

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ HASTALIĞI
(KKKAH) VİRÜSÜ YAPISAL OLMAYAN S
PROTEİNİNİN (NSs) PROKARYOTİK SİSTEMDE
AÇIKLATILMASI VE NSs'İN KKKAH VİRÜSÜNÜN
REPLİKASYONUNDAKİ ROLÜ**

**Hazırlayan
Günsu AYDIN**

**Danışman
Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ**

Yüksek Lisans Tezi

**Temmuz 2019
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ HASTALIĞI
(KKKAH) VİRÜSÜ YAPISAL OLMAYAN S
PROTEİNİNİN (NSs) PROKARYOTİK SİSTEMDE
AÇIKLATILMASI VE NSs'İN KKKAH VİRÜSÜNÜN
REPLİKASYONUNDAKİ ROLÜ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Hazırlayan
Günsu AYDIN**

**Danışman
Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ**

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TYL-2018-8212 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Temmuz 2019
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Günsu AYDIN

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı (KKKAH) Virüsü Yapısal Olmayan S Proteininin (NSs) Prokaryotik Sistemde Açıklanması ve NSs’in KKKAH Virüsünün Replikasyonundaki Rolü” Yüksek Lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

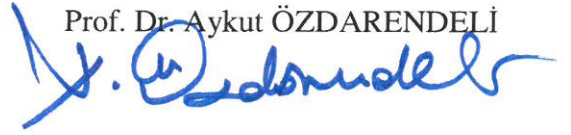
Tezi Hazırlayan

Günsu AYDIN



Danışman

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ



Tıbbi Mikrobiyoloji ABD Başkanı

Prof. Dr. Hüseyin KILIÇ



Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ danışmanlığında **Günsu AYDIN** tarafından hazırlanan “**Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı (KKKAH) Virüsü Yapısal Olmayan S Proteininin (NSs) Prokaryotik Sistemde Açıklanması ve NSs’in KKKAH Virüsünün Replikasyonundaki Rolü**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Mikrobiyoloji** Anabilim Dalında **yüksek lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

17 / 07 / 2019

JÜRİ:

Danışman : Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ

(Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı)

Üye : Prof. Dr. Hüseyin KILIÇ

(Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı)

Üye : Prof. Dr. Mehmet Ziya DOYMAZ

(Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı)

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve

sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrencisi olarak beni kabul eden, eğitim ve öğrenim sürem boyunca engin tecrübesini benimle paylaşan, tez çalışmam boyunca bana yol gösteren, yanlış anlamalarımı ve anlatımlarıma sabır gösteren, çalışma azmini kendime örnek aldığım değerli danışmanım Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ'ye,

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bilgi, deneyim ve tecrübelerini benimle paylaşan başta Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hüseyin KILIÇ olmak üzere bölümdeki tüm öğretim üyelerine,

Laboratuvarında çalıştığım süre boyunca her türlü desteği ve yardımı alabildiğim, birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum arkadaşlarım Hazel YETİŞKİN ve Shaikh Terkis Islam PAVEL'e

Bana yaşam veren, beni mükemmel değer yargıları ile yetiştiren, tüm hayatım boyunca her konuda tam desteklerini hissettiğim, kendimi geliştirmemi sağlayan, her daim arkamda olan, sonsuz sevgi ve saygı ile bağlı olduğum aileme sonsuz teşekkürler...

Bu tez çalışmasına maddi destek veren Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje kodu: TYL-2018-8212) teşekkür ederim.

Günsu AYDIN

Kayseri, Temmuz 2019

**KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ HASTALIĞI VİRÜSÜ (KKKAHV)
YAPISAL OLMAYAN S PROTEİNİNİN PROKARYOTİK SİSTEMDE
AÇIKLATILMASI VE REKOMBİNANT YAPISAL OLMAYAN S PROTEİNİ
KULLANILARAK ELISA GELİŞTİRİLMESİ**

Günsu AYDIN

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Temmuz 2019

Danışman: Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ

ÖZET

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı (KKKAH), Çin'nin batısından Güney Asya'ya; Orta Doğu'dan Güneydoğu Avrupa'ya ve Afrika'ya kadar geniş bir alanda yayılım gösteren, çoğunlukla insanlarda görülen kene kaynaklı viral bir enfeksiyondur. KKKAH virüs genomu, sırasıyla nükleokapsit proteinini, Gn ve Gc glikoproteinlerini ve RNA-bağımlı RNA polimerazını kodlayan küçük (S), orta (M) ve büyük (L) üç negatif-polariteli RNA segmenti içerir. Ek olarak, *Bunyavirales* takımının bazı üyeleri M segmentinde (NSm olarak adlandırılan) veya S segmentinde (NSs olarak adlandırılan) yapısal olmayan proteinleri kodlar. KKKAH virüsü NSs'i, S segmentinin pozitif polariteli kısmından kodlanır. Hemen hemen tüm KKKAH virüsü suşlarında NSs'e ait bir açık okuma çerçevesi bulunur ve bu durum, NSs'lerin korunmuş bir biyolojik fonksiyona sahip olabileceğini göstermektedir. Bu çalışmanın amacı, KKKAH virüsü ile enfekte olmuş hücrelerde viral yapısal olmayan S proteininin varlığını ve proteinin replikasyon üzerine etkilerini araştırmaktır. Bu amaçla, NSs geni çoğaltıldı ve pCOLD TF-NSs olarak adlandırılan pCOLD TF plazmidine klonlandı. Rekombinant protein, *E. coli* C43 (DE3) hücrelerinde eksprese edilip pürifiye edildi. Enfeksiyon sırasında NSs'in ekspresyon seviyelerini incelemek için hücreler, KKKAH virüsü ile enfekte edildi ve rekombinant NSs proteinine karşı oluşmuş hiperimmün serumlar kullanılarak IFA testi yapıldı. IFA sonuçları, NSs ekspresyonunun enfekte olmuş hücrelerde, erken dönemde, enfeksiyondan 6 saat sonra belirlendiğini gösterdi. NSs'in varlığı, KKKAH pozitif insan

serumları ile problemlenerek immünoablottama ile doğrulandı. Ayrıca hedef hücrelerin proteazom inhibitörü olan MG132 ile muamele edilmesi NSs proteininin ekspresyonunu arttırdığını gösterdi. Bu şekilde, NSs'in proteazom tarafından degradasyonu, KKKAH virüs enfeksiyonuna karşı erken bir hücre içi savunmayı temsil etmektedir. Küçük interferans RNA (siRNA), RNA interferans (RNAi) yolağında bir rol oynamakta ve spesifik viral genlerin ekspresyonunu azaltmaktadır. Bu çalışmada NSs'e karşı spesifik siRNA'ların KKKAH virüs üretimini güçlü şekilde inhibe ettiğini belirlenmiştir. Bu veriler, siRNA'nın uygulanmasının, KKKAH'nın antiviral tedavisi için ümit verici olabileceğini göstermiştir. Son olarak, indirekt ELISA geliştirmek için rekombinant NSs antijeninin kullanımı araştırıldı; ancak serum numuneleri paneli kullanarak KKKAH enfeksiyonunun tespiti sağlanamadı.

Anahtar Kelimeler: KKKAH virüsü, Yapısal olmayan S proteini (NSs), küçük interferans RNA (siRNA)

**EXPRESSION OF NONSTRUCTURAL S PROTEIN (NSs) OF CRIMEAN-
CONGO HEMORRHAGIC FEVER (CCHF) VIRUS IN PROKARYOTIC
SYSTEM AND THE ROLE OF NSs IN CCHF VIRUS REPLICATION**

Günsu AYDIN

Erciyes University, Graduate School of Health Sciences

Department of Stem Cell Science

M.Sc. Thesis, July 2019

Supervisor: Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ

ABSTRACT

Crimean–Congo hemorrhagic fever (CCHF) is the most widespread tick-borne viral infection of humans, occurring across a vast area from western China through southern Asia and the Middle East to southeastern Europe and throughout most of Africa. The CCHFV genome contains three negative-sense RNA segments, small (S), medium (M), and large (L), encoding the nucleocapsid protein, Gn and Gc glycoproteins, and the RNA-dependent RNA polymerase, respectively. In addition, several Bunyavirales members encode nonstructural proteins, either on the M (termed NSm) or S segment (termed NSs) of the genome. The NSs of CCHFV is encoded by the positive-sense of the S segment genome. The ORF of NSs is conserved in almost all strains of CCHFV, indicating that NSs might have a conserved biological function. The aim of this study is to investigate the presence of NSs in CCHFV-infected cells and to investigate its effects on replication. For this purpose, the gene encoding NSs was amplified and cloned into pCOLDFX plasmid, called pCOLDFX-NSs. The recombinant protein was expressed in *E. coli* BL21 C43(DE3) and was purified. To examine the expression of NSs during infection, cells were infected with CCHFV and were subjected to immunofluorescence assay (IFA) with the hyperimmune sera against the recombinant NSs protein. IFA results indicated that the expression of NSs was determined as early as 6 hours post infection. The presence of NSs which was probed with CCHF positive human sera was also confirmed by immunoblotting. We also showed that treatment of target cells with the proteasome inhibitor MG132 increased the expression of NSs protein. Thus, degradation of NSs by the proteasome represents an early intracellular defense against CCHF virus infection. Short interfering RNA (siRNA) plays a roles in the RNA

interference (RNAi) pathway and decreases the expression of specific viral genes. Here we determined that specific siRNAs against the NSs potently inhibited CCHF virus production. This data showed that the application of siRNA might be promising for antiviral treatment of CCHF. Lastly, we examined the utility of recombinant NSs antigen for developing indirect ELISA but we were not able to achieve the detection of CCHF infection using a panel of serum samples.

Key Words: CCHFV, Non structural S protein (NSs), small interfering RNA



İÇİNDEKİLER

KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ HASTALIĞI (KKKAH) VİRÜSÜ YAPISAL OLMAYAN S PROTEİNİNİN (NSs) PROKARYOTİK SİSTEMDE AÇIKLATILMASI VE NSs'İN KKKAH VİRÜSÜNÜN REPLİKASYONUNDAKİ ROLÜ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	ii
ONAY:	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	xviii
TABLolar LİSTESİ.....	xxii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xxiii
1.GİRİŞ ve AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığının Tarihçesi.....	3
2.2. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı Virüsü	6
2.2.1. Viral Sınıflandırma.....	6
2.2.2. Viral Yapı ve Viral Genom Özellikleri	9
2.2.3. Viral Proteinler ve Fonksiyonları	11
2.2.3.1. S Segmenti	11
2.2.3.2. M Segmenti.....	13
2.2.3.3. L segmenti.....	15
2.2.4. Virüsün Replikasyonu	16
2.3. Patogenez	20

2.4. Epidemiyoloji	23
2.5. Klinik Seyri ve Laboratuvar Bulguları	27
2.6. Teşhis Yöntemleri.....	29
2.7. Tedavi.....	31
2.7.1. Destekleyici Tedaviler	31
2.7.2. Ribavirin	31
2.7.3. Metilprednizolon	32
2.7.4. Konvelesan Kan Ürünleri	33
2.7.5. Monoklonal Antikor Tedavisi	33
2.7.6. Arbidol and Favipiravir (T-705)	34
2.8. Korunma ve Kontrol	34
2.8.1. Aşılama	35
3. GEREÇ VE YÖNTEM	38
3.1. KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit 06 Suşu Yapısal Olmayan S (NSs) Proteininin DNA Sekansınının ve Amino asit Diziliminin Belirlenmesi.....	38
3.2. KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit06 Suşu NSs Geninin pCOLD TF Plazmid Vektörüne Klonlanması	38
3.2.1. pCOLD TF plazmid DNA vektörünün <i>E.coli</i> JM109 Kompetan Hücrelerine Transformasyonu	38
3.2.1.1. Materyal.....	38
3.2.1.2. Metot.....	39
3.2.2. pCOLD TF plazmid DNA Ekstraksiyonu	40
3.2.2.1. Materyal.....	40
3.2.2.2. Metot.....	40
3.2.3. KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit06 Suşu NSs Geninin PZR Yöntemi ile Çoğaltılması	41
3.2.3.1. Materyal.....	41
3.2.3.2. Metot.....	42

3.2.4. NSs Geni PZR Ürününün Agaroz Jelden Ekstraksiyonu ve Pürifikasyonu	42
3.2.4.1. Materyal	42
3.2.4.2. Metot	43
3.2.5. pCOLD TF plazmid DNA ve NSs Geninin Restriksiyon Enzimleriyle Kesilmesi	44
3.2.5.1. Materyal	44
3.2.5.2. Metot	44
3.2.6. pCOLD TF plazmid DNA ve NSs Geninin Ligasyonu	44
3.2.6.1. Materyal	44
3.2.5.2. Metot	45
3.2.7. Koloni PZR ile Pozitif Klonların Belirlenmesi	45
3.2.7.1. Materyal	45
3.2.7.2. Metot	45
3.2.8. pCOLD TF-NSs Plazmidinin <i>E. coli</i> C43 (DE3) Hücrelerine Transformasyonu	46
3.2.8.1. Materyal	46
3.2.8.2. Metot	47
3.3. pCOLD TF-NSs Vektörü Kullanılarak Prokaryotik Sistemde Rekombinant Protein Üretimi ve Saflaştırılması	47
3.3.1. pCOLD TF-NSs Vektörünün IPTG ile İndüksiyonu	47
3.3.1.1. Materyal	47
3.3.1.2. Metot	48
3.3.2. pCOLD TF-NSs Rekombinant Proteininin Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) ile Görüntülenmesi	49
3.3.2.1. Materyal	49
3.3.2.2. Metot	50
3.3.3. pCOLD TF-NSs Rekombinant Proteinin Lizis Tamponu ile Ekstraksiyonu	51

3.3.3.1. Materyal.....	51
3.3.3.2. Metot.....	51
3.3.4. pCOLD TF-NSs Rekombinant Proteinin Safılaştırılması	52
3.3.4.1. Materyal.....	52
3.3.4.2. Metot.....	52
3.3.5. pCOLD TF-NSs Rekombinant Proteinin Miktarının Belirlenmesi.....	53
3.3.5.1. Materyal.....	53
3.3.5.2. Metot.....	54
3.4. pCOLD TF-NSs Rekombinant Proteinini ile Fare İmmünizasyonu	55
3.5. pCOLD TF-NSs Rekombinant Proteinin İndirekt ELISA Testlerinde Kullanılması	55
3.5.1. Rekombinant pCOLD TF-NSs Proteinini ile İmmünize Edilen Farelerden Alınan Serumların ELISA ile Test Edilmesi.....	55
3.5.1.1. Materyal.....	55
3.5.1.2. Metot.....	56
3.5.2. Rekombinant pCOLDTF-NSs Proteininin, KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit06 Suşuyla İmmünize Edilen Fare Serumlarında Anti-KKKAHV IgG Belirlenmesi Amacıyla ELISA Testinde Kullanılması..	57
3.5.2.1. Materyal.....	57
3.5.2.2. Metot.....	57
3.5.3. Rekombinant pCOLD TF-NSs Proteinin, KKKAH IgG Pozitif İnsan Serumlarında Anti-KKKAH IgG Belirlenmesi Amacıyla ELISA Testinde Kullanılması	58
3.5.3.1. Materyal.....	58
3.5.3.2. Metot.....	59
3.6. KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit 06 Suşu NSs Proteinine ait Peptitlerin ELISA Yöntemi ile Test Edilmesi.....	60
3.6.1. Rekombinant pCOLD TF-NSs Antijeni ile İmmünize Edilen Fare Serumlarının Peptit ELISA ile Test Edilmesi.....	60

3.6.1.1. Materyal.....	60
3.5.1.2. Metot.....	61
3.6.2. KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit06 Suşuyla İmmünize Edilen Fare Serumlarının Peptit ELISA ile Test Edilmesi.....	62
3.6.2.1. Materyal.....	62
3.6.2.2. Metot.....	62
3.6.3. KKKAH IgG Pozitif İnsan Serumlarının Peptit ELISA ile Test Edilmesi.....	63
3.6.3.1. Materyal.....	63
3.6.3.2. Metot.....	64
3.7. KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit06 Suşuyla Enfekte Edilmiş Vero E6 Hücrelerinde NSs Proteininin IFA Yöntemi ile Araştırılması.....	65
3.7.1. Dondurulmuş Vero E6 Hücrelerinin Kültüre Edilmesi.....	65
3.7.1.1. Materyal.....	65
3.7.1.2. Metot.....	65
3.7.2. Vero E6 Hücrelerinin Pasajlanması.....	66
3.7.2.1. Materyal.....	66
3.7.2.2. Metot.....	67
3.7.3. KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit06 Suşuyla Enfekte Edilmiş Vero E6 Hücrelerinde Enfeksiyonun Farklı Zaman Aralıklarında <i>In vitro</i> NSs proteininin IFA Yöntemi ile Gösterilmesi.....	67
3.7.3.1. Materyal.....	67
3.7.3.2. Metot.....	68
3.8. KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit06 Suşuyla Enfekte Edilmiş Vero E6 Lizatlarından Viral RNA Ekstraksiyonu ve NSs Geninin Revers Transkriptaz PZR Yöntemi ile Belirlenmesi.....	69
3.8.1. KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit06 Suşuyla Enfekte Edilmiş Vero E6 Lizatlarından Viral RNA Ekstraksiyonu.....	69
3.8.1.1. Materyal.....	69
3.8.1.2. Metot.....	70

3.8.2. KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit06 Suşuyla Enfekte Edilmiş Vero E6 Lizatlarından Viral RNA'larda Revers Transkriptaz PZR Yöntemi ile NSs Geninin Çoğaltılması	70
3.8.2.1. Materyal.....	70
3.8.2.2. Metot.....	71
3.9. Rekombinant pCOLD TF-NSs Proteinini Kullanılarak NSs Proteinin İmmunblotlama Yöntemi ile Belirlenmesi.....	71
3.9.1. İmmunblotlama (Western Blot)	71
3.9.1.1. Materyal.....	71
3.9.1.2. Metot.....	73
3.10. KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit06 Suşu NSs Geninin Memeli Hücrelerine plazmid DNA Aracılı Transfeksiyonu ve Memeli Hücrelerinde NSs Proteininin Ekspresyonunun Belirlenmesi.....	74
3.10.1. KKKAH virüsü NSs'in PZR ile Çoğaltılması.....	75
3.10.1.1. Materyal.....	75
3.10.1.2. Metot.....	75
3.10.2. PZR Ürününün (NSs) Agaroz Jelden Ekstraksiyonu	76
3.10.2.1. Materyal.....	76
3.10.2.2. Metot.....	76
3.10.3. pcDNA3.1/V5-His-TOPO TA Ekspresyon Vektörüne Klonlama	76
3.10.3.1. Materyal.....	76
3.10.3.2. Metot.....	77
3.10.4. One Shot TOP10 <i>E.coli</i> Kimyasal Kompetan Hücrelerine Transformasyon.....	77
3.10.4.1. Materyal.....	77
3.10.4.2. Metot.....	77
3.10.5. pcDNA 3.1/V5-His TOPO-NSs Plazmid DNA'nın Restriksiyon Kesim Enzimleri ile Kesilmesi	78
3.10.5.1. Materyal.....	78

3.10.5.2. Metot.....	78
3.10.6. pcDNA 3.1/V5-His TOPO-NSs plazmid DNA'nın Vero E6 Hücrelerine Lipid Aracılı Transfeksiyonu.....	79
3.10.6.1. Materyal.....	79
3.10.6.2. Metot.....	79
3.10.7. İmmunblotlama	80
3.10.7.1. Materyal.....	80
3.10.7.2. Metot.....	82
3.11. Küçük interferans RNA (siRNA'lar) Kullanılarak KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit06 Suşu NSs Geninin Susturulması ve NSs'in Virüs Titrasyonuna Etkisinin Belirlenmesi	83
3.11.1. KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit06 Suşu NSs Genini Hedef Alan siRNA'ların Vero E6 Hücrelerine Transfeksiyonu.....	83
3.11.1.1. Materyal.....	83
3.11.1.2. Metot.....	84
3.11.2. Virüsün Titresinin Belirlenmesi	84
3.11.2.1. Materyal.....	84
3.11.2.2. Metot.....	86
4. BULGULAR	87
4.1. KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit06 Suşu NSs Geninin DNA Sekansı ve NSs Proteini Aminoasit Sekansı.....	87
4.2. pCOLD TF Plazmid DNA Ekstraksiyonu.....	88
4.3. KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit06 Suşu NSs Geninin PZR Yöntemi ile Çoğaltılması	89
4.4. NSs Geni PZR Ürününün Agaroz Jelden Ekstraksiyonu ve Pürifikasyonu. 89	
4.5. pCOLD TF plazmid DNA ve NSs Geninin Restriksiyon Kesim Enzimleriyle Kesilmesi.....	90
4.6. Koloni PZR ile Pozitif Klonların Belirlenmesi	91
4.7. pCOLD TF-NSs'in Restriksiyon Enzimleri ile Çift Kesilmesi.....	91

4.8. pCOLD TF-NSs Vektörünün IPTG ile İndüksiyonu	92
4.9. pCOLD TF-NSs Rekombinant Proteinin Lizis Tamponu ile Ekstraksiyonu	93
4.10. pCOLD TF-NSs Rekombinant Proteinin Saflaştırılması	94
4.11. pCOLD TF-NSs Rekombinant Proteinin Miktarının Belirlenmesi	95
4.12. Rekombinant pCOLD TF-NSs Antijeni ile İmmünize Edilen Farelerden Alınan Serumların ELISA ile Test Edilmesi	96
4.13. Rekombinant pCOLDTF-NSs Antijeninin, KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit06 Suşuyla İmmünize Edilen Fare Serumlarında Anti-KKKAHV IgG Belirlenmesi Amacıyla ELISA Testinde Kullanılması	98
4.14. Rekombinant pCOLD TF-NSs Antijeninin, KKKAH IgG Pozitif İnsan Serumlarında Anti-KKKAHV IgG Belirlenmesi Amacıyla ELISA Testinde Kullanılması	99
4.15. Rekombinant pCOLD TF-NSs Antijeni ile İmmünize Edilen Fare Serumlarının Peptit ELISA ile Test Edilmesi	101
4.16. KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit06 Suşuyla İmmünize Edilen Fare Serumlarının Peptit ELISA ile Test Edilmesi	104
4.18. KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit06 Suşuyla Enfekte Edilmiş Vero E6 Hücrelerinde Enfeksiyonun Farklı Zaman Aralıklarında <i>In vitro</i> NSs proteininin IFA Yöntemi ile Gösterilmesi	106
4.19. KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit06 Suşuyla Enfekte Edilmiş Vero E6 Hücre Lizatlarından Viral RNA'larda Revers Transkriptaz PZR Yöntemi ile NSs Geninin Çoğaltılması	109
4.20. Rekombinant pCOLD TF-NSs Proteinini Kullanılarak NSs Proteinin İmmunblotlama Yöntemi ile Belirlenmesi	110
4.21. KKKAH Virüsü NSs Geninin PZR Yöntemi ile Çoğaltılması	112
4.22. NSs'in Agaroz Jelden Ekstraksiyonu	113
4.23. KKKAH Virüsü NSs Geninin pcDNA 3.1/V5-His TOPO Vektörüne Klonlanması	114
4.24. KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit06 Suşu NSs Geninin Memeli Hücrelerine plazmid DNA Aracılı Transfeksiyonu ve Memeli Hücrelerinde NSs Proteininin Ekspresyonunun Belirlenmesi	115

4.25. Küçük interferans RNA (siRNA'lar) kullanılarak KKKAH virüsü Turkey-Kelkit06 Suşu NSs Geninin Susturulması ve NSs'in Virüs Titrasyonuna Etkisinin Belirlenmesi	116
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	120
6. KAYNAKLAR.....	127
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	



KISALTMALAR ve SİMGELER

Al(OH)₃	: Alüminyum hidroksit
ALT	: Alanin aminotransferaz
APS	: Amonyum persülfat
AST	: Aspartat aminotransferaz
BSL	: Biyogüvenlik seviyesi
bp	: Baz çifti
C-	: Karboksi terminal uç
CD	: Başkalaşım kümesi
CD4+	: Yardımcı T lenfosit
CD8+	: Sitotoksik T lenfosit
CDC	: Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri
cm²	: Santimetrekare
CO₂	: Karbondioksit
CPK	: Kreatinin fosfokinaz
cRNA	: Komplementer ribonükleik asit
DENV	: Dang virüsü
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Dinükleotittrifosfat
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
DUGV	: Dugbe Virüsü
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
ELISA	: Enzim ilintili immunosorbent tahlil
FITC	: Floresan izotiyosiyanat
g/gr	: Gram
Gc	: Amino terminal uç proteini
Gn	: Karboksi terminal uç proteini
GP	: Glikoprotein
GPC	: Glikoprotein prekürsörü/öncülü
HAZV	: Hazara virüsü
HDMP	: Metilprednizolon

HIV	: İnsan immün yetmezlik virüsü
I-CLiPs	: İntramembran kesim proteazları
ICTV	: Uluslararası viral taksonomi komitesi
IFA	: İmmunoforesan antikor testi
IFN	: İnterferon
IFNAR-/-	: İnterferon α/β reseptör çıkartılan fare
IgG	: İmmunglobulin G
IgM	: İmmunglobulin M
IPTG	: İzopropil- β -D-tiyogalaktopiranozit
IVIG	: İntravenöz immünoglobulin
kb	: Kilobaz
kDa	: Kilodalton
KH₂PO₄	: Potasyum monofosfat
KKA	: Kırım Kanamalı Ateşi
KKAV	: Kırım Kanamalı Ateşi Virüsü
KKKA	: Kırım Kongo Kanamalı Ateşi
KKKAH	: Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı
KKKAHV	: Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı Virüsü
l/lt	: Litre
LDH	: Laktat dehidrojenaz
Log	: Logaritma
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
MLD	: Müsin benzeri domain
MOI	: Virüsün enfekte edilen organizmaya oranı
mRNA	: Mesajcı RNA
MVA	: Modiye çiçek hastalığı virüsü Ankara
MVB	: Multivesiküler cisimcik
N-	: Amino terminal uç
Na₂CO₃	: Sodyum karbonat
Na₂HPO₄	: Sodyum fosfat dibazik
NaCl	: Sodyum klorür
NaHCO₃	: Sodyum bikarbonat

NCR	: Tamamlayıcı kodlanmayan bölge
NCS	: Yenidoğan buzağı serumu
NF-κB	: Nükleer faktör κB
nM	: Nanometre
NP	: Nükleoprotein
NSDV	: Nairobi koyun hastalığı virüsü
NSm	: Yapısal olmayan M proteini
NSs	: Yapısal olmayan S proteini
nt	: Nükleotit
OD	: Optik dansite
OTU	: Over tümör proteaz
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
pMol	: Pikomol
PFU	: Plak formasyon ünitesi
PPFU	: Psödo-plak formasyon ünitesi
PreGc	: Gc öncül proteini
PreGn	: Gn öncül proteini
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
QH	: Q humması
RdRp	: RNA bağımlı RNA polimeraz
RNA	: Ribonükleik asit
RNP	: Ribonükleoprotein kompleksi
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
RSV	: Respiratuar sinsityal virüs
RT-PZR	: Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
SARS	: Şiddetli akut solunum yetmezliği sendromu
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
SKI-1/S1P	: Subtilisin kexin izozim-1/alan-1 proteaz
STAT 1	: Transkripsiyon 1 sinyal dönüştürücü ve aktivatörü
SW-13	: İnsan böbreküstü bezi karsinoma hücresi
TAE	: Tris-Asetat-EDTA
TE	: Tris-EDTA

TEMED	: Tetrametiletildiamin
TGN	: Trans-Golgi ağı
TNF-α	: Tumor nekroz faktörü-alfa
U	: Ünite
UV	: Ultraviyole
V	: Volt
Vero E6	: Afrika yeşil maymun böbrek epitel hücre hattı
vRNA	: Viral ribonükleik asit
α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gama
%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1.	NSs genini PZR ile çoğaltmak için kullanılan primerler	42
Tablo 2.	PZR için ayarlanan zaman ve sıcaklık göstergeleri.....	42
Tablo 3.	Koloni PZR için ayarlanan zaman ve sıcaklık göstergeleri	46
Tablo 4.	TOPO Klonlama için PZR'de ayarlanan zaman ve sıcaklık göstergeleri.....	75
Tablo 5.	<i>BamHI</i> ve <i>XbaI</i> enzimleri ile çift kesim reaksiyonu.....	78
Tablo 6.	<i>XhoI</i> ve <i>XbaI</i> enzimleri ile çift kesim reaksiyonu	78
Tablo 7.	Rekombinant pCOLD TF-NSs antijeni ile farelerin immünizasyonu sonucu elde edilen serumların ELISA OD değerleri.	97
Tablo 8.	Fare IgG ELISA geliştirilmesinde pCOLD TF-NSs rekombinant antijeni ve inaktif KKKAH virüsü antijeni kullanılarak yapılan ELISA'nın OD değerleri.....	99
Tablo 9.	İnsan IgG ELISA geliştirilmesinde pCOLD TF-NSs rekombinant antijeni ve inaktif KKKAH virüsü antijeni kullanılarak yapılan ELISA'nın OD değerleri.....	101
Tablo 10.	KKKAH virüsü NSs proteinine ait sentetik polipeptitlerin amino asit dizilimleri.....	102
Tablo 12.	Fare IgG Peptit ELISA geliştirilmesinde KKKAH virüsü antijeni ile immünize pozitif fare serumları ve immünize olmayan negatif fare serumları kullanılarak yapılan Peptit ELISA'nın OD değerleri.....	105
Tablo 13.	İnsan IgG pozitif serumların KKKAH virüsü NSs peptitleri ile test edilmesi ile elde edilen Peptit ELISA'nın OD değerleri	106
Tablo 15.	KKKAH virüsü Turkey-Kelkit06 Suşu NSs ve NP transkriplerini hedef alan siRNA'ların DNA sekansları.....	117
Tablo 16.	KKKAH virüsü Turkey-Kelkit06 Suşu NSs ve NP transkriplerini hedef alan siRNA transfeksiyonundan sonra enfekte edilen hücrelerde virüs titresi.....	119

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Kırım-Kongo kanamalı ateş virüsünün S segmentine ait kısmi parçanın filogenetik analizi.	8
Şekil 2A. KKKAH virüs yapısının şematik görünümü	10
Şekil 2B. KKKAH virüslerinin renkli transmisyon elektron mikrografı	10
Şekil 3. KKKAH virüsünün genomu.....	11
Şekil 4. KKKAH virüsü NP domainleri, motifleri ve katalitik rezidüleri	12
Şekil 5A. KKKAH virüsü glikoproteinlerinin işlenmesi.....	14
Şekil 5B. KKKAH virüsü glikoprotein öncülünden oluşan proteinler	14
Şekil 6. KKKAH virüsü L proteininin domainleri, motifleri ve katalitik rezidüleri.....	15
Şekil 7. KKKAH virüsünün intrasellüler replikasyon aşamalarının şematik görünümü.....	19
Şekil 8. KKKAH patogenezi.....	21
Şekil 9. KKKAH'nin coğrafik dağılımı.....	24
Şekil 10. KKKAH virüsünün coğrafik dağılımı.....	25
Şekil 11. KKKAH virüsünün bulaş yolları	26
Şekil 12. KKKAH'nın klinik seyri.....	28
Şekil 13. KKKAH virüsü NSs geni DNA sekansı	87
Şekil 14. KKKAH virüsü NSs proteinine ait aminoasit dizilimi	88
Şekil 15. pCOLD TF vektör haritası	88
Şekil 16. pCOLD TF plazmid DNA agaroz jel görüntüsü.....	89
Şekil 17. PZR yöntemi ile çoğaltılan NSs'in agaroz jel görüntüsü.....	89
Şekil 18. NSs geninin agaroz jel ekstraksiyonu sonrası görüntüsü.....	90
Şekil 19A. pCOLD TF plazmid DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesi.	90
Şekil 19B. NSs DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesi.	90
Şekil 20. Koloni PZR ile belirlenen pozitif kolonilerin agaroz jel görüntüsü.	91

Şekil 21.	pCOLD TF-NSs plazmid DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesi.	92
Şekil 22.	IPTG ile indüklenen pCOLD TF-NSs rekombinant proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü.	93
Şekil 23.	Lizis tamponu ile ekstrakte edilmiş pCOLD TF-NSs rekombinant proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü.	94
Şekil 24.	Pürifiye pCOLD TF-NSs rekombinant proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü.	95
Şekil 25.	Pürifiye pCOLD TF-NSs rekombinant proteininin miktarının belirlenmesi.	96
Şekil 26.	Rekombinant pCOLD TF-NSs proteini ile immünize edilen farelerden alınan serumların ELISA sonucu.	97
Şekil 27.	Fare IgG ELISA geliştirilmesinde pCOLD TF-NSs rekombinant antijeni ve inaktif KKKAH virüsü antijeni kullanılarak yapılan ELISA sonuçları.	98
Şekil 28.	İnsan IgG ELISA geliştirilmesinde pCOLD TF-NSs rekombinant antijeni ve inaktif KKKAH virüsü antijeni kullanılarak yapılan ELISA sonuçları.	100
Şekil 29.	KKKAH virüsü NSs proteine ait peptitler kullanılarak test edilen rekombinant antijenle immünize fare serumuna ait ELISA sonuçları.	103
Şekil 30.	KKKAH virüsü NSs proteine ait peptitler kullanılarak test edilen KKKAH IgG pozitif fare serumuna ait Peptit ELISA sonuçları.	104
Şekil 31.	KKKAH virüsü NSs proteine ait peptitler kullanılarak test edilen KKKAH IgG pozitif insan serumuna ait Peptit ELISA sonuçları.	106
Şekil 32.	KKKAH virüsü Turkey-Kelkit06 suşu ile enfekte edilen Vero E6 hücrelerinde enfeksiyonun farklı saatlerinde NSs ekspresyonunun IFA yöntemi ile gösterilmesi.	108
Şekil 33.	KKKAH virüsü ile enfekte Vero E6 hücre lizatlarından ekstrakte edilen viral RNA'lardan elde edilen cDNA'lardan RT-PZR yöntemi ile çoğaltılan NSs geninin agaroz jel görüntüsü.	109
Şekil 34.	Rekombinant pCOLD TF-NSs antijeni kullanılarak yapılan western blot görüntüsü.	111
Şekil 35.	pCDNA3.1/V5-His-TOPO vektör haritası.	112

- Şekil 36.** pCOLD TF-NSs plazmid DNA'dan PZR yöntemi ile çoğaltılan NSs'in agaroz jel görüntüsü..... 113
- Şekil 37.** NSs geninin agaroz jel ekstraksiyonu sonrası görüntüsü..... 113
- Şekil 38.** Koloni PZR pozitif kolonilerin agaroz jel görüntüsü. 114
- Şekil 39.** Restriksiyon enzimleri ile tek ve çift kesilmiş pcDNA3.1/V5-His-TOPO-NSs plazmidlerin agaroz jel görüntüsü..... 114
- Şekil 40.** pcDNA3.1/V5-His-TOPO-NSs plazmidi ile transfekte hücrelerde NSs'in ekspresyonunun western blot görüntüsü..... 116
- Şekil 41.** siRNA transfeksiyonundan sonra KKAH virüsü ile enfekte edilmiş hücre lizatlarında virüs titresinin IFA ile belirlenmesi. 118

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Tez çalışmasının amacı, Kırım-Kongo kanamalı ateşi hastalığı (KKKAH) virüsü yapısal olmayan S proteinin (NSs) prokaryotik sistemde üreterek rekombinant NSs antijeninin indirekt ELISA geliştirilmesinde kullanılabilirliğini test etmektir. Aynı zamanda bu tez çalışması ile KKKAH virüsü ile enfekte hücrelerde NSs varlığının araştırılması, viral enfeksiyon sırasında proteinin *in vitro* kinetiğinin belirlenmesi ve replikasyon üzerine etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

KKKAH, keneler tarafından taşınan bir viral hastalıktır. İnsanlarda KKKAH virüsü enfeksiyonları, ölüm oranı %5 ila %30 arasında değişen ağır bir kanamalı ateşe neden olmaktadır (Hoogstraal, 1979; Whitehouse, 2004; Bente ark., 2013). Enfekte olmuş insanların %10-20'sinde klinik bulgular gelişir. KKKAH virüsünün patojenik karakterde olması, mortalite oranının yüksek oluşu ve virüsün virülansına ilişkin bilimsel veriler sınırlı olması nedeniyle potansiyel bir biyolojik silah adayı olabileceği gündeme getirilmiştir (Leblebicioğlu, 2016).

Virüs ile enfekte organizmada viral genom tarafından üretilen; ancak olgun viral partiküllerde bulunmayan proteinler 'yapısal olmayan viral proteinler' olarak adlandırılırlar. Yapısal olmayan protein kavramı literatürde ilk defa 1965 yılında, Aujeszky hastalığına neden olan pseudorabies virüsü ile enfekte hücrelerde çeşitli antijenik protein türlerinin sentezlenme kinetiğinin araştırıldığı bir çalışmada 'enfeksiyonun erken dönemlerinde sentezlenen ve virionda bulunmayan proteinler' olarak tanımlanmıştır (Hamada ve Kaplan, 1965). Genel olarak yapısal olmayan proteinler; viral replikasyon ve patogeneizde, apoptozun indüklenmesinde, virion morfogenezinde, antiviral cevabın inhibisyonunda görev alırlar. Bunyavirüsler RNA bağımlı RNA polimerazı ve farklı yapısal protein kodlamalarını yanı sıra bir veya birden fazla sayıda yapısal olmayan protein kodlarlar. Bu yapısal olmayan proteinler virüsün çoğalması ve replikasyonu için her zaman gerekli değildir; ancak konak immün

sistemi ile etkileşimleri yoluyla viral patogeneizde önemli rol oynarlar (Eifan ve ark., 2013).

KKKAH virüsü S segmentinin viral RNA'sında yer alan ilave bir açık okuma çerçevesinin varlığı (450-477 nt uzunlukta) ve bu bölgenin pozitif yönde kodlanması KKKAH virüsünün ambisens bir virüs olduğunu düşündürmüştür. (Hewson ve ark., 2004) Bu nükleoproteine zıt yönde kodlanan yapısal olmayan S proteini (NSs) ile ilgili literatürde yer alan tek bir çalışma mevcut olup çalışmada; KKKAH virüsü ile transfekte hücrelerde, NSs'in mitokondriye lokalize olduğu ve mitokondriyal membran potansiyelini bozarak apoptozu indüklediği bulunmuştur (Barnwal ve ark., 2015). KKKAH virüsü ile enfekte hücrelerde NSs tespit edilmiş olsa da çalışmada bahsedilen apoptotik fonksiyonlar sadece NSs'nin aşırı ekspresyonuna dayanmaktadır; bu nedenle NSs'in varlığı ile ilgili daha fazla kanıtı ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tez çalışmasında öncelikli olarak KKKAH NSs proteininin varlığının ortaya konulması hedeflenmiştir. Bu amaçla NSs proteini prokaryotik sistemde üretilmiştir ve prokaryotik sistemde üretilen rekombinant NSs proteini kullanılarak, enfeksiyon sırasında bu yapısal olmayan proteine karşı oluşan antikor kinetiği ELISA sistemi ile test edilmiştir. Aynı zamanda KKKAH virüsü ile enfekte hücrelerde virüsün NSs proteininin varlığı çeşitli moleküler ve serolojik yöntemlerle araştırılmış, viral enfeksiyon sırasında proteinin *in vitro* kinetiğinin belirlenmesi ve replikasyon üzerine etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığının Tarihçesi

KKKAH ilk olarak, 12. yüzyılda şimdiki adıyla Tacikistan'da, normalde karatavuk paraziti olan bit veya kenenin ısırmasına bağlı olarak; idrarda, rektumda, diş etinde, kusmukta, tükürükte ve karın boşluğunda kan bulunması olarak belirtilerini gösteren ciddi hemorajik bir hastalık tanımlanmıştır (Hoogstraal, 1979). Bazı kaynaklarda yakın zamanda ortaya çıkmış bir hastalık olarak tanımlanmasına rağmen, hastalığa neden olan virüsün keneler ve omurgalı hayvanlar ile taşınarak geniş bir yayılım gösterdiği; Güney Asya, Güneydoğu Avrupa ve Afrika'da bin yıl kadar insanlarda enfeksiyonlar meydana getirdiği öne sürülmektedir (Bente ve ark., 2013). Hastalık ayrıca Özbekistan yerel halkı tarafından *khungribta* (kanama), *khunymuny* (burun kanaması) ve *karakhalak* (kara ölüm) olarak adlandırılmıştır (Hoogstraal, 1979; Chumakov, 1974; Whitehouse, 2004).

Hastalık ile ilgili vakaların daha çok kırsal alanlarda yaşayan bireylerde tek ve sporadik olarak ortaya çıkması ve çoğu enfekte bireyde tanımlanabilir kanamalı bir ateş sendromu olmadan hafif ve spesifik olmayan hastalığın gelişmesi, uzmanlar tarafından KKKAH'nın farklı bir insan hastalığı olarak tanımlanmasını geciktirmiştir (Bente ve ark., 2013).

Modern tıp biliminde ilk defa KKKAH salgını,1944 yazında, Sovyet birlikleri Alman işgali altındaki Kırım yarımadasını yeniden işgal ettiklerinde, ordudaki askerlerde yoğun kanama ve şok ile akut ateşli bir hastalık olarak tanımlanmıştır (Hoogstraal, 1979; Grashchenkov, 1945; Chumakov, 1965). Enfeksiyon geçiren yaklaşık 200 askeri personel hastaneye kaldırılmış ve bu askerlerin yaklaşık %10'u ölmüştür. Bölgeye hastalıkla ilgili araştırma yapmak amacı ile, Moskova'dan, uzak doğu Sovyetler Birliği'ndeki kene kaynaklı ensefalitin etken ajanını izole eden Mikhail Chumakov liderliğindeki bir araştırma ekibi gönderilmiştir. Araştırmacılar, hastalık ile kene

ısırmaları arasında bir bağlantı olduğunu bulmuşlardır. Araştırmacılar aynı zamanda, Alman işgali sırasında büyük ekili alanların terk edilmesinden dolayı, Hyalomma cinsi kenelerinin konakçı hayvan popülasyonunun arttığını ve bu alanlarda tarımsal üretimi geri getirmek için uğraşan askerler ve çok sayıda tarım işçisinin keneler tarafından ısırıldığını belirtmişlerdir. Chumakov ve ark. (1974), kısa bir süre sonra, KKA hasta serumu ultrafiltratlarının veya kenelerden elde edilen ekstraktların, psikiyatrik hastalara ve gönüllü askerlere inokulumu ile “Kırım kanamalı ateşi” nin (KKA); kene kaynaklı bir viral enfeksiyon olduğunu kanıtlamışlardır (Chumakov, 1965, 1974). Aynı ekip başlangıçta hastalığı çeşitli deney hayvanlarda oluşturduklarını iddia etmelerine rağmen, sonraki raporlarda bu sonuçların mikrobiyal kontaminasyona bağlı olarak oluştuğunu söylemişlerdir (Bente ve ark., 2013).

KKA'nın tanımlanmasından sonraki yirmi yıldan fazla bir süre boyunca laboratuvar araştırmalarında hastalığın etkeni kültüre edilememiştir. Bununla birlikte, Work, Casals ve diğerleri tarafından 1960'ların başlarında yapılan araştırmalarda, yeni doğan farelerde intraserebral olarak şüpheli örneklerin verilmesi ile arbovirüslerin çoğaltılabileceği gösterilmiştir (Bente ve ark., 2013). 1967'de Chumakov ve ark. (1968), KKA ile enfekte hastalardan veya enfekte kenelerden alınan numunelerin yeni doğan farelere intraserebral olarak verilmesi sonucunda lethal bir hastalığın geliştiğinin keşfedilmesi KKA araştırmalarında bir dönüm noktası olmuştur. Yeni doğan farelerin virüsü çoğaltmak, numuneleri titre etmek ve immünolojik analizler için antijen üretmek için kullanılması, KKA virüsünün bulaş yollarını belirlemek ve virüse özgü antikörlerin varlığı göstermek için insan ve hayvan serumlarının test edilmesine yönelik olan araştırmalara ivme kazandırmıştır (Bente ve ark., 2013).

1960'ların sonunda, Sovyet araştırmacıları, Rusya'da Astrakhan'daki bir hastadan elde edilen Drosdov KKA virüs izolatını standart bir referans suşu olarak seçmişlerdir (Chumakov, 1974; Butenko ve ark., 1968). Yenidoğan fare metodu ve immünolojik analizler kullanılarak, Sovyetler Birliği'nde ve Bulgaristan'da geniş ölçüde ayrı odalarda bulunan çeşitli ateşli hastalıklara KKA virüsü suşlarının neden olduğunu göstermişlerdir (Chumakov, 1970). Hastalığın bilinen coğrafi dağılımı, Casals ve ark. (1969)'nın, Chumakov tarafından kendilerine gönderilen KKA virüsü Drosdov suşu ile 1956'da şimdiki adıyla Kongo Demokratik Cumhuriyeti'nde izole edilen ve “Kongo virüsü” olarak adlandırılan etkenin aynı olduğunu keşfetmeleriyle daha da genişlemiştir.

Casals ve ark. (1970), bu ajanların tümüne, 'KKKAHV' olarak basitleştirilen 'KKA-Kongo virüsü' adının verilmesini önermiştir.

Batılı bilim insanları, bir hastadan elde edilen Drosdov suşunun yerine, 1966'da Nijerya'da görünüşte sağlıklı bir deveden alınan bir keneden izole edilen IbAr 10200 olarak adlandırılan virüs suşunu referans olarak kullanmışlardır. Yeni doğan farelerde birkaç kere pasajlanarak çoğaltılan IbAr 10200 virüsü, Yale arbovirüs koleksiyonuna ve diğer laboratuvarlara transfer edilmiş ve son birkaç on yıl boyunca çoğu araştırmacı için mevcut olan tek KKKAH virüsü suşu olmuştur (Bente ve ark., 2013).

KKKAH virüsünün coğrafi dağılımı, insan sağlığını etkileyen kene kaynaklı virüsler arasında en yaygın olanıdır (Ergönül, 2006a). KKKAH ilk olarak Kırım bölgesi ve Kongo havzasında keşfedildikten sonra, hastalık birçok bölgede bildirilmiştir. Halen, Afrika, Asya, Orta Doğu ve Avrupa'daki 50'den fazla ülke endemik veya potansiyel olarak endemik bölgeler olarak kabul edilmektedir (Ergönül, 2006a; Öncü, 2013).

Türkiye'de Kırım-Kongo kanamalı ateşi üzerine ilk bulgular, 1970'lerde Ege bölgesinde arbovirüslerin mevcut durumunu göstermeyi hedefleyen bir seroepidemiolojik çalışma ile yayınlanmıştır. Bu çalışmaya göre, Kırım-Kongo kanamalı ateş virüsüne karşı oluşan antikorlar, hemaglutinasyon inhibisyonu testi ile 1074 insan serum örneğinden 96'sında (%9,2) tespit edilmiştir. Benzer şekilde, virüse karşı oluşan nötralizan antikorlar 96 örneğin 13'ünde (%13,5) tespit edilmiştir. Ancak, 2002'den önce, Türkiye'de kenelerde virüs tespiti veya hiçbir klinik KKKAH vakası bildirilmemiştir (Ergönül ve Whitehouse, 2007).

Ülkemizde 4 Mayıs-6 Ağustos 2002 tarihleri arasında, Orta Karadeniz bölgesinde yer alan Tokat ilinde ve İç Anadolu'nun kuzeyinde bulunan bazı illerde; ateş, artralji/miyalji, bulantı/kusma, karın ağrısı ve ishal klinik bulguları ile seyreden benzer olgular saptanmıştır. Hastaların büyük kısmında lökopeni, trombositopeni ve karaciğer enzim yüksekliğinin saptanması ve tetrasiklin grubu antibiyotiklerle tedaviye hızla cevap alınması, enfeksiyonun riketsiyosiz ya da erlihyozis olabileceği konusunda dikkatleri bu bölgeye çekmiştir. Kesin tanının konulabilmesi için hastalardan alınan akut ve konvelesan dönem kan ve serum örnekleri ulusal ve uluslararası laboratuvarlarda *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Leptospira* ve *Coxiella* enfeksiyonları yönünden değerlendirilmiştir. 19 hastaya ait örneklerin Fransa'da bulunan Ulusal Referans

Laboratuvarı ve DSÖ Riketsiyal Enfeksiyon için Referans ve Araştırma İş birliği Merkez Laboratuvar'ında serolojik olarak değerlendirilmesi sonucunda, bu olgulardan 7'sine akut Q humması, 8'ine ise geçirilmiş Q humması (QH) tanısı konulmuştur (Gözalan, 2005).

2003 yılı Mayıs ayı içinde, yine aynı bölgeden benzer semptomlar ile seyreden yeni olguların bildirimini yapılmıştır. Bu olguların kene ile temas öykülerinin geçen yıla göre daha fazla olması, tetrasiklinlere cevabın daha düşük olması ve *C. burnetii* antikorlarının negatif bulunması nedeniyle enfeksiyonun viral etkene bağlı olduğu düşünülmüştür. Bu olgulara ait örnekler incelenmek üzere Fransa'da bulunan Ulusal Referans Laboratuvarı ve DSÖ Arbovirüsler ve Viral Kanamalı Ateşler için Referans ve Araştırma İş birliği Merkez Laboratuvar'ına gönderilmiştir. Gelen ön bilgilerin, etkenin KKKAH virüsü olduğunu işaret etmesi üzerine Ulusal Serum Bankası'nda korunan önceki yıla ait 26 hastanın serumları, viral etken yönünden geriye dönük olarak aynı merkezde tekrar araştırılmış ve 17'sinde KKKAH virüsü IgM pozitif olarak bildirilmiştir. Bu hastaların 4'ü 2002 yılında akut QH, 1'i geçirilmiş QH tanısı alan, 2'si QH negatif ve 10'u QH yönünden araştırılmayan hastalardır (Gözalan, 2005).

2003 yılında Türkiye'de ilk kez, ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC) ile ortaklaşa yapılan bir RT-PZR çalışmasında 5 hastada KKKAH virüsü olduğu gösterilmiştir (Karti ve ark., 2004). 2008-2009 yıllarında vaka sayıları zirveye ulaşmış, sonrasında düşüş kaydedilmiştir (Yılmaz ark., 2009; Leblebicioğlu ark., 2016). Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanlığı Ulusal Viroloji Referans Laboratuvarı verilerine göre 10000'den fazla vaka rapor edilmiştir ve vaka ölüm oranı %4,6 olarak belirlenmiştir (Spengler ve ark., 2018).

2.2. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı Virüsü

2.2.1. Viral Sınıflandırma

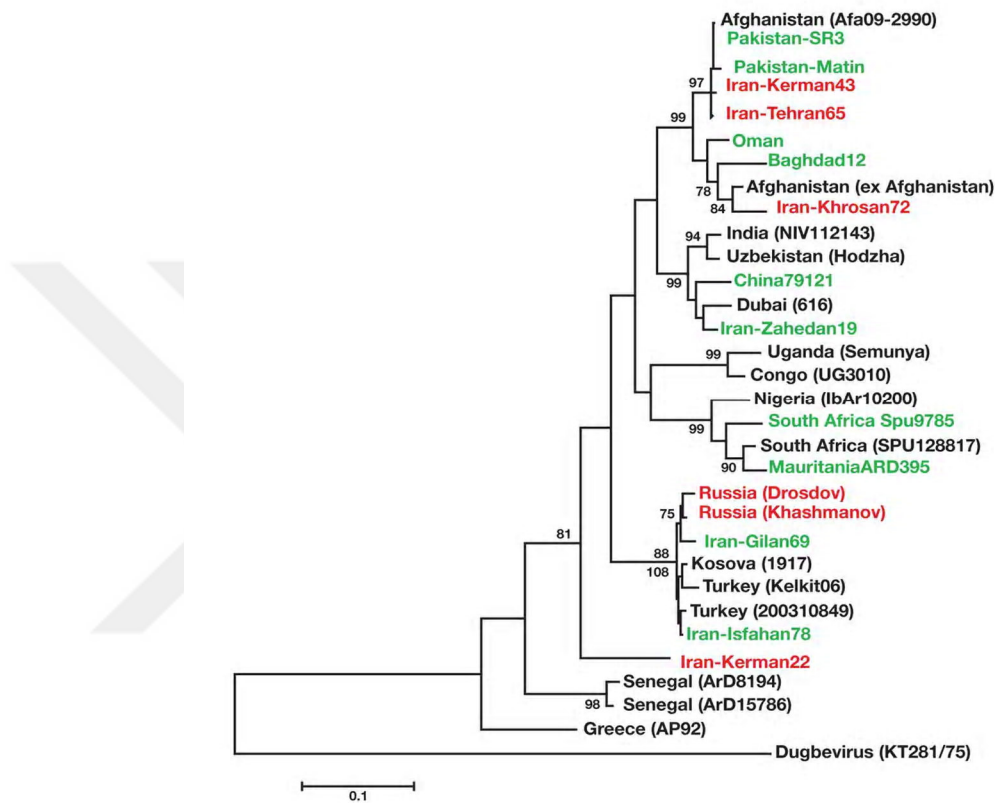
2017 yılında Uluslararası Viral Taksonomi Komitesi'ne (ICTV) göre, daha önce mevcut olan *Bunyaviridae* ailesi *Bunyavirales* takımına yükseltilerek; segmentli, doğrusal, tek iplikli, negatif polariteli veya ambisens RNA genomuna sahip virüsleri içeren 9 aileye ayrılmıştır. Daha önce *Bunyaviridae* ailesi içerisinde yer alan *Hantavirus*, *Nairovirus* ve

Tospovirus genusları, *Orthohantavirus*, *Orthonairovirus* ve *Orthospovirus* olarak yeniden adlandırılmış ve yeni kurulan ailelere sırasıyla *Hantaviridae*, *Nairoviridae* ve *Tospoviridae* dahil edilmiştir. *Nairoviridae* ailesi; *Orthonairovirus*, *Shaspivirus*, *Striwavirus* olmak üzere üç genera ayrılmıştır (Maes ve ark., 2018, 2019). Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı virüsünün de içinde bulunduğu *Orthonairovirus* genusunda 15 farklı tür bulunmaktadır (<https://talk.ictvonline.org>. Erişim Tarihi: 23 Nisan 2019). *Nairoviridae* ailesindeki genuslar ve bu genuslar içerisindeki türler, öncelikle serolojik çapraz reaksiyonlara, karakteristik cins spesifik genom segmenti termini dizilerine, konakçılarına, bulaş yollarına göre belirlenmiştir. Bu türlerin çoğu, arbovirüsler olup; yarasalar, kuşlar veya kemirgenlere keneler tarafından iletilen birkaç farklı üyeye sahiptir. Halk sağlığı üzerinde en önemli etkiye sahip *Orthonairovirüs*, Batı Asya, Balkanlar, Güney Avrupa ve Afrika'nın çoğunda sıklıkla ölümcül bir viral hemorajik ateşe neden olan kene kaynaklı Kırım-Kongo kanamalı ateş hastalığı virüsüdür (Jens ve ark., 2016). *Orthonairovirus* genusunda yer alan diğer önemli viral etkenler; Hazara virüs (HAZV), Dugbe virüs (DUGV) ve Nairobi koyun hastalığı virüsü (NSDV)dür (Maes ve ark., 2019).

