



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



**KOYUNLARDA VİRAL HASTALIK
MAEDİ-VİSNA'YA KARŞI
AŞI GELİŞTİRİLMESİNDE ANTİJENİK
EPİTOPLARIN KEŞFİ**

Yüksek Lisans Tezi

Ecem Su KOÇKAYA

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

İzmir
2023

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**KOYUNLARDA VİRAL HASTALIK
MAEDİ-VİSNA'YA KARŞI
AŞI GELİŞTİRİLMESİNDE ANTİJENİK
EPİTOPLARIN KEŞFİ**

Ecem Su KOÇKAYA

Danışman: Prof. Dr. Cemal ÜN

Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Programı

İzmir
2023

Ecem Su KOÇKAYA tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “Koyunlarda Viral Hastalık Maedi-Visna’ya Karşı Aşı Geliştirilmesinde Antijenik Epitopların Keşfi” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 13/07/2023 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı	:	
Raportör Üye	:	
Üye	:	

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi / Doktora Tezi olarak sunduğum “Koyunlarda Viral Hastalık Maedi-Visna’ya Karşı Aşı Geliştirilmesinde Antijenik Epitopların Keşfi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

13/ 07 / 2023

Ecem Su KOÇKAYA

ÖZET**KOYUNLARDA VİRAL HASTALIK MAEDİ-VİSNA'YA
KARŞI AŞI GELİŞTİRİLMESİNDE ANTİJENİK EPİTOPLARIN
KEŞFİ**

KOÇKAYA, Ecem Su

Yüksek Lisans Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Cemal ÜN

Temmuz 2023, 58 sayfa

Maedi Visna (MVV), retrovirüsler familyasının Lentivirus alt grubunda yer alan, koyunları enfekte eden virüstür. Hastalığın Maedi formu ilerleyici bir interstisyel pnömonidir, Visna ise bir meningoensefalittir. Hayvan sağlığı ve refahı problemlerinin yanında ciddi ekonomik kayıplara sebep olan bu virüse karşı günümüzde halen etkin bir tedavi yöntemi ve korunmaya yönelik aşı bulunmamaktadır. Öte yandan biyoinformatik alanındaki gelişmeler, aşı çalışmalarının ilk ve en önemli adımını oluşturan antijenik proteinlerin ve epitopların seçimi için büyük olanaklar sağlamaktadır. Buradan yola çıkılarak *in silico* analizler sonrasında sentezlenen epitopların immünojenitesi *in vitro* koşullarda MVV pozitif koyunlardan toplanan serum örneklerinin kullanımı ile test edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre gag proteininin amino asit sekanslarının daha fazla korunduğu ve daha yüksek antijenite değerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, multi-epitop aşı konstraktı toplam 19 epitop ile tasarlanmıştır ve TLR-2/4 arasında güçlü bir afinite göstermiştir. Yapılan ELISA testlerinden elde edilen absorbans değerlerine göre tüm peptitlerin immünojenik olduğu saptanmıştır. Yapılan ROC analizi sonucunda, sentezlenen peptitlerden gag proteini için 3. peptit' in (CKQGSKE), env proteini için 5. peptit' in (CEHERRTSHRS) gösterdikleri yüksek değerlerdeki sensitivite ve spesifite ile en iyi peptitler olduğu sonucuna varılmıştır. Sonuç olarak, MVV'ye karşı peptit aşısı geliştirilmesi sırasında kullanılabilecek immünojenitesi hem *in silico* hem de *in vitro* çalışmalar ile gösterilmiş ideal peptitler ilk kez saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: Maedi-Visna, reverse vaccinology, immünoinformatik ve ELISA

ABSTRACT
**DISCOVERY OF ANTIGENIC EPITOPES IN VACCINE
DEVELOPMENT AGAINST VIRAL DISEASE MAEDI-VISNA IN
SHEEP**

KOÇKAYA, Ecem Su

MSc in Biotechnology.

Supervisor: Prof. Dr. Cemal ÜN

July 2023, 58 pages

Maedi Visna (MVV), is a retrovirus that member of the lentivirus subfamily and it can infect the sheep. The Maedi form of the disease is a progressive interstitial pneumonia, while Visna is a meningoencephalitis. While virus cause serious economic losses as well as animal health and welfare problems, there is no effective treatment and vaccine. For this reason, the need of developing a vaccine against MVV is inevitable. On the other hand, developments in bioinformatics provide great opportunities for the selection of antigenic proteins and epitopes, which constitute the first and most important step of vaccine studies. Moreover, the selected epitopes can be synthesized in a short time, and their immunogenicity can be tested in vitro with the use of serum samples collected from previously infected hosts. From that point, the immunogenicity of the epitopes synthesized after *in silico* analysis was tested by using serum samples collected from MVV positive sheep under *in vitro* conditions. According to the obtained data, the amino acid sequence of gag protein was found more conserved and antigenic. the multi-epitope vaccine construct was designed with a total of 19 epitopes and showed strong affinity for TLR-2/4. According to the absorbance values obtained from ELISA tests, it was determined as all peptides were immunogenic. As a result of the ROC analysis, it was concluded that the 3. peptide for the gag protein (CKQGSKE) and the 5. peptide for the env protein (CEHERRTSHRS) were best peptides with their high sensitivity and specificity. In conclusion, ideal peptides for the development of a peptide vaccine against MVV have been identified for the first time that demonstrated by both in silico and in vitro studies.

Keywords: Maedi-Visna, reverse vaccinology, immunoinformatics, ELISA

ÖNSÖZ

Maedi Visna Virüsü, akciğer ve merkezi sinir sistemini enfekte ederek koyunlarda ölümcül bir hastalığa sebep olmaktadır. Hastalığın inkübasyon süresinin uzun olması nedeniyle enfekte koyun hiçbir belirti göstermeden tüm sürüye virüsü bulaştırabilmektedir. Virüs her ne kadar ciddi sosyo-ekonomik kayıplara yol açsa da hastalığa karşı günümüzde henüz efektif bir tedavi yöntemi ya da aşı geliştirilememiştir. Öte yandan biyoinformatik ve deneysel immünolojinin bir ara yüzü olarak ortaya çıkan immünoinformatik alanı, en iyi antijen seçiminde aşı teknolojisine büyük vaatler sağlamaktadır.

Böylelikle, Maedi Visna Virüsüne karşı aşı geliştirilmesindeki çabaların eksikliğini gidermek için bu çalışmada çeşitli reverse vaccinology tekniği ve immünoinformatik programların içine girdiği *in silico* çalışmaların yanında ELISA analizlerinin içine girdiği *in vitro* çalışmalarla, bir peptit aşısı için en iyi aday epitoplar seçilmiştir. Sonuç olarak, Maedi Visna virüsüne karşı peptit aşısı geliştirilmesi sırasında kullanılabilecek, immünojenitesi hem *in silico* hem de *in vitro* çalışmalar ile gösterilmiş ideal peptitler Türkiye’de ve dünyada ilk kez saptanmıştır. Elde edilen sonuçlarla beraber seçilen epitopların kullanımı, pre-klinik aşamadaki hayvan deneylerinde humoral ve hücrel bağışıklık tepkilerini aktive edip güçlü bir immün yanıtın ortaya çıkacağı düşünülmektedir.

Bu tez çalışması boyunca, bilim dünyasında henüz yeni bir alan olan immünoinformatiğe yönelik çeşitli analizler öğrendim. Bununla beraber reverse vaccinology tekniğinin mantığını ve uygulamalarını öğrenerek genom sekanslama teknolojisinin aşı geliştirme çalışmalarına olan etkisini anlayarak bu teknikte uzmanlaştım. Ayrıca aşı çalışmalarının vazgeçilmezi olan ELISA analizlerini öğrenerek ilerleyen aşı çalışmalarında yoluma ışık tutacağına inanmaktayım. Yaptığım analizler süresince öğrendiğim bilgiler ve tecrübelerin gelecekteki çalışmalarına yol göstereceğini düşünmekteyim.

İZMİR

13.07.2023

Ecem Su KOÇKAYA

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
İÇİNDEKİLER	xiii
1. GİRİŞ	1
2. LİTARATÜR ÖZETİ.....	4
2.1 Tarihçe ve sınıflandırma	4
2.2 Hastalık Epizootiyolojisi.....	4
2.3 Viral genomun organizasyonu ve morfolojisi	6
2.4 Hastalık patogenezi ve klinik belirtiler	7
2.5 Tanı Yöntemleri.....	9
2.6 Virüs Bulaş Yolları.....	9
2.7 Hastalığa karşı korunmada aşı teknikleri	10
2.8. İmmünoloji	10
2.9 Konvansiyonel aşılarından biyoteknolojik aşılarına: Reverse vaccinology tekniği	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	15
3.1 Varyasyon analizi.....	15
3.2 Proteinlerin fiziko-kimyasal özellikleri ve sekonder yapı tahmini	15
3.3 Antijenite tahmini	15
3.4 Subselüler lokalizasyon, transmembran heliks sayısı ve proteinlerin membrandaki konumu	16
3.5 Sinyal peptit tahmini	16
3.6 Alerjenite tahmini	16

İÇİNDEKİLER (devam)

3.7 BetaWrap motiflerinin tahmini.....	17
3.8 Konak proteomu ile benzerlik.....	17
3.9 B hücre epitoplarının tahmini.....	17
3.10 MHC-I ve MHC-II epitoplarının tahmini.....	18
3.11 Moleküler docking analizleri	19
3.12 Epitopların toksisite, çözünürlük ve hemolitik özelliklerinin tahmini.....	19
3.13 Epitoplarda solvent ekspozite pozisyonların tahmini	20
3.14 Multi-epitop aşı konstraktının tasarımı	20
3.15 Proteinlerin 3D yapısal modellemesi.....	20
3.16 Multi-epitop aşı konstraktının 3D görüntüsünün iyileştirilmesi ve doğrulanması	21
3.17 Serum örnekleri.....	21
3.18 B hücre epitoplarının indirekt elisa ile immünojenite tayini	22
3.18.1 Laboratuvar aletleri	22
3.18.2 Solüsyonlar	22
3.18.3 Antikor	22
4. BULGULAR	24
4.1 Varyasyon analizi	24
4.2 Proteinlerin fiziko-kimyasal özellikleri ve sekonder yapı tahmini.....	24
4.4 Subselüler lokalizasyon, transmembran heliks sayısı ve proteinlerin membrandaki konumu	26
4.5 Sinyal peptit tahmini.....	27
4.6 Alerjenite tahmini	27
4.7 BetaWrap motiflerinin tahmini.....	28
4.8 Konak proteomu ile benzerlik.....	28
4.9 B hücre epitoplarının tahmini.....	28
4.10 MHC-I ve MHC-II epitoplarının tahmini.....	29

4.12 Epitoplarda solvent ekspozite pozisyonların tahmini	34
4.13 Multi-epitop aşısı konstraktının tasarımı	34
4.14 Multi-epitop aşısı konstraktının 3D görüntüsünün iyileştirilmesi ve doğrulanması	37
4.15 B hücre epitoplalarının peptit ELISA ile immünojenite tayini	40
5. TARTIŞMA	52
6. SONUÇ	58
KAYNAKLAR DİZİNİ	59
TEŞEKKÜR	71



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sekil

Sayfa

1.1. Maedi-Visna virüsünün genomik organizasyonu	7
1.2. Maedi-Visna virüsünün morfolojik yapısı.	7
1.3. Maedi-Visna virüsü ile enfekte olmuş koyun.	8
4.1. Gag ve env proteininin zardaki uzamsal konumu.....	27
4.2. MHC-I alellerinin, tahmini epitopları ile docking analizi sonuçları.....	33
4.3. MHC-II alellerinin, tahmini epitopları ile docking analizi sonuçları.....	33
4.4. Multi epitop aşı konstraktının, TLR reseptörü ile docking analizi	34
4.5. Multi epitop aşı konstraktının şematik olarak görselleştirilmesi	35
4.6. Sekonder yapı özelliklerine ilişkin grafik	36
4.7. Multi-epitop aşı konstraktının solvent ekspoz alan grafiği.	36
4.8. Multi-epitop aşı konstraktının 3 boyutlu yapı tahmini ve amino asit sekansı	38
4.9. Multi-epitop aşı konstraktının iyileştirilmiş yapıları.	39
4.10. Multi-epitop aşı konstraktının validasyonu.....	40
4.11. 1. peptit' in (CRPQGKAGHKG) pozitif ve negatif serum örnekleri ile absorbans değerlerinin grafikleştirilmesi.	42
4.12. 2. peptit' in (CPGNRAQKE) pozitif ve negatif serum örnekleri ile absorbans değerlerinin grafikleştirilmesi.	43
4.13. 3. peptit' in (CKQGSKE) pozitif ve negatif serum örnekleri ile absorbans değerlerinin grafikleştirilmesi.	43
4.14. 4. peptit' in (CVKRQQEEEEQQGLVSGKKKS) pozitif ve negatif serum örnekleri ile absorbans değerlerinin grafikleştirilmesi.....	44
4.15. 5. peptit' in (CEHERRTSHRS) pozitif ve negatif serum örnekleri ile absorbans değerlerinin grafikleştirilmesi.	44
4.16. 6. peptit' in (CWEKEDEESMK) pozitif ve negatif serum örnekleri ile absorbans değerlerinin grafikleştirilmesi.	45
4.17. 7. peptit' in (CKYSCESN) pozitif ve negatif serum örnekleri ile absorbans değerlerinin grafikleştirilmesi.	45
4.18. Gag peptitlerinin karışımının (CRPQGKAGHKG, CPGNRAQKE, CKQGSKE) pozitif ve negatif serum örnekleri ile absorbans değerlerinin grafikleştirilmesi.	46

