

ELİF KARAASLAN

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2019



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

(DOKTORA TEZİ)

**KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ VİRÜSÜ KELKİT
SUŞUNUN YAPISAL OLMAYAN PROTEİNLERİ VE
HUMORAL İMMÜNİTEDEKİ
ROLLERİ**

ELİF KARAASLAN

**DANIŞMAN
DOÇ.DR.A.SEHİR BİRTEKSÖZ TAN
2. DANIŞMAN
PROF.DR.MEHMET ZİYA DOYMAZ**

**FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ DOKTORA
PROGRAMI**

İSTANBUL-2019

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Farmasötik Mikrobiyoloji Programında Doktora öğrencisi Elif KARAASLAN tarafından Doç.Dr. A. Seher BİRTEKSÖZ TAN ve Prof. Dr. Mehmet Ziya DOYMAZ (2. Danışman)'ın danışmanlıklarında hazırlanan 'Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü Kelkit Suşunun Yapısal Olmayan Proteinleri ve Humoral İmmünitedeki Rollerini' başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 12/06/2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.



Jüri Başkanı

Prof.Dr. Berna ÖZBEK ÇELİK
İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi,
Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı



Jüri-Danışman

Doç.Dr. A. Seher BİRTEKSÖZ TAN
İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi,
Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Anabilim Dalı



Jüri

Prof.Dr.Ali Osman KILIÇ
Karadeniz Teknik Üniversitesi,
Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji



Jüri

Doç.Dr. Fahri AKBAŞ
Bezmialem V. Üni. Tıp Fakültesi,
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

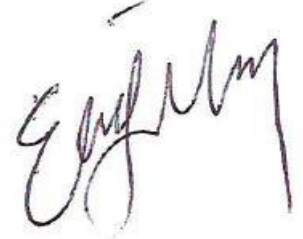


Jüri

Doç.Dr. Sibel DÖŞLER
İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi,
Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

ELİF KARAASLAN

İTHAF

Kızım Nil'e ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Doktora tezimi hazırlamamda bilgilerini ve deneyimlerini benimle paylaşan ve çalışmamın her aşamasında büyük bir titizlikle yardımcı ve destek olan, bana bilim sevgisini aşılayan danışman hocalarım Prof.Dr.Mehmet Ziya DOYMAZ ve Doç.Dr.A.Seher BİRTEKSÖZ TAN'a teşekkür ederim.

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince yakınlık ve anlayış gösteren Anabilim Dalı'mızdaki değerli hocalarım Prof.Dr.Berna ÖZBEK ÇELİK, Doç.Dr.Sibel DÖŞLER ve Doç.Dr.Çağla BOZKURT GÜZEL'e, Kimyager Emine TUNCER ile Ahmet Kesim'e sonsuz teşekkür ederim. Ayrıca çalışma arkadaşlarım Nesibe Selma ÇETİN, Merve YAZICI, Sevde HASANOĞLU ve Filiz GÜNEY'e yardımları ve anlayışlarından dolayı teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca beni her koşulda destekleyen, yalnız bırakmayan, varlıklarıyla bana dünyadaki en büyük armağan olan canım anneme ve babama, benimle birlikte sabahlayan ve daima destekleyen eşime içtenlikle teşekkür ederim.

Bu çalışma, TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. Proje No: 117S403

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ii
BEYAN.....	iii
İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xv
ÖZET	xviii
ABSTRACT.....	xix
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü	4
2.1.1. Tarihçe	4
2.1.2. Epidemiyoloji ve Ekoloji	5
2.1.3. Bulaş Yolları	7
2.1.4. Klinik Seyir ve Patogenez.....	9
2.1.5. Tanı, Tedavi ve Korunma	12
2.2. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsünün Yapısı, Genomu ve Proteinleri	14
2.2.1. KKKAV'nin Yapısal Proteinleri.....	17
2.2.1.1. Nükleoprotein.....	17
2.2.1.2. Glikoproteinler	19
2.2.1.3. RNA-Bağımlı RNA Polimeraz	22
2.2.2. KKKAV'nin Yapısal Olmayan Proteinleri	23
2.2.2.1. S Segment Kökenli Yapısal Olmayan Protein (NSs).....	23
2.2.2.2. M Segment Kökenli Yapısal Olmayan Protein (NSm)	25
2.3. <i>Bunyaviridae</i> Ailesinde Viral Yapısal Olmayan Proteinlerin Rollerini.....	26
2.3.1. NSs	26
2.3.2. NSm	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	30

3.1. Çözeltiler ve Besiyerleri	30
3.1.1. 1 M Sodyum Klorid	30
3.1.2. 2.5 M Potasyum Klorid	30
3.1.3. 2 M Magnezyum Sülfat	30
3.1.4. 1 M pH:8 Tris Çözeltisi	30
3.1.5. 0.5 M Etilendiamintetraasetik asit Çözeltisi	30
3.1.6. %50 Glukoz Çözeltisi	30
3.1.7. Kanamisin Stok Çözeltisi	30
3.1.8. Luria-Bertani (LB) Sıvı Besiyeri	31
3.1.9. Kanamisinli Luria-Bertani Sıvı Besiyeri	31
3.1.10. %30 Gliserollü Luria-Bertani Sıvı Besiyeri	31
3.1.11. Luria-Bertani Agar	31
3.1.12. Kanamisinli Luria-Bertani Agar	31
3.1.13. Katabolit Represyonlu Super Optimal (SOC) Sıvı Besiyeri	32
3.1.14. Ekspresyon Besiyeri	32
3.1.15. Tris-EDTA Çözeltisi	32
3.1.16. 0.1 M Kalsiyum Klorid Çözeltisi	33
3.1.17. %15 Gliserollü 0.1 M Kalsiyum Klorid Çözeltisi	33
3.1.18. 5x Tris-Borik Asit-EDTA Çözeltisi	33
3.1.19. Fosfat Tamponlu Tuzlu Su (PBS) Çözeltisi	33
3.1.20. 100 mM İzopropil β -D-1- Tiyogalaktopiranozid Çözeltisi	33
3.1.21. 0.5 M Tris pH 6.8	34
3.1.22. Akrilamid/BİS	34
3.1.23. %10 Sodyum Dodesil Sülfat Çözeltisi	34
3.1.24. 1.5 M Tris pH 8.8	34
3.1.25. %0.5 Bromofenol Mavisi	34
3.1.26. SDS Örnek Yükleme Çözeltisi	34
3.1.27. 10x SDS Yürütme Çözeltisi	35
3.1.28. %10 Amonyum Persülfat	35
3.1.29. Coomasie Boyama Çözeltisi	35
3.1.30. Coomasie Boya Uzaklaştırma Çözeltisi	35
3.1.31. Denatüre Lizis Tamponu	35
3.1.32. Denatüre Yıkama Tamponu	36

3.1.33. Denatüre Elüsyon Tamponu.....	36
3.1.34. Western Blotlama Transfer Tamponu.....	36
3.1.35. Western Blotlama TBST Yıkama Tamponu.....	37
3.1.36. Western Blotlama Bloklama, Primer ve Sekonder Antikor Dilüsyon Tamponu	37
3.1.37. EİA Karbonat/Bikarbonat Kaplama Tamponu	37
3.1.38. EİA PBST Yıkama Tamponu	37
3.1.39. EİA Bloklama, Primer ve Sekonder Antikor Dilüsyon Tamponu	37
3.1.40. Dot-Blot Tris Tamponlu Tuzlu Su (TBS).....	38
3.1.41. Dot-Blot Tween 20 (TTBS) Yıkama Tamponu	38
3.1.42. Dot-Blot Bloklama, Primer ve Sekonder Antikor Dilüsyon Tamponu.....	38
3.2. Kullanılan Cihazlar ve Diğer Sarf Malzemeler	38
3.3. Yöntemler	39
3.3.1. KKKAV Kelkit 06 Suşu NSs ve NSm Proteinlerinin Sekanslarının Belirlenmesi	39
3.3.2. Sentetik, Optimize Sekansların Elde Edilmesi	40
3.3.3. Sentetik Peptit Sekanslarının Belirlenmesi	41
3.3.4. Klonlama Stratejilerinin Belirlenmesi	42
3.3.5. Klonlama İçin Gerekli Primerlerin Tasarlanması	43
3.3.6. Klonlanacak Genlerin PCR ile Çoğaltılması	44
3.3.7. Çoğaltılan Genlerin Temizlenmesi	46
3.3.8. A Kuyruklarının Eklenmesi	47
3.3.9. Vektör ve Klonlanacak Genlerin Restriksiyon Enzimleri ile Kesimi	47
3.3.10. Agaroz Jel Elektroforez	47
3.3.11. Agaroz Jelden DNA Ekstraksiyonu	48
3.3.12. Ligasyon Reaksiyonu	49
3.3.13. Bakterilerin Stoklanması.....	49
3.3.14. Kullanılan Bakteri Suşları	49
3.3.15. Kimyasal Yöntem ile Kompetan Bakterilerin Hazırlanması	49
3.3.16. Kompetan Hücrelerin Transformasyonu.....	50
3.3.17. Pozitif Transformantların Seçilimi.....	51
3.3.18. Plazmid İzolasyonu	51
3.3.19. Bakteriyel Ekspresyonun Optimizasyonu	52

3.3.20. Kùltür ÖrneKlerinin Analizi	53
3.3.20.1. Protein Elektroförezini için Jel Hazırlanması	53
3.3.20.2. Protein Elektroförezini için ÖrneKlerin Hazırlanması	54
3.3.20.3. ÖrneKlerin YüKlenmesi ve Yürütölməsi	54
3.3.20.4. Jellerin Boyanarak İncelenmesi	55
3.3.21. Denatüre Koşullarda Bakteri Lizisi.....	55
3.3.22. Spin Kolonlarla Protein Saflaştırma	56
3.3.23. Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC-AKTA PURE Sistemi) ile Protein Saflaştırma.....	56
3.3.24. Diyaliz.....	57
3.3.25. Western Blotlama.....	57
3.3.26. EİA	58
3.3.27. Dot-Blotlama.....	59
3.3.28. Poliklonal Antikor Eldesi.....	63
3.4. İstatistiksel Analiz.....	63
4. BULGULAR.....	65
4.1. Kelkit06 NSm ve NSs Proteinlerinin Belirlenmesi	65
4.1.1. Kelkit06 NSm Proteininin Belirlenmesi	65
4.1.2. Kelkit06 NSs Proteininin Belirlenmesi.....	65
4.1.3. NSm ve NSs Genlerinin pETSUMO Vektörüne Klonlanması	66
4.1.4. NSm ve NSs Genlerinin pET28b Vektörüne Klonlanması.....	68
4.1.5. NSm Geninin pET30b Vektörüne Klonlanması	70
4.2. Üretilen Proteinlerin Saflaştırılması	71
4.2.1. Proteinlerin Spin Kolonlar Aracılığıyla Saflaştırılması	71
4.2.2. Proteinlerin FPLC AKTA Pure Sistemi ile Saflaştırılması.....	72
4.3. Rekombinant Proteinlerin Analizi	75
4.3.1. rNSs'in Analizi	75
4.3.2. rNSm'in Analizi.....	77
4.4. Sentetik Peptitlerin Analizi	79
4.4.1. NSs Peptidinin Analizi.....	79
4.4.2. NSm Peptidinin Analizi	81
4.5. NSs ve NSm'e Karşı Poliklonal Antikor Eldesi	83
4.5.1. rNSs'e Karşı Poliklonal Antikor Eldesi	83

4.5.2. rNSm'e Karşı Poliklonal Antikor Eldesi	83
4.5.3. pNSs'e Karşı Poliklonal Antikor Eldesi	84
4.5.4. pNSm'e Karşı Poliklonal Antikor Eldesi.....	84
4.6. Rekombinant Proteinlere Karşı Elde Edilen Poliklonal Antikorlar ile Sentetik Peptitler Arasındaki Çapraz Reaksiyonun Araştırılması	86
5. TARTIŞMA	88
KAYNAKLAR	94
ETİK KURUL KARARI	102
HAM VERİLER	107
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	108
ÖZGEÇMİŞ	109

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3-1: KKKAV 10200 ve KKKAV Kelkit06 NSs ve NSm proteinlerinin sekansları	40
Tablo 3-2: NSs ve NSm proteinlerinin nativ ve optimize sekansları	41
Tablo 3-3: NSm ve NSs proteinlerinin antijenik olduğu tahmin edilen bölgeleri	42
Tablo 3-4: NSm ve NSs proteinlerinden sentetik peptit eldesi için seçilen sekanslar....	42
Tablo 3-5: Klonlama için tasarlanan primerler	44
Tablo 3-6: NSs ve NSm genleri için PCR koşulları	45
Tablo 3-7: NSs geninin pET30b vektörüne klonlanmasında uygulanan PCR koşulları.	45
Tablo 3-8: PCR'ın bileşenleri.....	46
Tablo 3-9: Protein Elektroforezi için Jel Hazırlanması	53

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: <i>Hyalomma</i> cinsi kenelerde yaşam döngüsü.	6
Şekil 2-2: <i>Hyalomma</i> cinsi kenelerin ve KKKAV'nin coğrafik yayılımı.	7
Şekil 2-3: KKKAV'nin klinik seyri ve ilişkili laboratuvar bulguları.	9
Şekil 2-4: Ciddi seyirli KKKAH ile ilişkili klinik ve laboratuvar bulguları.	11
Şekil 2-5: KKKAV'nin patogenezi.	13
Şekil 2-6: KKKAV'nin yapısı.	16
Şekil 2-7: KKKAV'nin segmentleri ve bu segmentlerden kodlanan proteinleri.	16
Şekil 2-8: KKKAV'nin konak hücreye girişi, çoğalması ve çıkışı.	18
Şekil 2-9: KKKAV nükleoproteininin yapısı.	19
Şekil 2-10: <i>Bunyaviridae</i> ailesinde M segmentten kodlanan poliproteinler ve hücrel proteazlarla kesilmeleri.	20
Şekil 2-11: KKKAV'de M segmentten kodlanan poliprotein prekürsörünün kesilimi... 21	
Şekil 2-12: KKKAV L proteini ve domainleri.	23
Şekil 2-13: NSs'in tahmin edilen sekonder yapısı.	24
Şekil 2-14: KKKAV'de NSm'in tahmin edilen lokasyonu.	25
Şekil 2-15: <i>Bunyaviridae</i> ailesinin bazı cinslerinde yapısal olmayan proteinlerin genomik organizasyonu.	27
Şekil 3-1: pETSUMO vektöründe TA klonlama stratejisi.....	43
Şekil 3-2: Dot-Blot cihazının birleştirilmesi.....	62
Şekil 3-3: Akış valfi ayarları.....	62
Şekil 3-4: Poliklonal antikor eldesinde bağışıklama takvimi.	64
Şekil 4-1: KKKAV Kelkit06 suşu M poliproteininin transmembran heliksleri ve NSm'in lokasyonu.	65
Şekil 4-2: KKKAV Kelkit06 suşunda nükleoprotein ve NSs'in açık okuma çerçeveleri.	66
Şekil 4-3: NSm geninin pETSUMO vektörüne klonlanması.....	66
Şekil 4-4: NSs geninin pETSUMO vektörüne klonlanması.	67
Şekil 4-5: NSm ve NSs genlerinin pETSUMO vektörüne klonlama aşamalarının kontrolü.	67
Şekil 4-6: NSm geninin pET28b vektörüne klonlanması.	68

Şekil 4-7: NSm ve NSs genlerinin pET28b vektörüne klonlanmasının kontrolü.....	69
Şekil 4-8: NSs geninin pET28b vektörüne klonlanması.....	69
Şekil 4-9: NSm geninin pET30b vektörüne klonlanması.	70
Şekil 4-10: NSm geninin pET30b vektörüne klonlanma aşamalarının kontrolü.....	71
Şekil 4-11: pETSUMO sisteminde üretilen NSm ve NSs proteinlerinin Ni-NTA spin kolonlarıyla saflaştırılması.....	71
Şekil 4-12: pETSUMO sistemiyle üretilen NSs proteininin saflaştırılmasının incelenmesi.	72
Şekil 4-13: pET30b sistemiyle üretilen NSm proteininin saflaştırılmasının incelenmesi.	72
Şekil 4-14: pETSUMO sistemi ile üretilen NSs proteininin saflaştırılmasına ait kromatogram.....	73
Şekil 4-15: pET30b sistemi ile üretilen NSm proteininin saflaştırılmasına ait kromatogram.....	74
Şekil 4-16: rNSs in immünolojik analizi.	75
Şekil 4-17: rNSs kullanılarak EİA ile KKKAV antikor pozitif insan serumlarının taranması.....	76
Şekil 4-18: rNSs kullanılarak EİA ile KKKAV antikor negatif insan serumlarının taranması.	76
Şekil 4-19: rNSm'in immünolojik analizi.	77
Şekil 4-20: rNSm kullanılarak EİA ile KKKAV antikor pozitif insan serumlarının taranması.....	78
Şekil 4-21: rNSm kullanılarak EİA ile KKKAV antikor negatif insan serumlarının taranması.....	78
Şekil 4-22: pNSs'in immünolojik analizi.....	79
Şekil 4-23: pNSs kullanılarak EİA ile KKKAV antikor pozitif insan serumlarının taranması.....	80
Şekil 4-24: pNSs kullanılarak EİA ile KKKAV antikor negatif insan serumlarının taranması.....	80
Şekil 4-25: pNSm'in immünolojik analizi.	81
Şekil 4-26: pNSm kullanılarak EİA ile KKKAV antikor pozitif insan serumlarının taranması.....	82

Şekil 4-27: pNSm kullanılarak EİA ile KKKAV antikor negative insan serumlarının taranması.	82
Şekil 4-28: rNSs ile bağışıklanmış fare serumunda IgG titresi.	83
Şekil 4-29: rNSm ile bağışıklanmış fare serumunda IgG titresi.	84
Şekil 4-30: pNSm ile bağışıklanmış fare serumunda IgG titresi.	85
Şekil 4-31: pNSs ile bağışıklanmış fare serumunda IgG titresi.	85
Şekil 4-32: 1/10 dilüsyonda çapraz tepkimenin belirlenmesi.	86
Şekil 4-33: 1/50 dilüsyonda çapraz tepkimenin belirlenmesi.	87



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

KKKAV	: Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü
KKKA	: Kırım Kongo Kanamalı Ateşi
WHO	: World Health Organization
CDC	: Centers for Disease Control ve Prevention
aPTT	: Aktive Parsiyal Tromboplastin Zamanı
IL-6	: İnterlökin-6
TNF- α	: Tümör Nekroz Faktör- α
EİA	: Enzim İmmün Assay
INR	: Uluslararası Normalleştirilmiş Oran
KFK	: Kreatin fosfokinaz
sICAM-1	: Salgısal interselüler Adezyon Molekülü-1
VCAM-1	: Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1
IgM	: İmmünglobulin-M
IgG	: İmmünglobulin-G
RT-PCR	: Reverz Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik Asit
vRNA	: Viral RNA
cRNA	: Komplementer RNA
KKKAH	: Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı
DİK	: Dissemine İntravasküler Koagülasyon
IFNAR	: İnterferon α/β Reseptör Knock-Out
MVA	: Modifiye Vaksinya Ankara
HAZV	: Hazara Virüs
ORF	: Open Reading Frame
PdRp	: RNA-Bağımlı RNA Polimeraz
NP	: Nükleoprotein
NCR	: Noncoding Region
RNP	: Ribonükleoprotein
PARP	: Poli (ADP-riboz) Polimeraz
SKI-1/S1P	: Subtilisin Kexine Isoenzyme-1 / Site-1- Protease

MLD	: Mucin Like Domain
OTU	: Ovarian Tümör
RIG-I	: Retinoic Acid-Inducible Gene 1
NSs	: Yapısal Olmayan Protein S
NSm	: Yapısal Olmayan Protein M
SFTSV	: Severe Fever With Thrombocytopenia Virus
RVFV	: Rift Valley Fever Virus
IRF-3	: Interferon Regulatory Factor 3
NaCl	: Sodyum Klorid
KCl	: Potasyum Klorid
MgSO ₄	: Magnezyum Sülfat
CaCl ₂	: Kalsiyum Klorid
Na ₂ HPO ₄	: Sodyum Fosfat Dibazik
KH ₂ PO ₄	: Potasyum Fosfat Monobazik
NaH ₂ PO ₄	: Sodyum Fosfat Monobazik
Na ₂ CO ₃	: Sodyum Karbonat
NaHCO ₃	: Sodyum Bikarbonat
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
TBE	: Tris Borik Asit EDTA
IPTG	: İzopropil -D-1- Tiyogalaktopiranozid
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
APS	: Amonyum Persülfat
BSA	: Bovin Serum Albümin
PBS	: Phosphate Buferred Saline
PBST	: Phosphate Buffered Saline with Tween 20
LB	: Luria-Bertani
SOC	: Super Optimal Catabolite
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
PCR	: Polimerase Chain Reaction
MGW	: Molecular Grade Water
MCS	: Multiple Cloning Site
F	: Forward
R	: Reverz

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis
TEMED : Tetrametiletilen Diamin



ÖZET

Karaaslan, E. (2019). Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü Kelkit Suşunun Yapısal Olmayan Proteinleri ve Humoral İmmunitedeki Roller. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Mikrobiyoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü (KKKAV) yaygın görülen bir arbovirüs olup mortalite oranı yaklaşık %5-30 arasında değişen ciddi kanamalı ateşli hastalık etkenidir. Biyogüvenlik seviyesi 4 (BSL 4) ajanı olarak sınıflandırılmış olan bu virüse karşı henüz kabul edilmiş bir tedavi yöntemi veya aşı bulunmamaktadır. BSL 4 çalışma koşulları gerektirmesi araştırmacıları bu patojen ile ilgili olabildiğince fazla bilgi elde edebilmek için alternatif metotlara yöneltmiştir ve rekombinant protein teknolojisi bu metotlardandır. Rekombinant olarak elde edilen proteinler bu gibi virüslerin yaşam döngüsündeki farklı basamakları incelemek için güçlü bir araç sunmaktadır. Diğer proteinlerinin yanı sıra viral yapısal olmayan proteinler vektör/konak immün sistem ile olan interaksiyonları ve viral patogenezdaki rolleri nedeniyle öne çıkmaktadır. Viral yapısal olmayan proteinlerin viral birleşmedeki rolleri, muhtemel adaptör ve bağlayıcı protein benzeri rolleri, apoptotik/antiapoptotik aktiviteleri, interferon temelli reaksiyonların inhibisyonunda ve virüs atenuasyonundaki rolleri artropod kaynaklı bunyavirüsler dahil bir çok cinste gösterilmiştir. Viral yaşam döngüsündeki muhtemel rollerinin yanı sıra bu proteinlerin tanı, tedavi ve aşı geliştirmede işlevsel olabilecekleri gösterilmiştir. KKKAV'nin M (NSm) ve S (NSs) segmentlerinde bir veya muhtemelen iki yapısal olmayan proteini bulunmaktadır. Bu çalışmada KKKAV Kelkit06 suşunun yapısal olmayan proteinlerinin bakteriyel ekspresyonu amaçlanmıştır. Bu amaçla NSm (369 baz çifti), NSs (477 baz çifti)'in optimize sekansları pETSUMO, pET28b ve pET30b vektörlerine klonlanmış ve *Escherichia coli* BL21 (DE3) suşu N veya C-terminalinde His-tag barındıran proteinlerin ekspresyonunda konak olarak kullanılmıştır. Elde edilen rekombinant proteinler Western Blotlama ve enzim immün assay (EİA) ile KKKAV antikor pozitif ve negatif hasta serumlarında spesifik antikorların aranmasında kullanılmıştır. İki protein de Western Blotlamalarda KKKAV antikor pozitif hasta serumlarıyla reaksiyon vermiş, EİA ile taranan KKKAV antikor pozitif hasta serumlarının % 64'ü NSm ve NSs spesifik IgG yönünden pozitif bulunmuştur. Rekombinant proteinler ile bağışıklanan farelerden ise yüksek titrede antikor elde edilebilmiştir. Bu proteinlerin gerçek rollerinin belirlenmesi için daha ileri çalışmalar gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler : KKKAV, rekombinant , NSs, NSm, humoral immünite

Bu çalışma, TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. Proje No: 117S403

ABSTRACT

Karaaslan, E. (2019). Non-Structural Proteins of Crimean Congo Hemorrhagic Fever Virus Kelkit Strain ve Their Roles in Humoral Immunity. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Pharmaceutical Microbiology. PhD Thesis. İstanbul.

Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV) is a widely distributed arbovirus ve causative agent of a severe febrile hemorrhagic disease that have a mortality rate between 5-30%. Currently there is no approved vaccine or treatment against this agent which has been classified as a biosafety level 4 (BSL 4) pathogen. BSL 4 facility requirement directs researchers to alternative methods to gather as much information about this pathogen as possible ve recombinant protein technology is one of these methods. Recombinantly expressed viral proteins are powerful tools to dissect different stages of life cycle of such viruses. Among other proteins, viral non-structural proteins stve out because of their ability to interact with vector/ host immun system ve contribution to viral pathogenesis. Roles of viral non structural proteins at viral assembly, possible activities as a scaffolding proteins, apoptotic/anti-apoptotic activities, inhibition of interferon based reactions ve virus attenuation have been shown in many species including arthropod-borne bunyaviruses. Besides their various biological roles at virus life cycle, it has also been shown that these proteins could have potential roles at diagnosis, treatment ve vaccine development. CCHFV has one ve possibly two non structural proteins originated from M segment (NSm) ve S segments (NSs). In this study bacterial expression of nonstructural proteins M ve S of CCHFV Kelkit06 strain is aimed. For this purpose, NSm (369 base pair) ve NSs (477 base pair) optimized sequences are cloned to various expression vectors (pETSUMO, pET28b ve pET30b) ve *Escherichia coli* BL21(DE3) was utilized as an expression host for N or C-terminally His tagged proteins. Recombinant proteins were used in Western Blotting ve enzyme immunoassay (EİA) tests against CCHFV antibody positive ve negative human serum to detect the antibodies against these proteins. Both proteins reacted with CCHFV antibody positive human sera when tested with Western Blotting, 64 % of all tested CCHFV antibody positive human sera were found to be positive for NSm ve NSs specific IgG. Also high titer NSm ve NSs specific antibodies obtained from mice immunized with recombinant proteins Further studies are warranted to specify exact roles played by these proteins.

Key Words: CCHFV, recombinant, NSs, NSm, humoral immunity

The present work was supported by the TÜBİTAK. Project No. 117S403

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü (KKKAV) grip benzeri semptomlar, yüksek ateş, miyalji, hemoraji, dissemine intravasküler koagülasyon, şok ve ölüm gibi hafiften şiddetliye farklı semptomlarla seyredebilen Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) hastalığının etkenidir. Doğada iksodid keneler aracılığıyla taşınması ve birincil bulaş yolunun keneler olması sebebiyle bir arbovirüs olarak sınıflandırılmıştır. Mortalite oranının infekte eden suş, viral yük, konağa özgü farklılıklar gibi faktörler nedeniyle % 5-30 arasında olduğu bildirilmiştir. Güneydoğu Avrupa, Orta Doğu, Asya ve Afrika’da birçok ülkede görülmesi nedeniyle tıbbi önemi olan ve kene ile taşınan virüsler arasında en geniş coğrafi yayılıma sahip olan virüstür [1, 2]. Virüsün temel olarak doğada varlığını sürdürmesinden ve yayılımından *Ixodidae* ailesi sorumlu tutulmaktadır ve bilinen en yaygın vektörü *Hyalomma* cinsi ve özellikle *Hyalomma marginatum*’dur [3, 4]. KKKAV’nin Avrupa, Orta Doğu, Orta Asya, Çin ve Sahraaltı Afrika’da bulunan 30’dan fazla ülkede infeksiyonlara sebep olduğunun serolojik olarak gösterilmesi, bu virüsün hem vektörü hem de doğada en önemli rezervuarı olan *Hyalomma* cinsi kenelerin geniş coğrafi yayılımının etkisidir [5].

İnsan KKKAV infeksiyonu sonucunda, kanamalı ateşli hastalık geçirdiği bilinen tek canlı olması rağmen virüsün yaşam döngüsünde tesadüfi konaktır. İnsanlar kene ısırığı veya infekte kenenin çıplak deri yüzeyinde ezilmesi yoluyla infekte olmaktadır. Viremili hayvanların kanı veya dokusuyla temas, pastörize edilmemiş süt tüketimi gibi perkütanöz veya permukozal yollarla da infekte olabilmektedirler. Tam olarak kanıtlanmamış olsa da aerosol bulaşı ve anneden çocuğa perinatal veya intrauterin bulaşı işaret eden vakalar bulunmaktadır [6-8].

Virüsün endemik olduğu ülkelerin dışında diğer bölgelerde de vektörün bulunması [9], daha önce sadece kenelerin toplanarak viral RNA’nın varlığının veya hayvanlarda seropozitifliğin gösterildiği ülkelerde KKKA vakalarının gözlenmesi [10] veya endemik bölgelerde bulunup kendi ülkelerine dönen hastaların virüsü endemik olmayan ülkelere taşıması [11, 12] bu virüsün dünya çapında bir önem kazanmasına neden olmuştur. Ayrıca Dünya Sağlık Örgütü’nün (World Health Organization-WHO) ve Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi’nin (Centers for Disease Control ve

Prevention-CDC) bu virüsü potansiyel biyoterör ajanı olarak bildirmesi de bu öneme katkı sağlamıştır [13].

Virüsle infeksiyonu takiben insanlarda gelişen hastalığın süresinde ve şiddetinde farklılıklar olmakla beraber infeksiyonun dört belirgin aşamada ilerlediği bildirilmiştir. Bunlar; *inkübasyon*, *prehemorajik*, *hemorajik* ve *konvalesans* dönemdir [2, 5, 14]. İnkübasyon dönemi, bulaş kene ısırığıyla gerçekleştiyse 1-3 gün kadar kısa olabilirken bu süre temas yolu ve viral yük gibi birçok faktöre bağlı olarak 13 güne kadar uzayabilmektedir. Hastalığın ağır seyrettiği vakalarda infeksiyonu takip eden 3-6 gün içerisinde hemorajik dönem başlamaktadır. Hastalığa yenik düşen kişilerde infeksiyonu takip eden 5-14 gün arasında kanamalar, çoklu organ yetmezliği ve şoka bağlı ölüm gerçekleşmektedir. Hastalığa yenik düşmeyenlerde infeksiyonun başlangıcından 15-20 gün sonra konvalesans dönemi başlamakta ve tamamen iyileşme bir yılı bulabilmektedir [2, 5].

KKKAH'nin tedavisi sıvı ve elektrolit dengesinin korunması, oksijen seviyesinin sabit tutulması için ventilasyon desteğinin sağlanması ve hafif sedasyonu içeren destekleyici terapidir [15]. Henüz onaylanmış bir aşısı veya tedavisi bulunmamaktadır. Ancak ribavirin WHO tarafından tedavideki antiviral seçenek olarak bildirilmektedir [2].

Virüs segmentli, negatif polariteli RNA virüslerini kapsayan *Bunyaviridae* ailesindeki beş cinsten biri olan ve diğer cinslerden yaklaşık % 60 daha büyük L segmentiyle ayrılan *Nairovirus* cinsinde yer almaktadır [16]. 80-105 nm çapında, yuvarlağa yakın şekilli, konak hücreden kaynaklanan lipid bilayer ile çevrili olan bu virüs ailenin diğer üyelerinde olduğu gibi üç parçalı genomu ve kene aracılı taşınma ve yayılımı ile karakterizedir [17].

Büyük (Large-L; ~ 12.1 kb) segment, orta (Medium-M; ~ 5.4 kb) segment ve küçük (Small-S; ~ 1.6 kb) segmenti üç açık okuma çerçevesi (open reading frame-ORF) barındırmaktadır ve bu segmentlerin ORF'lerinden sırasıyla RNA-bağımlı RNA polimeraz (RdRp), glikoproteinler Gn ve Gc, nükleoprotein (NP) olmak üzere dört yapısal protein üretilmektedir. M segment ORF'sinden elde edilen glikoprotein prekürsörünün posttranslasyonel kesilimleri sonucunda Gn ve Gc ile beraber GP38, GP85/160, mûsin benzeri domain ve NSm (Non-Structural/Yapısal Olmayan M) olmak

dört yapısal olmayan protein oluşmaktadır. Ayrıca S segmentte NP geninin zıt oryantasyonundan NSs (Non-Structural/Yapısal Olmayan S) proteini kodlanmaktadır.

Viral yapısal olmayan proteinler virüs tarafından kodlanan ancak virionun yapısına katılmayan proteinlerdir. Bu proteinler hem patogenezdaki rolleri hem de vektör/konak bağışıklık sistemiyle olan etkileşimleri nedeniyle dikkati çekmektedirler [18]. KKKAV’de, *Bunyaviridae* ailesinin diğer birçok üyesinde de olduğu gibi yapısal olmayan proteinlerin olduğu belirlenmiştir. Bu yapısal olmayan proteinlerden biri S segmentten ambisens okunma sonucu eksprese edilen NSs, diğeri ise M segmentten oluşan poliprotein prekürsörünün posttranslasyonel kesilimleri sonucunda orataya çıkan NSm’dir.

KKKAV ile ilgili bilgiler oldukça sınırlıdır. Virüsün endemik olarak görüldüğü ülkelerin genellikle gelişmekte olan ülkeler olması ve bu virüs ile çalışmanın biyogüvenlik seviyesi 4 (BSL 4) olan birimler gerektirmesi sahip olunan bilgi azlığının sebepleri arasında gösterilebilirken, araştırmacılar bu gibi virüslerin biyolojisini anlayabilmek için farklı metodlara yönelmişlerdir. Çoğalma yeteneği kaybettirilmiş virüs benzeri yapılar kullanılarak hücre kültür sistemlerinde virüs biyolojisinin ve immünolojisinin çalışılmasına olanak sağlayan reverz genetik sistemleri ve rekombinant protein teknolojisi de bu metodlar arasındadır [19-22].

Bu virüsün yapısal olmayan proteinleri ile ilgili çalışmalar oldukça sınırlı olup bu proteinlerin görevlerinin aydınlatılması için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu çalışmada KKKAV’nin yapısal olmayan proteinlerinin bakteriyel ekspresyon sisteminde üretilerek humoral immünitadaki rollerinin araştırılması hedeflenmiştir. Farklı ekspresyon vektörleri kullanılarak elde edilen rekombinant proteinlerin ayıraç olarak kullanıldığı Western Blotma ve Enzim İmmün Assay (EİA) testleri ile enfeksiyon sırasında bu proteinlere karşı antikor yanıt oluşumu sorgulanmıştır. Ayrıca rekombinant proteinler ile aşılanan farelerden elde edilen poliklonal serumlar daha ileri çalışmalarda ayıraç olarak kullanılabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü

KKKAV grip benzeri semptomlar, yüksek ateş, miyalji, hemoraji, dissemine intravasküler koagülasyon, şok ve ölüm gibi hafiften şiddetliye farklı semptomlarla seyredebilen KKKAH'nin etkenidir. Doğada iksodid keneler aracılığıyla taşınması ve birincil bulaş yolunun keneler olması nedeni ile bir arbovirüs olarak sınıflandırılmıştır. Mortalite oranının infekte eden suş, viral yük, konağa özgü farklılıklar gibi faktörlere bağlı olarak % 5-30 arasında değiştiği bildirilmektedir. Güneydoğu Avrupa, Orta Doğu, Asya ve Afrika'da birçok ülkede görülmesi nedeniyle tıbbi önemi olan ve kene ile taşınan virüsler arasında en geniş coğrafi yayılıma sahip olan virüstür [1, 2].

KKKAV sığır, koyun, deve gibi hayvanlarda asemptomatik infeksiyonlara neden olurken bu virüsle temasın sadece insanlarda hastalığa yol açtığı bilinmektedir [23]. İnsanlara bulaş kene ısırığı, infekte hayvan veya insanların vücut sıvılarıyla gerçekleşebilmektedir. Etkin korunma ve tedavisinin bulunmayışı yüksek risk grubunda sınıflandırılmasına, BSL 4 koşullarda çalışmayı gerektirmesi ise virüsün biyolojisi ile ilgili bilgilerin kısıtlanmasına buna bağlı olarak da virüse karşı etkin bir tedavi veya aşının geliştirilmesinde gecikmelere neden olmaktadır [24].

2.1.1. Tarihçe

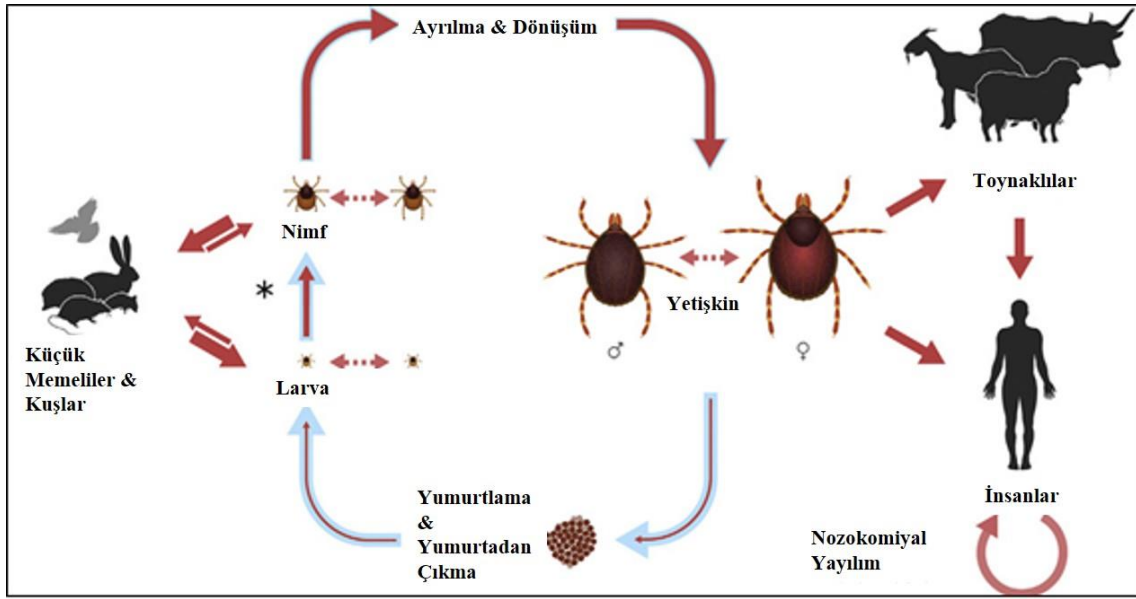
KKKA, ilk kez 12. yüzyılda, günümüzde Tacikistan olarak bilinen bölgede bir doktor tarafından kanamalı bir hastalık olarak tanımlanmıştır. Harzem Şahı İncelemesi'nde (The Compendium of the Sheikh of Khorezm) hastalık belirtilerini, idrar, rektum, dış eti, balgam ve abdominal kativetede kan varlığı olarak belirtmiştir. Hastalık, yüzyıllarca *khungribta* (kan alan), *khunymuny* (burun kanaması), *karakhalak* (kara ölüm) gibi farklı isimlerle anılmış, hastalık etkeninin bulunması ve isimlendirilmesi ise 1944-1945 yıllarında o zamanlar bir savaş bölgesi olan Kırım'da 200'e yakın Sovyet askeri personeline ciddi kanamalarla seyreden bir epidemi sonrası gerçekleşmiştir. Bu ve bundan önceki epidemilerde insanlarda görülen kanamalı ateşli hastalıklarla keneler arasında bir ilişki olduğu sadece tahmin edilirken virüsün karakterizasyonuna yönelik ilk çalışmalar 1960'lı yıllarda Chumakov ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. 1967 yılında konvalesan hasta serumları kullanılarak yenidoğan fare beyninde pasajlanarak elde edilen Drozdov suşu, Sovyet Sosyalist

Cumhuriyetler Birliği'nde ve diğer ülkelerde kullanılan prototip virüs suşu olmuştur. Benzer tarihlerde Casals Kongo ve Ugvea bölgelerinde kanamalı ateşli hastalıktan muzdarip hasta serumlarından ve Pakistan'da *Hyalomma* cinsi kenelerden izole edilen virüslerin Drozdov suşundan ayırt edilemediğini bildirmiştir [25, 26]. Tüm bu bilgilerin ışığında Kırım Kanamalı Ateşi-Kongo Virüsü olarak adlandırılmasına karar verilen virüs, dönemin araştırmacıları tarafından ismin garip bulunması nedeni ile Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü olarak anılmaya başlanmış ve literatürdeki yerini almıştır [5, 14].

2.1.2. Epidemiyoloji ve Ekoloji

Artropod kaynaklı zoonotik bir etken olarak KKKAV doğadaki varlığını enzootik kene-insan dışı omurgalı hayvan-kene döngüsüyle çoğunlukla farkedilmeden sürdürmektedir [14]. *Dermacentor*, *Boophilus*, *Amblyomma*, *Rhipicephalus* ve *Haemaphysalis* cinsi kenelerin KKKAV'yi taşıdıkları ve deneysel olarak infekte oldukları gösterilmiş olsa da temel olarak doğada varlığını sürdürmesinden ve yayılımından *Ixodidae* ailesi sorumlu tutulmaktadır. Bilinen en yaygın vektörü ise *Hyalomma* cinsi kenelerden özellikle *Hyalomma marginatum*'dur [3, 4]. Kenenin kanla beslenmesi aracılığıyla alınan virüs orta midede çoğalmakta, hemosöle geçmektedir. Virüs titresinin en yüksek olduğu dokular olan tükürük bezleri ve üreme dokuları aracılığıyla virüsün yayılımı sağlanmaktadır [4, 27, 28]. Keneler larvadan nimfe, nimften yetişkinliğe geçişteki metamorfoz aşamalarında ihtiyaç duydukları besinleri her gelişimsel evrede omurgalı kanıyla beslenerek sağlamaktadır. Metamorfozlarını tamamlamak için her gelişimsel evrede kanla beslenmenin yanı sıra yetişkin keneler ayrıca yumurta üretebilmek için de kanla beslenmeye ihtiyaç duymaktadırlar. Larva aşamasından nimf aşamasına geçişte gerek duydukları kanla beslenmeyi kemirgenler, yabani tavşanlar, yerde beslenen kuşlar ve diğer küçük memelilerden sağlayan keneler bu beslenme döneminde konaktan ayrılıp larvadan nimfe dönüşüp farklı konaklara geçebilecekleri gibi bu konaklar üzerindeyken de bu dönüşümü gerçekleştirebilmektedirler. Yetişkinliğe geçiş ve yumurta üretimi için gerekli olan besinlerin sağlığı kanla beslenmede ise koyun, sığır veya diğer büyük memelileri kullanılmaktadır (Şekil 2-1). Yaşam döngülerini tamamlamak için küçük ve büyük memelilerde gerçekleştirdikleri bu beslenmeler aracılığıyla virüsün horizontal yayılımını sağlamaktadırlar. İnfekte kenelerden memeli konağa virüsün geçmesi ve bu

viremili hayvanlardan beslenen naif kenelerin infekte olmasıyla horizontal yayılım sağlanmaktadır. İnfekte kenelerin beslendikleri her omurgalı hayvan KKKAV ile viremi geçirmemesine rağmen aynı konakta yakın mesafede beslenen kenelere infekte kenelerin tükürük salgıları aracılığıyla da yayılım gerçekleşmektedir. Yetişkin kenelerden yeni oluşan binlerce yumurtaya transovaryal yolla virüs geçişi ile büyük bir infekte kene popülasyonu oluşmaktadır [4, 28].