Zaman içerisinde, farklı coğrafi bölgelerdeki KKKAH virüsleri arasında genetik bir değişkenlik gözlemlenmiştir. KKKAH virüslerinin S segmentinin sekansı filogenetik analizlerde kullanılmıştır. S-RNA segmentinin sekans verilerine dayanan filogenetik çalışmalar, dünyanın farklı bölgelerinden gelen birçok KKKAH virüs suşu için genetik çeşitlilik göstermiştir (**Şekil 1**). Viral S-RNA ve L-RNA segmentlerinin filogenetik analizleri, coğrafi olarak ayrılan, 2'si Avrupa, 3'ü Afrika ve 2'si Asya'da olmak üzere 7 ana genetik grubun tanımlanmasına yol açmıştır. Filogenetik analizler, bilinen KKKAH virüs gruplarının atalarının yaklaşık 1000 yıl önce, muhtemelen Afrika'da ortaya çıktığını göstermektedir (Shayan ve ark., 2015).

L-RNA segmenti sekansına dayanan filogenetik analiz S-RNA segmenti sekansına dayanan filogenetik analiz ile benzerlik gösterirken; KKKAH virüsünün M-RNA segment sekanslarının filogenetik gruplamasının, virüsün S-RNA segmentleri için gözlenen farklı olduğu gösterilmiştir (Shayan ve ark., 2015). Farklı genetik gruplarda yer alan KKKAH virüslerinin RNA segment sekansları arasındaki bu genetik değişkenlik oranları, nükleotit seviyesinde %30'a kadar farklılık göstermektedir; ancak bu değişkenlik amino asit seviyesinde daha düşüktür (Coşkun ve Aşık, 2019;

Özdarendeli ark., 2010). Bu genetik grupların varlığı, KKKAH virüsünün geniş coğrafi dağılımını göstermektedir ve bu durumun gerçekleşmesi için virüsün adaptasyonu gerekmektedir. Bu tür bir adaptasyon, yerel virüs varyantlarının ortaya çıkmasına neden olmuştur (Chinikar ve ark., 2014).



Şekil 1. Kırım-Kongo kanamalı ateş virüsünün S segmentine ait kısmi parçanın filogenetik analizi. Yeşil ile vurgulanan suşlar rekombinasyon varlığını, kırmızı ile vurgulanan suşlar reassortment varlığını göstermektedir (Coşkun ve Aşık, 2019).

Hewson ve ark. (2004), S ve M segmentlerinin nükleotid sekanslamasını gerçekleştirmiş ve izolatlar arasında genetik farklılıklar bildirmiş ve bu farklılıkların reassortmenttan kaynaklandığını ileri sürmüştür. İran'da yapılan bir araştırmada, KKKAH virüsünün S segmentinde bir rekombinasyon tespit edilmiş ve bunun epidemiyolojik ve aşılama çalışmalarına katkıda bulunabileceğini vurgulamıştır (Chinikar ve ark., 2016).

Tonbak ve ark. (2006), 1015 ergin keneden izole ettiği KKKAH virüsü izolatları ile yaptığı filogenetik analiz sonucuna göre izolatlarının, güneybatı Rusya ve Kosova'yı kapsayan Grup 5'de yer aldığını göstermiştir. Bu çalışma ile KKKAH virüsünün Türkiye'deki kenelerde virüsün varlığı ilk defa kanıtlanmıştır. Özdarendeli ve ark.

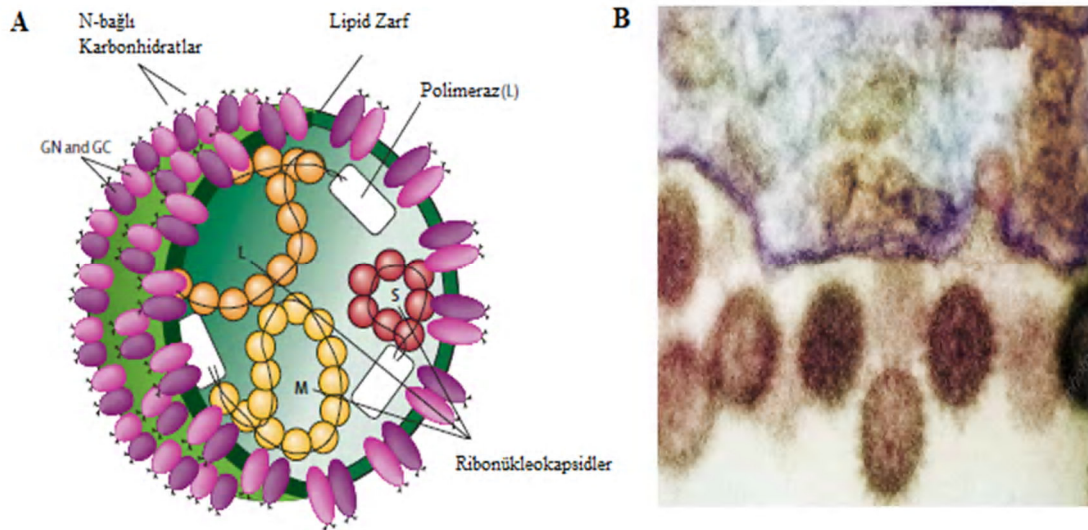
(2010), Türkiye'nin endemik bir bölgesindeki KKKAH klinik semptomlarını gösteren bir hastanın kanından izole ettikleri ve "Turkey-Kelkit06" adını verdikleri KKKAH virüs izolatının, tüm genomunu sekanslayarak S, M ve L segmentlerini baz alarak yaptıkları filogenetik analiz sonucunda, KKKAH virüsü Türkiye-Kelkit06 suşunun, Avrupa/Türkiye coğrafi hattını temsil eden Grup V'de yer alan diğer izolatlar ile hem nükleotit hem de aminoasit dizilimi yönünden yüksek oranda benzerlik gösterdiğini bulmuşlardır.

Özkaya ve ark. (2010), KKKAH virüsünün moleküler epidemiyolojisini belirlemek amacı ile yaptıkları çalışmada 48 konfirme insan KKKAH vakası ile çalışmış ve Türkiye'deki KKKAH virüsü suşlarının çoğunluğunda S segmentinde genetik değişkenlik olmadığını ve izolatların KKKAH virüsü Avrupa suşu ile yakından ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, Kalaycıoğlu ve ark. (2012), Türkiye'nin birçok ilinde 2 yıllık bir süre (2009 ve 2010) boyunca enfekte hastalardan elde edilen KKKAH virüs izolatları arasındaki genetik çeşitlilik ve genetik ilişkinin araştırmak amacı ile izole ettikleri virüslerin S segmentini sekanslamış ve genetik olarak homojen olduğunu bulmuşlardır. Chinikar ve ark. (2016) yaptığı çalışma ile, KKKAH virüsünün S segmentinde rekombinasyonların var olduğu gösterilmiştir ve bu rekombinasyon yoluyla farklı suşlar arasında farklı genomik bölgelerin değiştirilmesinin KKKAH virüsünün çeşitlendirilmesine ve gelişimine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

2.2.2. Viral Yapı ve Viral Genom Özellikleri

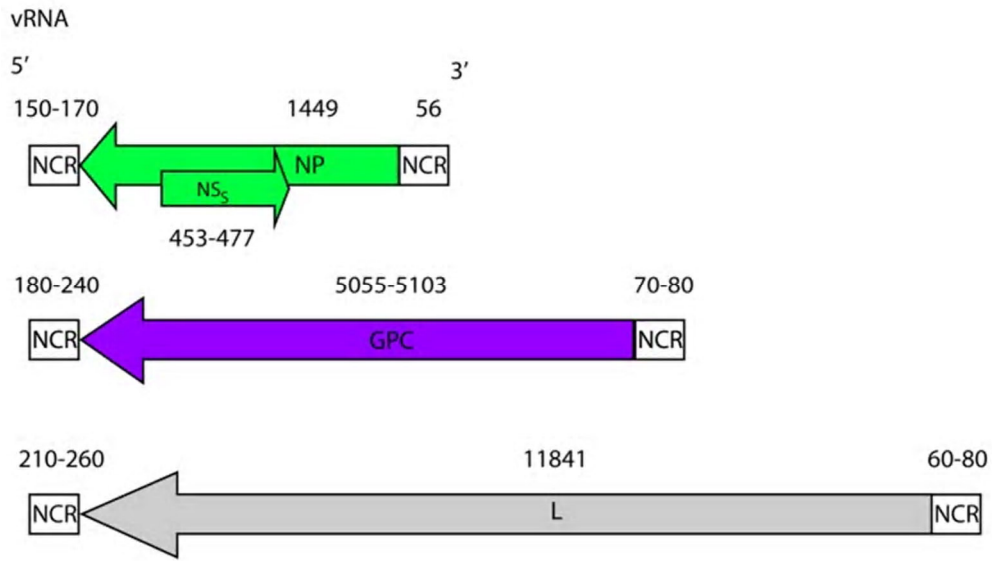
Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı virüsü, *Bunyavirales* takımı içerisinde yer alan 12 aileden biri olan *Nairoviridae* ailesine ait *Orthonairovirus* genusunda yer alan 3 segmentli negatif polariteli genoma sahip bir RNA virüsüdür (**Şekil 2**) (Maes ve ark., 2019). KKKAH virüsünün viral genomunda yer alan small (S), medium (M) ve large (L) segmentlerinin 5' ve 3' terminal uçlarında yer alan kodlanmayan bölgeler (NCR'ler); nairovirüslerin viral genomunun dairesel görünümde olmasını sağlamaktadır (Hewlett ve ark., 1977). Nairovirüsler arasında, terminal nükleotitler (5'-UCUCAAAGA ve 3'-AGAGUUUCU) olarak adlandırılan ve viral promoter bölge olarak görev alan 9 tane korunmuş nükleotit vardır (Donets ark., 1977; Bertolotti-ciarlet ark., 2005). NCR'ler, viral RNA'ya bağımlı RNA polimerazın (RdRp veya L proteini) viral genoma bağlanması ve transkripsiyonu ve/veya replikasyonu başlatması için gereklidir. NCR

dizileri viral segmentler arasında farklılık gösterse de her biri yeni vironların oluşması için, viral genomların kapsidasyonunu, transkripsiyonunu, replikasyonunu ve paketlenmesini başlatabilme özelliğine sahiptir (Zivcec ve ark., 2016).



Şekil 2. (A) KKKAH virüs yapısının şematik görünümü (Ergönül, 2006a) ve KKKAH virüslerinin (kahverengi) renkli transmisyon elektron mikrografı (B) (<https://www.sciencephoto.com>. Erişim Tarihi: 23 Nisan 2019).

Yakın zamana kadar, KKKAH virüsünün üç segmentinin her birinin tek bir proteini kodladığı biliniyordu. Bununla beraber, S segmentinin viral RNA'sında ilave bir açık okuma çerçevesinin varlığı ve bu açık okuma çerçevesinin pozitif yönde transkripsiyonuyla NSs proteininin (453-477 nt uzunluğunda) kodlanması ve bu genin KKKAH virüsünün hemen hemen tüm suşlarında (izolat AP92 hariç) bulunması; KKKAH virüsünün ambisens genoma sahip bir virüs olduğunu düşündürmektedir (Şekil 3) (Zivcec ark., 2016; Barnwal ark., 2015). Bununla birlikte, KKKAH virüsündeki ambisens kodlama, overlapping kodlama bölgelerini içermektedir. Bu durum, viral proteinlerin zıt yönde kodlandığı ve transkripsiyon sonlandırma sinyali olarak hizmet veren bir intergenik bölge ile ayrıldığı bunyavirüslerde ve arenavirüslerdeki ambisens kodlamadan farklıdır (Zivcec ark., 2016; Albariño ark., 2007; Pinschewer ark., 2005). Diğer nairovirüsler ile kıyaslandığında KKKAH virüsünün nükleoproteinini (NP) kodlayan S segmentinin (~ 1.6 kb) aksine, glikoprotein öncülünü (GPC) kodlayan M (~ 5.4 kb) ve L proteinini kodlayan L (~ 12.1 kb) segmentleri önemli ölçüde daha büyüktür (Şekil 3) (Zivcec ve ark., 2016).



Şekil 3. KKKAH virüsünün genomu (Zivcec ve ark., 2016).

Viral RNA'lar (vRNA'lar), genomik ribonükleoprotein komplekslerini (RNP) oluşturmak için NP ve L proteini ile kaplanmıştır. Genomik RNP'ler, bir lipid zarfla ve yüzey glikoproteinleri olan Gn ve Gc (**Şekil 2**) eklenerek viral partiküller halinde paketlenir. Nairovirüslerin elektron mikroskopi çalışmaları, KKKAH virüs yapısının, viral partikül yüzeyinden küçük (<10 nm) yüzeyel çıkıntılara sahip ~ 90-100 nm çapındaki nispeten düzgün boyutta küresel parçacıklar şeklinde olduğunu göstermektedir (Whitehouse, 2004; Ergönül ve Whitehouse, 2007; Zivcec ve ark., 2016).

2.2.3. Viral Proteinler ve Fonksiyonları

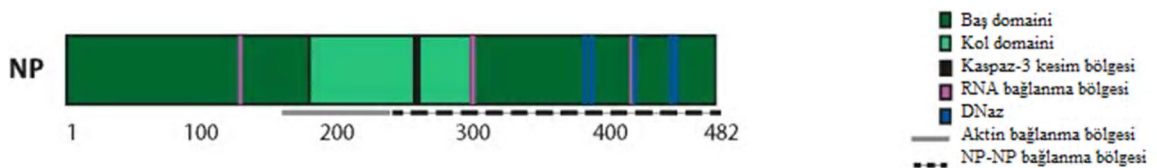
2.2.3.1. S Segmenti

S segmenti yaklaşık olarak 1.6 kb boyutundadır ve viral NP'yi kodlayan negatif yönde bir açık okuma çerçevesine sahiptir. KKKAH virüsü NP'nin birincil işlevi, viral RNA (vRNA) genomunu RNP ile enkapsüle etmektedir; ancak NP'nin viral RNA ile nasıl etkileşime geçtiği hala tam olarak anlaşılmamıştır (Kraus ve Mirazimi, 2010). RNP oluşumundaki rolüyle uyumlu olarak, NP'nin L proteininin N- ve C-terminal bölgeleriyle etkileşime girdiği ve transfekte hücrelerde işaretli L proteini ile kolokalizasyon yaptığı gösterilmiştir (Bergeron ark., 2010; Macleod ark., 2015). KKKAH virüsü ile enfekte olmuş hücrelerde NP, perinükleer bölgede bulunur. NP'nin aktin filamentleri ile etkileşime girdiği ve aktin filamentlerinin NP'nin perinükleer

bölgeye hedeflenmesinde rol oynadığı öne sürülmüştür. KKKAH virüsü ile enfekte olmuş hücrelerin sitokalsin D ile muamele edilmesi sonucunda aktin filamentlerinin bozulması, NP'nin lokalizasyonunu bozar. Sonuç olarak, viral genomun biraraya toplanması sınırlanır ve enfeksiyöz virionlar ortaya çıkmaz (Andersson ve ark., 2004a). Ayrıca NP'nin, diğer viral partiküllerin yokluğunda bile hücrelerden salınabilmesi ve olgun virüse benzeyen küresel partiküllerin oluşumuna yol açması, NP'nin viral tomurcuklanmada olası bir rolü olduğunu düşündürmektedir (Zhou ve ark., 2011).

KKKAH virüsü NP'nin viral aracılı immün evazyona katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Bir çalışmada insan hücrelerinde MxA proteininin, virüsün NP'yi hedef alıp etkileşime girerek, viral RNA'nın replikasyonunu önlediği ve böylece yeni bulaşıcı virüs partiküllerinin üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir (Andersson ve ark., 2004b). Ayrıca, NP yüksek oranda immünojenik olduğu ve memelilerde hem B hem de T lenfositlerinin ana hedefi olduğu bilinmektedir (Zivcec ark., 2016; Wei ark., 2010). *In vitro*, KKKAH virüsü NP'nin, endonükleaz aktivitesine sahip olduğu, ancak aktivitesinin RNA yerine DNA ile sınırlı olduğu görünmektedir (Guo ve ark., 2012).

Enfeksiyonun erken safhalarında KKKAH virüsü NP'nin Bax proteini ile apoptozun indüksiyonunu baskılayarak ve sitokrom C'nin mitokondri iç zarından sitozole geçişini engelleyerek apoptozu inhibe edebilir. Bununla birlikte, enfeksiyonun ileri safhalarında Bid'in aktivasyonunu indükler ve böylece ekstrinsik apoptotik sinyalleşmeyi aktive ederek apoptozu tetiklemektedir (Karlberg ve ark., 2011). S segmenti, virüsün nükleoproteinini ve aynı zamanda NP'nin bir fraksiyonu olan korunmuş bir kaspaz-3 bölünme bölgesi içeren çıkıntılı bir "kol" adı verilen domaini kodlamaktadır (Şekil 4) (Wang ve ark., 2012). Kaspaz-3 bölünme bölgesinin virüs çoğalmasındaki rolü bilinmemektedir. NP, enfeksiyonun geç apoptotik hücrelerinde kaspaz-3 enzimi tarafından kesilir; bu bölünme, RNA polimeraz aktivitesini inhibe ettiği için replikasyonu düzenleyici bir rol oynadığı düşünülmektedir (Estrada ve Guzman, 2011).



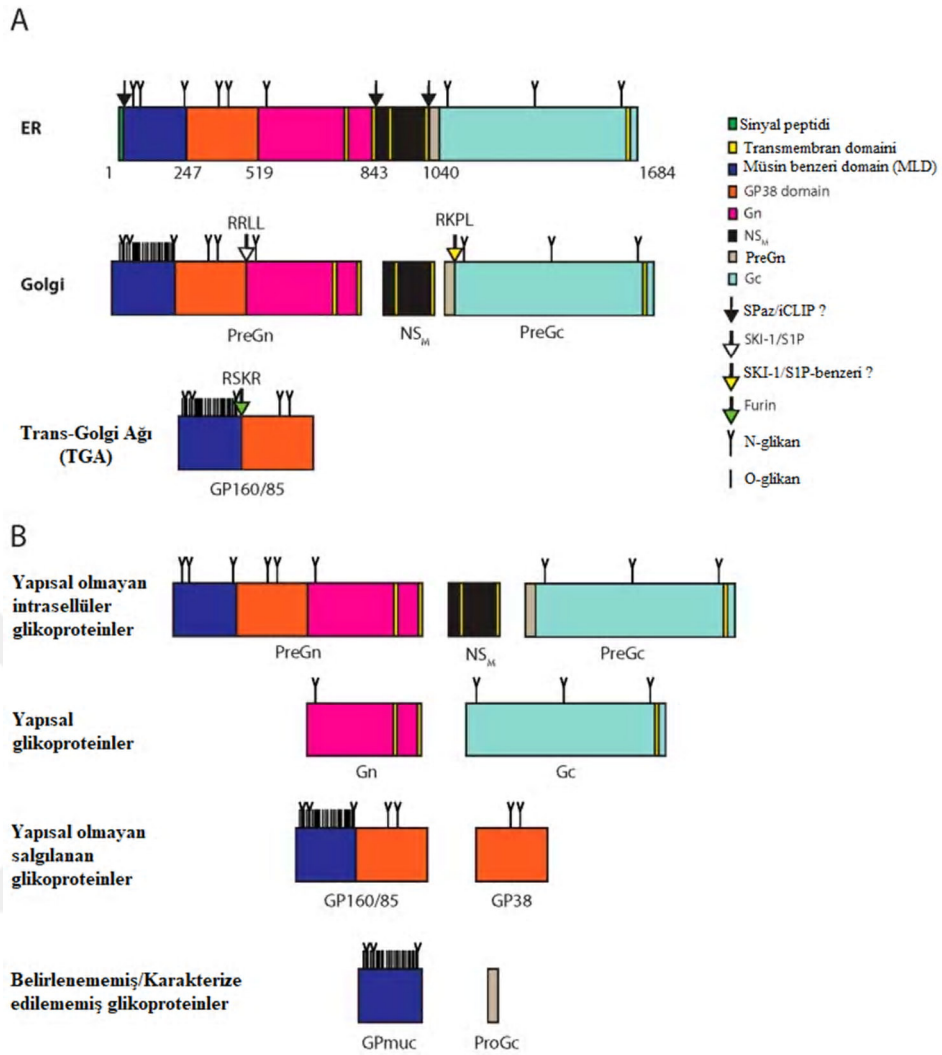
Şekil 4. KKKAH virüsü NP domainleri, motifleri ve katalitik rezidüleri (Zivcec ve ark., 2016)

KKKAH virüsü NP'ye zıt yönde kodlanan yapısal olmayan S proteini (NSs) ile ilgili literatürde yer alan tek bir çalışma mevcut olup çalışmada; KKKAH virüsü ile transfekte hücrelerde, NSs'in mitokondriye lokalize olduğu ve mitokondriyal membran potansiyelini bozarak apoptozu indüklediği bulunmuştur. KKKAH virüsü ile enfekte hücrelerde NSs tespit edilmiş olsa da çalışmada bahsedilen apoptotik fonksiyonlar sadece NSs'nin aşırı ekspresyonuna dayanmaktadır; bu nedenle NSs'in varlığı ile ilgili daha fazla kanıt ihtiyacı duyulmaktadır (Barnwal ve ark., 2015).

2.2.3.2. M Segmenti

M segmenti yaklaşık olarak 5.4 kb büyüklüğündedir. M segmenti tarafından kodlanan glikoprotein prekürsörünün (GPC) matürasyonu oldukça karmaşıktır. GPC'nin matürasyonu (olgunlaşması) sonucunda Gn ve Gc yapısal glikoproteinler; sekrete yapısal olmayan proteinler GP160, GP85 ve GP38 ve yapısal olmayan M proteini (NSm) oluşur (Kraus ve Mirazimi, 2010). Genel olarak, KKKAH virüsü glikoproteinleri, virüsün hedef hücreye girişi ve füzyon, virion oluşumu ve konağın immun sisteminden kaçışına yardım etmektedir (Zivcec ve ark., 2016).

Gn ve Gc proteinlerinin hedef hücreye giriş ve füzyona aracılık ettiği düşünülmektedir. Gn'nin sitoplazmik kuyruğu viral RNA ile etkileşime girebileceği ve matriks proteinine benzer işlevleri yerine getirebileceği düşünülen, RNA'yı *in vitro* bağlayan bir çinko parmak domainini içermektedir (Wang ve ark., 2012). Bununla birlikte, viral RNA, RNP ile enkapsüle edildiğinden, Gn'nin RNP'yi yeni oluşan virionlara nasıl bağlayabileceği açık değildir (Zivcec ve ark., 2016). KKKAH virüsü endoplazmik retikulumda sentezlenen glikoprotein prekürsörünün kotranslasyonel olarak, sinyal peptidazlar ve intramembran parçalayıcı proteazlar ile PreGn (140 kDa) ve PreGc (85 kDa)'ne bölünmektedir (Altamura ve ark., 2007). PreGn ve PreGc normal olarak Golgi kompleksinde lokalize olur; enfeksiyöz viral partiküllerinin üretimini düzenlemektedir (Bergeron ve ark., 2007).



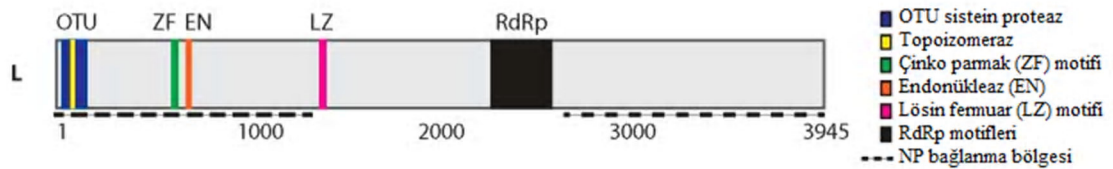
Şekil 5. KKKAH virüsü glikoproteinlerinin işlenmesi. (A) Viral glikoproteinlerin işlenmesi (B) Glikoprotein öncülünden oluşan proteinler (Zivcec ve ark., 2016)

PreGn Golgi kompleksine geçmeden önce, musin benzeri domaini (MLD) O-glikolize edilir. PreGn Golgi'de, Gn proteinin N terminal ucunu oluşturmak ve mucin-G38 domainini serbest bırakmak için SKI1/S1P tarafından RLL motifinden kesilir. Musin-GP38 domaini daha sonra GP38, GP85/GP160 ve musin benzeri proteini oluşturmak için furin ve sinyal peptidazlar tarafından işlenir. PreGc ise SKI1 benzeri proteaz tarafından Gc'nin N terminal ucunu oluşturmak için RKPL motifinden kesilir (Şekil 5) (Altamura ve ark., 2007). Musin-GP38 domaininin furin tarafından kesilmesinin engellenmesi hücre kültüründe virüsün titresinde geçici bir azalma ile sonuçlanmış ve bu durum olgun GP38'in virüsün replikasyonu için önemli olmadığını göstermiştir (Bergeron ve ark., 2015). KKKAH virüsü MLD'i viral partiküllere dahil edilmez (Sanchez ve ark., 2002). GPC'nin katlanması ve taşınması için MLD'nin kesilmesi gerekmektedir. Buna karşılık, GP38 domainini içeren N-terminalinin daha fazla

kesilmesi Gn'nin endoplazmik retikulumda tutulmasına, bu da GP38 domaninin PreGn'nin katlanmasına yardımcı olan veya PreGn'i endoplazmik retikulumdan serbest bırakan bir şaperon aktivitesine sahip olduğunu düşündürmektedir (Bertolotti-ciarlet ve ark., 2005).

2.2.3.3. L segmenti

L segmenti yaklaşık olarak 12 kb büyüklüğünde olup, viral RNA replikasyonundan ve mRNA sentezinden sorumlu olan viral RNA bağımlı RNA polimerazı (L proteini) kodlamaktadır (**Şekil 6**) (Kraus ve Mirazimi, 2010). KKKAH virüsü L segmentinin açık okuma çerçevesi, diğer *Bunyavirüs* cinslerinin açık okuma çerçeveleri ile karşılaştırıldığında neredeyse iki kat daha büyüktür, bu durum L segmentinin viral polimerazın yanı sıra diğer proteinleri de kodlayabildiğini gösterir. 2004 yılında Honig et al., KKKAH virüsünün L proteininin amino terminalinde over tümörü (OTU) proteaz domaininin varlığını tanımlamışlardır (Honig ve ark., 2004).



Şekil 6. KKKAH virüsü L proteininin domainleri, motifleri ve katalitik rezidüleri (Zivcec ve ark., 2016)

OTU domain ailesi içerisinde yer alan sistein proteazlar, ubikitini konjuge proteinlerden hidrolize eder ve proteazomal degradasyon için etiketler (Isaacson ve Ploegh, 2009). Protein ubikitinasyonu hem doğal hem de adaptif hücrel immün yanıtın indüksiyonu için gereklidir (Liu ve ark., 2005). Bu sayede, viral polimerazlar, konağın TNF- α ve tip I interferon (IFN) sitokin gibi ubikitine bağlı antiviral yolaklarını spesifik olarak inhibe etmektedir (Frias-Staheli ve ark., 2007).

KKKAH virüsü L segmentinin atipik olarak büyük boyutu, segmentin N-terminal bölgesinde OTU domaini ile L proteininin otokatalitik bir şekilde işlenebileceğini düşündürmektedir (Honig ve ark., 2004). Ancak, yapılan çalışmalarda L proteininin herhangi bir spesifik proteolitik aktivitesi tespit edilememiştir. Ayrıca, KKKAH virüsü minigenom sisteminde OTU domaini inaktive edildiğinde, viral polimerazın

fonksiyonunda bir azalma görülmemiştir (Bergeron ve ark., 2010). KKKAH virüsünün L segmentinde kodlanan bu viral enzim, konak immün sisteminden kaçışta rol oynamaktadır (Frias-Staheli ve ark., 2007). OTU domaini endoproteazının ekspresyonu, nükleer faktör κ B'nin (NF- κ B) nükleusa translokasyonunu inhibe eder ve böylece doğrudan viral evazyonu kolaylaştırmaktadır (Kraus ve Mirazimi, 2010).

2.2.4. Virüsün Replikasyonu

Virüsün hedef hücre yüzeyine ilk bağlanmasına, Gn ve/veya Gc glikoproteinleri aracılık etmektedir. Bununla birlikte, virüsün hedef hücreye bağlanmasında, internalizasyonda ve füzyonda glikoproteinlerin spesifik rolleri henüz bilinmemektedir. Gc'yi hedef alan monoklonal antikoların memeli hücrelerinde KKKAH virüs enfeksiyonunu nötralize edebilmesi, Gc'nin, virüsün hücresel reseptörlere bağlanmasından sorumlu olduğunu düşündürmektedir (Bertolotti-ciarlet ve ark., 2005). KKKAH virüsünün hücreye girişi için gereken hücresel reseptörler henüz tanımlanmamıştır. Ağırlıklı olarak çekirdekçik içinde bulunan bir protein olan hücre yüzeyi nükleolin proteini ile Gc arasında fonksiyonel bir etkileşim olduğu öne sürülmüştür (Xiao ve ark., 2011). Nükleolin proteini Respiratuar Sinsityal virüs (RSV) için reseptör görevi görürken, Japon ensefalit virüsü için bir giriş faktörü olarak görev almaktadır; aynı zamanda İnsan İmmün Yetmezlik virüsünün (HIV) hücreye girişini arttırmaktadır (Tayyari ark., 2011; Thongtan ark., 2012; Tajrishi ark., 2011; Ueno ark., 2004). KKKAH virüsünün hedef hücreye bağlanması ve/veya füzyonunda nükleolinin rolünü kanıtlamak için daha fazla detaylı çalışma gerekmektedir (Zivcec ve ark., 2016).

Virüs hücre yüzeyine bağlandıktan sonra, klatrin aracılı endositoz mekanizması vasıtasıyla hücre içine alınır. Virüsün hücreye girişi için, klatrin ve klatrin kaplı çukur adaptör protein-2 kompleksi gerekmektedir (Simon ve ark., 2009). Virüsün hücreye girişi aynı zamanda kolesterole ve düşük pH'a da bağlıdır (Simon ark., 2009; Garrison ark., 2013). Endositozu takiben virüs partikülleri, erken endozomlara ve daha sonra multivesiküler cisimciklere (MVB) taşınır (Zivcec ve ark., 2016).

Virüsün hücreye girişinin ve füzyonunun ardından, genomik RNP'ler sitozole salınır ve enkapsüle edilmiş vRNA, viral mRNA'yı sentezlemesi için L proteinine bir şablon olarak görev yapar (Şekil 7) (Zivcec ve ark., 2016).

Genomik RNP'lerin replikasyonu, negatif polariteli vRNA'nın ve pozitif polariteli komplementer RNA'nın (cRNA) replikasyonunu ve enkapsülasyonunu gerektiren bir süreçten oluşmaktadır. RNP'lerin replikasyonu için minimal olarak L proteinini ve NP'yi gerekmektedir (Bergeron ve ark., 2010). Virüsün cRNA ve vRNA'nın kapsüllenmiş formları sırasıyla antijenomik ve genomik RNP'ler olarak tanımlanmaktadır. KKKAH virüsü negatif iplikli bir RNA virüsü olduğundan, genomik RNP'ler, mRNA'yı sentezlemek ve antijenomik RNP'leri üretmek için şablon olarak kullanılmaktadır. Genomik RNP'lerin replikasyonu sırasında, bir cRNA, L proteini tarafından sentezlenmektedir. Antijenomik RNP'lerin elde edilmesi için uzayan ipliklere NP alt birimleri eklenir ve ardından antijenomik RNP'lerin cRNA'sı, genomik RNP'lerin elde edilmesi için bir şablon kullanılır (Zivcec ve ark., 2016).

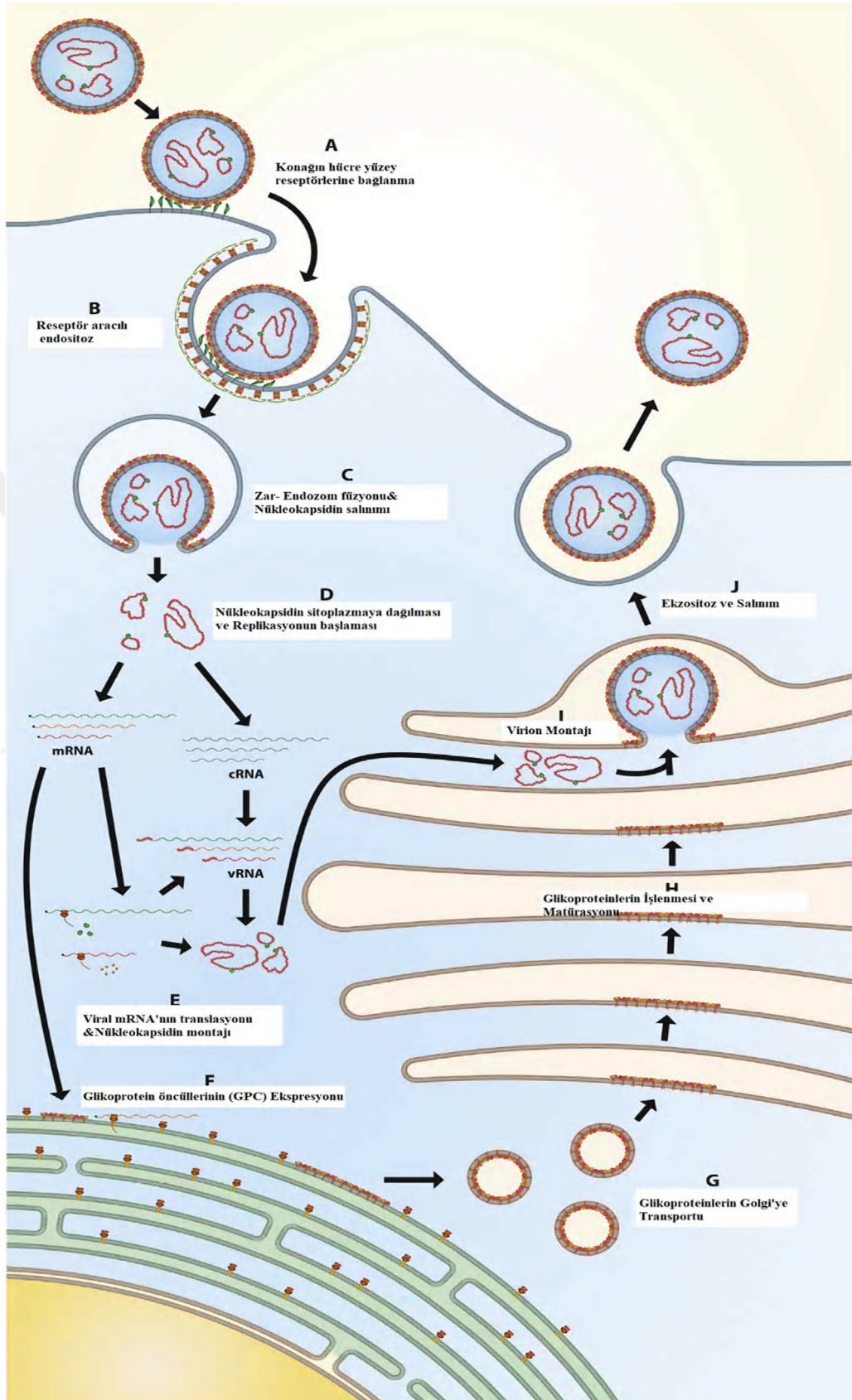
RNP oluşumunu viral protein prekürsörlerinin sentez edilmesi, bu öncül proteinlerin işlenmesi ve viral proteinlerin olgunlaşması takip eder. M segmenti tarafından sentezlenen GPC'nin matürasyonu, virüsün Gn ve Gc yapısal glikoproteinlerini, GP160, GP85 ve GP38 salgılanan yapısal olmayan proteinlerini ve yapısal olmayan M proteinini (Nsm) oluşumlarını sağlamaktadır (Altamura ark., 2007; Sanchez ark., 2002, 2006). Virüsün tüm glikoproteinlerini oluşturmak için, GPC önce glikolizasyona uğramakta ve ardından konak hücresinin proprotein konvertazları içeren serin proteazları tarafından kesilmektedir (Zivcec ark., 2016; Altamura ark., 2007).

GPC, bir N-terminal sinyal peptidi içerir (Haferkamp ve ark., 2005). Endoplazmik retikulum (ER) içine uzama ve translokasyon üzerine, sinyal peptidi çıkarılır, GPC N-glikosile edilir, katlanır, moleküler disülfid köprüleri oluşturulur ve öncü proteinin transmembran alanları ER membranını beş kez geçer (Sanchez ve ark., 2002). GPC tamamen transle edilmeden önce, sinyal peptidazlar ve intramembran kesim proteazlar (I-CLiPs) tarafından Gn öncülüne (PreGn), Gc öncülüne (PreGc) ve NsM proteinlerini oluşturmak için bölünür (Altamura ark., 2007; Sanchez ark., 2002).

ER'deki üretken olgunlaşmanın ardından PreGn ve PreGc, Golgi kompleksine taşınır; burada PreGn MLD'i sayısız O-bağlı glikan ile kaplanır (Bergeron ark., 2007; Sanchez ark., 2002, 2006). PreGn, virüs montaj bölgesi olan Golgi kompleksine bölgesine direkt taşınabilirken; PreGc, ER'den çıkmak için PreGn'e ihtiyaç duymaktadır (Haferkamp ve ark., 2005).

GPC'nin olgunlaşmasını tamamlamak için PreGn ve PreGc'nin sınırlı endoproteolizi gerekmektedir. PreGc'yi Gc'ye dönüştürmek için gereken konak hücre proteazı tanımlanmamıştır. Subtilisin kexin izozim-1/serin-1 proteaz (SKI-1/S1P) ile kesilen bir arenavirüs olan Guanarito virüsünün GPC kesilme bölgesi motifi ile KKKAH virüsünün PreGc proteini kesilme bölgesi motifinin (RKPL) aynı olduğu göz önüne alındığında, KKKAH virüsü PreGc'ninin aynı proteaz veya benzer özelliklere sahip bir proteaz (SKI / S1P benzeri) tarafından kesildiği varsayılmaktadır (Rojek ve ark., 2008). PreGn'in SKI-1/S1P tarafından kesilmesi, ER'de veya *cis*-Golgi aparatından çıkışından sonra meydana gelmektedir. PreGn'nin RRLL motifinden proteazlar tarafından kesilmesi, MLD ve GP38 alanını içeren N-terminal ürünlerin (GP160 ve GP85) serbest kalmasına yol açar (Vincent ve ark., 2003). GP160/85, *trans*-Golgi ağında (TGN), MLD ve GP38 bölgesinin birleşme yerindeki iyi korunmuş RSKR motifinden furin ile kesilmektedir. Bu kesim sonucunda GP38 domaininin MLD'den ayrıldığı tahmin edilmektedir (Sanchez ve ark., 2006).

KKKAH virüs partiküllerinin montajı ve hücreden çıkışı ile ilgili bilgiler sınırlıdır. KKKAH virüsü RNP'leri sitoplazmada bulunur ve NP, Golgi kompleksine yakın perinükleer bölgede lokalize olur (Andersson ve ark., 2004a). Viral glikoproteinlerin hücre altı lokalizasyonu sıklıkla virüs tomurcuklanmasının yerini belirler. Glikoproteinlerin TGN ve Golgi kompleksinde birikmesi ile NP'nin perinükleer bölgelerde birikmesi ile yeni KKKAH virüs partiküllerinin montajı başlar (Andersson ve ark., 2004a, 2004b). Montajın ardından, virüs partikülleri, genellikle polarize epitel hücrelerinin bazolateral membrandan ekzositoz yoluyla hücre dışına salınmaktadır (Connolly-Andersen ve ark., 2007).

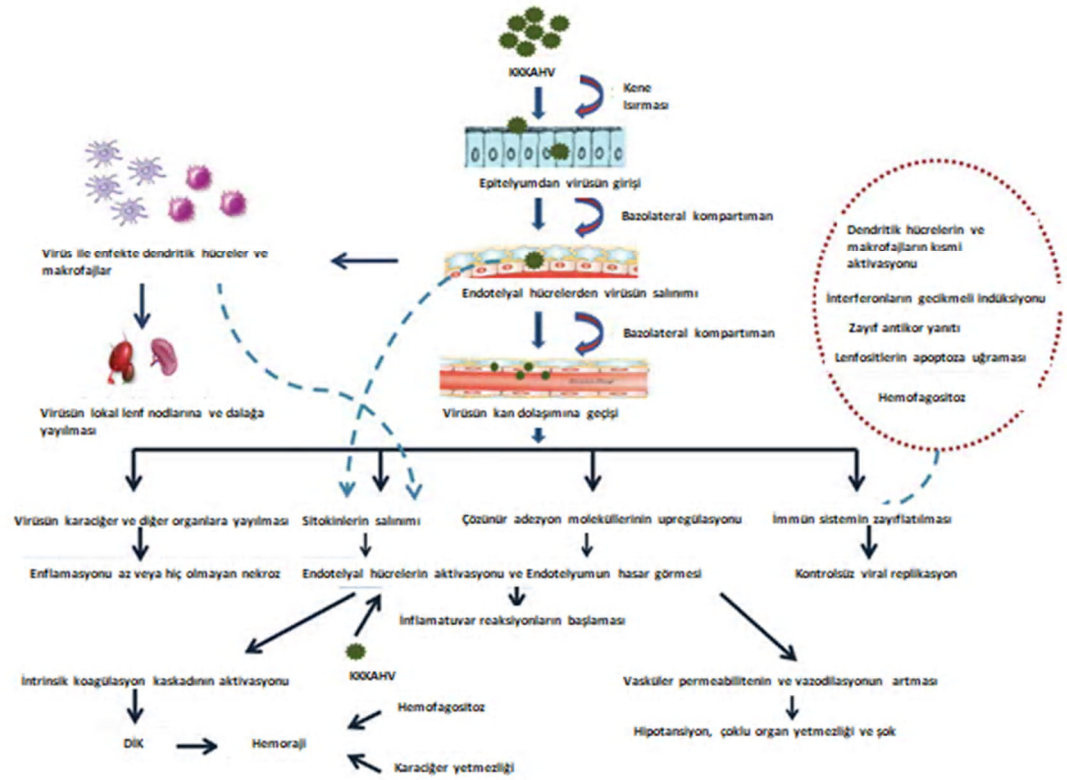


Şekil 7. KKH virüsünün intrasellüler replikasyon aşamalarının şematik görünümü (Bente ve ark., 2013).

2.3. Patogenez

KKKAH virüsü enfeksiyonundan sonra hastalık geliştirdiği bilinen tek konakçı insandır. Enfeksiyon ateş, halsizlik, ağır kanamalar ve potansiyel olarak ölümlü karakterize edilen, ağır bir hemorajik ateş olan KKKAH ile sonuçlanabilir (Kraus ve Mirazimi, 2010). KKKAH'nin patogenezi, enfeksiyonların sporadik olarak meydana gelmesi, hastalığın görüldüğü bölgelerdeki tesislerin tam otopsiyi yapmak için sınırlı olması, virüslerin biyogüvenlik seviye 4 içeren laboratuvarlarda çalışılması gerekliliği ve hastalığın anlaşılması için uygun hayvan modellerinin yetersizliği gibi nedenlerden ötürü tam olarak karakterize edilememiştir (Kraus ve Mirazimi, 2010).

İnokülasyondan sonra virüs ilk önce dendritik hücrelerde ve diğer lokal dokularda çoğalır; daha sonra bölgesel lenf düğümlerine göç eder ve ardından karaciğer, dalak ve lenf düğümleri dahil olmak üzere çok çeşitli doku ve organlara yayılır. Doku makrofajlarının göçü, parankimal hücrelerin sekonder enfeksiyonuna yol açar. Her ne kadar lenfositler enfeksiyondan uzak kalsa da diğer septik şok formlarında görüldüğü gibi, apoptoz yoluyla hastalık boyunca çok sayıda lenfositin tahribatı gerçekleşebilir. Hücre yüzey dokusu faktörünün sentezi, ekstrinsik koagülasyon yolağını tetikler. Hemostazın bozulması, endotel hücre, trombosit ve/veya pıhtılaşma faktörünün işlev bozukluğuna yol açabilir. Dissemine intravasküler koagülasyona (DİK), KKKAH virüs enfeksiyonlarında sıkça rastlanmaktadır. Koagülasyon faktörünün kandaki seviyesinin azalması sekonder olarak, karaciğer fonksiyon bozukluğuna ve/veya dissemine intravasküler koagülasyona neden olabilir. Ayrıca, KKKAH virüsü, trombositlere ve endotel hücrelerine doğrudan ve/veya dolaylı olarak immünolojik yollara ve inflamatuvar yollarına zarar vererek hemorajik diyateze yol açabilir (Chen ve Cosgriff, 2007; Peters ve Zaki, 2002; Geisbert ve Jahrling, 2004). Virüs ile enfekte monositlerden ve makrofajlardan, sitokinlerin, kemokinlerin ve diğer proinflamatuvar mediatörlerin salınmasının sonucu olarak bu değişikliklerin meydana geldiği düşünülmektedir (Bray, 2007; Ergönül ark., 2006b). Doğrudan enfekte olmuş hücrelerin nekrozu veya dolaylı olarak immün hücrelerin apoptozu yoluyla doku hasarı meydana gelebilir. Hepatositlerin KKKAH virüsü enfeksiyonunda özellikle etkili olduğu bildirilmiştir (**Şekil 8**) (Rodrigues ve ark., 2012)



Şekil 8. KKKAH Patogenezi (Akıncı ve ark., 2013)

KKKAH virüsünün tip I interferon sistemi olmayan farelerde ağır veya ölümcül hastalıklara neden olması ve vahşi tip (WT) farelerde böyle bir etki göstermemesi; omurgalı konaklarındaki doğal immün yanıtların virüsün patogenezi sınırlamada önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Zivcec ark., 2013; Berczky ark., 2010; Bente ark., 2010). *In vitro* çalışmalar, retinoik asit-uyarılabılır gen I (RIG-I) 'i KKKAH virüsünün doğal bağışıklığın sensörü olarak tanımlamıştır (Spengler ve ark., 2015). İnsanlarda yapılan retrospektif çalışmalar, Toll benzeri reseptörlerdeki (TLR'ler) polimorfizmler ile hastalığın şiddeti arasında korelasyon tespit etmiştir ve bu durum TLR'lerin önemli bir immün algılayıcı yolak olabileceğini düşündürmektedir. TLR7, 8, 9 ve 10'daki polimorfizmlerin, Türkiye'deki enfekte hastalarda hastalığın şiddeti ve sonucu ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Arslan ark., 2015; Engin ark., 2010; Kızıldağ ark., 2018). Benzer polimorfizmlerin KKKAH ile ilişkili olup olmadığı ve diğer coğrafi bölgelerdeki popülasyonlarda vaka şiddeti henüz belirlenmemiştir.

KKKAH virüsü ayrıca doğal bağışıklık sisteminin sinyalizasyonunu antagonize eder. Virüsün L segmentinde yer alan OTU domaini doğal bağışıklık sinyalizasyonunda görev alan proteinlerdeki ubiquitinleri hidrolize ederek, doğal bağışıklığı baskılamaktadır

(Scholte ve ark., 2017). Ayrıca OTU domaini, interferon ile uyarılmış gen 15 (ISG15) modifikasyonlarını parçalayabilir (Frias-Staheli ark., 2007; James ark., 2011). ISG15 modifikasyonları doğrudan antiviral etkilere dahil edildiğinden ve ISG15'in, viral enfeksiyona karşı konakçı doğal immün yanıtını düzenlediği tespit edildiğinden, virüsün OTU domainin de-ISG15 aktivitesi, viral patogenez için önemli olabilir (Perng ve Lenschow, 2018). KKKAH virüsü OTU domaini ayrıca insan ISG15'i için, diğer *Nairoviridae* ailesi üyelerinin OTU domaininden daha yüksek afiniteye sahiptir; bu durum OTU domaininin KKKAH virüsü için önemli bir virülans faktörü olabileceğini düşündürmektedir (Capodagli ve ark., 2013).

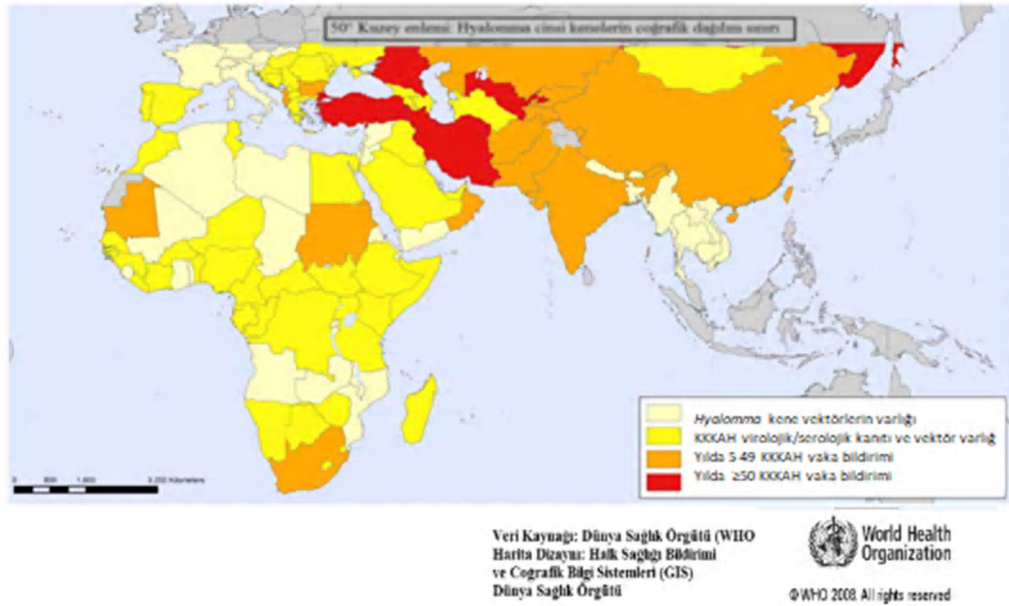
KKKAH virüsünün insanlardaki patogenezinde adaptif immün yanıtların rolü daha az bilinmektedir. Düşük titrelerde oluşan anti-KKKAHV antikor yanıtlarının, şiddetli hastalık ve ölüm ile ilişkili olduğu ve antikor seviyelerinin, hastalık sonucunun bir öngörücüsü olarak işlev görebileceği bulunmuştur (Ergönül ark., 2006c; Shepherd ark., 1989; Swanepoel ark., 1989). Bununla birlikte, antikor yanıtlarının primer KKKAH virüsü enfeksiyonunun kontrolüne katkıda bulunup bulunmadığı bilinmemektedir ve hayatta kalan hastalarda bile nötralizan antikor yanıtı tipik olarak düşüktür (Shepherd ve ark., 1989). Türkiye ve Güney Afrika'daki KKKAH virüsünden hayatta kalanlardan lineer peptidler ve serum kullanılarak yapılan epitop haritalaması, MLD, GP38 ve Gn karşı oluşan, ancak nötralizan olmayan antikor yanıtları tanımlamıştır. Bununla birlikte, nötralizan olmayan antikorların KKKAH virüsü epruvasyonun karşı koruyucu olduğu ve bu durum, antikorların nötralizasyon dışındaki mekanizmalar yoluyla koruyucu olabileceğini göstermiştir (Fritzen ark., 2018; Bertolotti-Ciarlet ark., 2005).