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

4.19. Env peptitlerinin karışımının (CVKRQQQEEEEQQGLVSGKKKS, CEHERRTSHRS, CWEKEDEESMK, CKYSCSN) pozitif ve negatif serum örnekleri ile absorbans değerlerinin grafikleştirilmesi.	46
4.20. 1. peptit' in (CRPQGKAGHKG) pozitif ve negatif serum örnekleri ile absorbans değeri ortalamalarının grafikleştirilmesi.....	47
4.21. 2. peptit' in (CPGNRAQKE) pozitif ve negatif serum örnekleri ile absorbans değeri ortalamalarının grafikleştirilmesi.....	47
4.22. 3.peptit' in (CKQGSKE) pozitif ve negatif serum örnekleri ile absorbans değeri ortalamalarının grafikleştirilmesi.....	48
4.23. 4. peptit' in (CVKRQQQEEEEQQGLVSGKKKS) pozitif ve negatif serum örnekleri ile absorbans değeri ortalamalarının grafikleştirilmesi.	48
4.24. 5.peptit' in (CEHERRTSHRS) pozitif ve negatif serum örnekleri ile absorbans değeri ortalamalarının grafikleştirilmesi.....	49
4.25. 6. peptit' in (CWEKEDEESMK) pozitif ve negatif serum örnekleri ile absorbans değeri ortalamalarının grafikleştirilmesi.....	49
4.26. 7. peptit' in (CKYSCSN) pozitif ve negatif serum örnekleri ile absorbans değeri ortalamalarının grafikleştirilmesi.....	50
4.27. Gag peptitlerinin karışımının (CRPQGKAGHKG, CPGNRAQKE, CKQGSKE) pozitif ve negatif serum örnekleri ile absorbans değeri ortalamalarının grafikleştirilmesi.	50
4.28. Env peptitlerinin karışımının (CVKRQQQEEEEQQGLVSGKKKS, CEHERRTSHRS, CWEKEDEESMK, CKYSCSN) pozitif ve negatif serum örnekleri ile absorbans değeri ortalamalarının grafikleştirilmesi.	51

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
4.1. ExPASy ProtParam tarafından tahmin edilen fiziko-kimyasal parametrelerin sonuçları.....	25
4.2. Her bir proteinin ve multi epitop aşısı konstraktının çeşitli analizlerinin sonuçları.....	26
4.3. B hücrelerine özgü epitoplar.....	29
4.4. MHC-I ve MHC-II alellerine özgü epitoplar.....	30
4.5. MHC-I ve MHC-II alellerine özgü epitopların özellikleri.....	31
4.6. Her bir peptidin ROC analizi ve t-testi ile elde edilen sonuçları.....	42

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
MVV	Maedi-Visna Virüsü
bç	Baz çifti
kb	Kilo baz
kDA	kilodalton
gag	grup spesifik antijen
env	envelop
pol	polimeraz
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
AGID	Agar jeli immunodifüzyon testi
RIPA	Ristosetin Agregasyon Testi
WB	Western Blot
TCR	T-hücre reseptörü
MHC	Majör doku uygunluk kompleksi
HLA	İnsan lökosit antijeni
MALT	Mucosa-associated lymphoid tissue
ASH	Antijen Sunan Hücre
DNA	Deoksiribonükleik Asit
IEDB	İmmün Epitop Veritabanı
NCBI	Biyoteknoloji Enformasyonu için Ulusal Merkez
BLAST	Temel lokal hizalama arama aracı
PDB	Protein Data Bankası
GRAVY	Grand Average of Hydropathicity Value

1. GİRİŞ

Maedi-Visna (MVV) koyunlarda gözlenen kronik bir viral enfeksiyondur. Hastalığın etkeni olan MVV, Retrovirüsler familyasının Lentivirüs alt grubunda yer alan pozitif kutuplu, klinik ve patolojik bulguları yönünden iki ayrı formda gözlenen ve inkübasyon süresinin uzun olması nedeniyle yavaş seyirli virüs hastalıkları içinde listelenen bir virüstür (Pepin et al., 1998). Enfeksiyona ilk kez 1939 yılında İzlanda'da, Almanya'dan ihraç edilen Karakul koyunlarında tespit edilmiştir. 1952 yılında literatüre kazandırılıp, günümüzde Yeni Zelanda ve Avustralya hariç pek çok ülkede yüksek prevalanslarda gözlenmektedir (Sigurdsson, 1954; Blacklaws et al., 2004).

Enfeksiyon çeşitli organda ilerleyici enflamatuvar lezyonlarla karakterize olup insan (HIV) ve maymun (SIV) immün yetmezlik virüslerinin de içine girdiği Lentivirüs alt grubuna karakteristik enfeksiyon özelliklerine sahiptir ve konakçı spesifiktirler (Norouzi et al., 2015). İmmün sistem hücrelerinden monosit/makrofaj ve dentritik hücrelerini enfekte eder ve konak hücre genomuna kendi genomunu entegre ederek yaşam boyu devam eden ölümcül bir enfeksiyona sebep olurlar (Ryan et al., 2000). Hastalığın Visna formu merkezi sinir sistemi ile ilgili bozukluklara sebep olur. Yürüyüşte bozuklukların gözleendiği ve özellikle arka bacaklarda zayıflıkların oluştuğu bu formda, enfekte hayvanlar sürünün gerisinde kalır, zaman zaman düşerler. Bazı durumlarda baş bir yana bükölüp, dudak ve yanak kaslarında kasılmalar oluşabilir. Bacaklardaki zayıflık zamanla ilerler ve felç meydana gelir (Sigurdsson et al., 1957). Hastalığın Maedi formu ise, dispnea, solunumda zorlanma ve hızında artma, bazen kuru bir öksürük ile karakterize edilir. Enfekte koyunlardan doğan kuzular küçük ve zayıftırlar. Bunun yanında koyunların süt veriminde düşme ile düşük doğumlar gözlenebilmektedir (Sigurdsson et al., 1952).

Hastalığa karşı günümüzde halen etkin bir tedavi yöntemi bulunmadığından ve korunmaya yönelik aşların geliştirilmesindeki çabalar henüz tatmin edici sonuçlar vermediğinden dolayı hayvancılık sektöründe, hayvan sağlığı ve refahı yanında ciddi ölçekli büyük ekonomik kayıplar yaşanmaktadır.

Bu sebeple devam edecek çalışmalar için yüksek bağışıklık yanıtı sağlayan epitop bölgelerinin seçimi güçlü peptit aşı adaylarının belirlenmesi için çok önemlidir (Kalogianni et al., 2020).

Aşılar, virüs, bakteri veya parazit gibi patojen organizmaların hastalığa neden olan özelliklerini arındırma gc ile hümoral ve hücrenel bağışıklık sistemini uyarak güvenilir şekilde bağışıklık tepkisi başlatabilen biyolojik ürünlerdir (Plotkin ve Plotkin, 2004). Hayvanların yaşamlarını kurtararak ve sağlıklı yaşamlarını koruyarak patojenlerle mücadelede en etkili stratejidir (Arora ve Aryandra, 2020). Bu etkili strateji, 10-15 yıl arasında değişen geliştirilme sürecine sahip, antijen keşfi ve hayvan denemeleri gibi pre-klinik aşamalar içeren, sonrasındaysa klinik aşamaların gerçekleştirildiği uzun soluklu süreçlerden oluşmaktadır. Antijen keşfi ise bu uzun soluklu süreçlerin ilk ve en önemli aşamasını oluşturmaktadır (Rappuoli, 2004; Lee et al., 2012).

Gelişen bilgisayar tabanlı programlar ile *in silico* yöntemler ve reverse vaccinology tekniği, aşı çalışmalarının ilk ve en önemli adımını oluşturan antijenik proteinlerin ve epitop adı verilen 10-15 amino asit uzunluğundaki peptitlerin seçimi için büyük olanaklar sağlamaktadır (Rappuoli, 2004). Bu sayede kısa bir zaman dilimi içerisinde büyük harcamalara gerek kalmadan patojen organizmaların genomu analiz edilebilir ve böylece aşı çalışmaları için önemi olan yapısal proteinler seçilebilir. Dahası, seçimi yapılan peptitler/epitoplar günümüz teknolojisi koşullarında kısa zamanda sentezlenerek, daha önceden hastalığı geçirmiş konaklardan toplanan serum örneklerinin kullanımı ile *in vitro* koşullarda immünojenitesi test edilebilir (Can et al., 2022).

Buradan yola çıkararak bu çalışmada 9.2 kilo baz büyüklüğünde bir genoma sahip Maedi-Visna virüsünün gag ve env adı verilen yapısal proteinleri, antijenisite, B ve T hücre epitop tahmini ve docking analizlerinin dahil olduğu çok sayıda biyoinformatik analizi içeren bir yaklaşım ile ilk kez çalışılmıştır. İçlerinden aşı çalışmalarında kullanılabilecek olan yüksek antijenite değerine sahip, alerjen ve toksik olmayan, suda znr, MHC-I ve MHC-II ile yüksek bağlanma afinitesine sahip en ideal B ve T hücre epitopları tespit edilerek, belirlenen epitoplardan antijenik ve immünojenik yönlerinden ne çıkanlar aşı adayı olarak seçilmiştir. Seçilen epitoplar uygun linker diziler ile birbirine

bağlanarak multi-epitop peptit aşı kontraktı tasarlanmış ve moleküler docking ile TLR2 ve TLR4 reseptörleri ile bağlanma afinitesi test edilmiştir. Biyoinformatik analizler sonrasında sentezlenen epitopların immünojenitesi *in vitro* koşullarda ELISA yöntemi ile çok iyi kategorize edilmiş “Bandırma Koyunculuk Araştırma Enstitüsü” arşivinde tutulan Maedi-Visna pozitif ve negatif koyunlardan toplanmış serum örneklerinin kullanımı ile test edilmiştir.

Sonuç olarak bu tezde, veteriner hekimlikte önemli bir viral hastalık olan ve hayvancılık sektöründe ciddi ekonomik kayıplara neden olan Maedi-Visna virüsüne karşı peptit aşısı geliştirilmesi sırasında kullanılabilecek olan antijenitesi ve immünojenitesi hem biyoinformatik hem de *in vitro* çalışmalar ile gösterilmiş ideal peptitler Türkiye’de ve dünyada ilk kez saptanmıştır. Ayrıca, belirlenen peptitler/epitoplar MVV’ye karşı peptit aşısı geliştirilme çalışmalarının pre-klinik aşamasında kullanım için hazır hale getirilmiştir.

2. LİTARATÜR ÖZETİ

2.1 Tarihçe ve sınıflandırma

MVV, insan (HIV), maymun (SIV), kedi (FIV) ve sığır (BIV) immün yetmezlik virüsleri, caprine arthritis encephalitis virüsünün (CAEV) ve at enfeksiyöz anemi virüsünün (EIAV) içinde yer aldığı, Retrovirüsler familyasının Lentivirüs alt grubunda bulunan bir virüstür (Caroline et al., 2010). Aynı zamanda küçükbaş hayvanları enfekte ettiği için MVV, Small Ruminant Lentivirus (SRLV) grubuna da dahil edilmektedir. SRLV alt tiplerinde A, B, C, D ve E olmak üzere 5 suş tanımlanmıştır (Gomez-Lucia et al., 2018). Günümüzde genomik sekansı bilinen çeşitli MVV izolatu bulunmaktadır. Örneğin, K1514 (İzlanda), KV1772 (İzlanda), LV1-1 (İzlanda), EV1 (İngiltere), 697, (İspanya), 85/34 (ABD), ve NM1111 (Çin), bu sekanslanmış suşlardan bir kaçıdır (Sonigo et al., 1985; Staskus et al., 1991, Sargan et al., 1991; Glaria et al., 2012; Karr et al., 1996).

