



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



KIRIM-KONGO KANAMALI ATEŞİ VİRUSUNA KARŞI MONOKLONAL ANTİKOR ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

Alireza HANİFEHNEZHAD

**VETERİNERLİK VİROLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Aykut ÖZKUL**

**ANKARA
2022**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KIRIM-KONGO KANAMALI ATEŞİ VİRUSUNA
KARŞI MONOKLONAL ANTİKOR ÜRETİMİ VE
KARAKTERİZASYONU**

Alireza HANİFEHNEZHAD

**VETERİNERLİK VİROLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Aykut ÖZKUL**

**ANKARA
2022**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Virusuna Karşı Monoklonal Antikor Üretimi ve Karakterizasyonu” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Alireza HANİFEHNEZHAD

Tarih:

İmza:

KABUL ve ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Viroloji Anabilim Dalında

Alireza HANİFEHNEZHAD tarafından hazırlanan

“Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Virusuna Karşı Monoklonal Antikor Üretimi ve Karakterizasyonu” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

imza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Jüri Başkanı

imza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Raportör

imza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

imza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

imza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

imza
Unvanı Adı ve Soyadı
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller	xi
Çizelgeler	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virusü (KKKAV)	3
1.1.1. KKKAV'un Sınıflandırma, Yapı ve Genetik Özellikleri	4
1.1.2. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Virusü (KKKAV) Replikasyon Döngüsü	5
1.1.3. KKKAV Proteinleri	7
1.1.3.1. S Segmenti: NP ve NSS	7
1.1.3.2. M Segmenti: Glikoproteinler	8
1.1.3.3. L Segment: Ovarian Tumor Proteaz, Nükleaz ve RdRp	8
1.1.4. KKKA Hastalığının Patogenez	8
1.1.5. Hastalık ve Teşhis	12
1.1.6. Mevcut Antiviral Stratejiler	13
1.1.6.1. Nükleotid Analogları	13
1.1.6.2. Ribavirin	14
1.1.6.3. Favipiravir	15
1.1.6.4. 2'-deoksi-2'-florositidin	15
1.1.6.5. OTU Proteaz İnhibitörleri	16
1.1.6.6. İnterferon (IFN)	17
1.1.6.7. Antikor Tedavisi	18
1.1.6.7.1. Nekahat Dönem Serumı (Convalescent Serum)	18
1.1.6.8. KKKAV ve Aşı	19
1.1.7. Monoklonal Antikorlar (mAb)	21
1.1.7.1. Antikorların Bağışıklık Tepkisindeki Rolü	23
1.1.7.2. Antikorların Yapısı ve İşlevi	25
1.1.7.3. Monoklonal Antikorların Üretilmesi ve Hibridoma Teknolojisi	28
2. GEREÇ ve YÖNTEM	34
2.1. Gereç	34
2.1.1. Biyogüvenlik Bildirisi	34
2.1.2. Deney Hayvanları	34
2.1.3. Araştırmada Kullanılan Hücreler	34
2.1.4. Virus	35
2.1.5. Kullanılan Kimyasal Maddeler	35
2.1.6. Kullanılan Malzeme ve Aletler	36
2.1.7. Kullanılan Kitler	37
2.1.8. Çalışmada Kullanılan Ekspresyon Vektörleri ve Bakteri Suşları	37
	iv

2.1.9. Bakteri Besiyerleri	38
2.1.10. Çalışmada Kullanılan Enzimler	39
2.1.11. Çalışmada Kullanılan Antikorlar	40
2.1.12. Çalışmada Kullanılan Tamponlar ve Solüsyonlar	40
2.1.12.1. Ni-NTA Affinite Purifikasyon Tamponu	40
2.1.12.2. SDS-PAGE için Tamponlar	41
2.1.12.3. Western Blotlama İçin Tamponlar	43
2.1.12.4. İmmunohistokimya İçin Kullanılan Tampon ve Malzemeler	43
2.1.12.5. Çalışmada kullanılan Primer Çiftleri	44
2.2. Hücre Hatlarının Üretilmesi	45
2.3. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virusunun Üretilmesi	45
2.4. KKKAV Genomik RNA Ekstraksiyonu ve Reverz Transkripsiyon	45
2.5. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Virusunun S (Nucleocapsit-NC) Segmentini Kodlayan İfade Plazmitinin Hazırlanması	46
2.6. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Virusunun M (Glikoproteinleri Kodlayan-GPC) Segmentini Kodlayan İfade Plazmitlerinin (Gn ve Gc) Hazırlanması	49
2.7. Farelerin İmmünizasyonu	51
2.7.1. İmmünojenin Hazırlanması	51
2.7.2. İntrasplenik Bağışıklama	52
2.7.3. Hibridoma Elde Edilmesi	55
2.7.3.1. Makrofaj Hücre Kültürü (Mouse feeder cells)	55
2.7.3.2. Splenosit İzolasyonu	56
2.7.3.3. Füzyon	57
2.7.4. Pozitif Klonların Saptanması	58
2.7.5. Antikor Purifikasyonu	58
2.7.6. KKKAV NC ve GPC ifade eden Stabil BHK21-C13 hücre hazırlanması	59
2.7.6.1. Transfeksiyon Protokolü	59
2.7.7. İndirekt İmmün Floresan Testi (IIFT)	60
2.8. Monoklonal Antikorların Karakterizasyonu	60
2.8.1. Antikor İsoptlendirme Testi	60
2.8.2. Virus Nötralizasyon Testi	61
2.8.3. Rekombinant pET-28a(+)-NC ekspresyonunun	61
2.8.4. His-Tagged rNC Purifikasyonu	62
2.9. SDS-PAGE	62
2.10. İmmunoblotlama (Western Blotting)	63
2.11. İmmünohistokimya (IHC)	64
3. BULGULAR	66
3.1. KKKAV'un Hücre Kültüründe Çoğaltılması ve Enfektivitesi	66
3.2. KKKAV NC Spesifik Monoklonal Antikor Üretimi	67
3.2.1. RNA Ekstraksiyonu ve NC Geninin Çoğaltılması	67
3.2.2. KKKAV'un S (Nucleocapsit-N) segmentini kodlayan pCDNA3.1/myc-hisA +NC İfade Plazmitinin Hazırlanması	67
3.2.3. KKKAV-NC İfade Eden Stabil BHK21-C13 Hücre Hazırlanması	68
3.2.4. KKKAV-NC'nin Prokaryotik pET28a+NC Plazmitinde İfade Edilmesi	69
3.2.5. Hayvanların pCDNA3.1/myc-HisA+NC ile İmmünizasyonu	70
3.2.6. KKKAV-NC'e Karşı Hibridoma Geliştirilmesi	71

3.2.7. Hibridomaların NC Spesifik Antikorlar Yönünden İndirekt İmmün Floresan Testi (IIFT) ile Kontrolü	72
3.2.8. Üretilen KKKAV-NC Antikorlarının Denatüre Viral Proteinlere Spesifitesi	73
3.2.9. KKKAV-NC Karşı Üretilen Antikorların İsoptendirmesi	74
3.3. KKKAV GPC Spesifik Monoklonal Antikor Üretimi	74
3.3.1. KKKAV M segmenti Sentezi ve GPC Kodlayan Genin İfade Vektörüne Nakli	74
3.3.2. Hayvanların pCDNA3.1/myc-HisA+GPC ile İmmünizasyonu	75
3.3.3. KKKAV-GPC ifade Eden Stabil BHK21-C13 Hücre Hazırlanması	76
3.3.4. KKKAV-GPC'e Karşı Hibridoma Geliştirilmesi	76
3.3.5. Hibridomaların GPC Spesifik Antikorlar Yönünden İndirekt İmmün Floresan Testi (IIFT) ile Kontrolü	77
3.3.6. Üretilen KKKAV-NC Antikorlarının Denatüre Viral Proteinlere Spesifitesi	78
3.3.7. KKKAV-GPC Antikorlarının İsoptendirmesi	79
3.4. Virus Nötralizasyon Testi (VNT)	80
3.5. İmmünohistokimya (IHC)	80
4. TARTIŞMA	84
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	92
ÖZET	94
SUMMARY	95
KAYNAKLAR	96
EKLER	108
Ek-1. Etik Kurul Onayı	108

ÖNSÖZ

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) *Bunyavirales* takımı içinde *Nairoviridae* ailesi içinde sınıflandırılan bir Kırım Kongo Kanamalı Ateşi *Orthonairovirus* (KKKAV) tarafından meydana getirilen, birçok hayvan türünde asemptomatik seyretmesine rağmen insanlarda ölümle son bulabilen (%4-30) yaygın koagülopati ve organ yetmezlikleri ile karakterize bir hastalık olarak yılın belli dönemlerinde etkisini hissettirmektedir. Ülkemizin de yer aldığı coğrafyada önemli halk sağlığı sorunlarının başında gelen bu hastalık halen etkin bir tedavi rejimi ve korunmaya yönelik geliştirilmiş bir biyolojik ürün (aşı) olmaması sebebiyle önem arz etmektedir. Hastalık konak hücre ve konak immün sistem üzerindeki etkileşimi ağırlıklı olarak iki yüzey glikoproteini (GPC) olan Gn ve Gc ile virus nükleik asitini çevreleyen Nükleoprotein (N) aracılığıyla olmaktadır. Yapılan birçok tedavi rejimi ve koruyucu ürün geliştirilmesine ilgili çalışmalar büyük oranda bu yapılar hedeflenerek gerçekleştirilmektedir.

Monoklonal antikorlar (MAb) tek bir B hücre popülasyonu tarafından üretilen, dolayısıyla tek bir protein/peptit spesifitesine sahip olan özel antikorlardır. Dolayısıyla immunojen üzerinde etkin olan farklı domain ve/veya motiflere karşı reaktif olabilme özellikleri vardır. Bu noktadan hareketle MAb'ler tedavi edici, pasif koruyucu ve teşhise yardımcı süreçlerde geniş bir kullanım olasılığına sahip biyolojik moleküller olarak değerlendirilmektedirler.

Bu tez çalışmasında, KKKA virusunun S ve M segmentleri tarafından kodlanan proteinlerine karşı MAb üretimi amaçlanmıştır. Böyle bir çalışma kapsamında herhangi bir viral epitopa hedeflenmiş (konformasyon bağımlı ya da bağımsız) antikorların elde edilebilmesi mümkündür. Ancak temel hedef öncelikli olarak üretilebilecek antikorların nötralizan fonksiyonlarının olup olmadığını sorgulamak ve bu ana hedef paralelinde çalışma kapsamında elde edilebilecek tüm antikorların ağırlıklı olarak tanısal kullanım olasılıklarının değerlendirilmesi hedeflenmektedir.

Doktora eğitimi ve tez çalışmam süresince, desteğini ve bilgisini esirgemeyen, doktora tezim süresince ortam sağlayan danışman hocam Prof. Dr. Aykut ÖZKUL’a teşekkürlerimi borç biliyorum. Tez jürilerim ve izleme komitesinde olan hocalarıma, Prof. Dr. Feray ALKAN, Prof. Dr. Hakan YARDIMCI, Prof. Dr. Atila ŞİMŞEK ve Prof.Dr. Atila TANER KALAYCIOĞLU’na teşekkürlerimi sunuyorum. Viroloji Anabilim Dalımız’da doktora öğrencilerine ve tüm tezde destek veren arkadaşlarımın hepsine kalbimden gelen saygılarımı ve teşekkürlerimi sunuyorum. Son olarak aileme ve hayatıma sevgi katan hayat yoldaşım ve ömür dostuma teşekkürlerimi borç biliyorum. Ancak, çalıştığım *’’Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Virusuna Karşı Monoklonal Antikor Üretimi ve Karakterizasyonu’’* başlıklı Doktora (Ph.D.) tezimi Covid-19 hastalığı nedeni ile fani dünyadan göç eden aziz kardeşim Ali Hanifehnezhad’a ithaf ediyorum.

SİMGELER VE KISALTMALAR

µg

Mikrogram

μ l	Mikrolitre
mM	Milimolar
E.coli	Escherichia coli
EtBr	Etidium bromide
$^{\circ}$ C	Santigrat
μ m	Mikrometre
BCA	Bikinkoninik asit
BSA	Sığır serum albümini
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotit
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
ELISA	Enzyme-Linked immunosorbent assay
FBS	Fetal sığır serumu
gr	Gram
H ₂ O	Su
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Dakikadaki devir sayısı
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel elektroforez sn Saniye
SOB	Super optimal broth
SOC	Katabolit baskılayıcı
Taq	Thermus aquaticus
TEMED	Tetrametiletilediamin
TBE	Tris-Borik asit- EDTA
TBS	Tris tamponlu tuz çözeltisi
TBS-T	Tween-20 içeren tris tamponlu tuz çözeltisi
TMB	3,3',5,5'-tetramethybenzidine

UV	Ultraviyole
V	Volt
HAT	Hipoksantin aminopterim timidin
HCl	Hidroklorik asit
HGPRT	Hipoksantin-guanin fosforibosiltransferaz
HRP	Horseradish peroxidase
HT	Hipoksantin timidin
IFN- α	İnterferon alfa
IgG	İmmunoglobulin G
IL	İnterlökin
IPTG	İzopropil- β -D-tiyogalaktopiranozit
LB	Luria bertani M Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MgCl ₂	Magnezyum klorür
NK	Doğal öldürücü
nm	Nanometre
OD	Optik yoğunluk
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PBS-T	Tween-20 içeren fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PEG	Polietilen glikol
PCR / PZT	Polimeraz zincirleme (chain) tepkimesi (reaction)
RNase	RNA parçalayıcı enzi

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Kırım -Kongo kanamalı (ateşi virusu KKKAV) bulaşma yolları ve semptomları	4
Şekil 1.2. Kırım- Kongo kanamalı ateşi virusu (KKKAV) virion yapısı ve replikasyon döngüsü	6
Şekil 1.3. KKKA virus genom organizasyonu	7
Şekil 1.4. Murin, kimerik, insanlaştırılmış ve tamamen insan antikorları dahil olmak üzere pazarlama için onaylanmış farklı terapötik monoklonal antikor biçimleri ve ayrıca yapı, kaynak ve hedefe göre jenerik adların her birine uygulanışı	23
Şekil 1.5. Bir IgG molekülünün protein zincirlerinin organizasyonunun gösterimi	26
Şekil 1.6. IgG'nin antijen bağlayıcı F(ab') ₂ bölgesini ve CH ₂ alanına eklenmiş karbonhidratlı Fc bölgesini gösteren alan yapısı	27
Şekil 1.7. Hibridoma teknolojisi ile monoklonal antikor üretimi	32
Şekil 2.1. Bu çalışmada kullanılan pET28a(+) plazmidinin genom haritası	38
Şekil 2.2. Bu çalışmada kullanılan pcDNA2.1(+)/myc-His A plazmidinin genom haritası	39
Şekil 2.3. İntrasplenik bağışıklama aşamaları	55
Şekil 2.4. Peritoneal makrofaj hücre Kültürü (Mouse feeder cells) hazırlanması	56
Şekil 2.5. Splenosit hücrelerin izolasyonu için farelerden dalakların alınması	56
Şekil 2.6. Fare dalağından splenosit hücrelerin elde edilmesi	57
Şekil 3.1. KKKAV ile enfekte edilen Vero-E6 hücrelerinde inokulasyonu izleyen günler bazında tespit edilen viral patoloji	66
Şekil 3.2. KKKAV'un (Ank-2) NC geninin PCR ile çoğaltılması	67
Şekil 3.3. pCDNA3.1/myc-hisA+NC konstraktın doğrulanması	68
Şekil 3.4. Stabil KKKA-NC ifade eden BHK21 hücresi üretimi	69
Şekil 3.5. pET28(a)+NC konstraktın doğrulanması	70
Şekil 3.6. KKKAV N proteinine karşı fare kan serumlarından elde edilen spesifik antikorların, stabil olarak N proteini ifade eden BHK-21 hücrelerinde IIFT ile tespiti	71

Şekil 3.7. KKKAV N (Nükleokapsit) proteini ifade eden plasmid ile immünize edilen farelerin dalaklarından hibridoma teknolojisi kullanarak elde edilen hibrit hücrelerden örnekler	72
Şekil 3.8. KKKAV-NC proteinine karşı hibridoma hücrelerinden elde edilen spesifik antikorların, stabil olarak NC proteini ifade eden BHK-21 hücrelerinde IIFT ile tespiti	73
Şekil 3.9. KKKAV-NC proteinine karşı elde edilen iki MAb (AH-NC3 ve AH-NC16) ile immunoblotting analizi	73
Şekil 3.10. KKKAV-NC spesifik antikorların izotiplemesi için kullanılan Rapid ELISA Mouse mAb Isotyping Kit protokolü (Pierce, USA) ve yapılan test sonucu	74
Şekil 3.11. pCDNA3.1/myc-hisA+M konstraktın doğrulanması	75
Şekil 3.12. KKKAV-GPC ifade eden plazmid ile immünize edilen farelerin dalaklarından hibridoma teknolojisi kullanarak elde edilen hibrit hücre kolonileri	77
Şekil 3.13. KKKAV GPC proteinine karşı AH-GPC14 kodlu klondan elde edilen antikorların, BHK-21-GPC hücrelerinde IIFT ile tespiti	78
Şekil 3.14. KKKAV GPC proteinine karşı AH-GPC15 kodlu klondanelde edilen antikorların, BHK-21-GPC hücrelerinde IIFT ile tespiti	78
Şekil 3.15. KKKAV-GPC proteinine karşı hibridoma hücrelerinden üretilen antikorların immünblotlama görüntüsü	79
Şekil 3.16. KKKAV-GPC antikorlarına ait Rapid ELISA Mouse mAb Isotyping Kit (Pierce, ABD) ile yapılan izotiplendirme sonucu	80
Şekil 3.17. AH-GPC16 ile gerçekleştirilen IHC sonuçları, X40 büyütme	81
Şekil 3.18. AH-GPC17 ile gerçekleştirilen IHC sonuçları, X40 büyütme	81
Şekil 3.19. AH-NC9 ile beyin dokusundan gerçekleştirilen IHC sonucu, X40 büyütme	82

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Araştırma kapsamında kullanılan hücre hatlarına ilgili bilgiler	35
Çizelge 2.2. Bakteri besi yerlerinin hazırlanması	38
Çizelge 2.3. Tez çalışmasında kullanılan primer dizileri	44
Çizelge 2.4. S Segment çoğaltılması için PCR miks bileşenleri ve programı	47
Çizelge 2.5. pCDNA3.1/myc-hisA vektörünün ve PCR ürünleri için kullanılan kesim protokolü	47
Çizelge 2.6. pET-28a(+) vektörünün ve PCR ürünleri için kullanılan kesim protokolü	47
Çizelge 2.7. pCDNA3.1/myc-hisA vektör ve PCR ürünleri için kullanılan ligasyon protokolü	48
Çizelge 2.8. pET-28a(+)vektör ve PCR ürünleri için kullanılan ligasyon protokolü	48
Çizelge 2.9. S (Nucleocapsit-N) Segmentini plasmidlerde doğrulama için koloni PCR miks bileşenleri ve programı.	49
Çizelge 2.10. pCDNA3.1/myc-hisA ve pUC57 vektörleri için kullanılan kesim protokolü	50
Çizelge 2.11. pCDNA3.1/myc-hisA vektör ve KKKAV-GPC (Glikoproteinleri) kodlayan M Segmenti için kullanılan ligasyon protokolü	50
Çizelge 2.12. KKKAV-GPC kolonileri seçimi için kullanılan koloni PCR miks bileşenleri ve programı	51
Çizelge 2.13. Farelerde uygulanan bağışıklama programı	51
Çizelge 2.14. SDS-poliakrilamid jellerinin hazırlanması	63
Çizelge 3.1. İmmunize edilen farelere ilişkin vital veriler	76
Çizelge 3.2. Araştırmada elde edilen mAb'ların yapısal ve fonksiyonel özellikleri	83

1. GİRİŞ

Kırım-Kongo kanamalı ateşi (KKKA), Afrika, Avrupa ve Asya'da yaygın olarak görülen kene kaynaklı viral hastalıklardan biri olup ilk olarak Sovyetler Birliği'nin Kırım bölgesinde 1944 yılında tespit edildiği ve 'Kırım kanamalı ateşi' olarak tanımlandığı bildirilmektedir. Daha sonra 1956 yılında Belçika Kongo'sunda 'Kongo virusu' adıyla tanımlanmış, daha sonra yapılan araştırmalarda iki virusun benzerliği sonucu 1969'da nihai olarak KKKAV (Kırım-Kongo kanamalı ateşi Virus) olarak adlandırılmıştır. KKKA, Asya'da (Hindistan, Pakistan, Tacikistan, Kazakistan ve Rusya), Orta Doğu'da (İran ve Afganistan), Avrupa'da (Türkiye, Bulgaristan, Yunanistan, Arnavutluk ve Kosova) ve Afrika cumhuriyetlerinde (Sudan, Moritanya, Kenya, Senegal ve Güney Afrika) geniş bir coğrafi yayılıma sahip olduğu bilinmektedir (Farhadpour ve ark., 2016; Mazzola ve Kelly-Cirino, 2019; Okely ve ark., 2020 ve Spengler ve ark., 2019).

Kırım Kongo kanamalı ateşi virusu (KKKAV), insanlarda şiddetli bir kanamalı ateş olan Kırım-Kongo kanamalı ateşine (KKKA) neden olan kene kaynaklı bir virus olarak bilinmektedir. Asya, Afrika, Güneydoğu Avrupa ve Orta Doğu'daki 30'dan fazla ülkede %30'a varan ölüm oranına sahiptir ve *Hyalomma* cinsinin enfekte kenelerinin ısırması veya enfekte hayvanlardan ve insanlardan alınan doku veya vücut sıvıları ile doğrudan temas yoluyla insanlara bulaşması bildirilmektedir. İnsanlarda yüksek patojenitesine rağmen, sığır, eşek, keçi, yabani tavşan, at, deve kuşu, küçük kemirgenler ve koyun gibi çok çeşitli hayvanların, KKKA enfeksiyonunu takiben belirgin hastalık semptomları göstermeden viremi geliştirdikleri bildirilmektedir. Viral tehdit çalışması yapmak için, yeni doğmuş fareler, bağışıklığı baskılanmış kemirgenlerin bir alt kümesi ve cynomolgus macaque'lar insan hastalığını kısmen taklit edebilmekte ve bu nedenle KKKAV'nun potansiyel hayvan modelleri olarak değerlendirilmektedir. Uygun hayvan modellerinin sınırlı olması ve ayrıca yüksek-tecrit laboratuvarların olmaması (biyogüvenlik seviyesi 4 - BSL4) virolojik çalışmadaki ilerlemeyi ve antiviral ilaç ve

aşıların geliştirilmesini büyük ölçüde yavaşlatmaktadır (Dai ve ark., 2021 ve Mohammadi ve ark., 2021).

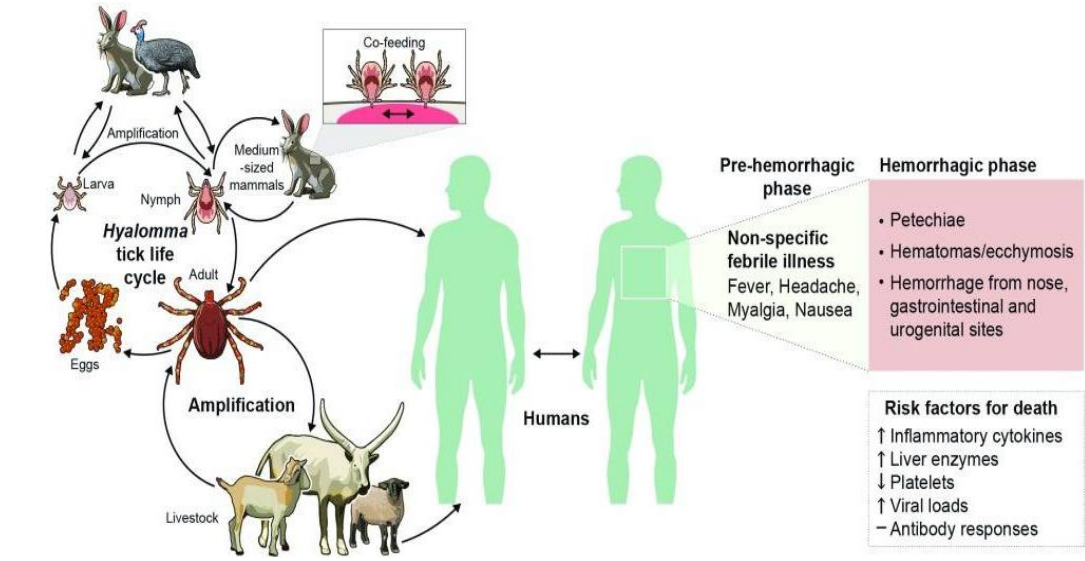
KKKAV,*Orthonairovirus* cinsine, *Nairoviridae* familyasına, *Bunyavirales* takımına ait olduğu bildirilmektedir. Viral genom, üç negatif iplikçikli RNA segmentinden oluşmaktadır. Küçük (S) segment nükleoproteini (NP), orta (M) segmenti, daha sonra olgun Gn, Gc ve müsin, GP38 ve NSm dahil olmak üzere çeşitli yapısal olmayan proteinlere bölünen glikoprotein prekürsor (GPC) kodlamakta ve (L) segmenti ise viral RNA sentezini katalize eden RNA'ya bağımlı RNA polimerazı (RdRp) ve konakçı doğuştan gelen bağışıklığın viral antagonizminde yer alan bir yumurtalık tümörü (OTU) proteaz alanını içeren L proteinini kodlaması bildirilmektedir (Okely ve ark., 2020; Dai ve ark., 2021).

Spesifik antiviral tedavilerin olmaması, yüksek ölüm oranı, artan vektör biyonomiği ve iklim değişikliği nedeniyle, KKKAV birçok ülkede yeni ortaya çıkan bir arboviral zoonotik hastalık olarak kabul edilmekte ve bir halk sağlığı acil durumuna neden olabilecek oldukça bulaşıcı bir patojen olarak listelenmektedir. Bu nedenle, artan KKKA halk sağlığı tehdidini yönetmek için KKKA'ya karşı yeni antiviral terapötiklerin geliştirilmesine acilen ihtiyaç olduğu öne sürülmektedir. Şu anda, destekleyici tedavi birincil tedavi şeklidir. Geniş spektrumlu bir antiviral ilaç olan ribavirin, insan KKKA vakalarına uygulanmıştır; bununla birlikte, terapötik faydalar belirsizliğini hala korumaktadır. Ayrıca vaka raporlarında kullanılan diğer terapötik adaylar arasında steroid, nekahat serumu (convalescent serum) ve spesifik immünoglobulin bulunmaktadır, ancak bu ilaçların etkinliğini değerlendirmek için yeterli kanıt elde olmadığı bildirilmektedir. Ek olarak, bunyaviruslerin potansiyel inhibitörleri geçtiğimiz on yıllarda değerlendirilmiş ve bunların bazılarının KKKA enfeksiyonuna karşı olası etkinlik gösterebileceği bildirilmiştir (Dai ve ark., 2021 ve Tchesnokov ve ark., 2020).

1.1. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virusu (KKKAV)

Bir hastalık olarak KKKA ilk kez insanlarda 1940’larda Kırım’da terk edilmiş tarım arazilerini yeniden işgal eden askerlerin hemorajik bir hastalığa yakalanmasıyla tanımlandığı bildirilmektedir. 1960’ların sonlarında, Kırım’daki bu hemorajik hastalığa neden olan ajanın, Belçika Kongo’daki (şimdiki Demokratik Kongo Cumhuriyeti) hemorajik hastalığa neden olan ajana benzer olduğu keşfedildi ve patojene “Kırım-Kongo kanamalı ateşi virusu” adı verilmiştir. Ayrıca *Rhipicephalus* ve *Dermacentor* türleri gibi diğer kene türlerinin vektör olabileceğine dair sınırlı kanıt olmasına rağmen, KKKAV’nun ana vektörü ve rezervuarı, esas olarak *Hyalomma* cinsinden sert vücut kenelerdir. Evcil çiftlik hayvanları ve tavşan gibi yabani hayvanlar gibi omurgasız konaklar, muhtemelen KKKAV’nin çoğaltıcı konakları olarak bilinmektedir. Enfekte olmayan kenelerin, viremik hayvanlardan beslenme sırasında veya enfekte kenelerle birlikte beslenme sırasında enfekte oldukları bildirilmektedir. Kırım-Kongo kanamalı ateşi virusu bulaşma yolları Şekil 1.1’de gösterilmektedir (Gargili ve ark.,2017 ve Hawman ve ark., 2018).

Hyalomma vektörü Afrika, Güney ve Doğu Avrupa, Orta Doğu, Hindistan ve Asya’da bulunur ve bu bölgelerde KKKA vakaları rapor edilmektedir. Ayrıca bunların çoğu subklinik ve/ya tanısı konulamamış olmasına rağmen, KKKAV ile her yıl tahmini 10.000 ila 15.000 insan enfeksiyonu meydana gelmektedir. KKKAV’nun geniş coğrafi dağılımı ile bağlantılı olarak farklı izolatlar arasında önemli genetik çeşitlilik görülmektedir. Yapılan çalışmalarda izolatlar amino asit seviyesinde nükleoprotein ve L proteininde %5 ve glikoprotein öncüsünde %25’e kadar farklılık bildirilmektedir (Hawman ve ark., 2018).



Şekil 1.1. Kırım-Kongo kanamalı ateşi virusu (KKKAV) bulaşma yolları ve semptomları. KKKAV için doğal rezervuar ve vektör, *Hyalomma* cinsinin keneleridir. Keneler, viremik bir hayvanda beslenme sırasında veya enfekte bir kene ile beslenme (co-feeding) sırasında herhangi bir yaşam döngüsü aşamasında enfekte olabilir. Memeli türleri virus için önemli çoğaltıcı konaklar olarak tanımlanmaktadır. İnsanların, kene ısırıklarından, hayvancılıktan ve enfekte çiftlik hayvanlarının kesilmesinden ve KKKAV'lı hastaların bakımı sırasında KKKAV enfeksiyonuna maruz kalabilecekleri bildirilmektedir. (Hawman ve ark., 2018).

1.1.1. KKKAV'un Sınıflandırma, Yapı ve Genetik Özellikleri

Etiyolojik ajan, Kırım-Kongo kanamalı ateşi virusu (KKKAV) zarflı, üç segmentli, negatif polariteli, tek sarmallı (ss) bir RNA arbovirusu olarak sınıflandırılır. Ayrıca viral genomik ve metagenomik karşılaştırma analizindeki gelişmelere dayanan en son sınıflandırmaya göre, *Riboviria* (yeni bir megataksonomik takson sıralaması) içinde *Orthonairovirus* cinsine (*Nairoviridae* familyası, *Bunyavirales* takımı) ait olduğu bilinmektedir (ICTV, 2021).

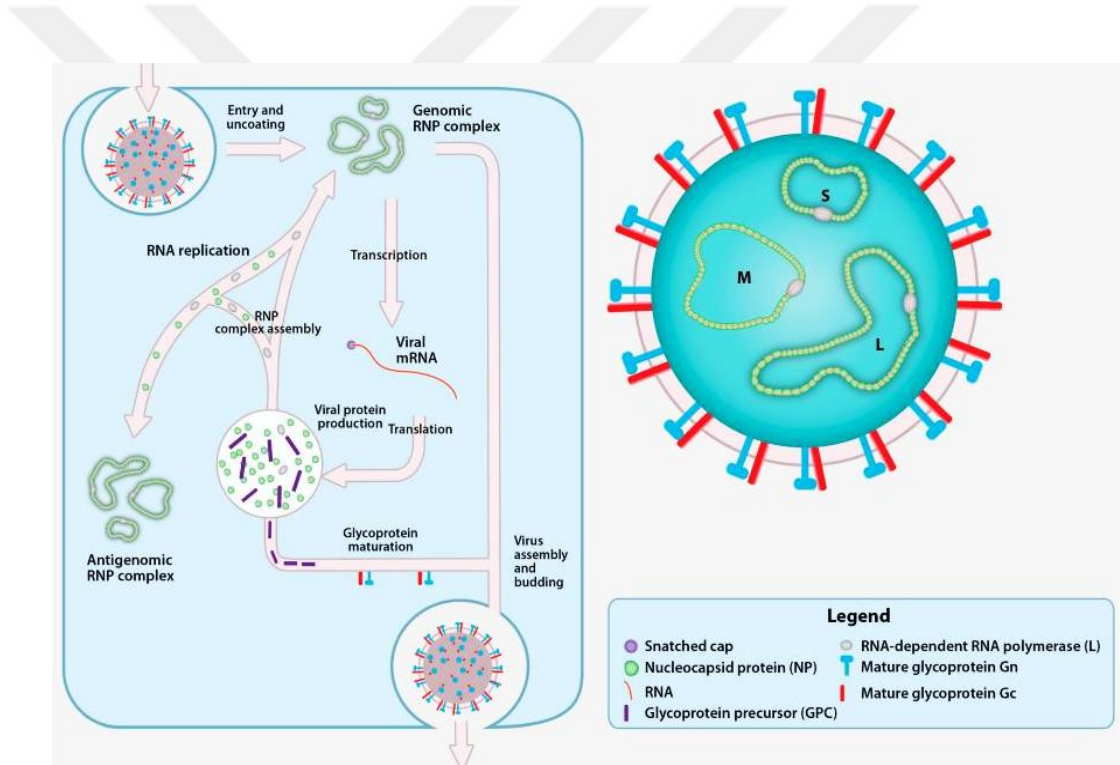
KKKAV virionu yaklaşık 80–100nm çapında ve helikal simetrik nükleokapsid, lipid zarfı 5-7 nm kalınlığında ve 8-10 nm uzunluğunda glikoprotein sivri uçlarına sahip olduğu bilinmektedir (Wahid ve ark., 2019). KKKAV, üç segment içeren negatif polariteli bir RNA genoma sahiptir. Küçük segment (S~1.7 kb) nükleokapsid proteinlerini (NP) ve Orta segment (M~ 5.3 kb), olgun Gn (37-kDa) ve Gc'den (75-kDa) oluşan glikoproteinlerin üretimini destekleyen M 1700 amino asitlerin öncüsünü (GPC) kodlamaktadır. M segmenti tarafından kodlanan glikoprotein presürkor (GPC) tek bir protein olarak sentezlenir ancak translasyon sonrasında çeşitli enzimler tarafından yüzey glikoproteinlerine (Gn ve Gc) kesilerek ayrılmaktadır. Büyük segment (L~ 12,1 kb) viral polimerazı (RNA'ya bağımlı RNA-polimerazı; 450 kDa- L-RdRp) kodlamaktadır (Hager ve ark., 2022 ve Papa. 2019).

KKKAV, virusun geniş bir dağılımını ortaya çıkaran diğer kene kaynaklı viruslardan daha yüksek genetik çeşitlilik sergilemektedir. KKKAV'nun tam genomik dizileri mevcut hale geldiğinden, son yıllarda yeni viral sınıflandırmalar sergilemektedir. Genomun S RNA segmentinin dizisi temelinde yapılan filogenetik değerlendirmeler ve coğrafi kökene dayalı olarak dokuz adet genetik soy tanımlanmaktadır. Bunlar Afrika-1 (genotip I), Afrika-2 (genotip II), Afrika-3, (genotip IIIa) ve Afrika 4 (genotip IIIb); Asya-1 (genotip IVa) ve Asya-2 (genotip IVb); Europe-1 (genotip V), Europe-2 (genotip VI) ve Europe-3 (genotip VII) olarak isimlendirilmiştir (Garrison ve ark., 2020; Gruber ve ark., 2019 ve Portillo ve ark., 2021).

1.1.2. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Virus (KKKAV) Replikasyon Döngüsü.

