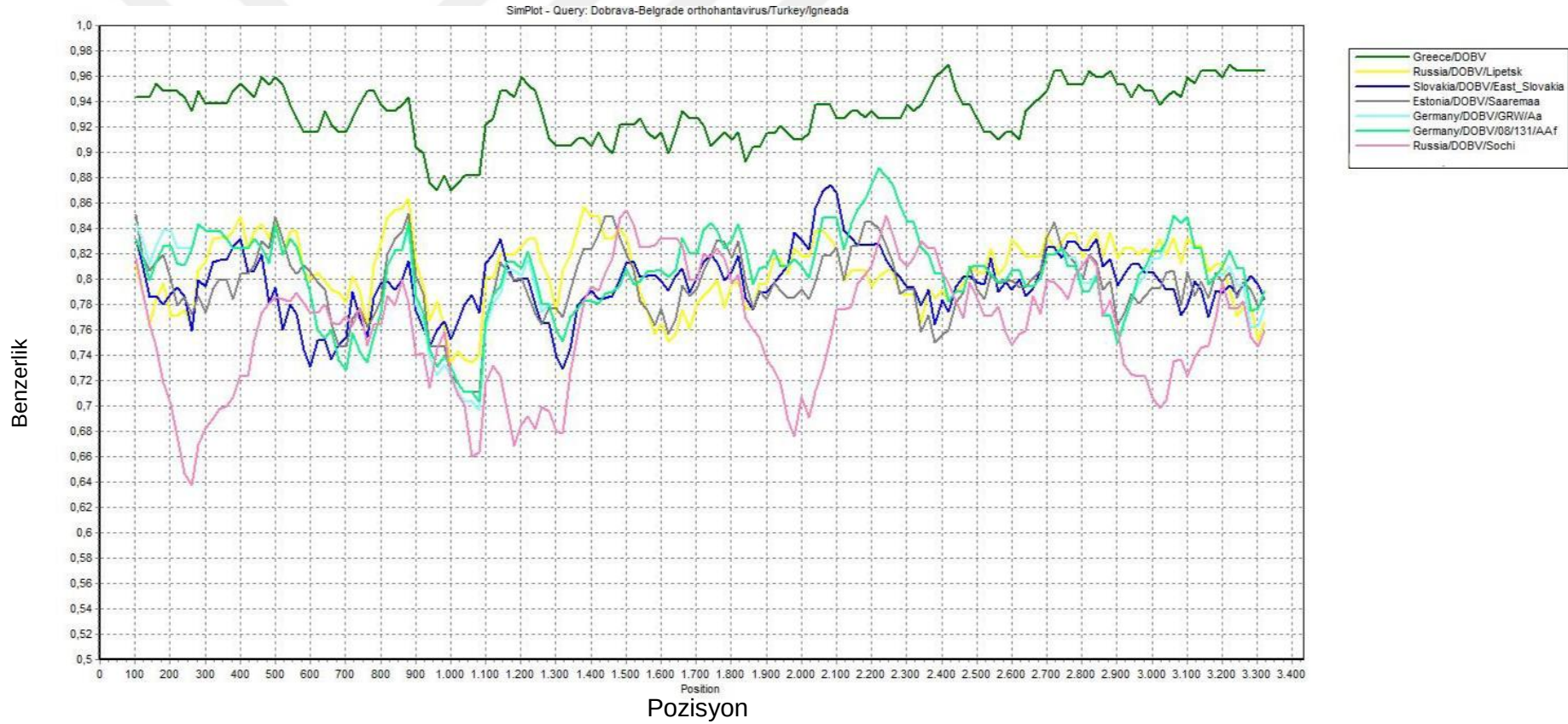
Tablo 15. Yerel DOBV izolatının en çok yakınlık gösterdiği Yunanistan DOBV izolatı ile benzerlik oranları.

Karşılaştırılan Segment	En yüksek benzerliği gösteren izolat	Nükleotid benzerliği	Amino asit benzerliği
S	Yunanistan/Ano-Poroia	%96,26	%99,77
M	Yunanistan/Ano-Poroia	%93,64	%98,50
L	Yunanistan/Ano-Poroia	%93,71	%99,09

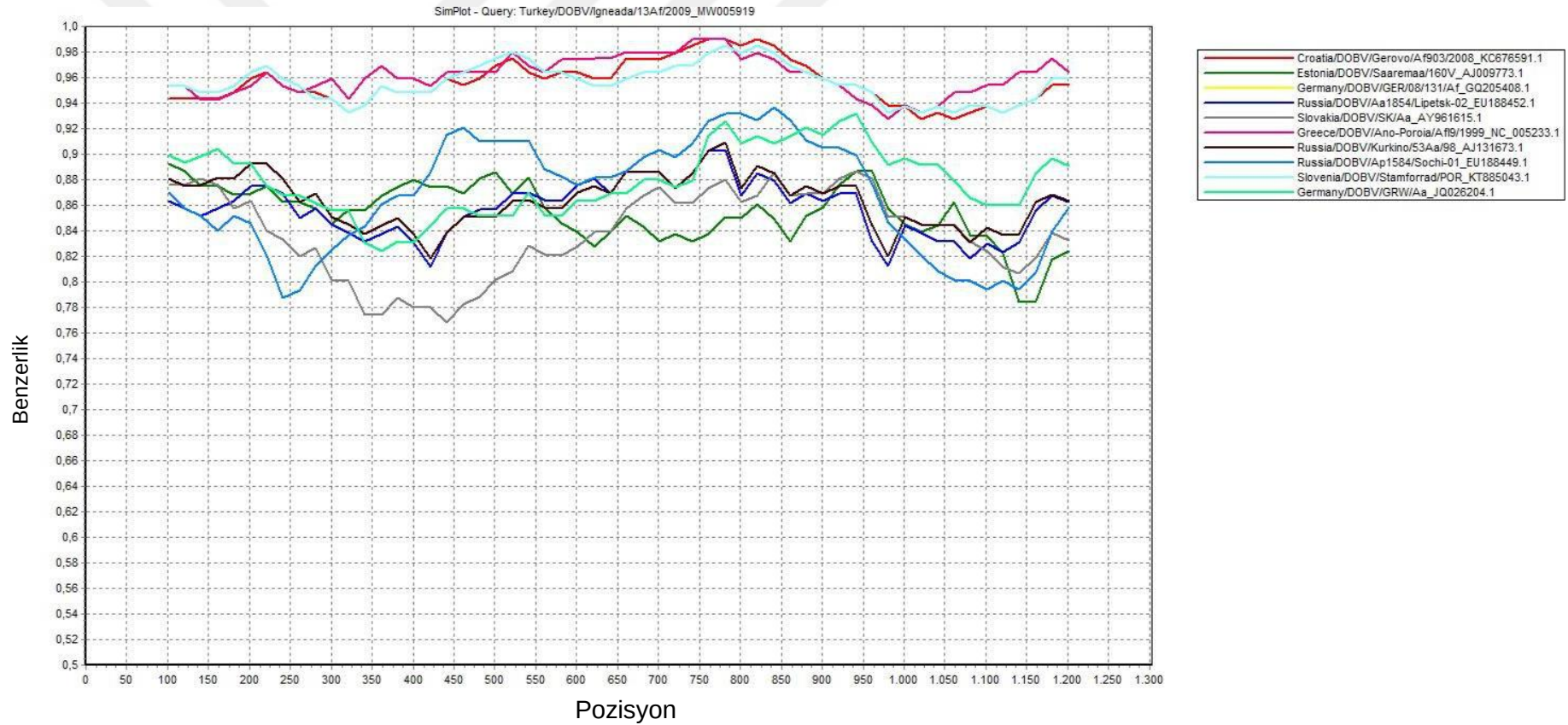
Filogenetik analizleri ve benzerlik oranı hesaplama işlemleri tamamlanan yerel DOBV izolatının segmentleri son olarak, nükleotid zincirlerindeki her bir pozisyonun farklılığının hesaplanması için “SimPlot” analizine alındı. Bu analiz sonucunda, yerel DOBV izolatına ait segmentlerdeki nükleotid dizilimi pozisyon bakımından teker teker diğer izolatlarla karşılaştırıldı. Yerel DOBV izolatının segmentlerinin nükleotid dizilimi bakımından hangi izolatlarla benzerlik gösterdiği ortaya kondu. SimPlot ile oluşturulan grafikler aşağıda gösterilmiştir. (Şekil 10, Şekil 11 ve Şekil 12)