2.2 Hastalık Epizootiyolojisi

İlk kez Almanya'dan İzlanda'ya ihraç edilen Karakul ırkı koyunlarda 1939 yılında saptanan MVV'nin o zamanlar klinik belirtileri gözle görülür olsa da hayvanların durumu hafife alınıp yanlış teşhis konulmuştur (Thormar, 2013). Günümüzde ise koyun yetiştiriciliği yapılan birçok ülkede varlığı bilinmektedir. Türkiye'de varlığı ilk kez 1975 yılında patolojik verilere dayanılarak tanımlanmıştır (Gürçay ve Parmaksız, 2013). Bununla birlikte tüm dünyada yüksek prevalansa sahip olup Avustralya ve Yeni Zelanda hariç olmak üzere dünyanın koyun yetiştiriciliği yapılan çoğu bölgesinde yaygın olarak saptanmıştır (Lopez and Martinson, 2017). Örneğin, seroprevelans araştırmalarında, İtalya'da %60-90 (Tolari, 2000), Portekiz'de %82 (Fevereiro, 1995), İspanya'da %52,8 (Pérez et al., 2010), İsviçre'de %9 (Schaller et al., 2000), Yunanistan'da %33,5 (Minas, 1994), Almanya'da %51,2 (Hüttner, 2010), İran'da %2,2 (Sakhaee ve Khalili, 2010), Irak'da %22,9 (Al-Baroodi et al., 2022) oranlarında Maedi-Visna ile enfekte hayvan saptanmıştır. Bu çalışmaların yanında Türkiye'de erişkin 11 farklı sürü ile gerçekleştirilen seroprevelans oranlarının araştırılmasıyla beraber bu oranın %0 ila %83 arasında değiştiği saptanmıştır. Örneğin Çine Çaparı ve Karakacan koyunları tamamen seronegatif testip edilmişken, Karacabey Merinos, Ramlıç,

Hampshire melezi koyun ırklarının en az seropozitif oranına sahip (%2.8) ve Bandırma, Sakız, İmroz ve Kıvrıcık koyunlarının ise en yüksek seropozitif oranına sahip (%23.3) koyun ırkları olduğu tespit edilmiştir (Yaman et al., 2019). MVV'nin sosyo-ekonomik etkisinin farkına varan Dünya Hayvan Sağlık Örgütü (World Organization for Animal Health), bu virüsü, bildirilmesi zorunlu karasal ve sucul hayvan hastalıkları listesine dahil etmiştir (Tabet et al., 2017). Yapılan araştırmalarla beraber hastalığın ciddiyetini anlayan birçok avrupa ülkesi eradikasyon programları uygulamıştır. Hastalığın çiftlikler arası bulaşına ilişkin epizootiyolojik verilerin eksikliği, kanıtlanabilir eradikasyon programlarının ve bu programları takiben güvenilir bir hastalık kontrolünün geliştirilmesi yolunda önemli bir engel yaratmaktadır (Peterhans et al., 2004; Hüttner et al., 2010). Bu durumun yanında, yapılan araştırmalarda koyunlarda tür farklılığına bağlı olarak hastalığa yatkınlık ve direncin bir dizi lokusa bağlı olarak ortaya çıkabileceği de öne sürülmüştür (Cutlip et al., 1986; Berriatua et al., 2003). Kuzey Amerika koyunlarında yapılan denemelerde esas olarak TMEM154 (transmembran protein 154) geninin küçükbaş lentivirüs enfeksiyonuna karşı duyarlılıkta ilişkili olduğu saptanmıştır. 35. Amino asit pozisyonunda lizin (K35) bulunan iki TMEM154 haplotipine sahip koyunların, aynı pozisyonda glutamat (E35) bulunan koyunlara göre enfekte olma olasılığı daha az olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle TMEM154 haplotiplerine sahip damızlık sürü seçimi Kuzey Amerika sürülerinde eradikasyon stratejisinin tamamlayıcı bir parçası olarak ortaya çıkmıştır. Türkiye de bu haplotiple yapılan çalışmada, bilinen 12 missense mutasyonların 8'inde (E31Q, D33N, E35K, T44M, N70I, E82Y) sekanslarda analiz edilebileceği için ekson 2 çalışılmıştır. Ardından TMEM154 genotipleri, seropozitif koyunların (287) %100'ünde ve seronegatif koyunların (772) %39'unda değerlendirilmiştir. Gerçekleştirilen sekans analizlerinde TMEM154 ekson 2'nin bilinen dört missense mutasyonu (D33 N, E35 K, T44 M ve I70 N) ve daha önce bildirilmemiş yeni bir missense mutasyonu (G38R) ortaya çıkarılmıştır. Bunun yanında haplotip 2, 3 ve 9' un E35 amino asiti taşıdığı saptanarak MVV'ye karşı yüksek duyarlılık gösterebileceği tahmin edilmiştir (Yaman et al., 2019). Ayrıca koyun MHC-II alleleli olan Ovar DRB1 genini bağışıklık sistemindeki anahtar rolü ile koyunlar ve diğer memeli canlılarda çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiş ve enfeksiyona karşı dirençli koyunların seçiminde araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Türkiye de gerçekleştirilen çalışmalarda bu genin yoğun varyasyonlar içerdiği bilinen

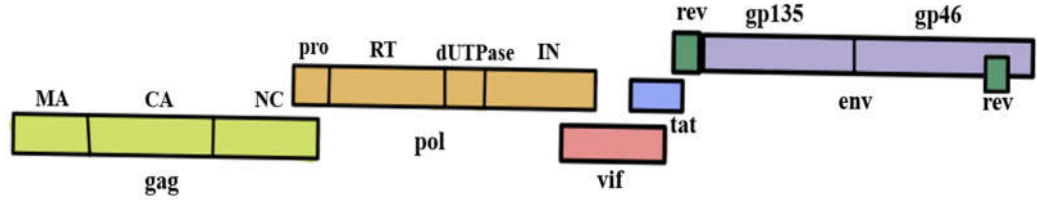
ekson 2 bölgesinde ırklar arasında toplam 65 adet ekson 2 haplotip sayısı tahmin edilmiştir. Bu haplotiplerin yanı sıra ekson 2 nin 11 bp yukarısında bulunan intron 1 bölgesinde 2 bp delesyon mutasyonu da (CG nükleotidlerinde gerçekleşen mutasyon) tanımlanmıştır. Bu delesyonun haplogrup 13 (13:01, 13:02 ve 13:03) üzerindeki bir H/Y61T mutasyonu ile bağlantılı olduğu ve MVV enfeksiyonuna karşı duyarlılığa sebep olabileceği düşünülmüştür (Yaman et al., 2021). Böylelikle MVV enfeksiyonuna yakalanma riskini azaltmada 2 bp del varyantının ve TMEM154 genindeki mutasyonların göz önünde bulundurulması gerektiği sonucuna varılmıştır (Yaman et al., 2019; Yaman et al., 2021)

2.3 Viral genomun organizasyonu ve morfolojisi

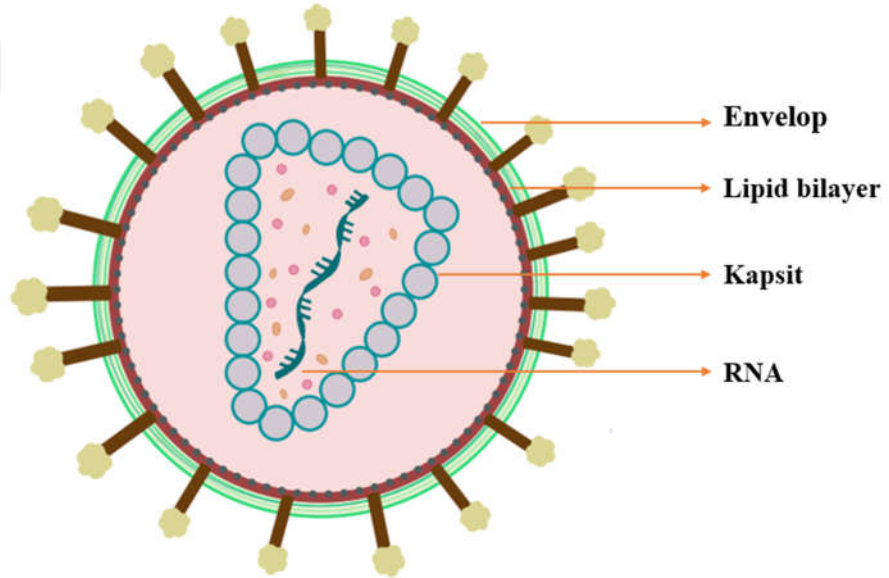
MVV, pozitif kutuplu bir RNA dimerinden oluşan, 9.2 kb büyüklüğünde genoma sahip bir virüstür. Genomunda üç yapısal gen (gag, pol, env) ve üç aksesuar gen (tat, rev, vif) bulunur (Şekil 1.1) (Thormar, 2005). Yapısal genlerden gag geni; kapsit (p25), nükleokapsit (p14) ve matris proteini (p17) olmak üzere üç protein kodlar. Kapsit proteini virionun hidrofobik çekirdeğini oluşturur ve enfeksiyon sırasında güçlü bir antikor tepkisi ortaya çıkmasına sebep olur, nükleokapsit proteini viral RNA genomunu kaplar ve matris proteini, hücre plazma membranı ile birleşmeden sorumludur. Öte yandan env geni, glikoprotein sentezinden sorumludur. Gp160 isimli bir öncüden, gp135 isimli yüzey glikoproteini ve gp46 isimli transmembran glikoproteini meydana gelir. Lentivirüslerin env geninden sentezlenen glikoproteinlerin nötralize edici antikorların indüksiyonunu ve virüsün konak hücre reseptörüne bağlanmasını sağlaması gibi pek çok önemli fonksiyonu bulunmaktadır. Son yapısal gen pol geni ise; reverse transkriptaz, dUTPase, integras ve proteaz gibi virüsün konak hücre içerisine girip kendini DNA'ya entegre ederek çoğalmasında görev alan proteinlerin sentezinden sorumlu gendir (Pépin et al., 1998; Glaria et al., 2012). Lentivirüsler, her ne kadar ortak bir genomik organizasyona sahip olsalar da genetik olarak heterojendir. Bu çeşitlilik, antijenik değişkenliğe, virülans etkisinde ve in vivo büyümede farklılıklara sebep olur. Bu sebeple hastalığın teşhisinde ve tedavi yöntemi geliştirme de problemler ortaya çıkmaktadır (Preziuso, 2003).

Genetik organizasyonunun yanında, tipik bir retrovirüs morfolojisine sahip olan MVV küresel ve üç katmanlı bir yapıdan oluşmaktadır. Virionun boyutu

yaklaşık 100 nm'dir ve konak hücrenin plazma zarından oluşan ikozahedral şeklinde bir dış kapsiti bulunmaktadır. Merkezi kısmında ise genom-nükleoprotein kompleksi bulunmaktadır (Şekil 1.2) (Preziuso et al., 2003).



Şekil 1. 1. Maedi-Visna virüsünün genomik organizasyonu. Virüsün yapısal proteinlerini sağlayan gag geninin kodladığı proteinlerden MA: matris, CA: kapsit, ve NC: nükleokapsit; pol geninin kodladığı proteinlerden pro: proteaz, RT: revers transkriptaz, dUTPase, IN: integraz; env geninin kodladığı proteinlerden gp153: yüzey glikoproteini, gp46: transmembran proteinini gösterilmiştir. Ayrıca virüsün aksesuar genlerinden vif, tat ve rev de gösterilmiştir.



Şekil 1. 2. Maedi-Visna virüsünün morfolojik yapısı. Lipid bilayer ile çevrelenen yapı içerisinde kapsit ve kapsitin de içerisinde vira RNA korunmaktadır. RNA'nın etrafında virüsün konak hücre DNA'sına entegrasyonunda kolaylık sağlayan pol proteinleri bulunmaktadır.

2.4 Hastalık patogenezi ve klinik belirtiler

MVV'nin, başlıca monosit/makrofaj ve dentritik hücrelerini enfekte ettiği bilinse de akciğer, bağırsak ve meme bezi epitel hücreleri gibi diğer hücre

tiplerinin de viral nükleik asidi barındırabileceği ve viral proteini eksprese edebileceği gösterilmiştir (Wu et al., 2008). Bunun yanında uzun inkübasyon süresiyle bilinen MVV enfeksiyonunda, semptomların gelişmesi aylar, hatta yıllar sürebilir. Bir kere enfekte olan hayvan tüm yaşamı boyunca virüsün taşıyıcısı olarak kalır. Bazı durumlarda koyunlar ömür boyu asemptomatik taşıyıcı kalarak klinik belirtiler göstermeyebilir (Oguma et al., 2014).

Hastalığın merkezi sinir sistemi bozukluklarına sebep olan Visna formu 2 yaşın üzerindeki koyunlarda gözlenmeye başlar. Kilo kaybı, yürüyüşte bozuklukların gözleendiği ve özellikle arka bacaklarda zayıflıkların oluştuğu bu formda enfekte hayvanlar sürünün gerisinde kalır, zaman zaman düşerler. Bacaklardaki zayıflık zamanla ilerleyerek felce dönüşebilir (Şekil 1.3). Bazı durumlarda baş bir yana bükülüp, dudak ve yanak kaslarında kasılmalar gözlenebilir (Pritchard, 2007; Straub, 2004). Öte yandan, Visna formundan daha sık gözlenen Maedi formu ise 3 yaşın üzerindeki koyunlarda gözlenmeye başlar. İlerleyici bir pnömoni olan hastalığın, erken dönemlerinde vücut kondisyon kaybı gözlenir. Ardından dispnea, solunumda zorlanma ve hızında artma şeklinde klinik belirtiler ortaya çıkar (Lujan et al., 1991; Pritchard, 2007). Hastalığın yan etkisi olarak yün kaybı, hamilelik sırasında düşük yapma ve süt üretiminde azalma gözlenebilir. Kötü hava koşulları, aşırı hareket, gebelik gibi faktörler klinik bulguları belirginleştirir (Christodouloupoulos, 2005).



Şekil 1. 3. Maedi-Visna virüsü ile enfekte olmuş koyun. Enfeksiyona bağlı olarak gelişen bacaklardaki felç koyunlarda ölüm ile sonuçlanır (Crilly et al., 2015).

