

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ VİRÜSÜ İÇİN BİR DNA TABANLI
AŞI GELİŞTİRİLMESİ**

Ergin ŞAHİN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2018**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Ergin ŞAHİN tarafından hazırlanan “**Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü İçin Bir DNA Tabanlı Aşı Geliştirilmesi**” adlı tez çalışması 21/06/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı



Jüri Üyeleri :

Başkan : Prof. Dr. Cumhuri ÇÖKMÜŞ
Konya Gıda ve Tarım Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik A.B.D



Üye : Prof. Dr. Özlem YILDIRIM
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Reyhan ÇOLAK
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Koray ERGÜNAY
Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı



Üye : Doç. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı



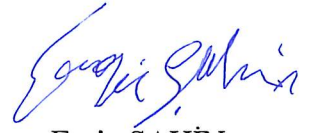
Yukarıdaki sonucu onaylıyorum.

Prof. Dr. Atila YETİŞEMİYEN
Enstitü Müdürü

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

21.06.2018



Ergin ŞAHİN

ÖZET

Doktora Tezi

KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ VİRÜSÜ İÇİN BİR DNA TABANLI AŞI GELİŞTİRİLMESİ

Ergin ŞAHİN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doçent Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN

Kırım kongo kanamalı ateşi virüsü (KKKAV) için DNA aşısı olarak kullanılabilecek bir plazmit vektör oluşturulmuş ve bu vektörün immün yeterli BALB/c ırkı farelerde humoral ve hücrel bağışıklık yanıtlarını meydana getirme etkinliği değerlendirilmiştir. Bu amaç için hedef antijen olarak KKKA virüsünün yüksek düzeyde immünojenik özellik gösteren Gc yüzey glikoproteinini kullanılmıştır. Öncelikle Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Bölümü'nün virüs koleksiyonunda bulunan Türkiye kökenli, klinik bir izolat olan KKKAV KAST2012'nin olgun Gc glikoproteinini kodlayan açık okuma çerçevesi (ORF), pVAX1 vektörüne klonlanarak nükleotit ve kodladığı amino asit dizisi belirlenmiştir. Elde edilen amino asit dizisi ile yapılan filogenetik analizler, KKKAV KAST2012 izolatının Türkiye kökenli KKKAV suşları ile yüksek oranda benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur. Klonlanan Gc glikoproteinini ORF'sinin *in vitro* olarak ifadesinin çalışılması için aynı ORF'yi kodlayan, pEGFP-Gc ökaryotik ifade vektörü oluşturulmuştur. Transfekte hücrelerdeki Gc glikoprotein ifadesi hem protein seviyesinde hem de transkripsiyon seviyesinde gösterilmiştir. Fare immünizasyonu çalışmaları için pEGFP-Gc vektöründen EGFP ORF'si çıkartılarak aşı deneylerinde kullanılması üzere pGc-VAC aşı vektörü elde edilmiştir. Fareler pGc-VAC aşı vektörü ile kas içi olarak ikişer hafta arayla üç sefer aşılanmıştır. Aşılanmış farelerde 2,4 log₁₀ titrede nötralize edici antikor yanıtı elde edilmiştir. Aşılanmış farelerde kontrol grubuna göre total IgG1 ile birlikte özellikle daha belirgin olarak total IgG2a ve IgG2b antikor yanıtlarında anlamlı olarak artış gözlenmiştir. Aşılanmış farelerde hem Th1 hem de Th2 hücrel bağışıklık yanıtları ile ilişkili sitokinlerde kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artış görülmüş ve sonuç olarak dengelenmiş Th1/Th2 yanıtları elde edilmiştir. Bu çalışma, DNA aşısı aracılığıyla ve tek başına olarak ifadelenen Türkiye kökenli bir KKKA virüsünün Gc antijeninin immünojenik özelliklerinin rapor edildiği ilk araştırma olması sebebiyle önem arz etmektedir.

Haziran 2018, 146 sayfa

Anahtar Kelimeler: Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü, Gc glikoprotein, Plazmit vektör, DNA Aşısı, Fare modeli, İmmünizasyon, Humoral ve hücrel bağışıklık

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

DEVELOPMENT OF A DNA BASED VACCINE FOR CRIMEAN CONGO HEMORRHAGIC FEVER VIRUS

Ergin ŞAHİN

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN

A plasmid vector which could be used as DNA vaccine for Crimean Congo Hemorrhagic Fever Virus (CCHFV) was constructed and its ability to elicit humoral and cellular immune responses in immunocompetent BALB/c mice was assessed. For this aim, the highly immunogenic glycoprotein Gc antigen of the CCHFV was used as the target antigen. Firstly, the open reading frame (ORF) of the glycoprotein Gc from a clinical isolate of CCHFV with Turkey origin (isolate KAST2012) which is present in the virus collection of Ankara University Faculty of Veterinary Medicine Department of Virology was cloned into pVAX1 vector and its nucleotide as well as the coded amino acid sequences were determined. Phylogenetic analysis based on the obtained amino acid sequence revealed the closest relatives of the isolate KAST2012 as CCHFV strains isolated also from Turkey. For the expression of the cloned glycoprotein Gc ORF *in vitro*, pEGFP-Gc eukaryotic expression vector expressing the same ORF was constructed. The expression of the glycoprotein Gc was demonstrated both at the protein and transcription level in transfected cells. For the mouse immunization studies, EGFP ORF was removed from the pEGFP-Gc vector and pGc-VAC vaccine vector was generated to be used in the vaccination experiments. Mice were vaccinated intramuscularly with pGc-VAC vector three times with two weeks intervals. Neutralizing antibody responses with the titre of $2,4 \log_{10}$ was obtained in the vaccinated mice. Compare to the control group, vaccinated mice elicited increased levels of IgG1, IgG2a and IgG2b total antibodies with IgG2 isotypes being the most prominent ones. Increased levels of both Th1 and Th2 related cytokines were detected in the vaccinated mice compare to the control group indicating a balanced Th1/Th2 immune responses. To our knowledge, this is the first study reporting on the immunogenic characteristics of a CCHFV Gc antigen with Turkey origin as a single agent expressed via DNA based vaccine.

June 2018, 146 pages

Key Words: Crimean Congo Hemorrhagic Fever Virus, Gc glycoprotein, Plasmid vector, DNA Vaccine, Mouse model, Immunization, Humoral and cellular immunity

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında, bana yol gösteren, karşılaştığım zorluklarda yardımcı olan, çalışmalarında bana esin kaynağı olan, değerli danışman hocam, Sayın Doç. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN'a (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı) sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmalarımın bütün aşamalarında bana her türlü desteği veren, kişisel laboratuvarımı ve araştırma ödeneklerini tez çalışmalarım boyunca rahatlıkla kullanımına sunan, ayrıca akademik ve kişisel gelişimimde çok değerli katkıları bulunan değerli hocam Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Müdürü ve Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Aykut ÖZKUL'a teşekkürlerimi sunarım.

Çok değerli katkılarından dolayı TİK üyeleri hocalarım Sayın Prof. Dr. Cumhur ÇÖKMÜŞ (Konya Gıda Tarım Üniversitesi Rektörü) ve Sayın Prof. Dr. Özlem YILDIRIM'a (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı) teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca doktora öğrenimim süresince, bilgi ve deneyimlerinden çokça istifade ettiğim, Sayın hocam Dr. Öğretim Üyesi Evren Doruk ENGİN'e (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü) ve tez çalışmamda bana yardımcı dokunan Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Bölümü araştırmacısı Dr. Touraj FARZANİ'ye teşekkürü bir borç bilirim.

İyimser, yapıcı ve üretken karakterleri ile bana sıcak ve samimi bir çalışma ortamı sağlayan Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarındaki çalışma arkadaşlarım Sayın Arş. Gör. Dr. Başar KARACA (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı) ve yüksek lisans öğrencisi Ayşe Büşra KARAKAYA'ya, ayrıca, Arş. Gör. Ekin DEMİRAY (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı), MSc Hüseyin Kaan KABADAYI ve üzerimde emeği olan tüm öğretmenlerime ve hocalarıma, sonsuz teşekkürü bir borç bilirim. Doktora tez çalışmalarım sırasında bana vermiş oldukları manevi desteklerinden ötürü Sayın Dr. Mutlu ERDOĞAN (Max Planck Nörobiyoloji Enstitüsü) ve Sayın Öğretim Üyesi Dr. Volkan ERGİN'e (Erzincan Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı) teşekkürlerimi sunarım.

Tüm yaşamım boyunca, bana maddi manevi her türlü desteği eksiksiz olarak sunmuş olan anne ve babama, doktora çalışmalarımın bütün aşamalarına yakından şahit olan ve her türlü desteği ve anlayışı benden esirgemeyen sevgili abim Sayın Doç. Dr. Mehmet Cem ŞAHİN'e (Ankara Üniversitesi İlahiyat Fakültesi) ve kardeşim Fırat ŞAHİN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu doktora tezi, 115S074 no'lu, "Kırım-Kongo kanamalı Ateşi Hastalığına Karşı Profilaktik ve İmmunoterapötik Biyolojik Madde Üretimi" başlıklı 1003 projesi ile kısmen desteklenmiş olup, TÜBİTAK Başkanlığı'na sonsuz saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Ergin ŞAHİN

Ankara, Haziran 2018

“Yüksek elektrik mühendisi, emekli deniz albayı, merhum dedem Mustafa Suzi
ERGİN’in aziz hatırasına”



İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xviii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	8
2.1 Kırım Kongo Kanamalı Ateşinin Tarihçesi.....	8
2.2 Kırım Kongo Kanamalı Ateşinin Moleküler Biyolojisi	11
2.2.1 Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsünün virion özellikleri ve genom organizasyonu	11
2.2.2 Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsünün yaşam döngüsü.....	14
2.2.3 Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsünün kodladığı proteinler ve konağı ile etkileşimi	21
2.3 Kırım Kongo Kanamalı Ateşinin Filogenisi	28
2.4 Kırım Kongo Kanamalı Ateşinin Epidemiyoloji.....	33
2.5 Kırım Kongo Kanamalı Ateşinin Klinik ve Laboratuvar Bulguları.....	40
2.6 Kırım Kongo Kanamalı Ateşinin Patogenezi	44
2.7 Kırım Kongo Kanamalı Ateşinin Tedavisi ve Korunma Stratejileri	47
2.8 Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü için Aşı Geliştirme Yaklaşımları.....	51
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	57
3.1 Materyal	57
3.1.1 Hayvanlar	57
3.1.2 Memeli hücreleri	58
3.1.3 KKKAV suşu	58
3.1.4 Bakteri suşları	58
3.1.5 Plazmitler	58
3.1.6 Oligonükleotit primerler	60
3.2 Yöntem	61

3.2.1 Bakteri kültürü.....	61
3.2.2 Memeli hücre kültürü	61
3.2.3 Farelerin barındırılması	61
3.2.4 KKKAV KAST2012 izolatının kültürü.....	62
3.2.5 KKKAV KAST2012 suşunun genomik RNA'sının izolasyonu ve komplementer DNA (cDNA) sentezi	62
3.2.6 Polimeraz zincir tepkimesi (PZT).....	62
3.2.7 Agaroz jel elektroforezi	64
3.2.8 Bakterilerden plazmit izolasyonu	64
3.2.9 Restriksiyon enzimi ile plazmit vektörlerin kesilmesi ve kesim ürünlerinin ve PZT amplikonlarının agaroz jelden geri alınması	64
3.2.10 SLiCE klonlama	65
3.2.11 5' uçlarından fosfatlanmış küt uçlu lineer DNA'nın T4 DNA ligaz enzimi ile halkasal hale getirilmesi	68
3.2.12 Bakterilerin plazmit ile transformasyonu için alıcı (kompetent) hale getirilmesi ve alıcı bakterilere plazmit aktarımı	68
3.2.13 DNA dizi analizi	69
3.2.14 Filogenetik analizler.....	69
3.2.15 BHK-21 hücrelerinin plazmit vektörlerle geçici ve kararlı olarak transfeksiyonu.....	70
3.2.16 Floresan mikroskopisi.....	71
3.2.17 Western blot.....	71
3.2.18 BHK-21 hücrelerinden Trizol ajanı ile genomik DNA ve total RNA izolasyonu ve Ters Transkripsiyon (RT) PZT	72
3.2.19 3.2.19 Boş vektör hazırlanması	73
3.2.20 Plazmit DNA aşılı vektörü ile BALB/c ırkı farelerin aşılınması ve farelerden serumların toplanması	73
3.2.21 Nötralizasyon deneyi.....	74
3.2.22 Antikor izotip analizi	74
3.2.23 Aşılanmış farelerin serumlarında sitokin seviyelerinin belirlenmesi.....	75
3.2.24 İstatistik analizleri.....	75
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	76
4.1 KKKAV KAST2012 İzolatının Olgun Gc Glikoproteinini Kodlayan Dizisinin pVAX1 Vektörüne Klonlanması	76
4.1.1 KKKAV KAST2012 izolatının olgun Gc kodlayan dizisi için yapılan RT-PZT	76

4.1.2 pVAX1 vektörünün HindIII restriksiyon enzimi ile lineer hale getirilmesi	77
4.1.3 KKKAV KAST2012 izolatının Gc kodlayan dizisinin, HindIII restriksiyon enzimi ile lineer hale getirilmiş olan pVAX1 plazmit vektörüne SLiCE klonlama yöntemi ile klonlanması.....	78
4.2 KKKAV KAST2012 izolatının, klonlanmış olan Gc açık okuma çerçevesinin kodladığı proteinin amino asit dizisinin filogenetik analizi	83
4.3 KKKAV KAST2012 İzolatının Gc Glikoproteininin Açık Okuma Çerçevesinin pEGFP-C1 İfade Vektörüne Klonlanması.....	84
4.3.1 KKKAV KAST2012 izolatına ait Gc açık okuma çerçevesinin, pVAX1-Gc vektörü kalıp olarak kullanılarak PZT ile çoğaltılması.....	85
4.3.2 pEGFP-C1 vektörünün HindIII ve BamHI restiksiyon enzimleri ile lineer hale getirilmesi	86
4.3.3 KKKAV KAST2012 izolatının Gc açık okuma çerçevesinin, HindIII ve BamHI restriksiyon enzimleri ile lineer hale getirilmiş olan pEGFP-C1 plazmit vektörüne SLiCE klonlama yöntemi ile klonlanması.....	87
4.3.4 Girdi pozitif transformanttan elde edilen plasmidin Sanger DNA dizilemesi	88
4.4 Klonlaması Yapılan KKKAV KAST2012 İzolatına Ait Olgun Gc Kodlayan Dizinin <i>in vitro</i> Olarak İfadesinin Gösterilmesi.....	90
4.4.1 BHK-21 hücrelerinin pEGFP-C1-Gc vektörü ile geçici transfeksiyonu.....	91
4.4.2 BHK-21 hücrelerinin pEGFP-C1-Gc vektörü ile kararlı olarak transfeksiyonu ve Gc'nin hem transkripsiyon hem de protein düzeyindeki ifadesinin gösterilmesi	92
4.5 pEGFP-C1-Gc Vektöründen EGFP Açık Okuma Çerçevesinin Çıkartılması	95
4.6 pGc-VAC Vektörüne N-uç 8X Histidin Etiketinin Takılması.....	98
4.7 BHK-21 Hücrelerinin pGc-VAC-8xHistag Vektörü ile Kararlı Olarak Transfeksiyonu ve Gc İfadesinin Protein Düzeyinde Gösterilmesi.....	102
4.8 Fare İmmünizasyon Deneyleri İçin Boş Vektör Hazırlanması	103
4.9 İmmün Olarak Yeterli, BALB/c Irkı Farelerin, pGc-VAC DNA Aşı Vektörü ile İmmünizasyonu ve Farelerde KKKAV Gc'ye Karşı Oluşturulan Hümmoral ve Hümmesal Bağışıklık Yanıtlarının Değerlendirilmesi.....	106
4.9.1 pGc-VAC DNA aşı vektörü ile bağışıklanmış, immün olarak yeterli, BALB/c ırkı farelerde, KKKAV KAST2012 izolatına karşı geliştirilen nötrale edici antikor yanıtlarının değerlendirilmesi.....	107
4.9.2 pGc-VAC DNA aşı vektörü ile bağışıklanmış, immün olarak yeterli, BALB/c ırkı farelerde meydana gelen total antikor yanıtlarının değerlendirilmesi.....	109

4.9.3 pGc-VAC DNA aşı vektörü ile bağışıklanmış, immün olarak yeterli, BALB/c ırkı farelerde meydana gelen hücresel immün yanıtların, serum sitokin seviyelerinin belirlenmesi ile değerlendirilmesi.....	113
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	117
KAYNAKLAR	121
ÖZGEÇMİŞ.....	144



SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
<	Büyüktür
>	Küçüktür
~	Yaklaşık olarak
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
A (nükleik asit için)	Adenin
A (peptit için)	Alanin
bç	Baz çifti
C (nükleik asit için)	Sitozin
C (peptit için)	Sistein
°C	Santigrat derece
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
cm	Santimetre
D	Aspartat
dH ₂ O	Distile su
ddH ₂ O	İki defa distile edilmiş su
E	Glutamat
g	Gram
G (nükleik asit için)	Guanin
G (peptit için)	Glisin
H	Histidin
HCl	Hidroklorik asit
I	İzolösin
K	Lizin
kb	Kilo baz
kbç	Kilo baz çifti
L (hacim birimi için)	Litre
L (peptit için)	Lösin
L (+)	Polarize ışık düzlemini sola çeviren molekül
log	Logaritma
M	Metiyonin
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum klorür
MgSO ₄	Magnezyum sülfat
mL	Mililitre
mM	Milimolar
N	Asparajin
NaCl	Sodyum klorür
ng	Nanogram
nm	Nanometre
p	İstatistiksel anlamlılık değeri
P	Prolin

R	Arjinin
rpm	Dakikadaki devir
S	Serin
T (nükleik asit için)	Timin
T (peptit için)	Treonin
V	Valin
W	Triptofan
Y	Tirozin
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
κ	Kappa

Kısaltmalar

AdHu5	İnsan serotip 5 adenovir�s�
ALT	Alanin amimo transferaz
AST	Aspartat amino transferaz
ATCC	Amerikan tipi kültür kolleksiyonu
BUN	Kan �re nitrojeni
CD	farklılaşma yığılım molekülleri (Cluster of Differentiation)
CMV	Sitomegalo virüs
cRNA	Tamamlayıcı (komplementer) ribonükleik asit
�VC	çoklu veziküler cisimcikler
DC	Dendritik hücre
DNA	deoksiribonükleik asit
DMEM	Dulbecco'nun modifiye ettiği Eagle'nin besiyeri
DMSO	Dimetilsülfoksit
dNTP	Deoksin�kleozit trifosfat
dsRNA	çift iplik�ekli ribonükleik asit
ECL	Arttırılmış kemilüminesan
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
ER	Endoplazmik retikulum
ESCRT	Taşınma için gerekli endozomal tasnif kompleksi
FBS	Fetal sığır serumu
Gc	Glikoprotein C
GP	Glikoprotein
Gn	Glikoprotein N
GP�	Glikoprotein �nc�s�
HIV-1	İnsan immün yetmezlik virüsü 1
IFN	İnterferon
IFNAR	İnterferon alfa/beta reseptörü
IFNAR ^{-/-}	İnterferon alfa/beta reseptör geni işlevsiz hale getirilmiş hayvan
IL	İnterlökin
IRF3	İnterferon düzenleyici faktör 3

ISG15	İnterferon uyarımlı gen 15
KKKA	Kırım Kongo kanamalı ateşi
KKKAV	Kırım Kongo kanamalı ateşi virüsü
LB	Luria Bertani besiyeri
LRT	Likelihood oranı testi
MAVS	RIG-1/mitokondriyal antiviral sinyalizasyon proteini
MBD	Mucin benzeri domain
MERS	Orta Doğu solunum sendromu
M-MuLV	Moloney fare lösemi virüsü
MOI	Enfeksiyon çokluk çarpanı
mRNA	Haberci ribonükleik asit
MVA	Modifiye Vaccinia Ankara virüsü
NCR	Kodlama yapmayan bölge
NFκB	Nükleer-kappa-hafif-zincir-aktive olmuş B hücrelerin enhanseri
NK	Doğal öldürücü hücre
NO	Nitrik oksit
NP	Nükleokapsit proteini
NS _M	Yapısal olmayan protein M
NS _S	Yapısal olmayan protein S
OD	Optik yoğunluk
ORF	Açık okuma çerçevesi
OTU	Yumurtalık tümörü
PAGE	Poliakrilamit jel elektroforezi
PKR	Protein kinaz R
PreGc	Öncü Glikoprotein C
PreGc	Öncü Glikoprotein N
PT	Protrombin zamanı
Rab	RAS ilintili protein
PZT	Polimeraz zincir tepkimesi
RdRp	RNA bağımlı RNA polimeraz
RIG-1	Retinoik asit uyarımlı gen 1
RNA	Ribonükleik asit
RNP	Ribonükleoprotein
RSV	Solunum sinsityal virüsü
RT	Ters transkripsiyon
RT-PZT	Ters transkripsiyon-polimeraz zincir tepkimesi
RVAV	Rift Vadisi ateşi virüsü
SARS	Şiddetli akut solunum sendromu
SDS	Sodyumdodesilsülfat
SLiCE	Dikişsiz ligasyon klonlama özütü (Seamless ligation cloning extract)
SKI-1/S1P	Subtilisin keksin izozim-1/bölge-1 proteazı
STAT1	Sinyal transdüseri ve transkripsiyon aktivatörü
TAE	Tris-asetik asit-EDTA
TBST	Tris ile tamponlanmış tuzlu su çözeltisi
TEM	Geçirmeli elektron mikroskopu
TGA	Trans golgi ağı

Th1	Yardımcı T hücre tip 1
Th2	Yardımcı T hücre tip 2
TNF	Tümör nekroz faktörü
TRIM25	Üç parçalı motif içeren protein 25
TSS	Transformasyon saklama çözeltisi
Ub	Ubiküitin
vRNA	Viral ribonükleik asit
YDP	Yaygın damar içi pıhtılaşma sendromu



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 KKKA virüsünün negatif boyama yöntemi kullanılarak geçirmeli elektron mikroskopu (TEM) ile alınmış görüntüsü	11
Şekil 2.2 KKKA virüsünün genom segmenlerinin virion içerisindeki temsili gösterimi	13
Şekil 2.3 KKKA'nın genom organizasyonu	14
Şekil 2.4 KKKA'nın yaşam döngüsü	17
Şekil 2.5 KKKA glikoprotein işlenmesi ve oluşan ürünler	20
Şekil 2.6 KKKA protein domainleri, motifleri ve katalitik amino asit kalıntıları	26
Şekil 2.7 KKKA S segmentindeki 1446 bazlık ORF'nin filogenetik analizi	30
Şekil 2.8 <i>Hyalomma marginatum</i> türü kenenin insan derisi üzerinde alınmış fotoğrafı	34
Şekil 2.9 <i>Hyalomma</i> cinsi kenelerin yaşam döngüsü ve KKKA'nın dikey ve yatay bulaşısı	36
Şekil 2.10 KKKA'nın coğrafik dağılımı	38
Şekil 2.11 Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde yatan KKKA'lı hastalar	42
Şekil 3.1 Tez çalışmasında kullanılan BALB/c ırkı fareler	57
Şekil 3.2 pVAX1 vektörünün (Invitrogen) haritası	59
Şekil 3.3 pEGFP-C1 vektörünün (Clontech) haritası	59
Şekil 3.4 Tek DNA parçasının SLiCE ile klonlanması	65
Şekil 4.1 KKKA KAST2012 izolatının Gc kodlayan dizisi için yapılan RT-PZT sonucu	77
Şekil 4.2 HindIII restriksiyon enzimi ile lineer hale getirilmiş pVAX1 vektörünün agaroz jeldeki görüntüsü	78
Şekil 4.3 Gc2-F ileri ve Gc1-R geri primerleri kullanılarak 32 koloni ile yapılan PZT sonrasında elde edilen amplikonların agaroz jeldeki görüntüleri	79
Şekil 4.4 Gc2-F ve Gc 3'-R primerleri kullanılarak, klon 7, 11, 14, 19, 24 ve 27 ile yapılan koloni PZT sonrasında elde edilen amplikonların agaroz jeldeki görüntüleri	80
Şekil 4.5 CMV 3'-F ileri ve pVAX1-R geri primer çifti kullanılarak girdi pozitif klon 14'ten elde edilen dört tane koloni (14[1], 14[2], 14[3] ve 14[4]) ile yapılan koloni PZT sonrasında elde edilen amplikonların agaroz jeldeki görüntüleri	81

Şekil 4.6 NotI restriksiyon enzimi ile lineer hale getirilmiş pVAX1-Gc vektörünün agaroz jeldeki görüntüsü	82
Şekil 4.7 pVAX1-Gc vektörünün haritası.....	83
Şekil 4.8 KKKAV KAST2012 izolatına ve KKKAV'nin 13 farklı suş veya izolatına ait olgun Gc protein dizileri ile, MEGA7 yazılımında, n eighbour joining algoritması ve 500 önyükleme yinelemesi (bootstrap replicate) kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaç	84
Şekil 4.9 pVAX1-Gc vektörü kalıp olarak kullanılarak, Gc SLiCE-F2 ve Gc SLiCE-R2 primerleri ile yapılan PZT sonucunda elde edilen amplikonun agaroz jeldeki görüntüsü	85
Şekil 4.10 HindIII ve BamHI restriksiyon enzimleri ile lineer hale getirilmiş pEGFP-C1 vektörünün agaroz jeldeki görüntüsü	86
Şekil 4.11 EGFP-F ve Gc SLiCE-R2 primerleri kullanılarak, Klon1a ile yapılan koloni PZT sonrasında elde edilen amplikonun agaroz jeldeki görüntüsü	87
Şekil 4.12 Klon1a'nın plazmidi ile EGFP-F, Gc Seq2, Gc Seq3 ve Gc Seq4 dizileme primerleri kullanılarak yapılan Sanger DNA dizilemesinden elde edilen kromatogramlar	89
Şekil 4.13 pEGFP-C1-Gc vektörünün haritası.....	90
Şekil 4.14 pEGFP-C1-Gc vektörü ile geçici olarak transfekte BHK-21 hücrelerinin, floresan ışık mikroskopi ve aynı alanın basit ışık mikroskopi ile alınmış görüntüsü.....	91
Şekil 4.15 pEGFP-C1-Gc vektörü ile kararlı olarak transfekte olmuş BHK-21 hücrelerinin genomik DNA'sında Gc geninin varlığının gösterilmesi	92
Şekil 4.16 pEGFP-C1-Gc vektörü ile kararlı olarak transfekte olmuş BHK-21 hücrelerinin mRNA'ları ile Gc Seq4 ve Gc SLiCE-R2 primer çifti kullanılarak yapılan RT-PZT sonrası elde edilen amplikonun agaroz jeldeki görüntüsü	93
Şekil 4.17 pEGFP-C1-Gc vektörü ile kararlı halde transfekte BHK-21 hücrelerinde EGFP-Gc füzyon ürününün western blot yöntemi ile gösterilmesi	94
Şekil 4.18 pEGFP-C1-Gc vektöründen EGFP açık okuma çerçevesinin çıkartılması için yapılan PZT sonucunda elde edilen amplikonun agaroz jeldeki görüntüsü	95
Şekil 4.19 CMV 3'-F ve Gc SLiCE-R2 primerleri kullanılarak 17 koloni ile yapılan koloni PZT sonrasında elde edilmiş amplikonların agaroz jeldeki görüntüleri	96

Şekil 4.20 Klon 5'in, plazmidi ile CMV-F dizileme primeri kullanılarak yapılan Sanger DNA dizilemesinden elde edilen kromatogram	97
Şekil 4.21 pGc-VAC DNA aşı vektörünün haritası	98
Şekil 4.22 pGC-VAC vektörüne N-uç histidin etiketi takılması için yapılan PZT sonucunda elde edilmiş ampikonun agaroz jeldeki görüntüsü	99
Şekil 4.23 His Tag-F ve Gc 5'-R primerleri kullanılarak, 12 koloni ile yapılan koloni PZT sonrasında elde edilmiş olan ampikonların agaroz jeldeki görüntüleri	100
Şekil 4.24 Klon 12'in, plazmidi ile CMV-F dizileme primeri kullanılarak yapılan Sanger DNA dizilemesinden elde edilen kromatogram	101
Şekil 4.25 pGc-VAC-8xHistag vektörünün haritası.....	102
Şekil 4.26 pGc-VAC-8xHistag vektörü ile kararlı halde transfekte BHK-21 hücrelerinde 8x His-Gc füzyon ürününün western blot yöntemi ile gösterilmesi	103
Şekil 4.27 pEGFP-C1 vektörünün NdeI ve NheI restriksiyon enzimleri ile kesilmesi sonrası oluşan ürünlerin agaroz jeldeki görüntüsü.....	104
Şekil 4.28 Ori 3'-F, F1 Ori 5'-R primerleri kullanılarak, yedi koloni ile yapılan koloni PZT sonrasında elde edilmiş olan ampikonların agaroz jeldeki görüntüleri	105
Şekil 4.29 Fare immünizasyon deneylerinde negatif kontrol olarak kullanılacak boş vektörün haritası	106
Şekil 4.30 pGC-VAC DNA aşı vektörü ile immunize edilmiş farelerden alınan serumlarda, KKKAV'ye özgü nötralize edici antikorların varlığının gösterilmesi	108
Şekil 4.31 KKKAV KAST2012 izolatu ile enfekte olmuş Vero E6 hücrelerinde meydana gelen sitopatik etkiler.....	109
Şekil 4.32 pGc-VAC DNA aşı vektörü ile bağışıklanan, immün olarak yeterli BALB/c ırkı farelerin, aşı rejimi boyunca, serum total IgG1 antikor seviyelerinde meydana gelen değişiklikler	110
Şekil 4.33 pGc-VAC DNA aşı vektörü ile bağışıklanan, immün olarak yeterli BALB/c ırkı farelerin, aşı rejimi boyunca, serum total IgG2a antikor seviyelerinde meydana gelen değişiklikler	111
Şekil 4.34 pGc-VAC DNA aşı vektörü ile bağışıklanan, immün olarak yeterli BALB/c ırkı farelerin, aşı rejimi boyunca, serum total IgG2b antikor seviyelerinde meydana gelen değişiklikler	112

Şekil 4.35 pGc-VAC DNA aşısı vektörü ile bağışıklanan, immün olarak yeterli BALB/c ırkı farelerin, aşısı rejimi boyunca, serum total IgG3 antikor seviyelerinde meydana gelen değişiklikler	113
Şekil 4.36 pGc-VAC DNA aşısı vektörü ile üç defa aşılanmış immün olarak yeterli BALB/c ırkı farelerin serumlarındaki interferon gama (IFN- γ) seviyesi....	114
Şekil 4.37 pGc-VAC DNA aşısı vektörü ile üç defa aşılanmış immün olarak yeterli BALB/c ırkı farelerin serumlarındaki tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) seviyesi	115
Şekil 4.38 pGc-VAC DNA aşısı vektörü ile üç defa aşılanmış immün olarak yeterli BALB/c ırkı farelerin serumlarındaki interleukin 2 (IL2) seviyesi	115
Şekil 4.39 pGc-VAC DNA aşısı vektörü ile üç defa aşılanmış immün olarak yeterli BALB/c ırkı farelerin serumlarındaki interleukin 4 (IL4) seviyesi	116
Şekil 4.40 pGc-VAC DNA aşısı vektörü ile üç defa aşılanmış immün olarak yeterli BALB/c ırkı farelerin serumlarındaki interleukin 10 (IL10) seviyesi	116

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 İnsan KKKAV aşısı için öngörülen ürün özellikleri.....	55
Çizelge 3.1 Tez çalışmasında kullanılan oligonükleotit primerler.....	60
Çizelge 3.2 PZT deneylerinin tepkime hazırlığı ve ısı döngü koşulları.....	63
Çizelge 3.3 SLiCE klonlama tepkimesinin standart koşulları	67



1. GİRİŞ

Bugün Kırım Kongo Kanamalı Ateşi olarak bilinen enfektif hastalık ilk defa 12. yüzyılda bugünkü Tacikistan bölgesinde tanımlanmıştır (Ergönül 2006a). Modern tıpta, bu şiddetli kanamalı ateş hastalığı, 1944-1945 yıllarında eski Sovyetler Birliği'nde bulunan Kırım yarım adasında 200 insan vakasını içeren büyük bir salgın şeklinde yeniden ortaya çıkmıştır (Ergönül 2006a). Bundan yaklaşık 9 yıl sonra, Kongo'da kanamalı ateş sendromuna yol açan viral bir hastalık rapor edilmiştir (Simpson vd. 1967). Nihayetinde her iki hastalığa da aynı virüsün sebep olduğu bulunmuş ve bu virüse Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü (KKKAV) adı verilmiştir (Casals 1969).

KKKAV, Dang Humması Virüsünden sonra ikinci en çok yayılış gösteren ve tıbbi öneme sahip arbovirüstür (Hoogstraal 1979). Bugün KKKAV'nin Afrika'da, Asya'da, Ortadoğu'da ve Avrupa'da olmak üzere 30'dan fazla ülkede yayılış gösterdiği bilinmektedir. Bu haliyle KKKAV, dünyanın geniş bir kısmında endemik olarak bulunmaktadır. KKKAV, *Bunyavirales* takımında bulunan *Nairoviridae* ailesinin *Orthonairovirus* cinsine mensuptur. KKKAV hayvanları da enfekte etmektedir. Fakat bu enfeksiyonlar asemptomatiktir. Aslında endemik bölgelerde sığır, at, koyun, keçi, domuz, deve, eşek, fare ve köpekleri içeren evcil ve yabani omurgalılarda viremi ve antikör varlığı gösterilmiştir. Fakat virüsün bu hayvanlarda hastalık yaptığına dair henüz herhangi bir kanıt bulunmamaktadır. Dolayısıyla KKKAV, doğada göze çarpmadan enzootik kene-omurgalı-kene döngüsü ile dolaşır (Bente vd. 2013).

KKKAV, insanlara temel olarak *Ixodidae* ailesine mensup *Hyalomma* cinsinde bulunan daha çok enfekte *Hyalomma marginatum* türü kenenin kişiyi ısırması ile veya enfekte kenenin el ile ezilmesi sonucu bulaşır (Whitehouse 2004, Vorou vd. 2007, Leblebicioglu 2010). İnsan enfeksiyonları ayrıca enfekte hayvanların ve insanların kanı ve dokuları ile temas yoluyla da meydana gelebilir. İlave olarak insandan insana bulaşma, ileri evredeki hastaların vücut sıvıları ile ve aerosollerini ile temas yoluyla da meydana gelebilir (Whitehouse 2004, Vorou vd. 2007, Leblebicioglu 2010). Endemik bölgelerdeki hayvan yetiştiricileri ve enfekte hastalarla temas halinde olan sağlık sektörü çalışanları risk grupları arasındadırlar (Whitehouse 2007). Genel olarak

KKKAV enfeksiyonları, kişide aniden beliren yüksek ateş ile spesifik olmayan grip benzeri semptomlar oluşturur. Enfeksiyonun klinik semptomları genellikle hemoraji, kas ağrıları ve yüksek ateştir. KKKAV enfeksiyonlarının dünya genelinde yol açtığı ölüm oranı % 2 ile % 80 arasında değişmektedir (Whitehouse 2004, Leblebicioğlu 2010). Ancak bu oran Türkiye'deki vakalarda % 5'in biraz altında belirlenmiştir (Yılmaz vd. 2009, Leblebicioğlu vd. 2016). Hastalığın muğlak belirtileri ve çok değişken inkübasyon süresi, ayırıcı teşhis olmaksızın hastalığa sebep olan ajanın KKKAV olduğunu kesin olarak tanımlamamızı zorlaştırmaktadır. Kırım kongo kanamalı ateşi hastalığının teşhisinde yaygın olarak kandaki KKKAV genomunu tespit eden ters transkripsiyon polimeraz zincir tepkimesi (RT-PZT) yöntemi ile kandaki KKKAV antijenlerini tespit eden immunofloresan yöntemi ve ELISA yöntemi kullanılmaktadır. Hastalardaki viremi, kandan, plazmadan veya dokudan virüs izolasyonu yapılarak gösterilebilir. Ancak virus izolasyonu, biyogüvenlik düzeyi 3+ olan laboratuvarlarda yapılabilmektedir. Hastalığın spesifik bir tedavisi olmadığı için enfekte kişilere destekleyici tedaviler uygulanmaktadır. Ayrıca bu hastalıktan korunmak için hali hazırda onay almış herhangi bir aşı da bulunmamaktadır.

KKKAV, yapılan genom analizleri sonucunda yedi farklı gruba ayrılmıştır (Anagnostou ve Papa 2009, Leblebicioğlu 2010). Bunlar sırasıyla: Afrika 1 (Senegal), Afrika 2 (Demokratik Kongo Cumhuriyeti ve Güney Afrika), Afrika 3 (Güney ve Batı Afrika), Avrupa 1 (Rusya, Türkiye, Bulgaristan, Kosova ve Arnavutluk), Avrupa 2 (Yunanistan), Asya 1 (Orta Doğu, Pakistan ve İran) ve Asya 2 (Çin, Özbekistan, Tacikistan ve Kazakistan)'dir.

Nairoviridae ailesine mensup virüsler üç tane negatif polariteli tek iplikçikli RNA genomu bulundurlar. Bunlar sırayla küçük (S), orta (M) ve büyük (L) genom segmentleridir. Bu ailedeki virionlar, kılıflıdır ve çapları yaklaşık 100 nm kadar olan küresel bir yapıdadır (Schmaljohn ve Nichol 2007). KKKAV'nin S segmenti, nükleokapsit proteini (NP) ve NP açık okuma çerçevesine (ORF) zıt yönde kodlanan, yapısal olmayan S (NS_S) proteini için kodlama yapar (Barnwal 2015). KKKAV'nin M segmenti, Gn ve Gc adı verilen zarf glikoproteinleri için ve bir tane

yapısal olmayan protein (NS_m) için bir öncül poliprotein kodlar. KKKAV'nin L segmenti ise, RNA bağımlı RNA polimerazı kodlar (Schmaljohn ve Nichol 2007).

KKKAV'nin L segmenti yaklaşık 12 kb uzunluğundadır ve 4000 amino asite yakın bir protein kodlayan tek açık okuma çerçevesi içerir. L segmenti üzerinde kodlanan RNA bağımlı RNA polimeraz, RNA genom replikasyonundan ve mRNA sentezinden sorumludur. KKKAV'nin M segmenti yaklaşık 5,4 kb uzunluğundadır ve iki tane kılıf glikoproteininin yanında öncül poliprotein N ucunda konumlanmış, işlevleri tam olarak bilinmeyen "Mucin benzeri" ve GP38 adlı iki tane domain ile birlikte bir tane yapısal olmayan protein (NS_m) için kodlama yapar (Schmaljohn ve Nichol 2007). Viral Gn ve Gc glikoproteinleri, virionun yüzeyinde bulunur ve konak hücreye tutunmadan ve hücreye girişten sorumludurlar. Olgun Gn ve Gc glikoproteinlerinin oluşturulabilmesi için öncül poliprotein konak proteazlarca işlenmeleri gerekmektedir. Gn ve Gc viral glikoproteinler, konak hücre yüzey almaçlarına (reseptörlerine) tutunmak için birbirleriyle fiziksel olarak etkileşirler (Schmaljohn ve Nichol 2007). Diğer yandan bu zarf glikoproteinleri nötralize edici antikorlar için hedef yapıları temsil ederler. Aslında iyileşmekte olan hastaların serum örneklerinin, akut enfeksiyonlu kişileri belli bir seviyeye kadar hastalıktan koruyabildiği gösterilmiştir (Vassilenko vd. 1990). KKKAV'nin S segmenti yaklaşık 1,6 kb uzunluğundadır ve nükleokapsit proteini (NP) için kodlama yapar. Bu protein, viral RNA moleküllerini enkapside ederek ribonükleokapsit parçacıklarının oluşturulmasından sorumludur (Schmaljohn ve Nichol 2007). Ancak NP'nin viral RNA ile nasıl etkileştiği tam olarak bilinmemektedir.

KKKAV'nin replikasyonuna kısaca değinilecek olursa: virüsün konak hücre yüzeyine tutunmasında rol alan hücresel almaçlar (reseptörler) halen bilinmemektedir. Ancak enfeksiyon genel olarak virüsün konak hücre yüzeyine bağlanması ile başlar. Bu bağlanmada KKKAV'nin yüzey glikoproteinleri rol oynamaktadır. KKKAV'nin hücre içerisine kladrin bağımlı endositoz yoluyla girdiği gösterilmiştir (Simon vd. 2009a). Hücre içine alınan kladrin kaplı veziküller, önce endozomlarla sonra da lizozomlarla kaynaşırlar. Lizozomlardaki asidik ortamın varlığı, virüste bir dizi konformasyonel değişiklikler meydana getirir ve bu sayede virüsün sitoplazmaya geçişi sağlanır (Marsh ve Helenius 2006).

KKKAV'nin genom replikasyonu diğer tüm negatif polariteli RNA virüslerinde olduğu gibi öncelikle virion ile ilişkili RNA bağımlı RNA polimeraz kullanılarak pozitif polariteli antigenomun sentezlenmesini gerektirir. KKKAV enfeksiyonlarının ilk altı saatinde yalnızca viral transkripsiyon gözlenir (Simon vd. 2009b). Viral replikasyon olasılıkla yeni sentezlenen genom ve antigenomları enkapside etmeye yetecek kadar NP'ler ortamda bulundukları zaman başlar.

Özel olarak Orthonaïrovirus cinsindeki virüslerin hücre içerisindeki montajlanma süreci çok az anlaşılmıştır. Ancak viral montajlama ile ilgili yapılan önceki çalışmalar, *Nairoviridae* ailesindeki virüslerin virion olgunlaşmasının, golgi'deki sisterna içine tomurcuklanma yolu ile yapıldığını göstermiştir (Matsuoka ve Chen 1991). KKKAV ribonükleokapsit partikülleri, viral montajın geç aşamalarının meydana geldiği golgi aygıtında bulunurlar (Booth vd. 1991). KKKAV glikoproteinleri, endoplazmik retikulumda sentezlenirler ve sonrasında golgi aygıtına taşınırlar (Bertolotti-Ciarlet vd. 2005). Viral polimeraz, virionun olgunlaştığı golgi sisternasına yakın bir yerde, perinükleer bölgede bulunan NP ile birlikte lokalize olur, ancak lokalizasyon sürecinde rol oynayan viral sinyaller halen bilinmemektedir.

Özet olarak viral proteinler, endoplazmik retikulumdan golgi aygıtına taşınırlar ve burada olgunlaştırılan virionlar veziküller içine tomurcuklanırlar. Sonunda bu veziküller hücre iskelet sistemi kullanılarak hücre yüzeyine taşınırlar ve konak hücrenin salgı yolağı ile hücreden dışarı salınırlar (Schmaljohn ve Nichol 2007, Simon vd. 2009b).

KKKAV enfeksiyonlarından korunmada bugün için hali hazırda Avrupa İlaç Birimi'nden veya ABD Gıda ve İlaç Dairesi'nden lisans almış herhangi bir onaylı aşı bulunmamaktadır. Günümüzde yalnız Bulgaristan'da, 1970'lerde eski Sovyetler Birliği'nde geliştirilen, KKKAV ile enfekte yeni doğmuş fare ve sıçan beyin dokusu örneklerinin formaldehit ve ısı ile muamelesi sonucunda elde edilen ve alüminyum hidroksit adjuvanı ile formüle edilmiş enfektif olmayan inaktif virüs aşısı kullanılmaktadır (Papa vd. 2011a). Bununla birlikte son zamanlarda farklı yaklaşımların kullanıldığı, KKKAV için aşı geliştirilme çalışmaları yapılmaktadır. Yakın zaman önce yapılan bir çalışmada KKKAV IbAr 10200 suşunun glikoproteinlerini ifade eden

rekombinant Modifiye Vaccinia Ankara (MVA) virüsü oluşturularak KKKAV için bivalen bir aşı geliştirilmiştir (Buttigieg vd. 2014). Bu aşının, KKKAV enfeksiyonunun *in vivo* modeli olan tip 1 interferon almaç (reseptör) geni ortadan kaldırılmış (IFNAR^{-/-}) fareleri hastalıktan % 100 oranda koruduğu gösterilmiştir (Buttigieg vd. 2014). Yine Türkiye’de yapılan bir çalışmada KKKAV’ye karşı hücre kültürü tabanlı bir inaktif virüs aşısı geliştirildiği bildirilmiştir (Canakoglu vd. 2015). Kelkit06 suşundan elde edilen bu aşının da immünize tip 1 interferon almaç (reseptör) geni ortadan kaldırılmış fareleri hastalıktan % 80 oranda koruduğu gösterilmiştir (Canakoglu vd. 2015). Son zamanlarda yapılan bir başka çalışmada, KKKAV’nin glikoproteinlerini ifade eden, yenilebilir transgenik bitkiler kullanılarak farelerin oral yolla immünizasyonu gerçekleştirilebilmiştir (Ghiasi vd. 2011). Yaklaşık on yıl kadar önce yapılan bir diğer çalışmada, KKKAV’nin IbAr 10200 suşunun tüm M segmentini ifade eden bir DNA tabanlı KKKAV aşısı geliştirilmiştir (Spik vd. 2006). Ancak bu aşı ile farelerin immünizasyonu sonrasında antikor yanıtı elde edilebilmiş olmakla beraber o dönemde *in vivo* enfeksiyon modelinin bulunmaması sebebiyle aşının canlıyı hastalıktan koruyabilme özellikleri araştırılamamıştır. Yine son zamanlarda yapılan bir başka çalışmada, transkripsiyonel olarak yetkin olan, KKKAV yüzey glikoproteinlerini (Gn ve Gc) sergileyen virüs benzeri partiküllerin ve KKKAV Gn, Gc ve NP proteinlerinin ubiquitin bağlı hallerini ifade eden DNA plazmitlerinin hastalıktan koruma etkinlikleri IFNAR^{-/-} farelerde gösterilmiştir (Hinkula vd. 2017). Sonuç olarak, sadece DNA plazmitleri ile bağışıklanmış farelerin tamamının letal enfeksiyondan korundukları gösterilmiştir. Bu yüksek hayatta kalma oranı aşılanmış farelerde meydana gelen baskın durumdaki hücre aracılı Th1 yanıtlarına dayandırılmıştır (Hinkula vd. 2017). Yakın zaman önce KKKAV IbAr 10200 suşunun M segmentinin kodon optimize hale getirilmiş dizisi ile meydana getirilen DNA aşısının etkinliği iki ayrı letal fare modelinde çalışılmıştır (Garrison vd. 2017). Aşının hem IFNAR^{-/-} fareleri hem de tip 1 interferon yolağı antikorlarla geçici olarak baskılanmış fareleri letal KKKAV enfeksiyonundan % 60’tan fazla oranda koruduğu gösterilmiştir (Garrison vd. 2017).

Günümüzde klinik çalışmalar devam ettirilmekle birlikte, insanda kullanılmak üzere, herhangi bir insan patojeni mikroorganizma için geliştirilmiş lisanslı bir DNA tabanlı aşı bulunmamaktadır. Ancak DNA tabanlı aşılar oldukça güvenilir olmaları sebebiyle

umut vermektedir ve halen aktif araştırma konusudur. Bu güne kadar kanser için hazırlananlar da olmak üzere pek çok viral enfeksiyona karşı DNA tabanlı aşı geliştirilmiştir (Saade vd. 2012). DNA tabanlı aşılarda etki mekanizmasını, DNA'nın kas içi olarak enjeksiyonunu takiben antijenin kas hücrelerinde ve/veya antijen sunan hücrelerde ifade ettirilmesi, daha sonra antijenin işlenerek MHC-I ve MHC-II molekülleri üzerinde T hücrelerine sunulması, bununla beraber hücre dışına çıkan antijenin yine antijen sunan hücrelerce alınması ve işlenmesi ve antijen yüklü antijen sunan hücrelerin lenf nodlarına taşınarak buralarda B ve T hücrelerini aktive etmesi süreçleri oluşturmaktadır. DNA aşısı ile birlikte aşının immünojenitesini artırıcı özellikte olan adjuvanlar da kullanılabilmekle beraber, plazmit kökenli DNA aşılarında bulunan metile olmayan CpG motiflerinin antijen sunan hücrelerde bulunan endozomal ve sitoplazmik DNA sensörlerini aktive ederek immün sistemi uyardığı ve böylece kendi başına adjuvan özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir (Dalpke vd. 2001). Bugün DNA tabanlı aşılarda etkinliği hayvan modellerinde gösterilmiş ve hali hazırda veterinerlikte kullanılmak üzere dört farklı onay almış DNA aşısı bulunmakla birlikte, bu zamana kadar yapılan insan klinik denemelerinde bu etkinlik oldukça düşük seviyede kalmıştır (Pereira vd. 2014). Geline aşamada DNA tabanlı aşılarda geliştirilmesindeki en büyük sıkıntı, aşının insandaki immünojenitesinin yeterli seviyede olmasının sağlanmasıdır. Son zamanlarda yapılan klinik denemelerde ilk nesil DNA aşılarının yerini, antijen tasarımı ve ifadesi iyileştirilmiş, formülasyonu yeni moleküler adjuvanlarla geliştirilmiş olan ikinci nesil DNA aşıları almıştır (Ferraro vd. 2011). Geliştirilmiş olan yeni nesil DNA aşıları ayrıca kişiye daha etkin teslim yöntemleri kullanılarak verilmektedir. Bu haliyle yeni nesil DNA aşılarının insandaki immünojenik etkinliği arttırılarak umut vaat edici sonuçlar alınmaya başlanmıştır (Ferraro vd. 2011).

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi, yeniden ortaya çıkan (Re-emerging) viral zoonotik bir hastalıktır. Bu hastalık, Türkiye'de ilk defa 2002 yılında Kelkit Vadisi'nde tanımlanmıştır (Leblebicioğlu 2016). O zamandan beri KKKA hastalığı, Türkiye'de Bolu, Kastamonu, Karabük, Çorum, Çankırı, Yozgat, Amasya, Tokat, Sivas, Erzincan, Gümüşhane, Bayburt ve Erzurum illeri ile çevresini kapsayan Orta ve Doğu Anadolu'nun kuzey kesimlerinde görülmektedir (Leblebicioğlu 2016). Ancak son yıllarda hastalığın görüldüğü alan daha da genişlemiştir ve hemen hemen ülkemizin her

bölgesinden sporadik vaka bildirimi yapılmaktadır (Leblebicioğlu 2016). Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı'nın verilerine göre 2002 ile 2016 yılları arasında Türkiye'de toplam 10119 KKKA olgusu rapor edilmiş ve bu olguların toplam 485 tanesi ölümle sonuçlanmıştır (<http://ekmud.org.tr> 2016). KKKA hastalığı için koruma amaçlı geliştirilmiş henüz herhangi bir aşının olmayışı, ülkemizde korunulması büyük önem arz eden bu hastalığa karşı güvenli ve etkili aşların geliştirilmesini öncelikli kılmaktadır. KKKAV'ye karşı DNA tabanlı bir aşının geliştirilebilmesi için gerekli olan bilgi birikiminin sağlanması, ülkemizin akademik ve ekonomik anlamda gelişmesine katkı sağlayacaktır.

Önerilen bu çalışmada KKKAV'ye karşı DNA tabanlı bir aşı prototipi olarak kullanılabilecek bir ökaryotik ifade plazmiti geliştirilmesi ve seçilen fare modelindeki immünojenik etkinliğinin sorgulanması amaçlanmıştır. Bu amaca yönelik olarak hazırlanmış olan DNA aşı vektörünün KKKAV'nin immunodominant özellikteki Gc yüzey glikoproteinini hedef alması amaçlanmıştır. Oluşturmuş olduğumuz bu DNA aşı vektöründen kodlanan KKKAV Gc yüzey glikoproteininin, *in vitro* olarak, seçilen hücrede ifadenmesi hem protein hem de transkripsiyon seviyesinde gösterilmiştir. *In vitro* gen ifadesi doğrulanan DNA aşı vektörü, *in vivo* olarak fare modelinin immünizasyonunda kullanılmış ve aşılanmış farelerdeki B hücreleri ile yürütülen humoral bağışıklık yanıtları ile T hücreleri ile yürütülen hücresel bağışıklık yanıtları incelenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Kırım Kongo Kanamalı Ateşinin Tarihçesi

Enfektif hastalıkların tarihinin kendiliğinden oluşmuş veya insan eliyle yapılmış mumyalar üzerinde yapılan çalışmalar ile aydınlatılabiliyor olması bir yana tıp tarihçileri, özellikle yazılı metinlerin yetersizliği sebebiyle belli bir enfektif hastalığın kesin olarak tarihlendirilmesinde milattan önce (MÖ) 3000 yıllarının ötesine geçilmesinin imkansız olduğu yönünde hem fikirdirler. Yine tıp tarihçilerine göre tarihte kullanılmış belirli bir hastalık adı, o dönemde benzer semptomlara sahip pek çok başka hastalığı da tanımlamak için kullanılıyor olabilir ve bu gerçekten yola çıkarak bir hastalığın geçmişe dönük olarak değerlendirilmesinde dikkatli olunması gerekir. Örneğin Anadolu’da kurulmuş Hitit medeniyetinin kullandığı dil olan Hititçe’de içerisinde deri döküntüsü, yüksek ateş ve isal gibi KKKA semptomlarını da içermesi olası görünen ve pek çok hastalığı birden tanımlamak için kullanılmış olan “henkan” kelimesi bulunmaktadır. Bu sebepten ötürü KKKA hastalığının tarihte ilk defa ne zaman ve nerede ortaya çıktığı konusu kesinlik kazanmamıştır. Ancak pek çok enfektif hastalık gibi KKKA’nın da daha çok tarım reformu ve hayvanların evcilleştirilmesinden sonra görülmeye başlanmış olması olasılık dahilindedir.

KKKA’nın mevcut yazılı kaynaklardan yola çıkılarak ilk görüldüğü tarihlere dair yapılan araştırmalar incelendiğinde, Arda ve Acıduman, 9. ve 10. yüzyıllarda, bugünkü İran’ın Rey şehrinde doğmuş ve yaşamış olan ve Doğu Dünya’sında olduğu kadar Batı Dünya’sında da tanınmış seçkin bir hekim olan Ebu Bekir Muhammed bin Zekeriyya er-Razi’nin ünlü tıp eseri El-Havi’nin 18. yüzyılda kaleme alınmış olan Hamidiye el yazmalarında KKKA benzeri bir vakadan bahsettiğini belirtmişlerdir (Arda ve Acıduman 2007). El-Havi’nin Hamidiye el yazmalarında vaka şu şekilde takdim edilmiştir: “Hulife bir kadının ateşi ve ishali olduğunu, daha sonra ondan siyah kan benzeri birşeyin akmaya başladığını söyledi. Üstad o siyah şeyin toprak üzerinde köpürüp köpürmediğini sordu. Hayır; köpürmedi dediler. Üstad eğer köpürseydi siyah safra olarak değerlendirilirdi; çünkü köpürmeyi karaciğerde hapsolmuş olan yanmış kan olarak değerlendirilir dedi. Şimdi bir çift kase ateşte kızgın hale getirilir ve içine

sığır yoğurdunun ayrıranı koyularak söndürülür; daha sonra hasta ayrıranı içer. Allahın izni ile o kan durdurulur ve hasta tamamen iyileşir (Arda ve Aciduman 2007).”

Hoogstraal’a göre yaklaşık olarak 1110 yılında Harzemşahlılar döneminde Dzhurzhoni adlı bir hekim tarafından Tacikçe olarak kaleme alınmış bir tıp kavramları dizininde, İbni Sina’nın takipçilerinden olan hekim Zeyneddin Seyit İsmail ibn el-Hüseyni el-Jorjani’nin (Ölümü Merv 1136) KKKA benzeri bir hastalığı tanımlamış olduğu görülmektedir (Hoogstraal 1979). Eserde bu hastalığın belirtileri, idrarda, rektumda, dış etlerinde, kusmukta, tükürükte ve karın boşluğunda kan bulunması olarak ifade edilmiştir. Eserde, hastalığa pire veya kene gibi sert ve küçük olan ve normalde siyah bir kuşun paraziti olarak yaşayan bir eklembacaklının yol açtığı yazmaktadır. Hastalığın bazen etkisi olmayan tedavisi, eserde, ısırılmış bölgeye “bodzkhar” ve kırmızı sandal ağacı özünün uygulanması ve hastanın taze keçi sütü ile birlikte tereyağı, “khot’ma” çiçeği (Ebegümeçigiller, *Malvaceae*), “khovre” bitkisinin yaprağı veya özü ve keten tohumu, hindiba ve su kabağı özleri ile beslenmesi olarak ifade edilmektedir (Hoogstraal 1979). KKKA hastalığı asırlar boyunca Özbekistan’nın güney bölgesinde yaşayan yerel halk tarafından da en az üç farklı isim ile tanımlanmıştır (Hoogstraal 1979).

KKKA’nın modern tıptaki önemi ilk defa 1944-1945 yıllarında yaklaşık 200 Sovyet ordu çalışanının İkinci Dünya Savaşı’nın harap ettiği Kırım’daki çiftçilere yardım ettikleri sırada ortaya çıkan salgında enfekte olmaları ile fark edilmiştir. Sonraki salgınlar, Sovyet Rusya’nın Astrahan ilinde (1953-1968) ve Rostov ilinde (1963-1971) ve Bulgaristan’da (1953-1973) meydana gelmiştir. İkinci Dünya Savaşını takiben Rus hekim Chumakov, KKKA ile enfekte hasta kanı enjekte ettiği insanlarda hastalığı yeniden meydana getirerek KKKA’nın virüs kaynaklı bir hastalık olduğunu öne sürmüş ve hastalığın vektörünün ise yaygın olarak insanları ısırarak kene türleri olduğunu tespit etmiştir (Chumakov 1945). Chumakov bu virüsü Kırım Kanamalı Ateşi Virüsü (KKAV) olarak adlandırmıştır. Sonraki yirmi yılda henüz herhangi bir viral ajanın karakterize edilememiş olmasından ve dolayısıyla antijenlerinin ve antikollarının bilinmemesinden ötürü, serolojik, tanısal, deneysel ve epidemiyolojik çalışmalar yapılamamış ve hastalığın doğal geçmişine ve kritik bulaşma faktörlerine dair herhangi bir bilgi

edinilememiştir. Bu dönemde hastalığın kontrol altına alınması ve önlenmesi varsayımlara bağlı olarak yürütülmüştür.