Şekil 10. Yerel DOBV izolatının L segmentinin diğer DOBV izolatları ile SimPlot analizinde karşılaştırılmasını gösteren grafik. Analiz parametreleri; “GapStrip” açık, “Bootstrap” 1000, F84 “Maksimum Likelihood” modeli ve T/t: 2.0 değerinde olacak şekilde ayarlandı. Analizde; Yunanistan (Kırmızı), Rusya (Yeşil), Slovakya (Sarı), Estonya (Mavi), Almanya (Turuncu) ve Slovenya (Pembe) kökenli DOBV izolatları kullanıldı.



Şekil 11. Yerel DOBV izolatının M segmentinin diğer DOBV izolatları ile SimPlot analizinde karşılaştırılmasını gösteren grafik. Analiz parametreleri; “GapStrip” açık, “Bootstrap” 1000, F84 “Maksimum Likelihood” modeli ve T/t: 2.0 değerinde olacak şekilde ayarlandı. Analizde; Yunanistan (Greece / Yeşil), Rusya Lipetsk suşu (Russia / Sarı), Slovakya (Slovakia / Mavi), Estonya (Estonia / Gri), Almanya GRW/Aa izolatı (Germany / Açık Mavi), Almanya 08/131/AAf izolatı (Germany / Açık Yeşil) ve Rusya Sochi (Russia / Pembe) kökenli DOBV izolatları kullanıldı.



Şekil 12. Yerel DOBV izolatının S segmentinin diğer DOBV izolatları ile SimPlot analizinde karşılaştırılmasını gösteren grafik. Analiz parametreleri; “GapStrip” açık, “Bootstrap” 1000, F84 “Maksimum Likelihood” modeli ve T/t: 2.0 değerinde olacak şekilde ayarlandı. Analizde; Hırvatistan (Croatia / Kırmızı), Estonya Saaremaa suşu (Estonia / Yeşil), Almanya GER/08/131/Af suşu (Germany / Sarı), Rusya Lipetsk suşu (Russia / Lacivert), Slovakya (Slovakia / Gri), Yunanistan (Greece / Pembe), Rusya Kurkino suşu (Russia / Siyah), Rusya Sochi suşu (Russia / Mavi), Slovenya (Slovenia / Açık Mavi) ve Almanya GRW/Aa (Germany / Açık Yeşil) kökenli DOBV izolatları kullanıldı.

5. TARTIŞMA

Ülkemizde DOBV ile ilk defa Bartın ve Zonguldak illerinde çıkan RSKA salgını sırasında 2009 yılında yapılan saha çalışmalarında karşılaşılmıştır (70). 2010 yılında İstanbul ilinden bir kişide RSKA tablosu gelişmiş ve enfeksiyon etkeninin DOBV olduğu bildirilmiştir (71). Yine 2010 yılı içerisinde Giresun ilinde bir RSKA salgını meydana gelmiş ve araştırmalar sonucunda etkenlerden birisinin DOBV olduğu saptanmıştır (72). 2018 yılında ise, ekibimiz tarafından yapılan çalışmada ülkemizin Trakya bölgesindeki Kırklareli ilinden toplanan *Apodemus flavicollis* türü kemiricilerde hem serolojik hem de moleküler olarak DOBV varlığı ortaya konmuştur (11).

Günümüze kadar yapılan çalışmalar, ülkemizde de salgına sebep olan DOBV'nin RSKA gibi ağır bir klinik tabloya ve sonucunda mortaliteye sebep olabildiğini göstermiştir. DOBV ile enfekte olan bireylerde etkenin yarattığı tablo göz önünde bulundurulduğunda, DOBV mortalite oranı en yüksek olan orthohantavirüsler içerisinde yer almaktadır. Bu oran DOBV için %5-15 arasındadır ve ülkemizde de birden fazla yerde saptanmıştır (27, 45-46, 70). Bu kadar yüksek bir mortalite oranına sahip olan ve böylesine ağır bir klinik tabloya sebep olan bir virüsün, tüm genom karakterizasyonunun yapılması ve doğasının tam olarak anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Ülkemizde belirlenen bir DOBV izolatının genetik karakterizasyonunun yapılması ile; antijenik farklılıkların saptanması, patogeneze meydana gelebilecek değişikliklerin belirlenmesi ve kökeninin tam olarak anlaşılmasından elde edilen verilerle etkene karşı tanı tedavi ve önlemede ihtiyaç duyulan bilgiler sağlanmış olacaktır.

Türkiye ve özellikle Balkan ülkeleri, DOBV için endemik bölgeleri oluşturmaktadır. Bu ülkelerden her yıl ortalama 10.000 – 12.000 olguya RSKA tanısı konmaktadır. Bu olgularda sıklıkla etken olarak PUUV ve DOBV belirlenmektedir (88). Ülkemizde ve Balkanlardaki komşularımızda bu kadar yaygın görülen bir virüsün tüm genom dizisinin elde edilmesi ve genetik karakterizasyonunun yapılması büyük önem taşımaktadır. Bunun sebeplerinden bir tanesi, literatürde veya GenBank veri tabanındaki DOBV dizileri incelendiğinde DOBV'e ait tüm genom dizilerinin çok az sayıda yer almasıdır. Özellikle Balkan bölgelerinde dağılım gösteren DOBV izolatlarının birbirleri ile akrabalık derecelerinin tam anlamıyla ortaya konabilmesi için, tüm genom dizileri üzerinden detaylı analiz yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışma ile Türkiye'den ilk defa DOBV'e ait bir tüm genom dizisi

bildirilmiştir ve DOBV'ün her üç segmentine ait olan tüm genom dizileri GenBank veri tabanına yüklenmiştir.

Teknik bazı zorluklardan dolayı direkt sahadan elde edilen örneklerden viral RNA genomuna ulaşmak oldukça zorlayıcıdır. Böyle örneklerden elde edilen virüs RNA'sının miktarında kayıplar meydana gelmekte veya düşük viral yükten dolayı hiç elde edilememektedir (12-13,89). Literatürdeki çalışmalarda viral RNA'nın miktarını arttırmak için hücre kültürü gibi yöntemler kullanılmıştır (92-93). Bununla birlikte hücre kültürü virüsün klonal seçilimine veya genetik yapısında değişikliklere sebep olmaktadır ve böyle elde edilen virüs dizileri doğada bulunan örneği tam olarak temsil edememektedir. Bu sebeple, doğada bulunan virüsün evrimsel sürecinin tam anlamıyla ortaya konabilmesi için, virüs RNA'sının direkt taşıyıcı konak dokusundan izole edilmesi daha doğru ve uygun bir yaklaşımdır (90). Bu sebepler göz önünde bulundurulduğunda, çalışmamızda direkt dokudan elde edilen RNA kullanılmış, hücre kültürü ile çoğaltma yoluna kesinlikle başvurulmamıştır. Bu sayede, Türkiye'den bildirilen DOBV izolatu doğada bulunan virüsün gerçek bir temsilcisi olmuştur. Yapılan literatür taramasında bugüne kadar DOBV'ün tam L segment dizisinin hücre kültürü kullanılmadan elde edilebildiği bir yayına rastlanmamıştır. Bu çalışmada, DOBV L segment dizisini elde etmek için, direkt taşıyıcı kemiricinin dokusundan izole edilen RNA kullanılmıştır. Böylece, ilk defa DOBV'ün tüm L segment dizisi doğada olduğu haliyle elde edilmiştir. Bu sayede, çalışmadan elde edilen tüm genom dizisinin, dünya literatüründe ilk kez direkt dokudan elde edilen doğal DOBV tüm genom dizileri olmasını sağlanmıştır.