KKKA virionu, nükleoprotein (NP) ve RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RdRp; L proteini) tarafından kapsidasyona tabi tutulan üç segmentli, tek sarmallı ve negatif bir RNA (vRNA: viral RNA) genomu içermektedir. Hücre membranı ile füzyondan sonra, viral genomik segmentlerin L proteini tarafından viral mRNA'ya kopyaları oluşturulur ve bu yapılar, kep aşırma yoluyla konakçı hücreden türetilmiş

5' kep (capping) kazanırlar. Viral mRNA'lar sitoplazmik ribozomlar tarafından NP ve L proteinlerine çevrilmiştir. Glikoprotein öncüsü (GPC), endoplazmik retikulum (ER) ile ilişkili ribozomlar tarafından çevrilmiş gibi görünmektedir. Yeni sentezlenen NP ve L proteininin bir kısmı, antijenomik RNA (cRNA) içeren bir RNP oluşturarak genomik RNA'yı kopyalamak için kullanılmaktadır. GPC, ER Golgi'de işleme ve olgunlaşmaya tabi tutulur ve sonuç olarak viral zarfta sergilenen Gn ve Gc'yi oluşturmaktadır (Şekik 1.2.). Elde edilen olgun glikoproteinlerin ve genomik RNP'lerin birikmesi neticesinde, Golgi'de yeni KKKAV partiküllerinin meydana geldiğine ve ardından Golgi'den türetilmiş veziküllerde virion salınımının olduğuna inanılmaktadır (Zivcec ve ark., 2016).

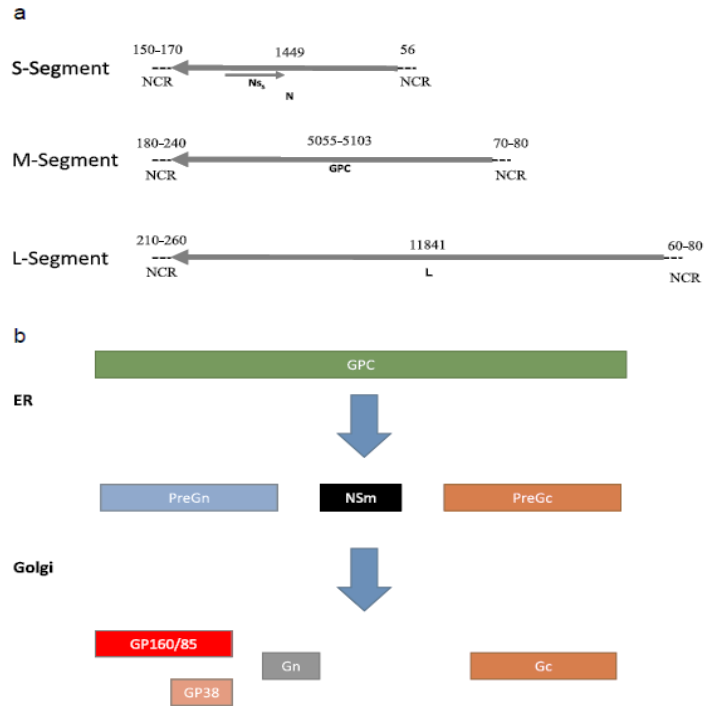


Şekil 1.2. Kırım-Kongo kanamalı ateşi virusu (CCHFV) virion yapısı ve replikasyon döngüsü (Zivcec ve ark., 2016).

1.1.3. KKKAV Proteinleri

1.1.3.1. S Segmenti: NP ve NSS

S segmenti, KKKAV partiküllerinde en bol bulunan viral protein olan N'yi kodlamaktadır ve viral genomun kapsidasyonunda anahtar rol oynamaktadır. KKKAV'un N yapısı, polipeptidin N- ve C-terminal bölümlerinin katkıda bulunduğu geniş bir küresel alan ve ayrıca kolun tepesinde korunmuş bir kaspaz-3 bölünme bölgesi içeren çıkıntılı bir "kol" düzenlemektedir. Büyük olasılıkla küresel bölge RNA bağlanmasından sorumludur. S segmenti ayrıca yapısal olmayan bir proteini ambisense yönde kodlayabilmektedir (Estrada ve De Guzman, 2011 ve Mirazimi ve ark., 2021).



Şekil 1.3. KKKAV virus genom organizasyonu. KKKAV virusu üç segmentli negatif iplikçikli RNA genomundan oluşmaktadır. Küçük (~1.6 kb), orta (~5.4 kb) ve büyük (~12.1 kb) segmentler sırasıyla N, GPC ve L proteinini kodlamaktadır. Küçük segment aynı zamanda zıt anlamda yapısal olmayan bir S proteinini (NSS) de kodlar. Kodlama bölgeleri, kodlamayan bölgeler (NCR'ler) ile çevrilidir (Mirazimi ve ark., 2021).

1.1.3.2. M Segmenti: Glikoproteinler

M segmenti, tek bir poliproteini, glikoprotein öncüsünü (GPC) kodlamaktadır. KKKAV GPC'nin olgunlaşması çok karmaşıktır ve diğer bunyaviruslerdeki glikoprotein işleme ile pek benzerlik göstermemektedir. GPC olgunlaşması, virus zarfına eklenen iki adet tip I transmembran glikoproteini, GN ve GC'yi ortaya koymaktadır. Endoplazmik retikulum (ER) ve Golgi'deki GPC işlemesi, iki yapısal glikoprotein, GN ve GC ve GP160, GP85 ve GP38 olarak adlandırılan yapısal olmayan proteinler ve yapısal olmayan M proteini (NSM) ile sonuçlanmaktadır. GPC, ağır şekilde glikosile edilir ve ardından proprotein dönüştürücüler dâhil olmak üzere konakçı proteazlar tarafından bölünmesi bildirilmektedir (Estrada ve De Guzman, 2011 ve Miazimi ve ark., 2021).

1.1.3.3. L Segment: Ovarian Tumor Proteaz, Nükleaz ve RdRp

Nairoviridae ailesi üyelerinin, diğer üyelere kıyasla alışılmadık derecede büyük bir RNA'ya bağımlı RNA polimeraz proteinine (neredeyse iki katı büyüklükte) sahip oldukları bildirilmektedir. Bu segment, tek bir açık okuma çerçevesine sahiptir ve yaklaşık 4000 amino asitlik bir poliproteini kodlamaktadır. Ayrıca, 1–609 amino asitleri, yumurtalık tümörü (OTU) sistein proteaz işlevine sahip alanlar içermektedir. Ayrıca, OTU alanı ve RdRp korunmuş motifler arasında yer alan diziler, potansiyel bir lösin fermuarı ve bir C₂H₂ çinko parmak motifi içermektedir (Hoing ve ark., 2004 ve Miazimi ve ark., 2021).

1.1.4. KKKA Hastalığının Patogenez

Yapılan serolojik araştırmaların sonuçları KKKAV'nun ilginç bir şekilde hem vahşi hem de evcil hayvanlar dahil olmak üzere çok sayıda omurgalı türünü etkin bir şekilde enfekte edebileceğini göstermektedir (Spengler ve ark., 2016). Ancak bu türler arasında sadece insanlar, şiddetli veya ölümcül hastalık tablosuna

sergilemektedirler. Diğer taraftan insanlarda bile, çoğu KKKAV enfeksiyonu hafif veya subklinik bir seyir gösterebilmektedir (Bodur ve ark., 2012). Henüz neden bazı hastalarda ciddi veya ölümcül bir hastalık gelişirken diğerlerinde asemptomatik bir enfeksiyon geliştiğine dair kesin bulgular mevcut değildir. KKKAV'nun tip I interferon sistemi silinmiş olan farelerde şiddetli veya ölümcül hastalığa neden olma yeteneği, omurgalı konakçılarda doğuştan gelen bağışıklık tepkilerinin KKKAV patogenezi sınırlamada önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Ayrıca, *in vitro* çalışmalar, retinoik asitle indüklenebilir gen I'i (RIG-I), KKKAV'nun doğuştan gelen bir bağışıklık sensörü olarak tanımlamıştır (Habjan ve ark., 2008; Atkinson ve ark., 2012 ve Zivcec ve ark., 2013).

Bununla birlikte, daha doğuştan gelen bağışıklık sensörlerinin KKKAV'nin algılanmasına katkıda bulunması muhtemeldir. İnsanlarda yapılan retrospektif çalışmalar, Toll-benzeri reseptörlerdeki (TLR'ler) polimorfizmler ile hastalığın şiddeti arasında korelasyonlar belirlemiştir. Bu da TLR'lerin KKKAV'nun kontrolünde önemli bir bağışıklık algılama yolu olabileceğini düşündürmektedir. TLR7, 8, 9 ve 10'daki polimorfizmlerin, Türkiye'deki enfekte hastalarda hastalık şiddeti ve sonucu ile ilişkili olduğu bulunmaktadır (Kızıldağ ve ark., 2018 ve Spengler ve ark., 2015).

Nükleer faktör-kappa B'deki polimorfizmlerin de artmış KKKA riski ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (Arslan ve Engin, 2012). Benzer polimorfizmlerin KKKA ile ilişkili olup olmadığı ve diğer coğrafi bölgelerdeki popülasyonlardaki vaka şiddeti henüz bilinmemektedir. KKKAV replikasyonu apoptozu indükleyebildiğinden, konak apoptotik yollar KKKAV replikasyonunu kısıtlayabilmektedir (Barnwal ve ark., 2016 ve Rodrigues ve ark., 2012) ve apoptoz sırasında aktive olan kaspaz 3, KKKAV nükleoproteinini parçalayabilmekte ve böylelikle viral replikasyonu inhibe edebilmektedir (Karlberg ve ark., 2011 ve Wang ve ark. 2012).

KKKAV ayrıca doğuştan gelen bağışıklık sinyalini antagonize etmektedir. KKKAV'nun L segmenti, son zamanlarda doğuştan gelen bağışıklık sinyal yollarında

yer alan proteinleri deubikitinasyon yoluyla doğal bağışıklık tepkilerini baskıladığı gösterilen bir yumurtalık tümörü benzeri deubiquitinaz (OTU) alanını kodlamaktadır. KKKAV OTU alanının ayrıca interferon ile uyarılan gen 15 (ISG15) modifikasyonlarını parçalayabildiği bildirilmektedir (Frias-Staheli ve ark., 2007; James ve ark., 2011 ve Scholte ve ark., 2017).

Ayrıca, ISG15 modifikasyonlarının doğrudan antiviral etkilerle ilişkilendirildiği ve ISG15'in kendisinin viral enfeksiyona karşı konağın doğal bağışıklık tepkisini düzenlediği noktasından hareketle, KKKAV OTU alanının de-ISGylation aktivitesinin viral patogeneze için önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir. Deubiquitinaz aktivitesi eksik olan veya hem deubiquitinaz hem de de-ISGylation aktivitesi eksik olan bir OTU'yu kodlayan rekombinant KKKAV, interferon-kompetent ancak interferon-kompetent olmayan hücrelerde WT KKKAV ile karşılaştırıldığında viral büyüme kinetiklerinin azaldığı tespit edilmiştir. Bu da OTU alanının konağa ait interferon yanıtlarının üstesinden gelmede önemli olduğunu göstermektedir (Perng ve Lenschow., 2018 ve Scholte ve ark., 2017).

Diğer taraftan KKKAV OTU alanının, insan ISG15'e kıyasla fare ISG15'e yönelik afinitesi düşüktür. Bu da fare ISG15'in farelerin KKKAV enfeksiyonuna karşı önemli bir bariyer olabileceğini düşündürmektedir. KKKAV OTU alanının ayrıca insan ISG15'i için ilgili Nairoviridae'nin OTU alanlarından daha yüksek afiniteye sahip olduğu bildirilmektedir. Tüm bu veriler OTU alanının KKKAV için önemli bir virülans faktörü olabileceğini düşündürmektedir (Capodagli ve ark., 2018 ve Deaton ve ark., 2016).

İnsan patogeneğinde KKKAV'ne karşı adaptif immün yanıtların rolünün daha az olduğu bilinmektedir. Düşük ya da eksik anti-KKKAV antikor yanıtlarının şiddetli hastalık ve ölümle ilişkili olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, antikor yanıtlarının birincil KKKAV enfeksiyonunun kontrolüne katkıda bulunup bulunmadığı bilinmemekte ve hayatta kalanlarda bile nötralize edici antikor düzeylerinin düşük olduğu bildirilmektedir (Ergonul ve ark., 2006 ve Hawman ve ark., 2018).

Türkiye ve Güney Afrika’da KKKAV’dan kurtulanlardan alınan lineer peptitler ve serum kullanılarak gerçekleştirilen epitop haritalaması sonunda, müsin benzeri alan, GP38 ve Gn protein bölgelerindeki epitoplara karşı antikor reaktivitelerini tanımlanmıştır. Bununla birlikte, nötralize edici olmayan antikorların farklı mekanizmalar yoluyla koruyucu olabileceğini ve hatta ölümcül KKKAV tehdidine karşı koruyucu oldukları bildirilmiştir (Fritzen ve ark., 2018).

KKKAV için modifiye edilmiş vaccinia virusu bazlı aşıyı değerlendiren çalışmalar, korumanın hem hücresel hem de hümorale tepkiler gerektirdiğini ortaya koymuştur. Bu da T hücrelerinin KKKAV’ne karşı aşı aracılığı korumanın önemli bir bileşeni olabileceğini düşündürmektedir (Buttigieg ve ark., 2014 ve Dowall ve ark., 2018). Primer KKKAV enfeksiyonunu kontrol etmede T hücrelerinin rolü belirsizdir. Periferik kanda dolaşan $CD3^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerinin seviyelerinin ölümcül sonuçla pozitif korelasyon gösterdiği ve KKKAV’dan kurtulan insanlarda KKKAV’ne özgül ve uzun ömürlü $CD8^+$ T- hücre varlığı bildirilmektedir. İnsan lökosit antijen alellerinin de KKKAV’e karşı koruma ve duyarlılık ile ilişkili olduğu bulunmaktadır. KKKAV’nun insanlaştırılmış bir fare modeli, KKKAV enfeksiyonunun ardından T hücrelerinin aktive olduğunu ve $CD8^+$ T hücrelerinin sitolitik aktivitenin bir belirtisi olan yüksek performans seviyelerine sahip olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, T hücre yanıtlarının enfeksiyonun çözülmesine nasıl katkıda bulunduğunu anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu bildirilmektedir (Spengler ve ark., 2017).

Birincil KKKAV enfeksiyonunun kontrolünde adaptif bağışıklık tepkisinin rolünü anlamak konusunda, uygun hayvan modellerinin olmaması nedeniyle hala eksiklikler bulunmaktadır. Tip I interferon eksikliği olan fareler, adaptif bağışıklık tepkilerinin geliştirilmesinden önce hızlı başlangıçlı ölümcül bir hastalık sergilemekte ve bu durum bu modelin adaptif bağışıklık tepkilerini incelemek için uygunluğunu sınırlamaktadır. Bununla birlikte, STAT1 eksikliği olan farelerde yapılan çalışmalar, $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerinin erken aktivasyonunu göstermektedir, bu hücreler enfeksiyondan sonraki 3. günde dalakta tespit edilebilir düzeyin altında kaldığından, fareler antikor yanıtları saptanamadan enfeksiyona

yenik düşmüşlerdir. Bir interferon blokaj antikoru ile tedavi edilen farelerin kullanıldığı bir çalışmada, adaptif immün yanıtları eksik olan, ancak WT olmayan fareler’de, enfeksiyondan en az 2 hafta sonrası kalıcı viral replikasyon gözlemiş olup bu durum adaptif immün yanıtların farelerde KKA’nu kontrol edebileceğini göstermektedir. Bu model aynı zamanda sitolitik T-hücre aktivitesi gibi adaptif bağışıklık tepkilerinin, KKA enfeksiyonu sonrasında karaciğer hasarı için gerekli olmadığını da göstermektedir. Bu veriler, KKA’nun, konakçı adaptif bağışıklık tepkisinin viral replikasyonu kontrol etme girişimlerinden bağımsız olarak doğrudan karaciğer hasarına neden olma yeteneğine sahip olduğunu göstermektedir. Son olarak bir sinomolgus makak modelinde (cynomolgus macaque model) KKA’nın adaptif bağışıklık tepkisi ve hastalık sonucunun rolü hakkında fikir sağlanabilmiştir. Bu modelde ne antikor titrelerinin ne de antikorların nötralize edici aktivitesinin hastalık sonucu ile bağıntılı olmadığı bildirilmiştir. Bununla birlikte, bu modelde T-hücre yanıtının hastalık sonucuna olan katkısını değerlendiren çalışmalara hala ihtiyaç olduğunu bildirmişlerdir (Lindquist ve ark., 2018 ve Hawman ve ark., 2018).

1.1.5. Hastalık ve Teşhis

İnsanların kene ısırıkları ve enfekte hayvanların kesilmesi sırasında ve sağlık merkezlerinde enfekte hastaların bakımı sırasında KKA ile enfekte olabildikleri bildirilmektedir. Birkaç günlük bir inkubasyon döneminden sonra, KKA’nın ilk semptomları aniden ortaya çıkabilen spesifik olmayan ateşli bir hastalıktır. Ani başlayan ateş, kas ağrısı, ishal, bulantı ve kusma tipik olarak rapor edilmektedir. Bundan sonra, hastalar vücudun çeşitli yerlerinde kanamalar göstermeye başladıkları kanamalı döneme girmektedir (Ergönül, 2006). Ayrıca, vaka ölüm oranları salgınlar arasında farklılık göstermekte ancak tipik olarak %5 ila %30 arasında değişmektedir. Bununla birlikte, subklinik veya hafif KKA vakaları fark edilmeyebilir ve insanlarda KKA enfeksiyonlarının önemli bir bölümünü temsil edebilmektedir (Bodur ve ark., 2012).

KKKAV'nun bilinen genetik çeşitliliğine rağmen, KKKAV'nun enfekte edici suşunun hastalık şiddetini ve sonucunu etkileyip etkilemediği bilinmemektedir. Yüksek viral yükler, erken antikor yanıtlarının olmaması ve yüksek düzeyde alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST), hastalığın kötü seyrinin ortak belirleyicileridir (Duh ve ark., 2006 ve Hasanoglu ve ark., 2016). Trombositopeni ve uzamış pıhtılaşma süreleri de şiddetli vakalarda görülmektedir. Ayrıca şiddetli ve ölümcül KKKA vakalarında inflamatuvar sitokin seviyeleri yükselir, bu da KKKA enfeksiyonunun inflamatuvar bir immün yanıtı tetiklediğini göstermektedir (Hawman ve ark., 2018).

Şüpheli KKKA vakalarının teşhisi, hastalığın viremik fazı sırasında alınan kan örneklerinde ters transkripsiyon-kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) kullanılarak yapılabilmektedir. RT-qPCR, genellikle hastalık sonucu ile ilişkili olan viral yükü de belirleyebilmektedir. Bu uygulamalar için önemli olan husus, KKKAV'nun genetik çeşitliliğidir. Bununla birlikte, çok sayıda KKKAV genotipini tanıyabilen test sistemlerinin geliştirildiği bildirilmektedir (Atkinson ve ark., 2014 ve Sas ve ark., 2018). KKKAV'ne özgü IgM ve IgG antikorların saptanması için ELISA ve indirek immüno floresan testi serolojik tanı için tercih edilen yaklaşımlardır. Ancak, ciddi KKKA vakalarında antikor yanıtları genellikle bulunmadığından veya geciktiğinden, bu testlerin hastalığın akut fazındaki erken şüpheli vakalar için uygun olmayabileceği bildirilmiştir (Hawman ve ark., 2018).

1.1.6. Mevcut Antiviral Stratejiler

1.1.6.1. Nükleotid Analogları

Viral RNA polimerazı hedefleyen bir ilaç sınıfı olan nükleozid analogları hem in vitro hem de in vivo olarak birçok farklı viruse karşı geniş spektrumlu antiviral aktivite sergilemektedir. Bunların çoğu şu anda ortaya çıkan enfeksiyonlarda terapötik kullanım için aday ilaçlar olarak değerlendirilmektedir. Ribavirin,

favipiravir ve 2'-deoksi-2'-florositidin dahil olmak üzere birkaçı da anti-KKKAV testlerinde kullanıldığı bildirilmektedir (Dai ve ark., 2021 ve Graci ve ark., 2013).

1.1.6.2. Ribavirin

Ribavirin, *in vitro* ve *in vivo* olarak bilinen geniş spektrumlu antiviral aktiviteye sahip bir purin nükleozid analog bileşiğidir ve KKKA tedavisi için Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından önerilen tek antiviral ilaç olarak bilinmektedir. Watts ve ark. (1989), Afrika Yeşil Maymun Böbrek hücre dizisi (Vero) ile yapılan *in vitro* testlerle ribavirinin çeşitli KKKAV suşları üzerinde anti-KKKAV etkinliği olduğunu bildirmişlerdir. Ribavirinin koruyucu aktivitesi daha sonra KKKAV ile enfekte olmuş emziren farelerde (Tignor ve ark., 1993), sinyal transdüseri ve transkripsiyon-1 (STAT-1) aktivatörü (Bente ve ark., 2011) ve tip I interferon reseptörü eksikliği olan (IFNAR^{-/-}) farelerde incelenmiştir (Hawman ve ark., 2018 ve Oestereich ve ark., 2014). Söz konusu çalışmaların ortak sonucu, klinik yarar görmek için KKKAV'e karşı ribavirin tedavisinin enfeksiyondan hemen sonra başlatılması gerekliliğidir. Bununla birlikte, ribavirin'in tedavideki faydasına ilişkin klinik kanıtlar tutarsızdır ve araştırmacılar ile klinisyenler arasında tartışmaların devam ettiği bilinmektedir (Espy ve ark., 2018 ve Johnson ve ark., 2018).

Sistematik incelemeler ve meta-analizler, KKKA hastaları için ribavirin'in yetersiz etkinliğini göstermektedir. Buna ilişkili olarak yeterli fayda sağlayabilmek için semptomların başlangıcından (<48 saat) sonra ribavirin ile erken tedavinin gerekli olduğunu öne sürülmektedir. Hastalığın endemik olduğu ülkemizde yapılan bazı çalışmalarda ise KKKA hastalarında ribavirinin etkinliğinin yetersiz olduğu bildirilmektedir (Ascioglu ve ark., 2011 ve Ergonul ve ark., 2018).

1.1.6.3. Favipiravir

Favipiravir (T-705), influenza virusu enfeksiyonlarının tedavisi için Japonya'da lisanslı bir ilaç olarak üretilmektedir, ancak şiddetli akut solunum sendromu koronavirus 2 (SARS-CoV2), Hantavirus ve Rift Vadisi Ateşi virusu (RVFV) ve KKKAV dahil olmak üzere diğer yüksek derecede patojenik RNA viruslerine karşı umut vaat etmektedir (Furuta ve ark., 2013; Delang ve ark., 2018 ve Kaptein ve ark., 2020). Ayrıca, iki grup, araştırmalarında IFNAR^{-/-} fare modelinde favipiravir'i KKKAV'e karşı değerlendirdiğinde, favipiravir tedavisinin çeşitli dokularda viral replikasyonunu etkili bir şekilde baskıladığını ve KKKAV enfeksiyonlarını takiben mortaliteyi azaltabileceğini ifade etmişler (Oestereich ve ark., 2014 ve Hawman ve ark., 2018).

Oestereich ve ark. (2014), favipiravir tedavisinin, tedaviye geç başlansa bile, KKKAV enfeksiyonunu takiben ölümcül bir sonucun önlenmesinde ve viral replikasyonun inhibe edilmesinde etkili olduğunu bildirmektedirler. Ayrıca, favipiravir ve ribavirin'in *in vitro* sinerjistik etki sergilediklerini, her iki ilacın daha düşük dozlarının *in vivo* olarak klinik etkinlikte kombine bir tedavi uygulaması şeklinde yan etkilerden ziyade faydalı olabileceğini düşündürmektedir.

Hawman ve ark. (2018), tarafından yapılan çalışmada, favipiravir, enfeksiyondan altı gün sonra uygulandığında bile klinik fayda gösterdiğini bildirilmiştir. Yine bu araştırmacılar, favipiravirin bir sinomolgus makak modelinde KKKAV enfeksiyonuna karşı terapötik etkinliğe sahip olduğunu bildirmektedir.

1.1.6.4. 2'-deoksi-2'-florositidin

Yukarıda bahsedilen ribavirin ve favipiravire ek olarak, bunyavirus enfeksiyonlarına karşı öne çıkan birkaç başka geniş spektrumlu inhibitör de rapor edilmektedir. Welch ve ark.(2017), bir raportör proteini kodlayan bir rekombinant KKKAV kullanarak KKKAV antiviral ilaç keşfi için yüksek verimli bir tarama

tahlili geliştirdiler ve potansiyel bir KKKAV antiviral olarak 2'-deoksi-2'-florositidin adlı bir bileşik tanımlamışlardır. Yapılan *in vitro* alışmada favipiravir veya ribavirin'den daha üstün inhibitör aktiviteye sahip olduğunu gösterdiklerini bildirilmiştir. Ayrıca 2'-dFC'nin sitotoksisiteye neden olmadan KKKAV replikasyonunu inhibe etmek için favipiravir ile sinerjistik olarak etki ettiğini göstermişlerdir, bu da 2'-dFC ve favipiravir ile kombinasyon tedavisinin potansiyelini ortaya koymaktadır.

Smee ve ark. (2018), ayrıca IFNAR^{-/-} fare modelinde geniş spektrumlu bir bunyavirus inhibitörü olarak 2'-FdC'nin potansiyelini araştırdıklarını bildirmişlerdir. 2'-FdC'nin hem RVFV'e hem de trombositopeni sendromu viruslu (SFTSV) şiddetli ateşe karşı inhibitör etkinliği olduğunu ve bu nedenle belirli bunyavirus enfeksiyonlarının tedavisi için umut verici bir aday olduğunu belirtmişlerdir. Bununla birlikte, KKKAV enfeksiyonunun hayvan modellerinde 2'-FdC'nin nasıl performans gösterdiği belirsizliğini korumaktadır (Dai ve ark., 2021 ve Hawman ve ark., 2018).

1.1.6.5. OTU Proteaz İnhibitörleri

Birçok virus, viral replikasyonda ve doğuştan gelen bağışıklıktan kaçınmada önemli bir rol oynayan deubiquitinating (DUB) enzimlerini kodlamaktadır. KKKAV L proteini, doğuştan gelen konakçı antiviral bağışıklık tepkilerini atlatmak için ubikuitin (Ub) ve interferon ile uyarılan gen 15'i (ISG15) bağlayan ve protein hedeflerinden uzaklaştıran DUB aktivitesi de sergileyen bir OTU alanı içermektedir. Bu, KKKAV OTU'nun DUB aktif bölgesini oldukça çekici bir ilaç hedefi haline getirmektedir. Çünkü aktivitenin bozulmasının sadece viral replikasyona doğrudan müdahale etmesi değil, aynı zamanda enfeksiyon üzerine bağışıklık tepkilerini de arttırması beklenmektedir (Frias-Staheli ve ark., 2007 ve Scholte ve ark., 2017).

Kocabaş ve Aslan. (2015), KKKAV'e karşı potansiyel antiviral aktiviteye sahip olabilecek KKKAV OTU inhibitörlerini taramak için KKKAV OTU

proteazının bir floresan raportör analizini geliştirdiklerini bildirmektedirler. İki molekülün (özellikle fenantrenkinon bileşiğinin) gözle görülür bir OTU inhibitör aktiviteleri olduğunu *in vitro* olarak gösterdiklerini bildirmektedirler.

Scholte ve ark. (2019), KKKAV OTU'nun UbV-CC4 tarafından stabil işgalinin, sadece OTU'nun IFN antagonist fonksiyonunu inhibe ederek değil, aynı zamanda RNP komplekslerinin oluşumunu bloke ederek de viral büyümeyi güçlü bir şekilde inhibe ettiğini göstermişlerdir. Bu çalışmalar, KKKAV OTU'sunu hedeflemenin ikili antiviral potansiyelini gösterdiğini ve OTU'ya özgü antiviral ilaçların geliştirilmesi için önemli bir kavramsal temel sağladığı bildirilmektedir. KKKAV OTU inhibitörlerinin antiviral potansiyeline ilişkin veriler *in vitro* oluşturulduğundan, daha fazla *in vivo* çalışmalar gerekli olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmektedir.

1.1.6.6. İnterferon (IFN)

Doğuştan gelen bağışıklık tepkisi, memeli hücrelerinde viral enfeksiyonlara karşı konak savunmasının ilk başlangıcı olarak bilinmektedir (Zhou ve ark., 2018). Ancak önceki çalışmalar, KKKAV enfeksiyonunun, özellikle IFN- α ve IFN- β olmak üzere tip I interferonların (IFN'ler) önemli ölçüde salgılanması ve ardından interferon ile uyarılan genlerin (ISG'ler) yukarı regülasyonu ile sonuçlandığını göstermektedir (Kozak ve ark., 2020 ve Papa ve ark., 2015).

Andersson ve ark. (2004a), tarafından yapılan çalışmalarda, IFN- α ile ön tedavinin, büyük olasılıkla MxA gibi ISG'lerin indüklenmesinden dolayı *in vitro* olarak KKKAV'ne karşı antiviral aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Diğer taraftan, KKKA enfeksiyonu, sonraki IFN- α ile tedaviye neredeyse duyarsızdır ve ayrıca KKKA'e karşı IFN kullanımına ilişkin bugüne kadar hiçbir pozitif klinik veri mevcut değildir (Andersson ve ark., 2008b). 1985'te Güney Afrika'da gerçekleştirilen tek klinik uygulamada, hastalara ve temaslılara insan IFN- α

uygulanmış, ancak ciddi yan etkiler nedeniyle bu tedavinin kesildiği bildirilmiştir (Van Eeden ve ark., 1985).

Son zamanlarda, Bordi ve ark. (2015), tip III IFN'nin (IFN- λ 1) ayrıca bir anti-KKKAV aktivitesine sahip olduğunu, ancak tip I IFN (IFN- α) ile karşılaştırıldığında bu etkinin daha az olduğunu bildirmişler. Ek olarak, insan A549 ve Huh7 hücre hatlarında IFN- λ ve IFN- α arasında bariz bir antagonistik etki gözlemlemiştir.

1.1.6.7. Antikor Tedavisi

Antikor mühendisliğinin ilerlemesiyle, antikor tedavisi son yıllarda istikrarlı bir şekilde büyümektedir. Antikorların, özellikle monoklonal antikorların (mAb'ler), Ebola ve Lassa viruslerinin neden olduğu olanlar da dahil olmak üzere, *in vitro* ve *in vivo* modellerle hemorajik ateş virusu ile ilişkili birkaç enfeksiyon hastalığının tedavisinde etkili olduğu araştırmacılar tarafından gösterilmektedir (Qiu ve ark., 2014 ve Cross ve ark., 2016).

1.1.6.7.1. Nekahat Dönem Serumı (Convalescent Serum)

Sınırlı sayıda yapılan çalışma ile immünoterapinin KKKAV enfeksiyonları sonrasında kullanımının bazı klinik faydalar gösterebildiği ifade edilmektedir. Farelerde yapılan aşı çalışmaları, antikorların KKKAV enfeksiyonunu önlemede önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Buttigieg ve ark., 2014 ve Dowall ve ark., 2016).

Donörlerden alınan nekahat serumu bazı KKKA vakalarında kullanılmış ve özellikle intravenöz infüzyon yoluyla, daha erken zamanda başlanan ve daha uzun süre boyunca ve 200 mL'den büyük hacimlerde uygulanmasının klinik süreçte katkısının olabileceği bildirilmiştir (Keshtkar-Jahromi ve ark., 2011). Donörlerin plazma havuzundan elde edilen spesifik insan immünoglobulininin (KKKA-Venin),

Bulgaristan’da yedi KKKAV hastasında test edilerek iyi terapötik etkiler gösterdikleri bildirilmiştir (Vassilenko ve ark., 1990). Bununla birlikte, iyileşen hasta serumlarının etkinliği, geniş örneklem grupları ile yapılan randomize kontrollü klinik çalışmalarda değerlendirilmemiştir. Bu nedenle şimdiye dek paylaşılan hiçbir çalışma, KKKAV’nın maruziyet sonrası profilaksisi veya tedavisi için spesifik immünoglobulinlerin etkinliğini kanıtlar düzeyinde değildir (Bertolotti-Ciarlet ve ark., 2005).

Sınırlı kaynaklar, bireysel farklılıklar ve kan ürünlerinin karmaşıklığı gibi faktörler, nekahat dönemindeki serumların geniş çapta benimsenmesini engelleyen önemli riskleri de beraberinde getirmektedir. Bu nedenle, nekahat dönemindeki hastalardan alınan serum veya immünoglobulin genellikle acil durumlarda kullanılabileceği bildirilmiştir (Dai ve ark., 2021).

1.1.6.8. KKKAV ve Aşı

Şu anda, KKKAV için tek aşı, yenidoğan fare beyinlerine adapte edilen virusun inaktive edilmiş bir preparasyonudur. Ancak bu aşı yalnızca Bulgaristan’da kullanılmış ve risk altındaki diğer ülkelerde kullanımı onaylanmamıştır. Bu tip aşının ölçeklenebilirliği ve güvenlik endişeleri, muhtemelen bu aşının yaygın olarak kullanılmasını önleyecektir ve KKKAV için yeni aşı platformlarına ihtiyaç olduğu bildirilmektedir (Mousavi-Jazi ve ark., 2012 ve Papa ve ark., 2011;).

KKKAV aşıları geliştirmek ve bunları kliniğe getirmek için KKKAV araştırmacıları arasında uluslararası bir iş birliği başlatılmıştır (<http://www.cchfvaccine.eu/>) ve bu grup tarafından geliştirilen birkaç aşı, klinik öncesi denemelerde umut vaat etmektedir. KKKAV’nun glikoproteinlerini eksprese eden modifiye edilmiş vaksiniya virus aşısı farelerde letal KKKAV enfeksiyonuna karşı %100 koruma sağladığı araştırmacılar tarafından bildirilmektedir. Ayrıca DNA bazlı aşılama veya VLP (Virus Like Particle-Virus Benzeri Parçacık) aşılamanın da

ölümcül KKKAV tehdidine karşı koruma sağladığı bildirilmektedir (Buttigieg ve ark., 2014; Garrison ve ark., 2017 ve Hinkula ve ark., 2018).

Bir başka araştırmada, KKKAV glikoproteinlerini eksprese eden transgenik bitkilerle beslenen fareler, glikoproteinlere karşı antikorlar geliştirmiş olmasına rağmen bu platformun KKKAV tehdidine karşı etkinliğinin test edilmediği bildirilmiştir (Ghiasi ve ark., 2011). İlginç bir şekilde, glikoproteinleri içeren alt birim aşılar farelerde immünojenik olsalar da KKKAV tehdidine karşı koruyucu bağışıklık tepkilerini indüklemeyebildikleri bildirilmektedir (Rahpeyma ve ark., 2017). Formalin ile inaktive edilmiş bir KKKAV preparatının da farelerde KKKAV enfeksiyonuna karşı koruyucu olduğu da ifade edilmiştir (Canakoglu ve ark., 2015).

Glikoproteinlere ek olarak, KKKAV'nun S segmenti tarafından kodlanan nükleoproteini (NP) aşılar ya kendi başına ya da hem nükleoprotein hem de glikoproteinleri içeren kombinasyon platformlarında hedeflenmiştir. Özellikle, KKKAV'nun nükleoproteinini eksprese eden bir adenovirus ile aşılama, farelerde ölümcül KKKAV tehdidine karşı önemli bir koruma sağladığı ve nükleoproteine karşı yönlendirilen bağışıklık tepkilerinin glikoproteinlere verilen tepkilerden bağımsız olarak koruyucu olabileceğini göstermektedir (Hinkula ve ark., 2017 ve Zivcec ve ark., 2018).

KKKAV'nun nükleoproteinini eksprese eden modifiye edilmiş vaksiniya virusu kullanarak hazırlanan aşının immünojenik olmasına rağmen, ölümcül KKKAV tehdidine karşı koruma sağlamada başarısız olduğu ve nükleoprotein bazlı aşılarda sağladığı korumanın eksik olduğu bildirilmektedir. Ancak, daha farklı KKKAV suşları arasında bile, nükleoprotein, geniş ölçüde koruyucu bağışıklık tepkileri oluşturmak için aşı preparatlarına dahil edilmeye değer olabileceğini öne sürmektedir (Hawman ve ark., 2018).