1967 yılında Kırım Kanamalı Ateşi hastalarından ve cesetlerden alınan kanlar yeni doğmuş farelere intraserebral olarak verilerek etiyolojik ajan çoğaltılabilmiş ve izole edilmiştir. Böylelikle KKKA araştırmalarında yeni bir döneme gelinmiştir. Hastalık etkeni virüs, elektron mikroskopu ile yapısal karakterizasyon çalışmalarında, fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesinde ve serolojik sınıflandırmasının yapılmasında kullanılabilmektedir. Ayrıca tanımlanabilir antikoları ve antijenleri üretilerek çeşitli deneysel ihtiyaçlar için ve serolojik araştırmalarda kullanılabilmektedir. Bu çalışmalarla Chumakov ve diğerleri tarafından serolojik olarak sınıflandırılan KKAV'nin Drozdov suşu, ileri karakterizasyon çalışmaları için 1968 yılında, o sıralarda Casals'ın Kongo ve Uganda'daki geçmiş kanamalı ateşi salgınları sırasında hastalardan izole edilen "Kongo Virüsü" suşları ile çalışmalar yaptığı Yale Arbovirüs Araştırma Ünitesi'ne gönderilmiştir. Casals, KKAV Drozdov suşu ve Kongo virüsü suşları ile yaptığı serolojik çalışmalar sonucunda farklı olarak değerlendirilen bu iki virüse ait suşların antijenik özellikleri bakımından birbirlerinin tamamen aynısı olduğu sonucuna varmıştır (Casals 1969). Casals, aynı çalışmasında serolojik olarak incelediği Pakistan'da *Hyalomma* cinsi kenelerden izole edilmiş virüs suşlarının ve Nijerya'da kene, sığır, kirpi ve tatarcık sineklerinden elde edilmiş bazı virüs suşlarının da antijenik olarak yine KKAV Drozdov suşundan ve Kongo virüsü suşlarından ayırt edilemez olduklarını bulmuştur. Böylece, Chumakov'un virüs izolasyonu ve karakterizasyonu için ilk defa yeni doğmuş fareleri kullanmasından iki yıldan daha az bir süre sonra, KKKA'ya yol açan virüsün, Dünya üzerinde Bulgaristan'dan Pakistan'a Afrika'nın pek çok bölgesinden Orta Asya'ya kadar geniş bir coğrafyada yayılış gösterdiği ortaya çıkartılabilmektedir.

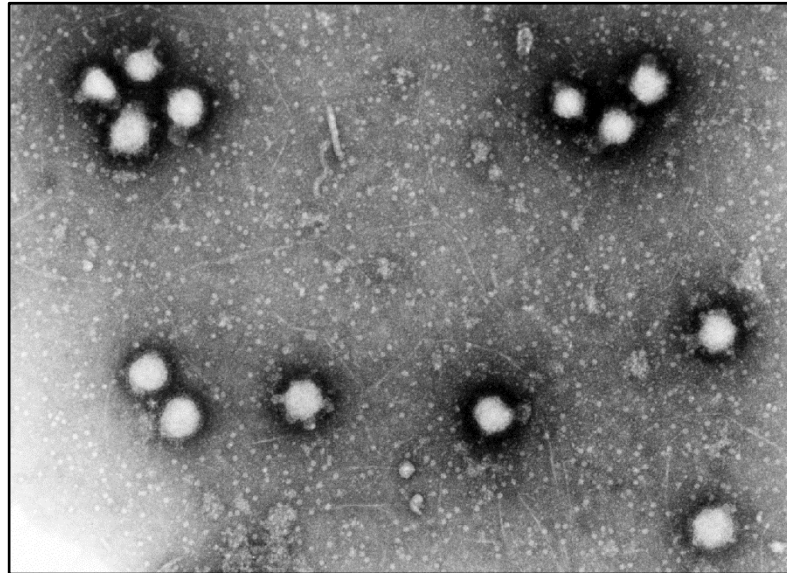
Kongo virüsü, Dünya Arbovirüsleri (eklembacaklı kaynaklı virüsler, Arthropod-borne Virus) Kataloğu'na resmi olarak 1969 yılında kaydedilmiştir. Ancak çok geçmeden tasfiyeci taksonomistler Kongo virüsünün, kanamalı ateş hastalığı yapan diğer kene kaynaklı virüslerin hepsinin ortak adı olması gerektiği yönünde tartışma başlatmışlardır. Fakat Sovyet otoriteler, uzun süredir tanınmış olan Kırım Kanamalı Ateşi Virüsü adının

korunması gerektiği yönünde ısrarcı olmuşlardır. Bir orta yol bulmak adına Casals, hem resmi olmayan tarihi nitelikteki Kırım Kanamalı Ateşi adını, hem de resmi olan Kongo virüsü adını kullanarak “Kırım Kanamalı Ateşi Kongo Virüsü” ortak adını önermiştir. Bazı Sovyet yazarlar bu adı benimserken bazıları Kırım Kanamalı Ateşi adını kullanmaya devam etmiş ve Afrika suşları ile uğraşan diğerleri ise Kongo virüsü adını kullanmayı tercih etmiştir. Nihayet Hoogstraal, Kırım Kanamalı Ateşi Kongo Virüsü adını biçimsiz bulmuş ve bugünkü kullanılan şekliyle Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü adını önermiştir. Bu isim zaman içerisinde herkes tarafından genel kabul görmüştür.

2.2 Kırım Kongo Kanamalı Ateşinin Moleküler Biyolojisi

2.2.1 Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsünün virion özellikleri ve genom organizasyonu

KKKAV, zarflı, küresel yapıda ve yaklaşık olarak 90-100 nm çapında olan bir virion yapısına sahiptir (Schmaljohn ve Nichol 2007). KKKA virüsünün virion yapısının geçirmeli elektron mikroskopu (TEM) ile alınmış görüntüsü şekil 2.1’de verilmiştir.

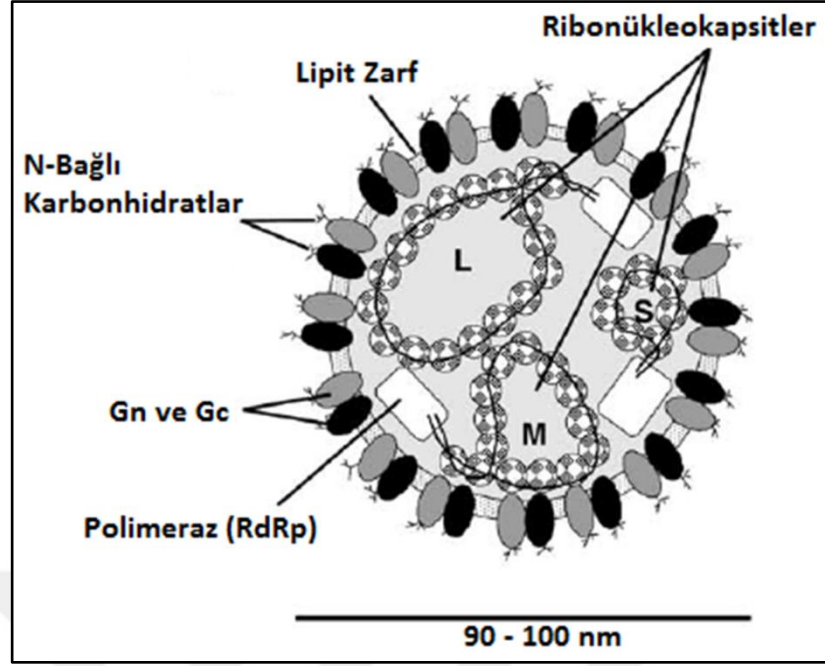


Şekil 2.1 KKKA virüsünün negatif boyama yöntemi kullanılarak geçirmeli elektron mikroskopu (TEM) ile alınmış görüntüsü (<https://web.stanford.edu> 2000)

KKKAV'nin yüzeyinin nanoölçümsel yapısına (ultrayapısına) dair yürütölmüş henüz bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak KKKAV'nin üyesi olduğu Orthonairovirus cinsinin prototip üyesi olan Bunyamwera virüsü ile yapılan elektron kriyo-tomografik çalışmalar, bu virüsün ikozahedral olmayan pleomorfik şekilde olduğunu ve yüzeyinde bulunan glikoprotein (Gn-Gc) çıkıntılarının kendine mahsus üçayak (tripod) benzeri bir diziliş gösterdiğini ortaya koymuştur (Bowden vd. 2013).

KKKAV'nin süktroz gradient santrifüjleme ile belirlenmiş batık (buoyant) yoğunluğu 1,17 g/cm³tür. Virüsün, zarf içermesinden ötürü enfektivitesi eter ve kloroform gibi lipid çözücüler tarafından yüksek düzeyde etkilenmektedir. Virüsün sıcaklığa bağılı olarak enfektivitesini tamamen yitirmesi 37 °C'de 18-20 saatte, 45 °C'de 1,5 – 2 saatte ve 56 °C'de 5 – 10 dakikada gerçekleşmektedir (Donets vd. 1977).

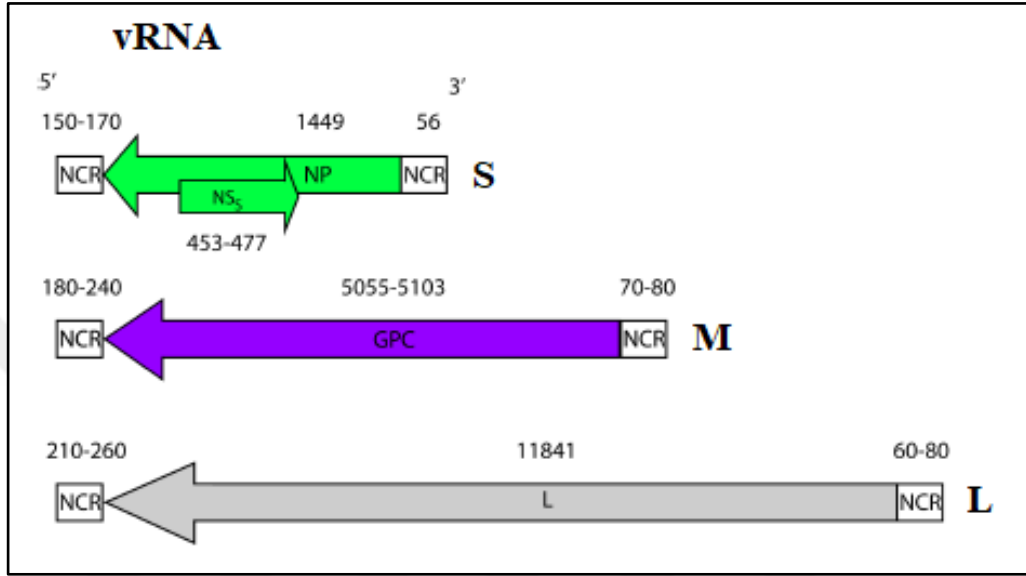
KKKAV üç parçadan oluşan (tripartite) negatif anlamlı tek iplikçikli RNA genomu içermektedir. KKKAV genom segmenlerinin virion içerisindeki şematik gösterimi şekil 2.2'de verilmiştir. Küçük (S), orta (M) ve büyük (L) olarak tanımlanan bu genom segmentleri 5' ve 3' uçlarında birbirlerine komplementer olan ve kodlama yapmayan bölgeler (NCR) içerirler. Bu her iki uçta bulunan komplementer diziler, genom segmentlerinin halkasal halde bulunmalarını sağlar (Hewlett vd. 1977). Genom segmentlerinin terminal kısımlarında bulunan dokuz nükleotitlik diziler (5'-UCUCAAAGA ve 3'-AGAGUUUCU) Orthonairovirüslerde korunmuştur ve viral promotor bölgeleri olarak işlev görürler. Bu NCR bölgeleri, viral RNA bağımlı RNA polimeraz'ın (RdRp) (L proteini) buraya bağlanarak viral genomun transkripsiyonunu ve replikasyonunu başlatması için gereklidir (Bergeron vd. 2010, Devignot vd. 2015, Zivcec vd. 2015). NCR bölgelerinin nükleotit dizileri, genom segmentleri arasında farklılık göstermekle birlikte, herbirisi, viral genomun enkapsidasyon, transkripsiyon, replikasyon ve yeni oluşan virionlar içine paketlenme süreçlerini başlatma kabiliyetine sahiptir.



Şekil 2.2 KKKAV virüsünün genom segmenlerinin virion içerisindeki temsili gösterimi (Whitehouse 2004)

Yakın zamana kadar KKKAV'nin üç genom segmentinin herbirinin sadece bir tane protein kodladığı tahmin ediliyordu. Ancak S segmentinde nükleokapsit proteinini (NP) kodlayan NP genine göre zıt yönelimde olan ikinci bir yapısal olmayan S (NS_S) proteininin kodlandığı gösterilmiştir (Barnwal 2015). Bu yönüyle KKKAV çift anlamlı (ambisense) özellikte bir virüs olarak değerlendirilebilir (Barnwal 2015). KKKAV'nin genom organizasyonunun tasviri gösterimi şekil 2.3'te verilmiştir. KKKAV'deki bu çift anlamlı kodlama üst üste örtüşen (overlapping) kodlanan bölgeler içerir. Bu haliyle Nairovirüslerdeki çift anlamlı kodlama, zıt yönlerde protein kodlayan genlerin transkripsiyon sonlanma sinyalleri içeren genler arası (intergenik) bölgeler ile ayrılmış olduğu Arenavirüslerdekinden farklılık gösterir (Albarino vd. 2007). Diğer Nairovirüslerle benzer büyüklükte S segmenti (~1,6 kb) içermesine karşın, KKKAV'nin M segmenti (~5,4 kb) ve L segmenti (~12,1 kb), diğer Nairovirüs üyelerininkinden belirgin olarak daha büyüktür ve sırasıyla glikoprotein öncüsü (GPÖ) ve RdRp (L proteini) için kodlama yapan tek gen içerirler.

KKKAV'nin genom segmentleri veya viral RNAları (vRNA) NP ve RdRp ile enkapside edilerek genomik ribonükleoprotein kompleksini (RNP) oluştururlar. Genomik RNPlar lipid zarfını ve yüzey glikoproteinlerini (Gn ve Gc) edinerek viral partiküller içerisine paketlenirler (Sanchez vd. 2002), (Şekil 2.2).



Şekil 2.3 KKKAV'nin genom organizasyonu (Zivcec vd. 2016)

Genom segmentlerindeki herbir kodlama yapan ve yapmayan bölgelerin baz uzunlukları üzerlerinde belirtilmiştir.

2.2.2 Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsünün yaşam döngüsü

KKKAV'nin ilk olarak hücre yüzeyine bağlanmasına Gn ve/veya Gc yüzey glikoproteinleri aracılık etmektedir. Ancak, viral tutunmada, hücre içerisine alınmada ve membran kaynaşmasında (Füzyon) görev alan spesifik glikoprotein hangisi olduğu ve bu süreçlerdeki detaylı rolü bilinmemektedir. Hücresel almaçlara (reseptörlere) bağlanmadan sorumlu glikoprotein Gc olduğu tahmin edilmektedir, çünkü Gc'yi hedef alan monoklonal antikolar, KKKAV'nin memeli hücrelerini enfekte etmesini nötralize edebilmektedir (Bertolotti-ciarlet vd. 2005). Gc glikoproteininin ayrıca virionun hücre içerisine alınmasından sonra bulundurduğu tahmin edilen kaynaşma ilmeği (fusion loop) bölgesi ile membran kaynaşmasına da aracılık ettiği düşünülmektedir (Garry ve Garry 2004). KKKAV Gc glikoproteininin bulundurduğu

tahmin edilen kaynaşma ilmeği, Rift Vadisi ateşi virüsünün (RVAV) Gc kaynaşma ilmeği ile belirgin olarak dizi homolojisi göstermektedir (Dessau ve Modis 2013). KKKAV'nin hücre içerisine girişi için gerekli olan hücresel almaçlar (reseptörler) henüz belirlenmemiştir. KKKAV Gc glikoproteini ile bir hücre yüzey proteini olan ve baskın olarak hücre çekirdekçiğinde (nükleolus) bulunan nükleolin arasında fonksiyonel bir fiziksel etkileşim olduğu önerilmiştir (Xiao vd. 2011). Nükleolinin solunum sinsityal virüsü (RSV) ve Japon ensefaliti virüsü için hücre almacı (reseptörü) olarak işlev yaptığı gösterilmiştir (Tayyari vd. 2011, Thongtan vd. 2012). Ancak, Nükleolinin KKKAV için hücre almacı (reseptörü) olarak görev aldığı savını desteklemek için daha fazla KKKAV enfeksiyon çalışmalarının yapılmasına ihtiyaç vardır.

Hücre yüzeyine bağlandıktan sonra, KKKAV, klatrin aracılı endositoz mekanizması ile hücre içerisine alınır. KKKAV'nin hücre içerisine girişi, kaveolin-1'e değil ancak klatrine ve klatrin oyuğu adaptör proteini-2 kompleksine ihtiyaç duymaktadır (Simon vd. 2009a, Garrison vd. 2013, Shtanko vd. 2014). KKKAV'nin hücre içerisine girişi ayrıca kolesterole ve düşük pH'a bağlıdır (Simon vd. 2009a, Garrison vd. 2013). Endositozu takiben KKKAV partikülleri, RAS ilintili protein 5 (Rab5)'e bağımlı olarak yürütülen bir süreçle erken endozomlara, buradan da son olarak çoklu veziküler cisimciklere (ÇVC) (Multivesicular Bodies) taşınırlar (Garrison vd. 2013, Shtanko vd. 2014). Buna karşın Rab7 bağımlı vezikül trafiğinin bloke edilmesi, KKKAV enfeksiyonunu veya KKKAV'nin ÇVC'lerle olan bağlantısını herhangi bir şekilde etkilememektedir (Shtanko vd. 2014). Öte yandan "taşınma için gerekli endozomal tasnif kompleksi" (ESCRT) yolağının bileşenlerinin bloke edilmesiyle işlevsel ÇVC'lerin oluşumunun engellenmesi, KKKAV'nin enfeksiyonunu azaltmıştır (Shtanko vd. 2014). Bu sonuç, KKKAV zarfının konak hücre membranları ile kaynaşması sırasında kullandığı temel membran sisteminin, olasılıkla ÇVC'ler olduğuna işaret etmektedir.

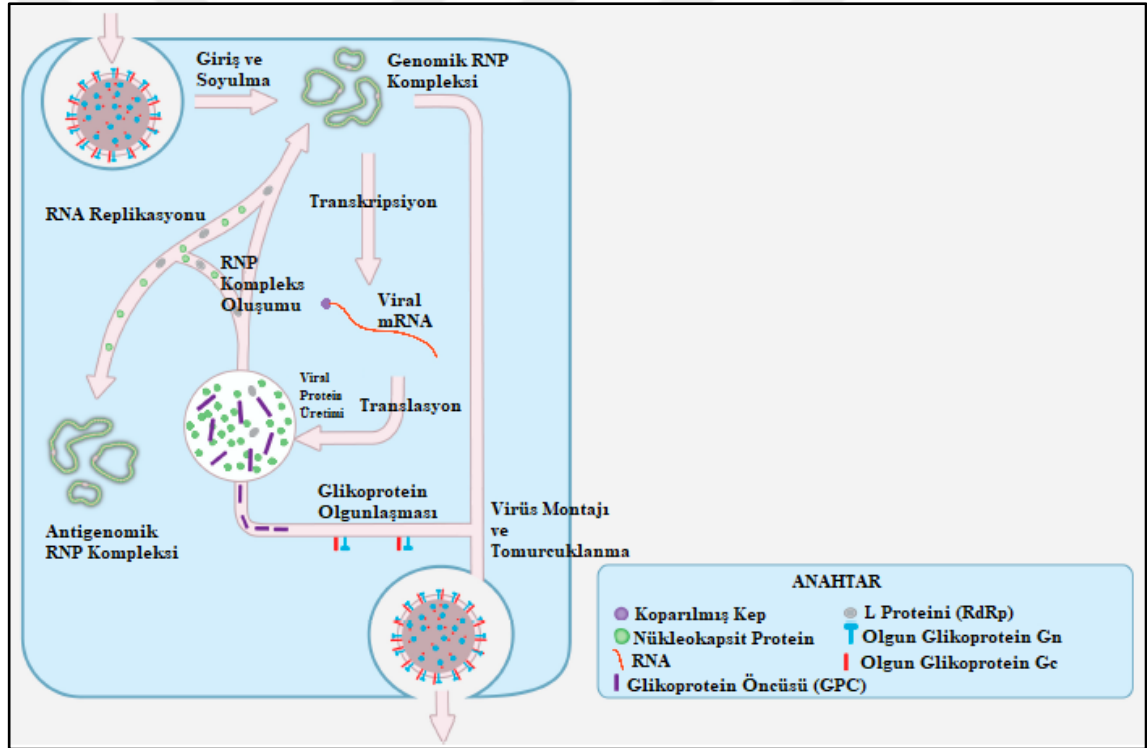
Hücre içerisine girmeyi ve membran kaynaşmasını takiben genomik RNP'ler sitozole geçirilirler ve enkapside haldeki viral RNA'lar, L proteini tarafından viral mRNA'ların sentezinde kalıp olarak kullanılırlar. Nairovirüs mRNA'larının 3' uçlarının transkripsiyon sonlanmasında kullanıldıklarına dair yapılmış herhangi bir çalışma

bulunmamaktadır. Ancak, Nairovirüslerle ilişkili Dugbe virüs mRNA'larının 5' ucu, hücrel mRNA'ların dizilerinden türetilen 7-metilguanilat (m7G) kepi yapısı içermektedir. L proteinin, viral mRNA sentezini başlatmak için primer olarak, kendi endonükleaz domainini kullanarak hücrel mRNA'lardan kopardığı m7G kepli oligonükleotitleri kullanır. KKKAV L proteininin, diğer virüslerin L proteinlerindeki endonükleazlarda gösterildiği gibi, 693. pozisyonunda bulundurduğu aspartat kalıntısı ile kepi koparma aktivitesi için gerekli olan Mn^{2+} iyonlarını koordine ettiği tahmin edilmektedir (Dias vd. 2009, Morin vd. 2010, Reguera vd. 2010, Devignot vd. 2015). D693'ün mutasyona uğratılması, seçici olarak L proteininin transkripsiyon aktivitesini ortadan kaldırmakta, fakat KKKAV genom analoglarını replike etme kabiliyetini etkilememektedir (Bergeron vd. 2010). Bu bulgu, kepli primerlerin KKKAV genom replikasyonunu başlatmak için kullanılmadığını göstermektedir.

Genomik RNP'lerin replikasyonu, kepsiz, negatif anlamlı vRNA'lar ile pozitif anlamlı komplementer RNA'ların (cRNA) replikasyonunu ve enkapsidasyonunu içeren bir süreçtir. Viral RNP'lerin replikasyonu minimum düzeyde L proteini ve NP gerektirmektedir (Bergeron vd. 2010). cRNA'ların ve vRNA'ların enkapside formları, sırasıyla antijenomik ve genomik RNP'ler olarak tanımlanırlar. KKKAV negatif anlamlı bir RNA virüsü olduğu için, genomik RNP'ler, kepli viral mRNA'ların sentezi için ve antijenomik RNP'lerin üretilmesinde kalıp olarak kullanılırlar. Genomik RNP'lerin replikasyonu sırasında, cRNA'lar, L proteini tarafından sentezlenir ve NP alt üniteleri uzayan iplikçiğe ilave edilerek antijenomik RNP'ler elde edilir. Daha sonra antijenomik RNP'lerin cRNA'ları, kalıp olarak kullanılmak suretiyle genomik RNP'ler elde edilir. KKKAV yaşam döngüsünün aşamalarını özetleyen tasvir, şekil 2.4'te verilmiştir.

RNP replikasyonunu takiben viral protein işlenmesi ve bunun sonunda da virüs olgunlaşması meydana gelir. KKKAV M segmentinden kodlanan glikoprotein öncüsünün (GPÖ) işlenmesi oldukça karmaşık bir olaydır ve diğer Nairovirüslerin glikoprotein işlenmesi süreçleri ile çok az benzerlik gösterir (Sanchez vd. 2002). GPÖ'nün olgunlaştırılması sonucunda, yapısal glikoproteinler olan Gn ve Gc, salgılanan ve yapısal olmayan proteinler GP160, GP85 ile GP38 ve yapısal olmayan M

proteini (NS_M) meydana getirilir (Sanchez vd. 2002, Sanchez vd. 2006, Altamura vd. 2007). *Nairoviridae* ailesi içerisinde salgılanan, yapısal olmayan glikoproteinleri kodladığı bilinen tek cins *Orthonairovirus*lerdir (Sanchez vd. 2002, Bertolotti-Ciarlet vd. 2005, Haferkamp vd. 2005, Altamura vd. 2007, Bergeron vd. 2007, Erickson vd. 2007, Estrada ve De Guzman 2011, Bergeron vd. 2015). Glikoproteinlerin tamamını meydana getirebilmek için GPÖ'ler aşırı derecede glikozillenir ve sonrasında çok çeşitli hücrel proteinleri, viral glikoproteinleri ve bakteriyel toksinleri işlediği bilinen, memeli serin proteaz ailesinden olan proprotein konvertazları da içeren konak proteazlar tarafından kesilirler (Vincent vd. 2003, Sanchez vd. 2006, Bergeron vd. 2007, Bergeron vd. 2015).



Şekil 2.4 KKKAV'nin yaşam döngüsü (Zivcec vd. 2016)

GPÖ'nün N-ucu, sentezlenmesini salgı yolağına yönlendiren bir sinyal peptidi bulundurur (Sanchez vd. 2002, Altamura vd. 2007). Peptit uzaması ve endoplazmik retikulum (ER) taşıma sonrasında N-uçtaki sinyal peptidi uzaklaştırılır, GPÖ'nün, N-glikozilasyonu yapılır, katlanır, molekül içi disülfid bağları kurulur ve öncü proteinin transmembran domainleri, ER membranını beş defa kateder (Sanchez vd. 2002). GPÖ,

ribozomlarda tamamen sentezlenmeden önce, Gn öncüsü (PreGn), Gc öncüsü (PreGc) ve NS_M proteinini oluşturmak üzere proteolitik olarak kesimlenir. Bu kesim aşamasının sinyal peptidazına ve membran içinde kesme yapan I-CLiPs proteazlarına gereksinim duyduğu düşünülmektedir. Çünkü bu üç proteinin oluşturulması, sinyal peptidinden sonra yapılan ve transmembran domainleri 2 ve 4'ün yakınından veya içerisinden yapılan kesimleme işlemine gereksinim duyar (Sanchez vd. 2002, Altamura vd. 2007). KKKAV glikoprotein işlenmesini ve sonunda oluşan ürünleri özetleyen tasvir şekil 2.5'te verilmiştir.

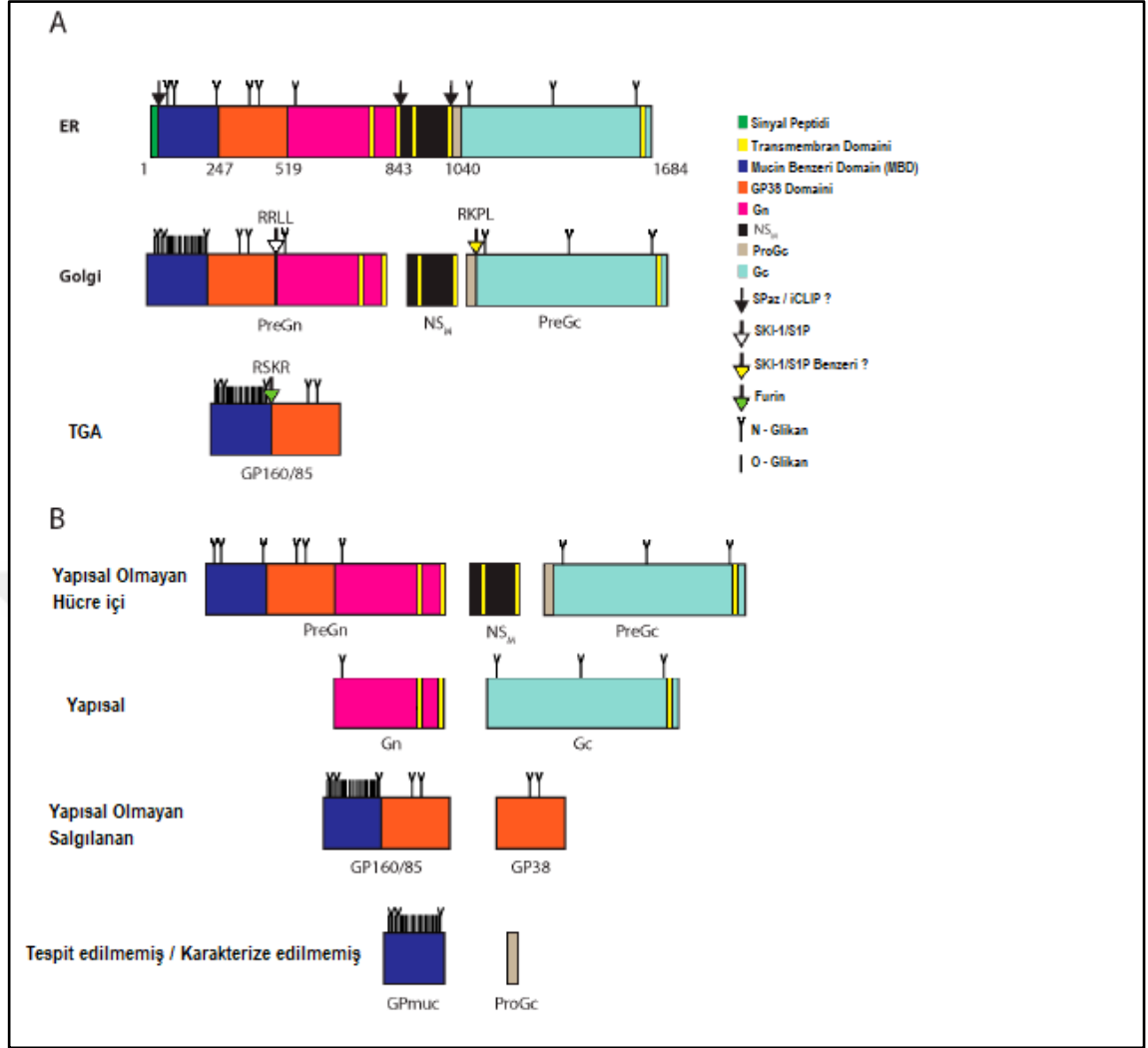
ER'deki GPÖ olgunlaşmasını PreGn'nin ve PreGc'nin Golgi kompleksine taşınması takip eder (Altamura vd. 2007, Bergeron vd. 2007). Burada PreGn'nin mucin benzeri domaini (MBD) çok sayıda O-bağlı glikan zincirleri edinir (Sanchez vd. 2006). PreGn, PreGc'nin yokluğunda kendi başına KKKAV montajlamasının yapıldığı yer olarak önerilen Golgi kompleksine taşınabilirken, PreGc, ER'den çıkabilmesi için PreGn'e gereksinim duyar (Bertolotti-Ciarlet vd. 2005). PreGn'in olgun Gn bölgesinde bulundurduğu N577 glikozilasyon bölgesi mutasyona uğratıldığında, PreGn'in ER'den çıkışı ve GP160'ın, GP85'in ve GP38'in salgılanması engellenmektedir (Erickson vd. 2007). Bu bulgu, N577'nin glikozillenmesinin, PreGn'nin katlanmasında ve Golgi kompleksine normal olarak taşınmasında kritik rol oynadığını önermektedir (Erickson vd. 2007).

GPÖ olgunlaşmasını tamamlamak için PreGn'nin ve PreGc'nin endoproteolitik olarak işlenmesi gerekir. PreGc'yi Gc'ye dönüştüren konak proteazı halen tanımlanmamıştır. KKKAV PreGc'nin kesilmesinde kullanılan RKPL motifinin, bir Arenavirüs olan Guanarito virüsünün GPÖ'sünün olgunlaştırılmasında kullanılan kesilme motifi ile tamamen aynı olması, Guanarito virüsü GPÖ olgunlaşmasında kullanılan subtilisin keksin izozim-1/bölge-1 proteazın (SKI-1/S1P) veya benzer özgünlüğe sahip başka bir proteazın KKKAV PreGc olgunlaşmasında da kullanılıyor olabileceğini düşündürmektedir (Rojek vd. 2008). PreGn'nin SKI-1/S1P tarafından kesilmesi, salgı yolağının erken evresinde, ya ER'de yada ER'den çıkışı sonrası cis-Golgi aparatında meydana gelmektedir (Vincent vd. 2003). PreGn'nin RRLL motifinden kesilmesi, MBD'yi ve GP38'i içeren N-uçtaki ürünleri (GP160 ve GP85) serbest bırakır (Vincent

vd. 2003). GP160/85, daha sonra, *trans*-Golgi ağında (TGA), furin proteaz tarafından MBD ve GP38 bağlantısının olduğu yerde bulunan, iyi korunmuş RSKR motifinden kesilir (Sanchez vd. 2006). Bu kesim işleminin GP38'i MBD'den kopardığı tahmin edilmektedir. Ancak mevcut antikolar, ya GP38'i ya da MBD'yi içeren kesilmemiş glikoptoteini (GP160/85) tanımaktadır ve henüz kesilmiş haldeki MBD'yi tanıyan herhangi bir antikor üretilmemiştir.

Önceleri GP160'ın GP85'in dimer hali olduğu düşünülmüştür. Çünkü MBD ve GP38'de bulunan epitoplar, her iki glikoproteinde de mevcuttur. Ancak bu glikoproteinlerin üre ve denatüre edici ajanlarla muamele edilmesi, jeldeki hareketliliklerinde herhangi bir değişiklik meydana getirmemiştir. İlave olarak GP160, GP85 ve GP38 glikoproteinlerinin *N*- ve *O*-bağlı glikanlara özgü olan glikozidazlara karşı benzer duyarlılığa sahip olmalarından dolayı bu glikoproteinlerin glikan içerikleri büyük ihtimalle birbirlerine benzemektedir (Sanchez vd. 2002, Sanchez vd. 2006). Bu sebeple, GP85 ile GP160'ın jeldeki hareketliliklerinde meydana gelen farklılıkları açıklayabilmek için ilave deneylerin yapılması gerekmektedir.

KKKAV'nin montajı ve hücre içerisinden çıkışı hakkındaki bilgilerimiz sınırlıdır. Diğer Nairovirüslerde olduğu gibi, KKKAV RNP'leri, büyük olasılıkla sitoplazmada bulunurlar ve NP'ler ise Golgi kompleksine yakın bir yerde perinükleer bölgede lokalize olmuştur (Andersson vd. 2004a). Virüs tomurcuklanmasının meydana geldiği bölgeyi çoğunlukla viral glikoproteinlerin hücre altı (subselüler) lokalizasyonu belirler. Glikoproteinlerin Golgi kompleksinde ve TGA'da, NP'lerin ise perinükleer bölgede birikmesi bulgusu, KKKAV partiküllerinin Golgi kompleksinde ve/veya TGA'da montajlandığı ve tomurcuklandığı gözlemleri ile örtüşmektedir (Bertolotti-Ciarlet vd. 2005, Bergeron vd. 2007, Andersson vd. 2004a, Andersson vd. 2004b). Montaj işlemini takiben KKKAV partikülleri çoğunlukla gözle görülür bir sitopatolojiye sebep olmadan ekzositoz ile hücre dışına bırakılırlar ve bu hücre dışına çıkış olayı, polarize olmuş epitel hücrelerinde bazolateral membranda meydana gelir (Connolly-Andersen vd. 2007).



Şekil 2.5 KKKAV glikoprotein işlenmesi ve oluşan ürünler (Zivcec vd. 2016)

a. KKKAV glikoprotein işlenmesi. GPÖ, N-glikozilasyonun meydana geldiği ER'de sentezlenir. Numaralar, amino asit pozisyonlarını belirtir. Sinyal peptidaz ve/veya membran içi kesme proteazları (iCLIPS), translasyonla eş zamanlı olarak GPÖ'yü, transmembran domaini-2'nin ve -4'ün yakınından veya içerisinden keser. Bu kesme işlemi sonunda PreGn, yapısal olmayan M proteini (NS_M) ve PreGc meydana gelir. Bu proteinler Golgi'ye hareket ederler ve burada, PreGn'nin mucin benzeri domaini O-glikozillenir ve SKI-1/S1P proteazı tarafından RRLL motifinden kesimlenir. PreGc de, SKI-1/S1P proteazı ile benzer özgünlüğe sahip bir proteaz tarafından RKPL motifinden kesimlenir. PreGn kesimlenmesi sonucu SDS PAGE'deki total moleküler ağırlıkları görünürde 160 kDa (GP160) ve 85 kDa (GP85) olan N-uç fragmanı serbest kalır. GP160/85, daha sonra, trans-Golgi ağında (TGA) furin proteaz tarafından kesimlenir (Zivcec vd. 2016), **b.** GPÖ ürünleri. GPÖ'nün proteolitik olarak işlenmesi, hücre ile ilişkili yapısal olmayan ürünleri (yapısal olmayan hücre içi), virionla ilişkili ürünleri (yapısal), salgılanan fakat virionla ilişkili olmayan ürünleri (yapısal olmayan salgılanan) ve karakterize edilmemiş veya tespit edilmemiş olan, çıkarımsal olarak bilinen ürünleri meydana getirir.

2.2.3 Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsünün kodladığı proteinler ve konağı ile etkileşimi

NP'nin primer işlevi, RNP'leri oluşturmak üzere vRNA'ları ve cRNA'ları enkapside etmektir. RNP oluşumundaki rolü ile uyumlu olarak, NP'nin, L proteininin N- ve C-uçları ile fiziksel etkileşime girdiği ve transfekte hücrelerde etiketlenmiş L proteini ile birlikte lokalize olduğu gösterilmiştir (Bergeron vd. 2010, Macleod vd. 2015). Hali hazırda L proteini için üretilmiş herhangi bir antikor bulunmamaktadır ve bu durum enfekte hücrelerde L proteininin çalışmasını engellemektedir. KKKAV ile enfekte hücrelerde, NP, aktin filamentine bağımlı bir şekilde perinükleer bölgede lokalize olur ve aktin polimerizasyonunun engellenmesi KKKAV'nin enfektivitesini azaltır (Connolly-Andersen vd. 2007). NP, olasılıkla başka fonksiyonlara da sahiptir. Örneğin, NP, viral partiküllerin yokluğunda dahi hücrelerden dışarı çıkabilir ve Nairovirüsleri andıran küresel partiküllerin oluşmasına yol açabilir. NP'nin bu özelliği, viral tomurcuklanmada muhtemel bir rolü olabileceğini ortaya koymaktadır (Zhou vd. 2011).

NP'nin işlevlerine dair önemli bilgiler, Irak'tan ve Çin'den izole edilen KKKAV izolatlarındaki NP proteinlerinin kristal yapısı incelenerek elde edilmiştir (Carter vd. 2012, Guo vd. 2012, Wang vd. 2015). KKKAV NP'nin yapısı, diğer Orthonairovirüs NP'lerinin yapısından daha çok Arenavirüslerin NP'leri ile yakından ilişkilidir (Qi vd. 2010, Raymond vd. 2010, Hastie vd. 2011, Reguera vd. 2013, Olal vd. 2014). KKKAV NP globüler baş ve esnek kol olmak üzere iki tane major domain içermektedir. KKKAV NP'nin globüler baş domaini, 23 tane α -heliks yapısı içerir ve genel görünüşü itibariyle bir Arenavirüs olan Lassa virüsünün NP'sine benzemektedir. RNA varlığında NP'nin oligomerler halinde kristalizasyonu, NP alt ünitelerinin baş-kuyruk yöneliminde organize olduklarını ortaya koymuştur. Bu organizasyon biçiminde, bir alt ünitenin kol domaini, komşu alt ünitenin baş domaini ile etkileşmekte ve sonra ilave etkileşimlerle çift antiparalel süpersarmal yapıda olan NP polimerleri meydana getirilmektedir. NP oligomerlerinin RNA ile birlikte oluşturduğu bu organizasyon biçimi NP'nin RNP'lerdeki organizasyonunu temsil edebilir (Wang vd. 2012).

NP'nin oligomerizasyonu, onun işlevini düzenliyor gibi görünmektedir. RNA'nın yokluğunda, NP'ler, yalnızca monomer halde bulunuyor gibi görünmektedir. NP'nin bu monomer hali, RNA'ya zayıf bir şekilde bağlanmaktadır ve bu bulgu, sadece oligomer haldeki NP'lerin etkin bir şekilde RNA bağladığını önermektedir (Gou vd. 2012, Wang vd. 2015). İlave olarak, monomerik ve oligomerik NP organizasyonlarının karşılaştırılması sonucunda, oligomerizasyonu takiben, kol domaininin konformasyonunu değiştirdiği ve bu değişikliğin NP'nin daha kuvvetli bir şekilde RNA bağlamasını sağladığı gösterilmiştir (Wang vd. 2012). RNA ve NP arasında kurulan kimyasal bağların doğası henüz bilinmemektedir. Çünkü mevcut NP modellerinin henüz hiçbirinde RNA'nın yapısı çözümlenmemiştir. Ancak, RNA bağladığı tahmin edilen KKKAV NP'nin üç amino asit kalıntısı (K132, Q300 ve K411) mutasyona uğratıldığında, KKKAV'nin minigenomlarının transkripsiyonu ve replikasyonu engellenmektedir (Carter vd. 2012, Guo vd. 2012).

NP, virüs aracılı yapılan immün sistemden kaçmaya katkıda bulunuyor olabilir. İnterferon (IFN) tarafından uyarılan antiviral gen MxA'nın, KKKAV replikasyonunu engellediği örneğinde olduğu gibi, memeli hücrelerinde meydana gelen antiviral cevaplar, pek çok yönüyle NP'yi hedef alıyor gibi görünmektedir (Andersson vd. 2004b). Dahası, NP, yüksek derecede immünojeniktir ve memelilerde hem B hücrelerinin hem de T hücrelerinin başlıca hedefidir (Bertolotti-Ciarlet vd. 2005, Burt vd. 2009, Wei vd. 2010, Mousavi-Jazi vd. 2012, Burt vd. 2013). Lassa virüsün ve ilişkili Hantavirüslerin NP'lerinin, IFN antagonistleri (karşıtları) olarak işlev gördüğü gösterilmiştir (Levine vd. 2010, Qi vd. 2010). Ancak KKKAV NP, çift iplikçik RNA'ya (dsRNA) karşı kuvvetli bir innat (doğal, içsel) immün yanıt oluşturulmasını uyaran, bir model virüs olan Sendai virüsün enfeksiyonu sırasında meydana gelen IFN yanıtını baskılamamaktadır (Guo vd. 2012). Yapısal olarak ilişkili olan Arenavirüs NP'leri, RNA'ya özgün olan, korunmuş bir 3' - 5' ekzonükleaz aktivitesine sahiptir ve bu RNaz aktivitesi, dsRNA'ya karşı geliştirilen innat immün yanıtı baskılar (Qi vd. 2010). *In vitro* olarak KKKAV NP, endonükleaz aktivitesine sahiptir, ancak bu aktivite RNA yerine DNA'ya özgü gibi görünmektedir (Guo vd. 2012).

Enfeksiyonun erken evresinde KKKAV NP, apoptozis'i engelleyebilir (Karlberg vd. 2015). Ancak enfeksiyonun geç evresinde apoptozis'i uyarmaktadır (Karlberg vd. 2011). Apoptozis sırasında, NP'lerin küçük bir kısmı, kaspaz-3 tarafından, proteinin kol domaininin tepe kısmında konumlanmış olan, varsayılan DEVD motifinden kesimlenir (Karlberg vd. 2011). Kol domaini, NP oligomerlerinde baş domaini ile etkileşim halinde olduğundan, NP oligomerizasyonu sonucunda meydana gelen sterik (yapısal) engelleme, NP'nin kaspaz-3 tarafından kesimlenmesini bloke edebilir (Wang vd. 2012). KKKAV NP monomerleri, yapısal olarak ilişkili olduğu bir Arenavirüs olan Junin virüs için önerildiği gibi, kaspaz-3 için birer sahte substrat olarak davranarak apoptozisi engelleyebilir veya geciktirebilir (Wolff vd. 2013).

Transfekte hücrelerde, yakın zaman önce tanımlanan KKKAV NS_S, mitokondrilerde lokalize olur ve mitokondriyal membran potansiyelini bozarak apoptozisi uyarır (Barnwal vd. 2015). NS_S, KKKAV ile enfekte hücrelerde gösterilmiş olmakla birlikte, önerilen apoptotik işlevler, özel olarak NS_S'nin hücrelerde normalden fazla olarak ifade ettirildiği *in vitro* deneylere dayandırılmaktadır. Bu sebeple, şüphesiz ki NS_S için daha ileri araştırmalar yapılacaktır.

Genel itibariyle, KKKAV glikoproteinleri, hücreye girişte, membran füzyonunda, virion oluşumunda ve immün sistemden kaçışta görev alıyor gibi görünmektedir. Gn'nin ve Gc'nin hücreye giriş ve membran füzyonuna aracılık ettiğine inanılmaktadır. Bu glikoproteinlerin işlevleri, çoğunlukla uzak ilişkili oldukları diğer Nairovirüslerin glikoproteinleri ile yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre tahmini olarak tanımlanmıştır. Gn'nin sitoplazmik kuyruk kısmı, *in vitro* olarak RNA bağladığı gösterilen bir çinko parmağı domaini içerir. Bu bulgu, Gn'nin RNA ile etkileşebileceğini ve viral matriks proteini benzeri bir işlev gösterebileceğini önermektedir (Estrada ve De Guzman 2011). Ancak, RNA, RNP'ler içerisinde enkapside edildiğinden, Gn'nin RNP'ye nasıl bağlanabileceği ve onu oluşan virionlara nasıl dahil edebileceği konusu açık değildir. KKKAV GPÖ'nün işlevlerine dair yapılan çalışmalar, enfektif partiküllerin üretilmesinde PreGn dönüştürücü enzim (konvertaz) SKI-1/S1P'nin hayati rollerini ortaya çıkartmıştır (Bergeron vd. 2007). Bunun dışında, PreGn ve PreGc, normal olarak Golgi kompleksinde lokalize olurlar ve bu bulgu,

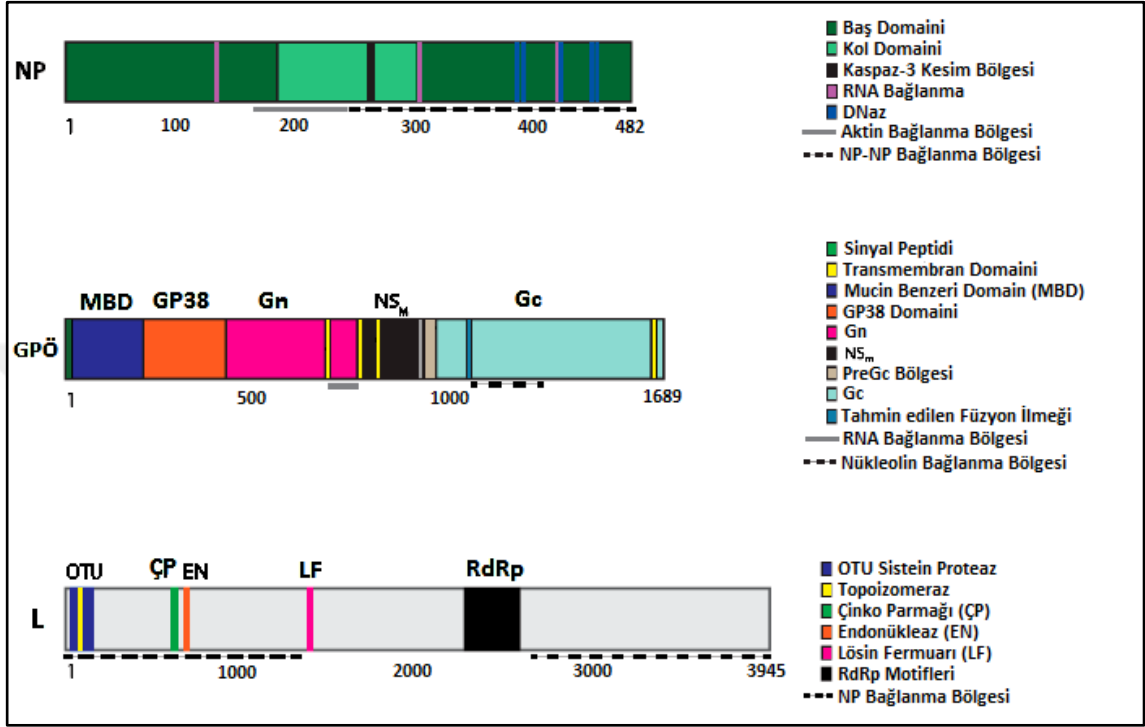
PreGn'nin ve PreGc'nin doğru olarak işlenmesinin, enfektif KKKAV üretimini düzenlediğini göstermektedir (Bergeron vd. 2007). GP38'in işlevinin belirlenmesi bilhassa merak uyandırıcıdır. Çünkü bu protein, sadece Nairovirüslere özgüdür ve diğer hücresel veya viral proteinlerle hiçbir amino asit dizi benzerliği (homolojisi) göstermemektedir. Furin proteaz kesimlemesinin, SKI-1/S1P ile yapılan kesimleme sonucu oluşan GP160'ın ve GP85'in salgılanmasını engellemeksizin, seçici olarak GP38 üretimini engellediği gösterilmiştir (Sanchez vd. 2006, Bergeron vd. 2015). Furin ile yapılan kesimlemenin engellenmesi, viral titrede yalnızca geçici bir azalmaya yol açmaktadır. Bu sonuç, olgun GP38'in, en azından hücre kültüründeki KKKAV replikasyonu için önemli olmadığını göstermektedir. İlave olarak, Furin kesimlemesinin engellenmesi, ayrıca PreGn işlenmesinde çok az bir azalmaya yol açmaktadır. Bu sonuç, furin kesimlemesinin, dolaylı olarak SKI-1/S1P bağımlı GPÖ işlenmesini düzenliyor olabileceğini göstermektedir (Bergeron vd. 2015).

Mucin benzeri domain, PreGn'de, GP85'te ve GP160'ta bulunur. İlginç olarak, Filovirüslerin glikoprotein öncüleri de (örneğin, Ebola virüs ve Marburg virüs) bir MBD ve bir furin kesim bölgesi içerir (Volchkov vd. 1998, Volchkov vd. 2000). Filovirüslerde, furin kesim ürünleri olan GP1 ve GP2, virionun yapısal bileşenleridir ve GP1 MBD'nin O-bağlı glikanları, GP2 epitoplarını maskeler ve nötralize edici antikörlere karşı hedef olmaktan korur (Fusco vd. 2015). Ebola virüsün MBD'si, protein işlevini etkilemeksizin KKKAV MBD'si ile değiştirilebilir. Bu sonuç, KKKAV MBD'sinin de dışarı sergilenen epitopları maskeliyor olabileceğini önermektedir (Fusco vd. 2015). Ancak, KKKAV MBD'nin işlevi, Filovirüslerinkinden belirgin olarak farklılık gösteriyor olabilir. Çünkü KKKAV MBD, filovirüslerde olduğu gibi viral partiküllere dahil olmamaktadır (Sanchez vd. 2002). İlave olarak, KKKAV MBD'nin N-uçtan kırılmasının, GPÖ'nün katlanmasına ve taşınmasına herhangi bir etkisi olmamaktadır (Bertolotti-Ciarlet vd. 2005). Buna karşın, MBD'de, GP38'i de içine alan daha uzun N-uç kırılmaları, Gn'yi ER'de hapsedmektedir. Bu sonuç, GP38'in, PreGn'nin katlanmasına ve ER'den serbest bırakılmasına yardım eden, bir şaperon aktivitesine sahip olduğunu önermektedir (Bertolotti-Ciarlet vd. 2005).

Orthonairovirüsler, diğer *Bunyaviridae* üyeleri ile karşılaştırıldığında alışılmadık derecede büyük L proteinine sahiptir (~4000 amino asite karşı ~2500 amino asit). Diğer *Bunyaviridae* üyelerinde görülmeyen bu ilave diziler, Orthonairovirüs L proteinlerinin N-ucunda bulunurlar. Bu bulgu, 1. ve 609. amino asitler arasında kalan bölgenin, yumurtalık tümörü (ovarian tumor) (OTU) sistein proteazı gibi, klasik olmayan L fonksiyonlarına sahip domainler içerdiğini önermektedir. OTU domaini ile RdRp'nin korunmuş motifleri arasında kalan dizilerin, NP'nin, L proteininin N-uç bölgesine bağlanması için önemli olan, potansiyel bir lösin fermuarı ve bir C2H2 çinko parmağı motifi içerir (Honig vd. 2004, Macleod vd. 2015). KKKAV proteinlerinin domainlerini, motiflerini ve katalitik amino asit kalıntılarını gösteren resimli tasvir şekil 2.6'da verilmiştir.

mRNA transkripsiyonunda ve viral genomun replikasyonunda yer alan L protein bölgeleri, olasılıkla iç kısımda yer alan endonükleaz domaini ile başlar ve pek çok korunmuş RdRp motiflerini içerir (Honig vd. 2004, Kinsella vd. 2004). Viral endonükleaz, konak mRNA'larını keser ve kesim sonucunda meydana gelen 5' kepli oligonükleotitleri, viral transkripsiyonu başlatmak için primer olarak kullanır. Daha yaygın olarak, genomlarının 5' uçlarında trifosfat grubu (5'-pppRNA) bulunduran pek çok diğer RNA virüslerine zıt olarak, KKKAV'nin vRNA'larının 5' uçları, monofosforile (5'-pRNA) durumdadır (Habjan vd. 2008, Spengler vd. 2015). Monofosforile haldeki 5' genom uçları, olasılıkla, viral endonükleazın 5' genomik uçtaki ilk nükleotiti koparması sonucu meydana getirilir. Sonunda 5'-pRNA'ların elde edildiği bu zincir başlatma mekanizmasına, kurma/hazırlama ve yeniden sıralama (prime and realign) adı verilir. Bu mekanizma, daha önce, KKKAV ile ilişkili olan Hantaan virüs için önerilmiştir (Garcin vd. 1995). KKKAV genomunun 5' ucunun monofosfat grubuna (5'-p) dönüştürülmesi, tercihen 5'-pppRNA tarafından aktive olan, retinoik asit uyarımlı gen 1'in (RIG-1) aktivasyonunun engellenmesi yoluyla innat immün yanıtın atlatılması için olası bir stratejidir (Habjan vd. 2008, Spengler vd. 2015). Yine de, KKKAV'ye karşı geliştirilen tip-1 IFN yanıtı, RIG-1 aracılı olarak meydana gelir (Spengler vd. 2015). RIG-1'in, viral enfeksiyon esnasında, sadece bir sensör olarak değil, aynı zamanda bir antiviral efektör olarak da işlev gördüğüne inanılmaktadır (Yao vd. 2015). RIG-1'in bu efektör işlevi, zayıf IFN yanıtı oluşturan veya RIG-1'in öncelikli

ligantları olan 5'-ppRNA'ya veya 5'-pppRNA'ya sahip olmayan RNA virüslerinin, neden RIG-1 yok edildiğinde daha etkin bir şekilde replike olduklarını kısmen açıklayabilir (Lee vd. 2011, Spengler vd. 2015).



Şekil 2.6 KKKAV protein domainleri, motifleri ve katalitik amino asit kalıntıları (Zivcec vd. 2016)

Her proteinin yaklaşık olarak büyüklüğü ve katalitik bölgelerinin ve motiflerinin yaklaşık olarak lokasyonları, aşağılarında, amino asit numaraları olarak belirtilmiştir.

KKKAV L proteininin en geniş ölçüde çalışılan bölgesi, N-uçta bulunan OTU domainidir (1.'den 152. amino asit kalıntısına kadar olan bölge). OTU domaini, ubiküitini (Ub) ve Ub benzeri bir protein olan IFN uyarımlı gen 15'i (ISG15), protein substratlarından ayırmaktadır (Frias-Staheli vd. 2007, James vd. 2011, Van Kasteren vd. 2012). Viral OTU'lar ve benzer aktiviteli papain benzeri proteazlar, daha önce, Dugbe virüsü, Nairobi koyun hastalığı virüsünü, prinç çizgi virüsünü (rice stripe virus), porcine üreme ve solunum sendromu virüsünü, at arterit virüsünü, faregiller (murin) hepatit virüsünü, şiddetli akut solunum sendromu (SARS) koronavirüsünü, insan koronavirüsü NL63'ü ve Orta Doğu solunum sendromu (MERS) koronavirüsünü içeren, hem pozitif anlamlı hem de negatif anlamlı RNA virüslerinde bulunmuştur (Makarova 2000,

Kinsella vd. 2004, Frias-Staheli vd. 2007, Zhang vd. 2007, Zheng vd. 2008, Clementz vd. 2010, Holzer vd. 2011, Lombardi vd. 2013, Van Kasteren vd. 2012, Mielech vd. 2014). İlave olarak, pozitif anlamlı RNA virüslerinin deubiküitinazları, viral poliproteinleri proteolitik olarak işlerler ve dolayısıyla viral replikasyon için gereklidirler (Van Kasteren vd. 2012). KKKAV’de, L proteini, OTU domaini tarafından proteolitik olarak işlenmez ve OTU sistein proteaz aktivitesi, KKKAV transkripsiyonu ve minigenomların replikasyonu için gerekli değildir (Bergeron vd. 2010).