Ülkemizde daha önce salgınlara sebep olan ve Balkan ülkelerinde de endemik olarak bulunan DOBV, RSKA'nın ağır bir formuna sebep olmaktadır. Buna ek olarak, ülkemizde salgına sebep olan diğer bir virüs olan PUUV, EN gibi hafif bir klinik tablo oluşturmaktadır. Bu virüslerden DOBV'ün mortalite oranı %5-15 arasında değişirken, PUUV'ün mortalite oranı ise %1'in altındadır (27, 45-46). Hafif bir kliniğe sahip olan EN'ye sebep olduğu bildirilen PUUV, ülkemizde yaptığı salgında EN yerine RSKA'ya sebep olmuştur. Diğer bölgelerde hafif bir klinik tabloya sebep olan PUUV, ülkemizde ağır bir klinik tabloya sebep olmuştur ve bu durum Karadeniz bölgesinde meydana gelen salgından yapılan çalışma ile bildirilmiştir (9). Bu çalışmada, ülkemizde birden fazla yerde salgına sebep olan, salgın bölgelerinden farklı yerlerde münferit çalışmalarla hem serolojik hem de moleküler olarak varlığı gösterilen ve daha yüksek mortalite oranına sahip olan DOBV örnekleri seçilmiştir. Bu çalışmanın en önemli amaçlarından birisi, ülkemizde salgın bölgelerinde varlığı gösterilen bu iki etkenden ağır klinik

tabloya sebep olan virüsün genetik karakterizasyonunun yapılmasıdır. Bunların yanında, genetik karakterizasyonu yapılan DOBV örneğinin hem nükleotid üzerinden diğer izolatlarla akrabalık derecelerinin gösterilmesi hem de amino asit içeriği bakımından yakınlık derecelerinin ortaya konması hedeflenmiştir. Bu çalışmanın bir diğer amacı ise, özellikle M segmentten kodlanan Gn ve Gc antijenlerinin ileride protein modellemelerinin yapılması ve epitop bölgelerinin belirlenmesi için, amino asit zincirini kodlayan AOB'lerinin tamamen elde edilmesidir. Böylece, günümüzde DOBV'ye yönelik kullanılan serolojik kitlerin yerel DOBV izolatı için uygunluğunun belirlenmesine yönelik yapılacak olan çalışmalara ön veri sağlanacaktır.

Çalışmada belirlenen hedefleri gerçekleştirmeye yönelik yapılan deneyler sonucunda, yerel DOBV izolatının S ve M segmentlerinin AOB'leri tam olarak şekilde elde edilmiştir. L segmentte ise AOB'nin büyük bir kısmı elde edilirken, 5' ucunda çok kısa bir kayıp bulunmaktadır. Bundan başka, virüsün S segmentinin nükleotid dizisi hem 5' hem de 3' uçlarında toplam 35 nükleotidlik kayıp içermektedir. Bu nükleotid eksiklikleri AOB etkilememektedir ve segmentin kodlanmayan bölgelerinde bulunmaktadır. M segmentin nükleotid dizisinde sadece 5' ucunda çok kısa bir eksiklik bulunmaktadır. Bu eksiklik AOB etkilememektedir ve segmentin kodlanmayan bölgesinde bulunmaktadır. L segmentte ise, nükleotid dizisinin 5' ucunda diğer segmentlere göre daha büyük bir eksiklik bulunmaktadır. Bu eksiklik AOB düşük oranda etkilememektedir ve eksikliğin büyük bir kısmı segmentin kodlanmayan bölgesine denk gelmektedir. Aynı zamanda, L segmentin nükleotid zincirinin 3' ucunda da kısa bir eksiklik bulunmaktadır ve bu eksiklik AOB'ni etkilememektedir. Bu çalışmada DOBV izolatından elde edilen dizilerin bazı eksiklikleri olduğu görülmektedir. Bununla beraber GenBank veri tabanında yapılan taramalarda DOBV için taşıyıcıdan elde edilen doğal kökenli tüm genom dizileri içerisinde en geniş veri setine ve tamamlanmış DNA dizilerine sahip olduğu belirlenmiştir.

RNA virüslerinin tüm genom dizilerinin elde edilmesi genel olarak zordur. Bunun sebebi, RNA'nın yapısından dolayı çevresel koşullardan hızlı şekilde etkilenmesi ve buna bağlı olarak da kolay şekilde parçalanmasıdır. RNA'nın maruz kaldığı sıcaklık, nem oranı, süre gibi parametreler RNA parçalanmasının üzerinde etki gösteren değişkenlerdir. Bu çalışma kapsamında kullanılan virüs RNA'sı -80°C'de saklanmıştır. Bu saklama koşulu RNA için uygun olsa da RNA'nın kullanılacağı zaman dondurulup çözündürülmesi dahi belirli bir oranda RNA'nın parçalanmasına neden olmaktadır. Çalışma kapsamında konak kemiricinin

dokularından yapılan RNA izolasyonu toplam RNA izolasyonu olup, virüs RNA'sının yanında konak kaynaklı RNA'yı da içermektedir. Böylesine hassas bir yapıya sahip olan RNA'nın, bu kadar çeşitliliğe sahip bir havuz içerisinde bulunuyor olması, bir de üzerine RNA'nın bir miktarının kaybediliyor olması, bu virüs RNA miktarının görece düşmesine ve konak RNA'sı tarafından baskılanmasına sebep olabilmektedir. Bu durum, YND tekniklerinde direkt kemirici dokusundan izole edilen RNA'nın kullanılmasıyla eksiksiz bir dizinin elde edilmesini güçleştirmektedir. Bu çalışmada kullanılan örnekte de bir miktar RNA'nın parçalandığı anlaşılmaktadır. Bu sebeple YND ile virüs RNA'sının tüm dizisinin elde edilmesi zorlaşmıştır. Bu sorun, kütüphane hazırlık basamaklarında yapılan değişiklikler ve çalışmanın Sanger dizileme ile desteklenmesiyle aşılmıştır. Ancak, DOBV'e ait segmentlerin uç kısımları elde edilememiştir. Bu eksiklikleri gidermenin bir yolu, YND tekniklerinin bir özelliği olan "Derin Dizileme" ile RNA örneğinin yeniden dizilenmesidir ve bu yöntem bu çalışma kapsamında teknik sorunlardan dolayı uygulanamamıştır. Bu sorunu çözebilecek bir diğer yöntem ise, taşıyıcı kemirici dokusundan yeni bir RNA izolasyonu yapılması ve ardından RNA'nın dondurulmadan direkt kütüphane hazırlığına başlanmasıdır. Bu alternatif yöntem ise teknik sınırlılıklardan dolayı uygulanamamıştır. Tüm bunlara rağmen, bu çalışma kapsamında elde edilen diziler GenBank veri tabanında direkt taşıyıcı dokusundan elde edilen en uzun DOBV dizilerindendir.