Adaptif immün yanıtın primer KKKAH virüsü enfeksiyonunun kontrolündeki rolü, uygun hayvan modellerinin eksikliği ile sınırlıdır. Tip I interferon eksikliği olan fareler, adaptif immün yanıt geliştirilmesinden önce hızlı başlayan bir ölümcül hastalık gösterdiklerinden, bu hayvan modeli adaptif immün bağışıklığın rolünü anlamak için yetersizdir. Bununla birlikte, STAT1 eksikliği olan farelerdeki çalışmalar, CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin erken aktivasyonunu göstermiştir; ancak bu hücreler enfeksiyondan 3 gün sonra dalakta saptanamamış ve fareler antikor yanıtları saptanamadan ölmüştür (Bente ve ark., 2010). T hücresi yanıtının hastalık sonucuna katkısını değerlendiren daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

2.4. Epidemiyoloji

Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı Afrika, Orta Doğu, Asya ve Güneydoğu Avrupa'da endemiktir (Maltezoğlu ve Papa, 2010; Mertens ark., 2013; Negrodo ark., 2017). KKKAH virüsü, Afrika (Kongo Demokratik Cumhuriyeti, Güney Afrika, Nijerya, Senegal, Uganda, Tanzanya, Moritanya, Kenya), Asya (Pakistan, Afganistan, Tacikistan, Özbekistan, Kazakistan, Çin), Orta Doğu (İran, Irak, Birleşik Arap Emirlikleri, Suudi Arabistan, Umman) ve Güneydoğu Avrupa (Rusya Federasyonu, Bulgaristan, Arnavutluk, Kosova, Türkiye, Yunanistan ve İspanya) dahil olmak üzere 30'dan fazla ülkede gözlenmiştir (**Şekil 9**) (Maltezoğlu ve Papa, 2010; Negrodo ark., 2017; Leblebicioğlu, 2010; Papa ark., 2015; Kizito ark., 2018). Hindistan'da KKKAH'nin ortaya çıkışı 2011'de bildirilmiştir (Bajpai ve Nadkar, 2011) ve İspanya'da KKKAH ilk olarak 2016'da bildirilmiştir (Negredo ark., 2017; García Rada, 2016). 1998-2013 yılları arasında hastalık en sık Türkiye, Rusya, İran, Pakistan ve Afganistan'da meydana gelmiştir (Leblebicioğlu ark., 2017; İnce ark., 2014).

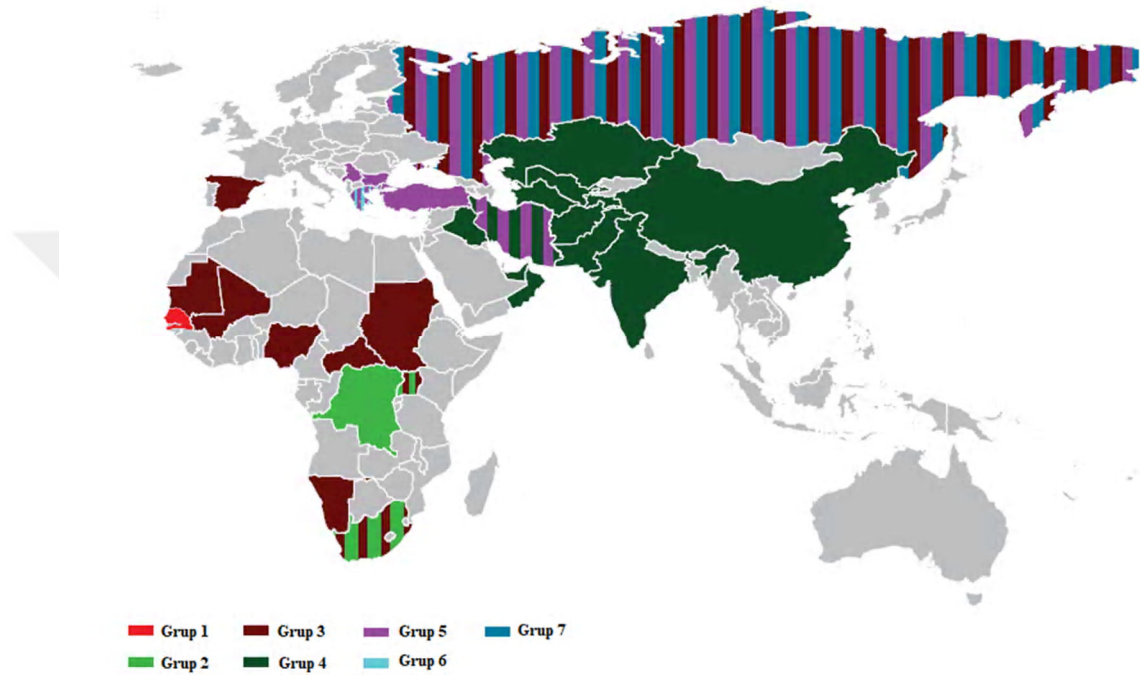
Kuzey Yarımküre'de virüsün bulaşı, Nisan ve Eylül ayları arasında aynı olup, Haziran ve Temmuz aylarında en yüksek oranda görülmektedir (Yılmaz ve ark., 2009). Türkiye'de yaz aylarının başında bulaşın en yüksek seviyede olması ve 836,5 m'den daha yüksek rakımda görülmesi ile güçlü bir ilişki vardır, bu durum kene popülasyonu için optimal koşulların yüksek bölgelerde olmasından kaynaklanmaktadır (Aker ve ark., 2015).



Şekil 9. KKKAH'nin coğrafik dağılımı (Spengler ve ark., 2018).

KKKAH virüsü enzootik bir kene-omurgalı-kene döngüsünde dolaşmaktadır ve virüsün hayvanlarda hastalığa neden olduğuna dair kanıt yoktur. KKKAH viral enfeksiyonu, kene vektörlerinin olgunlaşmamış aşamaları için konak görevi gören, daha küçük vahşi yaşam türleri arasında yaygın olarak gösterilmiştir. KKKAH virüsü *Hyalomma* cinsi kenelerinden, özellikle de *Hyalomma marginatum marginatum*'dan bulaşmaktadır. KKKAH virüsü, 1960'larda yetişkin *Hyalomma* cinsi kenelerinden izole edilmiştir (Hoogstraal, 1979; Watts ark., 1988). Virüs kenelerde, transovaryal ve transstadial geçişle idame olmakla birlikte, keneler arasında veneral olarak bulaşma da şekillenmektedir (Estrada-Pena ve ark., 2012). Avrupa, Asya ve Afrika'da KKKAH varlığı, *Hyalomma* cinsi kenelerin küresel dağılımı ile örtüşmektedir. *H. marginatum*, Kosova'dan Pakistan'a kadar uzanan bölgedeki başlıca vektördür (Özdarendeli ve ark., 2010). *Hyalomma* kenelerinin geniş coğrafik yayılımı; savan, bozkır ve hafif ormanlık alanlar gibi çeşitli ortamlara adapte olabilmelerinden ve larva ve nimf formlarının agresif olarak kirpi, tavşan gibi çeşitli konakçılardan, yetişkin formlarının ise aktif olarak koyun, sığır gibi büyükbaş hayvanlardan beslenebilme yeteneklerinden kaynaklanmaktadır (Hoogstraal, 1979). Yakın zamanda KKKAH virüsü RNA'sı Güney İspanya'da *Hyalomma lusitanicum*'dan ekstrakte edilmiştir (Estrada-Pena ve ark., 2012). *Hyalomma marginatum rufipes* de dahil olmak üzere, *Hyalomma* cinsinin diğer üyeleri, yabani omurgalı hayvancılığının, çok sayıda kene popülasyonlarının varlığının

ve bu nedenle virüse maruziyetin çok olduğu Afrika'daki KKKAH virüsünün başlıca vektörleridir (Rechav, 1986). Virüs ayrıca Türkiye, Yunanistan ve Arnavutluk'ta *Rhipicephalus* cinsi kenelerden ve Türkiye'de *Dermacentor marginatus* türü kenenin dahil olduğu termofilik kene türlerinden de belirlenmiştir (**Şekil 10**) (Yeşilbağ ve ark., 2013).

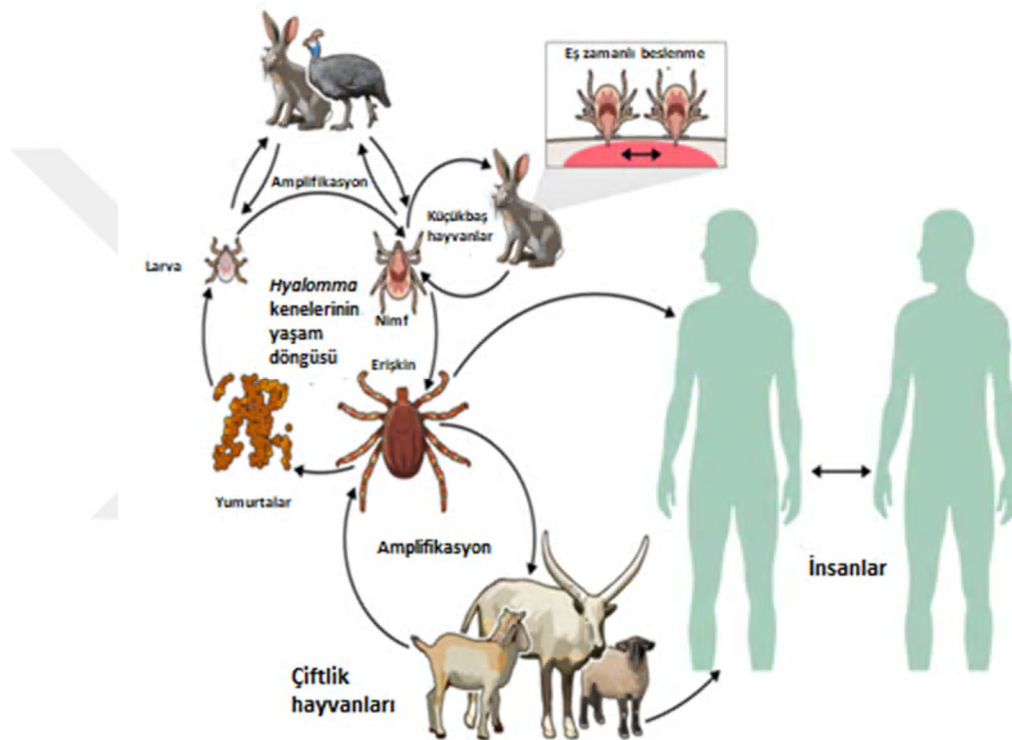


Şekil 10. KKKAH virüsünün coğrafik dağılımı (Bartolini ve ark., 2019).

KKKAH'nin görülme sıklığı artmaktadır. KKKAH salgınlarının olası nedenleri arasında tarımsal uygulamaların değiştirilmesi, iklim değişikliği, evcil hayvanların hareketi, kuşların göç etmesi, virüse duyarlı hayvan sayısının artması ve kene popülasyonlarının artması sayılabilir. Ormansızlaşma ve sulama projeleri gibi değişen tarım uygulamaları, vektörlerle temasın artmasına neden olabilmektedir. Tarımsal faaliyetlerin azaltıldığı belirli bir bölgelerde kene sayılarının artması ve tarım için bu tür alanların daha sonra kullanılması, KKKAH salgınları ile ilişkilendirilmektedir. Virüsün laboratuvar tanısının artması, hastalığın insidansındaki artışta rol oynamaktadır (Ergönül, 2006a).

KKKAH; keneler, enfekte hayvanların kanına veya diğer vücut sıvılarına doğrudan temas, nazokomiyal yolla ve vertikal yolla bulaşmaktadır (Ergönül, 2006a). KKKAH çoğunlukla kenenin konağı tutması yoluyla bulaşmaktadır. Kene; gövde, ekstremiteler, baş ve boyun gibi insan vücudunun tüm bölgelerine tutunmakta; *H. marginatum* ise

genellikle gövdeye tutunmaktadır (Kar ve ark., 2013). Nazokomiyal yolla bulaşın en sık nedenleri sağlık personelinin virüs ile enfekte kan ve vücut sıvıları ile direkt teması, iğne batmasıdır (Leblebicioğlu ve ark., 2016). Vertikal yolla bulaşın olduğu bilinmesine rağmen, emzirme ile virüs bulaşına ait bir veri bulunmamaktadır (Erbay ve ark., 2008). Cinsel yolla virüsün bulaşı ise halen belirsizliğini korumaktadır (**Şekil 11**) (Ergönül ve Battal, 2014).



Şekil 11. KKKAH virüsünün bulaş yolları (Hawman ve ark., 2018)

KKKAH virüsü enfeksiyonu riski taşıyan bireyler arasında tarım işçileri, hayvancılıkla uğraşan kırsal alanlardaki kişiler, mezbanhede çalışan işçiler, veterinerler, kene yoğunluğunun yüksek olduğu bölgelerde çalışan deri fabrikası işçileri, kampçılar ve yürüyüşçüler, avcılar, askerler, sağlık çalışanları ve endemik bölgelere seyahat edenler sayılabilmektedir (Cobo, 2016; Bakır ark., 2005; Conger ark., 2009). Yüksek riskli popülasyonlarda, KKKAH virüsü enfeksiyonunun seroprevalansı %10-14'tür (Güneş ve ark., 2009). İmmün sistemi baskılanmış bireylerde KKKAH virüsü enfeksiyonu riski ile ilgili veriler yetersizdir.

Türkiye'de ilk KKKAH vakası 2002'de, Doğu Karadeniz bölgesindeki hastalarda tespit edilmiştir. 2009 yılı itibariyle yaklaşık 5000 kişiye enfeksiyon teşhisi konulmuş ve vaka ölüm oranı %5 olarak belirlenmiştir (T.C Sağlık Bakanlığı verileri). 2015 yılına gelindiğinde konfirme vaka sayısı 9787 olarak belirlenmiş ve toplam 469 kişinin ölümü ile sonuçlanan hastalığın vaka ölüm oranı %4,79 olarak saptanmıştır (Leblebicioğlu ve ark., 2016). Hastalığın erken belirtileri ve semptomları spesifik olmadığı için, bazı KKKAH hastalarının 2/3'ü başlangıçta yanlış tanı almaktadır (Taşdelen ve ark., 2010). Vakaların çoğu, evcil hayvanların neredeyse %80'inde KKKAH karşı spesifik antikorlar tespit edilen Orta ve Doğu Anadolu bölgesinde meydana gelmektedir (Taşdelen ve ark., 2010).

2.5. Klinik Seyri ve Laboratuvar Bulguları

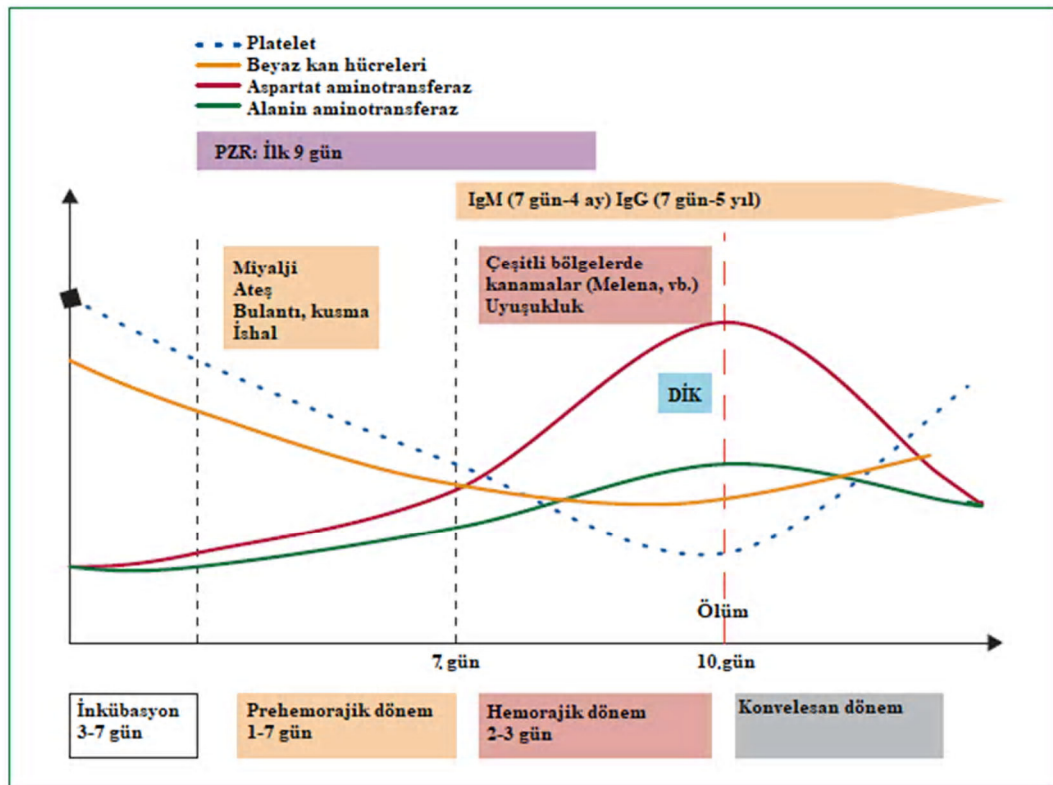
KKKAH virüs enfeksiyonunun meydana geldiğini gösteren ilk endikasyonlar; kene ısırığı öyküsü, riskli alanlarda yaşayan ruminantların kan veya vücut sıvıları ile temas ya da bir KKKAH sahip bir birey ile doğrudan temas sonucunda; halsizlik, yüksek ateş, miyalji, baş ağrısı ve iştahsızlık gibi ortaya çıkan yaygın klinik bulgulardır (Mertens ve ark., 2013).

Trombositopeni, lökopeni ile aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), laktat dehidrojenaz (LDH) ve kreatinin fosfokinaz (CPK) enzim seviyelerinin yüksekliği KKKAH ile bağlantılı laboratuvar bulgularıdır. Anormal laboratuvar bulguları genellikle enfeksiyonun başlangıcında oluşmakta ve hemorajik fazda en belirgin hale gelmektedir (Ergönül, 2006a). Kanama zamanı, protrombin zamanı ve aktif parsiyel tromboplastin zamanında artış; fibrinojende azalma ve fibrin son ürünlerinde artış gibi koagülasyon testlerindeki anormallik enfeksiyonun 3. aşamasında tespit edilebilmektedir (Öncü, 2013)

İnsanlar, KKKAH virüsünün hastalık oluşturduğu bilinen tek konağıdır (Whitehouse,2004; Watts ark., 1988). Bir çalışmada, enfekte olmuş kişiler için KKKAH geliştirme olasılığının 0,215 (virüs ile enfekte her beş kişiden birinde hastalık gelişmektedir) olduğu bulunmuştur (Goldf ve ark., 1980).

KKKAH enfeksiyonunun tipik olarak dört farklı evrede seyretmektedir: inkübasyon, prehemorajik, hemorajik ve konvelesan dönemleri (**Şekil 12**) (Hoogstraal, 1979).

Kenenin tutmasını takiben başlayan inkübasyon süresi genellikle kısadır (3-7 gün); ancak kesin veriler elde etmek zordur (Hoogstraal, 1979; Swanepoel ark., 1989). İnkübasyon süresi, viral doz ve virüse maruz kalma yolu gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişebilmektedir; örneğin, kanla bulaşa inkübasyon süresi daha kısadır. Güney Afrika'da hastalığın, kene ısırığına maruz kaldıktan 2-3 gün sonra, enfekte kan veya canlı hayvan dokusuna temastan 5 gün sonra, enfekte kişilerin kanına temastan 5-6 gün sonra başladığı bildirilmiştir (Swanepoel ve ark., 1987). Hastalığın klinik seyrinin başlangıcının Türkiye'de 5-6 gün, Birleşik Arap Emirlikleri'nde ise 3-5 gün olduğu bildirilmiştir (Schwarz ve ark., 1997).



Şekil 12. KKKAH'nın klinik seyri (Ergönül, 2006a)

Hemorajik dönem, ani ateş başlangıcı ($39-41^{\circ}\text{C}$), baş ağrısı, miyalji ve baş dönmesi ile karakterizedir. Ateş ortalama 4-5 gün sürmektedir. Sıklıkla yüz, boyun ve göğüste hiperemi, sklerada kırışma ve konjonktivit ile bazı vakalarda ek olarak ishal, bulantı ve kusma semptomları da görülmektedir. Hemorajik dönem 1 ila 7 gün arasında, ortalama 3 gün sürmektedir (Hoogstraal, 1979; Watts ark., 1988; Swanepoel ark., 1987; Schwarz ark., 1997).

Hemorajik dönem kısadır, 2-3 gün sürer, hızla gelişir ve genellikle hastalığın üçüncü ila beşinci günleri arasında başlar (Hoogstraal, 1979). Hemorajik bulgular, mukoza ve deride görülen peteşilerden büyük hematomlara kadar uzanmaktadır. Kanamanın en sık görüldüğü vücut bölgeleri; burun, gastrointestinal sistem (hematemez, melena ve karın içi), uterus (menometroraji) ve idrar yolu (hematüri) ve solunum yoludur (hemoptizi) (Watts ark., 1988; Ergönül ark., 2006c). Hepatomegali ve splenomegalinin hastalarının 1/3'ünde ortaya çıktığı bildirilmiştir (Hoogstraal, 1979). Türkiye'de hepatomegali, vakaların %20-40'ında tespit edilmiş ve iki çalışmada %14 ve %23'lük sıklıkta splenomegali bildirilmiştir (Karti ark., 2004; Bakır ark., 2005; Ergönül ark., 2004; Özkurt ark., 2006).

Konvelesan dönem, hayatta kalan bireylerde virüs kaynaklı hastalıkların meydana gelmesinden yaklaşık 10-20 gün sonra başlar. Hastalar yaklaşık 9-10 gün hastanede kalır (Karti ark., 2004; Schwarz ark., 1997). İyileşme döneminde, labil nabız, taşikardi, geçici tam saç dökülmesi, polinöritis, solunum zorluğu, kserostomi, görme bozukluğu, işitme kaybı ve hafıza kaybı bildirilmiştir; ancak bu bulguların hiçbiri Türkiye'deki son salgınlarda görülmemiştir (Karti ark., 2004; Bakır ark., 2005; Schwarz ark., 1997; Ergönül ark., 2004). Hepatorenal yetmezlik Güney Afrika'da bildirilmiş; ancak Türkiye'de bildirilmemiştir (Bakır ark., 2005). Enfeksiyonun bilinen bir nüksü yoktur ve eski Sovyetler Birliği'nde yayınlanan çalışmalarda da belirtildiği gibi, hastalığın bifazik seyri Türkiye'de görülmemiştir (Ergönül, 2006a).

2.6. Teşhis Yöntemleri

Erken tanı, hem hastalanan bireyin durumunun belirlenmesi hem de hastalığın daha fazla bulaşımın önlenmesi açısından önem arz etmektedir. Endemik bölgelere seyahat geçmişi, kene ısırması ve enfekte hayvanların ya da insanların vücut sıvılarına maruz kalma erken teşhis için önemlidir. Bu gibi durumlarda, virüsün yayılmasını önleyici tedbirler alındıktan sonra, hızlı bir şekilde laboratuvar tanı çalışmasına başlanması gerekmektedir. Teşhis yöntemleri arasında antikor tespiti, antijen tespiti, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve virüs izolasyonu bulunur (Vanhomwegen ve ark., 2012).

Serolojik testlerle antikor tespiti, KKKAH tanısı için yaygın olarak kullanılmaktadır. Enzim bağlı immünosorbent testi (ELISA), dolaylı immünofloresans testi (IFA), hemaglutinasyon inhibisyonu, kompleman fiksasyonu ve immünodifüzyon, virüse karşı

oluşan antikor yanıtının tespiti için kullanılan tekniklerdir. Düşük maliyet ve uygulama kolaylığı nedeniyle ELISA antikor tespiti için kullanılan en yaygın testtir ve duyarlılığı %90'ın üzerindedir (Putilina ve ark., 2011). Hastalığın tanısında kullanılan KKKAH virüsüne özgü IgM ve IgG tipi antikorlar, akut ve konvelesan dönemde alınan serumlarda, IgG'nin dört kat artışıyla tespit edilmiştir (Burt ve ark., 1994). Bununla birlikte, antikor seviyeleri hastalığın yaklaşık altıncı gününden itibaren mevcut hale geldiğinden, ELISA testi enfeksiyonun başlangıç aşamasının tespitinde etkili olmamaktadır. Spesifik IgM antikor, enfeksiyonun başlangıcından yaklaşık 4 ay sonra serumda saptanamayan seviyelere düşmektedir; ancak IgG birkaç yıl boyunca tespit edilebilir düzeyde kalmaktadır. Öte yandan, KKKAH hastalığından ölen bireylerde, ölçülebilir düzeyde antikor yanıtı oluşmayabilir ve bununla birlikte tersine transkriptaz PZR (RT-PZR) veya virüsün izolasyonu yoluyla tanı konulabilir (Mardani ve ark., 2007). Viral antijenler ELISA testi ile de belirlenebilmektedir (Saijo ve ark., 2004). Bu yöntem PZR'den daha az duyarlı olmasına rağmen, KKKAH sahip kişilerin akut dönemdeki serumlarında virüsün nükleoproteinini tespit edebilmektedir. Bununla birlikte, bu yöntem, özellikle RT-PZR testi uygulanamayan laboratuvarlarda KKKAH'nin akut aşamasının teşhisinde faydalı olabilmektedir. Çok sık olmamasına rağmen, KKKAH virüsü ile aynı ailede yer alan diğer nairovirüslerle (Hazara virüsü, Nairobi koyun hastalığı virüsü, Dugbe virüsü vb.) ELISA'da çapraz reaktivite bildirilmiştir (Zeller, 2007).

Gerçek zamanlı PZR, KKKAH virüsünün tanımlanması için spesifik, hassas ve hızlı bir yöntemdir (İbrahim ve ark., 2011). Genellikle ters transkripsiyon adımını spesifik amplifikasyonla birleştirerek kontaminasyon riski en aza indirilmektedir (Drosten ve ark., 2002). Ayrıca, otomatize gerçek zamanlı analizler daha yüksek hassasiyete ve özgüllüğe, daha düşük bir kontaminasyon oranına sahiptir ve geleneksel RT-PZR'den daha hızlıdır (Atkinson ve ark., 2012). Virüsün izolasyonu uzun süren (2-5 gün), duyarlılığın az olduğu ve yalnızca virüsün yüksek konsantrasyonlarını tespit edebilen bir yöntem olduğu için uygulanması sınırlıdır. Ayrıca bu yöntem, çoğu bölgede bulunmayan bir BSL-4 laboratuvarında çalışmayı gerektirmektedir (Shepherd ve ark., 1986).

2.7. Tedavi

2.7.1. Destekleyici Tedaviler

KKKA hastası için destekleyici tedavi, sıvı ve elektrolit dengesinin korunması, yeterli oksijen seviyesini korumak için ventilasyon desteği ve hafif sedasyonu içermektedir. Hastalığın şiddetine bağlı olarak kişiler, eritrosit, trombosit ve taze donmuş plazma transfüzyonu gibi hemodinamik desteğe de ihtiyaç duyabilirler. Tam kan sayımı sonucuna bağlı olarak kan replasman tedavisi uygulamak, şiddetli KKKAH vakalarında mevcut bakım standardının bir bileşenidir (Jabbari ve ark., 2012).

2.7.2. Ribavirin

Ribavirin (1-(β -D-Ribofuranosil)-1H-1,2,4-triazol-3-karboksamid), DNA ve RNA virüslerinin neden olduğu çeşitli enfeksiyonların tedavisi için kullanılan küçük moleküllü bir ilaçtır (Mendoza ve ark., 2018). Lassa virüs enfeksiyonunun neden olduğu hemorajik ateş tedavisinde de etkili olduğunu göstermiştir (McCormick ve ark., 1986). 1970'lerde sentezlenen ribavirin, viral polimerazlara bağlanarak viral transkripsiyonu doğrudan inhibe edebilen veya yeni viral RNA genomlarına dahil olarak viral mutageneze neden olan bir purin nükleozid analogudur (Mendoza ve ark., 2018). KKKAH virüsü, *in vitro* suşa-bağlı olarak ribavirine duyarlı olduğu bulunmuştur (Watts ve ark., 1989). KKKAH virüsü IbAr 10200 (Nijerya), SPU 128/81 (Güney Afrika) ve HY-13 (Çin), 4-6 μ g/ml ribavirine karşı oldukça duyarlı; UG 3011 (Uganda), AP-92 (Yunanistan) ve SPU 41/84 (Güney Afrika) 9 -16 μ g/ml ribavirine karşı daha az duyarlı bulunmuştur (Watts ve ark., 1989).

DSÖ ve CDC, KKKAH tedavisinde ribavirin kullanımını teşvik etmesine rağmen, insanlardaki KKKAH vakalarında ribavirinin etkinliği tartışmalıdır. Terapötik olarak ribavirinin kullanıldığı İran'da yapılan bir çalışmada, şüpheli ve konfirme KKKAH vakalarında oral ribavirinin etkinliği sırasıyla %34 ve %80 olarak bulunmuştur (Mardani ve ark, 2003). Ergönül ve ark. (2004), yaptıkları bir çalışmada 8 KKKA hastasına ortalama 5,5 gün içerisinde oral ribavirin verildiğinde, hastalarının tamamının iyileştiği gözlenmiştir. Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyöz Hastalıklar ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği'nde 2004 ve 2011 yılları arasında yatan KKKAH'na sahip orta dereceli hastalarda ribavirinin vaka ölüm oranını

azaltmada etkili olduğu bulunmuştur (Dokuzoğuz ve ark., 2013). Buna karşın, günümüzde yapılan çalışmaların çoğu, ribavirinin KKKAH tedavisinde etkili olmadığı sonucunu desteklemektedir. Bir randomize kontrollü çalışma ve yedi gözlemsel çalışma için yapılan bir meta-analiz, ribavirinin KKKA hastalarında sağkalımı arttırmadığını ve önemli klinik bir fayda sağlamadığını göstermiştir (Aşçıoğlu ve ark., 2011). Diğer çalışmalarda, KKKA hastaları arasında oral ribavirin tedavisi alanlarla tedavi almayan hastalar kıyaslandığında, viral yük ve hastalığın ilerlemesi açısından önemli bir fark sağlanamamış; ayrıca sağkalım oranlarını da artmamıştır (Mendoza ve ark., 2018). KKKAH tedavisi için uygulanan ribavirinin etkinliğindeki tutarsızlıklar, semptomlar görüldüğünde uygulanan farklı tedaviler ya da destekleyici tedavilerin uygulanması gibi birçok faktörün bir sonucu oluşabileceği düşünülmektedir. KKKAH tedavisinde ribavirinin yararını doğrulamak için daha büyük örneklem büyüklüğüne sahip randomize kontrollü çalışmalar gerekmektedir.

2.7.3. Metilprednizolon

Metilprednizolon, artrit ve bronşit gibi iltihabi hastalıkların yanı sıra sistemik lupus eritematozus ve multipl skleroz gibi otoimmün hastalıkların tedavisi için lisans almış sentetik bir kortikosteroiddir (Sloka ve ark., 2005). Metilprednizolon, bağışıklık sistemini modüle eden ve kan bariyerinin bozulmasının restorasyonuna yardımcı olan genlerin ekspresyonunu aktive eden hücre içi glukokortikoid reseptörlerini bağlar. Metilprednizolon, insan deneylerinde, Koronavirüs ile ilişkili Şiddetli Akut Solunum Yetmezliği Sendromu (SARS) ve Dang virüsü gibi viral rahatsızlıklar açısından değerlendirilmiştir. Bugüne kadar, metilprednizolonun KKKAH virüsüne karşı etkinliği hayvan çalışmalarında değerlendirilmemiştir, ancak insanlarda diğer destekleyici tedavilerle birlikte kullanılmıştır (Mendoza ve ark., 2018).

Yüksek doz metilprednizolon (HDMP) KKKAH'nın hemorajik aşamasında, çocuklara uygulandığında ateşin düşürülmesinde ve trombosit sayısının arttırılmasında etkinlik göstermiştir. HDMP'nin enfeksiyonun hematolojik etkilerini telafi etmek için gereken kan ürünlerinin miktarını azalttığı ortaya çıkmıştır. Bununla birlikte, HDMP'nin etkinliği, tedaviden önce intravenöz immünoglobulin (IVIG) ve/veya granülosit koloni stimüle edici faktörün (G-CSF) uygulandığı durumlarda yetersiz kalmaktadır (Dilber ve ark., 2010).

2.7.4. Konvelesan Kan Ürünleri

Konveselan kan ürünlerinin KKKAH virüsü tehdidine karşı etkinliği henüz hayvan çalışmalarında değerlendirilmemesine rağmen, yeni enfekte olmuş hastaları tedavi etmek için konvelesan KKKA hastalarından toplanan hiperimmün serum kullanımı 1945 gibi erken bir zamanda önerilmiştir (Keshtkar-Jahromi ve ark., 2011). Konvelesan serumun intramüsküler uygulaması, ilk kez 1967'de KKKA hastalarını tedavi etmek için kullanılmış, ancak etkinliğinin zayıf olduğu gözlenmiştir. Daha sonra, 1970 yılında 61 hastaya, semptomların başlangıcından sonraki 4 gün boyunca günde bir ya da iki kez intramüsküler olarak 80 ml konvelesan serum uygulanmış; ancak tedavi uygulananların uygulanmayan hastalara göre istatistiksel olarak daha iyi sonuçlar sergilemediği görülmüştür (Leshchinskaya ve ark., 1970). Dubai'de nozokomiyal KKKAH salgını sırasında 300 ml konvelesan serum uygulanan bir hastanın tamamen iyileştiği ve iyileşme süresinin diğer hastalara kıyasla daha kısa olduğu tespit edilmiştir (Suleiman ve ark., 1980). 1985'teki Güney Afrika KKKAH salgınında, 2 doz hiperimmün serum transfüzyonu ile tedavi edilen 5 KKKA hastasının enfeksiyondan kurtulduğu; beş kişiden dördünde, ilk doz uygulamasından sonra semptomların iyileşme gösterdiği bildirilmiştir. Sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen, bu çalışma ile transfüzyonların hastalık sonuçlarını iyi yönde etkileyebileceğini göstermiştir (Van Eeden ve ark., 1985).

2.7.5. Monoklonal Antikor Tedavisi

İlk olarak 1987'de KKKAH virüsünü tanımlamak için geliştirilen ve virüsün Gn ve/veya Gc yüzey glikoproteinlerini hedef alan monoklonal antikorlar şu anda KKKAH için bir tedavi seçeneği olarak değerlendirilmektedir (Blackburn ve ark., 1987). *In vitro*, Gc'ye özgü, fakat Gn'e özgü olmayan monoklonal antikorların, SW-13 hücrelerinde KKKAH virüsü enfeksiyonunu nötralize edebildiği gösterilmiştir (Blaising ve ark., 2013). Yeni doğan farelere letal KKKAH virüsü eprüvasyonundan 24 saat önce anti-Gc monoklonal antikorunu uygulandığında virüse karşı %100'e kadar koruma sağlamıştır; bununla birlikte, KKKAH virüsü enfeksiyonundan 24 saat sonra uygulandığında sadece %70'e kadar koruma sağladığı bulunmuştur. Buna karşılık, enfeksiyondan 24 saat sonra farelere anti-Gn monoklonal antikorunu uygulandığında, %90'a kadar koruma sağlandığı görülmüştür. Bu durum antikora bağımlı hücre sitotoksitesisi veya kompleman aracılı

hücre lizisi gibi diğer mekanizmaların virüse karşı korumada bir rol oynayabileceğini öne sürmüştür. Bu ve diğer antikor temelli terapötiklerin etkinliğini IFNAR-/- ve STAT 1 KO fareleri gibi insan hastalıklarının daha iyi araştırılmasını sağlayan bir hayvan modelinde değerlendirmek daha iyi sonuç alınmasını sağlayacaktır (Bertolotti-ciarlet ve ark., 2005).

2.7.6. Arbidol and Favipiravir (T-705)

Arbidol, klatrin aracılı endositozu kesintiye uğratan ve böylece viral girişi engelleyen geniş spektrumlu bir antiviraldir (Blaising ve ark., 2013). Arbidol insanlarda influenza virüs enfeksiyonunu tedavi etmek için kullanılmıştır ve *in vitro* hepatit C virüsü gibi virüslerde virüs girişini ve replikasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Pécheur ve ark., 2016). Favipiravir (T-705; 6-floro-3-hidroksi-2-pirazinkarboksamid), insanlarda influenza virüsü enfeksiyonlarına karşı etkinlik sergileyen, geniş spektrumlu bir seçici viral RNA polimeraz inhibitörüdür (Furuta ve ark., 2013). Bir çalışmada hem arbidol hem de favipiravirin *in vivo* virüs replikasyonunu ≥ 3 log baskıladığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte letal KKKAH virüsü epruvasyonundan 1 saat önce IFNAR-/- farelere 150 mg/ (kg gün) olacak şekilde bir doz arbidol verildiğinde, farelerde koruma veya ölüm süresini uzatma gibi bir etki göstermemiştir. Buna karşılık, enfeksiyondan 2 gün sonra 300 mg/ (kg gün) olacak şekilde bir doz favipiravir uygulanan fareler, letal KKKAH virüsü epruvasyonuna karşı korunmuş ve kan veya organlarda klinik bir hastalık veya virüs replikasyonu geliştirmemiştir (Oestereich ve ark., 2014).

2.8. Korunma ve Kontrol

Bireysel olarak, kene ısırıklarına karşı etkili kişisel koruyucu önlemlerin alınması ve hayvanlarla etkileşimin sınırlandırılması, enfeksiyonu önlemenin en iyi yoludur. Permetrin kaplı kıyafet ve ekipman kullanılması, pantolonların botlara veya çorapların içine sokulması, kene tanımlanmasını kolaylaştırmak için açık renkli kıyafetlerin kullanılması, cilde uygulanabilen böcek kovucu maddeler ve günlük cilt muayenesi vektör kenelerden korunmanın temel ilkeleridir. Sağlık kurumlarında nazokomiyal bulaş riski vardır ve hasta bakım alanlarında ve laboratuvarında uygun önlemler alınmalıdır. Şüpheli hasta özel bir odaya yerleştirilmeli ve özellikle öksürme, kusma veya büyük damlacıklı aerosoller üreten diğer aktiviteler meydana gelirse negatif basınç solunum izolasyonu düşünülmelidir. Hastanın odasına girenlerin eldiven ve önlük giymesi ve bir

metreden fazla hastaya yaklaşanların kan veya diğer vücut sıvılarıyla temasını önlemek için cerrahi maske ve gözlük kullanması gerekir. Nazokomiyal bulaş riski ağır hastalarda daha fazladır. Risk altındaki büyük insan grupları için (örneğin bir mülteci kampında), mevsimsel riskin arttığı dönemlerde (ilkbaharın sonlarında) bölgesel akarazit uygulaması düşünülebilir (Mardani ve Jahromi, 2007).

2.8.1. Aşılama

Viral hastalıklara karşı korunmada, aşılama çok önemlidir. Ancak, KKKAH'ye karşı geliştirilen güvenilir ve FDA tarafından onaylanmış bir aşı mevcut değildir. KKKAH virüs enfeksiyonu için hayvan modellerinin geliştirilmesi, yeni geliştirilen aşı adaylarının virüse karşı korunmalarının değerlendirilmesine olanak sağlamıştır. İnsanlarda KKKAH virüsü enfeksiyonuna karşı koruma için optimal olan spesifik immün yanıtların belirlenmesi, gelecekte geliştirilecek aşılar için önemli taşımaktadır (Mendoza ve ark., 2018).

1970 yılında KKKAH'na karşı geliştirilen bir Sovyet aşısında, yeni doğan fare beyinde kültüre edilen KKKAH virüs daha sonra kloroform ile inaktive edilip, 58 °C'de ısıtılmış ve Al (OH)₃ içerisine absorbe edilmiştir. Bu aşı Bulgaristan'da lisanslanmıştır ve 1974'ten beri endemik bölgelerde yaşayan tıbbi personel, tarım işçileri ve askeri personel için kullanılmaktadır. Mevcut Bulgar aşısı, 1981'de bir hastadan izole KKKAH virüsü V42/81 suşunu kullanmaktadır (Papa ve ark., 2014). Bulgaristan Sağlık Bakanlığı'ndan elde edilen veriler, 22 yıllık süre içinde bildirilen KKKAH vakalarında dört kat azalma olduğunu göstermektedir (Christova ve ark., 2010). Bununla birlikte veriler, bu azalmanın mutlaka aşının bir sonucu olmayabileceğini, bölgedeki kene maruziyetini azaltan çok sayıda faktörden kaynaklanabileceğini göstermektedir. (Papa ve ark., 2011). Ayrıca, komşu ülkelerde aynı zaman diliminde KKKAH'nin görülme sıklığına ilişkin veri eksikliğinin oluşu, o tarihlerde uygulanan aşı etkinliğinin analizini sorgulatmaktadır (Keshtkar-Jahromi ve ark., 2011). 2012 yılında, Bulgar aşısı ile yapılan aşılama sonrası sağlıklı bireylerde hücresel ve humoral immün yanıtın ilk ayrıntılı analizi yapılmıştır. Aşılanmış bireylerin anti-KKKAHV immün yanıtını geliştirdiği IFN- γ ELISpot ve nötralizasyon deneyler ile belirlenmesine rağmen, immün yanıtların düşük olduğu ve immün yanıtları arttırmak için 3 doz aşı uygulanması gerektirdiğini göstermiştir (Mousavi-Jazi ve ark., 2012). Fare beyinde üretilen aşılar,

miyelin bazik proteini indükleyerek olası otoimmün ve alerjik tepkiler meydana getirmeleri nedeniyle çeşitli problemler ortaya çıkarmaktadır ve uluslararası yasal düzenleme onayı almaları pek olası gözükmemektedir (Hemachudha ve ark., 1987)

Çanakoğlu ve ark. (2015) yaptığı bir çalışmada, IFN- α/β -reseptörü olmayan farelerin hücre kültürü temelli bir aşı ile immünizasyonunun, yüksek dozda (1000 PPFU) homolog bir Turkey-Kelkit06 KKKAH virüsü suşu ile epruvasyon sonrası farelerde önemli bir koruma sağladığını göstermiştir. 5, 20 veya 40 μ g'lık dozlarla aşılardan hayvanlar sırasıyla %60, %80 ve %80 oranında koruma göstermiştir. İlk immünizasyondan sonra tüm hayvanlarda KKKAH virüsüne özgü antikorlar ve ikinci immünizasyondan sonra nötralizan antikorlar saptanmıştır; bu da nötralizan antikorların üretilmesi için en az iki immünizasyonun gerekli olduğunu düşündürmüştür. Aşılardan hayvanlardan elde edilen kan, karaciğer ve dalağın enfeksiyöz viral titreleri, aşılammamış hayvanlardan 3-4 log daha düşük çıkmıştır.

Yapısal KKKAH virüsü glikoproteinleri olan Gn ve Gc'nin ektomainlerini içeren bir alt ünite aşısını geliştirmek için bir Drosophila insekt hücre temelli ekspresyon sistemi kullanılmıştır. Aşı, primer boost rejiminde uygulandığında, STAT-1 knockout farelerde KKKAH virüsü nötralizan antikorları indüklenmiştir. Bununla birlikte, aşılardan 42 gün sonra KKKAH virüsü IbAr10200 suşu ile intraperitoneal epruvasyon yapıldığında STAT-1 knockout fare modelinde aşının koruma sağlamadığı görülmüştür (Kortekaas ve ark., 2015) Bu çalışmanın sonuçları, KKKAH virüsü nötralizan antikorları ile hastalıktan korunma arasında bir korelasyonun olmadığını öne sürse de diğer hayvan modellerinde virüs nötralizasyonunun rolünü değerlendirmek için gelecekteki çalışmalarda, bu durumun modele özgü bir fenomen mi yoksa enfeksiyon yanıtını taklit eden bir özellik mi olduğunu belirlemek gerekmektedir.

KKKAH virüsü glikoproteinlerini (GP) eksprese etmek için yakın zamanda attenüe poksvirüs vektörü, Modiye çiçek hastalığı virüsü Ankara (MVA) kullanan bir rekombinant aşı geliştirilmiştir. Aşı, MVA-GP olarak isimlendirilmiş ve hem IFNAR-/- farelerde hem de vahşi tip kontrol farelerinde KKKAH virüsü GP' ye özgü IFN- γ hücresel immun yanıtı ve anti-KKKAHV GP antikorlarını indüklemiştir. Primer aşılardan 28 gün sonra IbAr10200 suşu ile letal epruvasyon sonrasında IFNAR-/- fare modelinde %100 koruma sağlanmıştır (Buttigieg ve ark., 2014). Diğer çalışmalar, IFNAR-/- farelerde MVA-GP aşısı tarafından sağlanan korumanın hem hücresel hem de

hümmoral immun yanıtı içerdiğini göstermiştir (Dowall ve ark., 2016). Gelecekteki araştırmalar, insan vakalarında KKKAH virüsüne karşı korunma için bu yanıtlardan birinin veya ikisinin gerekli olup olmadığını değerlendirmelidir.

KKKAH virüsü M segmentinin açık okuma çerçevesini kodlayan bir rekombinant DNA aşısı, pWRG7077 memeli ekspresyon vektörü kullanılarak geliştirilmiştir. Aşı, 3 hafta aralıklarla üç kez uygulandığında IFNAR-/- farelerde virüse özgü antikorların ve nötralizan antikorların üretimini indüklemiştir. Aşı, IFNAR-/- fare modelinde final boost aşılamaadan 4 hafta sonra yapılan IbAr10200 suşu ile intraperitoneal epruvasyonda farelerde %71 koruma sağlamıştır (Garrison ve ark., 2017). Bu çalışmada, anti-KKKAHV glikoprotein antikor yanıtı ve sağkalım arasında doğrudan bir korelasyon bulunmadığından, diğer KKKAH virüsü proteinlerini hedef alan antikorların ve/veya hümmesel immun yanıtın aşı aracılı korumaya dahil olabileceğini düşündürmektedir.

Hinkula ve ark. (2017), IFNAR-/- fare modelinde, KKKAH virüsü Gn, Gc ve N'in ubiquitin bağlı versiyonunu kodlayan bir DNA aşısı ve transkripsiyonel olarak kompetent virüs benzeri partiküller (tc-VLP'ler) kullanarak iki yeni KKKAH aşı adayını geliştirmişlerdir. Bu çalışmada, nötralizan antikor oluşumuna odaklanan çoğu araştırmanın aksine, aşılamaadan sonra oluşan hem hümmoral hem de hümmesel immün yanıt araştırılmış ve DNA aşısı ile letal KKKAH virüsü epruvasyonuna karşı %100 etkili bir koruyucu bağışıklık sağlandığı görülmüştür. Hem DNA hem de tc-VLP kullanılarak immünizasyon yapılan grupta %80 korunma sağlanırken, sadece tc-VLP ile aşılama yapılan grupta %40 sağkalım oranı saptanmıştır. KKKAH virüsü IbAr10200 suşu ile epruvasyondan 10 gün sonra, DNA plazmidi ile aşılanan birinci gruptan ve VLP ile birlikte DNA plazmidi ile aşılanan ikinci gruptan toplanan serumlarda yüksek oranda IgG ve nötralizan antikor titresi saptanmıştır. Aynı zamanda bu gruplarda, Th1 sitokin (IFN- γ , IL-2, IL-12p70, TNF- α) ve Th2 sitokin yanıtının (IL-4, IL-5, GM-CSF) negatif kontrol gruplarına göre oldukça yüksek olduğu saptanmıştır. Ayrıca KKKAH virüsü suşları arasında yüksek oranda korunan yeni lineer B hümmeli epitop bölgeleri tanımlanmıştır. Ağırlıklı olarak Th1 tipi bir immün yanıtın, KKKAH virüsüne karşı en etkili koruyucu immüniteyi sağladığını gösterilmiş; bununla birlikte, hayatta kalan immünize farelerde yüksek nötralizan antikor titresi saptanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasının tüm deneyleri Erciyes Üniversitesi Aşı Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi (ERAGEM) bünyesinde bulunan BSL2/BSL3/ABSL3 Laboratuvarları'nda gerçekleştirilmiştir.

3.1. KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit 06 Suşu Yapısal Olmayan S (NSs) Proteininin DNA Sekansının ve Amino asit Diziliminin Belirlenmesi

Bu amaçla, KKKAH virüsü Turkey-Kelkit06 suşu (GenBank: GQ337053.1) S segmentinde yer alan NSs geninin DNA sekansının belirlenmesi için ORFFinder biyoinformatik programı kullanıldı. Belirlenen 477 nükleotitlik NSs geni DNA sekansı ExPASy Translate programı kullanılarak, NSs proteinine ait 158 aminoasitlik protein dizilimi belirlendi.

3.2. KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit06 Suşu NSs Geninin pCOLD TF Plazmid Vektörüne Klonlanması

KKKAH virüsü Turkey-Kelkit 06 Suşu NSs proteinin prokaryotik sistemde eksprese edilebilmesi için pCOLD TF vektörü seçildi ve 477 nükleotidlik KKKAH virüsü NSs geni plazmid içerisine yerleştirildi; elde edilen plazmid pCOLD TF-NSs olarak adlandırıldı.

3.2.1. pCOLD TF plazmid DNA vektörünün *E.coli* JM109 Kompetan Hücrelerine Transformasyonu

3.2.1.1. Materyal

- Su banyosu (Mommert, WNB14)
- Otoklav (Hirayama-Hiclave HVE-85L)

- Etüv (**Memmert**)
- Çalkalayıcı inkübatör (**IKA KS 4000i**)
- Sarf malzemeler (Petri, Erlen mayer)
- 10-100-1000 µl'lik Mikropipetler (**Gilson**)
- *E. coli* JM109 kimyasal kompetan hücre (**Promega, P9751**)
- pCOLD TF plazmid DNA (**Takara, 3365**)
- Ampisilin (**Sigma, A0166**)
- **LB (Luria-Bertani) Sıvı Besiyeri**
- %1 Tripton (**Merck, 107213**)
- %0,5 Maya özütü (**Merck, 103753**)
- %1 NaCl (**Sigma, S3014**)
- 1 lt distile su
- **LB (Luria-Bertani) Katı Besiyeri**
- %1 Tripton (**Merck, 107213**)
- %0,5 Maya özütü (**Merck, 103753**)
- %1 NaCl (**Sigma, S3014**)
- %1.5 Agar (**Merck,101614**)
- 1 l distile su

3.2.1.2. Metot

E. coli JM109 kimyasal kompetan hücrelerden bir tane (100 µl) alınarak -80 °C'den çıkartıldı ve hücreler buz üzerinde çözdürüldü. 10 ng/µl pCOLD TF plazmid DNA kompetan hücrelere bırakıldı; pipetasyon yapılmadan birkaç kez parmakla yavaşça vurularak karıştırma işlemi tamamlandı. Hücreler buz üzerinde 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda hücreler 42°C'ye ısıtılmış su banyosunda 45 sn bekletildi ve süre sonunda tekrar buza alınarak 5 dakika inkübe edildi. Hücrelerin üzerine 200 µl LB sıvı besiyeri eklendi. 37 °C'de 225 rpm'deki çalkalayıcıda 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra 10,30,50,100 µl hücre süspansiyonundan alındı ve 100 µg/ml ampisilin ile hazırlanmış LB katı besi yerlerine ayrı ayrı ekim yapıldı ve petriler 37 °C'deki etüvde bir gece bekletildi. Ertesi gün katı besiyerinde büyüyen hücrelerden plazmid DNA ekstraksiyonu için tek koloni seçildi.

3.2.2. pCOLD TF plazmid DNA Ekstraksiyonu

3.2.2.1. Materyal

- Otoklav (**Hirayama-Hiclave HVE-85L**)
- Çalkalayıcı inkübatör (**IKA KS 4000i**)
- Santrifüj (**Hettich, Mikro220R**)
- NanoDrop (**Thermo Scientific,2000c**)
- Sarf malzemeler (Petri, Erlen mayer, falkon, mikrosantrifüj tüpü)
- 10-100-1000 µl'lik Mikropipetler (**Gilson**)
- Ampisilin (**Sigma, A0166**)
- Plazmid DNA Ekstraksiyon Kiti (**Qiagen, 12145**)
- Etanol (**Sigma,34870**)
- İzopropanol (**Merck, 109634**)
- Agaroz (**Fisherbrand, 3153131**)
- Etidyum bromür (**Promega, H5041**)
- 50X TAE (Tris-Asetat-EDTA) Tampon Çözeltisi
242g Tris (**Merck, 108387**)
57.1 ml Asetik asit (**Merck, 100063**)
0.5 M EDTA, pH 8.0 (**Bio-Rad, 161-0729**)
- 1X TE Tampon Çözeltisi
1 mM EDTA, pH 8.0 (**Bio-Rad, 161-0729**)
10 mM Tris, pH 8.0 (**Merck, 108387**)
- **LB (Luria-Bertani) Sıvı Besiyeri**
%1 Tripton (**Merck, 107213**)
%0,5 Maya özütü (**Merck, 103753**)
%1 NaCl (**Sigma, S3014**)
1 l distile su

3.2.2.2. Metot

pCOLD TF plazmid DNA'nın *E. coli* JM109 hücrelerine transforme edildikten sonra elde edilen bakteriyel kültürden tek koloni seçildi ve 5 ml 100 µg/ml ampisilin içeren falkon içerisinde 37 °C'de 225 rpm'deki çalkalayıcıda 8-10 saat inkübe edildi. Bu

başlangıç kültüründen 2 ml alınıp, aynı konsantrasyonda ampisilin içeren 100 ml hacmindeki LB sıvı besiyerine eklendi; kültür 37 °C’de 225 rpm’deki çalkalayıcıda bir gece inkübasyona bırakıldı. Bir gece önce kültüre alınmış bakteriler 6000rpm, 4°C’de 30 dk santrifüj edilerek çöktürüldü. Bakteriyel pellet 4ml P1 Buffer ile resüspanse edildi. 4ml P2 Buffer eklendi ve tüpün kapağı sıkıca kapatılıp, alt üst edilerek kuvvetlice 4-6 kere karıştırıldı ve oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi. Önceden soğutulmuş 4 ml P3 buffer ilave edilip karıştırıldıktan sonra 15 dk buzda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından 6000rpm, 4°C’de 30 dk santrifüj edildi. Bu sırada Qiagen kolon 4 ml QBT buffer ile yıkanarak hazır hale getirildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant kolondan geçirildi. Kolon 2 kere 10’ar ml QC Buffer ile yıkandı. Plazmid DNA, 5 ml QF Buffer ile kolondan alındı. Oda sıcaklığındaki 3,5 ml izopropanol ilave edilerek DNA’nın presipite olması sağlandı ve hemen 17000 rpm’de, 4°C’de 30 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant pellete dokunmadan dikkatlice döküldü. DNA pelleti 1 ml oda sıcaklığındaki %70 etanol ile yıkandı ve 14000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi, süpernatant atıldı. Pelletin 5-10 dk kuruması için beklendi. Pellet uygun hacimde TE tampon çözeltisi ile çözüldü ve plazmid DNA miktarı Nanodrop’ta ölçülerek belirlendi. Daha sonra plazmid DNA agaroz jel elektroforezi ile görüntüledi.