Bir başka araştırmada, KKKAV'nun Nükleokapsid Proteini eksprese edildiği sırasıyla Bovine Herpesvirus Tip 4 (BoHV-4) ve insan adenovirus (Ad5) vektörleri kullanıldığı bildirilmektedir. Bu aşılarda IFN α /βR^{-/-} Fare Modellerinde ölümcül

KKKAV' karşı sırasıyla %75 ve %50 koruyuculuk sağlanmaları rapor edilmiştir (Farzani ve ark., 2019).

1.1.7. Monoklonal Antikorlar (mAb)

Antikorların 1962'de Gerald M. Edelman (1929-2014) ile birlikte Nobel fizyoloji Ödülü'nü alan İngiliz biyokimyacı Rodney Robert Porter (1917-1985) tarafından keşfedildiği bilinmektedir. Antikorlar, B tipi lenfositlerden kaynaklanan plazmositler tarafından salgılanan proteinler olarak bilinmektedir (Buss ve ark., 2012).

Laboratuvar koşullarında mAb'leri sentezlemek için ilk teknoloji Cambridge'den Georges Köhler ve Cesar Milstein tarafından geliştirilmiştir. Antikor üreten bir hücreyi bir tümör hücresiyle kaynaştırarak sınırsız bir antikor üretimine neden olduklarını bildirmişlerdir. Araştırmaları, üç sayfalık bir rapor şeklinde, 1975'te Nature'da yayınlandı ve bugüne kadar 10.000'e kadar atıf topladığı bilinmektedir. Önerilen teknoloji (hibridomların elde edilmesi) birkaç aşamayı içermektedir: laboratuvar farelerinin bilinen bir antijene karşı bağışıklanması, fare dalağından B lenfositlerinin çıkarılması (antikor üreten hücreler) ve bunların bilinen antijene karşı sürekli olarak antikor sentezleyebilen miyelom hücrelerine kaynaştırılması. Milstein ve Köhler, araştırmaları için 1984 yılında Nobel Fizyoloji/Tıp Ödülü'nü aldıkları bu teknikleri, hastalıkların teşhis ve tedavisinde kullanmak suretiyle çok büyük ekonomik değerlere sahip küresel bir biyoteknoloji endüstrisi yarattığı bildirilmektedir (Köhler ve Milstein, 1975 ve Sirbu ve ark., 2021).

Monoklonal antikorların ilk kez Philip Stashenko ve Lee Nadler tarafından 1979'da geliştirildiği bildirilmektedir. Bu antikorlar, lenfomalı insan deneklerde kanser hücrelerinin yüzeyindeki antijenlere karşı fare hücrelerinden yapay olarak sentezlendiği göstermektedir. Bununla birlikte, tümör antijenlerine bağlı az sayıda

murin antikoru, insan vücudu tarafından yabancı hücreler (antijenler) olarak da algılanmaktadır (Nadler ve ark., 1980;).

1986'da FDA, ilk terapötik mAb olan muromonab-CD3'ü onayladığı bilinmektedir. Bu antikor, seçici immünosupresif etkiler yoluyla böbrek nakli reddini azalttığı bildirilmektedir. Bununla birlikte, murin mAb'lerinin uzun süreli kullanımından sonra, insan anti-murin antikorlarının (HAMA) gelişmesiyle etkinlikleri büyük ölçüde azaldığı araştırmacılar tarafından bildirilmektedir (Cai, 2018).

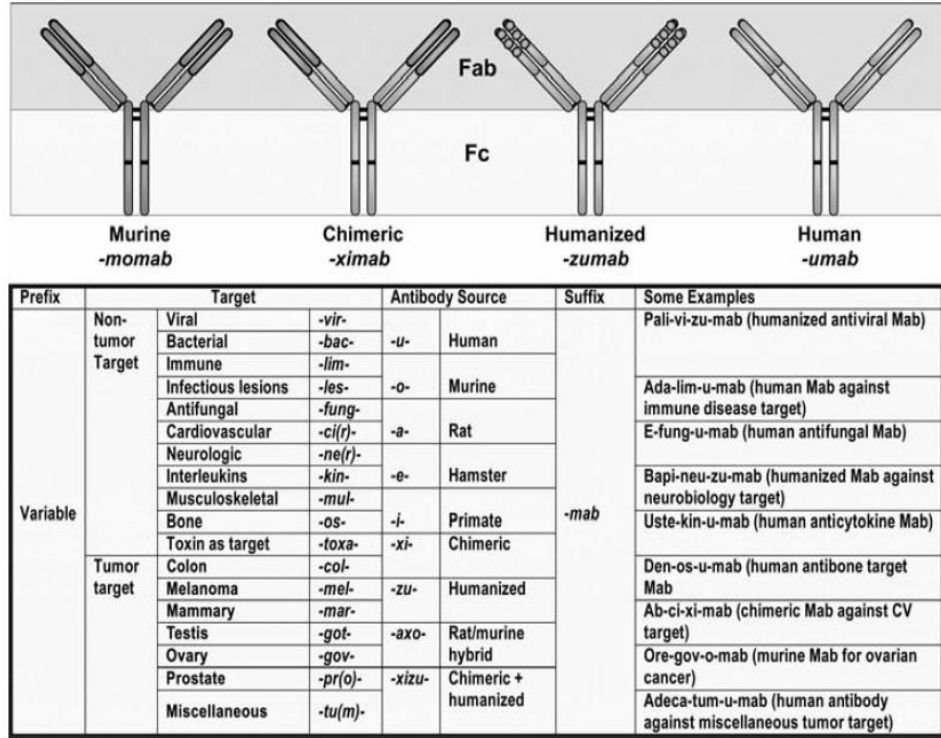
İkinci nesil biyolojik tedaviler 1990'ların başında, değişken murin bölgeleri ve sabit insan bölgelerini taşıyan kimerik mAb'ların sentezlendiği bilinmektedir (Morrison ve ark., 1984).

1990'ların sonlarında ise insanlaştırılmış antikorlara dayalı üçüncü nesil biyolojik tedaviler ortaya çıktığı bildirilmektedir. Böylelikle mAb'lerdeki murin amino asit dizilerinin yüzdesindeki azalma, insan vücudundaki immünojenisitelerini daha da azaltmaktadır (Boulianne ve ark., 1984).

Genetik mühendisliğinde devam eden gelişmeler ve transgenik fare teknolojisinin gelişimi ile 2000 yılında insan mAb'leri elde edildiği bildirilmektedir. Bu antikorların özgüllük, seçicilik, homojenlik, düşük toksisite ve büyük miktarlarda üretim kolaylığı gibi birçok avantajı beraberinde getirmektedir. Bununla birlikte, yüksek moleküler ağırlıkları, dokulara derinlemesine nüfuz edememeleri ve plazma zarından düşük geçirgenlikleri ile bu antikorların kullanımlarının sınırlandığı bildirilmektedir (Chames ve ark., 2009 ve Scott, 2007).

Terapötik değeri onaylanmış veya klinik çalışmalarda test edilen çok sayıda mAb için Ekim 2008'de Dünya Sağlık Örgütü tarafından birleşik bir terminolojinin hazırlanmasına karar verilmiştir. Bu terminoloji, antikorum etki ettiği hedefi ve antikorum kaynağını dikkate almaktadır. Ancak, 'Monoklonal antikor'un kısaltması

olan yaygın bir sonek ile mab ve adın benzersizliğini veren bir önek vardır (Lai ve ark., 2017 ve Sirbu ve ark., 2021). İsimlendirmeye ilişkin geçerli güncel yaklaşım Şekil 1.4.'de sunulmuştur.



Şekil 1.4. Murin, kimerik, insanlaştırılmış ve tamamen insan antikorları dahil olmak üzere pazarlama için onaylanmış farklı terapötik monoklonal antikor biçimleri ve ayrıca yapı, kaynak ve hedefe göre jenerik adların her birine uygulaması (Dimitrov ve Marks, 2008).

1.1.7.1. Antikorların Bağışıklık Tepkisindeki Rolü

Bağışıklık sistemi iki kısımda ele alınabilmektedir. Doğuştan gelen bağışıklıkta çeşitli fiziksel ve biyokimyasal engeller ve yabancı organizma veya moleküle spesifik olmayan yanıt veren hücreler aracılık etmektedir. Doğal bağışıklık, aynı yabancı maddeye tekrar maruz kalındığında benzer bir tepki ile karakterizedir. Bağışıklık sisteminin ikinci kısmı olan adaptif bağışıklık, lenfositler olarak adlandırılan hücreler tarafından düzenlenir ve aynı yabancı maddeye yeniden maruz kalındığında daha gelişmiş bir verimlilik ile karakterizedir. Bu sistemde antikorlar

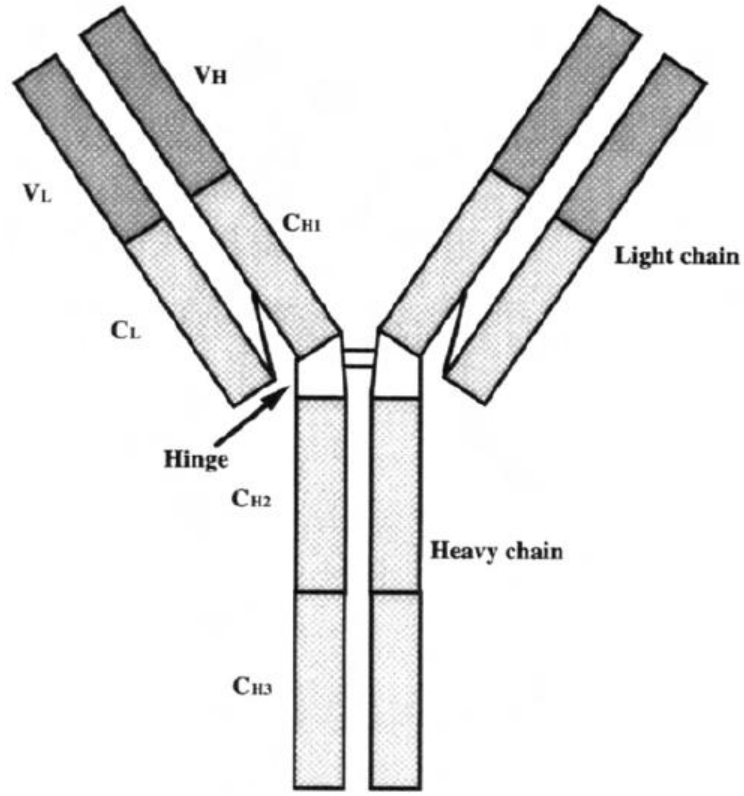
önemli bir rol oynamaktadırlar. Adaptif immün yanıtta iki ana tip lenfosit rol oynamaktadır, T lenfositleri ve B lenfositleri. T lenfositler, sitotoksik T lenfositler ve ‘yardımcı’ T lenfositler (helper) olarak alt bölümlere ayrılabilir. Sitotoksik T lenfositler, bir yüzey antijen reseptörü, T hücre reseptörü aracılığıyla yabancı veya enfekte olmuş hücrelere bağlanarak onları lize etmektedir. Yardımcı T lenfositleri hem T hem de B lenfositlerinin yanıtını kontrol etmede düzenleyici bir rol oynamaktadır. B lenfositleri etkilerini yabancı maddeye bağlanan ve eliminasyonu için spesifik mekanizmalar başlatan antikor molekülleri üreterek göstermektedirler. Antijen, hücre yüzeyindeki antikor moleküllerinin kullanımı yoluyla B lenfositleri tarafından tanımlanmaktadır. Her bir B lenfosit, rastgele, antijenden bağımsız bir süreçte gelişimi sırasında tek tek hücre tarafından immünoglobulin genlerinin yeniden düzenlenmesinin bir sonucu olarak yüzeyinde tek bir özgüllük ile antikor molekülleri taşımaktadır. Her birey aynı anda milyonlarca B hücresine sahip olacak ve böylece bir "poliklonal" popülasyon oluşacağı bilinmektedir. Bir antijen vücuda girdiğinde, antijen üzerinde bulunan antijenik belirleyicilere (epitoplar) bağlanabilen antikor moleküllerine sahip herhangi bir B hücresi tarafından tanınmaktadır. Bu tanıma, çoğalma ve farklılaşmaya yol açan hücrenin aktivasyonuna yol açmaktadır (Grosio ve ark., 2022 ve Rajewsky, 1996).

Protein antijenleri söz konusu olduğunda, bağlı antijen molekülleri B hücresine içselleştirilir ve peptitlere indirgenir. Bu antijen peptitlerinin bazıları daha sonra hücre yüzeyine taşınan ve B hücresi tarafından "sunulan" bir kompleks oluşturmak için major histocompatibility complex (MHC) sınıf II moleküllerine bağlanır ve B hücresi tarafından ‘presente’ olduğu bildirilmektedir. B hücreleri, dendritik hücreler gibi diğer hücre tiplerine kıyasla antijen sunumunda nispeten zayıf olmasına rağmen, bu kompleksler T lenfositlerinde bulunan reseptörler, T hücresi reseptörleri tarafından tanınabilmektedir. Uygun tanıma gerçekleşirse, T hücresi, çoğalmayı ve farklılaşmayı uyarmak için B hücresine sinyaller şeklinde ‘yardım’ sağlayabilmektedir. Dolayısıyla bu süreç, bir ‘T-hücresine bağımlı B hücre yanıtı’na yol açtığı bildirilmektedir (Marshal ve ark., 2018 ve Rajewsky, 1996;).

Proliferasyon, orijinal aktif B hücresi ile aynı spesifikliğe sahip büyük miktarlarda çözünür antikör salgılayabilen plazma hücrelerini veya yeniden antijen maruziyet üzerine hızlandırılmış bir bağışıklık tepkisi oluşturan hafıza hücrelerini oluşturmak üzere farklılaşabilen özdeş hücrelerin bir klonu ile sonuçlanmaktadır. Bellek hücresi aracılı ‘ikincil’ yanıt, immünoglobulin gen lokuslarındaki hipermutasyona bağlı olarak daha yüksek afiniteli antikorların üretilmesi ve ardından afinite olgunlaşması olarak bilinen bir süreç olan antijen güdümlü seçim ile sonuçlanmaktadır (Rajewsky, 1996 ve Warrington ve ark., 2011).

1.1.7.2. Antikorların Yapısı ve İşlevi

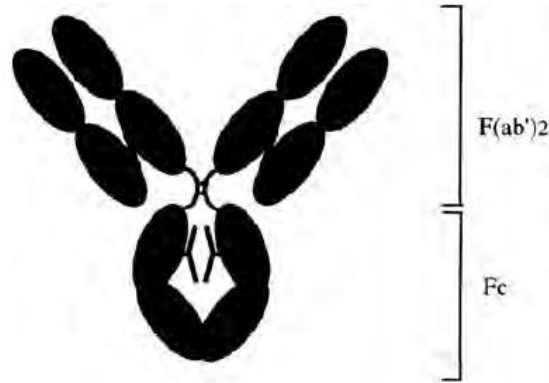
Antikör moleküllerinin, birincisi antijene bağlanmak ve ikincisi vücuttan atılmasını tetiklemek olmak üzere iki temel işlevi vardır. Bu nedenle antikorlar hem antijen molekülüne bağlanma yeteneğine hem de daha sonra yabancı maddeyi elemine edebilen efektör sistemin moleküllerini bağlama ve harekete geçirme yeteneğine sahip olan 'adaptör' moleküllerdir. Ancak her durumda antikör aynı efektör sistemleri tetikleyebilmelidir. Bunu başarmak için antikör molekülü, çok çeşitli farklı antijenlere bağlanma spesifisitelerinin geliştirilmesine uyum sağlamak için protein dizilimi ve yapısında değişiklik gösteren değişken bölgeler ve her antikorda büyük ölçüde aynı olan sabit bölgeler geliştirdiği bildirilmektedir. Sabit bölgeler, molekülün ortak yapısını korur ve fagositozu aktive etmek için makrofajlar üzerindeki Fc reseptörlerine kompleman bağlanması gibi efektör sistemlerle etkileşime izin verdiği gösterilmektedir. Antikör molekülleri ayrıca immünoglobulinler olarak da bilinmektedir. Ancak ‘İmmünoglobulin’ terimi, molekülün bağlanma özgülüğü karakterize edilsin veya edilmesin antikör proteini için geçerlidir, oysa antikör terimi antijene özgü bir immünoglobulin olduğunu ifade etmektedir. Pratikte bu iki terim genellikle birbirinin yerine kullanılmaktadır (Harris ve ark., 1997 ve Padlan, 1994).



Şekil 1.5. Bir IgG molekülünün protein zincirlerinin organizasyonunun gösterimi.

Daha yüksek memeliler, IgG, IgM, IgA, IgE ve IgD olarak adlandırılan beş immünoglobulin sınıfına (izotip) sahiptirler. Antikorların çoğu uygulamasında kullanılan bunlardan en bol olanı, ikincil bağışıklık tepkisi (secondary immune response) tarafından üretilen ana antikor sınıfı olan IgG sınıfı olarak bilinmektedir. IgG molekülü, yaklaşık 50 kDa'lık iki ağır zincir ve yaklaşık 25 kDa'lık iki hafif zincir olmak üzere dört polipeptit zincirinden oluşmaktadır (Şekil 1.5). Bunların her biri, bir iç disülfid bağı ile stabilize edilmiş yaklaşık 110 amino asitlik ayrı ayrı katlanmış yapısal alanlara bölündüğü bildirilmektedir. Bunlar, alanların birbirine göre hareketine izin veren nispeten esnek protein zincirinin kısa bölgeleriyle birbirine bağlanmaktadır. Her hafif zincir, bir değişken alan (VL) ve bir sabit alan (CL) ve her ağır zincir bir değişken alan (VH) ve üç sabit alan (CH1, CH2 ve CH3) içermektedir. Ağır ve hafif zincir değişken alanları, antijen bağlama bölgesini oluşturmak üzere birleşmesi bildirilmektedir. Ağır ve hafif zincirler, CL ve CH1 alanları arasındaki bir disülfid bağı ile bağlanmaktadır. Mentşe (hinge) olarak bilinen esnek bir bölge, her bir ağır zincirin CH1 ve CH2 alanlarını birbirine bağlar

ve bu noktada iki ağır zincir, disülfid bağları ile bağlanmaktadır. CH2 alanı normal olarak glikosile edilir ve her bir ağır zincirin CH3 alanları, kovalent olmayan etkileşimlerle birbirleriyle birleşmeleri bildirilmektedir. Antikorların yapısı ve işlevi üzerine yapılan çok erken çalışmalar, antikor proteininin proteolizini kapsamlı bir şekilde kullandı ve bu, antikorun farklı bölgeleri için yaygın olarak kullanılan terminolojiye yol açmaktadır (Şekil 1.6). Antikor menteşesinin etrafındaki alan, sıkıca katlanmış alanlara göre proteolize daha duyarlıdır ve bu nedenle bu, proteolitik bölünmenin genellikle gerçekleştiği nokta olduğu bilinmektedir. Menteşe bölgesindeki disülfid bağlarının üzerindeki proteoliz, ağır zincirin N-terminal iki alanı ile hafif zincir içeren monovalent Fab (fragman antijen bağlama) fragmanları ile sonuçlanmaktadır (Padlan, 1994; Poljak ve ark., 1973 ve Warington ve ark., 2011).



Şekil.1.6. IgG'nin antijen bağlayıcı F(ab')2 bölgesini ve CH2 alanına eklenmiş karbonhidratlı Fc bölgesini gösteren alan yapısı.

Fab fragmanı böylece bir fonksiyonel antijen bağlama bölgesi içermektedir. Bir veya daha fazla menteşenin hemen altında proteoliz disülfid bağları, iki değerli F(ab)2 fragmanı ile sonuçlanmaktadır. CH2 ve CH3 alanları birlikte efektör moleküllerin bağlanması için yerleri içeren Fc fragmanını (parça kristalli) oluşturmaktadır. Bozulmamış IgG molekülünün esnekliği kristalleşmeyi engellediğinden, bu fragmanlar antikor yapısının kristalografik belirlemeleri için yakın zamana kadar başlangıç noktaları olarak bildirilmektedir. Bu nedenle, literatürde Fab fragmanları için 50'den fazla yapı ve menteşe bölgeleri silinmiş

immünoglobulin yapıları bulunurken, bozulmamış bir IgG'nin yalnızca bir tam olarak tanımlanmış yapısı olduğu bildirilmektedir (Harris ve ark., 1997; Marshal ve ark., 2018 ve Warington ve ark., 2011).

1.1.7.3. Monoklonal Antikorların Üretilmesi ve Hibridoma Teknolojisi

MAB'lerin üretimi için geleneksel olarak kullanılan teknikler, Kohler ve Milstein(1975)'in orijinal raporuna dayanmaktadır. Hibridoma teknolojisi olarak bilinen bu teknolojinin, örneğin proteinler, nükleik asitler, karbonhidratlar ve haptenler gibi çok çeşitli farklı antijenlere önceden belirlenmiş spesifikliğe sahip kemirgen antikorları üretebildiği kanıtlanmıştır. Her bir B hücresi, tek bir spesifikliğe sahip antikor ürettiğinden, tek bir spesifikliğe sahip antikorların üretimi, ayrı B hücrelerinin izolasyonunu gerektirmektedir. Bununla birlikte, B hücreleri kültürde normal olarak büyüme yeteneğine sahip değildir ve bu nedenle doğrudan B hücrelerinden MAB'lerin üretilmesi mümkün değildir. Hibridoma teknolojisi, potansiyel olarak sınırsız miktarlarda üretilen, tek bir monoklonal antikor salgılayan B hücrelerinden hibrit hücre hatlarının üretilmesine izin vermektedir. MAB'lerin hibridoma teknolojisi ile üretilmesine yönelik genel şema, (Şekil 1.4'de) gösterilmektedir. Fareler, bir MAB'nin gerekli olduğu antijenin enjeksiyonu ile bağışıklanır. Rat'lar da MAB'ler oluşturmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Yapılan literatür denemesinde bazı durumlarda (özellikle fare antijenlerine karşı antikorlar gerekli olduğunda) hamsterler (Houlden ve ark., 1991), tavuklar (Nishinaka ve ark., 1991) tavşanlar (Speiker-Polet ve ark., 1995) ve diğer türlerin bu amaçla kullanıldığı görülmektedir. Bir bağışıklık tepkisi yükseldiğinde, B hücreleri kemirgenden, genellikle dalaktan hasat edilir ve bunlar hücre zarlarının füzyonunu teşvik eden kimyasallar (örneğin polietilen glikol gibi) ile muamele edilmesiyle miyelom hücreleri ile kaynaştırılır. Miyelom hücreleri, bir B hücre tümörünün mutant hücre dizisinden türetilir ve herhangi bir immünoglobulin salgılamayan ve esasen ölümsüz olan ve kültürde kolaylıkla büyütülebilen hücreler olarak tanımlanabilir. Füzyon, ölümsüzleştirilmiş hibrit hücrelerin veya hibridomların üretilmesiyle sonuçlanmaktadır. İşlemin geri kalanı, B hücresinin antikor üretme

yeteneğini ve miyelom hücresinin iyi büyüme özelliklerini koruyan hibridoma hücrelerinin izolasyonu ve çoğalmasından biri olarak bildirilmektedir. Hibridoma üretim süreci bu nedenle üç kısımda: bağışıklama, füzyon ve gerekli hibridomun seçimi olarak düşünülmektedir (Donohoe ve ark., 1995; Harlow ve Lane, 1988 ve Parray ve ark., 2020).

Bir bağışıklık yanıtı oluşturmak için hayvanın bağışıklanması kilit öneme sahiptir. Farklı moleküler tiplerde immünojenler kullanılabilir ve gerekli özgünlükte bir MAb salgılayan bir hibridom daha sonra seçilebileceğinden, bunların saf maddeler olmaları gerekmez. Farklı moleküller, immünojenisitelerinde büyük farklılıklar gösterir ve bu nedenle optimal bir yanıt için farklı immünizasyon protokolleri gerektirmektedir. Antijenin formu, bağışıklamaların sayısı ve yolu, taşıyıcı, adjuvan ve kullanılan hayvanın türü ve suşu gibi faktörlerin dikkate alınması gerekmektedir. MAb'nin bağlanması istenen molekülün konformasyonunu dikkate almak önemlidir. Kullanılabilecek immünojenlerin iki önemli istisnası vardır. Antikorların normalde "kendi" antijenlerine cevap oluşturamadığı ve küçük antijenlerin (moleküler ağırlık olarak yaklaşık 1000'den az), yüksek moleküler ağırlıklı bir taşıyıcı proteine konjuge edilmedikçe bir yanıt oluşturmadıkları bilinmektedir. Bu amaçla, kemirgenlerde çok immünojenik olan, kolayca elde edilebilen ve küçük moleküllere kolayca konjuge olan sığır serum albümini veya keyhole limpet hemosiyanin (KLH) gibi proteinler kullanılmaktadır. T hücreleri, MHC sınıf II molekülleri tarafından sunulan antijenin proteolitik olarak üretilmiş peptitlerine tepki verir ve bu nedenle genel olarak kendi kendine olmayan proteinler ve glikoproteinler, çoklu bağışıklamalardan sonra yüksek afinite tepkileri ortaya çıkarmaktadır. Protein olmadan, karbonhidratlar ve diğer proteinli olmayan materyaller, çok az bellek veya sınıf değiştirme ile yalnızca T hücresinden bağımsız bir yanıt ortaya çıkarmaktadır. Üretilen antikor tipi ayrıca bağışıklama sayısına da bağlı olduğu bilinmektedir. IgM gerekliyse, bir birincil yanıt gerektiği için yalnızca bir bağışıklama gerçekleştirilir, oysa IgG antikorları, etkili bir ikincil yanıtı izin vermek için yaklaşık 3-4 haftalık aralıklarla birden fazla enjeksiyon (genellikle üç veya dört) gerektiği bildirilmektedir. Freund adjuvanı gibi adjuvanlar genellikle birincil bağışıklamalar için, intraperitoneal, intradermal, intramusküler veya

subcutaneous yolla enjekte edilen çözünür antijenlere karşı bir bağışıklık yanıtının oluşturulmasına yardımcı olmak için yaygın olarak kullanılmaktadır (Harlow ve Lane, 1988; Pad-dock ve ark., 1994 ve Parray ve ark., 2020).

Adjuvanlar genellikle, hayvana enjekte edilen çözünür antijen ile karıştırılan ve yavaş yavaş salınan ve böylece yanıtı sürekli olarak artıran uzun süreli bir yerel antijen "deposu" sağlayan kolloidal veya yağlardır. Ek olarak, bağışıklık sistemini spesifik olmayan şekilde aktive etmek için adjuvan karışımı bazen diğer bileşenler de dahil edilmektedir. Örneğin, complete Freund's adjuvant, aktivasyon için öldürülmüş mikobakterilerin yanı sıra yağ ve bir emülsifiye edici ajan içermektedir. Complete Freund's adjuvant, ilk bağışıklama için kullanılır ve sonraki destekleyici bağışıklamalar, antijene yanıtı en üst düzeye çıkarmak ve mikobakterilere karşı aşırı enflamatuvar yanıtlardan kaçınmak için incomplete Freund's adjuvant (mikobakteri içermeyen) ile gerçekleştirilmektedir. Çözünmeyen antijenler, kendi başlarına çözünmeyen "depolar" oluşturduklarından, genellikle adjuvansız kullanılabilir oldukları bildirilmektedir. Genetik bağışıklama, yakın zamanda, ilgilenilen bir proteini kodlayan DNA ile bağışıklamaya olanak sağlamak için geliştirilmiştir. DNA, fare dokusu tarafından DNA'dan protein ekspresyonuna izin veren bir biçimde doğrudan fare dokusuna enjekte edilmektedir. Daha sonra, MAb'lerin üretilmesine izin veren proteine karşı bir bağışıklık tepkisi üretilmektedir. Bu yaklaşım, proteinin doğrudan immünizasyona izin verecek şekilde üretilmesi veya yeterince saflaştırılması zor olduğunda özellikle faydalı olabilir. Ek olarak, yüksek oranda immünojenik bir diziye sahip füzyon proteinleri üreterek zayıf immünojenik proteinlere karşı bağışıklık tepkisini artırmak mümkün olabildiği gösterilmektedir (Pad-dock ve ark., 1994).

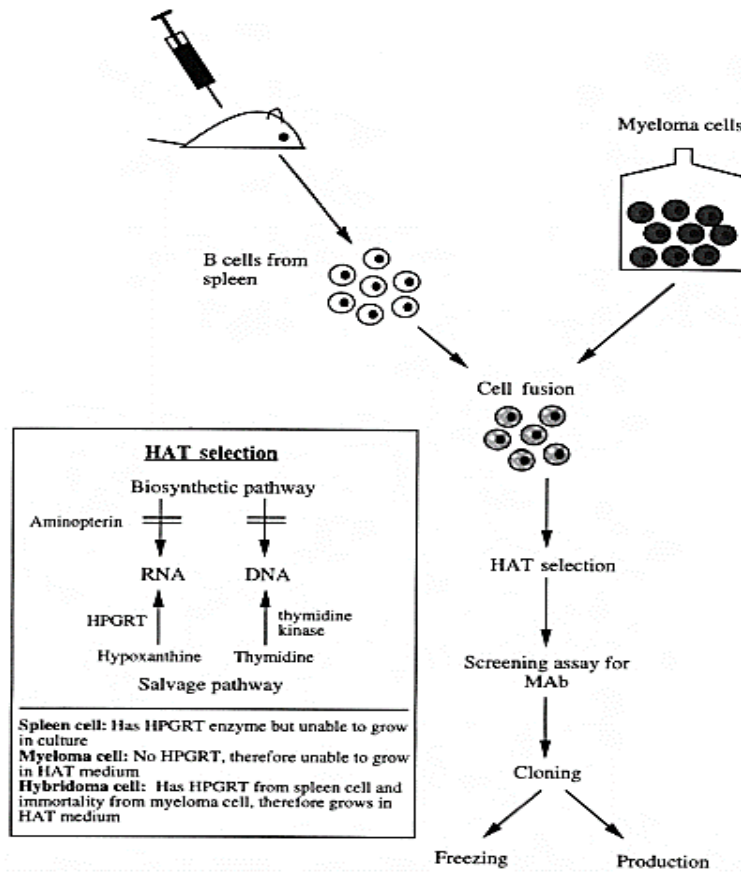
B hücreleri toplanmadan önce antijene bir bağışıklık yanıtının oluşturduğundan emin olmak için, bağışıklaştırılmış hayvanlardan kan örnekleri alınabilir ve spesifik antikörlerin varlığı için test edilebilir. Eğer pozitifse, çözünebilir antijenin nihai takviyeleri, hasattan önce dalakta bulunan bağışıklık B hücrelerinin sayısını artırmak için genellikle damar içi yoldan yapılır. Dalak, bağışıklık B hücrelerinin en yaygın kaynağıdır, ancak hücreler lenf düğümlerinden de toplanabilir.

Füzyon amaçları için farelerden ve ratlardan elde edilen çeşitli miyelom hücre hatlarının mevcut olduğu bilinmektedir. Bu hatlar, antikör üreten B hücrelerinin tümörlerinden türetildiği için, kendi antikörlerini üretmeyen bir hat seçmeye çalışmak önemlidir. Ortaya çıkan hibridoma iki tip hafif ve ağır zincir üretirse, bunlar muhtemelen rastgele birleşerek orijinal miyelom antikörünü, istenen MAb'yi ve iki tip ağır ve hafif zincirin çeşitli karışık kombinasyonlarını içeren üretilen antikör moleküllerinin bir karışımı ile sonuçlanacaktır. Bu karışım, bispesifik antikörlerin üretimi için avantajlı olmasına karşın bir MAb'nin ilk izolasyonunun verimliliğini azaltacak ve MAb'nin arzu edilen düzeyde saflaştırılmasını zorlaştıracaktır. Miyelom hücrelerinin bir başka gereksinimi, hipoksantin fosforibosiltransferaz enziminde eksik olmaları ve kaynaşmış hibridom hücresinin ana miyelom hücresi üzerinden seçilmesine izin veresidir (Pad-dock ve ark., 1994 ve Smith ve Crowe, 2015).

Miyelom hücrelerinin ve hasat edilen B hücrelerinin füzyonu, genellikle membran füzyonunu indüklemek için ajan olarak polietilen glikol (PEG) kullanılarak gerçekleştirilir. PEG füzyonu basit, ucuz ve güvenilir bir şekilde elde edilir ve bu nedenle en yaygın yöntem haline geldiği bildirilmektedir. Başlangıçta sadece hücre zarları birleşir ve hücrede iki çekirdek bulunmaktadır. Nükleer füzyon, mitoz sırasında gerçekleşmektedir. Bir hibridoma hücresinin sonraki nesillerinde zaman zaman bazı kromozomların kaybı görülebilmektedir. Füzyondan sonra hibridoma hücreleri, dalak hücreleri ve miyelom hücrelerinin bir karışımı bulunur ve işlemin bir sonraki aşaması hibridoma hücrelerinin diğer hücre tiplerine göre seçilmesidir. Dalak hücreleri kültürde büyümeyecektir ve bu nedenle hücre karışımının birkaç gün büyümesi, kalan dalak hücrelerini kolayca uzaklaştıracaktır. Miyeloma hücreleri ise hızla büyüyecek ve herhangi bir hibridoma hücresinin izolasyonunu çok zorlaştıracaktır.

Miyeloma hücreleri, hypoxanthinephosphoribosyltransferase enzimi (HPRT) eksik olduğundan ve dolayısıyla RNA sentezi için kurtarma yolunu kullanamayan füzyon için kullanılmaktadır ve seçim daha sonra HAT ortamı kullanılarak gerçekleştirilir. (Şekil1.7). HAT ortamı hipoksantin (H), aminopterin (A) ve timidin

(T) içermektedir. Aminopterin, RNA ve DNA sentezinin etkili bir inhibitörüdür ve bu nedenle miyeloma hücrelerinin büyümesini engellediği bildirilmektedir. Bununla birlikte, dalak hücrelerinden HPRT enzimine sahip olan hibrit hücreler, eklenen hipoksantin ve timidin'i kurtarma yoluyla RNA üretmek ve canlandırmak için kullanabilecekleri bildirmektedir (Pad-dock ve ark., 1994; Tomita ve Tsumoto, 2011 ve Smith ve Crowe, 2015).



Şekil 1.7. Hibridoma teknolojisi ile monoklonal antikor üretimi.

HAT ortamında seçimden sonra, hibrit hücreler üzerinde büyütülür ve hangi hücre kolonilerinin ilgili antikorları ürettiğini belirlemek için test edilir. Hibrid oluşturan dalak hücrelerinin tümü B hücresi değildir ve böylece hiç antikor üretmeyen bazı hibridler ve ayrıca ilgilenilmeyen antikorları üreten birçok hücre mevcut olacaktır. Bu nedenle önemli bir adım, hücre klonlarının taranmasıdır. Bu

konu ile ilgili gerekli MAb'leri üretenleri belirlemek gerekmektedir. Daha fazla kültür için gerekli olanların seçimine izin vermek için çok sayıda klonun hızlı bir şekilde taranması gerekebilir. Bu nedenle uygun bir tarama tahlili hızlı olmalı, birçok numuneyi tarayabilmeli ve erken hücre klonları tarafından üretilen az miktarda antikorla sonuç verebilmelidir. Antijen bağlama özelliklerini ölçmek için birçok serolojik yöntem; ELISA (enzime bağlı immünosorbent tahlili), radyoimmünoassay, dot blot ve western blot, immünohistokimya ve immünofloresan kullanılabilmektedir. Ek olarak, izotip gibi diğer özelliklerin veya komplement aktivasyonu veya ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity)'yi belirleme yeteneği gibi spesifik fonksiyonel özelliklerin taranmasının istenebildiği bildirilmektedir (Awsuik ve ark., 2019; Pad-dock et al., 1994 ve Tomita ve ark., Tsong, 1990).