Balkan bölgesinde bulunan ve ülkemize komşu olan Yunanistan'dan tüm genom dizisi bildirilen ve aynı zamanda GenBank veri tabanında referans dizi olan DOBV "Ano-Poroia" izolatu bulunmaktadır (91). Çalışmada elde edilen yerel DOBV izolatu hem nükleotid bakımından hem de amino asit bakımında en çok benzerliği Yunanistan izolatu ile göstermiştir. Hem filogenetik analizler hem de SimPlot analizi bu iki izolatın birbirleriyle yüksek oranda benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur. Ancak, genbankası veri tabanında, ülkemizden elde edilen DOBV dizilerinin filogenetik analizleri için çok sayıda tüm genom dizisi bulunmamaktadır. Özellikle Trakya bölgesinde Kırklareli iline yakın olan Bulgaristan'dan DOBV tüm genom dizisi bildirilmemiştir. Bu durumda, daha çok Yunanistan'a benzerlik gösteren yerel DOBV izolatının kökeni ile ilgili şu soru oluşmaktadır: "Yerel DOBV izolatımız diğer Balkan ülkelerinde ve özellikle Bulgaristan'da bulunan bir DOBV ile daha fazla genetik benzerlik gösterebilir mi?". Bu soru aynı şekilde ülkemizin içerisinde dolaşan DOBV'ler için de sorulabilir: "Kırklareli ilinden izole edilen bu dizilerin, Türkiye'nin Karadeniz bölgesinde salgına sebep olan DOBV ile benzerlik oranları ne kadardır?". Bunlara ek olarak, GenBank veri

tabanında bulunan tüm genom dizilerinin büyük çoğunluğu hücre kültüründe çoğaltılmış virüs RNA'larından elde edilen dizilerdir. Bu durum şu soruyu doğurmaktadır: “Şu ana kadar elde edilen DOBV tüm genom dizilerinin gerçekten kaç tanesi doğada bulunan DOBV temsil etmektedir?”. Ülkemizde ve özellikle Balkan ülkelerinde direkt konaktan izole edilen RNA ile elde edilen tüm genomların sayısı artmadıkça bu sorular ne yazık ki cevapsız kalacaktır.

Çalışma kapsamında elde edilen veriler birçok yeni projenin hayata geçirilmesi için ön veri niteliği taşımaktadır. Günümüzde insan enfeksiyonların ve salgınlara sebep olan bu etkenin patogenezinin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Bu bağlamda, genetik özelliklerinin ve antijenik yapılarının ortaya konması kritiktir. Ayrıca, aşı çalışmalarının yapılması ve etken spesifik bir tedavinin oluşturulması büyük önem taşımaktadır. Bu projenin sonuçları, etkenin enfeksiyon mekanizmasının tam anlamıyla anlaşılması ve aşı çalışmalarının tasarlanması için fayda sağlayabilir. Böylesine önemli projelerin hayata geçirilmesi de bu çalışma kapsamında elde edilen tüm genom dizilerinin ön veri olarak kullanılmasıyla mümkündür. Etkenin L segmentinden kodlanan RNA bağımlı RNA polimeraz enziminde veya M segmentten kodlanan Gn ve Gc glikoprotein öncüllerinde meydana gelen değişiklikler, etken virüsün patogenezinde değişikliklere sebep olmaktadır (94-95). Bu değişikliklerin belirlenmesi ve gerekli görülürse bir enfeksiyon modelinin oluşturulması, çalışmada elde edilen yerel DOBV izolatının daha iyi anlaşılmasını sağlayabilir. Tüm bunların yanında, orthohantavirüsler için onaylı spesifik bir aşı ve tedavi bulunmamaktadır. Elde edilen bu veriler ile, M segmentten kodlanan Gn ve Gc antijenlerinin modellemelerinin yapılması ve *in vitro* koşullarda üretilmeleriyle, DOBV'e yönelik aşı ve tedavi çalışmalarının yapılması mümkün hale gelmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez kapsamında Kırklareli ilinden daha önce ekibimiz tarafından hem serolojik hem de moleküler yöntemlerle varlığı gösterilen DOBV örneklerinden bir tanesi temsili olarak seçildi ve tüm genom dizilemesi gerçekleştirildi. Bu çalışma kapsamında elde edilen DOBV İğneada, Kırklareli izolatının her üç segmentinin de tüm genom dizileri elde edilmiştir. Bu sayede, Türkiye’den ilk defa DOBV’e ait tüm genom dizisi bu tez ile bildirilmektedir.

Bu tezin amaçlarından bir tanesi, yerel DOBV izolatının tüm genom dizileri üzerinden yapılan filogenetik analizleri sonucunda hangi DOBV izolatı ile benzerlik gösterdiğinin ortaya konmasıdır. Yapılan filogenetik analizler yerel DOBV izolatının Yunanistan’dan bildirilen DOBV Ano-Poroia ile en çok benzerliği gösterdiğini ortaya koymuştur. Bunun yanında, “SimPlot” analizi ile segmentlerdeki nükleotid değişimlerine göre yerel izolat ile yakınlık gösterenler ortaya konmuştur. Buna göre, L segment analizi yerel DOBV izolatının başta Yunanistan ve ardından Slovenya izolatlarıyla en yüksek benzerliği gösterdiği görülmüştür. M segment analizi sonucunda en yüksek benzerlik Yunanistan izolatı ile gözlenmiştir. S segment analizleri ise, başta Yunanistan olmak üzere, Hırvatistan ve Slovenya izolatlarıyla da benzerlik göstermektedir.

Çalışma kapsamında elde edilen yerel DOBV dizilerinin uç kısımlarından eksiklikleri bulunmaktadır. Bu eksiklikler AOB’lerini etkilememektedir. Bu eksikliklerin bulunmadığı dizilerin elde edilmesi, ileride yapılacak çalışmalara daha kaliteli veri sağlayabileceği düşünülmektedir. Bu tez kapsamında dizileri elde edilen örnek sayısı bir tanedir ve İğneada, Kırklareli bölgesinde bulunan örneklerden temsili olarak seçilmiştir. Bunların yanında, bu tez kapsamında elde edilen DOBV dizileri ülkemiz için bir ilktir ve ileride farklı bölgelerde saptanan DOBV dizileri ile karşılaştırma yapılması, ülkemizdeki DOBV durumu hakkında daha detaylı bilgiler elde edilmesi beklenmektedir.