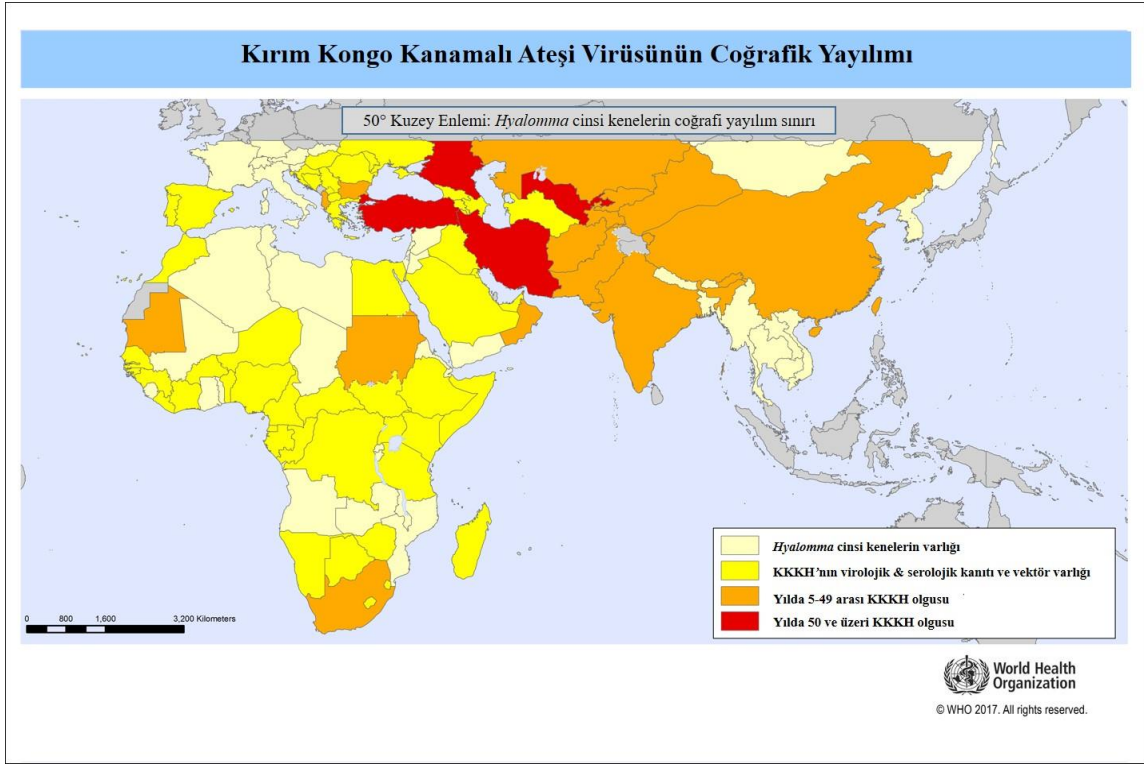


Şekil 2-1: *Hyalomma* cinsi kenelerde yaşam döngüsü.

Kene yaşam döngüsündeki aşamalar mavi oklarla, keneler ve memeliler arasında virüs geçişinin gerçekleştiği aşamalar kırmızı oklarla, keneler arası virüs geçişi ise kesik kırmızı çizgilerle gösterilmiştir. Bente ve ark. (2013)'den alınmıştır.

KKKAV'nin Avrupa, Orta Doğu, Orta Asya, Çin ve Sahraaltı Afrika'da bulunan 30'dan fazla ülkede infeksiyonlara sebep olduğunun serolojik olarak gösterilmesi, bu virüsün hem vektörü hem de doğada en önemli rezervuarı olan *Hyalomma* cinsi kenelerin geniş coğrafi yayılımı nedeniyledir (Şekil 2-2) [5]. Sıcak yazlar ve hafif geçen kışlar, bitki örtüsü bölünmüş araziler *Hyalomma* cinsi keneler için uygun yaşam alanları olup yüksek riskle ilişkili bulunmuştur [29]. Oldukça yaygın bir coğrafyada varlığını sürdüren kenelerin, yağış oranında düşüşler, yıllık sıcaklık oranlarındaki artış gibi iklim değişimleri ve tarım arazisi elde etme amacıyla ormanların azaltılması, uygun olmayan tarım aktiviteleri nedeniyle çalılık alanlarda artış, bir bölgede belirli süreyle avlanma aktivitesinde azalma gibi insana bağlı sebepler ile yıl boyunca aktif oldukları dönemde

popülasyonlarında artışlar gerçekleşmektedir [2, 29]. Her ne kadar KKKAV ile enfeksiyona karşı refraktör olsalar da infekte keneleri taşıyan göçmen kuşların da bu geniş coğrafi yayılıma katkıları oldukları düşünülmektedir [14].



Şekil 2-2: *Hyalomma* cinsi kenelerin ve KKKAV'nin coğrafi yayılımı.

WHO'nun 2017 yılında yayınladığı bu haritada *Hyalomma* cinsi kenelerin coğrafi yayılımı, sadece KKKAV'nin virolojik ve serolojik olarak kanıtlanırlığı veya farklı sayıda olguların gözlemlendiği ülkeler gösterilmiştir. https://www.who.int/csr/disease/crimean_congoHF/Global_CCHFRisk_2017.jpg?ua=1 uzantısı ile WHO'nun web sitesinden alınmıştır.

2.1.3. Bulaş Yolları

İnsan, KKKAV enfeksiyonu sonucunda kanamalı ateşli hastalık geçirdiği bilinen tek canlı olmasına rağmen virüsün yaşam döngüsünde tesadüfi konaktır. İnsanlar, kene ısırığı veya infekte kenenin çıplak deri yüzeyinde ezilmesi yoluyla infekte olabildikleri gibi viremili hayvanların kanı veya dokusuyla temas, pastörize edilmemiş süt tüketimi gibi perkutanöz veya permukozal yollarla da infekte olabilmektedir. Tam olarak kanıtlanmamış olsa da aerosol bulaşı ve anneden çocuğa perinatal veya intrauterin bulaşı işaret eden vakalar da bulunmaktadır [6-8].

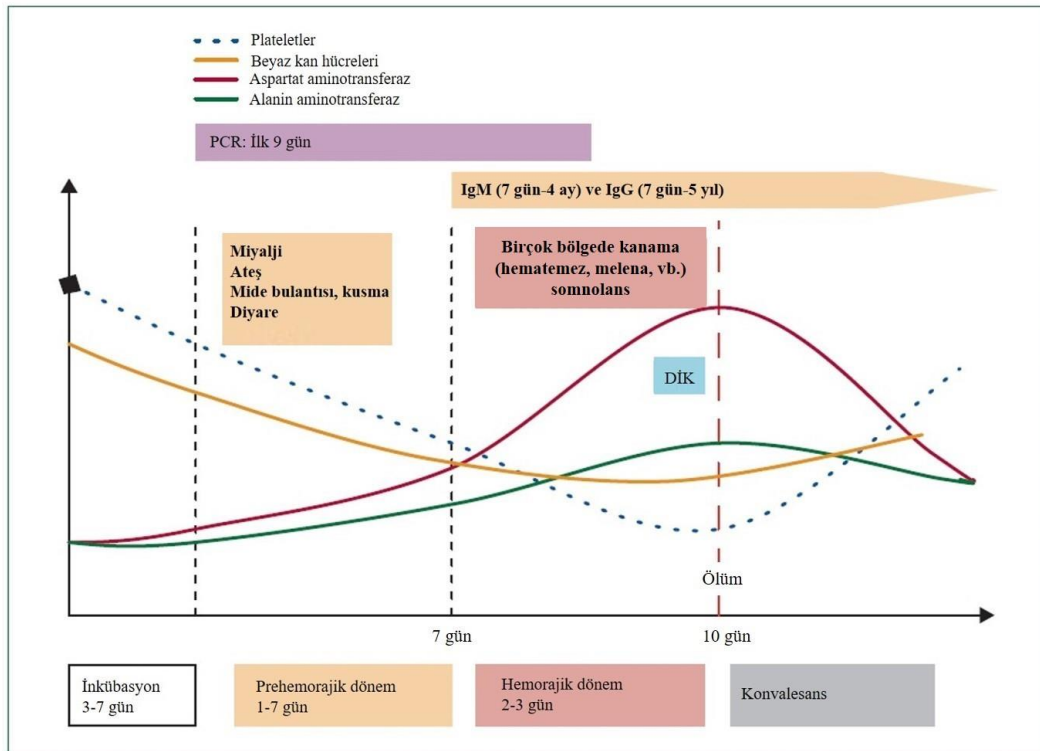
İnsanların KKKAV ile infekte olma oranlarına bakıldığında mesleki maruziyet en büyük risk faktörleri arasında gösterilmektedir. Çobanlık, çiftçilik, veterinerlik, mezhaba çalışanı olmak KKKAV taşıyan kenelerin konakçısı olan küçük ve büyük memeli hayvanlarla teması artırırken aynı zamanda kene ısırığı sonucu KKKAV viremisini geçiren bu hayvanların kanlarıyla temas riski de artmaktadır. Mesleki maruziyetin dışında insanlar genellikle normal yaşam alanlarının dışında bulunduklarında da virüsle infekte olabilmektedirler. Doğa yürüyüşleri ve kamp yapmak kenelerin yaygın olduğu bölgelerde bulunma ihtimalini arttırmaktadır. Tüm bunların yanı sıra 2. Dünya Savaşı sırasında Kırım'da görevli 200'e yakın askerin infekte olduğu, 2002 yılında ise Türkiye'de görülen salgında olduğu gibi daha önce terör veya savaş nedeniyle uzun süre tarım ve hayvancılığın yapılmadığı alanlarda insan aktivitesinin artması infekte kenelerle temas riskini arttıran sebeplerdendir [5, 29].

Her ne kadar direkt kene ısırığı veya infekte hayvanlar aracılığıyla virüsün insanlara geçişi en temel bulaş yolları olsa da insvean insana yayılım da oldukça önem taşımaktadır. KKKAV ile enfeksiyonların kısmen hafif atlatılması ve ciddi seyirli enfeksiyonlarda hastalığın erken dönemlerinde ateş, miyalji, bulantı, kusma gibi grip benzeri semptomlar göstermesi virüsün hem aile içinde hasta ile ilgilenen bireylere hem de birinci basamak sağlık çalışanlarına geçişine neden olmaktadır. Gerekli kişisel koruyucu önlemlerin alınmadığı durumlarda temel tıbbi prosedürler de sağlık çalışanlarının infekte olmasına neden olabilmektedir. Ancak Türkiye'de olduğu gibi hastalığın tanınması ve özellikle endemik bölgelerde gerekli önlemlerin alınması nozokomiyal enfeksiyon insidansında azalmayı sağlamıştır [30].

Virüsün endemik olduğu ülkelerin dışında diğer bölgelerde de vektörün bulunması [9], daha önce sadece kenelerin toplanarak viral RNA varlığının veya hayvanlarda seropozitifliğin gösterildiği ülkelerde KKKA vakalarının gözlenmesi [10] veya endemik bölgelerde bulunup kendi ülkelerine dönen hastaların virüsü endemik olmayan ülkelere taşıması [11, 12] bu virüsün önemini göstermektedir. WHO'nun ve CDC'nin bu virüsü potansiyel biyoterör ajanı olarak bildirmesi de virüsün önemine katkı sağlamıştır [13].

2.1.4. Klinik Seyir ve Patogenez

Birçok küçük veya büyük memeli hayvvea viremilere bağlı seropozitiflik bildirilmiş olsa da bunun klinik bir hastalığa dönüştüğüne dair bir veri bulunmamaktadır [2, 5]. İnsanların ise virüs yaşam döngüsünde rastlantısal konak olduğu, bunun yerine virüsün kene vektörü ve hayvan konaklarıyla birlikte evrim geçirdiği bildirilmiştir [31]. KKKAV ile infekte beş kişiden sadece birinin klinik hastalık geliştirdiği belirtilse de hastalığın geliştiği bu kişilerde infeksiyon ağır hemorajilerle seyredip %5-30 arasında değişen oranlarda mortalite ile sonuçlanabilmektedir [1, 2]. Bu bilgiler doğrultusunda, virüsle infeksiyonu takiben insanlarda gelişen hastalığın süresinde ve şiddetinde farklılıklar olmakla beraber esas olarak dört belirgin aşamada ilerlediği bildirilmiştir: Bunlar; inkübasyon, prehemorajik, hemorajik ve konvalesans dönemdir (Şekil 2-3) [2, 5, 14].



Şekil 2-3: KKKAV'nin klinik seyri ve ilişkili laboratuvar bulguları.

KKKAH'de inkübasyon, prehemorajik, hemorajik ve konvalesans dönemlerinin belirgin klinik ve laboratuvar bulguları, ortalama süreleri, IgM, IgG ve PCR pozitifliğin süreleri gösterilmiştir. Ergonul (2006)' dan alınmıştır.

İnkübasyon dönemi:

İnkübasyon dönemi, bulaş kene ısırığıyla gerçekleştiyse 1-3 gün kadar kısa olabilirken bu süre temas yolu ve viral yük gibi birçok faktöre bağlı olarak 13 güne kadar uzayabilmektedir [32]. Güney Afrika'da infekte olmuş 21 hastanın verilerinden elde edilen sonuca göre eğer temas kene yoluyla gerçekleşmişse inkübasyon süresinin 3.2 gün olduğu, temas viremili çiftlik hayvanlarının kanı veya dokusu aracılığı ile olduğunda 5.0 gün, insan kanı aracılığıyla olduğu durumlarda ise 5.6 gün olduğu belirtilmiştir [5, 33]. Hastalığın bulaşması için 1-10 arası virüs yeterli olabilmektedir [6, 34].

Prehemorajik dönem:

İnkübasyon döneminin ardından hemen her hastada ani başlangıçlı ateş, kas ağrısı, baş ağrısı, kusma, baş dönmesi, fotofobi, bel ve karın ağrısı ile karakterize prehemorajik dönem başlamaktadır. 1-7 gün arası süren bu dönemde ateş genellikle yüksek seyretmekte (39-41°C) ve bu dönemde duygudurum değişiklikleri, şiddete eğilim gibi nöropsikiyatrik bulgular da gözlenebilmektedir. Yüz, boyun ve göğüste hiperemi gibi belirtiler deri ve mukoz membranların katılımını gösterirken; kardiyovasküler distrese dair belirtiler arasında ise bradikardi ve hipotansiyon bulunmaktadır [2, 5, 6].

Hemorajik dönem:

Hastalığın ağır seyrettiği vakalarda infeksiyonu takip eden 3-6 gün içerisinde bu dönem başlamaktadır. Genellikle üst vücut ve uzuvlarda, deri ve mukoz membranlarda peteşi veya büyük ekimozlar görülebilmektedir. Hastalığın şiddetine göre dış etlerinde kanama, epistaksis, hematemez, melena, hemoptiz, hematüri, menometroraji, serebral kanamalar gibi birçok organ sisteminde kanamalar gözlenebilmektedir. Hepatomegali ve splenomegali oldukça yaygın olarak izlenmektedir [2, 5].

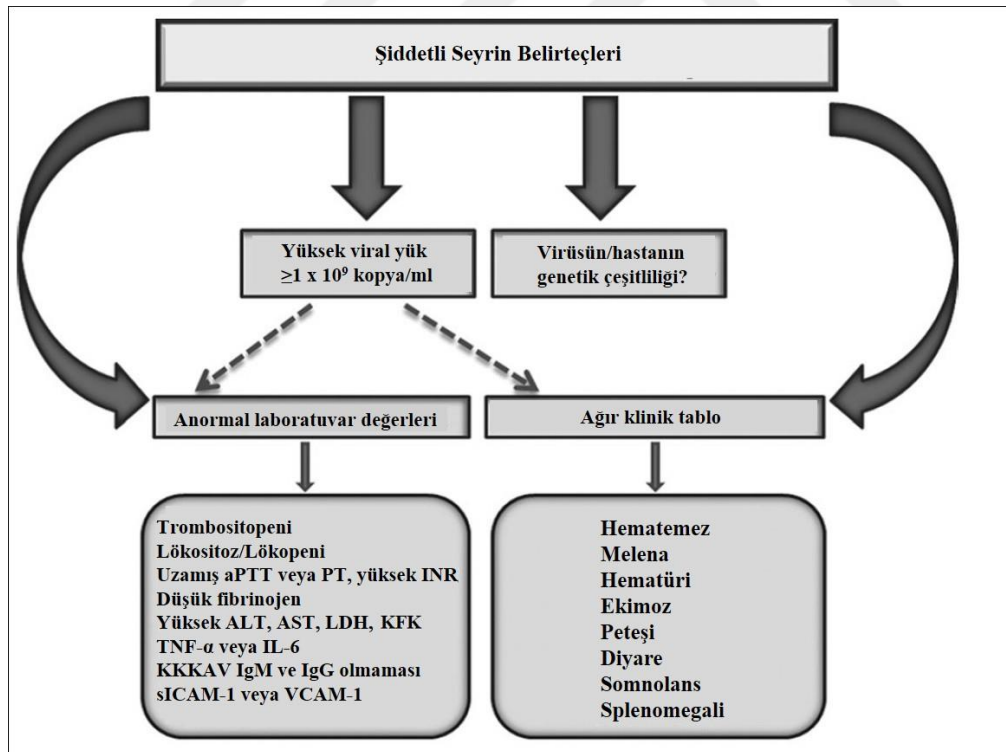
Hastalığa yenik düşen kişilerde infeksiyonu takip eden 5-14 gün arasında kanamalar, çoklu organ yetmezliği ve şoka bağlı ölüm gerçekleşmektedir. Yüksek viremi, trombositopeni, uzamış aktive parsiyal tromboplastin zamanı (aPTT), düşük fibrinojen, aspartat ve alanin aminotransferaz (AST/ALT), laktat dehidrojenaz (LDH), kreatin

fosfokinaz (KFK) seviyelerinde artış ölümle sonuçlanan vakalarda ölümcül olmayan vakalara kıyasla anlamlı orvea farklılık göstermektedir (Şekil 2-4) [28, 35].

Konvalesans dönemi:

Hastalığa yenik düşmeyenlerde infeksiyonun başlangıcından 15-20 gün sonra bu dönem başlamakta ve tamamen iyileşme bir yılı bulabilmektedir. Bu dönemde hemorajik dönemin şiddetine ve etkilediği bölgelere bağlı olarak devam eden halsizlik, düşük nabız, saç dökülmesi, iştahsızlık, bradikardi, nefes almakta güçlük, çift görme, işitme kaybı, hafıza kaybı, polinevrit görülebilmektedir [2, 5, 28, 33].

KKKAH'nin görüldüğü ülkelerin genellikle gelişmekte olan ülkeler olması ve laboratuvar imkanlarının kısıtlı olması, çalışmak için BSL 4 birimlerin gerekmesi ve uygun hayvan modelinin bulunmaması gibi nedenlerle hastalığın patogenezi ile ilgili bilgiler kısıtlıdır. Sahip olunan bilgilerin çoğunluğu hastaların kan değerlerindeki değişimlerden ve karaciğer biyopsilerinden alınan bilgilerden edinilmektedir.



Şekil 2-4: Ciddi seyirli KKKAH ile ilişkili klinik ve laboratuvar bulguları.

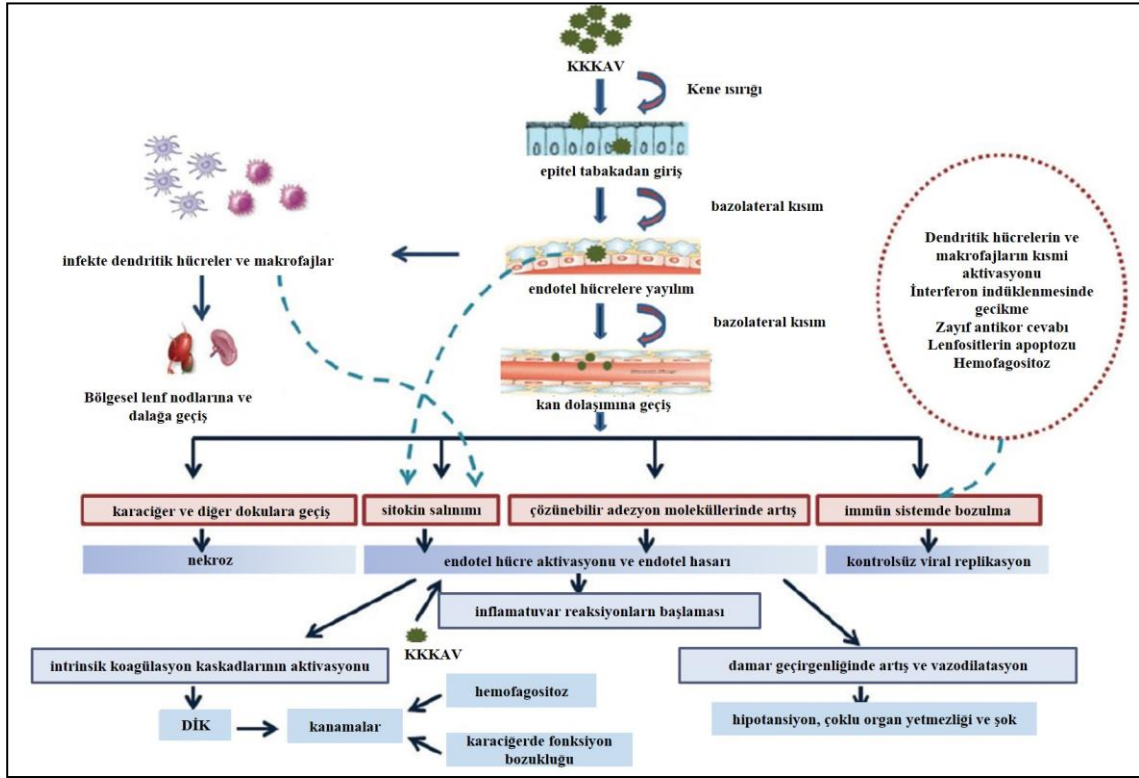
Hastalığın şiddetli seyri ile ilişkili bulunan laboratuvar ve klinik bulgular gösterilmiştir. Akıncı ve ark. (2013)'den alınmıştır. INR: Uluslararası normleştirilmiş oran, IgM: İmmüoglobulin M, IgG: İmmüoglobulin G, sICAM-1: salgısal interseleüler adezyon molekülü-1, VCAM-1: vasküler hücre adezyon molekülü-1.

Genel olarak kene ısırığı aracılığıyla vücudun koruyucu bariyerini aşan virüs bazolateral bölgeden endotel hücrelerine geçmektedir. Hem bu yolla virüsün kana ve takiben karaciğere geçmesi hem de lokal makrofajlar ve dendritik hücreleri infekte ederek bölgesel lenf nodlarına ve dalağa ulaşmasıyla virüsün sistemik yayılımı gerçekleşmektedir. Hemoraj ve artmış vasküler permeabilite, endotel hücrelerin virüsün temel hedeflerinden biri olduğunu göstermektedir. Virüsün endotel hücreleri hedef almasıyla hem inflamatuvar yanıt başlamakta hem de intrinsik koagülasyon kaskadları aktive olmaktadır. Koagülasyon kaskadının aktive olmasıyla platelet sayısında azalma veya fonksiyonunda bozulma meydana gelmektedir. Ayrıca disemine intravasküler koagülasyon (DİK) ve çoklu organ yetmezliğine yol açabilmektedir. İnflamatuvar yanıtın başlaması sonucunda artan sitokin yanıtı ile daha fazla endotel hücre hasarı ve sonucunda vasküler permeabilitede artış, vazodilatasyon ve şok meydana gelmektedir. Artan sitokin yanıtında özellikle interlökin-6 (IL-6), tümör nekroz faktör- α (TNF- α) seviyeleri hastalığın şiddeti ile ilişkilendirilmiştir. Dendritik hücrelerin ve makrofajların kısmi aktivasyonu, interferon yanıtında gecikme, zayıf antikor yanıtı, lenfositlerin apoptozu ve hemofagositoz gibi virüse bağlı etkiler bağışıklık sisteminin gerekli cevabı oluşturmamasına neden olmaktadır (Şekil 2-5) [3, 5, 23].

2.1.5. Tanı, Tedavi ve Korunma

Hastalığın erken tanısı hem hastanın tedavisinde hem de hastalığın yayılımının engellenmesinde oldukça önem taşımaktadır. Endemik bölgede yaşayan veya bu bölgelere seyahat geçmişi olan ya da riskli meslek grubunda olan kişilerde nonspesifik semptomlarla birlikte koagülasyon sorunlarını ve vasküler sızıntıyı düşündüren fiziksel bulgular da mevcutsa kanamalı ateşli hastalıktan şüphelenilmektedir. Laboratuvar bulgularının şüpheleri güçlendirdiği durumlarda spesifik tanının konması gerekmektedir [2, 5, 28]. Bu amaçla EİA ile virüse spesifik IgM veya IgG'ler belirlenebilmektedir ancak ciddi hastalık durumunda antikor yanıtı oldukça geç oluşmakta veya hiç oluşmamaktadır. Bu amaçla hastalığın erken safhasında güçlü bağışık yanıtı oluşturan KKKAV nükleoprotein rekombinant yollarla elde edilip yakalayıcı antijen olarak kullanıldığı EİA testleri geliştirilmiştir [3]. Serum örneğinden reverz transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile viral RNA belirlenebilmektedir. Ancak bu

yöntemde de her KKKAV suşunun belirlenemediği belirtilmiştir [28, 36]. Doğru tanının konulmasında ise iki yönteminde kullanılması tavsiye edilmektedir [3].



Şekil 2-5: KKKAV'nin patogenezi.

Kene ısırığı aracılığıyla vücuda giren virüsün doku ve organlarda yayılımı, bu yayılıma bağlı olarak gözlenen değişimler ve sonucunda gözlenen hasarlar gösterilmiştir. Akıncı ve ark. (2013)'ten alınmıştır.

KKKAH'nin tedavisi sıvı ve elektrolit dengesinin korunması, oksijen seviyesinin sabit tutulması için ventilasyon desteğinin sağlanması ve hafif sedasyonu içeren destekleyici terapidir [15]. Hastanın kan değerlerinin yakın takibi ile özellikle kanamaların gerçekleştiği ve koagülasyon bozukluklarının olduğu vakalarda trombosit, taze donmuş plazma, eritrosit preparasyonları verilebilmektedir [2]. Her ne kadar rveomize kontrollü çalışmalarla etkisinin kanıtlanması gerekse de özellikle enfeksiyonun erken safhalarında etkili olduğu gösterilen ribavirin WHO tarafından da KKKAH'nin tedavisindeki antiviral seçeneği olarak bildirilmektedir [6, 37, 38]. Virüs-ilişkili hemofagositik sendromu olan hastalarda metilprednizolonun ümit vadettiği belirtilmiş ve güncel tedavi rejimine eklenmiştir [15]. 1944-45 yıllarında Kırım'da gerçekleşen salgında, Bulgaristan'da, Güney Afrika'da ve Türkiye'de pasif

immünoterapi uygulanmış olsa da bu konuda da yeterli veri ve kontrollü çalışma bulunmamaktadır [28, 39, 40].

Özellikle hastane personelleri gibi doğrulanmış veya muhtemel KKKAV vakalarının kan veya vücut sekresyonlarıyla temasının olduğu durumlarda ribavirin kullanımı önerilmekte ve hastanın 14 gün boyunca vücut ısısının ve baş ağrısı, kas ağrısı gibi şikayetlerinin takip edilmesi gerekmektedir [6].

Endemik bölgelerde yaşayan insanların, tarım ve hayvancılık gibi riskli meslek gruplarında olan kişilerin, kene ile temastan korunmak amacıyla uygun kıyafetlerle çalışmaları ve kene popülasyonunun kontrol altında tutulması için akarisit kullanımı önerilmektedir. Benzer şekilde hastane çalışanlarının da uluslararası tedbirleri uygulamaları, eldiven, önlük, yüz koruyucusu ve gözlük gibi ekipmanları kullanmaları gerekmektedir [6]. Şüpheli veya doğrulanmış KKKAV vakalarının izolasyonu sağlık personellerinin korunmasında en önemli tedbirler arasında yer almaktadır [41].

Günümüzde henüz onaylanmış bir aşısı bulunmayan KKKAV'ye karşı kullanılan tek aşı yeni doğan fare beyninde pasajlanıp saflaştırılmış ve ardından inaktive edilmiş virüs temelli aşıdır. Sadece Bulgaristan'da kullanılan bu aşının güvenlikle ilgili endişelerden ötürü uluslararası sağlık otoriteleri tarafından kabul görmediği düşünülmektedir. Ülkemizde yeni doğan fare beyni yerine hücre kültürü temelli inaktif aşının interferon α/β reseptör (IFNAR) knock-out farelerde % 80 koruma sağladığı gösterilmiştir [2, 42]. Birçok ekip tarafından Modifiye Vaksinya Ankara (MVA), adenoviral vektörler, rekombinant proteinler, DNA aşılı, transjenik bitkiler gibi farklı metodlarla aşı geliştirme çalışmaları devam etmektedir [43-47]. Avrupa komisyonunun desteğiyle 14 ekibin KKKAV'ye karşı aşı geliştirmek için işbirliği yaptığı altı yıllık bir proje bulunmaktadır [48].

2.2. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsünün Yapısı, Genomu ve Proteinleri

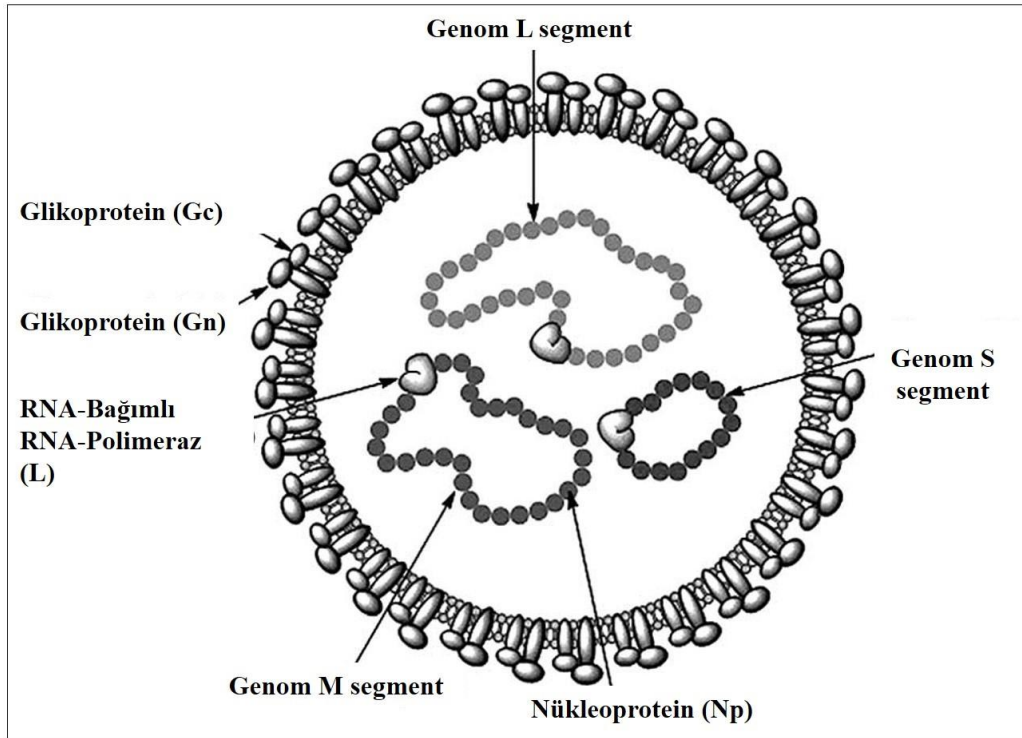
Segmentli, negatif polariteli RNA virüslerini kapsayan *Bunyaviridae* ailesi 350'den fazla virüs ve beş cins barındırmaktadır. Beş cinsten dördü olan *Hantavirus*, *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus* ve *Nairovirus* hayvanları infekte eden virüslerden oluşurken *Tospovirus* cinsi, bitkileri infekte eden virüslerden oluşmaktadır. Ayrıca yine bu dört cins yıkıcı etkileri olan kanamalı ateşlerden sorumlu, herhangi bir tedavi veya korunma yolu bulunmaması sebebiyle seviye 3 ve 4 patojenler olarak sınıflandırılan virüsleri barındırmaktadır. Hantavirüsler haricinde bu ailede bulunan virüsler genel

olarak sinekler ve keneler gibi eklem bacaklı vektörlerle taşınan artropod-kaynaklı virüslerdir. Bu ailede bulunan birçok virüs yeni konakları ve değişen coğrafi yayılımları ile dikkatleri çekmektedir [49].

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü *Bunyaviridae* ailesindeki beş cinsten biri olan ve diğer cinslerden yaklaşık % 60 daha büyük L segmentiyle ayrılan *Nairovirus* cinsinde yer almaktadır [16]. *Nairovirus* cinsi 34 tanımlı virüs barındırmaktadır ve bu virüsler yedi serogrupta toplanmıştır. KKKAV grubunda KKKAV ile beraber Hazara virüs (HAZV) bulunmaktadır [5]. 80-105 nm çapında, yuvarlağa yakın şekilli, konak hücreden kaynaklanan lipid bilayer ile çevrili olan bu virüs ailenin diğer üyelerinde olduğu gibi üç parçalı genomu ve kene aracılı taşınma ve yayılımı ile karakterizedir (Şekil 2-6) [17].

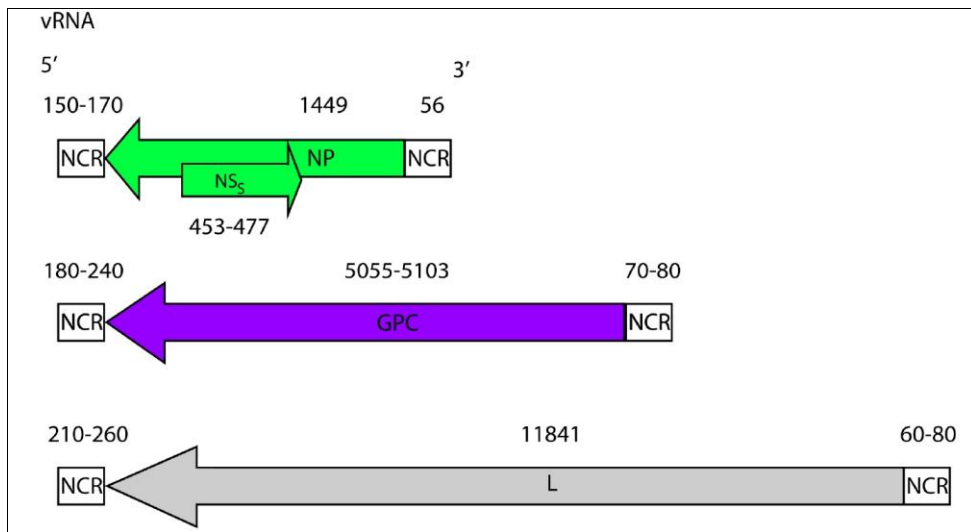
Büyük (Large-L; ~ 12.1 kb) segment, orta (Medium-M; ~ 5.4 kb) segment ve küçük (Small-S; ~ 1.6 kb) segmenti üç açık okuma çerçevesi (open reading frame-ORF) barındırmakta ve bu segmentlerin ORF'lerinden sırasıyla RNA-bağımlı RNA polimeraz (RdRp), glikoproteinler Gn ve Gc, nükleoprotein (NP) olmak üzere dört yapısal protein üretilmektedir. M segment ORF'sinden elde edilen glikoprotein prekürsörünün posttranslasyonel kesimleri sonucunda Gn ve Gc ile beraber GP38, GP85/160, mün benzeri domain ve NSm olmak dört yapısal olmayan protein oluşmaktadır.

Ayrıca S segmentte NP geninin zıt oryantasyonundan yapısal olmayan NSs proteini kodlanmaktadır (Şekil 2-7). Üç segmentin de kodlanmayan bölgelerinde (Noncoding Region-NCR) dokuz terminal nükleotid (5'-UCUCAAAGA ve 3'-AGAGUUUCU) Nairovirüsler arasında korunmuş sekanslardır ve bu komplementer sekansların eşleşmesi ile yine cinse özgü panhvele yapısı oluşmaktadır. NCR'lar arasındaki bu etkileşim nedeniyle RNA segmentleri infekte hücre ve virionlar içerisinde sirküler halde görülmektedir [1, 5, 28, 50]. Bu NCR'ların ayrıca genomun enkapsidasyonu, transkripsiyonu ve replikasyonunda rolleri bulunmaktadır [1, 17, 28]. KKKAV genomunun NP ile sarmalanmasıyla S, M ve L ribonükleoproteinleri (RNP) oluşmaktadır. KKKAV partikülünün içerisinde 9-10 nm uzunluğunda tübüler fragmanlar şeklinde görünen yapıların bu RNP'ler olduğu düşünülmektedir [50]. İnfektif virüsün oluşması için üç segmentten en az birer tane virüs partikülü içerisinde bulunması gerekmektedir ancak segmentlerin bir virion içerisindeki sayısının rastgele olduğu düşünülmektedir [5].



Şekil 2-6: KKKAV'nin yapısı.

KKKAV'nin yüzeyinde Gn ve Gc glikoproteinleri, segmentli genomu, segmentlerin yapısında bulunan RdRp ve NP'ler gösterilmiştir. Aslam ve ark. (2015)'ten alınmıştır.



Şekil 2-7: KKKAV'nin segmentleri ve bu segmentlerden kodlanan proteinleri.

KKKAV'nin segmentleri, segmentlerden oluşan bazı proteinleri, segmentlerin ve NCR bölgelerinin uzunlukları gösterilmiştir. Zivcec ve ark. (2019)'dan alınmıştır.

KKKAV'de hedef hücreye giriş mekanizması tam olarak aydınlatılmış olmasa da Gn ve Gc spesifik monoklonal antikorlardan Gc spesifik olanların virüsü nötralize ettiğinin gösterildiği bir çalışma Gc'nin hücreye girişteki rolünü göstermektedir. Ayrıca hücreye girişin klatrin–aracılı endositoz yoluyla gerçekleştiği, pH ve kolesterol bağımlı olduğu ve Gc-nükleolin interaksiyonunun önemli olduğu bilinmektedir [1, 28, 51-53]. Hücre içine giriş ve füzyonu takiben sitoplazmaya salınan RNP komplekslerinden genomik ve antijenomik RNA'ların sentezi, L ve NP proteinlerinin varlığını gerektirmektedir. Genomik RNP'ler mRNA ve antijenomik RNP oluşturulmasında kalıp olarak kullanılmakta ve L proteiniyle sentezlenen komplementer RNA'ya NP altbirimlerinin de eklenmesiyle oluşan antijenomik RNP de genomik RNP'lerin üretilmesinde kalıp olarak kullanılmaktadır. Golgi kompleksinde viral komponentlerin birleşmesini takiben virüs ekzositoz yoluyla polarize epitel hücrelerinin bazolateral membranından serbestlenmektedir (Şekil 2-8).

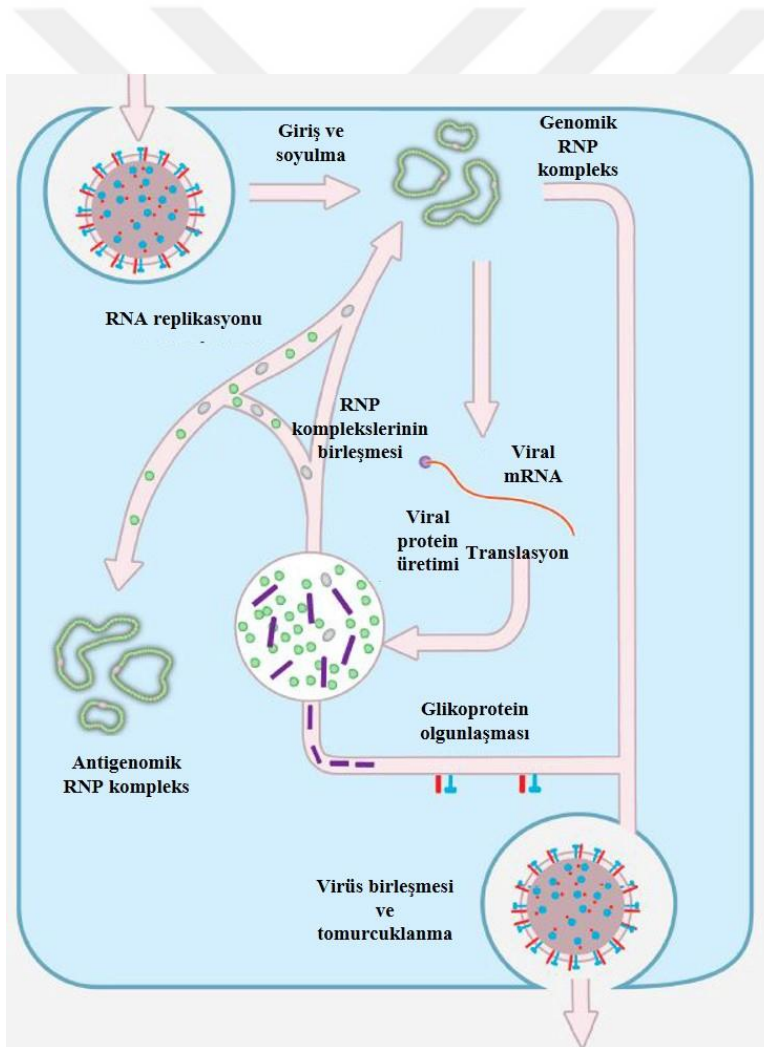
2.2.1. KKKAV'nin Yapısal Proteinleri

2.2.1.1. Nükleoprotein

S segmentten kodlanan NP viral partikülde fazla miktarda bulunan ve virüs biyolojisinin birçok aşamasında rol almasıyla KKKAV için vazgeçilmez olan bir proteindir [54]. Yaklaşık 54 kDa olan bu proteinin, kristal yapısı ve bu yapıların proteinin biyolojik rolleriyle ilişkisinin araştırıldığı çalışmalarda dışarıya doğru uzanmış sap kısmı ve globüler baş kısmından oluşan kompakt bir yapıya sahip olduğu gösterilmiştir (Şekil 2-9). KKKAV gen ekspresyonundaki önemli rolü düşünüldüğünde molekülün dışında bulunan bu globüler domainin pozitif yüklü yüzeylerinin RNA bağlanmasında rolü olduğu düşünülmektedir [54, 55]. Proteinin sap kısmının esnek yapıda olması proteinin oligomerizasyon özelliğini kazandırmakta ve serbest monomer formları RdRp ile etkileşime geçmeyi sağlamakta olup bu iki interaksiyon proteinin en önemli fonksiyonu olan RNP komplekslerinin oluşmasını sağlamaktadır [56].