Uygun hibridomalar tanımlandıktan sonra, stabil, homojen bir hücre kolonisi sağlamak ve antikorun gerçekten monoklonal olduğundan emin olmak için bunlar birkaç kez klonlanmalıdır. Bunu yapmak için tek bir hücreden bir koloninin büyümesini gerektirir. Bu, kültür plakasının her kuyucuğunun bir hücre taşıyacak şekilde, hücrelerin alt kültürlenmesiyle elde edildiği bildirilmektedir. Alternatif olarak klonlamanın, hücrelerin yarı katı agar içinde kaplanması veya tek hücre manipülasyon teknikleri ile gerçekleştirildiği bilinmektedir. Klonlandıktan sonra hibridoma hücresi büyük miktarlarda antikor üretimi için kullanılmaya hazırdır, ancak değerli hibridomların kaybolmaması için hücre örneklerinin her aşamada sıvı nitrojen içinde dondurularak korunmasını sağlamak önemlidir (Awsuik ve ark., 2019; Pad-dock ve ark., 1994; Paray ve ark., 2020 ve Tomita ve ark., 1990).

Bu tez çalışmasında, KKKA virusüne karşı hybridoma teknolojisi kullanarak monoklonal antikorların üretimi amaçlanmaktadır. Böyle bir çalışma kapsamında herhangi bir viral epitopa hedeflenmiş (konformasyon bağımlı ya da bağımsız) antikorların elde edilebilmesi mümkündür. Ancak temel hedef öncelikli olarak nötralizan antikorların elde edilebilme potansiyelini sorgulamak ve bu ana hedef yanında çalışma kapsamında elde edilebilecek tüm antikorların ağırlıklı olarak tanısal kullanım olasılıkları yönünden sorgulamak da hedeflenmektedir.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Biyogüvenlik Bildirisi

Bulaşıcı KKKAV'u içeren tüm biyolojik prosedürler, anabilim dalı bünyesindeki Yüksek Güvenlikli Viral Zoonozlar Tanı, İleri Araştırma (BSL-3+) ve Hayvan Laboratuvarlarında (ABSL3) yürütüldü. Diğer işlemler BSL-2 koşulları altında gerçekleştirildi.

2.1.2. Deney Hayvanları

Tez çalışması kapsamında 10 adet 6-8 haftalık BALB/c fare kullanılmıştır. Hayvan çalışmalarına ilişkin izin, Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun (HADYEK) 21/02/2018 tarihli, Toplantı No: 2018-4, Dosya No: 2018-30 ve karar NO: 2018-4-32 sayılı etik kurul onayı ile verildi. Etik kurul karar örneği EKLER bölümünde sunuldu.

2.1.3. Araştırmada Kullanılan Hücreler

Çalışmada viruslerin çoğaltılması, enfektivitelerinin tespiti ve nötralizasyon testleri ile hibridomaların geliştirilmesi sırasında farklı devam hücre hatları ile primer hücreler kullanıldı. KKKAV üretilmesi ve virus proteinlerini ifade eden transforme hücre hatlarının oluşturulması amacıyla sırasıyla Vero-E6 ve BHK-21 hücreleri, hibridomaların elde edilmesi sırasında ise fare myeloma hücresi olan F0 hücresi kullanıldı. Bu hücreler viroloji anabilim dalı hücre koleksiyonundan temin edildi. Araştırmada primer olarak ise hibridoma hazırlanması aşamasında fare dalaklarından

elde edilen lenfosit hücreleri ile besleyici (Mouse feeder cells) özellikleri sebebiyle fare periton boşluğundan elde edilen makrofaj hücreleri kullanıldı (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Araştırma kapsamında kullanılan hücre hatlarına ilgili bilgiler.

Hücre Hattı	F0	BHK-21	Vero-E6
ATCC NO	CRL-1646	CCL-10	CRL-1586
Organizma	<i>Mus musculus</i> , (fare)	<i>Mesocricetus auratus</i> , (hamster)	<i>Cercopithecus aethiops</i> (maymun)
Hücre Tipi	B lymphoblast	fibroblast	epithelial
Strain	BALB/c	Syrian golden	aethiops
Hastalık	Plazmasitom, Miyelom	Normal	Normal

2.1.4. Virus

Çalışmada virus nötralizasyon ve monoklonal antikörlerin reaktivite profillerinin tespit edilmesi için tasarlanan biyotik ve abiyotik testlerde daha önce ana bilim dalımızda izole edilen lokal KKKAV Ank-2 izolatu (GenBank Erişim numarası: MK309333) kullanıldı.

2.1.5. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Freund's Complete, FCA (Sigma)
- Freund's Incomplete Adjuvantı, IFA (Sigma)
- Fetal Bovine Serum, FBS (Gibco)
- Gentamisin (Gibco)
- Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL) (Gibco)
- Kanamycin Sulfate (Gibco)
- Ampicillin (Gibco)

- Dulbeccus Modified Eagle Medium (high glucose), DMEM (Gibco)
- Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium (Gibco)
- Dimetil Sülfoksit, DMSO (Sigma)
- Hipoksantin aminopterin timidin, HAT (50x, sigma)
- Hipoksantin timidin, HT (50x, Sigma)
- Polietilen Glikon- PEG-1500 (Merck)
- Nonfat Dry Milk #9999 (Cell Signaling)
- Tween 20 (Sigma)
- Glycerol (Sigma)
- Povilion İode (Baticonol) %10, 1000 ml Batikon Tentürdiyot

2.1.6. Kullanılan Malzeme ve Aletler

- Hücre kültür pleytleri Greiner (Bio-one CELLSTAR® 6-12- 24-96 well)
- Hücre kültür şişeleri, 25-75-150cm² (Corning Cell Culture Flask)
- Cell Scraper, 30cm length, 20 mm width, Falcon® Cell Scraper
- Laminar air flow kabin
- CO₂ Inkübatör
- Invert Işık ve Floresan Mikroskop (Nikon Eklipse, Japonya)
- Hemacytometer, Fisher Scientific
- Syringe filters, 0.22µm, MILLEX
- Serolojik pipet
- Santrifüj, Sigma Centrifuge 1-14
- SDS-PAGE gel electrophoresis system, Bio-Rad Mini Protean
- Trans-Blot Turbo Transfer System, Bio-Rad
- Immun-Blot® Low Fluorescence PVDF/Filter Paper Sets #1620262
- Thermal Cycler - Biorad T100
- Thermo Scientific™ NanoDrop™ OneC Microvolume UV-Vis Spectrophotometer

- Dikiş iğnesi (Surgipro II Suture 6-0 Polypropylene P-13; sp: 5695)
- Cerrahi bantları ve gereken melzemeler

2.1.7. Kullanılan Kitler

- GeneJET Plasmid Maxiprep Kit (Katalog numarası: K0492)
- PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Katalog numarası: K220001)
- Rapid ELISA Mouse mAb Isotyping Kit (Thermo Scientific™)
- Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific™; 23225)
- WesternBright™ ECL HRP Substrate Kits (Advansta 490005-018)
- Melon Gel Monoklonal IgG Purification Kit (45214; Thermo Scientific)
- PRO-PREP Protein Extraction Solution, 100 ml (İntron:17081)
- Ultravision detection system Large Volume DAB Substrate system(Thermo Scientific; TA-125-HD)
- Large VolumAnti-polyvalent, HRP(RTU). (Thermo Scientific; TP-125-HL)
- Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent(Invitrogen)

2.1.8. Çalışmada Kullanılan Ekspresyon Vektörleri ve Bakteri Suşları

Klonlama basamağında pCDNA3.1/*myc-hisA* ve pET28a(+) plazmidi kullanıldı. Bakteriyel transformasyon amacıyla *E.coli DH5α* ve *E.coli BL21(DE3)* suşları seçilmiştir. Vektörlerin haritası Şekil 2.1. ve 2.2.'de gösterildi.

BL21(DE3)pLysS:

Genotype: F– *dcm ompT hsdS*(rB– mB–) *gal λ*(DE3)[pLysS Camr], Novagen

DH5α *Escherichia coli*

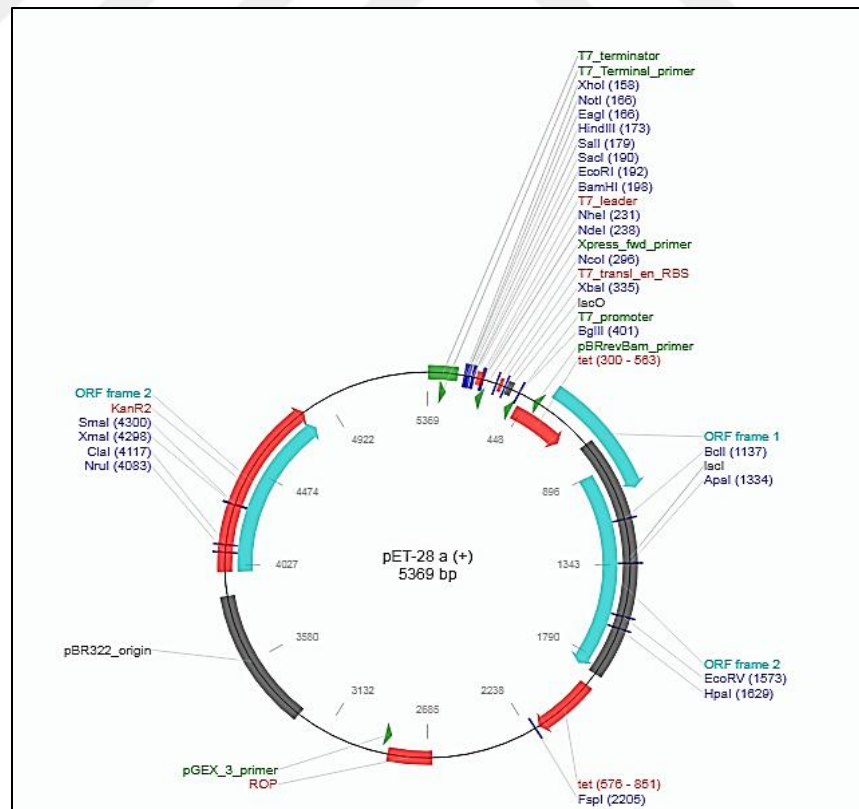
Genotype: F–, ϕ 80*dlacZ*_M15, *_(lacZYA-argF)*U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(rk, mk+), *phoA*, *supE44*, λ –, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*, (Invitrogen)

2.1.9. Bakteri Besiyerleri

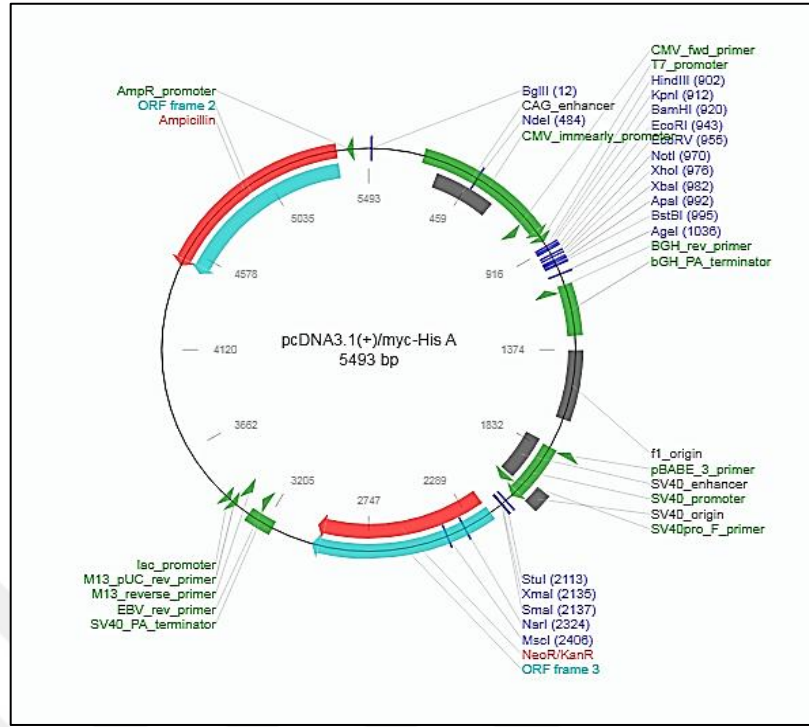
Bu tez çalışmasında klonlama ve plasmid hazırlama bölümünde besiyeri olarak Super Optimal Broth (SOC), Luria Bertani (LB) broth ve agar kullanıldı (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Bakteri besi yerlerinin hazırlanması.

LB broth		LB agar		SOC	
Yeast extract	5 g	Yeast extract	5g	Yeast extract	%2 (w/v)
Tryptone	10 g	Tryptone	10g	Tryptone	%0,5 (w/v)
NaCl	10 g	NaCl	10g	NaCl	10 mM
distile su	1 litre	distile su	1litre	KCl	2,5 mM
		Agar	20g	MgCl ₂	10 mM
				Glucose	20 mM



Şekil 2.1. Bu çalışmada kullanılan pET28a(+) plazmidinin genom haritası.



Şekil 2.2. Bu çalışmada kullanılan pcDNA2.1(+)/myc-His A plazmidinin genom haritası.

2.1.10. Çalışmada Kullanılan Enzimler

- FD-EcoRI ThermoScientific FD0275
- FD-XhoI ThermoScientific FD0694
- FD-Kpn I ThermoScientific FD0524
- Eco RV ThermoScientific FD0303
- T4 DNA ligaz ThermoScientific EL0014
- Taq DNA polimeraz ThermoScientific EP0061
- Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/μL; ThermoScientific F530L)

2.1.11. Çalışmada Kullanılan Antikorlar

- Anti-mouse IgG Antibody-HRP (Horse Radish Peroxidase), Pierce
- Anti-mouse IgG Antibody-Alexa 488, Invitrogen
- Primer antikor olarak hybridoma hücrelerinden üretilen monoklonal antikorlar.
- Immunhistokimya'da kullanılan antikorlar (kit olarak tamin edildi). Acu-Satin Mouse+Rabbit HRP Kit (Genemed Biotechnologies 54-0003C)

2.1.12. Çalışmada Kullanılan Tamponlar ve Solüsyonlar

2.1.12.1. Ni-NTA Affinite Purifikasyon Tamponu

- | | |
|---|----------|
| • Lizis Tamponu | 10 ml |
| • NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O | 78 mg |
| • NaCl | 175,4 mg |
| • Imidazole | 6,8 mg |

pH, NaOH ile 8,0'a ayarlandı.

Yıkama Tamponu (10 ml)

- | | |
|---|----------|
| • NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O | 78 mg |
| • NaCl | 175,4 mg |
| • Imidazole | 13,6 mg |

pH, NaOH ile 8,0'a ayarlandı.

Elusyon Tamponu (5 ml)

- | | |
|---|---------|
| • NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O | 39 mg |
| • NaCl | 87,7 mg |
| • Imidazole | 2,72 g |

pH, NaOH ile 8,0'a ayarlandı.

2.1.12.2. SDS-PAGE İçin Tamponlar

- **Akrilamid/Bis (30% T, 2.67% C)**

Akrilamid (29,2 g/100 ml) 87,60 g

N'N'-bis-methilen-akrilamid 2,40 g

Deyonize saf su (diH₂O) ile 300 ml tamamlandı. Filtreden geçirildi ve +4°C buzdolabında karanlık ortamda saklandı (30 gün kullanma süresi).

- **1.5 M Tris-HCl, pH 8,8 (150 ml)**

Tris base (18,15 g/100 ml) 27,23 g

Deyoniz saf su (diH₂O) 80 ml

6 N HCl HCl kullanarak pH 8,8'e ayarlandı ve deyonize saf su ile 150ml 'ye tamamlandı ve +4°C buzdolabında saklandı.

- **Sodyumdeodesil sülfat (SDS; %10 w/v) (100 ml)**

SDS 10,00 g

diH₂O 90 ml

Hafifçe karıştırarak eritildi ve deyonize saf su ile (diH₂O) 100 ml tamamlandı.

- **2× SDS-PAGE (Laemmli, 30 ml)**

0.5 M Tris-HCl, pH 6,8 3,75 ml

%50 Glycerol 15,0 ml

%1,0 Bromophenol blue 0,3 ml

%10 SDS 6,0 ml

diH₂O 30 ml tamamlandı

β -mercaptoethanol (950 μ l sample buffer için 50 μ l) kullanmadan önce taze olarak eklendi.

- **Amonyumpersülfat (APS; % 10 w/v) günlük taze hazırlanır**

Ammonium persulfate	0,10 g
diH ₂ O	1 ml

- **10× SDS-PAGE Tamponu (1 L)**

Tris base	30,30 g
Glycine	144,10 g
SDS	10,00 g
diH ₂ O	1 Litreye tamamlandı
pH'i (~pH 8,3) ayarlamaya gerek yoktur.	

- **Coomassie Jel Boyası (1 L)**

Coomassie Blue R-250	1,0gr
Methanol	450 ml
H ₂ O	450 ml
Glacial acetic acid	100 ml

- **Coomassie Jel Destain Solüsyonu (1 L)**

Methanol	100ml
Glacial acetic acid	100ml
H ₂ O	800ml

2.1.12.3. Western Blotlama İçin Tamponlar

- **Transfer Tamponu (150 ml)**

Tris	1,6 g
Glycine	0,9 g
Methanol	20 ml
%10 SDS	800 µl

- **Tris-Buffered Saline (TBS) (300ml)**

NaCl	2,4 g
KCl	0,06 g
Tris	0,9 g
pH	7,4 ayarlandı

- **Tris-Buffered Saline -Tween 20 (TTBS)**

Tween 20 (%0.05)	100 µl
TBS	180 ml

- **Bloklama Tamponu**

Non-fat dry milk (5 %)	2,5g
TBS	50 ml

- **Primer Antikor Solüsyonu**

Hybridoma supernatant	10 ml
-----------------------	-------

2.1.12.4. İmmunohistokimya İçin Kullanılan Tampon ve Malzemeler

Ksilen (Merk; 1.08297.2500)

EtOH (ISOLAB)

Sitrat Genemed Biotechnologies (Thermo Scientific 10-0062C 1X)

Hydrogen peroxide H₂O₂ %30 (Merck)

Methanol (ISOLAB)

Acu-Satin Mouse+Rabbit HRP Kit Genemed Biotechnologies 54-0003C

DAB (Thermo Scientific TA-125-HD)

Hematoksilen (Sigma1.05174.0500)

Primer Antikor (hybridoma supernatant)

Entellan (Merk; 1.07961.0100)

Formaldehit Solüsyonu, %37 (ISOLAB)

2.1.12.5. Çalışmada Kullanılan Primer Çiftleri

Araştırmada kullanılan primerlerin tamamı çalışma kapsamında CLCBio Main Workbench v7.0 yazılımı kullanılarak tasarlandı. Kullanılan dizinler Çizelge 2.3'te sunuldu.

Çizelge 2.3. Tez çalışmasında kullanılan primer dizileri.

Primer	Yö nü	Primer Dizinleri (5'→3')	Ürün Büyüklüğü (bp)
M (GPC)	F	TAATACGACTCACTATAGGG	5000
	R	TAGAAGGCACAGTCGAGG	
Gn	F	ATCATGCACACCCCTCTC	2840
	R	GTTGCTGCCGGTCTTTCT	
Gc	F	CCCCTGTTCTTGATTCT	1934
	R	GATGTGTGTCTTGGTGCT	
NC	F	<u>GAATTC</u> ATGGAAAACAAGATCGAGG	1500
	R	<u>CTCGAG</u> AGGAGGAGAAAAGCTGAA	

Kalın, italik ve altı çizili bölgeler restriksiyon enzimi tanıma sekanslarıdır.

2.2. Hücre Hatlarının Üretilmesi

Vero E6 hücre stoğu 37°C’de benmaride hızlıca çözündürüldükten sonra %10 FDS, 2mM glutamine, 100U/ml penisilin, 10mg/ml streptomisin ilave edilmiş olan Dulbecco’s Minimal Essential Medium (DMEM; Sigma, ABD) içinde üretildi. Hücreler, %80-90 kapladığında subkültürü yapıldı ve 37°C’de, %5 CO₂’li inkubatörde inkubasyona bırakıldı.

2.3. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virusunun Üretilmesi

Bu çalışmada KKKAV yerel suşu olan Ank-2’nin üretilmesi amacıyla Vero E6 hücre kültüründen yararlanıldı. Virus, 75 cm²’lik hücre kültürü şişesinde üretilen ve %80-90 kaplamış olan Vero E6 hücre kültürüne, içlerindeki hücre üretme vasatı döküldükten sonra, 0,1 çoklu enfeksiyonda (moi) KKKAV Ank-2 virusu inokule edildi. Virus inokule edilmiş hücre kültürü şişelerine, 37°C’lik inkubatörde 1 saat inkubasyona bırakıldı, şişe hacminin %5- 10’u oranında, %2 fetal dana serumu (FDS) içeren virus üretme vasatı (DMEM) konuldu. Hücre kültürleri 5-7 gün süre ile 37°C’de inkubasyona bırakılıp, her gün sitopatik değişiklikler yönünden invert ışık mikroskobu kullanarak kontrol edildi. Hücrelerin %90’ının parçalandığı 6’inci günde hücre kültür şişeleri -80°C dondurucuya kaldırıldı.

2.4. KKKAV Genomik RNA Ekstraksiyonu ve Reverz Transkripsiyon

Virus inokulasyonu yapılan hücrelerde en az %90 CPE görülmesinin ardından, kültür ortamı 3 kez dondurma/çözme işlemine tabi tutuldu. Son çözülme işlemi takiben 4°C’de, 4000 x g’de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant temiz bir tüpe aktarıldı ve toplam RNA ekstraksiyon için kullanıldı. RNA İzolasyonu için EZ-RNA total RNA izolasyon kiti (Biological Industries, ABD) kullanıldı. Diğer taraftan hücre dışı serbest virüslere ait genomik RNA kültür süpernatantlardan

QIAamp Viral RNA Mini Kiti (QIAGEN, Germantown, MD, USA) üreticisinin talimatlarına göre ekstrakte edildi.

RT işlemi için ticari kit kullanıldı (First Strand cDNA sentez kiti, Fermentas/ Thermo, Litvanya) ve üretici firma tarafından önerilen protokol uygulandı. Komplementer DNA sentezi sırasında hedeflenen genlere ait Çizelge 2.3'te sunulan primerler kullanıldı. Reaksiyonun ısı basamakları ve süreleri aşağıdaki sunuldu.

25°C'de 10 dakika

37°C'de 60 dakika

72°C'de 10 dakika

Elde edilen cDNA'lar, ifade plazmitlerinin hazırlanmasında yapılacak PCR reaksiyonları için kalıp DNA'lar olarak kullanıldı.

2.5. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Virusünün S (Nucleocapsit-NC) Segmentini Kodlayan İfade Plazmitinin Hazırlanması

Virusun N proteinini kodlayan genin amplifikasyonu amacıyla Çizelge 2.3'te verilen NC primerleri kullanıldı ve Phusion TaqPolimeraz (ThermoScientific) ile PCR analizi gerçekleştirildi (Çizelge 2.4).

Primer sekanslarının 5' uçlarına yerleştirilen ve Kalın, İtalik ve altı çizili olarak verilen diziler sırasıyla EcoRI ve XhoI restriksiyon enzimleri tanıma sekanslarıdır. pCDNA3.1/*myc-hisA* ökaryotik ifade vektörüne klonlaması için plazmit bu enzimlerle kesildi ve 1500 nükleotid uzunlukta çoğaltılan NC(Nucleokapsit) geni bu vektöre klonlandı. Bu konstraktın doğrulaması için restriksiyon kesimi fastdigest XhoI ile yapıp ve 6700 bp konstrakt jelde görüntülendi. Ayrıca pCDNA3.1 içinde koloni PCR yapılarak elde edilen DNA yapısı doğrulandı. Aynı klonlama işlemi pET-28a(+) vektörü üzerinde uygulandı pET-28a(+) -NC ve western blot için kullanıma hazır hale getirildi. Elde edilen ve doğrulanan nihai pcDNA+NC yüksek hacimde üretildi, saflaştırıldı ve endotoksin kontrolü yapılarak farelerin immünizasyonu için hazır hale getirildi.

Çizelge 2.4. S Segment çoğaltılması için PCR miks bileşenleri ve programı.

Bileşenler	Konsantrasyon	Isı Döngüsü
5 X Phusion HF buffer	4 µl	98 °C'de 30 s 98 °C'de 10 s 55 °C'de 15 s 72 °C'de 45 s 72 °C'de 10 dk 30 siklus
10 mM dNTP mix	1 µl	
Primer F (10 pmol/µl)	0,5 µl	
Primer R (10 pmol/µl)	0,5 µl	
Phusion DNA polymerase (2u/µl)	0,5 µl	
Nükleaz Free Su	10,5 µl	
Komplementer DNA	3 µl	
Toplam	20 µl	

Elde edilen PCR ürünleri pCDNA3.1/*myc-hisA* ve pET-28a(+) vektörünün sırasıyla FastDigest EcoRI (ThermoScientific, # FD0275) ve FastDigest XhoI (ThermoScientific, #FD0694) ile kesilip (Çizelge 2.5.ve 2.6.), T4 DNA ligaz enzimi ile (ThermoScientific, #EL0014) ligasyonları yapıldı (Çizelge 2.7 ve 2.8).

Çizelge 2.5. pCDNA3.1/*myc-hisA* vektörünün ve PCR ürünleri için kullanılan kesim protokolü.

Bileşen	Konsantrasyon (µl)	Isı derecesi ve zaman
Fastdigest 10X buffer	2 µl	37°C de 20 dk
XhoI fastdigest	1 µl	
EcoRI fastdigest	1 µl	
Nükleaz Free Su	14 µl	
DNA (PCR ürünü ya da vektör) (1µg)	2 µl	
Toplam	20 µl	

Çizelge 2.6. pET-28a(+) vektörünün ve PCR ürünleri için kullanılan kesim protokolü.

Bileşen	Konsantrasyon (µl)	Isı derecesi ve zaman
Fastdigest 10X buffer	2 µl	37°C de 20 dk
XhoI fastdigest	1 µl	
EcoRI fastdigest	1 µl	
Nükleaz Free Su	14 µl	
DNA (PCR ürünü ya da vektör) (1µg)	2 µl	
Toplam	20 µl	

Restriksiyon enzimleri ile kesim işlemi gerçekleştirildikten sonra hem insertler ve hem de vektör kit (Invitrogen™ PureLink™ Quick Gel Extraction Kit) yardımıyla elde edilen ürünler Çizelge 2.7. ve Çizelge 2.8.'de verilen reaksiyon karışımlarında ligasyona tabi tutuldu.

Çizelge 2.7. pCDNA3.1/myc-hisA vektör ve PCR ürünleri için kullanılan ligasyon protokolü.

Bileşen	Konsantrasyon (μl)	Isı derecesi ve zaman
10X T4 ligaz buffer	2μl	22°C de 1 saat
pCDNA3.1/myc-hisA	1μl	
PCR insert	3 μl	
Nükleaz Free Su	13 μl	
T4 ligaz enzimi	1μl	
Toplam	20 μl	

Çizelge 2.8. pET-28a(+)-vektör ve PCR ürünleri için kullanılan ligasyon protokolü.

Bileşen	Konsantrasyon (μl)	Isı derecesi ve zaman
10X T4 ligaz buffer	2μl	22°C de 1 saat
pET-28a(+)-vektör	1μl	
PCR insert	3 μl	
Nükleaz Free Su	13 μl	
T4 ligaz enzimi	1μl	
Toplam	20 μl	

Vektör-insert oranı 3:1 olarak kullanıldı

Daha sonra DH5-alfa kompetent Ecoli cell'e (DH5- alpha Competent cells, ThermoScientific, #18265017) ligasyon ürünlerinin transformasyonu yapıldı. Bu amaçla 2 μl ligasyon ürününden alındı, 50 μl hacminde hazırlanan DH5-alfa kompetent bakteriye eklendi ve 30 dakika buzda bekletildi. Ardından 42°C'de 90 saniye bekletilip, son basamakta 400 μl Super Optimal Broth' dan (SOC) bakteri üzerine eklendi ve 37°C de 1 saat 250 rpm'de karıştırıldı. pCDNA3.1/myc-hisA+NC ve pET-28a(+)-NC vektörleri için sırasıyla Ampisilin (100μg/μL) ve Kanamycin (50μg/ml) içeren LB agar plate üzerine yayma plak yöntemi ile ekim yapıldı ve gece boyunca 37°C'de bekletildi. Pozitif koloniler elde etmek için koloni PCR yapıldı (Çizelge 2.9). Pozitif koloniler 37°C'de 16 saat plasmide bağlı antibiotik içeren Luria-Bertani (LB) Broth içerisinde (pET-28a(+)-NC için kanamycin ve

pCDNA3.1/*myc-hisA*+NC için ampisilin) çoğaldı ve plazmid ekstraksiyon kiti (Thermo Scientific™ GeneJET Plasmid Maxiprep Kit; Thermo Scientific™ K0491) kullanarak plazmid ekstraksiyonu yapıldı. Daha sonra ikinci doğrulama için XhoI ve EcoRI kullanarak elde edilen plazmid üzerinde restriksiyon enzim kesimi gerçekleştirildi. Pozitif plazmid içeren bakteriler eşit miktarda 50% gliserol da -80°C de muhafaza edildi. Saflaştırılan ve endotoksin kontrolü yapılan plazmitler farelerin bağışıklanması amacıyla kullanıldı.

Çizelge 2.9. S (Nucleocapsit-N) Segmentini plazmidlerde doğrulama için koloni PCR miks bileşenleri ve programı.

Bileşen	Konsantrasyon (µl)	Isı döngüleri
10 X Taq buffer	3 µl	94 °C'de 10 dk 94 °C'de 1 dk 51 °C'de 30 s 72 °C'de 2 dk 72 °C'de 10 dk } 25 siklus
MgCl ₂ (25 mM)	2,4 µl	
10 mM dNTP mix	0,7 µl	
Forward primer için	0,5 µl	
Revers primer için	0,5 µl	
Taq DNA polymerase (5u/µl)	0,3 µl	
Nükleaz Free Su	19,6µl	
Toplam	27 µl	

2.6. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Virusunun M (Glikoproteinleri Kodlayan- GPC) Segmentini Kodlayan İfade Plazmitlerinin (Gn ve Gc) Hazırlanması

Bu amaçla öncelikle M segmenti tarafından kodlanan GPC'nin fare için kodon optimizasyonu (<https://www.idtdna.com/CodonOpt>) yapıldı. Elde edilen nihai sekans, 5' ve 3' uçlarında sırasıyla Kpn I (ThermoScientific FD0524) ve EcoRV (ThermoScientific FD0303) olacak şekilde ticari olarak sentez ettirildi. Sentezlenen ürün laboratuvarımıza pUC57 plazmiti içinde ulaştırıldı. Daha sonra hedef gen, verilen enzimler ile kesilerek, aynı enzimlerle açılan pcDNA3.1*myc.HisA* (ThermoFisher, USA) (Çizelge 2.10) ifade vektörü içine yerleştirilerek klonlandı (Çizelge 2.11).

Çizelge 2.10. pCDNA3.1/myc-hisA ve pUC57 vektörleri için kullanılan kesim protokolü.

Bileşen	Konsantrasyon (µl)	Isı derecesi ve zaman
Fastdigest 10X buffer	2 µl	37°C de 20 dk
KpnI fastdigest	1 µl	
EcoRV fastdigest	1 µl	
Nükleaz Free Su	14 µl	
DNA (PCR ürünü ya da vektör) (1µg)	2 µl	
Toplam	20 µl	

Çizelge 2.11. pCDNA3.1/myc-hisA vektör ve KKKAV-GPC (Glikoproteinleri) kodlayan M Segmenti için kullanılan ligasyon protokolü.

Bileşen	Konsantrasyon (µl)	Isı derecesi ve zaman
10X T4 ligaz buffer	2	22°C de 1 saat
pCDNA3.1/myc-hisA	1	
İnsert (Msegment)	3	
Nükleaz Free Su	13	
T4 ligaz enzimi	1	

Elde edilen ifade plazmiti (pcDNA3.1_GPC) gerek restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek ve gerekse sekans analizi ile doğrulandı. Pozitif plazmid içeren bakteriler eşit miktarda 50% gliserol da -80°C de muhafaza edildi. Safılaştırılan ve endotoksin kontrolü yapılan plazmitler farelerin bağışıklanması amacıyla kullanıldı. Doğrulama için yapılan koloni PCR protokolü Çizelge 2.12’de sunuldu. Gn ve Gc kodlayan bölgelerin varlığını göstermek için Çizelge 2.3’te verilen PCR primerler kullanıldı.

Çizelge 2.12. KKKAV-GPC kolonileri seçimi için kullanılan koloni PCR miks bileşenleri ve programı.

Bileşen	Miktar (µl)	Isı döngüleri
10 X Taq buffer	3	94 °C'de 10 dk 94 °C'de 1 dk X °C'de 30 s } 25siklus 72 °C'de 2 dk 72 °C'de 10 dk
MgCl ₂ (25 mM)	2,4	
10 mM dNTP mix	0,7	
Forward primer için	0,5	
Revers primer için	0,5	
Taq DNA polymerase (5u/µl)	0,3	X: Gn- ve Gc için, sırasıyla, 58 °C ve 56 °C
Nükleaz Free Su	19,6	
Toplam	27	

2.7. Farelerin İmmünizasyonu

BALB-c farelerin hazırlanan plazmit yapıları ile bağışıklanması anabilim dalı biyogüvenlikli hayvan laboratuvarında gerçekleştirildi. KKKAV'nün gerek NC ve gerekse GPC'leri ile bağışıklama yapılacak fare grupları 10 haftalık erkek farelerden oluşturuldu. Her grupta 2 adet fare yer aldı. Farelerin bağışıklaması, hazırlanan DNA yapılarının Velikovsky ve ark (2000)'nin bildirdiği yönteme göre direkt fare dalağına enjekte edilmesi suretiyle gerçekleştirildi. Bu amaçla kullanılan immünizasyon protokolü aşağıda sunuldu.

Çizelge 2.13. Farelerde uygulanan bağışıklama programı.

Zaman (Gün)	Adjuvan	İmmünojen (NC veya GPC ifade eden plazmit - µg)	Uygulama Yolu
0	Freund's Complete	20	Dalak içi
4	Freund's Incomplete	10	Dalak içi
11	Freund's Incomplete	10	Dalak içi
13	Füzyon		

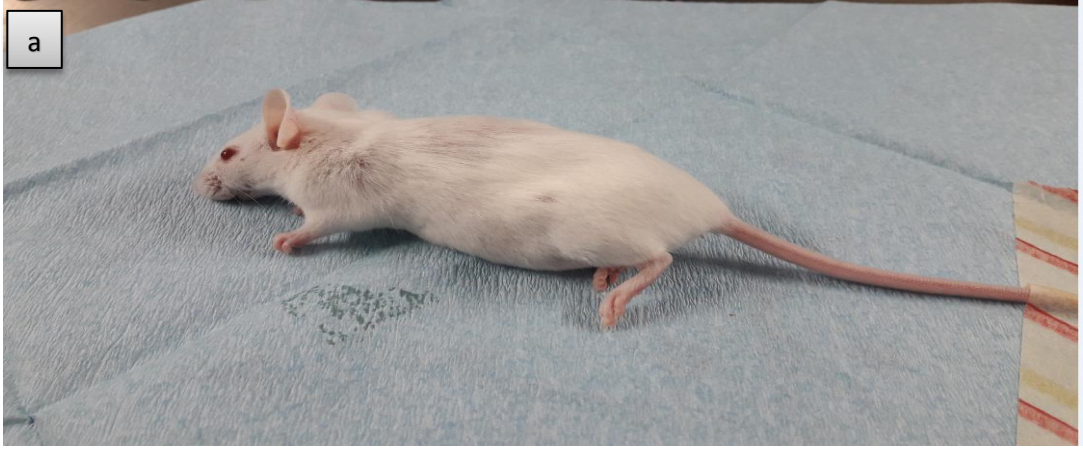
2.7.1. İmmünojenin Hazırlanması

Çözünür antijenler, 50-100µl'de, ilk enjeksiyonda 20 µg, ikinci ve üçüncü enjeksiyonda 10µg antijen verecek şekilde yaklaşık %0,02-0,04'te fosfat tamponlu salin (PBS) içinde çözündürüldü. Birinci grup fareler eşit miktar antijen ve adjuvant

(Freund's Complete ve Freund's Incomplete) karışımı ile immünize edildi. İkinci group farelere adjuvant kullanmadan sadece DNA yapıları immünize edildi. Adjuvan, antijenik bölgelerin ele alınmasının ve sunulmasının farklı bir yolu olarak immünojenik kullanmanın muhtemelen bir avantajı olarak ve düşünerek kullanıldı. Enjeksiyon için bu süspansiyon, 50 veya 100µl içinde ilk immünizasyon için 20µg, ikinci ve üçüncü immünizasyon için 10 µg immünojen içerecek şekilde PBS ile seyreltilti. Hayvanların bağışıklanmaya cevabı immünizasyonun 12. günü alınan kan serumu örneklerinde yapılan indirekt immunofloresan testi (IIFT) ile sorgulandı. Bu amaçla immünizasyonda kullanılan viral proteinleri sürekli ifade eden BHK-21 hücrelerinden yararlanıldı.