3.2.3. KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit06 Suşu NSs Geninin PZR Yöntemi ile Çoğaltılması

3.2.3.1. Materyal

- Thermal cycler cihazı (**Applied Biosystem GeneAmp PCR system 9700**)
- PZR tüpleri (**Molecular BioProducts, 3412A**)
- 10-100-1000 µl’lik Mikropipetler (**Gilson**)
- Phusion High Fidelity PCR Kit (**Thermo Scientific, F5538**)
- DNaz/RNaz içermeyen steril distile su (**Gibco, 10977015**)
- Agaroz (**Fisherbrand, 3153131**)
- Etidyum bromür (**Promega, H5041**)
- 50X TAE (Tris-Asetat-EDTA) Tampon Çözeltisi
242g Tris (**Merck, 108387**)
57.1 ml Asetik asit (**Merck,**
0.5 M EDTA, pH 8.0 (**Bio-Rad, 161-0729**)

3.2.3.2. Metot

2 µl KKKAH pozitif serum örneklerinin RNA'sından elde edilen cDNA kalıp olarak kullanılarak, her bir reaksiyon için 0.2 ml PZR tüplerine 10 µl 5X phusion HF buffer 1 µl 10 mM dNTP, 2 µl 20 pMol forward primer, 2 µl 20 pMol reverse primer (**Tablo 1**), 32,5 µl steril distile su ve 0.5 µl Phusion DNA polimeraz enzimi konularak reaksiyon hacmi 50 µl'e tamamlandı. Tüpler thermal cycler cihazına yerleştirildi. PZR siklus adımları; **Tablo 2'de** belirtildiği şekilde ayarlandı. Elde edilen PZR ürünleri %1 agaroz jelde agaroz jel elektroforezi ile görüntüledi. Agaroz jelin hazırlanması için 50 ml 1X TAE tampon çözeltisi içinde 0,5 gr agaroz eklendi ve mikrodalga fırında 3 dakika çözdürüldükten sonra jel soğutuldu. Soğuma işlemi jel donmadan önce sonlandırıldı ve 50 ml için 3 µl etidyum bromür jele karıştırıldı; jel örneklerin yükleneceği taraklarında içinde bulunduğu kasete döküldü. Jel donduktan sonra elektroforez tankı, jelin üzeri kapanacak şekilde 1X TAE tampon çözeltisi ile dolduruldu. PZR ürünleri jeldeki kuyucuklara yüklendi ve 150 V'da 30 dk yürütüldükten sonra UV ışık altında görüntüleme yapıldı.

Tablo 1. NSs genini PZR ile çoğaltmak için kullanılan primerler

Primer	DNA Sekansı
NSs Forward Primer	GCCTCGAGCCAACAGGCTGCTCTTAAG
NSs Reverse Primer	GCCCTAGGCGGTGGATGTGCTTAGGGAGGTTTGTATC

Tablo 2. PZR için ayarlanan zaman ve sıcaklık göstergeleri

Basamak	Zaman	Sıcaklık	Siklus
Başlangıç Denatürasyonu	30 sn	98°C	1X
Denatürasyon	10 sn	98°C	
Bağlanma	20 sn	55°C	30X
Uzatma	45 sn	72°C	
Final Uzatma	30 dk	72°C	1X

3.2.4. NSs Geni PZR Ürününün Agaroz Jelden Ekstraksiyonu ve Pürifikasyonu

3.2.4.1. Materyal

- Isıtıcı blok (**Benchmark**)

- Hassas tartı (**Ohaus, Adventure Pro AV4102C**)
- Vorteks (**Heidolph, Reax top**)
- Santrifüj (**Hettich Mikro120,1204**)
- 10-100-1000 µl'lik Mikropipetler (**Gilson**)
- Mikrosantrifüj tüpleri (**Starlab, S1615-5500**)
- Bistüri (**Broche**)
- Jel Ekstraksiyon Kiti (**Qiagen, 28706**)
- İzopropanol (**Merck, 109634**)
- Agaroz (**Fisherbrand, 3153131**)
- Etidyum bromür (**Promega, H5041**)
- 50X TAE (Tris-Asetat-EDTA) Tampon Çözeltisi
242g Tris (**Merck, 108387**)
57.1 ml Asetik asit (**Merck,**
0.5 M EDTA, pH 8.0 (**Bio-Rad, 161-0729**)
- 1X TE Tampon Çözeltisi
1 mM EDTA, pH 8.0 (**Bio-Rad, 161-0729**)
10 mM Tris, pH 8.0 (**Merck, 108387**)

3.2.4.2. Metot

PZR yöntemi ile çoğaltılıp agaroz jelde yürütülen NSs DNA fragmenti UV ışığı altında steril bistüri yardımı ile kesilerek jelden ayrıldı. DNA fragmentini içeren jel dilimi küçük parçalararak ayrılarak renksiz bir mikrosantrifüj tüpü içerisine alındı ve hassas tartıda tartıldı. Jel hacminin 3 katı hacimde Buffer QG eklendi. Jel tamamen eriyene kadar tüp 50°C'de inkübe edildi. Jelin çözülmesine yardımcı olmak için tüp 2-3 dakikada bir vortekslendi. Başlangıçtaki jel hacmi kadar izopropanol eklendi ve karıştırıldı. 2 ml'lik koleksiyon tüpü ile QIAquick kolonu kit içerisinden çıkarıldı. DNA'yı bağlamak için, örnek QIAquick kolona konuldu ve 1 dk 13.000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra koleksiyon tüpünde kalan kısım döküldü. Yıkama için, 750 µl Buffer PE QIAquick kolona eklendi ve 1 dk 13.000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra koleksiyon tüpünde kalan kısım döküldü ve tekrar 1 dk 13.000 rpm'de santrifüj edildi. QIAquick kolon steril bir mikrosantrifüj tüpüne dikkatlice konuldu. DNA'yı elüe etmek için, 20 µl TE tamponu QIAquick membranın merkezine

bırakıldı ve 3 dk beklendi; ardından 1 dk 13.000 rpm’de santrifüj edilir. Pürifiye edilen DNA’nın konsantrasyonunu belirlemek için Nanodrop kullanıldı.

3.2.5. pCOLD TF plazmid DNA ve NSs Geninin Restriksiyon Enzimleriyle Kesilmesi

3.2.5.1. Materyal

- Etüv (**Memmert**)
- 10-100-1000 µl’lik Mikropipetler (**Gilson**)
- PZR tüpleri (**Molecular BioProducts, 3412A**)
- DNaz/RNaz içermeyen steril distile su (**Gibco, 10977015**)
- 2X Tango Buffer (**Thermo Scientific, ER0695**)
- 10 U/µL *BamHI* (**Thermo Scientific, ER0055**)
- 10 U/µL *XhoI* (**Thermo Scientific, ER0695**)

3.2.5.2. Metot

Klonlama işlemi için pCOLD TF plazmid DNA ve jelden pürifiye edilen NSs geni *BamHI* ve *XhoI* restriksiyon kesim enzimleri ile çift kesim yapıldı. 1 µl *BamHI*, 1 µl *XhoI*, 4 µl 2X Tango Buffer 3 µg pCOLD TF plazmid DNA PZR tüplerine konuldu, hacim distile su ile 20 µl’ye tamamlandı. Diğer tüpe eşit hacimlerde bileşenler ve PZR ile çoğaltılıp jelden pürife edilen NSs DNA konuldu. Tüpler 37°C’deki etüvde 3 saat inkübe edildi. Kesimin kontrolü amacıyla plazmid DNA ve NSs jelde yürütüldü ve ligasyon için ürünler jelden pürifiye edildi.

3.2.6. pCOLD TF plazmid DNA ve NSs Geninin Ligasyonu

3.2.6.1. Materyal

- Etüv (**Memmert**)
- Thermal cycler cihazı (**Applied Biosystem GeneAmp PCR system 9700**)
- 10-100-1000 µl’lik Mikropipetler (**Gilson**)
- PZR tüpleri (**Molecular BioProducts, 3412A**)
- 10X T4 Ligaz Buffer (**NEB, B0202S**)
- 400000 U/ml T4 DNA Ligaz (**NEB, M0202S**)

- DNaz/RNaz içermeyen steril distile su (**Gibco, 10977015**)

3.2.5.2. Metot

Restriksiyon kesim enzimleri ile çift kesilmiş 50 ng pCOLD TF plazmid DNA ve 150 ng NSs geni 2 µl 10X T4 Ligaz Buffer, 1 µl T4 DNA Ligaz PZR tüpüne konuldu, hacim distile su ile 20 µl'ye tamamlandı. 16°C'deki Thermal cycler cihazında bir gece inkübe edilerek ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi. İnkübasyon işleminin ardından ligasyon miksiden 4 µl alınıp *E. coli* JM109 kimyasal kompetan hücrelerine transformasyon yapılarak ampisilin içeren katı besiyerine ekim işlemi gerçekleştirildi.

3.2.7. Koloni PZR ile Pozitif Klonların Belirlenmesi

3.2.7.1. Materyal

- Thermal cycler cihazı (**Applied Biosystem GeneAmp PCR system 9700**)
- PZR tüpleri (**Molecular BioProducts, 3412A**)
- 10-100-1000 µl'lik Mikropipetler (**Gilson**)
- High Fidelity PCR Kit (**Invitrogen, 11304-011**)
- DNaz/RNaz içermeyen steril distile su (**Gibco, 10977015**)
- Agaroz (**Fisherbrand, 3153131**)
- Etidyum bromür (**Promega, H5041**)
- 50X TAE (Tris-Asetat-EDTA) Tampon Çözeltisi
242g Tris (**Merck, 108387**)
57.1 ml Asetik asit (**Merck,100063**)
0.5 M EDTA, pH 8.0 (**Bio-Rad, 161-0729**)

3.2.7.2. Metot

Ligasyonun kontrolü için seçilen 10 koloninin her birinin test edilebilmesi için ayrı ayrı her tüpe 5 µl 10X High Fidelity PZR Buffer, 1 µl 50 mM MgSO₄, 2 µl 20pmol NSs forward primer, 2 µl 20pmol NSs reverse primer, 1 µl 10 mM dNTP karışımı konulup ve steril distile su ile reaksiyonun hacmi 25 µl'ye tamamlandı. Steril bir 10 µl lik pipet ucu yardımıyla koloni alındı ve reaksiyon tüpünün içine batırılıp birkaç kez karıştırılarak homojenizasyon sağlandı. Reaksiyon tüpleri thermal cycler cihazına yerleştirildi. 95°C'de 10 dakika bekletildi. 30 µl steril distile su içerisine 3 µl Platinum

Taq DNA polimeraz HF enzimi konulup yavaşça pipetasyon yapıldı. Sulandırılmış Taq polimerazdan 3 µl alınarak hazırlanan reaksiyon tüplerine eklendi ve pipetasyon yapıldı. Tüpler thermal cycler cihazına yerleştirildi. PZR siklus adımları; **Tablo 3'de** belirtildiği şekilde ayarlandı. Koloni PZR ürünleri agaroz jelde yürütülüp, UV ışık ile görüntü alındı.

Tablo 3. Koloni PZR için ayarlanan zaman ve sıcaklık göstergeleri

<i>Basamak</i>	<i>Zaman</i>	<i>Sıcaklık</i>	<i>Siklus</i>
Başlangıç Denatürasyonu	1 dk	95°C	1X
Denatürasyon	1 dk	95°C	
Bağlanma	1 dk	55°C	30X
Uzatma	1 dk	72°C	
Final Uzatma	7 dk	72°C	1X

3.2.8. pCOLD TF-NSs Plazmidinin *E. coli* C43 (DE3) Hücrelerine Transformasyonu

3.2.8.1. Materyal

- Su banyosu (**Memmert, WNB14**)
- Otoklav (**Hirayama-Hiclave HVE-85L**)
- Etüv (**Memmert**)
- Çalkalayıcı inkübatör (**IKA KS 4000i**)
- Sarf malzemeler (Petri, Erlen mayer)
- 10-100-1000 µl'lik Mikropipetler (**Gilson**)
- *E. coli* C43 (DE3) kimyasal kompetan hücre (**Lucigen, 60446-1**)
- Ampisilin (**Sigma, A0166**)
- **LB (Luria-Bertani) Sıvı Besiyeri**
%1 Tripton (**Merck, 107213**)
%0,5 Maya özütü (**Merck, 103753**)
%1 NaCl (**Sigma, S3014**)
1 lt distile su
- **LB (Luria-Bertani) Katı Besiyeri**
%1 Tripton (**Merck, 107213**)
%0,5 Maya özütü (**Merck, 103753**)

%1 NaCl (Sigma, S3014)

%1,5 Agar (Merck,101614)

1 lt distile su

3.2.8.2. Metot

Koloni PZR sonucu pozitif çıkan rekombinant pCOLD TF-NSs plazmidini içeren kolonilerden bir tanesi seçilip 5 ml LB100 µg/ml ampisilin içeren falkon içerisinde 37 °C'de 225 rpm'deki çalkalayıcıda 8-10 saat inkübe edildi. Bu başlangıç kültüründen 2 ml alınıp, aynı konsantrasyonda ampisilin içeren 100 ml hacmindeki LB sıvı besiyerine eklendi; kültür 37 °C'de 225 rpm'deki çalkalayıcıda bir gece inkübasyona bırakıldı. Bir gece kültüre edilen bakterilerden rekombinant plazmid DNA ekstraksiyonu yapıldı. Plazmidin NSs genini içerdiğini konfirme etmek amacıyla *XhoI* ve *BamHI* restriksiyon kesim enzimleri ile elde edilen plazmid DNA için çift kesim yapıldı ve agaroz jel elektroforezinde görüntü alındı. *E. coli* C43(DE3) kimyasal kompetan hücrelerden bir tane (50 µl) alınarak -80 °C'den çıkartıldı ve hücreler buz üzerinde çözdürüldü. Ekstrakte edilen 5 ng/µl pCOLD TF-NSs plazmid DNA kompetan hücrelere bırakıldı; pipetasyon yapılmadan birkaç kez parmakla yavaşça vurularak karıştırma işlemi tamamlandı. Hücreler buz üzerinde 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda hücreler 42°C'ye ısıtılmış su banyosunda 45 sn bekletildi ve süre sonunda tekrar buza alınarak 5 dakika inkübe edildi. Hücrelerin üzerine 200 µl LB sıvı besiyeri eklendi. 37 °C'de 225 rpm'deki çalkalayıcıda 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra 50,100,150 µl hücre süspansiyonundan alındı ve 100 µg/ml ampisilin ile hazırlanmış LB katı besi yerlerine ayrı ayrı ekim yapıldı ve petriyerler 37 °C'deki etüvde bir gece bekletildi. Ertesi gün katı besiyerinde büyüyen kolonilerden seçilip IPTG indüksiyonu için kültüre edildi.

3.3. pCOLD TF-NSs Vektörü Kullanılarak Prokaryotik Sistemde Rekombinant Protein Üretimi ve Saflaştırılması

3.3.1. pCOLD TF-NSs Vektörünün IPTG ile İndüksiyonu

3.3.1.1. Materyal

- Su banyosu (Memmert, WNB14)
- Otoklav (Hirayama-Hiclave HVE-85L)

- Etüv (**Memmert**)
- Spektrofotometre (**Shimadzu, UVmini-1240**)
- Çalkalayıcı inkübatör (**IKA KS 4000i**)
- Santrifüj (**Mikro220R, Hettich**)
- Sarf malzemeler (Petri, Erlen mayer)
- 10-100-1000 µl'lik Mikropipetler (**Gilson**)
- Mikrosantrifüj tüpleri (**Starlab, S1615-5500**)
- Ampisilin (**Sigma, A0166**)
- **LB (Luria-Bertani) Sıvı Besiyeri**
- %1 Tripton (**Merck, 107213**)
- %0,5 Maya özütü (**Merck, 103753**)
- %1 NaCl (**Sigma, S3014**)
- 1 l distile su
- IPTG (**Sigma, 16758**)
- 2X Laemmli Sample Buffer (**Bio-Rad, 161-0737**)

3.3.1.2. Metot

pCOLD TF-NSs plazmidi ile transforme edilmiş *E. coli* C43 (DE3) kimyasal kompetent hücrelerinden tek koloni alınarak 100 µg/ml ampisilin içeren 5 ml LB sıvı besiyerine inokülasyon yapıldı. Hücreler, 37°C 225 rpm'deki çalkalayıcıda bir gece inkübe edildi. Kültürden 2 ml alınıp 100 µg/ml ampisilin içeren 100 ml LB sıvı besiyerine aktarıldı. Hücreler O.D₆₀₀: 0.5-0.6 oluncaya kadar, 37°C, 225 rpm deki çalkalayıcıda inkübe edildi. Her 2-3 saatte bir hücrelerin yoğunlukları spektrofotometre ile ölçüldü. İndüklenmemiş hücre kültüründen 1000 µl alınıp eppendorf tüpe aktarıldı. 13.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilip süpernatantı atıldı. Bakteriyel pellet 100µl 2X Laemmli Sample Buffer ile homojenize edildi; daha sonra SDS-PAGE ile görüntülmek üzere -20°C'e kaldırıldı. Kalan kültüre 1 mM IPTG eklendi, kültür 16°C 225 rpm'deki çalkalayıcıda bir gece inkübe edildi. İndüksiyonun kontrolü için kültürden 1000 µl alınıp mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. 13.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilip süpernatantı atıldı. Bakteriyel pellet 100µl 2X Laemmli Sample Buffer ile homojenize edildi; daha sonra SDS-PAGE ile görüntülmek üzere -20°C'e kaldırıldı.

3.3.2. pCOLD TF-NSs Rekombinant Proteininin Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile Görüntülenmesi

3.3.2.1. Materyal

- Mini-PROTEAN Tetra Cell Sistemi (**Bio-Rad, 165-8000**)
- Santrifüj (**Mikro220R, Hettich**)
- ChemiDoc MP Görüntüleme Sistemi (**Bio-Rad**)
- Güç kaynağı (**Bio-Rad, 164-5052**)
- Çalkalayıcı (**Heidolph, Polymax 1040**)
- Sarf malzemeler (Falkon, Erlen mayer)
- 10-100-1000 µl'lik Mikropipetler (**Gilson**)
- Mikrosantrifüj tüpleri (**Starlab, S1615-5500**)
- Commassie blue R-250 (**Bio-Rad, 161-0436**)
- 2X Laemmli Sample Buffer (**Bio-Rad, 161-0737**)
- 2-Merkaptoetanol (**Bio-Rad, 161-0710**)
- TEMED (**Sigma, 110732**)
- Akrilamid (**Sigma, A8887**)
- Bisakrilamid (**Applichem, A3636**)
- Tris (**Merck, 108387**)
- SDS (**Sigma, L5750**)
- Amonyum persülfat (APS) (**Applichem, A2941**)
- **15 ml %10'luk seperasyon jeli**

5,9 ml Distile su

5 ml %30'luk akrilamid/bisakrilamid karışımı

3,8 ml 1,5 M Tris (pH 8.8)

0,15 ml %10 SDS

0,15 ml %10 APS

0,012 ml TEMED

- **6 ml %5'lik yükleme jeli**

4,1 ml Distile su

1 ml %30'luk akrilamid/bisakrilamid karışımı

0,75 ml 1 M Tris (pH 6.8)

0,06 ml %10 SDS

0,06 ml %10 APS

0,006 ml TEMED

• 10X Tris/Glisin/SDS Yürütme Tamponu (**Bio-Rad, 161-0771**)

• **Destaining Solüsyonu**

50 ml glasiyal asetik asit (**Merck, 100063**)

250 ml metanol (**Merck,106009**)

200 ml distile su

3.3.2.2. Metot

Mini-PROTEAN Tetra Cell sistem kurulumu yapıldıktan sonra falkon tüp içerisinde önce 15ml %10'luk seperasyon jeli hazırlandı. Hazırlanan seperasyon jeli cam plakalar arasına yukarıdan 2 cm boşluk bırakılacak şekilde döküldü. Jelin üst kısmının düz olması için jel daha polimerize olmadan üzerine pastör pipeti ile distile su eklendi ve jel oda sıcaklığında 15-20 dk polimerize olması için bekletildi. Jelin polimerize olduğundan emin olduktan sonra üzerindeki su döküldü, falkon tüp içerisinde 6 ml %5'lik yükleme jeli hazırlandı. Hazırlanan yükleme jeli, seperasyon jelinin üzerine döküldü ve kuyucukları oluşturmak için jelin üzerine tarak takıldı. 20 µl indüklenmiş ve indüklenmemiş protein örnekleri yükleme tamponu (950 µl 2X Laemmli Sample Buffer + 50 µl 2-merkaptanoetanol) ile 1:1 oranında karıştırılıp 95°C'deki suda 5 dakika ısıtıldı ve jeli yükleme yapılıncaya kadar kısa bir süre buz üzerinde bekletildi. Cam plakalar içerisinde polimerize olmuş jel tank içerisine özenle yerleştirildi. Jeli ihtiva eden tank yaklaşık 3 cm yüksekliğe kadar 1X Tris/Glisin/SDS yürütme tamponu ile doldurulup, tamponun sızdırıp sızdırmadığı kontrol edildi. Kalan yürütme tamponu tank içerisinde belirtilen yüksekliğe kadar dolduruldu. Örneklerden 20 µl kuyucuklara yüklendikten sonra jel 150 Voltta 90 dk yürütüldü. SDS- PAGE bittikten sonra jel sistem üzerinden çıkartıldı. Cam plakalar birbirlerinden dikkatlice ayrıldıktan sonra, üstteki yükleme jeli dikkatlice separasyon jelinden ayrılıp atıldı. Kalan kısım plastik bir kaba aktarıldı ve jelin üzerini kaplayacak kadar Coomassie Brilliant Blue R-250 boyama solüsyonu dökülüp 3 saat çalkalayıcıda bekletildi. Boya jelin yüzeyini tamamen boyadığı için protein olmayan bölgelerden uzaklaştırılması gerekir. Bu amaçla jel birkaç kez destaining solüsyonu ile 30 dakika boyunca iki kere yıkandı. Jel son kez destaining solüsyonu koyularak bir gece boyunca çalkalayıcıda bekletildi. Bir gece destaining

solüsyonu ile yıkanan jel, distile suya konularak birkaç saat beklenildi. Ardından ChemiDoc MP görüntüleme sistemi kullanılarak pCOLD TF-NSs rekombinant proteinin indüksiyonu analiz edildi.

3.3.3. pCOLD TF-NSs Rekombinant Proteinin Lizis Tamponu ile Ekstraksiyonu

3.3.3.1. Materyal

- Santrifüj (**Mikro220R, Hettich**)
- Çalkalayıcı (**Heidolph, Polymax 1040**)
- Sonikatör
- Lizozim (**Sigma, L7651**)
- Benzonaz (**Novagen,71206-3**)
- **Lizis Tamponu**

50 mM Tris-HCl (pH 8.0) (**Merck, 108387**)

50 mM NaCl (**Sigma, S3014**)

%5 Gliserol (**Sigma, G5516**)

Distile su

3.3.3.2. Metot

IPTG ile indüklenmiş kültür 6000 rpm'de 4°C'de 30 dk santrifüj edildi. Elde edilen hücre pelletinin ağırlığı hassas tartıda ölçülerek belirlendi. 1 gr hücre pelleti için 7 ml lizis tamponu kullanıldı. Pellet oda sıcaklığındaki lizis tamponu ile resüspanse edilip hafifçe vortekslendi. Hücre süspansiyonu üzerine benzonaz ve yeni hazırlanmış lizozim solüsyonu eklenip karıştırma işlemi yapıldı. 1 ml lizis tamponu için 25 U benzonaz, 0,3 ml lizozim kullanıldı. Hücre süspansiyonu 20 dk oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edildi. İnkübasyonun ardından falkon buz üzerine alındı, 1 dakika 20 saniye (Pulse on: 10 sn; Pulse off: 2 sn) sonikasyon yapıldı. Hücre süspansiyonu 6000 rpm'de 4°C'de 20 dk santrifüj edildi. Elde edilen lizat ve pellet ayrı falkon tüplere alınıp -20°C'e kaldırıldı. Rekombinant proteinin çözümlü form ya da inklüzyon cisimciği formlarının hangisinde olduğunu belirlemek için, lizat ve pellet SDS-PAGE ile analiz edildi.

3.3.4. pCOLD TF-NSs Rekombinant Proteinin Saflaştırılması

3.3.4.1. Materyal

- Santrifüj (**Hettich, Mikro120R, 1204**)
- 10-100-1000 µl'lik Mikropipetler (**Gilson**)
- Mikrosantrifüj tüpleri (**Starlab, S1615-5500**)
- Ni-NTA Spin Kolonları (**Qiagen, 31014**)
- **Lizis Tamponu (NPI-10), pH 8.0**

50 mM Sodyum fosfat monobazik (**Sigma, 71505**)

300 mM NaCl (**Sigma, S3014**)

10 mM İmidazol (**Sigma, I5513**)

Distile su

- **Yıkama Tamponu (NPI-20), pH 8.0**

50 mM Sodyum fosfat monobazik (**Sigma, 71505**)

300 mM NaCl (**Sigma, S3014**)

20 mM İmidazol (**Sigma, I5513**)

Distile su

- **Elüsyon Tamponu (NPI-500), pH 8.0**

50 mM Sodyum fosfat monobazik (**Sigma, 71505**)

300 mM NaCl (**Sigma, S3014**)

500 mM İmidazol (**Sigma, I5513**)

Distile su

3.3.4.2. Metot

Lizis tamponu ile ekstraksiyon sonrası elde edilen lizat -20°C'den çıkarılıp buz üzerinde 15-30 dakika çözdürüldü. Ni-NTA Spin Kolona 600 µl NPI-10 (bağlama/lizis tamponu) uygulandı, kolon 2 dk 2900 rpm'de santrifüj edildi. 600 µl lizat kolona eklendi ve 5 dk 1600 rpm'de santrifüj edildi. Proteinin bağlanma etkinliğini SDS-PAGE ile kontrol etmek için kolondan akan fraksiyondan 100 µl örnek alındı, lizatın tamamı bu şekilde kolondan geçirildi. Kolona 600 µl NPI-20 buffer (yıkama tamponu) uygulandı, 2 dk 2900 rpm'de santrifüj edildi. Yıkama işleminin sızdırmazlığını SDS-PAGE ile kontrol etmek için kolondan akan fraksiyondan 100 µl örnek alındı. Yıkama işlemi 2 kere

tekrarlandı. Son olarak Kolona 300 µl NPI-500 buffer (elüsyon tamponu) uygulandı, 2 dk 2900 rpm'de santrifüj edildi. Kolondan iki keredede alınan pürifiye protein steril bir eppendorf tüpe konuldu ve SDS-PAGE ile analiz edildi. Rekombinant protein ilerleyen zamanlarda kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edildi.

3.3.5. pCOLD TF-NSs Rekombinant Proteinin Miktarının Belirlenmesi

3.3.5.1. Materyal

- Mini-PROTEAN Tetra Cell Sistemi (**Bio-Rad, 165-8000**)
- Santrifüj (**Mikro220R, Hettich**)
- ChemiDoc MP Görüntüleme Sistemi (**Bio-Rad**)
- Güç kaynağı (**Bio-Rad, 164-5052**)
- 10-100-1000 µl'lik Mikropipetler (**Gilson**)
- Mikrosantrifüj tüpleri (**Starlab, S1615-5500**)
- Sığır serum albümini (BSA) (**Sigma, A2153**)
- Commassie blue R-250 (**Bio-Rad, 161-0436**)
- 2X Laemmli Sample Buffer (**Bio-Rad, 161-0737**)
- 2-Merkaptoetanol (**Bio-Rad, 161-0710**)
- TEMED (**Sigma, 110732**)
- Akrilamid (**Sigma, A8887**)
- Bisakrilamid (**Applichem, A3636**)
- Tris (**Merck, 108387**)
- SDS (**Sigma, L5750**)
- Amonyum persülfat (APS) (**Applichem, A2941**)
- **15 ml %10'lük seperasyon jeli**
- 5,9 ml Distile su
- 5 ml %30'lük akrilamid/bisakrilamid karışımı
- 3,8 ml 1,5 M Tris (pH 8.8)
- 0,15 ml %10 SDS
- 0,15 ml %10 APS
- 0,012 ml TEMED
- **6 ml %5'lik yükleme jeli**
- 4,1 ml Distile su

1 ml %30'luk akrilamid/bisakrilamid karışımı

0,75 ml 1 M Tris (pH 6.8)

0,06 ml %10 SDS

0,06 ml %10 APS

0,006 ml TEMED

• 10X Tris/Glisin/SDS Yürütme Tamponu (**Bio-Rad, 161-0771**)

• **Destaining Solüsyonu**

50 ml glasiyal asetik asit (**Merck, 100063**)

250 ml metanol (**Merck,106009**)

200 ml distile su

3.3.5.2. Metot

Pürifiye edilen rekombinant pCOLD TF-NSs rekombinant proteininin ELISA ve immünizasyon deneylerinde kullanılmak üzere konsantrasyonu bilinen standart bir protein (BSA) ile miktar tayini yapıldı. 20 mg/ml konsantrasyonda distile su içerisinde hazırlanan BSA'dan farklı konsantrasyonlarda alınıp 1:1 oranında yükleme tamponu ile karıştırılıp, 95°C'deki suda 5 dakika ısıtıldı ve jele yükleme yapılıncaya kadar kısa bir süre buz üzerinde bekletildi. Pürifiye rekombinant proteinden 20 µl alındı ve benzer şekilde 1:1 oranında yükleme tamponu ile karıştırılıp, 95°C'deki suda 5 dakika ısıtıldı ve jele yükleme yapılıncaya kadar kısa bir süre buz üzerinde bekletildi. Standart BSA örnekleri ve pürifiye rekombinant protein jele yüklenerek 150 Voltta 90 dk yürütüldü. SDS- PAGE bittikten sonra jel sistem üzerinden çıkartıldı. Seperasyon jelinin üzerini kaplayacak kadar Coomassie Brilliant Blue R-250 boyama solüsyonu dökülüp 3 saat çalkalayıcıda bekletildi. Boya jelin yüzeyini tamamen boyadığı için protein olmayan bölgelerden uzaklaştırılması gerekir. Bu amaçla jel birkaç kez destaining solüsyonu ile 30 dakika boyunca iki kere yıkandı. Jel son kez destaining solüsyonu koyularak bir gece boyunca çalkalayıcıda bekletildi. Bir gece destaninig solüsyonu ile yıkanan jel, distile suya konularak birkaç saat beklenildi. Ardından ChemiDoc MP cihazına konulan jeldeki proteinlerin miktarı ImageLab Software Version 5.1. programı kullanılarak relatif olarak belirlendi.

3.4. pCOLD TF-NSs Rekombinant Proteinini ile Fare İmmünizasyonu

115S076 nolu ve 'Kırım-Kongo Kanamalı Ateş Hastalığına (KKKAH) Karşı Adenovirus (Ad) Tabanlı Rekombinant İki Aşılı Adayının Geliştirilmesi ve Etkinliğinin Belirlenmesi' isimli TÜBİTAK 1003 projesi kapsamında pCOLD TF-NSs vektörü kullanılarak rekombinant NSs proteini üretilip saflaştırıldıktan sonra Balb/c farelerine verildi. Bu amaçla, 5 adet 6-8 haftalık Balb/c farelerinden ikisi kontrol grubu olmak üzere rekombinant antijen uygulanmadı ve diğer 3 fare 50µg pCOLD TF-NSs rekombinant antijeni intraperitonel olarak 2 hafta aralıklarla ile 7 defa immünize edildi. Her immunizasyondan önce farelerin orbital sinüsünden ya da pleksusundan mikrohematokrit tüp yardımıyla kan alındı. Alınan kanlar 10.000 rpm'de 5 dk santrifüjlendikten sonra elde edilen immünize fare serumları -20°C'de muhafaza edildi. Yine aynı proje kapsamında elde edilen KKKAH virüsü Turkey-Kelkit06 suşuyla immünize edilen fare serumları çalışmalarda pozitif kontrol olarak kullanıldı.

3.5. pCOLD TF-NSs Rekombinant Proteinin İndirekt ELISA Testlerinde Kullanılması

3.5.1. Rekombinant pCOLD TF-NSs Proteinini ile İmmünize Edilen Farelerden Alınan Serumların ELISA ile Test Edilmesi

3.5.1.1. Materyal

- ELISA Okuyucu (Thermo Scientific, Multiskan FC 357)
- 96 kuyucuklu mikroyuvarlak (Thermo Scientific, 473768)
- Keçi anti-fare IgG (SouthernBiotech, 1010-05)
- TMB SENS HRP substrat solüsyonu (ECO-TEK, 4850L)
- 1X PBS
- 8 gr NaCl (Sigma, S3014)
- 0,2 gr KCl (Sigma, P9333)
- 1,44 gr Na₂HPO₄ (Sigma, S0876)
- 2,4 gr KH₂PO₄ (Merck, 104873)
- 1 lt distile su
- Karbonat Tamponu, pH 9.6
- 1,59 gr Na₂CO₃ (Sigma, S7795)

2,3 gr NaHCO₃ (Sigma, S5761)

1 lt distile su

• **Yıkama Solüsyonu**

500 ml 1X PBS

0.5 ml Tween 20 (Merck, 822184)

• **Bloklama Solüsyonu**

50 ml %0.05 PBS-Tween 20

2,5 gr yağsız süt tozu (Pınar marka)

• **Durdurma Solüsyonu**

0.2 N Sülfirik asit (Merck,101833)

3.5.1.2. Metot

Rekombinant pCOLD TF-NSs proteinin biyolojik olarak aktif olduğunun teyit edilmesi ve antijenik özelliğinin araştırılması amacıyla rekombinat proteini ile immünize edilen Balb/c farelerinden alınan serumlar ELISA yöntemi ile test edildi. pCOLD TF vektörü kullanılarak üretilen ve pürifiye edilen 4 µg rekombinant NSs antijeni ve 1µg PEG presipite KKKAH virüsü antijeni karbonat tamponu kullanılarak kuyucuk başına toplam hacim 100 µl olacak şekilde 96 kuyucuklu mikroplyte bağlandı. Pleyt bir gece 4°C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra bloklama solüsyonundan, her kuyucuğa 100 µl bırakıldı ve pleyt 37°C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından pleyt bir kere yıkama solüsyonu ile yıkandı. Rekombinant antijen ile immünize edilmiş fare serumlarının bloklama solüsyonu içerisinde 1/100 oranında dilüsyonları yapıldı ve bu dilüsyonlardan her kuyucuğa 100 µl bırakıldıktan sonra pleyt 37°C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından pleyt 5 kere yıkama solüsyonu ile yıkandı. Keçi anti-fare IgG konjugatı, 1/4000 oranında bloklama solüsyonu içerisinde sulandırıldı ve her kuyucuğa 100 µl bırakıldı, daha sonra pleyt 37°C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından pleyt 5 kere yıkama solüsyonu ile yıkandı. TMB SENS HRP substrat solüsyonundan her kuyucuğa 100 µl bırakıldı. Pleyt 15 dakika karanlıkta inkübe edildikten sonra her kuyucuğa 100 µl durdurma solüsyonu ilave edilerek ELISA okuyucuda 450 nm dalga boyunda okuma yapıldı. Negatif kontrollerin ortalamasının iki katı cut off değeri olarak alındı.

3.5.2. Rekombinant pCOLDTF-NSs Proteininin, KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit06 Suşuyla İmmünize Edilen Fare Serumlarında Anti-KKKAHV IgG Belirlenmesi Amacıyla ELISA Testinde Kullanılması

3.5.2.1. Materyal

- ELISA Okuyucu (Thermo Scientific, Multiskan FC 357)
- 96 kuyucuklu mikroplyet (Thermo Scientific, 473768)
- Keçi anti-fare IgG (SouthernBiotech, 1010-05)
- TMB SENS HRP substrat solüsyonu (ECO-TEK, 4850L)

• 1X PBS

8 gr NaCl (Sigma, S3014)

0,2 gr KCl (Sigma, P9333)

1,44 gr Na₂HPO₄ (Sigma, S0876)

2,4 gr KH₂PO₄ (Merck, 104873)

1 lt distile su

• Karbonat Tamponu, pH 9.6

1,59 gr Na₂CO₃ (Sigma, S7795)

2,3 gr NaHCO₃ (Sigma, S5761)

1 lt distile su

• Yıkama Solüsyonu

500 ml 1X PBS

0.5 ml Tween 20 (Merck, 822184)

• Bloklama Solüsyonu

50 ml %0.05 PBS-Tween 20

2,5 gr yağsız süt tozu (Pınar marka)

• Durdurma Solüsyonu

0.2 N Sülfirik asit (Merck,101833)

3.5.2.2. Metot

Rekombinant pCOLD TF-NSs antijeninin fare IgG ELISA sisteminde kullanılabilirliğini araştırma amacı ile KKKAH virüsü Turkey-Kelkit06 suşu ile immünize edilen Balb/c farelerinden alınan serumlar ELISA yöntemi ile test edildi.

pCOLD TF vektörü kullanılarak üretilen ve pürifiye edilen 1µg, 2µg, 3µg, 4µg rekombinant NSs antijeni ve 1µg PEG presipite KKKAH virüsü antijeni karbonat tamponu kullanılarak kuyucuk başına toplam hacim 100 µl olacak şekilde 96 kuyucuklu mikroye bağlandı. Pleyt bir gece 4°C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra bloklama solüsyonundan, her kuyucuğa 100 µl bırakıldı ve pleyt 37°C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından pleyt bir kere yıkama solüsyonu ile yıkandı. Rekombinant antijen ile immünize edilmiş fare serumlarının bloklama solüsyonu içerisinde 1/100 oranında dilüsyonları yapıldı ve bu dilüsyonlardan her kuyucuğa 100 µl bırakıldıktan sonra pleyt 37°C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından pleyt 5 kere yıkama solüsyonu ile yıkandı. Keçi anti-fare IgG konjugatı, 1/5000 oranında bloklama solüsyonu içerisinde sulandırıldı ve her kuyucuğa 100 µl bırakıldı, daha sonra pleyt 37°C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından pleyt 5 kere yıkama solüsyonu ile yıkandı. TMB SENS HRP substrat solüsyonundan her kuyucuğa 100 µl bırakıldı. Pleyt 15 dakika karanlıkta inkübe edildikten sonra her kuyucuğa 100 µl durdurma solüsyonu ilave edilerek ELISA okuyucuda 450 nm dalga boyunda okuma yapıldı. Negatif kontrollerin ortalamasının iki katı cut off değeri olarak alındı.

3.5.3. Rekombinant pCOLD TF-NSs Proteinin, KKKAH IgG Pozitif İnsan Serumlarında Anti-KKKAH IgG Belirlenmesi Amacıyla ELISA Testinde Kullanılması

3.5.3.1. Materyal

- ELISA Okuyucu (Thermo Scientific, Multiskan FC 357)
- 96 kuyucuklu mikroye (Thermo Scientific, 473768)
- Keçi anti-insan IgG (ThermoFisher, 62-8420)
- TMB SENS HRP substrat solüsyonu (ECO-TEK, 4850L)
- 1X PBS

8 gr NaCl (Sigma, S3014)

0,2 gr KCl (Sigma, P9333)

1,44 gr Na₂HPO₄ (Sigma, S0876)

2,4 gr KH₂PO₄ (Merck, 104873)

1 lt distile su

• Karbonat Tamponu, pH 9.6

1,59 gr Na₂CO₃ (Sigma, S7795)

2,3 gr NaHCO₃ (Sigma, S5761)

1 lt distile su

• Yıkama Solüsyonu

500 ml 1X PBS

0.5 ml Tween 20 (Merck, 822184)

• Bloklama Solüsyonu

50 ml %0.05 PBS-Tween 20

2,5 gr yağsız süt tozu (Pınar marka)

• Durdurma Solüsyonu

0.2 N Sülfirik asit (Merck,101833)

3.5.3.2. Metot

Rekombinant pCOLD TF-NSs antijeni ile KKKAH yönünden IgG pozitif olduğu bilinen insan serumları ELISA yöntemi ile test edildi. pCOLD TF vektörü kullanılarak üretilen ve pürifiye edilen 1µg, 2µg, 3µg, 4µg rekombinant NSs antijeni karbonat tamponu kullanılarak kuyucuk başına toplam hacim 100 µl olacak şekilde 96 kuyucuklu mikropleyde bağlandı. Pleyt bir gece 4°C’de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra bloklama solüsyonundan, her kuyucuğa 100 µl bırakıldı ve pleyt 37°C’de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından pleyt bir kere yıkama solüsyonu ile yıkandı. Rekombinant antijen ile immünize edilmiş fare serumlarının bloklama solüsyonu içerisinde 1/100 oranında dilüsyonları yapıldı ve bu dilüsyonlardan her kuyucuğa 100 µl bırakıldıktan sonra pleyt 37°C’de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından pleyt 5 kere yıkama solüsyonu ile yıkandı. Keçi anti-insan IgG konjugatı, 1/3000 oranında bloklama solüsyonu içerisinde sulandırıldı ve her kuyucuğa 100 µl bırakıldı, daha sonra pleyt 37°C’de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından pleyt 5 kere yıkama solüsyonu ile yıkandı. TMB SENS HRP substrat solüsyonundan her kuyucuğa 100 µl bırakıldı. Pleyt 15 dakika karanlıkta inkübe edildikten sonra her kuyucuğa 100 µl durdurma solüsyonu ilave edilerek ELISA okuyucuda 450 nm dalga boyunda okuma yapıldı. Negatif kontrollerin ortalamasının iki katı cut off değeri olarak alındı.

3.6. KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit 06 Suşu NSs Proteinine ait Peptitlerin ELISA Yöntemi ile Test Edilmesi

KKKAH virüsü NSs Proteinini Peptit-tabanlı ELISA yöntemi ile test etmek amacı ile KKKAH virüsü Turkey-Kelkit 06 Suşu NSs proteinine ait 20 aminoasit dizisi içeren ve 12 tanesi overlap olacak şekilde dizayn edilen, GenScript firmasından hizmet alımı yoluyla sentezlenen polipeptitler kullanıldı. Sentetik polipeptitler yapılan hidrofobite/hidrofilite analizlerine göre asidik, bazik ve nötral peptitler olarak gruplandırıldı. Steril DNaz/RNaz içermeyen distile suda konsantrasyonları 1 mg/ml olacak şekilde çözüldü. Çözünür formdaki sentetik polipeptitlerden üçerli ve dörderli gruplar halinde oluşturulan kombine peptit havuzları ELISA testinde kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edildi.

3.6.1. Rekombinant pCOLD TF-NSs Antijeni ile İmmünize Edilen Fare Serumlarının Peptit ELISA ile Test Edilmesi

3.6.1.1. Materyal

- ELISA Okuyucu (**Thermo Scientific, Multiskan FC 357**)
- 96 kuyucuklu mikroplyet (**Thermo Scientific, 473768**)
- Keçi anti-fare IgG (**SouthernBiotech, 1010-05**)
- TMB SENS HRP substrat solüsyonu (**ECO-TEK, 4850L**)
- **1X PBS**

8 gr NaCl (**Sigma, S3014**)

0,2 gr KCl (**Sigma, P9333**)

1,44 gr Na₂HPO₄ (**Sigma, S0876**)

2,4 gr KH₂PO₄ (**Merck, 104873**)

1 lt distile su

- **Karbonat Tamponu, pH 9.6**

1,59 gr Na₂CO₃ (**Sigma, S7795**)

2,3 gr NaHCO₃ (**Sigma, S5761**)

1 lt distile su

- **Yıkama Solüsyonu**

500 ml 1X PBS

0.5 ml Tween 20 (Merck, 822184)

• **Bloklama Solüsyonu**

50 ml %0.05 PBS-Tween 20

2,5 gr yağsız süt tozu (Pınar marka)

• **Durdurma Solüsyonu**

0.2 N Sülfirik asit (Merck,101833)

3.5.1.2. Metot

KKKAH virüsü Turkey-Kelkit06 suşu NSs proteinine ait sentetik polipeptitler, karbonat tamponu kullanılarak peptitlerden her birinin konsantrasyonu 2 µg/kuyucuk ve kuyucuk başına toplam hacim 100 µl olacak şekilde 96 kuyucuklu ELISA pleytine bağlandı. Rekombinant pCOLD TF-NSs antijeni ile immünize edilen Balb/c farelerinden 7. immünizasyon sonrası alınan serumlar peptit-tabanlı ELISA yöntemi ile test edildi. Pleyt bir gece 4°C’de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra bloklama solüsyonundan, her kuyucuğa 100 µl bırakıldı ve pleyt 37°C’de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından pleyt bir kere yıkama solüsyonu ile yıkandı. Rekombinant antijen ile immünize edilmiş fare serumlarının bloklama solüsyonu içerisinde 1/100 oranında dilüsyonları yapıldı ve bu dilüsyonlardan her kuyucuğa 100 µl bırakıldıktan sonra pleyt 37°C’de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından pleyt 5 kere yıkama solüsyonu ile yıkandı. Keçi anti-fare IgG konjugatı, 1/4000 oranında bloklama solüsyonu içerisinde sulandırıldı ve her kuyucuğa 100 µl bırakıldı, daha sonra pleyt 37°C’de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından pleyt 5 kere yıkama solüsyonu ile yıkandı. TMB SENS HRP substrat solüsyonundan her kuyucuğa 100 µl bırakıldı. Pleyt 15 dakika karanlıkta inkübe edildikten sonra her kuyucuğa 100 µl durdurma solüsyonu ilave edilerek ELISA okuyucuda 450 nm dalga boyunda okuma yapıldı. Negatif kontrollerin ortalamasının iki katı cut off değeri olarak alındı.

3.6.2. KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit06 Suşuyla İmmünize Edilen Fare Serumlarının Peptit ELISA ile Test Edilmesi

3.6.2.1. Materyal

- ELISA Okuyucu (**Thermo Scientific, Multiskan FC 357**)
- 96 kuyucuklu mikroplyet (**Thermo Scientific, 473768**)
- Keçi anti-fare IgG (**SouthernBiotech, 1010-05**)
- TMB SENS HRP substrat solüsyonu (**ECO-TEK, 4850L**)

• 1X PBS

8 gr NaCl (**Sigma, S3014**)

0,2 gr KCl (**Sigma, P9333**)

1,44 gr Na₂HPO₄ (**Sigma, S0876**)

2,4 gr KH₂PO₄ (**Merck, 104873**)

1 lt distile su

• Karbonat Tamponu, pH 9.6

1,59 gr Na₂CO₃ (**Sigma, S7795**)

2,3 gr NaHCO₃ (**Sigma, S5761**)

1 lt distile su

• Yıkama Solüsyonu

500 ml 1X PBS

0.5 ml Tween 20 (**Merck, 822184**)

• Bloklama Solüsyonu

50 ml %0.05 PBS-Tween 20

2,5 gr yağsız süt tozu (**Pınar marka**)

• Durdurma Solüsyonu

0.2 N Sülfirik asit (**Merck,101833**)

3.6.2.2. Metot

KKKAH virüsü Turkey-Kelkit06 suşu NSs proteinine ait sentetik polipeptitler, karbonat tamponu kullanılarak peptitlerden her birinin konsantrasyonu 2 µg/kuyucuk ve kuyucuk başına toplam hacim 100 µl olacak şekilde 96 kuyucuklu ELISA pleytine bağlandı. KKKAH virüsü Turkey-Kelkit06 suşu ile immünize edilen Balb/c farelerinden 3.

immünizasyon sonrası alınan serumlar peptit-tabanlı ELISA yöntemi ile test edildi. Pleyt bir gece 4°C’de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra bloklama solüsyonundan, her kuyucuğa 100 µl bırakıldı ve pleyt 37°C’de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından pleyt bir kere yıkama solüsyonu ile yıkandı. Rekombinant antijen ile immünize edilmiş fare serumlarının bloklama solüsyonu içerisinde 1/100 oranında dilüsyonları yapıldı ve bu dilüsyonlardan her kuyucuğa 100 µl bırakıldıktan sonra pleyt 37°C’de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından pleyt 5 kere yıkama solüsyonu ile yıkandı. Keçi anti-fare IgG konjugatı, 1/4000 oranında bloklama solüsyonu içerisinde sulandırıldı ve her kuyucuğa 100 µl bırakıldı, daha sonra pleyt 37°C’de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından pleyt 5 kere yıkama solüsyonu ile yıkandı. TMB SENS HRP substrat solüsyonundan her kuyucuğa 100 µl bırakıldı. Pleyt 15 dakika karanlıkta inkübe edildikten sonra her kuyucuğa 100 µl durdurma solüsyonu ilave edilerek ELISA okuyucuda 450 nm dalga boyunda okuma yapıldı. Negatif kontrollerin ortalamasının iki katı cut off değeri olarak alındı.

3.6.3. KKKAH IgG Pozitif İnsan Serumlarının Peptit ELISA ile Test Edilmesi

3.6.3.1. Materyal

- ELISA Okuyucu (**Thermo Scientific, Multiskan FC 357**)
- 96 kuyucuklu mikropleyt (**Thermo Scientific, 473768**)
- Keçi anti-insan IgG (**ThermoFisher, 62-8420**)
- TMB SENS HRP substrat solüsyonu (**ECO-TEK, 4850L**)
- **1X PBS**
- 8 gr NaCl (**Sigma, S3014**)
- 0,2 gr KCl (**Sigma, P9333**)
- 1,44 gr Na₂HPO₄ (**Sigma, S0876**)
- 2,4 gr KH₂PO₄ (**Merck, 104873**)
- 1 lt distile su
- **Karbonat Tamponu, pH 9.6**
- 1,59 gr Na₂CO₃ (**Sigma, S7795**)
- 2,3 gr NaHCO₃ (**Sigma, S5761**)
- 1 lt distile su

• Yıkama Solüsyonu

500 ml 1X PBS

0.5 ml Tween 20 (Merck, 822184)

• Bloklama Solüsyonu

50 ml %0.05 PBS-Tween 20

2,5 gr yağsız süt tozu (Pınar marka)

• Durdurma Solüsyonu

0.2 N Sülfirik asit (Merck,101833)

3.6.3.2. Metot

KKKAH virüsü Turkey-Kelkit06 suşu NSs proteinine ait sentetik polipeptitler, karbonat tamponu kullanılarak peptitlerden her birinin konsantrasyonu 2 µg/kuyucuk ve kuyucuk başına toplam hacim 100 µl olacak şekilde 96 kuyucuklu ELISA pleytine bağlandı. KKKAH yönünden IgG pozitif olduğu bilinen insan serumları peptit tabanlı ELISA yöntemi ile test edildi. Pleyt bir gece 4°C’de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra bloklama solüsyonundan, her kuyucuğa 100 µl bırakıldı ve pleyt 37°C’de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından pleyt bir kere yıkama solüsyonu ile yıkandı. Rekombinant antijen ile immünize edilmiş fare serumlarının bloklama solüsyonu içerisinde 1/100 oranında dilüsyonları yapıldı ve bu dilüsyonlardan her kuyucuğa 100 µl bırakıldıktan sonra pleyt 37°C’de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından pleyt 5 kere yıkama solüsyonu ile yıkandı. Keçi anti-insan IgG konjugatı, 1/3000 oranında bloklama solüsyonu içerisinde sulandırıldı ve her kuyucuğa 100 µl bırakıldı, daha sonra pleyt 37°C’de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından pleyt 5 kere yıkama solüsyonu ile yıkandı. TMB SENS HRP substrat solüsyonundan her kuyucuğa 100 µl bırakıldı. Pleyt 15 dakika karanlıkta inkübe edildikten sonra her kuyucuğa 100 µl durdurma solüsyonu ilave edilerek ELISA okuyucuda 450 nm dalga boyunda okuma yapıldı. Negatif kontrollerin ortalamasının iki katı cut off değeri olarak alındı.

3.7. KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit06 Suşuyla Enfekte Edilmiş Vero E6 Hücrelerinde NSs Proteininin IFA Yöntemi ile Araştırılması

3.7.1. Dondurulmuş Vero E6 Hücrelerinin Kültüre Edilmesi

3.7.1.1. Materyal

- Sınıf 2 Biyogüvenlik Kabini (**ADS Laminare Optimale**)
- İverted Mikroskop (**Leica, DM IL LED**)
- CO₂'li İnkübatör (**Panasonic, MCO-18AC-PE**)
- Su banyosu (**Memmert, WNB14**)
- Açılır rotorlu santrifüj (**Beckman Coulter, Allegra X-22**)
- 25 cm² Flask (**Greiner Bio-one, 690175**)
- Pipet tabancası (**Gilson**)
- 10-100-1000 µl'lik Mikropipetler (**Gilson**)
- 5-10-25 ml'lik Serolojik pipetler (**Greiner Bio-one**)
- Sarf Malzemeler (Falkon tüpler, pipet uçları)
- Sodyum Bikarbonat (**Sigma, S5761**)
- Vero E6 hücre hattı (**ERAGEM hücre hattı stoğu**)

• Hücre Kültür Vasatı

DMEM-F12 (**Sigma, D8900**)

%10 NCS (**Sigma, N4762**)

%1 Penisilin Streptomisin Amfoterisin Antibiyotik (**Biological Industries, 03-031-1B**)

3.7.1.2. Metot

Dondurulmuş Vero E6 hücrelerini içeren kriyovial (1x10⁶ hücre/ml) sıvı azottan çıkarılarak, 37°C'deki su banyosunda, kapak kısmından tutulup hafifçe sallanarak, içerisinde az miktarda buz kalıncaya kadar çözdürüldü. Daha sonra kriyovial %70 etanol ile silinerek biyogüvenlik kabini içine alındı. Çözdürülen hücreler önceden 37°C'ye getirilmiş hücre hattına uygun kültür vasatı içerisine ilave edildi. Hücre süspansiyonu 1000 rpm'de 10 dk santrifüj edilip, süpernatant hücre pelletine zarar verilmeden uzaklaştırıldı. Pellet, hücre vasatı ile homojenize edildi. Hücre süspansiyonu flaska aktarıldı ve üzerine besi yerinden ilave edildi. Flask 37°C %5 CO₂'li inkübatöre

kaldırıldı. 12-24 saat sonra besi yeri değiştirildi. Hücreler flask yüzeyinde %80-90 konfluense ulaştıklarında pasajlama işlemi gerçekleştirildi.