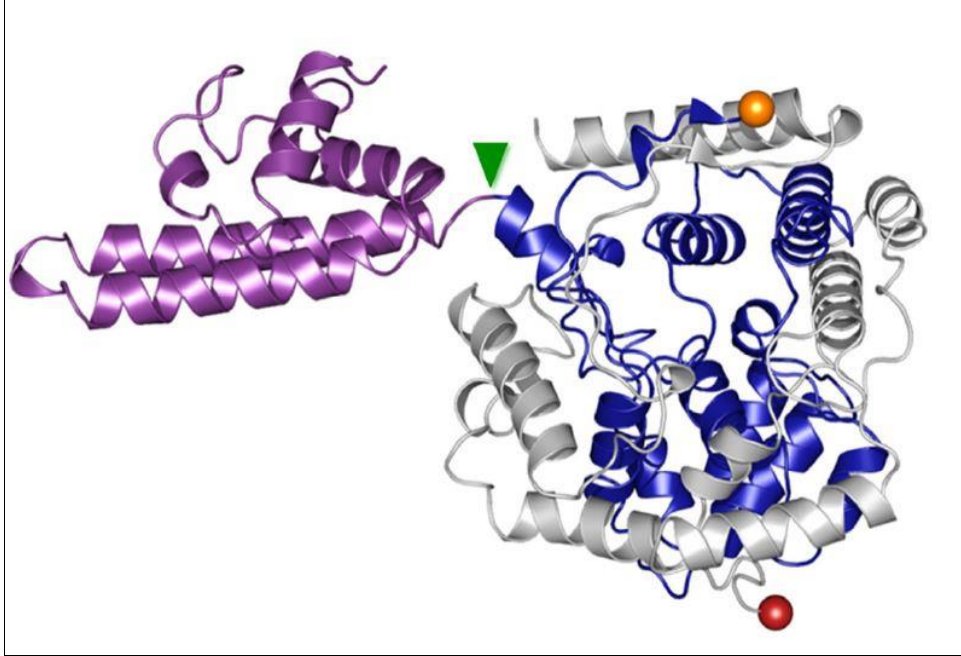
Ayrıca serbest monomer formlarının bu fonksiyona ek olarak vRNA'lara bağlanıp bunların degradasyondan korunmasında rolü olduğu düşünülmektedir [54]. Proteinin yapısında bulunan sap kısmının pozitif yüklü yüzeyinin ise genomun gruba özgü panhvele yapısına bağlılığı, baş kısmındaki benzer bölgelerin ise tek iplikli RNA'lara bağlılığı gösterilmiştir [56].

RNP komplekslerinin oluşması, viral paketlenme, transkripsiyon ve replikasyondaki rollerinin yanı sıra NP, virüsün bağışıklık sisteminin elemanlarından kaçışında görev alabildiği gibi bu elemanların aynı zamanda hedefi olduğu gösterilmiştir. NP'nin immünojenitesi oldukça yüksektir ve B ve T hücrelerinin en temel hedefidir [1]. Her ne kadar suşa bağımlı olsa da NP'nin tip 1 interferon cevabını baskıladığı gösterilmiştir [57]. Bax aracılı apoptoz aktivasyonunu baskıladığı [58], barındırdığı DEVD motifi aracılığıyla kaspaz-3 ile kesilerek apoptozu indükleyebildiği [54, 59] veya aynı motif aracılığıyla kesilen monomer formdaki NP'ler aracılığıyla kaspaz-3 enzimini meşgul ederek apoptozun indüklenmesini geciktirebildiği gösterilmiştir [1].



Şekil 2-8: KKKAV'nin konak hücreye girişi, çoğalması ve çıkışı.

Endositoz yoluyla virüsün hücreye girişini takiben RNP komplekslerinin, viral proteinlerin ve yeni virüs partiküllerinin oluşumu ve ekzositoz yoluyla hücreden çıkışı gösterilmiştir. Zivcec ve ark. (2016)'dan alınmıştır.



Şekil 2-9: KKKAV nükleoproteininin yapısı.

Proteinin N-terminal kısmı gri, sap kısmı mor, C-terminal kısmı ise mavi ile gösterilmiştir. Carter ve ark. (2012)'den alınmıştır.

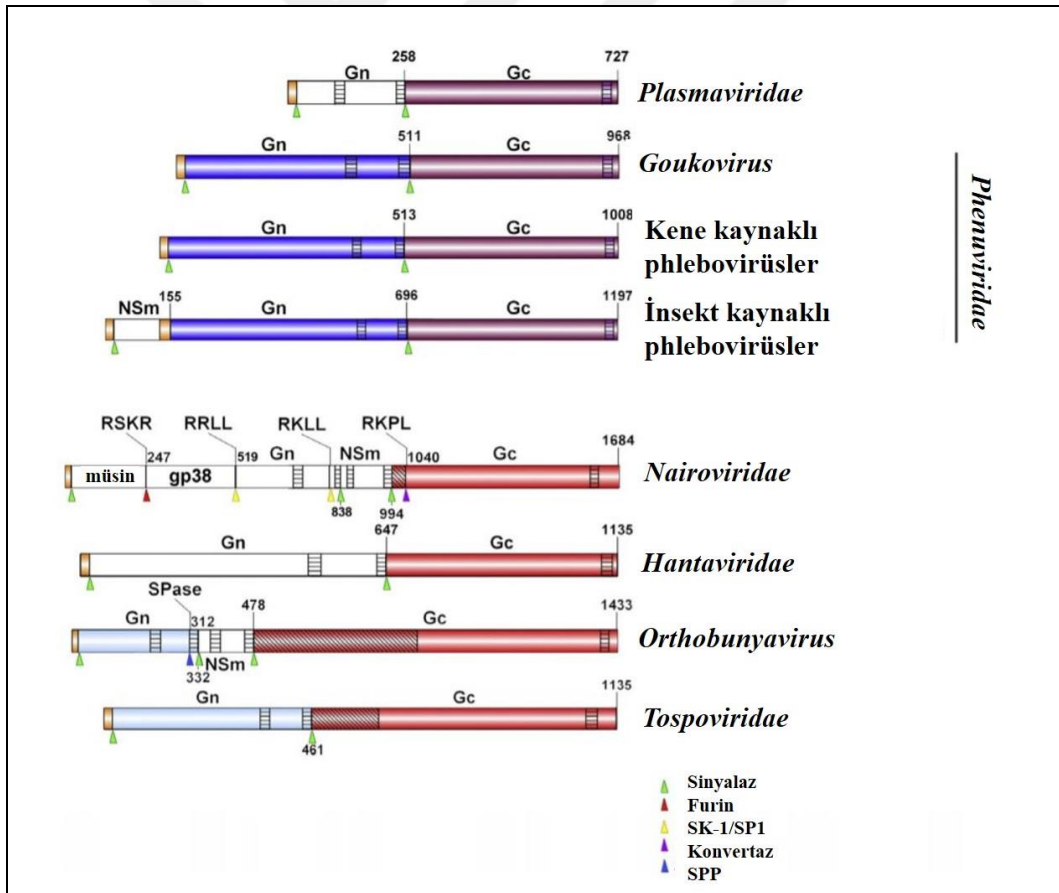
2.2.1.2. Glikoproteinler

Bunyaviridae ailesinin tamamında M segmentten viral partikülün tomurcuklanmasını ve hedef hücrelere girmesini sağlayacak bir poliprotein prekürsörü kodlanmaktadır (Şekil 2-10). KKKAV'de M segment kaynaklı mRNA'nın translasyonu endoplazmik retikulum ile asosiye ribozomlarda gerçekleşmektedir. Yaklaşık 225 kDa boyutundaki bu poliprotein altı hidrofobik bölge içermektedir. Bu hidrofobik bölgeler transmembran heliksi, sekresyon sinyali, membran bağlayıcı olabilmektedirler. Bu hidrofobik bölgeler aracılığıyla poliprotein üç ekstrasitozolik, iki adet de sitoplazmik ilmek barındıran bir membran topolojisi göstermektedir.

Yaklaşık 225 kDa boyutundaki bu prekürsör endoplazmik retikulum membranında sinyal peptidazlarla kesime uğramaktadır. Bu kesim sonucunda 140 kDa PreGn ve 85 kDa PreGc açığa çıkmaktadır. PreGn ve PreGc'nin subtilisin kexine isoenzyme-1 / site-1- protease (SKI-1/S1P) ile kesilmeleri sonucu olgun Gn ve Gc'nin N – terminalleri oluşmakta olup Gn'nin N-terminalinden 85 kDa boyutunda musin-

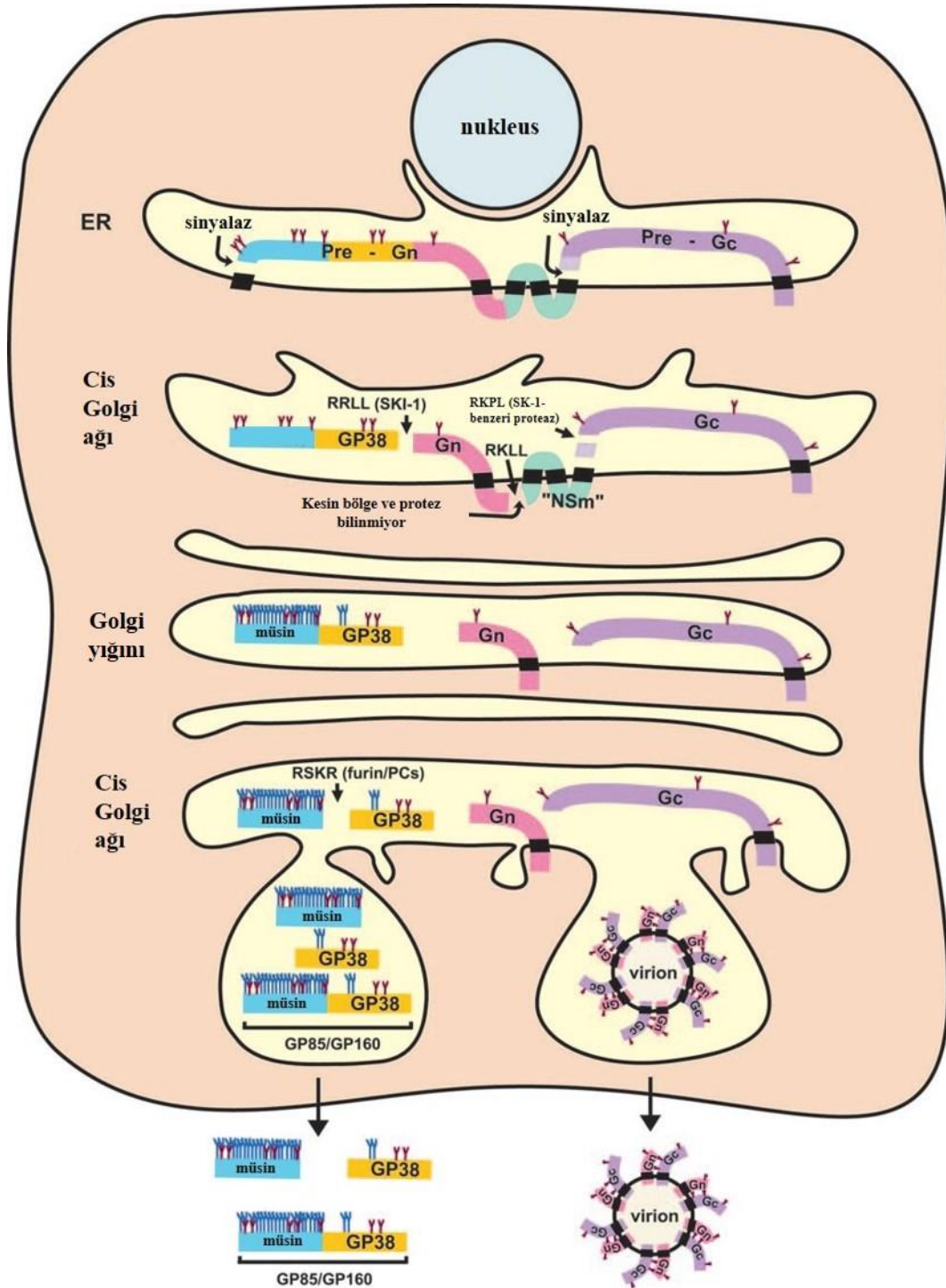
GP38, bu proteinin dimerize olmasıyla 160 kDa boyutunda GP160, musin-GP38'in fűrın aracılı kesimiyle henüz herhangi bir çalışmada gşsterilmiş olmasa da musin benzeri domain (mucin like domain-MLD) ve 38 kDa boyutunda GP38 açığa çıkmaktadır (şekil 10) [60, 61].

Bu poliprotein kesilimleri sonucu serbestlenen Gn/Gc, disulfit bağlarıyla tutunmuş heterodimer oluşturmakta ve bu heterodimer Golgi cisimciğine gitmektedir. Gn (37 kDa)/Gc (75 kDa) heterodimerleri Golgi cisimciğinde daha bşyşk protein kompleksleri oluşturmakta ve bu kompleks aracılığıyla hşcre membranında oluşan kavislenme sonucunda virşs partikşlşnşn hşcreden tomurcuklanarak ayrılması sağlanmaktadır. Bu proteinler viral yşzeyin dışına doğru 5-10 nm uzunluğunda çıkıntılar olarak gşzlenmektedirler [49, 60, 62].



şekil 2-10: *Bunyaviridae* ailesinde M segmentten kodlanan poliproteinler ve hşresel proteazlarla kesilmeleri.

Bunyaviridae ailesindeki virşslerde M segmentten kodlanan poliproteinlerin boyutu, posttranslasyonal kesilimi gerçekleştiren bazı enzimler ve bu kesilimler sonucunda serbestlenen proteinler gşsterilmiştir. Guardado ve ark. (2017)'den alınmıştır.



Şekil 2-11: KKKAV'de M segmentten kodlanan poliprotein prekürsörünün kesilimi.

Endoplazmik retikulum ile asosye ribozomlarda translasyonu takiben poliprotein Golgi kompleksinde posttranslasyonel kesilim sinyalleri ve enzimleri, serbestlenen yapısal ve yapısal olmayan proteinler Sanchez ve ark. (2006)'dan alınmıştır.

KKKAV glikoproteinleri yüksek orvea sistein rezidüleri ve MLD barındırmaları, Gn'nin N-terminalinin serin, treonin ve prolince zengin olması gibi özellikler barındırmaktadır [51].

Proteinlerin katlanması, şaperonlarla ilişkileri, hücrel lokalizasyon gibi önemli fonksiyonlar kazveıran glikozilasyon, nairovirüs M polipeptidinde özellikle N terminal kısımda yoğun olarak gözlenmekte olup KKKAV suşları arasında sadece Gn'deki bir glikozilasyonun korunmuş olduğu gösterilmiştir. Bu glikozilasyonun Gn'nin olgunlaşması, doğru lokalizasyonu ve hem kendisinin hem de Gc ve diğır glikoproteinlerin doğru transportu için zorunlu olduğu gösterilmiştir [63].

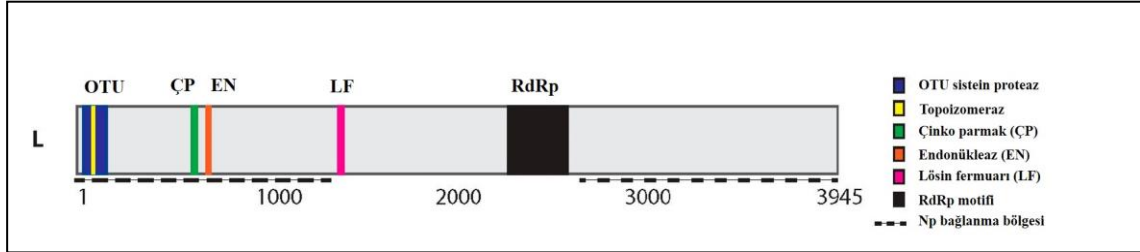
Ayrıca Gn'nin C-terminalinde bulunan yine suşlar arasında korunmuş olan zinc-finger domaininin virüs birleşmesi ve tomurcuklanmasını sağlayacak Gn-RNP interaksıyonundan sorumlu olduğu düşünülmektedir [17]. Gc'nin ise endoplazmik retikulum sinyali taşıdığı bildirilmiştir [51, 64]. Buna ek olarak Golgi cisimciğine transportun Gn'de bulunan sinyal aracılığıyla gerçekleştiğı ve Gn-Gc interaksıyonu sayesinde Gc'nin Golgi cisimciğine transportunun sağlveığı gösterilmiştir (Şekil 2-11) [17, 51].

2.2.1.3. RNA-Bağımlı RNA Polimeraz

Tüm bunyavirüslerde yaklaşık 12 kb olan L segmentten bu segmentin tek ürünü olan RdRp kodlanmaktadır. Kodlanan yaklaşık 450 kDa boyutundaki bu protein diğır bunyavirüslere kıyasla yaklaşık iki kat daha büyüktür (Şekil 2-12). Her ne kadar bunyavirüsler arasında L proteinin boyutu farklılıklar gösterse de hepsinde ortak ve korunmuş olan farklı fonksiyon bölgeleri tanımlanmıştır. Bu fonksiyonlardan biri olan RdRp nairovirüs L proteininin sadece üçte birini oluşturmaktadır. RdRp'nin C terminal kısmı her ne kadar cinsler arasında korunmuş olsa da fonksiyonu bilinmemektedir.

Bu proteinin N terminal kısmında ise nairovirüslerde birçok domain bulunmakta olup bu domainlerden en fazla çalışılan ovarian tümör (OTU) benzeri proteaz domainidir [65, 66]. KKKAV'de de gösterildiğı gibi bu OTU domaini hem otoproteolitik aktivite ile RdRp'nin serbestlenmesini sağlayabilirken [65] hem de übikütin ile konak hücre proteinlerini bağlayan peptit bağlarını kesen deübikütinasyon enzimi görevi görmektedir. Bunun yanı sıra interferonla uyarılmış gen 15 proteini (interferon stimulated gene 15 - ISG 15) gibi übikütin benzeri diğır proteinlerin yaptığı peptit bağlarını da kesebilmektedir [67]. Bu domainin proteaz fonksiyonunun yanı sıra

topoizomerez benzeri motifler içermesi L proteininin RNA ipliklerinin manipülasyonlarına dair rolü olabileceğini göstermektedir [17, 49].



Şekil 2-12: KKKAV L proteini ve domainleri.

L proteininin yapısında bulunan farklı fonksiyonlar ile ilişkili domainlerinin protein üzerindeki lokalizasyonları gösterilmiştir. Zivcec ver ark. (2016)'dan alınmıştır.

L proteinin barındırdığı bir diğer fonksiyon ise endonükleaz aktivitesidir. Bu endonükleaz aktivitesi sonucunda vRNA'ların 5' uçları monofosforile olmakta ve bu sayede diğer bunyavirüslerdeki gibi 5' ucunda trifosfat taşımamaktadır. Birçok RNA virüsünde bu trifosfat uçlar retinoik asitle indüklenebilir gen 1 (retinoic acid-inducible gene 1 – RIG-I)'in hedefi olup hücrede antiviral cevabın başlamasını tetiklerken KKKAV L proteininin bu endonükleaz aktivitesi RIG-I tarafından tanınmayı engelleyerek bağışık yanıtı kaçmayı sağlayabileceği düşünülmektedir [1].

2.2.2. KKKAV'nin Yapısal Olmayan Proteinleri

Viral yapısal olmayan proteinler virüs tarafından kodlanan ancak virionun yapısına katılmayan proteinlerdir. Bu proteinler hem patogenezdaki rolleri hem de vektör/konak bağışıklık sistemiyle olan etkileşimleri nedeniyle dikkati çekmektedirler [18]. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü'nde *Bunyaviridae* ailesinin diğer birçok üyesinde de olduğu gibi yapısal olmayan proteinlerin olduğu belirlenmiştir. Bu yapısal olmayan proteinlerden biri S segmentten ambisens okunma sonucu eksprese edilen NSs, diğeri ise M segmentten oluşan poliprotein prekürsörünün posttranslasyonel kesilimleri sonucunda ortaya çıkan NSm'dir.

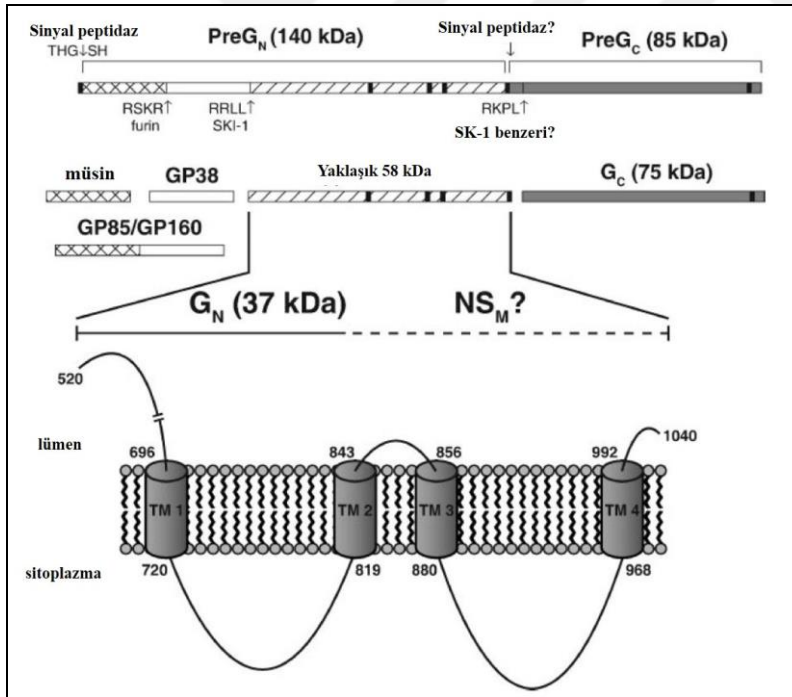
2.2.2.1. S Segment Kökenli Yapısal Olmayan Protein (NSs)

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü NSs'i ile ilgili ilk bilgi virüsün GenBank'a bildirilen S segmentlerinin analiz edildiği bir çalışmada geçmekte olup bu çalışmada S

2-13). Üç farklı hücre hattında NSs'in eksprese edildiği bu çalışmada NSs'in kaspaz 3/7 aktivasyonunu ve PARP (Poli-ADP-riboz polimeraz) kesimini indüklediği belirlenmiştir. NSs'in mitokondriyada lokalizasyonunun da gösterildiği çalışmada 127 ve 135. pozisyonlardaki lösinlerin bu fonksiyonlarda rolü olduğu gösterilmiştir [69].

2.2.2.2. M Segment Kökenli Yapısal Olmayan Protein (NSm)

Bunyaviridae ailesinde, phlebovirüslerde Gn'nin N terminalinden, tospovirüslerde M segmentten ambisens okunma sonucu farklı bir açık okuma çerçevesinden yapısal olmayan proteinler oluşmakla beraber Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü'nde de olduğu gibi M segmentten kodlanan poliproteinde Gn'nin C terminal ve Gc'nin N terminal kesilim bölgeleri arasında iki veya üç transmembran domaine sahip bir bölgenin açığa çıktığı ve bu bölgeden M segment kökenli bir yapısal olmayan proteinin oluştuğu orthobunyavirüslerde de gösterilmiştir [70-72].



Şekil 2-14: KKKAV'de NSm'in tahmin edilen lokasyonu.

KKKAV'de Gn'nin N terminali ve Gc'nin C terminali arasında kalan bölgede NSm'in tahmini lokasyonu gösterilmiştir. Altamura ve ark. (2007)'den alınmıştır.

KKKAV'de NSm'in varlığını ilk olarak Gn ve Gc'nin N ve C terminal kesim bölgelerini belirlemeyi hedefleyen çalışmalar düşündürmüştür. Bu çalışmalarda Gn'in

37 kDa, Gc'nin ise 75 kDa boyutunda olması sonucu bu iki protein arasında kalan bölgenin boyutu ve bu bölgede bulunan transmembran domainlerde kesilim sinyali sekanslarını bulunması NSm'in varlığına dair ipuçlarını oluşturmaktadır [17, 61, 73, 74]. 2007 yılında yapılan bir çalışmada Gc'nin tahmin edilen N-terminaline kadar uzanan farklı boyutlarda PreGn konstraktlarının kesilimi analiz edilmiş, 37 kDa boyutunda Gn'nin oluşumu etkilenmeden yaklaşık 14 kDa boyutunda farklı bir proteinin açığa çıktığı ve bu proteinin lumenal ilmeğin tamamını, üçüncü transmembran domaini ve ikinci sitoplazmik ilmeğin tamamını içeren NSm olduğu belirtilmiştir (Şekil 2-14). Çalışmada NSm'in varlığı hem farklı sekans uzunluklarında PreGn konstraktlarıyla transfekte edilmiş hücrelerde hem de KKKAV infekte hücrelerde gösterilmiştir. Bu çalışmada NSm spesifik antiserum aracılığıyla infekte hücre lizatında NSm'in gösterilmesi ancak virion peletinde tespit edilememesi, bu proteinin yapısal olmayan bir protein olduğuna kanıt olarak ifade edilmiştir [75].

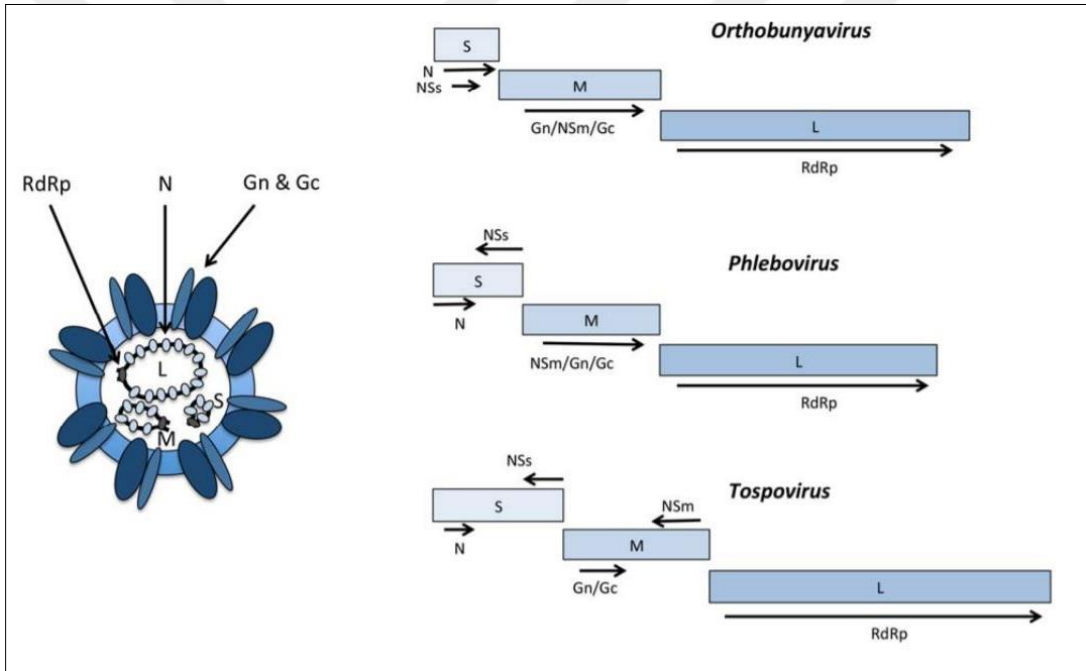
2.3. *Bunyaviridae* Ailesinde Viral Yapısal Olmayan Proteinlerin Roller

Yaklaşık 350'den fazla izolat ve beş cins ile *Bunyaviridae* ailesi, yeni ve yeniden görülen (emerging/re-emerging) enfeksiyon etkenleri arasında sayılan ve bu etkenler içerisinde gözlemlendikleri coğrafyanın ve vektör yayılımının genişliği, bazılarının biyoterör ajanı olarak kullanılabilir olma ihtimalleri ve kompleks biyolojileri nedeniyle yüksek tıbbi öneme sahip ve merak uyandıran grupları içermektedir. Moleküler biyolojideki gelişmeler ve reverz genetik sistemlerinin geliştirilmesi, viral biyolojiyle ilgili bildiklerimizi arttırmış, viral komponentlerin rollerini daha iyi kavrama imkanı sağlamıştır. Yapısal proteinlerin yanı sıra hem vektör hem konak bağışıklık sistemi ile olan interaksiyonları hem de viral patogeneze olan katkıları nedeniyle viral yapısal olmayan proteinler dikkat çekmektedirler [76].

2.3.1. NSs

Orthobunyavirüslerde NSs N proteiniyle aynı mRNA transkriptinden kodlanmakta ancak N proteininkinden daha ileride bir AUG ile başlamaktadır. Oropouche virüs ile reverz genetik sistemi kullanılarak yapılan bir çalışmada NSs'in interferon antagonisti olduğu gösterilmiştir [77]. Yine orthobunyavirüslerin bir üyesi olan Bunyamwera virüsünde N proteini ile çakışan açık okuma çerçevesinden kodlanan NSs proteini ile ilgili yapılan bir çalışmada reverz genetik sistemiyle NSs mutant klonlar elde edilmiş ve bu klonların vahşi tip virüs ile olan farklarına bakıldığında plak

testinde daha küçük fenotip gözlenmiştir. Ayrıca N proteini üretiminde artış, konak hücre protein sentezinin durdurulma fonksiyonunda ve interferon β -promoterinin indüklenmesinde azalma gözlenmiştir. Ayrıca Balb/c farelerine intraserebral inokülasyon sonucunda vahşi tip virüse kıyasla mutant virüste farelerin ölüm sürelerinde uzama, hücreden hücreye yayılımında ve beyin dokusundaki virüs titresinde azalma gözlenmiştir [78]. Bunyamwera virüsüyle yapılan başka bir çalışmada NSs mutant virüsün vahşi tip virüse kıyasla sinekleri infekte etme oranının daha düşük olduğu gözlenmiştir [79]. Orthobunyavirus ailesinin başka bir üyesi olan Schmallerberg virüsün NSs'inin ise nüklear lokalizasyon sinyali taşıdığı gösterilmiştir [80].



Şekil 2-15: *Bunyaviridae* ailesinin bazı cinslerinde yapısal olmayan proteinlerin genomik organizasyonu.

Bunyaviridae ailesinde bulunan cinslerde NSs'lerin ambisens okuma ve çakışan açık okuma çerçevelerinden alternatif başlangıç kodonu aracılı üretimleri, NSm'lerin ise posttranslasyonel kesilim ve ambisens okuma aracılı üretimi gösterilmiştir. Eifan ve ark. (2013)'ten alınmıştır.

Phlebovirüs ailesinde yer alan Trombositopeni Sendromlu Yüksek Ateş Virüsü (severe fever with thrombocytopenia virus/SFTSV)'nde S segmentten ambisens okuma stratejisiyle kodlanan NSs proteininin anti-interferon aktivitesi olduğu, viroplazm benzeri yapılar oluşturduğu ve N proteininin, viral RNA'nın ve viral çift sarmallı RNA'nın viroplazmalar içerisinde lokalize olduğu bulunmuş ve bu rolü sebebiyle viral

RNA replikasyonunda rolü olabileceği öne sürülmüştür [81, 82]. Aynı ailede bulunan Rift Vadisi Humması Virüsü (Rift Valley Fever Virus/RVFFV)'nün NSs proteininin de interferon- β indüksiyonunu baskıladığı ve protein kinaz R (protein kinase R/PKR) antagonisti olduğu gösterilmiştir [83, 84]. Yine bu ailede bulunan Tatarcık Humması Virüsü (Svefly Fever Virus) Sicilya serotipinin interferon β transkripsiyonunu engellediği ve fonksiyonel hedefinin interferon regülatör faktör 3 (interferon regulatory factor 3/IRF3) olduğu gösterilmiştir [85].

Hantavirüs ailesinin üyelerinden Tula ve Puumala Hantavirüs'lerde N proteininin açık okuma penceresiyle çakışan ve +1 pozisyonundan başlayarak kodlanan NSs proteinlerinin fonksiyonel olduğu, infekte hücrelerde spesifik antikorlarıyla gösterilebildikleri ve bunun yanı sıra tip 1 interferon antagonisti oldukları öne sürülmüştür [86]. Tula hantavirüsü ile yapılan başka bir çalışmada NSs'in perinükleer bölgede lokalize olduğu gösterilmiştir [87]. Vees hantavirüs ile yapılan ve NSs'in +1 açık okuma çerçevesinden okunabilmesi için gerekli tanınma sinyalinin ne olduğunun araştırıldığı bir çalışmada N proteininin AUG kodonunu bypass eden 40S ribozomal altbirimlerin NSs'in AUG'sine bağlanıp translasyonu başlattığı gösterilmiş ve bu yolla N'in başlangıç kodonunun her durumda etkin bir şekilde okunamadığı ve bu tarama mekanizmasındaki kaçakların sonucunda NSs'in okunduğu iddia edilmiştir [88].

Tospovirüslerde S segmentten ambisens strateji ile kodlanan NSs proteininin antiviral RNA interferansını baskıladığı ve hücre ölümünü indüklediği ve bu iki farklı görevi proteindeki farklı domainlerin gerçekleştirdiği [89], adenosin trifosfat ve magnezyuma bağımlı çift yönlü DNA helikaz aktivitesi olduğu [90], vektör doku kolonizasyonundaki rolü nedeniyle persistan enfeksiyon için gerekli olduğu gösterilmiştir [91].

2.3.2. NSm

Orthobunyavirüslerde Gn ve Gc proteinlerinin arasından hücresel proteazlarla kesilim sonrası serbestlenen NSm proteinin N-terminalinin Bunyamwera virüsünde virüs birleşmesi ve paketlenmesinde görevi olduğu [92], Maguari ve Oropouche virüste hücre kültüründe virüs replikasyonunda NSm'in gerekli olmadığı [93, 94], Bunyamwera virüsle yapılan başka bir çalışmada ise bu proteinin hücresel aktinle beraber hücredeki viral fabrikaların yapısına katıldığı gösterilmiştir [95].

Phlebovirüs ailesinden RVFV’de NSm’in virulans ve letalitede rolü olmadığı gösterilse de [96] antiapoptotik fonksiyonu olduğu gösterilmiştir [97]. Yine RVFV’in NSm mutant suşlarıyla yapılan çalışmada virüsün vektörü olan sineklerde viral titrenin oldukça düştüğü ve bu nedenle NSm’in sinek orta midesindeki infeksiyon bariyerini modüle ettiği öne sürülmüştür. Yine bu sineklerde virüs diseminasyon ve transmisyonundaki azalmanın, NSm’in orta mideden kaçışı engelleyen bariyer üzerinde baskılayıcı etkiyi ortadan kaldırması nedeniyle gerçekleştiği düşünülmüştür [98].

Tospovirüslerde M segmentten ambisens yolla kodlanan NSm proteininin viral hareket proteini olduğu [99], membranlarla C terminal domaini aracılığıyla etkileşime geçtiği gösterilmiştir [100].



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çözeltiler ve Besiyerleri

3.1.1. 1 M Sodyum Klorid

58.44 g sodyum klorid (NaCl 58.44 g/mol) tartılıp 1 litre steril distile suda çözündürülmüştür.

3.1.2. 2.5 M Potasyum Klorid

186.375 g potasyum klorid (KCl 4.55 g/mol) tartılıp 1 litre steril distile suda çözündürülmüştür.

3.1.3. 2 M Magnezyum Sülfat

240.732 g magnezyum sülfat (MgSO₄ 120.366 g/mol) tartılıp 1 litre steril distile suda çözündürülmüştür.

3.1.4. 1 M pH:8 Tris Çözeltisi

121.14 g tris (121.14 g/mol) tartılıp 800 ml steril distile su eklenerek çözündürülmüştür. Çözündürüldükten sonra hidroklorik asit ile pH 8 olacak şekilde ayarlanmış, ardından hacim 1 litreye tamamlanmıştır.

3.1.5. 0.5 M Etilendiamintetraasetik asit Çözeltisi

146.12 g etilendiamintetraasetik asit (EDTA) (292.24 g/mol) tartılıp 800 ml steril distile su eklenerek çözündürülmüştür. Çözündürüldükten sonra hidroklorik asit ile pH 8 olacak şekilde ayarlanmış, ardından hacim 1 litreye tamamlanmıştır.

3.1.6. %50 Glukoz Çözeltisi

50 g glukoz tartılıp 100 ml steril distile suda çözündürülmüştür. Ardından 0.22 µm'lik filtreden geçirilerek steril edilmiştir.

3.1.7. Kanamisin Stok Çözeltisi

50 mg/ml kanamisin stok çözeltisi hazırlamak için 1 g kanamisin 20 ml distile suda çözündürülmüş ardından 0.22 µm'lik filtreden geçirilerek steril edilmiştir. Mikrosantrifüj tüplerine 1'er ml olacak şekilde dağıtılıp -20°C'de saklanmıştır.

3.1.8. Luria-Bertani (LB) Sıvı Besiyeri

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

Toz şeklindeki besiyerinden 1 litre hazırlamak için 25 g tartılmış, üzerine distile su ilave edilerek çözdürüldükten sonra hacmi 1 litreye tamamlanmıştır. Otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edilmiştir.

3.1.9. Kanamisinli Luria-Bertani Sıvı Besiyeri

3.1.12’de tarif edildiği gibi hazırlanan LB sıvı besiyerine ml’de 50 µg olacak şekilde kanamisin çözeltisinden eklenmiş ve 4°C’de saklanmıştır.

3.1.10. %30 Gliserollü Luria-Bertani Sıvı Besiyeri

3.1.12’de tarif edildiği gibi hazırlanan LB sıvı besiyerine 100 ml’de 30 ml olacak şekilde gliserol eklenmiş ve 4°C’de saklanmıştır.

3.1.11. Luria-Bertani Agar

Trypton	10 g/L
Maya özütü	5 g/L
NaCl	10 g/L
Agar	20 g/L

Toz şeklindeki besiyerinden 1 litre hazırlamak için 45 g tartılmış, üzerine distile su ilave edilerek çözdürüldükten sonra hacmi 1 litreye tamamlanmıştır. Otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edilmiş, uygun sıcaklığa geldiğinde petri kaplarına dağıtılmıştır. Agar katılaştıktan sonra besiyeri içeren petri kutuları 37°C’lik inkübatörde bir gece bekletilerek sterilite kontrolü yapılmış ve daha sonra 4°C’de saklanmıştır.

3.1.12. Kanamisinli Luria-Bertani Agar

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

3.1.13. Katabolit Represyonlu Super Optimal (SOC) Sıvı Besiyeri

Maya özütü	5 g/L
Trypton	20 g/L
1 M NaCl	10 ml/L
2.5 M KCl	1 ml/L
2 M MgSO ₄	20 ml/L
%20 Glukoz Çözeltisi	20 ml/L

Glukoz dışındaki tüm bileşenler eklendikten sonra üzerine distile su ilave edilerek çözdürülerek pH 7.5 olacak şekilde tamponlanmış, ardından hacmi 980 ml'ye tamamlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiş ve yeterince soğuduktan sonra filtreden geçirilerek steril edilmiş %20'lik glukoz çözeltisinden 20 ml eklenmiştir. 37°C'lik inkübatörde bir gece bekletilerek sterilite kontrolü yapıldıktan sonra 1 ml'lik santrifüj tüplerine 250 µl olacak şekilde dağıtılmış ve -20°C'de saklanmıştır.

3.1.14. Ekspresyon Besiyeri

Trypton	10 g/L
Maya özütü	5 g/L
NaCl	10 g/L
% 50 Glukoz Çözeltisi	20 ml/L

Toz şeklindeki besiyerinden 1 litre hazırlamak için 25 g tartılmış, üzerine distile su ilave edilerek çözdürüldükten sonra hacmi 1 litreye tamamlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir. Besiyeri oda ısısına geldikten sonra glukozu eklenmiş ve 4°C'de saklanmıştır.

3.1.15. Tris-EDTA Çözeltisi

1 M Tris pH 8	5 ml/500 ml
0.5 M EDTA pH 8	1 ml/500 ml

Tris ve EDTA eklendikten sonra hacim 500 ml'ye tamamlanmış ve otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir.

3.1.16. 0.1 M Kalsiyum Klorid Çözeltisi

1.1 g kalsiyum klorid (CaCl_2 110.98 g/mol) tartılıp 100 ml steril distile suda çözündürülmüştür. Otoklavda 121°C 'de 15 dakika steril edildikten sonra 4°C 'de saklanmıştır.

3.1.17. %15 Gliserollü 0.1 M Kalsiyum Klorid Çözeltisi

1.1 g CaCl_2 (110.98 g/mol) tartılıp 85 ml steril distile suda çözündürülmüştür. 115 ml gliserol eklendikten sonra otoklavda 121°C 'de 15 dakika steril edilip 4°C 'de saklanmıştır.

3.1.18. 5x Tris-Borik Asit-EDTA Çözeltisi

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

Tüm bileşenler eklendikten sonra üzerine distile su eklenerek çözündürülmüş ve hacmi 1 litreye tamamlanmıştır.

3.1.19. Fosfat Tamponlu Tuzlu Su (PBS) Çözeltisi

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Sodyum Fosfat Dibazik (Na_2HPO_4)	1.44 g
Potasyum Fosfat Monobazik (KH_2PO_4)	0.24 g

Tüm bileşenler 800 ml distile suda çözündürülmüş, hidroklorik asit ile pH 7.4 olacak şekilde ayarlanmış ve hacim 1 litreye tamamlanmıştır. Otoklavda 121°C 'de 15 dakika steril edildikten sonra oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.1.20. 100 mM İzopropil β -D-1- Tiyogalaktopiranozid Çözeltisi

2.38 g izopropil -d-1- tiyogalaktopiranozid (IPTG) (238.30 g/mol) tartılıp 100 ml steril distile suda çözündürülüp -20°C 'de saklanmıştır.

3.1.21. 0.5 M Tris pH 6.8

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

Tris 60 ml distile suda çözdürüldükten sonra hidroklorik asit ile pH 6.8 olacak şekilde ayarlanmış, ardından hacim 100 ml'ye tamamlanıp 4°C'de saklanmıştır.