2.7.2. İntrasplenik (Dalak içi) bağışıklama

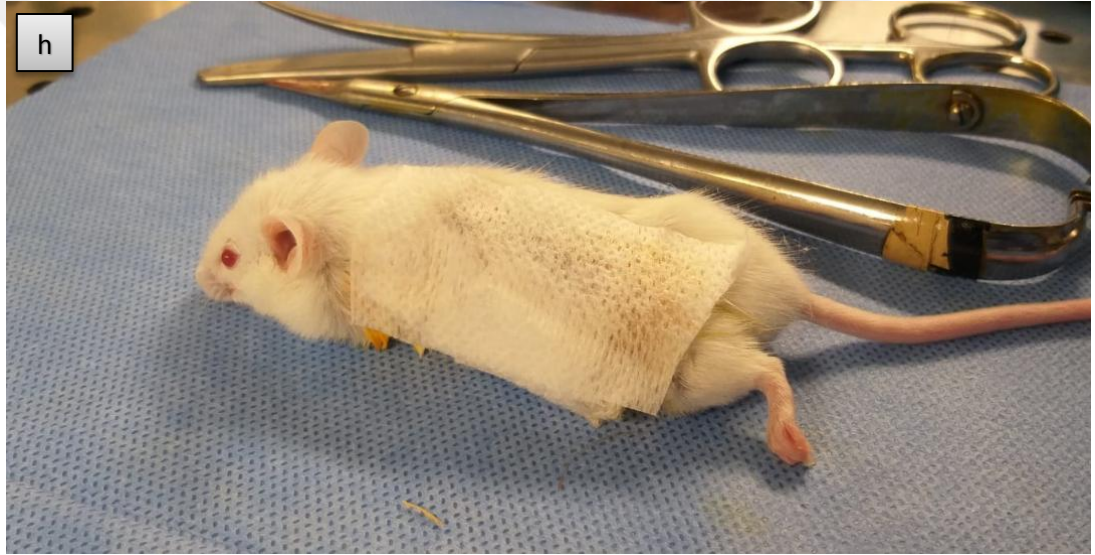
İntrasplenik immünizasyon, daha önce açıklanan tekniğe göre yapıldı (Velikovsky ve ark., 2000). Bağışıklanacak farelere Ketamine (100mg/kg) + Xylazine (10mg/kg) kombinasyonu ile intraperitoneal olarak anestezi uygulandı. Anesteziye giren hayvanlar sağ tarafları üzerine yatırıldı ve Şekil 2.3.a-c'de gösterildiği gibi bantlarla pano üzerinde sabitlendi. Sol paralumber bölgenin tüyleri tıraş makinesi kesildi. Cilt %70 etanol ile silindi ve daha sonra batikon solüsyonu ile dezenfekte edildi. Soldaki kaburganın altına 1-1,5 cm uzunluğunda eğik bir cilt kesisi yapıldı. Künt diseksiyon (blunt dissection) ile cilt kas tabakasından ayrıldı. Kas tabakası ve periton forseps ile alındı ve bağırsağı zarar vermemek için dikkatlice kesildi. Dalak, mideye bitişik uzun koyu kırmızı bir organ olarak görülmektedir. Dalak, forseps yardımıyla alt kutbu (lower pole) hafifçe kaldırılarak dışarı çıkarıldı. 1 ml'lik bir şırıngaya takılan 12 × 0,4 mm (1/2 × 27 gauge) iğne dalağın derinliklerine sokuldu ve antijeni dalağın büyük bir kısmına dağıtmak için iğne dışarı çekilirken antijen enjekte edildi (Şekil 2.3.e,f).. Enjeksiyondan sonra dalak periton boşluğuna geri itildi, periton ve kas tabakası iplikle birbirine dikildi ve cilt kenarları iki veya üç dikişle kapatıldı ve üzerine dikişleri ve bölgeni muhafaza etmek için bant yapıştırıldı (Şekil 2.3.g,h).



Şekil 2.3. İntrasplenik bağışıklama aşamaları.



Şekil 2.3. İntrasplenik bağışıklama aşamaları. Devam.



Şekil 2.3. İntrasplenik bağışıklama aşamaları.

2.7.3. Hibridoma Elde Edilmesi

2.7.3.1. Makrofaj Hücre Kültürü (Mouse feeder cells)

Makrofajlar önemli bir “*feeder layer*” olarak besi yerine salgıladıkları sitokinlerle füzyon hücrelerinin idamesi için destek olmaktadır. Bu amaçla immünize farelerin sakrifikasyonundan 4 gün önce, immünizasyonda kullanılmayan bir seri farenin periton boşluğuna 5-10 ml DMEM enjekte edildi. İki üç dakika sonra enjekte edilen DMEM periton boşluğundan enjektör kullanarak geri çekildi (Şekil

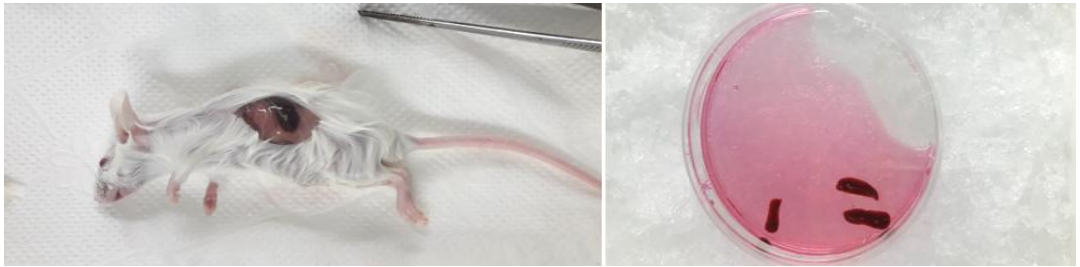
2.4) ve 15 ml'lik tüplere konuldu. 400 g'de 5 dk santrifüj edildikten sonra oluşan pellet DMEM besi yeri ile resüspanse edildi ve ardından 24 kuyucuklu hücre kültürü pleytlerine transfer edildi.



Şekil 2.4. Peritoneal makrofaj hücre Kültürü (Mouse feeder cells) hazırlanması.

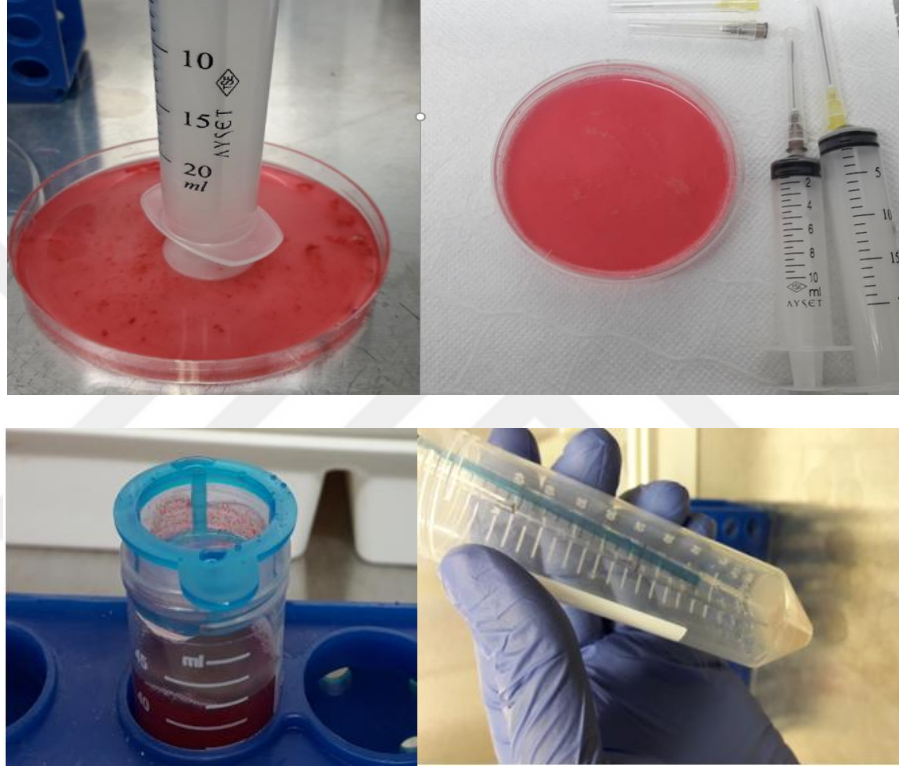
2.7.3.2. Splenosit izolasyonu

İmmünize edilen fareler, immünizasyonun 13-14. gününde daha önce verilen kombinasyonla uygulanan anestezi altında ötanazi edildiler. Ötanazi edilen hayvanların tüm vücudu %70 etanol içine dezenfekte edildi ve aseptik şartlarda açılan abdominal keseden dalaklar dikkatlice alındı. Vücut dışına alınan dalaklar, buz üzerinde olan ve içinde 3ml DMEM olan petri kutuları içine kondu ve işlemlerin devamı için yatay akışlı biyogüvenlik kabinine transfer edildi (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Splenosit hücrelerin izolasyonu için farelerden dalakların alınması

Her bir hayvana ait dalak ayrı işlenmek şartıyla, dalaklar önce enjektörün pistonu yardımıyla ezildi. Daha ileri homojenizasyon için uçlarına 18G ve 26G iğne ucu takılan enjektörlere çekilip, geri verilmek suretiyle muamele edildi. Daha sonra dalaklar DMEM ile 70 mikron boyutunda olan metal mesh üzerine transfer edildi ve 10 ml boş DMEM içerisinde toplanarak 400×g'de 5 dakika santrifüj edilerek yıkandı ve 10 ml serumsuz DMEM içinde resüspanse edildi (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Fare dalağından splenosit hücrelerin elde edilmesi.

2.7.3.3. Füzyon

İmmünize edilen farelerin dalaklarının alınmasından 3 gün önce sağlıklı farelerden peritoneal makrofaj hücreleri toplanarak feeder-layer oluşturmak üzere 12- veya 24-gözlü tabletlerde %10 FDS içeren DMEM içinde kültüre edildi. Aynı zaman zarfında füzyon için kullanılacak fare myeloma hattı F0'lar da çözülerek HT besi yerinde 3 gün süreyle kültüre edildi. İmmünizasyonun 13-14. gününde ötanazi edilen farelere ait dalaklar kapsülaları zarar görmeksizin vücut dışına alındı. Hücre

parçalayıcısından (0.4 µm çaplı) geçirilerek dalak hücreleri bireysel olarak ayrıştırıldı. Bir santrifüj tüpünde ve Polietilen glikol varlığında F0 (1 kısım) ve dalak hücreleri (5 kısım) karıştırılarak 2000 rpm’de santrifüj edildi. Hücre peleti daha sonra HAT içeren besi yeri ile resüspanse edilerek kültüre edilen peritoneal makrofaj hücrelerinin üzerine dağıtıldı. Dört gün süreyle %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edilen hücreler, süre sonunda mikroskop kontrolüne alındı ve hücre bölünmesi yönünden kontrol edildi. Oluşan koloniler takip edilerek 16-32 hücreli koloniler 24-gözlü tablettten alınarak her koloni bir göze yerleşecek şekilde 96-göz tablete aktarıldı. Medyum pH’sına göre antikor üretimleri kontrol edildi. Yeterince düşük pH gösteren tablet gözlerinden alınan süpernatant örnekleri immünizasyonda kullanılan antijenlere spesifik antikor içerikleri açısından kontrol edildi

2.7.4. Pozitif Klonların Saptanması

Hücre süpernatantları antikor varlığı açısından teste alındı. Bu kapsamda öncelikle füzyon sonrası çoğalan kolonilerin immunojenlere karşı antikor üretilip üretilmediği test edildi. Bunun için 96-göz pleytlerde üretilen ve KKKAV’nin N ve GPC proteinleri ifade eden BHK-21 hücrelerinde IIFT yapıldı. Kültürün 48. saatinde fikse edilen hücrelere, kültürdeki hibridoma kolonilerinden alınan süpernatantlar ilave edildi ve 1 saat süreyle inkübe edildi. Süre sonunda yıkanan hücre yüzeylerine anti-fare IgG-FITC ilave edildi ve tekrarlayan 1 saatlik inkubasyon sonunda test gözleri floresan mikroskop ile kontrol edildi.

2.7.5. Antikor Purifikasyonu

Antikorları purifiye ve saflaştırma için tipik bağlama ve ayrıştırma afinite yöntemlerinden farklı olarak, Melon™ Gel Monoclon IgG Purification Kit (Katalog no: 45214) kullanıldı. Bu kit IgG olmayan proteinlerin bağlanmasına dayanır, böylece saf IgG’nin akış fraksiyonda geri kazanılmasına izin verir. Kullanılan tamponların etkilerini azaltmak için nötralize etmeye veya tuzu gidermeye gerek yoktur. Purifikasyon üretici firmanın yönergesi doğrultusunda uygulandı.

2.7.6.KKKAV NC ve GPC İfade Eden Stabil BHK21-C13 Hücre Hazırlanması

Stabil olarak KKKAV NC ve GPC ifade eden BHK21-C13 hücre hazırlanması için bu hücreler pCDNA3.1/myc-HisA-NC ve pCDNA3.1/myc-HisA-GPC plazmidleri ile transfekte edildi.

2.7.6.1. Transfeksiyon Protokolü

Transfeksiyondan bir gün önce bir T75 hücre flaskına 3×10^6 adet BHK21-C13 hücresi konuldu ve inkubasyona bırakıldı. Transfeksiyondan 1 saat önce BHK21-C13 hücrelerin medyumunu serumsuz ve antibiotiksiz DMEM ile değiştirildi. Transfeksiyon için iki farklı tüp hazırlandı.

TüpA: 400µL opti-MEM artı sirküler pCDNA3.1/myc-HisA-NC veya pCDNA3.1/myc-HisA-GPC vektör ve 20µL p3000 reaktifi.

Tüp B: 400µL opti-MEM ve 20µL Lipofectamine3000

İki tüp karıştırıp ve oda ısısında 15 dakika bekletildi. Daha sonra 800µL damla damla 5ml opti-MEM vasata eklendi. Transfeksiyondan 6 saat sonra vasat, 20 mL serumsuz ve antibiotiksiz, yüksek konsantrasyonda glukoz (4 g/L) içeren DMEM ile değiştirildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra 200µL G418 antibiotik (50mg/mL) 20mL DMEM içerisinde eklendi. Hücrelerin kültürünün devam ettiği 10 gün boyunca, her 3 günde bir kere vasat ve G418 yenilendi. İşlemin 11 inci gününde kalan stabil hücreler subkültür edildi. Bu hücreler 2 hafta boyunca antibiotik içeren vasatta çoğaldı. Elde edilen hücreler stabil olarak kabul edildi ve KKKAV-NC veya KKKAV-GPC varlığını doğrulamak için tekrardan IIF testi yapıldı.

2.7.7. İndirekt İmmün Floresan Testi (IIFT)

Stabil pCDNA3.1/myc-HisA-NC ve pCDNA3.1/myc-HisA-GPC içeren BHK21-C13 hücreleri 24 gözlü pleytlerde kültüre edildi. Kültüre alındıktan 24 saat sonra gözlerdeki vasat çekildi ve hücreler 200µL %3,7 formaldehit eklenerek fikze edildi. Daha sonra, 1x PBS ile her seferi 5 dakika olmak üzere 3 kere yıkama gerçekleştirildi. Tabletın her gözüne % 0,1TritonX-100'den 200 µL eklenip ve 15 dakika oda ısısında beklendi. Daha önce belirtildiği şekilde gözler yıkandı. Bloklama tamponu (%5 yağsız süt; Cell Signaling Technology, Inc, ABD) 300µL olacak şekilde her göze eklendi ve 1 saat oda ısısında bloklama işlemi yapıldı. Standart yıkama işlemleri sonrasında, birinci antikor olarak hybridoma hücrelerinden elde edilen antikor olarak 1:100 oranında 1xTBST'te sulandırıldı ve her göze 200µL eklendi. Birinci antikor ile inkubasyon gece boyunca +4°C'de tamamlandı. Yıkama işlemlerinden sonra, ikinci antikor olarak Alexa Fluor™ Plus 488 işaretli anti-mouse IgG (Invitrogen) 1:1000 oranında seyreltilerek her göze 200µL olarak ilave edildi ve 1 saat oda ısısında inkübe edildi. İşlemin ardından 3 kere yıkama işlemi yapıldı. Test, immunofloresan mikroskopta değerlendirildi.

2.8. Monoklonal Antikorların Karakterizasyonu

2.8.1. Antikor İsotiplendirme Testi

KKKAV'nin NC ve GPC proteinleri ifade eden BHK-21 hücrelerinde, IIFT testinde pozitiflik gösteren klonlarda, üretilen antikor isotipinin belirlenmesi amacıyla Rapid ELISA Mouse mAB Isotyping Kit (Thermo Fisher Scientific) kullanıldı. Test aşamaları kolonlardan üretilen monoklonal antikorun hangi ağır ve hafif zincir tipinde olduğu belirlendi. Kit, üreticinin yönergesi doğrultusunda kullanıldı.

2.8.2. Virus Nötralizasyon Testi

Araştırma kapsamında üretilen MAb'ların KKKAV'ünü nötralize etme yeteneği sorgulandı. Virus nötralizasyon testi, 24 kuyucuklu hücre kültürü tabletlerinde gerçekleştirildi. Bu amaçla, Vero E6 hücreleri 24-kuyucuklu hücre kültürü tabletinin gözlerinde 24 saat üretildi. Süre sonunda 100DKID₅₀ (10³ /ml) oranında sulandırılmış 200 µL hacimdeki KKKAV-Ank2 izolatu ile eşit hacimdeki MAB'ler ependorf tüp içinde karıştırıldı. Karışım 37°C'de 1 saat süreyle nötralizasyon için inkübe edildi. Bu işlem sonunda her nötralizasyon karışımı, medyumunu aspire edilmiş Vero E6 hücreleri üzerine ve her birisi 200 µL olacak şekilde 2 adet göze inoküle edildi. İnokulasyon işlemleri tamamlanınca 24 kuyucuklu tabletler %5 CO2 etüvde 37°C'de 1 saat bekletildi. Süre sonunda kullanılan tüm kuyucuklara 1 ml DMEM ilave edilerek virus kontrol olarak ayrılan gözlerde CPE gözlenene kadar aynı şartlarda inkübe edildi.

2.8.3. Rekombinant pET-28a(+)-NC Ekspresyonunun Başlatılması

Rekombinant pET-28a(+)-NC plazmidi , *E. coli* BL21 (DE3) competent cell'e transfere edildi ve pET28a(+) için kanamisin antibiyotiği kullanıldı. Koloniler seçildikten sonra LB/kanamycin kültürüne inoküle edildi ve 250 rpm'de O/N olarak 37°C inkübatörde karıştırıldı. (kanamisin konsantrasyonu 50 µg/ml). Kültürlenmiş bakteri hücreleri, transgen ekspresyonunun indüksiyonu için kullanıldı. O/N kültürden %1(V/V) oranında kanamisin içeren (50 µg/ml) LB broth medium içerisine inoküle edilerek 37°C'de bakterinin logaritmik faza ulaşana kadar inkübatöre ve 250 rpm'de OD₆₀₀=0,6 ulaşınca kadar karıştırıldı. Bu aşamayı takiben IPTG (izopropil β-D-l-tiogalaktopiranosid), 1 mM konsantrasyonda kültür üzerine ilave edildi ve 4-5 saat boyunca 37 ° C'de karıştırılmaya devam edildi. Örnekler, 3.000 x g'de 15 dakika süreyle 4 ° C'de santrifüj edildi ve süpernatantı alınarak daha ileri analizler için -80 ° C'de pelletleri donduruldu.

2.8.4. His-Tagged rNC Purifikasyonu

pET28a(+) vektör sisteminde ifade edilen rNC proteinin purifikasyonu için MagneHis™ Protein Purification System (Promega; V8500) kiti kullanıldı.

Bu aşamada 1 ml bakteri kültürü bir mikrosantrifüjde 10.000 x g'de 2 dakika santrifüjlendi ve süpernatant tamamen atıldı. Hücre peleti 1X FastBreak™ Hücre Lizis Reaktifinde yeniden süspanse edildi. Daha sonra, Liyofilize DNase I, lize edilmiş bakteri kültürüne 1µl ilave edildi ve bir döner mikser veya çalkalama platformu üzerinde oda sıcaklığında 10-20 dakika çalkalanarak inkübe edildi. 1X FastBreak™ Hücre Parçalama Reaktifinde yeniden süspanse edilen hücre peletine 30µl MagneHis™ Ni-Particle eklendi. İşlemin devamında tüp ters çevrilerek karıştırıldı (yaklaşık 10 kez) ve 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Bunu takiben tüp, MagneHis™ Ni-Parçacıklarını yakalamak için yaklaşık 30 saniye boyunca manyetik standda yerleştirildi. Bir pipet kullanılarak süpernatant dikkatlice alındı. Tüp manyetik standdan çıkarıldı. Karışıma 10 µl MagneHis™ Bağlayıcı/Yıkama Tamponu MagneHis™ Ni-Partiküllerine eklendi ve karıştırmak için pipetlendi. Tüp, MagneHis™ Ni-Parçacıklarını yakalamak için yaklaşık 30 saniye boyunca manyetik standda yerleştirildi. Bir pipet kullanılarak süpernatant dikkatlice çıkarıldı. Yıkama aşaması, toplam 3 yıkama için 2 kez tekrarlandı. Tüp manyetik standdan çıkarıldı ve 100 ul MagneHis™ Elüsyon Tamponu eklendi ve karıştırıldı. Örnek 1-2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve MagneHis™ Ni-Partiküllerini yakalamak için manyetik bir standda yerleştirildi. Bir pipet kullanılarak saflaştırılmış proteini içeren süpernatant çıkarıldı ve numuneler hem SDS-PAGE ile hem de fonksiyonel tahlil ile analiz edildi.

2.9. SDS-PAGE

Protein konsantrasyonu Bradford yöntemi ile belirlendi. İlgili proteinlerin ifadesi ve saflığı, proteinin %12,5 sodium dodecyl sulphate polyacrylamide jelinde (SDS-PAGE) çözündürülmesi, ardından Coomassie G250 blue silvir boyama ile

tespit edildi. Eksprese olan Hiss-işaretli proteinler Western Blottan sonra His-tagged monoklonal antikor ile tesbit edildi, bu işlem hem recombinant NC'nin doğru klonlanmasını ve bir yandan KKKAV'un NC bölgesine Monoklonal Antikor üretimini bildirdi.

SDS-poliakrilamid jelleri, Laemmli'ye (1970) göre hazırlandı (Çizelge 2.14). Bu çalışmada 10 µg protein, 2x sample loading buffer ile karıştırıldı ve 95 °C'de 10 dk bekletildi. Daha sonra yükleme boyası sonuna ulaşana kadar bir Mini-Protean elektroforez cihazı (Bio-Rad) kullanılarak 1X running buffer'de 10-15 V /cm çalıştırıldı. Bu çalışmada elektroforezde 50 v'da 10 dk sonra 10-15 V / cm 100v'de 1saat programı kullanıldı

Çizelge 2.14. SDS-poliakrilamid jellerinin hazırlanması.

Resolving Jel %12.5 -5ml		Stackig JEL (% 4)-4ml	
%30Acrylamide/bisacrylamide	2,08µl	%30Acrylamide/bisacrylamide	680 µl
H ₂ O	1,57µl	H ₂ O	2,72 µl
1.5M Tris(pH 8.8)	1,25µl	1M Tris(pH 6.8)	500 µl
% 10SDS	50µl	10% SDS	40 µl
% 10APS	50µl	10% APS	40 µl
TEMED	5µl	TEMED	4 µl

2.10. İmmunoblotlama (Western Blotting)

Trans-Blot Turbo sistemi (BioRad), proteini jelden membrana 3 dakika gibi kısa bir sürede aktarabilen hızlı bir protein transfer aparatıdır. SDS-PAGE 'den elde edilen jeldeki proteini PVDF membrana transfer etmek için jel, 10-15 dakika Towbin tamponunda bekletildi. Membran metanole daldırıldı ve ardından hemen 5 dakika Towbin tamponunda bekletildi ve metanoldan temizlendi. Daha sonra sırasıyla filtre kağıdı, membran, jel ve filtre kağıdı sırasında katmanlar hazırlanarak protein transferi için cihaz 2,5A'de ve 25V'da 10 dakikaya ayarlandı. Daha sonra membran 1X TBS içinde çözülen %5 yağsız süt ile 1 saat inkübe edildi ve ardından 1X TBST

(1X TBS'de %0,5 Twin) içinde her biri 5 dakika olmak üzere 3 kez çalkalayarak yıkandı. Daha sonra membran, 1:50 seyreltilmiş Anti NC ve GPC monoklonal antikor ile O/N olarak +4°C de inkübe edildi. Membran yıkama tamponu içinde (1X TBST) her biri 5 dakika olmak üzere 3 kez çalkalayarak yıkandı ve oda sıcaklığında 1 saat boyunca 1X TBST'de 1:5000 seyreltilmiş ikincil antikor Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP) (Abchem, ab6789) ile muamele edildi. Daha sonra membran 1X TBST kullanarak her biri 5 dakika olmak üzere 3 kez çalkalayarak yıkandı. Son olarak membran üzerine ECL substrat eklendi ve kemoluminisens cihazında görüntülendi.

2.11. İmmünohistokimya (IHC)

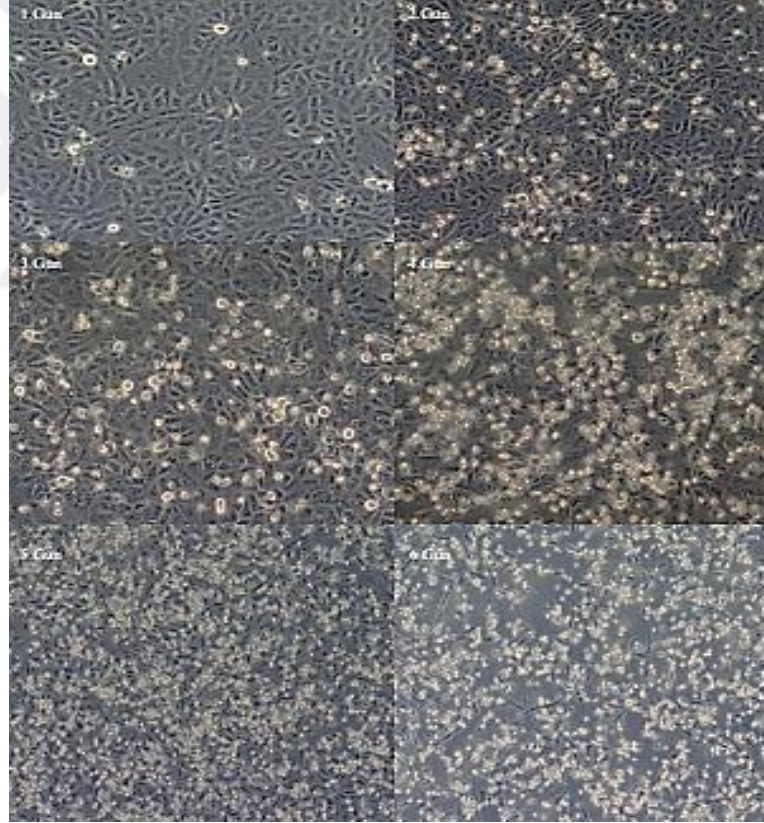
Antijenlerin spesifik tanı yöntemlerinden biri de enfekte doku örneklerinde yapılan immünohistokimya (IHC) uygulamasıdır. KKKAV ile enfekte olan farelerden postmortem alınan organlar (Dalak, Karaciğer, Beyin) %10 formaldehit (pH 7-7.4) ile fikse edildi ve daha sonra parafine bloklara gömüldü. İmmünohistokimya (IHC) test öncesinde bloklanan dokulardan 20A kalınlıkta kesitler alındı. Preparatlar etüvde bir gece boyunca 60°C'de bekletildikten sonra parafini uzaklaştırmak için 2 x 10 dk ksilan inkübasyonu uygulandı. Ardından rehidrasyon için %96, %90, %70'lik EtOH inkübasyonu 2 x 5 dk olarak uygulandı. Lamlar manyetik karıştırıcı üzerinde ddH₂O ile 3 x 3 dk yıkandı. Antijen kazanımı için lamlar 1X Sitrat (270 ml ddH₂O + 30 ml 10X sitrat) solüsyonu içerisine alındı. Mikrodalga en yüksek güçte çalıştırılarak solüsyon kaynayana kadar gözlemlendi. Kaynama başlayınca fırının gücü 550W'an indirilerek 10 dk daha işleme devam edildi. Lamlar oda ısısında 10 dk bekletildi ve daha sonra manyetik karıştırıcıda ddH₂O ile 3 x 3 dk yıkandı. Endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için lamlar %6 H₂O₂ + %80 Metanol karışımında (160 ml Metanol + 40 ml %30 H₂O₂) 20 dk bekletildi. İşlemin devamında lamlar manyetik karıştırıcıda ddH₂O ile 2 x 3 dk yıkandı ve tekrar lamlar manyetik karıştırıcıda 1X PBS ile 2 x 5 dk yıkandı. Lamlar bloklama solüsyonu (Acu-Stain Mouse+Rabbit HRP Kit) içinde oda derecesinde ve nemli tepsi içerisinde 10 dk bekletildi. Lam üzerindeki solüsyon yıkamadan uzaklaştırıldı, fazla solüsyon 3 MM kâğıt ile silindi.

Birincil antikör (1:100 dilüsyon) ile 60 dk oda sıcaklığında uygulandı. Lamlar manyetik karıştırıcıda 1X PBS ile 3 x 5 dk yıkandı. İkincil antikör (Acu-Stain Mouse+Rabbit HRP Kit) ile 30 dk oda sıcaklığında inkübasyon uygulandı. Lamlar manyetik karıştırıcıda 1X PBS ile 3 x 5 dk yıkandı. *Streptavidin-peroksidaz* ile 30 dk oda sıcaklığında inkübasyon uygulandı. Lamlar manyetik karıştırıcıda 1X PBS ile 3 x 5 dk yıkandı. DAB (3,3'-Diaminobenzidine) hazırlandı (40 µl DAB + 1 ml substrat). DAB solüsyonu 5 dk uygulandı. Preparatlar ddH₂O'ya koyularak reaksiyon durduruldu. Zıt boyama için lamlar hematoksilen boyasına 5 sn batırılıp çıkarıldı. Lamlar ılık musluk suyunda 15 dk yıkandı. Dehidratasyon için %70, %90, %96'lık EtOH'de 2 x 2 dk inkübasyon uygulandı. Lamlara 2 x 10 dk ksilen inkübasyonu uygulandı. Lamlar hafif eğimli olacak şekilde havlu peçete üzerine alındı ve balsam damlatılarak lamel ile kapatıldı ve mikroskop ile görüntülendi.

3. BULGULAR

3.1. KKKAV'un Hücre Kültüründe Çoğaltılması ve Enfektivitesi

Virus çoğalması VeroE6 hücresinde gerçekleştirildi. Bu amaçla virus 0,01 moi miktarında %70 kaplanmış hücreye inokule edildi. Genel olarak sitoliz, hücre yuvarlaklaşması ve hücre dökülmesi ile karakterize CPE inokulasyondan 72 saat sonra virusa özgü sitopatik değişiklikler tespit edildi. İnokulasyon sonrası altıncı günde tüm hücreler enfekte oldu ve üreyen viruslar toplandı (Şekil 3.1). Üretilen virusun enfektivitesi $DKID_{50} = 2 \times 10^5 / 0,1 \text{ mL}$ olarak kaydedildi.

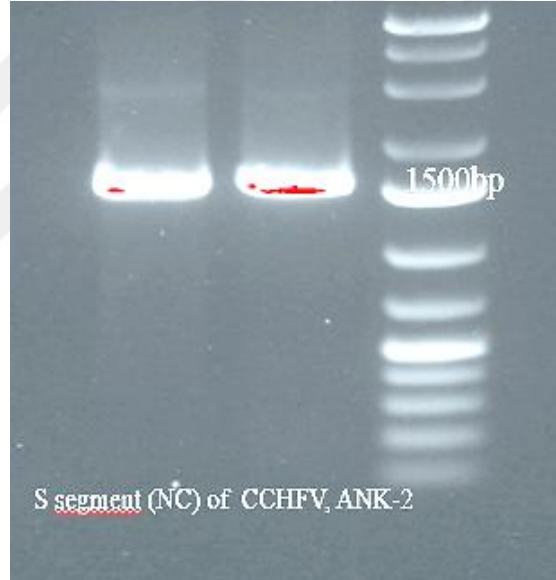


Şekil 3.1. KKKAV ile enfekte edilen Vero-E6 hücrelerinde inokulasyonu izleyen günler bazında tespit edilen viral patoloji.

3.2. KKKAV NC Spesifik Monoklonal Antikor Üretimi

3.2.1. RNA Ekstraksiyonu ve NC Geninin Çoğaltılması

Enfekte hücrelerden, RNA ekstraksiyonu için ticari QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) üretici tavsiyeleri doğrultusunda kullanıldı. Elde edilen viral RNA, Komplementer DNA(cDNA) sentezi için kullanıldı. Elde edilen cDNA, KKKAV'ün S segment (NC) bölgesine yönelik tasarlanmış primerler ile Phusion DNA polymerase (2u/μl) kullanarak PCR reaksiyonu başlatıldı ve bölge doğrulandı. (Şekil 3.2).

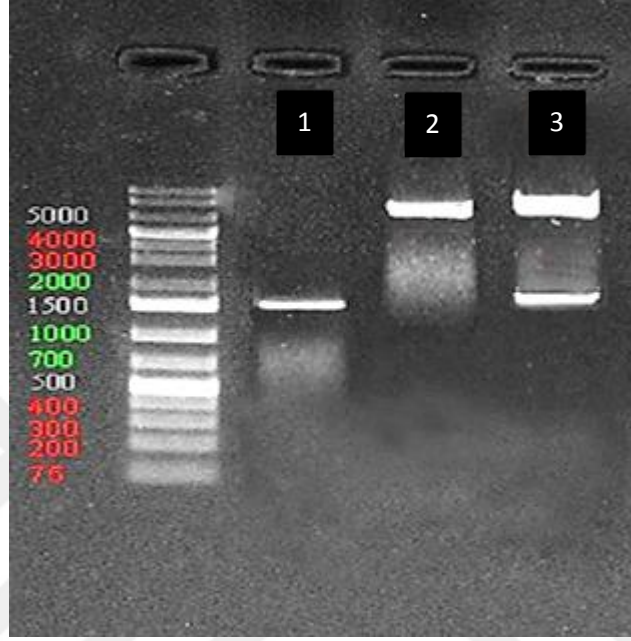


Şekil 3.2. KKKAV'un (Ank-2) NC geninin PCR ile çoğaltılması.