Memeli deubiküitinazları, IFN yanıtının negatif geri bildirim (feedback) sistemi olarak değerlendirilirler ve bu bağlamda viral OTUlar, benzer işlevleri sergiliyor gibi görünmektedir (Kayagaki vd. 2007). KKKAV OTU domaininin, Ub’yi ve ISG15’i substratlarından ayırmak suretiyle innat immün yanıtını baskıladığı düşünülmektedir. Ub’nin ve ISG15’in, kendi substratlarındaki serin kalıntılarına bağlanmaları (ubiküitinasyon ve ISG15ilasyon), IFN sinyalizasyonunu düzenler ve nükleer-kappa-hafif-zincir-aktive olmuş B hücrelerin enhanseri (NFκB), RIG-1, MxA, interferon düzenleyici faktör 3 (IRF3), sinyal transdüseri, transkripsiyon aktivatörü 1 (STAT1) ve protein kinaz R (PKR) gibi innat immün yanıtın pek çok anahtar bileşenini aktive eder (Giannakopoulos vd. 2005, Zhao vd. 2005, Shi vd. 2010, Jiang vd. 2012, Okumura vd. 2013, Wang vd. 2015). KKKAV OTU domaininin kristal yapısı, bu proteinin Ub’ye ve ISG15’e bağlanma özgünlüğünün iç yüzünü anlamamızı sağlamış ve spesifik olarak Ub’ye ve ISG15’e karşı aktivite kaybı gösteren KKKAV mutantlarının tasarlanabilmesine olanak sağlamıştır (James vd. 2011, Akutsu vd. 2011, Capodagli vd. 2011). KKKAV OTU domaininin hücrede normalden fazla olarak ifade ettirilmesi, genel hücresel ubiküitinasyon ve ISG15ilasyon seviyelerinde azalmaya yol açmaktadır. İlave olarak, KKKAV OTU’nun hücrede normalden fazla olarak ifade ettirilmesi, olasılıkla RIG-1’in ubiküitinasyonunu engellediğinden ötürü, RIG-1/mitokondriyal antiviral sinyalizasyon proteini (MAVS) aracılığıyla yürütülen IFN yanıtlarını azaltmaktadır (Frias-Staheli vd. 2007, Van Kasteren vd. 2012). OTU’nun enfeksiyon durumundaki varsayılan rolü, şu anda paradoksal olarak görünmektedir. Çünkü, RIG-1’in, üç parçalı motif içeren protein 25 (TRIM25) tarafından ubiküitinasyonu, RIG-1’i aktive ederken, RIG-1’in ISG15ilasyonu, ubiküitinasyon bölgeleri ile yarışmaya girmesi sebebiyle RIG-1’in aktivasyonunu negatif olarak düzenlemektedir (Jiang vd. 2012, Kim

vd. 2008). RIG-1'in bir viral OTU tarafından deubiküitasyonunun, eş zamanlı olarak RIG-1'den ISG15 parçalarının çıkarılması antiviral yanıtlarında artışa yol açabilirken, nasıl viral replikasyonu kolaylaştırabileceğini anlamak için daha çok çalışmanın yapılması gereklidir.

2.3 Kırım Kongo Kanamalı Ateşinin Filogenisi

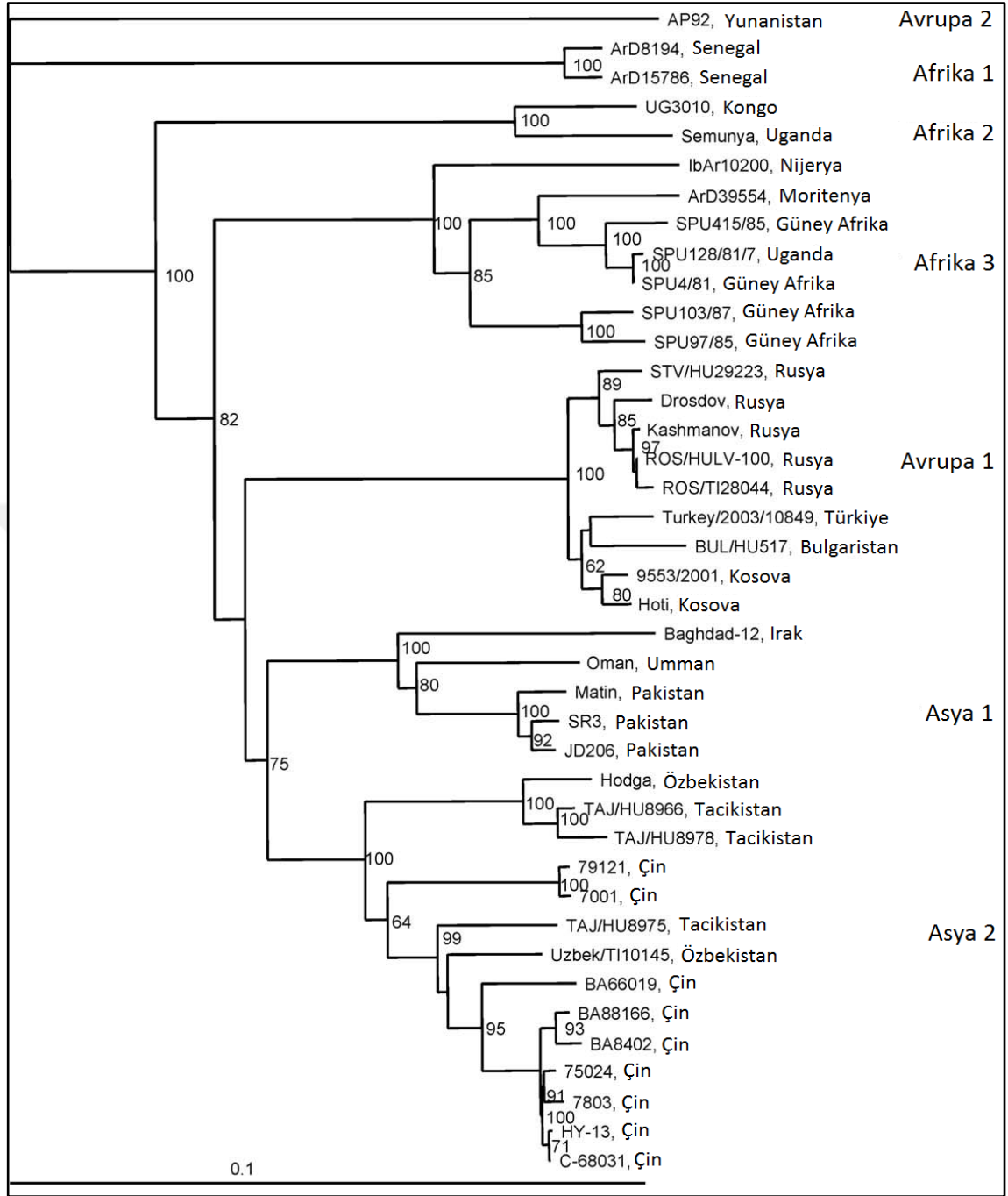
1859 yılında, Charles Darwin'in "Türlerin Kökeni Üzerine" çalışması yayınlandığından bu yana, canlıların evrimi üzerine çok fazla bilgi edinilmiştir ve bugün, virüslerin, özellikle de RNA virüslerinin hataya meyilli olan replikasyonlarına bağlı olarak hızlı bir şekilde evrimleştikleri bilinmektedir. Virüslerin evrimini etkileyen bir diğer faktör ise, virüslerin replikasyon dereceleridir. Buna göre, hızlı bir şekilde replike olan virüsler (HIV-1 gib), yaşam süresi (jenerasyon) kısa olan diğer virüslere göre daha hızlı bir şekilde evrimleşmektedir. Bu bağlamda, artropod kaynaklı RNA virüslerinin evrimi, "çift filtre kavramı" ile açıklanan, hem artropod konağında hem de omurgalı konağında uyum başarısı (fitness) göstermesi adına, diğer virüslere göre daha yavaş olmaktadır (Deyde vd. 2006).

1962 ile 1965 yılları arasında, Zuckerkandl ve Pauling, belirli herhangi bir proteinin evrim hızının zamana bağlı olarak sabit olduğu hipotezini öne sürdükleri iki önemli makale yayınlamışlardır (Zuckerkandl ve Pauling 1962, Zuckerkandl ve Pauling 1965). Bu sav, farklı genler için hızlı veya yavaş çalışan, fakat, farklı türlere ait belirli herhangi bir gen için ise az veya çok sabit bir hızda çalışan moleküler bir saatin varlığına işaret etmektedir. Şayet böyle bir moleküler saat varsa ve bir genin evrim hızı hesaplanabiliyorsa, o zaman bu bilgi, nükleotit veya amino asit dizilerini karşılaştırmak suretiyle iki tür arasındaki ayrışmanın (divergens) tarihlendirilmesinde kolaylıkla kullanılabilir. Tam tersi olarak, eğer iki tür arasındaki ayrışma zamanı biliniyorsa, bu durumda seçilen genin moleküler evrim hızı tahmin edilebilir. Moleküler saat hipotezi, evrimin nötral teorisi ile tam bir uyum halindedir (Kimura 1983).

Anagnostou ve Papa, KKKAV'nin evrimi üzerine yapmış oldukları bir çalışmada, 1956 ile 2003 yılları arasında farklı coğrafik bölgelerden izole edilmiş 40 farklı KKKAV

suşunun GenBank veri tabanındaki mevcut olan genom dizilerini filogenetik olarak incelemişler, ve sonuç olarak, KKKAV'nin yüksek derecede genetik çeşitliliğe sahip olduğunu ortaya koymuşlardır (Anagnostou ve Papa 2009). Bu 40 KKKAV suşunun S segmentinden kodlanan ORF'ler ile yapılan filogenetik analizler sonucunda, KKKAV suşlarının, coğrafik olarak dağılımları ile de az ya da çok uyumlu olarak, yedi farklı grupta (klad) kümelenmiş oldukları bulunmuştur (Anagnostou ve Papa 2009). Bu gruplar veya genotipler, çeşitli Afrika ülkelerinden izolatlar içeren Afrika 1, Afrika 2 ve Afrika 3, Orta Doğu'dan izolatlar içeren Asya 1, Çin'den, Tacikistan'dan, Kazakistan'dan ve Özbekistan'dan izolatların bulunduğu Asya 2, Arnavutluk, Bulgaristan, Yunanistan, Kosova, Rusya ve Türkiye'den izolatların bulunduğu Avrupa 1 ve son olarak, Yunanistan'dan tek bir suşun (AP92) yer aldığı Avrupa 2 olarak belirlenmiştir (Anagnostou ve Papa 2009). KKKAV'nin S segmenti temelinde yapılan filogenetik analizleri sonucu elde edilen, yedi KKKAV grubunu (klad) gösteren filogenetik ağaç, şekil 2.7'de verilmiştir. KKKAV'nin özellikle tüm genom dizileri ile yapılan filogenetik çalışmaları, KKKAV genomlarında meydana gelen rekombinasyon ve yeniden tasnif olma (reassortment) olaylarının, KKKAV için, mutasyon temelli seçici kuvvetlerin tek başına meydana getirdiğinden daha karmaşık olan evrimsel rotalar meydana getirmiştir (Hewson vd. 2004, Lukashev 2005, Deyde vd. 2006). KKKAV'de gözlenen bu çeşitlilik yüksek olmakla birlikte, genom segmentlerinde bulunan ORF'ler, ve kodladığı proteinlerdeki önemli motifler oldukça korunmuşlardır.

Anagnostou'nun ve Papa'nın yukarıda bahsi geçen çalışmasında, KKKAV suşları arasında sıkça meydana gelen yeniden tasnif olma olaylarının, çalışılan KKKAV suşlarının filogenetik analizinde zıtlıklara sebep olduğu, bunun dışında rekombinasyon olaylarının ise görece daha az sıklıkla meydana geldiği ortaya konulmuştur. Bu zıtlıklara örnek olarak Çin'den izole edilmiş 7001 ve 79121 suşları verilebilir. Bu Çin suşları, S segmentleri temelinde yapılan filogenetik analizler sonucunda diğer Çin izolatları ile gruplanırlarken, M segmentlerine göre yapılan aynı analizler, bu suşları Afrika suşları ile bir arada gruplamaktadır. İlave olarak, Pakistan'dan izole edilen Martin suşu, S segmenti bakımından Asya 1 grubunda yer alırken, M segmenti temelindeki filogenetik analizlere göre bazı Çin izolatları ile birlikte kümelenmektedir (Anagnostou ve Papa 2009).



Şekil 2.7 KKKAV S segmentindeki 1446 bazlık ORF'nin filogenetik analizi (Anagnostou ve Papa 2009)

AP92, dış grup durumundadır. Rakamlar, yüzde bootstrap eşleri (100) ifade etmektedir. 60'dan az olan bootstrap değerleri verilmemiştir. Yatay uzaklıklar, nükleotit farklılıkları ile doğru orantılıdır. Ölçek çubuğu, % 10 nükleotit dizi ayrışmasını belirtmektedir. Ağaçtaki diziler, suş isimleri ve izole edildikleri ülke ile belirtilmiştir.

Anagnostou ve Papa, aynı çalışmalarında, Schmidt'in ve von Haeseler'in geliştirdiği TREE-PUZZLE algoritmasını kullanarak KKKAV için moleküler saat hipotezini (Likelihood oranı testi, LRT) test etmişler ve sonuç olarak çalışılan tüm KKKAV suşları dikkate alındığında, moleküler saat hipotezinin RNA segmentlerinin hiç birine uymadığı, ancak belli grupların (Avrupa 1, Asya 2 ve Afrika 3) S segmentlerinin filogenetik ağaçları kendi içerisinde çalışıldığında, moleküler saat benzeri bir ağacın testi geçtiği görülmüştür (Schmidt ve von Haeseler 2003). Bu gözlem, KKKAV S genom segmentleri için aynı hızda çalışan bir global moleküler saatin olmadığına, ancak, belirli bir grup içerisinde sabit bir hızda ilerleyen evrime olanak tanıyan, ancak farklı gruplar için farklı hızlarda çalıştığı varsayılan bir yerel moleküler saat modelinin, KKKAV S segmentinin evrimini açıklamak için yeterli gibi görülebileceğini önermektedir (Yoder ve Yang 2000). İnsan immün yetmezlik virüsü tip 1'in (HIV-1) evrimi üzerine yapılan çalışmalarda, moleküler saat benzeri davranışın gösterilmemesi durumunun, virüs örneklemelerinin eş zamanlı olarak yapılmamış olmasından ötürü nükleotit yer değişimlerinin (substitüsyon) hızlarındaki varyasyonlardan kaynaklandığı ve bu durumun da moleküler saat modelinin yanlış bir şekilde reddedilmesine sebep olduğu belirtilmiştir (Liu vd. 2004). Anagnostou ve Papa, yaptıkları çalışmada, KKKAV'nin evriminde, virüs örnekleme zamanlarının moleküler saat benzeri davranışı etkilemiyor gibi göründüğünü, ancak, birden fazla KKKAV kaynağının dahil olduğu, yeniden tasnif olma olaylarının, KKKAV suşlarının evriminde moleküler saat benzeri davranıştan sapmalara sebep olduğu belirtilmiştir (Anagnostou ve Papa 2009).

Anagnostou ve Papa, ayrıca M segmentinde bulunan yüksek derecede çeşitlilik gösteren Mucin benzeri domain (MBD) ile korunmuş bölgenin birlikte evrimleşip evrimleşmediğini anlamak adına, bu bölgeleri ayrı ayrı çalışmışlar ve sonuçta MBD'nin korunmuş bölgeye göre 2.3 kat daha hızlı evrimleştiğini bulmuşlardır (Anagnostou ve Papa 2009). Bu sonuç, KKKAV'nin, hem kenelerde hem de omurgalılarda uyum başarısı göstermesi adına pozitif bir seçim etkisi altında kaldığı gerçeği ile ve bu seçimden en fazla MBD'nin etkilendiği önermesi ile açıklanmıştır.

Daha güvenilir bir sonuç elde etmek adına, tüm genom segmentlerinin (S, M ve L) dizisinin bilindiği 18 KKKAV suşu ile yapılan filogenetik analiz çalışmalarında, M

segmentinin S segmentinden 3,58 kat, L segmentinden de 1,2 kat daha hızlı evrimleştiği, L segmentinin de S segmentinden 2,9 kat daha hızlı evrimleştiği bulunmuştur (Anagnostou ve Papa 2009). Bu sonuca göre M ve L segmentleri hızlı bir şekilde evrimleşirken, S segmenti, viral genomun en çok korunmuş parçasını temsil etmektedir. M segmentinin, diğer segmentlere göre daha fazla genetik çeşitlilik göstermesi beklenen bir durumdur. Çünkü, M segmentinden kodlanan zarf glikoproteinleri, hücresel tropizmasından, konak hücreye tutunmadan, nötralize edici antikorların uyarılmasından ve daha fazlası, sıklıkla patojenitesindeki farklılıklardan sorumludur. Aynı şekilde S RNA segmentindeki sabitlik (karalılık) de beklenen bir durumdur. Çünkü S segmenti tarafından kodlanan nükleokapsit proteini, virionun yapısal esasını oluşturmaktadır. Filogenetik ağaç topolojileri yüksek derecede benzerlik gösterdiğinden dolayı, KKKAV suşlarının S ve L segmentlerinin birlikte evrimleşme (coevolüsyon) paterni (örgüsü) gösterdikleri önerilmektedir (Chamberlain vd. 2005).

Sonuç olarak KKKAV'nin genetik çeşitliliğinin ortaya çıkmasında rol oynayan muhtemel faktörler, yeni viral suşları meydana getiren yeniden tasnif olma ve rekombinasyon olaylarını içerdiği kadar, endemik coğrafi bölgelerin kendine has çevresel koşullarını (ekolojik niş, kene popülasyonunu ve sonuçta virüs yayılımını etkileyen iklim şartları), kene vektör türlerini ve omurgalı konaklarını ve bunların göçlerini de içermektedir. KKKAV, bir konaktan diğer konağa taşınma sırasında uyum başarısını korumaya çalıştığından, taşınma rotası da virüsün evrimi için önem teşkil etmektedir.

Yakın zaman önce yapılan bir çalışmada, KKKAV gruplarının (genotiplerinin) tahmini olarak ortaya çıkış zamanları belirlenmiştir (Lukashev vd. 2016). KKKAV'nin tüm genom segmentleri ile yapılan filogenetik analizler, KKKAV'nin sadece birkaç bin yıl önce Afrika kıtasında ortaya çıktığını önermektedir (Lukashev vd. 2016). Ancak binlerce yıl önce meydana gelen evrimsel olayların kesine yakın bir şekilde tarihlendirilmesi, filogenetik analizlerde kullanılan mevcut algoritmaların kısmen yüksek hata oranlarından dolayı şuan için mümkün görünmemektedir ve bu sebeple sonuçlara temkinli yaklaşılması gerekmektedir.

Yukarıda bahsi geçen, Lukashev ve diğerlerinin yaptığı çalışmada, KKKAV'nin Orta ve Güney Asya'ya girişi, orta çağ dönemlerine tarihlendirilmiştir (Lukashev vd. 2016). Bu sonuç, tarihsel belgelerle de uyum içerisinde görünmektedir (Hoogstraal 1979). Daha sonra, KKKAV Avrupa 1 grubu, sadece birkaç yüz yıl önce, Volga deltası üzerinden Avrupa kıtasına girmiş ve Balkanlara ise bundan daha da yakın bir zaman önce girmiştir. Avrupa 2 grubunda yer alan AP92, yaklaşık 100 yıl kadar önce olasılıkla Türkiye üzerinden Avrupa'ya girmiştir. İlginç bir şekilde, birkaç bin yıl önce Afrika'da ortaya çıkan KKKAV, çok kısa bir zaman önce Avrupa'ya girerek buraya yerleşmiştir. Bu kıtalar arası virüs taşınmasında enfekte kene taşıyan, göç eden kuşların rolü kanıtlanmıştır ve yatsınamaz (Lindeborg vd. 2012). Lukashev ve diğerleri, bahsi geçen çalışmalarında, KKKAV'de meydana gelen yeniden tasnif olma olgusunu, bir olasılık olarak değil düzenli bir olay olarak belirlemişler ve farklı genom segmentlerinde yeniden tasnif olma olaylarının yaklaşık 100 yılda bir meydana geldiğini hesaplamışlardır (Lukashev vd. 2016). Öte yandan, KKKAV Avrupa 1 grubu ile diğer KKKAV grupları arasında yeniden tasnif olma olaylarının görülmemesi, KKKAV'nin Asya ve Afrika suşları arasında yaygın olarak meydana getirdiği segment değişimleri ile zıtlık oluşturmaktadır. Bu bulgu, Avrupa 1 grubunun, ana KKKAV gen havuzundan “taşma etkisi” (spill over effect) ile oluştuğunu ve daha sonra da üreme izolasyonuna maruz kaldığını (gen transferlerinde yer almadığını) önermektedir (Lukashev vd. 2016).

2.4 Kırım Kongo Kanamalı Ateşinin Epidemiyoloji

KKKAV, doğada genellikle enzootik kene-omurgalı-kene döngüsü ile dolaşır ve esas olarak *Hyalomma* cinsine ait keneler ile bulaşır. Hastalığın coğrafik dağılımı, *Hyalomma* cinsi kenelerin küresel dağılımı ile kesişmektedir (Whitehouse 2004, Vorou vd. 2007). Dünya genelinde KKKAV bulaşısına en çok sebep olan kene türü *Hyalomma marginatum*'un insan derisi üzerindeki fotoğrafik görüntüsü şekil 2.8'da verilmiştir. KKKAV, diğer cinslere (*Amblyomma*, *Rhipicephalus*, *Ornithodoros*, *Boophilus*, *Dermacentor* ve *Ixodes*) ait kenelerden de izole edilmiş olmasına rağmen, bu kenelerin virüs bulaşısındaki rolleri henüz belirlenmemiştir (Shepherd vd. 1989a). KKKAV'nin, kenelerin hem yumurtalarından hem de beslenmemiş (kan emmemiş) ergin olmayan gelişim aşamalarından izole edilmiş olması, gerek transovarial (yumurta ile taşınma)

gerekse de transstadial (gelişim evreleri arasında taşınan) bulaşmalara işaret etmektedir (Whitehouse 2004, Logan vd. 1989, Okorie 1991, Gordon vd. 1993). Yine, keneler arasında KKKAV'nin cinsel yolla da bulaştırılabildiği gösterilmiştir (Shepherd vd. 1991, Wilson vd. 1991). Ayrıca keneler, enfekte olmamış bir konak üzerinde, bir başka enfekte kene ile beraber beslenmesi sırasında da enfekte olabilirler (Gordon vd. 1993). *Hyalomma cisi* kenelerin yaşam döngüsünü ve KKKAV bulaştırmasını genel itibariyle özetleyen resimli gösterim, şekil 2.9'da verilmiştir. Ilıman iklimlerin olduğu yerlerde, KKKAV vakaları, normal olarak kenelerin en aktif oldukları dönem olan bahar ile erken güz dönemleri arasında görülür. Kenelerin konağına olan ilgisini, sıcaklık ve karbondioksit konsantrasyonu düzenlemektedir (Allan vd. 2010).



Şekil 2.8 *Hyalomma marginatum* türü kenenin insan derisi üzerinde alınmış fotoğrafı (<http://dogalhayat.org> 2013) (siteye ulaşım tarihi: 20.05.2018)

KKKAV, enfekte kenelerde devamlı olarak kalmakla birlikte, omurgalılar, kenelere kan öğünlerini sağlamak için gereklidir. Çeşitli çiftlik hayvanları (sığır, keçi, koyun, at, deve, domuz, yabani tavşan, kirpi, deve kuşu, eşek, fare ve evcil köpekler) KKKAV ile enfekte olabilirler. Aslında, birçok evcil ve yabani omurgalının KKKAV'ye karşı antikor yanıtı ve/veya viremi geliştirdikleri rapor edilmiştir (Shepherd vd. 1989a).

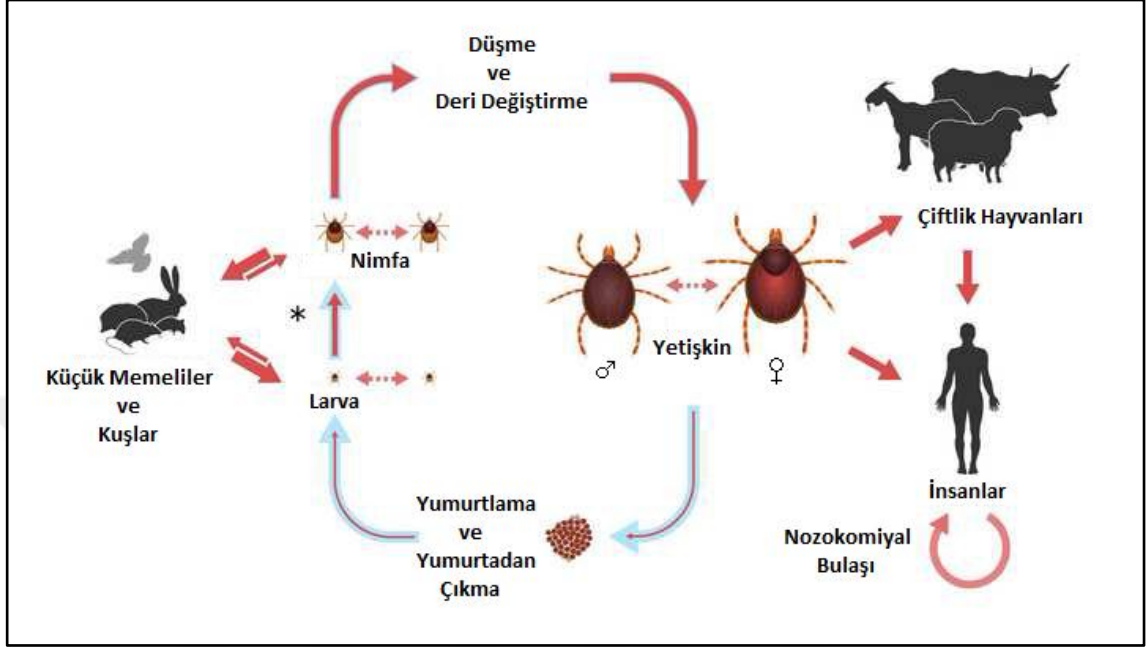
Bunun dışında, sürüngenler ve deve kuşu hariç diğer kuşlar, KKKAV enfeksiyonlarına karşı dirençlidir (Vorou 2009, Adam vd. 2013). KKKAV ile enfekte insanların aksine, enfekte çiftlik hayvanları, genellikle hiçbir hastalık belirtisi göstermezler (Swanepoel vd. 1987, Logan vd. 1989, El-Azazy ve Scrimgeour 1997, Whitehouse 2004).

Kuşların ekseriyetinin KKKAV enfeksiyonuna karşı dirençli olduğu gösterilmiştir (Whitehouse 2004). Ancak, göç eden kuşlar, enfekte keneleri taşıyabilirler ve bu sebeple KKKAV'nin bir endemik ülkeden yeni bir başka ülkeye yayılmasını kolaylaştırabilirler (Hoogstraal 1979, Shepherd vd. 1987, Swanepoel vd. 1998). KKKAV antikorları tespit edilmemiş olmasına rağmen, kene taşıyan deve kuşlarının Güney Afrika'daki hayvan kesimleri sırasında ciddi KKKAV salgınlarına yol açtığı gösterilmiştir. İlginç bir şekilde, deneysel olarak enfekte edilmiş deve kuşları, viremi meydana getirebilmektedir (Swanepoel vd. 1998).

İnsanlar, KKKAV ile enfekte çiftlik hayvanlarının kan veya dokularına doğrudan temas ederek, enfekte kenenin ısırmasıyla veya el ile enfekte kenenin ezilmesi yoluyla veya olasılıkla, enfekte hayvanlarının vücut sıvılarından meydana gelen aerosollerle enfekte olabilirler. KKKAV vakaları, esasen, çiftçilerde, mezbaha çalışanlarında, sağlık hizmeti çalışanlarında ve veterinerlerde görülür (Ergönül 2006a). Endemik bölgelerde yaşayan ve kene ısırma hikayesi olan insanlarda, KKKAV seroprevalansı, % 20 kadar yüksek oranda olabilmektedir (Uyar vd. 2011). KKKAV'nin insandan insana bulaşma potansiyeli, sağlık çalışanlarını, KKKA'lı hastalara bakarlarken enfeksiyon riski ile karşı karşıya getirmektedir. Enfekte kan ile temas etme veya virüs taşıyan şırınga ucu ile yaralanma olayları, ölümlü vakaları da içeren pek çok nozokomiyal salgınlara yol açmaktadır (Ergönül 2006a). Sağlık hizmeti çalışanlarının, koruyucu kıyafetler giyinmeleri tavsiye edilmektedir (Tarantola vd. 2007). Yine enfektif KKKAV ile yapılan araştırma çalışmalarının, sadece biyogüvenlik düzeyi dört olan laboratuvarlarda yürütülmesi tavsiye edilmektedir (Whitehouse 2007).

Pişmiş etin tüketilmesi, kesim sonrası dokularda meydana gelen asidifikasyonun KKKAV'yi etkisiz hale getirmesinden ötürü risk teşkil etmemektedir. KKKA için endemik olan bölgelerde, doğa yürüyüşü gibi, kamp yapmak gibi doğa aktiviteleri ve

diğer kırsal alan aktiviteleri, enfekte kenelere maruz kalma ve KKKK hastalığı kapma açısından risk faktörleri olarak önerilmiştir (Ergönül 2006a).



Şekil 2.9 *Hyalomma* cinsi kenelerin yaşam döngüsü ve KKKAV'nin dikey ve yatay bulaşısı (Bente vd. 2013)

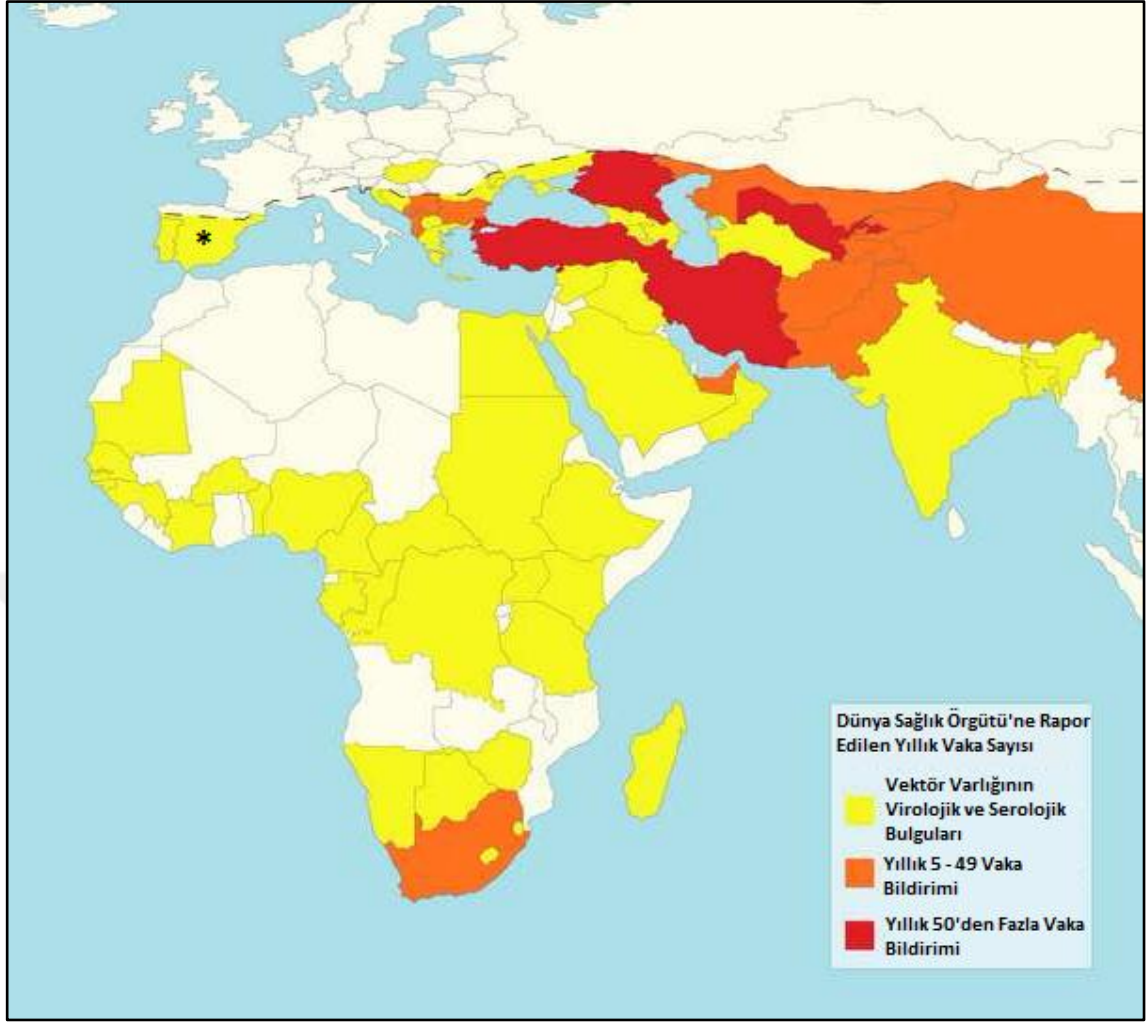
Kene yaşam döngüsünün aşamaları mavi oklarla gösterilmiştir. Yumurtadan çıktıktan sonra, larva, ilk kan öğünü için kendine küçük bir hayvan konağı bulur. Kene türüne bağlı olarak, larva, tıkanıldıktan sonra ya konağına tutunmuş halde kalır ve burada deri değiştirir (iki konaklı keneler), ya da konağından düşer ve deri değiştirir (üç konaklı keneler). Bu geçiş, yıldız ile gösterilmiştir. Nimfalar, daha sonra, ya üzerlerinde deri değiştirdikleri konaklarında beslenmeye devam ederler (iki konaklı keneler), ya da yeni bir küçük hayvan konağına tutunurlar (üç konaklı keneler). Tıkanmayı takiben, bütün türlerin nimfaları, konaklarından düşerler ve deri değiştirerek yetişkin hale gelirler. Yetişkin keneler, daha sonra kan öğünleri için kendilerine büyük hayvan konağı bulurlar ve bu konaklarına tutunmuş haldeyken çiftleşirler. Kan öğünlerinden sonra tıkanmış haldeki dişi keneler, konaklarından düşerek yumurtlamak için kendilerine uygun bir yer bulurlar. Kene yaşam döngüsü sırasında, keneler ile memeliler arasında (kırmızı oklar) ve beraber beslenme sırasında keneler arasında (kesikli oklar) KKKAV bulaştırılması için birkaç fırsat vardır. Her şekilde virüs bulaştırılmasının etkinliği, kırmızı okların kalınlığı ile doğru orantılı olarak gösterilmiştir.

Kırım Kongo kanamalı ateşi, dang hummasından sonra ikinci en çok yayılış alanına sahip arbovirüs kaynaklı bir hastalıktır ve kene kaynaklı olarak meydana gelen viral hastalıklar içerisinde ise, coğrafik yayılış alanı en geniş olan zoonozdur (Ergönül 2006a). Şuan için, KKKAV'nin, Afrika'da (örneğin, Demokratik Kongo Cumhuriyeti, Uganda, Moritanya, Nijerya, Senegal, Güney Afrika Cumhuriyeti), Güney Doğu Avrupa'da (örneğin, Rusya, Bulgaristan, Kosova, Yunanistan, Türkiye), Orta Doğu'da

(örneğin, İran, Irak, Sudi Arabistan, Umman) ve Asya'da (örneğin Çin, Kazakistan, Özbekistan, Tacikistan, Pakistan, Hindistan) olmak üzere, 30'dan fazla ülkede bulunduğu bilinmektedir (Mourya vd. 2014). KKKAV'nın, rapor edilen yıllık vaka sayılarına göre yapılmış coğrafik dağılımını gösteren resim, şekil 2.10'de verilmiştir.

Son on yılda, KKKAV, Türkiye'yi, İran'ı, Yunanistan'ı, Gürcistan'ı, Arnavutluk'u ve Hindistan'ı içeren, daha önce KKKAV'dan etkilenmemiş olan ülkelerde hastalıklara yol açmıştır (Chinikar vd 2008, Yılmaz vd. 2009, Zakhshvili vd. 2010, Mishra vd. 2011, Papa vd. 2011b). KKKAV, ayrıca Rusya Federasyonu'nun Güney Batı bölgelerinde ve Orta Afrika'da yaklaşık 30 yıl aradan sonra yeniden ortaya çıkmıştır (Maltezou vd. 2010). Dahası, bazı yeni veriler, KKKAV'nin yayılış alanının Avrupa'da daha da genişlediğini önermektedir. Örneğin Portekiz'de ve Macaristan'da, insanlarda, KKKAV'nin serolojik belirtileri rapor edilmiştir (Maltezou vd. 2010, Németh vd. 2013). Romanya'daki çiftlik hayvanlarında, hastalığın endemik olduğu diğer bölgelerdeki çiftlik hayvanlarındaki KKKAV antikor görülme sıklığı (prevalans) ile benzer sıklıkta KKKAV antikorları saptanmıştır. 2010 yılında, İspanya'da yaşayan geyiklerin üzerlerinden toplanmış *Hyalomma lusitanicum* türü kenelerde, KKKAV tespit edilmiş ve bu tespitten altı yıl sonra, İspanya'nın orta batı kesiminde 2016 yılında biri ölümle sonuçlanan iki insan vakası meydana gelmiştir (Estrada-Peña vd. 2010, Rada 2016).

Küresel ısınmanın ve iklim değişikliklerinin KKKAV'nın insidansını (belirli sürede yeni vakaların sayısı) ve coğrafik yayılımını arttırabileceği öne sürülmüştür. Bu gibi değişiklikler, kenelerin gelişme özelliklerini ve enfekte kenelere konukçuluk eden göçmen kuşların göç rotalarını değiştirebilir. Arazi kullanımındaki, tarım uygulamalarındaki, avlanma aktivitelerindeki ve çiftlik hayvanlarının taşınmasındaki değişiklikler gibi antropojenik faktörler de KKKAV epidemiyolojisinin dinamiklerini etkileyebilir (Maltezou vd. 2010).



Şekil 2.10 KKKA'nın coğrafik dağılımı (Bente vd. 2013)

Kırmızı ile gösterilen ülkeler, Dünya Sağlık Örgütü'ne yılda 50'den fazla vaka bildirmektedir. Turuncu ile gösterilen ülkeler, Dünya Sağlık Örgütü'ne yılda 5 ile 49 arasında vaka bildirmektedir. Sarı ile gösterilen ülkelere, henüz KKKA vakası rapor edilmemiş olmakla birlikte KKKAV'nin insanlardaki serolojik veya kenelerdeki virolojik bulguları mevcuttur. Yıldız ile gösterilen İspanya'da 2016 yılında, biri ölüm ile sonuçlanan iki KKKA vakası bildirilmiştir. *Hyalomma marginatum*'unve *Hyalomma asiaticum*'un kuzey sınırları kesikli gri çizgiler ile gösterilmiştir.

Türkiye'de, KKKA'ya ilk defa, 2002 yılında, Tokat'ta ateş ve peteşiyal kanama belirtileri ile hastaneye başvuran bir grup hastada rastlanmıştır. Ancak, daha önce yapılan bir serolojik çalışmada, ilk KKKA vakalarının görülmesinden çok önce, KKKAV'nin Türkiye'de uzun süredir dolaşarak olduğu belirtilmiştir (Serter 1980). 2003 yılında, Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı tarafından ve Türkiye Cumhuriyeti Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından oluşturulan bir gözlem heyeti, hastalığın görüldüğü bölgede bir araştırma yapmış ve hastaların hayvancılıkla

uğraştığını ve kene tarafından ısırılma hikâyelerinin olduğunu fark etmiştir. Bu hastalar, ayrıca grip benzeri şikâyetler, peteşiyal kanama, trombositopeni (trombosit azlığı), lökopeni (lökosit azlığı) ve serumda karaciğer enzim miktarlarının artması gibi ortak klinik bulgulara sahiplerdi.

Vaka sayısı artmaya devam edince ve klinisyenler, hastaların kene tarafından ısırılma hikâyelerinin olduğunu ve tetrasiklin antibiyotiğine karşı hemen hemen hiç yanıt vermediklerini fark ettiklerinde, 26 tane hastadan alınan serum örnekleri, Fransa Ulusal Arbovirüs Referans Merkezi ve Dünya Sağlık Örgütü Ortak Arbovirüs ve Viral Kanamalı Ateş Merkezi tarafından incelenmiş ve 17 vakada KKKAV'ye özgü IgM antikorları tespit edilmiştir. 2003 yılında, ilk defa Karti ve diğerleri, Birleşik Devletler Hastalık Kontrolü ve Korunma Merkezi ile ortak çalışarak, RT-PCR yöntemini kullanarak, Türkiye'deki beş hastanın etiyolojisinin KKKA olduğunu göstermişlerdir (Karti vd. 2004). Takip eden yıllarda vaka sayıları artmış ve 2008-2009 yıllarında zirve yaparak daha sonraki yıllarda azalmıştır (Yılmaz vd. 2009). Ancak halen, yılda yaklaşık 900 yeni KKKA vakası görülmektedir ve Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığının verilerine göre 2002 yılından beri görülen toplam vaka sayısı, % 5'ten biraz azı ölümlü olmakla birlikte 10000'i aşmıştır (Sünbül vd. 2015). Yapılan bir çalışmada, Türkiye'deki KKKA vakalarının % 69'unda kene ile temas veya kene tarafından ısırılma hikayesi, % 61,7'sinde ise hayvanların dokuları, kanları ve diğer vücut sıvıları ile temas etme hikayesi olduğu rapor edilmiştir (Yılmaz vd. 2009). Endemik kırsal bölgelerde yapılan iki ayrı çalışmada, insanlardaki seroprevalans yüzdeleri % 10,0 ve % 12,8 olarak bulunmuştur (Güneş vd. 2009, Bodur vd. 2012). İlerlemiş yaşta olma, düşük eğitim seviyesi, tarımla uğraşma, kene tarafından ısırılma ve hayvanlardan kene koparma hikâyesi, hayvancılıkla uğraşma ve kırsal alanlarda yaşama, KKKAV'ye özgü IgG seropozitivitesi için önemli risk faktörleridir (Güneş vd. 2009, Bodur vd. 2012, Köksal vd. 2014, Yağcı-Çağlayık vd. 2014).

Türkiye'de KKKAV'nin sağlık hizmeti çalışanlarına bulaşısı rapor edilmiştir. 2016 yılına kadar beş sağlık hizmeti çalışanı (iki hemşire, bir doktor, bir laboratuvar teknisyeni ve bir yardımcı sağlık personeli), nozokomiyal KKKAV enfeksiyonlarından dolayı yaşamını yitirmiştir (Leblebicioğlu vd. 2016).

Epideminin başlangıcında, KKKA, yaygın olarak Tokat ve civarında görülmüştür. Ancak daha sonra, benzer iklim koşullarına sahip olan Karadeniz ve Orta Anadolu'nun Kuzey bölgelerinde (Artvin, Bayburt, Erzurum, Erzincan, Gümüşhane, Çankırı, Amasya, Kastamonu, Çorum, Çankırı, Yozgat, Sivas) ortaya çıkmıştır. Bu bölgeler, kış mevsiminin ılıman geçmesi, arazi yapısının bölünmüş olması ve ziraatin, arka bahçe tarımının ve hayvancılığın yaygın olması gibi ortak özelliklere sahiptir. Ormanlık alan ve bodur ağaç tipi vejetasyonun içerisinde dağılmış durumda olan bölünmüş zirai alanlar, vejetasyon yapısı hayvan otlatmak için uygun olduğundan, kenelerin hayatta kalmaları için elverişli bir habitat oluşturmaktadır. Türkiye'de keneler, deniz seviyesinden yaklaşık 1000 metre yükseklikte yaşamaktadır ve KKKA, genel olarak Türkiye'nin deniz kıyılarında görülmemektedir (Anonymous 2006, Aker vd. 2015).

Türkiye'de, Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı, 2003 yılından bu yana, KKKA için, tanı, tedavi ve korunma ile ilgili çalışmalarda liderlik görevi üstlenirken, Türkiye Cumhuriyeti Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı ise KKKA'nın hayvanlarda ve arazilerde kontrol altına alınma çalışmalarını yürütmüştür. Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı, Türkiye'de KKKA'yı kontrol altına almak adına, birimler arasındaki koordinasyonu kolaylaştırmış, hastalıktan korunmak için vatandaşlarda farkındalığı artırmak adına önemli halk sağlığı eğitimlerine liderlik etmiş, sağlık hizmeti çalışanlarının hastalık hakkındaki bilgilerini güncel tutmuş ve şüpheli vakaların yönetilmesinde ve KKKA'lı hastaların tedavisinde kullanılacak standart yaklaşımlar geliştirmiştir (Leblebicioğlu vd. 2016).

2.5 Kırım Kongo Kanamalı Ateşinin Klinik ve Laboratuvar Bulguları

KKKAV'nin pek çok enfeksiyonu, hafif, spesifik olmayan ateşli hastalı'ğa sebep olsa da, bazı hastalar, şiddetli kanamalı (hemorajik) hastalık geliştirir. 1944'teki Kırım salgınında, hastaneye kaldırılan hastalarda, aniden başlayan ateş ile beraber halsizlik, baş ve kas ağrısı, kusma, yüzde ve orofarinkste belirgin kan toplanması, kanamalı (hemorajik) kızarıklıklar ile birlikte ekimoz gelişimi ve nazofarinkste, midede ve bağırsakta ve diğer bölgelerde kanama gözlenmiştir (Grashchenkov 1945). Benzer

bulgular, Güney Afrika'daki, Türkiye'deki ve Kosova'daki vaka serilerinde ve salgınlarda rapor edilmiştir (Swanepoel vd. 1989, Ergönül 2006a).

KKKA'nın seyri, kuluçka, hemoraji öncesi, hemoraji ve iyileşme olmak üzere dört evrede gerçekleşmektedir (Hoogstraal 1979). Kuluçka evresinin uzunluğu, kısmen, virüsün kapılma şekline bağlı gibi görünmektedir. Kuluçka evresi, kene tarafından ısırılmayı takiben, 1 ila 5 gün arasında sürmekteyken, enfekte kan veya dokulara temas yoluyla bulaşmayı takiben, en çok 13 gün olmak üzere, genellikle 5 ila 7 gün sürmektedir (Ergönül 2006a, Ergönül vd. 2006b). Kene salyasında bulunan bazı maddelerin immünolojik etkilerinin, virüsün vücuda yayılmasında hızlandırıcı rol oynadığı önerilmiştir (Nuttall ve Labuda 2004).

KKKA'nın hemoraji öncesi evresi, ateş, halsizlik ve çeşitli spesifik olmayan belirtiler ve semptomlar ile karakterize edilir. Eğer klinisyen, hastanın hikâyesinden KKKAV enfeksiyonu şüphesini taşıyorsa, RT-PCR ile teşhisini yapabilir. Hemorajik evre, tipik olarak hemoraji öncesi evrenin başlamasından 3 ila 5 gün sonra ortaya çıkar (Ergönül 2006a). Bu evrenin en yaygın başlangıç belirtisi, sonrasında geniş cilt ekimozuna dönüşen, deride, göz sümüksel zarında (konjonktiva) ve diğer mukoz zarlarda meydana gelen peteşiyal kızarıklıklar (Şekil 2.11) ve midede, bağırsakta ve idrar yollarında kanamalardır (Swanepoel vd. 1989). Bu evrede karaciğer ve dalak büyümesi yaygındır. Ölümcül vakalarda, hemorajinin, çoklu organ yetmezliğinin ve septik şokun sonucu olarak ölüm, genellikle hastalık başladıktan 5 ila 14 gün sonra meydana gelir. Beyinde hemoraji ve vajinada ve karın kaslarında kanama meydana gelebilir.



Şekil 2.11 Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde yatan KKKA'lı hastalar (Ergönül 2006a)

KKKA'yı atlatan hastaların tamamen iyileşmesi, bir yıl kadar sürebilir (Ergönül 2006a). Güney Afrika'daki geçmiş raporlarda, iyileşen hastaların sıklıkla, zayıflık, saç dökülmesi, iştahsızlık, çoklu sinir iltihabı (polinevrit), işitme ve hafıza kaybı ve görme eksikliği ve hepatorenal yetmezlik gibi çeşitli sağlık sorunlarını deneyimlediği not edilmiştir (Swanepoel vd. 1989). Ancak son zamanlarda Türkiye'deki ve İran'daki vakaları rapor eden yayınlarda, hastalık sonrasında bu gibi sorunların geliştiği belirtilmemiştir (Bakir vd. 2005, Mardani ve Keshtkar-Jahromi 2007). KKKA'nın hastada tekrardan ortaya çıkması ile ilgili olarak her hangi bir belge bulunmamaktadır.

KKKA hastalığının ilk haftasında, hematoloji testlerinde, trombositopeninin gelişimi ile birlikte erken lökopeni görülür ve ölümcül vakalarda, trombosit (platelet) sayıları aşırı derecede azalmış olabilir (Ergönül 2008). Şiddetli hastalıklarda, hemoglobin seviyesinde de düşüşler tipik olarak görülür. Aynı zamanda, yaygın damar içi pıhtılaşma sendromu (YDP) belirtileri olarak, protrombin zamanındaki (PT) ve aktive edilmiş parsiyel (kısmi) tromboplastin zamanındaki (aPTZ) uzamalara bağlı olarak pıhtılaşma anormallikleri gelişir ve fibrin parçalanma ürünleri ile D-dimerleri kanda tespit edilir. İlerlemiş karaciğer fonksiyon bozuklukları, karaciğer ile ilgili alanin ve aspartat aminotransferaz (ALT ve AST) enzimlerin kandaki seviyelerinin yükselmesine sebep olur. Hastalarda düşük tansiyon meydana geldiğinden dolayı, kandaki seviyesi artmış olan kan üre nitrojeni (BUN) ve kreatinin, böbrek yetmezliğine sebep olur. Hastalığı atlatmakta olan kişilerde, hastalık başladıktan 7 gün sonra, KKKAV'ye özgü IgM antikorları ve hastalık başladıktan 7 ila 9 gün sonrasında ise KKKAV'ye özgü IgG antikorları kanda tespit edilebilir seviyeye ulaşmaktadır (Burt vd. 1994). Ölümcül vakalarda, KKKAV'ye özgü antikor yanıtları geliştirilememektedir (Ergönül vd. 2006c).

KKKA'nın rapor edilen ölümlü vaka oranları, bazı küçük vaka serilerinde % 30'u geçmekle birlikte çok değişkendir. Çoğu zaman, salgınlarda yer alan küçük hasta örnekleme ve teşhis kabiliyetinin yetersizliği, hafif hastalık geçiren bütün hastaların tespit edilmelerini ve ölümlü vaka oranlarının belirlenmesinde değerlendirmeye alınmalarını zorlaştırmaktadır. Ancak, bugüne kadar 10000'den fazla vakanın meydana geldiği Türkiye'de ortalama ölümlü vaka oranı % 5'in biraz altındadır (Leblebicioğlu vd. 2016). Bu bulgu, geçmiş salgınlarda rapor edilen daha yüksek ölümlü vaka oranlarının, daha az şiddetli geçen enfeksiyonların farkına varılmasında başarısız olunmasından kaynaklanıyor olduğuna işaret etmektedir. Bu gözlemsel yanılgıya rağmen, farklı zamanlarda ve yerlerde rapor edilen ölümlü vaka oranlarındaki farklılıkların, ya sağlık yardımının ve tedavinin kalitesinden, ya da bölgede dolaşan KKKAV suşlarının virülenslerindeki farklılıklarından kaynaklanıyor olabileceği olasılık dâhilindedir.

Enfektif virüsün hastadan elde edilmesi ve gösterilmesi, uzun süreler KKKA'nın teşhisinde altın standart olarak değerlendirilmiştir. Ancak bu çalışmalar, pek çok endemik ülkede bulunmayan, biyogüvenlik seviyesi 4 olan laboratuvarları gerektirmektedir. Hızlı ve güvenli olması, yüksek özgünlük ve duyarlılıkta çalışması sebebiyle, viral RNA'yı tespit edebilen, geleneksel ve gerçek zamanlı RT-PCR yöntemleri, günümüzde KKKA'nın teşhisinde standart laboratuvar yöntemi olarak değerlendirilmektedir. Hastalığın teşhisinde ve seyrinde, ayrıca KKKAV'ye özgü IgM ve IgG antikorlarını tespit eden ELISA yöntemleri de kullanılabilmektedir (Bente vd. 2013).

2.6 Kırım Kongo Kanamalı Ateşinin Patogenezi

KKKA, ilk defa 1944 yılında tanımlandığında, hastalığın temel patolojik anormalliğinin hemoraji ve plazma sıvısının dokular arası boşluğa geçmesi ile sonuçlanan vasküler işlev bozukluğu olduğu aşikârdı. O dönemdeki Sovyet klinisyenler, otopsi bulgularına dayanarak, organlardaki temel patolojik sürece, en çok kapiller ve küçük damarlarda meydana gelen kan dolaşımındaki bozulmanın yol açtığı sonucuna varmış ve hastalığı, “enfektif kapiller toksikoz” olarak değerlendirmişlerdir (Grashchenkov 1945). O zamandan beri, KKKA hastalarının, hastalığın erken evresinden itibaren anormal pıhtılaşma parametreleri sergiledikleri ve şiddetli geçen hastalığın, yaygın damar içi pıhtılaşma sendromu (YDP) ile karakterize olduğu anlaşılmıştır (Swanepoel vd. 1989, Burt vd. 1997). Ancak, vasküler işlev bozukluğunun, doğrudan endotel hücrelerinin viral enfeksiyonu sonucu mu meydana geldiği, yoksa dolaylı olarak dolaşımda olan proinflatuvar araçlar tarafından mı meydana getirildiği bilinmemektedir.

KKKAV'nin, doğrudan insan damarlarını enfekte edebildiğine dair tek delil, mononükleer fagositlerde, hepatositlerde ve endotel hücrelerinde Viral RNA'nın tespit edildiğini belirten, 1997 yılında, 12 otopsi üzerinde yapılmış bir çalışmadır (Burt vd. 1997). Ancak, ölüm anında endotel hücrelerinde virüsün bulunması, hastalık meydana geldikten hemen sonra kendini gösteren vasküler geçirgenlikteki artışın sebebinin de bu olması gerektiği anlamına gelmemektedir. Bunun yerine, vasküler sızdırma, prokoagülan durumu ve hemoraji, şiddetli sistemik inflamatuvar yanıt tarafından

meydana getirilebilirler ve bunlar aslında gram negatif bakteriyal enfeksiyonlar tarafından uyarılan septik şokun tipik özellikleridir (Bray ve Mahanty 2003). KKKA ile pek çok ortak özellik bulunduran, Ebola Kanamalı Ateşi'nin hayvan çalışmalarında, vasküler işlev bozukluğuna, proinflatuvar sitokin yanıtının uyarılmasını, trombositlerin kümelenmesini (agregasyonunu) ve degranülasyonunu, lökosit adezyonunu ve içsel (intrinsik) pıhtılaşma kaskadlarının aktifleşmesini içeren, konaktan doğan mekanizmaların sebep olduğu önerilmiştir (Schnittler ve Feldmann 2003, Mahanty ve Bray 2004). Türkiye'de yapılan iki yeni çalışmada, vasküler aktivasyonun serumdaki belirteçleri olan sICAM-1'in ve sVCAM-1'in KKKA'lı hastalarda yükselmiş olduğu ve ölümcül vakalarda miktarlarının daha da artmış olduğu bulunmuştur (Bodur vd. 2010, Öztürk vd. 2010). Ancak, bu iki çalışmada, VEGF belirteci yönünden birbirleri ile çelişen sonuçlar bulunmuştur. Kültüre alınmış insan endotel hücrelerinin KKKAV ile enfeksiyonunun, ICAM-1'in ve VCAM-1'in ifadelerinin artmasına ve IL-6'nın ve IL-8'in salgılanmalarına sebep olduğu gösterilmiştir (Connolly-Andersen vd. 2009).

Proinflatuvar sitokin yanıtlarının, KKKA'nın patogenezindeki önemi, birkaç çalışma ile desteklenmiştir. Türkiye'de, hafif ve şiddetli KKKA vakaları ile yapılan bir çalışmada, TNF- α 'nın serumdaki yüksek seviyesi, şiddetli hastalık ile ilişkilendirilirken, IL-6'nın seviyesi hem hafif, hem de şiddetli KKKA vakalarında artmış olarak bulunmuştur (Ergönül vd. 2006d). Ölümcül vakalarda, ölümcül olmayan vakalara göre her iki sitokin de seviyesinde belirgin düzeyde artış gözlenmiştir. Kosova'da yapılan geniş kapsamlı bir çalışmada, ölümcül KKKA vakalarında, IFN- γ , TNF- α ve IL-10 seviyeleri, belirgin bir şekilde yükselmiş olarak bulunmuştur (Saksida vd. 2010). Benzer bir şekilde, KKKA'dan ötürü ölmekte olan bir Arnavut hastada sTNF-R, TNF- α , IL-6 ve IL-10 sitokinlerinin serumdaki seviyeleri yüksek olarak bulunmuştur (Papa vd. 2006). Bu klinik gözlemler, laboratuvar çalışmaları ile elde edilen, KKKAV'nin insan monosit kökenli dendritik hücrelerdeki (DC) replikasyonunun, bu hücrelerde proinflatuvar sitokinlerin salgılanmasını uyardığı bulguları ile desteklenmiştir (Connolly-Andersen vd. 2009). *In vitro* KKKAV ile enfekte DC'lerin süpernatantlarının, kültüre alınmış endotel hücrelerini aktive ettiği ve bu aktivasyonun TNF- α 'ya özgü antikorlar tarafından engellendiği gösterilmiştir. Yine, primer insan

makrofajlarının ve DC'lerinin KKKAV ile enfeksiyonu sonucunda, bu hücrelerden proinflamatuvar sitokin salgılanmasının uyarıldığı gösterilmiştir (Peyrefitte vd. 2010).

Yukarıda bahsi geçen bu çalışmaların pek çoğu, KKKAV'nin bir hastalık modeli olan STAT-1 geni işlevsiz hale getirilmiş farelerde de tekrar edilmiş ve hastalığın erken aşamasında, farelerin serumlarında, IL-6, IL-10, IFN- γ ve TNF- α sitokin seviyeleri yükselmiş olarak bulunmuştur (Bente vd. 2010). Ayrıca, Türkiye'de ve Yunanistan'da yapılan çalışmalarda, pek çok hastada, pansitopeniye katkı sağlayabilecek özellikte reaktif hemofagositik lenfohistiyositoz oluşumu gözlenmiştir (Karti vd. 2004, Taşdelen Fisgin vd. 2008, Papa vd. 2009). Bu fenomen, monositlerin, yüksek düzeydeki Th1 sitokinleri tarafından aşırı derecede aktive edilmesi sonucu meydana geliyor olabilir.