3.1.22. Akrilamid/BİS

Akrilamid	87.6 g/300 ml
-----------	---------------

N'-N'-bis-metilen-akrimalid	2.4 g/300 ml
-----------------------------	--------------

Tüm bileşenler eklendikten sonra hacim 300 ml'ye tamamlanmış ve 4°C'de saklanmıştır.

3.1.23. %10 Sodyum Dodesil Sülfat Çözeltisi

10 g sodyum dodesil sülfat (SDS) 90 ml distile suda yavaşça karıştırarak çözdürülmüş ve hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

3.1.24. 1.5 M Tris pH 8.8

Tris	27.23 g
------	---------

Tris 80 ml distile suda çözdürüldükten sonra hidroklorik asit ile pH 8.8 olacak şekilde ayarlanmıştır. Hacim 150 ml'ye tamamlanıldıktan sonra 4°C'de saklanmıştır.

3.1.25. %0.5 Bromofenol Mavisi

50 mg bromofenol mavisi 10 ml distile suda çözdürülmüş ve oda ısısında saklanmıştır.

3.1.26. SDS Örnek Yükleme Çözeltisi

0.5 M Tris pH 6.8	1.25 ml
-------------------	---------

Gliserol	2.5 ml
----------	--------

%10 SDS	2 ml
---------	------

%0.5 Bromofenol Mavisi	0.2 ml
------------------------	--------

Tüm bileşenler eklendikten sonra 3.55 ml deiyonize su eklenip oda ısısında saklanmıştır. Kullanmadan önce 950 µl SDS örnek yükleme çözeltisinde 50 µl beta merkaptotanol eklenmiştir.

3.1.27. 10x SDS Yürütme Çözeltisi

Tris	30.3 g
Glisin	144 g
SDS	10 g

Tüm bileşenler çözündürülüp hacim 1 litreye tamamlanmış ve 4°C’de saklanmıştır. Presipitasyon olması durumunda kullanmadan önce oda ısısına getirilmiştir.

3.1.28. %10 Amonyum Persülfat

100 mg amonyum persülfat (APS) 1 ml deiyonize suda çözündürülmüştür. Çözelti her kullanımdan önce taze hazırlanmıştır.

3.1.29. Coomasie Boyama Çözeltisi

Metanol	40 ml/100 ml
Asetik asit	10 ml/100 ml
Coomasie Brilliant Mavisi R250	0.1 ml/100 ml

Tüm bileşenler eklendikten sonra 50 ml distile su eklenmiş ve 4°C’de saklanmıştır.

3.1.30. Coomasie Boya Uzaklaştırma Çözeltisi

Metanol	40 ml/100 ml
Asetik asit	10 ml/100 ml

Tüm bileşenler eklendikten sonra 50 ml distile su eklenmiş ve 4°C’de saklanmıştır.

3.1.31. Denatüre Lizis Tamponu

Sodyum fosfat monobazik (NaH_2PO_4)	11.99 g/L
1 M pH 8 Tris	10 ml/L
NaCl	300 mM
Üre	480.48 g/L
Tween 20	10 ml/L

Tüm bileşenler eklendikten sonra distile su ile çözündürülmüş ve pH 8.5 olacak şekilde ayarlandıktan sonra 0.22 µm'lik filtreden geçirilerek steril edilmiş ve oda ısısında saklanmıştır.

3.1.32. Denatüre Yıkama Tamponu

NaH ₂ PO ₄	11.99 g/L
1 M pH 8 Tris	10 ml/L
NaCl	300 mM
Üre	480.48 g/L
Tween 20	10 ml/L
İmidazol	1.36 g/L

Tüm bileşenler eklendikten sonra distile su ile çözündürülmüş ve pH 8.5 olacak şekilde ayarlandıktan sonra 0.22 µm'lik filtreden geçirilerek steril edilmiş ve oda ısısında saklanmıştır.

3.1.33. Denatüre Elüsyon Tamponu

NaH ₂ PO ₄	11.99 g/L
1 M pH 8 Tris	10 ml/L
NaCl	300 mM
Üre	480.48 g/L
Tween 20	10 ml/L
İmidazol	17.02 g/L

Tüm bileşenler eklendikten sonra distile su ile çözündürülmüş ve pH 8.5 olacak şekilde ayarlandıktan sonra 0.22 µm'lik filtreden geçirilerek steril edilip oda ısısında saklanmıştır.

3.1.34. Western Blotlama Transfer Tamponu

Tris	3.03 g/L
Glisin	14.4 g/L
Metanol	200 ml/L

Tüm bileşenler eklendikten sonra tamponun hacmi steril distile su ile 1 litreye tamamlanmış ve 4°C’de saklanmıştır.

3.1.35. Western Blotlama TBST Yıkama Tamponu

1 M Tris pH 7.4	10 ml/L
NaCl	9 g/L
Tween 20	2 ml/L

Tüm bileşenler eklendikten sonra tamponun hacmi steril distile su ile 1 litreye tamamlanmış ve 4°C’de saklanmıştır.

3.1.36. Western Blotlama Bloklama, Primer ve Sekonder Antikor Dilüsyon Tamponu

1 M Tris pH 7.4	10 ml/L
NaCl	9 g/L
Tween 20	2 ml/L
Skim Milk	50 g/L

Tüm bileşenler eklendikten sonra tamponun hacmi steril distile su ile 1 litreye tamamlanmış ve 4°C’de saklanmıştır.

3.1.37. EİA Karbonat/Bikarbonat Kaplama Tamponu

Sodyum Bikarbonat (NaHCO_3)	1465 mg
Sodyum Karbonat (Na_2CO_3)	795 mg

Bileşenler steril distile suda çözündürülüp ardından pH 9.6 olacak şekilde ayarlanmıştır. Hacim 500 ml’ye tamamlanıldıktan sonra 4°C’de saklanmıştır.

3.1.38. EİA PBST Yıkama Tamponu

3.1.19’de belirtildiği şekilde hazırlanan 5xPBS çözeltisi steril distile su ile 5 kat dilüe edilmiş ardından 1 litreye 500 µl Tween 20 eklenmiş ve 4°C’de saklanmıştır.

3.1.39. EİA Bloklama, Primer ve Sekonder Antikor Dilüsyon Tamponu

3.1.38’de belirtildiği gibi hazırlanan PBST çözeltisine % 5 oranında skim milk eklenip manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve 4°C’de muhafaza edilmiştir. Her kullanımdan önce taze olarak hazırlanmıştır.

3.1.40. Dot-Blot Tris Tamponlu Tuzlu Su (TBS)

Tris-Cl pH 7.5 20 mM

NaCl 500 mM

4.84 g Tris-Cl (157.594 g/mol) ve 58.54 g NaCl tartılıp yaklaşık 1.5 litre distile suda çözdürüldükten sonra hidroklorik asit ile pH 7.5 olacak şekilde ayarlanmıştır. Hacim distile su ile 2 litreye tamamlanmadan sonra 4°C’de saklanmıştır.

3.1.41. Dot-Blot Tween 20 (TTBS) Yıkama Tamponu

Tris-Cl pH 7.5 20 mM

NaCl 500 mM

4.84 g Tris-Cl (157.594 g/mol) ve 58.54 g NaCl tartılıp yaklaşık 1.5 litre distile suda çözdürüldükten sonra hidroklorik asit ile pH 7.5 olacak şekilde ayarlanmıştır. 1 ml Tween 20 eklendikten sonra hacim distile su ile 2 litreye tamamlanmadan sonra 4°C’de saklanmıştır.

3.1.42. Dot-Blot Bloklama, Primer ve Sekonder Antikor Dilüsyon Tamponu

3.1.33’de belirtildiği şekilde hazırlanmış olan TBS’e % 1 BSA (bovin serum albümin) eklenerek hazırlanmış ve çözdürülüp -20°C’de saklanmıştır.

3.2. Kullanılan Cihazlar ve Diğer Sarf Malzemeler

Çalışmada tek kanallı ve 8 kanallı otomatik pipetler (Rainin, Eppendorf, Thermo) ve bunlara ait 121°C’de 15 dakika steril edilmiş uçlar, çalkalamalı inkübatör (INFORS HT), pH metre (OHAUS), manyetik karıştırıcı (BIORAD), terazi (KERN), hassas terazi (SARTORIUS), mikropalak yıkayıcı (THERMO Well Wash Versa), spektrofotometre (HITACHI), mikropalak okuyucu (BIO-RAD iMark Plate Reader), blotlama cihazı (BIO-RAD TransBlot Turbo), agaroz jel görüntüleme cihazı (BIO-RAD GelDoc XR+), ısı bloğu (THERMO), vorteks (VWR), masaüstü soğutmalı santrifüj (THERMO MicroCL 21R, BECKMAN-COULTER Allegra X-30R), vakum pompası (KNF), beyaz ışık transilüminatörü (UVP), yatay elektroforez sistemi (BIORAD), dikey elektroforez sistemi (BIORAD Mini Protean Tetra Cell), termal döngü cihazı (Applied Biosystems, BIORAD), su banyosu (WITEG), tüp döndürücü (THERMO), mini santrifüj (BIORAD), orbital çalkalayıcı (BENCHMARK), kuru sıcak hava fırını (NÜVE), otoklav (HIRAYAMA), kemilüminesans görüntüleme cihazı (FUSION SOLO

S), buz makinesi (SCOTSMAN), -80°C derin dondurucu (THERMO), -20°C derin dondurucu (THERMO), 4°C dolap (THERMO, LIEBHERR), ultra saf su cihazı (SARTORIUS), kromatografi sistemi (AKTA PURE), ultrasantrifüj (BECKMAN-COULTER), tek kullanımlık dereceli pipetler (LP ITALIANA), EİA plakları (THERMO IMMULON 2HB), falkon tüpleri (NEST), mikropalak (LP ITALIANA), mikrosantrifüj tüpleri (ISOLAB), petri kabı (FIRATMED), şırınga ucu filtre (SORFA) ve membran filtre (MILLIPORE) kullanılmıştır.

3.3. Yöntemler

3.3.1. KKKAV Kelkit 06 Suşu NSs ve NSm Proteinlerinin Sekanslarının Belirlenmesi

Çalışmada kullanılacak NSs ve NSm genlerinin sekanslarının belirlenmesinde ülkemizde hastalığa sebep olmuş bir suşa ait sekansların kullanılması hedeflenmiş ve bu amaçla 2005 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Hastanesi'ne kene ısırığı hikayesi olan ve ani yükselen ateş, peteşi, baş ağrısı, karın ağrısı, mide bulantısı, karaciğer enzim değerlerinde artış ve trombositopeni gibi klinik ve laboratuvar bulgular ile başvurmuş, hastalığın pozitif KKKAV spesifik IgM ve PCR ile doğrulveği hasta serumunun yenidoğan fare beynine pasajlanması ve ardından Vero E6 hücrelerine inokülasyonu sonucunda izole edilen virüsün tüm genomunun sekanslveği çalışma sonrası NCBI GenBank'a bildirilen KKKAV cRNA (komplementer RNA) sekansları kullanılmıştır [101]. NSm ve NSs proteinlerinin belirlendiği çalışmalarda kullanılan KKKAV IbAr 10200 suşu için belirtilen sekansların KKKAV Kelkit06 suşunda karşılık gelen sekanslarının belirlenmesi amacıyla iki suşun S ve M Segmentlerinin NCBI GenBank'ta bildirilmiş sekansları karşılaştırılmıştır (KKKAV IbAr 10200 S Segment Erişim Numarası: MH483987.1, M Segment Erişim Numarası: MH483988.1; KKKAV Kelkit06 S Segment Erişim Numarası: GQ337053.1, M Segment Erişim Numarası: GQ337054.1). Segmentlerin karşılaştırılıp protein sekanslarının belirlenmesinde NCBI ORFFINDER ve TMHMM Server v.2.0 web sayfaları kullanılmıştır (Tablo 3-1) [102, 103].

Tablo 3-1: KKKAV 10200 ve KKKAV Kelkit06 NSs ve NSm proteinlerinin sekansları

KKKAV 10200 NSs	MLSALALSTSSLCLSRYPRLASTVFLASSNIPFPSVSASLARPVATSAIPER PDLLMSPHGGLKAMMYLPLTNSLHQSTCSWLTGPRGFSSPPLFRIRFLLL IMSDSISLTDITISPGTLYSARTLLLRAAVLALTRKPMSFLHFKAACW
KKKAV Kelkit06 NSs	MLSALALSTSSLCLSKYPLRASTVFLASSKTPFPSVSASLARPVATSAIPE RPDLLMSPQGGLKAMMYLPLTNSLHHSTCSRLTGPRGFSSPPLLIRFLL LIMSDSISLTDITISPGTLYSARTLLLKAAVFALTRKPMSFLHLRAACW
KKKAV 10200 NSm	GQGKTIEAYRAREGYTSICLFVLGSILFIVSCLMKGLVDSVGNSFFPGLSI CKTCSISSINGFEIESHKCYCSLFCCPYCRHCSTDKEIHKHLHSICKKRKK GSNVMLAVCKLMCFRATMEV
KKKAV Kelkit06 NSm	GHGKTIEIYQTREGFASICLFMLGSILFIVSCLVKGLVDSVSEFFPGLSVC KTCSIGSVNGFEIESHKCYCSLFCCPYCRHCSADREIHLHLHSICKKRKTG SNVMLAVCKRMCFRATIEA

3.3.2. Sentetik, Optimize Sekansların Elde Edilmesi

3.3.1’de belirtildiği şekilde belirlenen sekansların sentetik olarak elde edilmesi ve bakteriyel ekspresyon sisteminde üretilmesi için amino asit sekansında değişim olmaksızın nükleotid sekansında bakteriler tarafından daha sık kullanılan kodonlara göre optimize edilmesi GenScript firması tarafından sağlanmıştır. Tablo 3-2’de belirtilen sekanslarda optimizasyon amacıyla değiştirilmiş bazlar kırmızı renkte gösterilmiştir.

Tablo 3-2: NSs ve NSm proteinlerinin nativ ve optimize sekansları

NSs Nativ Sekans	5'ATGGCATTAGGGAGGTTTGTATCATGCTGTCAGCACTTGCTTTGTCGAC TTCGTCCCTGTGCTTGCCAAATACCCATTGAGAGCCTCCACGGTCTTCTTA GCTTCGTCAAAAACCTCTTCCCTCGGTCTCTGCAAGCTTGCAAGGCCT GTTGCAACAAGTGCTATTCCCGAACGACCTGATTTGTTGATGTCCCCCAA GGTGGATTGAAAGCCATGATGTACTTGCCTTTGACAAATCCCTGCACCAC TCCACATGTTACGGCTCACTGGGCCGCGTGATTTTCATCACCGCCCCTG TTGAGAATTAGATTCTCCTTCTAATCATGTCTGACAGCATTTCTTTAACAGA CATCACAATTTACACAGGGACTTTGTATTCTGCAAGGACTTTGTTGCTTAAG GCTGCCGTGTTGCGTTGACACGGAAACCTATGTCTTCTCCACTTAAGA GCAGCCTGTTGG'3
NSs Optimize Sekans	5'ATGGCGCTGGGTCGTTTCGTGATCATGCTGAGCGCGCTGGCGCTGAGC ACCAGCAGCCTGTGCCTGAGCAAGTACCCGCTGCGTGCGAGCACCGTTT CCTGGCGAGCAGCAAAAACCCCGTTTCCGAGCGTGAGCGCGAGCCTGGCG CGTCCGGTTGCGACCAGCGCGATTCCGGAGCGTCCGGACCTGCTGATGA GCCCCGAGGGTGGCCTGAAGGCGATGATGTATCTGCCGCTGACCAACAGC CTGCACCACAGCACCTGTAGCCGCTGACCGGTCCGCGTGGCTTCAGCAG CCCGCCGCTGCTGCGTATTGTTTTCTGCTGCTGATCATGAGCGACAGCAT TAGCCTGACCGACATCACCATCTCTCCGGGCACCCTGTACAGCGCGCGTA CCCTGCTGCTGAAGGCGGCGGTGTTGCGCTGACCCGTAAACCGATGAGC TTTCTGCACCTGCGTGCGGCGTGCTGG'3
NSm Nativ Sekans	5'ATGGGTCATGGAAGACAATCGAAATATATCAGACCAGGGAAGGATTCTG CAAGCATCTGTCTCTTTATGTTAGGAAGCATTCTATTTATAGTCTCTTGCTTG GTGAAAGGGCTAGTTGACAGTGTCAAGTAAAGCTTCTTCCCGGCCTATCT GTCTGTAAGACATGCTCTATTGGCAGTGTAATGGCTTTGAAATTGAATCGC ACAAATGCTACTGTAGCCTATTTTGCTGCCCTACTGTAGGCACTGCTCTG CTGACAGAGAAATTCACCAGTTACACTTGAGTATCTGCAAAAAAAGGAAAAC GGGGAGCAATGTCATGCTGGCCGTCTGCAAACGCATGTGCTTTAGGGCAA CCATAGAAGCA'3
NSm Optimize Sekans	5'ATGGGTACCGGCAAGACCATCGAGATTTACCAGACCCGTGAAGGTTTCG CGAGCATCTGCCTGTTTATGCTGGGCAGCATCCTGTTTCATTGTGAGCTGCC TGTTAAAGGTCTGGTGACAGCGTTAGCGAGAGCTTCTTTCCGGGCGCTG AGCGGTGCAAGACCTGTAGCATCGGTAGCGTTAACGGCTTCGAGATTGAA AGCCACAAATGCTATTGCAGCCTGTTTGTGCTGCCCGTACTGCCGTCATTGC AGCGCGGACCGTGAGATCCACCAACTGCCGTAAGACCGGTAGCAACGTGA TGCTGCGGTTTGCAACGTATGTGCTTTCGTGCGACCACCTGAGCATTG CAAGAAAATTGAAGCG'3

3.3.3. Sentetik Peptit Sekanslarının Belirlenmesi

Hem deteksiyon hem de bağışıklama çalışmalarında kullanılması hedeflenen sentetik peptit sekanslarının belirlenmesi amacıyla NSm ve NSs proteinlerinin antijenik bölgeleri belirlenmiştir. Proteinlerdeki tahmini antijenik bölgelerin belirlenmesinde EMBOSS:antigenic web sayfasından yararlanılmıştır [104]. Protein sekanslarındaki antijenik bölgeler Tablo 3-3'de kırmızı renkte gösterilmiştir. Belirlenen bu antijenik bölgelerden seçilerek sentezlenmesine karar verilen 30 amino asitlik peptitler Tablo 3-4'te gösterilmiştir.

Tablo 3-3: NSm ve NSs proteinlerinin antijenik olduğu tahmin edilen bölgeleri

Protein	Antijenik Bölgeler
NSm	GHGKTIEIYQTREG FASICLFMLGSILFIVSCLVKGLVDSVSESFFPGLSVCKTCSIGSVNGFEIESHKCYCSLFCCPYCRHCSADREIHLHLSICKKRKTGSNVMLAVCKRMCFRATIEA
NSs	MLS ALALSTSSLCLSKYPLRASTVFLASSKTPFPSVSASLARPVATS AIPERPDLLMSPQGGLKAMMYLPLTNSLHHSTCSRLTGPRGFSSPPL LRIRFLLLIMSDSISLTDITISPGTLYSARTLLLKAAVFALTRKPMISFL HLRAACW

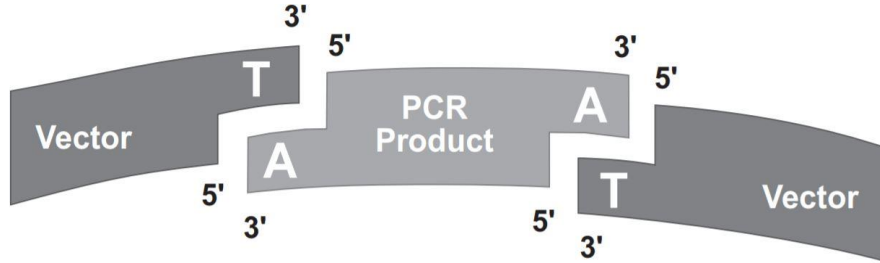
Tablo 3-4: NSm ve NSs proteinlerinden sentetik peptit eldesi için seçilen sekanslar

	Peptit Sekansı
NSm peptit	ESHKCYCSLFCCPYCRHCSADREIHLH
NSs peptit	LCLSKYPLRASTVFLASSKTPFPSVSASLA

3.3.4. Klonlama Stratejilerinin Belirlenmesi

Proteinlerin bakterilerde üretilmesi amacıyla iki farklı klonlama stratejisi tercih edilmiştir. Bunlardan ilki proteinlerin nativ şekilde *Escherichia coli*'de ekspresyonu, saflaştırılması amacıyla übikütün benzeri bir modifiye edici barındıran pETSUMO sistemidir. Bu sistemde proteinler N terminallerinde His-Tag olacak şekilde yaklaşık 13 kDa boyutunda olan SUMO proteini ile füzyon halinde üretilmekte olup bu yolla hem ekspresyon seviyesinde hem de çözünür olmayan proteinlerin çözünebilirliklerinde artış imkanı elde edilebilmektedir. TA klonlama stratejisiyle çalışan bu sistemde polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılan genin tek aşamayla vektöre klonlamasına imkan tanınmaktadır. pETSUMO vektörü linearize halde olup 3' uçlarında serbest deoksitimidin barındırmaktadır. Taq polimerazın kalıp DNA'dan bağımsız bir şekilde PCR ürününün 3' uçlarına deoksiadenozin ekleme özelliği kullanılır ve vektördeki serbest deoksitimidinler ile kalıp DNA'daki serbest deoksiadenozinlerin ligaz enzimi ile birleştirilmesi sonucunda vektör sirküler yapısını kazanmaktadır (Şekil 3-1) [105].

Proteinlerin ekspresyon sonrasında sumo proteaz ile kesilmesi sonucunda nativ proteinler elde edilebilmektedir.



Şekil 3-1: pETSUMO vektöründe TA klonlama stratejisi.

Linearize halde temin edilen vektörün kesim enzimleri kullanmaksızın sirküler yapısını kazanmasını sağlayan, vektörün 3' uçlarında bulunan serbest deoksitimidinlerin klonlanacak PCR ürününün 3' uçlarında bulunan serbest deoksiadenozinler ile ligasyon reaksiyonu gösterilmiştir. Thermo Fischer Scientific Champion pET SUMO Protein Expression Kit kitapçığından alınmıştır.

İkinci klonlama stratejisi ise restriksiyon enzimleri kullanarak gerçekleştirilen direksiyonel klonlamadır. Bu yöntemde klonlamanın gerçekleştirileceği vektörün çoklu klonlama bölgesinde (multiple cloning site-MCS) bulunan restriksiyon kesim enzimlerinden, klonlanacak gene ve amaca uygun olarak seçilen iki enzimin kesim bölgeleri arasına klonlanan gen yerleştirilmektedir. Bu sistemde klonlamanın gerçekleştirilebilmesi için seçilen enzimlerin tanıma bölgelerinin klonlanacak genin 5' ve 3' uçlarına eklenmesi gerekmektedir. Hem vektörün hem klonlanacak genin aynı iki enzimle kesilmesi sonucu oluşan komplementer nükleotidler ligaz enzimi aracılığıyla birleşmekte ve vektör sirküler yapısını kazanmaktadır. Bu klonlama stratejisi kullanılarak NSs ve NSm genleri *NcoI* ve *XhoI* enzimleri kullanılarak pET28b vektörüne, *NdeI* ve *XhoI* enzimleri kullanılarak pET30b vektörüne klonlanmıştır [106].

3.3.5. Klonlama İçin Gerekli Primerlerin Tasarlanması

Belirlenen klonlama stratejilerine uygun forward (F) ve reverz (R) primer çiftlerinin tasarlanması sırasında primerlerin kendi üzerlerine katlanma oranları, primer çiftlerinin heterodimer oluşturma oranları ve GC içerikleri dikkate alınmıştır. Tasarlanan primerler OligoAnalyzer Tool kullanılarak analiz edilmiştir (Tablo 3-2) [106, 107].

Tablo 3-5: Klonlama için tasarlanan primerler**NSm pET28b primerleri**

Forward Primer 5' CAT GCC ATG GGT CAT GGA AAG 3'

Reverse Primer 5' G CCG CTC GAG TGC TTC TTA TGG T 3'

NSs pET28b primerleri

Forward Primer 5' -CCG GCC ATG GCA TTA GGG AGG TTT G-3'

Reverse Primer 5' -GCG CTC GAG CCA ACA GGC TGC TCT TAA G -3'

NSm pETSUMO primerleri

Forward Primer 5' -ATG GGT CAC GGC AAG AC-3'

Reverse Primer 5' -TTA CGC TTC AAT GGT CGC AC-3'

NSs pETSUMO primerleri

Forward Primer 5' -ATG GCG CTG GGT CGT T-3'

Reverse Primer 5' -TTA CCA GCA CGC CGC A-3'

NSm pET30b primerleri

Forward Primer 5' -ATG GGT CAC GGC AAG AC-3'

Reverse Primer 5' -TTA CGC TTC AAT GGT CGC AC-3'

NSs pET30b primerleri

Forward Primer 5' -G GAA TTC CAT ATG TGC CTG GGT-3'

Reverse Primer 5' -A ATC TAT CCG CTC GAG CCA GCA CGC CGC A-3'

3.3.6. Klonlanacak Genlerin PCR ile Çoğaltılması

GenScript firmasından elde edilen sentetik ve optimize genler 3.3.4'te belirtilen yöntemlerle tasarlanan primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. PCR koşulları Tablo 3-5 ve 3-6'da PCR'ın bileşenleri ise Tablo 3-7'de verilmiştir. NSs geninin pET30b'ye klonlaması için gerekli PCR reaksiyonları two-step touchdown metoduyla kurulmuştur.

Tablo 3-6: NSs ve NSm genleri için PCR koşulları

	NSs pET28b	NSm pET28b/ pET30b	NSs pETSUMO	NSm pETSUMO
Denatürasyon 5'	95°C	95°C	95°C	95°C
35 Döngü	Denatürasyon 0:30'	95°C	95°C	95°C
	Bağlanma 0:30'	55°C	55°C	57°C
	Uzama 0:30'	72°C	72°C	72°C
Son Uzama 10'	72°C	72°C	72°C	72°C

Tablo 3-7: NSs geninin pET30b vektörüne klonlanmasında uygulanan PCR koşulları

Denatürasyon 5'	95°C
5x10 Döngü	Denatürasyon 0:30'
	Bağlanma 0:30'
	70-54°C (Her döngüde 2°C azalarak)
Son uzama 5'	95°C

Tablo 3-8: PCR'ın bileşenleri

Taq Polimeraz	0.25 µl
Primer (F+R)	1+1 µl
Reaksiyon Tamponu	5 µl
Kalıp DNA	2 µl
dNTP	1 µl
dH₂O	38.75 µl
Total Hacim	50 µl

Çalışmalarda moleküler kalitede su (molecular grade water-MGW) kullanılmıştır.

3.3.7. Çoğaltılan Genlerin Temizlenmesi

PCR sonrası elde edilen ürünlerin reaksiyon bileşenlerinden arındırılmasında, IntronBio Fragment DNA Pürifikasyon Kiti üreticinin talimatları doğrultusunda kullanılmıştır. Bu talimatlara göre yapılan işlemler aşağıda maddeler halinde sıralanmıştır [108].

1. 100 µl'ye kadar olan PCR ürünü bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılır ve hacminin beş katı kadar BNL çözeltisi eklenir.
2. Koleksiyon tüpüne kolon yerleştirilir.
3. 1'deki karışım kolona aktarılır ve 11000xg'de 30 saniye santrifüj edilir. Süzüntü atılır.
4. 750 µl Yıkama Çözeltisi eklenir ve 11000xg'de 30 saniye santrifüj edilir. Süzüntü atılır.
5. Maksimum hızda (~18000xg) 3 dakika santrifüj edilir.
6. Kolon yeni bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilir.

7. Kolondaki membranın merkezine 40 µl Elüsyon Çözeltisi eklenir. 1 dakika oda ısısında inkübasyonun ardından maksimum hızda (~18000xg) 1 dakika santrifüj edilir.

3.3.8. A Kuyruklarının Eklenmesi

1 mM dATP	10 µl
Dream Taq Polimeraz	0.25 µl
10x Dream Taq Buffer	5 µl
PCR'la çoğaltılmış DNA	x µl
MGW	34.75-x µl

Çoğaltılıp temizlenmiş DNA'ya serbest A uçlarının eklenmesi amacıyla yukarıda belirtilen bileşenler eklenerek 50 µl'lik reaksiyon kurulur. 72°C'de 20 dakika inkübe edilir [105].

3.3.9. Vektör ve Klonlanacak Genlerin Restriksiyon Enzimleri ile Kesimi

Bu amaçla yapılan işlemler aşağıda sıralanmıştır.

1. Vektör ve insertlerin miktarları 260 nm'de absorpsiyon ölçümü ile belirlenir.
2. Belirlenen miktarlara göre enzim miktarı ayarlanır. Teorik olarak 1 birim enzim 1 µg DNA'yı 37°C'de 1 saatte kesebilmektedir.
3. Total hacime uygun olacak şekilde 10x CutSmart reaksiyon tamponu eklenir.
4. 37°C'de bir gece inkübasyona bırakılır.
5. Kesilen vektörler % 0.7'lik agaroz jelde 3.3.10'da belirtildiği gibi elektorforez edilerek ayrıştırılır, 3.3.11'de belirtildiği gibi jelden saflaştırılır ve miktarı belirlenir.
6. Kesilen DNA fragmanları 3.3.6'da belirtildiği gibi temizlenir.
7. Temizlenme sonrası tekrar miktar tayinleri yapılır.

3.3.10. Agaroz Jel Elektroforez

Bu amaçla yapılan işlemler aşağıda sıralanmıştır [106].

1. 3.1.12’de tarif edilen 5xTBE distile su ile 5 kat dilüe edilerek 1xTBE elde edilir.
2. İstenilen orvea agar tartılır ve 100 ml 1xTBE’ye eklenir.
3. Mikrodalga fırında 2 dakika 30 sn ısıtıldıktan sonra 2 µl etidyum bromür eklenir.
4. Elde edilen karışım jel dökme kabına hava kabarcığı olmayacak şekilde dökülür ve tarak yerleştirilir.
5. Agar katılaştıktan sonra jel içerisinde 1xTBE olan yürütme tankına alınır ve jelin üstünü geçecek kadar 1xTBE eklenir. Ardından tarak çıkartılır.
6. 6x yürütme boyasından 2 µl alınır ve 10 µl yürütülecek örnekle karıştırılır. Buradan 10 µl alınarak kuyuya yüklenir.
7. Yürütülen DNA’nın boyutuna bağlı olarak 100 voltta 30-45 dakika arası yürütülür.
8. Yürütme işleminin ardından jel görüntülenir.

3.3.11. Agaroze Jelden DNA Ekstraksiyonu

Kesim sonrası jelden saflaştırılacak DNA fragmanları ultraviyole ışık altında temiz bistüri kullanılarak kesilir. IntronBio Fragment DNA Pürifikasyon Kiti üreticinin talimatları doğrultusunda kullanılarak DNA jelden saflaştırılır. Bu talimatlara göre yapılan işlemler aşağıda maddeler halinde sıralanmıştır [108].

1. 300 mg’a kadar jel parçası temiz bir tüpe aktarılır.
2. 500 µl BNL tamponu eklenir ve 55°C’de 2-3 dakikada bir vorteklenerek 5-10 dakika inkübe edilip jelin çözünmesi sağlanır.
3. Jel çözündükten sonra karışımın sıcaklığının oda ısısına gelmesi sağlanır.
4. Koleksiyon tüpüne kolon yerleştirilir ve bu karışım 800 µl’lik hacimler halinde kolona aktarılır.
5. 11000xg’de 30 saniye santrifüj edilir. Süzüntü atılır. Örnek hacmi 800 µl’den fazla ise bu işlem örnek bitene kadar devam ettirilir.
6. 750 µl Yıkama Çözeltisi eklenir ve 11000xg’de 30 saniye santrifüj edilir. Süzüntü atılır.

7. Maksimum hızda (~18000xg) 3 dakika santrifüj edilir.
8. Kolon yeni bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilir.
9. Kolondaki membranın merkezine 40 µl Elüsyon Çözeltisi eklenir. 1 dakika oda ısısında inkübasyonun ardından maksimum hızda (~18000xg) 1 dakika santrifüj edilir.

3.3.12. Ligasyon Reaksiyonu

Bu amaçla yapılan işlemler aşağıda sıralanmıştır [106].

1. Kesim veya A kuyruğu eklenmesi sonrasında temizlenen vektör ve insertlerin miktar tayinleri yapılır.
2. Vektör insert oranı 1:3 veya 1:7 olacak ve total DNA miktarı 100 ng'dan fazla olmayacak şekilde gerekli miktarlar belirlenir.
3. Eklenecek miktarlara göre reaksiyonun total hacmi belirlenir ve bu miktara göre 10x reaksiyon tamponundan eklenir.
4. Son olarak 1 µl ligaz enzimi eklenir ve reaksiyon oda ısısında bir gece bekletilir.

3.3.13. Bakterilerin Stoklanması

Hazırlanışı 3.1.10'da belirtilen %30 gliserollü LB besiyerine stoklanmak istenen bakterinin bir gecelik taze kültüründen gliserolün son konsantrasyonu %15 olacak şekilde eklenir ve -80°C'de saklanır [106].

3.3.14. Kullanılan Bakteri Suşları

Çalışmada klonlamalar sonrası elde edilen plazmitlerin propagasyonu ve çoğaltılması amacıyla *Escherichia coli* OneShot Top10, ekspresyonlarda ise *E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* BL21 Star, *E. coli* BL21 (DE3) pLyss ve *E. coli* Rosetta (DE3) suşları kullanılmıştır.

3.3.15. Kimyasal Yöntem ile Kompetan Bakterilerin Hazırlanması

Bu amaçla yapılan işlemler aşağıda sıralanmıştır.

1. Kompetans kazveirılacak bakteri suşunun -80°C'deki stoğundan LB Agar besiyerine ekim yapılır.

2. 37°C’de bir gece inkübasyonun ardından tek bir koloni alınarak 5 ml LB sıvı besiyerine inoküle edilir ve tekrar 37°C’de bir gece inkübasyona bırakılır.
 3. Bir gecelik kültürden 1 ml alınarak 100 ml LB sıvı besiyerine inokülasyon yapılır.
 4. 250 rpm’de 1.5-3 saat arası inkübasyona bırakılır.
 5. İnkübasyon süresi tamamlanınca hücreler 10 dakika buzda bekletilir.
 6. Hücreler 3700xg’de 3 dakika santrifüjlenerek çöktürülür.
 7. Süpernatant dökülür ve hücre peleti 10 ml 0.1 M kalsiyum klorid ile çözündürülür.
 8. 20 dakika buzda bekletilir.
 9. Hücreler 3700xg’de 3 dakika santrifüjlenerek çöktürülür.
 10. Süpernatant dökülür ve hücre peleti yavaşça 5 ml % 15 gliserollü 0.1 M kalsiyum klorid ile çözündürülür.
 11. Mikrosantrifüj tüplerine 250’şer µl olacak şekilde dağıtılır ve -80°C’de saklanır.
- Tüm süreç boyunca hücrelerin buzdan ayrılmamasına ve mekanik hasara duyarlılıklarına dikkat edilir [109].

3.3.16. Kompetan Hücrelerin Transformasyonu

Bu amaçla yapılan işlemler aşağıda sıralanmıştır.

1. Gerekli miktarda kompetan hücre -80°C’deki stoklarından buza çıkarılır.
2. Hücrelerin buzda çözünmesi beklenir.
3. Ligasyon ürünü ve izole edilmiş plazmid yavaşça eklenir.
4. Buz üstünde 30 dakika inkübe edilir.
5. 42°C’de bir dakika ısı şoku uygulanır ve tekrar buza alınarak 15 dakika daha inkübe edilir.
6. Ardından 250 µl SOC besiyeri eklenir ve 37°C’de 1 saat 250 rpm’de inkübe edilir.
7. İnkübasyon süresinin ardından uygun besiyerine yayma yöntemiyle ekim yapılır [109].

3.3.17. Pozitif Transformantların Seçilimi

Transformasyon sonrasında uygun antibiyotiği içeren besiyerinde 37°C’de inkübasyonun ardından büyüyen kolonilerin pozitif transformant olduğunu doğrulamak için koloni PCR yapılır. Bu amaçla içerisinde 100 µl MGW bulunan tüplere kolonilerden pipet ucuyla alınarak 95°C’de 5 dakika ısı bloğunda veya termal döngü cihazında ısıtılmıştır. Buradan 2 µl alınarak uygun primerler ile 3.3.6’da belirtildiği gibi PCR yapılır ve 3.3.10’da belirtildiği gibi agaroz jel elektroforez ile analiz edilir. PCR pozitif çıkan koloniler uygun antibiyotiği içeren LB besiyerinde 37°C’de 250 rpm’de bir gece inkübe edilir. Elde edilen kültürün bir kısmı 3.3.13’te belirtildiği gibi -80°C stoğu hazırlamakta kullanılırken kalan kısmından plazmid izolasyonu yapılır.

3.3.18. Plazmid İzolasyonu

Plazmid izolasyonunda. IntronBio DNA-Spin Plasmid DNA Purification Kiti, üreticinin talimatları doğrultusunda kullanılmıştır. Bu talimatlara göre yapılan işlemler aşağıda maddeler halinde sıralanmıştır [110].

1. Plazmid izolasyonu yapılacak bakteri süşunun uygun katı besiyerinde azaltma yöntemiyle yapılmış ekimi sonucu oluşan kültürden seçilen tek koloni ile uygun antibiyotiği içeren LB sıvı besiyerinde kültür başlatılır.
2. 37°C’de 250 rpm’de bir gece inkübasyonun ardından bu kültürden 3-5 ml 16000xg’de 30 saniye santrifüj edilir ve supernatant atılır.
3. Bakteri peleti 250 µl resüpsansiyon tamponunda vortekslenerek çözündürülür. Bu basamakta hücre agregatı kalmaması önemlidir.
4. Resüspvee edilmiş hücre çözeltisine 250 µl Lizis tamponu eklenir ve vortekslemeden tüp 10 kere tersine çevrilerek karışma sağlanır ve oda ısısında 3 dakika inkübe edilir.
5. 350 µl Nötralizasyon tamponu eklenerek yavaşça 10 kere ters çevrilerek karışma sağlanır ve buzda 5 dakika inkübe edilir.
6. 4°C’de 16000xg’de 10 dakika santrifüj edilir.
7. Santrifüjden sonra supernatant hemen kolon geçirilmiş koleksiyon tüpüne aktarılır.
8. 16000xg’de 1 dakika santrifüj edilir ve süzüntü atılır.

9. 500 µl Yıkama Çözeltisi A eklenir. 16000xg'de 1 dakika santrifüj edilir ve süzüntü atılır.
10. 700 µl Yıkama Çözeltisi B eklenir. 16000xg'de 1 dakika santrifüj edilir ve süzüntü atılır.
11. 16000xg'de 3 dakika daha santrifüj edilerek filtre membranının kuruması sağlanır.
12. Kolon temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılır ve membranın merkezine gelecek şekilde 50 µl Elüsyon Çözeltisi veya MGW eklenir.
13. Oda ısısında 1 dakika inkübasyonun ardından 16000xg'de 1 dakika santrifüj edilir. 260 nm'de absorbans ölçülerek miktar tayini yapılır ve kullanılabilecek kadar -20°C'de saklanır.

3.3.19. Bakteriyel Ekspresyonun Optimizasyonu

Bu amaçla yapılan işlemler aşağıda sıralanmıştır.

1. Üretilmek istenen proteinlerin genlerini taşıdığı doğrulanan plazmidler ekspresyonun gerçekleşeceği bakteri suşlarına 3.3.16'da belirtildiği gibi transforme edilir.
2. Bu transformasyondan sonra da 3.3.17'de belirtildiği gibi pozitif transformantlar doğrulanır.
3. Doğrulanan suşlar 3.3.13'te belirtildiği gibi stoklanır.
4. Ekspresyonun optimizasyonu için bakterilerin -80°C'deki stoklarından uygun antibiyotik içeren LB besiyerine aktarılır. 37°C'de 250 rpm'de inkübasyona bırakılır.
5. Ertesi gün 600 nm'de optik dansite 1-1.5 arası olduğunda bu kültürden ekspresyon besiyerine 1/50 oranında dilüsyon sağlayacak şekilde aktarılır.
6. Bu besiyerinde bakterilerin 600 nm'de optik dansitesi 0.400-0.600 arası olduğunda bakteri kültürü IPTG ile indüklenir.
7. İndüklemeye kullanılacak IPTG konsantrasyonu ve indüklenmenin gerçekleştirileceği sıcaklığın optimizasyonu için 0.1, 0.5, 1, 5 ve 10 mM IPTG ile 4, 16, 24 ve 37°C'de ekspresyon denenir. Ayrıca indüklenme

süresinin optimizasyonu için indüklenme sonrasındaki ilk 4 saat her saat başı ardından denenen sıcaklığa göre 12, 24, 48 ve 72. saatlerde örnek alınır.

8. Kültürden analiz etmek amacıyla 1 ml olarak alınan örnekler 16000xg'de 1 dakika santrifüj edilir ve pelet ile supernatant ayrı ayrı -20°C'de saklanır.

3.3.20. Kültür Örneklerinin Analizi

Kültürden alınan örneklerdeki proteinlerin incelenmesi ve bu proteinlerin arasında istenen kDa'da yüksek miktarda üretilmiş protein olup olmadığı sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile gerçekleştirilmiştir.

3.3.20.1. Protein Elektroforezi için Jel Hazırlanması

Bu amaçla beklenen proteinlerin 50 kDa'nın altında olması nedeniyle % 13 yığıcı (stacking) %17 ayırıcı (resolving) orvea SDS-PAGE jeller hazırlanmıştır [111]. Bu jellerin hazırlanması için gerekli bileşenler Tablo 3-9'da verilmiştir.

Tablo 3-9: Protein Elektroforezi için Jel Hazırlanması

	%17 Ayırıcı Jel	%13 Yığıcı Jel
dH₂O	1.7 ml	3.1 ml
Akrilamid/Bisakrilamid	5.7 ml	4.3 ml
1.5 M Tris-CI pH 8.8	2.5 ml	-
0.5 M Tris-CI pH 6.8	-	2.5 ml
%10 SDS	0.1 ml	0.1 ml
%10 APS	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	10 µl

Ayırıcı jel için 1.5 M Tris-CI pH 8.8, yığıcı jel için 0.5 M Tris-CI pH 6.8 kullanılır. 10 ml jel hazırlamak için gerekli miktarlar verilmiştir. Bir adet jel için yaklaşık 5 ml ayırıcı 1.5 ml yığıcı jel gerekmektedir.