3.2.2. KKKAV'un S (Nucleocapsit-N) Segmentini Kodlayan pCDNA3.1/myc-hisA +NC İfade Plazmitinin Hazırlanması

pCDNA3.1/myc-hisA ökaryotik ifade vektörüne NC (Nucleokapsit) genini klonlama amacıyla, plazmit sırasıyla EcoRI ve XhoI restriksiyon enzimleri ile kesildi ve 1500 nükleotid uzunlukta çoğaltılan, sekansı teyit edilen S segment bölgesi vektöre klonlandı. Elde edilen pCDNA3.1/myc-hisA+NC plazmid koloni PCR

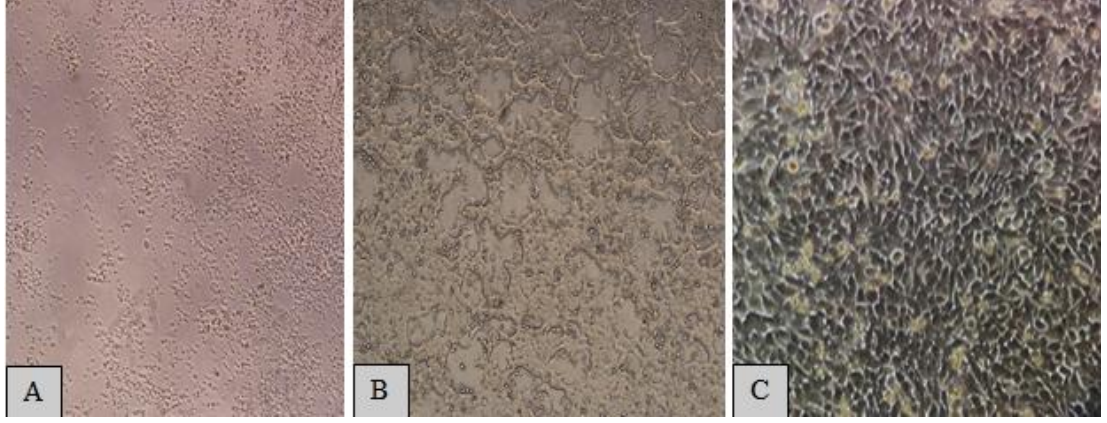
kullanarak transforme bakterilerden seçildi. Pozitif koloniler plazmid ekstraksiyonundan sonra XhoI ve EcoRI ile kesildi ve doğrulandı. Ayrıca S segmentin (NC) varlığı PCR ile tespit edildi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. pCDNA3.1/*myc*-hisA+NC konstraktın doğrulanması. 1: Koloni PCR ile yapılan doğrulamada 1500 bp spesifik S segment (NC) içeren bant, 2: pCDNA3.1/*myc*-hisA+NC kesim, XhoI ile kesildi, 3: pCDNA3.1/*myc*-hisA+NC plasmit, XhoI ve EcoRI enzimleri ile kesildi. Thermo Scientific™ O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, Ready-to-Use - 75-20,000 bp- DNA ladder olarak kullanıldı.

3.2.3. KKKAV-NC İfade Eden Stabil BHK21-C13 Hücre Hazırlanması

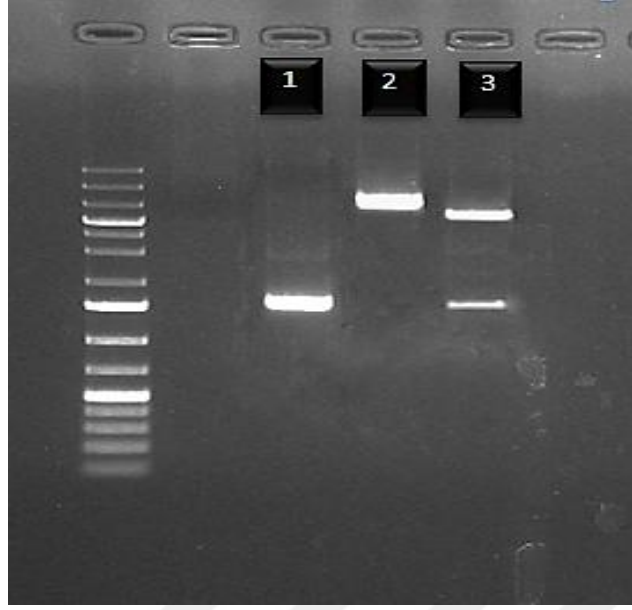
pCDNA3.1/*myc*-HisA+NC lipofektamin yardımıyla BHK-21 hücrelerine transfeke edildi. Transfeksiyon sonrası BHK-21 hücreleri kültür medyumunu Geneticin (G418) içeren DMEM ile kültüre edildi. Böylelikle antibiyotik direnci olmayan BHK-21 hücreleri öldürüldü ve rezistan olanların çoğalması sağlandı. Bu hücreler hem farelerde immünizasyon sonrası oluşan bağışık yanıtın ve hem de hybridoma hücrelerinden KKKAV-N proteinine karşı antikor üretilmesinin doğrulamasında kullanıldı (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Stabil KKKA-NC ifade eden BHK21 hücresi üretimi. A); plazmit taşımayan BHK-21 hücreleri, B); plazmit taşıyan ilk transfeksiyon BHK-21 hücreleri, C) Seri pasajlar sonu G418 içeren medyumda sınırsız çoğalan BHK-21-KKKAV-NC.

3.2.4. KKKAV-NC'nin Prokaryotik pET28a+NC Plazmitinde İfade Edilmesi

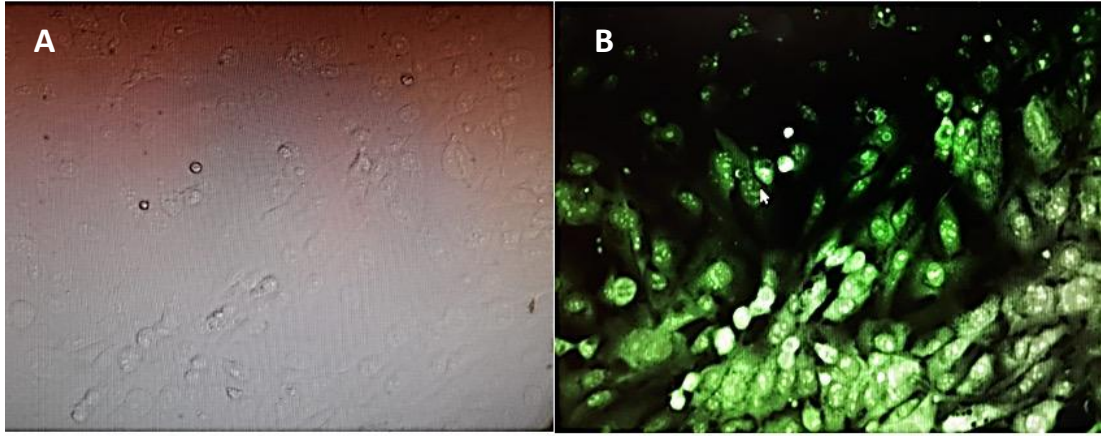
Klasik yöntem ile pET28a(+) vektörüne NC genini klonlamak için, plazmit EcoRI ve XhoI restriksiyon enzimleri ile kesildi ve 1500 nükleotid uzunlukta çoğaltılan, sekansı teyit edilen NC geni vektöre klonlandı. Elde edilen pET28a+NC plazmit koloni PCR kullanarak transforme bakterilerden seçildi. Pozitif koloniler plazmid ekstraksiyonundan sonra XhoI ve EcoRI ile kesildi ve doğrulaması yapıldı. Ayrıca NC geninin varlığı PCR ile de tespit edildi (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. pET28(a)+NC konstraktın doğrulanması. 1: Koloni PCR ile yapılan doğrulamada 1500 bp spesifik S segment (NC) içeren bantın elde edilmesi, 2: pet28a(+)+NC kesim, XhoI ile kesildi, 3: pet28a(+)+NC plasmid, XhoI ve EcoRI enzimleri ile kesildi. Thermo Scientific™ O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, Ready-to-Use - 75-20,000 bp- DNA ladder olarak kullanıldı.

3.2.5. Hayvanların pCDNA3.1/myc-HisA+NC ile İmmünizasyonu

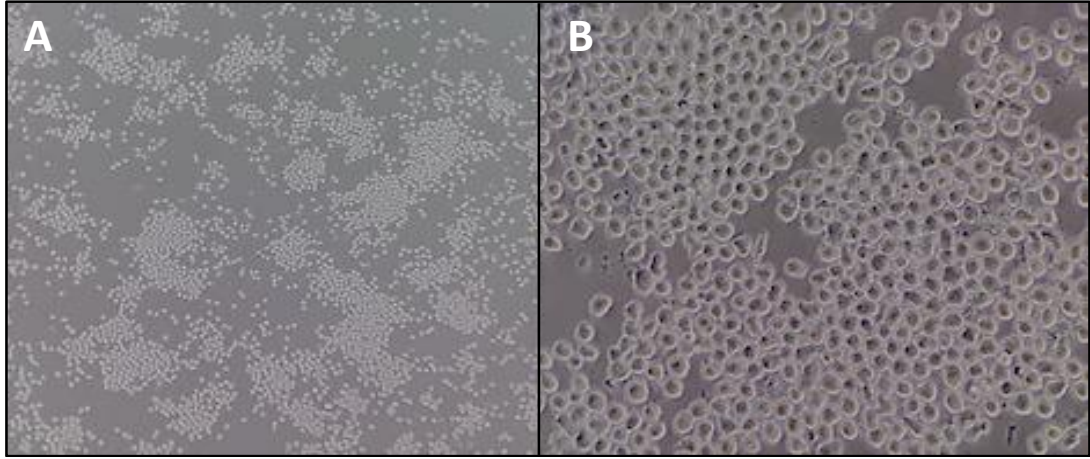
Birinci grup fareler antijen (pCDNA3.1/myc-hisA+NC) ve adjuvant karışımı kullanarak immünizasyon işlemine tutuldu, ilk immünizasyon için 20µg antijen ikinci ve üçüncü immünizasyon için 10ug immünojen içerecek şekilde 50 veya 100µl içinde PBS ile seyreltildi ve intrasplenik immünizasyon metodu kullanarak farelere enjekte edildi. İmmünizasyonun 12. günü alınan kan serumu örneklerinde immünojene özgül antikor sentezlenip sentezlenmediği immünizasyonda kullanılan viral proteinleri sürekli ifade eden BHK-21 hücrelerinde gerçekleştirilen IIFT ile kontrol edildi. Uygulama süresinde yara bakımı ile komplikasyon yaşanmadı, hayvanlarda uygulama sonrasında vücut ağırlığı kaybı yaşandı (Çizelge 3.1). Stabil BHK21-KKKAV-NC kullanılarak yapılan IIFT sonunda bu parametre için immünize edilen her iki grup (adjuvanlı ve adjuvansız) farede de NC spesifik antikor varlığı saptandı (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. KKKAV N proteinine karşı fare kan serumlarından elde edilen spesifik antikorların, stabil olarak N proteini ifade eden BHK-21 hücrelerinde IIFT ile tespiti. A) Test sonrası ışık mikroskopisi, B) Aynı alanın Floresan mikroskopisi (X40).

3.2.6. KKKAV-NC'e Karşı Hibridoma Geliştirilmesi

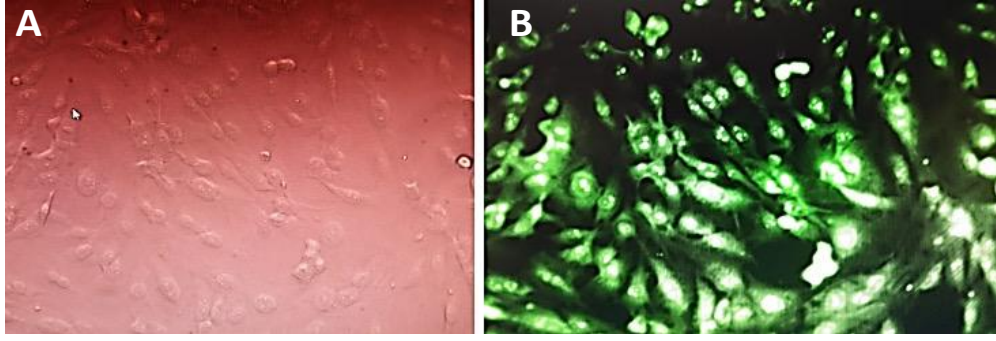
İmmünize edilen farelerin dalaklarının alınmasından 3 gün önce sağlıklı farelerden peritoneal makrofaj hücreleri toplanarak feeder-layer oluşturmak üzere 1 24-gözlü tabletlerde %10 FDS içeren DMEM içinde kültüre edildi. Aynı zaman zarfında füzyon için fare myeloma hattı F0'lar da kültüre edildi. İmmünizasyonun 13. gününde ötanazi edilen farelere ait dalaklar kapsülaları zarar görmeksizin vücut dışına alındı ve füzyon işlemleri başarıyla gerçekleşti. Oluşan koloniler 24-gözlü tabletten alınarak her koloni bir göze yerleşecek şekilde 96-göz tablete aktarıldı. Medyum pH'sına göre antikor üretimleri kontrol edildi. Yeterince düşük pH gösteren tablet gözlerinden alınan süpernatant örnekleri immünizasyonda kullanılan antijenlere spesifik antikor içerikleri açısından kontrol edilmek için toplandı. Çalışma kapsamında 5 hibridoma klonunda yüksek metabolizma aktivitesi (düşük pH belirteci olan) ve sağlıklı hücre morfolojisi gösteren klonlara (Şekil 3.7) ait süpernatantlar antikor içeriği yönünden IIFT'e tabi tutuldu.



Şekil 3.7. KKKAV N (Nükleokapsit) proteini ifade eden plasmid ile immünize edilen farelerin dalaklarından hibridoma teknolojisi kullanarak elde edilen hibrit hücrelerden örnekler. A) X10 büyütme; B) X40 büyütme.

3.2.7. Hibridomaların NC Spesifik Antikorlar Yönünden İndirekt İmmün Floresan Testi (IIFT) ile Kontrolü

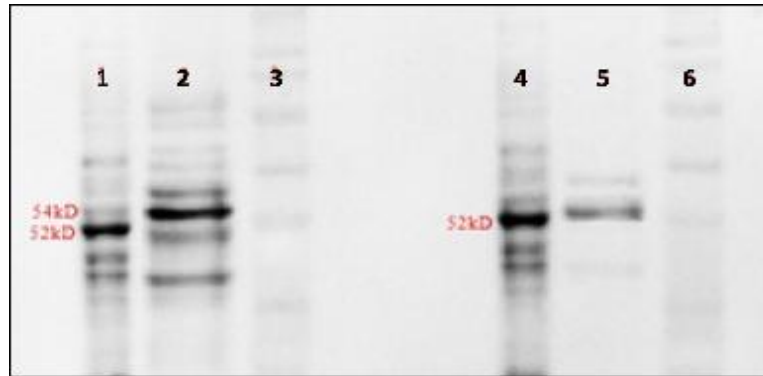
24-gözlü tablette üretilen stabil BHK21-NC hücreleri % 3.7 formaldehit ile fikze edildi. Hücreler yıkama ve bloklamadan sonra tekrar yıkandı. Farelerden immünizasyon sonrası kan serumlarında antijene karşı üretilen antikor testi ve ayrıca hybridoma hücrelerinden spesifik antijene karşı elde edilen monoklonal antikor primer antikor olarak kullanıldı. İkinci antikor olarak Alexa Fluor™ Plus 488 (Invitrogen) kullanıldı. Test sonunda yukarıdaki kriterleri sağlayan 5 hibridoma klonunun NC-spesifik antikor ürettiği ve bunların sırasıyla AH-NC3, AH-NC9, AH-NC11, AH-NC16ve AH-NC19 oldukları tespit edildi. Bu klonlardan bir tanesine ait test sonucu Şekil 3.8’de sunuldu.



Şekil 3.8. KKKAV-NC proteinine karşı hybridoma hücrelerinden elde edilen spesifik antikorların, stabil olarak NC proteini ifade eden BHK-21 hücrelerinde IIFT ile tespiti. A) Test sonrası ışık mikrokobisi (X40), B) Aynı alanın floresan mikroskobisi (X40).

3.2.8. Üretilen KKKAV-NC Antikorlarının Denatüre Viral Proteinlere Spesifitesi

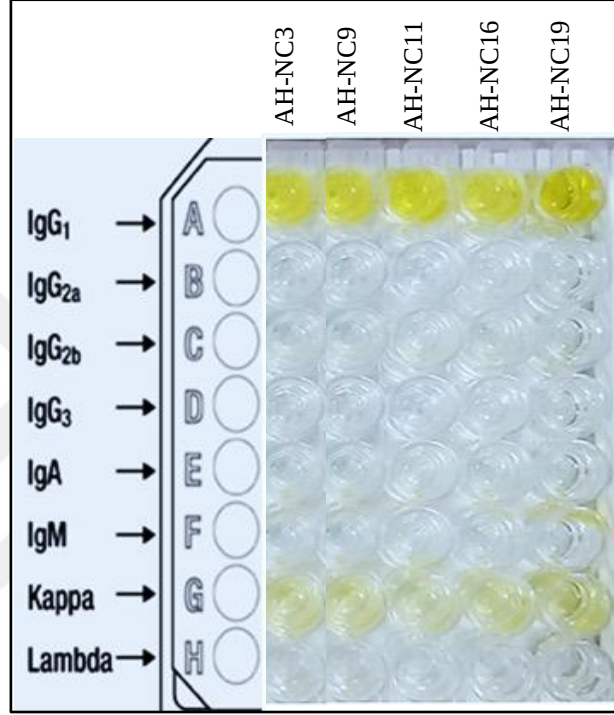
Araştırma kapsamında üretilen NC MAb'larının etkinliğinin ve viral proteinlere olan spesifitesinin tespit edilmesi için immunblotlama yapıldı. Bu amaçla gerek Vero E6 hücrelerinden saflaştırılan virion proteinleri ve gerekse pET28-NC tarafından üretilen rekombinant NC molekülü kullanıldı. Test edilen 5 NC MAb'unun tamamının yapılan immunoblotlama sonrasında 52 kD büyüklüğünde NC proteinine bağlandığı gözlemlendi. Diğer taraftan antikorların rekombinant NC ile 52 kD'dan büyük bantla reaksiyon vermesi, bu proteinlere ekli çoklu histidin kuyruğunun varlığına ilişkilendirildi (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. KKKAV-NC proteinine karşı elde edilen iki MAb (AH-NC3 ve AH-NC16) ile immunoblotting analizi. 1: KKKAV ile enfekte Vero hücre lizati; 2: pET-28a-NC lizati, 3: Protein merdiveni, 4: Vero hücre lizati, 5: Pet-28a-NC lizati; 6: Protein merdiveni. 1-3 hatlarda bulunan proteinler çalışmada üretilen AH-NC3, 4-5 hatlarda bulunan proteinler ise AH-NC16 ile lekelenmişlerdir.

3.2.9. KKKAV-NC Karşı Üretilen Antikorların İzotiplendirmesi

Thermo Rapid ELISA Mouse mAb Isotyping kit kullanılarak Heavy ve Light chain izotiplendirmesi yapıldı. Sonuca göre üretilen NC antikorların tamamının IgG1 izotipinde ve hafif zincirinin ise Kappa yapısında olduğu tespit edildi.



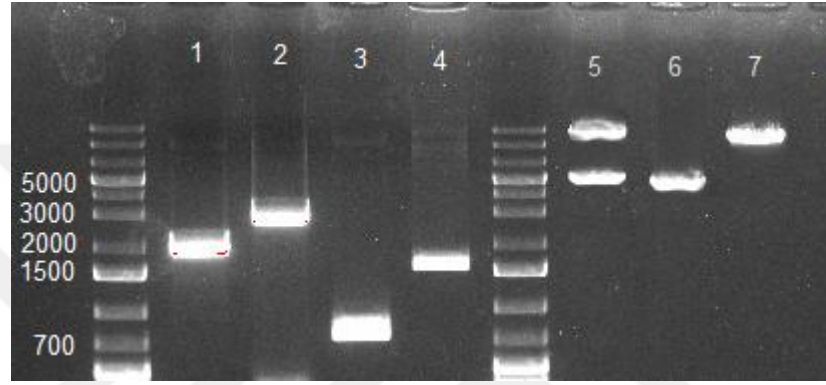
Şekil 3. 10. KKKAV-NC spesifik antikorların izotiplemesi için kullanılan Rapid ELISA Mouse mAb Isotyping Kit protokolü (Pierce, USA) ve yapılan test sonucu.

3.3. KKKAV GPC Spesifik Monoklonal Antikor Üretimi

3.3.1. KKKAV M segmenti Sentezi ve GPC Kodlayan Genin İfade Vektörüne Nakli

Fare için kodon optimizasyonu gerçekleştirilmiş hali ile ticari olarak sentezletirilen tam uzunluktaki M segmenti pUC57 taşıma vektörü içinde laboratuvara ulaştırıldı. Bu plazmid tasarlandığı şekilde Kpn I ve EcoRV restriksiyon enzimleri ile kesilerek 5000 bp uzunluktaki KKKAV-GPC kodlayan genin serbest

kalması sağlandı. Daha sonra aynı enzimlerle açılan pCDNA3.1/myc-hisA ökaryotik ifade vektörüne klonlanması başarıyla gerçekleştirildi. Elde edilen pCDNA3.1/myc-hisA+M plazmit koloni PCR kullanarak transforme bakterilerden seçildi. Pozitif koloniler plazmid ekstraksiyonundan sonra ve Kpn I ve EcoRV ile kesildi ve doğrulandı. Ayrıca farklı primer çiftleri ile yapılan PCR testleri ile M segmentin pCDNA3.1 içindeki varlığı tespit edildi (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. pCDNA3.1/myc-hisA+M konstraktın doğrulanması. 1: GC1934bp, 2: GN2840 bp, 3: GC3, 728bp, 4: Musin like 1517bp, M segmentin kontrolü için yapıdı, 5:pCDNA3.1/myc-hisA+M plasmidi Kpn I ve EcoRV restriksiyon enzimleri ile kesildi, 6:PCR ile doğrulamada 5000 bp spesifik M segment içeren bant elde edildi, 7; pCDNA3.1/myc-hisA+M EcoRV ile kesildi. Thermo Scientific™ O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, Ready-to-Use - 75-20,000 bp- DNA ladder olarak kullanıldı.

3.3.2. Hayvanların pCDNA3.1/myc-HisA+GPC ile İmmünizasyonu

Bu amaçla adjuvanlı ve adjuvansız olacak şekilde 2 grup fare pCDNA3.1/myc-hisA+GPC ile immünize edildi. İmmünizasyon için 20µg antijen ilk injeksiyonda ve ikinci ve üçüncü immünizasyon'da ise 10ug immünojen 50 veya 100µl içinde suspansiyon içerecek şekilde PBS ile seyreltildi ve intrasplenik olarak uygulandı. İmmünizasyonun 12. günü alınan kan serumu örneklerinde immünojene özgül antikor sentezlenip sentezlenmediği, M segment tarafından kodlanan prekürsör proteini sürekli ifade eden transforme BHK21-GPC hücrelerinde gerçekleştirilen IIFT ile kontrol edildi. Yapılan kontrollerde pCDNA3.1/myc-hisA+GPC ile immünize edilen her iki hayvanda da antikor oluştuğu tespit edildi. İmmünizasyon

başlangıcı ve deney sonlanması arasında hayvanların vücut ağırlığında ortalama %10 azalma olduğu tespit edilmedi (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. İmmunize edilen farelere ilişkin vital veriler.

Fare No	İmmunojen	Vücut Ağırlığı (g)			IIFT	Deney sonu
		Başlangıç	Bitiş	Fark		
1	NC+Adj	19,8	18,2	-1,6	Pozitif	Canlı
2	NC+Adj	20	19,1	-0,9	Pozitif	Canlı
3	NC	21,1	19	-2,1	Pozitif	Canlı
4	NC	20,7	19	-1,7	Pozitif	Canlı
5	GPC+Adj	21,5	20,5	-1	Pozitif	Canlı
6	GPC+Adj	21	19,2	-1,8	Pozitif	Canlı
7	GPC	20,6	18,9	-1,7	Pozitif	Canlı
8	GPC	21,1	19,7	-1,4	Pozitif	Canlı

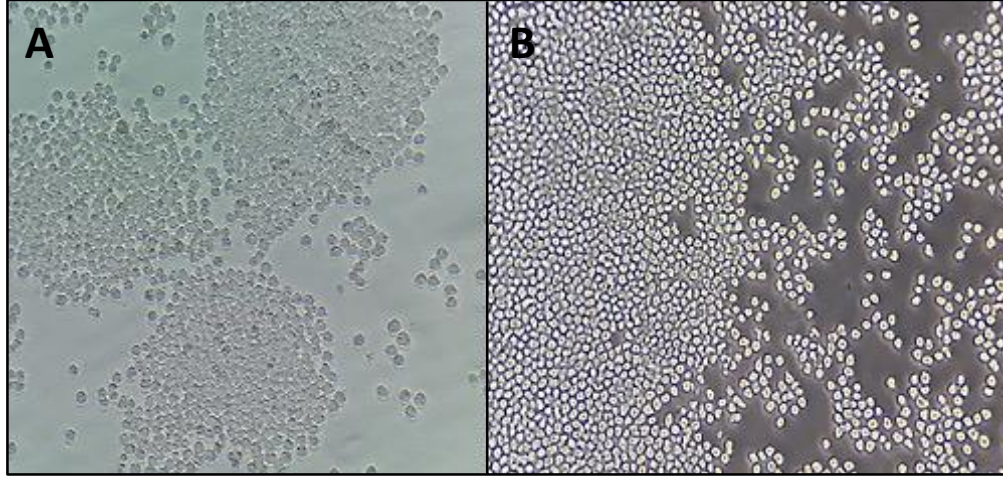
3.3.3. KKKAV-GPC ifade Eden Stabil BHK21-C13 Hücre Hazırlanması

Bölüm 3.2.3'te tarif edildiği şekilde pCDNA3.1/myc-HisA+GPC lipofektamin yardımıyla BHK-21 hücrelerine transfekte edildi ve transfeksiyon sonrası BHK-21 hücreleri kültür medyumunu Genetisin (G418) içeren DMEM ile kültüre edildi. Genetisin rezistansı olmayan BHK-21 hücrelerinin öldüğü ancak rezistan olanların çoğaldığı gözlemlendi. Genetisin varlığında ölmeksizin çoğalan BHK21 hücrelerine toplam 6 subkültür sonunda ulaşıldı. Bu hücreler hem farelerde immünizasyon sonrası oluşan bağışık yanıtın ve hem de hybridoma hücrelerinden KKKAV-M proteinine karşı antikor üretilmesinin doğrulamasında kullanıldı.

3.3.4. KKKAV-GPC'e Karşı Hibridoma Geliştirilmesi

KKKAV-NC'ye karşı hybridoma eldesinde anlatıldığı şekilde hazırlanan fare makrofaj hücreleri kullanılarak hazırlanan 24-gözlü tabletlere füzyon protokolü uygulanan F0 myeloma ve dalak B lenfosit hücreleri yerleştirildi ve koloni oluşumları yönünden kontrol edildi. Oluşan koloniler 24-gözlü tablettten alınarak her koloni bir göze yerleşecek şekilde 96-göz tablete aktarıldı. Medyum pH'sına göre

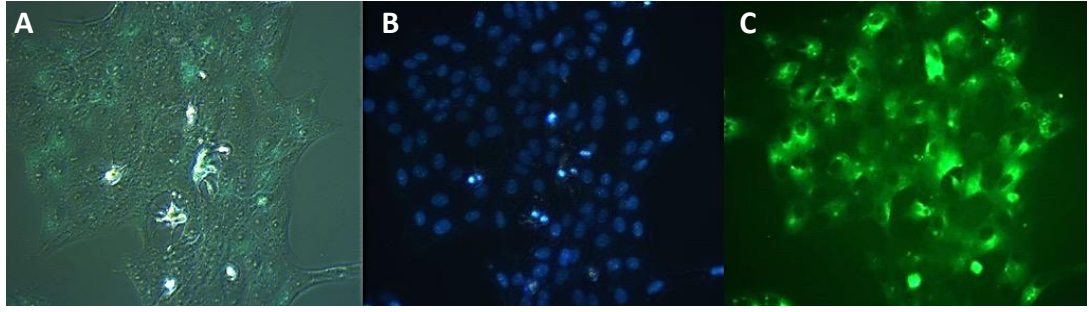
antikor üretimleri kontrol edildi. Yeterince düşük pH gösteren tablet gözlerinden alınan süpernatant örnekleri immünizasyonda kullanılan antijenlere spesifik antikor içerikleri açısından kontrol edilmek için toplandı (Şekil 3.12). Bu basamakta toplam 25 adet koloni belirlenerek antikor içerikleri yönünden takibe alındı. Bu klonlar AH-GPC-1 ile AH-GPC-25 arasında olacak şekilde kodlanarak IIFT'e tabi tutuldu.



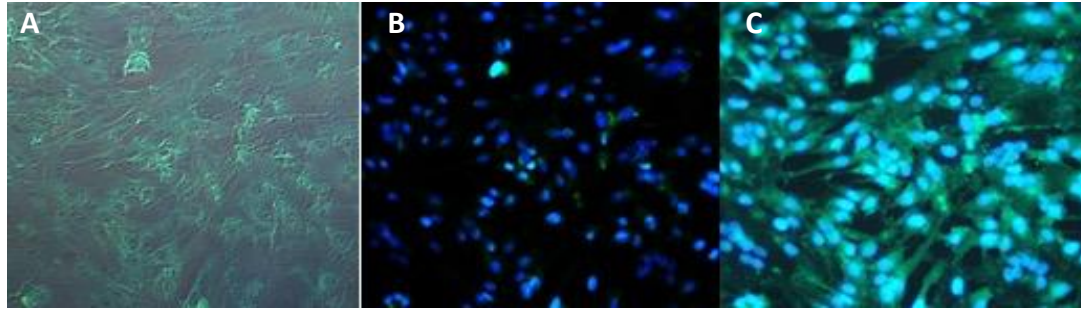
Şekil 3.12. A ve B : KKKAV-GPC ifade eden plazmid ile immünize edilen farelerin dalaklarından hibridoma teknolojisi kullanarak elde edilen hibrit hücre kolonileri.

3.3.5. Hibridomaların GPC spesifik Antikorlar Yönünden İndirekt İmmün Floresan Testi (IIFT) ile Kontrolü

Stabil olarak KKKAV-GPC ifade eden fikze edilmiş BHK21-C13 hücreleri üzerinde yapılan IIFT sonrasında kodları daha önce verilen 25 klondan 17 tanesinin KKKAV-GPC reaktif antikor sentezleyen hibrit hücreler oldukları doğrulandı. Antikor sentezlediği saptanan klonlar AH-GPC1, AH-GPC2, AH-GPC3, AH-GPC4, AH-GPC5, AH-GPC6, AH-GPC7, AH-GPC8, AH-GPC14, AH-GPC15, AH-GPC16, AH-GPC17, AH-GPC25, AH-GPC27, AH-GPC28, AH-GPC29 ve AH-GPC32 olarak kaydedildi. Bunlardan iki tanesine (AH-GP14 ve AH-GP15) ait IIFT görüntüleri Şekil 3.13 ve Şekil 3.14'de sunuldu.



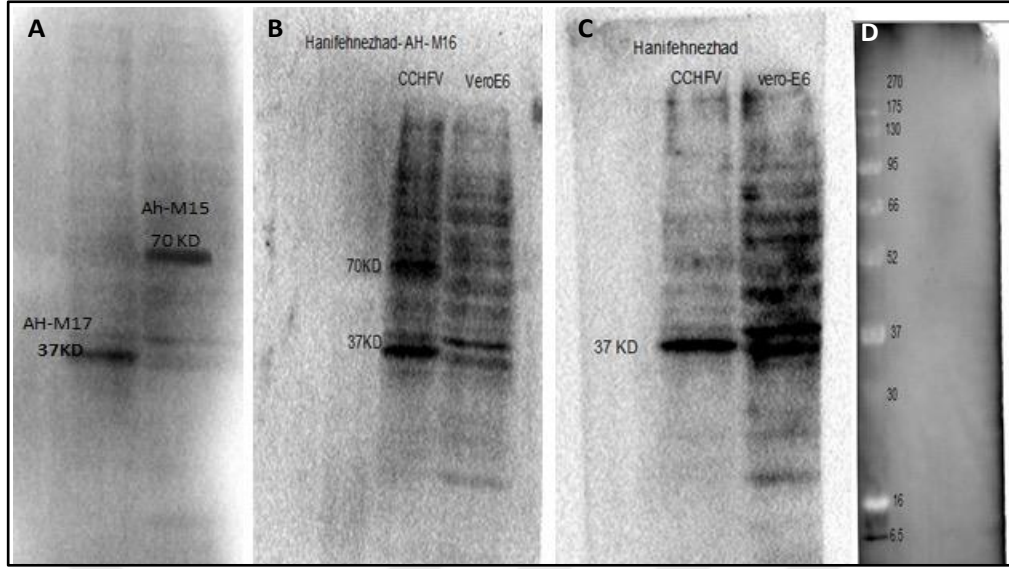
Şekil 3.13. KKKAV GPC proteinine karşı AH-GPC14 kodlu klondan elde edilen antikorların, BHK-21-GPC hücrelerinde IIFT ile tespiti. A) Işık mikroskobu (x40); B) Dapi boyama (X40) ; C) Floresan mikroskobu (x40).



Şekil 3.14. KKKAV GPC proteinine karşı AH-GPC15 kodlu klondan elde edilen antikorların, BHK-21-GPC hücrelerinde IIFT ile tespiti. A) Işık mikroskobu (x40); B) Dapi boyama (X40) ; C) Floresan mikroskobu (x40).

3.3.6. Üretilen KKKAV-GPc Antikorlarının Denatüre Viral Proteinlere Spesifitesi

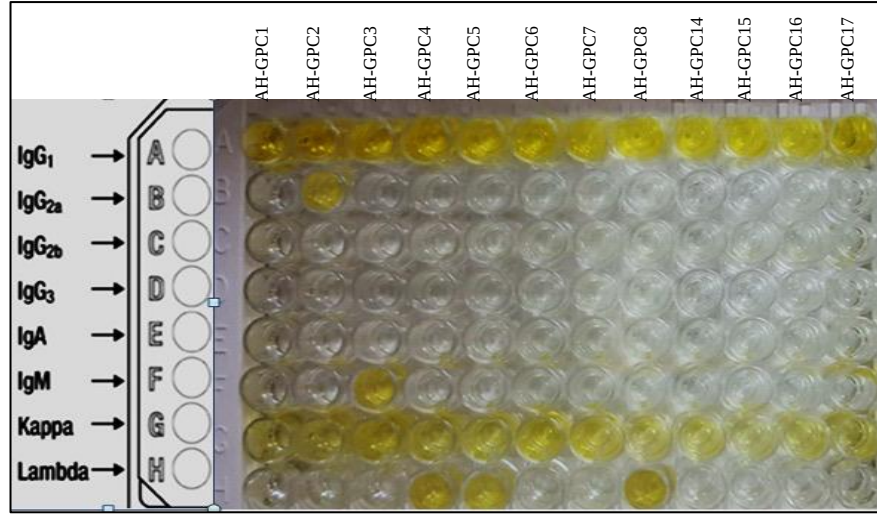
Antikor ürettiği belirlenen 17 klonun Vero-E6 hücrelerinde üretilerek saflaştırılan ve denatüran jel ortamında SDS-PAGE tekniği ile ayrıştırılan KKKAV proteinleri ile immunoblot analizi yapıldı. Böylelikle ökaryotik hücrede virus çoğalması sonrası proteolitik proses ile Gn ve Gc olarak sindirilen GPC üzerindeki reaktiviteleri tespit edildi (Şekil 3.15). Antikor sentezleyen 17 klonun 7 tanesi Gn, 8 tanesi Gc spesifik olarak bulunurken 2 adet klonun her iki viral proteine karşı reaktif olduğu tespit edildi.