Bu tez kapsamında elde edilen dizilerdeki AOB’lerinden kodlanan amino asit zincirleri S ve M segment için tamamen, L segment için de çok büyük oranda elde edilmiştir. Bu sayede, DOBV yerel izolatı sadece nükleotid üzerinden değil, aynı zamanda amino asit üzerinden de yüzde benzerliklerin saptanmasına olanak sağlamıştır. Bunun sonucunda, yerel DOBV izolatı amino asit zinciri bakımından en yüksek benzerliği Yunanistan Ano-Poroia izolatı ile göstermiştir. Bunlara ek olarak, her segmentten kodlanan amino asit zincirlerinin protein modellemeleri yapılarak, yerel izolatın tam anlamıyla yapısının ortaya konabileceği

düşünülmektedir. Bu bağlamda bir diğer önemli konu ise, M segment dizilerinden kodlanan Gn ve Gc antijenlerinin amino asit zincirleri üzerinden protein modellemelerinin yapılmasıyla, yerel DOBV izolatının antijen yapısı belirlenebilecektir. Bu veri sayesinde, yerel DOBV izolatına ait antijenlerin epitop bölgelerinin belirlenebileceği ve bu zamana kadar bilinen DOBV antijenlerinden varsa farklılıklarının ortaya konabileceği düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında elde edilen veriler, yerel DOBV izolatının patogenezi hakkında daha detaylı bilgi edinilmesi için ön veri niteliği taşımaktadır. Bu veriler üzerinden kodlanan proteinlerin amino asit zincirlerinde meydana gelen değişiklikler, üretilen proteinin konformasyonel yapısını da değiştirebilmektedir. Bu değişikliklerin üç boyutlu modellemeler ile belirlenmesi ve gerekli görülürse enfeksiyon modellerinin oluşturulması, yerel izolatın patogenezinde rol oynayabilecek potansiyel farklılıkların ortaya konmasını sağlayabilir. Bunların yanında, orthohantavirüslere karşı onaylı belirli bir aşı veya tedavi bulunmamaktadır. RSKA etkeni Orthohantavirüsler içerisinde en yüksek mortalite oranına sahip virüslerden birisi olan DOBV için, etkene spesifik bir aşının veya tedavinin geliştirilmesinde büyük bir öneme sahip olacaktır. Bu bağlamda, böylesine önemli bir etken için yapılacak olan aşı ve tedavi çalışmalarına yönelik ön veriler bu tez çalışması ile elde edilmiştir. Bu veriler üzerinden üç boyutlu modellemelerin yapılması ve devamında *in vitro* çalışmalarla hücre kültüründe etkenin antijenlerine yönelik tasarlanacak aşı çalışmaları mümkün hale gelmiştir. Bunlara ek olarak, elde edilen veriler, enfeksiyon modellerinin kullanıldığı, patogenezin bütün detaylarıyla anlaşılmasını hedefleyen çalışmaların tasarlanmasında rol oynayabilecektir. Bu sayede etkenin enfeksiyon yollarına yönelik kullanılacak antiviral tedavi ve aşı çalışmalarının mümkün hale gelebileceği de düşünülmektedir.

Sonuç olarak, bu tez kapsamında elde edilen veriler ile Türkiye’de ilk defa DOBV İğneada izolatlarının tüm genom dizileri elde edilmiştir. Bu çalışma ile elde edilen DOBV tüm genom dizileri, dünya literatüründe ilk kez direkt dokudan elde edilen doğal DOBV tüm genom dizileri olma özelliğini taşımaktadır. Bu veriler ile, ileride yapılabilecek olan birçok çalışma için ön veri sağlanmıştır. Bu tez aracılığıyla üretilen veriler ışığında yapılacak olan benzer çalışmalar ile daha fazla yerel DOBV dizisinin elde edileceği ve bu sayede daha verimli analizlerin yapılacağı düşünülmektedir. Bu analizler sayesinde ise, çağımız teknolojilerinin sağladığı yeni bir alan olan biyoinformatik modellemeler aracılığı ile ülkemizdeki DOBV izolatlarının genetik olarak modellemelerinin yapılmasıyla ülkemizin salgın önleme politikalarına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Sola-Riera C, Gupta S, Ljunggren H, Klingström J. Orthohantaviruses belonging to three phylogroups all inhibit apoptosis in infected target cells. Sci. Rep. 2019, 9:834.
2. Antti Vaheri, Tomas Strandin, Hussi Hepojoki, Tarja Sironen, ve ark. Uncovering the mysteries of hantavirus infection. Nature Reviews 2013, 11:539-550
3. Kefelioglu H, Tez C, Gündüz İ. The taxonomy and distribution of *Apodemus agrarius* (Pallas, 1771) (Mammalia: Rodentia) in the European Part of Turkey. Turk J Zool 2003; 27:141-6.
4. Yiğit N, Çolak E, Sözen M, Karataş A. Rodents of Türkiye: Türkiye Kemiricileri. Ankara: Meteksan Yayınevi, 2006
5. Krystufek B, Vohralik V. Distribution of field mice (*Apodemus*) (Mammalia: Rodentia) in Anatolia. Zool Middle East 2007; 42:25-36.
6. Krystufek B, Vohralik V. Mammals of Turkey and Cyprus. Rodentia II: Cricetinae, Muridae, Spalacidae, Calomyscidae, Capromyidae, Hystricidae, Castoridae. Slovenya: Koper, 2009.
7. Ertek M. An outbreak caused by hantavirus in the Black Sea Region of Turkey , January-May 2009. Eurosurveillance 2009, 14:1-2.
8. Kaya S, Yılmaz G, Erensoy S, Yağcı Çağlayık D, ve ark. Hantavirus ifection: two case reports from a province in the Eastern Black Sea Region, Turkey. Mikrobiyoloji Bulteni, 2010, 44(3):479-487.
9. Çelei G, Öztoprak N, Öktem IMA, Heyman P, ve ark. Dynamics of Puumala hantavirus outbreak in Black Sea Region, Turkey. Zoonoses Public Health. 2019;66:783–797.
10. Oncul O, Atalay Y, Onem Y, Turhan V, ve ark. Hantavirus infection in Istanbul, Turkey. Emerg Infect Dis. 2011; 17(2): 303-304.
11. Polat C, Sironen T, Plyusnina A, Karatas A, ve ark. Dobrava hantavirus variants found in *Apodemus flavicollis* mice in Kırklareli province, Turkey. J Med Virol. 2018; 90:810–818.
12. Polat C, Ergunay K, Irmak S, Erdin M, ve ark. A novel genetic lineage of Tula orthohantavirus in Altai voles (*Microtus obscurus*) from Turkey. 2019; 67:150-158.
13. No JS, Kim WK, Cho S, Lee SH, ve ark. Comparison of targeted next-generation sequencing for whole-genome sequencing of Hantaan orthohantavirus in *Apodemus agrarius* lung tissues. Sci Rep. 2019; 9(1):16631.
14. Radford AD, Chapman D, Dixon L, Chantrey J, ve ark. Application of next-generation sequencing technologies in virology. J Gen Virol. 2012; 93(Pt 9):1853-68.

15. Gajdusek DC. Muroid virus nephropathies and muroid viruses of the Hantaan virus group. *Scand J Infect Dis* 1982; 36 [Supple]: 96-108
16. Harper DR, Meyer AS. *Of mice, men and microbes: Hantavirus*. Academic Press San Diego, CA: 1999
17. Lee HW, Lee PW, Johnson KM. Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 1978; 137:298-308
18. Brummer-Korvenkontio M, Vaheri A, Hovi T, von Bonsdorff CH, ve ark. Nephropathia epidemica: detection of antigen in bank voles and serologic diagnosis of human infection. *J Infect Dis* 1980; 141:131-4
19. Haemorrhagic fever with renal syndrome: memorandum from a WHO meeting. *Bull World Health Organ* 1983; 61(2):269-75
20. Nichol ST, Spiropoulou CF, Morzunov S, Rollin PE, ve ark. Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science* 1993; 262:914-7
21. Vapalahti O, Mustonen J, Lundkvist A, Henttonen H, ve ark. Hantavirus infections in Europe. *Lancet Infect Dis* 2003; 3:653-61
22. Kavukçu S, Türkmen M, Salman Ş, Soylu A, ve ark. What is the risk of nephropathy associated with Hantavirus in Aegean region. *Office Journal of the Turkish Nephrology, Association* 1997; 3-4:131-135
23. Ertek M, Buzgan T. An outbreak caused by hantavirus in Black Sea Region of Turkey, January-May 2009. *European Communicable Disease Bulletin* 2009, 14(20):A171-84
24. Mir M. Hantaviruses. *Clin Lab Med* 2010; 30(1): 67-91
25. Schmaljohn, C. S. ve ark. Antigenic and genetic properties of viruses linked to hemorrhagic fever with renal syndrome. *Science* 1985; 227, 1041–1044.
26. Avsic-Zupanc T, Saksida A, Korva M; Hantavirus infections. *Clinic Microbiology and Infection*, 2016:1-11
27. Jonsson CB, Figueiredo LTM, Vapalahti O. A global perspective on Hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clinical Microbiology Reviews* 2010; 23:2, 412-441.
28. Muyangwa M, Martynova EV, Khaiboullina SF, Morzunov SP, ve ark. Hantaviral proteins: structure, functions, and role in Hantavirus infection. *Front. Microbiol.* 2015; 6:1326.
29. Cifuentes-Munoz N, Salazar-Quiroz N, Tischler ND. Hantavirus Gn and Gc envelope glycoproteins: key structural units for virus cell entry and virus assembly. *Viruses* 2014; 6, 1801-1822.