SDS-PAGE jelinin hazırlanması amacıyla yapılan işlemler aşağıda sıralanmıştır.

1. Jel hazırlanması için gerekli camlar jel dökme sistemine yerleştirilir.
2. Jelin alt kısmını oluşturacak olan ayırıcı jel hazırlanır.

3. Bu amaçla en son %10 APS ve tetrametiletildiamin (TEMED) olmak üzere tüm bileşenler bir tüpe eklenir.
4. Karışım hazır olunca bekletilmeden iki cam arasına pipet yardımıyla yüklenir. Jelin düz bir şekilde katılaşmasını sağlamak için kalan boşluğa izopropanol yüklenir.
5. Ayırıcı jel donduktan sonra benzer şekilde yığıcı jel hazırlanır. İzopropanol uzaklaştırılır ve ayırıcı jel ile iki cam arası boşluk doldurulur ve tarak yerleştirilir.

3.3.20.2. Protein Elektroforezi için Örneklerin Hazırlanması

Bu amaçla yapılan işlemler aşağıda sıralanmıştır [111].

1. Bakteri peletleri üzerine 50 µl SDS örnek yükleme çözeltisi eklenir ve vortekslendikten sonra 95°C'ye ayarlanmış ısı bloğunda 10 dakika kaynatılır.
2. Ardından pelet örnekleri 9600xg'de 5 dakika santrifüj edilir.
3. Süpernatant örnekleri 2:1 oranında SDS örnek yükleme çözeltisi ile karıştırılır ve vortekslendikten sonra 95°C'ye ayarlanmış ısı bloğunda 10 dakika kaynatılır.

3.3.20.3. Örneklerin Yüklenmesi ve Yürütülmesi

Bu amaçla yapılan işlemler aşağıda sıralanmıştır [111].

1. Örnekler 3.3.20.2 'de belirtildiği şekilde hazırlandıktan sonra yürütme tankı hazırlanır.
2. 10x SDS yürütme tamponundan distile su ile 1x yürütme tamponu elde edilir.
3. Jeller tanka yerleştirilir ve tank üzerinde belirtilen seviyeye kadar 1x yürütme tamponu ile doldurulur.
4. Jellerden taraklar çıkarılır ve hazırlanan örnekler kuyu başına 10 µl olacak şekilde yüklenir.
5. İlk kuyuya protein markeri yüklenir.

6. Önce 50 voltta 20 dakika ardından 200 voltta 40 dakika yürütme işlemi gerçekleştirilir.

3.3.20.4. Jellerin Boyanarak İncelenmesi

Bu amaçla yapılan işlemler aşağıda sıralanmıştır [106].

1. Yürütme işleminin ardından jeller iki cam arasından çıkartılıp ısıya dayanıklı bir kaba alınır.
2. Jellerin üzerini kaplayacak kadar Coomasie boyama çözeltisi eklenir.
3. Mikrodalga fırında düşük güçte 1 dakika ısıtılır ve orbital çalkalayıcı üzerinde 10 dakika bekletilir.
4. Boyama çözeltisi dökülür ve jeller distile su ile boya akmayıncaya kadar yıkanır.
5. Jellerin üzerini kaplayacak kadar Coomasie boya uzaklaştırma çözeltisi eklenir ve mikrodalga fırında düşük güçte 1 dakika ısıtılır.
6. Boyayı tutması için jellerin yanına kağıt peçete yerleştirilip orbital çalkalayıcı üzerinde 5 dakika bekletilir.
7. Beyaz ışık tablası üzerinde jeller incelenir.

3.3.21. Denatüre Koşullarda Bakteri Lizisi

Bu amaçla yapılan işlemler aşağıda sıralanmıştır.

1. 3.3.19'da belirtildiği şekilde ekspresyon koşullarının optimizasyonu yapıp sonuçlar analiz edildikten sonra uygun ekspresyon koşulları belirlenir.
2. Uygun koşullarda bakteri kültürü tamamladıktan sonra bakteriler 4°C'de 3'de 10 dakika çöktürülür.
3. Buza alınan bakteriler üç kere 1xPBS ile yıkanır.
4. Yıkama işleminden sonra pelletler denatüre lizis tamponunda çözündürülür.
5. 3 kere -80°C'de dondurulup oda ısısında çözündürülür.
6. 3 dakika 10 saniyelik döngülerle %35-40 güçte sonikasyon yapılır.
7. 1, 1.5 saat oda ısısında tüp revolver üzerinde inkübe edilir.

8. İnkübasyonun ardından karışımın berraklaşma ve vizkosite oranına bakılarak lizisin başarısı değerlendirilir. Gerekli durumlarda dondur-çöz döngüsü, sonikasyon veya eklenen lizis tamponu miktarı arttırılabilir.

3.3.22. Spin Kolonlarla Protein Saflaştırma

Bu amaçla yapılan işlemler aşağıda sıralanmıştır [112].

1. Total hacmi 22 ml olan santrifüj kolonlarına (Thermo Scientific Pierce Centrifuge Columns 89898), 1 ml rezin (Thermo Scientific HisPur Ni-NTA Resin, 88222) eklenir.
2. 700 g 'de 2 dakika santrifüj edilir.
3. 2 ml denatüre liziz tamponu eklenir ve 700 g'de 2 dakika santrifüj edilir.
4. Lize edilmiş bakteri süspansiyonu kolona eklenir ve tüp revolverde 30 dakika inkübe edilir.
5. 700 g 'de 2 dakika santrifüj edilir ve süzüntü analiz etmek için saklanır.
6. 2 ml denatüre yıkama tamponu eklenir ve 700 g'de 2 dakika santrifüj edilir. Bu işlem iki kere daha tekrarlanır. Süzüntü analiz etmek için saklanır.
7. 1 ml denatüre elüsyon tamponu eklenir ve 700 g'de 2 dakika santrifüj edilir. Bu işlem iki kere daha tekrarlanır.
8. Toplam 3 ml elüsyon ürünü saflık derecesinin belirlenmesi için SDS-PAGE ile analiz edilir. 280 nm'de absorbansı ölçülerek miktar tayini yapılır. Saflaştırılmış protein Western Blotma ve EİA testlerinde kullanılır.

3.3.23. Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC-AKTA PURE Sistemi) ile Protein Saflaştırma

Bu amaçla yapılan işlemler aşağıda sıralanmıştır.

1. Saflaştırma işleminde kullanılacak tamponlar 0.22 µm'lik filtreden geçirilir.
2. Cihaz açıldıktan sonra önce tüm sistemden ddH₂O geçirilir.
3. Seçilen pompa ve girişlerden kullanılacak tamponlar geçirilir. Bu aşamada iletkenlik ve UV sabitlenene kadar tampon geçirilmeye devam edilir.

4. Sistem örneği yüklemek için hazır olduğunda örnek hacmi, kolon pozisyonu, seçilen kolonun özelliklerine göre kolon basıncı ve akış hızları, fraksiyonlama şekli ve hacimleri girilerek metod yazılır.
5. Elüsyon aşamasında 10 kolon hacminde lineer elüsyon, 20 kolon hacminde step elüsyon tercih edilmiştir.
6. Saflaştırma işlemi tamamlandıktan sonra kromatogram beklenen piklerin varlığı yönünden incelenir ve elde edilen fraksiyonlar SDS-PAGE ile analiz edilir.
7. Cihaz kapatılırken tüm sistemden önce ddH₂O ardından %20 etanol içeren ddH₂O geçirilir.
8. İstenilen saflıkta protein içerdiği belirlenen fraksiyonların 280 nm'de absorbansı ölçülerek miktar tayinleri yapılır. Saflaştırılmış protein Western Blotlama ve EIA testlerinde kullanılır.

3.3.24. Diyaliz

İstenilen miktarda ve saflıkta protein içerdiği belirlenen fraksiyonlar denatüre liz ve elüsyon tamponlarından kaynaklanan üre ve imidazolden arındırmak için diyaliz edilir. Bu amaçla fraksiyonlar diyaliz membranına (SnakeSkin Dialysis Tubing 10K MWCO, Thermo Scientific) alınır. İçerisinde PBS bulunan beherde 6-8 saatte bir PBS değiştirilerek düşük rpm'de manyetik karıştırıcı üzerinde 48 saat boyunca diyaliz edilir.

3.3.25. Western Blotlama

Bu amaçla yapılan işlemler aşağıda sıralanmıştır.

1. Western Blotlaması yapılacak proteinler SDS-PAGE ile yürütülür.
2. Yürütme işleminin ardından camlar arasından alınan jeller önce 5 dakika dH₂O'da ardından 5 dakika transfer tamponunda hafif çalkalama ile inkübe edilir.
3. Transfer kaseti transfer tamponu ile ıslatılır ve yine transfer tamponu ile ıslatılmış olan filtre kağıtları yerleştirilir. Filtre kağıtlarının üzerine jel boyutuna uygun olarak kesilmiş nitroselüloz membran yerleştirilir.
4. Hava kabarcığı ve kuru alan kalmaması için kontrol edildikten sonra jel yerleştirilir.

5. Jelin üzerine bir kat daha transfer tamponu ile ıslatılmış olan filtre kağıtları yerleştirilir. Transfer kaseti kapatılır ve cihaza yerleştirilir.
6. Maksimum 5.5 amper ve 25 voltta 7 dakika boyunca akım verilerek transfer sağlanır.
7. Transferden sonra membran önce 5 dakika dH₂O ile ardından 5 dakika TBST ile hafifçe çalkalanarak yıkanır.
8. Ardından taze hazırlanmış Western Bloklama Çözeltisi ile oda ısısında iki saat bloklama işlemi gerçekleştirilir.
9. Bloklamanın ardından membran bir kere TBST ile yıkanır ve Western bloklama çözeltisinde istenilen dilüsyonda primer antikor hazırlanır.
10. Membran primer antikor ile 4°C’de bir gece inkübe edilir.
11. İnkübasyonun ardından membran 5 kere 5 dakika TBST ile yıkanır.
12. Western bloklama çözeltisinde istenilen dilüsyonda sekonder antikor hazırlanır ve membran 1 saat oda ısısında sekonder antikor ile inkübe edilir.
13. İnkübasyonun ardından membran 5 kere 5 dakika TBST ile yıkanır.
14. Western Blotlamanın görüntülenmesinde sekonder antikor ile konjuge edilmiş yabanturpu peroksidazın peroksit içeren solüsyon ile reaksiyonundan yararlanılır. Okside edici madde ile reaksiyona girdiğinde 450 nm dalgaboyunda ışımaya sağlayan luminol, kemilüminesans görüntülemeyi mümkün kılarken solüsyona eklenen modifiye fenol gibi güçlendiriciler kemilüminesans sinyalin bin kattan daha fazla artmasını ve daha uzun süre ışımaya yapmasını sağlar. Bu amaçla Santa Cruz Western Blotlama Kemilüminesans Luminol (SC-2048) ayırıcı belirtilen oranlarda karıştırılıp membran üzerine uygulanır.
15. Fusion FX Solo cihazının Kemilüminesans ayarında görüntüleme yapılır.

3.3.26. EİA

Bu amaçla yapılan işlemler aşağıda sıralanmıştır.

1. Optimizasyon sonucunda belirlenen miktarda protein EİA Kaplama Tamponu içerisinde hazırlanır.

2. Hazırlanmış antijen kuyu başına 100 µl olacak şekilde dağıtılır. Plaka bir gece boyunca 4°C’de inkübe edilir.
3. Plaka kuyu başı 200 µl olacak şekilde bir kez EİA PBST Yıkama Tamponu ile yıkanır.
4. Kuyu başı 200 µl EİA Bloklama Tamponu eklenerek oda ısısında 2 saat boyunca bloklama gerçekleştirilir.
5. Bloklama tamponu boşaltılıp EİA Bloklama Tamponu içerisinde istenilen dilüsyonda hazırlanmış primer antikor karışımından kuyu başı 100 µl olacak şekilde eklenir ve 37°C’de 1 saat inkübe edilir.
6. Kuyu başı 200 µl olacak şekilde Yıkama Tamponu ile 3 kere yıkanır.
7. EİA Bloklama Tamponu içerisinde istenilen dilüsyonda hazırlanmış sekonder antikor karışımından kuyu başı 100 µl olacak şekilde eklenir ve 37°C’de 1 saat inkübe edilir.
8. Kuyu başı 200 µl olacak şekilde Yıkama Tamponu ile 3 kere yıkanır.
9. Yıkamanın ardından kuyu başı 100 µl olacak tetrametil benzidin substratı (ABCAM- ab171523) eklenir.
10. Oda ısısında 15-25 dakika arası inkübasyonun ardından önce 650 nm’de absorbans ölçülür.
11. Reaksiyonu durdurmak için kuyu başı 100 µl 2N H₂SO₄ eklenir ve 450 nm absorbans ölçülür.

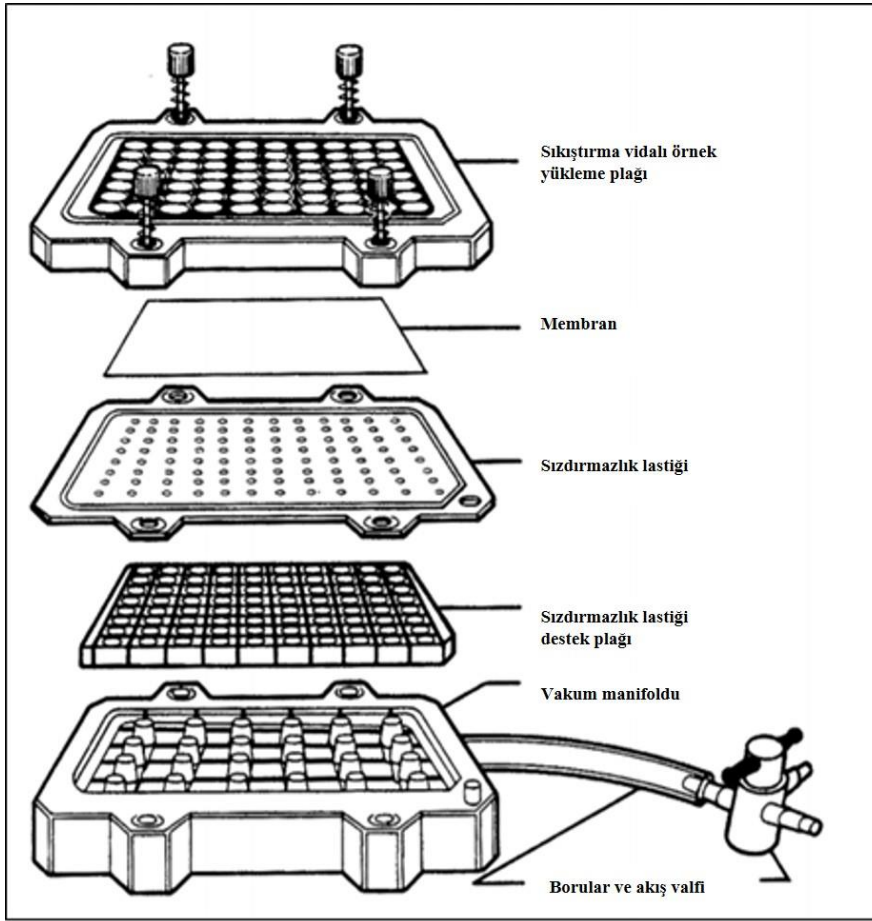
3.3.27. Dot-Blotlama

Boyutlarının küçük olması nedeniyle sentetik peptitler kullanılarak yapılacak blotlamalarda Western Blotlama yerine Dot-Blot metodu uygulanmıştır. Bu amaçla yapılan işlemler aşağıda sıralanmıştır [113].

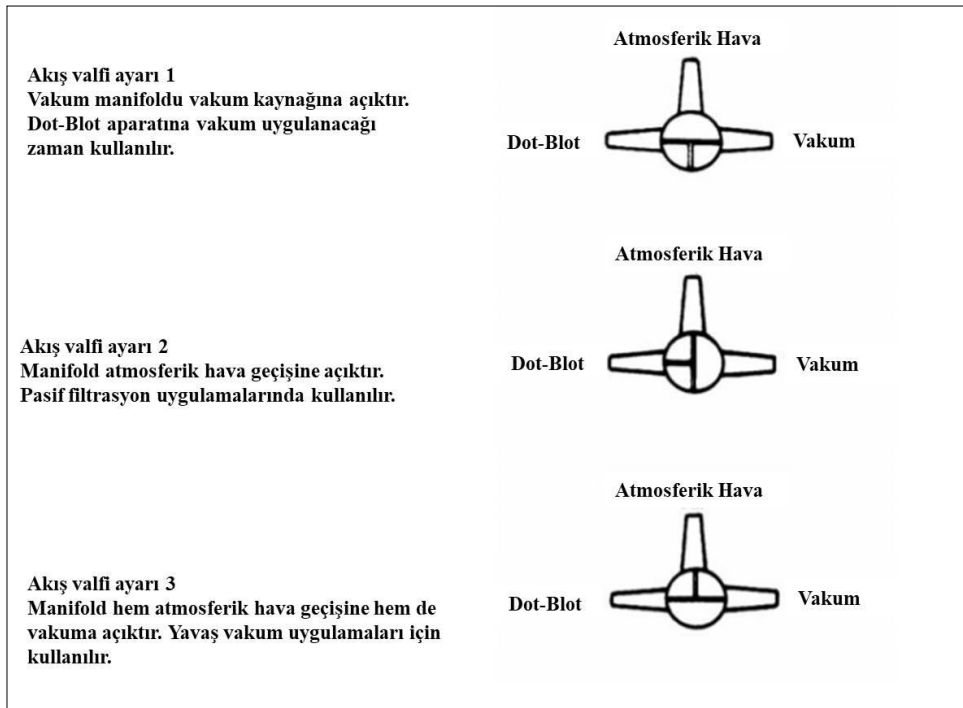
1. Birleştirmeden önce dot blot aparatının parçaları temizlenir ve üreticinin tarif ettiği şekilde aparat birleştirilir (Şekil 3-2).
2. Lastik şeriti destekleyen plaka vakum manifolduna yerleştirilir.
3. Sızdırmazlık lastiği destekleme plakasının üstüne yerleştirilir. Vakum manifoldu üzerindeki sıkıştırma vidaları plakalardaki kuyuların hizalanmasına yardımcı olur.

4. Dot-blot aparatına yerleştirmeden önce nitroselüloz membran TBS ile ıslatılır.
5. Örnek yükleme plakası membranın üzerine yerleştirilir. Sıkıştırma vidaları diagonal çaprazlama modeli kullanılarak sıkıştırılır.
6. Arada atık kabı olacak şekilde akış valfine vakum kaynağı bağlanır. Valf aparata vakum uygulanacak pozisyona ayarlanır (akış valfi ayarı 1 Şekil 3-3).
7. Vakum varlığında diagonal çaprazlama modeli kullanılarak sıkıştırma işlemi tekrarlanır.
8. Vakum manifoldu hava basıncına açık olacak şekilde akış valfi ayarlanır (akış valfi ayarı 2 Şekil 3-3). Her kuyuya 100 µl tampon çözeltisi eklenir.
9. Yavaşça vakum uygulanarak tampon çözeltisi kuyulardan uzaklaştırılır (akış valfi ayarı 3 Şekil 3-3). Bu aşamada kuyulardaki tampon çözelti miktarı takip edilir. Tampon çözeltisi kuyulardan uzaklaştırıldığı ve akış valfi ayarı 2'ye getirilir ve vakum kaynağı kapatılır.
10. Örnekler kuyulara yüklenir. Örneklerin membrvean geçişi pasif filtrasyon ile gerçekleştirilir. Bu aşamada 100 µl örneğin pasif filtrasyonu 30-40 dakikada gerçekleşmektedir.
11. Örnekler kuyulardan süzöldökten sonra kuyulara 300 µl bloklama çözeltisi eklenir. Bloklama çözeltisinin membrvean geçişi pasif filtrasyon ile gerçekleştirilir ve bu aşama yaklaşık 60 dakikada gerçekleşmektedir.
12. Kuyulara 200 µl TBST eklenir ve vakum uygulanır. TBST çözeltisi süzöldöğü ve vakum kapatılır. Bu işlem bir kere daha tekrarlanır.
13. Akış valfi ayarı 2'de iken primer antikor olarak 1:4000 dilösyonda hazırlanmış insan serumlarından, 1:1000 veya 1:100 oranında hazırlanmış fare serumlarından kuyu başına 100 µl eklenir. Primer antikorun membrvean pasif filtrasyon ile süzölmesi 30-40 dakikada gerçekleşmektedir.
14. Kuyulara 200 µl TBST eklenir ve vakum uygulanır. TBST çözeltisi süzöldöğü ve vakum kapatılır. Bu işlem iki kere daha tekrarlanır.

15. Akış valfi ayarı 2’de iken sekonder antikor olarak 1:500 dilüsyonda hazırlanmış koyun anti-insan IgG HRP (Abcam 6858) veya 1:200 oranında hazırlanmış koyun anti-fare IgG-HRP (Santa Cruz 2031) kuyu başına 100 µl olacak şekilde eklenir. Sekonder antikorun membrvean pasif filtrasyon ile süzülmesi 30-40 dakikada gerçekleşmektedir.
16. Kuyulara 200 µl TBST eklenir ve vakum uygulanır. TBST çözeltisi süzüldüğü vea vakum kapatılır. Bu işlem iki kere daha tekrarlanır.
17. Membran aparattan ayrılır ve iki kere TBS ile yıkanır. Kemilüminesans görüntüleme için Santa Cruz Western Blotlama Kemilüminesans Luminol (SC-2048) ayracı belirtilen oranlarda karıştırılıp membran üzerine uygulanır.
18. Fusion FX Solo cihazının Kemilüminesans ayarında görüntüleme yapılır.



Şekil 3-2: Dot-Blot cihazının birleştirilmesi.



Şekil 3-3: Akış valfi ayarları.

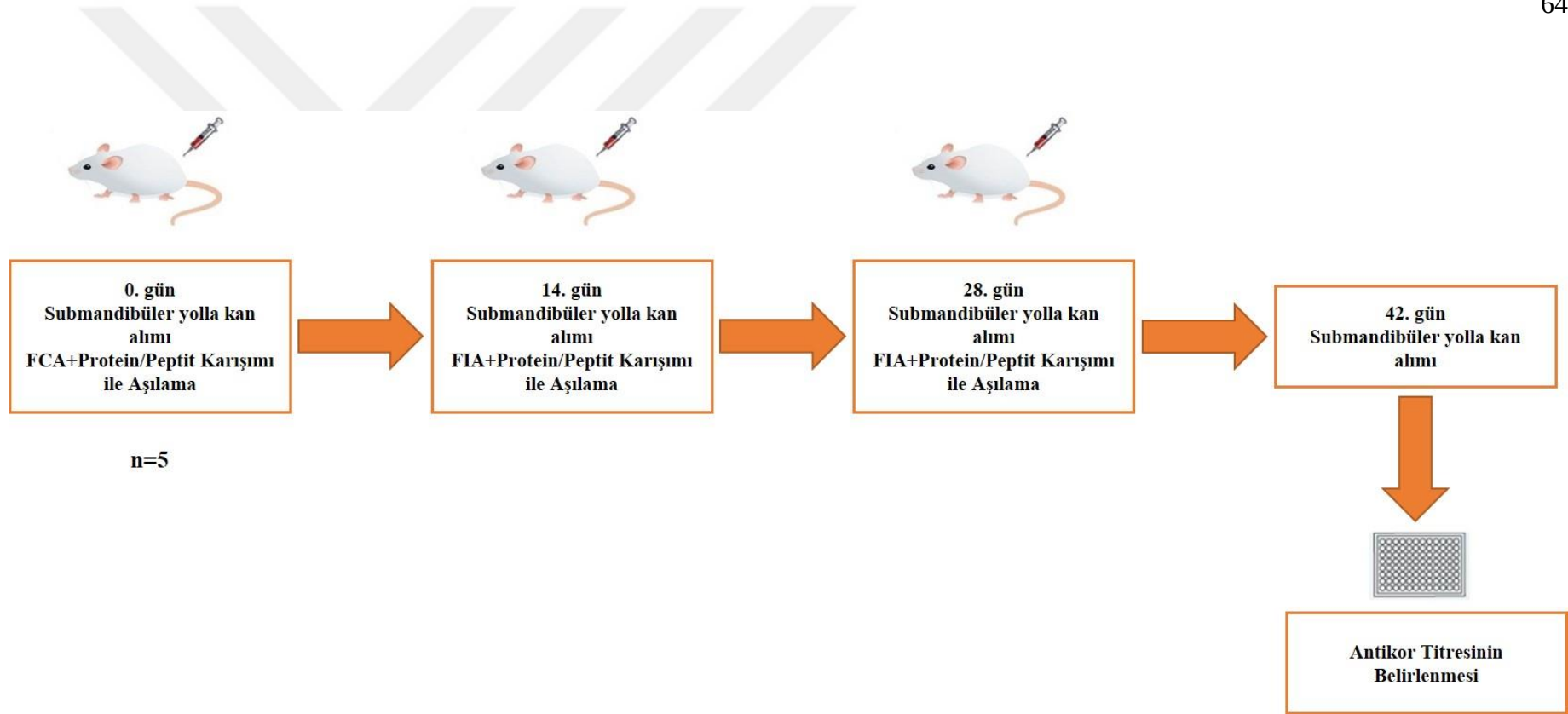
3.3.28. Poliklonal Antikor Eldesi

Üretilen rekombinant proteinlere ve sentetik peptitlere karşı poliklonal antikor elde etmek amacıyla her grup için 5 adet olacak şekilde 4-6 haftalık erkek Balb/c fareleri kullanılmıştır. Bağışıklamada kullanılmak üzere; proteinler son konsantrasyonları 1 mg/ml, peptitler ise son konsantrasyonları 200 µg/ml olacak şekilde Freund Komple (Freund's Complete Adjuvant/FCA Sigma F5881) ve İnkomple (Freund's Incomplete Adjuvant/FIA Sigma 5506) Adjuvanları içerisinde ayrı ayrı olacak şekilde emülsiyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan emülsiyonların enjeksiyonları subkutan yolla gerçekleştirilmiştir. Her bağışıklamadan önce ve son bağışıklamadan 2 hafta sonra farelerin fasiyal venlerinden kan alınmıştır. Alınan kanlar serum eldesi amacıyla 30 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 500xg'de 5 dakika santrifüj edilmiş ardından -80°C'de muhafaza edilmiştir. Bağışıklama takvimi Şekil 3-4'te verilmiştir.

3.4. İstatistiksel Analiz

Rekombinant proteinler ve sentetik peptitlerin yakalayıcı antijen olarak kullanıldığı EİA testlerinde sınır değeri belirlenmesinde üç kez tekrar edilen test sonuçlarından KKKAV antikor negatif hasta serumlarından elde edilen optik dansitelerle stveart sapma hesaplanmış, KKKAV antikor negatif hasta serumlarının ortalama değerine 2 stveart sapma değeri eklenmiştir. Hesaplanan bu sınır değerin üstünde kalan optik dansiteye sahip hasta serumları pozitif, altında kalan optik dansiteye sahip hasta serumları ise negatif olarak kabul edilmiştir.

Poliklonal serum eldesi amacıyla bağışıklanmış farelerin serumlarında rekombinant proteinlere ve sentetik peptitlere spesifik IgG'lerin tespit edilebildiği dilüsyonların belirlenmesinde gereken istatistiksel analizler t test metoduyla Graphad Prism 6 programında yapılmıştır.



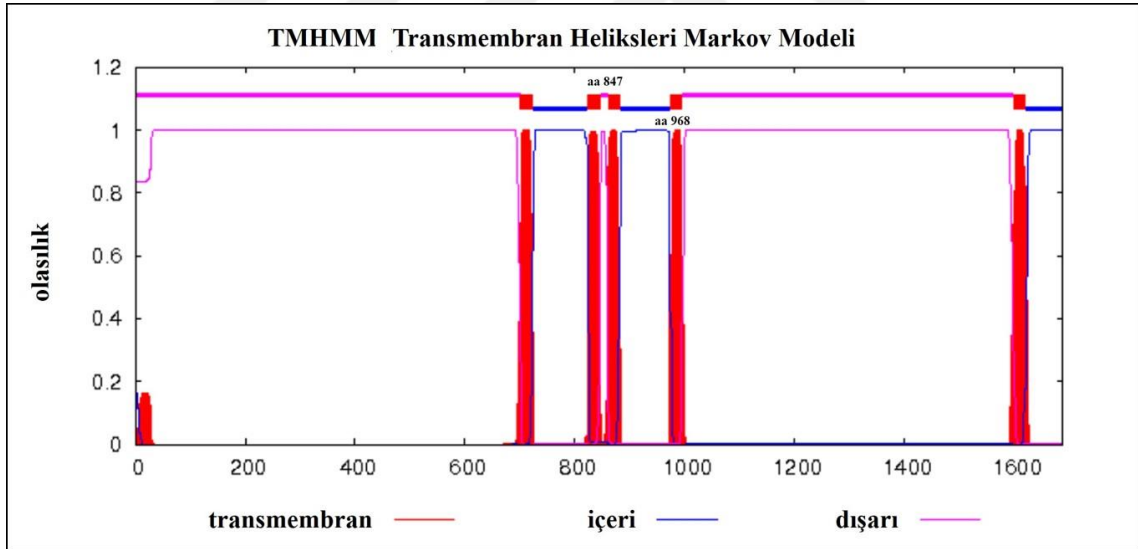
Şekil 3-4: Poliklonal antikor eldesinde bağışıklama takvimi.

4. BULGULAR

4.1. Kelkit06 NSm ve NSs Proteinlerinin Belirlenmesi

4.1.1. Kelkit06 NSm Proteininin Belirlenmesi

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü 10200 suşu kullanılarak yapılan çalışmada belirlenen NSm proteini için belirtilen sekans bilgileri kullanılarak KKKAV Kelkit06 suşunda NSm proteini belirlenmiştir [75]. Bu çalışmada M poliproteininin 843. ve 968. amino asitleri arasındaki bölgenin NSm olduğu belirtilmiş, aynı bölgenin Kelkit06 suşuyla eşleşen sekansı belirlenmiştir. İki protein sekansının hizalanması sonucunda sekanslarının %83.16 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Kelkit06 suşunun transmembran domainleri ve NSm'in başlangıç ve bitiş amimoasitleri Şekil 4-1'de gösterilmiştir.

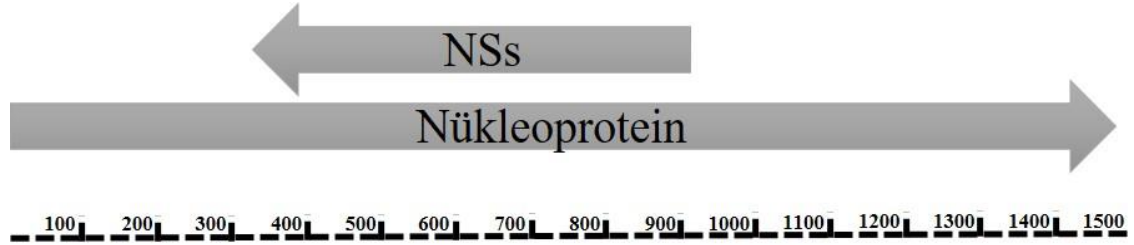


Şekil 4-1: KKKAV Kelkit06 suşu M poliproteininin transmembran heliksleri ve NSm'in lokasyonu.

4.1.2. Kelkit06 NSs Proteininin Belirlenmesi

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü Kelkit06 suşunun NSs'i açık okuma çerçevesi belirleyen program yardımıyla bulunmuştur (Şekil 4-2). Elde edilen sekans

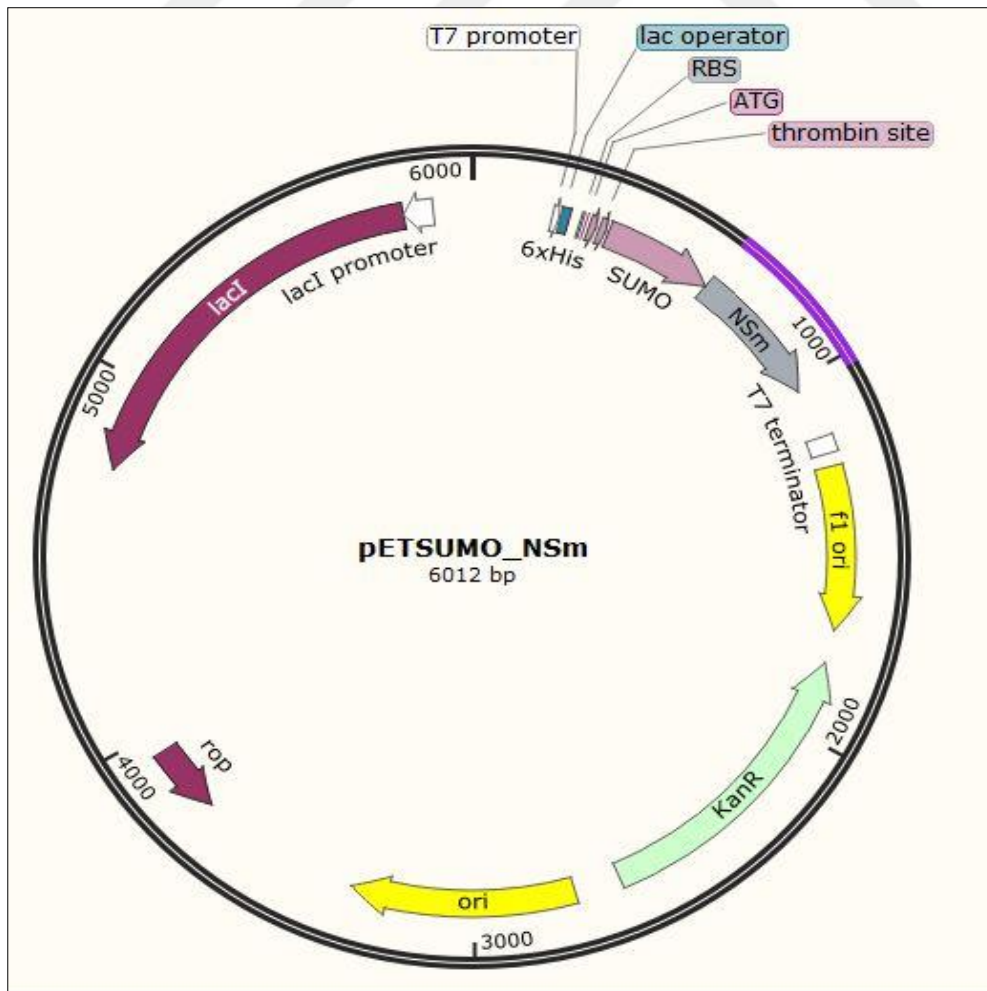
KKKAV 10200 suşu ile karşılaştırıldığında %92.67 oranında benzer oldukları belirlenmiştir.



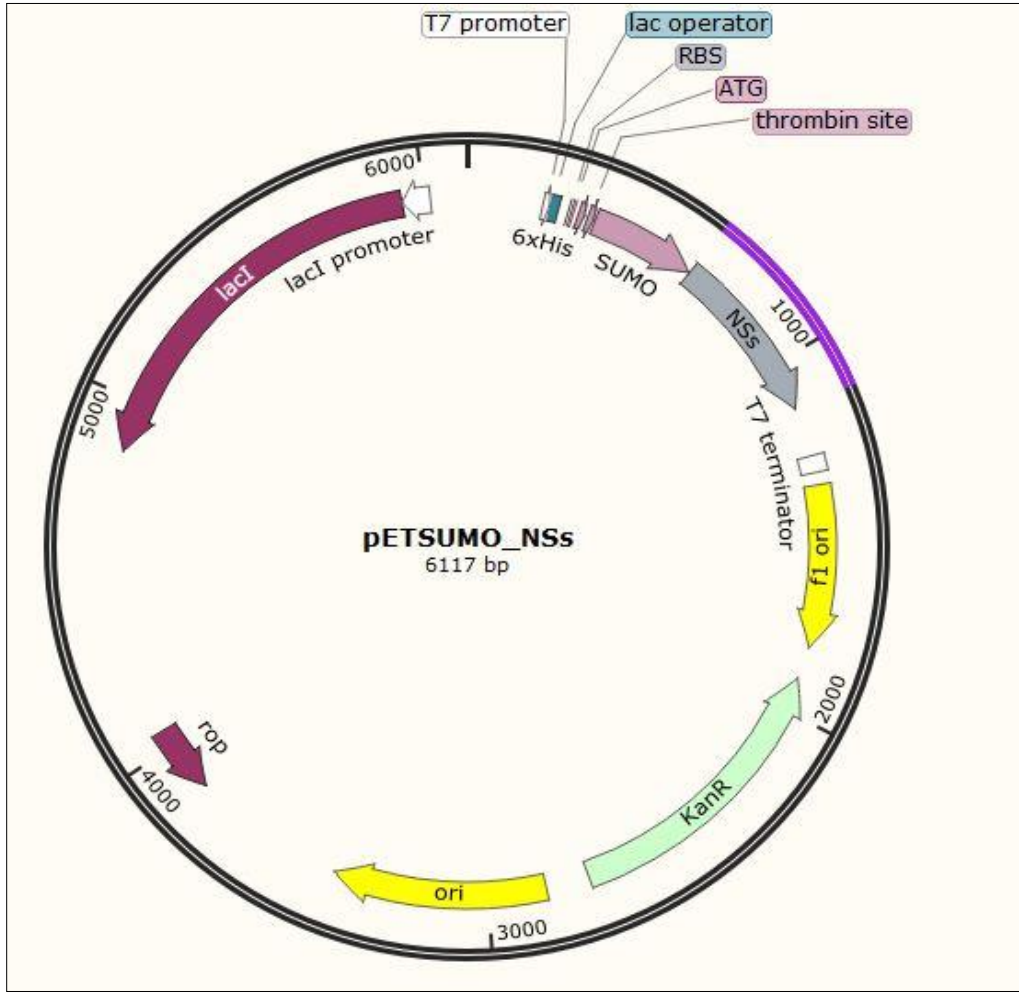
Şekil 4-2: KKKAV Kelkit06 suşunda nükleoprotein ve NSS'in açık okuma çerçeveleri.

4.1.3. NSm ve NSs Genlerinin pETSUMO Vektörüne Klonlanması

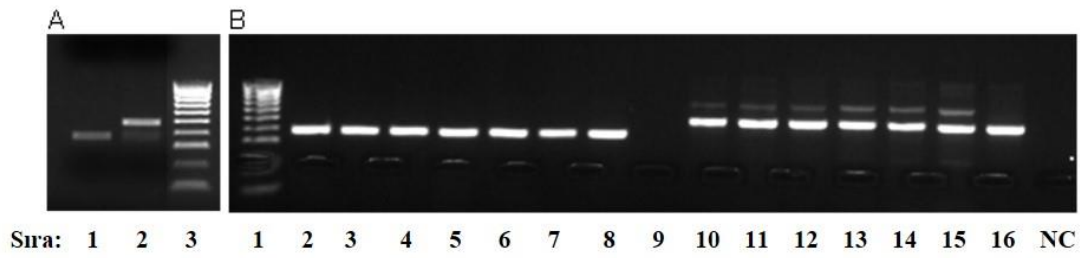
Vektör haritaları Şekil 4-3 ve Şekil 4-4'te verildiği gibi klonlanan genlerin klonlama sırasında PCR ile doğrulanmasına ait sonuçlar Şekil 4-5'te gösterilmiştir.



Şekil 4-3: NSm geninin pETSUMO vektörüne klonlanması.



Şekil 4-4: NSs geninin pETSUMO vektörüne klonlanması.

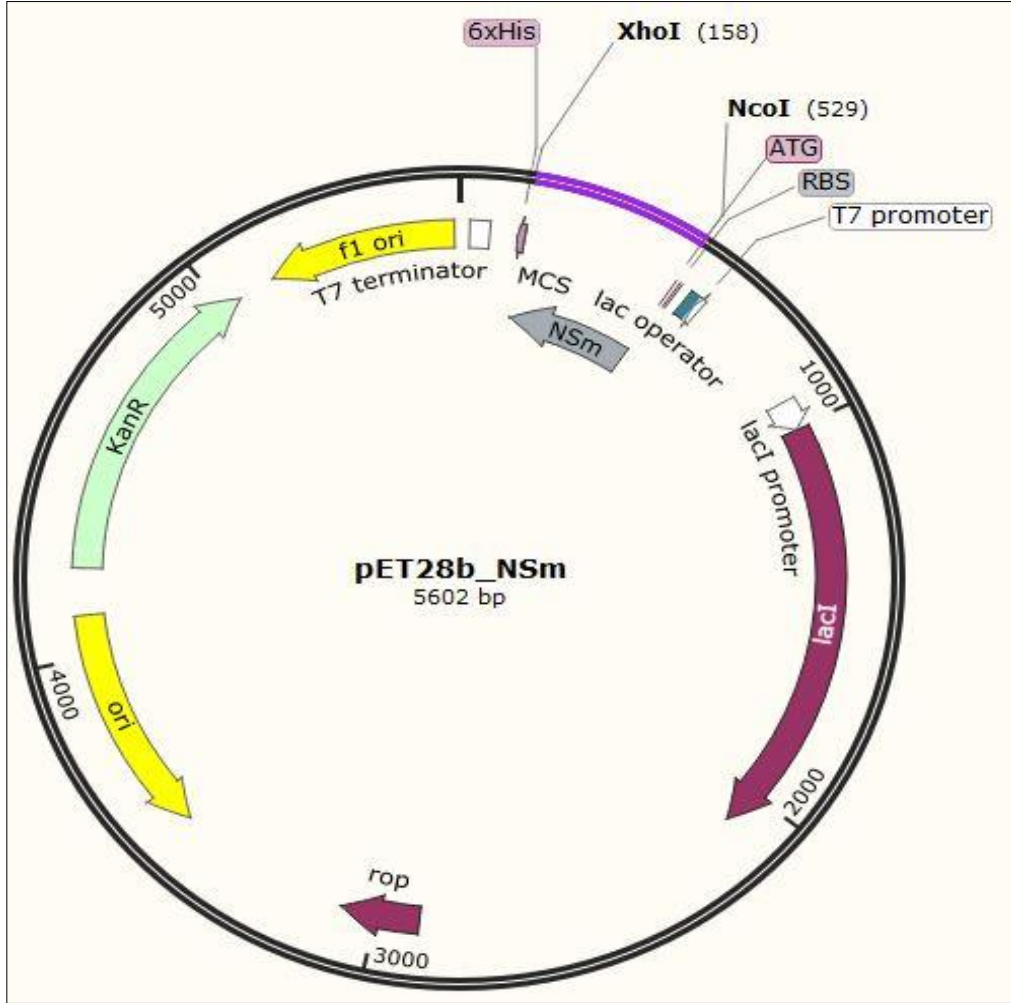


Şekil 4-5: NSm ve NSs genlerinin pETSUMO vektörüne klonlama aşamalarının kontrolü.