Şekil 3.15. KKKAV-GPC proteinine karşı hybridoma hücrelerinden üretilen antikorların immünblotlama görüntüsü. **A)** Hat 1- 37Kd Gn spesifik AH-GPC17, Hat 2- 70Kd Gc spesifik AH-GPC15; **B)** Hat 1- 37 ve 70 kD büyüklükteki Gn ve Gc spesifik AH-GPC16, Hat-2 Vero hücresi; **C)** Hat 1- 37kD büyüklükteki Gn AH-GPC14, Hat-2 Vero hücresi **D)** : Prime-Step™ Prestained Broad Range Protein Ladder (773301).

3.3.7. KKKAV-GPC Antikorlarının İsoptiplendirmesi

Thermo Rapid ELISA Mouse mAb Isotyping kit kullanılarak ağır ve hafif zincir isoptiplendirmesi yapıldı. Sonuca göre üretilen antikorların çoğunluğunun IgG1 (15 adet), 1'er tanesinin ise IgG2a ve IgM izotipine sahip olduğu ortaya konuldu (Şekil 3.16). Diğer taraftan hafif zincir yapısının ise 14 tanesinde Kappa ve 3 örnekte Lambda olduğu tespit edildi (Çizelge 3.2).



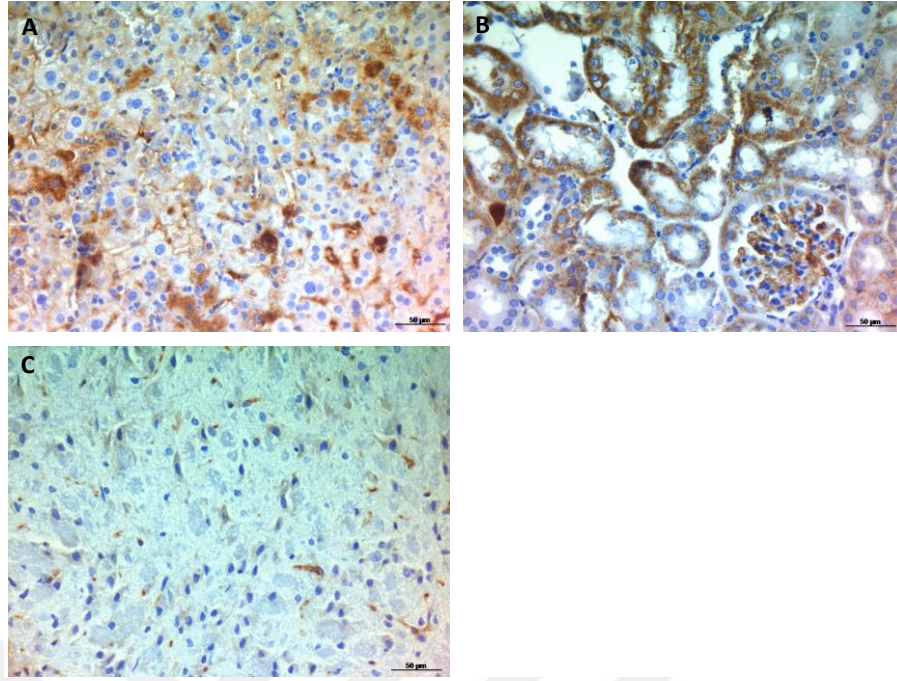
Şekil 3.16. KKKAV-GPC antikorlarına ait Rapid ELISA Mouse mAb Isotyping Kit (Pierce, ABD) ile yapılan izotiplendirme sonucu.

3.4. Virus Nötralizasyon Testi (VNT)

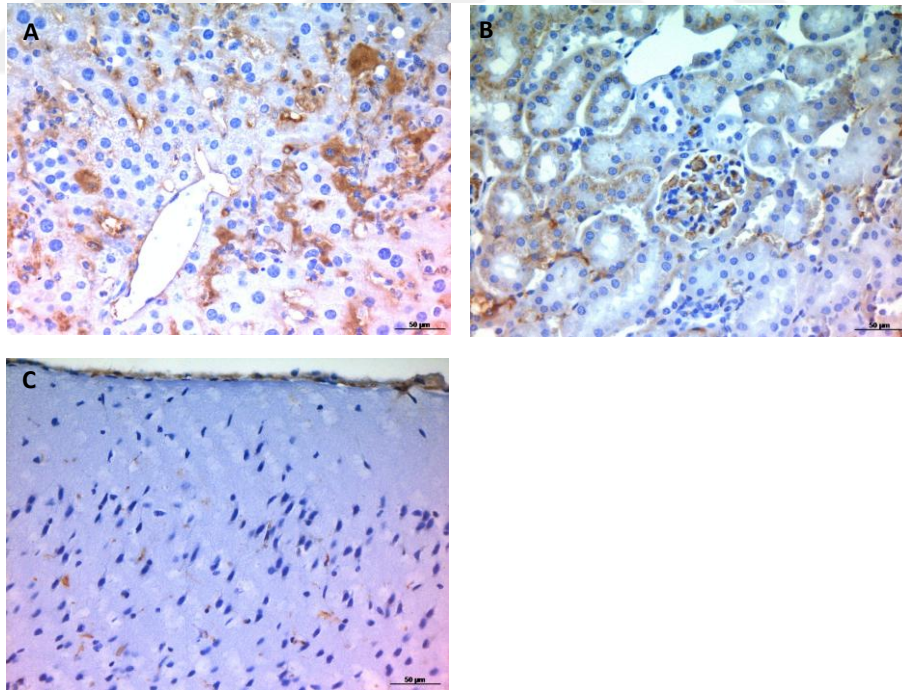
Yapılan VNT sonrasında KKKAV-NC proteinine karşı üretilen 5 MAb'un hiç birisi beklendiği gibi nötralizan karakterli bulunmadı. Diğer taraftan virusun GPC'e karşı üretilen antikorlardan 10 tanesinin nötralizan karakterli olduğu saptandı. Bu örneklerin 2 tanesinin hem Gc ve hem de Gn, kalan 8 adedinin ise sadece Gc ile reaktif oldukları yapılan immunblotlama sonunda tespit edildi (Çizelge 3.2).

3.5. İmmünohistokimya (IHC)

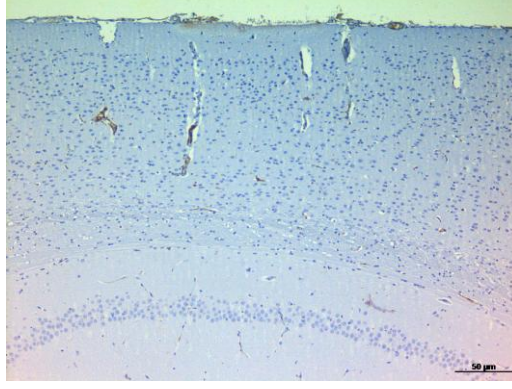
IFNAR-/- farelerin KKKAV ile yapılan deneysel enfeksiyonu sonrasında bu hayvanlara ait dokulardan hazırlanan kesitler araştırma kapsamında üretilen monoklonal antikorların tamamı ile IHC boyamasına tabi tutuldu. Farklı derecelerde de olsa preparatların tamamının üretilen antikorlar tarafından spesifik olarak boyandığı gözlemlendi. Üç farklı antikor ile değişik dokularda yapılan KKKAV antijen takibi sonuçları aşağıda Şekil 3.17 - 3.19'da sunuldu.



Şekil 3.17. AH-GPC16 ile gerçekleştirilen IHC sonuçları, X40 büyütme. A) Karaciğer; B) Böbrek; C) Beyin. Resimlerdeki bar 50µm uzunluğu göstermektedir.



Şekil 3. 18. AH-GPC17 ile gerçekleştirilen IHC sonuçları, X40 büyütme. A) Karaciğer; B) Böbrek; C) Beyin. Resimlerdeki bar 50µm uzunluğu göstermektedir.



Şekil 3.19. AH-NC9 ile beyin dokusundan gerçekleştirilen IHC sonucu, X40 büyütme.



Çizelge 3.2. Araştırmada elde edilen mAb'ların yapısal ve fonksiyonel özellikleri.

MAb	Hedef	Antikor		VNT	IIFT	IHC
		İzotip	Hafif Zincir			
AH-NC3	NC	IgG1	κ	-	+	+
AH-NC9	NC	IgG1	κ	-	+	+
AH-NC11	NC	IgG1	κ	-	+	+
AH-NC16	NC	IgG1	κ	-	+	+
AH-NC19	NC	IgG1	κ	-	+	+
AH-GPC1	Gc	IgG1	κ	+	+	+
AH-GPC2	Gc	IgG2a	κ	+	+	+
AH-GPC3	Gn	IgM	κ	-	+	+
AH-GPC4	Gn	IgG1	λ	-	+	+
AH-GPC5	Gc	IgG1	λ	+	+	+
AH-GPC6	Gn	IgG1	κ	-	+	+
AH-GPC7	Gc	IgG1	κ	+	+	+
AH-GPC8	Gn	IgG1	λ	-	+	+
AH-GPC14	Gc	IgG1	κ	+	+	+
AH-GPC15	Gc	IgG1	κ	+	+	+
AH-GPC16	Gc+Gn	IgG1	κ	+	+	+
AH-GPC17	Gn	IgG1	κ	-	+	+
AH-GPC25	Gn	IgG1	κ	-	+	+
AH-GPC27	Gc	IgG1	κ	+	+	+
AH-GPC28	Gc	IgG1	κ	+	+	+
AH-GPC29	Gc+Gn	IgG1	κ	+	+	+
AH-GPC32	Gn	IgG1	κ	-	+	+

4. TARTIŞMA

Son 20 yılda, KKKA sirkülasyon aralığı ve tanımlanan KKKA vakalarının toplam sayısı istikrarlı bir şekilde artmaktadır. Bu artışa, birden fazla KKKAV suşunu hedef alan moleküler teşhis metotları, terapötikler ve ayrıca coğrafi bölge içinde birlikte dolaşan birden fazla suş neden olmaktadır. Monoklonal antikorlar hayvan modellerinde ve hastalarda viral enfeksiyonlara karşı koruyucu etkinlik göstermelerine rağmen, etkileri genellikle tek bir viruse veya belirli bir suşa spesifik olarak bilinmektedir (Zivece ve ark., 2017). Ayrıca, meta analizler sonucunda, KKKA hastalarını tedavi etmek için mevcut olan profilaktik ve terapötik seçenekler, net klinik fayda göstermeyen antiviral ilaç ribavirin uygulaması ile sınırlı olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, KKKA'nın artan halk sağlığı tehdidine karşı yeni KKKA terapötiklerinin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır (Estrada ve ark., 2015). Son yıllarda, araştırmacılar tarafından poliklonal ve monoklonal antikorlar veya kombinasyonlarının, KKKA ile enfekte olmuş hayvanlarda uygulandığı ve ölümcül hastalığa karşı koruyucu oldukları bildirilmiştir (Cross ve ark., 2016 ve Zeitlin ve ark., 2016).

Bu tez çalışmasında, KKKA virusüne karşı hybridoma teknolojisi kullanarak monoklonal antikorların üretimi amaçlandı. Çalışma kapsamında kullanılan yöntem ile herhangi bir viral epitopa spesifik hedeflenmiş (konformasyon bağımlı ya da bağımsız) antikorların elde edilebilmesinin mümkün olduğu görüldü. Ancak temel hedef öncelikli olarak nötralizan antikorların elde edilebilme potansiyelini sorgulamaktı. Bu ana hedef yanında çalışma kapsamında elde edilen tüm antikorların ağırlıklı olarak tanısal kullanım olasılıkları yönünden incelendi ve sonuçlar bildirildi.

Monoklonal antikor üretimi için farklı immünizasyon programları önerilmektedir. Konvansiyonel immünizasyon ile monoklonal antikor elde etmek için 2 hafta aralıkla 3 ve/veya 6 enjeksiyon intramusküler, intraperitoneal veya subkutan olarak yapılmaktadır. Ancak tüm bu farklı programlar son enjeksiyonun intravenöz (i.v.) yolla yapılmasının daha etkili olduğunu ve son enjeksiyondan üç ila

dört gün sonra hayvan öldürölüp ve dalak hücreleri füzyon için kullanılmasının etkili olduğunu göstermektedir. Ayrıca serumda yüksek titrede spesifik antikor gösteren hayvanlardan alınan dalak hücreleri, en iyi hibridomaları üretmektedir.

Standart immünizasyon prosedürleri ve ayrıca kas içi veya gen tabancası DNA immünizasyon ile karşılaştırıldığında, dalak içi immünizasyon çok erken antikor yanıtı alınması ve B hücrelerin kolonizasyonuna neden olması sebebiyle, zaman kazandıran ve güçlü monoklonal antikor üretimi ile sonuçlanan bir teknik olarak tanımlanabilir. Spesifik hibridomalar oluşturmak için; immünizasyon yapılan hayvanlardan alınan dalak hücreleri, son immünizasyondan en geç 5 gün sonra füzyona tabi tutulmalıdır ancak Velicovsky ve ark. (2000), yaptıkları araştırmada intrasplenik immünizasyon (SSI) yoluyla spesifik monoklonal antikorları, 25 gün son enjeksiyondan sonra bile elde etdiklerini ve p18 proteinini kodlayan genin dalakta en az 20 gün eksprese edildiğini bildirmişlerdir.

Bu tez çalışmasında immünoaktif B hücrelerine odaklanarak ve yukarıdaki bilgiler ışığında hareket ederek, KKKAV'un S segment tarafından kodlanan nükleokapsit (NC) ve M segment tarafından kodlanan protein prekürsörleri (GPC) için çok erken, zaman kazandıran, spesifik ve güçlü monoklonal antikor elde etmeyi planladık. Bu sayede fareler ilk immünizasyon'da 20µg, ikinci ve üçüncü immünizasyonda 10µg olarak KKKAV'un S segmentini kodlayan pCDNA3.1/myc-hisA +NC ve KKKAV'un M segmentini kodlayan pCDNA3.1/myc-hisA+M İfade plazmitleri ile 11 gün boyunca 3 kez (0, 3, 11) intrasplenik olarak immünizasyona tabi tutuldular. Enjeksiyon sonrası 13'üncü gün füzyon yapıldı ve hybridoma teknolojisi kullanılarak hedef antijenlere spesifik 5 adet NC spesifik klon ile 17 adet GPC klonu elde edildi. Söz konusu uygulama ile hazırlanan immunojen tasarımlarının etkin ve doğru olduğu ve ayrıca uygulama sırasında asepsi ve antisepsi kurallarına uyulduğu noktada diğer immünizasyon prosedürlerine göre oldukça etkin bir bağışıklama yolu olduğu sonucuna varıldı.

İmmünizasyon için kullanılan farelerde dalak içi bağışıklama protokolü sonrasında herhangi kilo kaybı dışında herhangi bir yan etki tespit edilmedi. Yapılan değerlendirmelerde 13 günlük immünizasyon süresi sonunda aşılama gruplarında bireysel olarak % 4,5-9,9 arasında değişen vücut ağırlığı kaybı tespit edildi. Bu durumun yapılan aşılamalardan ziyade uygulamanın doğası gereği her hayvanda tekrarlayan anestezi ve laparotomi operasyonları ile ilişkili olduğu sonucuna varıldı. Benzer tablo operasyon yapılmasa dahi birçok anestezi uygulaması sonrasında deneme hayvanları için tanımlanan en önemli yan etki olarak tanımlanmaktadır (Yamada ve ark., 2022).

Spitz ve ark. (1984) ve Velikovsky ve ark. (2000), çok kısa bir immünizasyon süresi kullanarak ve hayvanın antikor tepkisinden bağımsız olarak iyi bir hibridoma üretimi elde etmenin mümkün olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, tek bir intrasplenik antijen enjeksiyonundan ve antijen olarak 1 µg'dan az soluble protein kullandıktan üç gün sonra, spesifik IgG veIgM monoklonal antikor elde ettiklerini, ancak, en iyi ve daha tutarlı sonuçları 10 ve 20 µg antijen kullanılması ile elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada ise Stephen ve ark. (2011), akut myeloid leukemia'ya karşı monoklonal antikor elde etmesi için 50 µg antigen kullanarak farelerin 0,4,11'inci günlerde dalaklarına intrasplenik olarak enjeksiyon yaptıkları yöntemi tanımlamışlardır.

İnasrasplenik (dalak içi) immünizasyon, CXCR5-CXCL13 kemokin yolağını aktive ederek, immünoreaktif lenfositlerin dalak içerisine taşınması amacıyla yapılmaktadır. CXCR5-CXCL13 kemokin yolağı, naive B hücrelerinin ve T hücrelerinin ikincil lenfoid doku folikülleri olarak tanımlanmakta olup, germinal merkezlerde foliküller yardımcı T hücrelerin lokalizasyonunu sağlamasının yanı sıra yüksek affiniteli B hücrelerin olgunlaşmasıyla, plazma ve bellek B hücrelerinin farklılaşmasında da kritik rol oynamaktadır. CXCR5 ve CXCL13 arasında meydana gelen etkileşim, T ve B hücrelerinin lenfoid organlara girişini sağlamakla beraber yüksek düzeyde bağışık yanıt meydana getirmektedir (Forster ve ark., 1996 ve Hsieh ve ark., 2022).

Çalışma kapsamında nükleokapsit proteinine karşı antikor üreten 5 hibridoma klonu elde edildi. Bu klonlar tarafından üretilen antikorların tamamı IgG1 izotipinde ve hafif zincirlerinin ise Kappa yapısında olduğu tespit edildi. Yapısal olarak IgG1 izomerlerinin fleksibilitelerinin daha yüksek olduğu ve bu nedenle de hedef antijene bağlanma oranlarının daha yüksek olduğu bildirilmektedir (Beers ve ark., 2016). Tamamlanan çalışma kapsamında elde edilen antikorlarla natif veya denatüran ortamlarda yapılan tüm antijen bağlantı reaksiyonlarından yüksek verim elde edilmesi bu temel verilerle uyumlu bulunmuştur.

Yapılan VNT sonrasında KKKAV-NC proteinine karşı üretilen 5 MAb'un hiç birisi nötralizan karakterli bulunmadı. Bilindiği üzere nükleokapsit proteini virionun zarfı altında yer alan ancak virionun protein yapısının büyük kısmını oluşturan önemli bir komponenttir (Carter ve ark., 2012 ve Zivcec ve ark., 2018). Bu nedenle nötralizan antikorların hedefi olması beklenemeyeceği gibi, bu proteinlere spesifik antikorların da nötralizan olması beklenmemektedir.

Nükleoprotein antikorlarının KKKAV'nü nötralize etmeseler de koruyuculukta çok önemli oldukları yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur. Özellikle T hücre aracılı bağışıklığın daha etkin şekilde işlerlik kazandığına ilişkin bilimsel veriler ışığında bu protein ile aşılama stratejileri ve takiben koruyuculuk çalışmaları yapılmıştır (Zivcec ve ark., 2018). Her ne kadar bu araştırma kapsamında geliştirilen antikorların terapötik veya pasif bağışıklama kapasitelerinin sorgulanması amaçlanmamış olsa da araştırma grubumuz tarafından daha önce yapılan çalışmalarda bu proteinin koruyucu etkisi farklı aşı platformları ile gösterilmiştir (Aligholipour ve ark., 2019a; Aligholipour ve ark., 2019b ve Aligholipour ve ark., 2019c).

Sunulan tez çalışması kapsamında KKKAV GPC için 17 klon elde edilmiş ve bunlardan farklı yapılarda GPC spesifik antikor üretilmesi gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda üretilen antikorların çoğunluğunun IgG1 (15 adet), 1'er tanesinin ise IgG2a ve IgM izotipine sahip olduğu ortaya konuldu. Diğer taraftan hafif zincir yapısının ise 14 tanesinde Kappa ve 3 örnekte Lambda olduğu tespit edildi.

Çalışmamızda izotiplendirme sonunda özellikle IgM sınıfı olarak identifiye edilen AH-GPC3 kodlu antikorun eş zamanlı olarak daha düşük dansitede IgG1 reaktivitesi verdiği de görüldü. Bu durumun iki nedenden oluşabileceği sonucuna varıldı. Bunlardan ilki bu antikorları sentezleyen klonun hala yeterince klonlanmadığı, kültür ortamının heterojen hücre yapısına sahip olduğu, dolayısıyla da her iki izotipin eş zamanlı üretimi söz konusu olduğudur. İkinci olasılık ise hibridomaların, subkültürleri paralelinde, kültür süresi uzadıkça imunglobulinler izotop sınıfında değişim meydana gelmektedir. İzotip değiştirme, izotipik komütasyon veya sınıf değiştirme rekombinasyonu (Class switch recombination - CSR) olarak da bilinen immunoglobulin sınıf değiştirmesi, bir B hücresinin immünoglobulin üretimini, izotip IgM'den izotip IgG'ye olduğu gibi bir türden diğerine değiştiren biyolojik bir mekanizmadır. Bu işlem sırasında, antikor ağır zincirinin sabit bölge kısmı değiştirilir, ancak ağır zincirin değişken bölgesi aynı kalır. Antikorun değişken bölgesi değişmediğinden, sınıf geçişi antijen özgüllüğünü etkilememektedir. Bunun yerine, bu antikorlar aynı antijenler için afiniteyi korurken farklı efektör moleküllerle de etkileşime girebilmektedir (Bauer, 2021).

GPC spesifik antikorlarda da NC antikorlarında tespit edildiği üzere, en yüksek oranda IgG1 izotipi bulunması bunların geniş bir reaktivitede antikorlar olduğunu ifade etmektedir. Özellikle daha korunaklı ve hedef epitop ile özel şartlarda reaktif olduğu bilinen IgG2a izotipi AH-GPC2 kodlu klonda tespit edilmiştir. Bilindiği üzere IgG2 molekülleri karbonhidrat antijenleri tarafından indüklenmekte ve antijen ile reaktiviteleri düşük affinitelidir (Beers ve ark., 2016 ve Correia, 2010). Bu nedenle bu antikorla ilişkili olarak kullanıma yönelik planlamaların bu özellikler doğrultusunda özenle değerlendirilmesi zorunluluğu bulunmaktadır.

Çalışma kapsamında KKKAV-GPC 17 klonun 7 tanesi Gn, 8 tanesi Gc spesifik olarak bulunurken 2 adet klonun her iki viral proteine karşı reaktif olduğu tespit edildi. Çalışma kapsamında M segment tarafından kodlanan GPC bir bütün olarak ökaryotik ifade plazmiti ile immunojen olarak hayvanlara inokule edildi. KKKAV biyolojisinden hatırlanacağı üzere proprotein prekürsör serin temelli bazı proteolitik enzimler tarafından öncü Gn ve öncü Gc proteinlerine ayrıştırılmakta, sonrasında ise

hücre için modifikasyonlar ile virionda sergilendiği üzere nihai Gn ve Gc proteinlerine evrilmektedir (Sanchez ve ark., 2006 ve Vincent ve ark., 2003). Geliştirilen antikorlarla bu farklı sonuçların alınmasının iki önemi vardır. Bunlardan ilki aslında tasarlanan GPC ifade eden ökaryotik plazmitin virus biyolojisine uygun bir hücresel üretim sergilediğidir. Diğeri ise bu biyolojik sürece paralel olarak bağımsız epitopların immün sistem üzerindeki uyarımı sağlıklı olarak gerçekleştirildiğidir.

Araştırmada geliştirilen 2 hibridoma klonunun her iki viral glikoproteine (Gn+Gc) reaktif antikor üretiyor olmasının nedeninin daha ileri düzeyde yapılacak epitop haritalama (epitop mapping) uygulamaları ile açıklanabilmesi yüksek olasılık dahilindedir (Shalitanati ve ark., 2018 ve Zhang ve ark., 2019).

KKKA virusu konak hücreler ile olan ilişkisini yüzey glikoproteinleri aracılığı ile kurmaktadır. Bu yüzey yapılarının spesifik antikorlarla bloke edilmesi doğrudan virus ataçmanını engelleyen bir uygulamadır. Yapılan çalışmalar Gc proteinin viral nötralizasyondan primer düzeyde sorumlu olduğunu ifade etse de Gn proteininin de özellikle bağışıklamalardan sonra yapılan koruyuculuk çalışmalarında önemli bir yüzey proteini olduğunu ortaya koymaktadır (Fels ve ark., 2021; Zhang ve ark., 2019 ve Zivcec et al., 2017). Çalışma kapsamında yapılan VNT sonrasında virusun GPC'e karşı üretilen antikorlardan 10 tanesinin nötralizan karakterli olduğu saptandı. Bu örneklerin 2 tanesinin hem Gc ve hem de Gn, kalan 8 adedinin ise sadece Gc ile reaktif oldukları yapılan immunblotlama sonunda tespit edildi. Elde edilen VNT testi sonuçları ile immunoblotlama testleri sonrasında saptanan epitop spesifitelerinin sonuçlarının birbiri ile korrelasyon gösterdiğini belirtmek isteriz.

Araştırmada üretilen antikorlar kullanılarak virusun natif formu, rekombinant proteinleri ve denatüre edilmiş proteinlerinin de yer aldığı geniş bir yelpazede reaktivite değerlendirmeleri yapıldı. Özellikle stabil olarak NC ve GPC ifade eden BHK-21 C13 hücrelerinde yapılan IIFT ile IHC uygulaması sonunda elde edilen antikorların yüksek affiniteli bağlanma yeteneği gösterildi. Diğer taraftan, immunoblotlama tekniği ile denatüre edilmiş viral ve hücresel proteinler arasından

spesifik olarak hedef proteinlerine bağlanma özelliği de ortaya konuldu. Tüm bu özellikler geliştirilen antikorların konformasyon zorunluluğu olmaksızın kendilerine spesifik epitoplara bağlanabileceği şeklinde yorumlandı. Bu özellikleri ile araştırmada geliştirilen NC ve GPC spesifik antikorların üst düzeyde epitop reaktivite yeteneklerinin olduğu ve bu nedenle de tanısal amaçla kullanımlarının uygun olabileceği sonucuna varıldı.

Elde edilen monoklonal antikor portföyünün test edilmesi gereken bir diğer önemli alan ise bunların tek (NC veya GPC) veya çok hedefli (NC+GPC) olarak terapötik etkinliklerinin sorgulanmasıdır. Tamamlanan doktora çalışmasının böyle bir nihai hedefi olmaması sebebiyle söz konusu etkinlik çalışmaları gerçekleştirilmemiştir. Antikor tedavileri özellikle tanımlanmış etkin tedavi rejimi ve aşısı olmayan viral hastalıklara karşı zaman zaman başvurulanan önemli alternatifler olarak güncelliğini korumaktadır.

Antikor tedavisi, insan KKKA'nın birkaç örneğinde denenmesine rağmen az miktarda başarı gösterdiği bildirilmektedir, ancak etkinliği büyük veya randomize edilmiş klinik çalışmalarda değerlendirilmemiştir. Ayrıca fare çalışmaları, antikorların KKKA'den korunmada önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur. Elde edilen veriler, antikor tedavisinin KKKA'ya karşı etkili bir tedavi olabileceğini düşündürse de cevaplandırılması gereken birtakım sorular vardır (Dowall ve ark, 2016).

Fare çalışmaları, GPC olarak ifade edilen KKKAV'un glikoproteinlerine karşı bağışıklık tepkilerinin koruma için önemli olduğunu, ancak kısmi GPC alt birimlerine karşı bağışıklık tepkilerinin ise ölüm süresini geciktirdiğini göstermektedir (Kortekaas ve ark., 2015). Bununla birlikte, GPC geni, nükleokapsid proteini (NC) ve viral RNA'ya bağımlı RNA-polimeraz (L) gibi diğer viral proteinlerden genetik olarak daha değişkendir. Kodlanmış yüzey glikoproteinleri, aynı bölgede var olan suşlar arasında amino asit seviyesinde %25'in üzerinde değişiklik gösterebilmektedir. Bu nedenle GPC'nin, özellikle virusun heterolog

suşları eşzamanlı dolaşımında olduğunda, bağışıklık sistemi veya antikor tedavisi için zor bir seçenek olduğu bilinmektedir (Zivcec ve ark., 2017).

Bir başka çalışmada KKKAV, IbAr 10200 suşuna karşı bir murin monoklonal antikor paneli üretilmiş ve bu antikorların birçoğu pre-Gn kompleksini veya Gc proteinini hedef aldığını göstermiştir. Gc bölgesini hedef alan antikorların çoğu nötralize edici aktiviteye sahip olduğu belirtilerek nötralize eden ve etmeyen monoklonal antikorlar neonatal fareleri ölümden koruduğunu göstermişlerdir. Araştırmacılar, nötralize edici özelliğe sahip olmayan (non-neutralizing) antikorların yetişkin fareleri KKKAV'una karşı koruduğunu ve evrensel olarak GP38 proteinini hedeflediğini bildirmişlerdir (Golden ve ark., 2019).

Başka bir çalışmada araştırmacılar KKKAV'nin Gn ve Gc glikoproteinlerine karşı geliştirdikleri monoklonal antikorlar için *in vitro* nötralizasyon testleri ve *in vivo* koruyuculuk testleri yapmışlardır. Bu çalışma sonucunda Gc'ye karşı geliştirilen monoklonal antikorların nötralizan etkiye sahip oldukları, Gn'e karşı geliştirilen monoklonal antikorların ise *in vitro* sistemde nötralizan etki göstermediği bildirilmiştir. Ancak aynı çalışmada Gc'ye karşı geliştirilen monoklonal antikorların aksine Gn'e karşı geliştirilen monoklonal antikorlar *in vivo* olarak fareleri öldürücü dozdan koruduğu bildirilmiştir (Berlotti-Ciarlet ve ark., 2005).

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Araştırma kapsamında dalak içi enjeksiyon ile gerçekleştirilen DNA bağışıklaması sonunda KKKAV'un NC ve GPC proteinlerine toplamda 22 adet monoklonal antikor üretildi. Bu antikorların üretimi ve karakterizasyon süreci sonunda,

- 1- Monoklonal antikor üretimine ilgili olarak, intrasplenik (dalak içi) immünizasyon ile kısa sürede ve etkin bir bağışıklama oluşturulduğu,
- 2- Bu yöntemler ile çok etkin B yanıtı zenginliği olan bağışıklamanın elde edildiği,
- 3- Geliştirilen hibrit klonların in vitro yaşam kalitesi ve antikor sentezi yeteneğinin yüksek olduğu,
- 4- Araştırmada 5 adet NC spesifik ve 17 adet GPC spesifik antikor elde edildiği,
- 5- Antikorların ağırlıklı olarak IgG1 izotipinde olduğu özellikle GPC spesifik antikorlar arasında IgG2a ve IgM izotipinde antikorların da bulunduğu,
- 6- Antikorların viral proteinlere natif veya denatüran ortam şartlarında yüksek affinite ile bağlandığı,
- 7- GPC ile immünize edilen hayvanlardan elde edilen hibridomalardan 10 tanesinin nötralizan antikor ürettiği, bunların da Gc (8 adet) ve Gn+Gc (2 adet) proteinlerine spesifik olduğu,
- 8- Geliştirilen tüm antikorların farklı tekniklerin kullanılabileceği geniş bir panelde tanısal kapasitelerinin olduğu sonuçlarına varıldı.

Tamamlanan bu çalışma sonrasında geliştirilen antikorların terapötik kapasitelerinin sorgulanması önemli bir gereklilik olarak görülmektedir. Özellikle KKKA gibi bölgesel olarak etkisi her yıl artan bir halk sağlığı problemine katkı verecek her türlü tedavi yaklaşımının tartışılmaz değeri vardır. Bu noktadan hareketle geliştirilen antikorların tek tek veya bir kokteyl tarzında yapılacak formülasyonlarının terapötik etkinlikleri yanı sıra alerjik, toksik ve diğer klinik öncesi değerlendirmelerinin yapılması önerilmektedir. Son olarak, tedavi etkinliği olan antikor ve/veya antikorların ise daha ilerleyen zamanlarda insansılaştırılmasına yönelik çalışmalar yapılması da önerilmektedir.



ÖZET

Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Virusuna Karşı Monoklonal Antikor Üretimi ve Karakterizasyonu

Kırım Kongo Kanamalı Ateş Virus (KKKAV), insanlarda ciddi hemorajik ateş hastalığına neden olabilen ve yüksek mortalite ve bulaşma hızı ve geniş coğrafi dağılımı nedeniyle halk sağlığı için büyük bir tehdit oluşturan kene kaynaklı bir virustur. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA), Afrika, Ortadoğu, Doğu Avrupa ve Asya'daki birçok ülkede endemik olan ağır bir kene hastalığıdır. Şu anda KKKA'ya karşı onaylı bir aşı bulunmamaktadır ve spesifik bir tedavi mevcut değildir. Bu çalışmada KKKAV'nun NC ve GPC proteinlerine karşı monoklonal antikor üretildi ve karakterizasyonları yapıldı. Çalışmada, zaman kazandıran, spesifik ve güçlü monoklonal antikor elde etmek için intrasplenik immünizasyon metodu kullanıldı. Deneyde kullanılan fareler ilk immünizasyon'da 20µg, ikinci ve üçüncü immünizasyonda 10µg olarak immünojen ile immünizasyona tabi tutuldular. Bağışıklamayı izleyen 13'üncü gün füzyon yapıldı. Hybridoma teknolojisi kullanarak hedef antijenlere karşı toplam 25 (5 tane NC ve 17 tanesi GPC spesifik) monoklonal antikor üretildi. GPC proteinine spesifik olarak geliştirilen ve nötralizan antikorların gelecekte, terapötik amaçlar için kullanıma uygun olabileceği sonucuna varıldı. Bu amaçlanırsa söz konusu antikorların humanizasyon sürecine alınması gereklidir. Diğer antikorların ise epitopun konformasyonuna bağlı olmaksızın tanısal amaçlarla farklı teknolojilerde kullanılabileceği ortaya konuldu.

Anahtar Sözcükler: Intrasplenik, Kırım Kongo Kanamalı Ateş Virus, Monoklonal Antikor.

SUMMARY

Production and Characterization of Monoclonal Antibody against Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus

Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus (CCHFV) is a tick-borne virus that can cause severe hemorrhagic fever in humans and poses a major threat to public health due to its high mortality and transmission rate and wide geographical distribution. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever (CCHF) is a severe tick disease that is endemic in many countries in Africa, the Middle East, Eastern Europe and Asia. There is currently no approved vaccine against CCHF and no specific treatment is available. In this study, monoclonal antibodies against NC and GPC proteins of CCHFV were produced and characterized. In the study, intrasplenic immunization method was used to obtain time-saving, specific and potent monoclonal antibody. In the study, intrasplenic immunization method was used to obtain time-saving, specific and potent monoclonal antibody. Mice used in the experiment were immunized with 20 μ g immunogen in the first immunization and 10 μ g in the second and third immunizations. Fusion was performed on the the thirteenth day following the immunization. A total of 25 (5 NC and 17 GP-specific) monoclonal antibodies against target antigens were produced using hybridoma technology. It was concluded that the neutralizing antibodies developed specifically for the GPC protein may be suitable for use for therapeutic purposes in the future. If this is aimed, the antibodies in question must be included in the humanization process. If this is aimed, the antibodies in question must be included in the humanization process. It has been demonstrated that other antibodies can be used in different technologies for diagnostic purposes, regardless of the conformation of the epitope.

Keywords: Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus, Intrasplenic, Monoclonal Antibody.