30. Manigold T, Vial P. Human hantavirus infections: epidemiology, clinical features, pathogenesis and immunology. *Swiss Med Wkly*, 2014; 144: w13937
31. Avsic-Zupanc T, Xiao SY, Stojanovic R, Gligic A, ve ark. Characterization of Dobrava virus: a hantavirus from Slovenia, Yugoslavia. *J Med Virol* 1992;38:132-7
32. Plyusnin A, Nemirov K, Apekina N, Plyusnina A, ve ark. Dobrava hantavirus in Russia. *Lancet* 1999;353:207.
33. Sibold C, Ulrich R, Labuda M, Lundkvist A, ve ark. Dobrava hantavirus causes hemorrhagic fever with renal syndrome in Central Europe and is carried by two different *Apodemus* mice species. *J Med Virol* 2001;63:158-67.
34. Klempa B, Stanko M, Labuda M, Ulrich R, ve ark. Central European Dobrava hantavirus isolate from a striped field mouse (*Apodemus agrarius*). *J Clin Microbiol* 2005;43:2756-63.
35. Nemirov K, Vapalahti O, Lundkvist A, Vasilenko V, ve ark. Isolation and characterization of Dobrava hantavirus carried by the striped field mouse (*Apodemus agrarius*) in Estonia. *J Gen Virol* 1999;80(Pt 2):371-9.
36. Sjolander KB, Golovljova I, Vasilenko V, Plyusnin A, ve ark. Serological divergence of Dobrava and Saaremaa hantaviruses: evidence for two distinct serotypes. *Epidemiol Infect* 2002;128:99-103.
37. Golovljova I, Vasilenko V, Mittzenkov V, Prükk T, ve ark. Characterization of hemorrhagic fever with renal syndrome caused by hantaviruses, Estonia. *Emerg Infect Dis* 2007;13:1773-6.
38. Klempa B, Tkachenko EA, Dzagurova TK, Yunicheva YV, ve ark. Hemorrhagic fever with renal syndrome caused by 2 lineages of Dobrava hantavirus, Russia. *Emerging Infect Dis* 2008;14:617-25.
39. Nuzum EO, Rossi CA, Stephenson EH, LeDuc J. Aerosol transmission of Hantaan and related viruses to laboratory rats. *Am J Trop Med Hyg* 1988, 38:636-640.
40. Voutilainen L, Sironen T, Tonteri E, Back AT, ve ark. Life-long shedding of Puumala hantavirus in wild bank voles (*Myodes glareolus*). *J Gen Virol* 2015, 96:1238-1247.
41. Forbes KM, Sironen T, Plyusnin A. Hantavirus maintenance and transmission in reservoir host populations. *Curr Opin Virol*. 2018 Feb;28:1-6.
42. Khaiboullina SF, Morzunov SP, St Jeor SC. Hantaviruses: molecular biology, evolution and pathogenesis. *Curr Mol Med* 2005; 5:773-90
43. Schmaljohn C, Hjelle B. Hantaviruses: a global disease problem. *Emerg Infect Dis* 1997;3:95-104.

44. Schonrich G, Rang A, Lutteke N, Raftery MJ, ve ark. Hantavirus-induced immunity in rodent reservoirs and humans. *Immunol Rev* 2008; 225:163-89.
45. Linderholm M, Elgh F. Clinical characteristics of hantavirus infections on the Eurasian continent. *Curr Topics Microbiol Immunol* 2001; 256:135-51
46. Vaheri A, Henttonen H, Voutilainen L, Mustonen J, ve ark. Hantavirus infections in Europe and their impact on public health. *Rev Med Virol* 2013; 23:35-49.
47. Kruger DH, Ulrich R, Lundkvist AA. Hantavirus infections and their prevention. *Microbes Infect* 2001; 3:1129-44.
48. Ferres M, Vial P. Hantavirus infection in children. *Curr Opin Pediatrics* 2004; 16:70-75
49. Overturf GD. Clinical Sin Nombre hantaviral infections in children. *Pediatric Infect Dis J* 2005; 24:373-374
50. Bi Z, Formenty PB, Roth CE. Hantavirus infection: a review and global update. *J Infect Develop Countries* 2008; 2:3-23.
51. Lee HW. Hemorrhagic fever with renal syndrome in Korea. *RevI Infect Dis* 1989;11(Suppl. 4):S864-76.
52. Heyman P, Vaheri A, Lundkvist A, Avsic-Zupanc T. Hantavirus infections in Europe: from virus carriers to a major public-health problem. *Exp Rev Antiinfect Ther* 2009; 7:205-17.
53. Heyman P, Ceianu CS, Christova I, Tordo N, ve ark. A five-year perspective on the situation of haemorrhagic fever with renal syndrome and status of the hantavirus reservoirs in Europe, 2005-2010. *Euro Surveill* 2011;16.
54. Antoniadis A, Stylianakis A, Papa A, Alexiou-Daniel S, ve ark. Direct genetic detection of Dobrava virus in Greek and Albanian patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. *J Infect Dis* 1996; 174:407-10.
55. Avsic-Zupanc T, Petrovec M, Furlan P, Kaps R, ve ark. Hemorrhagic fever with renal syndrome in the Dolenjska region of Slovenia: a 10- year survey. *Clin Infect Dis* 1999; 28:860-5.
56. Lundkvist A, Hukic M, Horling J, Gilljam M, ve ark. Puumala and Dobrava viruses cause hemorrhagic fever with renal syndrome in Bosnia-Herzegovina: evidence of highly cross-neutralizing antibody responses in early patient sera. *J Med Virol* 1997; 53:51-9.
57. Markotic A, Nichol ST, Kuzman I, Sanchez AJ, ve ark. Characteristics of Puumala and Dobrava infections in Croatia. *J Med Virol* 2002; 66:542-51.
58. Papa A, Johnson AM, Stockton PC, Bowen MD, ve ark. Retrospective serological and genetic study of the distribution of hantaviruses in Greece. *J Med Virol* 1998; 55:321-7.