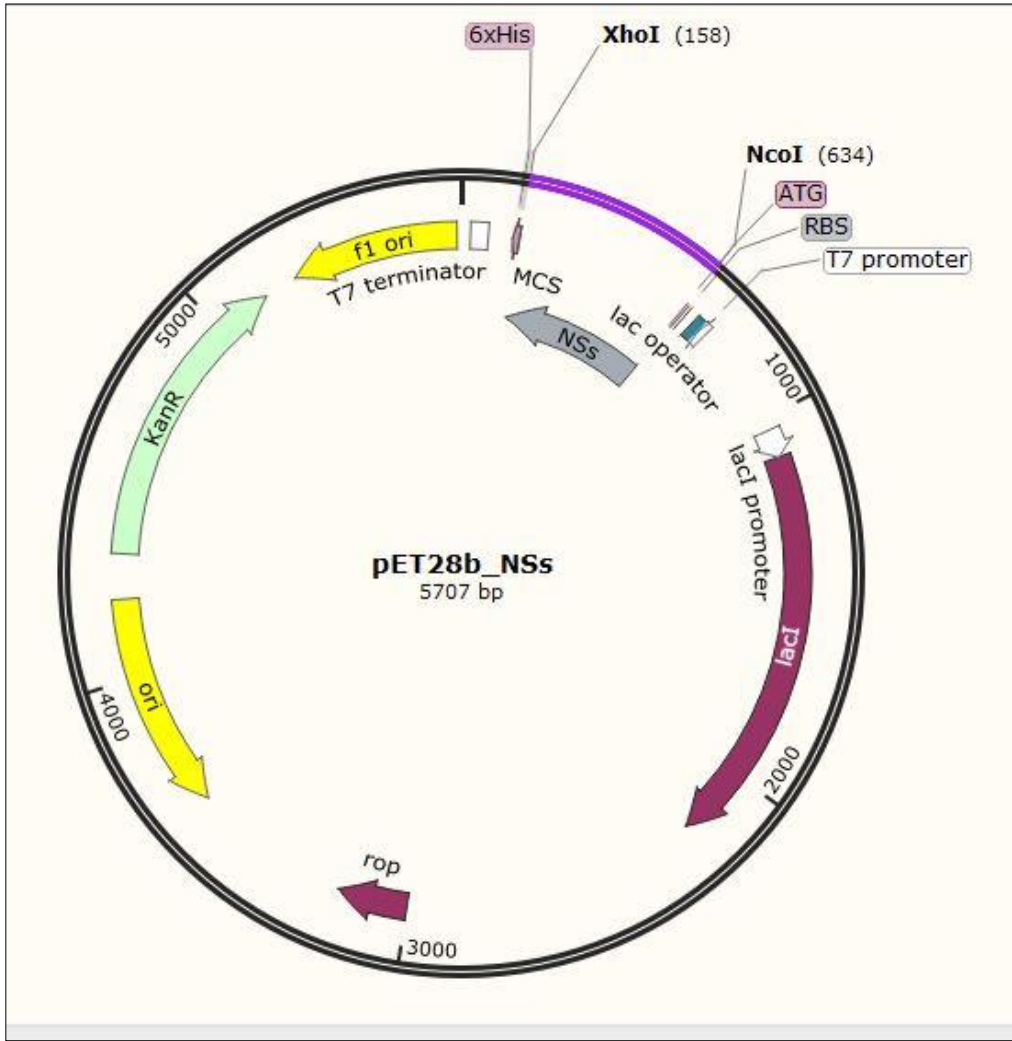
A) NSm ve NSs genlerinin pETSUMO vektörüne klonlanıp *Escherichia coli* One Shot suşuna transformasyonları sonrası PCR ile kontrollerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü Sıra 1: NSm Sıra 2: NSs Sıra 3: 100 baz çiftlik ladder
B) *Escherichia coli* BL21 (DE3) suşuna transformasyon sonrası seçilen kolonilerin PCR ile kontrollerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü Sıra 1: 100 baz çiftlik ladder Sıra 2-8: NSm geninin transforme edildiği yedi farklı koloni Sıra 10-16: NSs geninin transforme edildiği yedi farklı koloni Sıra 9/17: Negatif kontrol.

4.1.4. NSm ve NSs Genlerinin pET28b Vektörüne Klonlanması

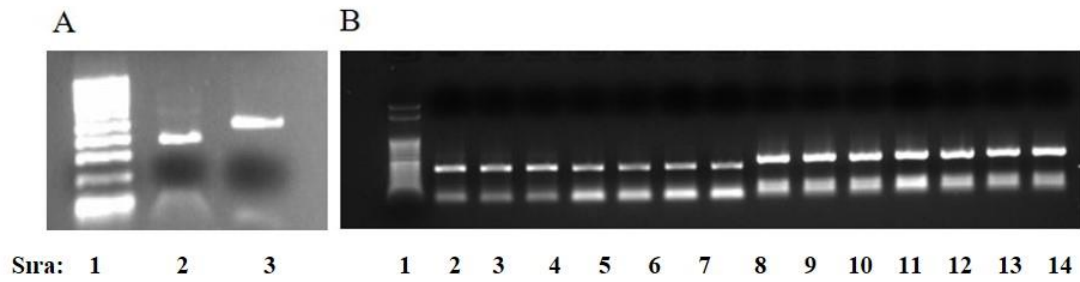
Vektör haritaları Şekil 4-6 ve Şekil 4-7’de verildiği gibi klonlanan genlerin klonlama sırasında PCR ile doğrulanmalarına ait sonuçlar Şekil 4-8’de gösterilmiştir.



Şekil 4-6: NSm geninin pET28b vektörüne klonlanması.



Şekil 4-8: NSs geninin pET28b vektörüne klonlanması.

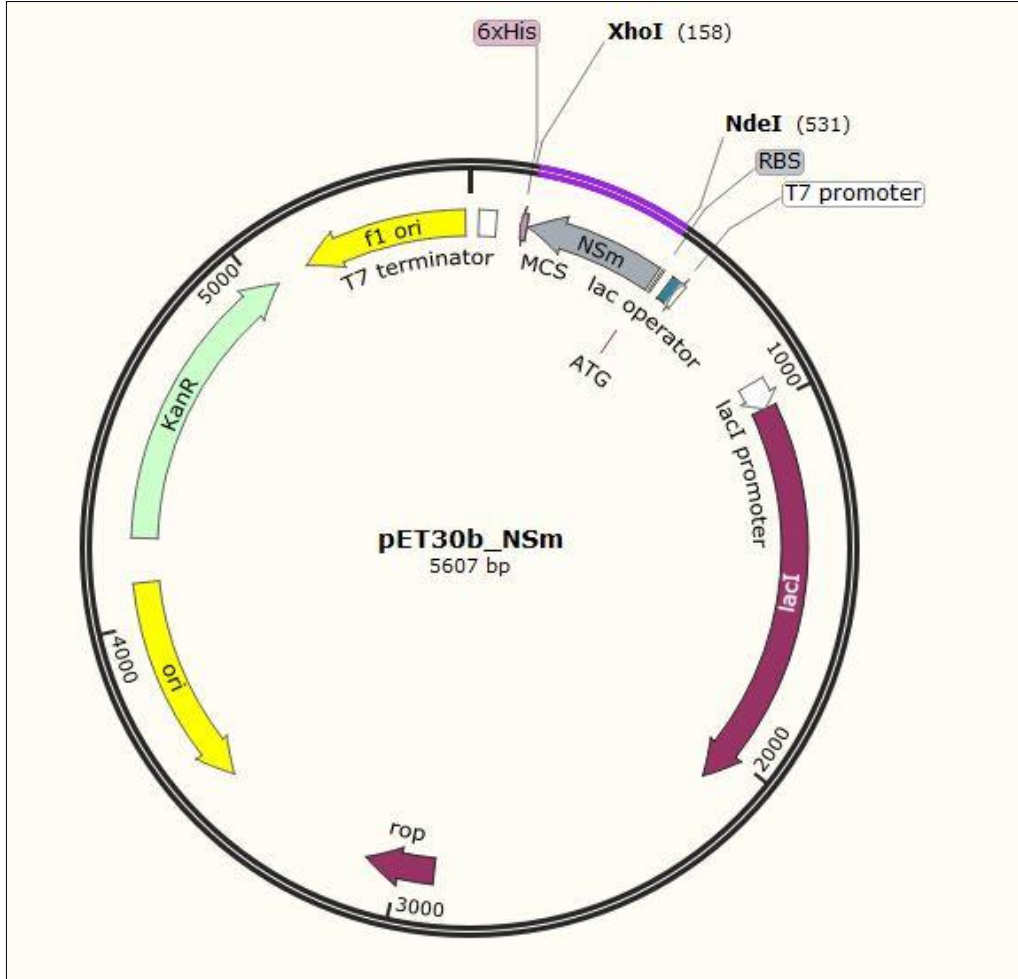


Şekil 4-7: NSm ve NSs genlerinin pET28b vektörüne klonlanmasının kontrolü.

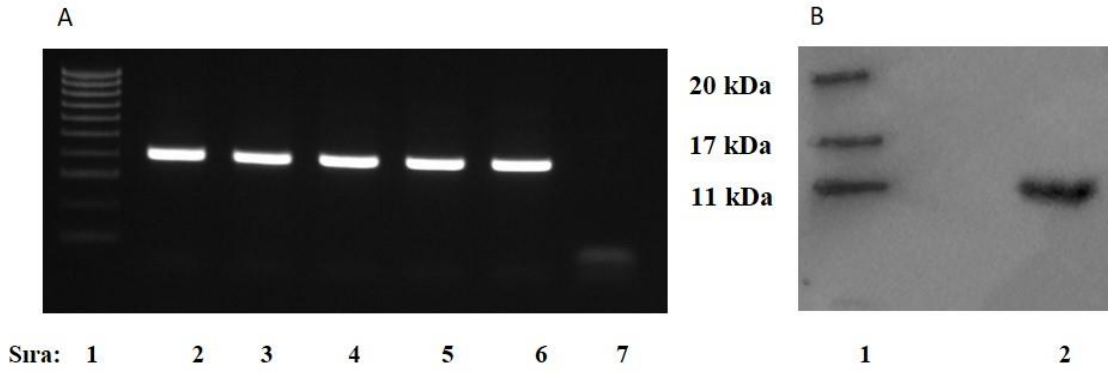
A) *Escherichia coli* One Shot suşuna transforme edilmiş NSs ve NSm genlerinin PCR ile kontrolüne ait agaroz jel elektroforez görüntüleri: Sıra 1: 100 baz çiftlik ladder Sıra 2: 369 baz çifti uzunluğunda NSm geni Sıra 3: 474 baz çifti uzunluğunda NSs geni. B) *Escherichia coli* BL21 (DE3) suşuna yapılan transformasyondan sonra seçilen transformantların PCR ile kontrolüne ait agaroz jel elektroforez görüntüleri Sıra 1: 50 baz çiftlik ladder Sıra 2-8: NSm geninin transforme edildiği yedi farklı koloni Sıra 9-15: NSs geninin transforme edildiği yedi farklı koloni.

4.1.5. NSm Geninin pET30b Vektörüne Klonlanması

Vektör haritaları Şekil 4-9’da verildiği gibi klonlanan genin klonlama sırasında PCR ile doğrulanmasına ait sonuçlar Şekil 4-10’da gösterilmiştir.



Şekil 4-9: NSm geninin pET30b vektörüne klonlanması.



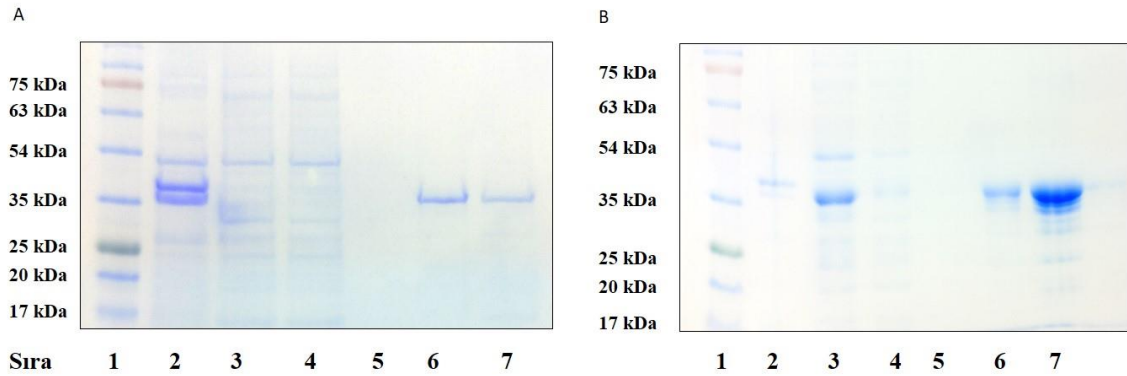
Şekil 4-10: NSm geninin pET30b vektörüne klonlanma aşamalarının kontrolü.

A) Klonlama sonrası transformant kolonilerin PCR ile doğrulanmasını gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü Sıra 1:100 bazçiftlik ladder Sıra 2-6: Seçilen pozitif koloniler Sıra 7: Negatif Kontrol B) pET30b vektörüne klonlandıktan sonra BL21 (DE3) suşunda eksprese edilen proteinin Anti-His antikoru kullanılarak Western Blotlama ile doğrulanması.

4.2. Üretilen Proteinlerin Saflaştırılması

4.2.1. Proteinlerin Spin Kolonlar Aracılığıyla Saflaştırılması

pETSUMO vektörüne klonlama sonucu üretilen NSm ve NSs proteinlerinin spin kolonlar kullanılarak saflaştırılmasına ait sonuçlar Şekil 4-11’de gösterilmiştir.

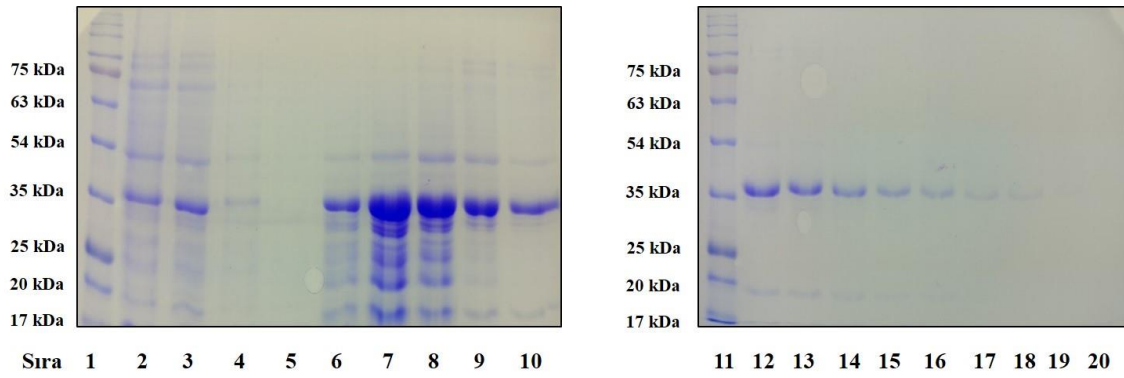


Şekil 4-11: pETSUMO sisteminde üretilen NSm ve NSs proteinlerinin Ni-NTA spin kolonlarıyla saflaştırılması

A) NSm’in saflaştırılma işleminin SDS-Page analizi Sıra 1: Protein ladder Sıra 2: bakteri peleti Sıra 3: Bakteri Lizisi Sıra 4: Flow through Sıra 5: Wash Sıra 6: Elution Sıra 7: Concentration. NSs’in saflaştırılma işleminin SDS-Page analizi Sıra 1: Protein ladder Sıra 2: bakteri peleti Sıra 3: Bakteri Lizisi Sıra 4: Flow through Sıra 5: Wash Sıra 6: Elution Sıra 7: Concentration.

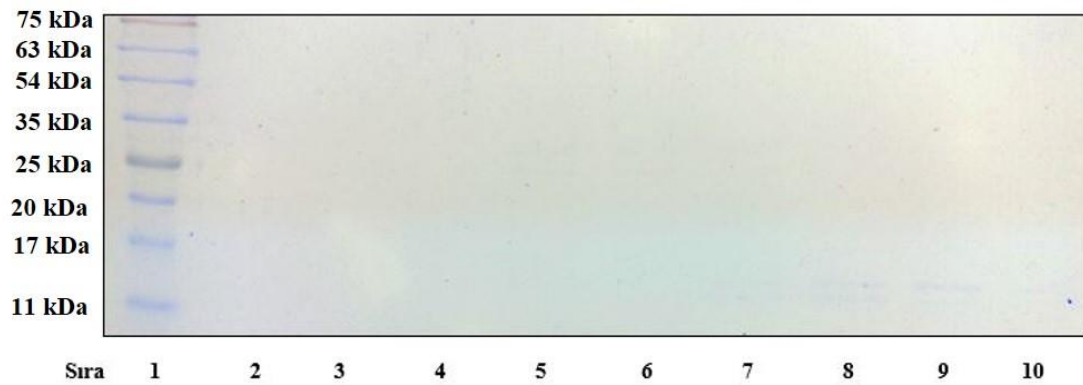
4.2.2. Proteinlerin FPLC AKTA Pure Sistemi ile Saflaştırılması

pETSUMO vektörüne klonlama sonucu üretilen NSs ve pET30b vektörüne klonlama sonucu üretilen NSsm proteinlerinin SDS-PAGE yöntemi ile saflıklarının incelenmesine ait sonuçlar Şekil 4-12 ve 4-13'te, FPLC AKTA Pure sistemi kullanılarak saflaştırılmalarına ait kromatogram sonuçları ise Şekil 4-14 ve 4-15'te gösterilmiştir.



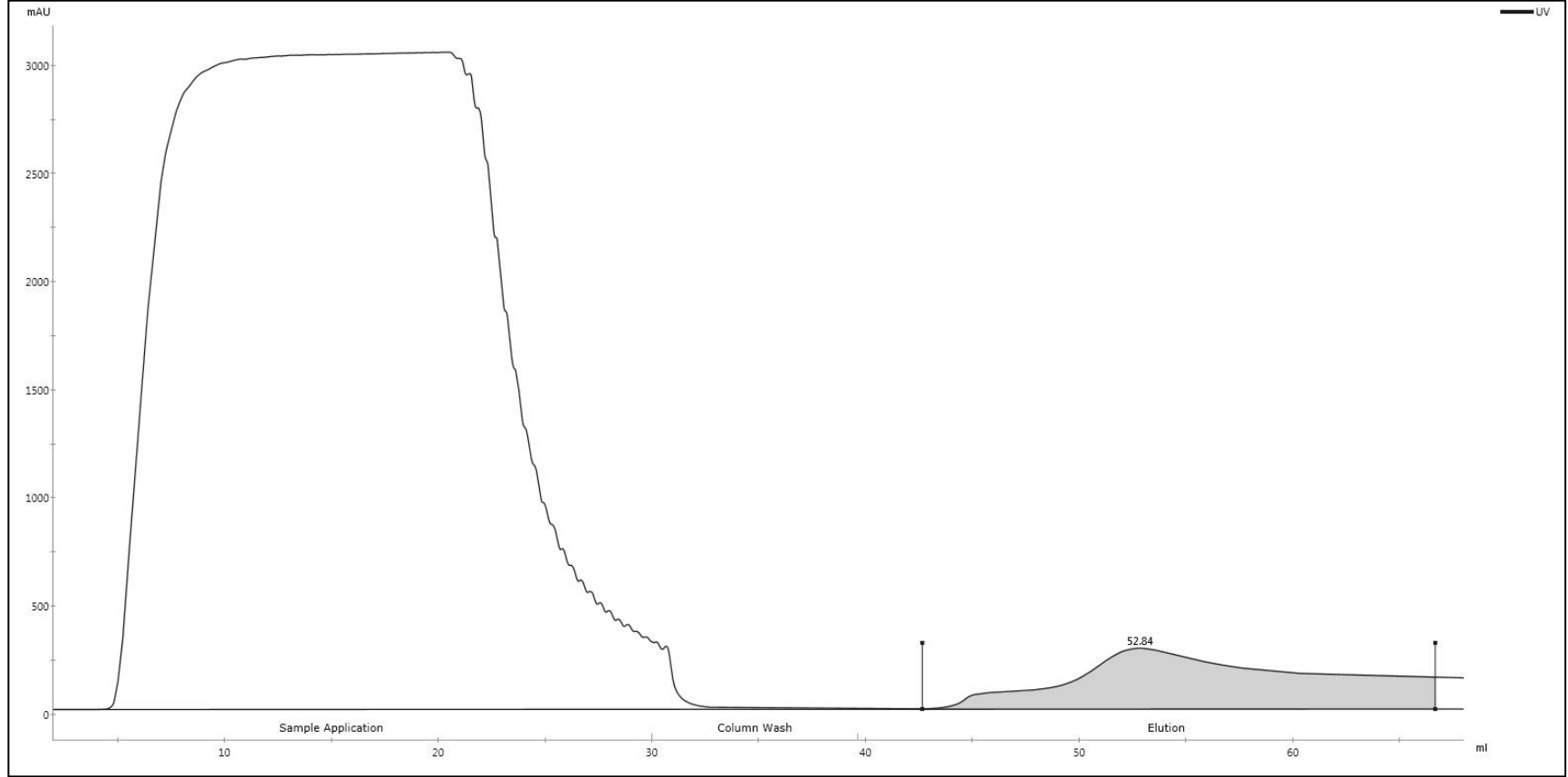
Şekil 4-12: pETSUMO sistemiyle üretilen NSs proteininin saflaştırılmasının incelenmesi.

FPLC sonrasında elde edilen fraksiyonların SDS-PAGE ile analizi. Sıra 1/11: Protein ladder Sıra 2-4: Örnek yüklenmesi Sıra 5: Yıkama Sıra 6-10/12-18: Protein fraksiyonları.

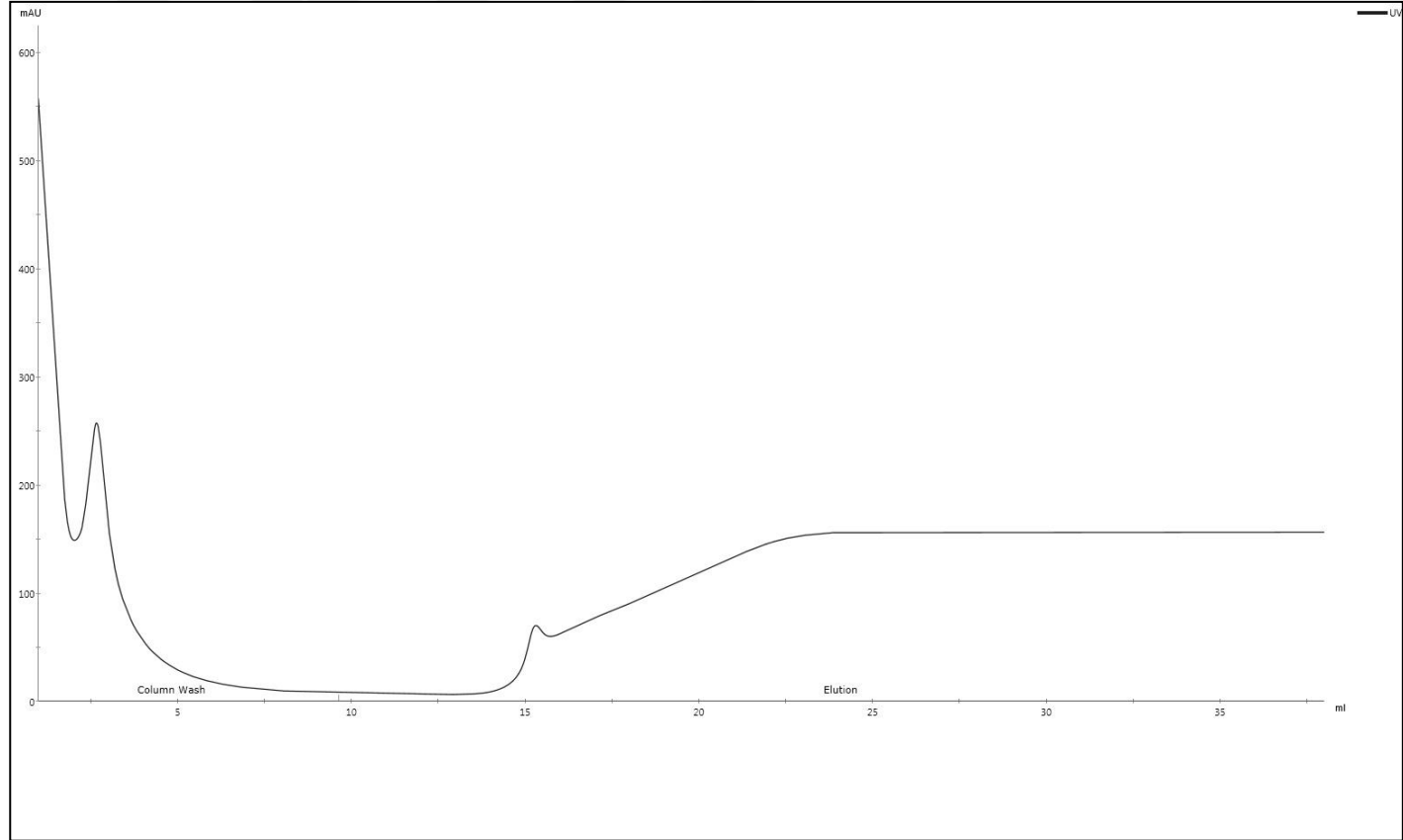


Şekil 4-13: pET30b sistemiyle üretilen NSsm proteininin saflaştırılmasının incelenmesi.

FPLC sonrasında elde edilen fraksiyonların SDS-PAGE ile analizi. Sıra 1: Protein Sıra 2-4: Örnek yüklenmesi Sıra 5: Yıkama Sıra 6-10: Protein fraksiyonları.



Şekil 4-14: pETSUMO sistemi ile üretilen NSs proteininin saflaştırılmasına ait kromatogram.

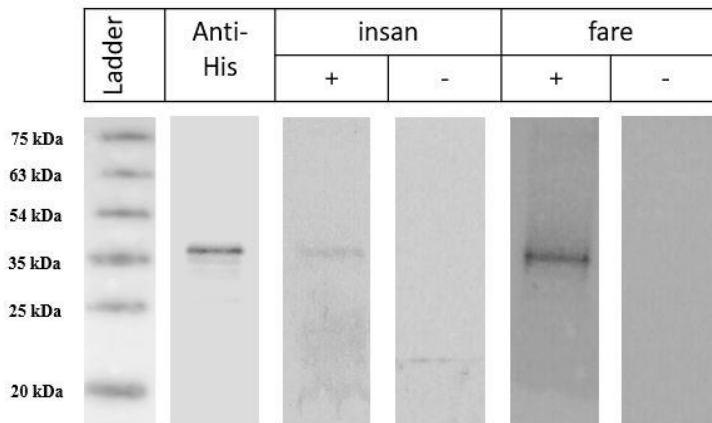


Şekil 4-15: pET30b sistemi ile üretilen NSm proteininin saflaştırılmasına ait kromatogram.

4.3. Rekombinant Proteinlerin Analizi

4.3.1. rNSs'in Analizi

Rekombinant NSs proteininin üretiminin doğrulanması amacıyla Anti-His antikorları ile, NSs proteinine karşı antikor yanıtının araştırılması amacıyla KKKAV ile infekte hasta serumu ve sağlıklı insan serumu ile, bu proteininin farelerde oluşturduğu antikor yanıtının belirlenmesi amacıyla ise NSs ile bağışıklanmış farelerden elde edilen serumlar kullanılarak Western Blotlama yapılmıştır. Anti-His antikorları ile reaksiyon elde edilmesi proteinin His-Tag barındırdığını doğrulamış, KKKAV antikor pozitif insan serumu ile reaksiyon vermesi ise NSs spesifik IgG varlığını göstermiştir. rNSs ile bağışıklanmış fare serumu ile reaksiyon elde edilmesi ise bağışıklamanın gerçekleştiğini göstermiştir. Western Blotlamalara ait sonuçlar Şekil 4-16'da verilmiştir.

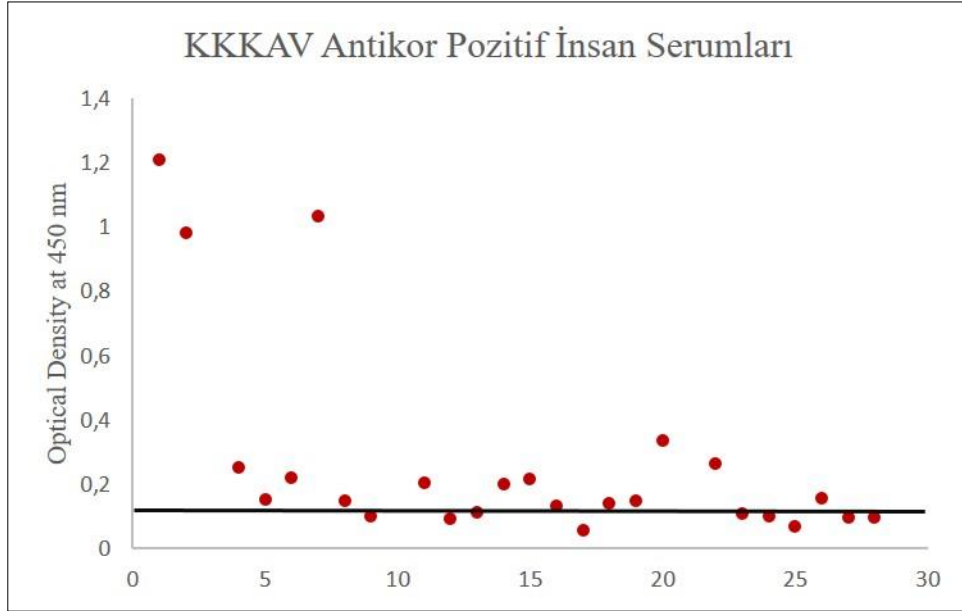


Şekil 4-16: rNSs in immünolojik analizi.

rNSs'in Western Blotlaması. Sıra 1: Ladder, Sıra 2: Anti His antikorları, Sıra 3: KKKAV antikor pozitif insan serumu (1:4000) , Sıra 4: KKKAV antikor negatif insan serumu (1:4000) , Sıra 5: rNSs ile bağışıklanmış fare serumu (1:1000) , Sıra 6: Naiv fare serumu (1:1000) ile rNSs'in tepkimesi.

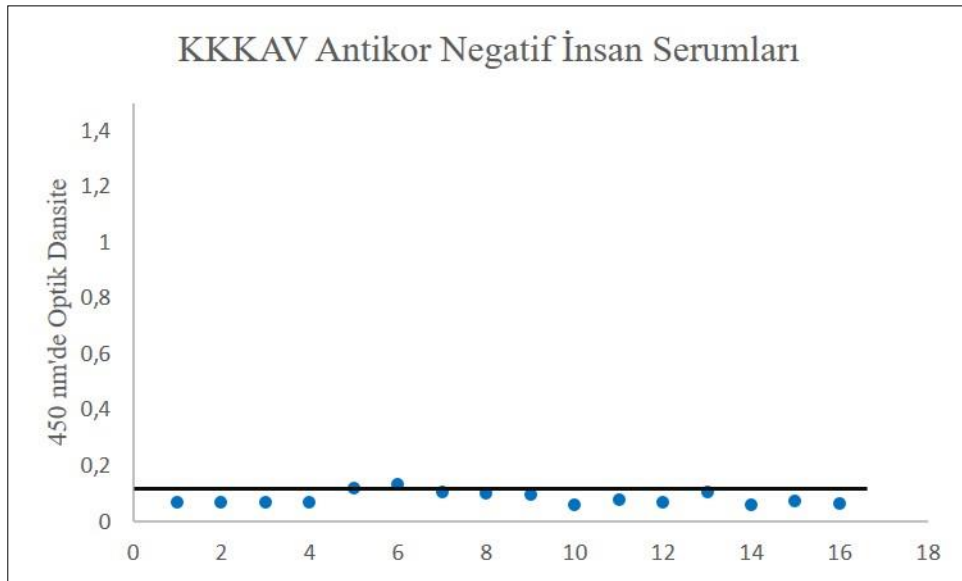
rNSs ile kaplanmış mikropaklarda KKKAV antikor pozitif ve negatif insan serumlarında immünoglobülin G yanıtının EİA ile araştırılmasına ait sonuçlar Şekil 4-17'de verilmiştir. Deneylerde 28 KKKAV antikor pozitif hasta serumu ve 16 KKKAV antikor negatif hasta serumu kullanılmış, üç kez tekrarlanan deney sonuçlarının ortalaması alınmıştır. Bu sonuçlara göre incelenen KKKAV antikor pozitif hasta serumlarının %64'ü NSs' e karşı geliştirilmiş IgG yönünden pozitif bulunmuştur. Negatif kontrol olarak kullanılan 16 hasta serumundan sadece bir tanesi sınır değer

üstünde kalmıştır (Şekil 4-18). Yapılan optimizasyon çalışmalarının sonucunda mikroplak $5\mu\text{g/kuyu}$ rNSs ile kaplanmış, sekonder antikor 1:500 dilüsyonda kullanılmıştır (ABCAM-ab97165).



Şekil 4-17: rNSs kullanılarak EİA ile KKKAV antikor pozitif insan serumlarının taranması.

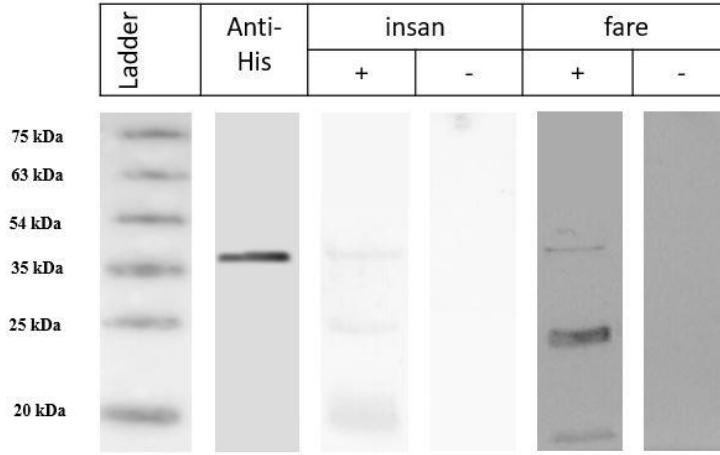
Sınır değeri 0,123 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4-18: rNSs kullanılarak EİA ile KKKAV antikor negatif insan serumlarının taranması. .

4.3.2. rNSm'in Analizi

Rekombinant NSm proteininin üretiminin doğrulanması amacıyla Anti-His antikorları ile, NSm proteinine karşı antikor yanıtının araştırılması amacıyla KKKAV ile infekte hasta serumu ve sağlıklı insan serumu ile, bu proteininin farelerde oluşturduğu antikor yanıtının belirlenmesi amacıyla ise NSm ile bağışıklanmış farelerden elde edilen serumlar kullanılarak Western Blotlama yapılmıştır. Anti-His antikorları ile reaksiyon elde edilmesi proteinin His-Tag barındırdığını doğrulamış, KKKAV antikor pozitif insan serumu ile reaksiyon vermesi ise NSm spesifik IgG varlığını göstermiştir. rNSm ile bağışıklanmış fare serumu ile reaksiyon elde edilmesi ise bağışıklamanın gerçekleştiğini göstermiştir. Western Blotlamalara ait sonuçlar Şekil 4-19'da verilmiştir.

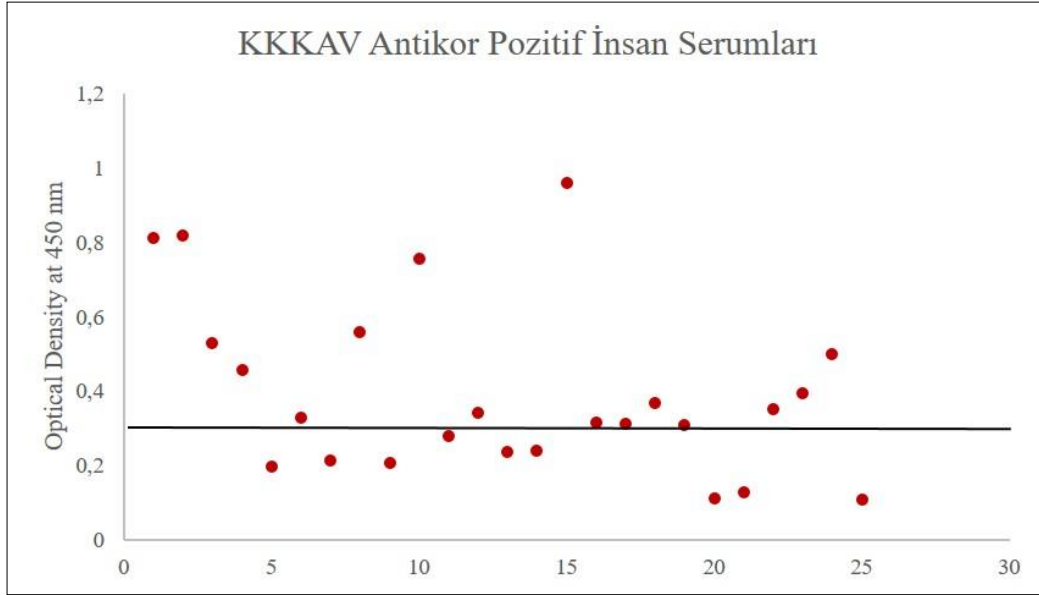


Şekil 4-19: rNSm'in immünolojik analizi.

rNSm'in Western Blotlaması. Sıra 1: Ladder, Sıra 2: Anti His antikorları, Sıra 3: KKKAV antikor pozitif insan serumu (1:4000) , Sıra 4: KKKAV antikor negatif insan serumu (1:4000) , Sıra 5: rNSm ile bağışıklanmış fare serumu (1:1000), Sıra 6: Naiv fare serumu (1:1000) ile rNSm'in tepkimesi.

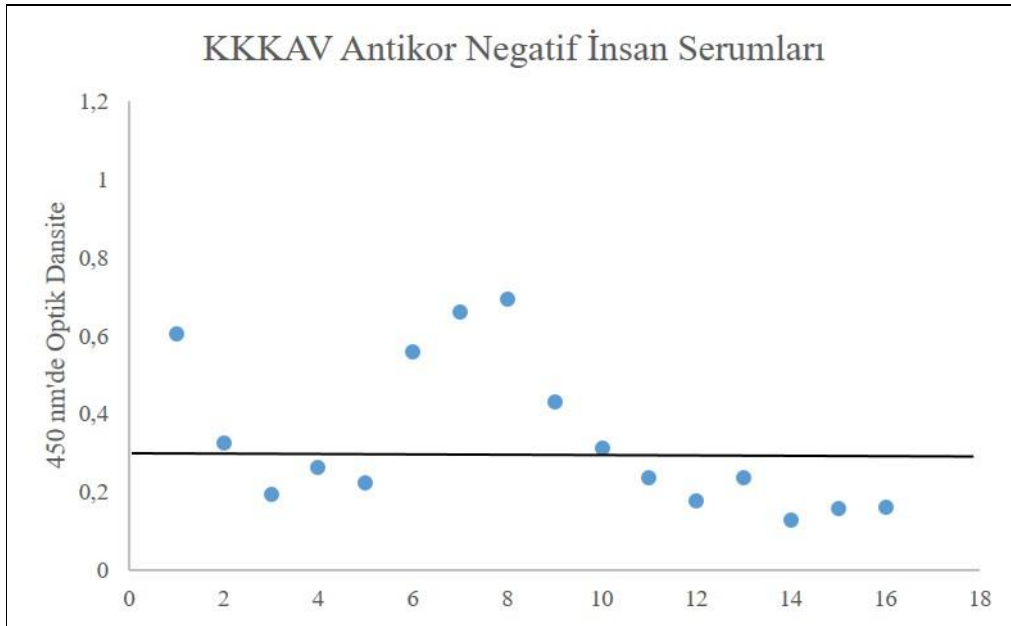
rNSm ile kaplanmış mikropklarda KKKAV antikor pozitif ve negatif insan serumlarında immünoglobülin G yanıtının EIA ile araştırılmasına ait sonuçlar Şekil 4-20'de verilmiştir. Deneylerde 25 KKKAV antikor pozitif hasta serumu 16 KKKAV antikor negatif hasta serumu kullanılmış, üç kez tekrarlanan deney sonuçlarının ortalaması alınmıştır. Bu sonuçlara göre incelenen KKKAV antikor pozitif hasta serumlarının %64'ü NSm' e karşı geliştirilmiş IgG yönünden pozitif bulunmuştur. Negatif kontrol olarak kullanılan 16 hasta serumundan yedi tanesi sınır değer üstünde kalmıştır (Şekil 4-21). Yapılan optimizasyon çalışmalarının sonucunda mikropklak

5µg/kuyu rNSm ile kaplanmış, sekonder antikor 1:500 dilüsyonda kullanılmıştır (ABCAM-ab97165).



Şekil 4-20: rNSm kullanılarak EİA ile KKKAV antikor pozitif insan serumlarının taranması.

Sınır değeri 0,298 olarak belirlenmiştir.

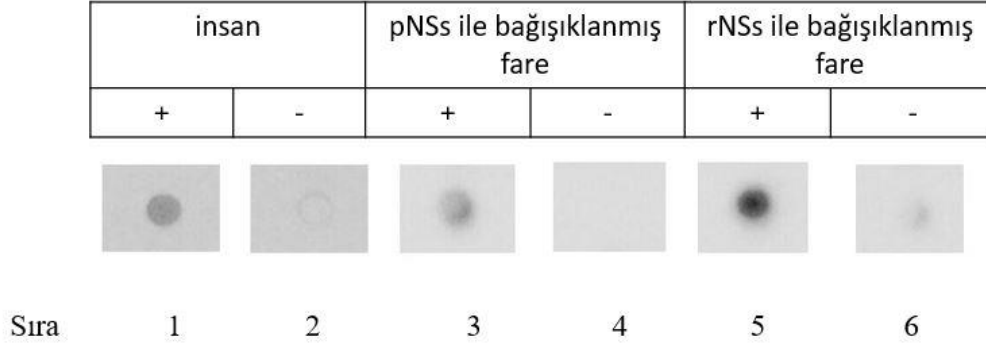


Şekil 4-21: rNSm kullanılarak EİA ile KKKAV antikor negatif insan serumlarının taranması.