3.7.2. Vero E6 Hücrelerinin Pasajlanması

3.7.2.1. Materyal

- Sınıf 2 Biyogüvenlik Kabini (**ADS Laminare Optimale**)
- CO₂'li İnkübatör (**Panasonic, MCO-18AC-PE**)
- İverted Mikroskop (**Leica, DM IL LED**)
- Açılır rotorlu santrifüj (**Beckman Coulter, Allegra X-22**)
- 25 cm² Flask (**Greiner Bio-one, 690175**)
- Pipet tabancası (**Gilson**)
- 10-100-1000 µl'lik Mikropipetler (**Gilson**)
- 5-10-25 ml'lik Serolojik pipetler (**Greiner Bio-one**)
- Sarf Malzemeler (Falkon tüpler, pipet uçları)
- Sodyum Bikarbonat (**Sigma, S5761**)
- Vero E6 hücre hattı (**ERAGEM hücre hattı stoğu**)

• Hücre Kültür Vasatı

DMEM-F12 (**Sigma, D8900**)

%10 NCS (**Sigma, N4762**)

%1 Penisilin Streptomisin Amfoterisin Antibiyotik (**Biological Industries, 03-031-1B**)

• Tripsin/EDTA Solüsyonu

8 gr Sodyum klorür (**Sigma, S3014**)

0,2 gr Potasyum dihidrojen fosfat (**Merck, 104873**)

1 gr D-glukoz (**Sigma, G5146**)

0,01 gr Fenol kırmızısı (**Merck, 7241**)

0,096 gr Sodyum fosfatdibazik (**Sigma, S0876**)

0,35 gr Sodyum bikarbonat (**Sigma, S7795**)

1,25 gr EDTA (**Bio-Rad, 161-0729**)

1,25 gr Tripsin (**Amresco, 0458**)

1 lt Distile su

3.7.2.2. Metot

%80-90 yoğunluğa ulaşan Vero E6 hücrelerinin bulunduğu flasktan besi yeri uzaklaştırıldı. Flaskın yüzeyini kaplayan hücreleri kaldırmak için 1ml Tripsin/EDTA solüsyonu eklendi. Tripsin/EDTA solüsyonu ilavesinden sonra flask yaklaşık 3 dk 37°C %5 CO₂'li inkübatörde bekletildi. Hücrelerin yüzeyden kalkıp kalkmadığı 30 sn aralıklarla, inverted mikroskop ile kontrol edildi. Hücreler flask yüzeyinden kaldırıldıktan sonra, kullanılan Tripsin/EDTA solüsyonu hacminin 2 katı hacimde hücre kültür vasatı ilave edildi. Hafif pipetlemelerle hücre grupları dağıtıldı. Hücre süspansiyonu bir falkon tüpe aktarıldı ve 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet hücre kültür vasatı ile homojenize edilip pleytlere aktarıldı.

3.7.3. KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit06 Suşuyla Enfekte Edilmiş Vero E6 Hücrelerinde Enfeksiyonun Farklı Zaman Aralıklarında *In vitro* NSs proteininin IFA Yöntemi ile Gösterilmesi

3.7.3.1. Materyal

- Sınıf 2 Biyogüvenlik Kabini (ADS Laminare Optimale)
- CO₂'li İnkübatör (Panasonic, MCO-18AC-PE)
- İverted Mikroskop (Leica, DM IL LED)
- Floresan Mikroskobu (Leica)
- Çalkalayıcı (Heidolph, Polymax 1040)
- Pipet tabancası (Gilson)
- 10-100-1000 µl'lik Mikropipetler (Gilson)
- 5-10-25 ml'lik Serolojik pipetler (Greiner Bio-one)
- Sarf Malzemeler (Falkon tüpler, pipet uçları)
- 96 kuyucuklu pleyt (Greiner Bio-one, 655160)
- Sodyum Bikarbonat (Sigma, S5761)
- Vero E6 hücre hattı (ERAGEM hücre hattı stoğu)
- Keçi-anti fare Ig- FITC sekonder antikoru (SouthernBiotech, 1010-02)
- Gliserol (Sigma, G5516)

- **Hücre Kültür Vasatı**

DMEM-F12 (**Sigma, D8900**)

%10 NCS (**Sigma, N4762**)

%1 Penisilin Streptomisin Amfoterisin Antibiyotik (**Biological Industries, 03-031-1B**)

- **Formalin Fiksasyon Solüsyonu:**

4 gr Sodyum Fosfat Monobazik (**Sigma, 71505**)

6,5 gr Sodyum Fosfat Dibazik (**Sigma, S0876**)

100 ml %37'lik Formaldehit (**Merck,104003**)

900 ml Distile su

- **Permeabilizasyon Solüsyonu:**

0.2 ml Triton-X100 (**Bio-Rad, 1610407**)

200 ml 1X PBS

- **TBST Solüsyonu:**

3 ml 1 M Tris-HCl (pH 8.0)

0.3 ml Tween 20 (**Merck, 822184**)

9 ml 5 M NaCl (**Sigma, S3014**)

300 ml Distile su

- **Bloklama Tamponu:**

2,5 gr yağsız süt tozu (**Pınar marka**)

50 ml 1X PBS

- **Virüs Üretme Vasatının Hazırlanması:**

DMEM-F12 (**Sigma, D8900**)

%2 NCS (**Sigma, N4762**)

%1 Penisilin Streptomisin Amfoterisin Antibiyotik (**Biological Industries, 03-031-1B**)

3.7.3.2. Metot

96 kuyucuklu pleyte Vero-E6 hücre süspansiyonundan eklendi. Hücreler bir gece 37°C %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hücreler, titresi önceden belirlenmiş KKKAH virüsü Turkey-Kelkit06 suşu ile MOI (Multiplicity of infection) 1 ve 2 olacak şekilde 1 saat enfekte edildi. İnkübasyonun ardından virüs üretme vasatı eklendi ve pleyt, enfeksiyondan sonra NSs proteininin varlığının araştırılmak istendiği süre boyunca (4-6-8-10-12-24-36-48-72 saat) 37°C %5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından hücreler formalin fiksasyon solüsyonu ile 30 dk fikse

edildi. Ardından hücreler 1 kere 1X PBS ile yıkandı. Yıkamanın ardından hücreler 4 kere permeabilize edildi. Permeabilizasyon işlemi bittikten sonra bloklama solüsyonu eklenip 30 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından, hücreler 1 kere 1X PBS ile yıkandı. pCOLD TF-NSs rekombinant antijeni ile yedinci immünizasyondan sonra elde edilen fare poliklonal serumu TBST içinde 1:500 ve/veya 1:1000 oranında dilüe edilip hücrelere uygulandı ve 1 saat inkübe edildi. Hücreler 3 kere TBST ile yıkandı. Keçi-anti fare Ig- FITC sekonder antikoru TBST içinde 1:2000 oranında hazırlanıp hücrelere uygulandı. Pleytin üzeri alüminyum folyo ile kaplandı ve 1 saat inkübe edildi. Daha sonra hücreler 3 kere TBST ile yıkandı, Yıkama solüsyonu uzaklaştırılıp her kuyucuğa %20 gliserol içeren 1X PBS konuldu. Floresans mikroskobu ile floresans ışımaya veren hücreler tespit edildi.

3.8. KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit06 Suşuyla Enfekte Edilmiş Vero E6 Lizatlarından Viral RNA Ekstraksiyonu ve NSs Geninin Revers Transkriptaz PZR Yöntemi ile Belirlenmesi

Bu amaçla 24 kuyucuklu pleyte Vero E6 hücrelerinden 250.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 500 µl hücre pasajlandı. Pleyt 37°C %5 CO₂'li inkübatörde bir gece, hücrelerin %90 konfluense ulaşması için inkübasyona bırakıldı. Hücreler KKKKAH virüsü Turkey-Kelkit 06 suşu ile MOI 0,1 olacak şekilde enfeksiyon yapıldı. Enfeksiyon sonrası incelenecek her bir saat (4-6-8-10-12-24-36-48-72) için iki kuyucuk enfekte edildi. Enfeksiyon sonrası hücre lizatlarından elde edilen viral RNA'lar revers transkriptaz ile cDNA'ya çevrilip, gen spesifik primerler ile (**Tablo 1**) viral genomda NSs gen varlığı PZR yöntemi ile araştırıldı.

3.8.1. KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit06 Suşuyla Enfekte Edilmiş Vero E6 Lizatlarından Viral RNA Ekstraksiyonu

3.8.1.1. Materyal

- Vorteks (**Heidolph, Reax top**)
- Santrifüj (**Hettich Mikro120,1204**)
- 10-100-1000 µl'lik Mikropipetler (**Gilson**)
- Mikrosantrifüj tüpleri (**Starlab, S1615-5500**)
- NanoDrop (**Thermo Scientific,2000c**)

- Viral RNA Pürifikasyon Kiti (**Qiagen, 52904**)
- %100 Etanol

3.8.1.2. Metot

560 µl Buffer AVL-Taşıyıcı RNA steril bir mikrosantrifüj tüpüne konuldu. KKKAH virüsü ile enfekte edilmiş ve enfeksiyonun farklı saatlerinde toplanmış Vero E6 hücre lizatlarından 140 µl alındı ve Buffer AVL-Taşıyıcı RNA içeren mikrosantrifüj tüpünün içerisine konuldu, 15 saniye vortekslendi, oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi. İnkübasyonun ardından mikrosantrifüj tüpünün iç duvarlarında bulunan damlacıkları bir araya toplamak için kısa bir spin edildi. 560 µl %100 etanolden örnek üzerine eklendi ve 15 sn vortekslendi. Vorteksleme işleminden sonra, ardından tüp kısa bir spin edildi. QIAamp spin kolon çıkarıldı ve 2 ml'lik koleksiyon tüpüne konuldu. 630 µl örnek kolona uygulanıp kolonun kapağı kapalı bir şekilde 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Santrifüjün ardından filtratı içeren koleksiyon tüpü atılıp, kolon temiz bir koleksiyon tüpüne yerleştirildi, işlem tekrarlandı. 500 µl Buffer AW2 kolona uygulanıp kolonun kapağı kapalı bir şekilde 14.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Santrifüjün ardından filtratı içeren koleksiyon tüpü atıldı. Kolon steril bir 1.5 ml'lik eppendorf tüpe alındı. 60 µl Buffer AVE kolonun tam ortasına dikkatlice eklenip kolonun kapağı kapatıldı, oda sıcaklığında 1 dk inkübe edildi. İnkübasyonun ardından kolon 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Nanodrop kullanılarak ekstrakte edilen viral RNA'nın miktarı belirlendi. Elde edilen viral RNA revers transkriptaz reaksiyonu ile cDNA'ya çevrilmek üzere -20°C'de muhafaza edildi.

3.8.2. KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit06 Suşuyla Enfekte Edilmiş Vero E6 Lizatlarından Viral RNA'larda Revers Transkriptaz PZR Yöntemi ile NSs Geninin Çoğaltılması

3.8.2.1. Materyal

- Thermal cycler cihazı (**Applied Biosystem GeneAmp PCR system 9700**)
- PZR tüpleri (**Molecular BioProducts, 3412A**)
- 10-100-1000 µl'lik Mikropipetler (**Gilson**)
- MLV-RT Buffer (**Promega, N251A**)
- M-MLV Revers transkriptaz enzimi (**Promega, M170B**)

- RNasin (**Promega, N251A**)
- Random primerler (**Promega, C1181**)
- 20 pmol Oligo-DT primer
- Isıtıcı (**Heidolph, MR Hei-Standard**)

3.8.2.2. Metot

KKKAH virüsü Turkey-Kelkit06 suşu ile enfekte Vero E6 hücre lizatından ekstrakte edilen 10 µl viral RNA'lar PZR tüpüne konuldu. Her bir reaksiyon için iki ayrı tüp hazırlandı. Birinci tüpteki viral RNA'ya 1 µl random primer; ikinci tüpteki viral RNA'ya 1 µl 20 pmol Oligo-DT primerden eklendi. Örnekler, 92°C'deki distile suya konuldu ve su sıcaklığı 42°C'ye gelene kadar inkübe edildi. Her bir tüp için 6µl MLV-RT Buffer, 5 µl 5 mM dNTP miksi, 1 µl RNasin ve 6 µl steril distile su konulup toplam 19 µl reaksiyon miksi hazırlandı ve inkübasyonun ardından viral RNA'ların bulunduğu PZR tüplerine eklendi. Tüpleri thermal cycler cihazına yerleştirilip 42°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından tüplere 1 µl M-MLV revers transkriptaz enzimi eklendi ve tekrar 1 saat 42°C'de thermal cycler cihazında inkübe edildi. İnkübasyonun ardından elde edilen cDNA'lar NSs genine spesifik forward ve reverse primerler kullanılarak PZR yöntemi ile test edildi.

3.9. Rekombinant pCOLD TF-NSs Proteini Kullanılarak NSs Proteinin İmmunblotlama Yöntemi ile Belirlenmesi

Bu amaçla antijen olarak prokaryotik sistemde üretilen rekombinant pCOLD TF-NSs proteini kullanıldı ve primer antikör olarak; rekombinant pCOLD TF-NSs proteini ile 7 kere immünize edilmiş poliklonal fare serumu, KKKAH IgG pozitif insan serumu, KKKAH virüsü Turkey-Kelkit06 Suşu ile immünize edilmiş poliklonal fare ve tavşan serumları test edildi.

3.9.1. İmmunblotlama (Western Blot)

3.9.1.1. Materyal

- Mini-PROTEAN Tetra Cell Sistemi (**Bio-Rad, 165-8000**)
- Transfer sistemi (**Bio-Rad, 170-3930**)
- Güç kaynağı (**Bio-Rad, 164-5052**)

- Çalkalayıcı (**Heidolph, Polymax 1040**)
- Vorteks (**Heidolph, Reax top**)
- Otoradyografi kaseti (**FisherBiotech, FBCS 810**)
- Sarf malzemeler (Falkon, beher, plastik kap)
- 10-100-1000 µl'lik Mikropipetler (**Gilson**)
- Mikrosantrifüj tüpleri (**Starlab, S1615-5500**)
- Nitroselüloz membran (**Merck, INYC00010**)
- Metanol (**Merck,106009**)
- Filtre kâğıdı (**Bio-Rad,1703932**)
- Film (**Sigma, F5763-50EA**)
- Kemilüminesan Substrat Solüsyonu 1-2 (**Thermo Scientific, 32106**)
- Keçi anti-fare IgG (**SouthernBiotech, 1010-05**)
- Keçi anti-insan IgG (**ThermoFisher, 62-8420**)
- Keçi anti-tavşan IgG (**SouthernBiotech, 4010-05**)
- 4X Laemmli Sample Buffer (**Bio-Rad,161-0747**)
- 2-Merkaptoetanol (**Bio-Rad, 161-0710**)
- TEMED (**Sigma, 110732**)
- Akrilamid (**Sigma, A8887**)
- Bisakrilamid (**Applichem, A3636**)
- Tris (**Merck, 108387**)
- SDS (**Sigma, L5750**)
- Amonyum persülfat (APS) (**Applichem, A2941**)
- **15 ml %12'lik seperasyon jeli**
- 4,9 ml Distile su
- 6 ml %30'luk akrilamid/bisakrilamid karışımı
- 3,8 ml 1,5 M Tris (pH 8.8)
- 0,15 ml %10 SDS
- 0,15 ml %10 APS
- 0,012 ml TEMED
- **6 ml %5'lik yükleme jeli**
- 4,1 ml Distile su
- 1 ml %30'luk akrilamid/bisakrilamid karışımı

0,75 ml 1 M Tris (pH 6.8)

0,06 ml %10 SDS

0,06 ml %10 APS

0,006 ml TEMED

• 10X Tris/Glisin/SDS Yürütme Tamponu (**Bio-Rad, 161-0771**)

• **Yıkama Solüsyonu:**

500 ml 1X PBS

0.5 ml Tween 20 (**Merck, 822184**)

• **Transfer Tamponu:**

3.03 gr Tris (**Sigma, T1503**)

14.4 gr Glisin (**Merck, 104201**)

200 ml Metanol (**Merck, 106009**)

800 ml Distile su

• **Bloklama Solüsyonu:**

50 ml PBS-Tween 20

2,5 gr yağsız süt tozu (**Pınar marka**)

• **Developer Solüsyonu:**

400 ml Developer solüsyonu (**Sigma, P7042-5GA**)

1600 ml Distile su

• **Fiksasyon Solüsyonu:**

400 ml Fiksasyon solüsyonu (**Kodak, 190 2485**)

1600 ml Distile su

3.9.1.2. Metot

pCOLD TF-NSs rekombinant antijeninden 3 µg, PEG Presipite KKKAH virüs antijeninden 12 µg alınıp yükleme tamponu (900 µl 4X Laemmli Sample Buffer + 100 µl 2-merkaptotanol) ile 1:3 oranında karıştırılıp 95°C'deki suda 5 dakika ısıtıldı ve jele yükleme yapıldı. SDS- PAGE bittikten sonra jel sistem üzerinden çıkartıldı. Nitroselüloz membran, SDS jelin büyüklüğünde kesildi ve metanol ile 5 dk aktive edildi. Proteinlerin jelden membrana transferini sağlamak için kullanılacak malzemeler transfer tamponu ile doldurulmuş kabın içine konuldu. Transfer tampon içerisinde kasetin üzerine sırasıyla fiber ped, filtre kâğıdı, jel, membran, filtre kâğıdı ve fiber ped yerleştirildikten sonra kasetin kapağı kapatıldı. Kaset tank içerisine yerleştirildi, tank

içerisine küçük bir manyetik boncuk konuldu. Transfer tamponu tankta işaretli yere kadar doldurulup, tank manyetik karıştırıcının üzerine oturtuldu ve güç kaynağına bağlandı. Transfer işlemi bir gece 30 Voltta gerçekleştirildi. Transfer işleminin ardından membran temiz bir plastik kap içerisine alınıp yıkama solüsyonu ile bir kere yıkandı. Membran üzerine bloklama solüsyonu konulup 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından yıkama solüsyonu ile membran bir kere yıkandı. Bloklama tamponu içerisinde primer antikor solüsyonu -pCOLD TF-NSs rekombinant antijeni ile 7 kere immünize edilmiş poliklonal fare serumu 1:5000 dilüsyonda; KKKAH virüsü IgG pozitif insan serumu 1:500 dilüsyonda, KKKAH virüsü ile immünize poliklonal fare serumu 1:500 dilüsyonda; KKKAH virüsü ile immünize poliklonal tavşan serumu 1:3000 dilüsyonda- hazırlandı. Membranın üzerine primer antikor solüsyonu eklendikten sonra 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından 3 kere yıkama solüsyonu ile membran yıkandı. Bloklama tamponu içerisinde sekonder antikor solüsyonu -Keçi anti-fare IgG 1:2500; Keçi anti-insan IgG 1:2000; Keçi anti-tavşan IgG 1:3000 dilüsyonda- hazırlandı. Membranın üzerine sekonder antikor solüsyonu eklendikten sonra 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından 3 kere yıkama solüsyonu ile membran yıkandı. Yıkamanın ardından kemilüminesans substrat 1'den 1 ml ve kemilüminesans substrat 2'den membran üzerine konulup 3 dk beklenildi. Membran temiz bir asetat üzerine alındı. Üzeri streç film ile kapatılıp otoradyografi kasetinin içerisine yerleştirildi. Bandın genişliğine bağlı olarak etki süresi belirlendi. Film kasetten çıkarıldıktan sonra sırasıyla developer solüsyonu, distile su ve fiksasyon solüsyonunda 1 dakika bekletildi.

3.10. KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit06 Suşu NSs Geninin Memeli Hücrelerine plazmid DNA Aracılı Transfeksiyonu ve Memeli Hücrelerinde NSs Proteininin Ekspresyonunun Belirlenmesi

Bu amaçla bir memeli ekspresyon vektörü olan pcDNA 3.1/V5-His TOPO plazmid DNA kullanıldı. KKKAH virüsü Turkey-Kelkit06 suşu NSs geni PZR yöntemi ile çoğaltılıp TOPO klonlama reaksiyonu ile plazmid DNA içerisine yerleştirildi. Elde edilen plazmid DNA Vero E6 hücrelerine lipid aracılı transfeksiyon yapıldı; MG132 proteozom inhibitörü uygulanan ve uygulanmayan transfekte hücre lizatlarında NSs proteininin ekspresyonu araştırıldı.

3.10.1. KKKAH virüsü NSs'in PZR ile Çoğaltılması

3.10.1.1. Materyal

- pcDNA 3.1/V5-His TOPO TA Expresyon Kiti (**İnvitrogen, K480001**)
- Platinum *Taq* DNA polimeraz HF (**İnvitrogen, 11304011**)
- Thermal cycler cihazı (**Applied Biosystem GeneAmp PCR system 9700**)
- PZR tüpleri (**Molecular BioProducts, 3412A**)
- 10-100-1000 µl'lik Mikropipetler (**Gilson**)
- Agaroz (**Fisherbrand, 3153131**)
- Etidyum bromür (**Promega, H5041**)
- 50X TAE (Tris-Asetat-EDTA) Tampon Çözeltilisi
242g Tris (**Merck, 108387**)
57.1 ml Asetik asit (**Merck, 100063**)
0.5 M EDTA, pH 8.0 (**Bio-Rad, 161-0729**)

3.10.1.2. Metot

50 ng/µl pCOLD TF-NSs plazmid DNA kalıp olarak kullanılarak, her bir reaksiyon için 0.2 ml PZR tüplerine 5 µl 10X PCR Buffer, 0,5 µl 50 mM dNTP miksi, 2 µl 20 pMol NSs forward primer, 2 µl 20 pMol NSs reverse primer (**Tablo 1**), 38,5 µl steril distile su ve 1 µl Platinum *Taq* DNA polimeraz enzimi konularak reaksiyon hacmi 50 µl'e tamamlandı. Tüpler thermal cycler cihazına yerleştirildi. PZR siklus adımları; **Tablo 4'de** belirtildiği şekilde ayarlandı. Elde edilen PZR ürünleri %1 agaroz jelde agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi.

Tablo 4. TOPO Klonlama için PZR'de ayarlanan zaman ve sıcaklık göstergeleri

<i>Basamak</i>	<i>Zaman</i>	<i>Sıcaklık</i>	<i>Siklus</i>
Başlangıç Denatürasyonu	30 sn	94°C	1X
Denatürasyon	10 sn	94°C	
Bağlanma	20 sn	55°C	30X
Uzatma	45 sn	72°C	
Final Uzatma	30 dk	72°C	1X

3.10.2. PZR Ürününün (NSs) Agaroz Jelden Ekstraksiyonu

3.10.2.1. Materyal

- Isıtıcı blok (**Benchmark**)
- Hassas tartı (**Ohaus, Adventure Pro AV4102C**)
- Vorteks (**Heidolph, Reax top**)
- Santrifüj (**Hettich Mikro120,1204**)
- 10-100-1000 µl'lik Mikropipetler (**Gilson**)
- Mikrosantrifüj tüpleri (**Starlab, S1615-5500**)
- Bistüri (**Broche**)
- Jel Ekstraksiyon Kiti (**Qiagen, 28706**)
- İzopropanol (**Merck, 109634**)
- Agaroz (**Fisherbrand, 3153131**)
- Etidyum bromür (**Promega, H5041**)
- 50X TAE (Tris-Asetat-EDTA) Tampon Çözeltisi
242g Tris (**Merck, 108387**)
57.1 ml Asetik asit (**Merck,**
0.5 M EDTA, pH 8.0 (**Bio-Rad, 161-0729**)
- 1X TE Tampon Çözeltisi
1 mM EDTA, pH 8.0 (**Bio-Rad, 161-0729**)
10 mM Tris, pH 8.0 (**Merck, 108387**)

3.10.2.2. Metot

Jel Ekstraksiyon kiti (QIAGEN, 28706) kullanılarak 3.2.4.2.'deki metotta belirtildiği gibi agaroz jelden pcDNA3.1/V5-His-TOPO vektörüne klonlanacak olan NSs'in ekstraksiyonu gerçekleştirildi.

3.10.3. pcDNA3.1/V5-His-TOPO TA Ekspresyon Vektörüne Klonlama

3.10.3.1. Materyal

- pcDNA 3.1/V5-His TOPO TA Ekspresyon Kiti (**İnvitrogen, K480001**)
- PZR tüpleri (**Molecular BioProducts, 3412A**)

- 10-100-1000 µl'lik Mikropipetler (**Gilson**)

3.10.3.2. Metot

Agaroz jelden yeni pürifiye edilmiş 3µl NSs, 1 µl tuz solüsyonu, 1 µl TOPO vektör DNA, 1 µl steril distile su bir PZR tüpünün içinde karıştırılıp 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Transformasyondan önce reaksiyon miksi buz üzerine alındı.

3.10.4. One Shot TOP10 *E.coli* Kimyasal Kompetan Hücrelerine Transformasyon

3.10.4.1. Materyal

- Su banyosu (**Memmert, WNB14**)
- Otoklav (**Hirayama-Hiclave HVE-85L**)
- Etüv (**Memmert**)
- Çalkalayıcı inkübatör (**IKA KS 4000i**)
- Sarf malzemeler (Petri, Erlen mayer)
- 10-100-1000 µl'lik Mikropipetler (**Gilson**)
- *E. coli* One Shot TOP10 kimyasal kompetan hücre (**İnvitrogen, C404003**)
- Ampisilin (**Sigma, A0166**)
- **LB (Luria-Bertani) Sıvı Besiyeri**
%1 Tripton (**Merck, 107213**)
%0,5 Maya özütü (**Merck, 103753**)
%1 NaCl (**Sigma, S3014**)
1 lt distile su
- **LB (Luria-Bertani) Katı Besiyeri**
%1 Tripton (**Merck, 107213**)
%0,5 Maya özütü (**Merck, 103753**)
%1 NaCl (**Sigma, S3014**)
%1,5 Agar (**Merck,101614**)
1 l distile su

3.10.4.2. Metot

One Shot TOP10 *E. coli* kimyasal kompetan hücrelerden bir tane (100 µl) alınarak -80 °C'den çıkartıldı ve hücreler buz üzerinde çözündürülür. 2 µl TOPO klonlama reaksiyon

miksinden alındı ve kompetan hücrelere bırakıldı. Hücreler buz üzerinde 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler 42°C'ye ısıtılmış su banyosunda 45 sn bekletildi. Hücreler tekrar buza alınarak 5 dk inkübe edildi, üzerlerine 250 µl LB sıvı besiyeri eklenip 37 °C'de 225 rpm'deki çalkalayıcıda 1 saat inkübe edildi. Süre sonunda 25,50,75,100 µl hücre süspansiyonundan alındı; 100 µg/ml ampisilin ile hazırlanmış katı besi yerlerine ayrı ayrı ekim yapıldı ve 37 °C'deki etüvde bir gece bekletildi. Transformasyondan sonra elde edilen kolonilerin analizi için **3.2.7'de** açıklandığı gibi Koloni PZR yapıldı.

3.10.5. pcDNA 3.1/V5-His TOPO-NSs Plazmid DNA'nın Restriksiyon Kesim Enzimleri ile Kesilmesi

3.10.5.1. Materyal

- Etüv (**Memmert**)
- 10-100-1000 µl'lik Mikropipetler (**Gilson**)
- PZR tüpleri (**Molecular BioProducts, 3412A**)
- DNaz/RNaz içermeyen steril distile su (**Gibco, 10977015**)
- NEBuffer 3.1 (**NEB, B7203S**)
- 20 U/µL *BamHI* (**NEB, R0136**)
- 20 U/µL *XhoI* (**NEB, R0146**)
- 20 U/µL *XbaI* (**NEB, R0145**)

3.10.5.2. Metot

Klonlamanın kontrolü için restriksiyon kesim enzimleri ile **Tablo 5.** ve **Tablo 6.** belirtilen miktarlarda bileşenler kullanıldı; plazmid DNA'nın çift kesimi yapılarak NSs'in vektör içindeki yerinin doğruluğu teyit edildi.

Tablo 5. *BamHI* ve *XbaI* enzimleri ile çift kesim reaksiyonu

<i>Bileşen</i>	<i>Miktar</i>
NEBuffer 3.1	5 µl
pcDNA 3.1/V5-His TOPO-NSs plazmid DNA	1 µl
<i>BamHI</i>	1 µl
<i>XbaI</i>	1 µl
Steril distile su	42 µl
Toplam Hacim	50 µl

Tablo 6. *XhoI* ve *XbaI* enzimleri ile çift kesim reaksiyonu

<i>Bileşen</i>	<i>Miktar</i>
NEBuffer 3.1	5 µl
pcDNA 3.1/V5-His TOPO-NSs plazmid DNA	1 µl
<i>XhoI</i>	1 µl
<i>XbaI</i>	1 µl
Steril distile su	42 µl
Toplam Hacim	50 µl

3.10.6. pcDNA 3.1/V5-His TOPO-NSs plazmid DNA'nın Vero E6 Hücrelerine Lipid Aracılı Transfeksiyonu

3.10.6.1. Materyal

- Sınıf 2 Biyogüvenlik Kabini (**ADS Laminare Optimale**)
- İverted Mikroskop (**Leica, DM IL LED**)
- CO₂'li İnkübatör (**Panasonic, MCO-18AC-PE**)
- Açılır rotorlu santrifüj (**Beckman Coulter, Allegra X-22**)
- Santrifüj (**Hettich, Mikro 220R**)
- 10-100-1000 µl'lik Mikropipetler (**Gilson**)
- Serolojik Pipetler (Greiner Bio-one)
- 24 kuyucuklu pleyt (**Corning, 3527**)
- Lipofectamine 2000 (**İnvitrogen, 11668-027**)
- NCS (**Sigma, D8418**)
- DMEM F12 (**Sigma, D8900**)
- MG132 (**Sigma, M7449**)

3.10.6.2. Metot

Transfeksiyondan bir gün önce, 500 µl %10 NCS içeren ve antibiyotik içermeyen DMEM F12 hücre vasatı ile Vero E6 hücreleri, 24 kuyucuklu pleytte 2.5×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde kültüre edildi Hücrelerin %70-90 yoğunluğa ulaşması için beklendi. Transfeksiyona başlanmadan önce hücrelerin üzerindeki serum içeren vasat yavaşça aspire edildi ve kalan serumu uzaklaştırmak için hücreler 1 kere 1X PBS ile yıkandı. Daha sonra 500 µl serum ve antibiyotik içermeyen DMEM F12 vasatı hücrelerin üzerine yavaşça eklendi. Lipofectamine 2000 reaktifi hafifçe vortekslendi. 50

μ l DMEM F12 hücre vasatı içerisine 2 μ l eklenerek reaktif dilüsyonu hazırlandı, 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. 50 μ l DMEM F12 hücre vasatı içerisine 1 μ g pcDNA 3.1/V5-His TOPO-NSs plazmid DNA eklenip hafifçe karıştırıldı. Daha sonra hazırlanan bu 50 μ l reaktif dilüsyonuna 50 μ l plazmid DNA dilüsyonu eklenip hafifçe karıştırıldı. Oluşan bu DNA-lipid kompleksi 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Hazırlanan 100 μ l'lik kompleks hücrelerin üzerine eklendi. Pleyt yavaşça ileri geri sallanarak, kompleksin vasat içerisine homojen dağılması sağlandı. Hücreler 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübe edildi. Hücreler toplanmadan 4 saat önce hücrelerin üzerindeki vasat yavaşça aspire edildi. 10 μ M konsantrasyonda MG132 proteazom inhibitörü eklendi. Pleyt tekrar 37°C %5 CO₂'li inkübatöre kaldırıldı. Transfeksiyondan 24 saat sonra hücre lizatları immunblotlama ile analiz edildi.

3.10.7. İmmunblotlama

3.10.7.1. Materyal

- Mini-PROTEAN Tetra Cell Sistemi (**Bio-Rad, 165-8000**)
- Transfer sistemi (**Bio-Rad, 170-3930**)
- Güç kaynağı (**Bio-Rad, 164-5052**)
- Çalkalayıcı (**Heidolph, Polymax 1040**)
- Vorteks (**Heidolph, Reax top**)
- Otoradyografi kaseti (**FisherBiotech, FBCS 810**)
- Sarf malzemeler (Falkon, beher, plastik kap)
- 10-100-1000 μ l'lik Mikropipetler (**Gilson**)
- Mikrosantrifüj tüpleri (**Starlab, S1615-5500**)
- Nitroselüloz membran (**Merck, INYC00010**)
- Metanol (**Merck,106009**)
- Filtre kâğıdı (**Bio-Rad,1703932**)
- Film (**Sigma, F5763-50EA**)
- Kemilüminesan Substrat Solüsyonu 1-2 (**Thermo Scientific, 32106**)
- Keçi anti-fare IgG (**SouthernBiotech, 1010-05**)
- 4X Laemmli Sample Buffer (**Bio-Rad,161-0747**)
- 2-Merkaptoetanol (**Bio-Rad, 161-0710**)
- TEMED (**Sigma, 110732**)

- Akrilamid (Sigma, A8887)
- Bisakrilamid (Applichem, A3636)
- Tris (Merck, 108387)
- SDS (Sigma, L5750)
- Amonyum persülfat (APS) (Applichem, A2941)
- **15 ml %12'lik seperasyon jeli**
4,9 ml Distile su
6 ml %30'luk akrilamid/bisakrilamid karışımı
3,8 ml 1,5 M Tris (pH 8.8)
0,15 ml %10 SDS
0,15 ml %10 APS
0,012 ml TEMED
- **6 ml %5'lik yükleme jeli**
4,1 ml Distile su
1 ml %30'luk akrilamid/bisakrilamid karışımı
0,75 ml 1 M Tris (pH 6.8)
0,06 ml %10 SDS
0,06 ml %10 APS
0,006 ml TEMED
- 10X Tris/Glisin/SDS Yürütme Tamponu (Bio-Rad, 161-0771)
- **Yıkama Solüsyonu:**
500 ml 1X PBS
0.5 ml Tween 20 (Merck, 822184)
- **Transfer Tamponu:**
3.03 gr Tris (Sigma, T1503)
14.4 gr Glisin (Merck, 104201)
200 ml Metanol (Merck, 106009)
800 ml Distile su
- **Bloklama Solüsyonu:**
50 ml PBS-Tween 20
2,5 gr yağsız süt tozu (Pınar marka)
- **Developer Solüsyonu:**

400 ml Developer solüsyonu (**Sigma, P7042-5GA**)

1600 ml Distile su

• **Fiksasyon Solüsyonu:**

400 ml Fiksasyon solüsyonu (**Kodak, 190 2485**)

1600 ml Distile su

• **Lizis Tamponu:**

150 mM NaCl (**Sigma, S3014**)

50 mM Tris, pH 8.0 (**Merck, 108387**)

%1 v/v Triton X-100 (**BioRad, 1610407**)

5 mM EDTA, pH 8.0 (**BioRad, 161-0729**)

%0,5 Sodium deoxycholate (**Sigma, 30970**)

%0,1 SDS (**Sigma, L5750**)

Proteaz inhibitör kokteyli (**Roche, 11873580001**)

Distile su

3.10.7.2. Metot

Transfeksiyondan 24 saat sonra hücrelerin lizisi için pleyt buz üzerine alındı. Hücreler, plastik hücre kazıyıcı yardımı ile pleyt yüzeyinden kaldırıldı. Hücre süspansiyonu steril bir mikrosantrifüj tüpüne konuldu ve 4°C'de 5000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Yıkamanın ardından lizis buffer ile hücreler resüspanse edildi. Hücre lizatı 3 kere -80°'de dondurulup-çözdürülerek hücrelerin daha iyi lizis olmaları sağlandı. Son olarak, hücre lizatı 4°C'de 13.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Lizat steril bir eppendorfa konulup immunblotlama yöntemi ile analiz edildi. Lizatlar SDS-PAGE ile jelde yürütüldükten sonra yükleme jeli dikkatlice separasyon jelinden ayrılıp atıldı. Nitroselüloz membran, SDS jelin büyüklüğünde kesilip metanol ile 5 dk aktive edildi. Proteinlerin jelden membrana transferini sağlamak için kullanılacak malzemeler transfer tamponu ile doldurulmuş kabın içine konuldu. Transfer tampon içerisinde kasetin üzerine sırasıyla fiber ped, filtre kâğıdı, jel, membran, filtre kâğıdı ve fiber ped yerleştirildikten sonra kasetin kapağı kapatıldı. Kaset tank içerisine yerleştirildi, tank içerisine küçük bir manyetik boncuk konuldu. Transfer işlemi bir gece 30 Voltta gerçekleştirildi. Transfer işleminin ardından membran yıkama solüsyonu ile bir kere yıkandı. Membranın üzerini kaplayacak kadar bloklama solüsyonu ile 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından yıkama solüsyonu ile membran bir kere

yıkandı. Bloklama tamponu içerisinde primer antikör solüsyonu pCOLD TF-NSs rekombinant antijeni ile 7 kere immünize edilmiş poliklonal fare serumu 1:2000 dilüsyonda- hazırlandı. Membranın üzerine primer antikör solüsyonu eklendikten sonra çalkalayıcıda 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından 3 kere yıkama solüsyonu ile membran yıkandı. Bloklama tamponu içerisinde Keçi anti-fare IgG 1:2000 dilüsyonda hazırlandı. Membranın üzerine sekonder antikör solüsyonu eklendikten sonra çalkalayıcıda 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından 3 kere yıkama solüsyonu ile membran yıkandı. Yıkamanın ardından kemilüminesans substrat 1'den 1 ml ve kemilüminesans substrat 2'den membran üzerine eklendi. Membran temiz bir asetat üzerine alındı. Üzeri streç film ile kapatılıp otoradyografi kasetinin içerisine yerleştirildi. Bandın genişliğine bağlı olarak etki süresi belirlendi. Film kasetten çıkarıldıktan sonra sırasıyla developer solüsyonu, distile suve fiksasyon solüsyonunda bekletildi.

3.11. Küçük interferans RNA (siRNA'lar) Kullanılarak KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit06 Suşu NSs Geninin Susturulması ve NSs'in Virüs Titrasyonuna Etkisinin Belirlenmesi

Bu amaçla, BLOCK-iT RNAi Designer programı kullanılarak KKKAH virüsü Turkey-Kelkit06 Suşu NSs transkriptini hedef alan 3 tane siRNA molekülü, pozitif kontrol olarak 1 tane KKKAH virüsü Turkey-Kelkit06 Suşu NP genini hedef alan siRNA molekülü dizayn edildi. Liyofilize formda olan, 20 nMol konsantrasyondaki siRNA duplekslerinin bulunduğu tüpler -20°C'den çıkarılıp kısa bir spin edildi. 100 µM stok solüsyon elde etmek için 200 µl DEPC-treated su eklenip, hafifçe karıştırıldı. 10 µM konsantrasyonda alikotlama yapıldı.

3.11.1. KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit06 Suşu NSs Genini Hedef Alan siRNA'ların Vero E6 Hücrelerine Transfeksiyonu

3.11.1.1. Materyal

- Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Thermo Fisher, 31985062)
- Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher, 13778075)
- CO₂'li inkübatör (Panasonic, MCO-18AC-PE)
- Vorteks (Heidolph, Reax top)

- NCS (Sigma, D8418)
- DMEM F12 (Sigma, D8900)
- 24 kuyucuklu pleyt
- Mikrosantrifüj tüpleri (Starlab, S1615-5500)

3.11.1.2. Metot

Transfeksiyondan birgün önce, transfeksiyon sırasında hücre yoğunluğu %30-50 olacak şekilde, antibiyotik içermeyen vasat içerisinde Vero E6 hücreleri 24 kuyucuklu pleyte pasajlandı. Transfeksiyondan önce hücre üzerindeki vasat uzaklaştırılıp, hücrelerin üzerinde Opti-MEM I Reduced Serum Medium eklendi. Transfekte edilecek her bir kuyucuk için, RNAi dupleks-Lipofectamine RNAiMAX kompleksi hazırlandı: 6 pmol siRNA 50 µl Opti-MEM I Reduced Serum Medium içerisinde dilüe edilip hafifçe karıştırıldı. Lipofectamine kullanmadan önce hafifçe vortekslendi. 1 µl Lipofectamine RNAiMAX 50 µl Opti-MEM I Reduced Serum Medium içerisinde dilüe edilip hafifçe karıştırıldı. Karışım oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi. Dilüe siRNA duplesi ile dilüe Lipofectamine RNAiMAX karıştırıldı ve oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. 100 µl siRNA dupleks- Lipofectamine RNAiMAX kompleksi kuyucuğa konuldu; böylece bir kuyucukta final RNA konsantrasyonu 10 nM oldu. Pleyt yavaşça ileri geri sallanarak, kompleksin vasat içerisine homojen dağılması sağlandı. Hücreler 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde 8 saat inkübe edildi. Transfeksiyondan 8 saat sonra hücreler KKKAH virüsü ile MOI 0.01 olacak şekilde 1 saat enfekte edildi. Enfeksiyondan sonra virüs içeren vasat yavaşça aspire edildi ve %2 NCS içeren DMEM F-12'den her bir kuyucuğa eklendi. Enfeksiyondan 24 saat sonra hücre lizatları toplamp dondur-çöz işlemi ile liziz edilerek ve -80°C'de muhafaza edildi.

3.11.2. Virüsün Titresinin Belirlenmesi

3.11.2.1. Materyal

- Sınıf 2 Biyogüvenlik Kabini (ADS Laminare Optimale)
- CO₂'li İnkübatör (Panasonic, MCO-18AC-PE)
- İverted Mikroskop (Leica, DM IL LED)
- Floresan Mikroskobu (Leica)
- Çalkalayıcı (Heidolph, Polymax 1040)

- Pipet tabancası (**Gilson**)
- 10-100-1000 μ l'lik Mikropipetler (**Gilson**)
- 5-10-25 ml'lik Serolojik pipetler (**Greiner Bio-one**)
- Sarf Malzemeler (Falkon tüpler, pipet uçları)
- 60 mm petri (**Corning, CLS430166**)
- 96 kuyucuklu pleyt (**Greiner Bio-one, 655160**)
- Sodyum Bikarbonat (**Sigma, S5761**)
- Vero E6 hücre hattı (**ERAGEM hücre hattı stoğu**)
- MG132 Proteozom İnhibitörü (**Sigma, M7449**)
- Keçi-anti tavşan Ig- FITC sekonder antikoru (**SouthernBiotech, 4030-02**)
- Gliserol (**Sigma, G5516**)
- **Hücre Kültür Vasatı**
- DMEM-F12 (**Sigma, D8900**)
- %10 NCS (**Sigma, N4762**)
- %1 Penisilin Streptomisin Amfoterisin Antibiyotik (**Biological Industries, 03-031-1B**)
- **Formalin Fiksasyon Solüsyonu:**
- 4 gr Sodyum Fosfat Monobazik (**Sigma, 71505**)
- 6,5 gr Sodyum Fosfat Dibazik (**Sigma, S0876**)
- 100 ml %37'lik Formaldehit (**Merck,104003**)
- 900 ml Distile su
- **Permeabilizasyon Solüsyonu:**
- 0.2 ml Triton-X100 (**Bio-Rad, 1610407**)
- 200 ml 1X PBS
- TBST Solüsyonu:**
- 3 ml 1 M Tris-HCl (pH 8.0)
- 0.3 ml Tween 20 (**Merck, 822184**)
- 9 ml 5 M NaCl (**Sigma, S3014**)
- 300 ml Distile su
- **Bloklama Tamponu:**
- 2,5 gr yağsız süt tozu (**Pınar marka**)
- 50 ml 1X PBS

• **Virüs Üretme Vasatı:**

DMEM-F12 (Sigma, D8900)

%2 NCS (Sigma, N4762)

%1 Penisilin Streptomisin Amfoterisin Antibiyotik (Biological Industries, 03-031-1B)

• **%2 CMC Solüsyonu:**

2 gr CMC (Sigma, C9481)

100 ml Distile su

3.11.2.2. Metot

96 kuyucuklu pleyte Vero E6 hücreleri 37°C %5 CO₂'li inkübatörde %90 yoğunluğa ulaşana kadar inkübe edildi. Ertesigün siRNA'lar ile transfekte edildikten sonra KKKAHV ile enfekte edilmiş Vero E6 hücre lizatlarının sırasıyla 10⁻¹' den 10⁻⁷'e kadar dilüsyonları yapıldı. Pleytteki hücre vasatları yavaşça aspire edildi. Hazırlanan lizat dilüsyonları yavaşça her kuyucuğa eşit miktarda eklenip hücreler 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından DMEM-F12/CMC karışımından yavaşça her kuyucuğa eklendi. Pleyt 3 gün 37°C %5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından formalin fiksasyon solüsyonu her kuyucuğa yavaşça eklendi; pleyt 30 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından hücreler 1 kere 1X PBS ile yıkandı. Yıkamanın ardından 4 kere permeabilizasyon yapıldı. Permeabilizasyon işlemi bittikten sonra bloklama solüsyonu her kuyucuğa eklendi ve pleyt 30 dk inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, bloklama solüsyonu uzaklaştırıldı. Hücreler 1 kere 1X PBS ile yıkandı. Primer antikor TBST içinde; KKKAH virüsü pozitif poliklonal tavşan serumu 1:1000 oranında hazırlanıp hücrelere uygulandı ve 1 saat inkübe edildi. Hücreler 3 kere TBST ile yıkandı. Keçi-anti tavşan Ig- FITC sekonder TBST içinde 1:2000 oranında oranında hazırlanıp hücrelere uygulandı. Pleytin üzeri alüminyum folyo ile kaplandı ve 1 saat inkübe edildi. Daha sonra hücreler 3 kere TBST ile yıkandı, Yıkama solüsyonu uzaklaştırılıp her kuyucuğa %20 gliserol içeren 1X PBS konuldu. Floresans mikroskopu ile floresans ışımaya veren hücreler tespit edildi. Aşağıdaki formüle göre virüsün titresini belirlendi:

Toplam floresan plak sayısı

Virüs miktarı (ml) x Dilüsyon faktörü

4. BULGULAR

4.1. KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit06 Suşu NSs Geninin DNA Sekansı ve NSs Proteini Aminoasit Sekansı

KKKAH virüsü Turkey-Kelkit06 suşu (GenBank: GQ337053.1) 1673 nükleotitlik S segmentine ait DNA sekansında yer alan, NSs proteinini sentezleyen açık okuma çerçevesi ORFFinder biyoinformatik programı kullanılarak belirlendi. NSs geninin 906. nükleotide başlayan 433. nükleotide son bulan 477 bp'lik DNA sekansı ExpASy Translate programı kullanılarak transle edildi ve NSs proteinine ait 158 aminoasitlik protein dizilimi belirlendi.

```
5'...CCAACAGGCTGCTCTTAAGTGGAGGAAGGACATAGGTTTCCGTGTCAAC
GCAAACACGGCAGCCTTAAGCAACAAAGTCCTTGCAGAATACAAAGTCCCT
GGTGAAATTGTGATGTCTGTAAAGAAATGCTGTCAGACATGATTAGAAGG
AGGAATCTAATTCTCAACAGGGGCGGTGATGAAAATCCACGCGGCCAGTG
AGCCGTGAACATGTGGAGTGGTGCAGGGAATTTGTCAAAGGCAAGTACATC
ATGGCTTTCAATCCACCTTGGGGGGACATCAACAAATCAGGTCGTTTCGGGA
ATAGCACTTGTTGCAACAGGCCTTGCCAAGCTTGCAGAGACCGAGGGGAAA
GGAGTTTTTGACGAAGCTAAGAAGACCGTGGAGGCTCTCAATGGGTATTTG
GACAAGCACAGGGACGAAGTCGACAAAGCAAGTGCTGACAGCATGATAAC
AAACCTCCCTAAGCACAT...3'
```

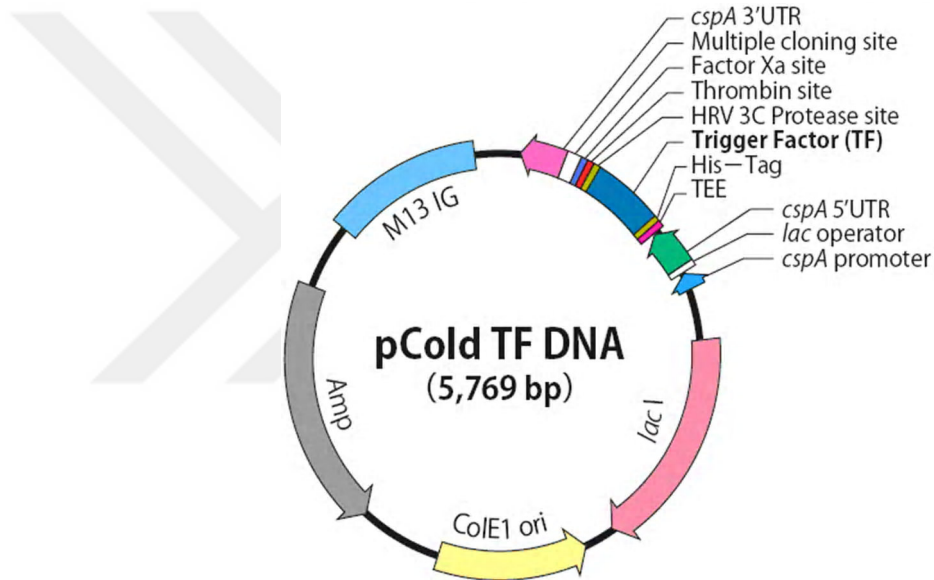
Şekil 13. KKKAH virüsü NSs Geni DNA Sekansı

MCLGRFVIMLSALALSTSSLCLSKYPLRASTVFLASSKTP
 FPSVVSASLARPVATS AIPERPDLLMSPQGGLKAMMYLPL
 TNSLHHSTCSRLTGPRGFSSPPLL RIRFLLIMSDSISLTD
 ITISPGTLYSARTLLLKAAVFALTRKPM SFLHLRAACW

Şekil 14. KKKAH virüsü NSs proteinine ait aminoasit dizilimi

4.2. pCOLD TF Plazmid DNA Ekstraksiyonu

KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit 06 Suşu NSs Proteinin prokaryotik sistemde eksprese edilebilmesi için 5769 bp uzunluğundaki pCOLD TF taşıyıcı vektörü seçildi.



Şekil 15. pCOLD TF vektör haritası

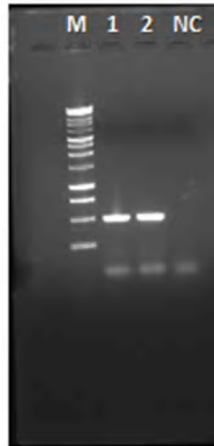
Plazmid DNA'nın E. coli JM109 kimyasal kompetan hücrelerine transforme edildi. pCOLD TF plazmid DNA'sını içeren hücrelerden, DNA ekstraksiyonu yapıldı. Elde edilen plazmid DNA 60 µl 1X TE buffer da çözüldü. Plazmid DNA miktarını belirlemek için NanoDrop 2000c kullanıldı. DNA miktarı 2945.4 ng/µl belirlendi. 260/280 oranı: 1.89 ve 260/230 oranı: 2.20 saptandı. Daha sonra plazmid DNA'yı görüntülemek için %1 lik agaroz jel elektroforezi yapıldı. UV kullanılarak jeldeki plazmid DNA'nın görüntüsü alındı.



Şekil 16. pCOLD TF plazmid DNA agaroz jel görüntüsü. *Hat M.* 10000 bp DNA Ladder *Hat 1.* pCOLD TF plazmid DNA

4.3. KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit06 Suşu NSs Geninin PZR Yöntemi ile Çoğaltılması

KKKAH pozitif serum örneklerinin RNA'sından elde edilen cDNA kalıp olarak kullanılarak, gen spesifik primerlerle KKKAH virüsü NSs geni PZR ile çoğaltıldı. Negatif kontrol olarak cDNA yerine steril nükleaz içermeyen su kullanıldı.

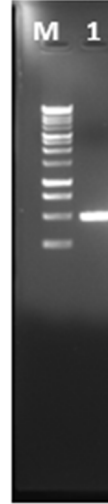


Şekil 17. PZR yöntemi ile çoğaltılan NSs'in agaroz jel görüntüsü *Hat M.* 10000 bp DNA Ladder *Hat 1.ve Hat2.* PZR ile çoğaltılmış NSs geni (477 bp) *Hat NC.* Negatif Kontrol

4.4. NSs Geni PZR Ürününün Agaroz Jelden Ekstraksiyonu ve Pürifikasyonu

PZR yöntemi ile çoğaltılan NSs geni %1 agaroz jele yüklendi. 150 V'da 20 dk elektroforez tankında yürütüldü. Steril bistüri ile jelden kesilip kit yardımıyla pürifikasyonu yapıldı. 30 µl 1X TE tamponunda çözüldü. Pürifiye NSs miktarını

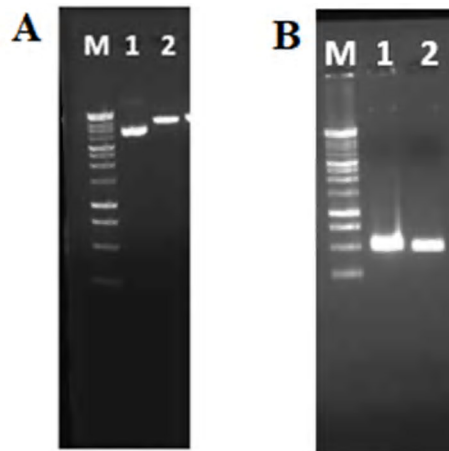
belirlemek için NanoDrop 2000c kullanıldı. NSs DNA miktarı 355 ng/ μ l olarak belirlendi.