Tip1 interferon yolağı ortadan kaldırılmış farelerin KKKAV enfeksiyonlarına karşı duyarlı olduklarının bulunması, KKKAV'a karşı koruyucu immünitenin geliştirilmesinde bu sitokin yanıtlarının oldukça önemli olduğunu göstermiştir (Bente vd. 2010, Bereczky vd. 2010). İnnat immün yanıt aracısı olan nitrik oksit (NO) de KKKAV replikasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (Simon vd. 2006). Bunun yanı sıra, doğal öldürücü (NK) hücrelerin de KKKAV enfeksiyonlarına karşı geliştirilen konak immün yanıtlarda rol aldığı gösterilmiştir. Kanda dolaşan NK hücrelerinin sayısı, şiddetli hastalıklarda, hafif geçen hastalıklara göre daha fazla olarak bulunmuştur (Yılmaz vd. 2008). Diğer bir çalışmada, kanda dolaşan lenfositler içerisinde CD8+ sitotoksik T lenfositlerinin oranı, hastanın viral yükü ile doğru orantılı bir şekilde, ölümcül vakalarda, ölümcül olmayan vakalara göre belirgin olarak daha fazla bulunmuştur (Akıncı vd. 2009). Daha önce belirtildiği üzere, KKKAV ile ölümcül bir biçimde enfekte olmuş hastalar, tespit edilebilir düzeylerde KKKAV'ye özgü IgM ve IgG antikorlarını üretememektedir. Bu bulgu, KKKAV'dan korunmada, humoral immün yanıtların ne derece önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Ancak, bu antikor yanıtı geliştirememesi durumunun sebebinin, lenfositlerin apoptozis sonucu kaybedilmesi olup olmadığı henüz aydınlatılmamıştır.

KKKA hastalığının ara sıra (sporadik) ortaya çıkması ve otopsi uygulamalarındaki güvenlik kaygılarından ötürü, ölümcül KKKA vakalarında meydana gelen histolojik

anormalliklere dair yapılmış sadece birkaç çalışma mevcuttur (Burt vd. 1997). Buna göre, karaciğerdeki temel bulgular, eozinofilik nekroz, kupfer hücrelerinin hiperplazisi ve Councilman cisimciklerinin (eozinofilik nekrotik hepatositler) varlığıdır (Burt vd. 1997). Ayrıca, belirgin dalak lenfoid apoptozisi ve lenfosit azalması ile birlikte akciğer iltihabi da gözlenmiştir. Yine, KKKAV 10200 suşu ile enfekte, STAT1 geni işlevsiz hale getirilmiş farelerde yapılan çalışmalarda da, insanlardaki ile benzer patolojik bulgulara rastlanmıştır (Bente vd. 2010).

2.7 Kırım Kongo Kanamalı Ateşinin Tedavisi ve Korunma Stratejileri

KKKA için hali hazırda geliştirilmiş, etkili bir antiviral ilaç tedavisi bulunmamaktadır ve destekleyici tedaviler, hastalığın yönetiminde ana dayanak noktasıdır (Leblebicioğlu vd. 2012). KKKA olduğu doğrulanmış vakalarda, genellikle hastanede tedaviye alınma gereklidir ve hastalığı şiddetli geçiren vakalar, iyi donanımlı yoğun bakım ünitelerinin olduğu ve kan ve kan ürünlerine kolay ulaşımın sağlandığı, üçüncül (tersiyer) koruma merkezlerine havale edilmelidir. Sağlık hizmeti çalışanlarını KKKA'dan korumak için, kan ve kan sıvılarını içeren uygulamalarda kontrol önlemlerinin alınması şarttır.

Genel destekleyici tedaviler, kristaloid veya sentetik kolloid ile sıvı yer değiştirmesini (sıvı resplasmanı) ve parasetamol ile ağrı ve ateşin kontrol altına alınmasını içermektedir. Hemoraji ihtilalı (komplikasyonu) duruma göre değerlendirilmekte ve hastalara, eritrosit süspansiyonu, dondurulmuş taze plazma ve/veya trombosit yer değiştirmesi (replasmanı) sağlanmaktadır. Böbrek yetmezliği, hiperkalemi, şiddetli metabolik asidozu, üremik kalp zarı iltihabı ve aşırı sıvı yüklenmesi olan hastalarda, hemodiyaliz gerekli olabilir (Leblebicioğlu vd. 2012). Mekanik havalandırma (ventilasyon), hastaya solunum yetmezliği durumlarında uygulanmaktadır ve ikincil (sekonder) enfeksiyonlar, antibiyotiklerle tedavi edilmektedir (Sünbül vd. 2015).

KKKA'nın spesifik tedavisi için kullanılabilecek, Amerika Birleşik Devletler'inin Gıda ve İlaç Dairesi'nden onay almış herhangi bir antiviral ilaç bulunmamaktadır. Ribavirin, hem *in vivo*, hem de *in vitro* olarak pek çok virüse karşı geniş spektrumlu antiviral aktivite gösteren bir nükleozit analogudur. Ribavirin, hem dolaylı olarak (inozin

monofosfat dehidrojenazi inhibe etme, immün sistemi düzenleme) hem de doğrudan (mRNA keplenmesini engelleme, RNA polimerazı inhibe etme ve ölümcül mutagenез yapma) meydana getirdiği antiviral mekanizmalarına sahiptir (Graci ve Cameron 2006). Ribavirinin geniş spektrumlu antiviral aktivitesi, onun çoklu etki mekanizmalarına dayandırılabilir. Ancak, ribavirinin hücre içerisine alınmasında, uygulanan hücre ve doku tiplerine göre farklılıklar gözlenmiştir ve ribavirin dirençli virüs varyantları tanımlanmıştır (Beaucourt ve Vignuzzi 2014). Hücre kültürlerindeki çalışmalar, ribavirinin KKKAV'ye karşı inhibitör etkisinin olduğunu ortaya koymuştur ancak, bu inhibisyon için kullanılması gereken doz, ribavirinin, Rift Vadisi ateşi virüsünün hayvanlardaki replikasyonunu inhibe ettiği bilinen dozundan dokuz kat daha fazladır (Watts vd. 1989). Bir çalışmada, ribavirinin, KKKK'nın bebek fare modelinde, farelerin ölümünü azalttığı ve ölen farelerin de ortalama ölüm sürelerini uzattığı gösterilmiştir (Tignor ve Hanham 1993). Bu sonuçla çelişkili olarak, yakın zaman önce yapılan bir çalışmada, ribavirinin, KKKAV ile enfekte edilmiş, hastalığa duyarlı olan, IFNAR^{-/-} farelerde, hayatta kalma oranlarını artırmadığı bulunmuştur (Oestereich vd. 2014).

Ribavirinin, KKKK'lı hastaların tedavisindeki etkinliği halen tartışmalıdır (Ceylan ve Turhan 2014, Ergönül 2014). İki klinik çalışmada, ribavirinin KKKK'lı hastalarda viral yükü azaltmadığı ve ölüm oranlarını da etkilemediği gösterilmiştir (Çevik vd. 2008, Bodur vd. 2011). Ancak bu çalışmaların bir tanesi hariç diğerleri, geriye dönük (retrospektif) olarak yapılmıştır. Türkiye'de yapılan yarı deneysel bir çalışmada, oral ribavirin tedavisinin, KKKK'lı hastaların hayatta kalma oranlarını artırmadığı gösterilmiştir (Elaldı vd. 2009). Çok değişkenli (multivariate) analiz yapıldığında, ılımlı bir şekilde hastalık geçiren KKKK'lı hastalarda, ribavirinin ölümlü vaka oranını azaltmada etkili olduğu bulunmuştur (Dokuzoğuz vd. 2013). İki çalışmada, ribavirinin, KKKK'nın erken evresinde kullanımının yararlı etkilerinin olabileceği önerilmiştir (Taşdelen Fisgin vd. 2009, Özbey vd. 2014). Ancak bu çalışmalarda, ilacın hayatta kalma oranları üzerindeki faydalı etkisine dair somut veriler bulunmamaktadır. Ayrıca, bu çalışmalarda, hasta grupları, ölümlü vakaların asli öngöstergesi olan viral yükleri esas alınarak sınıflandırılmamıştır (Çevik vd. 2007).

Türkiye’de ileriye dönük (prospektif) olarak yapılan tek çalışmada da, ribavirinin, KKKA’lı hastalarda ölüm oranları üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı rapor edilmiştir (Köksal vd. 2010). Aşçıoğlu ve diğerlerinin meta-analiz çalışmasında da ribavirinin, KKKA hastalığında, ölüm oranları üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir (Aşçıoğlu vd. 2011). KKKA, Türkiye’de ilk defa ortaya çıktığında, ribavirin, bir tedavi seçeneği olarak KKKA’lı hastaların tedavisinde ağırlıklı olarak kullanılmıştır. Ancak, ribavirinin KKKA’lı hastalarda kullanımı, 2004-2007 yılları arasında % 68’den % 12’ye düşmüştür ve bu dönemde, ölüm oranlarında herhangi bir değişim olmamıştır (Yılmaz vd. 2009). Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı, 2008 yılında, ribavirini, kanıtlanmış herhangi bir faydasının olmayışı sebebiyle, KKKA’nın tedavisi için hazırladığı tavsiye listesinden çıkartmıştır. Ancak ribavirin, halen bazı merkezlerde, KKKA’nın tedavisinde kullanılmaktadır. Bunun dışında, RNA virüslerine karşı geniş spektrumlu bir antiviral etki gösteren, viral RNA polimeraz inhibitörü olan favipiravirin KKKA’nın fare modelindeki etkinliği gösterilmiştir (Oestereich vd. 2014).

KKKA için etkinliği kanıtlanmış spesifik bir tedavinin olmayışı, araştırmacıları, diğer tedavi yöntemlerinin etkinliklerini sorgulamaya sevk etmiştir. KKKA hastalığını atlatan insanların plazmalarından hazırlanan hiperimmün serumun viral yükü düşürdüğü gösterilmiştir (Kubar vd. 2011). Viral yükün, 10^8 kopya/mL veya daha fazla olduğu hastaları içeren yüksek risk grubunda hayatta kalma oranı % 86,6 (13/15) olarak rapor edilmiştir. Doğal olarak, kontrol grubunun olmayışı, bu oranın değerlendirilmesini zorlaştırmaktadır. Ancak, bu sonuç umut vaat etmektedir ve bu etkinin araştırılması ve klinik sonuçlar ile ilişkisinin daha iyi belirlenmesi adına, geniş kapsamlı çalışmaların yapılması gerekmektedir. Bu çalışmanın dışında, çift filtrasyon plazmaferez yöntemi, bir KKKA vakasında başarıyla kullanılmıştır (Meco vd. 2013).

Herhangi bir aşı ve spesifik bir antiviral tedavi olmaksızın KKKA’nın kontrol altına alınması zordur. Virüse maruz kalma sonrası aşılama ve virüse maruz kalma açısından yüksek risk gruplarında olanların aşılama hastalıktan korunmak için son derece gereklidir.

Bütün kene kaynaklı hastalıklarda olduğu gibi, kişiler, hastalığa yakalanmamak için kene ısırılmasından korunmaya dikkat etmek zorundadır. KKKAV, viremik hastaların veya özellikle viremik çiftlik hayvanlarının salgılarına ve kanlarına doğrudan temas edildiğinde, son derece enfektif olabildiğinden, sağlık hizmetinde çalışanlar olduğu kadar, hayvancılıkla uğraşan ve hayvan kesimhanelerinde çalışan bireyler de, eldiven, maske, koruyucu önlük ve yüz koruyucusu kullanmak gibi, hastalıktan korunmak için yeterli olduğu kanıtlanmış, enfeksiyon kontrol yönergelerini takip etmelidirler. Bu amaç doğrultusunda, Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı, endemik bölgelerde yaşayan ev halkı için hastalık hakkında farkındalık yaratan eğitim programları düzenlemiştir (Leblebicioğlu 2016). KKKA hastalarının yönetilmesi sırasında, bariyer hemşirelik ve hasta izolasyonu gereklidir.

Türkiye Cumhuriyeti Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, endemik bölgelerde, hayvanların flumethrin gibi ektoparazitik ilaçlarla tedavisinin yapıldığı programlar yürütmüştür. Ancak, bu programın uygulanmasındaki en büyük zorluk, Türkiye’de yaygın olan arka bahçe çiftçiliğidir. Ayrıca, ektoparazitik ilaç kullanımının etkinliğini değerlendirmek adına, ileriye dönük (prospektif) çalışmalarının yapılması gereklidir (Leblebicioğlu 2016). Bunun dışında, her çiftlik hayvanına, Türkiye Cumhuriyeti Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından bir kimlik numarası verilmektedir ve bu şekilde Türkiye’de hayvanların hareketi kontrol edilmektedir. Ancak yine de ülkemizin İran, Irak ve Suriye ile olan sınır bölgelerinde kontrolsüz hayvan taşınımı yapılabilmektedir (Leblebicioğlu 2016). Bu bölgelerdeki hayvan taşınımının kontrol edilmesi, ülkemize yeni KKKAV suşlarının girmesini ve ayrıca yeni, yeniden tasnif olmuş (reassortant) KKKAV suşlarının ortaya çıkmasını önleyecektir (Leblebicioğlu 2016). Diğer yandan, nadiren de olsa, keneleri kontrol altına almak adına, Gine tavuklarının kullanımının önerilmesi gibi biyolojik kontrol önlemleri de gündeme gelmektedir. Ancak yapılan çalışmalar, bu hayvanların da keneler için uygun birer konak olduğunu ortaya koymuştur (Şekercioğlu 2013). Bu sebeple, faydası kanıtlanmamış olan biyolojik kontrol önlemlerinden kaçınılmalıdır (Şekercioğlu 2013). Kene popülasyonlarının kontrol altına alınması, şu aşamada yapılabilirliği çok kolay olmayan bir hedef olduğundan, endemik bölgelerdeki ve KKKA’nın yayılabileceği, risk

teşkil eden bölgelerde hastanelerin ve laboratuvarların kapasiteleri ve donanımları arttırılmalıdır.

2.8 Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü için Aşı Geliştirme Yaklaşımları

Hastalığın geniş bir coğrafik dağılıma sahip olması, şiddetli geçmesi ve insanlarda yüksek ölüm oranları meydana getirmesi, hastalık için geniş ölçüde kullanılabilecek, onay almış, herhangi bir güvenli ve etkili tedavi ajanının ve aşının bulunmayışı sebebiyle, KKKA, halen günümüzde halk sağlığı için önemli bir tehdit oluşturmaktadır.

KKKAV ile yapılan çalışmalar için yeterli biyogüvenlik önlemlerine sahip laboratuvarların kullanılması gerekliliği ve hastalığın uygun bir hayvan modelinin olmayışı, KKKA için yapılan aşı geliştirme araştırmalarını önemli ölçüde sekteye uğratmıştır. Yakın zaman önce, interferon yolaklarının işlevsiz hale getirilmiş olması sebebiyle, KKKA'nın en azından bazı semptomlarını gösterebilen iki letal fare modeli meydana getirilmiştir (Bente vd. 2010, Bereczky vd. 2010). Oluşturulan bu iki KKKA fare modeli, tip 1 interferon α/β alması (reseptörü) (IFNAR) işlevsiz hale getirilmiş (IFNAR^{-/-}) fare ve STAT1 sinyal aracı proteini işlevsiz hale getirilmiş (STAT1^{-/-}) fare, KKKA için yeni geliştirilen aşı adaylarının etkinliğinin test edilmesinin yolunu açmıştır. Her iki fare modelinde de, kene ısırması aracılı hastalık bulaşısını taklit eden, virüsün deri içi (subkutan) olarak enjeksiyonunu da içeren, çeşitli virüs bulaştırma yolları ile hastalık oluşturulması mümkündür. Ancak, A129 ırkı, IFNAR^{-/-} fareler, sadece tip 1 interferon yolaklarından yoksundur ve bu sebeple, hem tip1 hem de tip2 interferon yolaklarından yoksun olan STAT1^{-/-} farelere göre daha iyi bir KKKA modeli gibi görünmektedir.

Günümüzde, insanları bağışıklamak için mevcut olan tek aşı, emzirilme dönemindeki KKKAV ile enfekte farelerin beyin dokularından türetilen, kloroform ve ısı ile etkisiz hale getirilmiş ve alüminyum hidroksit adjuvanı ile formüle edilmiş inaktif virüs aşısıdır (Papa vd. 2011a). Bu inaktif virüs aşısı, aslen 1970 yılında, Sovyet Rusya'da geliştirilmiştir ve 1974 yılında Bulgaristan'da onaylanmasından bu yana, öncelikli olarak ordu ve sağlık hizmeti çalışanlarının, çiftçilerin ve endemik bölgelerde çalışan

veya yaşıyan insanların aşılmasında kullanılmıştır (Papa vd. 2011a). Bu Bulgar aşısının, sağlıklı kişilerde meydana getirdiği hüneral ve hücrenel immün yanıtların klinik değerdendirmesi yakın zaman önce yapılmıştır (Mousavi-Jazi vd. 2012). Aşılanmış grupta, artmış sayıda IFN- γ üreten T hücrelerin varlığının ve nötrale edici antikorların üretildiğinin gösterilmesiyle yapılan aşı etkinlik değerdendirmesinde, aşının KKKAV'ye karşı bağışıklık meydana getirdiği gösterilmiştir. Ancak, aşya karşı geliştirilen immün yanıtlar olması gerekenden daha az seviyede kalmıştır ve iyileştirilmiş bağışıklık için dört ardışık aşılanmanın yapılması gerekmiştir. Bulgar aşısının, otoimmün ve alerjik yanıtlara sebep olan, myelin bazık proteini bulaşısını meydana getiren ve dolayısıyla güvenlik kaygılarına sebep olan kaba bir hazırlanma süreci vardır. Ayrıca, bu aşının, kontrollü insan çalışmaları ve deney hayvanları üzerindeki etkinliğinin değerdendirildiği laboratuvar çalışmaları bulunmamaktadır. Bu sebeplerden ötürü, Bulgar aşısının uluslararası düzenleyici kuruluşlardan onay alması mümkün görünmemektedir. Bu sebeple, şu an için, güvenli ve KKKAV'ye karşı etkili olan, insanların kullanımı için yaygın bir şekilde bulunabilen, uluslararası olarak onay almış herhangi bir aşı bulunmamaktadır.

Virüslerin temel yapısal bileşenleri olmaları dolayısıyla, nükleoprotein ve glikoproteinler, KKKAV'ye karşı geliştirilen aşılar da potansiyel antijenik hedefler olarak kullanılmaktadır. KKKAV'nin en çok korunmuş olan proteini NP'dir. Bu özelliği, NP'yi, KKKAV'nin farklı suşlarına karşı etkili olabilecek aşıların geliştirilmesinde cazip bir hedef antijen yapmaktadır. NP'nin, pek çok Orthonairovirüs enfeksiyonu sırasında oluşturulan immün yanıtlar da baskın antijen olduğu bilinmektedir (Schmaljohn ve Nichol 2007). İnsanlar da, KKKAV Bulgar aşısı ile yapılan tekrarlı aşılamalar sonucunda, NP'nin tamamını meydana getiren peptit bölgelerine spesifik olan T hücre yanıtlarının meydana getirildiği bulunmuştur (Mousavi-Jazi vd. 2012). KKKAV'nin Gc ve Gn glikoproteinlerinin, virionun yüzeyinde sergilenmeleri sebebiyle, özellikle B hücre yanıtları için iyi birer antijenik hedef oldukları düşünülmektedir. Monoklonal antikorlarla yapılan çalışmalarda, Gn'yi değil, ancak Gc'yi hedef alan antikorların nötralizasyon aktivitesine sahip olduğunu bulunmuştur (Bertolotti-Ciarlet vd. 2005). Ancak, diğer araştırmacılar, hem Gn'de hem de Gc'de nötralizasyon epitopları tanımlamıştır (Ahmed vd. 2005). KKKAV suşları arasında, olgun

glikoproteinler bakımından sadece % 8,4 oranında bir dizi farklılığı mevcuttur (Ghiasi vd. 2011). Dolayısıyla oldukça korunmuş olan olgun glikoproteinler üzerinde bulunan nötralizasyon epitoplarının, çeşitli KKKAV suşları için ortak olan immün yanıtların gelişmesini sağladıkları düşünülmektedir.

Hastalarda, KKKAV'ye karşı geliştirilen güçlü IgM ve IgG antikor yanıtları, iyileşme belirteci olarak değerlendirilmekle birlikte, pek çok hasta, görece düşük seviyelerde nötralize edici antikor yanıtı geliştiriyor gibi görünmektedir (Shepherd vd. 1989b). Benzer şekilde, nötralize edici özelliği olmayan monoklonal antikorların, fareleri letal KKKAV enfeksiyonundan korumada etkili oldukları bulunmuş ve ilginç olarak, Gn'ye özgü olanlarda, Gc'ye özgü olanlara göre daha fazla koruyucu etki gözlenmiştir (Bertolotti-Ciarlet vd. 2005). İlave olarak, son zamanlarda yapılan KKKAV aşı çalışmalarında, nötralize edici antikor yanıtı eldesi ile aşı etkinliği arasında doğrudan bir ilişki kurulamamıştır (Kortekaas vd. 2015, Hinkula vd. 2017). Bu sebeple, hücre aracılı bağışıklık, KKKAV'ye karşı etkili bir koruma geliştirilmesinde hatırı sayılır bir rol oynuyor gibi görünmektedir. İnterferon yolağının da KKKAV enfeksiyonlarının kontrol altına alınmasında önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Andersson vd. 2006). Ancak, interferon yolağı KKKAV'ye karşı geliştirilen immün yanıtlarda önemli olmakla birlikte, immün yanıtların kinetiği ve çoklu immün yanıtların (hem hücresel hem de humoral) etkinleştirilmesi, enfeksiyonun gidişatını etkileyen en önemli faktörler olabilir (Dowall vd. 2017). Bu sebeple, KKKA sırasında geliştirilen koruyucu immün yanıtlar ile ilişkili faktörler, halen yeteri kadar aydınlatılamamıştır.

Dowall ve diğerlerine göre, hastalıktan etkilenen bölgelerin geniş bir kısmında kullanılabilecek, uluslararası düzenleyici kuruluşlarca onaylanabilir bir KKKA aşısı belli bazı özelliklere sahip olmalıdır ve bunlar çizelge 2.1'de özetlenmiştir (Dowall vd. 2017). Halk sağlığı araştırmacıları, KKKA için insan aşısı geliştirilmesi üzerine odaklanmış olmakla birlikte, KKKAV'ye karşı geliştirilecek bir veteriner aşısı, çiftlik hayvanlarındaki enfeksiyonları kontrol altına almak suretiyle, hayvan kesimleri sırasında hastalığın insana bulaşmasını önlemede önemli bir rol oynayacaktır (Dowall vd. 2017).

KKKAV için bu zamana kadar yapılmış aşı araştırmalarını değerlendirecek olursak, IFNAR^{-/-} farelerde koruma etkinliği olduğu gösterilmiş, KKKAV'ye karşı aşı adaylarının geliştirildiğini rapor eden, yakın zaman önce yapılmış çalışmalar mevcuttur (Buttigieg vd. 2014, Çanakoğlu vd. 2015, Hinkula vd. 2017, Garrison vd. 2017). Hücre kültürü ile türetilen, formalin ile etkisiz hale getirilmiş, KKKAV Kelkit06 suşu ile gerçekleştirilen deneysel bir KKKAV aşısı çalışmasında, bağışıklanmış A129 ırkı, IFNAR^{-/-} farelerin türdeş (homolog) virüs ile sorgulanması sonucunda, % 80'e ulaşan koruma oranları elde edilmiştir (Çanakoğlu vd. 2015). Bir diğer çalışmada, KKKAV IbAr 10200 suşunun M segmentininin ORF'sini ifade eden rekombinant Modifiye Vaccinia Virüsü Ankara (MVA-GP) oluşturulmuş ve aşının A129 ırkı, IFNAR^{-/-} farelerdeki koruyucu etkileri değerlendirilmiştir (Buttigieg vd. 2014). Bağışıklanmış farelerin, türdeş suş ile yapılan enfeksiyondan % 100 olarak korunmuş oldukları gösterilmiş ve MVA-GP'nin bu yüksek koruyucu etkisinin mekanizmaları üzerine yapılan sonraki çalışmalar, hastalıktan tamamen korunmada hem hücresel hem de humoral bağışıklık yanıtlarının gerekli olduğunu ortaya koymuştur (Dowall vd. 2016). Daha yakın zaman önce yapılmış bir çalışmada, transkripsiyonel olarak yetkin olan, KKKAV yüzey glikoproteinleri Gn ve Gc'yi sergileyen virüs benzeri partiküllerin ve KKKAV proteinleri Gn'nin, Gc'nin ve NC'nin ubiquitin bağlı biçimlerini kodlayan DNA plazmitlerinin, A129 ırkı, IFNAR^{-/-} fareleri hastalıktan koruma etkinlikleri test edilmiştir (Hinkula vd. 2017). Sonuç olarak, sadece DNA plazmitleri ile bağışıklanmış farelerin ölümcül enfeksiyondan % 100 oranda korundukları gösterilmiş ve bu yüksek hayatta kalma oranı, baskın olarak ortaya çıkan, hücresel Th1 yanıtlarına dayandırılmıştır. Son olarak, kodonları optimize edilmiş, KKKAV IbAr 10200 suşunun M segmentini ifade eden bir DNA aşısının hastalıktan koruyucu etkileri, iki letal fare modelinde (C57BL/6 ırkı, IFNAR^{-/-} fare ve tip1 IFN yolağı antikör aracılı bir şekilde kapatılarak immün sistemi geçici olarak baskılanmış C57BL/6 ırkı fare) gösterilmiştir (Garrison vd. 2017). Aşı ile bağışıklanmış her iki fare modelinin türdeş virüs ile sorgulanmaları sonrasında, % 60'dan daha fazla hayatta kalma oranları elde edilmiştir.

KKKAV için yenir aşı geliştirilmesine yönelik yapılan bir çalışmada, KKKAV genomunun Gn ve Gc kodlayan bölgeleri, bitki klonlama vektörüne yerleştirilmiş ve daha sonra transgenik tütün bitkisinde ifade ettirilmiştir (Ghiasi vd. 2011). Bu bitkinin

yaprakları ve kökleri ile beslenen farelerde, oral/mukozal immünizasyon yoluyla antijenlere özgü hüморal immün yanıtlar meydana getirilmiştir. Ne yazık ki bu çalışmada, KKKAV'nin hastalık modelleri kullanılmadığından aşının hastalıktan koruma etkinliği değerlendirilmemiştir.

Çizelge 2.1 İnsan KKKAV aşısı için öngörülen ürün özellikleri (Dowall vd. 2017)

Özellik	Sebeб
Hücrel ve hüморal immün yanıtların uyarılabilmesi	Sadece, adaptif immün sistemin her iki tarafını da uyararak aşı yaklaşımlarının KKKAV enfeksiyonuna karşı koruma sağladığı gösterilmiştir.
Gen ürününün doğru bir şekilde ifadenmesi	İmmün sisteme sunulan antijen, lineer ve lineer olmayan epitop tanınmalarını en iyi duruma getirmek için hedef virüs ile özdeş olmalıdır.
Kabul edilebilir maliyete sahip olma	Maliyet, aşının, sağlık hizmeti ödeneklerinin sınırlı olduğu endemik ülkelerdeki yetkililerce alınmasında önemli bir faktör olacaktır.
Kolay üretilebilir olma	Salgın durumlarında, aşı, endemik bölgelerdeki risk gruplarının immünizasyonu için hızlı şekilde ve yeterli miktarlarda üretilebilmelidir.
Isıya dayanıklı olma	KKKAV, yüksek sıcaklıkların olduğu ülkelerde endemiktir. Isıya dayanıklı bir aşı, lojistik ve soğuk zincirin korunması gibi ilave maliyetleri ortadan kaldırabilir.
Güvenli olma	Güvenlik verileri bulunan ve benzer teknolojiler kullanılarak yapılan bir aşının, klinik denemelerde başarı elde etmesi ve hızlı bir şekilde onay alması daha olasıdır.
Az dozlara gereksinim duyma	Çoklu tekrar (boost) aşılama gerektirmediği takdirde, insanların aşılama oranları artacaktır.

Modifiye Vaccinia Virüsü Ankara'ya (MVA) benzer bir yaklaşımla, KKKAV'nin tüm M segmenti, insan serotip 5 adenovirüsü'ne (AdHu5) yerleştirilmiştir. Ancak, bu aşı, hem hücrel hem de hümmoral immün yanıtları uyarmasına rağmen KKKAV'nin letal fare modelinde koruma meydana getirememiştir (Sahib vd. 2010). Bu aşının başarısız olmasının kesin nedenleri bilinmemekle birlikte, bir olası sebep, çalışmada IFNAR^{-/-} fareler yerine, adaptif immün yanıtlarında bariz eksiklikleri olan STAT-1^{-/-} farelerin kullanılmış olması olabilir. Diğer yandan adenovirüs temelli aşılar için önemli bir dezavantaj olarak görülen durum, insanların bu virüse karşı hali hazırda yüksek seviyede bir bağışık geliştirmiş olmasıdır. Yetişkin insanların yaklaşık % 45 ila % 80'i AdHu5 için nötrale edici antikor ifade etmektedir. Bu dezavantajın giderilmesi adına, adenovirüs aşı vektörleri olarak, belki diğer canlı türlerinden izole edilen adenovirüsler kullanılabilir (Vogels vd. 2003).

Böcek hücrelerinin ve ifade vektörlerinin kullanıldığı teknolojiler ile KKKAV'nin yapısal yüzey glikoproteinleri (Gn ve Gc) veya bu yüzey glikoproteinlerin dışarıya bakan domainleri (ektodomain) üretilmiştir. STAT-1^{-/-} farelerin, saflaştırılmış ve adjuvanlar ile birleştirilmiş haldeki Gn ve Gc ektodomainleri ile aşılannmaları sonucunda nötrale edici antikor yanıtları elde edilmiş, ancak geliştirilen bu alt ünite aşısı, fareleri ölümcül KKKAV enfeksiyonundan koruyamamıştır (Kortekaas vd. 2015). Bazı böcek hücreleri, memeli hücrelerine benzer şekilde bir glikozilasyon işlemi yürütse de, KKKAV glikoproteinlerinin karmaşık glikozilasyon işleminin böcek hücrelerinde tam anlamıyla desteklenemiyor olması olasılık dahilindedir (Harrison ve Jarvis 2006). Bu sebeple, aslına uygun olmayan glikoproteinler, koruyucu bağışıklık yanıtlarını geliştirememiş olabilirler.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Hayvanlar

Bu tez çalışmasında, 5 ila 9 haftalık soy içi üretilmiş dişi BALB/c ırkı fareler (The Jackson Laboratory, ME USA) kullanılmıştır. Tez çalışmasında kullanılan BALB/c ırkı farelerin örnek fotoğrafı şekil 3.1’de verilmiştir.



Şekil 3.1 Tez çalışmasında kullanılan BALB/c ırkı fareler

3.1.2 Memeli hücreleri

Bu tez çalışmasında, rutin virüs üretimi, *in vitro* protein ifadesi çalışmaları ve nötralizasyon deneyleri için memeli hücreleri olarak, bir bebek hamster böbrek hücre hattı olan BHK-21 ve bir maymun böbrek hücre hattı olan Vero E6 kullanılmıştır.

3.1.3 KKKAV suşu

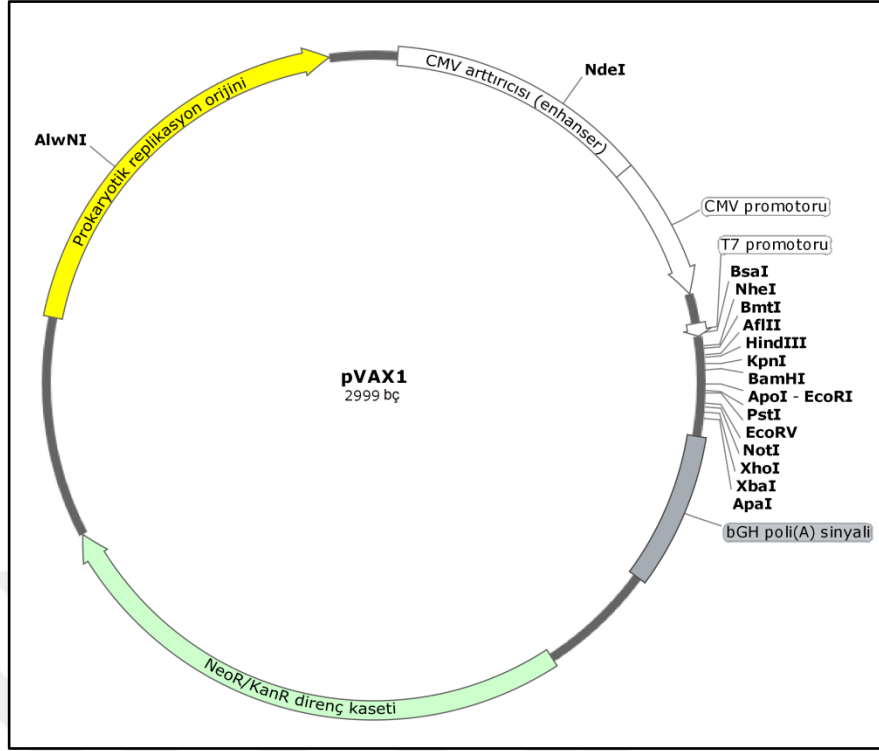
Bu tez’de yapılan tüm virüs çalışmalarında, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Bölümü’nün virüs kültür koleksiyonunda bulunan KKKAV’nin KAST2012 klinik izolatu kullanılmıştır.

3.1.4 Bakteri suşları

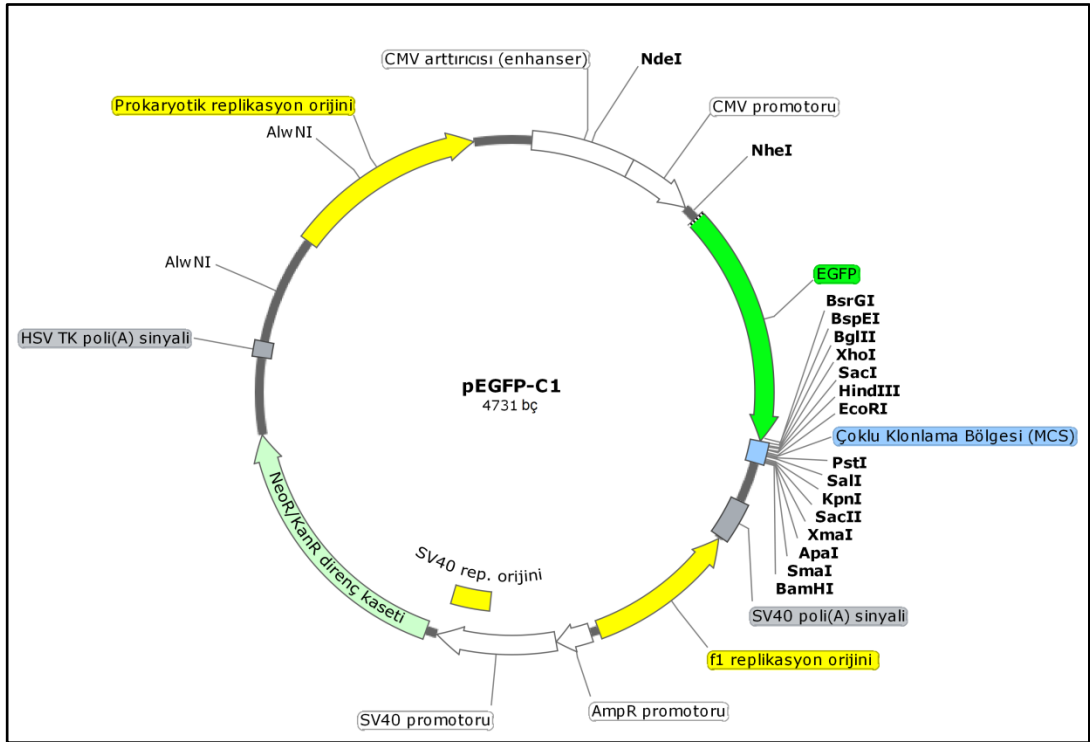
Klonlama çalışmalarında bakteri konağı olarak, *Escherichia coli* türü bakterinin DH5-Alpha suşu (ATCC) ve PYY suşu (Max Planck Nörobiyoloji Enstitüsü Öğretim Üyesi Dr. Oliver Griesbeck’in hediyesidir) kullanılmıştır.

3.1.5 Plazmitler

KKKAV KAST2012 izolatının Gc ORF’sinin filogenetik analizlerinde ve DNA aşı vektörünün hazırlanmasında, sırasıyla pVAX1 (Thermo Fischer Scientific) ve pEGFP-C1 (Clontech) plazmit vektörleri kullanılmıştır. pVAX1 ve pEGFP-C1 Plazmit vektörlerinin haritası şekil 3.2 ve 3.3’te verilmiştir.



Şekil 3.2 pVAX1 vektörünün (Invitrogen) haritası



Şekil 3.3 pEGFP-C1 vektörünün (Clontech) haritası

3.1.6 Oligonükleotit primerler

Bütün vektör hazırlama çalışmaları aşamalarında, polimeraz zincir tepkimesi (PZT) deneyleri ve dizi analizlerinde kullanılan oligonükleotit primerler çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Tez çalışmasında kullanılan oligonükleotit primerler

Oligonükleotit Primer Adı	Dizi (5' → 3')
Gc SLiCE-F1	acgactcactatagggagaccaagctggctagcgtttaaacttagccacatgttcttgg acagtatagttaaagg
Gc SLiCE-R1	aattccaccacactggactagtggatccgagctcggtaccaagctttagccaatgtgtgtt ttgtgg
Gc1-R	gcagtcacctgtacaagttg
Gc2-F	ctcggcgtagaagacgcctc
Gc 3'-R	gccaatgtgtgtttttag
CMV-F	cgcaaatgggcggtaggcgtg
CMV 3'-F	ggaggtctatataagcagagc
pVAX1-R	acagtcgaggctgatcagc
Gc SLiCE-F2	gagctgtacaagtccggactcagatctcgagctatgttcttgacagtatagttaaagg
Gc SLiCE-R2	gtatggctgattatgatcagttatctagatccggtttagccaatgtgtgttttgggagaac
EGFP-F	ccgacaaccactacctgagcac
Gc Seq2	gtggttgacatcatcaacctgc
Gc Seq3	ggatgtcctgggatggtgtgac
Gc Seq4	aaacttgagcagccacagagc
EGFP Removal-F	p-ttcttgacagtatagttaaaggtatgaaaaatttgc
EGFP Removal-R	p-catggtggcgaccggtag
His Tag Insertion-F	caccatcatcaccaccaccatcacttcttgacagtatagttaaaggtatgaaaaatttgc
His Tag Insertion-R	gtgatggtggtggtgatgatggtgcatggtggcgaccggtagcgc
His Tag-F	cgcacatgcatcatcacc
Gc 5'-R	gtgctccactgagctccaac
pUC Ori 3'-F	ggataaccgtattaccgcatgca
F1 Ori 5'-R	acactcaaccctatctcgggtcta

DNA kalıbına özgü diziler siyah renkle, SLiCE klonlamada kullanılan homoloji dizileri kırmızı renkle, Kozak dizisi yeşil renkle, 5' fosfat grubu, turuncu P harfi ile ve histidin etiketi kodlayan diziler mavi renkle belirtilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 Bakteri kültürü

E. coli'nin DH5-Alpha ve PYY suşları, standart olarak, sırasıyla, % 1 NaCl (Sigma), % 1 tripton (Sigma) ve % 0,5 maya özütü (ekstraktı) (Sigma) içeren Luria Bertani (LB) besiyerinde (pH 6,5) ve 2XYT besiyerinde (% 1,6 tripton, % 1 maya özütü, % 0,5 NaCl, pH 7,2) 37 °C'deki etüvde kültüre alınmıştır. Gerektiğinde, besiyerlerinin katılaştırılmasında % 2 oranında agar (Sigma) kullanılmıştır. Bakteriler, kullanılmadıkları durumlarda, % 50 gliserol içeren, ilgili besiyerlerinde, -80 °C'de saklanmışlardır.

3.2.2 Memeli hücre kültürü

BHK-21 ve Vero E6 hücrelerin kültürü, rutin olarak, % 10, ısı ile inaktif hale getirilmiş fetal sığır serumu (FBS) (Gibco) ve % 1 penisillin/streptomisin (Gibco) içeren, yüksek glikozlu, Dulbecco'nun modifiye ettiği, Eagle'nin besiyerinde (DMEM) (Gibco) yapılmıştır. Bütün hücreler, aktif olarak kültürleri sırasında, 37 °C'de, % 5 CO₂ içeren, nemlendirilmiş etüvlerde inkübe edilmiştir. Hücrelerin pasajlanması sırasında, hücre kültür tabaklarının yüzeyine tutunmuş hücreler, 37 °C'de tripsin (Gibco) uygulaması yardımıyla yüzeyden kaldırılmıştır. Hücrelerin, uzun süreli olarak korunabilmesi için, % 20 dimetilsülfoksit (DMSO) içeren DMEM besiyerine alınmış ve -80 °C'de saklanmıştır.

3.2.3 Farelerin barındırılması

Fareler, 20-21 °C'deki, yaklaşık % 50 nemli ortamda, 12 saat gece 12 saat gündüz koşullarında, ad libitum besleme yapılarak barındırılmıştır. Fare barındırma ve kullanım usülleri, Türkiye Cumhuriyeti Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın belirlediği etik kurallara göre takip edilmiştir. Bu tez çalışmasındaki tüm *in vivo* deneyler, Ankara Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu'nun onayı ile yürütülmüştür.

3.2.4 KKKAV KAST2012 izolatının kültürü

Gerekli olduğu durumda, KKKAV KAST2012 izolatı, orijinal stoğu kullanılarak Vero E6 hücrelerinde üretilmiş ve kullanılmadığı durumda, süspansiyon halde -80 °C’de saklanmıştır. KKKAV ile yapılan bütün deneysel çalışmalar, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Bölümü’nde bulunan, biyogüvenlik düzeyi 3+ olan laboratuvarlarda yürütülmüştür.

3.2.5 KKKAV KAST2012 suşunun genomik RNA’sının izolasyonu ve komplementer DNA (cDNA) sentezi

KKKAV KAST2012 suşunun genomik RNA’sının izolasyonu için, QIAamp cador *Pathogen* Mini Kit (Thermo Fisher Scientific; Cat No: 1069974) RNA izolasyon kiti kullanılmıştır. İzolasyon işleminde kitin kullanım talimatı izlenmiştir. İzole edilen RNA’nın miktarı ve saflık kalitesi spektrofotometrede (NanoDrop 2000 Thermo Fisher Scientific) 260nm, 280nm ve 230nm dalga boylarında ölçüm yapılarak belirlenmiştir. cDNA sentezi, Thermo Scientific Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Cat No: K1671) kullanılarak rastgele nükleotit dizilerine sahip hekzamerlerle yapılmıştır. Kısaca, 200 µL’lik PZT tüpleri içerisinde, 100 ng RNA örneği (en fazla 4µL içerisinde), 100 pmol (1 µL) rastgele hekzamerlerle karıştırılmış ve 65 °C’de, 5 dakika bekletilmiştir. Tüpler daha sonra buz üzerine alınmış ve üzerlerine 1 µL, 100 µM deoksiribonükleotit trifosfat (dNTP), 2 µL enzim tepkime tamponu (5x), 1 µL RNaz inhibitörü ve 2 µL (20 ünite) ters transkriptaz enzimi (M-MuLV RT) ilave edilmiş ve son hacim RNazlardan arındırılmış dH₂O ile 10 µL’ye tamamlanmıştır. Çözelti iyice karıştırıldıktan sonra, tüpler oda sıcaklığında 10 dakika ve daha sonra 55 °C’de bir saat bekletilmiştir. Tepkime, tüpler 85 °C’de beş dakika bekletilerek sonlandırılmıştır.

3.2.6 Polimeraz zincir tepkimesi (PZT)

Tüm PZT deneylerinde DNA polimeraz enzimi olarak MyTaq marka DNA Polimeraz kiti (Bioline; Cat No: BIO-21105) kullanılmıştır. PZT için kitin kullanım talimatları

izlenmiştir. Standart MyTaq PZT deneylerinin tepkime hazırlığı ve ısı döngü koşulları çizelge 3.2’de özetlenmiştir.

Çizelge 3.2 PZT deneylerinin tepkime hazırlığı ve ısı döngü koşulları

PZT Tepkime Hazırlığı		Isıl Döngü Koşulları			
PZT Tepkime Bileşenleri	Miktarlar	Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü
5x MyTaq Tepkime Tamponu	10 µL	Başlangıç Denatürasyonu	95 °C	1 dakika	1
DNA Kalıbı*	Gerektiği kadar	Denatürasyon	95 °C	15 saniye	25-35
Oligonükleotit Primerler herbiri 10-20µM	1 µL	Bağlanma	Oligonükleotit primere göre değiştirilmiştir.	15 saniye	
MyTaq DNA Polimeraz	1 µL	Uzama	72 °C	Kilobaz başına 10 saniye	
Su (ddH ₂ O)	Son hacmi 50 µL’ye tamamlayacak kadar	Son Uzama	72 °C	7 dakika	

*Kloni PZT çalışmalarında, kalıp olarak, 0,1-10 µL’lik hacimler için kullanılan steril beyaz pipet ucu ile bakteri kolonisine dokunularak alınmış olan bakteri örneği kullanılmıştır.

PZT sonucunda elde edilen amplikon, standart agaroz jel elektroforezi ile doğrulandıktan sonra, GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit (Thermo Scientific; Cat No: K0831) ile yıkanmış ve daha sonra amplikonun miktarı ve saflık kalitesi spektrofotometrede (NanoDrop 2000 Thermo Fisher Scientific) 260nm, 280nm ve 230nm dalga boylarında ölçüm yapılarak belirlenmiş ve klonlama çalışmalarında kullanılmıştır.

3.2.7 Agaroz jel elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi, standart olarak Sambrook ve diğerlerinin tanımladığı şekilde yapılmıştır (Sambrook vd. 1989). Agaroz jel elektroforezinde, jel ve tank tamponu olarak Tris-asetik asit etilendiamintetraasetik asit (EDTA) (TAE) tamponu (40 mM Tris-asetat/1 mM EDTA; pH: 8,3) kullanılmıştır. Jeldeki agaroz yüzdesi, elektroforetik olarak ayrılacak DNA parçalarının uzunluğuna göre ayarlanmıştır. Elektroforez işleminde voltaj, standart olarak elektrotlar arası mesafe (cm) başına 5 volt olarak ayarlanmıştır. DNA'ların görüntülenmesi için standart olarak UV transillüminatör (BioRad) ve interkalatör etidyum bromür boyası (Sigma) (10µg/100mL) kullanılmıştır. DNA parçalarının büyüklüklerinin belirlenebilmesinde, DNA belirteci olarak GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific; Cat No: SM1333) kullanılmıştır.

3.2.8 Bakterilerden plazmit izolasyonu

E. coli DH5-Alpha suşuna aktarılan plazmitlerin izolasyonu için, Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep (Cat No: K0502) ve Maxiprep (Cat No: K0491) plazmit izolasyon Kitleri kullanılmıştır. Plazmit izolasyon deneylerinde kitlerin kullanım yönergeleri takip edilmiştir.

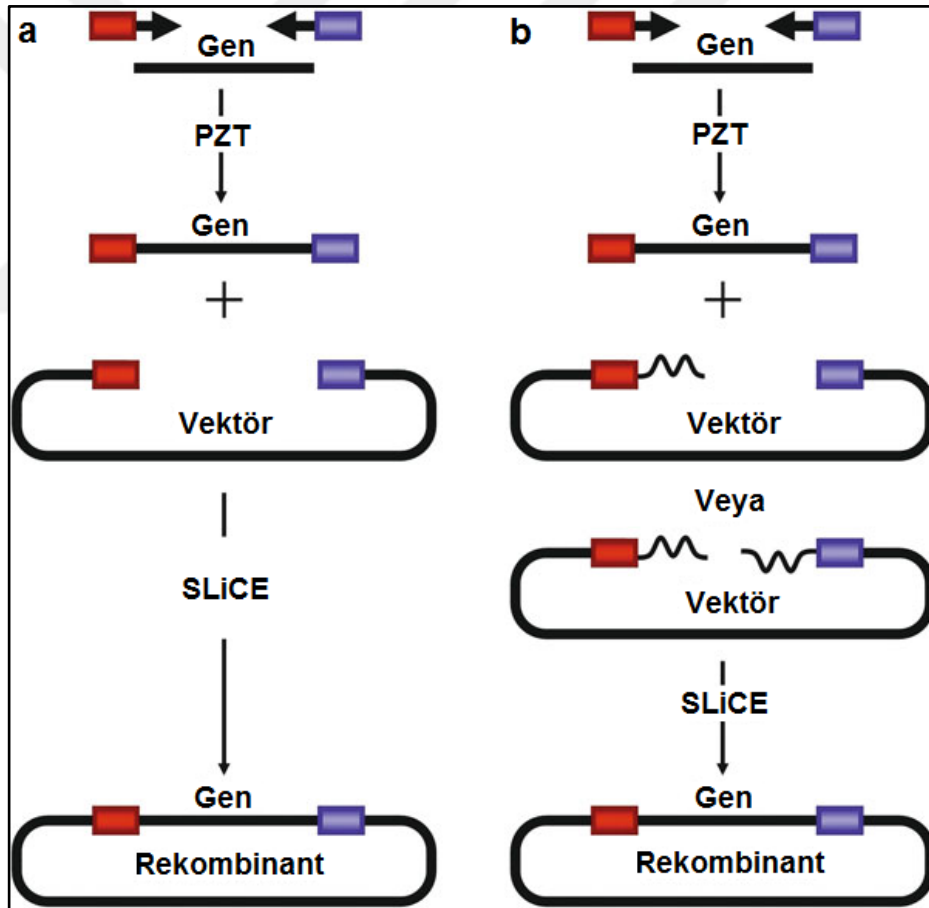
3.2.9 Restriksiyon enzimi ile plazmit vektörlerin kesilmesi ve kesim ürünlerinin ve PZT ampikonlarının agaroz jelden geri alınması

Plazmit vektörlerin kesilme deneylerinde, HindIII, BamHI, NotI, AlwNI, NheI ve NdeI restriksiyon enzimleri (New England Biolab; sırasıyla katalog numaraları: R0104S, R0136S, R0189S, R0514S, R0131S ve R0111S) kullanılmıştır. Restriksiyon enzimleri ile yapılan kesim tepkimesi için enzimlerin kullanım yönergeleri takip edilmiştir. Kesim ürünleri, agaroz jel elektroforezi ile doğrulandıktan sonra, klonlamada kullanılacak vektör parçaları, GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit (Thermo Scientific; Cat No: K0831) ile jelden geri alınmıştır. Gerekli görüldüğü durumlarda, PZT ürünleri de aynı yöntem ile jelden geri alınmıştır. Jelden geri alınan ve klonlama

çalışmalarında kullanılacak olan vektör parçalarının miktarı ve saflık kalitesi spektrofotometrede (NanoDrop 2000 Thermo Fisher Scientific) 260nm, 280nm ve 230nm dalga boylarında ölçüm yapılarak belirlenmiştir.

3.2.10 SLiCE klonlama

Bütün klonlama deneylerinde, homolog rekombinasyon esasına göre çalışan, SLiCE (Seamless Ligation Cloning Extract – Dikişsiz Ligasyon Klonlama Özü) klonlama yöntemi kullanılmıştır (Zhang vd. 2014). Tek DNA parçasının klonlanması için SLiCE klonlama yönteminin çalışma prensibi şekil 3.4’te özetlenmiştir.



Şekil 3.4 Tek DNA parçasının SLiCE ile klonlanması (Zhang vd. 2014)

a. Komşu heterolog diziler olmadan yapılan SLiCE klonlama, **b.** Komşu heterolog diziler varken yapılan SLiCE klonlama

SLiCE özütü, Zhang ve diğerlerinin açıkladığı şekilde, *E. coli* PYY suşu kullanılarak hazırlanmıştır (Zhang vd. 2014). SLiCE özütünün hazırlanmasında izlenen yönerge maddeler halinde aşağıda verilmiştir.

SLiCE Özütünün Hazırlanması:

1. *E. coli* PYY suşunun gliserol stoğundan veya taze kültüründen 10 µg/mL streptomisin ve 12,5 µg/mL kloramfenikol içeren steril LB agar besiyerine çizgi ekim yapılmış ve 37 °C’de bir gece inkübe edilmiştir.
2. Ertesi gün, kültürden tek koloni alınmış ve 50 mL’lik santrifüj tüpü içerisinde bulunan, 25 mL, 10 µg/mL streptomisin içeren, steril 2XYT sıvı besiyerine (% 1,6 tripton, % 1 maya özütü, % 0,5 NaCl, pH: 7,2) ekim yapılmıştır. Kültür daha sonra 37 °C’de 330 devir/dakika (rpm) çalkalamalı koşulda bir gece inkübe edilmiştir.
3. Ertesi gün, kültürün optik yoğunluğu (OD), spektrofotometrede, 600nm dalga boyunda ölçülmüş ve yöntemin ikinci aşamasında belirtilen besiyeri ile seyreltme yapılarak kültürün OD 600nm değeri 0,03’e ayarlanmıştır.
4. Daha sonra kültür, OD 600nm değeri, 5,0-5,5 olana kadar, 37 °C’de 330 rpm çalkalamalı koşulda inkübe edilmiştir.
5. Bu aşamadan sonra kültüre, % 0,2 oranında L(+) arabinoz (Sigma) ilave edilmiş ve λ profaj kırmızı protein ifadesinin uyarılması için, 37 °C’de 330 rpm çalkalamalı koşulda 2 saat inkübe edilmiştir.
6. Kültür daha sonra, 50 mL’lik iki ayrı santrifüj tüpüne bölünmüş ve 4 °C’de, 5000 rpm’de 20 dakika santrifüj edilerek bakteri hücreleri çöktürülmüştür.
7. Bakteri peletleri, iki kere distile edilmiş 50 mL su ile (ddH₂O) bir defa yıkanmış ve aynı koşullarda tekrar santrifüjlenmiştir.
8. Bakteri peletlerinin yaş ağırlığı ölçülmüş ve yaklaşık 0,23 g/mL yaş ağırlıktaki peletler, 300µL CelLytic™ B Cell Parçalanma (Lizis) çözeltisi (Sigma) ile yeniden süspanse edilmiştir.
9. Yeniden süspanse olmuş hücreler, az protein bağlama özelliğine sahip 1,5 mL’lik santrifüj tüplerine (Eppendorf) alınmış ve lizisin meydana gelmesi için, oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir.

10. Hücre lizatları daha sonra, çözünmeyen materyallerin çöktürülmesi için, 25000 rpm’de iki dakika santrifüj edilmiştir ve oluşan üst faz (süpernatant) yeni bir az protein bağlama özelliğine sahip 1,5 mL’lik santrifüj tüplerine (Eppendorf) alınmıştır.

11. Hücre özütleri daha sonra, eşit hacimde % 100 gliserol ile karıştırılmış ve 10 µL’lik miktarlara bölünerek az protein bağlama özelliğine sahip 0,5 mL’lik santrifüj tüplerine (Eppendorf) alınmış ve üzerlerine “PPY SLiCE Özütü” yazılmıştır.

12. PPY SLiCE Özütleri, uzun süreli korunmaları için –80 °C’de, iki ay kadar kısa süreli korunmaları için ise –20 °C’de saklanmıştır. PPY SLiCE Özütleri, 10 defaya kadar, belirgin bir aktivite kaybına uğramadan dondurulup çözölebilmıştır.

SLiCE özütleri ile yapılan klonlama tepkimesinin standart koşulları aşağıda çizelge 3.3’te verilmiştir. SLiCE tepkimesinde vektör kopya sayısının girdi (insert) kopya sayısına oranı, 1/5 olarak ayarlanmıştır.

Çizelge 3.3 SLiCE klonlama tepkimesinin standart koşulları

SLiCE Tepkime Hazırlığı		Sıcaklık Koşulları
SLiCE Bileşenleri	Miktarlar	37 °C’de 30 dakika bekletme
Vektör	X kopya	
Girdi (Insert)	Y kopya	
T4 Ligaz Tamponu (10x)	1 µL	
SLiCE	1 µL	
Su (ddH ₂ O)	Son hacmi 10 µL’ye tamamlayacak kadar	

* X/Y = 1/5

3.2.11 5' uçlarından fosfatlanmış küt uçlu lineer DNA'nın T4 DNA ligaz enzimi ile halkasal hale getirilmesi

5' uçlarından fosfatlanmış olan küt uçlu lineer DNA molekülünün, ligasyon ile halkasal hale getirilmesinde, T4 DNA ligaz enzimi (Fermentas; Cat No: EL0014) kullanılmıştır. Küt uç ligasyonu için 50 ng kadar, saf haldeki 5' uçlarından fosfatlanmış lineer amplikon, 200 µL'lik PZT tüpünde, 2 µL T4 DNA ligaz tamponu (10X) ve 1 µL T4 DNA ligaz enzimi (5 Unite/µL) (Fermentas) ile karıştırılmış ve son tepkime hacmi, DNaz'dan arındırılmış steril dH₂O ile 20 µL'ye tamamlanarak tepkime çözeltisi, 22 °C'de 1 saat bekletilmiştir.

3.2.12 Bakterilerin plazmit ile transformasyonu için alıcı (kompetent) hale getirilmesi ve alıcı bakterilere plazmit aktarımı

E. coli DH5-Alpha suşunun kompetent hale getirilmesi ve transformasyon aşaması Chung ve arkadaşlarının geliştirdikleri metoda göre yapılmıştır (Chung ve ark. 1989). Bu yöntemde kullanılan transformasyon ve saklama çözeltisi (TSS) şu şekilde hazırlanmış ve saklanmıştır: Steril LB sıvı besiyeri içerisine, son konsantrasyonları sırasıyla % 10 ve % 5 olacak şekilde PEG 6000 (Polietilen Glikol) ve dimetilsülfoksit (DMSO) ile son konsantrasyonları 50'şer mM olacak şekilde MgCl₂ ve MgSO₄ ilave edilmiş ve çözelti, 0,22 µL por çaplı membran filterden geçirilerek steril edilip -20 °C'de saklanmıştır.