4.4. Sentetik Peptitlerin Analizi

4.4.1. NSs Peptidinin Analizi

NSs peptidinin (pNSs) rNSs'e benzer şekilde KKKAV antikor pozitif insan serumlarıyla reaksiyonunun araştırılması amacıyla KKKAV antikor pozitif ve negatif insan serumları ile Dot-Blot yapılmıştır. NSs peptidinin farelerde oluşturduğu antikor yanıtının araştırılması amacıyla NSs peptidiyle bağışıklanmış fare serumu ve negatif kontrol olarak naiv fare serumu ile Dot-Blot yapılmıştır. Ayrıca rNSs ile pNSs arasındaki benzerliğin gösterilmesi amacıyla rNSs bağışıklanmış fare serumları ile pNSs arasındaki reaksiyon Dot-Blot ile araştırılmıştır. pNSs'in KKKAV antikor pozitif insan serumu ile reaksiyon vermesi NSs spesifik IgG varlığını tekrar göstermiş, elde edilen bu verinin rNSs ile elde edilen ile uyumlu olması sonuçların doğrulanmasını da sağlamıştır. pNSs ve rNSs ile bağışıklanmış fare serumu ile çapraz reaksiyon elde edilmesi ise hem bağışıklamanın gerçekleştiğini hem de rekombinant protein ve sentetik peptit arasındaki benzerliği göstermiştir (Şekil 4-22).

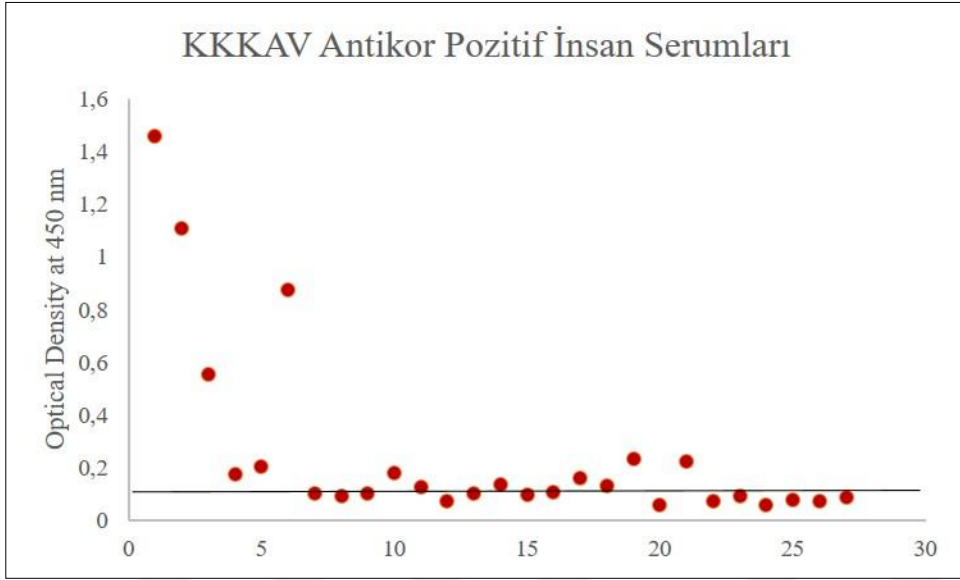


Şekil 4-22: pNSs'in immünolojik analizi.

pNSs'in Dot-Blotlaması. Sıra:1 KKKAV antikor pozitif insan serumu (1:4000 dilüsyon) Sıra 2: KKKAV antikor negatif insan serumu (1:4000 dilüsyon) Sıra 3: pNSs ile bağışıklanmış fare serumu (1:1000 dilüsyon) Sıra 4: Naiv fare serumu (1:1000 dilüsyon) Sıra 5: rNSs ile bağışıklanmış fare serumu (1:100 dilüsyon) Sıra 6: Naiv fare serumu (1:100 dilüsyon)

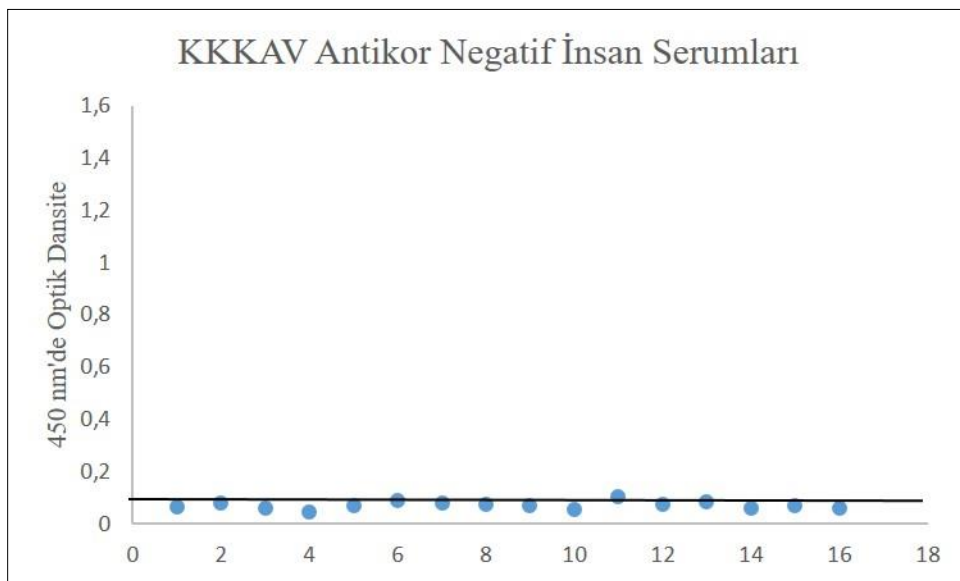
pNSs ile kaplanmış mikropiplaklarda KKKAV antikor pozitif ve negatif insan serumlarında immünoglobülin G yanıtının EİA ile araştırılmasına ait sonuçlar Şekil 4-23'de verilmiştir. Deneylerde 27 KKKAV antikor pozitif hasta serumu 16 KKKAV antikor negatif hasta serumu kullanılmış, üç kez tekrarlanan deney sonuçlarının ortalaması alınmıştır. Bu sonuçlara göre incelenen KKKAV antikor pozitif hasta

serumlarının %66,6'sı pNSs' e karşı geliştirilmiş IgG yönünden pozitif bulunmuştur. Negatif kontrol olarak kullanılan 16 hasta serumundan sadece 1 tanesi sınır değer üstünde kalmıştır (Şekil 4-24). Yapılan optimizasyon çalışmalarının sonucunda mikropak 0.5µg/kuyu pNSs ile kaplanmış, sekonder antikor 1:500 dilüsyonda kullanılmıştır (ABCAM-ab97165).



Şekil 4-23: pNSs kullanılarak EİA ile KKKAV antikor pozitif insan serumlarının taranması.

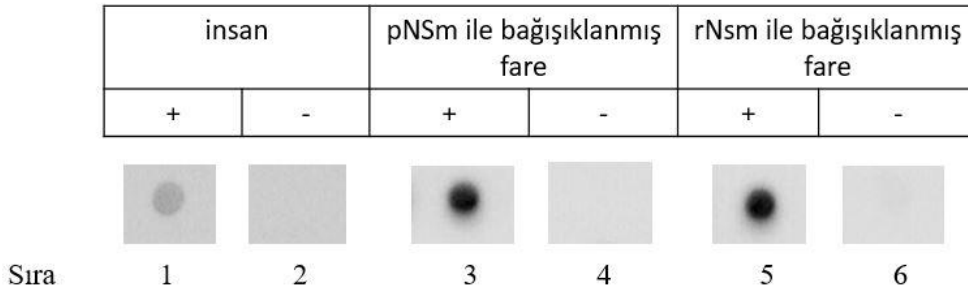
Sınır değeri 0,099 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4-24: pNSs kullanılarak EİA ile KKKAV antikor negatif insan serumlarının taranması.

4.4.2. NSm Peptidinin Analizi

NSm peptidinin (pNSm) rNSm'e benzer şekilde KKKAV antikor pozitif insan serumlarıyla reaksiyonunun araştırılması amacıyla KKKAV antikor pozitif ve negatif insan serumları ile Dot-Blot yapılmıştır. NSm peptidinin farelerde oluşturduğu antikor yanıtının araştırılması amacıyla NSm peptidiyle bağışıklanmış fare serumu ve negatif kontrol olarak naiv fare serumu ile Dot-Blot yapılmıştır. Ayrıca rNSm ile pNSm arasındaki benzerliğin gösterilmesi amacıyla rNSm ile bağışıklanmış fare serumları ile pNSm arasındaki reaksiyon Dot-Blot ile araştırılmıştır. pNSm'in KKKAV antikor pozitif insan serumu ile reaksiyon vermesi NSm spesifik IgG varlığını tekrar göstermiş, elde edilen bu verinin rNSm ile elde edilen ile uyumlu olması sonuçların doğrulanmasını da sağlamıştır. pNSm ve rNSm ile bağışıklanmış fare serumu ile çapraz reaksiyon elde edilmesi ise hem bağışıklamanın gerçekleştiğini hem de rekombinant protein ve sentetik peptit arasındaki benzerliği göstermiştir (Şekil 4-25).

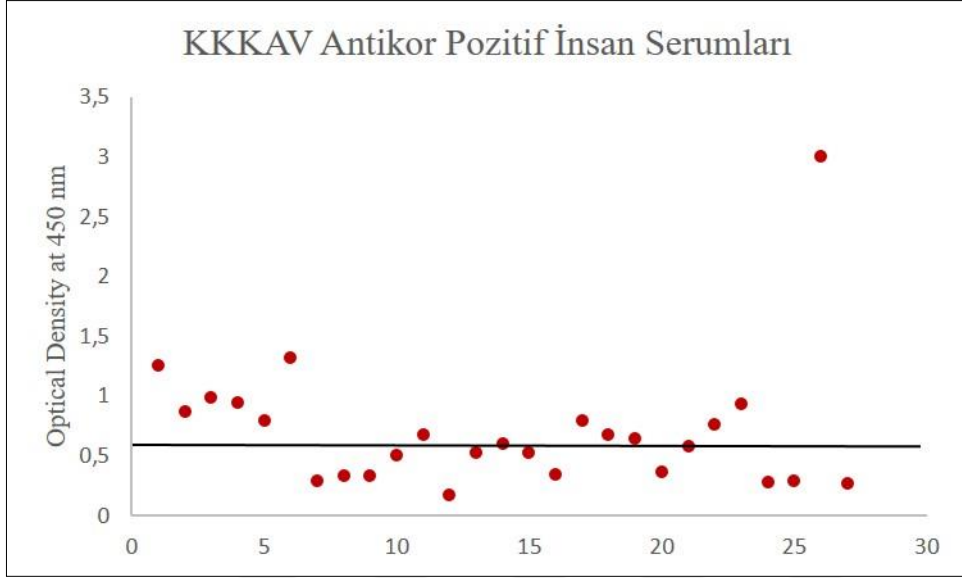


Şekil 4-25: pNSm'in immünolojik analizi.

pNSm'in Dot-Blotlaması. Sıra:1 KKKAV antikor pozitif insan serumu (1:4000 dilüsyon) Sıra 2: KKKAV antikor negatif insan serumu (1:4000 dilüsyon) Sıra 3: pNSm ile bağışıklanmış fare serumu (1:1000 dilüsyon) Sıra 4: Naiv fare serumu (1:1000 dilüsyon) Sıra 5: rNSm ile bağışıklanmış fare serumu (1:100 dilüsyon) Sıra 6: Naiv fare serumu (1:100 dilüsyon)

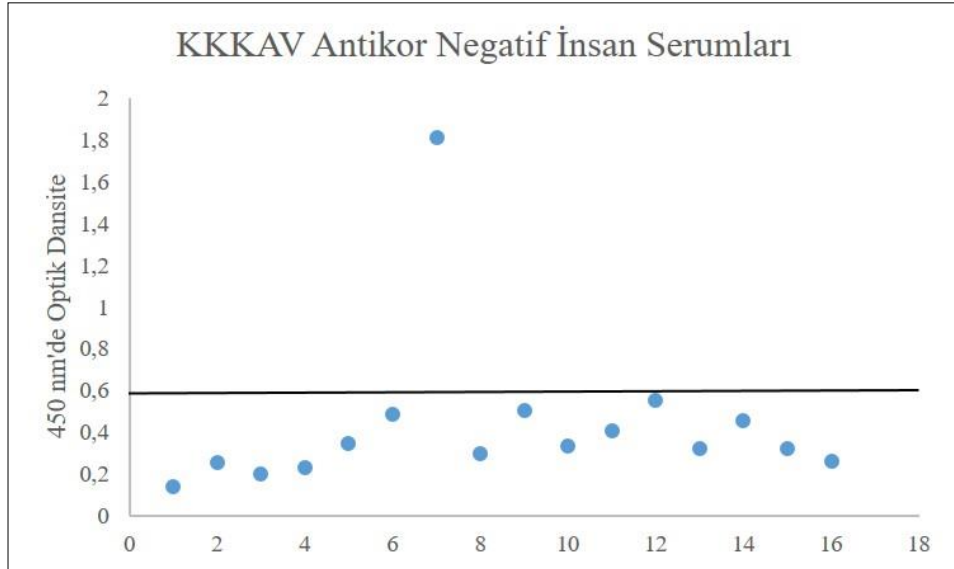
pNSm ile kaplanmış mikropklarda KKKAV antikor pozitif ve negatif insan serumlarında immünoglobülin G yanıtının EİA ile araştırılmasına ait sonuçlar Şekil 4-26'de verilmiştir. Deneylerde 27 KKKAV antikor pozitif hasta serumu 16 KKKAV antikor negatif hasta serumu kullanılmış, üç kez tekrarlanan deney sonuçlarının ortalaması alınmıştır. Bu sonuçlara göre incelenen KKKAV antikor pozitif hasta serumlarının %48,1'i pNSm'e karşı geliştirilmiş IgG yönünden pozitif bulunmuştur. Negatif kontrol olarak kullanılan 16 hasta serumundan bir tanesi sınır değer üstünde kalmıştır (Şekil 4-27). Yapılan optimizasyon çalışmalarının sonucunda mikropklak

0.5µg/kuyu pNSm ile kaplanmış, sekonder antikor 1:5000 dilüsyonda kullanılmıştır (BIORAD-5172-2504).



Şekil 4-26: pNSm kullanılarak EİA ile KKKAV antikor pozitif insan serumlarının taranması.

Sınır değeri 0,549 olarak belirlenmiştir

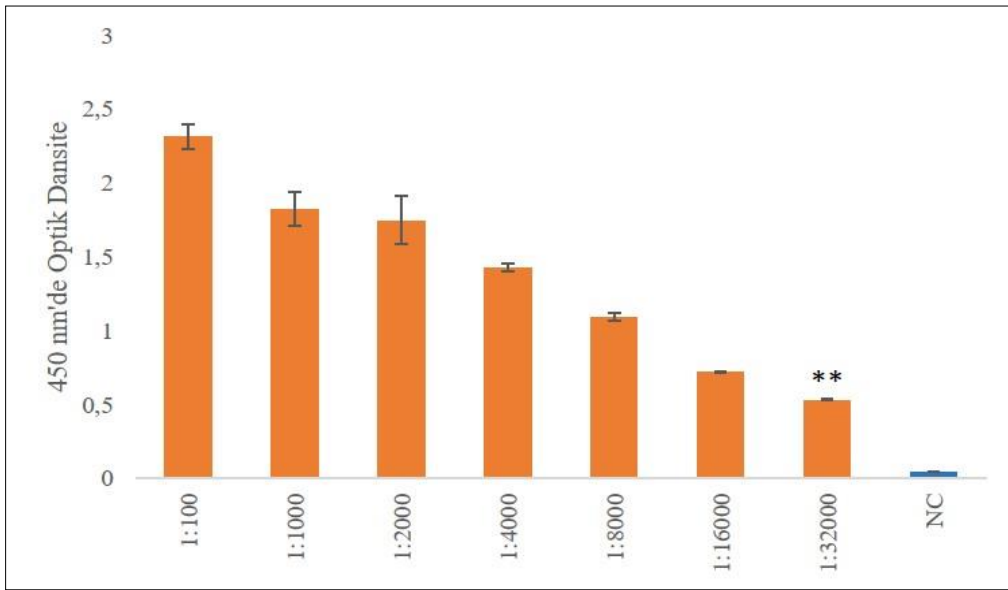


Şekil 4-27: pNSm kullanılarak EİA ile KKKAV antikor negative insan serumlarının taranması.

4.5. NSs ve NSm'e Karşı Poliklonal Antikor Eldesi

4.5.1. rNSs'e Karşı Poliklonal Antikor Eldesi

Bağışıklama takvimleri tamamlanvektan sonra farelerden alınan serumların antikor titrelerini belirlemek amacıyla 1 µg/kuyu rNSs ile kaplı mikrolaklarda EİA yapılmış, sonuçlar Şekil 4-28'de gösterilmiştir. Sekonder antikor 1:2000 dilüsyonda kullanılmıştır (Thermo 626520). Yapılan EİA sonucunda 1/32000 dilüsyona kadar antikor tespit edilebilmiştir.

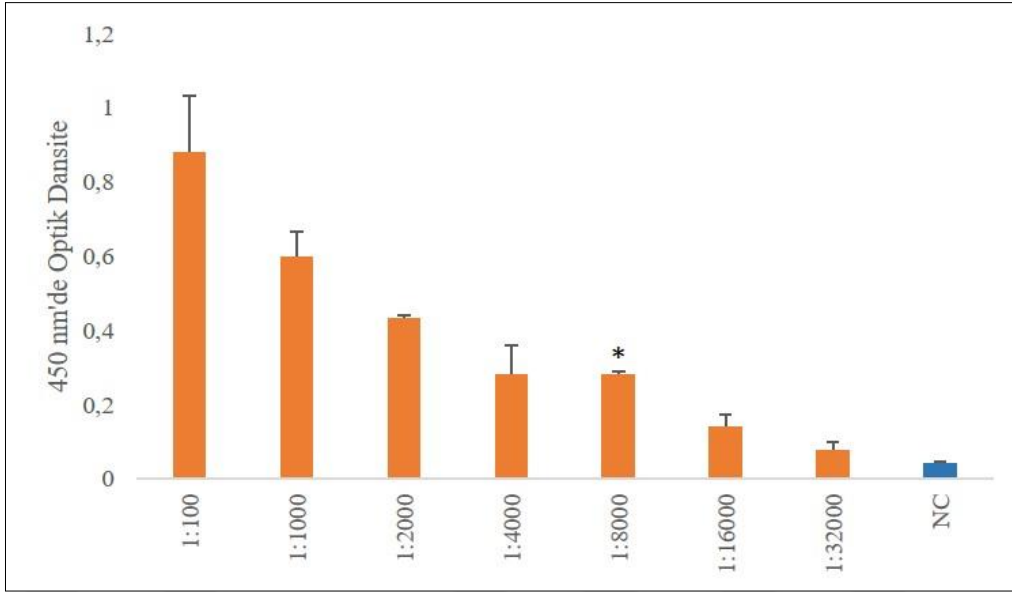


Şekil 4-28: rNSs ile bağışıklanmış fare serumunda IgG titresi.

**p<0.005

4.5.2. rNSm'e Karşı Poliklonal Antikor Eldesi

Bağışıklama takvimleri tamamlanvektan sonra farelerden alınan serumların antikor titrelerini belirlemek amacıyla 0.5 µg/kuyu rNSm ile kaplı mikrolaklarda EİA yapılmış, sonuçlar Şekil 4-29'de gösterilmiştir. Sekonder antikor 1:500 dilüsyonda kullanılmıştır (Santa Cruz-2005). Yapılan EİA sonucunda 1/8000 dilüsyona kadar antikor tespit edilebilmiştir.



Şekil 4-29: rNSm ile bağışıklanmış fare serumunda IgG titresi.

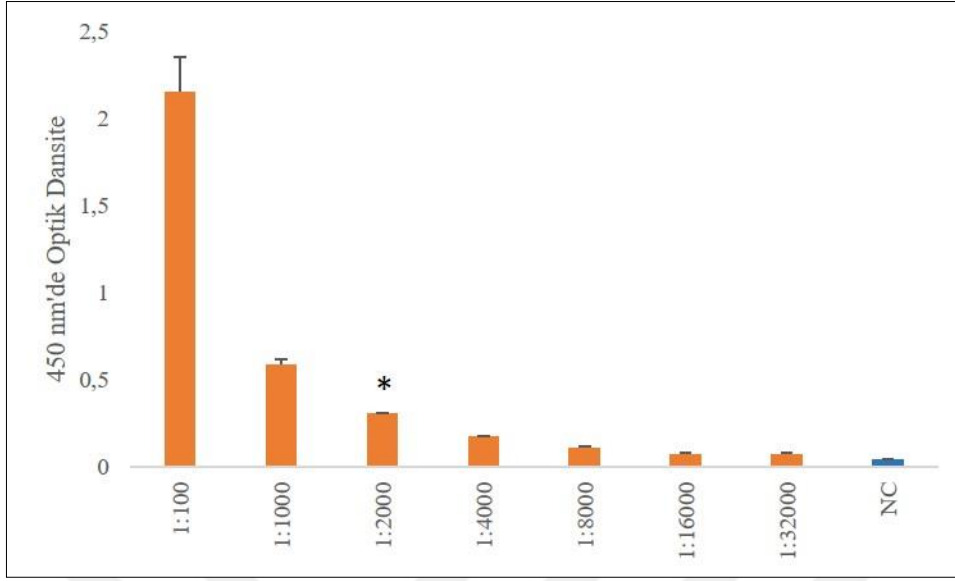
*p<0.05

4.5.3. pNSs'e Karşı Poliklonal Antikor Eldesi

Bağışıklama takvimleri tamamlanıldıktan sonra farelerden alınan serumların antikor titrelerini belirlemek amacıyla 1 µg/kuyu pNSs ile kaplı mikrolaklarda EİA yapılmış, sonuçlar Şekil 4-30'de gösterilmiştir. Sekonder antikor 1:2000 dilüsyonda kullanılmıştır (Thermo-626520). Yapılan EİA sonucunda 1/2000 dilüsyona kadar antikor tespit edilebilmiştir.

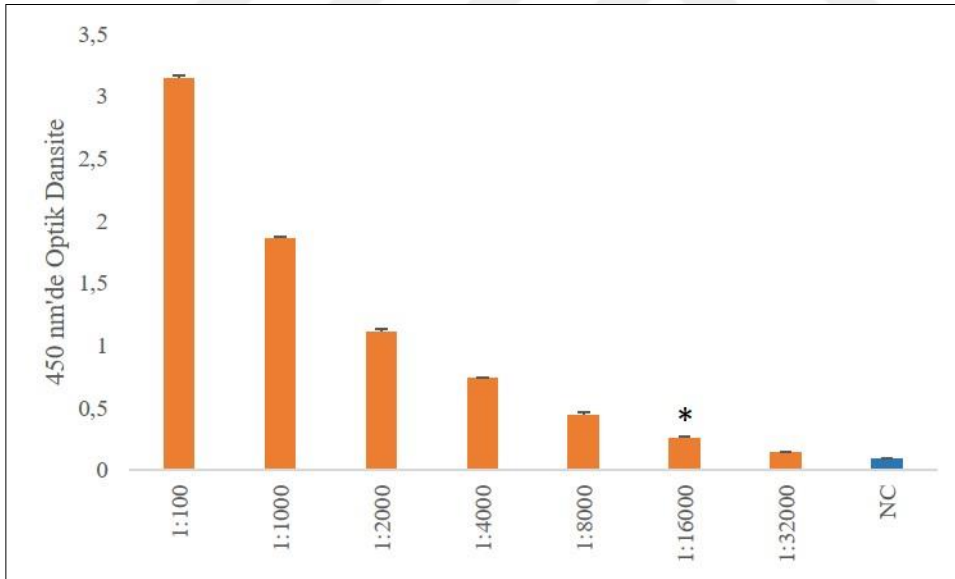
4.5.4. pNSm'e Karşı Poliklonal Antikor Eldesi

Bağışıklama takvimleri tamamlanıldıktan sonra farelerden alınan serumların antikor titrelerini belirlemek amacıyla 1 µg/kuyu pNSm ile kaplı mikrolaklarda EİA yapılmış, sonuçlar Şekil 4-31'de gösterilmiştir. Sekonder antikor 1:2000 dilüsyonda kullanılmıştır (Thermo-626520). Yapılan EİA sonucunda 1/16000 dilüsyona kadar antikor tespit edilebilmiştir.



Şekil 4-30: pNSm ile bağışıklanmış fare serumunda IgG titresi.

*p<0.05

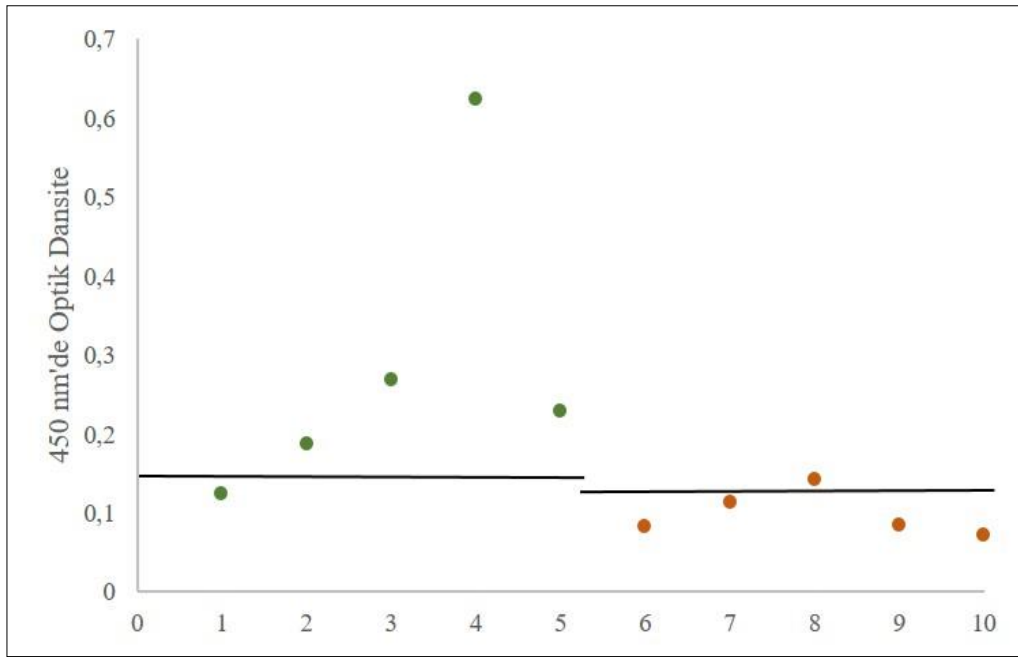


Şekil 4-31: pNSs ile bağışıklanmış fare serumunda IgG titresi.

*p<0.05

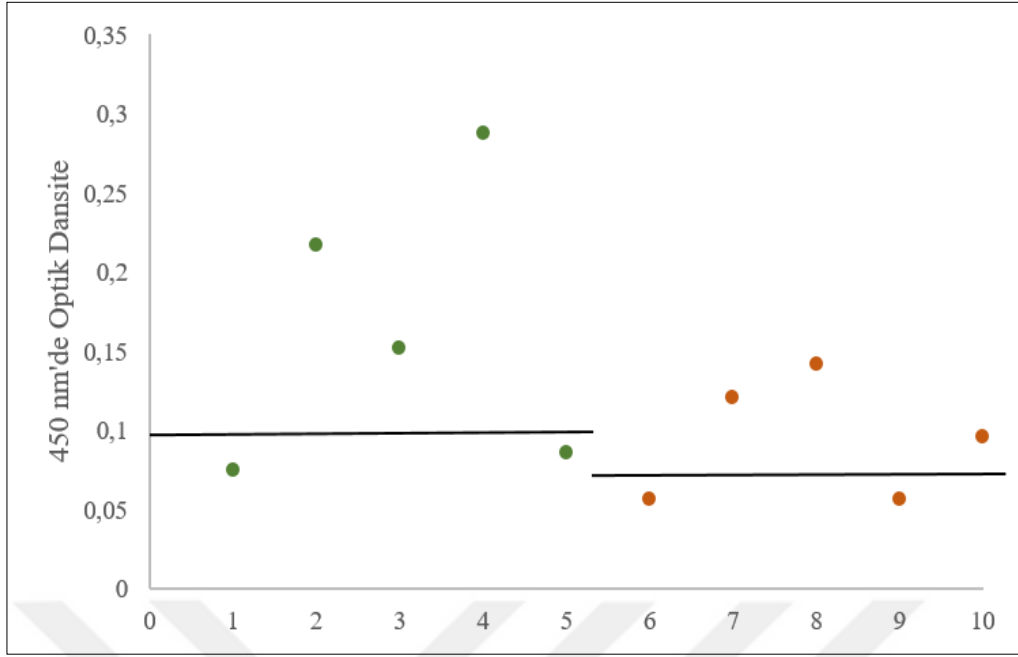
4.6. Rekombinant Proteinlere Karşı Elde Edilen Poliklonal Antikorlar ile Sentetik Peptitler Arasındaki Çapraz Reaksiyonun Araştırılması

Üretilen rekombinant proteinler ve bu proteinlerin sekanslarından antijenik oldukları tahmin edilerek seçilen sentetik peptitlerin arasındaki benzerliğin belirlenmesi amacıyla 1 µg/kuyu pNSm ve pNSs ile kaplı mikrolaplarda rNSm ve rNSs ile bağışıklanmış fare serumları 1/10 ve 1/50 dilüsyonlarında EİA ile test edilmiş, sonuçlar Şekil 4-32 ve 4-33'te gösterilmiştir.



Şekil 4-32: 1/10 dilüsyonda çapraz tepkimenin belirlenmesi.

Şekilde yeşil renk ile gösterilmiş ilk 5 örnek rNSm ile bağışıklanmış gruptaki 5 farklı fareyi, turuncu renk ile gösterilmiş son 5 örnek ise rNSs ile bağışıklanmış gruptaki 5 farklı fareyi temsil etmektedir. M grubu için sınır değeri 0,148, S grubu için sınır değeri ise 0,133 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4-33: 1/50 dilüsyonda çapraz tepkimenin belirlenmesi.

Şekilde yeşil renk ile gösterilmiş ilk 5 örnek rNSm ile bağışıklanmış gruptaki 5 farklı fareyi, turuncu renk ile gösterilmiş son 5 örnek ise rNSs ile bağışıklanmış gruptaki 5 farklı fareyi temsil etmektedir. M grubu için sınır değeri 0,095, S grubu için sınır değeri ise 0,073 olarak hesaplanmıştır.

5. TARTIŞMA

Birçok virüste viral genom tarafından yapısal olan proteinlerin yanı sıra yapısal olmayan proteinler de kodlanmaktadır. Viral yapısal proteinler isimlerinden de anlaşılacağı gibi virüsün temel yapısını oluşturmakta ve viral biyolojide vazgeçilmez roller üstlenmektedirler. Genom enkapsidasyonu ve transkripsiyonu, kapsid oluşumu, reseptöre bağlanma ve hedef hücreye giriş gibi fonksiyonlar bu proteinlerin en temel rolleri arasında bulunmaktadır. Viral yapısal proteinlerin yanı sıra viral yapısal olmayan proteinler ise virüsler tarafından infekte edilen konakta viral genomdan kodlanan ancak virüs partikülü içerisine paketlenmeyip olgun virionun yapısında bulunmayan proteinlerdir [114, 115]. Bu proteinlerin bazı durumlarda infeksiyon ve replikasyonda vazgeçilebilir olabileceği ancak konakta patogenezin artırımında rolü oldukları ifade edilmiştir [78, 116]. Bazı virüslerde ise *in vitro* koşullarda sınırlı görevleri bulunsa da korunmuş sekanslara sahip olmaları *in vivo* koşullarda daha önemli rolleri olabileceğine işaret etmektedir [117]. Tüm bu bilgiler, bu proteinleri ilgi çekici hedefler haline getirmektedir. Moleküler katlanmalar, hücre içi dağılım ve taşınma, genom paketlenmesi, kapsid oluşumu, virüs salınımı ve hücrenin infeksiyona verdiği cevabın kontrolü için şaperon rolüne sahip olmak bu proteinlerin muhtemel rolleri ile ilgili tahminlerden bazılarıdır. Ancak tüm bu muhtemel rollerine rağmen viral proteinlerin yapısı ve fonksiyonları ile ilgili var olan bilgiler çoğunlukla yapısal proteinler ile ilgili olmakta, bunun aksine yapısal olmayan proteinler ile ilgili daha az bilgi bulunmaktadır. [118].

Viral yapısal olmayan proteinler arasında en fazla bilgi influenza virüsü, hepatit C virüsü ve son yıllarda Deng virüsü yapısal olmayan proteinleri ile ilgili yapılmış çalışmalardan edinilmiştir. Bunların arasından influenza virüsünün 8. segmentinden kodlanan NS1 negatif iplikli RNA virüsleri arasında interferon antagonisti olarak tanımlanmış ilk yapısal olmayan proteindir. İnterferon antagonisti olmasının yanı sıra NS1, post-transkripsiyonel seviyede konak hücre protein ekspresyonunu durdurmaktadır [119]. Tüm bu rolleri NS1'in hem antiviral hem de aşı geliştirmede iyi bir hedef olabileceğini düşündürmüştür [120, 121]. Barnwal ve arkadaşları NS1 proteinine karşı geliştirdikleri monoklonal antikorları kullanılarak NS1 proteinini inhibe etmiş, bunun sonucunda ise virüs replikasyonunda azalma olduğunu gözlemlemişlerdir

[122]. You ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada kinoksalin derivatları arasında yaptıkları taramalar sonucunda geliştirdikleri bir maddenin NS1-dsRNA bağlanmasının gerçekleştiği bölgeyle interaksyona girdiğini ve virüsü inhibe edebildiklerini göstermişlerdir [123]. Hai ve arkadaşları reverz genetik sistemi kullanarak prematür stop kodonlar ile NS1'i modüle ederek elde ettikleri virüslerin hem *in vitro* hem de *in vivo* koşullarda atenüe olduğunu göstermişlerdir [124]. Nogales ve arkadaşları kanin influenza virüs suşları ile yaptıkları çalışmada modifiye NS1 proteinleri kullanılarak elde ettikleri rekombinant virüslerin tek intranasal bağışıklamadan sonra tam bir koruma sağlayan canlı atenüe virüs aşısı adayları olduklarını belirtmişlerdir [125].

NS3/NS4A proteazı hedefleyen boseprevir ve telaprevir HCV'nin tedavisinde onaylanmış antiviraller arasında bulunmakta [126], HCV NS5A ve NS5B ise tedavi de diğer bir hedef olarak görülmektedir [127-129]. Latimer ve arkadaşları HCV NS3/NS4A, NS4B, NS5A ve NS5B sekanslarını içeren DNA plazmidleri ile aşılama sonucunda güçlü hücrel immün yanıt aldıklarını bildirmişlerdir [130]. Wada ve arkadaşları ise HCV NS5 ile oluşturulmuş bir DNA aşısını transgenik farelerde deneyip aşının HCV protein ekspresyonunda azalmaya ve karaciğer patolojisinde iyileşmeye neden olduğunu gözlemlemiş ve kronik HCV enfeksiyonu olan bireylerin tedavisinde alternatif bir yaklaşım olabileceğini öne sürmüşlerdir [131].

Hücrel immün yanıtın oluşmasında T hücre aktivasyonunun koruyucu olabileceği düşüncesiyle yapılan bir çalışmada Deng Virüsü (DENV) CD4+ ve CD8+ sitotoksik T lenfosit epitopları barındırdığı bilinen yapısal olmayan protein-3'ün (NS3) rekombinant yolla elde edilmesi ve protein aşısı olarak kullanılması sonucunda Balb/c farelerinde T hücre yanıtının oluştuğu ve proteine karşı yüksek titrede antikor yanıtın geliştiği belirlenmiştir. Bu çalışmada nötralizan antikorlar gelişmesini sağlayacak bir DENV yapısal proteini ile birlikte NS3'ün kullanılmasıyla etkin bir aşı oluşturulabileceği bildirilmiştir [132]. DENV NS3 temelli DNA aşısı geliştirilerek yapılan bir çalışmada ise CD8+ T hücrelerinden üretilen IFN- γ aracılığıyla hücrel immün yanıtın indüklendiği gösterilmiş ve bu yolla elde edilen aşının Balb/c farelerinde koruyuculuğu incelenmiştir [133]. Memeli hücrelerinden hekzamer formda elde edilen DENV NS1'ye karşı fare ve tavşanlardan elde edilen poliklonal antikorların yakalayıcı antikor olarak kullanıldığı EİA testlerinde, ateşin başladığı ilk günden itibaren NS1'in detekte edilebildiği, DENV viral RNA'nın negatif olduğu erken dönemde bile virüsün

deteksiyonunun sağlanabildiği gösterilerek hem NS1'in erken tanıdaki rolü hem de patogenezdeki rolü vurgulanmıştır [134].

Xu ve arkadaşları ise NS1'i bakteriyel ekspresyon sisteminde üreterek monoklonal antikor geliştirmede kullanmış, geliştirdikleri monoklonal antikorun, EİA testlerinde yakalayıcı antikor olarak kullanımının, hastalığın erken teşhisi ve serotiplendirilmesinde kıymetli olabileceğini vurgulamışlardır [135].

KKKAV vektörünün oldukça geniş bir coğrafi yayılım göstermesi ile oldukça yaygın görülen bir virüs olup son yıllarda gözlenen iklim değişiklikleri nedeniyle ciddi bir halk sağlığı sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Virüsten en fazla etkilenen bölgelerden olan ülkemizde 2002-2017 yılları arasında 10562 olgu bildirilmiş, bu olguların 501'i ölümlle sonuçlanmıştır [136]. Ancak KKKAV biyolojisiyle ilgili çalışmalar oldukça kısıtlı olup bu çalışmaların çoğu viral yapısal proteinlerin fonksiyonu üzerine yapılmıştır. KKKAV yapısal olmayan proteinleri ile ilgili sadece iki çalışma bulunmakta, bunlardan NSm ile ilgili olan çalışmada sadece NSm'in varlığı ortaya konulmaya çalışılmış ve yapısal olmayan protein olduğu iddia edilmiş, diğer çalışmada ise NSs'in farklı KKKAV suşlarında korunmuş sekanslara sahip olduğu gösterilmiştir[68]. Ayrıca, farklı hücre hatlarında NSs ekspresyonu sonucunda NSs'in apoptoz yollarıyla ilişkisi araştırılmış ve mitokondriyal lokalizasyonu gösterilmiştir [69]. KKKAV yapısal olmayan proteinlerinin virüs biyolojisindeki kesin rolleri bilinmemekte, buna bağlı olarak bu proteinlerin tanı, tedavi ve korunmada hedef olup olamayacakları da sorgulanamamaktadır.

Bu çalışmada KKKAV NSs ve NSm'in bakteriyel ekspresyon sistemleri kullanılarak üretilmesi, üretilen bu proteinlerin yakalayıcı antijen olarak kullanıldığı EİA testleri geliştirilerek KKKAV antikor pozitif insan serumlarında bu proteinlere karşı antikor cevabının araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca rekombinant proteinler ile Balb/c farelerinin aşılansıyla bu antijenleri detekte edebilen poliklonal antikorların geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Rekombinant NSm ve NSs proteinlerinin elde edilmesi amacıyla üç farklı ekspresyon sistemi ile çalışılmıştır. Bu sistemlerden pETSUMO ekspresyon sistemi ile iki protein de üretilebilmiştir. NSs proteini bu sistem kullanılarak üretilmiş, FPLC aracılığıyla saflaştırılabilmiş ve 900 ml'lik kültürlerde yaklaşık 7 mg saf protein elde edilebilmiştir. Ancak NSm'in inklüzyon cisimlerinde bulunduğu, lizis aşamasından

sonra bakteri peletinde kaldığı gözlenmiş ve membran ile ilişkisi olabileceği düşünülmüştür. Singh ve arkadaşları da bir tospovirüsün NSm proteinini bakteriyel ekspresyon sisteminde üretirken benzer yorumlarda bulunmuş ve proteinin inklüzyon cisimlerinde biriktiğini belirtmişlerdir [100]. Bunun üzerine elde edilen bu pelet ile denatüre koşullarda lizis aşaması tekrarlanmıştır. SDS-PAGE’de gözlenen bantların boyut olarak doğrulanmasının yanı sıra Anti-His antikorları kullanılarak gerçekleştirilen Western blotlamalar ile de ekspresyon doğrulanmıştır. NSs’e kıyasla NSm’in agregasyona daha yatkın olması nedeniyle FPLC aracılığıyla saflaştırma gerçekleştirilememiş ancak tekrar eden lizis aşamaları sonucunda SDS-PAGE’de dominant iki bant olarak protein gözlenmiştir. Her ne kadar His-Tag aracılı saflaştırma işlemi gerçekleştirilememiş olsa da ve 900 ml’lik kültürlerde yaklaşık 8 mg protein elde edilebilmiştir. Ancak hem NSm proteininin saflaştırılmasında karşılaşılan zorluklar hem de üretilen proteinlerin SUMO protein ile füzyon halinde elde edilmiş olması sebebiyle nativ protein üretilmesine imkan tanıyan farklı ekspresyon sistemleri denenmiştir.

Nativ protein eldesi amacıyla denenilen sistemlerden pET28b ekspresyon sisteminde klonlamalar başarıyla gerçekleştirilmiş ancak ekspresyonda birçok farklı koşul denenmesine rağmen rekombinant proteinler elde edilememiştir.

Son olarak nativ protein elde edilmesi amacıyla pET30b ekspresyon sistemine klonlamalar yapılmış ve bu sisteme NSm geninin klonlaması başarıyla gerçekleştirilmiş, rekombinant protein elde edilebilmiş ve protein FPLC ile saflaştırılabilmıştır. Ancak elde edilen protein miktarı pETSUMO ekspresyon sistemine kıyasla oldukça düşük olup tekrarlayan ekspresyon denemelerinde benzer ekspresyon miktarları elde edilememiştir.

Tüm bu ekspresyon denemelerinin sonucunda pETSUMO sisteminde üretime devam edilmiş ve bu sistem kullanılarak elde edilen proteinler takip eden deneylerde kullanılmıştır.

KKKAV NSm ve NSs’ine ticari olarak geliştirilmiş spesifik antikorlar bulunmamaktadır. Hem üretilen rekombinant proteinlerin doğruluğunun test edilmesinde Anti-His antikorları ile gerçekleştirilen Western Blotlamalar dışında bir yönteme sahip olmak hem de KKKAV antikor pozitif hasta serumları ile elde edilen sonuçları doğrulayabilecek ikinci bir ayıraca sahip olabilmek amacıyla NSm ve NSs sentetik peptitleri tasarlanmıştır. Bu amaçla NSm ve NSs proteinlerinin antijenik olduğu belirlenen bölgelerinden 30 amino asitlik kısımlar belirlenmiş ve ticari olarak elde

edilmiştir. Rekombinant proteinler kullanılarak yapılan tüm çalışmalar sentetik peptitler kullanılarak da gerçekleştirilmiştir.