Şekil 18. NSs geninin agaroz jel ekstraksiyonu sonrası görüntüsü. **Hat M.** 10000 bp DNA Ladder **Hat 1.** PZR ile çoğaltılıp agaroz jelden ekstrakte edilen NSs geni (477 bp)

4.5. pCOLD TF plazmid DNA ve NSs Geninin Restriksiyon Kesim Enzimleriyle Kesilmesi

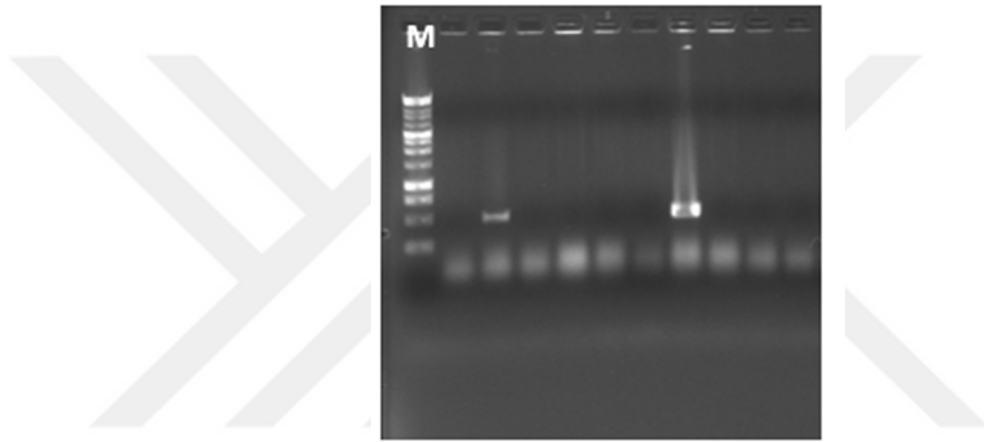
Plazmid DNA ekstraksiyonu yapılan 3 μ g pCOLD TF vektör DNA ve PZR yöntemi ile çoğaltılıp agaroz jelden ekstrakte edilen 2 μ g NSs DNA *XhoI* ve *BamHI* restriksiyon kesim enzimleri ile 37°C'de 3 saat kesildi. Kesim sonrası plazmid DNA ve insert DNA (NSs) ligasyon işlemi için agaroz jelden ekstrakte edildi.



Şekil 19.A pCOLD TF plazmid DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesi. **Hat M.** 10000 bp DNA Ladder **Hat 1.** Restriksiyon enzimleri ile kesilmemiş pCOLD TF plazmid DNA **Hat 2.** *XhoI* ve *BamHI* ile çift kesilmiş pCOLD TF plazmid DNA **B.** NSs DNA'nın restriksiyon kesim enzimleri ile kesilmesi **Hat M.** 10000 bp DNA Ladder **Hat 1.** Restriksiyon enzimleri ile kesilmemiş NSs **Hat 2.** *XhoI* ve *BamHI* ile çift kesilmiş NSs

4.6. Koloni PZR ile Pozitif Klonların Belirlenmesi

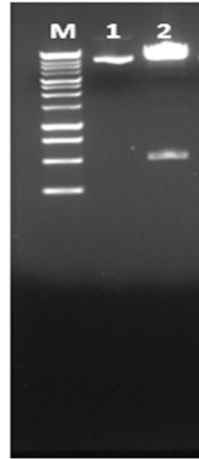
Restriksiyon kesim enzimleri ile çift kesilmiş 50 ng pCOLD TF plazmid DNA ve 150 ng NSs geni 16°C'deki Thermal cycler cihazında bir gece inkübe edilerek ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi. İnkübasyon işleminin ardından ligasyon miksinden 4µl alınıp *E. coli* JM109 kimyasal kompetan hücrelerine transforme edildi. Ligasyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol etmek amacı ile Koloni PZR yapıldı. Seçilen 10 koloniden 2 tanesinin NSs genini içeren plazmidi taşıdığı belirlendi. Pozitif kolonilerden biri seçilip plazmid DNA ekstraksiyonu yapıldı.



Şekil 20. Koloni PZR ile belirlenen pozitif kolonilerin agaroz jel görüntüsü. *Hat M.* 10000 bp DNA Ladder

4.7. pCOLD TF-NSs'in Restriksiyon Enzimleri ile Çift Kesilmesi

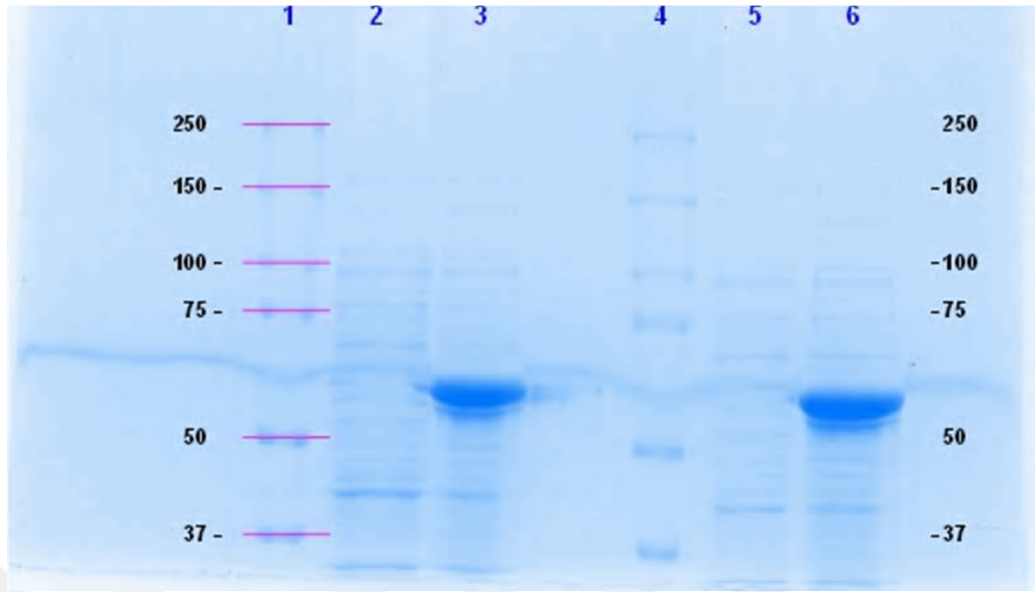
Koloni PZR sonucu pozitif çıkan koloniden elde edilen pCOLD TF-NSs plazmid DNA, *XhoI* ve *BamHI* restriksiyon enzimleri ile 37°C'de 3 saat çift kesilerek vektör DNA'nın NSs geninin doğru oryantasyonda taşıdığı konfirme edildi.



Şekil 21. pCOLD TF-NSs plazmid DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesi. *Hat M.* 10000 bp DNA Ladder *Hat 1.* Restriksiyon enzimleri ile kesilmemiş pCOLD TF-NSs plazmid DNA *Hat 2.* *XhoI* ve *BamHI* ile çift kesilmiş pCOLD TF-NSs plazmid DNA

4.8. pCOLD TF-NSs Vektörünün IPTG ile İndüksiyonu

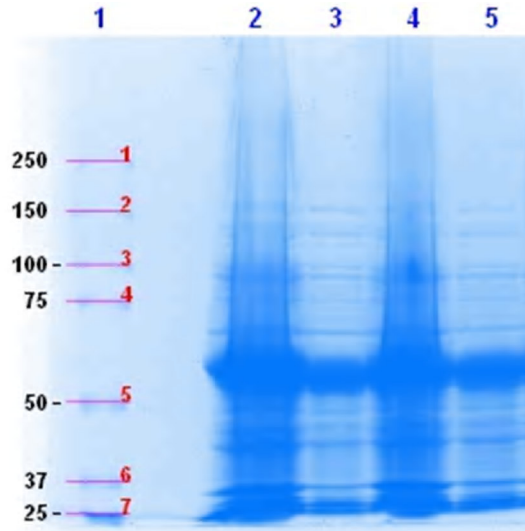
pCOLD TF-NSs plazmidini *E. coli* C43 (DE3) kompetan hücrelerine aktararak 5ml LB içerisinde başlangıç kültürü olarak üretildi. Başlangıç kültüründen 2 ml alınıp 100 µg/mL ampicilin içeren 100 ml LB içerisinde 37°C'de 225 rpm'de çalkalanarak OD₆₀₀ ~0,6 oluncaya kadar beklendi ve kültürden indüklenmemiş protein örneği alındıktan sonra 1mM IPTG eklenerek kültür sıcaklığı 16°C'e indirilip 225 rpm'de çalkalanarak 18 saat boyunca istenilen proteinin indüklenerek üretilmesi sağlandı. İndüklenmiş ve indüklenmemiş protein örnekleri ile SDS-PAGE görüntüldü. Rekombinant pCOLD TF-NSs vektöründe bulunan trigger faktörünün büyüklüğü 48 kDa ve NSs proteinin büyüklüğü ise yaklaşık olarak 18 kDa olması sebebiyle üretilmesi beklenen rekombinant proteinin büyüklüğü 66 kDa'dır. İndüklenmemiş pCOLD TF-NSs vektörünün rekombinant protein üretmediği, indüklenmiş pCOLD TF-NSs vektörünün ise yaklaşık 66 kDa büyüklüğünde protein ürettiği görüldü.



Şekil 22. IPTG ile indüklenen pCOLD TF-NSs rekombinant proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü. *Hat 1.ve 4.* Protein marker *Hat 2. ve 5.* İndüklenmemiş pCOLD TF-NSs protein örneği. *Hat 3. ve 6.* İndüklenmiş rekombinant pCOLD TF-NSs protein örneği.

4.9. pCOLD TF-NSs Rekombinant Proteinin Lizis Tamponu ile Ekstraksiyonu

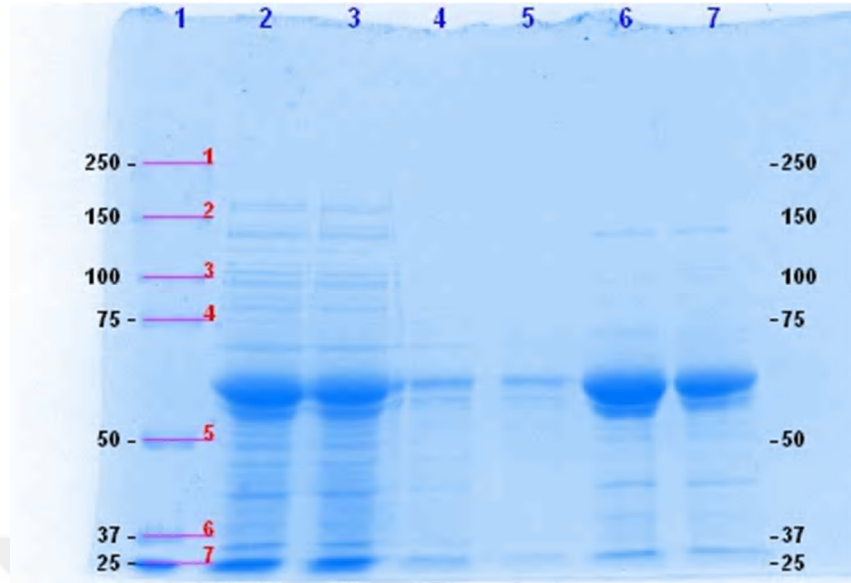
IPTG ile indüklenmiş 100 ml kültür 2 ayrı falkona bölündü ve 6000 rpm'de 4°C'de 30 dk santrifüjden sonra elde edilen hücre pelletlerinin ağırlığı hassas tartıda ölçülerek belirlendi. Her bir pellete ağırlıklarına göre lizis tampon çözeltisi ile ekstraksiyon protokolü uygulandı. Elde edilen iki süpernatant ve pellet için pCOLD TF-NSs rekombinant proteininin çözünebilir (soluble) ve inklüzyon cisimciği (insoluble) formlarını belirlemek amacıyla SDS-PAGE yapıldı. pCOLD TF-NSs (48 kDa şaperon protein + 18 kDa NSs proteini) rekombinant proteininin, protein marker ile kıyaslandığında 50-75 kDa arasında yaklaşık 66 kDa büyüklüğünde kalın bir bant şeklinde jelde görüntülenmesi ile, ekstraksiyon sonrası soluble formda olduğu belirlenmiş oldu.



Şekil 23. Lizis tamponu ile ekstrakte edilmiş pCOLD TF-NSs rekombinant proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü. *Hat 1.* Protein marker *Hat 2. ve 4.* pCOLD TF-NSs rekombinant proteinin çözümlü (soluble) fraksiyonu. *Hat 3. ve 5.* pCOLD TF-NSs proteinin çözümlü olmayan (insoluble) fraksiyonu.

4.10. pCOLD TF-NSs Rekombinant Proteinin Saflaştırılması

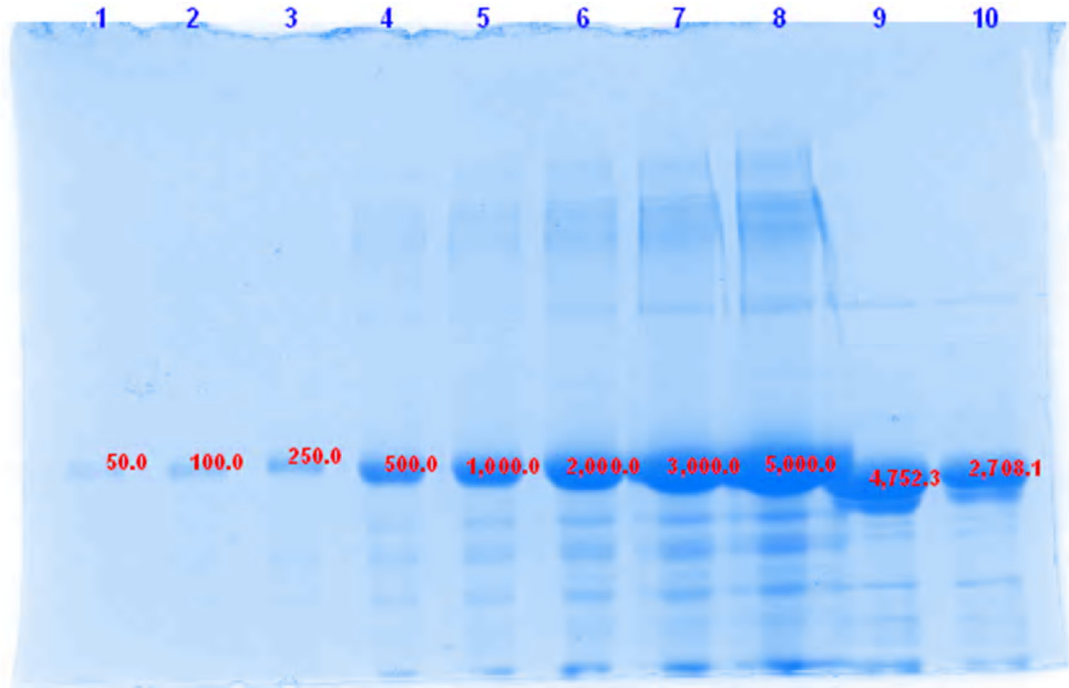
Lizis buffer ile ekstraksiyon sonrası elde edilen lizattan Nİ-NTA kolonu kullanılarak soluble pCOLD TF-NSs rekombinant protein pürifikasyonu yapıldı. Pürifikasyon için 2 adet Nİ-NTA Spin Kolon kullanıldı. Her kolona 300 µl elüsyon tamponu uygulanarak ilk elüsyonlar alındı. İkinci elüsyon için de her kolona 300 µl elüsyon tamponu uygulandı. Elde edilen ilk ve ikinci elüsyonlar kuyucuklara 10 µl yüklenerek (10 µl elüsyon protein + 10 µl 2X sample buffer) SDS-PAGE ile görüntülendi.



Şekil 24. Pürifiye pCOLD TF-NSs rekombinant proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü. *Hat 1.* Protein marker *Hat 2.* Pürifikasyon öncesi lizis tamponu ile ekstrakte edilen rekombinant protein *Hat 3.* NPI-10 bağlama tamponu ile kolon dengelendikten sonra kolona uygulanan örnekten sonra kolondan akan fraksiyon *Hat 4. ve 5.* Washing buffer kolona uygulandıktan sonra kolondan akan fraksiyon *Hat 6.* Kolondan ilk 300 µl elüsyon tamponu ile alınan protein *Hat 7.* Kolondan ikinci 300 µl elüsyon tamponu ile alınan protein

4.11. pCOLD TF-NSs Rekombinant Proteinin Miktarının Belirlenmesi

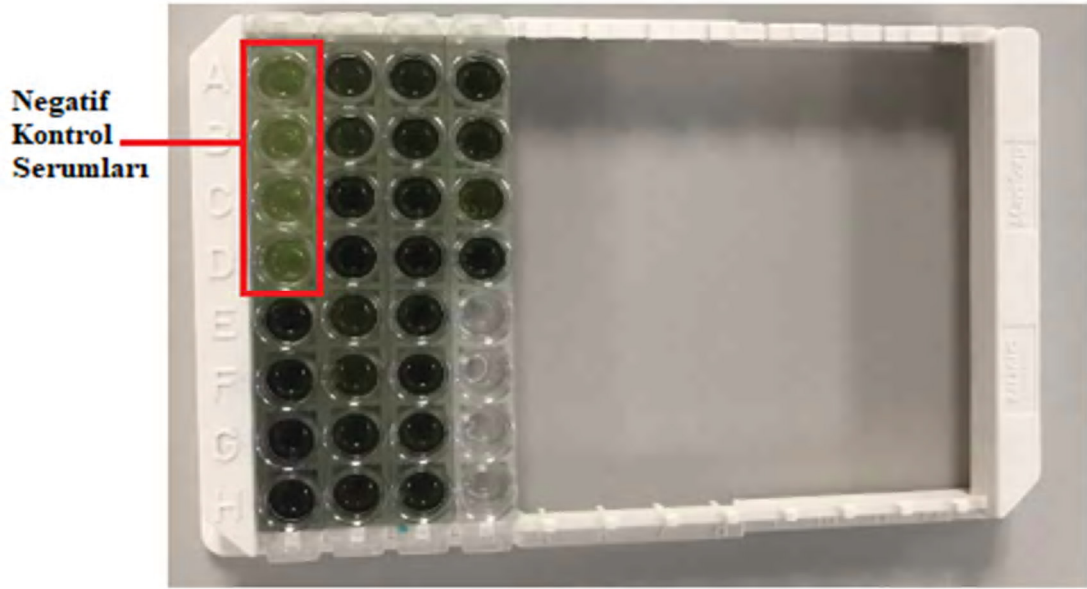
Nİ-NTA kolondan alınan birinci ve ikinci elüsyonların içerdiği pürifiye rekombinant pCOLD TF-NSs antijeninin konsantrasyonunu belirlemek için SDS-PAGE yapıldı; ImageLab Software Version 5.1. programı kullanılarak relatif olarak rekombinant protein miktarı belirlendi. SDS-PAGE de standart protein olarak BSA artan konsantrasyonlarda 50, 100, 250, 500, 1000, 2000, 3000, 5000 ng kuyucuklara yüklendi. Elüsyonlardan 10µl kuyucuklara yüklendi. Sonuçta birinci elüsyonda yaklaşık 475 ng/µl; ikinci elüsyonda yaklaşık 270 ng/µl rekombinant antijen olduğu belirlendi.



Şekil 25. Pürifiye pCOLD TF-NSs rekombinant proteininin miktarının belirlenmesi. *Hat 1.* 50 ng BSA *Hat 2.* 100 ng BSA *Hat 3.* 250 ng BSA *Hat 4.* 500 ng BSA *Hat 5.* 1000 ng BSA *Hat 7.* 3000 ng BSA *Hat 8.* 5000 ng BSA *Hat 9.* Kolondan ilk alınan elüsyondaki rekombinant protein miktarı *Hat 10.* Kolondan ilk alınan elüsyondaki rekombinant protein miktarı

4.12. Rekombinant pCOLD TF-NSs Antijeni ile İmmünize Edilen Farelerden Alınan Serumların ELISA ile Test Edilmesi

115S076 nolu ve ‘Kırım-Kongo Kanamalı Ateş Hastalığına (KKKAH) Karşı Adenovirus (Ad) Tabanlı Rekombinant İki Aşılı Adayının Geliştirilmesi ve Etkinliğinin Belirlenmesi’ isimli TÜBİTAK 1003 projesi kapsamında pCOLD TF-NSs vektörü kullanılarak rekombinant NSs proteini üretilip saflaştırıldıktan sonra intraperitoneal olarak Balb/c farelerine verildi. Rekombinant NSs proteininin biyolojik olarak aktif olduğunun teyit edilmesi ve antijenik özelliğinin araştırılması amacıyla pürifiye rekombinant protein ELISA testinde antijen olarak kullanıldı. Pürifiye edilen pCOLD TF-NSs rekombinant antijeni 4 µg konsantrasyonda karbonat tamponu ile kuyucuklara bağlandı. İmmünizasyonun etkinliğini test etmek için iki tane negatif serum (İmmünizasyon öncesi iki fareden alınan serum) ve 12 tane pozitif serum (İmmünizasyon sonrası farelerden alınan serum) kullanıldı. Serumlar 1/100 oranında bloklama tamponu içerisinde dilüe edildi ve her bir kuyucuğa 100 µl uygulandı. Konjugat olarak Keçi anti-fare IgG 1:4000 dilüsyonda kullanıldı. Substrat olarak ise TMB SENS HRP substrat solüsyonu kullanıldı. Stop solüsyonu eklendikten sonra 450 nm’de ELISA okuyucuda OD değerleri ölçüldü.



Şekil 26. Rekombinant pCOLD TF-NSs proteini ile immünize edilen farelerden alınan serumların ELISA sonucu. 4µg rekombinant antijen bağlanan kuyucuklarda A1-D1'de, immünizasyon öncesi farelerden alınan negatif kontrol serumları; E1-H1'de, 1. immünizasyon sonrası poliklonal fare serumları; A2-D2'de, 2. immünizasyon sonrası poliklonal fare serumları; E2-H2'de, 3. immünizasyon sonrası poliklonal fare serumları; A3-D3'te 4. immünizasyon sonrası poliklonal fare serumları; E3-H3'de 5. immünizasyon sonrası; A4-D4'te 6. immünizasyon sonrası elde edilen poliklonal fare serumları test edildi.

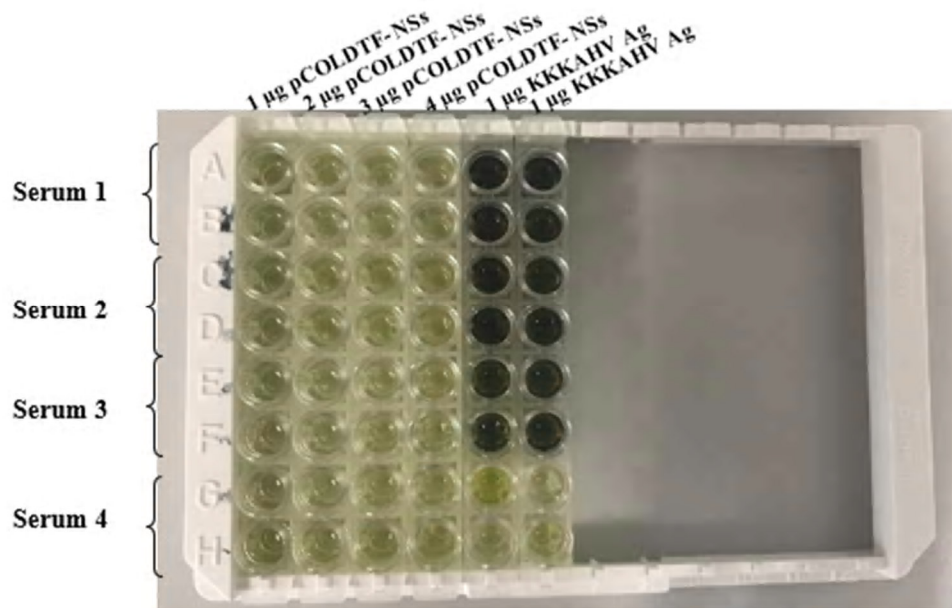
Tablo 7. Rekombinant pCOLD TF-NSs antijeni ile farelerin immünizasyonu sonucu elde edilen serumların ELISA OD değerleri.

	1	2	3	4
A	0,5965	1,4521	3,1297	3,7013
B	0,4794	0,9673	2,3321	4,7347
C	0,4154	4,4093	4,1735	1,7608
D	0,5559	6	6	4,3345
E	5,0891	1,3705	4,2944	
F	4,4113	1,8343	4,5375	
G	4,1880	2,9501	4,1080	
H	4,3861	3,1786	4,1415	

450 nm'de alınan absorbans değerlerine göre cut off değeri 1,023 olarak hesaplandı ve bu değer üzerindekiler pozitif kabul edildi. İmmünize fare serumlarının tümü ELISA testinde pozitif olarak bulundu. pCOLD TF-NSs rekombinant proteinin aktif olduğu ve immünizasyonlar arasında OD değerlerinde belirgin bir farklılık olmadığı görüldü.

4.13. Rekombinant pCOLDTF-NSs Antijeninin, KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit06 Suşuyla İmmünize Edilen Fare Serumlarında Anti-KKKAHV IgG Belirlenmesi Amacıyla ELISA Testinde Kullanılması

Pürifiye edilen pCOLD TF-NSs rekombinant antijeni 1, 2, 3, 4 µg konsantrasyonlarda karbonat tamponu ile kuyucuklara bağlandı. Pozitif kontrol olarak PEG presipite KKKAH virüsü antijeni 1 µg konsantrasyonda kullanıldı. Rekombinant antijenin etkinliğini Fare IgG ELISA’da test etmek için bir tane immünizasyon öncesinde Balb-c farelerden alınan negatif fare serumu (Serum 4) ve üç tane KKKAH virüsü ile 3. immünizasyon sonrası Balb-c farelerden alınan pozitif fare serumu (Serum 1-2-3) kullanıldı. Serumlar 1/100 oranında bloklama tamponu içerisinde dilüe edildi ve her bir kuyucuğa 100 µl uygulandı. Negatif serum ve pozitif serumlar 2 replika olarak uygulandı. Konjugat olarak Keçi anti-fare IgG 1:5000 dilüsyonda kullanıldı. Substrat olarak ise TMB SENS HRP substrat solüsyonu kullanıldı. 450 nm’de ELISA okuyucuda absorbans değerleri ölçüldü.



Şekil 27. Fare IgG ELISA geliştirilmesinde pCOLD TF-NSs rekombinant antijeni ve inaktif KKKAH virüsü antijeni kullanılarak yapılan ELISA sonuçları. A1-B1-C1-D1-E1-F1-G1-H1’e 1 µg; A2-B2-C2-D2-E2-F2-G2-H2’e 2 µg; A3-B3-C3-D3-E3-F3-G3-H3’e 3 µg; A4-B4-C4-D4-E4-F4-G4-H4’e 4 µg rekombinant antijen bağlanmıştır. A5-B5-C5-D5-E5-F5-G5-H5 ve A6-B6-C6-D6-E6-F6-G6-H6’a 1 µg inaktif KKKAH virüsü antijeni bağlanmıştır.

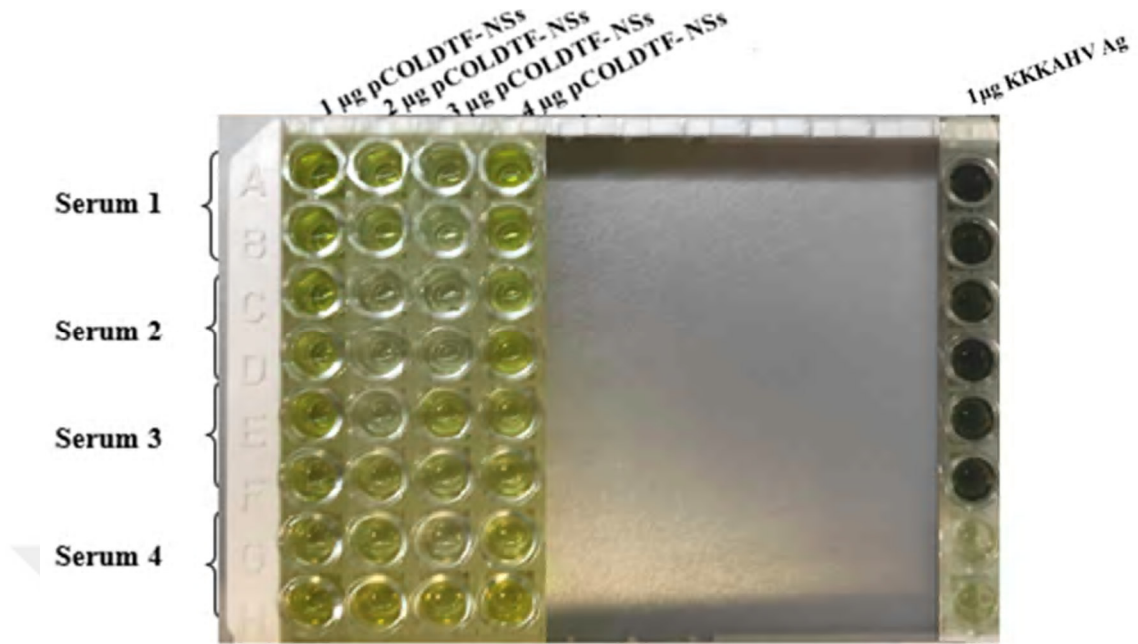
Tablo 8. Fare IgG ELISA geliştirilmesinde pCOLD TF-NSs rekombinant antijeni ve inaktif KKKAH virüsü antijeni kullanılarak yapılan ELISA'nın OD değerleri

		1	2	3	4	5	6
		1 µg NSs	2 µg NSs	3 µg NSs	4 µg NSs	1 µg KKKAHV	1 µg KKKAHV
A	Serum 1	0,3576	0,3589	0,3193	0,2914	6	6
B		0,3351	0,2758	0,2655	0,2624	3,7540	3,1187
C	Serum 2	0,3678	0,3235	0,3780	0,4026	3,7836	1,8593
D		0,3123	0,3491	0,3704	0,3725	3,5192	3,3269
E	Serum 3	0,3136	0,2632	0,2615	0,3212	6	6
F		0,3381	0,2909	0,3098	0,3019	6	5,2964
G	Serum 4	0,3424	0,3337	0,3511	0,3658	0,9562	0,3013
H		0,3115	0,3509	0,3029	0,3927	0,3213	0,5054

450 nm'de alınan absorbans değerlerine göre pCOLD TF-NSs rekombinant antijeni için cut off değeri 0,688; KKKAH virüsü antijeni için cut off değeri 1,042 olarak hesaplandı ve bu değerlerin üzerindeki pozitif kabul edildi. pCOLD TF-NSs rekombinant antijeni bağlanan kuyucuklarda KKKAH virüsü IgG pozitif olduğu bilinen ve pozitif kontrol olarak kullanılan KKKAH virüsü antijeni ile yapılan ELISA ile karşılaştırılan fare serumlarının hiç birinde OD yanıtının şekillenmediği görüldü ve negatif sonuç alındı.

4.14. Rekombinant pCOLD TF-NSs Antijeninin, KKKAH IgG Pozitif İnsan Serumlarında Anti-KKKAH IgG Belirlenmesi Amacıyla ELISA Testinde Kullanılması

Pürifiye edilen pCOLD TF-NSs rekombinant antijeni 1, 2, 3, 4 µg konsantrasyonlarda karbonat tamponu ile kuyucuklara bağlandı. Pozitif kontrol olarak PEG presipite KKKAH virüsü antijeni 1 µg konsantrasyonda kullanıldı. Rekombinant antijenin etkinliğini KKKAH IgG pozitif insan serumlarında anti-KKKAH IgG belirlenmesi amacıyla ELISA'da test etmek için bir tane KKKAH IgG negatif insan serumu (Serum 4) ve üç tane KKKAH IgG pozitif olduğu bilinen insan serumu (Serum 1-2-3) kullanıldı. Serumlar 1/100 oranında bloklama tamponu içerisinde dilüe edildi ve her bir kuyucuğa 100 µl uygulandı. Negatif serum ve pozitif serumlar 2 replika olarak uygulandı. Konjugat olarak Keçi anti-insan IgG 1:4000 dilüsyonda kullanıldı. Substrat olarak ise TMB SENS HRP substrat solüsyonu kullanıldı. 450 nm de ELISA okuyucuda absorbans değerleri ölçüldü.



Şekil 28. İnsan IgG ELISA geliştirilmesinde pCOLD TF-NSs rekombinant antijeni ve inaktif KKKAH virüsü antijeni kullanılarak yapılan ELISA sonuçları. A1-B1-C1-D1-E1-F1-G1-H1'e 1 µg; A2-B2-C2-D2-E2-F2-G2-H2'e 2 µg; A3-B3-C3-D3-E3-F3-G3-H3'e 3 µg; A4-B4-C4-D4-E4-F4-G4-H4'e 4 µg rekombinant antijen bağlanmıştır. A5-B5-C5-D5-E5-F5-G5-H5'e 1 µg inaktif KKKAH virüsü antijeni bağlanmıştır.

450 nm'de alınan absorbans değerlerine göre pCOLD TF-NSs rekombinant antijeni için cut off değeri 2,207; KKKAH virüsü antijeni için cut off değeri 0,637 olarak hesaplandı ve bu değerlerin üzerindeki pozitif kabul edildi. pCOLD TF-NSs rekombinant antijeni bağlanan kuyucuklarda KKKAH virüsü IgG pozitif olduğu bilinen ve pozitif kontrol olarak kullanılan KKKAH virüsü antijeni ile yapılan ELISA ile karşılaştırılan serumların hiç birinde OD yanıtının cut off değerini geçmediği görüldü ve negatif sonuç alındı.

Tablo 9. İnsan IgG ELISA geliştirilmesinde pCOLD TF-NSs rekombinant antijeni ve inaktif KKKAH virüsü antijeni kullanılarak yapılan ELISA'nın OD değerleri

		1	2	3	4	5
		1 µg NSs	2 µg NSs	3 µg NSs	4 µg NSs	1 µg KKKAHV
A	Serum 1	0,9001	0,5647	0,3510	0,7777	4,9882
B		0,7150	0,5484	0,2752	0,6463	4,9175
C	Serum 2	0,7553	0,4133	0,3643	0,4979	6
D		0,7810	0,5396	0,4205	0,8048	4,9543
E	Serum 3	1,0264	0,6319	0,7357	0,6553	5,1820
F		1,0549	0,8862	0,6848	0,8561	6
G	Serum 4	1,0735	0,9398	0,6472	0,9560	0,2821
H		1,5275	1,2421	1,0492	1,3936	0,3553

4.15. Rekombinant pCOLD TF-NSs Antijeni ile İmmünize Edilen Fare Serumlarının Peptit ELISA ile Test Edilmesi

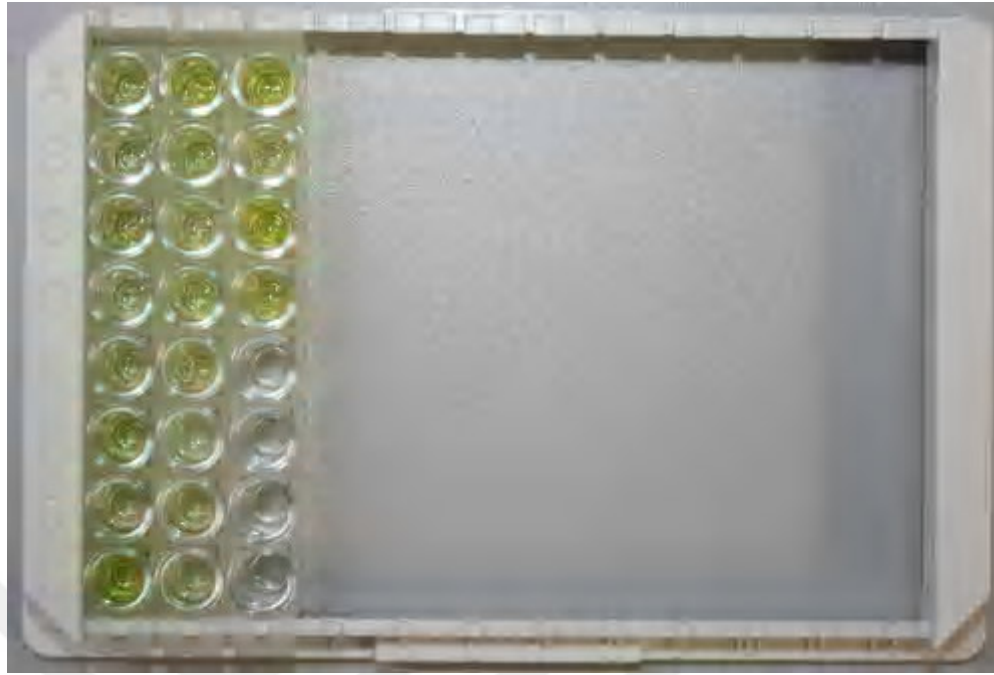
KKKAH virüsü NSs Proteinini Peptit-tabanlı ELISA yöntemi ile test etmek amacı ile KKKAH virüsü Turkey-Kelkit 06 Suşu NSs proteinine ait 20 aminoasit dizisi içeren ve bunların 12 tanesi overlap olacak şekilde dizayn edilen, GenScript firmasından hizmet alımı yoluyla sentezlenen polipeptitler kullanıldı. Sentetik polipeptitler yapılan hidrofobite/hidrofilite analizlerine göre asidik, bazik ve nötral peptitler olarak gruplandırıldı steril DNaz/RNaz içermeyen distile suda konsantrasyonları 1 mg/ml olacak şekilde çözüldü. Çözünür formdaki sentetik polipeptitlerden üçerli ve dörderli gruplar halinde oluşturulan kombine peptit havuzları ELISA testinde kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edildi.

Tablo 10. KKKAH virüsü NSs proteinine ait sentetik polipeptitlerin amino asit dizilimleri

Polipeptit	Amino asit dizilimi
NSs 2	MLSALALSTSSLCLSKYPLR
NSs 3	TSSLCLSKYPLRASTVFLAS
NSs 4	YPLRASTVFLASSKTPFPSV
NSs 5	FLASSKTPFPSVSASLARPV
NSs 6	FPSVSASLARPVATSAIPER
NSs 7	ARPVATSAIPERPDLLMSPQ
NSs 8	IPERPDLLMSPQGGLKAMMY
NSs 9	MSPQGGLKAMMYLPLTNSLH
NSs 10	AMMYLPLTNSLHHSTCSRLT
NSs 11	NSLHHSTCSRLTGPRGFSSP
NSs 12	SRLTGPRGFSSPPLLRIRFL
NSs 14	IRFLIMSDSISLTDITISP
NSs 15	SDSISLTDITISPGTLYSAR
NSs 16	ITISPGTLYSARTLLLKAAV
NSs 17	YSARTLLLKAAVFALTRKPM
NSs 18	KAAVFALTRKPMFLHLRAA
NSs 19	RKPMFLHLRAACW

Kombine peptitlerden oluşan birinci havuzunda (K1) NSs 2, NSs 3, NSs 4; ikinci havuzda (K2) NSs 6, NSs 7, NSs 8; üçüncü havuzda (K3) NSs 8, NSs 9, NSs 10; dördüncü havuzda (K4) NSs 11, NSs 12, NSs 14, NSs 15 ve son olarak beşinci havuzda (K5) NSs 16, NSs 17, NSs 18, NSs 19 peptitleri kullanıldı.

NSs peptitlerinin her birinin konsantrasyonu kuyucuk başına 2 µg olacak şekilde kombine edilip, karbonat tamponu ile kuyucuklara bağlandı. Pozitif kontrol için pCOLD TF-NSs rekombinant antijeni ile 7 kere immünize edilmiş poliklonal fare serumu ve negatif kontrol için immünizasyon öncesi fareden alınan serumu kullanıldı. Serumlar 1/100 oranında bloklama tamponu içerisinde dilüe edildi ve her bir kuyucuğa 100 µl uygulandı. Tüm peptitler 2 replika olacak şekilde test edildi. Sekonder antikor olarak keçi anti-fare IgG 1:4000 dilüsyonda kullanıldı. Substrat olarak ise TMB SENS HRP substrat solüsyonu kullanıldı. Stop solüsyonu eklendikten sonra 450 nm de ELISA okuyucuda absorbans değerleri ölçüldü.



Şekil 29. KKKAH virüsü NSs proteine ait peptitler kullanılarak test edilen rekombinant antijenle immünize fare serumuna ait ELISA sonuçları. A1-B1'e K1; C1-D1'e K2; E1-F1'e K3; G1-H1'e K4 ve A2-B2'e K5 peptitleri bağlanıp, rekombinant antijenle immünize fare poliklonal serumu test edildi. C2-D2'e K1; E2-F2'e K2; G2-H2'e K3; A3-B3'e K4 ve C3-D3'e K5 peptitleri bağlanıp, negatif fare serumu ile test edildi.

Rekombinant antijenle immünize fare serumu ve immünizasyondan önce fareden alınan negatif serumun KKKAH virüsü Turkey-Kelkit06 suşu NSs proteinine ait polipeptitler kullanılarak, peptit ELISA ile test edilmesi sonucunda pozitif ve negatif olduğu bilenen serumlarda 450 nm'de alınan absorbans değerlerine göre cut off değeri 0,912 olarak belirlendi ve tüm OD yanıtlarının negatif olduğu görüldü.

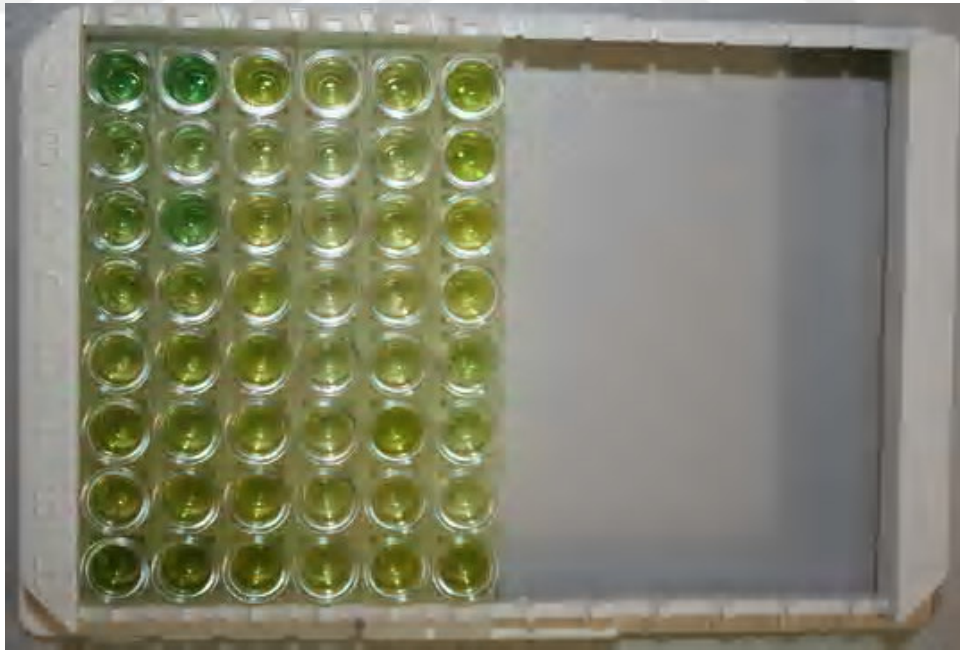
Tablo 11. Rekombinant pCOLD TF-NSs antijeni ile farelerin immünizasyonu sonucu elde edilen serumların Peptit ELISA OD değerleri.

	1	2	3
A	0,4220	0,5950	0,6679
B	0,2930	0,4128	0,3515
C	0,4645	0,3576	0,8099
D	0,2334	0,4193	0,6325
E	0,3447	0,4287	
F	0,4332	0,2103	
G	0,3097	0,3821	
H	0,7743	0,3021	

4.16. KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit06 Suşuyla İmmünize Edilen Fare Serumlarının Peptit ELISA ile Test Edilmesi

NSs peptitlerinden her birinin konsantrasyonu 2 µg olacak şekilde karbonat tamponu ile kuyucuklara bağlandı. Pozitif kontrol için KKKAH virüsü ile immünize edilmiş üç fareden alınan serumlar ve negatif kontrol için immüzyasyon öncesi üç fareden alınan serumlar kullanıldı. Serumlar 1/100 oranında bloklama tamponu içerisinde dilüe edildi ve her bir kuyucuğa 100 µl uygulandı. Tüm serumlar her bir kombine peptit için 2 replika olacak şekilde test edildi. Konjugat olarak Keçi anti-fare Ig 1:4000 dilüsyonda kullanıldı. Substrat olarak ise TMB SENS HRP substrat solüsyonu kullanıldı. Stop solüsyonu eklendikten sonra 450 nm de ELISA reader da okuma gerçekleştirildi.

KKKAH yönünden IgG pozitif olduğu bilinen fare serumlarının KKKAH virüsü Turkey-Kelkit06 suşu NSs proteinine ait peptitler kullanılarak ELISA ile test edilmesi sonucunda pozitif ve negatif olduğu bilenen serumlarda anlamlı bir OD yanıtı şekillenmedi, 450 nm’de alınan absorbans değerlerine göre cut off değeri 1,402 olarak belirlendi, tüm sonuçlar negatif olarak değerlendirildi.



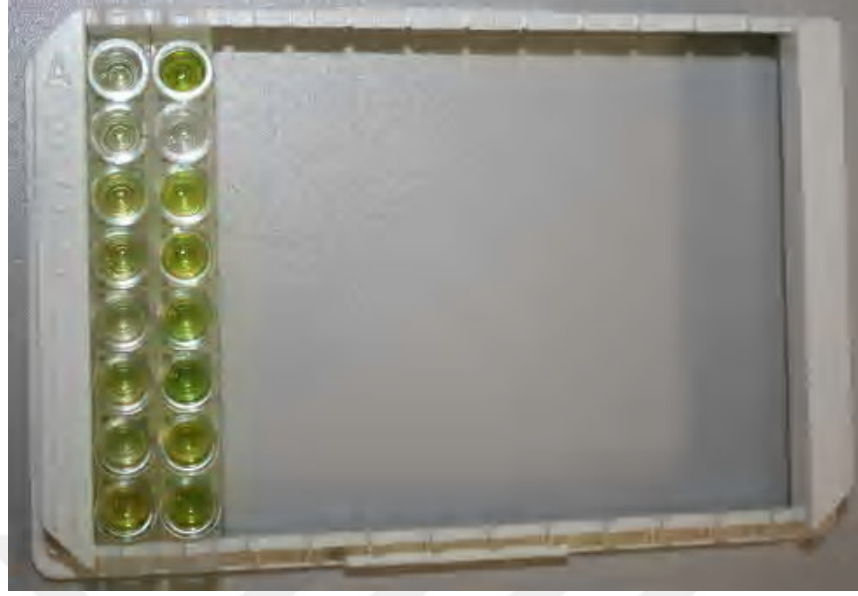
Şekil 30. KKKAH virüsü NSs proteinine ait peptitler kullanılarak test edilen KKKAH IgG pozitif fare serumuna ait Peptit ELISA sonuçları. A1-B1, A2-B2, A3-B3, A4-B4, A5-B5, A6-B6’a K1; C1-D1, C2-D2, C3-D3, C4-D4, C5-D5, C6-D6’a K2; E1-F1, E2-F2, E3-F3, E4-F4, E5-F5, E6-F6’a K3; G1-H1, G2-H2, G3-H3, G4-H4, G5-H5, G6-H6’a K4 peptitleri bağlandı. KKKAH virüsü ile immünize IgG pozitif fare poliklonal serumu ve negatif fare serumu ile peptit ELISA’nın etkinliği test edildi.

Tablo 12. Fare IgG Peptit ELISA geliştirilmesinde KKKAH virüsü antijeni ile immünize pozitif fare serumları ve immünize olmayan negatif fare serumları kullanılarak yapılan Peptit ELISA'nın OD değerleri

		1	2	3	4	5	6
		Pozitif serum 1	Pozitif serum 2	Pozitif serum 3	Negatif serum 1	Negatif serum 2	Negatif serum 3
A	K1	0,7971	0,8097	1,1795	0,6133	0,7608	1,0862
B		0,5617	0,4841	0,4690	0,2938	0,3956	1,0441
C	K2	0,6905	0,6029	0,7626	0,4298	0,5857	0,9606
D		0,7984	0,7748	0,8282	0,3418	0,4533	0,8631
E	K3	0,7880	1,0656	1,0369	0,3653	0,6058	0,6745
F		1,2407	0,8028	0,8156	0,5085	1,3126	0,6023
G	K4	1,1064	1,3332	1,2541	0,5244	0,6768	0,4969
H		1,4924	2,2059	1,4482	0,7179	1,1309	1,3842

4.17. KKKAH IgG Pozitif İnsan Serumlarının Peptit ELISA ile Test Edilmesi

NSs11-NSs12-NSs14-NSs15 (K4) peptitlerinin her birinin konsantrasyonu kuyucuk başına 2 µg olacak şekilde kombine edilip, karbonat tamponu ile kuyucuklara bağlandı. Pozitif kontrol için 4 tane KKKAH IgG pozitif insan serumu ve negatif kontrol için 4 tane KKKAH IgG negatif insan serumu kullanıldı. Serumlar 1/100 oranında bloklama tamponu içerisinde dilüe edildi ve her bir kuyucuğa 100 µl uygulandı. Tüm serumlar 2 replika olacak şekilde test edildi. Konjugat olarak Fare anti-insan IgG 1:4000 dilüsyonda kullanıldı. Substrat olarak ise TMB SENS HRP substrat solüsyonu kullanıldı. Stop solüsyonu eklendikten sonra 450 nm de ELISA okuyucuda OD değerleri belirlendi.



Şekil 31. KKKAH virüsü NSs proteine ait peptitler kullanılarak test edilen KKKAH IgG pozitif insan serumuna ait Peptit ELISA sonuçları. Tüm kuyucuklara K4 peptitleri bağlandı. KKKAH IgG pozitif ve negatif insan serumları ile peptit ELISA'nın etkinliği test edildi.

Tablo 13. İnsan IgG pozitif serumların KKKAH virüsü NSs peptitleri ile test edilmesi ile elde edilen Peptit ELISA'nın OD değerleri

		1		2
A	Pozitif serum 1	0,2306	Negatif serum 1	1,3399
B		0,2570		0,1198
C	Pozitif serum 2	0,6662	Negatif serum 2	0,9082
D		0,6121		1,1127
E	Pozitif serum 3	0,3522	Negatif serum 3	0,8570
F		0,5861		1,0234
G	Pozitif serum 4	0,5819	Negatif serum 4	1,4031
H		1,2512		1,3082

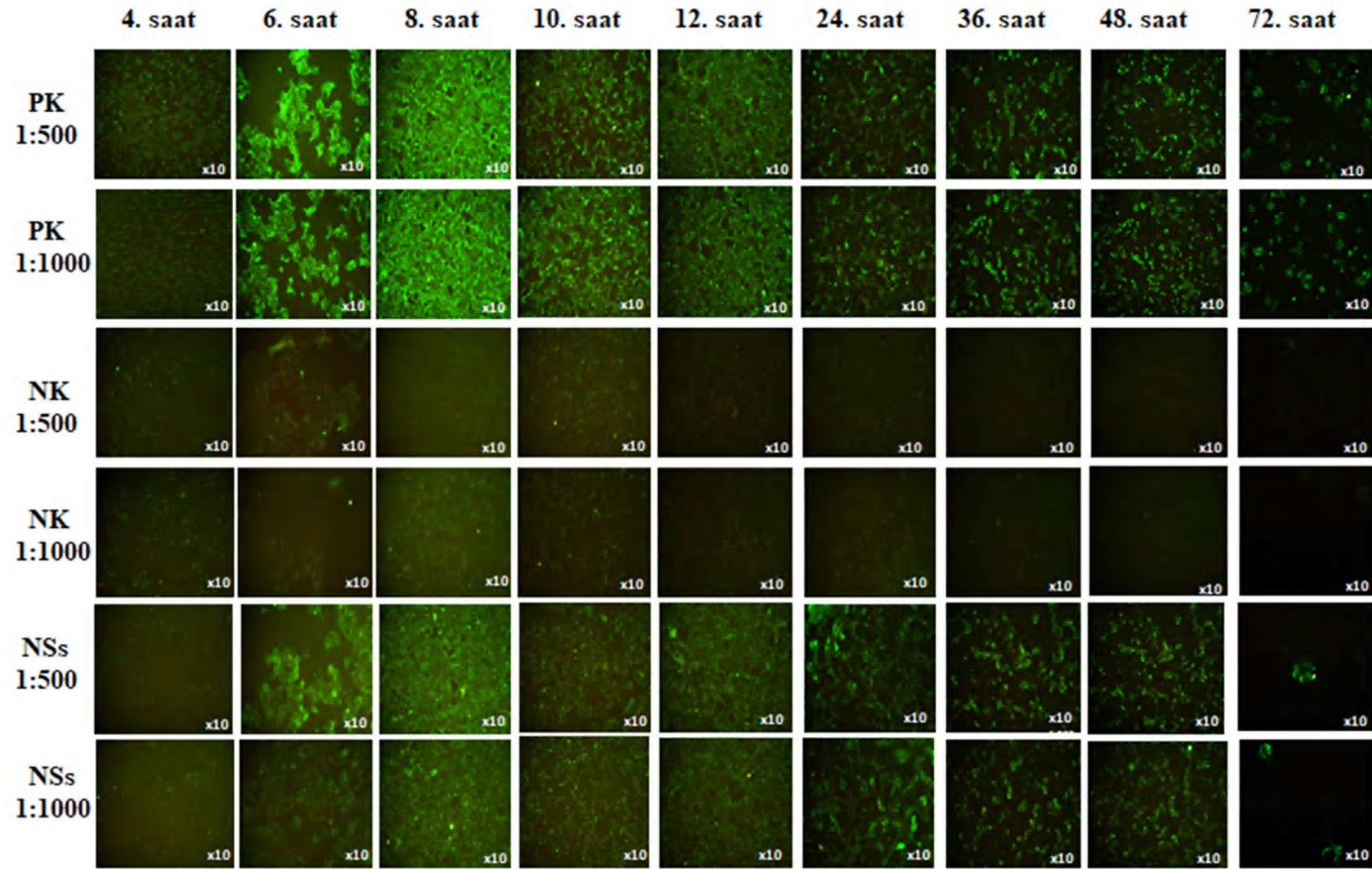
450 nm'de alınan absorbans değerlerine göre cut off değeri 2,018 olarak belirlendi. KKKAH virüsü Turkey-Kelkit06 suşu NSs proteinine ait peptitlerin bağlandığı kuyucuklarda OD yanıtlarına göre negatif sonuçlar elde edildi.