2.5 Tanı Yöntemleri

MVV'nin erken tanısı hastalık kontrolü için kritik öneme sahiptir. Enfeksiyonun tanı yöntemi esas olarak virüsün proteinlerine karşı antikorların tespit edilmesine dayanır (Kaba et al., 2013). MVV'nin tanısında kullanılan mevcut testlerden ilki ve en yaygın kullanılanı ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)'dır. ELISA, antiviral antikorları, yüksek duyarlılık ve özgüllükle saptama yeteneğine sahiptir (Peterhans et al., 2004). Bununla beraber bir moleküler tanı yöntemi olarak PZR (Polimeraz Zincir Reaksionu), hayvan vücudundaki sıvılarda ve dokularda bulunan viral DNA'yı saptayabilir. Ayrıca antikor gereksinimi olmadığı için PZR'ın önemli avantajlarından biri koyunun serokonversiyon geçirmeden önce virüsü saptayabilme özelliğidir (Herrmann-Hoesing, 2010). Bir diğer tanı testi AGID (Agar jeli immunodifüzyon testi) ise, kullanım kolaylığı yönünden her ne kadar yaygın olsa da duyarlılığı azdır (Minguijón et al., 2015). RIPA (Ristosetin Agregasyon Testi) bir diğer tanı yöntemidir ancak yüksek maliyet ve uygulama zorluğuna sahiptir. Son olarak WB (Western Blot), viral proteinleri tanıyarak serumda bulunan antikorları saptamada doğruluk payı yüksek olan bir testtir (Herrmann-Hoesing, 2010). Ne yazık ki mevcut tanı yöntemlerinin çoğu, viral antikorların saptanmasında serolojik testlere dayandığı için, dolaylı olarak seropozitif hayvan seçiminde serokonversiyon için uzun süre beklenmesi büyük bir dezavantaj yaratmaktadır (Kalogianni et al., 2020).

2.6 Virüs Bulaş Yolları

MVV virüsünün bulaş yolları günümüzde tamamen açıklığa kavuşturulamamıştır. Ancak yine de başlıca bulaş yolları olarak enfekte olan anne koyundan, yavruya emzirme sırasında kolostrum ve süt ile ve solunum salgıları yolları ile gerçekleştiği bilinmektedir (Blacklaws et al., 2004; Broughton-Neiswanger et al., 2010). Solunum yolu ile bulaşta akciğerler hedef organdır, burada MVV monosit/ makrofajları ve dentritik hücreleri enfekte ederek solunum yolu enfeksiyonlarının ortaya çıkmasına yol açar (Preziuso et al., 2004). Ayrıca yapılan saha çalışmalarında yetersiz havalandırma ve yüksek sayıda koyun bulunan sürüye sahip olma gibi etkenlerin virüsün yayılmasında önemli rol

oyunadığı gözlenmiştir. Kesin olan bulaş yollarından yola çıkılarak yeni doğmuş kuzuların ve henüz enfekte olmamış koyunların saptanarak sürüden ayrılması hastalık kontrolünde büyük önem taşımaktadır (Kalogianni et al., 2020).

2.7 Hastalığa karşı korunmada aşı teknikleri

Günümüzde henüz MVV'ye karşı aşı veya tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Geçmişte yapılan sınırlı sayıda aşı çalışması bulunmaktadır, ancak sonuçlar umut vadeditici olmamıştır. İlk aşı çalışması Cutlip et al. (1987) tarafından inaktive virüs kullanılarak gerçekleştirilmiş ancak koyunlarda deneysel enfeksiyon sırasında koruma sağladığı gözlenmemiştir. Ardından Petursson et al. (2005) MVV'nin zayıflatılmış moleküler klonunu kullanarak aşılama gerçekleştirmiş ne yazık ki deneysel enfeksiyon çalışmaları sırasında virüs ile muamelede koyunların enfekte olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmayı takiben, virüse karşı DNA aşı çalışmaları gerçekleştirilmiş ancak onlardan da virüse karşı korunmaya yönelik bir yanıt alınmamıştır. Örneğin Henriques et al. (2007) tarafından gag proteinini kodlayan bir DNA aşısı geliştirilmiş, ancak aşı her ne kadar farelerde güçlü bir hümmoral yanıt yaratsa da koyunlarda deneysel enfeksiyona yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Virüse karşı etkili bir aşının henüz geliştirilememesinin önünde duran çeşitli engeller vardır. Bunlardan ilki viral suşların yoğun genetik varyasyonlar içermesidir. Özellikle env gen bölgesinin sahip olduğu yüksek mutasyon geçirme yeteneği antigenic drift yaratmaktadır (Arnarson et al., 2017). Bu duruma ek, virüse karşı yüksek antikor titrelerinin indüklenmesi gerekliliği de bir diğer engeldir. Aşı kullanımının yanı sıra, nötrale edici antikorların kullanımı her ne kadar HIV ve SIV' a karşı korunmada önemli bir uygulama olsa da MVV'nin de içine girdiği SRLV grubu virüsler üzerinde koruyucu bir etkisi olduğu gözlenmemiştir (Blacklaws, 2012; Reina et al., 2013).

2.8. İmmünoloji

Vücudun kendinden olmayan, yabancı bir madde ile karşılaşmasında immün sistemde rol alan hücrelerin uyarılması ve etkileşim sağlamaları ile oluşan savunma mekanizmasına immün yanıt denir (Moser ve Leo, 2010). Bu yanıtın

oluşmasına sebep olan etkenler immünojen ve antijendir. Bir etkenin immünojen olması immün yanıtı oluşturabilme kapasitesiyken antijenik olması immün yanıtın spesifik elemanlarını (B hücreleri ve T hücreleri) uyarabilme kapasitesidir. Bütün immünojenler antijen olurken bütün antijenler immünojen olmayabilir. Ayrıca antijenik molekülün, kendine özgü immün sistem elemanına yakalanabilmesinden sorumlu kısımlarına epitop denir (Levinson and Jawetz, 1996; Abbas and Lichtman, 2007)

İmmün sistem elemanları esas olarak doğuştan gelen ve kazanılmış bağışıklık sistemi olmak üzere iki ana başlık içerisinde ayrılır. Doğuştan gelen bağışıklık sistemi tüm canlılarda bulunan ve patojen organizmaya spesifik olmayan bir sistemdir. İçine giren elemanlar monosit/makrofajlar, nötrofiller, dentritik hücreler, doğal öldürücü hücreler, mast hücreleri, eozinofiller ve bazofiller gibi hücrelerdir (Akira et al., 2006). Diğer yandan kazanılmış bağışıklık sistemi sadece omurgalı canlılarda bulunur ve patojen organizmaya karşı spesifik yanıtın ortaya çıktığı bir sistemdir. Kazanılmış bağışıklık sistemi B hücrelerinin sorumlu olduğu humoral yanıt ve T hücrelerinin sorumlu olduğu hücresel yanıtı oluşturmaktadır (Pancer ve Cooper, 2006).

B hücrelerinin oluşumu kemik iliğinde başlar ve lenfoid progenitör hücreden köken alır. Olgun bir hücreye dönüşmek için kemik iliğinde IgM kazanır ve periferik kana geçiş yaparak lenf bezi, dalak, MALT gibi dokulara yerleşirler. Antijen sunucu hücre gibi görev de yapabilen B hücrelerinin iki yanıtı bulunmaktadır. Bu yanıtlardan ilki antijen ile karşılaştığında yüzeyinde bulunan Ig reseptörüne göre antijene özgü tanıma gerçekleştirerek lenf bezinde bulunan germinal merkezlerde başkalaşım geçirmeleridir. Başkalaşım ile plazma hücreleri ve hafıza hücreleri ortaya çıkar. Çoğalma yeteneği olmayan ve kısa ömürlü plazma hücrelerinin görevi antijene özgü antikor sentezlemektir. Hafıza hücreleri ise, ikincil humoral yanıtı sorumludur. Antijen için oluşan bilgileri yıllarca saklayarak hafıza oluşturur, aynı antijenle tekrar karşılaştığında ise hızlı bir şekilde farklılaşır, çoğalır ve antikor sentezi meydana gelir (Jr Janeway et al., 2005; Abbas et al., 2000).

T hücrelerinin oluşumu ise, timositlerin kemik iliğinden timusa gelerek TCR (T cell receptor) kazanması ve böylece olgun T-hücreleri olarak periferik

dolaşıma geçiş yapmalarıyla başlar. B hücrelerinin aksine T hücreleri antijen sunucu hücre gibi görev yapamaz ve antijenleri kendi başlarına tanıyamazlar. İşte bu durum karşısında TCR, T-hücrelerinin, antijen sunan hücreler (ASH) tarafından onlara sunulan spesifik antijenlere bağlanmasında rol oynayan reseptördür (Jr Janeway et al., 2005). T hücreleri yüzeylerinde bulunan CD4+ (T-helper) ve CD8+ (t-sitotoksik) reseptörlerine göre farklılaşmaktadır. Bir T-hücresinin antijeni tanıyıp yok etmesindeki süreçte meydana gelen 3 sinyal vardır. Sinyallerden ilki antijen sunucu hücre yüzeyindeki MHC reseptörü ile T-hücre yüzeyindeki TCR'ın birbiriyle etkileşmesidir. MHC sınıf II reseptörleri ile sunulan antijenleri CD4+ T hücreler tanırken MHC sınıf I reseptörleri ile sunulan antijenleri CD8+ T hücreleri tanır. İkinci sinyal ise T-hücrelerinin yüzeyinde bulunan CD28 isimli reseptörün ASH'nin yüzeyinde bulunan B7 reseptörleri ile birleşmesidir. Böylelikle iki hücre arasındaki bağlanma güçlenir, T-hücre aktive olur ve immün yanıt gerçekleşir. CD28 reseptörünün ligandı olan B7 ile bağlanması ardından T-hücre aktivasyonu hızla artar ve bu artışa paralel T-hücrelerinde bulunan CTLA-4 ekspresyonu artarak immün yanıtta bir inhibitör görevi üstlenir. Son sinyal olan üçüncü sinyalde ise T helper hücrelerinin sitokin sentezinin başlamasını sağlaması ve farklı sayıda genlerin transkripsiyonunun gerçekleşmesini içerir (Sakaguchi et al., 2001). T helper hücreleri, B hücrelerinin ve T-sitotoksik hücrelerini aktive edip yangı yerine çağırabilir ve sitokinlerin sentezlenmesini de sağlayabilir. Öte yandan T-sitotoksik hücreleri özellikle virüs ile enfekte olan hücreleri tanımadan sorumludur. Salgıladıkları IFN γ sayesinde aynı zamanda sağlıklı hücrelerin viral enfeksiyona karşı dirençli olmasını da sağlar (McNab et al., 2015). Ayrıca tümör hücrelerini ve konakçı ile uyumu olmayan transplant hücreleri yok etmekle de görevlidir (Kappeler ve Müller, 2000). MHC reseptörlerinin antijen bağlanma bölgelerindeki polimorfizimler sayesinde farklı olan her patojene özgü tanıma gerçekleşmektedir (Radwan et al., 2020).

2.9 Konvansiyonel aşılarından biyoteknolojik aşılar: Reverse vaccinology tekniği

Aşılar, hümmoral ve hüccresel immün yanıtı uyararak güvenli bir bağışıklık tepkisi oluşturabilen, patojen organizmanın sebep olacağı enfeksiyona ve/veya hastalığa karşı koruma sağılayan, biyolojik ürünlerdir. Patojenler ve yol ağııkları hastalıklar ile mücadelede önemi tartışılmaz olan aşıların çeşitli teknikleri bulunmaktadır (Plotkin ve Plotkin, 2004).

Bunlardan ilki, 1. nesil aşılar olarak da bilinen konvansiyonel aşılardır. Bu aşılar, preparasyonu sırasında bir patojen organizmanın kendisini (ölü ya da zayıflamış) veya patojen organizmanın bir parçasını içeren aşı tipidir. Canlı/atenüe, inaktive, toksoid, alt birim ve konjuge olmak üzere çeşitli aşı uygulamalarını içerisinde bulundurmaktadır (Li et al., 2014). İlk konvansiyonel aşının keşfi, Louis Pasteur'ün *Pasteurella multocida* ile yaptığı deneyler sırasında oluşan bir kazaya dayanmaktadır. Böylelikle Pasteur, kültür edilen zayıflatılmış bir patojenin konakçılarını enfekte etme yeteneklerini kaybederken, aynı zamanda patojene karşı bağışıklık geliştirebilecekleri sonucuna varmıştır. Her ne kadar çeşitli çalışma yöntemleri içerse de konvansiyonel aşı çalışmaları, oldukça maliyetli, zaman alan ve sadece kültüre edilebilen patojenlerle sınırlı çalışmalardır (Bouazzaoui et al., 2021).

Ardından, rekombinant DNA teknolojisindeki gelişmelerin gücüyle, günümüzde patojen organizmalara karşı daha etkili, ikinci nesil aşılar olarak da bilinen rekombinant aşı teknolojisi ortaya çıkmıştır. Genom sekanslama, DNA microarray ve ekspresyon teknolojisi dahil olmak üzere ileri teknolojiler, aşı geliştirme çalışmalarını gözle görülür şekilde geliştirmiştir (Sette ve Rappuoli, 2010). DNA ve mRNA aşılarının da içerisine girdiği, rekombinant aşı teknolojisinin en güçlü yanı, konvansiyonel aşılarından farklı olarak patojen organizmanın sadece immün sistem tarafından uyarılan kısmının kullanılabilir olmasıdır. Böylelikle, tüm patojeni kullanmak yerine sadece belirli bir antijenik protein bölgesinin seçilerek kullanılması güvenlik profilini arttırmıştır. Ayrıca yüksek derecede saflaştırılmış antijenik komponentlerin elde edildiği, immün yanıtı hedef antijene özgü olan, kolay ve hızlı aşıların geliştirilmesi sağılanmıştır (Bonanni ve Santos, 2011).