59. Klempa B, Meisel H, Rath S, Bartel J, ve ark. Occurrence of renal and pulmonary syndrome in a region of northeast Germany where Tula hantavirus circulates. *J Clin Microbiol* 2003; 41:4894-7.
60. Klempa B, Tkachenko EA, Dzagurova TK, Yunicheva YV, ve ark. Hemorrhagic fever with renal syndrome caused by 2 lineages of Dobrava hantavirus, Russia. *Emerging Infect Dis* 2008; 14:617-25
61. Sibold C, Meisel H, Lundkvist A, Schulz A, ve ark. Short report: simultaneous occurrence of Dobrava, Puumala, and Tula hantaviruses in Slovakia. *Am J Trop Med Hygiene* 1999; 61:409-11
62. Sironen T, Vaheri A, Plyusnin A. Phylogenetic evidence for the distinction of Saaremaa and Dobrava hantaviruses. *Virology* 2005; 2:90.
63. Kallio-Kokko H, Laakkonen J, Rizzoli A, Tagliapietra V, ve ark. Hantavirus and arenavirus antibody prevalence in rodents and humans in Trentino, northern Italy. *Epidemiol Infect* 2006; 134:830-6.
64. Lundkvist A, Lindegren G, Brus Sjölander K, Mavtchoutko V, ve ark. Hantavirus infections in Latvia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 21:626-9.
65. Sandmann S, Meisel H, Razanskiene A, Wolbert A, ve ark. Detection of human hantavirus infections in Lithuania. *Infection* 2005; 33:66-72.
66. Mikhailenko AG, Tkachenko EA, Smirnov I, Malkin AE, ve ark. Results of serologic screening for hemorrhagic fever with kidney syndrome in Moldova. *Voprosy Virusologii* 1994; 39:260-2.
67. Lledo L, Klingström J, Gegúndez MI, Plyusnina A, ve ark. Hantavirus infections in Spain: analysis of sera from the general population and from patients with pneumonia, renal disease and hepatitis. *J Clin Virol* 2003; 27:296-307.
68. McCaughey C, Hart CA. Hantaviruses. *J Med Microbiol* 2000; 49:587-99.
69. Papa A. Dobrava-Belgrade virus: Phylogeny, epidemiology, disease. *J Antiviral* 2012; 104-117
70. Oktem IMA, Uyar Y, Dincer E, Gozalan A, ve ark. Dobrava-Belgrade virus in *Apodemus flavicollis* and *A. uralensis* mice, Turkey. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20.1:121-125
71. Oncul O, Atalay Y, Onem Y, Turhan V, ve ark. Hantavirus infection in Istanbul, Turkey. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17:303–304.
72. Kaya S, Yilmaz G, Erensoy S, Yagci DC. Hantavirus infection: two case reports from a province in the Eastern Blacksea Region, Turkey. *Mikrobiyol. Bull.* 2010; 44:479–487.

73. Kallio-Kokko H, Vapalahti O, Lundkvist A, Vaheri A. Evaluation of Puumala virus IgG and IgM enzyme immunoassays based on recombinant baculovirus-expressed nucleocapsid protein for early nephropathia epidemica diagnosis. *Clin Diagnostic Virol* 1998; 10:83-90.
74. Ahn C, Cho JT, Lee JG, Lim CS, ve ark. Detection of Hantaan and Seoul viruses by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) in renal syndrome patients with hemorrhagic fever. *Clin Nephrol* 2000; 53:79-89.
75. Aitichou M, Saleh SS, McElroy AK, Schmaljohn C, ve ark. Identification of Dobrava, Hantaan, Seoul, and Puumala viruses by one-step real-time RTPCR. *J Virol Methods* 2005; 124:21-6.
76. Hjelle B, Spiropoulou CF, Torrez-Martinez N, Morzunov S, ve ark. Detection of Muerto Canyon virus RNA in peripheral blood mononuclear cells from patients with hantavirus pulmonary syndrome. *J Infect Dis* 1994; 170:1013-7.
77. Evander M, Eriksson I, Pettersson L, Juto P, ve ark. Puumala hantavirus viremia diagnosed by real-time reverse transcriptase PCR using samples from patients with hemorrhagic fever and renal syndrome. *J Clin Microbiol* 2007; 45:2491-7.
78. Saksida A, Duh D, Korva M, Avsic-Zupanc T. Dobrava virus RNA load in patients who have hemorrhagic fever with renal syndrome. *J Infect Dis* 2008; 197:681-5.
79. Xiao R, Yang S, Koster F, Ye C, ve ark. Sin Nombre viral RNA load in patients with hantavirus cardiopulmonary syndrome. *J Infect Dis* 2006; 194:1403-9.
80. Liu R, Ma H, Shu J, Zhang Q ve ark. Vaccines and therapeutics against hantaviruses. *Front. Microbiol.* 2020; 10:2989
81. Schmaljohn CS, Hasty SE, Dalrymple JM. Preparation of candidate vacciniavectored vaccines for haemorrhagic fever with renal syndrome. *Vaccine* 1992; 10:10-3.
82. Spik KW, Badger C, Mathiessen I, Tjelle T, ve ark. Mixing of M segment DNA vaccines to Hantaan virus and Puumala virus reduces their immunogenicity in hamsters. *Vaccine* 2008; 26:5177-81.
83. Crowcroft NS, Infuso A, Illef D, Le Guenno B, ve ark. Risk factors for human hantavirus infection: Franco-Belgian collaborative case-control study during 1995-6 epidemic. *BMJ (Clinical Res Ed)* 1999; 318:1737-8.
84. Van Loock F, Thomas I, Clement J, Ghoo S, ve ark. A case-control study after a hantavirus infection outbreak in the south of Belgium: who is at risk? *Clin Infect Dis* 1999; 28:834e9.
85. Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. Overview of next generation sequencing technologies. *Curr Protoc Mol Biol.* 2018; 122(1): e59

86. Orton RJ, Gu Q, Hughes J, Maabar M, ve ark. Bioinformatics tools for analysis viral genomic data. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 2016; 35 (1), 271-285
87. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty- something years on. Nature Protocols, 2006; 1(2): 581-5.
88. Klempa B, Tkachenko E, Dzagurova T, Yunicheva Y, ve ark. Hemorrhagic fever with renal syndrome caused by 2 lineages of Dobrava Hantavirus, Russia. Emerg. Infect. Dis. 2008; 14(4): 617-625
89. Metsky H, Matranga C, Wohl S, Schaffner S, ve ark. Zika virus evolution and spread in Americas. Nature 2017; 546,411-415
90. Manso C, Bibby D, Mbisa J. Efficient and unbiased metagenomic recovery of RNA virus genomes from human plasma samples. Scientific Reports 2017; 7, 1743.
91. Papa A, Nemirov K, Henttonen H, Niemimaa J, ve ark. Isolation of Dobrava virus from *Apodemus flavicollis* in Greece. J Clin. Microbiol. 2001; 39 (6), 2291-2293.
92. Avsic-Zupanc T, Xiao SY, Stojanovic R, Gligic A, ve ark. Characterization of Dobrava virus: A hantavirus from Slovenia, Yugoslavia. J. Med. Virol. 1992; 38:132-137.
93. Nemirov K, Vapalahti O, Lundkvist A, Vasilenko V, ve ark. Isolation and characterization of Dobrava hantavirus carried by the striped field mouse (*Apodemus agrarius*) in Estonia. J. Gen. Virol. 1999; 80:371-379.
94. Hepojoki J, Strandin T, Vaheri A, Lankinen H. Interactions and oligomerization of Hantavirus glycoproteins. J. Virol. 2010; 84:1, 227-242.
95. Kukkonen SKJ, Vaheri A, Plyusnin A. L protein, the RNA-dependent RNA polymerase of hantaviruses. Arch. Virol. 2005; 150: 533-556.