4.18. KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit06 Suşuyla Enfekte Edilmiş Vero E6 Hücrelerinde Enfeksiyonun Farklı Zaman Aralıklarında *In vitro* NSs proteininin IFA Yöntemi ile Gösterilmesi

KKKAH virüsü Turkey-Kelkit06 suşu ile enfekte hücrelerde NSs proteinin ekspresyonunu göstermek amacıyla 96 kuyucuklu pleytte Vero E6 hücreleri MOI 2

olacak şekilde; pozitif kontrol için Vero E6 hücreleri MOI 1 olacak şekilde enfekte edildi. Negatif kontrol için hücreler virüs ile enfekte edilmedi. NSs proteininin ekspresyonunun belirlenen zaman aralıklarında hücreler 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde bekletildi. Proteinin ekspresyonunun gösterilmesi primer antikor olarak pCOLD TF-NSs rekombinant antijeni ile 7 kere immünize edilmiş fareden alınan poliklonal serum TBST içinde 1:500 ve 1:1000 olacak şekilde dilüe edildi ve her bir dilüsyon için iki kuyucukta çalışıldı. Pozitif kontrol ve negatif kontrol için KKKAH virüsü ile immünize edilmiş fareden alınan poliklonal serum benzer şekilde 1:500 ve 1:1000 oranında dilüe edildi ve her bir dilüsyon için iki kuyucukta çalışıldı. Sekonder antikor olarak Keçi-anti fare FITC 1:2000 oranında TBST içinde dilüe edilerek uygulandı. Floresan mikroskop altında enfeksiyondan 4-6-8-10-12-24-36-48-72 saat sonra NSs proteininin ekspresyonu floresan ışına veren hücre varlığı kontrol edilerek araştırıldı.

Enfeksiyonun 6. saatinden itibaren virüs ile enfekte hücrelerde NSs proteininin ekspresyonu pozitif ve negatif kontrollerle karşılaştırma yapılarak gösterildi. Enfeksiyonun 4. saatinde pozitif kontrolde, negatif kontrolde floresan hücrelerde görülmedi; NSs'in ekspresyonunun, enfeksiyonun 6. saatten itibaren başladığı görüldü.

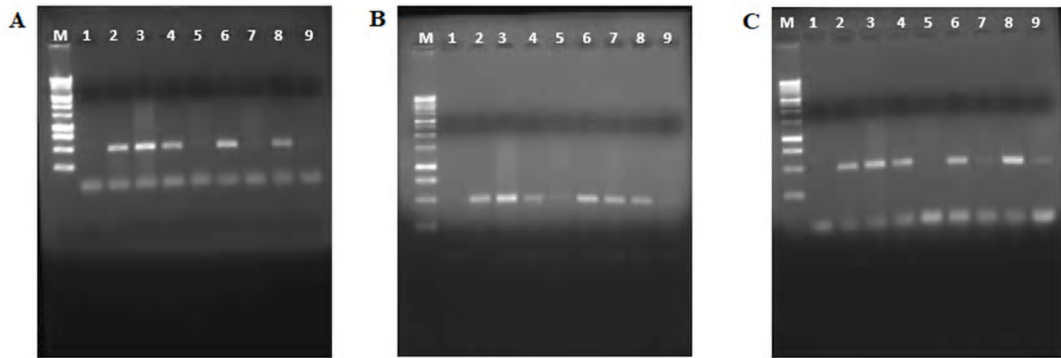


Şekil 32. KKKAH virüsü Turkey-Kelkit06 suşu ile enfekte edilen Vero E6 hücrelerinde enfeksiyonun farklı saatlerinde NSs ekspresyonunun IFA yöntemi ile gösterilmesi. PK: Pozitif Kontrol; NK: Negatif Kontrol; X10: Floresan mikroskobu objektif büyütmesi

4.19. KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit06 Suşuyla Enfekte Edilmiş Vero E6 Hücre Lizatlarından Viral RNA'larda Revers Transkriptaz PZR Yöntemi ile NSs Geninin Çoğaltılması

24 kuyucuklu pleyte Vero E6 hücrelerinden 250.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 500 µl hücre pasajlandı. Pleyt 37°C %5 CO₂'li inkübatörde bir gece, hücrelerin %90 konfluense ulaşması için inkübasyona bırakıldı. Hücreler KKKKAH virüsü Turkey-Kelkit 06 suşu ile MOI 0,1 olacak şekilde enfeksiyon yapıldı. Enfeksiyon sonrası incelenecek her bir saat (4-6-8-10-12-24-36-48-72) için iki kuyucuk enfekte edildi. Enfeksiyon sonrası hücre lizatlarından elde edilen viral RNA'lar revers transkriptaz ile cDNA'ya çevrilip, gen spesifik primerler ile (**Tablo 1**) viral genomda NSs gen varlığı PZR yöntemi ile araştırıldı.

Pozitif Kontrol olarak, 3. pasaj fare beyni KKKKAH virüsü ile enfekte edilmiş fareden alınan kandan ekstrakte edilen viral RNA'lardan oligo (dT) ve random primerler kullanılarak elde edilen cDNA'lar kullanıldı. Negatif kontrol olarak DNaz/RNaz içermeyen steril distile su kullanıldı.

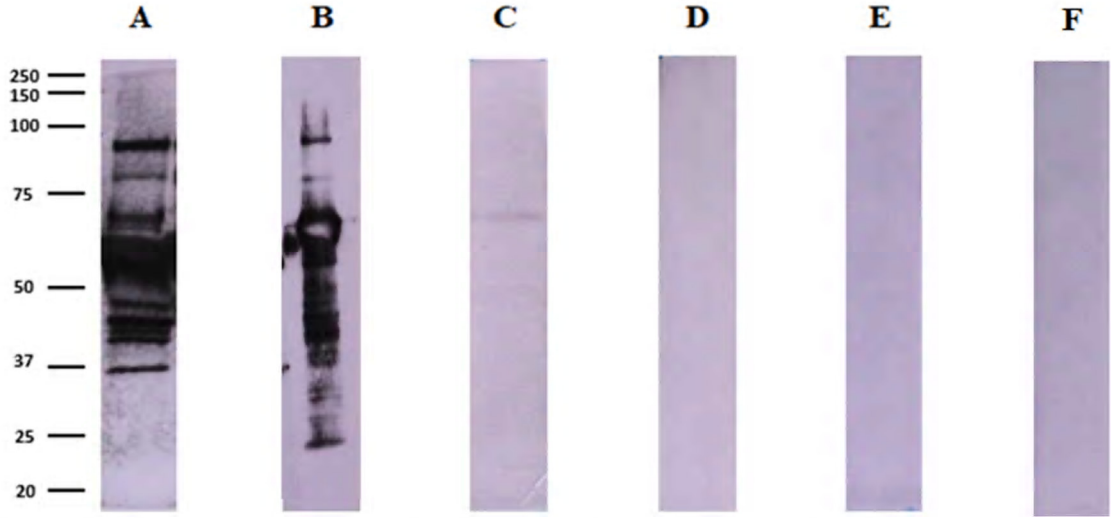


Şekil 33. KKKKAH virüsü ile enfekte Vero E6 hücre lizatlarından ekstrakte edilen viral RNA'lardan elde edilen cDNA'lardan RT-PZR yöntemi ile çoğaltılan NSs geninin agaroz jel görüntüsü **A.** *Hat M.* 10000 bp DNA Ladder *Hat 1.* Negatif kontrol *Hat2.* Pozitif kontrol random cDNA *Hat 3.* Pozitif kontrol oligo cDNA *Hat 4.* 4 saat enfekte lizat random cDNA *Hat 5.* 4 saat enfekte lizat oligo cDNA *Hat 6.* 6 saat enfekte lizat random cDNA *Hat 7.* 6 saat enfekte lizat oligo cDNA *Hat 8.* 8 saat enfekte lizat random cDNA *Hat 9.* 8 saat enfekte lizat oligo cDNA **B.** *Hat M.* 10000 bp DNA Ladder *Hat 1.* Negatif kontrol *Hat2.* Pozitif kontrol random cDNA *Hat 3.* Pozitif kontrol oligo cDNA *Hat 4.* 10 saat enfekte lizat random cDNA *Hat 5.* 10 saat enfekte lizat oligo cDNA *Hat 6.* 12 saat enfekte lizat random cDNA *Hat 7.* 12 saat enfekte lizat oligo cDNA *Hat 8.* 24 saat enfekte lizat random cDNA *Hat 9.* 24 saat enfekte lizat oligo cDNA **C.** *Hat M.* 10000 bp DNA Ladder *Hat 1.* Negatif kontrol *Hat2.* Pozitif kontrol random cDNA *Hat 3.* Pozitif kontrol oligo cDNA *Hat 4.* 36 saat enfekte lizat random cDNA *Hat 5.* 36 saat enfekte lizat oligo cDNA *Hat 6.* 48 saat enfekte lizat random cDNA *Hat 7.* 48 saat enfekte lizat oligo cDNA *Hat 8.* 72 saat enfekte lizat random cDNA *Hat 9.* 72 saat enfekte lizat oligo cDNA

3. pasaj fare beyni KKKAH virüsü ile MOI 0.1 olacak şekilde enfekte edilen, enfeksiyondan 4, 6, 8 saat sonra alınan Vero E6 hücre lizatından random primerler kullanılarak elde edilen cDNA'ların NSs genini içerdiği, oligo (dT) primerler kullanılarak elde edilen cDNA'ların NSs genini içermediği -6 ve 8'de çok silik bant gözlemlendi. Enfeksiyondan 10, 12, 24 saat sonra alınan Vero E6 hücre lizatından random primerler kullanılarak elde edilen cDNA'ların NSs genini içerdiği, oligo (dT) primerler kullanılarak 12. saatte elde edilen cDNA'nın NSs genini içerdiği; ancak 10. ve 24. saatte elde edilen cDNA'ların NSs genini çok az miktarda içerdiği gözlemlendi. Enfeksiyondan 36, 48, 72 saat sonra alınan Vero E6 hücre lizatlarından random primerler kullanılarak elde edilen cDNA'lar ile 48. ve 72. saatte oligo (dT) primerler kullanılarak elde edilen cDNA'larda NSs genine ait bant net görülürken; 36. saatte elde edilen cDNA' da NSs genine ait bant çok silik bir şekilde gözlemlendi.

4.20. Rekombinant pCOLD TF-NSs Proteini Kullanılarak NSs Proteinin İmmunblotlama Yöntemi ile Belirlenmesi

İmmunblotlama yöntemi ile virüse ait NSs proteininin varlığının araştırılması amacıyla antijen olarak prokaryotik sistemde üretilen rekombinant pCOLD TF-NSs proteini 3µg kullanıldı. Pozitif kontrol olarak, 12µg PEG presipite KKKAH virüs antijeni kullanıldı ve antijen poliklonal tavşan serumu ile problandı. Primer antikor olarak; rekombinant pCOLD TF-NSs proteini ile 7 kere immünize edilmiş poliklonal fare serumu, KKKAH IgG pozitif insan serumu, KKKAH virüsü Turkey-Kelkit06 Suşu ile immünize edilmiş poliklonal fare ve tavşan serumları test edildi. pCOLD TF-NSs rekombinant antijeni ile 7 kere immünize edilmiş poliklonal fare serumu 1:5000 dilüsyonda; KKKAH virüsü IgG pozitif insan serumu 1:500 dilüsyonda, KKKAH virüsü ile immünize poliklonal fare serumu 1:500 dilüsyonda; KKKAH virüsü ile immünize poliklonal tavşan serumu 1:3000 dilüsyonda kullanıldı. Konjugat olarak; keçi anti-fare IgG 1:2500; keçi anti-insan IgG 1:2000; keçi anti-tavşan IgG 1:3000 dilüsyonda kullanıldı.



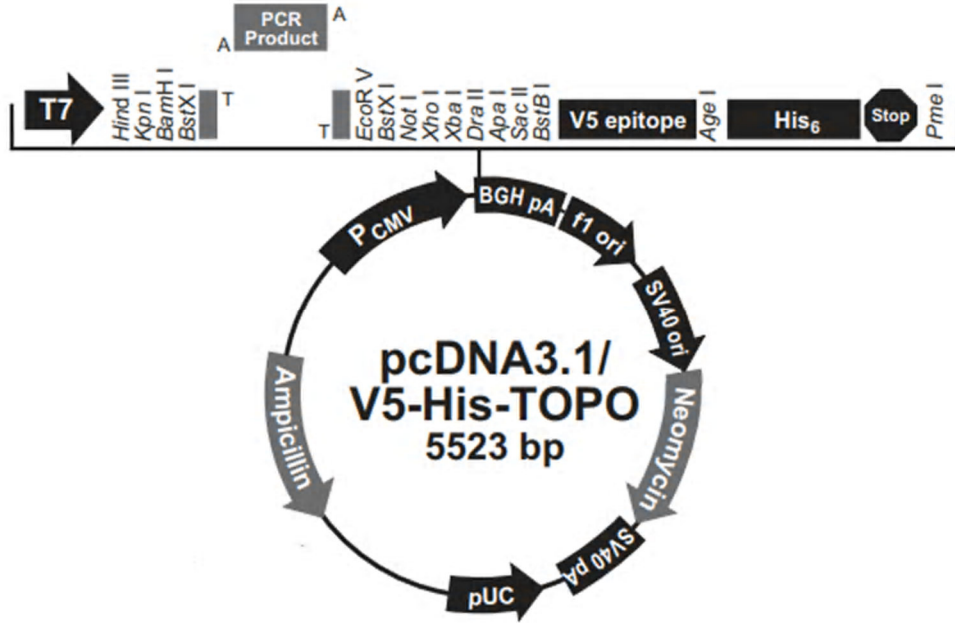
Şekil 34. Rekombinant pCOLD TF-NSs antijeni kullanılarak yapılan western blot görüntüsü. **A.** Pozitif kontrol; 12 μ g PEG presipite KKKAH virüs antijeni, poliklonal tavşan serumu ile problandı. **B.** 3 μ g rekombinant NSs antijeni, pCOLD TF-NSs rekombinant proteini ile 7 kere immünize edilen poliklonal fare serumu ile problandı. **C.** 3 μ g rekombinant NSs antijeni, KKKAH virüsü IgG pozitif olduğu bilinen insan serumu ile problandı. **D.** 3 μ g rekombinant NSs antijeni, KKKAH virüsü ile immünize poliklonal tavşan serumu ile problandı. **E.** 3 μ g rekombinant NSs antijeni, 3. pasaj fare beyni KKKAH virüsü ile immünize edilen poliklonal fare serumu ile problandı. **F.** Negatif kontrol; 12 μ g PEG presipite KKKAH virüs antijeni, immünizasyon öncesi fareden alınan serum ile problandı.

İmmunblotlama yöntemi ile virüse ait NSs proteininin varlığının araştırılması amacıyla antijen olarak prokaryotik sistemde üretilen rekombinant pCOLD TF-NSs proteini kullanılarak yapılan ve rekombinant protein ile immünize poliklonal fare serumu ile problanan western blot sonucunda birden fazla bantın görülmesi ve yaklaşık 66 kDa büyüklüğündeki bölgede rekombinant NSs'e karşı oluşmuş daha kalın bir bant görülmesi ile prokaryotik sistemde üretilen rekombinant proteinin tüm epitoplarına karşı oluşmuş antikor yanıtını gösterdi.

İmmunblotlama yöntemi ile virüse ait NSs proteininin varlığının araştırılması amacıyla antijen olarak prokaryotik sistemde üretilen rekombinant pCOLD TF-NSs proteini kullanılarak yapılan ve KKKAH virüsü IgG pozitif tavşan, fare ve insan serumları ile problanan western blot sonucunda; fare ve tavşan serumlarında rekombinant proteine ait bant görülmezken, insan serumu ile problanan kısımda beklenen büyüklükte yaklaşık 66 kDa büyüklüğünde tek bir bant görüldü.

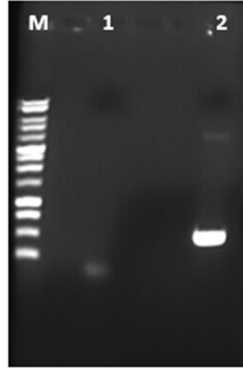
4.21. KKKAH Virüsü NSs Geninin PZR Yöntemi ile Çoğaltılması

KKKAH virüsü Turkey-Kelkit06 Suşu NSs geninin memeli hücrelerine plazmid DNA aracılı transfeksiyonu ve memeli hücrelerinde NSs proteinini eksprese etmek amacıyla, NSs genini klonlamak için bir memeli ekspresyon vektörü olan pcDNA 3.1/V5-His TOPO plazmid DNA kullanıldı.



Şekil 35. pcDNA3.1/V5-His-TOPO vektör haritası

NSs'in PZR yöntemi ile çoğaltılmasında kalıp olarak 50 ng/µl pCOLD TF-NSs plazmid DNA kullanıldı. Seçilen pcDNA 3.1/V5-His TOPO plazmid DNA; klonlama için 3' ucunda tek bazlık timidin (T) çıkıntıları ve vektöre kovalent olarak bağlı topoizomeras (aktif vektör) eklenerek lineer (doğrusal) hale getirilmiştir. Bu nedenle PZR için enzim olarak, PCR ürünlerinin 3' uçlarına tek bir deoksiadenozin (A) ekleyen, templeyt-bağımlı olmayan terminal transferaz aktivitesine sahip *Taq* polimeraz enzimi kullanıldı.

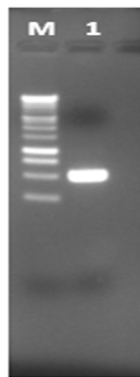


Şekil 36. pCOLD TF-NSs plazmid DNA'dan PZR yöntemi ile çoğaltılan NSs'in agaroz jel görüntüsü *Hat M*. 10000 bp DNA Ladder *Hat 1*. Negatif kontrol *Hat 2*. PZR ile çoğaltılmış NSs geni (477 bp)

KKKAH virüsü Turkey-Kelkit 06 suşuna ait 477 bp büyüklüğündeki NSs PZR yöntemi ile çoğaltıldı ve agaroz jelde görüntülendi.

4.22. NSs'in Agaroz Jelden Ekstraksiyonu

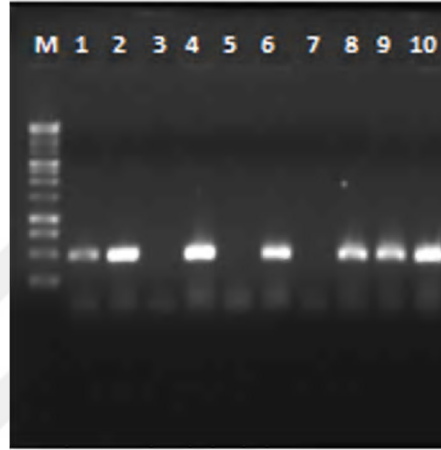
PZR yöntemi ile çoğaltılan NSs geni %1 agaroz jele yüklendi. 150 V'da 20 dk elektroforez tankında yürütüldü. Steril bistüri ile jelden kesilip kit yardımıyla pürifikasyonu yapıldı. 30 µl 1X TE tamponunda çözüldü. Pürifiye NSs miktarını belirlemek için NanoDrop 2000c kullanıldı. NSs DNA miktarı 111.2 ng/µl olarak belirlendi.



Şekil 37. NSs geninin agaroz jel ekstraksiyonu sonrası görüntüsü. *Hat M*. 10000 bp DNA Ladder *Hat 1*. PZR ile çoğaltılıp agaroz jelden ekstrakte edilen NSs geni (477 bp)

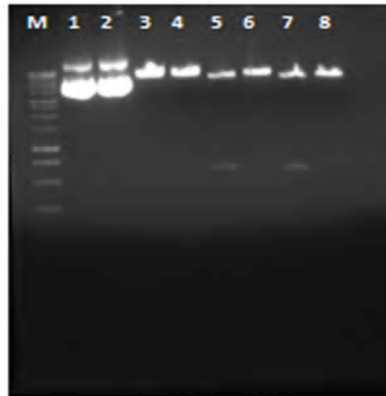
4.23. KKKAH Virüsü NSs Geninin pcDNA 3.1/V5-His TOPO Vektörüne Klonlanması

Agaroz jelden ekstrakte edilen NSs daha sonra pcDNA 3.1/V5-His TOPO plazmid DNA'ya klonlandı ve pcDNA 3.1/V5-His TOPO-NSs olarak adlandırıldı. Daha sonra plazmid DNA *E.coli* One Shot TOP10 kimyasal kompetan hücrelerine transforme edildi ve klonlamanın kontrolü için 10 tane koloni seçilip PZR yapıldı.



Şekil 38. Koloni PZR pozitif kolonilerin agaroz jel görüntüsü. *Hat M.* 10000 bp DNA Ladder

Koloni PZR pozitif çıkan iki koloni seçilip plazmid DNA ekstraksiyonu yapıldı. İnsert DNA'nın (NSs) plazmid içerisinde doğru yerleşip yerleşmediğini (in frame) kontrol etmek için *BamHI*, *XhoI* ve *XbaI* restriksiyon enzimleri ile 4 saat 37 °C'de tek ve çift kesim yapıldı.

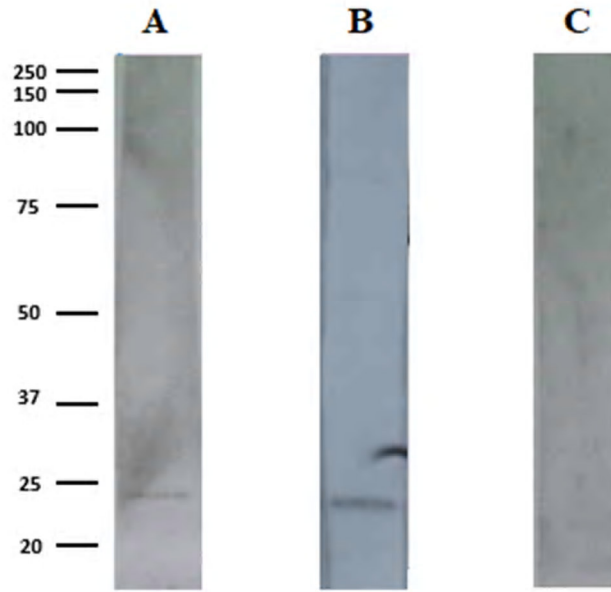


Şekil 39. Restriksiyon enzimleri ile tek ve çift kesilmiş pcDNA3.1/V5-His-TOPO-NSs plazmidlerin agaroz jel görüntüsü *Hat M.* 10000 bp DNA Ladder *Hat 1 ve 2.* Restriksiyon enzimleri ile kesilmemiş plazmid DNA'lar. *Hat 3 ve 4.* *XhoI* ile tek kesilmiş plazmid DNA'lar. *Hat 5 ve 7.* *BamHI* ve *XbaI* ile çift kesilmiş plazmid DNA'lar. *Hat 6 ve 8.* *XhoI* ve *XbaI* ile çift kesilmiş plazmid DNA'lar

Her iki plazmid DNA'nın da *XhoI* ile yapılan tek kesim ve *XhoI-XbaI* ile yapılan çift kesim sonucunda yapılan agaroz jel elektroforezi sonrasında insert DNA (NSs) görülmemesi; *BamHI* ve *XbaI* ile yapılan çift kesim sonrasında 554 bp bant görülmesi insert DNA'nın (NSs) her iki plazmid içerisinde de doğru yerleştiğini (in frame) gösterdi.

4.24. KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit06 Suşu NSs Geninin Memeli Hücrelerine plazmid DNA Aracılı Transfeksiyonu ve Memeli Hücrelerinde NSs Proteininin Ekspresyonunun Belirlenmesi

KKKAH virüsü Turkey-Kelkit06 suşu NSs genini içeren pcDNA3.1/V5-His-TOPO-NSs plazmidinin Lipofectamine 2000 reaktifi kullanılarak Vero E6 hücrelerine lipid aracılı transfeksiyonu yapıldı. NSs'in memeli hücrelerinde ekspresyonu sırasında proteozomal degradasyona uğrayıp uğramadığını araştırmak amacıyla, pcDNA3.1/V5-His-TOPO-NSs plazmidi ile transfekte edilmiş bazı hücrelere transfeksiyonun 20. saatinde 10µM MG132 proteozom inhibitörü uygulandı. Negatif kontrol olarak Vero E6 hücrelerinden bazıları 1µg pcDNA3.1/V5-His-TOPO/*lacZ* plazmidi ile transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra hücreler proteaz inhibitör kokteyli içeren lizis tamponu ile toplandı, dondur-çöz yöntemine tabi tutulduktan sonra elde edilen hücre lizatları, transfekte hücrelerde NSs'in ekspresyonunun kontrolü için immunblotlama yöntemi ile analiz edildi. Primer antikor olarak pCOLD TF-NSs rekombinant proteini ile 7 kere immünize edilen fare poliklonal serumu 1:2000 dilüsyonda; konjugat olarak keçi anti-fare IgG 1:2500 dilüsyonda uygulandı.



Şekil 40. pcDNA3.1/V5-His-TOPO-NSs plazmidini ile transfekte hücrelerde NSs'in ekspresyonunun western blot görüntüsü. **A.** MG132 uygulanmamış 24 saat transfekte edilmiş hücrelerde NSs'in ekspresyonu. **B.** 10 μ M MG132 uygulanmış 24 saat transfekte edilmiş hücrelerde NSs'in ekspresyonu. **C.** Negatif kontrol; pcDNA3.1/V5-His-TOPO/*lacZ* plazmidini ile transfekte hücrelerde NSs'in ekspresyonu

Memeli ekspresyon vektörü ile transfekte edilmiş Vero E6 hücrelerinde NSs proteininin ekspresyonunun belirlenmesi amacıyla yapılan 24 saatlik transfeksiyon sonucunda elde edilen hücre lizatları ile yapılan immunblotlama sonucunda NSs'in memeli hücrelerinde eksprese edildiği, plazmidten kaynaklanan V5 epitopundan ve polihistidin bölgesinden gelen yaklaşık 5 kDa'luk kısım ile NSs proteini 23 kDa büyüklüğünde görüldü. Aynı zamanda 10 μ M MG132 proteazom inhibitörü uygulanan transfekte hücrelerde NSs ekspresyonunun daha fazla olduğu görüldü. Negatif kontrol olarak pcDNA3.1/V5-His-TOPO/*lacZ* plazmidini ile transfekte hücrelerde, pCOLDF-NSs proteini ile 7 kere immünize edilen poliklonal fare serumu ile yapılan sonucunda beklenildiği gibi NSs'in ekspresyonu gözlenmedi.

4.25. Küçük interferans RNA (siRNA'lar) kullanılarak KKKAH virüsü Turkey-Kelkit06 Suşu NSs Geninin Susturulması ve NSs'in Virüs Titrasyonuna Etkisinin Belirlenmesi

KKKAH virüsü Turkey-Kelkit06 suşu NSs genini susturulması için BLOCK-iT RNAi Designer programı kullanılarak NSs transkriptini hedef alan 20 nükleotit uzunluğunda,

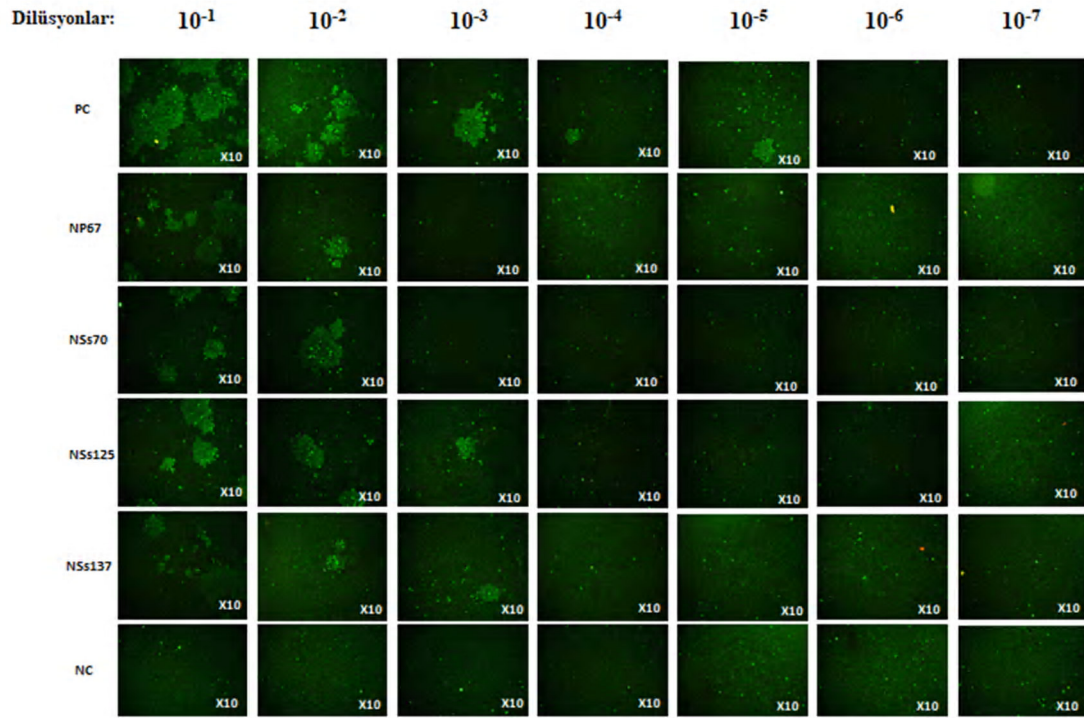
3 tane siRNA molekülü, pozitif kontrol olarak 1 tane KKKAH virüsü Turkey-Kelkit06 Suşu NP transkriptini hedef alan siRNA molekülü dizayn edildi (**Tablo 15**).

24 well pleytte, NP67, NSs70, NSs125 ve NSs137 siRNA'ları her kuyucukta 10 nM konsantrasyonda siRNA olacak şekilde Vero E6 hücrelerine transfekte edildi. Her bir siRNA transfeksiyonu için iki kuyucuk (iki replika) kullanıldı.

Transfeksiyondan 8 saat sonra, MOI 0.01 olacak şekilde hücreler 1 saat, 3. pasaj fare beyni KKKAH virüsü ile enfekte edildi. Enfeksiyondan 24 saat sonra hücre lizatları toplandı. Elde edilen hücre lizatlarının 10⁻¹'den 10⁻⁷'ye dilüsyonları yapılarak IFA yöntemi ile virüs titresi belirlendi. Pozitif kontrol olarak siRNA ile transfekte edilmemiş, sadece virüs ile enfekte edilmiş hücre lizatı kullanıldı. Negatif kontrol olarak siRNA ile transfekte edilmemiş ve virüs ile enfekte edilmemiş hücre lizatı kullanıldı. Her bir lizat 96 kuyucuklu pleytte 3 replika olacak şekilde test edildi.

Tablo 15. KKKAH virüsü Turkey-Kelkit06 Suşu NSs ve NP transkriplerini hedef alan siRNA'ların DNA sekansları

siRNA	DNA sekansı
NSs 70 sense (5'→3')	CAACAAAGUCCUUGCAGAAUACAAA
NSs 70 antisense (3'→5')	UUUGUAUUCUGCAAGGACUUUGUUG
NSs 125 sense (5'→3')	GAAAUGCUGUCAGACAUGAUUAGAA
NSs 125 antisense (3'→5')	UUCUAAUCAUGUCUGACAGCAUUUC
NSs 137 sense (5'→3')	GACAUGAUUAGAAGGAGGAAUCUAA
NSs 137 antisense (3'→5')	UUAGAUUCCUCCUUCUAAUCAUGUC
NP 67 sense (5'→3')	GGAAAUGGACUUAUGGACACUUUCA
NP 67 antisense (3'→5')	UGAAAGUGUCCAUAAGUCCAUUUCC



Şekil 41. siRNA transfeksiyonundan sonra KKKAH virüsü ile enfekte edilmiş hücre lizatlarında virüs titresinin IFA ile belirlenmesi. PK: Pozitif kontrol; NK: Negatif kontrol; X10: Floresan mikroskopu objektif büyütmesi

Transfeksiyonu farklı siRNA'lar ile yapılmış hücre lizatları ile virüs titresini belirlemek için yapılan IFA sonucuna göre; Pozitif kontrolde 10^{-4} dilüsyondan sonra plak oluşumu görülmedi ve virüs titresi 3×10^5 PFU/ml olarak hesaplandı. NP67 siRNA ile transfekte edilmiş hücre lizatlarında 10^{-2} dilüsyondan sonra plak oluşumu görülmedi ve virüs titresi $2,3 \times 10^3$ PFU/ml olarak hesaplandı. NSs70 siRNA ile transfekte hücre lizatlarında 10^{-2} dilüsyondan sonra plak oluşumu görülmedi ve virüs titresi $2,6 \times 10^3$ PFU/ml olarak hesaplandı. NSs125 siRNA ile transfekte hücre lizatlarında 10^{-3} dilüsyondan sonra plak oluşumu görülmedi ve virüs titresi 3×10^3 PFU/ml olarak hesaplandı. NSs137 siRNA ile transfekte hücre lizatlarında 10^{-3} dilüsyondan sonra plak oluşumu görülmedi ve virüs titresi 3×10^3 PFU/ml olarak hesaplandı. Negatif kontrolde beklenildiği gibi plak oluşumu görülmedi.

Tablo 16. KKKAH virüsü Turkey-Kelkit06 Suşu NSs ve NP transkriplerini hedef alan siRNA transfeksiyonundan sonra enfekte edilen hücrelerde virüs titresi

	Virüs titresi (PFU/ml)
Pozitif Kontrol	3×10^5 PFU/ml
NP 67	$2,3 \times 10^3$ PFU/ml
NSs 70	$2,6 \times 10^3$ PFU/ml
NSs 125	3×10^3 PFU/ml
NSs 137	3×10^3 PFU/ml
Negatif Kontrol	-

Sonuç olarak, KKKAH virüsü Turkey-Kelkit06 suşu NSs genini hedef alan siRNA'lar kullanılarak yapılan transfeksiyon sonucunda virüs titresinin 2 log düştüğü belirlendi. Pozitif kontrol olarak NP transkriptini hedef alan siRNA'nın uygulandığı hücre lizatındaki virüs titresinde de benzer şekilde 2 log azalma saptandı.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

KKKAH arbovirüs kaynaklı viral hemorajik ateşe neden olan bir hastalıktır, insanlara ağırlıklı olarak virüs ile enfekte *Hyalomma* spp. cinsi keneler, viremik hastalar ve hayvanların enfekte kan veya dokularına doğrudan temas yoluyla bulaşmaktadır. İnsanlarda KKKAH enfeksiyonunun klinik seyri hafif ateşli hastalıktan yüksek ateş, halsizlik, gastrointestinal semptomlar ve multiorgan yetmezliğine ilerleyebilen hemorajik sendroma kadar değişebilmektedir (Vorou ark., 2007; Çelikbaş ark., 2014). Türkiye'de ilk KKKAH vakası 2002 yılında tanımlanmıştır (Karti ve ark., 2004). Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı verilerine göre 2002-2017 yılları arasında toplam 10.562 vaka tespit edilmiştir ve vaka ölüm oranı %4,74 olarak bildirilmiştir (T.C. Sağlık Bakanlığı verileri).

KKKAH virüsünün de içinde bulunduğu *Bunyavirales* takımı, segmentli, negatif polariteli, tek iplikli RNA virüslerini içeren 9 aileye ayrılmıştır: *Feraviridae*, *Fimoviridae*, *Hantaviridae*, *Jonviridae*, *Nairoviridae*, *Peribunyaviridae*, *Phasmaviridae*, *Phenuiviridae* ve *Tospoviridae* (Maes ve ark., 2018, 2019). Bunyavirüsler omurgalılar (çoğunlukla memeliler), omurgasızlar (çoğunlukla eklembacaklılar) ve bitkiler de dahil olmak üzere geniş bir konakçı yelpazesine sahiptir. Bunyavirüslerin çoğu artropod kaynaklı virüslerdir (arbovirüsler) ve virüs ile enfekte eklembacaklı vektörlerin beslenme davranışlarına bağlı olarak omurgalılara veya bitkilere bulaşır (Horne and Vanlandingham, 2014). *Bunyavirales* takımının dört ailesi (*Peribunyaviridae*, *Nairoviridae*, *Hantaviridae* ve *Phenuiviridae*) insanlarda hayatı tehdit eden hastalıklara neden olabilecek virüs üyelerini içermektedir.

Bunyavirüslerin enfeksiyonu virüsün glikoproteinleri ile hücre yüzeyine tutunması ile başlamaktadır. Virüs hücreye bağlandıktan sonra klatri aracılı endositoz mekanizması ile hücre içine alınır. Virüsün hücre girişinin ve füzyonunun ardından genomik RNA'lar sitozole salınır ve enkapsüle edilmiş vRNA, viral mRNA'ları sentezmesi için L proteinine şablon görevi yapmaktadır (Zivcec ve ark., 2016). Bunyavirüs

genomlarının çoğu, dört veya daha fazla genomik RNA segmentine sahip olan *Fimoviridae* ailesindeki Emaravirüsler hariç, S (Küçük), M (Orta) ve L (Büyük) adlı üç RNA segmentine sahiptir (Mielke-Ehret ve Muhlbach; 2012). Üç genomlu bunyavirüsler için, NP proteini S segmentinden kodlanmaktadır, Gn ve Gc proteinleri, M segmenti tarafından kodlanan glikoprotein öncüsünün bölünmesiyle oluşmakta ve polimeraz L proteini, L segmentinden eksprese edilmektedir.

NP proteinine ek olarak, *Peribunyaviridae*, *Phenuiviridae* ve *Tospoviridae* ailesi üyelerinin S segmentleri, iki alternatif stratejiden birini benimseyen ikinci bir protein olan NSs'leri kodlar. *Peribunyaviridae* ailesinde, NP ve NSs ortak bir mRNA'daki iki farklı açık okuma çerçevesinden transle edilirken, *Phenuiviridae* ve *Tospoviridae* ailelerinde bu iki proteinin ekspresyonu için ambisense kodlama stratejisi uygulanır. Ambisense genoma sahip virüslerde S segmenti vRNA (3'→5') transkripsiyonla komplementer antijenomik RNA (5'→3') oluşturmakta ve oluşan bu antijenomik vRNA'da yer alan NSs'e ait açık okuma çerçevesinin mRNA'ya translasyonu ile NSs'in ekspresyonu gerçekleşmektedir. (Barr ve ark. 2005; Copeland ve ark. 2013; Gamage ve ark., 2015). Yakın zamanda Bunyamwera virüsü (BUNV), La Crosse virüsü (LACV), Akabane virus (AKBV) (Blakqori ve Weber, 2005; Ogawa ve ark., 2007; Weber ve ark., 2001) ve Schmallenberg virus (SBV) (Elliott ve ark., 2013; Varela ve ark., 2013) için reverse genetik sistemlerinin kullanımı, bunyavirüs biyolojisi hakkında ve özellikle yapısal olmayan proteinler ile ilgili çalışmaları arttırmıştır. Yapılan çalışmalar, NSs'in virüsün replikasyonu üzerine etkisinin olduğunu ve viral patogeneze katkıda bulunduğunu göstermiştir (Bridgen ve ark., 2001). NSs'den yoksun olan BUNV (Δ NSs), vahşi tip (wt) BUNV ile karşılaştırıldığında büyüme hızındaki azalmanın yanısıra konak memeli hücresinin proteini sentezini kapatma kabiliyetinde de bir azalma göstermiştir (Bridgen ve ark., 2001). Benzer bir etki wt LACV ile LACV Δ NSs'de de gözlenmiştir (Blakqori ve Weber, 2005). Ayrıca, *in vivo* fare deneyleri, virüsün beyindeki tropizminin, wt BUNV ve BUNV Δ NSs'de aynı olmasına rağmen, wt virüsün mutant virüsten daha hızlı replike olduğunu ve yayıldığını göstermiştir (Bridgen ve ark., 2001). Benzer şekilde NSs'i silinmiş virüs ile enfekte edilmiş farelerde virüsün atenüe olduğu görülmüş ve böylece bir virülans faktörü görevi gördüğü düşünülmüştür (Ogawa ve ark., 2007).

Hewson ve ark. (2004), KKKAH virüsünün 19 farklı suşunda kısmi RNA segmentlerinin sekans analizlerini yaptıkları çalışmada, AP92 izolatu hariç diğer tüm suşlarda viral S segmentinde 453-477 nt büyüklüğünde ek bir açık okuma çerçevesinin varlığını göstermişlerdir. KKKAH virüsü S segmentinde NP proteininin kodlandığı bölgenin tam tersi oryantasyonda ikinci bir proteinin kodlanması, virüsün ambisens genoma sahip olabileceğini düşündürmektedir. Bu tez çalışmasında, KKKAH virüsü NSs proteinini kodlayan gen bölgesi pCOLD TF rekombinant vektörüne klonlanmış ve prokaryotik sistemde 66 kDa büyüklüğündeki rekombinant NSs proteini üretilip saflaştırılmıştır (**Şekil 24,25**). NSs proteininin biyolojik olarak aktif olduğunun araştırılması için, aynı rekombinant protein ile fare immünizasyonları yapılmış ve hiperimmün serumlar elde edilmiştir. Elde edilen bu serumlar ELISA yöntemi ile test edilmiş ve prokaryotik sistemde üretilen rekombinant proteinin biyolojik olarak aktif olduğu gösterilmiştir (**Şekil 26**).

Prokaryotik sistemde üretilen pCOLD TF-NSs antijeni kullanılarak indirekt ELISA geliştirilmesi çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla rekombinant pCOLD TF-NSs antijeni ELISA pleytlerine bağlanarak KKKAH virüsü IgG pozitif olduğu bilinen insan ve fare serumları test edilmiştir (**Şekil 27, 28**). Ancak her iki ELISA sonucunda da pozitif ve negatif serumlar arasında anlamlı bir fark görülemedi, pozitif serumların OD değerlerinin cutt off değerlerinin altında kaldığı görülmüştür. NSs'in soluble formda üretilmesine rağmen ELISA'da istenilen sonuçların alınamamasının birçok nedeni olabilir. Bu sebeplerden birisi soluble formda üretilen NSs antijeninin daha yüksek derecede saflaştırılması gerektiği olabilir. KKKAH pozitif serum örneklerinin enfeksiyonunun hangi döneminde alındığı da ELISA sonuçlarına etkisi olabilir. Bir başka neden, enfeksiyonun erken döneminde eksprese edildiği bilinen NSs proteininin hızlı bir şekilde degrade olabileceği ve organizmada yüksek antikor yanıtını uyaramadığı düşünülmektedir. *Bunyavirales* takımında yer alan Rift Vadisi Ateşi virüsü ve KKKAH virüsü ile ilişkili olan Bunyamwera virüsü NSs proteininin enfeksiyondan 12 saat sonra ekspresyon seviyesinin azalması bu düşünceyi kanıtlar niteliktedir (Knippenberg ve ark., 2013).

Prokaryotik sistemde üretilen rekombinant pCOLD TF-NSs antijeni kullanılarak indirekt ELISA geliştirilmesi çalışmalarından istenilen sonuç alınmadığı için bir diğer alternatif olan peptid ELISA geliştirilmesi denemeleri yapılmıştır. Sentetik peptitlerin

serolojik tanıda antijen olarak kullanılması büyük avantajlara sahiptir, çünkü peptitlerin yenilenebilir şekilde üretimleri kolay ve ucuzdur. Bununla birlikte, peptit tabanlı ya da tek epitop tabanlı ELISA testinde, antijenik bilgi eksikliği nedeniyle duyarlılık düşük olabilmektedir. Serolojide kullanılan peptitlerin çoğu sürekli epitopları temsil eder, çünkü küçük doğrusal peptidler kullanarak kompleks süresiz epitoplara karşı oluşan antikorları tespit etmek zordur. Peptit seçimi ve tasarımı, başarılı bir peptit ELISA için büyük öneme sahiptir (Langedijk ve ark., 2001). Bu çalışmada NSs proteinine ait 20 aminoasitlik sentetik peptitler kullanılarak, rekombinant antijen ile immünize fare serumları, KKKAH IgG pozitif insan ve fare serumları test edilmiştir (**Şekil 29, 30, 31**). Ancak NSs peptitleri kullanılarak yapılan ELISA sonucunda pozitif ve negatif serumlarda bir antikor yanıtı şekillenmemiş; pozitif serumlarda cutt off değerinin üstünde saptanabilir OD yanıtı oluşmamıştır. Bunun nedeni, çalışmada test edilen serumların hastalığın hangi evresinde alındığı bilinmediğinden, test edilen serumlardaki IgG yanıtının seviyesinin düşüklüğünden kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir. Benzer şekilde Zika virüsü NS2B sentetik polipeptitleri kullanılarak geliştirilen peptit ELISA'da (Mishra ve ark., 2018) semptomatik enfeksiyonun başlamasından 2-3 hafta sonra kullanılan serumlarda sonuç alınması bu iddiayı güçlendirmektedir.

KKKAH virüsü NSs proteini ile ilgili literatürde tek bir çalışma mevcuttur. KKKAH virüsü ile transfekte hücrelerde, NSs'in mitokondriye lokalize olduğu ve mitokondriyal membran potansiyelini bozarak apoptozu indüklediği bulunmuştur (Barnwal ve ark., 2015). KKKAH virüsü ile MOI 1 olacak şekilde enfekte edilen SW-13 hücrelerinde 72. saatte elde edilen hücre lizatı ile yapılan immunblotlamada NSs proteini tespit edilmiş olsa da çalışmada bahsedilen apoptotik fonksiyonlar sadece NSs'nin aşırı ekspresyonuna dayanmaktadır; bu nedenle NSs'in varlığı ile ilgili daha fazla kanıtı ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tez çalışmasında KKKAH virüsü ile enfekte hücrelerde NSs varlığının gösterilmesi amacıyla, Vero E6 hücreleri virüsle MOI 2 olacak şekilde enfekte edilmiş ve rekombinant NSs ile immünize poliklonal fare serumları kullanılarak enfeksiyonun farklı saatlerinde IFA yöntemi ile proteinin varlığı araştırılmıştır. KKKAH Turkey-Kelkit06 suşu ile Vero E6 hücrelerine yapılan enfeksiyon sonrası, enfeksiyonun 6. saatinden itibaren 72. saate kadar NSs'in eksprese olduğu IFA yöntemi ile gösterilmiştir (**Şekil 32**). Benzer şekilde MOI 0,01 ile enfekte edilmiş Vero E6 hücre lizatlarından oligo ve random primer ile elde edilen cDNA'lar ile yapılan revers

transkriptaz PZR sonucunda NSs genine ait spesifik bantlar gösterilmiş ve enfekte hücrelerde NSs'in ekspresyonu teyit edilmiştir (**Şekil 33**). Aynı zamanda rekombinant NSs antijeni kullanılan ve KKKAH IgG pozitif insan serumu ile problanan western blot sonucunda rekombinant protein büyüklüğünde yaklaşık 66kDa tek bant görülmüştür; ancak KKKAH IgG pozitif tavşan ve fare serumlarında aynı sonuç alınamamıştır (**Şekil 34**). Elde edilen bu sonuç KKKAH virüsü NSs proteininin az miktarda üretildiğini ya da üretildikten kısa bir süre sonra degradasyona uğramış olabileceğini düşündürmektedir.

KKKAH virüsü NSs proteininin enfeksiyon sırasında memeli hücrelerinde degradasyona uğrayıp uğramadığını araştırmak amacıyla pcDNA3.1/V5-His-TOPO memeli ekspresyon vektörüne klonlanan NSs geninin, memeli hücrelerine lipid aracılı transfeksiyonu yapılmış ve bazı hücrelere kontrol amaçlı 10 µM MG132 proteozom inhibitörü uygulanmıştır. Elde edilen hücre lizatları ile yapılan western sonucunda MG132 uygulanan hücrelerde NSs ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir (**Şekil 40**). Elde edilen bu sonuç KKKAH virüsü NSs proteininin hızlı bir şekilde degradasyona uğradığını ve bu nedenle KKKAH virüsü NSs proteininin varlığının ortaya konulmasında KKKAH IgG kuvvetli pozitif insan serumu ile problanan western blot sonucunda rekombinant protein büyüklüğünde yaklaşık 66 kDa tek bant görülmesine rağmen KKKAH IgG pozitif tavşan ve fare serumlarında aynı sonucun neden alınamadığı konusunda ip ucu vermektedir.

Yapısal olmayan viral proteinlerin viral replikasyon üzerine etkileri olduğu bilinmektedir (Eifan ve ark., 2013). RNA interferans (RNAi) yoluyla spesifik olarak genlerin susturulması viral replikasyon üzerine oldukça değerli bilgiler vermektedir (Fire ve ark., 1998). RNAi'nin araçları olan küçük interferans RNA'lar (siRNA'lar), homolog mRNA'nın sekansa özgü bozulmasını indükleyerek translasyonu engelleyen çift sarmallı RNA moleküllerinin (uzunluğu 20-25 nükleotit) bir sınıfıdır (Elbashir ark., 2001; Hammond, 2005). Son zamanlarda, HIV-1 (Jacque ark., 2002; Kumar ark., 2008), influenza virüsü (Ge ve ark., 2004), solunum sinsityal virüsü (Bitko ve ark., 2005), hepatit B virüsü (Kapadia ve ark., 2003) dahil olmak üzere akut veya kronik enfeksiyonlara neden olan patojenik insan virüslerini hedef alan birkaç RNAi tabanlı uygulama geliştirilmiştir. İnsan immün yetmezlik virüsü tip 1 (HIV-1), RNA interferans tarafından inhibe edildiği gösterilen ilk primat virüsüdür. siRNA'ların HIV enfeksiyonunun erken ve geç aşamalarının inhibisyonuna yol açtığı Jacque ve ark.

(2002) tarafından bildirilmiştir. Hepatit C virüsü (HCV) de olası siRNA hedefleri için incelenmiştir. 5' UTR ve HCV'nin kor, NS3, NS4B ve NS5B kodlanma sekanslarının siRNA'ya duyarlı olduğu gösterilmiştir (Yokota ark., 2003; Kapadi ark., 2003; Seo ark., 2003; Randall ark., 2003; Wilson ark., 2003; Takigawa ark., 2004). Hepatit B virüsünde, RNAi'nin hedefleri olarak P, Pre C/C, Pre S/S, X genleri kullanılmıştır (Hamasaki ark., 2003; Ying ark., 2003; Shlomai ark., 2003; Ren ark., 2005; Moore ark., 2005). Bu shRNA'lar HBV replikasyonunu etkili bir şekilde inhibe etmiş ve ayrıca antiviral ilaç, lamivudin ile sinerjik etkiler göstermiştir (Chen ve ark., 2003).

Hazara virüsü (HAZV), *Nairoviridae* familyasındaki HAZV, insanlar için patojenik olmamasına rağmen, yeni doğan farelerde ölümcüldür (Smirnova ve ark., 1977) ve yetişkin farelerde KKKAH virüsü epruvasyonuna karşı çapraz koruma sağlar. HAZV, yakın serolojik ve filogenetik ilişkisi nedeniyle KKKAH virüsünü incelemek için alternatif bir modeldir (Foulke ve ark., 1981). Ayrıca, BSL2 laboratuvarlarında kullanılabilir. Flusin ve ark. (2011), insan akciğer karsinoma hücre hattı (A549) ve Afrika yeşil maymun böbrek hücre hattı (Vero E6) kullanarak yaptıkları çalışmada HAZV L, M, S segmentleri tarafından kodlanan mRNA'ları hedefleyen siRNA'ları ribavirin ile kombine olarak uyguladıklarında virüsün replikasyonunun inhibe edildiğini göstermişlerdir; bu çalışmada kullanılan L ve M genomik segmentleri tarafından kodlanan mRNA'ları hedefleyen siRNA'ların S segmentini hedefleyenlerden daha düşük bir etkiye sahip olduğunu bulmuşlardır. Diğer RNA virüslerinde olduğu gibi, nairovirüslerinde siRNA'ların inhibisyonundan kaçışlarına katkıda bulunabilecek yüksek bir mutasyon oranları vardır. Bu nedenle siRNA molekülleri dizayn edilirken en fazla korunan viral dizileri hedef alan siRNA'ların kullanılması viral mutantların ortaya çıkışı azalmaktadır. Üç genomik segment arasında, en düşük mutasyon oranı nedeniyle S segmenti *Nairovirüs*'lerde en fazla korunan kısımdır (Anagnostou ve Papa, 2009; Deyde ve ark., 2006). Bu nedenle, S segmentine karşı yönlendirilen siRNA'ların potansiyel olarak anti-nairovirüs molekülleri olarak kullanılacaklarını göstermektedir. Bu çalışmada, KKKAH virüsü NSs'in virüs replikasyonuna etkisi olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla, virüsün korunmuş bölgesi olarak, NSs'i hedef alan 3 farklı siRNA molekülünü BLOCK-iT RNAi Designer programı kullanarak dizayn edildi. Pozitif kontrol olarak virüsün S segmentinden kodlanan NP proteinini hedef alan 1 siRNA molekülü kullanıldı. 10 nM konsantrasyonda siRNA ile transfekte edilen Vero

E6 hücreleri daha sonra KKKAH virüsü ile MOI 0,01 olacak şekilde enfekte edildi. Enfeksiyondan 24 saat sonra hücre lizatlarında virüsün titresini IFA yöntemi ile belirlendi. KKKAH virüsü Turkey-Kelkit06 suşu NSs transkriptini hedef alan siRNA'lar kullanılarak yapılan transfeksiyon sonucunda virüs titresinin 2 log düştüğü belirlenmiştir (**Şekil 41**). Pozitif kontrol olarak NP transkriptini hedef alan siRNA'nın uygulandığı hücre lizatındaki virüs titresinde de benzer şekilde 2 log azalma saptanmıştır. Böylece ilk defa KKKAH virüs replikasyonu üzerine virüsün NSs proteinin etkisi belirlenmiş ve bir virülans faktörü olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca, bu sonuçlar KKKAH enfeksiyonunun erken dönemlerinde proteazlar aracılığı ile yapılan hücre içi savunma mekanizmasının varlığına da işaret etmektedir.