Biyoinformatik alanındaki gelişmeler ve genom sekanslama teknolojisinin gelişmesiyle beraber genomik ve proteomik yaklaşımlarının aşı geliştirme teknolojilerinde kullanılması, aşı çalışmalarının Pasteur kurallarının ötesine geçmesine imkan sağlamıştır (Seib et al., 2012). *In silico* aşı çalışmaları ve reverse vaccinology tekniği patojen organizmanın genomundan proteomuna yansıyan bilgilere dayanarak antikor tepkisini tetikleyecek spesifik antijenlerin seçimine dayanan bir tekniktir. Bu teknik aynı zamanda kültürde patojenik organizmaların çoğaltılma ihtiyacını ortadan kaldırarak büyük bir avantaj sağlamaktadır (Palatnik-de-Sousa, 2018). Yapılan analizlerde aşı tasarımında kullanılacak her bir antijen için, en umut verici adayı belirleme sırasında bir patojen organizmanın tüm protein repertuarı kullanılır. Böylece bu yöntem, daha önce geliştirilmesi zor veya imkansız olan aşılarda geliştirilmesine ışık tutar ve mevcut aşılarda geliştirebilmesini sağlayacak yeni antijenlerin tanımlanmasını sağlar (Rappuoli, 2004).

Aşı adayı olacak en iyi epitoplara seçebilmek için reverse vaccinology tekniği bizlere çeşitli yaklaşımlar sunar. İlk olarak genomik sekansı belirlenen patojen organizmanın protein bilgisi elde edilebilir, tüm bu protein repertuarıyla patojen organizmanın suşları arasında en iyi korunmuş epitop bölgeleri seçilebilir. Böylelikle patojen organizmanın tüm varyantlarını kapsayacak bir aşı tasarımı gerçekleştirilebilir. İkinci olarak patojenin yapısal proteinleri seçildikten sonra B ve T hücre yanıtını uyarabilen epitoplara seçilebilir. İleri çalışmalarda B hücreleri için linear ve non-linear epitoplardan örtüşenler seçilebilir ve T hücreleri içinse epitoplara MHC reseptörlerine bağlanma afinitesi docking analizleri ile test edilebilir. Elde edilen aday epitoplara çeşitli parametreler göz önüne alınarak en iyi olanı seçilebilir. Örneğin, seçilen epitoplara antijenik olup olmadığı veya antijenikse değerinin ne kadar olduğu saptanabilir. Ardından epitopun güvenilirliğini arttırmak için, suda çözünürlüğü, alejenikliği ve toksikliği hızlı ve kolay şekilde tahmin edilebilir. Son kalan en iyi epitoplara adjuvan ve uygun linker sekanslarla bağlanarak bir aşı konstraktı tasarlanabilir. Bu aşı konstraktının fizikokimyasal özellikleri saptanabilir, *in silico* klonlama gerçekleştirilebilir ve moleküler dinamik simülasyonu ölçülebilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Varyasyon analizi

Virüsün yapısal proteinlerinden gag ve env'nin hem gen hem protein bazında varyasyon analizi toplam 6 adet suş ile gerçekleştirilmiş. Referans izolat olarak MVV İzlanda kv1514 izolatı kullanılmıştır. Analiz sırasında kullanılan diğer izolatlar, KV1772 (İzlanda), EV1 (İngiltere), 85/34 (ABD), 697 (İspanya), NM1111 (Çin) izolatlarıdır. NCBI veri bankası (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), hem DNA hem protein dizisini elde etmek için kullanılmıştır. Referans izolatin seçiminden sonra gag ve env sekanslarının diğer izolatlardaki verilerini elde etmek için BLAST veri tabanı kullanılmıştır. Gen seçimi için kullanılan BLAST algoritması megablast, protein seçimi içinse blastp'dir (protein-protein BLAST). Gag için benzerlik oranı %87,44'den yüksek ve env için benzerlik oranı %94,89'den yüksek izolatlar seçim kriteri olarak kullanılmıştır. Daha sonra tüm bu sekanslar, hem genlerdeki hem de proteinlerdeki varyasyonları saptamak için MEGA 7.0 programında hizalanmıştır (Kumar et al., 2016).

3.2 Proteinlerin fiziko-kimyasal özellikleri ve sekonder yapı tahmini

Gag, *env* proteinlerinin ve tasarlanan multi-epitop aşısı konstraktının fizikokimyasal özelliklerini tahmin etmek için, Expasy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) kullanılmıştır. (Gasteiger et al., 2005).

Proteinlerin suda çözünürlüğünün detaylı analizi için SolPro (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>)' da kullanılmıştır (Cheng et al., 2005). Ardından proteinlerin sekonder yapı tahmini için GOR IV (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_gor4.html) kullanılmıştır (Garnier 1996). Multi-epitop aşısı konstraktının sekonder yapıları ayrıca PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/> &uuid=8ae9b1c2-892c-11ec-bb36-00163e100d53) ile bir grafik haline getirilerek de tahmin edilmiştir (McGuffin et al., 2000).

3.3 Antijenite tahmini

Gag ve env proteinlerinin, analizi yapılan her bir epitopun ve multi-epitop aşısı konstraktının antijenite değeri, 0.4'lük bir eşik değeri kullanılarak Vaxijen v2.0 (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>) programı tarafından tahmin edilmiştir (Doytchinova and Flower, 2007).

3.4 Subselüler lokalizasyon, transmembran heliks sayısı ve proteinlerin membrandaki konumu

Virus-mPLOC (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/virus-multi/>), enfekte konakçı hücrelerde gag, env proteinlerinin ve multi epitop aşısı konstraktının hücre altı lokalizasyonunu tahmin etmek için kullanılmıştır. Bu web sunucusu, ontoloji bilgilerine ve pseudo amino asit bileşimi yaklaşımına dayalı olarak geliştirilmiştir (Shen, 2010).

Ardından gizli Markov modeline dayanan TMHMM V. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) programı, transmembran sarmallarının sayısını tahmin etmek için kullanılmıştır (Krogh, 2001).

PPM 2.0 veri tabanı, proteinin zarda bulunan uzamsal konumunun tahmini için kullanılmıştır. (Lomize, 2012).

3.5 Sinyal peptit tahmini

Sinyal peptitleri, bir proteinin hedef yolunu belirlemede rol oynayan amino asit dizileridir. Signal-BLAST (<http://sigpep.services.came.sbg.ac.at/signalblast.html>), gag ve env proteinlerindeki sinyal peptidinin yanı sıra multi epitop aşısı konstraktını tahmin etmek için kullanılmıştır. BLASTP veritabanında 2500'den fazla sinyal peptiti tarayan bu sunucunun ortalama duyarlılığı ve doğruluğu sırasıyla %98 ve %95'tir. Tahmin sırasında organizma olarak virüs, tespit modu olarak SP1 - Best Sensitivity ve sonuç formatı olarak da detaylı analiz seçilmiştir (Frank and Sippl, 2008).

3.6 Alerjenite tahmini

Gag ve env proteinlerinin yanı sıra test edilen tüm epitopların ve multi epitop aşısı konstraktının alerjenik olup olmadığı, AllerTOP v. 2.0

(<https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/>) programı tarafından tahmin edilmiştir. Bu program, toplam 2210 alerjen ve 2210 alerjen olmayan veri setini kullanarak k-NN algoritması tarafından çalışmaktadır (Dimitrov et al., 2013).

3.7 BetaWrap motiflerinin tahmini

Gag, env proteinleri ve multi epitop aşısı konstraktının BetaWrap motiflerini tahmin etmek için, BetaWrap (<http://cb.csail.mit.edu/cb/betawrap/betawrap.html>) programı kullanılmıştır (Bradley et al., 2001).

3.8 Konak proteomu ile benzerlik

BlastP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) algoritması, gag ve env proteinlerinin konak proteomuna benzerliğini tahmin etmek için kullanılmıştır. Bu analiz sırasında standart veri tabanı kullanılmıştır. Ayrıca organizma olarak *Ovis aries* (koyun) seçilmiştir.

3.9 B hücre epitoplarının tahmini

B hücre epitop tahmininde kullanılan ilk veri tabanı Bcepred, linear epitopların tahminini sağlamıştır. Bcepred (https://webs.iitd.edu.in/raghava/bcepred/bcepred_submission.html), epitopları fiziko-kimyasal özelliklerine göre tahmin eden bir platformdur. Bu platformun veri setleri, Bcipep'ten deneysel olarak kanıtlanmış 1029 linear epitoptan ve SWISS-PROT veri tabanından 1029 epitop-olmayan sekanslardan elde edilmiştir. Fiziko-kimyasal özelliklere dayalı tahmin doğruluğu %52,92 ile %57,53 arasında değişmektedir (Saha and Raghava, 2004).

Diğer yandan İEDB platformu içerisinde bulunan Ellipro ile (<http://tools.iedb.org/ellipro/>), hem non-linear hem de linear epitopların tahminini sağlamıştır. Ellipro bu tahmini gerçekleştirirken 3 algoritma kullanır. Bunlar sırasıyla, protein şeklinin bir elipsoid olarak tahmini, arta kalan protein kalıntılarının çıkıntı indeksinin (PI) hesaplanması, ve PI değerlerine göre arta kalan protein kalıntılarının kümelenmesidir. PI, proteinlerde bulunan atomların, her bir arta kalan protein kalıntısının ellipsoidin dışına ilk hareket etmeye başladığı andaki değerdir. Arta kalan protein kalıntılarının kümelenmesi sırasında

non-linear epitoplar, sahip oldukları çıkıntı indeksi (S) ve mesafe (R) değerlerine göre tanımlanır. Arta kalan protein kalıntısının PI değeri S'den büyük ise, bu kalıntı non-linear epitop sınıfına girer (Ponomarenko et al., 2008).

Çalışmanın doğruluk oranını arttırmak için aynı zamanda Discotope (<http://tools.iedb.org/discotope/>) veri tabanı da kullanılarak non-linear epitopların tahmini gerçekleştirilmiştir. Discotope, proteinin 3D görüntüsüne dayanan bir metot kullanarak %95 özgüllük ile tahmin sağlar. Böylelikle hem Bcepred hem Ellipro'da tahmin edilen ve daha sonra Discotope'ta doğrulanan antijenik epitoplar, B hücresi epitopu olarak seçilmiştir (Haste Andersen et al., 2006).

3.10 MHC-I ve MHC-II epitoplarının tahmini

Gag ve env proteinlerinin MHC-I ve MHC-II epitoplarının tahmini için IEDB veritabanı (IEDB; <https://www.iedb.org>) kullanılmıştır (Vita et al., 2018). MHC-I ve MHC-II epitoplarının tahmini sırasında kullanılan metodlar sırasıyla NetMHCpan EL 4.1 ve IEDB recommended 2.22'dir. Ne yazık ki koyun MHC alleleri epitop tahminini sağlayan veri tabanlarında henüz bulunmadığı için koyunlar ile ortolog ve yüksek homolojiye sahip insan MHC alleleri çalışmamızda kullanılmıştır. MHC-I alleleri için, insan (HLA) A-01.01, A-02.01 ve B-27.05 alellerinin, koyun (Ovar) N-02.01, N-10.01 ve N-13.01 alelleri ile sırasıyla %75,41, %72,19 ve %73,33 oranlarında homoloji gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, MHC-II alellerinden HLA-DRB1.01.01, DRB1.15.01 ve DRB1.04.01 alellerinin Ovar-DRB1.07.01, DRB1.10.01 ve DRB1.02.01 alelleri ile sırasıyla %80,83, %78,20 ve %81,58 oranlarında homoloji gösterdiği tespit edilmiştir.

Buna göre, MHC-I epitoplarının tahmini için üç farklı insan MHC-I aleli (A-01.01, A02.01 ve B-27.05) seçilerek ve percentile rank değeri 1.00'den küçük epitoplar MHC-I epitopları olarak kabul edilmiştir. MHC-II epitoplarının tahmini için, üç farklı insan HLA MHC-II aleli (DRB1.01.01, DRB1.15.01, DRB1.04.01) seçilerek percentile rank değeri 10.0'dan küçük epitoplar, MHC-II epitopları olarak kabul edildi. Ayrıca, insan alelleri için tahmin edilen tüm MHC-I/II epitoplarının, koyun MHC allelerine gerçekten bağlanıp bağlanamayacağı yapılan docking analizleri ile doğrulanmıştır.

3.11 Moleküler docking analizleri

Multi epitop aşı konstraktının yapısını oluşturmak için seçilen son epitoplar ve insan MHC alelleri ile oldukça benzerlik gösteren koyun MHC-I/II alelleri arasında docking analizleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca virüslere karşı bağışıklık tepkisi oluşturduğu iyi bilinen TLR2 ve TLR4 reseptörleri ile tasarlanan multi-epitop aşı konstraktının da docking analizleri gerçekleştirilmiştir. Docking analizlerinin gerçekleştirilmesi için ClusPro (<https://cluspro.bu.edu/home.php>) programı kullanılmıştır. Bu program genellikle protein-protein etkileşimlerinin tahmini için kullanılmaktadır (Kozakov et al., 2017).

Ayrıca çalışmada kullanılan tüm proteinlerin 3 boyutlu yapısal modelleri I-Tasser (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>) programı kullanılarak modellenmiştir (Yang et al., 2015). Elde edilen modeller PyMOL (<https://www.pymol.org/>) üzerinden görselleştirilmiştir.

3.12 Epitopların toksisite, çözünürlük ve hemolitik özelliklerinin tahmini

İlk olarak epitopların toksisitesinin tahmini için ToxinPred programı kullanılmıştır. Bu programda çeşitli veri tabanlarından toplanan 1805 toksik peptit ve SwissProt veri tabanından 3893 toksik olmayan peptit ile tahminler gerçekleştirilir (Gupta et al., 2013).

Ardından epitopların suda çözünürlüklerinin tahmini için PepCalc (<https://pepcalc.com/>) programı kullanılarak suda çözünebilirliği iyi olan epitoplar seçilmiştir (Lear et al., 2016).