KAYNAKLAR

- ALIGHOLIPOUR FARZANI T, FOLDES K, ERGUNAY K, GURDAL H, BASTUG A, OZKUL A (2019). Immunological analysis of a CCHFV mRNA vaccine candidate in mouse models. *Vaccines*, **7**(3): 115.
- ALIGHOLIPOUR FARZANI T, HANIFEHNEZHAD A, FOLDES K, ERGUNAY K, YILMAZ E, HASHIM MOHAMED ALI H, OZKUL A (2019). Co-Delivery Effect of CD24 on the Immunogenicity and Lethal Challenge Protection of a DNA vector expressing nucleocapsid protein of crimean congo hemorrhagic fever virus. *Viruses*, **11**(1): 75.
- ALIGHOLIPOUR FARZANI T, FOLDES K, HANIFEHNEZHAD A, YENER ILÇE B, BILGE DAGALP S, AMIRZADEH KHIABANI N, OZKUL A (2019). Bovine herpesvirus type 4 (BoHV-4) vector delivering nucleocapsid protein of Crimean-congo hemorrhagic fever virus induces comparable protective immunity against lethal challenge in IFN α / β / γ R $^{-/-}$ mice models. *Viruses*, **11**(3): 237.
- ANDERSSON I, BLADH L, MOUSAVI-JAZI M, MAGNUSSON KE, LUNDKVIST A, HALLER O, MIRAZIMI A (2004). Human MxA protein inhibits the replication of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Journal of virology*, **78**(8): 4323-4329.
- ANDERSSON I, KARLBERG H, MOUSAVI-JAZI M, MARTINEZ-SOBRIDO L, WEBER F, MIRAZIMI A (2008). Crimean-Congo hemorrhagic fever virus delays activation of the innate immune response. *Journal of medical virology*, **80**(8): 1397-1404.
- ARSLAN S, ENGIN A (2012). Relationship between NF- κ B1 and NF- κ BIA genetic polymorphisms and Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, **44**(2): 138-143.
- ASCIOGLU S, LEBLEBICIOGLU H, VAHABOGLU H, CHAN KA (2011). Ribavirin for patients with Crimean-Congo haemorrhagic fever: a systematic review and meta-analysis. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, **66**(6): 1215-1222.
- ATKINSON B, CHAMBERLAIN J, LOGUE CH, COOK N, BRUCE C, DOWALL SD, HEWSON R (2012). Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, **12**(9): 786-793.
- AWSIUK K, PETROU P, THANASSOULAS A, RACZKOWSKA J (2019). Orientation of biotin-binding sites in streptavidin adsorbed onto the surface of polythiophene films. *Langmuir*. **35**(8): 3058-3066.
- AWSIUK KAMİL, PANAGIOTA PETROU, ANGELOS THANASSOULAS, AND JOANNA RACZKOWSKA(2019). Orientation of Biotin-Binding Sites in Streptavidin Adsorbed onto the Surface of Polythiophene Films *Langmuir*, **35**(8): 3058–3066.
- BAGGIOLINI M(1998). Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*, **392**:565–568.

- BARNWAL B, KARLBERG H, MIRAZIMI A, TAN YJ (2016). The Non-structural Protein of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Disrupts the Mitochondrial Membrane Potential and Induces Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, **291**(2): 582–592.
- BARRY MA, BARRY ME, JOHNSTON SA (1994). Production of monoclonal antibodies by genetic immunization. *Biotechniques*, **16**(4): 616-8.
- BAUER G (2021). The variability of the serological response to SARS-corona virus potential resolution of ambiguity through determination of avidity (functional affinity). *Journal of Medical Virology*, **93**(1): 311-322.
- BEERS SA, GLENNIE MJ, WHITE AL (2016). Influence of immunoglobulin isotype on therapeutic antibody function. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, **127**(9): 1097-1101.
- BERTOLOTTI-CIARLET A, SMITH J, STRECKER K, PARAGAS J, ALTAMURA LA, MCFALLS JM, FRIAS-STANHELI N, GARCIA-SASTRE A, SCHMALJOHN CS, DOMS RW (2005). Cellular localization and antigenic characterization of crimean-congo hemorrhagic fever virus glycoproteins. *Journal of virology*, **79**(10): 6152-6161.
- BERTOLOTTI-CIARLET A, SMITH J, STRECKER K (2005). Cellular localization and antigenic characterization of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus glycoproteins. *J Virol*, **79**: 6152–6161.
- BODUR H, AKINCI E, ASCIOGLU S, ONGURU P, UYAR Y (2012). Subclinical infections with Crimean- Congo hemorrhagic fever virus, Turkey. *Emerging infectious diseases*, **18**(4): 640.
- BORDI L, LALLE E, CAGLIOTI C, TRAVAGLINI D, LAPA D, MARSELLA P, CASTILLETTI C (2015). Antagonistic antiviral activity between IFN-lambda and IFN-alpha against lethal Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in vitro. *PLoS One*, **10**(2): e0116816.
- BOULIANNE GL, HOZUMI N, SHULMAN MJ (1984). Production of functional chimaeric mouse/human antibody. *Nature*, **312**: 643-646.
- BROMLEY S, MEMPEL TR, LUSTER AD (2008). Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of t cell traffic. *Nat immunol*, **9**:970–980.
- BUSS NA, HENDERSON SJ, MCFARLANE M, SHENTON JM, DE HAAN L (2012). Monoclonal antibody therapeutics: History and future. *Current opinion in pharmacology*, **12**(5): 615-622.
- BUTTIGIEG KR, DOWALL SD, FINDLAY-WILSON S, MILOSZEWSKA A, RAYNER E, HEWSON R, CARROLL MW (2014). A novel vaccine against Crimean-Congo Haemorrhagic Fever protects 100% of animals against lethal challenge in a mouse model. *PLoS One*, **9**(3): e91516.
- CAI HH (2017). Therapeutic monoclonal antibodies approved by FDA in 2016. *Moj Immunol*, **5**(1): 82-84.

- CANAKOGLU N, BERBER E, TONBAK S, ERTEK M, SOZDUTMAZ I, AKTAS M, KALKAN A, OZDARENDELI A (2015). Immunization of knock-out α/β interferon receptor mice against high lethal dose of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus with a cell culture based vaccine. *PLoS neglected tropical diseases*, **9**(3): e0003579.
- CAPODAGLI GC, DEATON MK, BAKER EA, LUMPKIN RJ, PEGAN SD (2013). Diversity of ubiquitin and ISG15 specificity among nairoviruses' viral ovarian tumor domain proteases. *Journal of virology*, **87**(7): 3815-3827.
- CARTER SD, SURTEES R, WALTER CT, ARIZA A, BERGERON É, NICHOL S T, BARR JN, (2012). Structure, function, and evolution of the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus nucleocapsid protein. *Journal of virology*, **86**(20): 10914-10923.
- CHAMES P, VAN REGENMORTEL M, WEISS E, BATY D (2009). Therapeutic antibodies: Successes, limitations and hopes for the future. *British journal of pharmacology*, **157**(2): 220-233.
- CROSS RW, MIRE CE, BRANCO LM, GEISBERT JB, ROWLAND MM, HEINRICH ML, GOBA A, MOMOH M, GRANT DS, FULLAH M, HUMARRKHAN S, ROBINSON JE, GEISBERT TW, GARRY RF (2016). Treatment of Lassa virus infection in outbred guinea pigs with first-in-class human monoclonal antibodies. *Antiviral research*, **133**: 218-222.
- CORREIA I (2010). Stability of IgG isotypes in serum. *Mabs*, **2**(3): 221-232.
- DELANG L, ABDELNABI R, NEYTS J (2018). Favipiravir as a potential countermeasure against neglected and emerging RNA viruses. *Antiviral research*, **153**: 85-94.
- DIMITROV DS, MARKS JD (2009). Therapeutic antibodies: current state and future trends- is a paradigm change coming soon? *Methods Molecular Biology*, **525**: 1-27.
- DONOHUE PJ, MACARDLE PJ, ZOLA H (2020). Making and using 'conventional' mouse monoclonal antibodies. In *Monoclonal Antibodies*, 15-42.
- DONOHUE PJ, MACARDLE PJ, ZOLA H (1995). Making and using conventional mouse monoclonal antibodies, *Monoclonal Antibodies, the Second generation* (Zola, H., ed.), *Bios Scientific Publishers, Oxford*, **15**: 42.
- DOWALL SD, BUTTIGIEG KR, FINDLAY-WILSON SJ, RAYNER E, PEARSON G, MILOSZEWSKA A, GRAHAM VA, CARROLL MW, HEWSON R (2016). A Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) viral vaccine expressing nucleoprotein is immunogenic but fails to confer protection against lethal disease. *Human vaccines & immunotherapeutics*, **12**(2): 519-527.
- DOWALL SD, GRAHAM VA, RAYNER E (2018). Protective effects of a Modified Vaccinia Ankara-based vaccine candidate against Crimean-Congo Haemorrhagic Fever virus require both cellular and humoral responses. *PLoS One*, **11**(6): e0156637.
- DOWALL SD, GRAHAM VA, RAYNER E, HUNTER L, WATSON R, TAYLOR I, HEWSON R (2016). Protective effects of a Modified Vaccinia Ankara-based vaccine

- candidate against Crimean-Congo Haemorrhagic Fever virus require both cellular and humoral responses. *PloS one*, **11**(6): e0156637.
- DUH D, SAKSIDA A, PETROVEC M, AHMETI S, DEDUSHAJ L, PANNING M, DROSTEN C, AVŠIČ-ŽUPANC T (2007). Viral load as predictor of Crimean-Congo hemorrhagic fever outcome. *Emerging infectious diseases*, **13**(11): 1769–1772.
- EMMONS C, HUNSICKER LG. MUROMONAB(1987). Muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3): the first monoclonal antibody approved for therapeutic use. *Iowa Med*, **77**(2):78-82.
- ERGONUL O (2006). Crimean-Congo haemorrhagic fever. *The Lancet infectious diseases*, **6**(4): 203–214.
- ERGONUL O, CELIKBAS A, BAYKAM N, EREN S, DOKUZOGUZ B (2006). Analysis of risk-factors among patients with Crimean-Congo haemorrhagic fever virus infection: Severity criteria revisited. *Clinical microbiology and infection*, **12**(6): 551-554.
- ERGONUL O, KESKE S, ÇELDIR MG, KARA IA, PSHENICHNAYA N, ABUOVA G, GONEN M (2018). Systematic review and meta-analysis of postexposure prophylaxis for Crimean-Congo hemorrhagic fever virus among healthcare workers. *Emerging infectious diseases*, **24**(9): 1642.
- ESPY N, PÉREZ-SAUTU U, RAMÍREZ DE ARELLANO E, NEGREDO A, WILEY MR, BAVARÍ S, MENENDEZ MD, SÁNCHEZ-SECO MP, PALACIOS G (2018). Ribavirin Had Demonstrable Effects on the Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus (CCHFV) Population and Load in a Patient With CCHF Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, **217**(12): 1952-1956.
- ESTRADA DF, DE GUZMAN RN (2011). Structural characterization of the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus Gn tail provides insight into virus assembly. *Journal of Biological Chemistry*, **286**(24): 21678-21686.
- ESTRADA-PEN~A A, DE LA FUENTE J, LATAPIA T, ORTEGA C(2015). The impact of climate trends on a tick affecting public health: a retrospective modeling approach for *Hyalomma marginatum (ixodidae)*, **10**; 1–16.
- FELS J M, MAURER D P, HERBERT A S, WIRCHNIANSKI A S, VERGNOLLE O, CROSS R W, ABELSON D M, MOYER C L, MISHRA A K, AGUILAN J T, KUEHNE A I, PAULI N T, BAKKEN R R, NYAKATUA E , HELLERT J, QUEVEDO G, LOBEL L, BALINANDI S, LUTWAMA J J, CHANDRAN K (2021). Protective neutralizing antibodies from human survivors of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Cell*, **184**; (13)
- FORSTER R, MATTIS AE, KREMMER E, WOLF E, BREM G, LIPP M A (1996). Putative Chemokine Receptor, BLR1, Directs B Cell Migration to Defined Lymphoid Organs and Specific Anatomic Compartments of the Spleen. *Cell*, **87**;1037–1047.
- FRIAS-STACHELI N, GIANNAKOPOULOS NV, KIKKERT M, TAYLOR SL, BRIDGEN A, PARAGAS J, RICHT AJ, ROWLAND RR, SCHMALJOHN CS, LENSCHOW JD, SNIJDER EJ, GARCÍA-SASTRE A, VIRGIN WH (2007). Ovarian tumor

domain contain viral proteases evade ubiquitin- and ISG15-dependent innate immune responses. *Cell host & microb*, **2**(6): 404-416.

FRITZEN A, RISINGER C, KORUKLUOGLU G, CHRISTOVA I, CORLI HITZEROTH A, VILJOEN N, BURT FJ, MIRAZIMI A, BLIXT O (2018). Epitope-mapping of the glycoprotein from Crimean-Congo hemorrhagic fever virus using a microarray approach. *PLoS neglected tropical diseases*, **12**(7): e0006598.

FURUTA Y, GOWEN BB, TAKAHASHI K, SHIRAKI K, SMEE DF, BARNARD DL (2013). Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor. *Antiviral research*, **100**(2): 446-454.

GARGILI A, ESTRADA-PEÑA A, SPENGLER JR, LUKASHEV A, NUTTALL PA, BENTE DA (2017). The role of ticks in the maintenance and transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: A review of published field and laboratory studies. *Antiviral research*, **144**: 93-119.

GARRISON AR, ALKHOVSKY SV, AVŠIČ-ŽUPANČIČ T, BENTE DA, BERGERON É, BURT F, DI PAOLA N, ERGUNAY K, HEWSON R, KUHN JH, MIRAZIMI A, PAPA A, SALL AA, SPENGLER JR, PALACIOS G (2020). ICTV Virus Taxonomy Profile: Nairoviridae. *Journal of General Virology*, **101**(8): 798-799.

GARRISON AR, SHOEMAKER CJ, GOLDEN JW, FITZPATRICK CJ, SUSCHAK JJ, RICHARDS MJ, SCHMALJOHN CS (2017). A DNA vaccine for Crimean-Congo hemorrhagic fever protects against disease and death in two lethal mouse models. *PLoS neglected tropical diseases*, **11**(9): e0005908.

GHIASI SM, SALMANIAN AH, CHINIKAR S, ZAKERI S (2011). Mice orally immunized with a transgenic plant expressing the glycoprotein of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Clinical and Vaccine Immunology*, **18**(12): 2031-2037.

GOLDEN JW, SHOEMAKER CJ, LINDQUIST ME, ZENG X, DAYE SP, WILLIAMS JA, LIU J, COFFIN KM, OLSCHNER S, FLUSIN O, ALTAMURA LA, KUEHL KA, FITZPATRICK CJ, SCHMALJOHN CS, GARRISON AR (2019). GP38-targeting monoclonal antibodies protect adult mice against lethal Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infection. *Sci Adv*, **10**: 57-9535.

GRACI JD, CAMERON CE (2006). Mechanisms of action of ribavirin against distinct viruses. *Reviews in medical virology*, **16**(1): 37-48.

GRUBER CEM, BARTOLINI B, CASTILLETI C, MIRAZIMI A, HEWSON R, CHRISTOVA I, AVSIC T, GRUNOW R, PAPA A, SÁNCHEZ-SECO MP, KOPMANS M, IPPOLITO G, CAPOBIANCHI MR, REUSKEN CBEM, DI CARO A (2019). Geographical variability affects cchfv detection by rt-pcr: a tool for in-silico evaluation of molecular assays, *Viruses*, **11**: 953.

HABJAN M, ANDERSSON I, KLINGSTROM J, SCHUMANN M, MARTIN A, ZIMMERMANN P, WAGNER V, PICHLMAIR A, SCHNEIDER U, MUHLBERGER E, MIRAZIMI A, WEBER F (2008). Processing of genome 5' termini as a strategy of negative-strand RNA viruses to avoid RIG-I-dependent interferon induction. *PLoS One*, **3**(4): e2032.

- HAGER A, BENDARY A, FATMA RASSLAN A, , MILTON WAINWRIGHT B, SALEH ALFARRAJ C, ALI M. ZAKI D, ABEER K. ABDULALL A (2022). Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in ticks collected from imported camels in Egypt. *Saudi J Biol Sci Apr*, **29(4)**:2597-2603.
- HARLOW ED (1988). Antibodies. *A laboratory manual*, **52**: 53-138.
- HARRIS LJ, LARSON SB, HASEL KW, MCPHERSON A (1997). Refined structure of an intact IgG2a monoclonal antibody. *Biochemistry*, **36(7)**: 1581-1597.
- HASANOGLU I, GUNER R, CARHAN A, TUFAN Z K, ÇAGLAYIK DY, GUVEN T, YILMAZ GR, TAŞYARAN MA (2016). Crucial parameter of the outcome in Crimean Congo hemorrhagic fever: Viral load. *Journal of Clinical Virology*, **75**: 42-46.
- HAWMAN DW, FELDMANN H (2018). Recent advances in understanding Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *PMID*: 30416710; *PMCID*, PMC6206615.
- HAWMAN DW, HADDOCK E, MEADE-WHITE K, WILLIAMSON B, HANLEY PW, ROSENKE K, KOMENO T, FURUTA Y, GOWEN BB, FELDMANN H (2018). Favipiravir (T-705) but not ribavirin is effective against two distinct strains of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in mice. *Antiviral research*, **157**: 18-26.
- HAWMAN DW, HADDOCK E, MEADE-WHITE K, WILLIAMSON B, HANLEY PW, ROSENKE K, KOMENO T, FURUTA Y, GOWEN BB, FELDMANN H (2018). Favipiravir (T-705) but not ribavirin is effective against two distinct strains of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in mice. *Antiviral research*, **157**: 18–26.
- HINKULA J, DEVIGNOT S, ÅKERSTROM S, KARLBERG H, WATTRANG E, BEREZKY S, MOUSAVI-JAZI M, RISINGER C, LINDEGREN G, VERNERSSON C, PAWESKA J, VAN VUREN PJ, BLIXT O, BRUN A, WEBER F, MIRAZIMI A (2017). Immunization with DNA plasmids coding for Crimean-Congo hemorrhagic fever virus capsid and envelope proteins and/or virus-like particles induces protection and survival in challenged mice. *Journal of virology*, **91(10)**: e02076-16.
- HONIG JE, OSBORNE JC, NICHOL ST (2004). Crimean–Congo hemorrhagic fever virus genome L RNA segment and encoded protein. *Virology*, **321(1)**: 29-35.
- HONIG JE, OSBORNE JC, NICHOL ST (2004). Crimean-Congo hemorrhagic fever virus genome L RNA segment and encoded protein. *Virology*, **30**:29-35.
- HOULDEN BA, WIDACKI SM, BLUESTONE JA (1991). Signal transduction through class I MHC by a monoclonal antibody that detects multiple murine and human class I molecules. *The Journal of Immunology*, **146(2)**: 425-430.
- HSIEH CH, JIAN CZ, LIN LI, LOW GS, OU PY, HSU C, OU DL(2022). Potential Role of CXCL13/CXCR5 Signaling in Immune Checkpoint Inhibitor Treatment in Cancer. *Cancers*, **14(2)**:294.
- ICVT(2021). International Committee on Taxonomy of Viruses ICTV Taxonomy History (https://talk.ictvonline.org/files/ictv_official_taxonomy_updates_since_the_8th_report/).

- JOHNSON S, HENSCHKE N, MAAYAN N, MILLS I, BUCKLEY BS, KAKOUREOU A, MARSHALL R (2018). Ribavirin for treating Crimean Congo hemorrhagic fever. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, **6**:CD012713.
- KAPTEIN SJF, JACOBS S, LANGENDRIES L, SELDESLACHTS L, TER HORST S, LIESENBORGHS L, HENS B, VERGOTE V, HEYLEN E, BARTHELEMY K, DELANG L (2020). Favipiravir at high doses has potent antiviral activity in SARS-CoV-2-infected hamsters, whereas hydroxychloroquine lacks activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **117**(43): 26955-26965.
- KARLBERG H, TAN YJ, MIRAZIMI A (2011). Induction of caspase activation and cleavage of the viral nucleocapsid protein in different cell types during Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infection. *Journal of Biological Chemistry*, **286**(5): 3227–3234.
- KESHTKAR-JAHROMI M, KUHN JH, CHRISTOVA I, BRADFUTE SB, JAHRLING PB, BAVAR S (2011). Crimean-Congo hemorrhagic fever: Current and future prospects of vaccines and therapies. *Antiviral research*, **90**(2): 85-92.
- KIZILDAG S, ARSLAN S, OZBILUM N, ENGIN A, BAKIR M (2018). Effect of TLR10 (2322A/G, 720A/C, and 992T/A) polymorphisms on the pathogenesis of Crimean Congo hemorrhagic fever disease. *Journal of Medical Virology*, **90**(1):19-25.
- KOCABAS F, ASLAN GS (2015). Fluorometric CCHFV OTU protease assay with potent inhibitors. *Virus genes*, **51**(2): 190-197.
- KOHLER G, MILSTEIN C (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **256**: 495-497.
- KORTEKAAS J, VLOET RPM, MCAULEY AJ, SHEN X, BOSCH BJ, DE VRIES L, MOORMANN RJM, BENTE DA, (2015). Crimean-Congo hemorrhagic fever virus subunit vaccines induce high levels of neutralizing antibodies but no protection in STAT1 knockout mice. *Vector-Borne Zoonotic Dis*, **15**; 759–764.
- KOZAK RA, FRASER RS, BIONDI MJ, MAJER A, MEDINA SJ, GRIFFIN BD, KOBASA D, STAPLETON PJ, URFANO C, BABUADZE G, ANTONATION K, FERNANDO L, BOOTH S, LILLIE BN, KOBINGER GP (2020). Dual RNA-Seq characterization of host and pathogen gene expression in liver cells infected with Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. *PLoS neglected tropical diseases*, **14**(4): e0008105.
- LAI Y, WANG R, CHEN X, TANG D, HU Y, CAI J, ZHANG Q, HU H (2017). Emerging trends and new developments in monoclonal antibodies: A scientometric analysis (1980-2016). *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, **13**(6): 1388-1397.
- LINDQUIST ME, ZENG X, ALTAMURA LA, DAYE SP, DELP KL, BLANCETT C, COFFIN KM, KOEHLER JW, COYNE S, SHOEMAKER CJ, GARRISON AR, GOLDEN J W (2018). Exploring Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus-Induced Hepatic Injury Using Antibody-Mediated Type I Interferon Blockade in Mice. *Journal of Virology*, **92**(21): e01083-18.
- LU RM, HWANG YC, LIU IJ (2020). development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *j biomed sci*, **27**; 1-30.

- MARSHALL JS, WARRINGTON R, WATSON W, KIM HL (2018). An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, **14**(2): 1-10.
- MAZZOLA LT, KELLY-CIRINO C (2019). Diagnostic tests for Crimean-Congo haemorrhagic fever: a widespread tickborne disease. *BMJ Glob Health*, PMC, **64**: 07549.
- MIRAZIMI A, FELICITY B, ANNA P (2021). Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Importance (Nairoviridae) .Elsevier Ltd, doi:10.1016/B978-012374410-4.00620-8.
- MORRISON SL, JOHNSON MJ, HERZENBERG LA, OI VT (1984). Chimeric human antibody molecules: Mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **81**(21): 6851-6855.
- MOUSAVI-JAZI M, KARLBERG H, PAPA A, CHRISTOVA I, MIRAZIMI A (2012). Healthy individuals' immune response to the Bulgarian Crimean-Congo hemorrhagic fever virus vaccine. *Vaccine*, **30**(44): 6225-6229.
- NADLER LM, STASHENKO P, HARDY R, KAPLAN WD, BUTTON LN, KUFE DW, ANTMAN KH, SCHLOSSMAN SF (1980). Serotherapy of a patient with a monoclonal antibody directed against a human lymphoma-associated antigen. *Cancer research*, **40**(9): 3147-3154.
- NISHINAKA S, SUZUKI T, MATSUDA H, MURATA M (1991). A new cell line for the production of chicken monoclonal antibody by hybridoma technology. *Journal of immunological methods*, **139**(2): 217-222.
- OESTEREICH L, RIEGER T, NEUMANN M, BERNREUTHER C, LEHMANN M, KRASEMANN S, WURR S, EMMERICH P, DE LAMBALLERIE X, OLSCHLÄGER S, GUNTHER S (2014). Evaluation of antiviral efficacy of ribavirin, arbidol, and T-705 (favipiravir) in a mouse model for Crimean-Congo hemorrhagic fever. *PLoS neglected tropical diseases*, **8**(5): e2804.
- OKELY M, ANAN R, GAD-ALLAH S, SAMY AM (2020). Mapping the environmental suitability of etiological agent and tick vectors of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Acta Trop*, **203**: 105-319.
- PADDOCK S, DEVRIES P, BUTH E, CARROLL, S(1994). Production of monoclonal antibodies by genetic immunization, *Biotechniques*, **16**: 616–620.
- PADLAN EA (1994). Anatomy of the antibody molecule. *Molecular immunology*, **31**(3): 169-217.
- PAPA A (2019). Diagnostic approaches for Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Expert Rev. Mol. Diagn*, **19** (6):531–536.
- PAPA A, MIRAZIMI A, KOKSAL I, ESTRADA-PENA A, FELDMANN H (2015). Recent advances in research on Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Journal of clinical virology*, **64**: 137-143.

- PAPA A, PAPADIMITRIOU E, CHRISTOVA I (2011). The Bulgarian vaccine Crimean-Congo haemorrhagic fever virus strain. *Scandinavian journal of infectious diseases*, **43**(3): 225-229.
- PARRAY H.A, SHUKLA S, SAMAL S, SHRIVASTAVA T, AHMED S, SHARMA C, KUMAR R (2020). Hybridoma technology a versatile method for isolation of monoclonal antibodies, its applicability across species, limitations, advancement and future perspectives. *International immunopharmacology*, **85**: 106639.
- PORTILLO A, PALOMAR AM, SANTIBÁÑEZ P, OTEO JA (2021). Epidemiological aspects of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Western Europe: what about the future?. *Microorganisms*, **9**(3): 649.
- QIU X, WONG G, AUDET J, BELLO A, FERNANDO L, ALIMONTI JB, FAUSTHER-BOVENDO H, WEI H, AVILES J, HIATT E, JOHNSON A, MORTON J, SWOPE K, BOHOROV O, BOHOROVA N, GOODMAN C, KIM D, PAULY MH, VELASCO J, PETTITT J, OLINGER GG, WHALEY K, XU B, STRONG J.E, ZEITLIN L, KOBINGER GP (2014). Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp. *Nature*, **514**(7520): 47-53.
- RAHPEYMA M, SAMARBAF-ZADEH A, MAKVANDI M, GHADIRI AA, DOWALL SD, FOTOUHI F (2017). Expression and characterization of codon-optimized Crimean-Congo hemorrhagic fever virus Gn glycoprotein in insect cells. *Archives of virology*, **162**(7): 1951-1962.
- RAJEWSKY K (1996). Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*, **381**(6585): 751-758.
- SANCHEZ A J, VINCENT M J, ERICKSON B R, NICHOL S T (2006). 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*, **80**(1); 514-525.
- SAS MA, VINA-RODRIGUEZ A, MERTENS M (2018). A one-step multiplex real-time RT-PCR for the universal detection of all currently known CCHFV genotypes. *J Virol Methods*, **255**: 38–43.
- SCHOLTE FEM, HUA BL, SPENGLER JR, DZIMIANSKI JV, COLEMAN-MCCRAY JD, WELCH SR, MCMULLAN LK, NICHOL ST, PEGAN SD, SPIROPOULOU CF, BERGERON E (2019). Stable Occupancy of the Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus-Encoded Deubiquitinase Blocks Viral Infection. *Mbio*, **10**(4): e01065-19.
- SCHOLTE FEM, ZIVCEC M, DZIMIANSKI JV, DEATON MK, SPENGLER JR, WELCH SR, NICHOL ST, PEGAN SD, SPIROPOULOU FC, BERGERON E (2017). Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Suppresses Innate Immune Responses via a Ubiquitin and ISG15 Specific Protease. *Cell reports*, **20**(10): 2396-2407.
- SCOTT CT (2007). Mice with a human touch. *Nature Biotechnology*, **25**: 1075-1077.
- SHALITANATI A YU H, LIU D, XU W X, YUE X, GUO R LI, Y DENG F, YANG J, ZHANG Y, SUN S. (2018). Fine mapping epitope on glycoprotein-Gn from Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, **59**;24-31.

- SIMKINS SG, KNAPP SL, BROUGH GH, LENZ KL, BARLEY-MALONEY L, BAKER JP, DEKKING L, WAI H, DIXON EP (2011). Generation of Monoclonal Antibodies to the AML1-ETO Fusion Protein: Strategies for Overcoming High Homology. *Hybridoma (Larchmt)*, **30**(5):433-43.
- SIRBU CA, GHINESCU MC, AXELERAD AD, SIRBU AM, IONITA-RADU F A (2021). new era for monoclonal antibodies with applications in neurology (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, **21**(1):86.
- SMITH SA, SILVA LA, FOX JM, FLYAK AI, KOSE N, SAPPARAPU G, CROWE JR JE (2015). Isolation and characterization of broad and ultrapotent human monoclonal antibodies with therapeutic activity against chikungunya virus. *Cell host & microbe*, **18**(1): 86-95.
- SPEIKER-POLET H, SETHUPATHI P, YAM PC, KNIGHT KL (1995). Rabbit monoclonal antibodies: generating a fusion partner to produce rabbit-rabbit hybridomas, *Proc. Natl Acad. Sci. (USA)*, **92**; 9348–9352.
- SPENGLER J.R, KELLY KEATING M, MCELROY AK, ZIVCEC M, COLEMAN-MCCRAY JD, HARMON JR, BOLLWEG BC, GOLDSMITH CS, BERGERON E, KECK JG, ZAKI SR, NICHOL ST, SPIROPOULOU CF (2017). Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Humanized Mice Reveals Glial Cells as Primary Targets of Neurological Infection. *The Journal of infectious diseases*, **216**(11): 1386-1397.
- SPENGLER JR, BERGERON É, ROLLIN PE (2016). Seroepidemiological Studies of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Domestic and Wild Animals. *PLoS neglected tropical diseases*, **10**(1): e0004210.
- SPENGLER JR, BERGERON É, SPIROPOULOU CF (2019). Crimean-Congo hemorrhagic fever and expansion from endemic regions. *Curr Opin Virol*, **34**: 70–78.
- SPENGLER JR, PATEL JR, CHAKRABARTI AK, ZIVCEC M, GARCÍA-SASTRE A, SPIROPOULOU CF, BERGERON É (2015). RIG-I Mediates an Antiviral Response to Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. *Journal of virology*, **89**(20): 10219-10229.
- SPEIKER-POLET H, SETHUPATHI P, YAM PC, KNIGHT KL (1995). Rabbit monoclonal antibodies: generating a fusion partner to produce rabbit-rabbit hybridomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **92**(20): 9348-9352.
- TCHESNOKOV EP, BAILEY-ELKIN BA, MARK BL, GOTTE M (2020). Independent inhibition of the polymerase and deubiquitinase activities of the Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus full-length L-protein. *PLoS Negl Trop Dis*, **14**: 82-83.
- TIGNOR GH, HANHAM CA (1993). Ribavirin efficacy in an in vivo model of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHF) infection. *Antiviral research*, **22**(4): 309-325.
- TOMITA M, TSUMOTO K (2011). Hybridoma technologies for antibody production. *Immunotherapy*, **3**(3): 371–380.
- VAN EEDEN PJ, VAN EEDEN SF, JOUBERT JR, KING JB, VAN DEWAL BW, MICHELL WL (1985). A nosocomial outbreak of Crimean-Congo haemorrhagic

fever at Tygerberg Hospital. Part II. Management of patients. *South African Medical Journal*, **68**: 718–721.

VASSILENKO SM, VASSILEV TL, BOZADJIEV LG, BINEVA IL, KAZAROV GZ (1990). Specific Intravenous Immunoglobulin for Crimean- Congo Hemorrhagic-Fever *The Lancet*, **335**(8692): 791-792.

VELIKOVSKY C A, CASSATARO J, GIANBARTOLOMEI GH, GOLDBAUM FA, BOWDEN RA, FAINBOIM L, FOSSATI CA, SPITZ, M (2000). Vaccination with DNA encoding a Brucella protein induced high cellular and humoral immune response. *Journal of Immunological Methods*, **244** :1 –7.

VINCENT M J, SANCHEZ A ., ERICKSON B R, BASAK A, CHRETIEN M, SEIDAH G, & NICHOL ST (2003). Crimean-Congo hemorrhagic fever virus glycoprotein proteolytic processing by subtilase SKI-1. *J Virol*, **77**(16); 8640-8649.

VINUESA CG, TANGYE SG, MOSER B, AND MACKAY CR (2005). Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*, **5**:853–865.

WANG Y, DUTTA S, KARLBERG H, DEVIGNOT S, WEBER F, HAO Q, TAN YJ, MIRAZIMI A, KOTAKA M (2012). Structure of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus nucleoprotein: superhelical homo-oligomers and the role of caspase-3 cleavage. *Journal of virology*, **86**(22): 12294-12303.

WARRINGTON R, SILVIU-DAN F (2011). Drug allergy. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, **7**(1): 1-8.

WARRINGTON R, WATSON W, KIM HL, ANTONETTI FR (2011). An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clin Immunol*, **23** ;7

WELCH SR, SCHOLTE FEM, FLINT M, CHATTERJEE P, NICHOL ST, BERGERON E, SPIROPOULOU CF (2017). Identification of 20-deoxy-20- fluorocytidine as a potent inhibitor of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus replication using a recombinant fluorescent reporter virus. *Antiviral research*, **147**: 91–99.

ZEITLIN L, GEISBERT JB, DEER DJ, FENTON KA, BOHOROV O, BOHOROVA N, GOODMAN C, KIM D, HIATT A, PAULY MH, VELASCO J, WHALEY KJ, ALTMANN F, GRUBER C, STEINKELLNER H, HONKO AN, KUEHNE AI, AMAN MJ, SAHANDI S, ENTERLEIN S, ZHAN X, ENRIA D, GEISBERT TW (2016). Junin monoclonal antibody therapy for virus infection. *Proc. Natl. Acad. Science. ABD*, **113** ;4458-4463.

ZHOU JH, WANG YN, CHANG QY, MA P, HU Y, CAO X (2018). Type III interferons in viral infection and antiviral immunity. *Cellular Physiology and Biochemistry*, **51**(1): 173-185.

ZIVCEC M, SAFRONETZ D, SCOTT D, ROBERTSON S, EBIHARA H, FELDMANN H (2013). Lethal Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infection in interferon α/β receptor knockout mice is associated with high viral loads, proinflammatory responses, and coagulopathy. *The Journal of infectious diseases*, **207**(12): 1909-1921.

- ZIVCEC M, SAFRONETZ D, SCOTT DP, ROBERTSON S, FELDMANN H (2018). Nucleocapsid protein-based vaccine provides protection in mice against lethal Crimean-Congo hemorrhagic fever virus challenge. *PLoS neglected tropical diseases*, **12**(7): e0006628.
- ZIVCEC M, SCHOLTE FE, SPIROPOULOU CF, SPENGLER JR, BERGERON É (2016). Molecular insights into Crimean-Congo hemorrhagic fever vi Zivcec M, Scholte FE, Spiropoulou CF, Spengler JR, Bergeron É. Molecular Insights into Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. *Viruses*, **21**;8-106
- ZIVCEC M, GUERRERO LIW, ALBARIÑO CG, BERGERON É, NICHOL ST, SPIROPOULOU CF. (2017) Identification of broadly neutralizing monoclonal antibodies against Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Antiviral Res*, **146**:112-120.



EKLER

Ek 1. Etik Kurul Onayı

ANKARA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARAR ÖRNEĞİ

TOPLANTI TARİHİ : 21/02/2018
TOPLANTI NO : 2018-4
DOSYA NO : 2018-30
KARAR NO : 2018-4-32

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Yılmaz Akça'nın yaptığı; araştırmacı olarak doktora öğrencisi Alireza Hanifehnezhad'ın katıldığı "Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Virusuna Karşı Monoklonal Antikor Üretimi ve Karakterizasyonu" başlıklı araştırma projesinin içeriği Kurulumuzca incelenmiş olup, söz konusu çalışmanın Üniversite Senatosunun 12/2/2016 tarihli toplantısında 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi"ne göre aşağıda belirtilen kapsamda yapılmasına; oy birliği ile karar verilmiştir.

Hayvan Türü : Fare
Hayvan Sayısı : 10
Geçerlilik Süresi : 01/03/2018-01/03/2020

ASLININ AYNIDIR
21/02/2018

Prof.Dr.M.Taner KARAOĞLU
A.Ü. HADYEK Başkanı