E. coli DH5-Alpha suşunun kompetent hale getirilmesinde ve plazmit ile transformasyonunda aşağıdaki yönerge izlenmiştir:

- 1- *E. coli* DH5-Alpha aktif kültründen steril LB besiyerine ekim yapılmış ve 30 °C'de, OD₆₀₀ değeri 0,3 – 0,5 olana kadar inkübe edilmiştir.
- 2- Kültür daha sonra, 1000 rpm'de 4 °C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
- 3- Bakteri pelleti, kültür hacminin 1/10'u kadar TSS çözeltisinde yeniden süspansiyon edilmiş ve 30 dakika boyunca buz üzerinde bekletilerek kompetent hale gelmesi sağlanmıştır.

- 4- 1-5µL plazmit, 1,5 mL'lik steril santrifüj tüplerine koyulmuş ve üzerlerine 100 µL kompetent bakteri ilave edilmiş ve 30 ila 60 dakika buz üzerinde bekletilmiştir.
- 5- Tüpler, daha sonra, 42 °C'deki su banyosunda, 90 saniye (30-90 saniye) kadar bekletilerek, bakterilere ısı şoku uygulaması yapılmıştır.
- 6- Isı şoku uygulamasından sonra tüpler tekrar buz üzerine alınmış ve 1-2 dakika kadar bekletilmiştir.
- 7- Bu aşamadan sonra, bakterilerin üzerine 900 µL, % 1 glikoz içeren, LB besiyeri ilave edilmiş ve hücreler 37 °C'de 45-60 dakika kadar inkübe edilmiştir.
- 8- İnkübasyondan sonra, 200-300 µL kadar bakteri süspansiyonu, 100µg/mL Kanamisin (Sigma) içeren LB agar besiyerine yayma ekim yöntemi ile ekilmiş ve 37 °C'de 16 saat inkübe edilmiştir.

3.2.13 DNA dizi analizi

Hazırlanan plazmit vektörlerin DNA dizileri, hem Sanger dideoksi zincir sonlandırma yöntemi ile hem de ion torrent platformunu kullanan yeni nesil DNA dizileme yöntemi ile belirlenmiştir (Sanger vd. 1977, Rothberg vd. 2011). Yeni nesil DNA dizilemesinden BAM dosyası olarak elde edilen ham dizi verileri, Integrative Genomics Viewer (IGV) 2.3 yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. DNA dizi analizleri, BM Labosis (Ankara/Türkiye) firmasına, hizmet alımı ile yaptırılmıştır.

3.2.14 Filogenetik analizler

KKKAV KAST2012 izolatının Gc ORF'sinin filogenetik analizi, kodladığı amino asit dizisi esas alınarak, MEGA7 yazılımı kullanılarak yapılmıştır (Kumar vd. 2016). KKKAV'nin, Türkiye'yi de içeren çeşitli coğrafik bölgelerdeki farklı suş ve izolatlarına ait olan 13 temsili olgun Gc amino asit dizisi, NCBI GenBank veri bankasından elde edilmiş ve filogenetik analizlerde kullanılmıştır. Filogenetik ağaç, Neighbour Joining algoritması ve 500 önyükleme yinelemesi (boothstrap replicate) kullanılarak oluşturulmuştur.

3.2.15 BHK-21 hücrelerinin plazmit vektörlerle geçici ve kararlı olarak transfeksiyonu

Tez çalışmasındaki tüm geçici ve kararlı transfeksiyon deneylerinde katyonik lipozom özelliğine sahip olan, Lipofectamine 3000 (Thermo Scientific; Cat No: L3000001) transfeksiyon ajanı kullanılmıştır. Geçici transfeksiyon deneyleri için 250 ng plazmit, 1,5 mL'lik santrifüj tüpünde bulunan 125 µL serumsuz (FBS) ve antibiyotiksiz DMEM besiyerine ilave edilmiş ve daha sonra, bu plazmit çözeltisinin üzerine, 4 µL Lipofectamine 3000 transfeksiyon ajanı içeren 125 µL serumsuz (FBS) ve antibiyotiksiz DMEM besiyeri ilave edilmiştir. 1,5 mL santrifüj tüpü içerisinde bulunan plazmit-transfeksiyon ajanı karışımı, vorteks yardımı ile birkaç saniye karıştırılmış ve 15 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra, plazmit-transfeksiyon ajanı karışımı, bir gece önceden hazırlanmış olan, 6 kuyulu hücre kültür tabağının bir kuyusunun yüzeyini % 70-80 oranında kaplamış olan, 1,5 mL serumsuz (FBS) ve antibiyotiksiz DMEM besiyerinde bulunan BHK-21 hücrelerinin üzerine ilave edilmiştir. Hücreler daha sonra, 37 °C'de, % 5 CO₂ içeren, nemlendirilmiş etüvde altı saat inkübe edilmiş ve sonrasında hücrelerin besiyeri, % 10 serum (FBS) ve % 1 penisillin/streptomisin içeren DMEM besiyeri ile değiştirilerek tekrar aynı inkübasyon koşullarında inkübe edilmiştir. Geçici olarak transfekte olan hücreler, transfeksiyonun 48. saatinden sonra ileri analizler için kullanılmıştır. BHK-21 hücrelerinin plazmit ile kararlı olarak transfeksiyonunda, transfeksiyondan önce plazmit vektör, hücre genomuna doğru bir şekilde girmesi adına, AlwNI restriksiyon enzimi ile (New England Biolab) lineer hale getirilmiştir. Lineer plazmit ile BHK-21 hücrelerinin kararlı olarak transfeksiyonu, geçici transfeksiyon deneylerinde olduğu gibi yapılmıştır. Ancak, transfeksiyonun 48. saatinden sonra, hücreler, 6 kuyulu hücre kültür tabağından tripsin uygulaması ile alınarak T75 hücre kültür tabağına aktarılmış ve kararlı olarak transfekte olmuş hücrelerin seçilmesi için, hücreler, 800 µg/mL genetisin (G418) (Gibco) antibiyotiği içeren aynı besiyerinde üç hafta boyunca kültüre alınmıştır.

3.2.16 Floresan mikroskopisi

Yeşil floresan protein ile füzyon halinde bulunan Gc'nin geçici olarak transfekte olmuş BHK-21 hücrelerindeki *in vitro* ifadesi, standart fluoresan mikroskopunda (Zeiss Axio Vert.A1 Germany), uyarım kaynağı olarak mavi ışık (488 nm) kullanılarak gösterilmiştir.

3.2.17 Western blot

Üç haftalık genetisin ile seçim işleminden sonra, plazmit ile kararlı olarak transfekte olmuş BHK-21 hücreleri, western blot deneyinde kullanılması için Pro-Prep protein ekstraksiyon çözeltisi (İNtRON Biotechnology; Cat No: 17081) ile lize edilerek protein örnekleri izole edilmiştir. İzole edilen protein örneklerinin miktarları, Bradford protein tayini yöntemine göre yapılmıştır (Bradford 1976). İzole edilen proteinler, daha sonra, 2X laemmli örnek tamponu ile bire bir oranda karıştırılmış ve 95 °C'de 5 dakika ısıtılmıştır (Laemmli 1970). Protein örnekleri, daha sonra, standart sodyum dodesil sülfat – poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Precast hazır jeller (Bio-Rad; Cat No: 4568123) kullanılarak ayrılmış ve Trans-Blot Turbo Mini PVDF membranlarına (Bio-Rad; 1704156) aktarılmıştır (blotlanmıştır) (Sambrook vd. 1989). Membranlar, daha sonra, % 5 oranında sığır serum albümini (Sigma) ilave edilmiş, % 0,1 oranında Tween 20 (Bio-Rad) içeren, Tris ile tamponlanmış tuzlu su çözeltisinde (TBST) (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, % 0,1 Tween 20, pH: 7,5) bloklanmıştır. Bloklanmış membranlar, ya EGFP için, TBST içerisinde 1/1000 oranında çözölmüş GFP tag fare monoklonal antikoru (Klon GF28R) ile (Invitrogen; Cat No: MA5-15256) yada Histidin etiketi için, yine aynı oranda aynı tamponda çözölmüş anti histidin etiketi antikoru (Bio-Rad; Cat No: 6200203) ile 4 °C'de bir gece çalkalamalı koşulda bekletilerek problemlenmiştir. Membranlar, daha sonra, TBST ile beş defa, onar dakika çalkalamalı koşulda yıkanmış ve TBST içerisinde 1/9000 oranında çözölmüş, turp preoksidazı ile konjuge halde anti fare IgG ikinci antikoru (Advansta; Cat No: R-05071-500) ile oda sıcaklığında bir saat çalkalamalı koşulda bekletilerek problemlenmiştir. Membranlar, daha sonra, ilave olarak TBST ile beş defa, onar dakika çalkalamalı koşulda yıkanmış ve arttırılmış kemilüminesan (ECL)

yöntemi kullanılarak, ChemiDo XRS+ membran görüntüleme sistemi (Bio-Rad) ile görüntülenmiştir. Western blot deneyinde, protein belirteci olarak PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific; Cat No: S 26619) kullanılmıştır.

3.2.18 BHK-21 hücrelerinden Trizol ajanı ile genomik DNA ve total RNA izolasyonu ve Ters Transkripsiyon (RT) PZT

Gc'nin *in vitro* olarak transkripsiyonel düzeydeki ifadesini göstermek için, pEGFP-Gc vektörü ile kararlı olarak transfekte olmuş BHK-21 hücrelerinden Trizol ajanı (Thermo Scientific Cat No: 15596026) kullanılarak genomik DNA ve total RNA izolasyonu yapılmış (Rio vd. 2010). İzole edilen RNA'lar, daha sonra, DNaz I (New England Biolab) ile muamele edilmiştir. DNazI muamelesini takiben, saflaştırılması için, RNA'lar, sodyum asetat/etanol yöntemi ile çöktürülmüş ve elde edilen RNA peletleri, % 70'lik etanol çözeltisi ile yıkandıktan sonra RNaz ve DNaz içermeyen steril saf su ile çözülmüştür. İzole edilen genomik DNA'nın saflaştırılmasında da aynı yöntem izlenmiştir. İzole edilen genomik DNA ve total RNA'nın miktarı ve saflık kalitesi spektrofotometrede (NanoDrop 2000 Thermo Fisher Scientific) 260nm, 280nm ve 230nm dalga boylarında ölçüm yapılarak belirlenmiştir. Saflaştırılan total RNA'nın mRNA içeriği, Thermo Scientific Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit kullanılarak oligo(dt) 18 primerlerle yöntem 3.2.5'de belirtildiği üzere cDNA'ya dönüştürülmüştür. Gc transkriplerinin cDNA'ları, yöntem 3.2.6'da belirtildiği gibi, dizi bilgileri çizelge 3.1'de dizi bilgisi verilen, Gc ORF'sinin aşağı bölgesine bağlanan, Gc Seq4 ileri ve Gc SLiCE-R2 geri oligonükleotit primerleri kullanılarak, PZT ile çoğaltılmıştır. pEGFP-Gc vektörü ile kararlı olarak transfekte olmuş BHK-21 hücrelerinin genomuna dahil olmuş Gc kodlayan gen, genomik DNA örnekleri ile yöntem 3.2.6'da belirtildiği gibi, dizi bilgileri çizelge 3.1'de dizi bilgisi verilen CMV 3'-F / Gc SLiCE-R2, Gc SLiCE-F2 / Gc SLiCE-R2 ve Gc Seq4 / Gc SLiCE-R2 primer çiftleri kullanılarak PZT ile çoğaltılmıştır.

3.2.19 Boş vektör hazırlanması

Fare immünizasyonu çalışmalarında, negatif kontrol olarak kullanılmak üzere, CMV promotorundan herhangi bir gen ifade etmeyen, boş vektör hazırlanmıştır. Bu amaç için pEGFP-C1 vektöründe bulunan CMV promotoru ve CMV enhanserinin bir kısmı, yöntem 3.2.9’da açıklandığı şekilde, NdeI ve NheI restriksiyon enzimleri (NEB) ile kesilmiştir. Vektör omurgası, daha sonra, yöntem 3.2.7’de açıklandığı gibi, agaroz jel elektroforezi yapılarak kesim ürününden (CMV promotor ve CMV enhanser dizileri) ayrılmış ve yöntem 3.2.9’da açıklandığı gibi jelden geri alınmıştır. Jelden geri alınan lineer vektör omurgası, yöntem 3.2.12’de açıklandığı gibi, alıcı hale getirilmiş *E. coli* DH5Alpha suşuna aktarılmış ve bu bakteri hücrelerinde, vektör omurgasının “alternatif uç birleştirme” mekanizması ile halkasal hale getirilmesi sağlanmıştır (Chayot vd. 2010). CMV negatif transformantlar, vektör omurgasında, CMV promotor ve enhanser bölgesinin yukarısına ve aşağısına bağlanan pUC Ori 3'-F ileri, F1 Ori 5'-R geri primerleri kullanılarak, yöntem 3.2.6’da açıklandığı gibi koloni PZT yapılarak belirlenmiştir. CMV negatif transformantların plazmitleri, yöntem 3.2.8’de açıklandığı gibi izole edilmiş ve fare aşılama çalışmalarında kullanılmıştır.

3.2.20 Plazmit DNA aşı vektörü ile BALB/c ırkı farelerin aşılınması ve farelerden serumların toplanması

Her biri iki BALB/c ırkı fareden oluşan deney ve kontrol grubundaki fareler, mediyal kalça kaslarından, 25 ölçülü şırınga iğnesi (BD) kullanılarak, 50 µL apirojenik fizyolojik tuz çözeltisinde çözülmüş, 100 µg pGc-VAC aşı vektörü ile veya boş vektör ile aşılınmıştır. Bütün fareler, ikişer hafta arayla üç defa aşılınmıştır. Her aşılama öncesinde, farelerin kuyruk toplar damarlarından 200 µL’lik PZT tüplerine, 100 µL kan alınmıştır. Toplanan kanlar, bir gece 4 °C’de bekletildikten sonra 2000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiş ve üst fazda kalan serumlar, ayrı bir tüpe alınarak üzerlerine eşit hacimde % 50’lik gliserol ilave edilmiş ve analizleri yapılana kadar -20 °C’de saklanmıştır.

3.2.21 Nötralizasyon deneyi

Üç ardışık pGc-VAC DNA aşısı alan farelerin serumlarındaki anti-KKKAV nötralize edici antikorların varlığı ve titreleri, mikronötralizasyon deneyi ile gösterilmiştir. Mikronötralizasyon deneyi için, serum örnekleri 56 °C’de 30 dakika bekletilerek inaktive edilmiştir. Serumların 1/32’den 1/532’ye kadar, iki kat seri dilüsyonları hazırlanmış ve aynı hacimde, enfeksiyon çokluk çarpanı (MOI) 5 olan, (yaklaşık $2,5 \times 10^5$ virion) KKKAV KAST2012 izolatının süspansiyonu ile karıştırılmış ve 37 °C’de bir saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, her tepkime karışımı, ikişer tekrarlar halinde, 96 kuyulu hücre kültür tabağının yüzeylerine tutunmuş olan, bir gece önceden hazırlanmış, 50000 Vero E6 hücrelerinin üzerine koyulmuş ve kültür tabakları, 37 °C’de, 5% CO₂ içeren, nemlendirilmiş etüvde, 1,5 saat inkübe edilmiştir. Tepkime karışımı, daha sonra, % 10, ısı ile inaktive edilmiş fetal sığır serumu (FBS) (Gibco) ve % 1 penisilin/streptomisin (Gibco) içeren, 200 µL taze DMEM besi yeri ile değiştirilmiş ve hücreler, bir hafta boyunca, yukarıda belirtilen aynı kültür koşullarında inkübe edilmiştir. bir haftalık inkübasyon sonunda, virüs kaynaklı sitopatik etkilerin (CPE) değerlendirilebilmesi için, hücreler, % 3,7’lik formaldehit ile tespit (fiks) edilmiş ve sonra basit ışık mikroskopunda (Olympus) fotoğraflanmıştır. Tespit edilen hücreler, daha sonra, % 20 etanol içerisinde bulunan, % 1’lik kristal viyole (Sigma) ile boyanarak çıplak gözle analiz edilmiş ve tekrar mikroskop altında fotoğraflanmıştır.

3.2.22 Antikor izotip analizi

pGc-VAC DNA aşısı veya boş vektör alan farelerin, her aşılama sonrasında alınan serumlarındaki total IgG antikor izotiplerinin göreceli nicelemesi (kantitasyonu) Pierce Rapid ELISA Mouse mAb İzotipleme kiti (Thermo Scientific; Cat No: 37503) kullanılarak yapılmıştır. Antikor izotip analizinde serumlar, 1/750 seyreltik olarak kullanılmıştır. Antikor izotiplemesinde, kitin kullanım talimatında belirtilen standart yönerge takip edilmiştir.

3.2.23 Aşılanmış farelerin serumlarında sitokin seviyelerinin belirlenmesi

Aşılanmış farelerdeki Th1 ve Th2 immün yanıtlarının değerlendirilmesi için, üç ardışık pGc-VAC DNA aşısı veya boş vektör alan farelerin serumlarındaki sitokin düzeyleri, LEGENDplex Mouse Th₁/Th₂ Panel (8-plex, Bead assay by flow cytometry) kiti (BioLegend; Cat No: 740029) kullanılarak belirlenmiştir (Sun vd. 2014). Tüm, boncuk tabanlı sitokin deneyleri, kitin kullanım talimatında belirtilen standart yönerge takip edilerek yapılmıştır. Sitokin analizlerinde akışlı hücre sayım (flow sitometre) cihazı olarak, Bioscience FacsCanto II (BD) kullanılmıştır. Boncuklarla konjuge halde olan sitokinlerin akışlı hücre sayımı analizlerinde, üretici firmanın standart yönergeleri takip edilmiştir. Sitokin ham verileri, LEGENDplex™ veri analiz yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.

3.2.24 İstatistik analizleri

Antikor izotipleme ve sitokin düzeyi belirleme deneylerinden elde edilen verilerin istatistik analizleri, sırasıyla, Tukey'in çoklu karşılaştırma yöntemini içeren tek yönlü ANOVA testi ve Mann Whitney U testi kullanılarak yapılmıştır. 0,05'ten küçük olan *p* değerleri, istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Tüm istatistik analizleri, SPSS sürüm 22.0 yazılımı kullanılarak yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

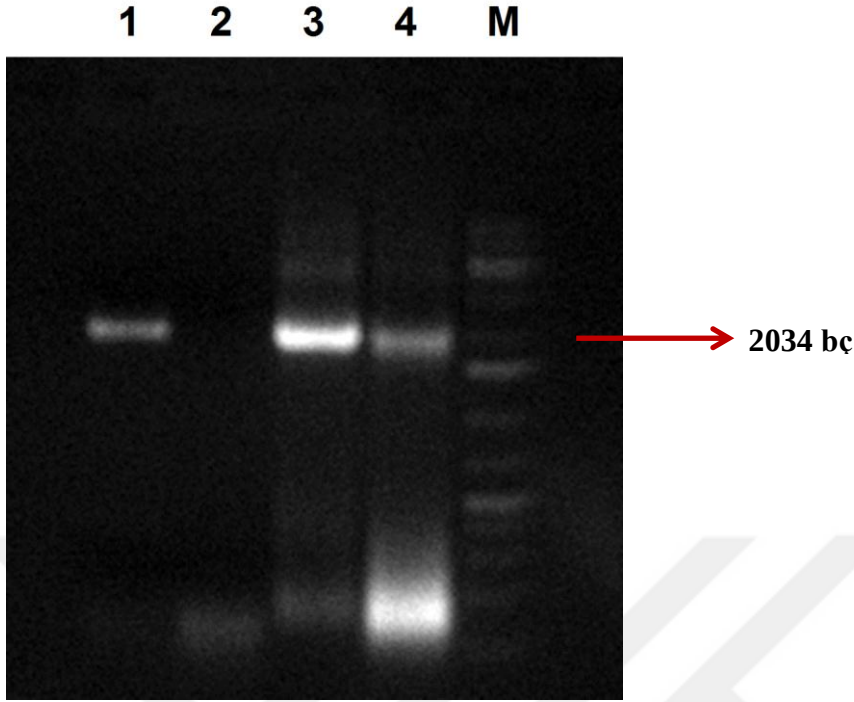
4.1 KKKAV KAST2012 izolatının olgun Gc glikoproteinini kodlayan dizisinin pVAX1 vektörüne klonlanması

SLiCE klonlama yöntemi ile, pVAX-1 vektöründeki HindIII tanıma dizisi kullanılarak KKKAV KAST2012 izolatının Gc açık okuma çerçevesi, vektörde sitomegalovirüs (CMV) promotorunun aşağısına klonlanmıştır.

4.1.1 KKKAV KAST2012 izolatının olgun Gc kodlayan dizisi için yapılan RT-PZT

KKKAV KAST2012 izolatının genomik RNA'sı izole edildikten sonra, yaklaşık, 100 ng RNA örneği, ters transkripsiyon ile cDNA'ya dönüştürülmüş ve M segmentinde bulunan, olgun Gc'yi kodlayan dizi, pVAX-1 vektörüne klonlanması üzere, Gc SLiCE F1 ileri ve Gc SLiCE R1 geri primerleri ile PZT yapılarak çoğaltılmıştır. PZT aşamasında, primerlerin bağlanma sıcaklığı olarak 55 °C kullanılmıştır.

Sonuç olarak, PZT'de, 10'ar pmol primer çifti kullanıldığında ve cDNA'dan yapılan birinci tur PZT sonucunda elde edilen ilk amplikon, tekrar kalıp olarak kullanılıp, aynı primer çifti ile ikinci tur PZT yapıldığında, klonlama için yeterli miktarda olgun Gc amplikonu elde edilebilmiştir. Bu amplikonun GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit (Thermo Scientific) kullanılarak yıkaması yapılmış ve spektrofotometre (NanoDrop 2000 Thermo Fisher Scientific) ile miktarı ve saflık kalitesi belirlenerek klonlama çalışmasında kullanılmıştır. PZT sonucunda elde edilen amplikonların, agaroz jel elektroforezi sonrasında alınmış jeldeki görüntüleri şekil 4.1'de gösterilmiştir.

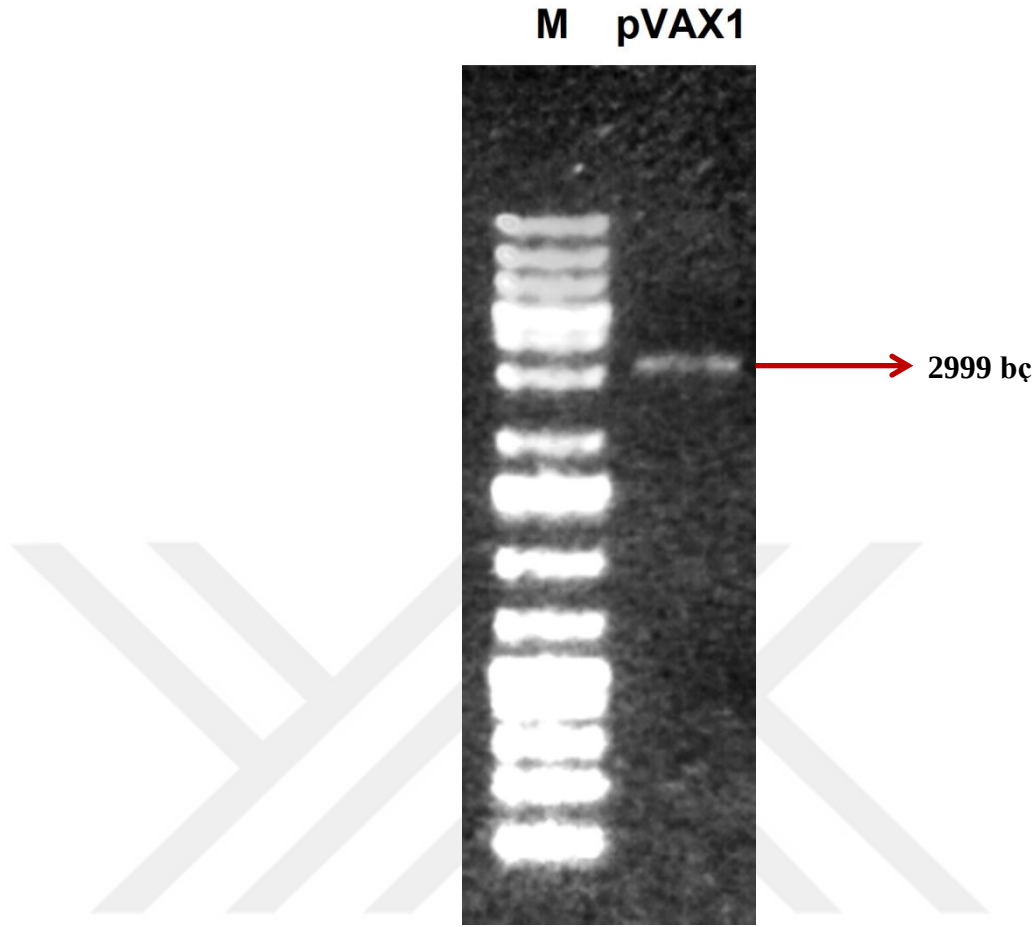


Şekil 4.1 KKKAV KAST2012 izolatının Gc kodlayan dizisi için yapılan RT-PZT sonucu

1: 10 pmol primer çifti ile cDNA'dan yapılan bir tur PZT'nin sonucu. **2:** 100 pmol primer çifti ile cDNA'dan yapılan bir tur PZT'nin sonucu. **3:** 10 pmol primer çifti ile cDNA'dan yapılan iki tur PZT'nin sonucu. **4:** 100 pmol primer çifti ile cDNA'dan yapılan iki tur PZT'nin sonucu. **M:** belirteç DNA

4.1.2 pVAX1 vektörünün HindIII restriksiyon enzimi ile lineer hale getirilmesi

Klonlama için pVAX1 vektörü HindIII restriksiyon enzimi ile lineer hale getirilmiştir. Kesim sonrasında Lineer vektör, GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit (Thermo Scientific) kullanılarak yıkanmış ve sonrasında 20 ünite Taq DNA Polimeraz (MyTaq Bioline) kullanılarak, 72 °C'de 10 dakika bekletilmiş ve böylece kesim sonucu meydana gelen yapışkan uçlar kapatılmıştır. Vektörde küt uçlar oluşturulduktan sonra, vektör tekrar yıkanmıştır. Klonlamadan önce, vektörün spektrofotometrede (NanoDrop 2000 Thermo Fisher Scientific) miktarı ve saflık kalitesi belirlenmiştir. Lineer haldeki pVAX1 vektörünün agaroz jel elektroforezi sonrası alınmış jel görüntüsü şekil 4.2'de gösterilmiştir.



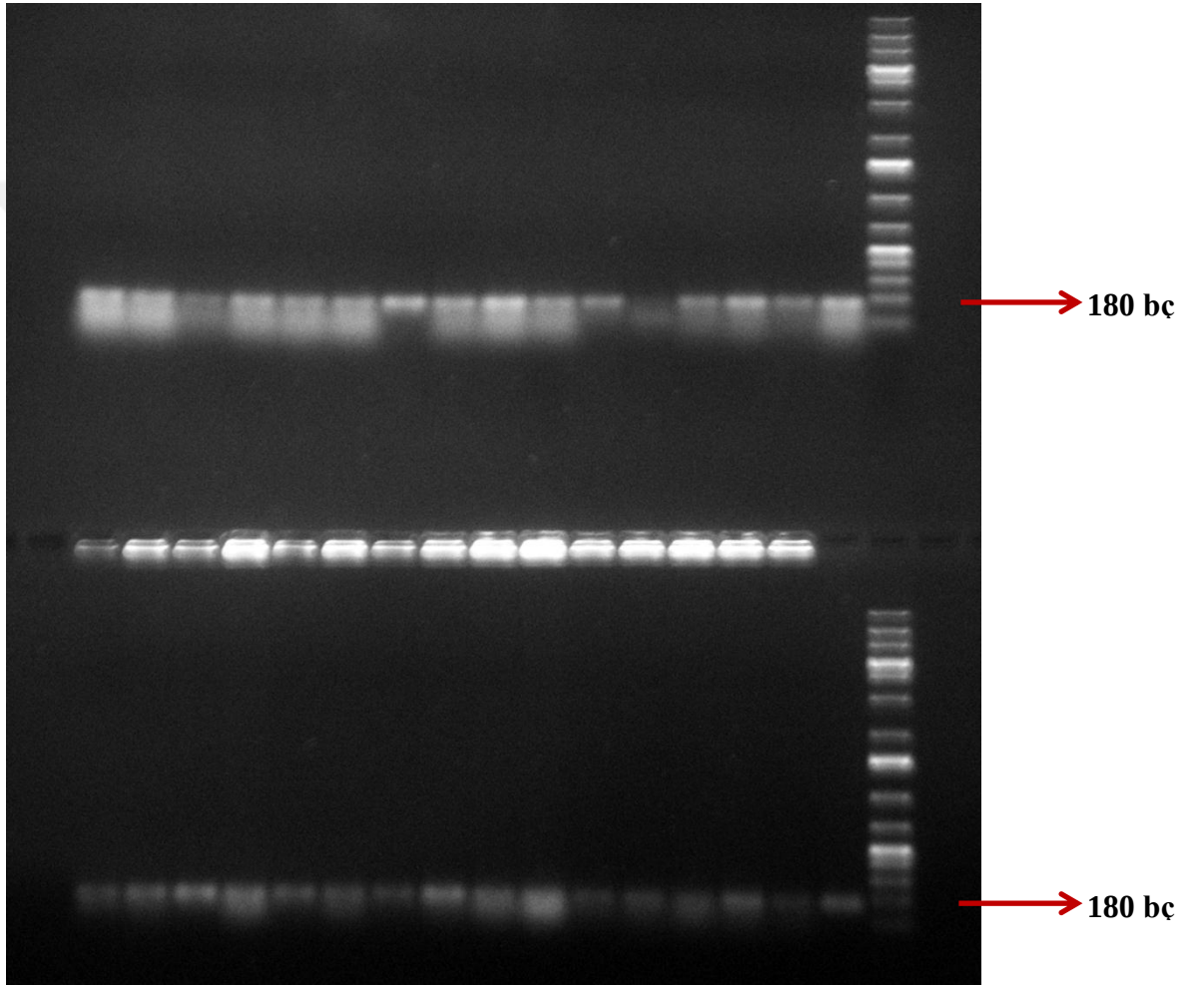
Şekil 4.2 HindIII restriksiyon enzimi ile lineer hale getirilmiş pVAX1 vektörünün agaroz jeldeki görüntüsü

M: belirteç DNA

4.1.3 KKKAV KAST2012 izolatının Gc kodlayan dizisinin, HindIII restriksiyon enzimi ile lineer hale getirilmiş olan pVAX1 plazmit vektörüne SLiCE klonlama yöntemi ile klonlanması

Vektör (pVAX1) ve girdi (insert) (Gc kodlayan dizi) hazırlandıktan sonra, yöntem 3.2.10'da açıklandığı gibi, SLiCE tepkimesi yapılmıştır. Daha sonra, SLiCE tepkime ürünü, yöntem 3.2.12'de açıklandığı gibi alıcı (kompetent) hale getirilmiş olan *E. coli* DH5Alpha suşuna aktarılmıştır. Transformasyondan sonra bakteriler, 100 µg/mL Kanamisin içeren LB Agar besiyerlerine yayma ekim ile ekilmiş ve 37 °C'de 16 saat inkübe edilmiştir. Transformasyon sonrası, petri kaplarında oluşan 32 koloni (transformant) ile KKKAV Gc açık okuma çerçevesinin 180 bç'lik bir bölgesini hedef

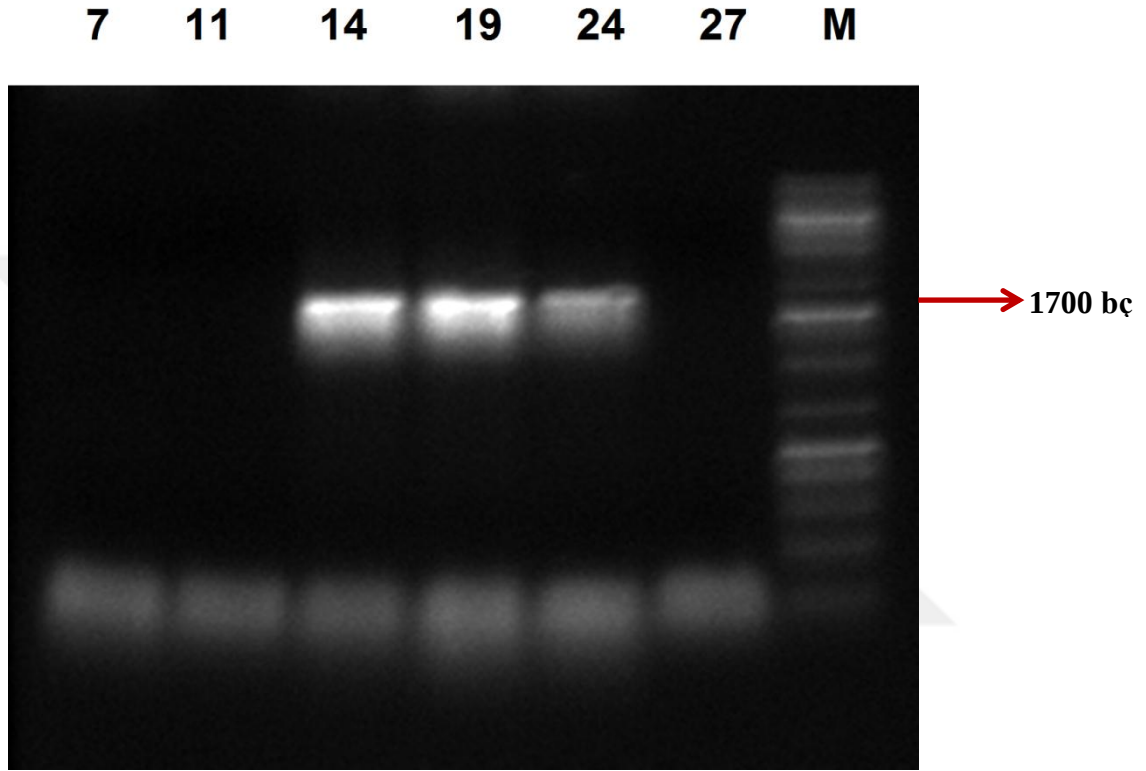
alan Gc2-F ileri ve Gc1-R geri primerleri kullanılarak 3.2.6’da açıklandığı gibi koloni PZT yapılmıştır. PZT sonrasında ampikonlar, agaroz jel elektroforezi ile analiz edilmiş ve taranan 32 transformantın tamamında da 180 bp uzunluğundaki özgün ampikonun varlığı gösterilmiştir. Gc2-F ileri ve Gc1-R geri primerleri kullanılarak 32 koloni ile yapılan PZT sonrasında elde edilen ampikonların agaroz jeldeki görüntüleri şekil 4.3’te verilmiştir.



Şekil 4.3 Gc2-F ileri ve Gc1-R geri primerleri kullanılarak 32 koloni ile yapılan PZT sonrasında elde edilen ampikonların agaroz jeldeki görüntüleri

Gc2-F ve Gc1-R primerleri ile yapılan koloni PZT sonucunda belirlenen girdi pozitif transformantlardan rastgele seçilen altı tanesi ile KKKAV Gc açık okuma çerçevesinin yaklaşık 1700 bp’lik kısmını hedef alan Gc2-F ileri ve Gc 3’-R geri primerleri

kullanılarak ikinci bir koloni PZT yapılmıştır. Bu PZT sonucunda, test edilen altı girdi pozitif klonun 3 tanesi (14, 19 ve 24), gerçek girdi pozitif olarak bulunmuştur. Bu PZT sonrasında elde edilen ampliconlarla yapılan agaroz jel elektroforezinin sonucu şekil 4.4'te verilmiştir.

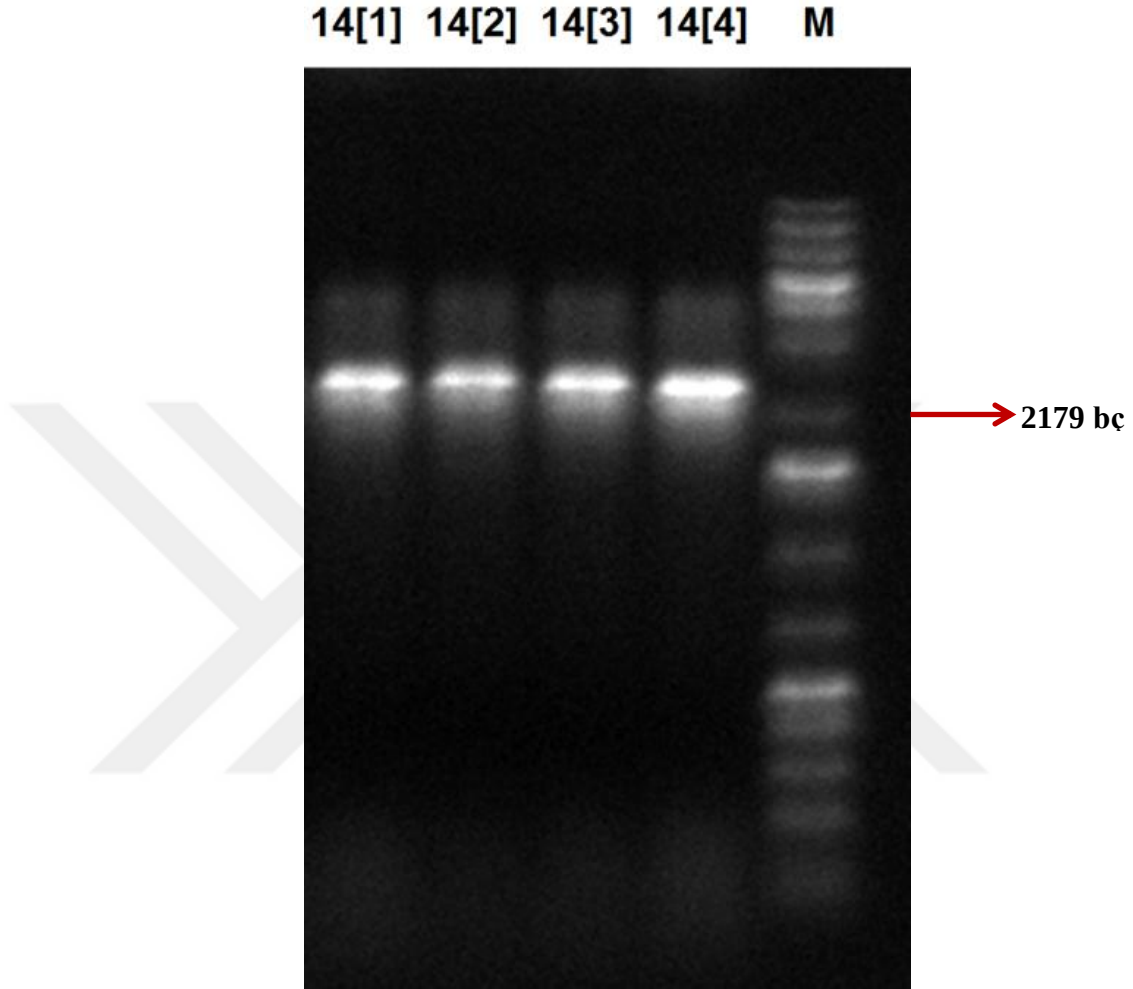


Şekil 4.4 Gc2-F ve Gc 3'-R primerleri kullanılarak, klon 7, 11, 14, 19, 24 ve 27 ile yapılan koloni PZT sonrasında elde edilen ampliconların agaroz jeldeki görüntüleri

M: belirteç DNA

Gc2 ve Gc-R primerleri ile girdi pozitif olarak bulunan klon 14, sonikasyon kullanılarak tek hücre süspansiyonu haline getirilmiş ve bu süspansiyonlardan elde edilen dört tane koloni (14[1], 14[2], 14[3], 14[4]) ile pVAX1 plazmit omurgasına bağlanan (girdinin yukarısına ve aşağısına bağlanan) ve yaklaşık 2200 bç'lik bir bölgeyi çoğaltan, CMV 3'-F ileri ve pVAX1-R geri primer çifti kullanılarak, 3. koloni PZT yapılmıştır. Bu PZT sonucunda test edilen dört girdi pozitif klonun tamamının girdi pozitif olduğu ve

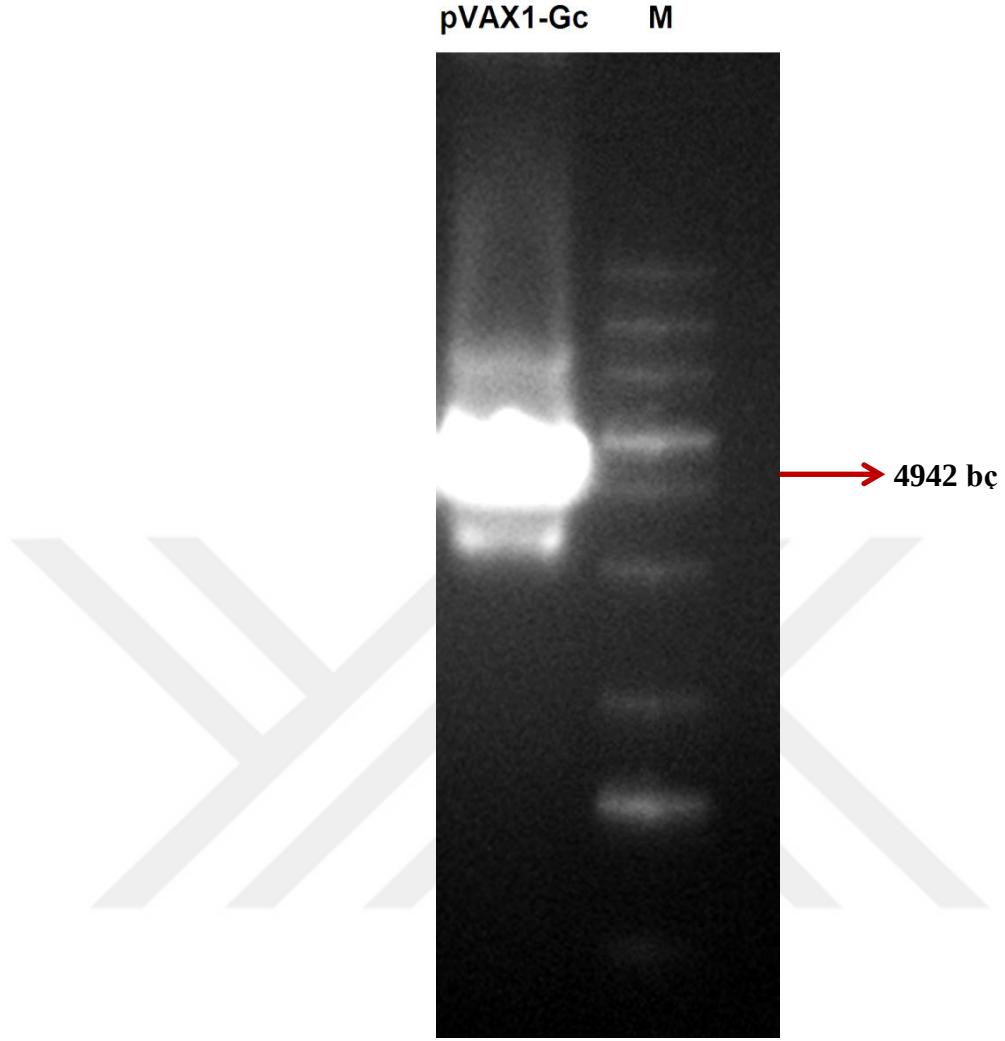
vektörde doğru lokasyona yerleştği doğrulanmıştır. Bu PZT sonrasında elde edilen amplikonlarla yapılan agaroz jel elektroforezinin sonucu şekil 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.5 CMV 3'-F ileri ve pVAX1-R geri primer çifti kullanılarak girdi pozitif klon 14'ten elde edilen dört tane koloni (14[1], 14[2], 14[3] ve 14[4]) ile yapılan koloni PZT sonrasında elde edilen amplikonların agaroz jeldeki görüntüleri

M: belirteç DNA

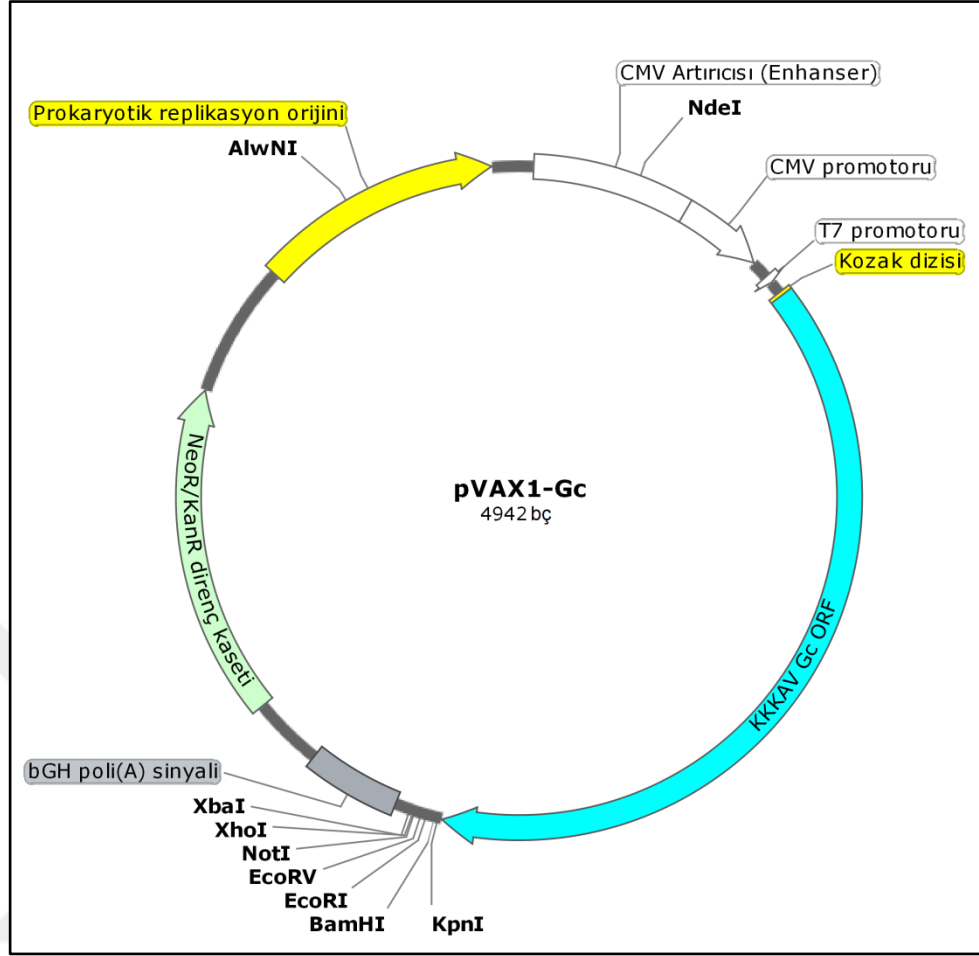
Elde edilen dört tane girdi pozitif klondan klon 14[4]'ün plazmiti yöntem 3.2.8'de açıklandığı gibi izole edilmiştir. İzole edilen plazmit, NotI restriksiyon enzimi ile yöntem 3.2.9'da açıklandığı üzere lineer hale getirilmiş ve agaroz jel elektroforezi ile boyutu tayin edilmiştir. Beklenildiği üzere, lineer plazmitin boyu, 5 kb'ye yakın bir yerde görülmüştür. KKKAV olgun Gc kodlayan diziyi içeren pVAX1-Gc vektörünün NotI enzimi ile lineerizasyonu sonrası agaroz jeldeki görüntüsü şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.6 NotI restriksiyon enzimi ile lineer hale getirilmiş pVAX1-Gc vektörünün agaroz jeldeki görüntüsü

M: belirteç DNA

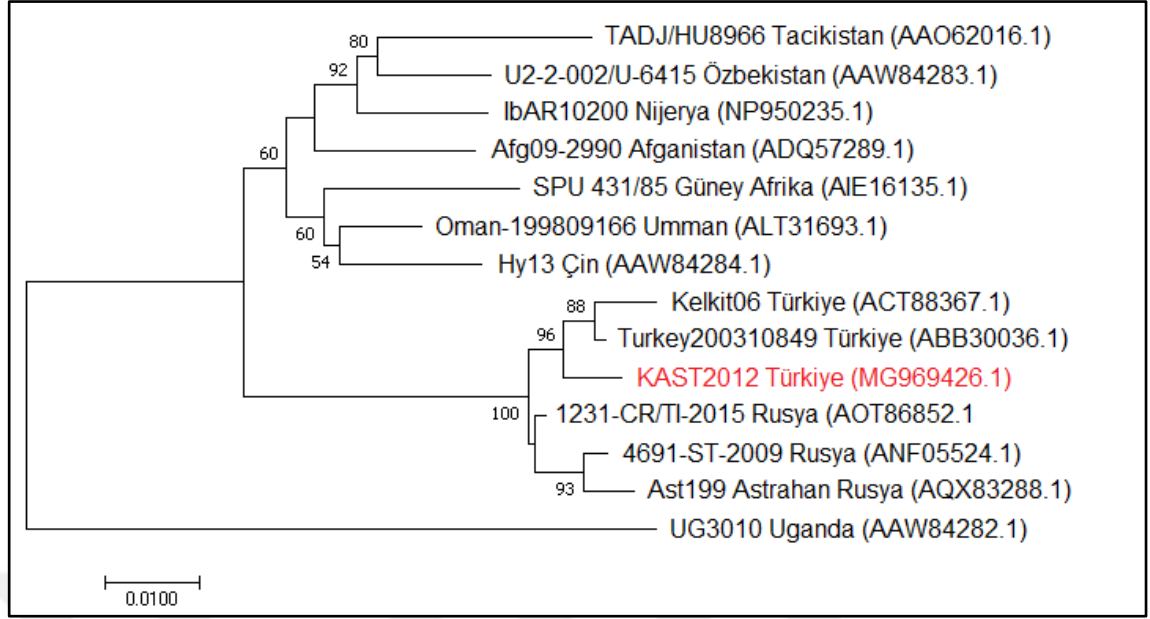
Klon 14[4]'ten elde edilen plazmit'in, ion torrent platformu kullanılarak, yeni nesil DNA dizileme yöntemi ile tüm DNA dizisi belirlenmiştir. Yötem 3.2.13'de açıklandığı gibi, dizilemelerden elde edilen ham verilerin analizi yapılmış ve KKKAV Gc açık okuma çerçevesinin istenildiği gibi pVAX1 vektörüne klonlanmış olduğu görülmüştür. Yeni nesil DNA dizilemesi ile nükleotit dizisi belirlenmiş olan, KKKAV KAST2012 izolatına ait olgun Gc kodlayan dizi, NCBI GenBank veri tabanına, MG969426.1 erişme numarası (aksesyon numarası) ile eklenmiştir (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov> 2018a ve 2018b). Sonuç olarak, pVAX1-Gc vektörü elde edilmiştir. pVAX1-Gc vektörünün haritası, şekil 4.7'de verilmiştir.



Şekil 4.7 pVAX1-Gc vektörünün haritası

4.2 KKKAV KAST2012 izolatının, klonlanmış olan Gc açık okuma çerçevesinin kodladığı proteinin amino asit dizisinin filogenetik analizi

KKKAV'nin, Türkiye'yi de içeren çeşitli coğrafik bölgelerdeki farklı suş ve izolatlarına ait olan 13 temsili olgun Gc amino asit dizisi, NCBI GenBank veri bankasından elde edilmiş ve KKKAV KAST2012 izolatının olgun Gc proteininin amino asit dizisinin filogenetik analizinde kullanılmıştır. Filogenetik analizler, yöntem 3.2.14'de açıklandığı üzere MEGA7 yazılımı ile, neighbour joining algoritması ve 500 önyükleme yinelemesi (bootstrap replicate) kullanılarak yapılmıştır. Filogenetik analiz sonucunda, KKKAV KAST2012 olgun Gc proteininin, en çok, Türkiye kökenli KKKAV suşlarının Gc proteinleri ile benzerlik gösterdiği bulunmuştur. KKKAV KAST2012 izolatının olgun Gc proteininin filogenisini gösteren ağaç şekil 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4.8 KKKAV KAST2012 izolatına ve KKKAV'nin 13 farklı suş veya izolatına ait olgun Gc protein dizileri ile, MEGA7 yazılımında, neighbour joining algoritması ve 500 önyükleme yinelemesi (bootstrap replicate) kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaç

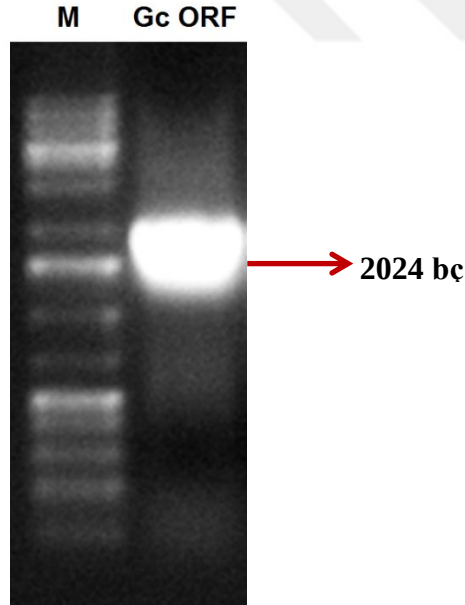
50'den küçük olan önyükleme değerleri, ağaç üzerinde gösterilmemiştir.

4.3 KKKAV KAST2012 izolatının Gc glikoproteininin açık okuma çerçevesinin pEGFP-C1 ifade vektörüne klonlanması

Yöntem 3.2.10'da açıklanan SLiCE klonlama yöntemi kullanılarak, pEGFP-C1 vektöründeki HindIII ve BamHI tanıma dizileri kullanılarak, KKKAV KAST2012 izolatının Gc açık okuma çerçevesi, vektörde sitomegalovirüs(CMV) promotoru kontrolünde ifade edilen EGFP açık okuma çerçevesinin aşağısına, çerçeve içi kodlanacak şekilde klonlanmıştır.

4.3.1 KKKAV KAST2012 izolatına ait Gc açık okuma çerçevesinin, pVAX1-Gc vektörü kalıp olarak kullanılarak PZT ile çoğaltılması

KKKAV KAST2012 izolatına ait Gc açık okuma çerçevesi, pVAX1-Gc vektörü kalıp olarak kullanılmak suretiyle, çizelge 3.1’de dizi bilgisi verilen Gc SLiCE-F2 ileri ve Gc SLiCE-R2 geri primerleri ile yöntem 3.2.6’da açıklandığı gibi PZT ile çoğaltılmıştır. PZT aşamasında, primerlerin bağlanma sıcaklığı olarak 59 °C kullanılmıştır. Sonuç olarak, yukarıda belirtilen primer çifti, PZT deneyinde, 20’şer pmol olarak kullanıldığında, tek tur yapılan PZT sonrasında, klonlama çalışmalarında kullanılmaya yetecek kadar amplikon elde edilmiştir. Bu amplikonun GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit (Thermo Scientific) kullanılarak yıkaması yapılmış ve spektrofotometre (NanoDrop 2000 Thermo Fisher Scientific) ile miktarı ve saflık kalitesi belirlenerek klonlama çalışmasında kullanılmıştır. PZT sonucunda elde edilen amplikonların, agaroz jel elektroforezi sonrasında alınmış jeldeki görüntüleri şekil 4.9’da verilmiştir.

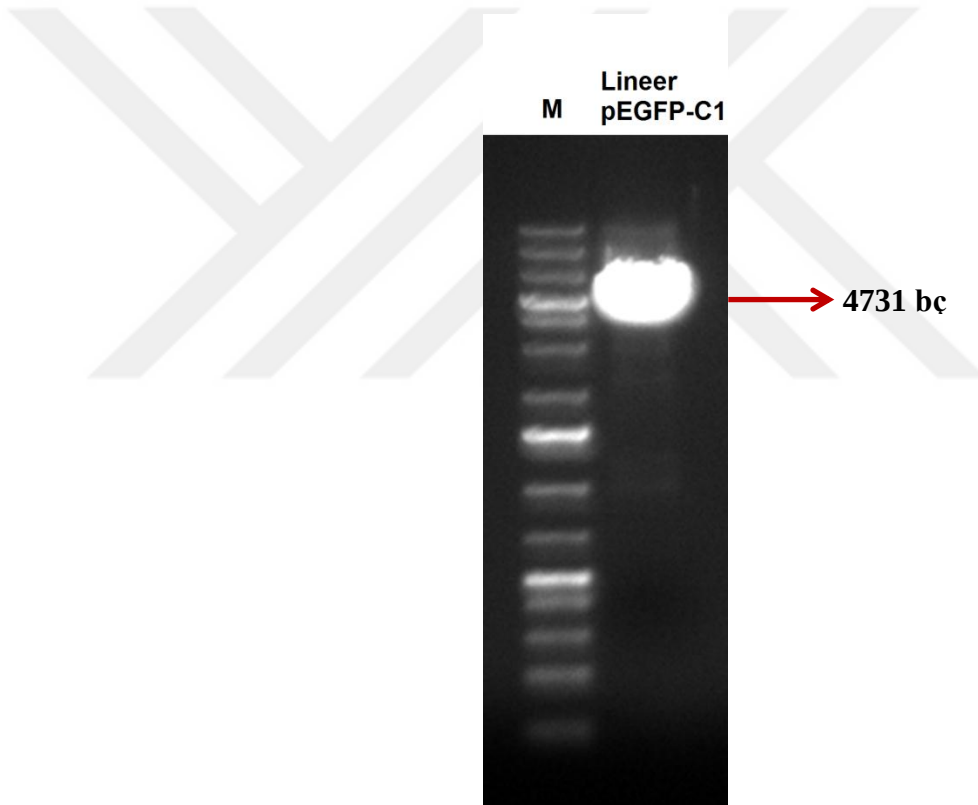


Şekil 4.9 pVAX1-Gc vektörü kalıp olarak kullanılarak, Gc SLiCE-F2 ve Gc SLiCE-R2 primerleri ile yapılan PZT sonucunda elde edilen amplikonun agaroz jeldeki görüntüsü

M: belirteç DNA

4.3.2 pEGFP-C1 vektörünün HindIII ve BamHI restriksiyon enzimleri ile lineer hale getirilmesi

Klonlama için pEGFP-C1 vektörü, yöntem 3.2.9’da açıklandığı gibi, HindIII ve BamHI restriksiyon enzimleri ile lineer hale getirilmiştir. Kesim sonrasında Lineer vektör, yöntem 3.2.9’da açıklandığı gibi GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit (Thermo Scientific) kullanılarak yıkanmıştır. Klonlamadan önce, vektörün spektrofotometrede (NanoDrop 2000 Thermo Fisher Scientific) miktarı ve saflık kalitesi belirlenmiştir. Lineer haldeki pEGFP-C1 vektörünün agaroz jel elektroforezi sonrası alınmış jel görüntüsü şekil 4.10’da gösterilmiştir.