Diğer yandan epitopların hemolitik özelliklerinin tahmini için HemoPI (<http://webs.iitd.edu.in/raghava/hemopi/index.php>) programı kullanılmıştır. Bu programa sunulan veriler, hemolitik veri tabanından 552 hemolitik peptit ve Swiss-Prot veri tabanından 552 hemolitik olmayan peptit ile test edilmektedir. Peptitlerin HemoPI değeri 1 ise hemolitik olarak, değeri 0 ise non-hemolitik olarak değerlendirilir (Chaudhary et al., 2016).

3.13 Epitoplarda solvent ekspozite pozisyonların tahmini

Gag ve env proteinleri ile varyantları ilk olarak Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) kullanılarak hizalanmıştır. Ardından hizalanan diziler ve proteinlerin 3D görüntüleri ESPript 3.0 (<http://esprict.ibcp.fr/ESPript/ESPript/>) programına girilerek epitop bölgelerinin proteinin solvent ekspozite yüzeye denk gelip gelmediği test edilmiştir (Robert and Gouet, 2014).

3.14 Multi-epitop aşısı konstraktının tasarımı

Multi-epitop aşısı konstraktının antijenik, alerjik olmayan, toksik olmayan, hemolitik olmayan, suda çözünür ve konakçıya homolog olmayan MHC-I/II ve B hücre epitopları seçilerek uygun linkerlar ile birleştirilmiştir. Multi-epitop aşısı konstraktı, gag ve env proteinlerinden toplam 19 adet epitop kullanılarak tasarlanmıştır. Konstraktın immünojenikliğini ve stabilitesini arttırmak için çeşitli linker dizilerinin (AAY, GPGPG, KK) yanında adjuvan da (50S ribozomal protein L7/L12) kullanılmıştır.

İlk olarak, 50S ribozomal protein L7/L12 (accession numarası: P9WHE3) olarak adlandırılan adjuvan, bir EAAAK linker dizisi kullanılarak dört tane MHC-I epitopu içeren konstraktın amino (N) terminaline eklenmiştir (Lee et al., 2014). Her bir MHC-I epitopu, bir AAY linker dizisi kullanılarak birleştirilmiştir. Daha sonra, MHC-II epitopları GPGPG linker dizisi ile birleştirilerek konstrakta eklenmiştir. Son olarak, bir KK linker sekansı ile birleştirilen yedi B hücre epitopu, multi epitop aşısı konstraktına eklenmiştir. Ayrıca, protein saflaştırmasını kolaylaştırmak için C terminaline bir 6xHis etiketi yerleştirilmiştir. Böylelikle multi-epitop aşısı konstraktının toplam 432 amino asitten oluştuğu belirlenmiştir (Azim et al., 2019; Crowe et al., 1995).

3.15 Proteinlerin 3D yapısal modellemesi

Epitopların, MHC-I/II alellerinin ve TLR-2/TLR-4 reseptörlerinin 3 boyutlu yapısal modellemesi, I-Tasser (iterative Threading ASSEmbly Refinement) (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>) programı kullanılarak

gerçekleştirilmiştir (Yang et al., 2015). Ayrıca MHC-II alelleri beta ve alfa zincirlerinden oluşan bir heterodimer yapı gösterdiğinden dolayı, MHC-II alellerinin 3 boyutlu yapısındaki zincirleri birleştirmek için DEMO (Domain Enhanced MOdeling, version 2) (<https://zhanggroup.org/DEMO/>) sunucusu kullanılmıştır (Zhou et al., 2019). Diğer bir platform RaptorX (<http://raptorx.uchicago.edu/>) ise multi-epitop aşı konstraktının tersiyer yapısının modellenmesi için kullanılmıştır (Källberg et al., 2014; Wang et al., 2016). Elde edilen tüm protein modelleri Pymol kullanılarak görselleştirilmiştir.

3.16 Multi-epitop aşı konstraktının 3D görüntüsünün iyileştirilmesi ve doğrulanması

Multi-epitop aşı konstraktının 3D yapısı RaptorX ile elde edildikten sonra, GalaxyRefine (<https://galaxy.seoklab.org/>) programı kullanılarak yapının olası iyileştirilmesi gerçekleştirilmiştir (Heo et al., 2013). İyileştirilen yapı tahminlerinden, GDT-HA, RMSD, MolProbity, Clash score, Ramachandran favored backbone gibi çeşitli parametreler göz önünde bulundurularak en iyisi seçilmiştir.

İyileştirilen protein yapısının olası hataları ise ProSA (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) platformu kullanılarak test edilmiştir (Wiederstein ve Sippl, 2007). Aynı zamanda multi-epitop aşı konstraktının stereokimyasal kalitesi, PROCHECK sunucusu (<https://saves.mbi.ucla.edu/>) altında çalışan Ramachandran aracılığıyla elde edilmiştir (Hollingsworth ve Karplus, 2010).

3.17 Serum örnekleri

“Bandırma Koyunculuk Araştırma Enstitüsü” arşivinde bulunan hastalığı daha önce geçirdiği tespit edilmiş koyunlardan toplanmış serum örnekleri (n:24) ve bu hastalığı geçirmemiş koyunlardan toplanmış serum örnekleri (n:23) biyoinformatik olarak seçilmiş peptitlerin/epitopların *in vitro* immünojenisitenin belirlenmesi için kullanılmıştır

3.18 B hücre epitoplarının indirekt elisa ile immünojenite tayini

En iyi özelliklere sahip olan 7 adet B-hücre epitopunun immünojenitelerini test etmek için 47 tane serum örneği kullanılmıştır. Bunlarda 24 tanesi pozitif ve 23 tanesi negatif örnek olarak kullanılmıştır. Ayrıca her bir epitopu sentezlemeden önce başlarına bir sistein (C) amino asidi eklenmiştir. Yapılan ELISA testleri sırasında kullanılan laboratuvar aletleri, solüsyon ve antikor aşağıda verilmiştir.

3.18.1 Laboratuvar aletleri

- Mikrosantrifüj (CAPP, Danimarka)
- İnkübatör (Medcenter Einrichtungen GmbH, Almanya)
- ELISA plak okuyucusu (BioTek Instruments, ABD)
- ELISA plak yıkayıcı (BioTek Instruments, ABD)
- Sulandırma plağı, 96 well master block 2 ml (Greiner Bio-One, Avusturya)
- ELISA Mikroplaklar, 96 çukurlu, tabanı düz: (Corning, ABD)

3.18.2 Solüsyonlar

- Tween 20 (Appllichem, Almanya)
- 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin (TMB): 3,3',5,5'—Tetramethyl benzidine
- Sodyum klorür (NaCl), Potasyum klorür (KCl), Disodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄), Potasyum dihidrojen fosfat (KH₂PO₄)
- Hidrojen sülfür (H₂S)

3.18.3 Antikor

- Peroksidaz (Horseradish Peroxidase; HRP) işaretli, konak hücre olarak eşekte üretilmiş, anti-sheep IgG (H+L)

İlk olarak ELISA plaklarının her bir kuyucuğuna, 100 µl distile su içerisinde hazırlanan, gag için 3 ve env için 4 adet olmak üzere toplam 7 adet peptit (1µg/ml) plaklara eklenerek, plaklar gece boyu 37 °C de inkübe edilmiştir.

Ertesi gün inkübatörden alınan plakların kuyucuklarına bloklama için 1xPBS ve %0,5 BSA çözeltisi hazırlanarak her bir kuyucuğa 100'er µl konulmuştur. Oda sıcaklığında 1 saat beklemenin ardından kuyucuklar PBS-T [%0,1 Tween 20 (v/v) içeren 1xPBS] ile 3 kere yıkanmıştır.

Serum dilüsyonu için koyunlara ait serumlar %0,5 BSA (v/w) ve %0,1 Tween 20 (v/v) içeren 1xPBS'de 1/200'e seyreltilerek ve 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından kuyucuklar PBS-T ile 3 kere yıkanmıştır.

Antikor dilüsyonu için Anti-sheep IgG antikor (Invitrogen-Termo Fisher) PBS-T içinde 1/20.000'e seyreltilerek ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. Ardından kuyucuklar PBS-T ile 3 kere yıkanmıştır. Son adım olarak, kuyucuklara tetrametilbenzidin (TMB) substratı eklenerek reaksiyon gözlenmiştir.

Reaksiyon, 75 µl 2 N sülfürik asit eklenerek durdurulmuştur. Absorbans değerlerini görmek için sonuçlar 450 nm'de bir mikro titre plaka okuyucusunda (Bio-Tek ELx808™, ABD) değerlendirilmiştir. ELISA sonuçları ile elde edilen her bir serumun absorbanslarının cut-off değeri ROC analizi kullanılarak analiz edilmiştir. Öte yandan testin istatistiksel olarak doğruluğunu kontrol etmek için p-değeri ise t testi kullanılarak hesaplanmış ve $p < 0,05$ olarak tespit edilenler anlamlı olarak varsayılmıştır.

4. BULGULAR

4.1 Varyasyon analizi

Gag ve env genlerinin ve proteinlerindeki varyasyonların tespit edilmesi sırasında referans izolat olarak MVV İzlanda KV1514 kullanılmıştır. Analizde kullanılan ve NCBI’da bulunan diğer izolatlar ise KV1772 (İzlanda), EV1 (İngiltere), 85/34 (ABD), 697 (İspanya), ve NM1111 (Çin)’dir. Yapılan analizlere göre 1326 bç uzunluğundaki gag geninde 358 ve 2973 bç uzunluğundaki env geninde 1143 varyasyon tespit edilmiştir. Bu varyasyonlardan 63 adetinin gag proteininde amino asit değişikliklerine neden olduğu tespit edilirken, 453 adetinin env proteininde amino asit değişikliklerine neden olduğu tespit edilmiştir.

4.2 Proteinlerin fiziko-kimyasal özellikleri ve sekonder yapı tahmini

Gag proteini için yapılan analizde, amino asit sayısı 442 amino asit uzunluğunda bulunmuştur. Proteinin ~49 kDa’ya sahip olduğu saptanmıştır. Teorik PI değeri 9,26, yarılanma ömrü 30 saat, instabilite indeksi sonucuna göre stabil, alifatik indeks sonucuna göre 72,81’lik bir değerle termostabil, ve hidropatiklik değeri negatif bulunduğu için suda çözünabilir olduğu saptanmıştır.

Env proteini için yapılan analizde, amino asit sayısı 991 amino asit uzunluğunda bulunmuştur. Proteinin ~115 kDa’ya sahip olduğu bulunarak gag proteininden daha büyük olduğu saptanmıştır. Teorik PI değeri 8,85, yarılanma ömrü 30 saat, instabilite indeksi sonucuna göre kararsız, alifatik indeks sonucuna göre 73,56’lık bir değerle termostabil ve hidropatiklik değeri negatif bulunduğu için suda çözünabilir olduğu saptanmıştır.

Multi-epitop aşı konstraktı için yapılan analizde, amino asit sayısı 432 amino asit uzunluğunda bulunmuştur. Proteinin ~46 kDa’ya sahip olduğu saptanmıştır. Teorik PI değeri 9,14, yarılanma ömrü 30 saat, Instabilite indeksi sonucuna göre stabil, Alifatik indeks sonucuna göre 65,19’luk bir değerle termostabil ve hidropatiklik değeri negatif bulunduğu için suda çözünabilir olduğu saptanmıştır (Tablo 4.1).

Sekonder yapı tahminlerinde gag proteini için alfa heliks oranı %42, ekstended strand oranı %17, random coil oranı %40 olarak saptanmıştır. Env proteini için alfa heliks oranı %25, ekstended strand oranı %32, random coil oranı %41 olarak saptanmıştır. Multi epitop aşı konstraktı içinse alfa heliks oranı %54.86, extended strand oranı %9.03, random coil oranı %36.11 olarak saptanmıştır (Tablo 4.2).

Protein ismi	Amino asit sayısı	Moleküler ağırlık	Teorik pI	Tahmini yarılanma ömrü (saat)	İnstabilite indeksi (II)	Alifatik indeks	GRAVY ^a	(Asp + Glu):	(Arg + Lys):
Gag Protein	442	49,914.64	9.26	30s in vitro	39.53	72.81	-0.614	47	64
Env Protein	991	115,002.34	8.85	30s in vitro	42.87	73.56	-0.570	105	126
Multi-epitop aşı konstraktı	432	46,318.53	9.14	30s in vitro	37.10	65.19	-0.781	59	69

Tablo 4. 1. ExPASy ProtParam tarafından tahmin edilen fiziko-kimyasal parametrelerin sonuçları.

4.3 Antijenite tahmini

Kullanılan Vaxijen programı ile gag ve env proteinlerinin sırasıyla 0,6282 ile 0,5530 arasında değişen değerlerle antijenik olduğu saptanmıştır. Böylelikle gag proteininin, env proteininden daha yüksek bir antijenikliğe sahip olduğu tespit edilmiştir. Tahmini yapılan her bir B hücre ve T hücre epitoplarının (RPQKGAGHKG, GAYPDPELEY, PMLVKQKNTESYEDF) antijenite değerleri analiz edilerek antijenik olanları aşı konstraktını oluşturmak için diğer analizlere tabi tutulmak üzeri seçilmiştir. Oluşturulan aşı konstraktının da antijen olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.2 ve 4.3).

4.4 Subselüler lokalizasyon, transmembran heliks sayısı ve proteinlerin membrandaki konumu

Subselüler lokalizasyon sonucuna göre gag proteini konakçı hücre zarında ve konakçı çekirdeğinde; env proteini konakçı çekirdeğinde ve multi epitop aşısı kontraktı konakçı sitoplazmasında bulunmuştur. Özellikle oluşturulan multi-epitop aşısı kontraktının sitoplazmada bulunması, immün sistem hücreleri tarafından tanınabilirliğini arttıran pozitif bir sonuçtur (Tablo 2).