Bu tez çalışmasında, KKKAH virüsü NSs proteini prokaryotik sistemde üretilmiş ve biyolojik olarak aktif olduğu fare immunizasyon deneyleri ile gösterilmiştir. KKKAH virüsü NSs antijeni kullanarak ELISA geliştirilmesi çalışmalarında istenilen sonuçlara ulaşılamamıştır. ELISA optimizasyon çalışmaları, daha yüksek oranda pürifiye antijen eldesi ve test edilecek örneklerin alınma zamanları gibi parametreler üzerinde gelecekte çalışılarak ELISA geliştirilmesinde mesafe alınabileceği düşünülmektedir. Tez çalışmasında, KKKAH virüsü ile enfekte hücrelerde NSs varlığının KKKAH virüsü ile enfekte Vero E6 hücreleri rekombinant NSs ile immunize poliklonal fare serumları kullanılarak enfeksiyonun farklı saatlerinde IFA yöntemi ile proteinin varlığı gösterilmiştir. Ayrıca, KKKAH IgG pozitif yüksek titreli insan serumu ile yapılan immunoblotma ile NSs varlığı teyit edilmiştir. Çalışmanın son bölümünde KKKAH virüsü NSs proteinin virülant bir faktör olduğu siRNA çalışmalarıyla saptanmıştır. Elde edilen bu sonuç, KKKAH karşı siRNA'ları antiviral ajanlarla kombinasyonu gelecekte hastalık için bir tedavi seçeneği olabileceğini göstermektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Aker S, Akıncı H, Kılıçoğlu C, Leblebicioglu H. The geographic distribution of cases of Crimean-Congo hemorrhagic fever: Kastamonu, Turkey. *Ticks Tick Borne Dis*, 2015; 6(6): 730-736.
2. Akıncı E, Bodur H, Leblebicioglu H. Pathogenesis of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2013; 13(7): 429-437.
3. Albariño CG, Bird BH, Nichol ST. A shared transcription termination signal on negative and ambisense RNA genome segments of Rift Valley fever, sandfly fever Sicilian, and Toscana viruses. *J Virol*, 2007; 81: 5246–5256
4. Altamura LA, Bertolotti-Ciarlet A, Teigler J, Paragas J, Schmaljohn CS, Doms RW. Identification of a novel C-terminal cleavage of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus PreGN that leads to generation of an NSM protein. *J Virol*, 2007; 81: 6632–6642.
5. Anagnostou V, Papa A. Evolution of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever virus. *Infect Genet Evol*, 2009; 9: 948–954.
6. Andersson I, Simon M, Lundkvist A, Nilsson M, Holmström A, Elgh F, Mirazimi A. Role of actin filaments in targeting of Crimean Congo hemorrhagic fever virus nucleocapsid protein to perinuclear regions of mammalian cells. *J Med Virol*, 2004a; 72(1): 83–93.
7. Andersson I, Bladh L, Mousavi-jazi M, Magnusson K, Lundkvist A, Haller O, Mirazimi A. Human MxA protein inhibits the replication of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J. Virol*, 2004b; 78: 4323–4329.
8. Arslan S, Engin A, Özbilüm N. Toll-like receptor 7 Gln11Leu, c.4-151A/G, and +1817G/T polymorphisms in Crimean Congo hemorrhagic fever. *J Med Virol*, 2015; 87(7): 1090–1095.

9. Ascioğlu S, Leblebicioğlu H, Vahaboglu H, Chan KA. Ribavirin for patients with Crimean-Congo haemorrhagic fever: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2011; 66(6): 1215–1222.
10. Atkinson B, Chamberlain J, Logue C H, Cook N, Bruce C, Dowall S D, and Hewson R. Development of a real-time rt-PCR assay for the detection of Crimean-Congo hemorrhagic Fever virus. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2012; 12: 786-793.
11. Bajpai S, Nadkar MY. Crimean Congo hemorrhagic fever: requires vigilance and not panic. *J Assoc Physicians India*, 2011; 59: 164.
12. Bakir M, Ugurlu M, Dokuzoguz B, et al. Crimean-Congo haemorrhagic fever outbreak in Middle Anatolia: a multicentre study of clinical features and outcome measures. *J Med Microbiol*, 2005; 54: 385.
13. Barber GN. Host defense, viruses and apoptosis. *Cell Death Differ*, 2001; 8: 113–126.
14. Barnwal B, Karlberg H, Mirazimi A, Yee-Joo T. The Non-structural protein of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever virus disrupts the Mitochondrial Membrane Potential and Induces Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 2015; 291(2): 582-591
15. Barr JN, Rodgers JW, Wertz GW. The Bunyamwera virus mRNA transcription signal resides within both the 3' and the 5' terminal regions and allows ambisense transcription from a model RNA segment. *J Virol*, 2005; 79: 12602–12607.
16. Bartolini B, Gruber CE, Koopmans M, Avšič T, Bino S, Christova I, Grunow R, Hewson R, Korukluoglu G, Lemos CM, Mirazimi A, Papa A, Sanchez-Seco MP, Sauer AV, Zeller H, Nishi C, Capobianchi MR, Ippolito G, Reusken CB, Di Caro A. Laboratory management of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus infections: perspectives from two European networks. *Euro Surveill*, 2019; 24(5).
17. Bente DA, Alimonti JB, Shieh WJ. Pathogenesis and immune response of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in a STAT-1 knockout mouse model. *J Virol*, 2010; 84(21): 11089–100.

18. Bente DA, Forrester NL, Watts DM, McAuley AJ, Whitehouse CA, Bray M. Crimean-Congo hemorrhagic fever: History, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity. *Antiviral Res*, 2013; 100 (1): 159–189
19. Berezky S, Lindegren G, Karlberg H. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infection is lethal for adult type I interferon receptor-knockout mice. *J Gen Virol*, 2010; 91(6): 1473–1477.
20. Bergeron E, Albariño CG, Khristova ML, Nichol ST. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus-encoded ovarian tumor protease activity is dispensable for virus RNA polymerase function. *J. Virol*, 2010; 84: 216–226.
21. Bergeron E, Vincent MJ, Nichol ST. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus glycoprotein processing by the endoprotease SKI-1/S1P is critical for virus infectivity. *J. Virol*, 2007; 81: 13271–13276.
22. Bergeron E, Zivcec M, Chakrabarti AK, Nichol ST, Albariño CG, Spiropoulou CF. Recovery of recombinant Crimean Congo hemorrhagic fever virus reveals a function for non-structural glycoproteins cleavage by furin. *PLoS Pathog*, 2015; 11: 106.
23. Bertolotti-ciarlet A, Smith J, Strecker K, Paragas J, Altamura LA, Mcfalls JM, Frias-sta N, Schmaljohn CS, Doms RW. Cellular localization and antigenic characterization of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus glycoproteins. *J. Virol*, 2005; 79: 6152–6161.
24. Bitko V, Musiyenko A, Shulyayeva O, Barik S. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat Med*, 2005; 11: 50–55.
25. Blackburn NK, Besselaar TG, Shepherd AJ, Swanepoel R. Preparation and use of monoclonal antibodies for identifying Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1987; 37(2): 392–397.
26. Blaising J, Lévy PL, Polyak SJ, Stanifer M, Boulant S, Pécheur EI. Arbidol inhibits viral entry by interfering with clathrin-dependent trafficking. *Antiviral Research*, 2013; 100(1): 215–219.
27. Blakqori G, Delhaye S, Habjan M, Blair CD, Sanchez-Vargas I, Olson KE, Attarzadeh-Yazdi G, Fragkoudis R, Kohl A, Kalinke U. La crosse bunyavirus

- nonstructural protein nss serves to suppress the type I interferon system of mammalian hosts. *J Virol*, 2007; 81: 4991–4999.
28. Blakqori G, Weber F. Efficient cDNA-based rescue of La Crosse bunyaviruses expressing or lacking the nonstructural protein nss. *J Virol*, 2005; 79: 10420–10428.
 29. Bodur H, Erbay A, Akinci E, Onguru P, Bayazit N, Eren SS, Kubar A. Effect of oral ribavirin treatment on the viral load and disease progression in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Int J Infect Dis*, 2011;15(1): 44-47
 30. Bray M. Comparative pathogenesis of Crimean Congo hemorrhagic fever and Ebola hemorrhagic fever. In: Ergonul O, Whitehouse CA (eds), *Crimean Congo Hemorrhagic Fever: A Global Perspective*. Springer, Dordrecht, 2007: 221-231.
 31. Bridgen A, Weber F, Fazakerley JK, Elliott RM. Bunyamwera bunyavirus nonstructural protein nss is a nonessential gene product that contributes to viral pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 200; 98: 664–669.
 32. Burt FJ, Leman PA, Abbott JC, Swanepoel R. Serodiagnosis of Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Epidemiol Infect*, 1994; 113: 551-562.
 33. Butenko AM, Chumakov MP, Smirnova SE, Vasilenko TI, Zavodova TI, Tkachenko EA, Rubin SG, Stolbov DN. Isolation and investigation of Astrakhan Strain (“Drozdov”) of Crimean Hemorrhagic Fever Virus. *Materials From the 15th Scientific Session (English translation NAMRU3-T866)*. Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, 1968; 88–90.
 34. Buttigieg KR, Dowall SD, Findlay-Wilson S, Miloszezewska A, Rayner E, Hewson R, Carroll MW. A novel vaccine against Crimean-Congo Haemorrhagic Fever protects 100% of animals against lethal challenge in a mouse model. *PLoS ONE*, 2014; 9(3), 91516.
 35. Canakoglu N, Berber E, Tonbak S, Ertek M, Sozdutmaz I, Aktas M, Kalkan A, Ozdarendeli A. Immunization of knock-out alpha/beta 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): 3579

36. Capodagli GC, Deaton MK, Baker EA. Diversity of ubiquitin and ISG15 specificity among nairoviruses' viral ovarian tumor domain proteases. *J Virol*, 2013; 87(7): 3815–3827.
37. Casals J. Antigenic similarity between the virus causing Crimean hemorrhagic fever and Congo virus. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1969; 131: 233–236.
38. Casals J, Henderson BE, Hoogstraal H, Johnson KM, Shelokov A. A review of Soviet viral hemorrhagic fevers. *J Infect Dis*, 1970; 122: 437–453.
39. Chattopadhyay S, Marques JT, Yamashita M, Peters KL, Smith K, Desai A, Williams BR, Sen GC. Viral apoptosis is induced by irf-3-mediated activation of bax. *Embo J*, 2010; 29: 1762–1773.
40. Chattopadhyay S, Yamashita M, Zhang Y, Sen GC. The irf-3/bax-mediated apoptotic pathway, activated by viral cytoplasmic rna and DNA, inhibits virus replication. *J Virol*, 2011; 85: 3708–3716.
41. Chen JP, Cosgriff TM. Hemorrhagic fever virus-induced changes in hemostasis and vascular biology. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2000, 11: 461-483
42. Chen Y, Du D, Wu J. Inhibition of hepatitis B virus replication by stably expressed shRNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003; 311: 398-404.
43. Chinikar S, Bouzari S, Shokrgozar MA. Genetic diversity of Crimean Congo hemorrhagic fever virus strains from Iran. *J Arthropod-Borne Dis*, 2014; 10(2): 127-140.
44. Chinikar S, Shah-Hosseini N, Bouzari S, Shokrgozar MA, Mostafavi E, Jalai T, Khakifirouz S, Groschup MH, Niedrig M. Assessment of recombination in the S-segment genome of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in Iran. *J Arthropod-Borne Dis*, 2016; 10: 12–23.
45. Christova I, Kovacheva O, Georgieva G, Ivanova S, Argirov D. Vaccine against Congo-Crimean haemorrhagic fever virus-Bulgarian input in fighting the disease. *Probl Infect Parasit Dis*, 2010; 37: 7–8.
46. Chumakov MP. A short review of the investigation of the virus of Crimean hemorrhagic fever. In: Chumakov MP (eds), *Endemic Viral Infections*. Sborn Trud Inst Polio Virus Encefal Akad Med Nauk USSR, Moscow, 1965: 193–196.

47. Chumakov MP. On 30 years of investigation of Crimean hemorrhagic fever. *Trud Inst Polio Virus Encefal Akad Med Nauk USSR, Moscow*, 1974: 5–18
48. Chumakov MP, Butenko AM, Shalunova NV, Mart'ianova LI, Smirnova SE, Bashkirtsev Iu N, Zavodova TI, Rubin SG, Tkachenko EA, Karmysheva V, Reingol'd VN, Popov GV, Savinov AP. New data on the viral agent of Crimean hemorrhagic fever. *Vopr Virusol*, 1968; 13(3): 377.
49. Chumakov MP, Smirnova SE, Tkachenko EA. Relationship between strains of Crimean haemorrhagic fever and Congo viruses. *Acta Virol*, 1970; 14: 82–85.
50. Cobo F. Viruses Causing Hemorrhagic Fever. *Open Virol J*, 2016; 10: 1–9.
51. Colon-Ramos DA, Irusta PM, Gan EC, Olson MR, Song J, Morimoto RI, Elliott RM, Lombard M, Hollingsworth R, Hardwick JM. Inhibition of translation and induction of apoptosis by bunyaviral nonstructural proteins bearing sequence similarity to reaper. *Mol Biol Cell*, 2003; 14: 4162–4172.
52. Conger NG, Paolino KM, Osborn EC. Health care response to CCHF in US soldier and nosocomial transmission to health care providers, Germany, 2009. *Emerg Infect Dis*, 2015; 21:23.
53. Connolly-Andersen AM, Magnusson KE, Mirazimi A. Basolateral entry and release of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in polarized MDCK-1 cells. *J Virol*, 2007; 81: 2158–2164.
54. Copeland AM, Altamura LA, Van Deusen NM, Schmaljohn CS. Nuclear relocalization of polyadenylate binding protein during Rift Valley fever virus infection involves expression of the NSs gene. *J Virol*, 2013; 87: 11659–11669.
55. Deyde VM, Khristova ML, Rollin PE, Ksiazek TG, Nichol ST. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus genomics and global diversity. *J Virol*, 2006; 80: 8834–8842.
56. Dilber E, Cakir M, Erduran E, Koksall I, Bahat E, Mutlu M, Okten A. High-dose methylprednisolone in children with Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Tropical Doctor*, 2010; 40(1), 27–30.

57. Dilcher M, Koch A, Hasib L, Dobler G, Hufert FT, Weidmann M. Genetic characterization of Erve virus, a European Nairovirus distantly related to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Virus Genes*, 2012; 45(3): 426-432.
58. Dokuzoguz B, Celikbas AK, Gök ŞE, Baykam N, Eroglu MN, Ergönül Ö. Severity scoring index for Crimean-Congo hemorrhagic fever and the impact of ribavirin and corticosteroids on fatality. *Clinical Infectious Diseases*, 2013; 57(9): 1270–1274.
59. Donets MA, Chumakov MP, Korolev MB, Rubin SG. Physicochemical characteristics, morphology and morphogenesis of virions of the causative agent of Crimean hemorrhagic fever. *Intervirology*, 1977; 8: 294–308.
60. Dowall SD, Graham VA, Rayner E, Hunter L, Watson R, Taylor I, Hewson R. Protective effects of a Modified Vaccinia Ankara-based vaccine candidate against Crimean-Congo Haemorrhagic Fever virus require both cellular and humoral responses. *PLoS ONE*, 2016; 11(6): 0156637.
61. Drosten C, Gottig S, Schilling S, Asper M, Panning M, Schmitz H, and Gunther S. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol*, 2002; 40: 2323-2330.
62. Eifan S, Schnettler E, Dietrich I, Kohl A, Blomström AL. Non-Structural Proteins of Arthropod-Borne Bunyaviruses: Roles and Functions. *Viruses*, 2013; 5: 2447-2468.
63. Elaldı N. Kırım-Kongo Hemorajik Ateşi Epidemiyolojisi. *Klinik Dergisi*, 2004; 17: 151-156.
64. Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, 2001; 15: 188–200.
65. Elliott RM, Blakqori G, van Knippenberg IC, Koudriakova E, Li P, McLees A, Shi X, Szemiel AM. Establishment of a reverse genetics system for schmallenberg virus, a newly emerged orthobunyavirus in europe. *J Gen Virol*, 2013; 94: 851–859.

66. Engin A, Arslan S, Kizildag S. Toll-like receptor 8 and 9 polymorphisms in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Microbes Infect*, 2010; 12(12–13): 1071–1078.
67. Erbay A, Cevik MA, Onguru P. Breastfeeding in Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Scand J Infect Dis*, 2008; 40: 186.
68. Ergonul O, Battal I. Potential sexual transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever infection. *Jpn J Infect Dis*, 2014; 67: 137.
69. Ergonul O, Celikbas A, Baykam N. Analysis of risk-factors among patients with Crimean-Congo haemorrhagic fever virus infection: Severity criteria revisited. *Clin Microbiol Infect*, 2006c; 12(6): 551–554.
70. Ergonul O, Celikbas A, Dokuzoguz B, Eren S, Baykam N, Esener H. The characteristics of Crimean-Congo hemorrhagic fever in a recent outbreak in Turkey and the impact of oral ribavirin therapy. *Clin Infect Dis*, 2004; 39: 285–289.
71. Ergonul O, Tuncbilek S, Baykam N, Celikbas A, Dokuzoguz B: Evaluation of serum levels of interleukin (IL)-6, IL-10, and tumor necrosis factor-alpha in patients with Crimean–Congo hemorrhagic fever. *J Infect Dis*, 2006b, 193: 941–944.
72. Ergonul O. Crimean Congo Haemorrhagic fever. *Lancet Infect Dis*, 2006a; 6: 203–214.
73. Ergunay K, Kocak Tufan Z, Bulut C, Kinikli S, Demiroz AP, Ozkul A. Antibody responses and viral load in patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever: a comprehensive analysis during the early stages of the infection. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2014; 79(1): 31–36.
74. Estrada DF, De Guzman RN. Structural characterization of the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus Gn tail provides insight into virus assembly. *J Biol Chem*, 2011; 286: 21678–21686
75. Estrada-Pena A, Palomar AM, Santibanez, P, Sanchez N, Habela MA, Portillo A, Romero L, Oteo JA. Crimean–Congo hemorrhagic fever virus in ticks, Southwestern Europe, 2010. *Emerg Infect Dis*, 2012; 18(1): 179–180.

76. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998; 391: 806–811.
77. Flusin O, Vigne S, Peyrefitte CN, Bouloy M, Crance JM, Iseni F. Inhibition of Hazara nairovirus replication by small interfering RNAs and their combination with ribavirin. *Virology*, 2011; 21; 8: 249.
78. Foulke RS, Rosato RR, French GR. Structural polypeptides of Hazara virus. *J Gen Virol*, 1981; 53: 169–172.
79. Frias-Staheli N, Giannakopoulos NV, Kikkert M. Ovarian tumor domain-containing viral proteases evade ubiquitin and ISG15-dependent innate immune responses. *Cell Host Microbe*, 2007; 2(6): 404–416.
80. Fritzen A, Risinger C, Korukluoglu G. Epitope-mapping of the glycoprotein from Crimean-Congo hemorrhagic fever virus using a microarray approach. *PLoS Negl Trop Dis*, 2018; 12(7): 0006598.
81. Furuta Y, Gowen BB, Takahashi K, Shiraki K, Smee DF, Barnard DL. Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor. *Antiviral Research*, 2013; 100(2), 446–454.
82. Gamage SW, Persley DM, Higgins CM, Dietzgen RG. First complete genome sequence of a capsicum chlorosis tospovirus isolate from Australia with an unusually large S RNA intergenic region. *Arch Virol*, 2015; 160: 869–872.
83. García Rada A. First outbreak of Crimean-Congo haemorrhagic fever in western Europe kills one man in Spain. *BMJ*, 2016; 354: 4891.
84. Garrison AR, Radoshitzky SR, Kota KP, Pegoraro G, Ruthel G, Kuhn JH, Altamura LA, Kwilas SA, Bavari S, Haucke V. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus utilizes a clathrin- and early endosome-dependent entry pathway. *Virology*, 2013; 444: 45–54.
85. Garrison AR, Shoemaker CJ, Golden JW, Fitzpatrick CJ, Suschak JJ, Richards MJ, Schmaljohn CS. A DNA vaccine for Crimean-Congo hemorrhagic fever protects against disease and death in two lethal mouse models. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2017; 11(9): 0005908.

86. Ge Q, Filip L, Bai A, Nguyen T, Eisen HN, Chen J. Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004; 101: 8676–8681.
87. Geisbert TW, Jahrling PB. Exotic emerging viral diseases: progress and challenges. *Nat Med*, 2004; 10: 110-121.
88. Goldfarb LG, Chumakov MP, Myskin AA, Kondratenko VF, Reznikov OY. An epidemiological model of Crimean hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg*, 1980; 29: 260.
89. Gozalan A, Esen B, Rolain JM, Akin L, Raoult D. Is Q fever an emerging infection in Turkey? *East Mediterr. Health J*, 2005; 11: 384-391.
90. Grashchenkov NI. Investigation of Etiology, Pathogenesis, and Clinical Symptomatology of Crimean Hemorrhagic Fever, Reports on the 1944 Scientific Investigation of the Institute of Neurology. *Akad Med Nauk SSR*, 1945; 100–107.
91. Gunes T, Engin A, Poyraz O. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in high-risk population, Turkey. *Emerg Infect Dis*, 2009; 15: 461.
92. Guo Y, Wang W, Ji W, Deng M, Sun Y, Zhou H, Yang C, Deng F, Wang H, Hu Z. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus nucleoprotein reveals endonuclease activity in bunyaviruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012; 109: 5046–5051.
93. Haferkamp S, Fernando L, Schwarz TF, Feldmann H, Flick R. Intracellular localization of Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) virus glycoproteins. *Virology*, 2005; 2: 42.
94. Hamada C, Kaplan AS. Kinetics Of Synthesis Of Various Types Of Antigenic Proteins In Cells Infected With Pseudorabies Virus. *J Bacteriol*, 1965; 89: 1328-1334.
95. Hamasaki K, Nakao K, Matsumoto K. Short interfering RNA directed inhibition of hepatitis B virus replication. *FEBS Lett*, 2003; 543: 51-54.
96. Hammond SM. Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Lett*, 2005; 579: 5822–5829.
97. Hawman DW, Feldmann H. Recent advances in understanding Crimean–Congo hemorrhagic fever virus. *F1000Res*, 2018; 29(7): 1715-1725.

98. Hemachudha T, Griffin DE, Giffels JJ, Johnson RT, Moser AB, Phanuphak P. Myelin basic protein as an encephalitogen in encephalomyelitis and polyneuritis following rabies vaccination. *The New England J Med*, 1987; 316: 369–374.
99. Hewlett MJ, Pettersson RF, Baltimore D. Circular forms of Uukuniemi virion RNA: An electron microscopic study. *J Virol*, 1977; 21: 1085–1093.
100. Hewson R, Chamberlain J, Mioulet V, Llyoyd G, Jamil B, Hasan R, Gmyl A, Gmyl L, Smirnova SE, Lukashev A, Karganova G, Clegg C. Crimean-Congo haemorrhagic fever virus: sequence analysis of the small RNA segments from a collection of viruses world wide. *Virus Research*, 2004; 102: 185-918
101. Hinkula J, Devignot S, Åkerström S, Karlberg H, Wattring E, Bereczky S, Mousavi-Jazi M, Risinger C, Lindegren G, Vernersson C, Paweska J, Jansen van Vuren P, Blixt O, Brun A, Weber F, Mirazimi A. Immunization with DNA Plasmids Coding for Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Capsid and Envelope Proteins and/or Virus-Like Particles Induces Protection and Survival in Challenged Mice. *J Virol*, 2017; 15; 91(10): 02076-16.
102. Hiscott J. Triggering the innate antiviral response through irf-3 activation. *J Biol Chem*, 2007; 282: 15325–15329.
103. Honig JE, Osborne JC, Nichol ST. Crimean–Congo hemorrhagic fever virus genome L RNA segment and encoded protein. *Virology*, 2004; 321(1): 29–35.
104. Hoogstraal H. The epidemiology of tick-borne Crimean–Congo hemorrhagic fever in Asia, Europe, and Africa. *J Med Entomol*, 1979; 15: 307–417.
105. Horne KM, Vanlandingham DL. Bunyavirus-vector interactions. *Viruses*, 2014; 6: 4373–4397.
106. <http://talk.ictvonline.org/taxonomy>. Erişim Tarihi: 23 Nisan 2019.
107. <http://www.sciencephoto.com/media/248582/view/crimean-congo-haemorrhagic-fever-virus>. Erişim Tarihi: 23 Nisan 2019.
108. Ince Y, Yasa C, Metin M. Crimean-Congo hemorrhagic fever infections reported by ProMED. *Int J Infect Dis*, 2014; 26: 44.
109. Isaäcson M. Viral hemorrhagic fever hazards for travelers in Africa. *Clin Infect Dis*, 2001; 33(10): 1707–1712.

110. Isaacson MK, Ploegh HL. Ubiquitination, ubiquitin-like modifiers, and deubiquitination in viral infection. *Cell Host Microbe*, 2009; 5(6): 559–570.
111. Jabbari A, Tabasi S, Abbasi A, Alijanpour E. Crimean-congo hemorrhagic fever: Treatment and control strategy in admitted patients. *Caspian Journal of Internal Medicine*, 2012; 3(2), 443–444.
112. Jacque JM, Triques K, Stevenson M. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature*, 2002; 418: 435–438.
113. James TW, Frias-Staheli N, Bacik JP. Structural basis for the removal of ubiquitin and interferon-stimulated gene 15 by a viral ovarian tumor domain-containing protease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011; 108(6): 2222–2227.
114. Jens H. Kuhn, Michael R. Wiley, Sergio E. Rodriguez, Yīmíng Bào, Karla Prieto. Genomic Characterization of the Genus Nairovirus (Family Bunyaviridae). *Viruses*, 2016; 8(6): 164.
115. Kalaycıoğlu AT, Durmaz R, Uyar Y, Unaldi O, Aksekili E, Ozkul A, Korukluoğlu G, Ertek M. Lack of genetic diversity in Crimean-Congo hemorrhagic fever viruses in Turkey: Assessment of present and future patterns of disease. *J Med Virol*, 2012; 84: 471–478.
116. Kallfass C, Ackerman A, Lienenklaus S, Weiss S, Heimrich B, Staeheli P. Visualizing production of beta interferon by astrocytes and microglia in brain of la crosse virus-infected mice. *J Virol*, 2012; 86: 11223–11230.
117. Kapadia SB, Brideau-Andersen A, Chisari FV. Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003; 100: 2014–2018.
118. Kar S, Dervis E, Akın A. Preferences of different tick species for human hosts in Turkey. *Exp Appl Acarol*, 2013; 61: 349.
119. Karlberg H, Tan YJ, Mirazimi A. Induction of caspase activation and cleavage of the viral nucleocapsid protein in different cell types during Crimean–Congo hemorrhagic fever virus infection. *J Biol Chem*, 2011; 286: 3227– 3234.
120. Karti SS, Odabasi Z, Korten V, Yilmaz M, Sonmez M, Caylan R, Akdogan E, Eren N, Koksall I, Ovali E, Erickson BR, Vincent MJ, Nichol ST, Comer JA,

- Rollin PE, Ksiazek TG. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey. *Emerg Infect Dis*, 2004; 10: 1379-1384.
121. Keshtkar-Jahromi M, Kuhn JH, Christova I, Bradfute SB, Jahrling PB, Bavari S. Crimean-Congo hemorrhagic fever: current and future prospects of vaccines and therapies. *Antivir Res*, 2011; 90 (2): 85–92.
122. Kızıldağ S, Arslan S, Özbilüm N. Effect of TLR10 (2322A/G, 720A/C, and 992T/A) polymorphisms on the pathogenesis of Crimean Congo hemorrhagic fever disease. *J Med Virol*, 2018; 90(1): 19–25.
123. Kizito S, Okello PE, Kwesiga B. Notes from the Field: Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Outbreak-Central Uganda, August-September 2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2018; 67: 646.
124. Kohl A, Clayton RF, Weber F, Bridgen A, Randall RE, Elliott RM. Bunyamwera virus nonstructural protein nss counteracts interferon regulatory factor 3-mediated induction of early cell death. *J Virol*, 2003; 77: 7999–8008.
125. Kortekaas J, Vloet RPM, McAuley AJ, Shen X, Bosch BJ, de Vries L, Bente DA. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus subunit vaccines induce high levels of neutralizing antibodies but no protection in STAT1 knockout mice. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 2015; 15(12): 759–764.
126. Kraus AA, Mirazimi A. Molecular Biology and Pathogenesis of Crimean–Congo Hemorrhagic Fever Virus. *Future Virol*, 2010; 5(4): 469-479
127. Kumar P, Ban HS, Kim SS, Wu H, Pearson T, Greiner DL, Laouar A, Yao J, Haridas V, Habiro K, Yang YG, Jeong JH, Lee KY, Kim YH, Kim SW, Peipp M, Fey GH, Manjunath N, Shultz LD, Lee SK, Shankar P. T cell-specific siRNA delivery suppresses HIV-1 infection in humanized mice. *Cell*, 2008; 22; 134(4): 577-586.
128. Langedijk JP, Middel WG, Meloen RH, Kramps JA, de Smit JA. Enzyme-linked immunosorbent assay using a virus type-specific peptide based on a subdomain of envelope protein E(rns) for serologic diagnosis of pestivirus infections in swine. *J Clin Microbiol*, 2001; 39(3): 906-912.

129. Leblebicioglu H, Ozaras R, Irmak H, Sencan I. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey: Current status and future challenges. *Antiviral Res*, 2016; 126: 21-34.
130. Leblebicioglu H, Ozaras R, Sunbul M. Crimean-Congo hemorrhagic fever: A neglected infectious disease with potential nosocomial infection threat. *Am J Infect Control* 2017; 45(7): 815-816.
131. Leblebicioglu H, Sunbul M, Guner R, et al. Healthcare-associated Crimean-Congo haemorrhagic fever in Turkey, 2002-2014: a multicentre retrospective cross-sectional study. *Clin Microbiol Infect*, 2016; 22: 387.
132. Leblebicioglu H. Crimean-Congo haemorrhagic fever in Eurasia. *Int J Antimicrob Agents*, 2010; 36(1): 43-46.
133. Leshchinskaya YV, Martinenko I. Certain problems in Crimean hemorrhagic fever therapy [Russian]. In: Chumakov MP (eds), *Crimean Hemorrhagic Fever Materials of the 3rd Scientific-practical Conference in Rostov-na-Donu Region Rostov-na-Donu: USSR, 1970: 111-115.*
134. Liu YC, Penninger J, Karin M. Immunity by ubiquitylation: a reversible process of modification. *Nat Rev Immunol*, 2005; 5(12), 941–952.
135. Macleod JML, Marmor H, García-Sastre A, Frias-Staheli N. Mapping of the interaction domains of the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus nucleocapsid protein. *J Gen Virol*, 2015; 96: 524–537.
136. Maes P, Adkins S, Alkhovsky SV, Avšič-Županc T, Ballinger MJ. Taxonomy of the order Bunyavirales: second update 2018. *Arch Virol*, 2019;164(3): 927-941.
137. Maes P, Alkhovsky SV, Bào Y, Beer M, Birkhead M. Taxonomy of the family Arenaviridae and the order Bunyavirales: update 2018. *Arch Virol*, 2018; 163(8): 2295-2310.
138. Maltezou HC, Papa A. Crimean-Congo hemorrhagic fever: risk for emergence of new endemic foci in Europe?. *Travel Med Infect Dis*, 2010; 8: 139.
139. Mardani M, Rahnavardi M, Rajaeinejad M, Naini KH, Chinikar S, Pourmalek F, Rostami M, and Shahri MH. Crimean-Congo hemorrhagic fever among health care workers in Iran: a seroprevalence study in two endemic regions. *Am J Trop Med Hyg*, 2007; 76: 443-445.

140. Mardani M, Jahromi MK. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever. *Arch Iranian Med*, 2007; 10 (2): 204 – 214.
141. Mardani M, Jahromi MK, Naieni KH, Zeinali M. The efficacy of oral ribavirin in the treatment of crimean-congo hemorrhagic fever in Iran. *Clinical Infectious Diseases*, 2003; 36(12): 1613–1618.
142. McCormick JB, King IJ, Webb PA, Scribner CL, Craven RB, Johnson KM, Belmont-Williams R. Lassa fever. Effective therapy with ribavirin. *The New England Journal of Medicine*, 1986; 314(1): 20–26.
143. Mendoza EJ, Warner B, Safronetz D, Ranadheera C. Crimean-Congo haemorrhagic fever virus: Past, present and future insights for animal modelling and medical countermeasures. *Zoonoses Public Health*, 2018; 65(5): 465-480.
144. Mertens M, Schmidt K, Ozkul A, Groschup MH. The impact of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus on public health. *Antiviral Res*, 2013; 98: 248.
145. Mielke-Ehret N, Muhlbach HP. Emaravirus: a novel genus of multipartite, negative strand RNA plant viruses. *Viruses*, 2012; 4: 1515–1536.
146. Mishra N, Caciula A, Price A, Thakkar R, Ng J, Chauhan LV, Jain K, Che X, Espinosa DA, Montoya Cruz M, Balmaseda A, Sullivan EH, Patel JJ, Jarman RG, Rakeman JL, Egan CT, Reusken CBEM, Koopmans MPG, Harris E, Tokarz R, Briese T, Lipkin WI. Diagnosis of Zika Virus Infection by Peptide Array and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *MBio*, 2018 6; 9(2): 00095-00118.
147. Mohamed M, McLees A, Elliott RM. Viruses in the anopheles a, anopheles b, and tete serogroups in the orthobunyavirus genus (family bunyaviridae) do not encode an nss protein. *J Virol*, 2009; 83: 7612–7618.
148. Moore MD, McGarvey MJ, Russell RA. Stable inhibition of hepatitis B virus proteins by small interfering RNA expressed from viral vectors. *J Gene Med*, 2005; 7: 918-925.
149. Mousavi-Jazi M, Karlberg H, Papa A, Christova I, Mirazimi A. Healthy individuals' immune response to the Bulgarian Crimean-Congo hemorrhagic fever virus vaccine. *Vaccine*, 2012; 30: 6225–6229.

150. Negredo A, de la Calle-Prieto F, Palencia-Herrejón E. Autochthonous Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Spain. *N Engl J Med*, 2017; 377: 154.
151. Ergonul O and Whitehouse CA (eds.), *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever*. Springer, 2007: 59-74.
152. Oestereich L, Rieger T, Neumann M, Bernreuther C, Lehmann M, Krasemann S, Günther S. Evaluation of antiviral efficacy of ribavirin, arbidol, and T-705 (favipiravir) in a mouse model for Crimean-Congo hemorrhagic fever. *PLoS Negl Trop Dis*, 2014; 8(5): 2804.
153. Ogawa Y, Sugiura K, Kato K, Tohya Y, Akashi H. Rescue of akabane virus (family bunyaviridae) entirely from cloned cdnas by using rna polymerase i. *J Gen Virol*, 2007; 88: 3385–3390.
154. Oncü S. Crimean-Congo hemorrhagic fever: an overview. *Virol Sin*, 2013; 28(4): 193-201.
155. Ozdarendeli A, Canakoglu N, Berber E, Aydin K, Tonbak S, Ertek M, Buzgan T, Bolat Y, Aktaş M, Kalkan A. The complete genome analysis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus isolated in Turkey. *Virus Res*, 2010; 147(2): 288–293.
156. Ozkaya E, Dincer E, Carhan A, Uyar Y, Ertek M, Whitehouse CA, Ozkul A. Molecular epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in Turkey: Occurrence of local topotype. *Virus Res*, 2010; 149: 64–70.
157. Ozkurt Z, Kiki I, Erol S, Erdem F, Yilmaz N, Parlak M, Gundogdu M, Tasyaran MA. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Eastern Turkey: clinical features, risk factors and efficacy of ribavirin therapy. *J Infect*, 2006; 52: 207–15.
158. Papa A, Mirazimi A, Köksal I. Recent advances in research on Crimean-Congo hemorrhagic fever. *J Clin Virol*, 2015; 64: 137.
159. Papa A, Papadimitriou E, Christova I. The Bulgarian vaccine Crimean-Congo haemorrhagic fever virus strain. *Scandinavian J Infect Dis*, 2011; 43: 225–229.
160. Papa A, Pappa S, Panayotova E, Papadopoulou E, Christova I. Molecular epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Bulgaria—An update. *J Med Virol*, 2016; 88: 769–773.

161. Pécheur EI, Borisevich V, Halfmann P, Morrey JD, Smee DF, Prichard M, Polyak SJ. The synthetic antiviral drug arbidol inhibits globally prevalent pathogenic viruses. *J Virol*, 2016; 90(6): 3086–3092.
162. Perng YC, Lenschow DJ. ISG15 in antiviral immunity and beyond. *Nat Rev Microbiol*, 2018; 16(7): 423–39.
163. Peters CJ, Zaki SR. Role of the endothelium in viral hemorrhagic fevers. *Crit Care Med*, 2002; 30: 268-273.
164. Pinschewer DD, Perez M, de La Torre JC. Dual role of the lymphocytic choriomeningitis virus intergenic region in transcription termination and virus propagation. *J Virol*, 2005; 79: 4519–4526.
165. Pshenichnaya NY, Sydenko IS, Klinovaya EP. Possible sexual transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Int J Infect Dis*, 2016; 45:109.
166. Putilina NG, Azarian AR, Trusova IN, Mal'kov PM, Grishanova AP, Kovtunov AI, Shendo GL, Dzharkenov AF, Arshba TE, Larichev VF, Butenko AM. Use of RT-PCR and enzyme immunoassays for the specific diagnosis of Crimean hemorrhagic fever. *Vopr Virusol*, 2011; 56: 34-38.
167. Randall G, Grakoui A, Rice CM. Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci*, 2003; 100: 235-245.
168. Rechav Y. Seasonal activity and hosts of the vectors of Crimean–Congo haemorrhagic fever in South Africa. *S Afr Med J*, 1986; 69: 364–368.
169. Ren XR, Zhou LJ, Luo GB. Inhibition of hepatitis B virus replication in 2.2.15 cells by expressed shRNA. *J Viral Hepatitis*, 2005; 12: 236-242.
170. Rodrigues R, Paranhos-Baccala G, Vernet G, Peyrefitte CN. Crimean–Congo hemorrhagic fever virus-infected hepatocytes induce ER-stress and apoptosis crosstalk. *PLoS One*, 2012; 7: 29712.
171. Rojek JM, Lee AM, Nguyen N, Spiropoulou CF, Kunz S. Site 1 protease is required for proteolytic processing of the glycoproteins of the South American hemorrhagic fever viruses Junin, Machupo, and Guanarito. *J Virol*, 2008; 82: 6045–6051.

172. Saijo M, Tang Q, Shimayi B, Han L, Zhang Y, Asiguma M, Tianshu D, Maeda A, Kurane I, and Morikawa S. Possible horizontal transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus from a mother to her child. *Jpn J Infect Dis*, 2004; 57: 55-57.
173. Sanchez AJ, Vincent MJ, Erickson BR, Nichol ST. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus glycoprotein precursor is cleaved by Furin-like and SKI-1 proteases to generate a novel 38-kilodalton glycoprotein. *J Virol*, 2006; 80: 514–525.
174. Sanchez AJ, Vincent MJ, Nichol ST. Characterization of the glycoproteins of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J Virol*, 2002; 76: 7263–7275.
175. Shayan S, Bokaeian M, Shahrivar MR, Chinikar PS. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever. *Lab Med*, 2015; 46(3): 180-189.
176. Savitsky D, Tamura T, Yanai H, Taniguchi T. Regulation of immunity and oncogenesis by the irf transcription factor family. *Cancer Immunol Immunother*, 2010; 59: 489–510.
177. Scholte FEM, Zivcec M, Dzimianski JV. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Suppresses Innate Immune Responses via a Ubiquitin and ISG15 Specific Protease. *Cell Rep*, 2017; 20(10): 2396–2407.
178. Schwarz TF, Nsanze H, Ameen AM. Clinical features of Crimean-Congo haemorrhagic fever in the United Arab Emirates. *Infection*, 1997; 25: 364–67.
179. Seo MY, Abrignani S, Houghton M. Small interfering RNA mediated inhibition of hepatitis C virus replication in the human hepatoma cell line Huh-7. *J Virol*, 2003; 77: 810-820.
180. Sheikh AS, Sheikh AA, Sheikh NS. Bi-annual surge of Crimean-Congo haemorrhagic fever (CCHF): a five-year experience. *Int J Infect Dis*, 2005; 9: 37.
181. Shepherd AJ, Swanepoel R, Leman PA, Shepherd SP. Comparison of methods for isolation and titration of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J Clin Microbiol*, 1986; 24: 654-656.
182. Shepherd AJ, Swanepoel R, Leman PA. Antibody response in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Rev Infect Dis*, 1989; 11(4): 801–806.

183. Shlomai A, Shaul Y. Inhibition of hepatitis B virus expression and replication by RNA interference, *Hepatology* 2003; 37: 764-770.
184. Simon M, Johansson C, Mirazimi A. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus entry and replication is clathrin-, pH- and cholesterol-dependent. *J Gen Virol*, 2009; 90: 210–215.
185. Sloka JS, Stefanelli M. The mechanism of action of methylprednisolone in the treatment of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*, 2005; 11(4): 425–432.
186. Smirnova SE, Shestopalova NM, Reingold VN, Zubri GL, Chumakov MP. Experimental Hazara Virus infection in mice. *Acta Virol*, 1977; 21: 128–132.
187. Spengler JR, Bente DA, Bray M, Burt F, Hewson R, Korukluoglu G, Mirazimi A, Weber F, Papa A. Second International Conference on Crimean-Congo Hemorrhagic Fever. *Antiviral Res*, 2018; 150: 137-147.
188. Spengler JR, Patel JR, Chakrabarti AK. RIG-I Mediates an Antiviral Response to Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. *J Virol*, 2015; 89(20): 10219–10229.
189. Steller H. Regulation of apoptosis in drosophila. *Cell Death Differ*, 2008; 15: 1132–1138.
190. Streitenfeld H, Boyd A, Fazakerley JK, Bridgen A, Elliott RM, Weber F. Activation of pkr by bunyamwera virus is independent of the viral interferon antagonist nss. *J Virol*, 2003; 77: 5507–5511.
191. Suleiman MN, Muscat-Baron JM, Harries JR., Satti AG, Platt GS, Bowen ET, Simpson DI. Congo/Crimean haemorrhagic fever in Dubai. An outbreak at the Rashid Hospital. *Lancet*, 1980; 2(8201), 939–941.
192. Swanepoel R, Gill DE, Shepherd AJ, et al.: The clinical pathology of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Rev Infect Dis*. 1989; 11 Suppl 4: S794–S800.
193. Swanepoel R, Shepherd AJ, Leman PA. Epidemiologic and clinical features of Crimean-Congo hemorrhagic fever in southern Africa. *Am J Trop Med Hyg*, 1987; 36: 120–32.
194. Tajrishi MM, Tuteja R, Tuteja N. Nucleolin: The most abundant multifunctional phosphoprotein of nucleolus. *Commun Integr Biol*, 2011; 4: 267–275.

195. Takigawa Y, Nagano-Fujii M, Deng L. Suppression of hepatitis C virus replicon by RNA interference directed against the NS3 and NS5B regions of the viral genome. *Microbiol Immunol*, 2004; 48: 591-598
196. Tasdelen Fisgin N, Doganci L, Tanyel E, Tulek N. Initial high rate of misdiagnosis in Crimean Congo haemorrhagic fever patients in an endemic region of Turkey. *Epidemiol Infect*, 2010; 138: 139–144.
197. Tayyari F, Marchant D, Moraes TJ, Duan W, Mastrangelo P, Hegele RG. Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus. *Nat Med*, 2011; 17: 1132–1135.
198. Thomas D, Blakqori G, Wagner V, Banholzer M, Kessler N, Elliott RM, Haller O, Weber F. Inhibition of rna polymerase ii phosphorylation by a viral interferon antagonist. *J Biol Chem*, 2004; 279: 31471–31477.
199. Thongtan T, Wikan N, Wintachai P, Rattanaungsan C, Srisomsap C, Cheepsunthorn P, Smith DR. Characterization of putative Japanese encephalitis virus receptor molecules on microglial cells. *J Med Virol*, 2012; 84: 615–623.
200. Tignor GH, Hanham CA. Ribavirin efficacy in an in vivo model of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHF) infection. *Antiviral Res*, 1993; 22: 309–325.
201. Tonbak S, Aktas M, Altay K, Azkur AK, Kalkan A, Bolat Y, Dumanli N, Ozdarendeli A. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: Genetic analysis and tick survey in Turkey. *J Clin Microbiol*, 2006; 44: 4120–4124.
202. Ueno T, Tokunaga K, Sawa H, Maeda M, Chiba J, Kojima A, Hasegawa H, Shoya Y, Sata T, Kurata T. Nucleolin and the packaging signal, psi, promote the budding of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) *Microbiol Immunol*, 2004; 48: 111–118.
203. Coskun US, Asik Z. Genotypic Analysis Of S Segment Of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus In Turkey. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 2019; 66 (1): 79–89.
204. Van Eeden PJ, Van Eeden SF, Joubert JR, King JB, Van de Wal BW, Michell WL. A nosocomial outbreak of Crimean-Congo haemorrhagic fever at Tygerberg

- Hospital. Part II. Management of patients. *South African Medical Journal*, 1985; 68(10): 718–721.
205. Van Knippenberg I, Fragkoudis R, Elliott RM. The transient nature of Bunyamwera orthobunyavirus NSs protein expression: effects of increased stability of NSs protein on virus replication. *PLoS One*, 2013; 8(5): 64137
206. Vanhomwegen J, Alves MJ, Zupanc TA, Bino S, Chinikar S, Karlberg H, Korukluoglu G, Korva M, Mardani M, Mirazimi A, Mousavi M, Papa A, Saksida A, Sharifi-Mood B, Sidira P, Tsergouli K, Wolfel R, Zeller H, and Dubois P. Diagnostic assays for Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Emerg Infect Dis*, 2012; 18: 1958-1965.
207. Varela M, Schnettler E, Caporale M, Murgia C, Barry G, McFarlane M, McGregor E, Piras IM, Shaw A, Lamm C. Schmallenberg virus pathogenesis, tropism and interaction with the innate immune system of the host. *PLoS Pathog*, 2013; 9: 1003133.
208. Verbruggen P, Ruf M, Blakqori G, Overby AK, Heidemann M, Eick D, Weber F. Interferon antagonist nss of la crosse virus triggers a DNA damage response-like degradation of transcribing rna polymerase ii. *J Biol Chem*, 2011; 286: 3681–3692.
209. Vincent MJ, Sanchez AJ, Erickson BR, Basak A, Chretien M, Seidah NG, Nichol ST. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus glycoprotein proteolytic processing by subtilase SKI-1. *J Virol*, 2003; 77: 8640–8649.
210. Wang Y, Dutta S, Karlberg H, Devignot S, Weber F, Hao Q, Tan YJ, Mirazimi A, Kotaka M. Structure of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus nucleoprotein: Superhelical homo-oligomers and the role of caspase-3 cleavage. *J Virol*, 2012; 86: 12294–12303.
211. Ward VK, Marriott AC, Polyzoni T, el-Ghorr AA, Antoniadis A, Nuttall PA. Expression of the nucleocapsid protein of Dugbe virus and antigenic cross-reactions with other nairoviruses. *Virus Res*, 1992; 24(2): 223-229.
212. Watts DM, Ksiazek TG, Linthicum KJ, Hoogstraal H. Crimean-Congo hemorrhagic fever. In: Monath TP (ed). *The arboviruses: epidemiology and ecology*, volume 2. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 1988: 177–260.

213. Watts DM., Ussery MA, Nash D, Peters CJ. Inhibition of Crimean-Congo hemorrhagic fever viral infectivity yields in vitro by ribavirin. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1989; 41(5): 581–585.
214. Weber F, Dunn EF, Bridgen A, Elliott RM. The bunyamwera virus nonstructural protein nss inhibits viral rna synthesis in a minireplicon system. *Virology*, 2001; 281: 67–74.
215. Wei P, Luo Y, Li T, Wang H, Hu Z, Zhang F, Zhang Y, Deng F, Sun S. Serial expression of the truncated fragments of the nucleocapsid protein of CCHFV and identification of the epitope region. *Virolog Sin*, 2010; 25: 45–51.
216. Whitehouse CA. Crimean Congo Hemorrhagic fever. *Antivir Res*, 2004; 64: 145-60
217. Wilson JA, Jayasena S, Khvorova A. RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human liver cells. *Proc Natl Acad Sci*, 2003; 100: 2783-2793.
218. Xiao X, Feng Y, Zhu Z, Dimitrov DS. Identification of a putative Crimean-Congo hemorrhagic fever virus entry factor. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011; 411: 253–258.
219. Yesilbag K, Aydin L, Dincer E, Alpay G, Girisgin AO, Tuncer P, Ozkul A. Tick survey and detection of Crimean–Congo hemorrhagic fever virus in tick species from a non-endemic area, Turkey. *Exp Appl Acarol*, 2013; 60: 253–261.
220. Yilmaz GR, Buzgan T, Irmak H, Safran A, Uzun R, Cevik MA, Torunoglu MA. The epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey, 2002-2007. *Int J Infect Dis*, 2009; 13: 380-386.
221. Ying C, De Clercq E, Neyts J. Selective inhibition of hepatitis B virus replication by RNA interference. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003; 309: 482-484.
222. Yokota T, Sakamoto N, Enomoto N. Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. *EMBO Reports*, 2003; 4: 602-608.

223. Zeller H. Laboratory Diagnosis of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever, In: Ergonul O and Whitehouse CA (eds.), Crimean-Congo Hemorrhagic Fever: A Global Perspective. Springer, Dordrecht. 2007; 233-243.
224. Zhou ZR., Wang ML, Deng F, Li TX, Hu ZH, Wang HL. Production of CCHF virus-like particle by a baculovirus-insect cell expression system. *Viol Sin*, 2011; 26(5): 338-46
225. Zivcec M, Safronetz D, Scott D. Lethal Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infection in interferon α/β receptor knockout mice is associated with high viral loads, proinflammatory responses, and coagulopathy. *J Infect Dis*, 2013; 207(12): 1909–1921.
226. Zivcec M, Scholte FEM, Spiropoulou CF, Spengler JR, Bergeron E. Molecular Insights into Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. *Viruses*, 2016; 8: 106.

KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ HASTALIĞI (KKKAH) VİRÜSÜ YAPISAL OLMAYAN S PROTEİNİNİN (NSs) PROKARYOTİK SİSTEMDE AÇIKLATILMASI VE NSs'İN KKKAH VİRÜSÜNÜN REPLİKASYONUNDAKİ ROLÜ

ORIJINALLIK RAPORU

%**4**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**3**

İNTERNET
KAYNAKLARI

%**3**

YAYINLAR

%

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR



d-nb.info

İnternet Kaynağı

<%**1**



www.parallel-bioreactor.com

İnternet Kaynağı

<%**1**



www.pmc-sierra.com

İnternet Kaynağı

<%**1**



www.pdmcc.org

İnternet Kaynağı

<%**1**



www.biriyilik.com

İnternet Kaynağı

<%**1**



[Methods in Molecular Biology, 2015.](#)

Yayın

<%**1**



www.jove.com

İnternet Kaynağı

<%**1**



www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER:

Adı, Soyadı: Günsu AYDIN

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 8 Nisan 1991, İstanbul

Medeni Durumu: Bekâr

Tel: +90 352 437 93 00

Fax: +90 352 437 93 01

email: gunsuaydinn@gmail.com

Yazışma Adresi: Erciyes Üniversitesi BSL2/BSL3/ABSL3 Laboratuvarları

Talas/KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	EÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2017
Lisans	İÜ Fen Fakültesi Biyoloji	2013
Lise	Atatürk Anadolu Lisesi, İstanbul	2009

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2013	EÜ Flowsitometri Laboratuvarı	Öğrenci Personel
2015	EÜ GENKÖK	Öğrenci Personel
2018-	EÜ Tıbbi Mikrobiyoloji ABD	Araştırma Görevlisi

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR

1. Aycan Gundogdu, Huseyin Kilic, Aysegul Ulu Kilic, Günsu Aydın, Emine Alp, "Epidemiology of nosocomial bloodstream infections in Turkish pediatric patients: a 1-year retrospective study", The 7th Eurasia Congress of Infectious Diseases, Tbilisi, Georgia, 30 September- 3 October 2015, pp.161-161
2. Gündoğdu A., Kiliç H., Ulu Kiliç A., Aydın G., Alp Meşe E., "Epidemiological features of nosocomial bloodstream infections in pediatric patients", Klimik Dergisi, vol.29, pp.29-3