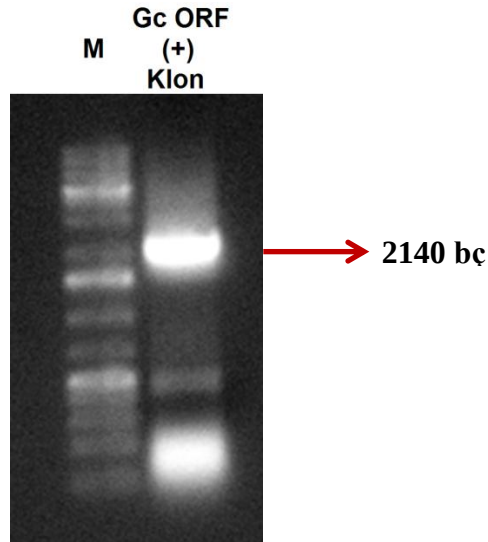


Şekil 4.10 HindIII ve BamHI restriksiyon enzimleri ile lineer hale getirilmiş pEGFP-C1 vektörünün agaroz jeldeki görüntüsü

M: belirteç DNA

4.3.3 KKKAV KAST2012 izolatının Gc açık okuma çerçevesinin, HindIII ve BamHI restriksiyon enzimleri ile lineer hale getirilmiş olan pEGFP-C1 plazmit vektörüne SLiCE klonlama yöntemi ile klonlanması

Vektör (pEGFP-C1) ve girdi (insert) (Gc ORF) hazırlandıktan sonra, yöntem 3.2.10'da açıklandığı gibi, SLiCE tepkimesi yapılmıştır. Daha sonra, SLiCE tepkime ürünü, yöntem 3.2.12'de açıklandığı gibi alıcı (kompetent) hale getirilmiş olan *E. coli* DH5Alpha suşuna aktarılmıştır. Transformasyondan sonra bakteriler, 100 µg/mL Kanamisin içeren LB Agar besiyerlerine yayma ekim ile ekilmiş ve 37 °C'de 16 saat inkübe edilmiştir. Transformasyon sonrası, petri kaplarında oluşan kolonilerin (transformant) bir tanesi (Klon1a) ile pEGFP-C1 vektöründe, EGFP ORF'sinin aşağısına bağlanan EGFP-F ileri ve Gc ORF'sinin aşağısına bağlanan Gc SLiCE-R2 geri primerleri kullanılarak yöntem 3.2.6'da açıklandığı gibi koloni PZT yapılmıştır. PZT sonrasında elde edilen amplikon, yöntem 3.2.7'de açıklandığı gibi, agaroz jel elektroforezi ile analiz edilmiş ve beklenen büyüklükteki (2140 bp) amplikonun varlığı tespit edilerek, transformantın, girdi pozitif olduğu görülmüştür. EGFP-F ileri ve Gc SLiCE-R2 geri primerleri kullanılarak Klon1a ile yapılan PZT sonrasında elde edilen amplikonun agaroz jeldeki görüntüsü şekil 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.11 EGFP-F ve Gc SLiCE-R2 primerleri kullanılarak, Klon1a ile yapılan koloni PZT sonrasında elde edilen amplikonun agaroz jeldeki görüntüsü

M: belirteç DNA

4.3.4 Girdi pozitif transformanttan elde edilen plazmitin Sanger DNA dizilemesi

Girdi pozitif olarak bulunan Klon1a'dan, yöntem 3.2.8'de açıklandığı gibi plazmit izolasyonu yapılmış ve çizelge 3.1'de dizi bilgisi verilen, EGFP-F, Gc Seq2, Gc Seq3 ve Gc Seq4 dizileme primerleri ile, vektörde, KKKAV Gc açık okuma çerçevesinin yerleştirildiği kısmının Sanger dideoksi zincir sonlanma yöntemi ile DNA dizisi belirlenmiştir. Dizileme sonucunda, KKKAV Gc açık okuma çerçevesinin istenildiği gibi EGFP açık okuma çerçevesi ile çerçeve içi olarak kodlanacak şekilde klonlanmış olduğu görülmüştür. Klon1a'nın plazmidi ile yapılan Sanger DNA dizilemesinden elde edilen kromatogramlar şekil 4.12'de verilmiştir.

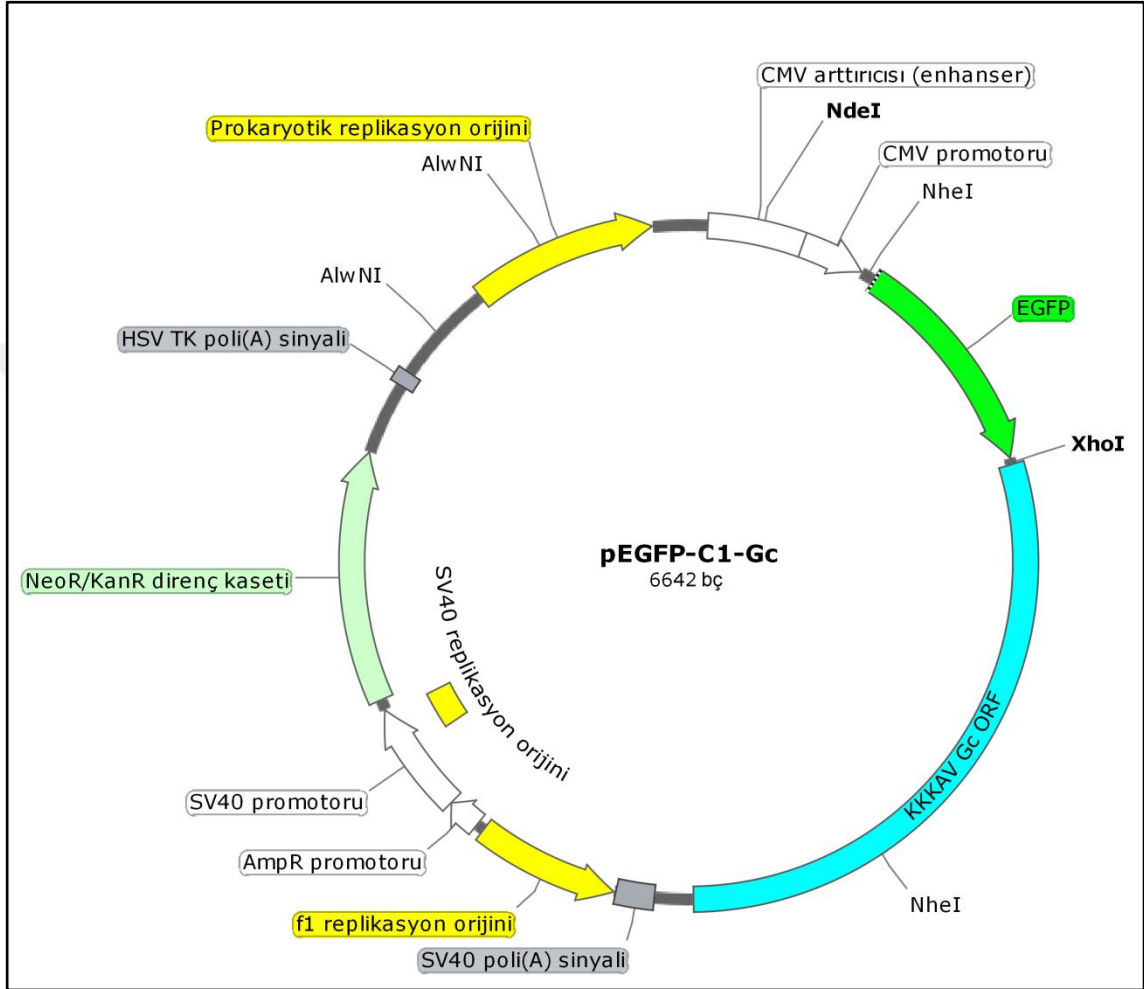




Şekil 4.12 Klon1a'nın plazmidi ile EGFP-F, Gc Seq2, Gc Seq3 ve Gc Seq4 dizileme primerleri kullanılarak yapılan Sanger DNA dizilemesinden elde edilen kromatogramlar

Açık okuma çerçevesindeki kodonların kodladığı amino asitler, tek harfli sembolleri ile kromatogramda gösterilmiştir. Dizilemede alınan nükleotit sinyallerinin kalite skorları, açık mavi renki bar grafiği olarak kromatogramda gösterilmiştir.

Oluşturulan bu vektör pEGFP-C1-Gc olarak adlandırılmış ve Gc'nin *in vitro* olarak ifadenmesi çalışmalarında kullanılmıştır. pEGFP-C1-Gc vektörünün haritası, şekil 4.13'te verilmiştir.



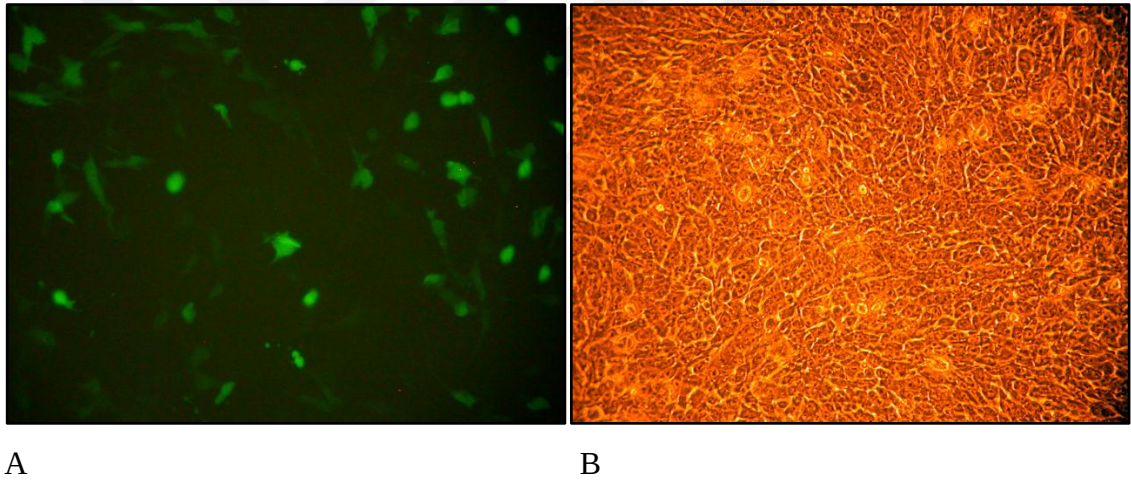
Şekil 4.13 pEGFP-C1-Gc vektörünün haritası

4.4 Klonlaması yapılan KKKAV KAST2012 izolatına ait olgun Gc kodlayan dizinin *in vitro* olarak ifadesinin gösterilmesi

Klonlaması yapılan KKKAV KAST2012 izolatına ait olgun Gc kodlayan dizinin *in vitro* olarak ifadenmesi, pEGFP-C1-Gc vektörü ile transfekte olmuş BHK-21 hücrelerinde, hem transkripsiyon (mRNA) hem de protein düzeyinde gösterilmiştir.

4.4.1 BHK-21 Hücrelerinin pEGFP-C1-Gc Vektörü İle Geçici Transfeksiyonu

Klonlanan Gc açık okuma çerçevesinin *in vitro* olarak ifadesinin, pEGFP-C1-Gc vektörünün kodladığı yeşil floresan protein (EGFP) kullanılarak değerlendirilebilmesi için, BHK-21 hücreleri, pEGFP-C1-Gc vektörü ile yöntem 3.2.15'te açıklandığı gibi, geçici olarak transfekte edilmiştir. Sonuç olarak, yöntem 3.2.16'te açıklandığı üzere yapılan floresan mikroskopisi çalışmaları ile vektörden kodlanan EGFP-Gc füzyon ürününün transfekte BHK-21 hücrelerindeki ifadesi gösterilmiştir. EGFP-Gc füzyon ürününü kodlayan pEGFP-C1-Gc vektörünün geçici olarak aktarıldığı BHK-21 hücrelerinin, transfeksiyondan 48 saat sonra, floresan mikroskopu ile alınmış görüntüsü şekil 4.14'te verilmiştir.



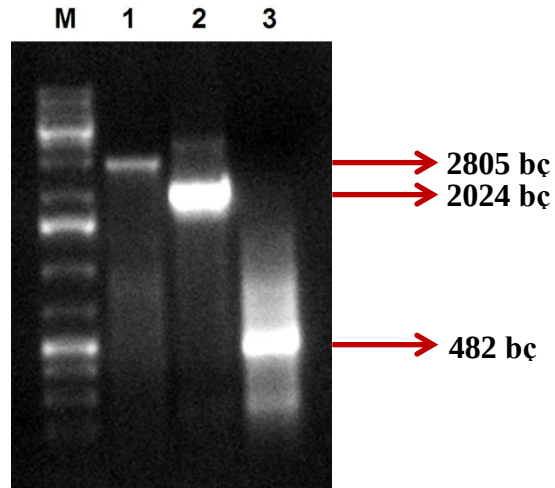
Şekil 4.14 pEGFP-C1-Gc vektörü ile geçici olarak transfekte BHK-21 hücrelerinin, floresan ışık mikroskopu ve aynı alanın basit ışık mikroskopu ile alınmış görüntüsü

a. Floresan ışık mikroskopu ile alınan görüntü, **b.** Basit ışık mikroskopu ile alınan görüntü

Büyütme 40X

4.4.2 BHK-21 hücrelerinin pEGFP-C1-Gc vektörü ile kararlı olarak transfeksiyonu ve Gc'nin hem transkripsiyon hem de protein düzeyindeki ifadesinin gösterilmesi

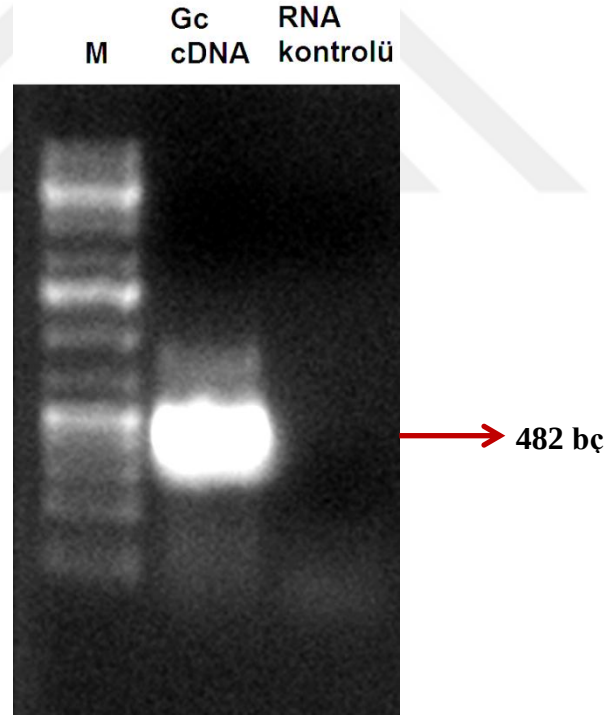
pEGFP-C1-Gc vektöründen kodlanan Gc açık okuma çerçevesinin, *in vitro* olarak, hem transkripsiyon (mRNA) hem de translasyon (protein) düzeyindeki ifadesinin değerlendirilebilmesi için, BHK-21 hücreleri, pEGFP-C1-Gc vektörü ile yöntem 3.2.15'te açıklandığı gibi, kararlı olarak transfekte edilmiştir. Kararlı transfeksiyon sonrasında, BHK-21 hücrelerinin genomunda, Gc geninin varlığını göstermek için, transfekte olmuş BHK-21 hücrelerinin, yöntem 3.2.18'de açıklandığı gibi genomik DNA'sı izole edilmiştir. İzole edilen BHK-21 genomik DNA'sında, pEGFP-C1-Gc vektörü kaynaklı olarak Gc kodlayan genin varlığı, yöntem 3.2.18'de ve yöntem 3.2.6'da açıklandığı gibi, çizelge 3.1'de dizi bilgisi verilen, CMV 3'-F / Gc SLiCE-R2, Gc SLiCE-F2 / Gc SLiCE-R2 ve Gc Seq4 / Gc SLiCE-R2 primer çiftleri kullanılarak, PZT deneyi ile gösterilmiştir. pEGFP-C1-Gc vektörü ile kararlı olarak transfekte olmuş BHK-21 hücrelerinin genomik DNA'sı ile Gc Seq4 ve Gc SLiCE-R2 primerleri kullanılarak yapılan PZT sonucunda elde edilmiş ampikonun agaroz jeldeki görüntüsü şekil 4.15'te verilmiştir.



Şekil 4.15 pEGFP-C1-Gc vektörü ile kararlı olarak transfekte olmuş BHK-21 hücrelerinin genomik DNA'sında Gc geninin varlığının gösterilmesi

1: CMV 3'-F / Gc SLiCE-R2, **2:** Gc SLiCE-F2 / Gc SLiCE-R2 ve **3:** Gc Seq4 / Gc SLiCE-R2 primer çiftleri ile yapılan PZT'lerin ürünlerini göstermektedir. **M:** belirteç DNA

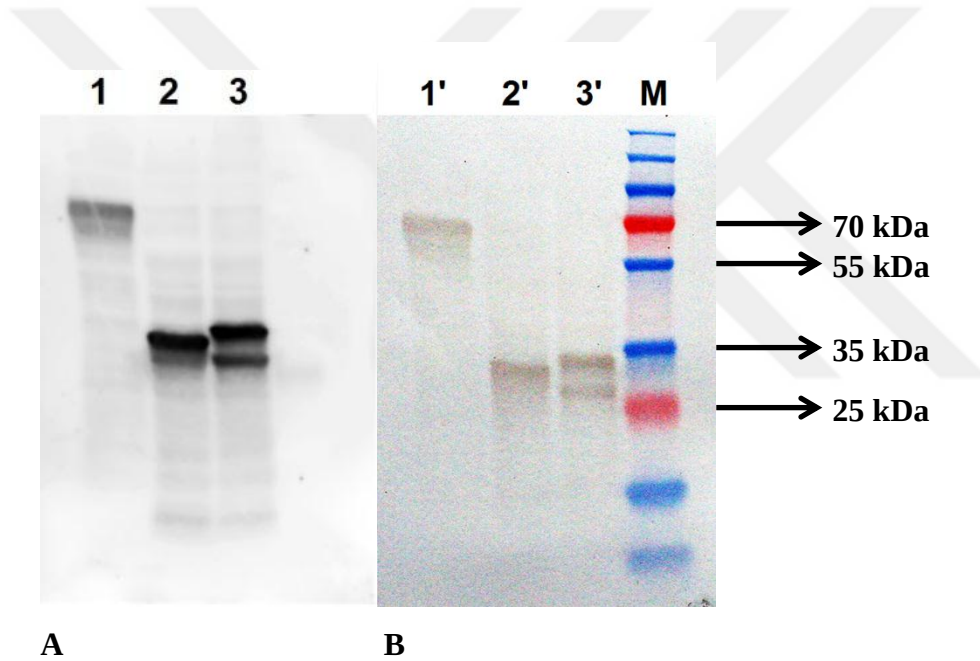
pEGFP-C1-Gc vektörü ile kararlı olarak transfekte olmuş BHK-21 hücrelerinin genomlarında Gc kodlayan genin varlığı gösterildikten sonra, bu genin transkripsiyonel (mRNA) düzeyindeki ifadesine bakılmıştır. Bu amaç için, kararlı olarak transfekte BHK-21 hücrelerinin, yöntem 3.2.18’de açıklandığı gibi, total RNA’sı izole edilmiş ve oligo(dt) 18 primerlerle, mRNA popülasyonunun, ters transkripsiyonu yapılarak komplementer DNA’sı (cDNA) sentezlenmiştir. Sentezlenen cDNA’larla, yöntem 3.2.18’de açıklandığı gibi, çizelge 3.1’de dizi bilgisi verilen Gc Seq4 ileri ve Gc SLiCE-R2 geri primerleri kullanılarak PZT yapılmıştır. Sonuç olarak kararlı olarak transfekte olmuş BHK-21 hücrelerinde Gc’nin transkripsiyonel düzeydeki ifadesi gösterilmiştir. Kararlı olarak transfekte BHK-21 hücrelerinin mRNA’ları ile Gc Seq4 ve Gc SLiCE-R2 primer çifti kullanılarak yapılan RT-PZT sonrası elde edilen ampliconun agaroz jeldeki görüntüsü şekil 4.16’da verilmiştir.



Şekil 4.16 pEGFP-C1-Gc vektörü ile kararlı olarak transfekte olmuş BHK-21 hücrelerinin mRNA’ları ile Gc Seq4 ve Gc SLiCE-R2 primer çifti kullanılarak yapılan RT-PZT sonrası elde edilen ampliconun agaroz jeldeki görüntüsü

M: belirteç DNA

pEGFP-C1-Gc vektörü ile kararlı olarak transfekte olmuş BHK-21 hücrelerinde, Gc kodlayan genin ifadesi, transkripsiyon düzeyinde gösterildikten sonra, bu genin translasyon (protein) düzeyindeki ifadesine bakılmıştır. Bu amaç için, kararlı olarak transfekte BHK-21 hücrelerinin, yöntem 3.2.17’da açıklandığı gibi, total proteini izole edilmiştir. Daha sonra, izole edilen proteinlerle, yöntem 3.2.17’da açıklandığı gibi, yeşil floresan proteinine özgü anti GFP antikoru ile western blot deneyi yapılmıştır. Sonuç olarak, kararlı halde transfekte olmuş BHK-21 hücrelerinde, EGFP-Gc füzyon ürününün ifadesi gösterilmiştir. pEGFP-C1-Gc vektörü ile kararlı halde transfekte olmuş BHK-21 hücrelerinde EGFP-Gc füzyon ürününün tespit edildiği western blot deneyine ait, ECL yöntemi ile alınmış membran görüntüsü şekil 4.17’de verilmiştir.

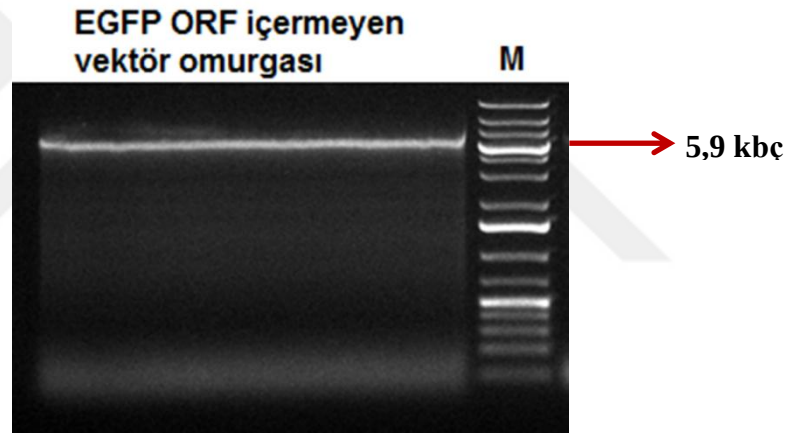


Şekil 4.17 pEGFP-C1-Gc vektörü ile kararlı halde transfekte BHK-21 hücrelerinde EGFP-Gc füzyon ürününün western blot yöntemi ile gösterilmesi

a. membranın transillüminatör ile alınmış görüntüsü, **b.** membranın ECL sonrası fotoğraf makinesi ile alınmış görüntüsü, **1/1'**: kararlı olarak transfekte hücrelerde ifade olan EGFP-Gc füzyon ürünü, **2/2'**: pEGFP-C1 vektörü ile geçici olarak transfekte olmuş BHK-21 hücrelerinde ifade olan EGFP, **3/3'**: pEGFP-C1-Gc vektörü ile geçici olarak transfekte olmuş BHK-21 hücrelerinde ifade olan EGFP-Gc füzyon ürünü, **M**: protein belirteci

4.5 pEGFP-C1-Gc vektöründen EGFP açık okuma çerçevesinin çıkartılması

KKKAV Gc glikoproteinini kodlayan pEGFP-C1-Gc vektörünün *in vitro* olarak ifadesi doğrulandıktan sonra, fare immünizasyonu çalışmaları için vektörden kodlanan EGFP açık okuma çerçevesi çıkartılmıştır. Bu amaç için pEGFP-C1-Gc vektörü, EGFP açık okuma çerçevesi dışarıda kalacak şekilde çizelge 3.1’de dizi bilgisi verilen 5’ uçlarından fosfatlanmış, EGFP Removal-F ileri ve EGFP Removal-R geri primer çifti kullanılarak Yöntem 3.2.6’da açıklandığı gibi, PZT ile çoğaltılmıştır. pEGFP-C1-Gc vektörü kalıp olarak kullanılarak, EGFP Removal-F ileri ve EGFP Removal-R geri primer çifti ile gerçekleştirilen PZT sonrasında elde edilen amplikonun agaroz jeldeki görüntüsü şekil 4.18’de verilmiştir.

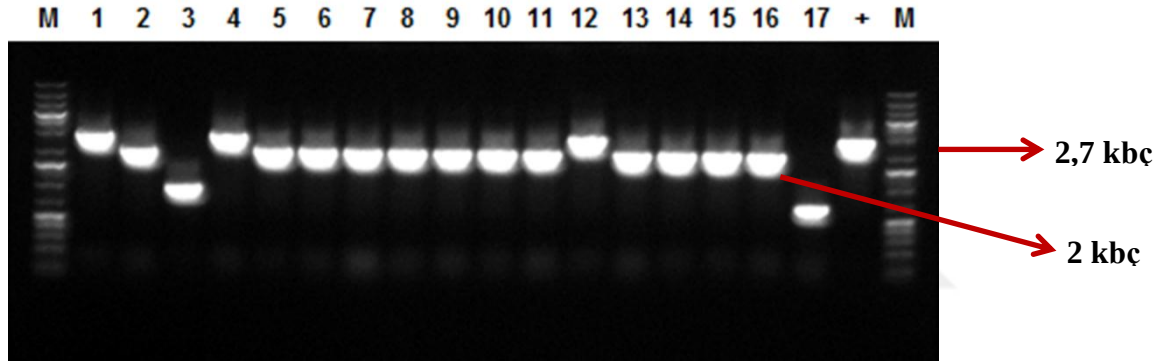


Şekil 4.18 pEGFP-C1-Gc vektöründen EGFP açık okuma çerçevesinin çıkartılması için yapılan PZT sonucunda elde edilen amplikonun agaroz jeldeki görüntüsü

M: belirteç DNA

pEGFP-C1-Gc vektörü kalıp olarak kullanılarak, EGFP Removal-F ileri ve EGFP Removal-R geri primer çifti ile gerçekleştirilen PZT sonrasında elde edilen, 5’ uçlarından fosfatlanmış haldeki lineer amplikon, yöntem 3.2.9’da açıklandığı gibi agaroz jelden geri alınmış ve amplikonun miktarı ve saflık derecesi spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. 5’ uçlarından fosfatlanmış olan lineer amplikonun, daha sonra yöntem 3.2.11’de açıklandığı gibi, T4 DNA ligaz enzimi ile küt uçları birleştirilmiş ve amplikon halkasal hale getirilmiştir. Küt uç ligasyonu ile halkasal hale getirilen vektör

omurgası, daha sonra, yöntem 3.2.12’de açıklandığı gibi, alıcı hale getirilmiş *E. coli* DH5Alpha suşuna aktarılmıştır. Transformasyondan sonra, petri kaplarında oluşan transformantlardan rastgele seçilen 17 tanesi ile pEGFP-C1-Gc vektöründe, çizelge 3.1’de dizi bilgisi verilen, CMV promotorunun aşağısına bağlanan, CMV 3’-F ileri ve Gc ORF’sinin aşağısına bağlanan, Gc SLiCE-R2 geri primer çifti kullanılarak yöntem 3.2.6’da açıklandığı gibi koloni PZT yapılmıştır. Koloni PZT sonrasında elde edilen amplikon, yöntem 3.2.7’de açıklandığı gibi, agaroz jel elektroforezi ile analiz edilmiş ve taranan 17 transformanttan 12 tanesinin, EGFP açık okuma çerçevesinin çıkarılmış olduğu vektörü taşıdığı bulunmuştur. CMV 3’-F ve Gc SLiCE-R2 primerleri kullanılarak 17 koloni ile yapılan koloni PZT sonrasında elde edilen amplikonların agaroz jeldeki görüntüleri şekil 4.19’da verilmiştir.

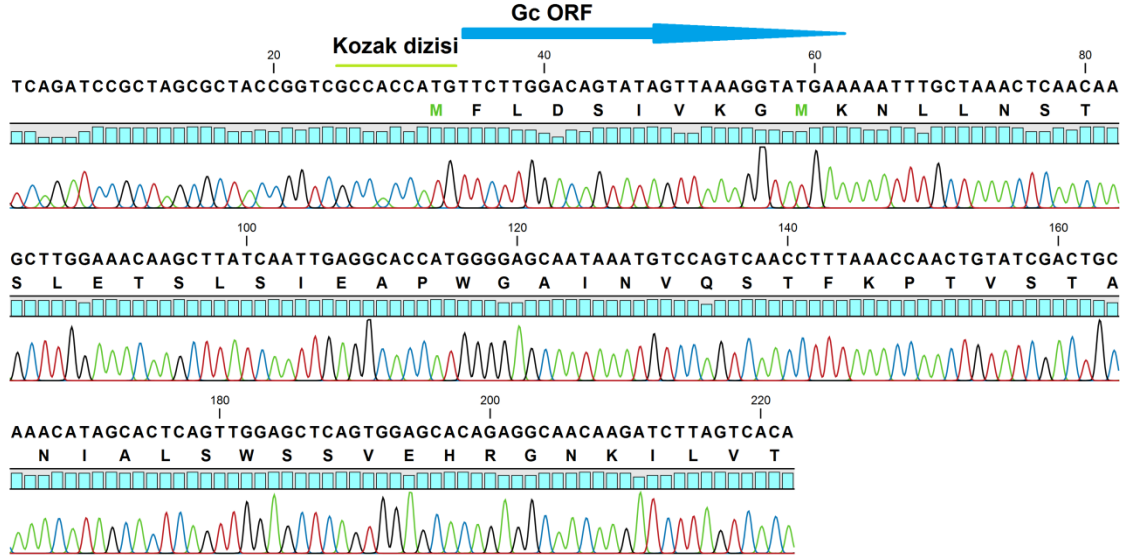


Şeki 4.19 CMV 3’-F ve Gc SLiCE-R2 primerleri kullanılarak 17 koloni ile yapılan koloni PZT sonrasında elde edilmiş amplikonların agaroz jeldeki görüntüleri

+: yaklaşık 2,7 kbç büyüklüğündeki EGFP + Gc açık okuma çerçevelerini içeren pEGFP-C1-Gc vektörünün kalıp olarak kullanıldığı PZT’den elde edilmiş amplikon. **M**: belirteç DNA
Sadece Gc açık okuma çerçevesini içeren vektörü taşıyan klonların (2, 5-11, 13-16) koloni PZT’leri sonucunda yaklaşık 2 kbç uzunluğundaki bantlar elde edilmiştir.

EGFP açık okuma çerçevesi çıkartılmış vektörü taşıyan 12 klondan (klon 2, 5-11, 13-16) yöntem 3.2.8’de açıklandığı gibi, plazmit izolasyonu yapılmış ve öncelikli olarak kozak dizisi ile KKKAV Gc açık okuma çerçevesi dizisinin çerçeve içi olarak yerleştirildiğinin doğrulanması üzere, çizelge 3.1’de dizi bilgisi verilen, CMV-F ileri primeri kullanılarak Sanger dideoksi zincir sonlanma yöntemi ile DNA dizisi belirlenmiştir. Dizileme sonucunda klon 5 ve klon 12’nin Kozak dizisi ve Gc açık okuma çerçevesini, çerçeve içi olarak bulundurduğu görülmüştür. Klon 5’in, plazmidi

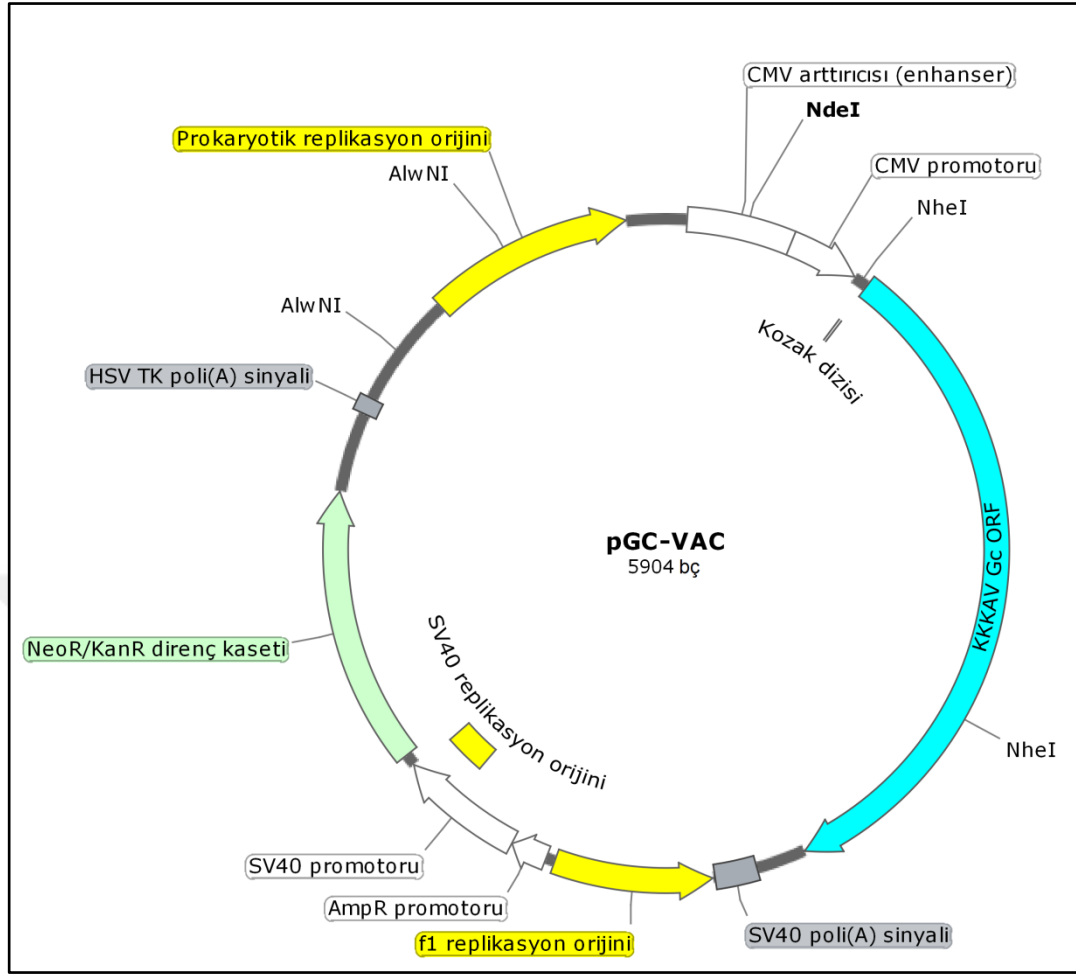
ile CMV-F dizileme primeri kullanılarak yapılan Sanger DNA dizilemesinden elde edilen kromatogram şekil 4.20’de verilmiştir.



Şekil 4.20 Klon 5’in, plazmidi ile CMV-F dizileme primeri kullanılarak yapılan Sanger DNA dizilemesinden elde edilen kromatogram

Açık okuma çerçevesindeki kodonların kodladığı amino asitler, tek harfli sembolleri ile kromatogramda gösterilmiştir. Dizilemede alınan nükleotit sinyallerinin kalite skorları, açık mavi renki grafiği olarak kromatogramda gösterilmiştir.

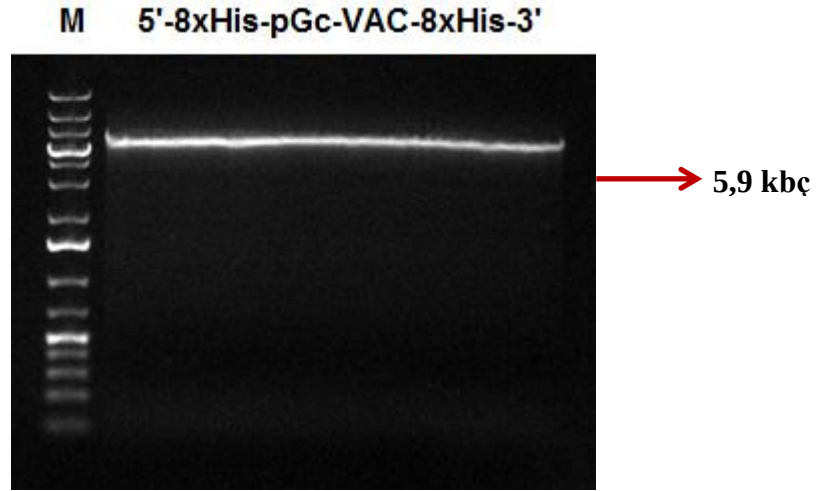
Bu iki klondan kodlanan Gc açık okuma çerçevelerinin daha sonra Gc Seq2, Gc Seq3 ve Gc Seq4 sekans primerleri ile DNA dizileri belirlenmiş ve herhangi bir erken dur kodonu oluşturan veya çerçeve kaymasına sebep olan mutasyona rastlanmamıştır. Bu aşamadan sonraki çalışmalara, klon 5’in plazmidi ile devam edilmiştir. pEGFP-C1-Gc vektöründen, EGFP ORF’sinin çıkartılması ile elde edilen vektöre pGc-VAC adı verilmiş ve bu vektör fare immunizasyonu deneylerinde DNA aşı vektörü olarak kullanılmıştır. pGc-VAC DNA aşı vektörünün haritası şekil 4.21’de verilmiştir.



Şekil 4.21 pGc-VAC DNA aşı vektörünün haritası

4.6 pGC-VAC Vektörüne N-uç 8X Histidin Etiketinin Takılması

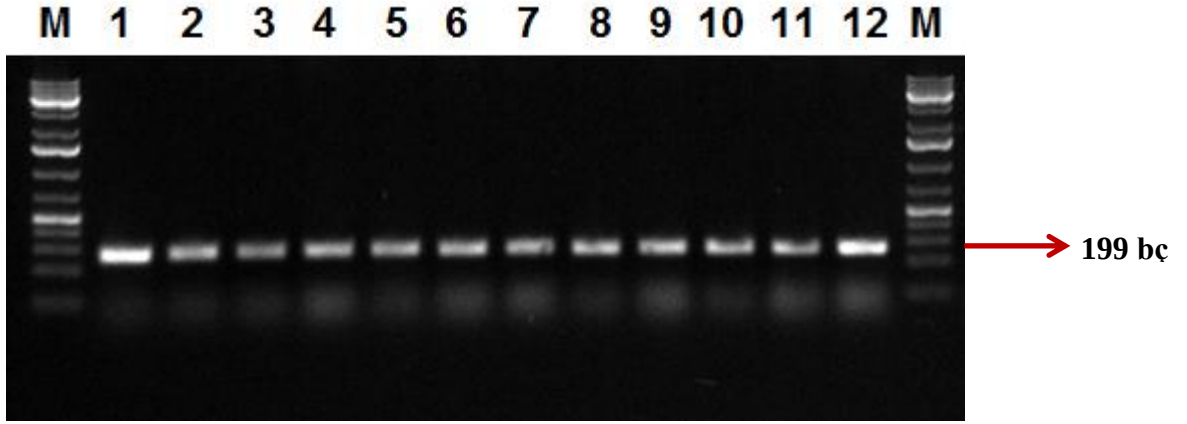
Oluşturulan pGC-VAC DNA aşı vektörünün, son olarak, *in vitro* ifadesinin doğrulanması amacı ile vektörde Gc açık okuma çerçevesinin yukarısına, ATG başlama kodonundan hemen sonra, 8X Histidin etiketi yerleştirilmiştir. Bu amaç için, öncelikle, pGC-VAC DNA aşı vektörü, çizelge 3.1’ de dizi bilgileri verilen His Tag Insertion-F ileri ve His Tag Insertion-R geri primer çifti ile yöntem 3.2.6’da açıklandığı üzere PZT yapılarak çoğaltılmıştır. pGC-VAC DNA aşı vektörü ile His Tag Insertion-F ve His Tag Insertion-R primer çifti kullanılarak yapılan PZT sonucunda elde edilmiş ampikonun agaroz jeldeki görüntüsü şekil 4.22’de verilmiştir.



Şekil 4.22 pGC-VAC vektörüne N-uç histidin etiketi takılması için yapılan PZT sonucunda elde edilmiş amplikonun agaroz jeldeki görüntüsü

M: belirteç DNA

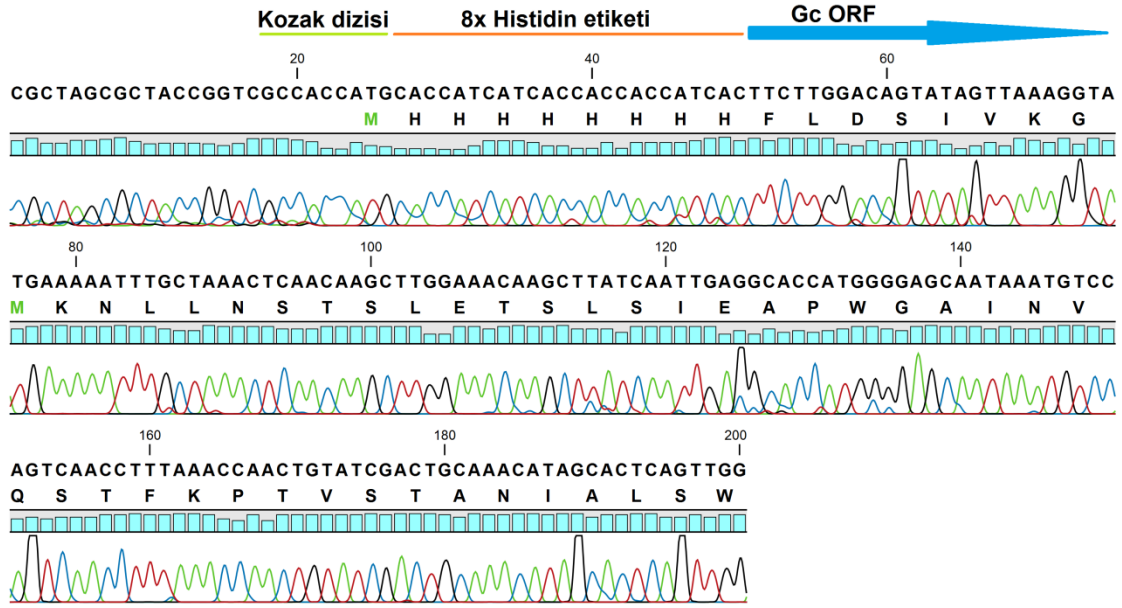
pGC-VAC DNA aşı vektörü ile His Tag Insertion-F ve His Tag Insertion-R primer çifti kullanılarak yapılan PZT sonucunda elde edilmiş amplikon, yöntem 3.2.9'da açıklandığı gibi, jelden geri alınmış ve amplikonun miktarı ve saflık kalitesi spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Lineer haldeki saf amplikon daha sonra, yöntem 3.2.10'da açıklandığı üzere SLiCE tepkimesi kullanılarak halkasal hale getirilmiştir. Elde edilen SLiCE tepkime ürünü, daha sonra, yöntem 3.2.12'de açıklandığı gibi, alıcı hale getirilmiş *E. coli* DH5Alpha suşuna aktarılmıştır. Transformasyondan sonra, petri kaplarında oluşan transformantlardan rastgele seçilen 12 tanesi ile pGc-VAC vektöründe, 8X histidin etiketini hedef alan, çizelge 3.1'de dizi bilgisi verilen His Tag-F ileri ve Gc ORF'sinin yukarısına bağlanan, Gc 5'-R geri primer çifti kullanılarak yöntem 3.2.6'da açıklandığı gibi koloni PZT yapılmıştır. Koloni PZT sonrasında elde edilen amplikon, yöntem 3.2.7'de açıklandığı gibi, agaroz jel elektroforezi ile analiz edilmiş ve taranan 12 transformantın tamamının, 8X histidin etiketi içeren vektörü taşıdığı bulunmuştur. His Tag-F ve Gc 5'-R primerleri kullanılarak 12 koloni ile yapılan koloni PZT sonrasında elde edilmiş olan amplikonların agaroz jeldeki görüntüleri şekil 4.23'de verilmiştir.



Şekil 4.23 His Tag-F ve Gc 5'-R primerleri kullanılarak, 12 koloni ile yapılan koloni PZT sonrasında elde edilmiş olan amplikonların agaroz jeldeki görüntüleri

M: belirteç DNA

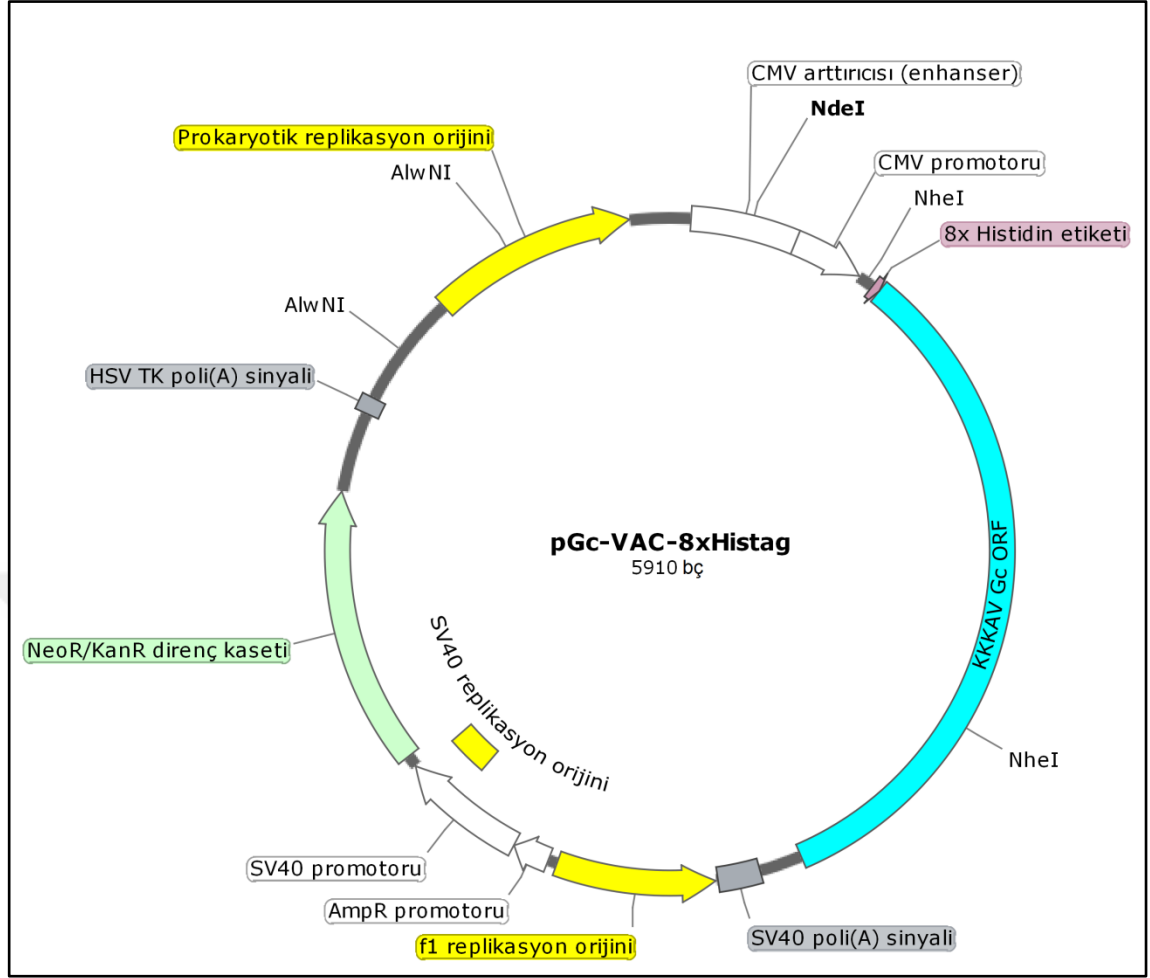
8x histidin etiketi içeren vektörü taşıyan 12 klonun tamamının yöntem 3.2.8'de açıklandığı gibi plazmiti izole edilmiş ve öncelikli olarak kozak dizisi, 8x histidin etiketi kodlayan dizi ve KKKAV Gc açık okuma çerçevesi dizisinin, birlikte çerçeve içi olarak yerleştirildiğinin doğrulanması üzere, çizelge 3.1'de dizi bilgisi verilen, CMV-F ileri primeri kullanılarak Sanger dideoksi zincir sonlanma yöntemi ile DNA dizisi belirlenmiştir. Dizileme sonucunda klon 1 ve klon 12'nin Kozak dizisini, 8x histidin etiketi kodlayan diziyi ve Gc açık okuma çerçevesini, çerçeve içi olarak bulundurduğu görülmüştür. Klon 12'in, plazmidi ile CMV-F dizileme primeri kullanılarak yapılan Sanger DNA dizilemesinden elde edilen kromatogram şekil 4.24'de verilmiştir.



Şekil 4.24 Klon 12'in, plazmidi ile CMV-F dizileme primeri kullanılarak yapılan Sanger DNA dizilemesinden elde edilen kromatogram

Açık okuma çerçevesindeki kodonların kodladığı amino asitler, tek harfli sembolleri ile kromatogramda gösterilmiştir. Dizilemede alınan nükleotit sinyallerinin kalite skorları, açık mavi renki bar grafiği olarak kromatogramda gösterilmiştir.

Kozak ve Gc ORF'si ile çerçeve içi olarak, 8x histidin etiketi kodlayan vektörü taşıdığı bulunan klon 5'in ve klon 12'nin plazmitlerindeki Gc açık okuma çerçevelerinin daha sonra Gc Seq2, Gc Seq3 ve Gc Seq4 sekans primerleri ile DNA dizileri belirlenmiş ve herhangi bir erken dur kodonu oluşturan veya çerçeve kaymasına sebep olan mutasyona rastlanmamıştır. Bu aşamadan sonraki çalışmalara, klon 12'in plazmidi ile devam edilmiştir. pGc-VAC DNA aşı vektörüne, 8x histidin etiketi kodlayan dizinin çerçeve içi olarak yerleştirilmesi ile elde edilen vektöre pGc-VAC-8xHistag adı verilmiş ve bu vektör, pGc-VAC DNA aşı vektörü ile fare immünizasyonu deneylerine geçilmeden önce, Gc'nin *in vitro* olarak ifadenmesinin doğrulanmasında kullanılmıştır. pGc-VAC-8xHistag vektörünün haritası şekil 4.25'de verilmiştir.

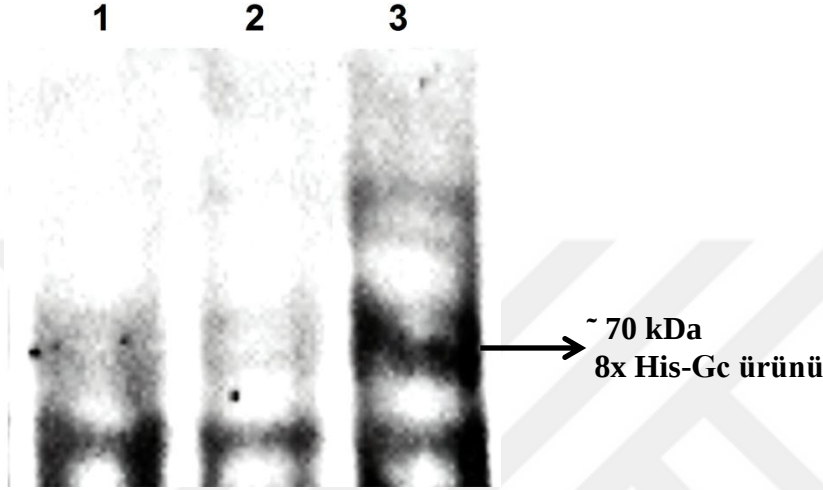


Şekil 4.25 pGc-VAC-8xHistag vektörünün haritası

4.7 BHK-21 Hücrelerinin pGc-VAC-8xHistag Vektörü ile Kararlı Olarak Transfeksiyonu ve Gc İfadesinin Protein Düzeyinde Gösterilmesi

pGc-VAC-8xHistag vektöründen kodlanan Gc açık okuma çerçevesinin, *in vitro* olarak, translasyon (protein) düzeyindeki ifadesinin değerlendirilebilmesi için, BHK-21 hücreleri, pGc-VAC-8xHistag vektörü ile yöntem 3.2.15'te açıklandığı gibi, hem geçici, hem de kararlı olarak transfekte edilmiştir. pGc-VAC-8xHistag vektörü ile kararlı olarak transfekte olmuş BHK-21 hücrelerinde, Gc kodlayan genin translasyon (protein) düzeyindeki ifadesine bakılması amacıyla, transfekte BHK-21 hücrelerinin, yöntem 3.2.17'da açıklandığı gibi, total proteini izole edilmiştir. Daha sonra, izole edilen proteinlerle, yöntem 3.2.17'da açıklandığı gibi, 8x ve 6x histidin etiketine özgü anti

histidin etiketi antikoru ile western blot deneyi yapılmıştır. Sonuç olarak, kararlı halde transfekte olmuş BHK-21 hücrelerinde, 8x His-Gc füzyon ürününün ifadesi gösterilmiştir. pGc-VAC-8xHistag vektörü ile kararlı halde transfekte olmuş BHK-21 hücrelerinde, 8x His-Gc füzyon ürününün tespit edildiği western blot deneyine ait, ECL yöntemi ile alınmış membran görüntüsü şekil 4.26’da verilmiştir.



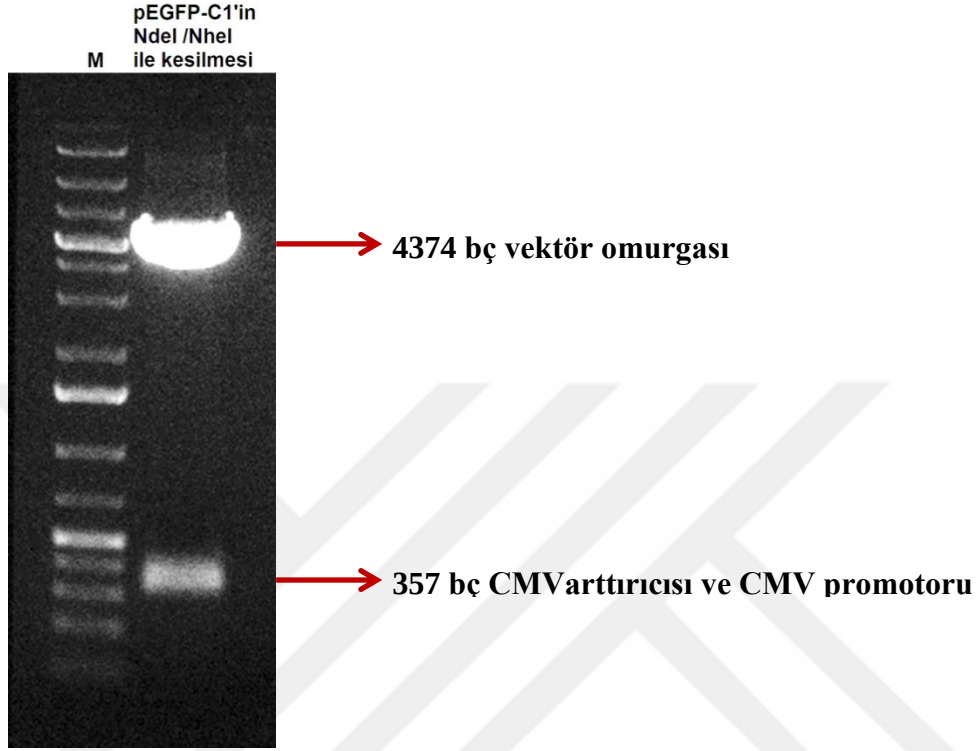
Şekil 4.26 pGc-VAC-8xHistag vektörü ile kararlı halde transfekte BHK-21 hücrelerinde 8x His-Gc füzyon ürününün western blot yöntemi ile gösterilmesi

1: pGc-VAC-8xHistag vektörü ile geçici olarak transfekte hücrelerde ifade olan EGFP-Gc füzyon ürünü, 2: Transfeksiyon yapılmamış BHK-21 hücrelerinin protein örnekleri ile yapılan negatif kontrol western blot deneyi sonucu, 3: pGc-VAC-8xHistag vektörü ile kararlı olarak transfekte olmuş BHK-21 hücrelerinde ifade olan 8x His-Gc füzyon ürünü

4.8 Fare İmmünizasyon Deneyleri İçin Boş Vektör Hazırlanması

Fare immünizasyonu çalışmalarında negatif kontrol olarak kullanılmak üzere, CMV promotorundan herhangi bir gen ifade etmeyen boş vektör hazırlanmıştır. Bu amaç için pEGFP-C1 vektöründe bulunan CMV promotoru ve CMV enhanserinin bir kısmı, yöntem 3.2.9’da açıklandığı gibi, NdeI ve NheI restriksiyon enzimleri ile kesilerek çıkarılmıştır. Kesim sonrasında oluşan lineer vektör omurgası, yöntem 3.2.7’de açıklandığı gibi elektroforez ile jelde ayrılmış ve yöntem 3.2.9’da açıklandığı gibi agaroz jelden geri alınmıştır. Vektörün daha sonra, yöntem 3.2.9’da açıklandığı gibi spektrofotometrede miktarı ve saflık kalitesi belirlenmiştir. Lineer haldeki vektör

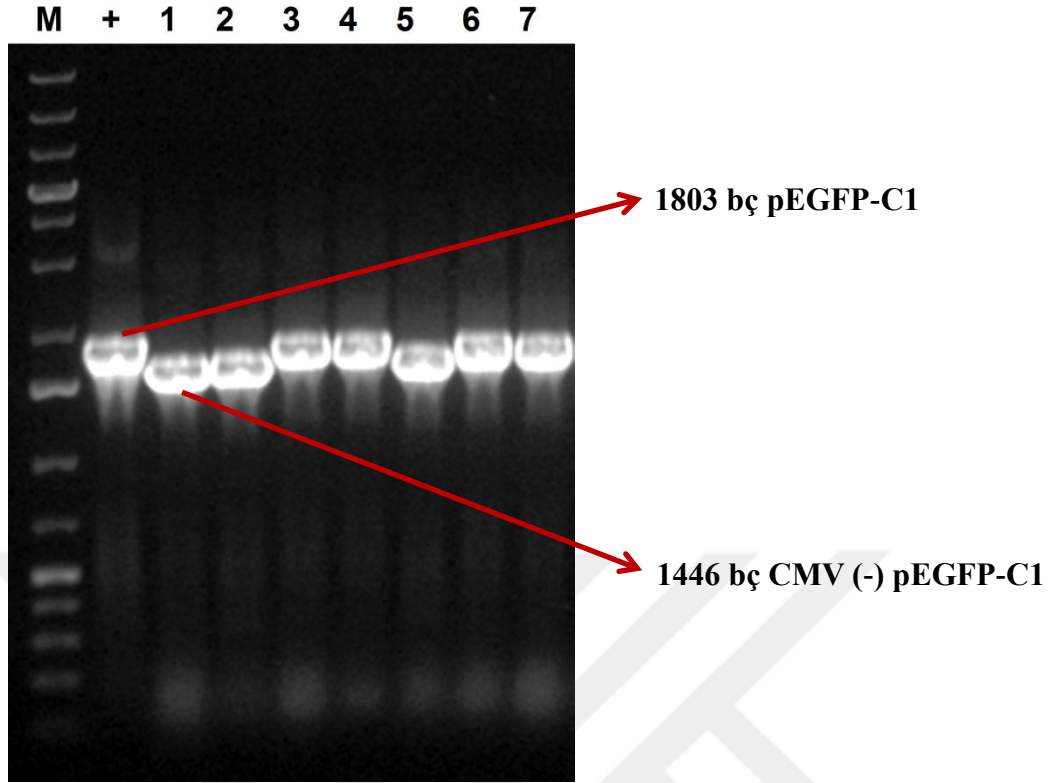
omurgasının agaroz jel elektroforezi sonrası alınmış jel görüntüsü şekil 4.27’de gösterilmiştir.