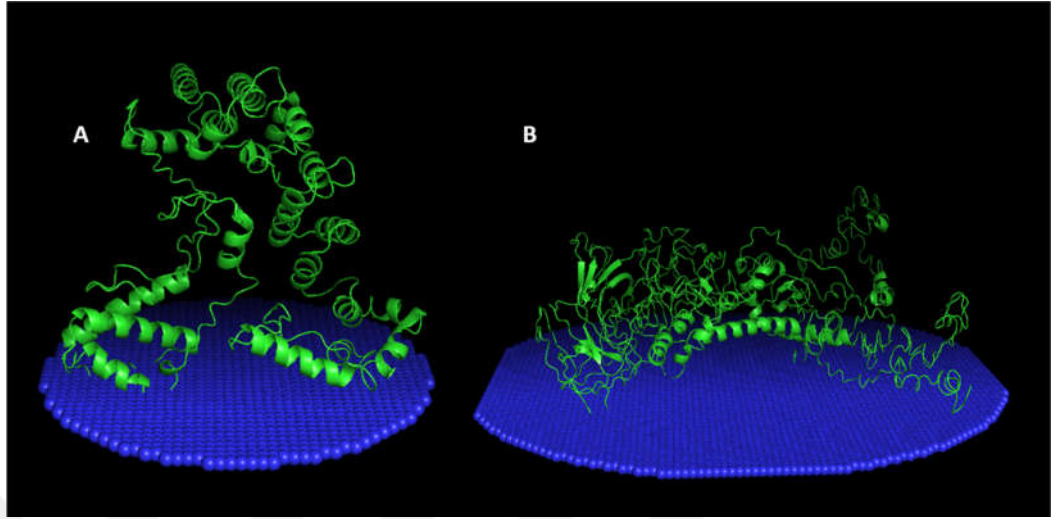
Transmembran heliks analizleri sonucunda, env proteininde 3 adet transmembran heliks saptanmışken gag proteininde ve multi epitop aşısı kontraktında hiç saptanmamıştır (Tablo 4.2).

Gag ve env proteinlerinin membrandaki uzamsal konumu PPM 2.0 serveri ile tahmin edildiğinde, gag ve env proteinlerinin ΔG_{transf} değerlerinin sırasıyla -9,4 kcal/mol ve -7,4 kcal/mol olduğu ve dolayısıyla bu proteinlerin integral olduğu saptanmıştır (Şekil 4.1).

Protein İsmi	Transmembran sayısı	Alfa heliks (%)	Extended strand (%)	Random coil (%)	Tahmini lokalizasyon	BetaWrap motifler	Signal peptide	Antijeni te Değeri	Alerjenite	Çözünürlük
Gag Protein	0	42.76	17.19	40.05	Konak hücre membranı	yok	yok	0.6282	Alerjen değil	Çözünürlük 0.755657
Env Protein	3	25.63	32.39	41.98	Konak hücre nükleusu	yok	106. Amino asit sonrası sinyal peptid	0.5530	Alerjen değil	Çözünürlük 0.635780
Multi-epitop aşısı kontraktı	0	54.86	9.03	36.11	Konak hücre sitoplazması	yok	yok	0.4856	Alerjen değil	Çözünürlük 0.939518

Tablo 4. 2. Her bir proteinin ve multi epitop aşısı kontraktının çeşitli analizlerinin sonuçları. Sırasıyla TMHMM, GOR IV, Virus-mPLOC, BetaWrap, Signal-BLAST, Vaxijen, AllerTop ve SolPro tarafından tahmin edilen transmembran heliks sayısı, sekonder yapılarının

oranı, hücre altı lokalizasyonu, BetaWrap motifleri, sinyal peptidi, antijenite, alerjenite, çözünürlük tahminlerinin sonuçları.



Şekil 40.1. Gag ve env proteininin (yeşil renkli) zardaki (mavi renkli) uzamsal konumu. (A) gag proteini. (B) env proteini.

4.5 Sinyal peptit tahmini

Dört farklı parametreye dayanan sinyal peptit tahminine göre, sadece env proteininin bir sinyal peptide sahip olduğu saptanırken, gag proteininin ve multi-epitop aşısı konstraktının bir sinyal peptidine sahip olmadığı saptanmıştır (Tablo 4.2).

4.6 Alerjenite tahmini

Patojen organizmanın proteinlerinin, epitopların ve tasarlanan multi-epitop aşısı konstraktının konakçıda alerjik bir etki yaratıp yaratmayacağı AllerTOP ile tahmin edilmiştir. Gag ve env proteinlerinin alerjen olmadığı tahmin edilmiştir. Ayrıca alerjenite tahmini epitoplarda uygulanılmış olup alerjik olmayanlar devam eden analizler için seçilmiştir. Tüm analizler sonunda kalan en iyi epitoplarla tasarlanan multi-epitop aşısı konstraktının da alerjik olmadığı tahmin edilmiştir (Tablo 4.2 ve 4.3).

4.7 BetaWrap motiflerinin tahmini

Suda çözünmeyi zorlaştıran BetaWrap motiflerine gag, env ve multi-epitop aşı konstraktında saptanmamıştır (Tablo 4.2).

4.8 Konak proteomu ile benzerlik

Maedi-Visna gag proteininin E-değeri, $1e-10$ ve $2e-07$ arasında bulunmuştur. Aynı zamanda benzerlik oranları %29,27-%29,52 arasında değişmekteydi. Öte yandan, Maedi-Visna env proteininin koyunlarda önemli bir benzerliği bulunamamıştır.

4.9 B hücre epitoplarının tahmini

Linear epitop tahmininde Bcepred kullanılmıştır. Gag proteini için 12, env proteini içinse 26 protein tahmin edilmiştir. Bcepred'de linear epitopların tahmininin ardından Ellipro'da hem linear hem non-linear epitopların tahmini yapılarak her iki programda hem linear hem non-linear grup içerisine giren epitoplar seçilmiştir. Linear epitop tahmininin ardından, gag proteini için Elliproda 10 linear epitop ve 7 non-linear epitop tahmin edilmiştir. Böylelikle iki programdan elde edilen verilerle totalde 22 adet gag epitopu tahmin edilmiştir. Bu epitoplardan 5 adedi iki uygulamada da saptanan ve hem linear hem non-linear özellik gösteren epitoplar olarak tespit edilmiştir. Env proteini için ise Ellipro da 26 linear ve 5 non-linear epitop tahmin edilmiştir. Böylelikle iki programdan elde edilen verilerle totalde 42 adet env epitopu tahmin edilmiştir. Bu epitoplardan 10 adedi iki uygulamada da saptanan ve hem linear hem non-linear özellik gösteren epitoplar olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak gag ve env proteinlerinde tahmin edilen toplam 15 epitop, diğer özellikler açısından analiz edilmiştir ve bu epitoplardan antijenik, alerjik olmayan, toksik ve hemolitik özellik göstermeyen, suda çözünür olan toplam 7 adet epitop, B hücre epitopu olarak seçilmiştir. Seçilen 7 epitop Discotop tarafından da amino asit pozisyonlarına göre non-linear olup olmadığı da test edilmiştir (Tablo 4.3).

4.10 MHC-I ve MHC-II epitoplarının tahmini

İlk olarak MHC-I epitoplarının seçiminde percentile rank değeri 1.00'den düşük olan 15 adet gag epitopu ve 39 adet env epitopu tahmin edilmiştir. Ardından MHC-II epitoplarının seçiminde percentile rank değeri 10'dan düşük olan 94 adet gag epitopu ve 200 adet env epitopu tahmin edilmiştir.

Sonuç olarak gag ve env proteinlerinde tahmin edilen toplam 54 MHC-I epitopu içerisinde antijenik, suda çözünür, alerjik toksik ve hemolitik olmayan 5 adet epitop docking analizlerinde test edilmek üzere seçilmiştir. Diğer yandan gag ve env proteinlerinde tahmin edilen toplam 294 MHC-II epitopu içerisinde antijenik, suda çözünür, alerjik toksik ve hemolitik olmayan 7 adet epitop docking analizlerinde test edilmek üzere seçilmiştir (Tablo 4.4 ve 4.5).

Protein	Epitop	*Discotop e	Vaxijen değeri	Tahmini Çözünürlük	Alerjenite Tahmini	Toksisite Tahmini	Epitopların Hemolitik Değeri	**Solvent ekspozite amino asitler
Gag	RPQKGAG HKG	RPQGKA GHKG	Antijen 1.8129	Suda Çözünür	Non-Allergen	Non-Toxin	0.49	RPQGKA GHKG
	PGNRAQK E	PGNRAQ KE	Antijen 0.8947	Suda Çözünür	Non-Allergen	Non-Toxin	0.47	PGNRAQ KE
	KQGSKE	KQGSKE	Antijen 0.4049	Suda Çözünür	Non-Allergen	Non-Toxin	0.49	KQGSKE
Env	VKRQQQE EEEQQGL VSGKKKS	VKRQQQ EEEQQ GLVSGK KKS	Antijen 1.0214	Suda Çözünür	Non-Allergen	Non-Toxin	0.49	VKRQQ QEEEEEQ QGLVSG KKS
	EHERRTS HRS	EHERRTS HRS	Antijen 0.4173	Suda Çözünür	Non-Allergen	Non-Toxin	0.49	EHERRT SHRS
	WEKEDEE SMK	WEKEDE ESMK	Antijen 0.5291	Suda Çözünür	Non-Allergen	Non-Toxin	0.49	WEKEDE ESMK
	KYSCESN	KYSCES N	Antijen 0.5876	Suda Çözünür	Non-Allergen	Non-Toxin	0.49	KYSCES N

Tablo 4.3. B hücrelerine özgü epitoplar. Sırasıyla Vaxijen, PepCalc, AllerTop, Toxinpred, HemoPI ve ESPript tarafından tahmin edilen antijenite, çözünürlük, alerjenite, toksisite, hemolitik

oran ve solvent ekspozite amino asit özellikleri. * Discotope programı ile non-linear olarak saptanan amino asitler kalın olarak belirtilmiştir. ** Solvent ekspozite amino asitler kalın olarak gösterilmiştir

	Protein	MHC Alleleri	Epitop	Score/ Adjusted rank	Percentile rank	Vaxijen değeri
MHC-I	Gag	HLA-A 0101	LVKQKNTESY	0.150298	0.68	Antijen 0.6293
	Env	HLA-A 0101	GAYPDPELEY	0.443681	0.23	Antijen 0.9076
		HLA-B 2705	GRKGSQRDSL	0.266927	0.72	Antijen 0.5609
		HLA-A 0201	KMPLAAVQRV	0.165977	0.95	Antijen 0.5824
		HLA-B 2705	QRDSLVIAGR	0.27021	0.71	Antijen 0.8195
MHC-II	Gag	HLA-DRB1. 04.01	ETSKREFASLQA TLA	0.01	0.01	Antijen 0.6764
		HLA-DRB1. 04.01	PMLVKQKNTES YEDF	5.80	5.80	Antijen 0.8751
		HLA-DRB1. 01.01	EGFKMQLLAQA LRPQ	1.60	1.60	Antijen 0.4309
		HLA-DRB1. 01.01	FKMQLLAQUALR PQ GK	4.70	4.70	Antijen 0.6762
		HLA-DRB1. 04.01	NPMLVKQKNTES SYED	5.80	5.80	Antijen 0.7660
	Env	HLA-DRB1. 01.01	EGNLSLLLREAA LQV	4.60	4.60	Antijen 0.6305
		HLA-DRB1. 04.01	LGYNISNPERGI CD	8.60	8.60	Antijen 0.4247

Tablo 4.4. MHC-I ve MHC-II alellerine özgü epitoplar. Adjusted rank ile percentile rank değerleri ve ayrıca Vaxijen ile yapılan antijenite tahmini sonuçları da gösterilmiştir.

	Epitop	Tahmini çözünürlük	Alerjenite	Toksisite	Hemolitik değeri	*Solvent- ekspoze amino asitler
MHC-I	LVKQKNTE SY	Good water solubility	Probable Non- Allergen	Non-Toxin	0.49	LVKQKNTE SY
	GAYDPPEL EY	Good water solubility	Probable Non- Allergen	Non-Toxin	0.49	GAYDPPEL EY
	GRKGSQRD SL	Good Water Solubility	Probable Non- Allergen	Non-Toxin	0.47	GRKGSQRDS L
	KMPLAAV QVR	Good Water Solubility	Probable Non- Allergen	Non-Toxin	0.49	KMPLAAVQ RV
	QRDSLZIA GR	Good Water Solubility	Probable Non- Allergen	Non-Toxin	0.49	QRDSLZIA GR
MHC-II	ETSKREFA SLQATLA	Good Water Solubility	Probable Non- Allergen	Non-Toxin	0.48	ETSKREFAS LQATLA
	PMLVKQK NTESYEDF	Good water solubility	Probable Non- Allergen	Non-Toxin	0.48	PMLVKQK NTESYEDF
	EGFKMQLL AQALRPQ	Good Water Solubility	Probable Non- Allergen	Non-Toxin	0.50	EGFKMQLL AQALRPQ
	FKMQLLA QALRPQ GK	Good water solubility	Probable Non- Allergen	Non-Toxin	0.50	FKMQLLAQ ALRPQ GK
	NPMLVKQ KNTESYED	Good Water Solubility	Probable Non- Allergen	Non-Toxin	0.49	NPMLVKQ KNTESYED
	EGNLSLLL REAAQV	Good water solubility	Probable Non- Allergen	Non-Toxin	0.49	EGNLSLLL EAALQV
	LGYNISNP ERGICD	Good water solubility	Probable Non- Allergen	Non-Toxin	0.47	LGYNISNP ERGICD

Tablo 4.5. MHC-I ve MHC-II alellerine özgü epitopların özellikleri. Sırasıyla PepCalc, AllerTop, Toxinpred, HemoPI ve ESPript tarafından tahmin edilen çözünürlük, alerjenite, toksisite, hemolitik ortalama ve solvent ekspoze amino asit özellikleri gösterilmiştir. * Solvent ekspoze amino asitler kalın olarak gösterilmiştir.