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü NSm ve NSs proteinlerinin humoral immünitadaki rolünün araştırılması amacıyla üretilen rekombinant proteinlerin ve sentetik peptitlerin yakalayıcı antijen olarak kullanıldığı EİA testleri gerçekleştirilmiş ve Western ve Dot Blotlamalar yapılmıştır. Bu testlerin sonucunda rNSs kullanılarak yapılan Western Blotlama sonucunda KKKAV antikor pozitif insan serumuyla pozitif reaksiyon alınmış, rNSs'in yakalayıcı antijen olarak kullanıldığı EİA testlerinde ise denenen KKKAV antikor pozitif insan serumlarının % 64'ü NSs'e özgü antikorlar yönünden pozitif bulunmuştur. pNSs'in yaklaşık 3 kDa boyutunda olması Western Blotlama yapmaya imkan tanımamış, KKKAV antikor pozitif insan serumlarıyla reaksiyonun araştırılması için Dot Blotlama yapılmıştır. Yapılan bu Dot Blotlamanın sonucunda KKKAV antikor pozitif insan serumuyla pozitif reaksiyon alınmış, pNSs'in yakalayıcı antijen olarak kullanıldığı EİA testlerinde ise denenen KKKAV antikor pozitif insan serumlarının % 66,6'sı pNSs'e özgü antikorlar yönünden pozitif bulunmuştur. Rekombinant ve peptit NSs kullanılarak gerçekleştirilen bu testlerde benzer sonuçlar elde edilmiştir.

NSm'in humoral immünitadaki rolünün araştırılmasına yönelik çalışmalarda Western Blotlama sonucunda KKKAV antikor pozitif insan serumuyla pozitif reaksiyon alınmış, rNSm'in yakalayıcı antijen olarak kullanıldığı EİA testlerinde ise denenen KKKAV antikor pozitif insan serumlarının % 64'ü NSm'e özgü antikorlar yönünden pozitif bulunmuştur. pNSm'in yaklaşık 3 kDa boyutunda olması Western Blotlama yapmaya imkan tanımamış, KKKAV antikor pozitif insan serumlarıyla reaksiyonun araştırılması için Dot Blotlama yapılmıştır. Yapılan bu Dot Blotlamanın sonucunda KKKAV antikor pozitif insan serumuyla pozitif reaksiyon alınmış, pNSm'in yakalayıcı antijen olarak kullanıldığı EİA testlerinde ise denenen KKKAV antikor pozitif insan serumlarının % 48,1'i pNSm'e özgü antikorlar yönünden pozitif bulunmuştur. Rekombinant ve peptit NSm kullanılarak gerçekleştirilen Blotlamalarda benzer sonuçlar elde edilmiş ancak Rekombinant ve peptid NSm'in yakalayıcı antijen olarak kullanıldığı EİA testlerinde rNSm ile daha yüksek pozitiflik elde edilmiştir. Genel olarak NSm'in yüksek sistein içermesi ve pNSm'in de benzer şekilde yüksek sistein içermesi bu peptidin hem firma tarafında üretilmesinde zorluklar ile karşılaşılmasına sebep olmuş

hem de elde edilen peptitte gözle görünür agregasyonlar oluşmuştur. Tekrarlanan EİA testlerinin sonuçlarında farklılıklar gözlenmiş ve bu farklılıkların agregasyon kaynaklı olduğu ve plakalara kaplanabilen peptit miktarında eşitsizlik olabileceği düşünülmüştür. rNSm ve pNSm'in yakalayıcı antijen olarak kullanıldığı EİA testlerinden elde edilen sonuçlar arasındaki farklılıkların yukarıda belirtilen sebeplerden kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

Rekombinant proteinler ve sentetik peptitler kullanılarak yapılan bağışıklamalar sonucunda bu antijenlere yönelik yüksek titrede antikorlar elde edilebilmiştir. rNSs ile bağışıklanmış farelerde 1/32000 oranında dilüsyona kadar antikor detekte edilebilmiş bu oran pNSs'te 1/2000 olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde gerçekleştirilen bağışıklamalar sonucunda NSm'e karşı ise sırasıyla 1/8000 ve 1/16000 dilüsyona kadar antikor detekte edilebilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda rekombinant ve sentetik peptit formlarında KKKAV yapısal olmayan proteinlerine karşı farelerde yüksek titrelerde antikor cevabı oluşturulduğu gösterilmiş bu da bu proteinlerin humoral immüniteyi uyaran antijenik bölgeler içerdiğini düşündürmüştür. Elde edilen bu poliklonal antikorlar gelecekte bu konu ile ilgili tasarlanacak çalışmalarda bu antijenleri detekte edebilecek antikorlar olarak kullanılabilir. Ayrıca rekombinant proteinler ile bağışıklanmış fare serumlarındaki antikorların aynı proteinlerin sentetik peptidleri ile reaksiyon vermiş olmaları üretilen rekombinant proteinlerin bir kez daha doğrulanmasını sağlamıştır.

Sonuç olarak bu çalışmadan elde edilen veriler KKKAV yapısal olmayan proteinlerinin KKKAV enfeksiyonuna cevap olarak oluşan humoral immünitinin parçası olduğunu ve konak bağışıklık sistemini uyardığını göstermektedir. Ancak bu proteinlerin hem virüsün biyolojisinde hem de humoral ve hücrel immünitedeki nispi rollerinin kesin olarak belirlenebilmesi için daha ayrıntılı çalışmalar gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Zivcec, M., et al., *Molecular Insights into Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus*. Viruses, 2016. **8**(4): p. 106.
2. Ergonul, O., *Crimean-Congo haemorrhagic fever*. Lancet Infect Dis, 2006. **6**(4): p. 203-14.
3. Papa, A., et al., *Recent advances in research on Crimean-Congo hemorrhagic fever*. J Clin Virol, 2015. **64**: p. 137-43.
4. Gargili, A., et al., *The role of ticks in the maintenance ve transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: A review of published field ve laboratory studies*. Antiviral Res, 2017. **144**: p. 93-119.
5. Whitehouse, C.A., *Crimean-Congo hemorrhagic fever*. Antiviral Res, 2004. **64**(3): p. 145-60.
6. Appannanavar, S.B. ve B. Mishra, *An update on crimean congo hemorrhagic Fever*. J Glob Infect Dis, 2011. **3**(3): p. 285-92.
7. Pshenichnaya, N.Y. ve S.A. Nenadskaya, *Probable Crimean-Congo hemorrhagic fever virus transmission occurred after aerosol-generating medical procedures in Russia: nosocomial cluster*. Int J Infect Dis, 2015. **33**: p. 120-2.
8. Ergonul, O., et al., *Pregnancy ve Crimean-Congo haemorrhagic fever*. Clinical Microbiology ve Infection, 2010. **16**(6): p. 647-650.
9. Englve, M.E., et al., *Hyalomma ticks on northward migrating birds in southern Spain: Implications for the risk of entry of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus to Great Britain*. J Vector Ecol, 2016. **41**(1): p. 128-34.
10. Negredo, A., et al., *Autochthonous Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Spain*. N Engl J Med, 2017. **377**(2): p. 154-161.
11. Jaureguiberry, S., et al., *Imported Crimean-Congo hemorrhagic Fever*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(9): p. 4905-7.
12. Conger, N.G., et al., *Health care response to CCHF in US soldier ve nosocomial transmission to health care providers, Germany, 2009*. Emerg Infect Dis, 2015. **21**(1): p. 23-31.
13. Bronze, M.S., et al., *Viral agents as biological weapons ve agents of bioterrorism*. Am J Med Sci, 2002. **323**(6): p. 316-25.
14. Hoogstraal, H., *The epidemiology of tick-borne Crimean-Congo hemorrhagic fever in Asia, Europe, ve Africa*. J Med Entomol, 1979. **15**(4): p. 307-417.
15. Mendoza, E.J., et al., *Crimean-Congo haemorrhagic fever virus: Past, present ve future insights for animal modelling ve medical countermeasures*. Zoonoses Public Health, 2018. **65**(5): p. 465-480.
16. Clerx, J.P., J. Casals, ve D.H. Bishop, *Structural characteristics of nairoviruses (genus Nairovirus, Bunyaviridae)*. J Gen Virol, 1981. **55**(Pt 1): p. 165-78.
17. Lasecka, L. ve M.D. Baron, *The molecular biology of nairoviruses, an emerging group of tick-borne arboviruses*. Arch Virol, 2014. **159**(6): p. 1249-65.
18. Eifan, S., et al., *Non-structural proteins of arthropod-borne bunyaviruses: roles ve functions*. Viruses, 2013. **5**(10): p. 2447-68.
19. Devignot, S., et al., *A Virus-Like Particle System Identifies the Endonuclease Domain of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus*. Journal of Virology, 2015. **89**(11): p. 5957.

20. Guo, Y., et al., *Crimean–Congo hemorrhagic fever virus nucleoprotein reveals endonuclease activity in bunyaviruses*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(13): p. 5046.
21. Zivcec, M., et al., *Assessment of Inhibitors of Pathogenic Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Strains Using Virus-Like Particles*. PLoS Negl Trop Dis, 2015. **9**(12): p. e0004259.
22. Scholte, F.E.M., et al., *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Suppresses Innate Immune Responses via a Ubiquitin ve ISG15 Specific Protease*. Cell Rep, 2017. **20**(10): p. 2396-2407.
23. Akinci, E., H. Bodur, ve H. Leblebicioglu, *Pathogenesis of Crimean-Congo hemorrhagic fever*. Vector Borne Zoonotic Dis, 2013. **13**(7): p. 429-37.
24. Keshkar-Jahromi, M., et al., *Crimean-Congo hemorrhagic fever: current ve future prospects of vaccines ve therapies*. Antiviral Res, 2011. **90**(2): p. 85-92.
25. Casals, J., *Antigenic similarity between the virus causing Crimean hemorrhagic fever ve Congo virus*. Proc Soc Exp Biol Med, 1969. **131**(1): p. 233-6.
26. Chumakov, M.P., S.E. Smirnova, ve E.A. Tkachenko, *Relationship between strains of Crimean haemorrhagic fever ve Congo viruses*. Acta Virol, 1970. **14**(1): p. 82-5.
27. Papa, A., et al., *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever: Tick-Host-Virus Interactions*. Front Cell Infect Microbiol, 2017. **7**: p. 213.
28. Bente, D.A., et al., *Crimean-Congo hemorrhagic fever: history, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome ve genetic diversity*. Antiviral Res, 2013. **100**(1): p. 159-89.
29. Mertens, M., et al., *The impact of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus on public health*. Antiviral Res, 2013. **98**(2): p. 248-60.
30. Ergonul, O., et al., *The lack of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus antibodies in healthcare workers in an endemic region*. Int J Infect Dis, 2007. **11**(1): p. 48-51.
31. Sherifi, K., et al., *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus clades V ve VI (Europe 1 ve 2) in ticks in Kosovo, 2012*. PLoS Negl Trop Dis, 2014. **8**(9): p. e3168.
32. *Crimean-Congo haemorrhagic fever*. 2013; Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/crimean-congo-haemorrhagic-fever>.
33. Swanepoel, R., et al., *Epidemiologic ve clinical features of Crimean-Congo hemorrhagic fever in southern Africa*. Am J Trop Med Hyg, 1987. **36**(1): p. 120-32.
34. Franz, D.R., et al., *Clinical recognition ve management of patients exposed to biological warfare agents*. Jama, 1997. **278**(5): p. 399-411.
35. Bastug, A., et al., *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever: Prognostic Factors ve the Association of Leukocyte Counts with Mortality*. Jpn J Infect Dis, 2016. **69**(1): p. 51-5.
36. Atkinson, B., et al., *Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus*. Vector Borne Zoonotic Dis, 2012. **12**(9): p. 786-93.
37. Mardani, M., et al., *The efficacy of oral ribavirin in the treatment of crimean-congo hemorrhagic fever in Iran*. Clin Infect Dis, 2003. **36**(12): p. 1613-8.

38. Tasdelen Fisgin, N., et al., *The role of ribavirin in the therapy of Crimean-Congo hemorrhagic fever: early use is promising*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2009. **28**(8): p. 929-33.
39. Kubar, A., et al., *Prompt administration of Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) virus hyperimmunoglobulin in patients diagnosed with CCHF ve viral load monitorization by reverse transcriptase-PCR*. Jpn J Infect Dis, 2011. **64**(5): p. 439-43.
40. Vassilenko, S.M., et al., *Specific intravenous immunoglobulin for Crimean-Congo haemorrhagic fever*. Lancet, 1990. **335**(8692): p. 791-2.
41. Ergonul, O., *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: new outbreaks, new discoveries*. Current Opinion in Virology, 2012. **2**(2): p. 215-220.
42. Canakoglu, N., et al., *Immunization of knock-out α/β interferon receptor mice against high lethal dose of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus with a cell culture based vaccine*. PLoS Negl Trop Dis, 2015. **9**(3): p. e0003579.
43. Garrison, A.R., et al., *A DNA vaccine for Crimean-Congo hemorrhagic fever protects against disease ve death in two lethal mouse models*. PLOS Neglected Tropical Diseases, 2017. **11**(9): p. e0005908.
44. Ghiasi, S.M., et al., *Mice Orally Immunized with a Transgenic Plant Expressing the Glycoprotein of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus*. Clinical ve Vaccine Immunology, 2011. **18**(12): p. 2031.
45. Dowall, S.D., et al., *A Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) viral vaccine expressing nucleoprotein is immunogenic but fails to confer protection against lethal disease*. Hum Vaccin Immunother, 2016. **12**(2): p. 519-27.
46. Zivcec, M., et al., *Nucleocapsid protein-based vaccine provides protection in mice against lethal Crimean-Congo hemorrhagic fever virus challenge*. PLOS Neglected Tropical Diseases, 2018. **12**(7): p. e0006628.
47. Ghiasi, S.M., et al., *Mice orally immunized with a transgenic plant expressing the glycoprotein of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus*. Clinical ve vaccine immunology : CVI, 2011. **18**(12): p. 2031-2037.
48. Commission, E., *CCHFVaccine*. 2017.
49. Walter, C.T. ve J.N. Barr, *Recent advances in the molecular ve cellular biology of bunyaviruses*. J Gen Virol, 2011. **92**(Pt 11): p. 2467-84.
50. Donets, M.A., et al., *Physicochemical characteristics, morphology ve morphogenesis of virions of the causative agent of Crimean hemorrhagic fever*. Intervirology, 1977. **8**(5): p. 294-308.
51. Bertolotti-Ciarlet, A., et al., *Cellular localization ve antigenic characterization of crimean-congo hemorrhagic fever virus glycoproteins*. J Virol, 2005. **79**(10): p. 6152-61.
52. Xiao, X., et al., *Identification of a putative Crimean-Congo hemorrhagic fever virus entry factor*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **411**(2): p. 253-8.
53. Simon, M., C. Johansson, ve A. Mirazimi, *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus entry ve replication is clathrin-, pH- ve cholesterol-dependent*. J Gen Virol, 2009. **90**(Pt 1): p. 210-5.
54. Wang, Y., et al., *Structure of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Nucleoprotein: Superhelical Homo-Oligomers ve the Role of Caspase-3 Cleavage*. Journal of Virology, 2012. **86**(22): p. 12294.
55. Carter, S.D., et al., *Structure, Function, ve Evolution of the Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Nucleocapsid Protein*. Journal of Virology, 2012. **86**(20): p. 10914.

56. Jeeva, S., et al., *Crimean Congo hemorrhagic fever virus nucleocapsid protein harbors distinct RNA binding sites in the stalk ve head domains*. J Biol Chem, 2019.
57. Fajs, L., K. Resman, ve T. Avsic-Zupanc, *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus nucleoprotein suppresses IFN-beta-promoter-mediated gene expression*. Arch Virol, 2014. **159**(2): p. 345-8.
58. Karlberg, H., Y.J. Tan, ve A. Mirazimi, *Crimean-Congo haemorrhagic fever replication interplays with regulation mechanisms of apoptosis*. J Gen Virol, 2015. **96**(Pt 3): p. 538-46.
59. Karlberg, H., Y.J. Tan, ve A. Mirazimi, *Induction of caspase activation ve cleavage of the viral nucleocapsid protein in different cell types during Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infection*. J Biol Chem, 2011. **286**(5): p. 3227-34.
60. Sanchez, A.J., et al., *Crimean-congo hemorrhagic fever virus glycoprotein precursor is cleaved by Furin-like ve SKI-1 proteases to generate a novel 38-kilodalton glycoprotein*. J Virol, 2006. **80**(1): p. 514-25.
61. Sanchez, A.J., M.J. Vincent, ve S.T. Nichol, *Characterization of the glycoproteins of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus*. J Virol, 2002. **76**(14): p. 7263-75.
62. Guardado-Calvo, P. ve F.A. Rey, *Chapter Three - The Envelope Proteins of the Bunyavirales*, in *Advances in Virus Research*, M. Kielian, T.C. Mettenleiter, ve M.J. Roossinck, Editors. 2017, Academic Press. p. 83-118.
63. Erickson, B.R., et al., *N-linked glycosylation of Gn (but not Gc) is important for Crimean Congo hemorrhagic fever virus glycoprotein localization ve transport*. Virology, 2007. **361**(2): p. 348-55.
64. Haferkamp, S., et al., *Intracellular localization of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever (CCHF) virus glycoproteins*. Virol J, 2005. **2**: p. 42.
65. Honig, J.E., J.C. Osborne, ve S.T. Nichol, *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus genome L RNA segment ve encoded protein*. Virology, 2004. **321**(1): p. 29-35.
66. Capodagli, G.C., et al., *Structural analysis of a viral ovarian tumor domain protease from the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in complex with covalently bonded ubiquitin*. J Virol, 2011. **85**(7): p. 3621-30.
67. James, T.W., et al., *Structural basis for the removal of ubiquitin ve interferon-stimulated gene 15 by a viral ovarian tumor domain-containing protease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(6): p. 2222-7.
68. Hewson, R., et al., *Crimean-Congo haemorrhagic fever virus: sequence analysis of the small RNA segments from a collection of viruses world wide*. Virus Res, 2004. **102**(2): p. 185-9.
69. Barnwal, B., et al., *The Non-structural Protein of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Disrupts the Mitochondrial Membrane Potential ve Induces Apoptosis*. J Biol Chem, 2016. **291**(2): p. 582-92.
70. Fazakerley, J.K., et al., *Organization of the middle RNA segment of snowshoe hare Bunyavirus*. Virology, 1988. **167**(2): p. 422-32.
71. Fuller, F. ve D.H. Bishop, *Identification of virus-coded nonstructural polypeptides in bunyavirus-infected cells*. J Virol, 1982. **41**(2): p. 643-8.
72. Nakitare, G.W. ve R.M. Elliott, *Expression of the Bunyamwera virus M genome segment ve intracellular localization of NSm*. Virology, 1993. **195**(2): p. 511-20.

73. Vincent, M.J., et al., *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus glycoprotein proteolytic processing by subtilase SKI-1*. J Virol, 2003. **77**(16): p. 8640-9.
74. Bergeron, É., M.J. Vincent, ve S.T. Nichol, *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Glycoprotein Processing by the Endoprotease SKI-1/S1P Is Critical for Virus Infectivity*. Journal of Virology, 2007. **81**(23): p. 13271.
75. Altamura, L.A., et al., *Identification of a Novel C-Terminal Cleavage of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus PreG₁N₁ That Leads to Generation of an NS₁M₁ Protein*. Journal of Virology, 2007. **81**(12): p. 6632.
76. Eifan, S., et al., *Non-structural proteins of arthropod-borne bunyaviruses: roles ve functions*. Viruses, 2013. **5**(10): p. 2447-2468.
77. Tilston-Lunel, N.L., et al., *Generation of Recombinant Oropouche Viruses Lacking the Nonstructural Protein NSm or NSs*. J Virol, 2015. **90**(5): p. 2616-27.
78. Bridgen, A., et al., *Bunyamwera bunyavirus nonstructural protein NSs is a nonessential gene product that contributes to viral pathogenesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98**(2): p. 664.
79. Szemiel, A.M., A.-B. Failloux, ve R.M. Elliott, *Role of Bunyamwera Orthobunyavirus NSs Protein in Infection of Mosquito Cells*. PLOS Neglected Tropical Diseases, 2012. **6**(9): p. e1823.
80. Gouzil, J., et al., *Nonstructural Protein NSs of Schmallenberg Virus Is Targeted to the Nucleolus ve Induces Nucleolar Disorganization*. Journal of virology, 2016. **91**(1): p. e01263-16.
81. Moriyama, M., et al., *Two Conserved Amino Acids within the NSs of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Phlebovirus Are Essential for Anti-interferon Activity*. Journal of Virology, 2018. **92**(19): p. e00706-18.
82. Wu, X., et al., *Roles of viroplasm-like structures formed by nonstructural protein NSs in infection with severe fever with thrombocytopenia syndrome virus*. Faseb j, 2014. **28**(6): p. 2504-16.
83. Billecocq, A., et al., *NSs Protein of Rift Valley Fever Virus Blocks Interferon Production by Inhibiting Host Gene Transcription*. Journal of Virology, 2004. **78**(18): p. 9798.
84. Kainulainen, M., et al., *NSs Virulence Factor of Rift Valley Fever Virus Engages the F-Box Proteins FBXW11 ve beta-TRCP1 To Degrade the Antiviral Protein Kinase PKR*. J Virol, 2016. **90**(13): p. 6140-7.
85. Wuerth, J.D., et al., *NSs Protein of Sfevly Fever Sicilian Phlebovirus Counteracts Interferon (IFN) Induction by Masking the DNA-Binding Domain of IFN Regulatory Factor 3*. Journal of virology, 2018. **92**(23): p. e01202-18.
86. Jaaskelainen, K.M., et al., *Tula ve Puumala hantavirus NSs ORFs are functional ve the products inhibit activation of the interferon-beta promoter*. J Med Virol, 2007. **79**(10): p. 1527-36.
87. Virtanen, J.O., et al., *Tula hantavirus NSs protein accumulates in the perinuclear area in infected ve transfected cells*. Archives of Virology, 2010. **155**(1): p. 117-121.
88. Vera-Otarola, J., et al., *The Veas hantavirus NSs protein is expressed from the viral small mRNA by a leaky scanning mechanism*. J Virol, 2012. **86**(4): p. 2176-87.
89. Singh, A., et al., *Induction of cell death by tospoviral protein NSs ve the motif critical for cell death does not control RNA silencing suppression activity*. Virology, 2017. **508**: p. 108-117.

90. Bhushan, L., et al., *Demonstration of helicase activity in the nonstructural protein, NSs, of the negative-sense RNA virus, Groundnut bud necrosis virus*. Archives of Virology, 2015. **160**(4): p. 959-967.
91. Margaria, P., et al., *The NSs protein of tomato spotted wilt virus is required for persistent infection ve transmission by Frankliniella occidentalis*. Journal of virology, 2014. **88**(10): p. 5788-5802.
92. Shi, X., et al., *Bunyamwera orthobunyavirus glycoprotein precursor is processed by cellular signal peptidase ve signal peptide peptidase*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2016. **113**(31): p. 8825.
93. Pollitt, E., et al., *Characterization of Maguari orthobunyavirus mutants suggests the nonstructural protein NSm is not essential for growth in tissue culture*. Virology, 2006. **348**(1): p. 224-232.
94. Tilston-Lunel, N.L., et al., *Generation of Recombinant Oropouche Viruses Lacking the Nonstructural Protein NSm or NSs*. Journal of Virology, 2016. **90**(5): p. 2616.
95. Fontana, J., et al., *The unique architecture of Bunyamwera virus factories around the Golgi complex*. Cell Microbiol, 2008. **10**(10): p. 2012-28.
96. Bird, B.H., C.G. Albariño, ve S.T. Nichol, *Rift Valley fever virus lacking NSm proteins retains high virulence in vivo ve may provide a model of human delayed onset neurologic disease*. Virology, 2007. **362**(1): p. 10-15.
97. Won, S., et al., *NSm Protein of Rift Valley Fever Virus Suppresses Virus-Induced Apoptosis*. Journal of Virology, 2007. **81**(24): p. 13335.
98. Crabtree, M.B., et al., *Infection ve transmission of Rift Valley fever viruses lacking the NSs ve/or NSm genes in mosquitoes: potential role for NSm in mosquito infection*. PLoS neglected tropical diseases, 2012. **6**(5): p. e1639-e1639.
99. Zhao, W., et al., *Plasmodesmata targeting ve intercellular trafficking of Tomato spotted wilt tospovirus movement protein NSm is independent of its function in HR induction*. J Gen Virol, 2016. **97**(8): p. 1990-7.
100. Singh, P., S.S. Indi, ve H.S. Savithri, *Groundnut bud necrosis virus encoded NSm associates with membranes via its C-terminal domain*. PLoS One, 2014. **9**(6): p. e99370.
101. Ozdarendeli, A., et al., *The complete genome analysis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus isolated in Turkey*. Virus Res, 2010. **147**(2): p. 288-93.
102. *Prediction of transmembrane helices in proteins*. Available from: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>.
103. *Open Reading Frame Finder*. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>.
104. *EMBOSS. Antigenic Site Determination*. Available from: <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/antigenic>.
105. *Champion™ pET SUMO Protein Expression System* p. 52.
106. Sambrook, J., *Molecular cloning : a laboratory manual*. 2001: Third edition. Cold Spring Harbor, N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory Press, [2001] ©2001.
107. *OligoAnalyzer Tool*. Available from: <https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>.
108. IntronBio. *MEGAquick-spin™ Plus Total Fragment DNA Purification Kit* [cited 2019 09.05.2019]; manual]. Available from: https://intronbio.com:6001/intronbioen/product/product_view.php?PRDT_ID=7.

109. Angela Chang, V.C., Julius Lveas, Yvonne Pang, *Preparation of Calcium Competent Escherichia coli and Heat Shock Transformation*. The Journal of Experimental Microbiology ve Immunology, 2017. **1**.
110. IntronBio. *DNA-spin™ Plasmid DNA Purification Kit* [cited 2019 09.05.2019]; Manual]. Available from: https://intronbio.com:6001/intronbioen/product/product_view.php?PRDT_ID=1.
111. BIORAD. *Mini-PROTEAN® Electrophoresis System* [cited 2019 09.05.2019]; Manual]. Available from: http://www.biorad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5535.pdf.
112. THERMO. *HisPur™ Ni-NTA Spin Columns*. [cited 2019 09.05.2019]; Manual]. Available from: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011699_HisPur_NiNTA_SpinColumn_UG.pdf.
113. BIORAD. *Bio-Dot® Microfiltration Apparatus Instruction Manual*. [cited 2019 09.05.2019]; Available from: <http://www.biorad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/M1706545.pdf>.
114. Krug, R.M., et al., *Intracellular warfare between human influenza viruses ve human cells: the roles of the viral NS1 protein*. Virology, 2003. **309**(2): p. 181-9.
115. Owens, R.J., C. Limn, ve P. Roy, *Role of an arbovirus nonstructural protein in cellular pathogenesis ve virus release*. J Virol, 2004. **78**(12): p. 6649-56.
116. van Gennip, R.G.P., S.G.P. van de Water, ve P.A. van Rijn, *Bluetongue Virus Nonstructural Protein NS3/NS3a Is Not Essential for Virus Replication*. PLOS ONE, 2014. **9**(1): p. e85788.
117. Komoto, S., et al., *Reverse Genetics System Demonstrates that Rotavirus Nonstructural Protein NSP6 Is Not Essential for Viral Replication in Cell Culture*. J Virol, 2017. **91**(21).
118. Marc, D., *Influenza virus non-structural protein NS1: interferon antagonism ve beyond*. J Gen Virol, 2014. **95**(Pt 12): p. 2594-611.
119. Ayllon, J. ve A. Garcia-Sastre, *The NS1 protein: a multitasking virulence factor*. Curr Top Microbiol Immunol, 2015. **386**: p. 73-107.
120. Basu, D., et al., *Novel influenza virus NS1 antagonists block replication ve restore innate immune function*. Journal of virology, 2009. **83**(4): p. 1881-1891.
121. Engel, D.A., *The influenza virus NS1 protein as a therapeutic target*. Antiviral research, 2013. **99**(3): p. 409-416.
122. Barnwal, B., et al., *A monoclonal antibody binds to threonine 49 in the non-structural 1 protein of influenza A virus ve interferes with its ability to modulate viral replication*. Antiviral Res, 2015. **116**: p. 55-61.
123. You, L., et al., *Synthesis ve evaluation of quinoxaline derivatives as potential influenza NS1A protein inhibitors*. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2011. **21**(10): p. 3007-3011.
124. Hai, R., et al., *Influenza B virus NS1-truncated mutants: live-attenuated vaccine approach*. Journal of virology, 2008. **82**(21): p. 10580-10590.
125. Nogales, A., et al., *Canine influenza viruses with modified NS1 proteins for the development of live-attenuated vaccines*. Virology, 2017. **500**: p. 1-10.
126. Ganta, N.M., et al., *A review on HCV inhibitors: Significance of non-structural polyproteins*. Eur J Med Chem, 2019. **164**: p. 576-601.
127. Hafez, E., et al., *A New Potent NS5A Inhibitor in the Management of Hepatitis C Virus: Ravidasvir*. Curr Drug Discov Technol, 2018. **15**(1): p. 24-31.

128. Ivanenkov, Y.A., et al., *Small-molecule inhibitors of hepatitis C virus (HCV) non-structural protein 5A (NS5A): a patent review (2010-2015)*. Expert Opin Ther Pat, 2017. **27**(4): p. 401-414.
129. Borgia, G., et al., *NS5B polymerase inhibitors in phase II clinical trials for HCV infection*. Expert Opin Investig Drugs, 2018. **27**(3): p. 243-250.
130. Latimer, B., et al., *Strong HCV NS3/4a, NS4b, NS5a, NS5b-specific cellular immune responses induced in Rhesus macaques by a novel HCV genotype 1a/1b consensus DNA vaccine*. Hum Vaccin Immunother, 2014. **10**(8): p. 2357-65.
131. Wada, T., M. Kohara, ve Y. Yasutomi, *DNA vaccine expressing the non-structural proteins of hepatitis C virus diminishes the expression of HCV proteins in a mouse model*. Vaccine, 2013. **31**(50): p. 5968-74.
132. Ramirez, R., et al., *Recombinant dengue 2 virus NS3 protein conserves structural antigenic ve immunological properties relevant for dengue vaccine design*. Virus Genes, 2014. **49**(2): p. 185-95.
133. Costa, S.M., et al., *Induction of a Protective Response in Mice by the Dengue Virus NS3 Protein Using DNA Vaccines*. PLOS ONE, 2011. **6**(10): p. e25685.
134. Alcon, S., et al., *Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections*. Journal of clinical microbiology, 2002. **40**(2): p. 376-381.
135. Xu, H., et al., *Serotype 1-specific monoclonal antibody-based antigen capture immunoassay for detection of circulating nonstructural protein NS1: Implications for early diagnosis ve serotyping of dengue virus infections*. Journal of clinical microbiology, 2006. **44**(8): p. 2872-2878.
136. T.C.S., *Kırım Kongo Kanamalı Ateşi*, H.S.G. Müdürlüğü, Editor. 2017: T.C. Sağlık Bakanlığı Resmi Web Sitesi.

ETİK KURUL KARARI



**T.C.
BEZMİÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
KARAR METNİ**

SAYI: 2016/ 80

26.02.2016

KONU: Sn. Prof. Dr. Mehmet Ziya DOYMAZ

Sayın, Prof. Dr. Mehmet Ziya DOYMAZ

“Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü Kelkit Suşunun Yapısal Olmayan Proteinin İmmünolojik Özelliklerinin Araştırılması” başlıklı projeniz 26.02.2016 tarihinde yapılan Yerel Etik Kurul toplantısında değerlendirilmiş ve onanmıştır.

Doç. Dr. Fahri AKBAS
Etik Kurul Başkanı

Prof. Dr. Ahmet BELCE
Üye

Prof. Dr. Erhan AYŞAN
Üye

Prof. Dr. İsmail MEBAL
Üye

Prof. Dr. Serdar UŞÜMEZ
Üye

Yrd. Doç. Dr. Ömer UYSAL
Üye

KATILMAZ

Vet. Hek. Mert ÇELİKTEN
Üye

Nasuhi GÜNAY
Üye

Hakan AKTÜRK
Üye

- Etik kurulumuzdan onam alan her proje için, çalışma başlamadan üç ay önce çalışılacak hayvan rezervinin uygunluğunu (tür, yaş, cinsiyet) belirlemek amacıyla Deney Hayvanları Laboratuvarına başvurulmalıdır.

Evrak Tarih ve Sayısı: 05/01/2017-292



T.C.
BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 71306642-050.01.04-
Konu : Etik Kurul Kararı

Sayın Prof.Dr. Mehmet Ziya DOYMAZ
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı

04.01.2017 tarihinde yapılan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu toplantısında "Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü Kelkit Suşunun Yapısal Olmayan Proteinlerinin İmmünolojik Özelliklerinin Araştırılması" başlıklı başvurunuz değerlendirilmiş olup karar yazısı ektedir. Bilgilerinize.

Doç.Dr. Özcan KARAMAN
Başkan

EK :
-Karar yazısı (3 sayfa)

05/01/2017 Mem. : M.İNCE

Mevcut Elektronik İmzalar

OZCAN KARAMAN (Klinik Araştırmalar Etik Kurulu - Başkan) 05/01/2017 12:55

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Adnan Menderes Bulvarı (Vatan
Caddesi) Fatih / İstanbul
Tel: 0 (212) 523 22 88
E-Posta: info@bezmialem.edu.tr

Ayrıntılı bilgi için irtibat: Merve İnce
Faks: 0 (212) 533 23 26
Elektronik ağı: www.bezmialem.edu.tr

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU (2011-KAEK-42) KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü Kelkit Suşunun Yapısal Olmayan Proteinlerinin İmmünolojik Özelliklerinin Araştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

04.01.2017

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Adnan Menderes Bulvarı Vatan caddesi 34093 Fatih/İstanbul
	TELEFON	(0212) 523 22 88 - 1028
	FAKS	(0212) 533 23 26
	E-POSTA	etikkurulu@bezmialem.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Mehmet Ziya DOYMAZ			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Mikrobiyoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Bezmialem Vakıf Üniversitesi			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI	-			
	DESTEKLEYİCİ	TÜBİTAK 1001 Projesi			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	-			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
		Gözlemsel ilaç çalışması	☐		
		Tıbbi cihaz klinik araştırması	☐		
		In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	☐		
		İlaç dışı klinik araştırma (akademik amaçlı)	☒ Temel Bilimsel Araştırma		
Diğer ise belirtiniz					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐	ULUSLARARASI ☐	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	-	-	Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU (2011-KAEK-42) KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü Kelkit Suşunun Yapısal Olmayan Proteinlerinin İmmünolojik Özelliklerinin Araştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama
	SIGORTA	☐	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒	28.09.2015, V.2, 04.01.2017 imza tarihli
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐	
	İLAN	☐	
	YILLIK BİLDİRİM	☐	
	SONUÇ RAPORU	☐	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
	DİĞER:	☒	- Klinik Araştırma Başvuru Formu (doküman no: KA-1, 07.09.2015) - Sorumlu araştırmacıya ait özgeçmiş formu - Çalışmanın Helsinki Bildirgesi, İKU/İLU' ya uygun yürütüleceğine dair taahhütname - Çalışma akış şeması - Araştırma ile ilgili yayınlar
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 1 / 16	Tarih: 04.01.2017	
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmacı/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmacı/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.		

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU (2011-KAEK-42) KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü Kelkit Suşunun Yapısal Olmayan Proteinlerinin İmmünolojik Özelliklerinin Araştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Doç. Dr. Özcan KARAMAN

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlişki	Katılım *	İmza
Doç. Dr. Özcan KARAMAN	İç Hastalıkları	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Selhattin TUGRUL	Kulak Burun ve Boğaz Hastalıkları	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Yrd. Doç. Dr. Harun BAŞOĞLU	Biyofizik	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Yrd. Doç. Dr. Ayşe Arzu ŞAKUL	Tıbbi Farmakoloji	Medipol Üniversitesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Prof. Dr. Akın İŞCAN	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Yrd. Doç. Dr. Mehmet ÖYÜKLÜ	Fizyoloji	Bezmialem Vakıf Üniversitesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Yrd. Doç. Dr. Meltem BAKKAL	Pedodonti	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Yrd. Doç. Dr. Alper YENİGÜN	Kulak Burun ve Boğaz Hastalıkları	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Ertuğrul KAYA	Tıbbi Farmakoloji	Düzce Üniversitesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Yrd. Doç. Dr. Ömer UYSAL	Bioistatistik ve Tıp Bilişimi	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Sultan ŞİMŞEK	Çalışan	Kurum Dışı	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Avukat Aybüke EKİCİ	Hukuk	Bezmialem Vakıf Üniversitesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

* :Toplantıda Bulunma

Karar:

☒ Onaylandı☐ ReddedildiEtik Kurul Başkanı
Doç. Dr. Özcan KARAMAN

Sayfa 3 / 3

HAM VERİLER

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ VİRÜSÜ KELKİT SUŞUNUN YAPISAL OLMAYAN PROTEİNLERİ VE HUMORAL İMMÜNİTEDEKİ ROLLERİ

ORJİNALLİK RAPORU

%**5**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**2**

İNTERNET
KAYNAKLARI

%**1**

YAYINLAR

%**4**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

Submitted to TechKnowledge Turkey

Öğrenci Ödevi

%**1**

2

Submitted to Eskisehir Osmangazi University

Öğrenci Ödevi

<%**1**

3

Submitted to Ankara University

Öğrenci Ödevi

<%**1**

4

Submitted to Canakkale Onsekiz Mart
University

Öğrenci Ödevi

<%**1**

5

Submitted to Recep Tayyip Erdogan University

Öğrenci Ödevi

<%**1**

6

www.jove.com

İnternet Kaynağı

<%**1**

7

Submitted to Ege Üniversitesi

Öğrenci Ödevi

<%**1**

8

Submitted to Erciyes Üniversitesi

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Elif	Soyadı	KARAASLAN
Doğ.Yeri	Istanbul/Fatih	Doğ.Tar.	03/07/1987
Uyruğu	Türk	TC Kim No	58933336550
Email	ekaraaslan@bezmialem.edu.tr	Tel	05469383276

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	Devam etmekte
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2013
Lisans	Abant İzzet Baysal Üniversitesi	2010
Lise	Bahçeşehir Atatürk Lisesi	2006

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Öğretim Görevlisi	Bezmialem Vakıf Üniversitesi	2015-
2.	Araştırma Görevlisi	Bezmialem Vakıf Üniversitesi	2013-2015
3.	Medikal Eğitmen	Celtis İlaç	2012-2013

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	91.25	YDS

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	71,91803	72,60205	75,63466
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	Çok iyi
SnapGene	Çok iyi
Graphpad	Çok iyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Uluslararası Yayınlar:

1. Dosler S. **Karaaslan E.** Inhibition ve destruction of Pseudomonas aeruginosa biofilms by antibiotics ve antimicrobial peptides. Peptides 2014(62): 32-37.

2. Dosler S., **Karaaslan E.**, Gerceker A. A. Antibacterial ve anti-biofilm activities of melittin ve colistin, alone ve in combination with antibiotics against Gram-negative bacteria. Journal of Chemotherapy 2015.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler:

1. **E. Karaaslan**, S. Döşler. Çevreden İzole Edilen Suşların Antimikrobiyal Direnç Durumlarının Araştırılması ve Klinik Suşlarla Karşılaştırılması.35. Türk Mikrobiyoloji Kongresi. 3-7 Kasım 2012, Kuşadası, Aydın, TÜRKİYE.
2. **E. Karaaslan**, S. Döşler. Çevresel Kaynaklı Suşlarda Antibiyotik Direnç Genlerinin Araştırılması ve Biyofilm Oluşturma Potansiyellerinin Araştırılması. 11. Antimikrobik Kemoterapi Günleri. 18-24 Nisan 2012, Harbiye, İstanbul, TÜRKİYE.
3. S.Döşler, **E. Karaaslan**. Çeşitli Gram Negatif Bakterilerin Biyofilm Oluşturma Özellikleri ve Biyofilmlerin Çeşitli Antibiyotik ve Antimikrobik Peptitler Tarafından İnhibisyonunun Araştırılması. . 11. Antimikrobik Kemoterapi Günleri. 18-24 Nisan 2012, Harbiye, İstanbul, Türkiye.
4. Nesibe S.Çetin, **Elif Karaaslan**, Ali Osman kılıç, Mehmet Z. Doymaz. Investigation of Humoral Immune Response Against Nucleoprotein of Crimean Congo Hemorrhagic Fever Virus (CCHFV) in Mice. 3rd International Molecular Immunology ve Immunogenetics Congress 2016, Antalya, TURKEY.
5. **E. Karaaslan**, M.Z. Doymaz. Comparison of polymyxin B ve colistin against battery of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* ve *Klebsiella pneumoniae* strains. IV International Conference on Antimicrobial Research - ICAR2016, Malaga, SPAIN.
6. **E. Karaaslan**, Mehmet Ziya DOYMAZ. In vitro activities of colistin in combination with doripenem, doxycycline ve rifampin against multi-drug resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii*. 7th Congress of European Microbiologists-FEMS 2017,Valencia, SPAIN.
7. **E. Karaaslan**, Mehmet Ziya DOYMAZ. Immunological Characteristics of Nonstructural Proteins of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. 2nd International Conference on Crimean-Congo Hemorrhagic Fever 2017, Thessaloniki, GREECE.
8. Nesibe Selma Çetin, Merve Yazıcı, **Elif Karaaslan**, Sevede Hasanoğlu, Ahmet Kalkan, Aykut Özdarendeli, Ali Osman Kılıç, Mehmet Ziya Doymaz. Evaluation of CCHFV nucleoprotein as diagnostic tool in ELISA. 2nd International Conference on Crimean-Congo Hemorrhagic Fever 2017, Thessaloniki, GREECE.
9. **Elif Karaaslan**, Nesibe Selma Çetin, Sevede Hasanoğlu, Ali Osman Kılıç, Ahmet Kalkan, Aykut Özdarendeli, Mehmet Ziya Doymaz. Detailed Immunological Analysis of Recombinant Crimean Congo Hemorrhagic Fever Virus Nucleoprotein. European Congress of Virology 2019, Rotterdam, HOLLVEA.

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Bilgisayar oyunları, romanlar, puzzle.