Şekil 4.27 pEGFP-C1 vektörünün NdeI ve NheI restriksiyon enzimleri ile kesilmesi sonrası oluşan ürünlerin agaroz jeldeki görüntüsü

M: belirteç DNA

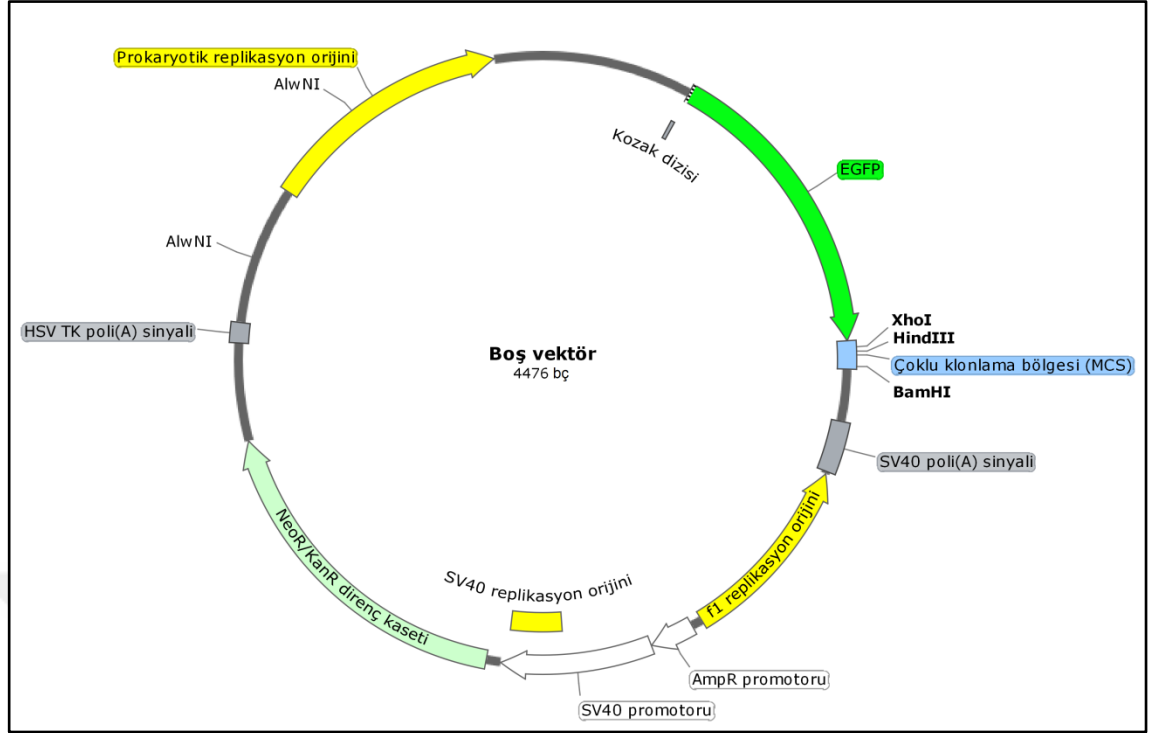
Jelden geri alınan ve spektrofotometrik olarak miktarı ve saflık derecesi belirlenen, 4374bc’lik pEGFP-C1 vektör omurgasını içeren linner parça, yöntem 3.2.19’da açıklandığı gibi “alternatif uç birleştirme” mekanizması ile halkasal hale gelmesi üzere yöntem 3.2.12’de açıklandığı gibi alıcı *E. coli* DH5Alpha suşuna aktarılmıştır (Chayot vd. 2010). CMV negatif transformantların belirlenebilmesi için, transformasyon sonrası oluşan transformantlardan rastgele seçilen yedi tanesi ile vektör omurgasında, sırayla, CMV promotoru ve CMV arttırıcı bölgelerinin yukarısına ve aşağısına bağlanan pUC Ori 3’-F ileri, F1 Ori 5’-R geri primerleri kullanılarak, yöntem 3.2.6’da açıklandığı gibi koloni PZT yapılmıştır. Yedi transformantla yapılan PZT sonrasında oluşan amplikonların agaroz jeldeki görüntüleri şekil 4.28’de verilmiştir.



Şekil 4.28 Ori 3'-F, F1 Ori 5'-R primerleri kullanılarak, yedi koloni ile yapılan koloni PZT sonrasında elde edilmiş olan ampikonların agaroz jeldeki görüntüleri

+: CMV arttırıcısı ve CMV promotorunu içeren pEGFP-C1 vektörü ile yapılan PZT sonrasında elde edilen ampikon, **M**: belirteç DNA

Sonuç olarak, taranan yedi transformant içerisinde, klon 1'in, klon 2'nin ve klon 5'in istenildiği üzere, CMV arttırıcısı ve CMV promotoru içermeyen vektörleri taşıdığı bulunmuştur. Bu aşamadan sonra, fare immünizasyon çalışmalarında, boş vektör olarak kullanılmak üzere, klon 1'in plazmiti, yöntem 3.2.8'de açıklandığı gibi izole edilmiştir. pEGFP-C1 vektöründen CMV arttırıcısı ve CMV promotoru çıkartılarak elde edilen boş vektörün haritası şekil 4.29'da verilmiştir.



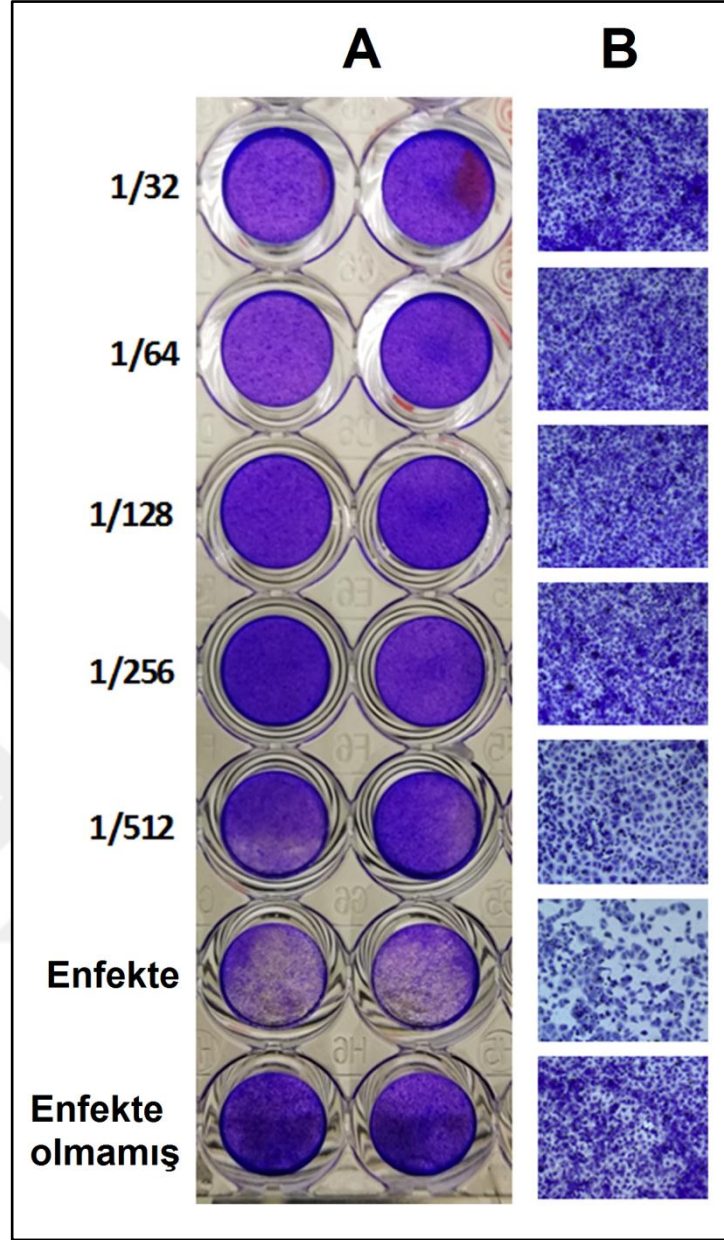
Şekil 4.29 Fare immünizasyon deneylerinde negatif kontrol olarak kullanılacak boş vektörün haritası

4.9 İmmün Olarak Yeterli, BALB/c Irkı Farelerin, pGc-VAC DNA Aşı Vektörü ile İmmünizasyonu ve Farelerde KKKAV Gc'ye Karşı Oluşturulan Hümorale ve Hücresele Bağışıklık Yanıtlarının Değerlendirilmesi

İmmün olarak yeterli BALB/c ırkı fareler, yöntem 3.2.20'de açıklandığı gibi, pGc-VAC DNA aşı vektörü ile aşılanmış ve her aşılamaadan iki hafta sonra, farelerden serum örnekleri toplanmıştır. Farelerin, pGc-VAC DNA aşı vektörü ile aşılanmaları sonrasında KKKAV Gc antijenine karşı geliştirdikleri hümorale yanıtlar, farelerde Gc antijenine karşı oluşturulan, KKKAV 2012KAST izolatını nötralize edici özellikte olan antikorların seviyeleri ve total IgG antikor seviyeleri belirlenerek değerlendirilmiştir. Ayrıca, aşılanmış farelerde, Gc antijenine karşı oluşturulan hücresele immün yanıtlar, farelerdeki Th1 ve Th2 hücreleri ile ilişkili olan sitokinlerin seviyeleri belirlenerek değerlendirilmiştir.

4.9.1 pGc-VAC DNA aşı vektörü ile bağışıklanmış, immün olarak yeterli, BALB/c ırkı farelerde, KKKAV KAST2012 izolatına karşı geliştirilen nötralize edici antikor yanıtlarının değerlendirilmesi

Yöntem 3.2.20’de açıklandığı gibi, pGc-VAC DNA aşı vektörü ile üç ardışık aşılama yapılan farelerin üçüncü aşılama sonrasında alınan serumlarında, KKKAV Gc glikoproteinine karşı bulunan ve KKKAV KAST2012 izolatını nötralize edici özellikte olan antikorların varlığı, yöntem 3.2.21’de açıklandığı gibi nötralizasyon deneyi yapılarak belirlenmiştir. Nötralizasyon deneyinin sonucunda, pGc-VAC DNA aşı vektörü ile bağışıklanmış olan farelerin serumlarında 2.4 Log₁₀ titrede KKKAV KAST2012 izolatını nötralize edici özellikte antikor bulundurduğu gözlenmiştir. pGc-VAC DNA aşı vektörü ile bağışıklanmış farelerin serumları ile KKKAV KAST2012 izolatı kullanılarak yapılan mikronötralizasyon deneyinin sonucu şekil 4.30’da verilmiştir.

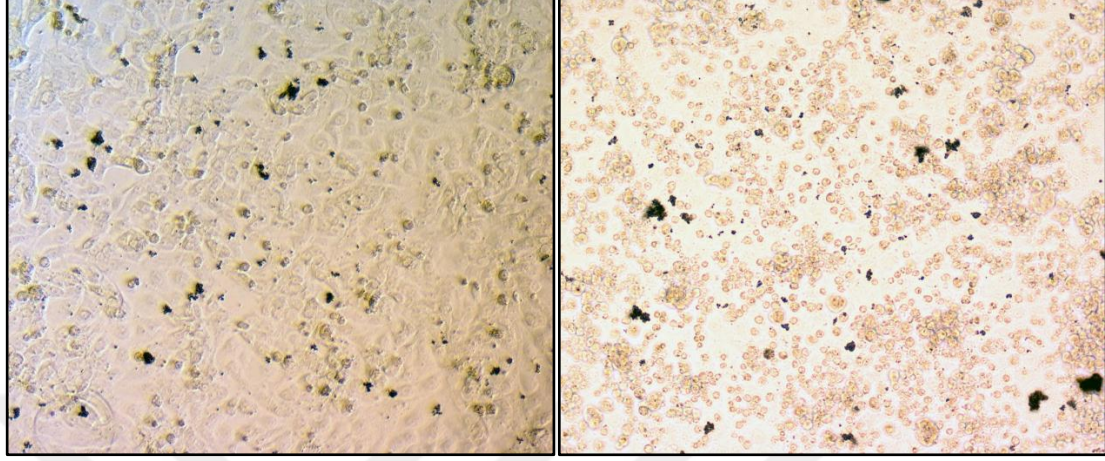


Şekil 4.30 pGC-VAC DNA aşı vektörü ile immunize edilmiş farelerden alınan serumlarda, KKKAV'ye özgü nötralize edici antikorların varlığının gösterilmesi

a. 96 kuyulu plakada iki tekrarlı (her bir kolon) olarak yapılan deneyin sonucunun fotoğraf makinesi ile alınmış genel görüntüsü, **b.** Her kuyudaki hücrelerin (her bir sıra) ışık mikroskopunda alınmış temsili görüntüsü

Yedi günlük inkübasyon sonunda, hücreler, yöntem 3.2.21'de açıklandığı gibi, formaldehit ile tespit edilmiş ve kristal viyole çözeltisi ile boyanmıştır.

KKKAV KAST2012 izolatu ile enfekte olmuş Vero E6 hücrelerinde meydana gelen sitopatik etkilerin gösterildiği mikroskop görüntüsü şekil 4.31’de verilmiştir.



A

B

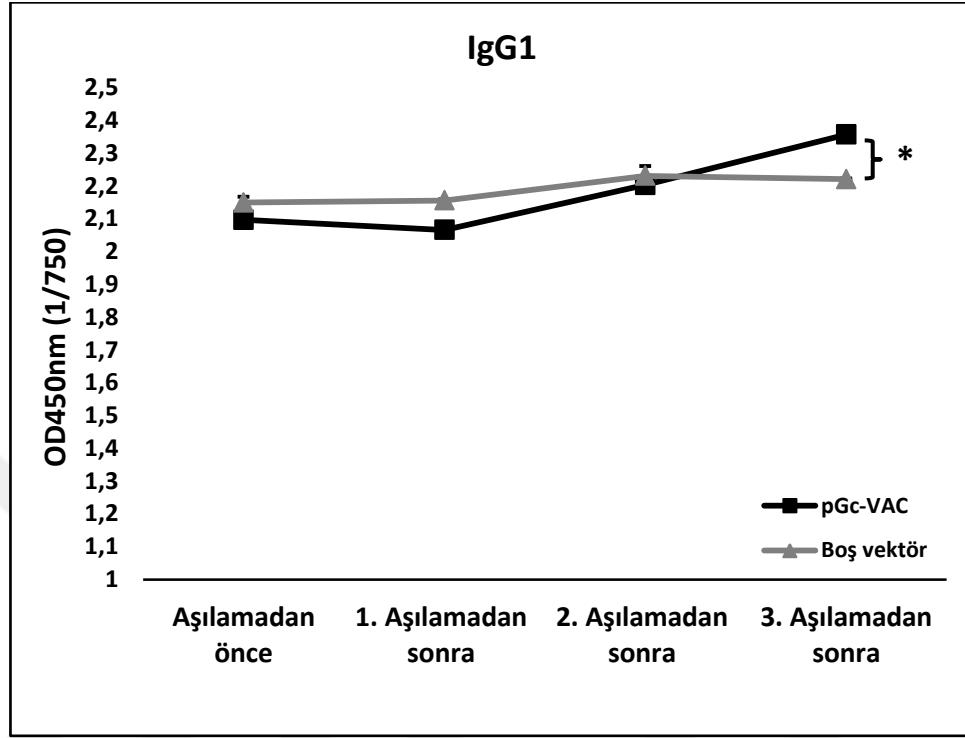
Şekil 4.31 KKKAV KAST2012 izolatu ile enfekte olmuş Vero E6 hücrelerinde meydana gelen sitopatik etkiler

a. Enfekte olmamış Vero E6 hücreleri, b. KKKAV KAST2012 izolatu ile enfekte olmuş Vero E6 hücreleri

4.9.2 pGc-VAC DNA aşı vektörü ile bağışıklanmış, immün olarak yeterli, BALB/c ırkı farelerde meydana gelen total antikor yanıtlarının değerlendirilmesi

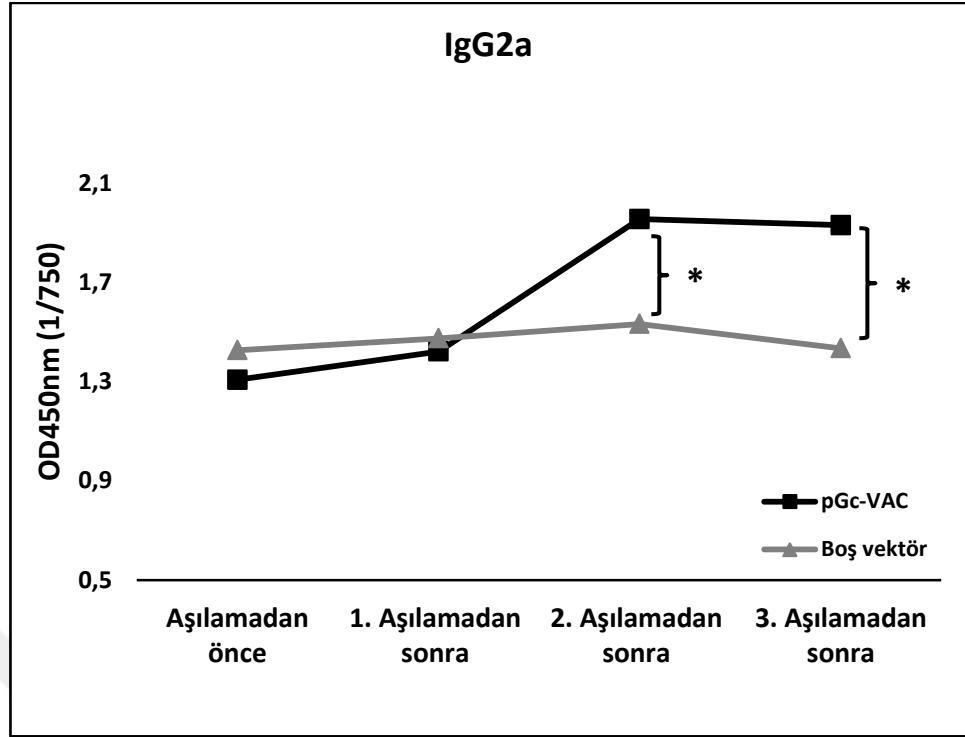
Yöntem 3.2.20’de açıklandığı gibi, pGc-VAC DNA aşı vektörü ile immün olarak yeterli BALB/c ırkı fareler aşılanmış ve her aşılamaadan iki hafta sonra farelerden serum örnekleri toplanmıştır. Farelerden, aşılama öncesinde ve her aşılamaadan sonra alınan serum örneklerindeki total IgG antikor izotip seviyeleri, yöntem 3.2.22’e açıklandığı gibi belirlenmiştir. Boş vektör alan farelerle karşılaştırıldığında, pGc-VAC DNA aşı vektörü ile bağışıklanan farelerde, IgG1, IgG2a ve IgG2b antikor izotiplerinin seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir. Öte yandan, immün yanıtların çözülmesi ile ilişkili olan IgG3 antikorlarının seviyesinde, aşılanmış farelerde, boş vektör alan farelere göre anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir. Genel olarak, pGc-VAC DNA aşı vektörü ile aşılanan farelerin total IgG1 ve IgG2 antikor seviyeleri, ikinci aşılama ve üçüncü aşılama sonrasında artış eğilimi göstermiştir. Bu artış, özellikle IgG2 izotiplerinde daha belirgin olarak gözlenmiştir. Aşı rejimi boyunca, farelerin, total

IgG izotip seviyelerinde meydana gelen değişimler, çizgi grafiği olarak, şekil 4.32-4.35’de verilmiştir.



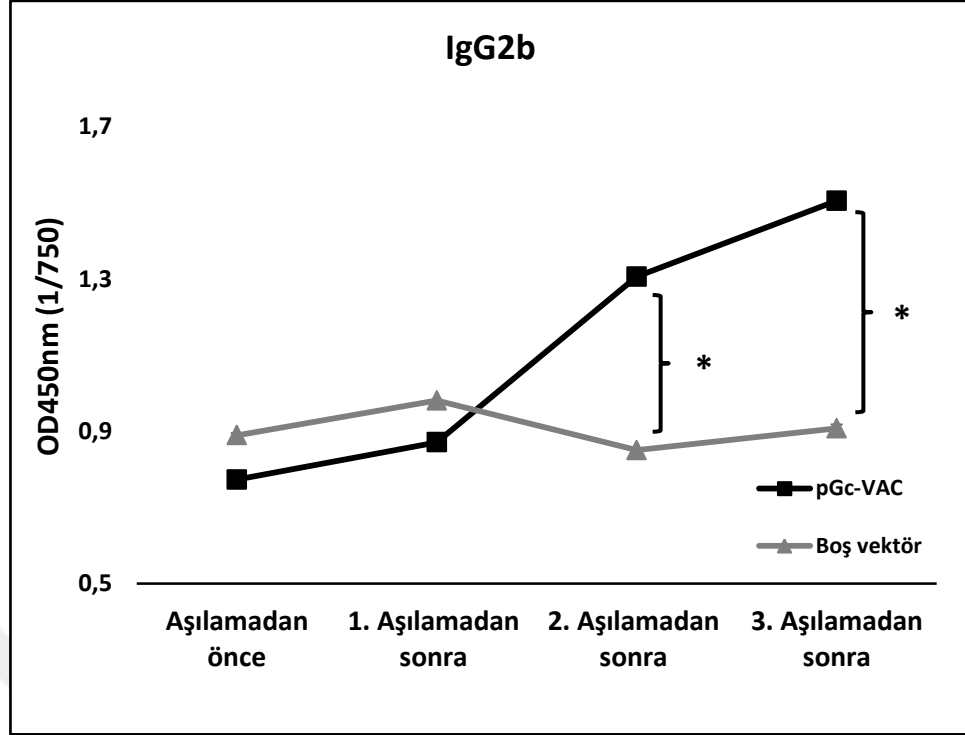
Şekil 4.32 pGc-VAC DNA aşı vektörü ile bağışıklanan, immün olarak yeterli BALB/c ırkı farelerin, aşı rejimi boyunca, serum total IgG1 antikor seviyelerinde meydana gelen değişiklikler

*Üçüncü aşılama sonrası alınan serum örneklerindeki, IgG1 antikor seviyesi, boş vektör alan farelere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek çıkmıştır (tek yönlü ANOVA testine göre $p < 0.001$).



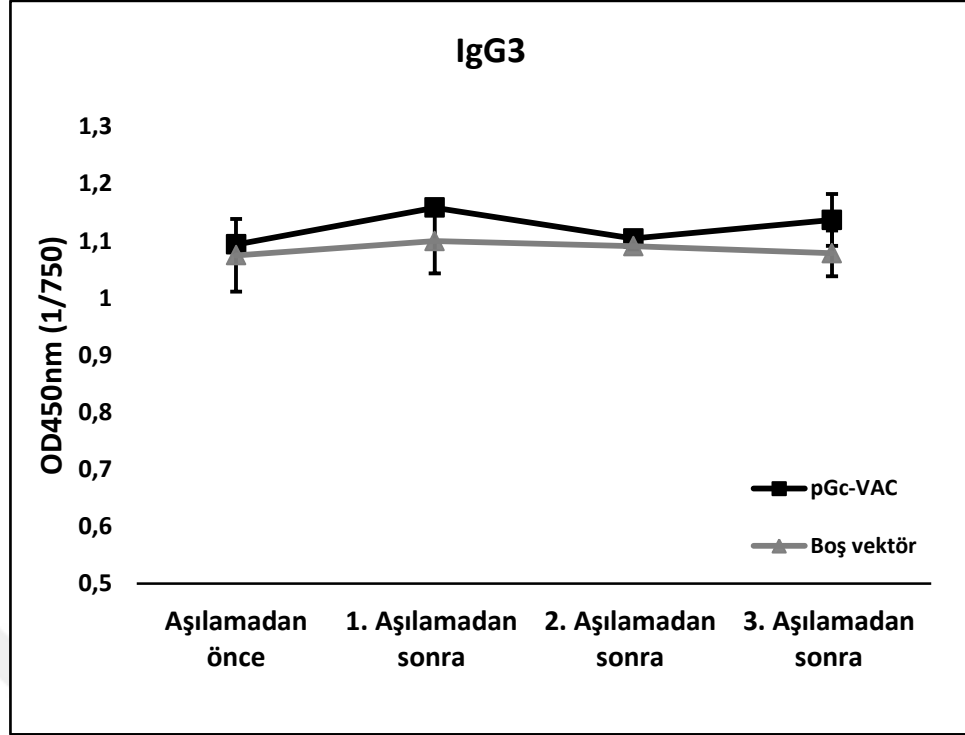
Şekil 4.33 pGc-VAC DNA aşı vektörü ile bağışıklanan, immün olarak yeterli BALB/c ırkı farelerin, aşı rejimi boyunca, serum total IgG2a antikor seviyelerinde meydana gelen değişiklikler

*İkinci ve üçüncü aşılama sonrası alınan serum örneklerindeki, IgG2a antikor seviyesi, boş vektör alan farelere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek çıkmıştır (tek yönlü ANOVA testine göre $p < 0.001$).



Şekil 4.34 pGc-VAC DNA aşı vektörü ile bağışıklanan, immün olarak yeterli BALB/c ırkı farelerin, aşı rejimi boyunca, serum total IgG2b antikor seviyelerinde meydana gelen değişiklikler

*İkinci ve üçüncü aşılamadan sonra alınan serum örneklerindeki, IgG2b antikor seviyesi, boş vektör alan farelere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek çıkmıştır (tek yönlü ANOVA testine göre $p < 0.001$).



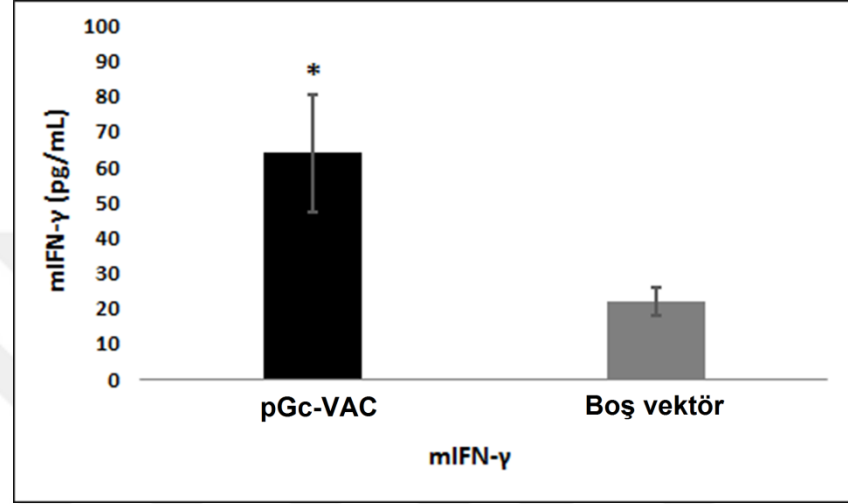
Şekil 4.35 pGc-VAC DNA aşı vektörü ile bağışıklanan, immün olarak yeterli BALB/c ırkı farelerin, aşı rejimi boyunca, serum total IgG3 antikor seviyelerinde meydana gelen değişiklikler

*Aşılama rejimi boyunca alınan serum örneklerindeki, IgG3 antikor seviyesi, boş vektör alan farelere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık göstermemiştir (tek yönlü ANOVA testine göre $p>0.05$).

4.9.3 pGc-VAC DNA aşı vektörü ile bağışıklanmış, immün olarak yeterli, BALB/c ırkı farelerde meydana gelen hücresel immün yanıtların, serum sitokin seviyelerinin belirlenmesi ile değerlendirilmesi

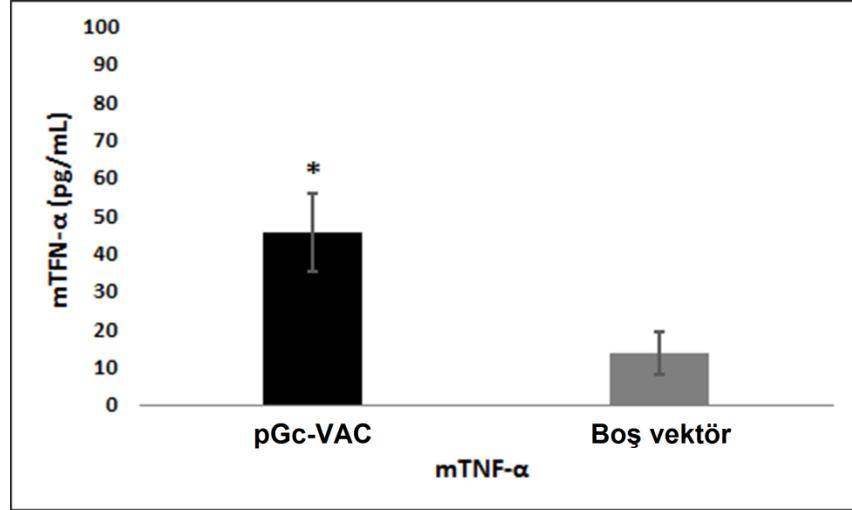
Yöntem 3.2.20’de açıklandığı gibi, pGc-VAC DNA aşı vektörü ile aşılanmış farelerde gelişen hücresel immün yanıtlar, yöntem 3.2.23’te açıklandığı gibi, farelerin üçüncü aşılama sonrasında alınan serumlarındaki Th1 ve Th2 hücreleri ile ilişkili olan sitokinlerin seviyeleri belirlenmiştir. Aşılanmış farelerin serumlarında, Th1 lenfositleri ile ilişkili interferon gama ($IFN-\gamma$), tümör nekroz faktörü alfa ($TNF-\alpha$) ve interlökin 2 ($IL2$) sitokinlerinin seviyeleri, Th2 lenfositleri ile ilişkili olarak ise interlökin 4 ($IL4$) ve interlökin 10 ($IL10$) sitokinlerinin seviyeleri belirlenmiştir. Sonuç olarak, pGc-VAC DNA aşı vektörü ile aşılanmış farelerin serumlarında, boş vektör almış farelere göre hem Th1 hem de Th2 hücreleri ile ilişkili sitokinlerin seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir. Dolayısıyla, pGc-VAC DNA aşı vektörü, immün olarak

yeterli BALB/c ırkı farelerde, dengelenmiş Th1/Th2 hücresel immün yanıtları uyarmıştır. pGc-VAC DNA aşı vektörü ile bağışıklanmış farelerin serumlarındaki Th1 ve Th2 hücreleri ile ilişkili sitokinlerin seviyeleri, boş vektör almış olan farelerinki ile karşılaştırmalı bir şekilde bar grafiği olarak şekil 4.36, 4.37, 4.38, 4.39 ve 4.40'ta verilmiştir.



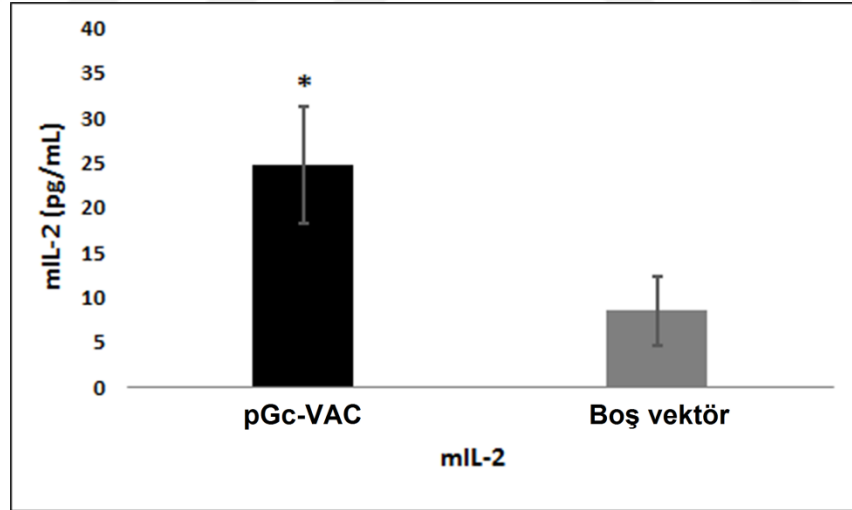
Şekil 4.36 pGc-VAC DNA aşı vektörü ile üç defa aşılanmış immün olarak yeterli BALB/c ırkı farelerin serumlarındaki interferon gama (IFN- γ) seviyesi

*pGc-VAC DNA aşı vektörü ile bağışıklanmış farelerin serum örneklerindeki, IFN- γ seviyesi, boş vektör alan farelere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek çıkmıştır (Mann Whitney U testine göre $p=0,043$).



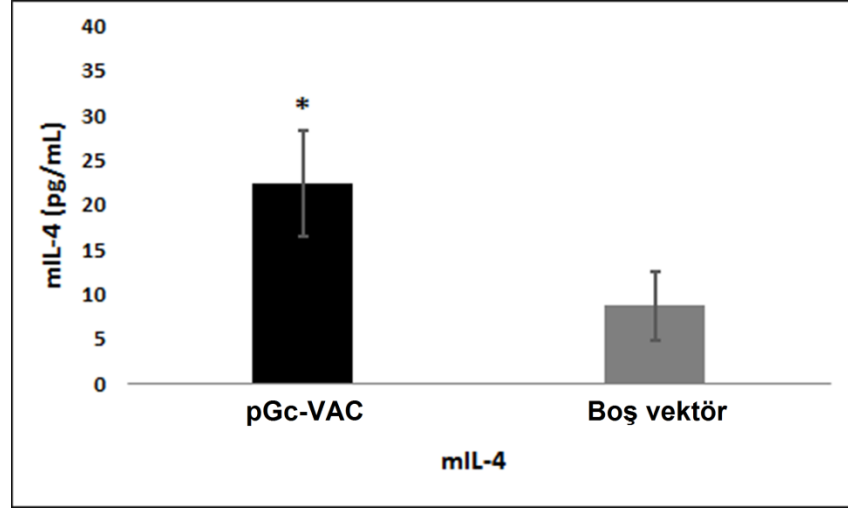
Şekil 4.37 pGc-VAC DNA aşı vektörü ile üç defa aşılanmış immün olarak yeterli BALB/c ırkı farelerin serumlarındaki tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) seviyesi

*pGc-VAC DNA aşı vektörü ile bağışıklanmış farelerin serum örneklerindeki, TNF- α seviyesi, boş vektör alan farelere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek çıkmıştır (Mann Whitney U testine göre $p=0,019$).



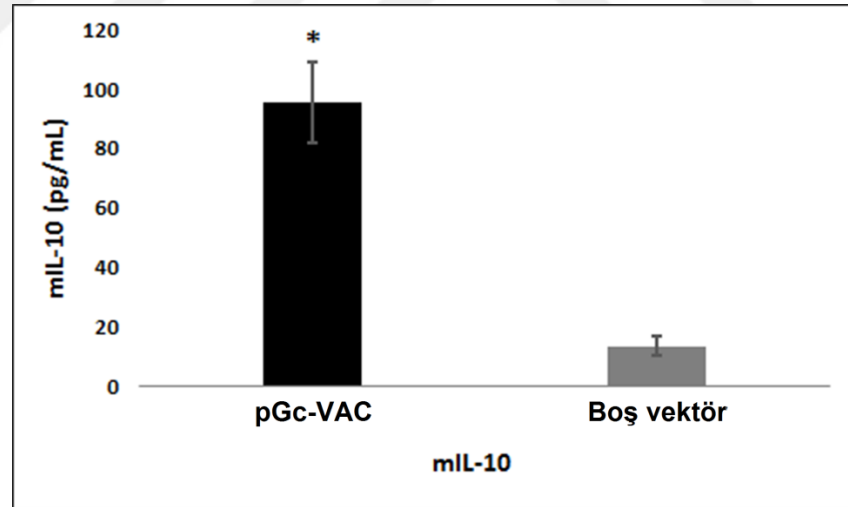
Şekil 4.38 pGc-VAC DNA aşı vektörü ile üç defa aşılanmış immün olarak yeterli BALB/c ırkı farelerin serumlarındaki interlökin 2 (IL2) seviyesi.

*pGc-VAC DNA aşı vektörü ile bağışıklanmış farelerin serum örneklerindeki, IL2 seviyesi, boş vektör alan farelere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek çıkmıştır (Mann Whitney U testine göre $p=0,031$).



Şekil 4.39 pGc-VAC DNA aşı vektörü ile üç defa aşılanmış immün olarak yeterli BALB/c ırkı farelerin serumlarındaki interlökin 4 (IL4) seviyesi

*pGc-VAC DNA aşı vektörü ile bağışıklanmış farelerin serum örneklerindeki, IL4 seviyesi, boş vektör alan farelere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek çıkmıştır (Mann Whitney U testine göre $p=0,019$).



Şekil 4.40 pGc-VAC DNA aşı vektörü ile üç defa aşılanmış immün olarak yeterli BALB/c ırkı farelerin serumlarındaki interlökin 10 (IL10) seviyesi

*pGc-VAC DNA aşı vektörü ile bağışıklanmış farelerin serum örneklerindeki, IL10 seviyesi, boş vektör alan farelere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek çıkmıştır (Mann Whitney U testine göre $p=0,031$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

KKKA, coğrafik olarak, en geniş yayılış alanına sahip kene kaynaklı viral zoonozdur. Endemik bölgelerin genişlemesi ve yeni endemik odak noktalarının ortaya çıkması, ilaveten, yıllık vaka sayılarındaki devam eden artış, KKKA'nın, halk sağlığı üzerindeki etkisini ortadan kaldırmak için, acil olarak etkili korunma önlemlerinin geliştirilmesini öncelikli yapmaktadır. KKKA'nın etkili tedavisinin, kaçınılmaz olarak özgün terapötik ajanların geliştirilmesini gerekli kılıyor olması bir yana, aşılama, hastalığın kontrol altına alınması için uygulanabilecek en akla yatkın strateji gibi görünmektedir. KKKA'ya karşı deneysel aşı geliştirilmesi ve etkinliğinin değerlendirilmesi üzerine yapılan son çalışmalar, umut vaat edici sonuçlar ortaya koymaktadır (Buttigieg vd. 2014, Garrison vd. 2017, Hinkula vd. 2017, Çanakoğlu vd. 2015). Ancak şuan için, KKKA'ya karşı kullanılacak, kolaylıkla ulaşılabilir, uluslararası olarak onay almış, güvenli ve etkili bir aşı bulunmamaktadır. Bu sebeple, farklı aşılama yaklaşımlarının bağışıklama ve koruyucu özelliklerinin belirlenebilmesi açısından, KKKA'ya karşı aşı geliştirilmesi, günümüzde faal olarak çalışılan bir araştırma konusudur.

Bu tez çalışmasında, Türkiye kökenli KKKAV KAST2012 izolatının Gc glikoproteinini kodlayan bir DNA aşı vektörü oluşturulmuş ve bu vektörün, immün olarak yeterli BALB/c ırkı fareleri bağışıklama özellikleri değerlendirilmiştir. Tez çalışmasında kullanılan, KKKAV KAST2012 izolatına ait Gc glikoproteininin amino asit dizisi temelinde yapılan filogenetik analizler, bu proteinin en yakın akrabalarının, Türkiye kökenli, KKKAV Kelkit06 and KKKAV Turkey200310849 suşları olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu sonuç şaşırtıcı değildir; çünkü KKKAV KAST2012 izolatı da Türkiye'de yaşayan, KKKA'lı bir hastadan izole edilmiştir. pEGFP-C1-Gc vektörü tarafından, EGFP ile füzyon ürünü oluşturacak şekilde kodlanan Gc glikoproteininin *in vitro* olarak ifadesi, transfeksiyonu yapılmış BHK-21 hücrelerinde, hem floresan mikroskopisi ve western blot yöntemleri kullanılarak protein seviyesinde hem de RT-PZT yöntemi kullanılarak transkript (mRNA) seviyesinde gösterilmiştir (Şekil 4.14, Şekil 4.16 - 4.17). pGc-VAC-8xHistag vektörü tarafından, N ucunda 8x histidin etiketi taşıyacak şekilde kodlanan Gc glikoproteininin *in vitro* ifadesi de, fare immünizasyon deneylerine geçilmeden önce, transfeksiyonu yapılmış BHK-21 hücrelerinde, western

blot yöntemi kullanılarak protein seviyesinde doğrulanmıştır (Şekil 4.26). Bu *in vitro* ifade çalışmalarında, western blot'u ve RT-PZT'yi içeren alt analizlerde sinyal artışını sağlamak amacıyla, kararlı olarak transfekte olmuş hücreler oluşturulmuştur.

pGc-VAC DNA aşısı vektörü ile aşılanmış farelerde meydana gelen antikor yanıtları, farelerin serum örneklerinde, KKKAV KAST2012 izolatını nötralize edici antikorların varlığı ve total IgG antikor izotiplerinin seviyeleri belirlenerek değerlendirilmiştir (Şekil 4.30, Şekil 4.32-4.35). Farelerin, pGc-VAC DNA aşısı vektörü ile üç defa ardışık olarak aşılanmaları, mikronötralizasyon deneyinin sonucundan anlaşılacağı üzere, oldukça yüksek seviyede nötralize edici antikor yanıtı sağlamıştır. KKKAV'nin klinik izolatlarının, Vero hücresini de dahil olmak üzere, çeşitli duyarlı hücre hatlarında, mikroskopik olarak farkedilebilecek sitopatik etkilere (CPE) yol açmadığını belirten önceki çalışmaların aksine, bu tez çalışmasında, KKKAV KAST2012 izolatının, enfekte olmuş VeroE6 hücrelerinde, bir haftalık bir zaman diliminde, belirgin sitopatik etkiler meydana getirebildiği gözlenmiştir (Connolly-Andersen vd. 2007, Çanakoğlu vd. 2013, Bergeron vd. 2015) (Şekil 4.31). KKKAV KAST2012 izolatının, VeroE6 hücrelerinde sitopatik etki oluşturabilme kabiliyeti, bağışık farelerin serumlarının, virüs aracılı sitopatik etkilere karşı koruyucu etkisi değerlendirilerek yorumlanabilecek bir mikronötralizasyon deneyini kurabilmemize olanak sağlamıştır. pGc-VAC DNA aşısı vektörü ile aşılanmış olan her iki farede, 1/256 seyreltme faktörüne karşılık gelen, 2,4 Log₁₀ kadar yüksek titrede nötralize edici antikor yanıtı elde edilmiştir (Şekil 4.30). pGc-VAC DNA aşısı vektörü ile aşılanmış olan farelerde, antikor yanıtlarını, izotip düzeyinde değerlendirdiğimizde, aşılanmış her iki farenin de, total IgG1 ve total IgG2 antikor seviyeleri artmış olarak bulunmuştur. Ancak aşılanmış farelerin total antikor seviyelerinde gözlenen bu artış, total IgG1 antikor izotipinin seviyesinde hafif olarak meydana gelmekle birlikte, total IgG2a ve IgG2b antikor izotiplerinde görece daha belirgin bir şekilde meydana gelmiştir (Şekil 4.32 - 4.34). pGc-VAC DNA aşısı vektörü ile aşılanan farelerde, total IgG2 izotiplerinin seviyesi, özellikle ilk rapel (boost) aşılama sonrası, boş vektör alan farelere göre belirgin bir şekilde yükselmiş olarak bulunmuştur (Şekil 4.33 ve Şekil 4.34). pGc-VAC DNA aşısı vektörü ile aşılanan farelerdeki total IgG izotipleri içerisinde seviyesi en belirgin biçimde artmış olanlardan bir tanesi, Th1 tipi hücresel immün yanıtlarla ilişkili olduğu bilinen IgG2a izotipi

olmuştur (Snapper ve Paul 1987, Finkelman vd. 1990). Öte yandan IgG3 antikor izotipinin seviyesinde, pGc-VAC DNA aşı vektörü ile aşılanan farelerde, boş vektör alan farelere göre, istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 4.35). Kompleman aktivasyonundaki tartışmalı rollerinden başka, IgG1, IgG2a and IgG2b yanıtları, etkilerini, Fc almasına (reseptörüne) bağımlı olarak, dendritik hücrelerce T hücrelerine yapılan antijen sunumunu arttırması ile gösteriyor olabilir (Sörman vd. 2014). Ayrıca, pGc-VAC DNA aşı vektörü ile aşılanan farelerin serumlarında bulunan nötralize edici antikorların, tüm IgG izotipleri içerisinde görece fazla oranda bulunması ile orantılı olarak, ekseriyetle IgG2a izotiplerini içermesi olasılık dahilindedir.

pGc-VAC DNA aşı vektörü ile aşılanan farelerde oluşan sitokin yanıtları değerlendirildiğinde, üç ardışık aşılama yapılan farelerin serum örneklerinde, boş vektör alan farelerinkine kıyasla, hem Th1 hücreleri ile hem de Th2 hücreleri ile ilişkili sitokinlerin seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı artışlar gözlenmiştir (Şekil 4.36-4.40). Bu sitokin yanıtına göre, pGc-VAC DNA aşı vektörü ile aşılanan fareler, dengelenmiş Th1/Th2 hücrel immün yanıtlarını meydana getirmiş gibi görünmektedir. pGc-VAC DNA aşı vektörü ile aşılanan farelerde oluşturulan dengelenmiş Th1/Th2 hücrel immün yanıtlar, farelerin total antikor yanıtları ile uyumlu görünmektedir. Çünkü, sırasıyla Th1 ve Th2 hücrel immün yanıtların kontrolü altında olan IgG2a ve IgG1 antikor seviyelerinin her ikisi de pGc-VAC DNA aşı vektörü ile aşılanan farelerde boş vektör alan farelere göre yükselmiş olarak bulunmuştur (Şekil 4.32 - 4.33). Th1'e meyilli veya dengelenmiş Th1/Th2 hücrel immün yanıtların geliştirilmesi, bağışıklamada kullanılan antijenin tipine bağlı olabilir (Loomis ve Johnson 2013). Örneğin, solunum sinsityal virüsüne (RSV) karşı DNA aşısı geliştirilmesi üzerine yapılan çalışmalarda, RSV'nin füzyon (F) yüzey glikoproteinini hedef alan DNA aşılarının, aşılanmış fare modellerinde Th1'e meyilli hücrel immün yanıtları uyardığı gözlenirken, aynı virüsün, hücre yüzeyine tutunmadan sorumlu olan (G) yüzey glikoproteinini hedef alan DNA aşılarının, aşılanmış fare modellerinde, dengelenmiş Th1/Th2 hücrel immün yanıtlarını ortaya çıkardığı gözlenmiştir (Li vd. 2000, Ma vd 2018). Farklı patojen antijenlerini hedef alan DNA tabanlı aşılardan meydana getirdiği dengelenmiş Th1/Th2 hücrel immün yanıtların hastalıktan koruma özellikleri, çeşitli

in vivo enfeksiyon deneylerinde gösterilmiştir. pGc-VAC DNA aşı vektörünün, IFNAR^{-/-} farelerde benzer immün yanıtları oluşturup oluşturmayacağı ve aşının, aynı fare modelini, ölümcül enfeksiyondan korumadaki kabiliyeti, ileriki çalışmalarımızda ele alınacak ve sorgulanacaktır.

KKKA, kene kaynaklı olarak ortaya çıkan ve yeniden ortaya çıkan, Asya, Avrupa ve Afrika kıtalarında olmak üzere çok geniş bir yayılım alanına sahip olan arboviral bir hastalıktır. KKKA, özellikle ülkemizde son 16 yıldır halk sağlığını ciddi bir şekilde tehdit etmektedir. Tarımsal faaliyetlerin geniş ölçüde yer aldığı ülkemizde, hastalığın kontrol altına alınması aciliyet arz etmektedir ve kontrol önlemlerinin en başında da hastalık için güvenilirliği ve etkinliği yüksek olan aşılarda geliştirilmesi gerekmektedir. Bu amaç için DNA tabanlı aşı yaklaşımlarının kullanılması, bugüne kadar KKKA için deneysel olarak geliştirilmiş olanları da dahil olmak üzere bu aşı yaklaşımının çeşitli enfektif hastalıklar için yürütülmüş olan klinik denemeleri umut vaat etmektedir (Wahren ve Liu 2014, Garrison vd. 2017, Hinkula vd. 2017). Bu tez çalışması, Türkiye kökenli bir KKKAV suşunun immünodominant antijenlerinden biri olan olgun Gc glikoproteinini hedef alan, DNA tabanlı bir aşı olarak kullanılabilecek bir vektörün geliştirildiği ve bu vektörün immünokompetent fare modelinde immünize edici özelliklerinin gösterildiği ilk çalışmadır.

KAYNAKLAR

- Adam, I.A., Mahmoud, M.A.M. and Aradaib, I.E. 2013. A seroepidemiological survey of Crimean Congo hemorrhagic fever among cattle in North Kordufan State, Sudan. *Virology Journal*, 10(1); 178.
- Ahmed, A.A., McFalls, J.M., Hoffmann, C., Filone, C.M., Stewart, S.M., Paragas, J., Khodjaev, S., Shermukhamedova, D., Schmaljohn, C.S., Doms, R.W. and Bertolotti-Ciarlet, A. 2005. Presence of broadly reactive and group-specific neutralizing epitopes on newly described isolates of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Journal of General Virology*, 86; 3327–36.
- Aker, S., Akinci, H., Kilicoglu, C. and Leblebicioglu, H. 2015. The geographic distribution of cases of Crimean-Congo hemorrhagic fever: Kastamonu, Turkey. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 6(6); 730-736.
- Akinci, E., Yilmaz, M., Bodur, H., Onguru, P., Bayazit, F.N., Erbay, A. and Ozet, G., 2009. Analysis of lymphocyte subgroups in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *International Journal of Infectious Diseases*, 13(5); 560-563.
- Akutsu, M., Ye, Y., Virdee, S., Chin, J.W. and Komander, D. 2011. Molecular basis for ubiquitin and ISG15 cross-reactivity in viral ovarian tumor domains. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, 108(6); 2228–2233.
- Al-amri, S.S., Abbas, A.T., Siddiq, L.A., Alghamdi, A., Sanki, M.A., Al-Muhanna, M.K., Alhabbab, R.Y., Azhar, E.I., Li, X. and Hashem, A.M. 2017. Immunogenicity of candidate MERS-CoV DNA vaccines based on the spike protein. *Scientific Reports*, 7; 44875.
- Albariño, C.G., Bird, B.H. and Nichol, S.T. 2007. A shared transcription termination signal on negative and ambisense RNA genome segments of Rift Valley fever, sandfly fever Sicilian, and Toscana viruses. *Journal of Virology*, 81(10); 5246–5256.
- Allan, S. 2010. Chemical ecology of tick-host interactions, In: *Ecology and Control of Vector-Borne Diseases*. Takken, W. and Knols, B.J.G. (eds), Wageningen Academic Publishers, 327-348, Netherlands.
- Altamura, L.A., Bertolotti-Ciarlet, A., Teigler, J., Paragas, J., Schmaljohn, C.S. and Doms, R.W. 2007. Identification of a novel C-terminal cleavage of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus PreGN that leads to generation of an NSM protein. *Journal of Virology*, 81(12); 6632–6642.
- Anagnostou, V. and Papa, A. 2009. Evolution of Crimean–Congo hemorrhagic fever virus. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(5); 948–54.

- Andersson, I., Lundkvist, A., Haller, O. and Mirazimi, A. 2006. Type I interferon inhibits Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in human target cells. *Journal of Medical Virology*, 78(2); 216–222.
- Andersson, I., Simon, M., Lundkvist, A., Nilsson, M., Holmström, A., Elgh, F. and Mirazimi, A. 2004a. Role of actin filaments in targeting of Crimean Congo hemorrhagic fever virus nucleocapsid protein to perinuclear regions of mammalian cells. *Journal of Medical Virology*, 72(1); 83–93.
- Andersson, I., Bladh, L., Mousavi-jazi, M., Magnusson, K., Lundkvist, A., Haller, O. and Mirazimi, A. 2004b. Human MxA protein inhibits the replication of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Journal of Virology*, 78(8); 4323–4329.
- Anonymous. 2000. Web Sitesi: <https://web.stanford.edu/group/virus/pox/2000/b6.gif>, Erişim Tarihi: 20.05.2018.
- Anonymous. 2006. Editorial team, Increase in Cases of Crimean-Congo Haemorrhagic Fever, Turkey, 2006. *Eurosurveillance*, 11(29); 3003.
- Anonymous. 2013. Web Sitesi: <http://dogalhayat.org/property/hyalomma-marginatum/>, Erişim Tarihi: 20.05.2018.
- Anonymous. 2016. Web Sitesi: <http://ekmud.org.tr/sunum/indir/145-dunyada-ve-turkiyede-kirim-kongo-kanamali-atesi-kkka-epidemiyojisi-ve-thskda-yurutulen-calismalar>, Erişim Tarihi: 20.05.2018.
- Anonymous. 2018a. Web Sitesi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MG969426.1/>, Erişim Tarihi: 20.05.2018.
- Anonymous. 2018b. Web Sitesi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MG969426.1/>, Erişim Tarihi: 20.05.2018.
- Aşçıoğlu, S., Leblebicioglu, H., Vahaboglu, H. and Chan, K.A. 2011. Ribavirin for patients with Crimean-Congo haemorrhagic fever: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(6); 1215-1222.
- Bakir, M., Ugurlu, M., Dokuzoguz, B., Bodur, H., Tasyaran, M.A. and Vahaboglu, H. 2005. Crimean-Congo haemorrhagic fever outbreak in Middle Anatolia: a multicentre study of clinical features and outcome measures. *Journal of Medical Microbiology*, 54(4); 385-9.
- Barnwal, B., Karlberg, H., Mirazimi, A. and Tan, Y.J. 2015. Non-structural protein of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus disrupts mitochondrial membrane potential and induces apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 291(2); 582–592.

- Beaucourt, S. and Vignuzzi, M. 2014. Ribavirin: a drug active against many viruses with multiple effects on virus replication and propagation. Molecular basis of ribavirin resistance. *Current Opinion in Virology*, 8; 10-15.
- Bente, D.A., Alimonti, J.B., Shieh, W.J., Camus, G., Ströher, U., Zaki, S. and Jones, S.M. 2010. Pathogenesis and immune response of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in a STAT-1 knockout mouse model. *Journal of virology*, 84(21); 11089-11100.
- Bente, D.A., Forrester, N.L., Watts, D.M., McAuley, A.J., Whitehouse, C.A. and Bray, M. 2013. Crimean-Congo hemorrhagic fever: history, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity. *Antiviral Research*, 100(1); 159-189.
- Bereczky, S., Lindegren, G., Karlberg, H., Åkerström, S., Klingström, J. and Mirazimi, A. 2010. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infection is lethal for adult type I interferon receptor-knockout mice. *Journal of General Virology*, 91(6); 1473-1477.
- Bergeron, E., Vincent, M.J. and Nichol, S.T. 2007. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus glycoprotein processing by the endoprotease SKI-1/S1P is critical for virus infectivity. *Journal of Virology*, 81(23); 13271–13276.
- Bergeron, E., Albarrino, C.G., Khristova, M.L. and Nichol, S.T. 2010. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus-encoded ovarian tumor protease activity is dispensable for virus RNA polymerase function. *Journal of Virology*, 84(1); 216–226.
- Bergeron, É., Zivcec, M., Chakrabarti, A.K., Nichol, S.T., Albarrino, C.G. and Spiropoulou, C.F. 2015. Recovery of recombinant Crimean Congo hemorrhagic fever virus reveals a function for non-structural glycoproteins cleavage by furin. *PLoS pathogens*, 11(5); e1004879.
- Bertolotti-Ciarlet, A., Smith, J., Strecker, K., Paragas, J., Altamura, L.A., McFalls, J.M., Frias-Stäheli, N., García-Sastre, A., Schmaljohn, C.S. and Doms, R.W. 2005. Cellular localization and antigenic characterization of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus glycoproteins. *Journal of Virology*, 79(10); 6152–6161.
- Bodur, H., Akinci, E., Onguru, P., Uyar, Y., Basturk, B., Gozel, M.G. and Kayaaslan, B.U. 2010. Evidence of vascular endothelial damage in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *International Journal of Infectious Diseases*, 14(8); 704-708.
- Bodur, H., Erbay, A., Akinci, E., Onguru, P., Bayazit, N., Eren, S.S. and Kubar, A. 2011. Effect of oral ribavirin treatment on the viral load and disease progression in Crimean- Congo hemorrhagic fever. *International Journal of Infectious Diseases*, 15(1); 44-47.