8. EKLER

EK-I

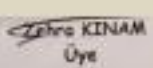
 DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ/ MULTİDİSİPLİN LABORATUVARI HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

Gündem No/ Toplantı No/Yıl : 04/18/2018
Toplantı Tarihi : 17 Ekim 2018

Sayın, Prof.Dr.Mehmet Ali ÖKTEM
DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

49/2018 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Orta Karadeniz bölgesinden elde edilen Orthohantavirus şüpheli örneklerin yeni nesil dizileme ile genetik karakterizasyonu" isimli; Mustafa Sözen, Ferhat Matur, Ceylan Polat, Sercan İrmak, Mert Erkin, Ortaç Çetintaş ve Muhsin Çoğalın araştırmacı olduğu 200 adet (19/2017 Protokol No'lu) çalışmanın denekleri olan Apodemus spp, microtus spp, mus spp, meriones spp, cricetus spp ve Cricacidura spp denekleri olan türlerin örneklerinin verildiği projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

 Prof. Dr. Osman YILMAZ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı	 Prof. Dr. Ali Necati GÖKMEN Başkan Vekili
 Üye	Prof. Dr. Hatice Nur OLGUN Üye (Topl. Katılmadı)
Prof. Dr. Gülgün OKTAY Üye	Prof. Dr. Pembe UY Dan
Prof. Dr. Türkan ERTAY Üye (Topl. Katılmadı)	KINOĞLU
Prof. Dr. Nalan DÜRMÜS	Prof. Dr. Zekiye Sultan ALTUN Üye (Topl. Katılmadı)
Doç. Dr. Nermin Nüket BOÇMEN MAS	Doç. Dr. Orhan KALEMCİ Üye (Topl. Katılmadı)
 Zehra KINAM Üye	Vet. Hekim A PEN

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin başvuru formunda bold karakter kullanılması, projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.

EK-II

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ MULTİDİSİPLİN LABORATUVARI HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

35340, Inciraltı, İzmir-232 4122234

Gündem No/Toplantı No/Yıl : 04/02/2020
Toplantı Tarihi : 17 Ocak 2020

Sayın, Prof.Dr.Mehmet Ali ÖKTEM
DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD

03/2020 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Kırklareli ilinden elde edilen Dobrava-Belgrade Orthohantavirus izolatının yeni nesil dizileme ile tüm genom dizilemesi ve genetik karakterizasyonu" isimli; Mustafa Sözen, Ferhat Matur, Ceylan Polat, Sercan Irmak, Mert Erdin, Ortaç Çetintaş, Muhsin Çoğal araştırmacı olduğu projede; 41/2009 protokol no ile Etik Kurul izni alan hayvan materyali kullanılmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

Prof.Dr.Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
Başkanı

Prof.Dr.Ali Necati GÖKMEN
Başkan Vekili

Prof.Dr.Satiye AKIŞ

Prof.

Prof.Dr.Zekiye Sultan ALTUN
Üye

Pr

Prof.Dr.Nergiz DURMUŞ
Üye(Topl.Katılmadı)

Prof.Dr.f

Prof.Dr.Gamze ÇAPA KAYA
Üye(Topl.Katılmadı)

Prof.Dr.Semra KOÇTÜRK
Üye

Prof.Dr.Çetin PEKÇETİN
Üye (Topl.Katılmadı)

Doç.Dr.Sefa KURT

Vet.Hek

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde bold karakter projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.

EK-III



MERT ERDİN

Ar-Ge Yetkinlik

Makaleler

F. MATUR, K. ERGUNAY, C. POLAT, S. IRMAK, M. ERDİN, A. BRINKMANN, O. CETİNTAŞ, M. COĞAL, İ. M. A. OKTEM, M. SOZEN & A. NİTSCHÉ, A novel genetic lineage of Tula orthohantavirus in Altai voles (*Microtus obscurus*) from Turkey, INFECTION GENETICS AND EVOLUTION, 2019, 1567-1348, 67, 150-158.

Bildiriler

M. ERDİN, S. IRMAK, O. ÇETİNTAŞ, K. K. KALKAN, M. ÇOĞAL, F. MATUR, F. BAYRAKDAR, C. POLAT, M. SÖZEN & İ. M. A. ÖKTEM, Sivas, Kars ve Ardahan İllerinden Moleküler Yöntemler ile Belirlenen İlk Orthohantavirus Pozitiflikleri, Sözlü Sunum, I. Ulusal Tek Sağlık Sempozyumu, 21 Kasım 2019, 23 Kasım 2019.

C. POLAT, M. ERDİN, O. ÇETİNTAŞ, F. ÇOLAK, K. K. KALKAN, M. ÇOĞAL, M. SÖZEN, F. MATUR & İ. M. A. ÖKTEM, Türkiye'de Saptanan İlk Mammarenavirus Soyu, Sözlü Sunum, I. Ulusal Tek Sağlık Sempozyumu, 21 Kasım 2019, 23 Kasım 2019.

C. POLAT, K. ERGÜNAY, S. IRMAK, M. ERDİN, A. BRINKMANN, O. ÇETİNTAŞ, M. ÇOĞAL, M. SÖZEN, F. MATUR, A. NİTSCHKE & İ. M. A. ÖKTEM, A NOVEL TULA ORTHOHANTAVIRUS LINEAGE IN TURKEY, Sözlü Sunum, Uluslararası 38. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 04 Kasım 2018, 08 Kasım 2018.

C. POLAT, B. ÇELEBİ, Ö. APPAK, M. ERDİN, S. IRMAK, O. ÇETİNTAŞ, M. ÇOĞAL, M. SÖZEN, F. MATUR & İ. M. A. ÖKTEM, TOKAT, ÇORUM VE AMASYA İLLERİNDEKİ KEMİRİCİLERDE BARTONELLA TAYLORİİ, B. ELİZABETHAE VE B. GRAHAMİİ VARLIĞI, Sözlü Sunum, Uluslararası 38. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 04 Kasım 2018, 08 Kasım 2018.

M. ERDİN, C. POLAT, S. IRMAK, O. ÇETİNTAŞ, M. ÇOĞAL, F. MATUR, M. SÖZEN & İ. M. A. ÖKTEM, TOKATTA YENİ TAŞIYICI, YENİ ORTHOHANTAVIRUS, Sözlü Sunum, Uluslararası 38. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 04 Kasım 2018, 08 Kasım 2018.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Proje Bilgileri

1185681, Türkiye'nin Doğusundaki Bazı İllerde (Ardahan, Bitlis, Bingöl, Elazığ, Erzincan, Erzurum, Iğdır, Kars, Malatya, Muş, Sivas, Tunceli, Van) Yaşayan Apodemus Spp, Microtus Spp, Chionomys Spp, Mus Spp, Crocidura Spp, Cricetulus Migratorius, Türlerinde Hantavirüs Varlığının ve Dağılımının Araştırılması, 1001 - Araştırma, Burslu, Yürürlükte, ARDEB, SBAG - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 10.07.2020 - 01.11.2020, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 01.11.2018 - 01.11.2020.

1185681, Türkiye'nin Doğusundaki Bazı İllerde (Ardahan, Bitlis, Bingöl, Elazığ, Erzincan, Erzurum, Iğdır, Kars, Malatya, Muş, Sivas, Tunceli, Van) Yaşayan Apodemus Spp, Microtus Spp, Chionomys Spp, Mus Spp, Crocidura Spp, Cricetulus Migratorius, Türlerinde Hantavirüs Varlığının ve Dağılımının Araştırılması, 1001 - Araştırma, Burslu, Yürürlükte, ARDEB, SBAG - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 13.05.2019 - 06.04.2020, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 01.11.2018 - 01.11.2020.

BİDEB Destekleri

MERT ERDİN, Araştırma Burs ve Destekleri Müdürlüğü, 2209-A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destekleme Programı, Ön İncelemede Eleldi, 2015 - 1.

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0