- Bodur, H., Akinci, E., Ascioğlu, S., Onguru, P. and Uyar, Y. 2012. Subclinical infections with Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Emerging infectious diseases*, 18(4); 640-642.
- Booth, T.F., Gould, E.A. and Nuttall, P.A. 1991. Structure and morphogenesis of Dugbe virus (Bunyaviridae, Nairovirus) studied by immunogold electron microscopy of ultrathin cryosections. *Virus Research*, 21(3); 199–212.
- Bowden, T.A., Bitto, D., McLees, A., Yeromonahos, C., Elliott, R.M. and Huiskonen J.T. 2013. Orthobunyavirus ultrastructure and the curious tripodal glycoprotein spike. *PLoS Pathogens*, 9(5); e1003374.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2); 248-254.
- Bray, M. and Mahanty, S. 2003. Ebola hemorrhagic fever and septic shock. *Journal of Infectious Diseases*, 188(11); 1613-1617.
- Burt, F.J., Leman, P.A., Abbott, J.C. and Swanepoel, R. 1994. Serodiagnosis of Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Epidemiology and Infection*, 113(3); 551-562.
- Burt, F.J., Swanepoel, R., Shieh, W.J., Smith, J.F., Leman, P.A., Greer, P.W., Coffield, L.M., Rollin, P.E., Ksiazek, T.G., Peters, C.J. and Zaki, S.R. 1997. Immunohistochemical and in situ localization of Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) virus in human tissues and implications for CCHF pathogenesis. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 121(8); 839-846.
- Burt, F.J., Swanepoel, R. and Braack, L.E.O. 2009. Enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibody to Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in the sera of livestock and wild vertebrates. *Epidemiology and Infection*, 111(3); 547–558.
- Burt, F.J., Samudzi, R.R., Randall, C., Pieters, D., Vermeulen, J. and Knox, C.M. 2013. Human defined antigenic region on the nucleoprotein of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus identified using truncated proteins and a bioinformatics approach. *Journal of Virological Methods*, 193(2); 706–712.
- Buttigieg, K.R., Dowall, S.D., Findlay-Wilson, S., Miloszezewska, A., Rayner, E., Hewson, R., and Carroll, M.W. 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.
- Capodagli, G.C., McKercher, M.A., Baker, E.A., Masters, E.M., Brunzelle, J.S. and Pegan, S.D. 2011. Structural analysis of a viral ovarian tumor domain protease from the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in complex with covalently bonded ubiquitin. *Journal of Virology*, 85(7); 3621–3630.

- Carter, S.D., Surtees, R., Walter, C.T., Ariza, A., Bergeron, É., Nichol, S.T., Hiscox, J.A., Edwards, T.A. and Barr, J.N. 2012. Structure, function, and evolution of the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus nucleocapsid protein. *Journal of Virology*, 86(20); 10914–10923.
- Casals, J. 1969. Antigenic similarity between the virus causing Crimean hemorrhagic fever and Congo virus. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 131(1); 233–236.
- Ceylan, B. and Turhan, V. 2014. The efficacy of ribavirin in Crimean-Congo hemorrhagic fever randomized trials are urgently needed. *International Journal of Infectious Diseases* 29; 297-298.
- Chamberlain, J., Cook, N., Lloyd, G., Mioulet, V., Tolley, H. and Hewson, R. 2005. Co-evolutionary patterns of variation in small and large RNA segments of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Journal of General Virology*, 86(12); 3337–3341.
- Chayot, R., Montagne, B., Mazel, D., and Ricchetti, M. 2010. An end-joining repair mechanism in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(5); 2141-2146.
- Chinikar, S., Goya, M.M., Shirzadi, M.R., Ghiasi, S.M., Mirahmadi, R., Haeri, A., Moradi, M., Afzali, N., Rahpeyma, M.M., Zeinali, M. and Meshkat, M. 2008. Surveillance and laboratory detection system of Crimean-Congo haemorrhagic fever in Iran. *Transboundary and Emerging Diseases*, 55(5–6); 200–204.
- Chumakov, M.P. 1945. A new tick-borne virus disease-Crimean hemorrhagic fever, In: Crimean hemorrhagic fever (acute infectious capillary toxicosis). Sokolov, A.A., Chumakov, M.P. and Kolachev, A.A. (eds), *Izd Otd Primorskoi Armii*, 3-43, Simferopol.
- Chung, C.T., Niemela, S.L., and Miller, R.H. 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(7); 2172-2175.
- Clementz, M.A., Chen, Z., Banach, B.S., Wang, Y., Sun, L., Ratia, K., Baez-Santos, Y.M., Wang, J., Takayama, J., Ghosh, A.K., Li, K., Mesecar, A.D. and Baker, S.C. 2010. Deubiquitinating and interferon antagonism activities of coronavirus papain-like proteases. *Journal of Virology*, 84(9); 4619–4629.
- Connolly-Andersen, A.M., Magnusson, K.E., and Mirazimi, A. 2007. Basolateral entry and release of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in polarized MDCK-1 cells. *Journal of virology*, 81(5); 2158-2164.

- Connolly-Andersen, A.M., Douagi, I., Kraus, A.A. and Mirazimi, A. 2009. Crimean Congo hemorrhagic fever virus infects human monocyte-derived dendritic cells. *Virology* 390(2); 157-62.
- Çanakoglu, N., Berber, E., Ertek, M., Yoruk, M.D., Tonbak, S., Bolat, Y., Aktas, M., Kalkan, A. and Ozdarendeli, A. 2013. Pseudo-plaque reduction neutralization test (PPRNT) for the measurement of neutralizing antibodies to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Virology Journal*, 10(1); 6.
- Çanakoglu, N., Berber, E., Tonbak, S., Ertek, M., Sozdutmaz, I., Aktas, M., Kalkan, A. and 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.
- Çevik, M.A., Erbay, A., Bodur, H., Eren, S.S., Akinci, E., Sener, K., Onguru, P. and Kubar, A. 2007. Viral load as a predictor of outcome in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Clinical Infectious Diseases*, 45(7); 96-100.
- Çevik, M.A., Elaldi, N., Akinci, E., Onguru, P., Erbay, A., Buzgan, T., Uzun, R., Kubar, A. and Bodur, H. 2008. A preliminary study to evaluate the effect of intravenous ribavirin treatment on survival rates in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Journal of Infection*, 57(4); 350-351.
- Dalpke, A., Zimmermann, S. and Heeg, K. 2001. CpG-oligonucleotides in vaccination: signaling and mechanisms of action. *Immunobiology*, 204(5); 667-676.
- Dessau, M. and Modis, Y. 2013. Crystal structure of glycoprotein C from Rift Valley fever virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 110(5); 1696–1701.
- Devignot, S., Bergeron, E., Nichol, S., Mirazimi, A. and Weber, F. 2015. A Virus-like particle system identifies the endonuclease domain of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Journal of Virology*, 89(11); 5957–5967.
- Deyde, V.M., Khristova, M.L., Rollin, P.E., Ksiazek, T.G. and Nichol, S.T. 2006. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus genomics and global diversity. *Journal of Virology*, 80(17); 8834-8842.
- Dias, A., Bouvier, D., Crépin, T., McCarthy, A.A., Hart, D.J., Baudin, F., Cusack, S. and Ruigrok, R.W.H. 2009. The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature*, 458(7240); 914–918.
- Dokuzoğuz, B., Celikbas, A.K., Gok, S.E., Baykam, N., Eroglu, M.N. and Ergonul, O. 2013. Severity scoring index for Crimean-Congo hemorrhagic fever and the impact of ribavirin and corticosteroids on fatality. *Clinical Infectious Diseases*, 57(9); 1270-1274.

- Donets, M.A., Chumakov, M.P., Korolev, M.B. and Rubin, S.G. 1977. Physicochemical characteristics, morphology and morphogenesis of virions of the causative agent of Crimean hemorrhagic fever. *Intervirology*, 8(5); 294-308.
- Dowall, S.D., Graham, V.A., Rayner, E., Hunter, L., Watson, R., Taylor, I., Rule, A., Carroll, M.W. and 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.
- Dowall, S.D., Carroll, M.W. and Hewson, R. 2017. Development of vaccines against Crimean-Congo haemorrhagic fever virus. *Vaccine*, 35(44); 6015–6023.
- Elaldı, N., Bodur, H., Ascıoglu, S., Celikbas, A., Ozkurt, Z., Vahaboglu, H., Leblebicioglu, H., Yilmaz, N., Engin, A., Sencan, M., Aydin, K., Dokmetas, I., Cevik, M.A., Dokuzoguz, B., Tasyaran, M.A., Ozturk, R., Bakir, M. and Uzun, R. 2009. Efficacy of oral ribavirin treatment in Crimean-Congo haemorrhagic fever: a quasi-experimental study from Turkey. *Journal of Infection* 58(3); 238-244.
- El-Azazy, O.M. and Scrimgeour, E.M. 1997. Crimean-Congo haemorrhagic fever virus infection in the western province of Saudi Arabia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 91(3); 275–278.
- Elliott, R.M., Schmaljohn, C.S. and Collett, M.S. 1991. Bunyaviridae genome structure and gene expression. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 169; 91–141.
- Ergönül, O. 2006a. Crimean–Congo haemorrhagic fever. *The Lancet Infectious Diseases*, 6(4); 203–214.
- Ergönül, O., Zeller, H., Kilic, S., Kutlu, S., Kutlu, M., Cavusoglu, S., Esen, B. and Dokuzoguz, B. 2006b. Zoonotic infections among veterinarians in Turkey: Crimean-Congo hemorrhagic fever and beyond. *International Journal of Infectious Diseases* 10(6); 465-469.
- Ergönül, O., Celikbas, A., Baykam, N., Eren, S. and Dokuzoguz, B. 2006c. Analysis of risk-factors among patients with Crimean-Congo haemorrhagic fever virus. *Clinical Microbiology and Infection*, 12(6); 551-554.
- Ergönül, O., Tuncbilek, S., Baykam, N., Celikbas, A. and Dokuzoguz, B. 2006d. Evaluation of serum levels of interleukin (IL)-6, IL-10, and tumor necrosis factor-alpha in patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Journal of Infectious Diseases*, 193(7); 941-944.
- Ergönül, O. 2008. Treatment of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Antiviral Research*, 78(1); 125-131.

- Ergönül, O. 2014. Evidence supports ribavirin use in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *International Journal of Infectious Diseases*, 29; 296.
- Erickson, B.R., Deyde, V., Sanchez, A.J., Vincent, M.J. and Nichol, S.T. 2007. N-linked glycosylation of Gn (but not Gc) is important for Crimean Congo hemorrhagic fever virus glycoprotein localization and transport. *Virology*, 361(2); 348–355.
- Estrada, D.F. and De Guzman, R.N. 2011. Structural characterization of the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus Gn tail provides insight into virus assembly. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(24); 21678–21686.
- Estrada-Peña, A., Palomar, A. M., Santibáñez, P., Sánchez, N., Habela, M. A., Portillo, A., Romero, L. and Oteo, J. A. 2012. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in ticks, Southwestern Europe, 2010. *Emerging Infectious Diseases*, 18(1); 179.
- Ferraro, B., Morrow, M.P., Hutnick, N.A., Shin, T.H., Lucke, C.E. and Weiner, D.B. 2011. Clinical applications of DNA vaccines: current progress. *Clinical Infectious Diseases*, 53(3); 296-302.
- Ferreira, D.M., Darrieux, M., Oliveira, M.L.S., Leite, L.C. and Miyaji, E.N. 2008. Optimized immune response elicited by a DNA vaccine expressing pneumococcal surface protein a is characterized by a balanced immunoglobulin G1 (IgG1)/IgG2a ratio and proinflammatory cytokine production. *Clinical and Vaccine Immunology*, 15(3); 499-505.
- Finkelman, F.D., Holmes, J., Katona, I.M., Urban Jr, J.F., Beckmann, M.P., Park, L.S., Schooley, K.A., Coffman, R.L., Mosmann, T.R. and Paul, W.E. 1990. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annual Review of Immunology*, 8(1); 303-333.
- Flick, R., Elgh, F. and Pettersson, R.F. 2002. Mutational analysis of the Uukuniemi virus (Bunyaviridae family) promoter reveals two elements of functional importance. *Journal of Virology*, 76(21); 10849–10860.
- Frias-Staheli, N., Giannakopoulos, N.V., Kikkert, M., Taylor, S.L., Bridgen, A., Paragas, J., Richt, J.A., Rowland, R.R., Schmaljohn, C.S., Lenschow, D.J., Snijder, E.J., García-Sastre, A. and Virgin, H.W. 2007. Ovarian tumor domain-containing viral proteases evade ubiquitin- and ISG15-dependent innate immune responses. *Cell Host Microbe*, 2(6); 404–416.
- Fusco, M.L., Hashiguchi, T., Cassan, R., Biggins, J.E., Murin, C.D., Warfield, K.L., Li, S., Holtsberg, F.W., Shulenin, S., Vu, H., Olinger, G.G., Kim, D.H., Whaley, K.J., Zeitlin, L., Ward, A.B., Nykiforuk, C., Aman, M.J., Berry, J. and Saphire, E.O. 2015. Protective mAbs and cross-reactive mAbs raised by immunization with engineered marburg virus GPs. *PLoS Pathogens*, 11(6); e1005016.

- Garcin, D., Lezzi, M., Dobbs, M., Elliott, R.M., Schmaljohn, C., Kang, C.Y. and Kolakofsky, D. 1995. The 5' ends of Hantaan virus (Bunyaviridae) RNAs suggest a prime-and-realign mechanism for the initiation of RNA synthesis. *Journal of Virology*, 69(9); 5754–5762.
- Garrison, A.R., Radoshitzky, S.R., Kota, K.P., Pegoraro, G., Ruthel, G., Kuhn, J.H., Altamura, L.A., Kwilas, S.A., Bavari, S., Haucke, V. and Schmaljohn, C.S. 2013. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus utilizes a clathrin- and early endosome-dependent entry pathway. *Virology*, 444(1-2); 45–54.
- Garrison, A.R., Shoemaker, C.J., Golden, J.W., Fitzpatrick, C.J., Suschak, J.J., Richards, M.J., Badger, C.V., Six, C.M., Martin, J.D., Hannaman, D., Zivcec, M., Bergeron, E., Koehler, J.W. and Schmaljohn, C.S. 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.
- Garry, C.E. and Garry, R.F. 2004. Proteomics computational analyses suggest that the carboxyl terminal glycoproteins of Bunyaviruses are class II viral fusion protein (beta-penetrenes). *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 1(1); 10.
- Ghiasi, S.M., Salmanian, A.H., Chinikar, S. and 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.
- Giannakopoulos, N.V., Luo, J.K., Papov, V., Zou, W., Lenschow, D.J., Jacobs, B.S., Borden, E.C., Li, J., Virgin, H.W. and Zhang, D.E. 2005. Proteomic identification of proteins conjugated to ISG15 in mouse and human cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 336(2); 496–506.
- Gordon, S.W., Linthicum, K.J. and Moulton, J.R. 1993. Transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in two species of *Hyalomma* ticks from infected adults to cofeeding immature forms. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 48(4); 576–580.
- Graci, J.D. and Cameron, C.E. 2006. Mechanisms of action of ribavirin against distinct viruses. *Reviews in Medical Virology*, 16(1); 37-48.
- Grashchenkov, N.I. 1945. Investigation of etiology, pathogenesis, and clinical symptomatology of Crimean hemorrhagic fever, Reports on the 1944 Scientific Investigation of the Institute of Neurology. *Vestnik Akademii Meditsinskikh Nauk SSSR*, 100-107.
- Guo, Y., Wang, W., Ji, W., Deng, M., Sun, Y., Zhou, H., Yang, C., Deng, F., Wang, H., Hu, Z., Lou, Z. and Rao, Z. 2012. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus nucleoprotein reveals endonuclease activity in bunyaviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 109(13); 5046–5051.

- Güneş, T., Engin, A., Poyraz, O., Elaldi, N., Kaya, S., Dokmetas, I., Bakir, M. and Cinar, Z. 2009. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in high-risk population. *Emerging Infectious Diseases*, 15(3); 461-464.
- Habjan, M., Andersson, I., Klingström, J., Schumann, M., Martin, A., Zimmermann, P., Wagner, V., Pichlmair, A., Schneider, U., Mühlberger, E., Mirazimi, A. and 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.
- Haferkamp, S., Fernando, L., Schwarz, T.F., Feldmann, H. and Flick, R. 2005. Intracellular localization of Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) virus glycoproteins. *Virology Journal*, 2(1); 42.
- Harrison, R.L. and Jarvis, D.L. 2006. Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell expression system and engineering of insect cells to produce "mammalianized" recombinant glycoproteins. *Advances in Virus Research*, 68; 159–91.
- Hastie, K.M., Liu, T., Li, S., King, L.B., Ngo, N., Zandonatti, M.A., Woods, V.L., de la Torre, J.C. and Saphire, E.O. 2011. Crystal structure of the Lassa virus nucleoprotein-RNA complex reveals a gating mechanism for RNA binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 108(48); 19365–19370.
- Hewlett, M.J., Pettersson, R.F. and Baltimore, D. 1977. Circular forms of Uukuniemi virion RNA: An electron microscopic study. *Journal of Virology*, 21(3); 1085–1093.
- Hewson, R., Gmyl, A., Gmyl, L., Smirnova, S.E., Karganova, G., Jamil, B., Hasan, R., Chamberlain, J. and Clegg, C. 2004. Evidence of segment reassortment in Crimean- Congo haemorrhagic fever virus. *Journal of General Virology*, 85(10); 3059–3070.
- Hinkula, J., Devignot, S., Åkerström, S., Karlberg, H., Wattrang, E., Bereczky, S., Mousavi-Jazie, M., Risinger, C., Lindegren, G., Verneris, C., Paweska, J., van Vuren, P.J., Blixt, O., Bruni, A., Weber, F. and 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.
- Holzer, B., Bakshi, S., Bridgen, A. and Baron, M.D. 2011. Inhibition of interferon induction and action by the nairovirus Nairobi sheep disease virus/Ganjam virus. *PLoS ONE*, 6(12); e28594.
- Honig, J.E., Osborne, J.C. and Nichol, S.T. 2004. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus genome L RNA segment and encoded protein. *Virology*, 321(1); 29–35.

- Hoogstraal, H. 1979. The epidemiology of tick-borne Crimean–Congo hemorrhagic fever in Asia, Europe, and Africa. *Journal of Medical Entomology*, 15(4); 307–417.
- Jahromi, M.K. 2014. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever-Treatment and Preventive Strategies. *International Journal of Infection*, 1(2); e20310.
- James, T.W., Frias-Staheli, N., Bacik, J.-P., Levingston Macleod, J.M., Khajehpour, M., García-Sastre, A. and Mark, B.L. 2011. Structural basis for the removal of ubiquitin and interferon-stimulated gene 15 by a viral ovarian tumor domain-containing protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 108(6); 2222–2227.
- Jiang, X., Kinch, L.N., Brautigam, C.A., Chen, X., Du, F., Grishin, N.V. and Chen, Z.J. 2012. Ubiquitin-induced oligomerization of the RNA sensors RIG-I and MDA5 activates antiviral innate immune response. *Immunity*, 36(6); 973–959.
- Karlberg, H., Tan, Y.J. and 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.
- Karlberg, H., Tan, Y.J. and Mirazimi, A. 2015. Crimean-Congo haemorrhagic fever replication interplays with regulation mechanisms of apoptosis. *Journal of General Virology*, 96(3); 538–546.
- Karti, S.S., Odabasi, Z., Korten, V., Yilmaz, M., Sonmez, M., Caylan, R., Akdogan, E., Eren, N., Koksall, I., Ovali, E., Erickson, B.R., Vincent, M.J., Nichol, S.T., Comer, J.A., Rollin, P.E. and Ksiazek, T.G. 2004. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey. *Emerging Infectious Diseases*, 10(8); 1379-1384.
- Kaygaki, N., Phung, Q., Chan, S., Chaudhari, R., Quan, C., O’Rourke, K.M., Eby, M., Pietras, E., Cheng, G., Bazan, J.F., Zhang, Z., Arnott, D. and Dixit, V.M. 2007. DUBA: A deubiquitinase that regulates type I interferon production. *Science*, 318(5856); 1628–1632.
- Kim, M.J., Hwang, S.Y., Imaizumi, T. and Yoo, J.Y. 2008. Negative feedback regulation of RIG-I-mediated antiviral signaling by interferon-induced ISG15 conjugation. *Journal of Virology*, 82(3); 1474–1483.
- Kimura, M. 1979. The Neutral Theory of Molecular Evolution. *Scientific American*, 241(5); 98-129.
- Kinsella, E., Martin, S.G., Grolla, A., Czub, M., Feldmann, H. and Flick, R. 2004. Sequence determination of the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus L segment. *Virology*, 321(1); 23–28.

- Kortekaas, J., Vloet, R.P., McAuley, A.J., Shen, X., Bosch, B.J., de Vries, L., Moormann R.J.M. and Bente D.A. 2015. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus subunit vaccines induce high levels of neutralizing antibodies but no protection in STAT1 knockout mice. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 15(12); 759–64.
- Köksal, I., Yilmaz, G., Aksoy, F., Aydin, H., Yavuz, I., Iskender, S., Akcay, K., Erensoy, S., Caylan, R. and Aydin, K. 2010. The efficacy of ribavirin in the treatment of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Eastern Black Sea region in Turkey. *Journal of Clinical Virology* 47(1); 65-68.
- Köksal, I., Yilmaz, G., Aksoy, F., Erensoy, S. and Aydin, H. 2014. The seroprevalance of Crimean-Congo haemorrhagic fever in people living in the same environment with Crimean-Congo haemorrhagic fever patients in an endemic region in Turkey. *Epidemiology and Infection*, 142(2); 239-245.
- Kraus, A.A. and Mirazimi, A. 2010. Molecular biology and pathogenesis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Future Virology*, 5(4); 469-479.
- Kubar, A., Hacıomeroglu, M., Ozkul, A., Bagriacik, U., Akinci, E., Sener, K. and Bodur, H. 2011. Prompt administration of Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) virus hyperimmunoglobulin in patients diagnosed with CCHF and viral load monitorization by reverse transcriptase-PCR. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 64(5); 439-443.
- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7); 1870-1874.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259); 680-685.
- Leblebicioğlu, H. 2010. Crimean–Congo haemorrhagic fever in Eurasia. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36; S43-S46.
- Leblebicioğlu, H., Bodur, H., Dokuzoguz, B., Elaldi, N., Guner, R., Koksall, I., Kurt, H. and Senturk, G.C. 2012. Case management and supportive treatment for patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*. 12(9); 805-811.
- Leblebicioğlu, H., Ozaras, R., Irmak, H. and Sencan, I. 2016. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey: Current status and future challenges. *Antiviral Research*, 126; 21-34.
- Lee, M.H., Lalwani, P., Raftery, M.J., Matthaei, M., Lutteke, N., Kirsanovs, S., Binder, M., Ulrich, R.G., Giese, T., Wolff, T., Krüger, D.H. and Schönrich, G. 2011. RNA helicase retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) as a sensor of Hantaan virus (HTNV) replication. *Journal of General Virology*, 92(9); 2191–2200.

- Levine, J.R., Prescott, J., Brown, K.S., Best, S.M., Ebihara, H. and Feldmann, H. 2010. Antagonism of type I interferon responses by new world hantaviruses. *Journal of Virology*, 84(22); 11790–11801.
- Li, X., Sambhara, S., Li, C. X., Ettorre, L., Switzer, I., Cates, G., James, O., Parrington, M., Oomen, R., Du, R.P. and Klein, M. 2000. Plasmid DNA encoding the respiratory syncytial virus G protein is a promising vaccine candidate. *Virology*, 269(1); 54-65.
- Lindeborg, M., Barboutis, C., Ehrenborg, C., Fransson, T., Jaenson, T.G., Lindgren, P.E., Lundkvist, Å., Nyström, F., Salaneck, E., Waldenström, J. and Olsen, B. 2012. Migratory birds, ticks, and crimean-congo hemorrhagic fever virus. *Emerging Infectious Diseases*, 18(12); 2095-2097.
- Liu, Y., Nickle, D.C., Shriner, D., Jensen, M.A., Learn Jr., G.H., Mittler, J.E. and Mullins, J.I. 2004. Molecular clock-like evolution of human immunodeficiency virus type 1. *Virology*, 329(1); 101–108.
- Logan, T.M., Linthicum, K.J., Bailey, C.L., Watts, D.M. and Moulton, J.R. 1989. Experimental transmission of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus by *Hyalomma truncatum* Koch. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 40 (2); 207–212.
- Lombardi, C., Ayach, M., Beaurepaire, L., Chenon, M., Andreani, J., Guerois, R., Jupin, I. and Bressanelli, S. 2013. A compact viral processing proteinase/ubiquitin hydrolase from the OTU family. *PLoS Pathogens*, 9(8); e1003560.
- Loomis, R. J. and Johnson, P.R. 2013. Gene-based vaccine approaches for respiratory syncytial virus, In: *Challenges and Opportunities for Respiratory Syncytial Virus Vaccines*. Graham, B.S. (ed), Springer, 307-324, Berlin, Heidelberg.
- Lukashev, A.N. 2005. Evidence for recombination in Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Journal of General Virology* 86(8); 2333–2338.
- Lukashev, A.N., Klimentov, A.S., Smirnova, S.E., Dzagurova, T.K., Drexler, J.F. and Gmyl, A.P. 2016. Phylogeography of crimean Congo hemorrhagic fever virus. *PloS One*, 11(11); e0166744.
- Ma, Y., Jiao, Y.Y., Yu, Y.Z., Jiang, N., Hua, Y., Zhang, X.J., Fu, Y.H., Peng, X.L., Zheng, Y.P., Anderso, L.J. and He, J.S. 2018. A Built-In CpG Adjuvant in RSV F Protein DNA Vaccine Drives a Th1 Polarized and Enhanced Protective Immune Response. *Viruses*, 10(1); e38.
- Macleod, J.M.L., Marmor, H., García-Sastre, A. and Frias-Staheli, N. 2015. Mapping of the interaction domains of the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus nucleocapsid protein. *Journal of General Virology*, 96(3); 524–537.

- Mahanty, S. and Bray, M. 2004. Pathogenesis of filoviral haemorrhagic fevers. *The Lancet Infectious Diseases*, 4(8); 487-498.
- Makarova, K. 2000. A novel superfamily of predicted cysteine proteases from eukaryotes, viruses and *Chlamydia pneumoniae*. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(2); 50–52.
- Maltezou, H.C., Andonova, L., Andraghetti, R., Bouloy, M., Ergönül, O., Jongejan, F., Kalvatchev, N., Nichol, S., Niedrig, M., Platonov, A., Thomson, G., Leitmeyer, K. and Zeller, H. 2010. Crimean-Congo haemorrhagic fever in Europe: current situation calls for preparedness. *Eurosurveillance*, 15 (10); 19504.
- Mardani, M. and Keshtkar-Jahromi, M. 2007. Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Archives of Iranian Medicine*, 10(2); 204-14.
- Marsh, M. and Helenius, A. 2006. Virus entry: open sesame. *Cell*, 124(4); 729–740.
- Matsuoka, Y., Chen, S.Y. and Compans, R.W. 1991. Bunyavirus protein transport and assembly. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 169; 161–179.
- Meco, B.C., Memikoglu, O., Ilhan, O., Ayyildiz, E., Gunt, C., Unal, N., Oral, M. and Tulunay, M. 2013. Double filtration plasmapheresis for a case of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Transfusion and Apheresis Science*, 48(3); 331-334.
- Mertens, M., Schmidt, K., Ozkul, A. and Groschup, M.H. 2013. The impact of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus on public health. *Antiviral Research*, 98(2); 248-260.
- Messina, J.P., Pigott, D.M., Duda, K.A., Brownstein, J.S., Myers, M.F., George, D.B. and Hay, S.I. 2015. A global compendium of human Crimean-Congo haemorrhagic fever virus occurrence. *Scientific Data*, 2; 150016.
- Mielech, A.M., Kilianski, A., Baez-Santos, Y.M., Mesecar, A.D. and Baker, S.C. 2014. MERS-CoV papain-like protease has deISGylating and deubiquitinating activities. *Virology*, 450; 64–70.
- Mishra, A.C., Mehta, M., Mourya, D.T. and Gandhi, S. 2011. Crimean-Congo haemorrhagic fever in India. *Lancet*, 378(9788); 372.
- Morin, B., Coutard, B., Lelke, M., Ferron, F., Kerber, R., Jamal, S., Frangeul, A., Baronti, C., Charrel, R., de Lamballerie, X., Vonnrhein, C., Lescar, J., Bricogne, G., Günther, S. and Canard, B. 2010. The N-terminal domain of the arenavirus L protein is an RNA endonuclease essential in mRNA transcription. *PLoS Pathogens*, 6(9); e1001038.
- Mourya, D.T., Yadav, P.D., Shete, A., Majumdar, T.D., Kanani, A., Kapadia, D., Chandra, V., Kachhiapatel, A.J., Joshi, P.T., Upadhyay, K.J., Dave, P. and Raval, D. 2014. Serosurvey of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in

- domestic animals, Gujarat, India, 2013. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 14(9); 690–692.
- Mousavi-Jazi, M., Karlberg, H., Papa, A., Christova, I. and Mirazimi, A. 2012. Healthy individuals' immune response to the Bulgarian Crimean-Congo hemorrhagic fever virus vaccine. *Vaccine*, 30(44); 6225-6229.
- Németh, V., Oldal, M., Egyed, L., Gyuranecz, M., Erdélyi K., Kvell, K., Kalvatchev, N., Zeller, H., Bányai, K. and Jakab, F. 2013. Serologic evidence of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infection in Hungary. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 13(4); 270–272.
- Nuttall, P.A. and Labuda, M. 2004. Tick-host interactions: saliva-activated transmission. *Parasitology*, 129; 177-189.
- Oestereich, L., Rieger, T., Neumann, M., Bernreuther, C., Lehmann, M., Krasemann, S., Wurr, S., Emmerich, P., de Lamballerie, X., Olschlager, S. and 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.
- Olal, D., Dick, A., Woods, V.L., Liu, T., Li, S., Devignot, S., Weber, F., Saphire, E.O. and Daumke, O. 2014. Structural insights into RNA encapsidation and helical assembly of the Toscana virus nucleoprotein. *Nucleic Acids Research*, 42(9); 6025–6037.
- Okorie, T.G. 1991. Comparative studies on the vector capacity of the different stages of *Amblyomma variegatum* Fabricius and *Hyalomma rufipes* Koch for Congo virus, after intracoelomic inoculation. *Veterinary Parasitology*, 38(2–3); 215–223.
- Okumura, F., Okumura, A.J., Uematsu, K., Hatakeyama, S., Zhang, D.E. and Kamura, T. 2013. Activation of double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) by interferon-stimulated gene 15 (ISG15) modification down-regulates protein translation. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(4); 2839–2847.
- Özbey, S.B., Kader, C., Erbay, A. and Ergonul, O. 2014. Early use of ribavirin is beneficial in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 14(4); 300-302.
- Öztürk, B., Kuscu, F., Tutuncu, E., Sencan, I., Gurbuz, Y. and Tuzun, H. 2010. Evaluation of the association of serum levels of hyaluronic acid, sICAM-1, sVCAM-1, and VEGF-A with mortality and prognosis in patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Journal of Clinical Virology*, 47(2); 115-9.
- Papa, A., Bino, S., Velo, E., Harxhi, A., Kota, M. and Antoniadis, A. 2006. Cytokine levels in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Journal of Clinical Virology*, 36(4); 272-276.

- Papa, A., Dalla, V., Papadimitriou, E., Kartalis, G.N. and Antoniadis, A. 2009. Emergence of Crimean-Congo haemorrhagic fever in Greece. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(7); 843-847.
- Papa, A., Papadimitriou, E. and Christova, I. 2011a. The Bulgarian vaccine Crimean-Congo haemorrhagic fever virus strain. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 43(3); 225-229.
- Papa, A., Tzala, E. and Maltezou, H.C. 2011b. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, northeastern Greece. *Emerging Infectious Diseases*, 17(1); 141-143.
- Pereira, V.B., Zurita-Turk, M., Saraiva, T.D.L., De Castro, C.P., Souza, B.M., Agresti, P.M., Lima, F.A., Pfeiffer, V.N., Azevedo, M.S.P., Rocha, C.S., Pontes, D.S., Azevedo, V. and Miyoshi, A. 2014. DNA vaccines approach: from concepts to applications. *World Journal of Vaccines*, 4(2); 50.
- Peyrefitte, C.N., Perret, M., Garcia, S., Rodrigues, R., Bagnaud, A., Lacote, S., Crance, J.M., Vernet, G., Garin, D., Bouloy, M. and Paranhos-Baccala, G. 2010. Differential activation profiles of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus and Dugbe virus-infected antigen-presenting cells. *Journal of General Virology*, 91(1); 189-198.
- Qi, X., Lan, S., Wang, W., Schelde, L.M., Dong, H., Wallat, G.D., Ly, H., Liang, Y. and Dong, C. 2010. Cap binding and immune evasion revealed by Lassa nucleoprotein structure. *Nature*, 468(7325); 779-783.
- Rada, A.G. 2016. First outbreak of Crimean-Congo haemorrhagic fever in western Europe kills one man in Spain. *The British Medical Journal*, 354; i4891
- Ramanathan, H.N. and Jonsson, C.B. 2008. New and Old World hantaviruses differentially utilize host cytoskeletal components during their life cycles. *Virology*, 374(1); 138-150.
- Raymond, D.D., Piper, M.E., Gerrard, S.R. and Smith, J.L. 2010. Structure of the Rift Valley fever virus nucleocapsid protein reveals another architecture for RNA encapsidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 107(26); 11769-11774.
- Reguera, J., Weber, F. and Cusack, S. 2010. Bunyaviridae RNA polymerases (L-protein) have an N-terminal, influenza-like endonuclease domain, essential for viral cap-dependent transcription. *PLoS Pathogens*, 6(9); e10011101.
- Reguera, J., Malet, H., Weber, F. and Cusack, S. 2013. Structural basis for encapsidation of genomic RNA by La Crosse Orthobunyavirus nucleoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 110(18); 7246-7251.
- Rio, D.C., Ares, M., Hannon, G. J. and Nilsen, T.W. 2010. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010(6); pdb-prot5439.

- Rojek, J.M., Lee, A.M., Nguyen, N., Spiropoulou, C.F. and Kunz, S. 2008. Site 1 protease is required for proteolytic processing of the glycoproteins of the South American hemorrhagic fever viruses Junin, Machupo, and Guanarito. *Journal of Virology*, 82(12); 6045–6051.
- Rothberg, J.M., Hinz, W., Rearick, T.M., Schultz, J., Mileski, W., Davey, M., Leamon, J.H., Johnson, K., Milgrew, M.J., Edwards, M., Hoon, J., Simons, J.F., Marran, D., Myers, J.W., Davidson, J.F., Branting, A., Nobile, J.R., Puc, B.P., Light, D., Clark, T.A., Huber, M., Branciforte, J.T., Stoner, I.B., Cawley, S.E., Lyons, M., Fu, Y., Homer, N., Sedova, M., Miao, X., Reed, B., Sabina, J., Feierstein, E., Schorn, M., Alanjary, M., Dimalanta, E., Dressman, D., Kasinskas, R., Sokolsky, T., Fidanza, J.A., Namsaraev, E., McKernan, K.J., Williams, A., Roth, G.T. and Bustillo, J. 2011. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*, 475 (7356); 348-352.
- Fadi, S. and Petrovsky, N. 2012. Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines. *Expert review of Vaccines*, 11(2); 189-209.
- Sahib, M.M. 2010. Rapid development of optimized recombinant adenoviral vaccines for biosafety level 4 viruses. University of Manitoba, Winnipeg.
- Saksida, A., Duh, D., Wraber, B., Dedushaj, I., Ahmeti, S. and Avsic-Zupanc, T. 2010. Interacting roles of immune mechanisms and viral load in the pathogenesis of crimean-congo hemorrhagic fever. *Clinical and Vaccine Immunology*, 17(7); 1086-1093.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory press, New York.
- Sanchez, A.J., Vincent, M.J. and Nichol, S.T. 2002. Characterization of the glycoproteins of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Journal of Virology*, 76(14); 7263–7275.
- Sanchez, A.J., Vincent, M.J., Erickson, B.R. and 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. *Journal of Virology*, 80(1); 514–525.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 74(12); 5463-5467.
- Schmaljohn, C.S. and Nichol, S.T. 2007. Bunyaviridae, In: *Fields Virology*. KdaH PM, (ed), Lippincott Williams & Wilkins, 1741-89, Philadelphia.
- Schmidt, H.A. and von Haeseler, A. 2003. Maximum likelihood analysis using TREEPUZZLE, In: *Current Protocols in Bioinformatics*. Baxevanis, A.D.,

- Davison, D.B., Page, R.D.M., Storno, G. and Stein, L. (eds), Wiley and Sons, 6.6.1–6.6.25, New York.
- Schnittler, H.J. and Feldmann, H. 2003. Viral hemorrhagic fever--a vascular disease?. *Thrombosis and haemostasis*, 90(6); 967-972.
- Serter, D. 1980. Present status of arbovirus sero-epidemiology in the Aegean region of Turkey, In: *Arboviruses in the Mediterranean Countries*. Vesenjask-Hirjan, J.C. (ed), Gustav Fischer Verlag, 155-161, Stuttgart.
- Shepherd, A.J., Swanepoel, R., Leman, P.A. and Shepherd, S.P. 1987. Field and laboratory investigation of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus (Nairovirus, family Bunyaviridae) infection in birds. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(6); 1004–1007.
- Shepherd, A.J., Swanepoel, R., Cornel, A.J. and Mathee, O. 1989a. Experimental studies on the replication and transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in some African tick species. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 40(3); 326–331.
- Shepherd, A.J., Swanepoel, R. and Leman, P.A. 1989b. Antibody response in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Reviews of Infectious Diseases*, 11(Suppl 4); 801–806.
- Shepherd, A.J., Swanepoel, R., Shepherd, S.P., Leman, P.A. and Mathee, O. 1991. Viraemic transmission of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus to ticks. *Epidemiology and Infection*, 106(2); 373-382.
- Shi, H.X., Yang, K., Liu, X., Liu, X.Y., Wei, B., Shan, Y.F., Zhu, L.H. and Wang, C. 2010. Positive regulation of interferon regulatory factor 3 activation by Herc5 via ISG15 modification. *Molecular and Cellular Biology*, 30(10); 2424–2436.
- Shtanko, O., Nikitina, R.A., Altuntas, C.Z., Chepurinov, A.A. and Davey, R.A. 2014. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus entry into host cells occurs through the multivesicular body and requires ESCRT regulators. *PLoS Pathogens*, 10(9); e1004390.
- Simon, M., Falk, K.I., Lundkvist, A. and Mirazimi, A. 2006. Exogenous nitric oxide inhibits Crimean Congo hemorrhagic fever virus. *Virus Research*, 120(1-2); 184-190.
- Simon, M., Johansson, C. and Mirazimi A. 2009a. Crimean–Congo hemorrhagic fever virus entry and replication is clathrin-, pH- and cholesterol-dependent. *Journal of General Virology*, 90(1); 210–215.
- Simon, M., Johansson, C., Lundkvist, A. and Mirazimi, A. 2009b. Microtubule-dependent and microtubule-independent steps in Crimean–Congo hemorrhagic fever virus replication cycle. *Virology*, 385(2); 313–322.

- Simpson, D.I., Knight, E.M., Courtois, G., Williams, M.C., Weinbren, M.P. and Kibukamusoke, J.W. 1967. Congo virus: a hitherto undescribed virus occurring in Africa. I. Human isolations – clinical notes. *East African Medical Journal*, 44(2); 86–92.
- Snapper, C.M., and Paul, W.E. 1987. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science*, 236(4804); 944-947.
- Sörman, A., Zhang, L., Ding, Z. and Heyman, B. 2014. How antibodies use complement to regulate antibody responses. *Molecular Immunology*, 61(2); 79-88.
- Spengler, J.R., Patel, J.R., Chakrabarti, A.K., Zivcec, M., García-Sastre, A., Spiropoulou, C.F. and Bergeron, E. 2015. RIG-I mediates an antiviral response to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Journal of Virology*, 89(20); 10119–10229.
- Spik, K., Shurtleff, A., McElroy, A. K., Guttieri, M. C., Hooper, J. W. and Schmaljohn, C. 2006. Immunogenicity of combination DNA vaccines for Rift Valley fever virus, tick-borne encephalitis virus, Hantaan virus, and Crimean Congo hemorrhagic fever virus. *Vaccine*, 24(21); 4657-4666.
- Sun, B., Hu, J., Yao, J. and Ji, S. 2014. 90: LEGENDplex™, a new multiplex solution for cytokine and chemokine quantification in biological samples. *Cytokine*, 70(1); 49.
- Sünbül, M., Leblebicioglu, H., Fletcher, T.E., Elaldi, N., Ozkurt, Z., Bastug, A., Yilmaz, G., Guner, R., Duygu, F. and Beeching, N.J. 2015b. Crimean-Congo haemorrhagic fever and secondary bacteraemia in Turkey. *Journal of Infection*, 71(5); 597-599.
- Swanepoel, R., Shepherd, A.J., Leman, P.A., Shepherd, S.P., McGillivray, G.M., Erasmus, M.J., Searle, L.A. and Gill, D.E. 1987. Epidemiologic and clinical features of Crimean-Congo hemorrhagic fever in southern Africa. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 36(1); 120–132.
- Swanepoel, R., Gill, D.E., Shepherd, A.J., Leman, P.A., Mynhardt, J.H. and Harvey, S. 1989. The clinical pathology of Crimean–Congo hemorrhagic fever. *Reviews of Infectious Diseases*, 11(Suppl. 4); 794–800.
- Swanepoel, R., Leman, P.A., Burt, F.J., Jardine, J., Verwoerd, D.J., Capua, I., Brückner, G.K. and Burger, W.P. 1998. Experimental infection of ostriches with Crimean-Congo haemorrhagic fever virus. *Epidemiology and Infection*, 121(2); 427–432.
- Şekercioğlu, C.H. 2013. Guinea fowl, ticks and Crimean Congo hemorrhagic fever in Turkey: the perfect storm?. *Trends in parasitology*, 29(1); 1-2

- Tarantola, A., Ergönül, O. and Tattevin, P. 2007. Estimates and prevention of Crimean-Congo hemorrhagic fever risks for health-care workers, In: Crimean-Congo hemorrhagic fever. Ergönül, O. and Whitehouse, C.A. (eds), Springer, 281–294, Dordrecht.
- Taşdelen Fisgin, N., Fisgin, T., Tanyel, E., Doganci, L., Tulek, N., Guler, N. and Duru, F. 2008. Crimean-Congo hemorrhagic fever: five patients with hemophagocytic syndrome. *American Journal of Hematology*, 83(1); 73-6.
- Taşdelen Fisgin, N., Ergonul, O., Doganci, L. and Tulek, N. 2009. The role of ribavirin in the therapy of Crimean-Congo hemorrhagic fever: early use is promising. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 28(8); 929-933.
- Tayyari, F., Marchant, D., Moraes, T.J., Duan, W., Mastrangelo, P. and Hegele, R.G. 2011. Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus. *Nature Medicine*, 17(9); 1132–1135.
- Thongtan, T., Wikan, N., Wintachai, P., Rattanaungsan, C., Srisomsap, C., Cheepsunthorn, P. and Smith, D.R. 2012. Characterization of putative Japanese encephalitis virus receptor molecules on microglial cells. *Journal of Medical Virology*, 84(4); 615–623.
- Tignor, G.H. and Hanham, C.A., 1993. Ribavirin efficacy in an in vivo model of Crimean- Congo hemorrhagic fever virus (CCHF) infection. *Antiviral Research*, 22(4); 309-325.
- Uyar, Y., Christova, I. and Papa, A. 2011. Current situation of Crimean Congo hemorrhagic fever (CCHF) in Anatolia and Balkan Peninsula. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 68(3); 139-151.
- van de Wal, B.W., Joubert, J.R., van Eeden, P.J. and King, J.B. 1985. A nosocomial outbreak of Crimean–Congo haemorrhagic fever at Tygerberg Hospital. Part IV. Preventive and prophylactic measures. *South African Medical Journal*, 68(10); 729–732.
- Van Kasteren, P.B., Beugeling, C., Ninaber, D.K., Frias-Staheli, N., van Boheemen, S., García-Sastre, A., Snijder, E.J. and Kikkert, M. 2012. Arterivirus and nairovirus ovarian tumor domain-containing Deubiquitinases target activated RIG-I to control innate immune signaling. *Journal of Virology*, 86(2); 773–785.
- Vassilenko, S.M., Vassilev, T.L., Bozadjiev, L.G., Bineva, I.L. and Kazarov, G.Z. 1990. Specific intravenous immunoglobulin for Crimean–Congo haemorrhagic fever. *Lancet* 335(8692); 791–792.
- Vincent, M.J., Sanchez, A.J., Erickson, B.R., Basak, A., Chretien, M., Seidah, N.G. and Nichol, S.T. 2003. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus glycoprotein

- proteolytic processing by subtilase SKI-1. *Journal of Virology*, 77(16); 8640–8649.
- Vogels, R., Zuijdgeest, D., van Rijnsoever, R., Hartkoorn, E., Damen, I., de Bethune, M.P., Kostense, S., Penders, G., Helmus, N., Koudstaal, W., Cecchini, M., Wetterwald, A., Sprangers, M., Lemckert, A., Ophorst, O., Koel, B., van Meerendonk, M., Quax, P., Panitti, L., Grimbergen, J., Bout, A., Goudsmit, J. and Havenga, M. 2003. Replication-deficient human adenovirus type 35 vectors for gene transfer and vaccination: efficient human cell infection and bypass of preexisting adenovirus immunity. *Journal of Virology*, 77(15); 8263–71.
- Volchkov, V.E., Feldmann, H., Volchkova, V.A. and Klenk, H.D. 1998. Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proprotein convertase furin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 95(10); 5762–5767.
- Volchkov, V.E., Volchkova, V.A., Ströher, U., Becker, S., Dolnik, O., Cieplik, M., Garten, W., Klenk, H.D. and Feldmann, H. 2000. Proteolytic processing of Marburg virus glycoprotein. *Virology*, 268(1); 1–6.
- Vorou, R., Pierroutsakos, I.N. and Maltezou, H.C. 2007. Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 20(5); 495-500.
- Vorou, R.M. 2009. Crimean-Congo hemorrhagic fever in southeastern Europe. *International Journal of Infectious Disease*, 13(6); 659-662.
- Wahren, B. and Liu, M.A. 2014. DNA vaccines: Recent developments and the future. *Vaccines*, 2(4); 785-796.
- Wang, Y., Dutta, S., Karlberg, H., Devignot, S., Weber, F., Hao, Q., Tan, Y.J., Mirazimi, A. and 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.
- Wang, P., Zhao, W., Zhao, K., Zhang, L. and Gao, C. 2015. TRIM26 negatively regulates interferon- β production and antiviral response through polyubiquitination and degradation of nuclear IRF3. *PLoS Pathogens*, 11(3); e1004726.
- Wang, W., Liu, X., Wang, X., Dong, H., Ma, C., Wang, J., Liu, B., Mao, Y., Wang, Y., Li, T., Yanga, C. and Guoa, Y. 2015. Structural and functional diversity of nairovirus-encoded nucleoproteins. *Journal of Virology*, 89(23); 11740–11749.
- Watts, D.M., Ussery, M.A., Nash, D. and Peters, C.J. 1989. Inhibition of Crimean-Congo hemorrhagic fever viral infectivity yields in vitro by ribavirin. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 41(5); 581-585.

- Wei, P., Luo, Y., Li, T., Wang, H., Hu, Z., Zhang, F., Zhang, Y., Deng, F. and Sun, S. 2010. Serial expression of the truncated fragments of the nucleocapsid protein of CCHFV and identification of the epitope region. *Virologica Sinica*, 25(1); 45–51.
- Whitehouse, C.A. 2004. Crimean–Congo hemorrhagic fever. *Antiviral Research*, 64(3); 145–160.
- Whitehouse, C.A. 2007. Risk groups and control measures for Crimean-Congo hemorrhagic fever, In: *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever*. Whitehouse, C.A. (ed), Springer, 273-280, Dordrecht.
- Wilson, M.L., Gonzalez, J.P., Cornet, J.P. and Camicas, J.L. 1991. Transmission of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus from experimentally infected sheep to *Hyalomma truncatum* ticks. *Research in Virology*, 142(5); 395-404.
- Wolff, S., Becker, S. and Groseth, A. 2013. Cleavage of the Junin virus nucleoprotein serves a decoy function to inhibit the induction of apoptosis during infection. *Journal of Virology*, 87(1); 224–233.
- Xiao, X., Feng, Y., Zhu, Z. and Dimitrov, D.S. 2011. Identification of a putative Crimean-Congo hemorrhagic fever virus entry factor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 411(2); 253–258.
- Xu, J., Bai, X., Wang, L.B., Shi, H.N., Van Der Giessen, J.W., Boireau, P., Liu, M.Y. and Liu, X.L. 2017. Immune responses in mice vaccinated with a DNA vaccine expressing serine protease-like protein from the new-born larval stage of *Trichinella spiralis*. *Parasitology*, 144(6); 712-719.
- Yağcı-Çağlayık, D., Korukluoglu, G. and Uyar, Y. 2014. Seroprevalence and risk factors of Crimean-Congo hemorrhagic fever in selected seven provinces in Turkey. *Journal of Medical Virology*, 86(2); 306e314.
- Yao, H., Dittmann, M., Peisley, A., Hoffmann, H.H., Gilmore, R.H., Schmidt, T., Schmid-Burgk, J.L., Hornung, V., Rice, C.M. and Hur, S. 2015. ATP-Dependent effector-like functions of RIG-I-like receptors. *Molecular Cell*, 58(3); 541–548.
- Yılmaz, M., Aydın, K., Akdogan, E., Sucu, N., Sonmez, M., Omay, S.B. and Koksall, I. 2008. Peripheral blood natural killer cells in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Journal of Clinical Virology*, 42(4); 415-7.
- Yılmaz, G.R., Buzgan, T., Irmak, H., Safran, A., Uzun, R., Cevik, M.A. and Torunoglu, M.A. 2009. The epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey, 2002—2007. *International Journal of Infectious Diseases*, 13(3); 380-386.

- Yoder, A.D. and Yang, Z. 2000. Estimation of primate speciation dates using local molecular clocks. *Molecular Biology and Evolution*, 17(7); 1081–1090.
- Zakhashvili, K., Tsertsvadze, N., Chikviladze, T., Jghenti, E., Bekaia, M., Kuchuloria, T., Hepburn, M.J., Imnadze, P. and Nanuashvili, A. 2010. Crimean-Congo hemorrhagic fever in man, Republic of Georgia, 2009. *Emerging Infectious Diseases*, 16(8); 1326–1328.
- Zivcec, M., Metcalfe, M.G., Albariño, C.G., Guerrero, L.W., Pegan, S.D., Spiropoulou, C.F. and Bergeron, É. 2015. Assessment of inhibitors of pathogenic Crimean-Congo hemorrhagic fever virus strains using virus-like particles. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(12); e0004259
- Zivcec, V., Scholte, F.E.M., Spiropoulou, C.F., Spengler, J.R. and Bergeron, E. 2016. Molecular Insight into Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. *Viruses*, 8(4); 106
- Zhang, H.M., Yang, J., Sun, H.R., Xin, X., Wang, H.D., Chen, J.P. and Adams, M.J. 2007. Genomic analysis of rice stripe virus Zhejiang isolate shows the presence of an OTU-like domain in the RNA1 protein and a novel sequence motif conserved within the intergenic regions of ambisense segments of tenuiviruses. *Archives of Virology*, 152(10); 1917–1923.
- Zhang, Y., Werling, U. and Edelmann, W. 2014. Seamless ligation cloning extract (SLiCE) cloning method, In: *DNA Cloning and Assembly Methods*. Valla, S. and Lale, R. (eds), Humana Press, 235–244, Totowa, NJ.
- Zhao, C., Denison, C., Huibregtse, J.M., Gygi, S. and Krug, R.M. 2005. Human ISG15 conjugation targets both IFN-induced and constitutively expressed proteins functioning in diverse cellular pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 102(29); 10200–10205.
- Zheng, D., Chen, G., Guo, B., Cheng, G. and Tang, H. 2008. PLP2, a potent deubiquitinase from murine hepatitis virus, strongly inhibits cellular type I interferon production. *Cell Research*, 18(11); 1105–1113.
- Zhou, Z.R., Wang, M.L., Deng, F., Li, T.X., Hu, Z.H. and Wang, H.L. 2011. Production of CCHF virus-like particle by a baculovirus-insect cell expression system. *Virologica Sinica*, 26(5); 338–346.
- Zuckerkandl, E. and Pauling, L. 1962. Molecular disease, evolution and genetic heterogeneity, In: *Horizons in Biochemistry*. Kasha, M. and Pullman, B. (eds), Academic Press, 189–225, New York.
- Zuckerkandl, E. and Pauling, L. 1965. Evolutionary divergence and convergence in proteins, In: *Evolving Genes and Proteins*. Bryson, V. and Vogel, H.J. (eds), Academic Press, 97–166, New York.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ergin ŞAHİN
Doğum Yeri : Malatya
Doğum Tarihi : 28.08.1983
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce (2017 YDS: 91,25 / 2017 YÖKDİL: 97,50 / 2009 TOEFL: 84)

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

İlk Öğretim : TED Ankara Koleji (1998)
Orta Öğretim : Ankara Gazi Anadolu Lisesi (2001)
Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2006)
Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Hepatoloji Anabilim Dalı (2008)
Yüksek Lisans : Louisville Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve İmmünoloji Bölümü (2012)
Doktora : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı (2014–2018)

SCI Yayınlar

D.H. CHUNG, C.B. JONSSON, N.A. TOWER, Y.K. CHU, **E. ŞAHİN**, J.E. GOLDEN, J.W. NOAH, C.E. SCHROEDER, J.B. SOTSKY, M.I. SOSA, D.E. CRAMER, S.N. MCKELLIP, L. RASMUSSEN, E.L. WHITE, C.S. SCHMALJOHN, J.G. JULANDER, J.M. SMITH, C.M. FILONE, J.H. CONNOR, Y. SAKURAI and R.A. DAVEY, Discovery of a novel compound with anti-Venezuelan equine encephalitis virus activity that targets the nonstructural protein 2, PLOS Pathogens, 2014, 10(6); e1004213.

M. ERDOĞAN and **E. ŞAHİN**, β -Tubulin mRNA expression profiles during long-term memory formation in classically conditioned *C. elegans*, Journal of Neurological Sciences (Turkish), 2013, 30(2); 296-304.

Hakemli Dergiler

E. ŞAHİN and I. AKATA, Viruses infecting macrofungi, VirusDisease, 2018, 29(1); 1-18.

Z. ELMAZOĞLU, V. ERGİN, **E. ŞAHİN**, H. KAYHAN and Ç. KARASU, Oleuropein and rutin protect against 6-OHDA-induced neurotoxicity in PC12 cells through modulation of mitochondrial function and unfolded protein response, Interdisciplinary Toxicology, 2017, 10(4); 129-141.

E. ŞAHİN, Evaluation of antiviral resistant hepatitis B virus subpopulations in patients with chronic hepatitis B by using terminal restriction fragment length polymorphism, *VirusDisease*, 2015, 26(4); 267-275.

E. ŞAHİN, M.E. EGGER, K.M. MCMASTERS and H.S. ZHOU, Development of oncolytic reovirus for cancer therapy, *Journal of Cancer Therapy*, 2013, 4(6); 1100-1115.

Uluslararası Kongreler

E. ŞAHİN, A. ÇÖLERİ CİHAN, A. ÖZKUL, In Vitro Expression Of CCHFV Surface Glycoprotein GC Via A Plasmid Vector Generated As DNA Based Vaccine, Sözlü Sunum, 2. International Conference On Crimean Congo Haemorrhagic Fever, 10 Eylül 2017, 12 Eylül 2017.

E. ŞAHİN, I. AKATA, Viruses Of Fungi: Perspectives On Macrofungus Virology, Sözlü Sunum, First Eurasian Mycology Congress, 03 Temmuz 2017, 05 Temmuz 2017.

E. ŞAHİN, The Use Of Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism For The Evaluation Of Antiviral Resistant Hepatitis B Virus Subpopulations In Patients With Chronic Hepatitis B, Poster Sunumu, The Viral Hepatitis Congress, 10 Eylül 2015, 12 Eylül 2015.

E. ŞAHİN, D.D. TAYLOR, Ç. GERÇEL TAYLOR, Exosomes Derived From Ascitic Fluid Of Patients With Ovarian Carcinoma Induce IL-4 Gene Expression In T Lymphocytes, Poster Sunumu, ACCR Tumor Immunology And Immunotherapy: A New Chapter, 1 Aralık 2014, 4 Aralık 2014.

Diğerleri

Görev Aldığı Projeler

KURUMSAL BAP, ARAŞTIRMACI, Termofilik *Anoxybacillus* Türlerinin Alfa-amilaz genlerinde Yapısal ve İşlevsel Genomik Çalışmalar, Yürütülen Kuruluş: ANKARA ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: ANKARA ÜNİVERSİTESİ (Yurt İçi), 01 Kasım 2016, 01 Kasım 2017.

ULUSLARARASI, ARAŞTIRMACI, A Cell-Based HTS to Discover Molecules That Inhibit Venezuelan Equine Encephalitis Virus Replication, Yürütülen Kuruluş: UNIVERSITY OF LOUISVILLE, Destek Alınan Kuruluş: National Institute of Health (Yurt Dışı), 01 Ocak 2011, 30 Nisan 2013.

TÜBİTAK 1001, YÜRÜTÜCÜ, *Caenorhabditis elegans*'ta Öğrenme ve Bellek, Yürütülen Kuruluş: ANKARA ÜNİVERSİTESİ, TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Birimi (Yurt İçi), 01 Ağustos 2005, 01 Ağustos 2006.

Aldığı Burslar

T.C. MİLLÎ EĞİTİM BAKANLIĞI YÜKSEK ÖĞRENİM GENEL MÜDÜRLÜĞÜ,
1416 sayılı kanuna kapsamında Yurtdışı Lisansüstü Öğrenim Bursu (Yurt İçi), 15
Ağustos 2008, 15 Haziran 2013

TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Birimi, Yurtiçi Yüksek Lisans Burs Programı
(Kod: 2210) 01 Ocak 2007, 28 Temmuz 2008