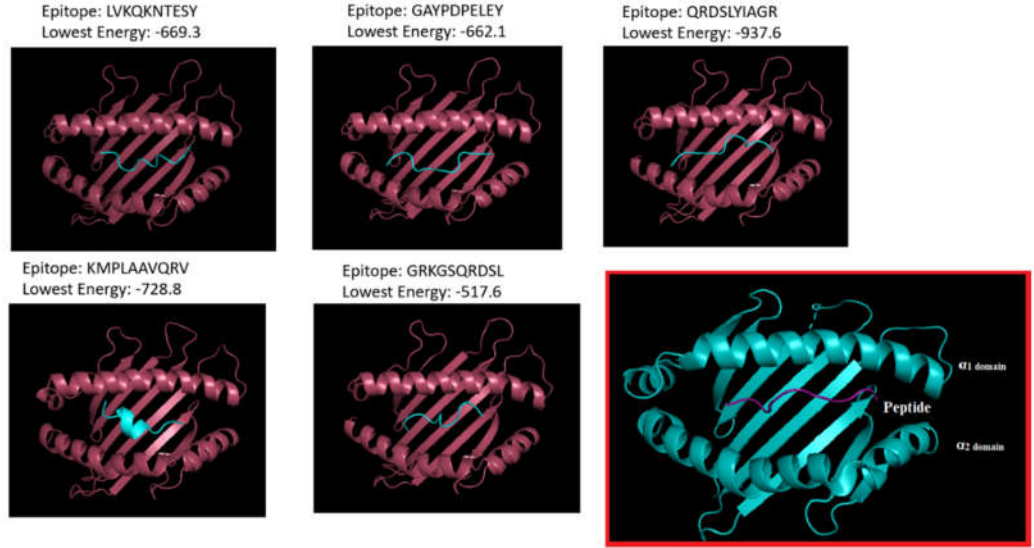
4.11 Moleküler docking analizleri

Daha ileri analizlere tabi tutulmak üzere seçilen MHC-I (5 epitop) ve MHC-II (7 epitop) epitoplarının MHC alleleri ile etkileşimlerini doğrulamak ve insanlarda saptanan allelerin gerçekten koyun alleleri ile bağlanabileceğini test etmek için docking analizleri gerçekleştirilmiştir. ClusPro programından elde edilen sonuçlara göre, tüm epitopların Ovar MHC alleleri ile yüksek enerjilerde bağlandığı tespit edilmiştir.

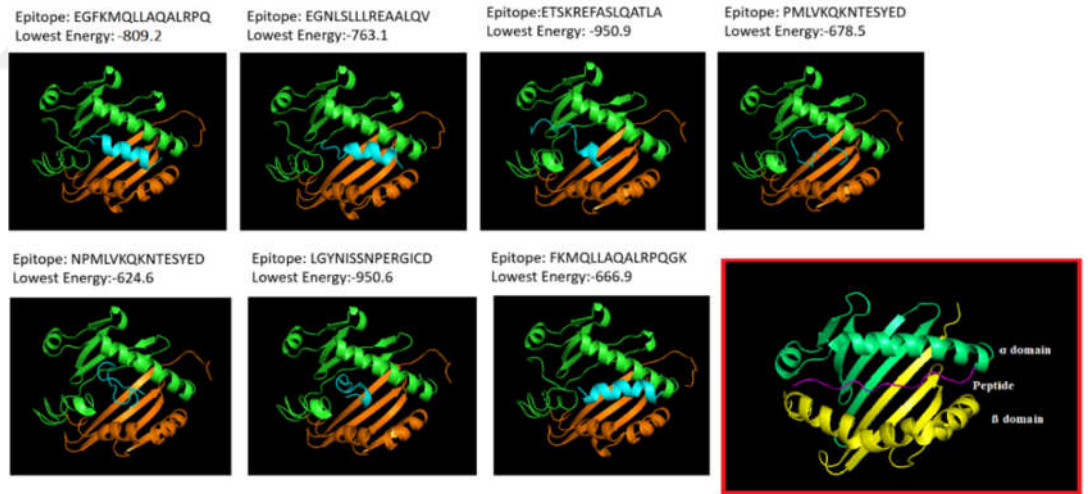
MHC-I spesifik epitopları arasında en yüksek enerji (-937,6) QRDSLYIAGR epitopu ile Ovar N-1301 alleleri arasında gözlenirken, en düşük enerji (-517) GRKGSQRDSL ve Ovar N-1301 alleleri arasında gözlenmiştir (Şekil 4.2).

MHC-II spesifik epitopları arasında en yüksek enerji (-950,9) ETSKREFASLQATLA ve Ovar DRB1.02.01 arasında gözlenirken, en düşük enerji (-624,6) NPMLVKQKNTESYED ve Ovar DRB1.02.01 arasında gözlenmiştir (Şekil 4.3).

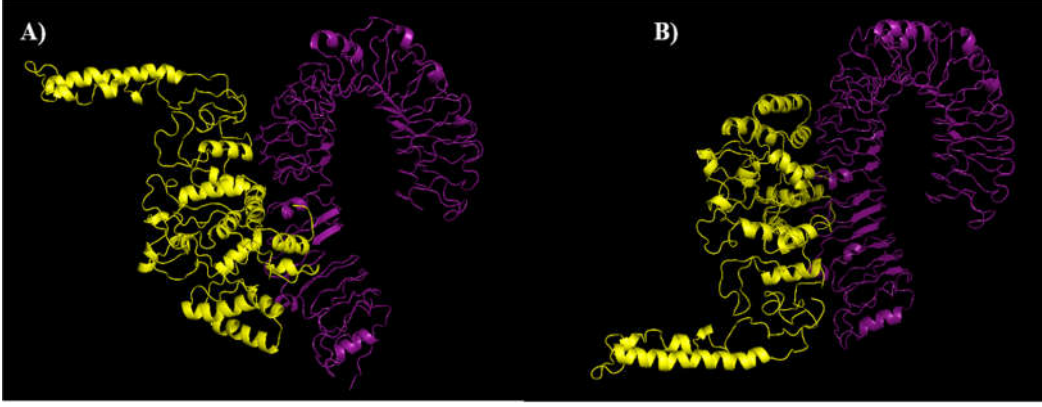
Bu çalışmada viral enfeksiyonları tanımada rolü olduğu bilinen TLR-2 ve TLR-4 reseptörleri ile docking analizleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan analiz sonucunda multi-epitop aşısı konstraktının TLR-2 reseptörü ile dockingi sonucunda -997.1 değerinde bir bağlanma enerjisi ve TLR-4 reseptörü ile dockingi sonucunda -1109.0 değerinde bir bağlanma enerjisi ortaya çıktığı gözlenmiştir. Böylece her iki reseptöre de bağlanabildiği ancak TLR-4 reseptörü ile daha güçlü bir afinitede bağlandığı gözlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.1. MHC-I alellerinin (mor renkli), tahmini epitopları ile docking analizi sonuçları. Cluspro kullanılarak gerçekleştirilen analizler Pymol kullanılarak görselleştirilmiştir. Ayrıca kırmızı çerçeve içine alınmış yapı peptit/MHC-I kompleksinin bilinen bir yapısıdır ve sonuçları karşılaştırmak için kullanılmıştır (PDB erişim numarası: 7CPO, MHC- I allelinin alındığı tür: *Anolis carolinensis*).



Şekil 4.2. MHC-II alellerinin, tahmini epitopları ile docking analizi sonuçları. Cluspro kullanılarak gerçekleştirilen analizler Pymol kullanılarak görselleştirilmiştir. MHC allelerinden yeşil renkli olan domain α zincirini temsil ederken turuncu renkli olan β zincirini temsil etmektedir. Ayrıca kırmızı çerçeve içine alınmış yapı peptit/MHC-I kompleksinin bilinen bir yapısıdır ve sonuçları karşılaştırmak için kullanılmıştır (PDB erişim numarası: 7NZF, MHC- I allelinin alındığı tür: *Homo sapiens*).



Şekil 4.3. Multi epitop aşı konstraktının (sarı renkli), TLR reseptörü ile docking analizi sonucu. A) multi-epitop aşı konstraktı/ TLR2 kompleksi. B) multi-epitop aşı konstraktı/ TLR4 kompleksi.

4.12 Epitoplarda solvent ekspozite pozisyonların tahmini

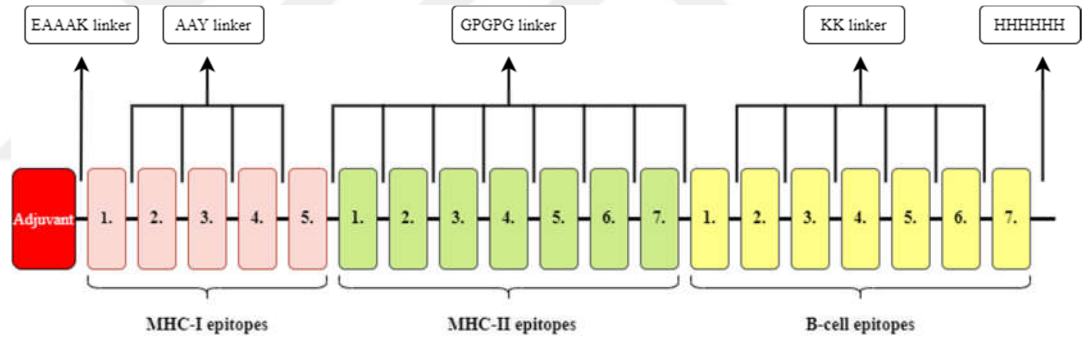
Epitopların çözücü ile doğrudan temas halinde olan amino asit bölgelerini test etmek için gerçekleştirilen analizde, B hücresi epitoplarının MHC-I ve MHC-II epitoplarından daha fazla solvent ekspozite alana sahip olduğu tespit edilmiştir. Özellikle B hücresi epitoplarından olan RPQGKAGHKG epitopunun glisin amino asidi hariç tüm amino asitleri solvent ekspozite alanda olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.2 ve 4.4).

4.13 Multi-epitop aşı konstraktının tasarımı

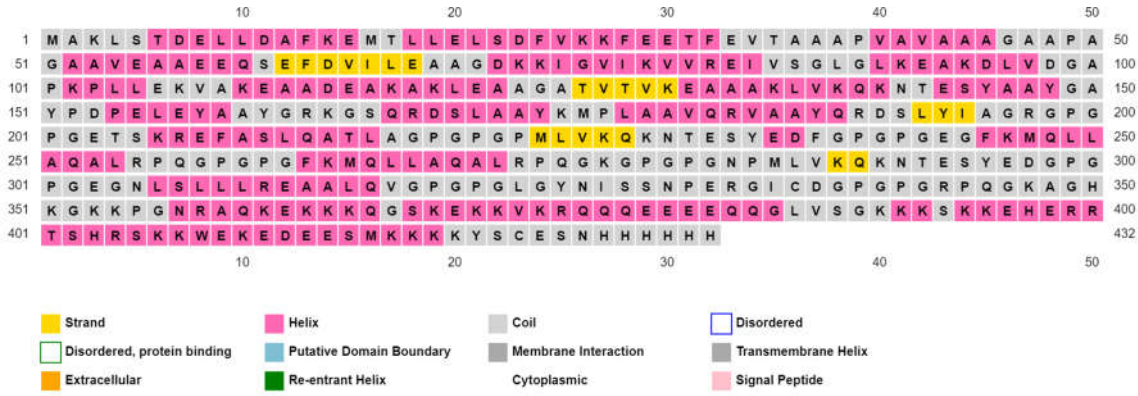
Multi-epitop aşı konstraktı sırasıyla adjuvan, EAAAK linkerı, AAY linkerı ile bağlanan MHC-I gag epitopları ve MHC-I env epitopları, GPGPG linkerı ile bağlanan MHC-II gag epitopları ve MHC-II env epitopları, KK linkerı ile bağlanan B hücre gag epitopları ve B-hücre env epitopları, son olarak da 6 tane histidin ile birbirleriyle bağlanarak 432 amino asitlik bir protein olarak tasarlanmıştır (Şekil 4.5).

Tasarlanan multi-epitop aşı konstraktı, aşı çalışmaları için önem taşıyan birçok özellik açısından test edilmiştir. Örneğin fiziko-kimyasal özellikleri test edildiğinde, elde edilen sonuçlarla suda çözünür ve stabil bir yapısının olduğu tespit edilmiştir. Sekonder yapı tahminleri PSIBRED programı ile

grafikleştirilmiştir ve alfa heliks ve random coil sayısının fazla olduğu (%54.86, %36,11) saptanmıştır (Şekil 4.6). Multi-epitop aşısı konstraktının Vaxijen ile antijenitesi test edildiğinde 0.4856'lük bir değerle antijen olduğu tahmin edilmiştir. Transmembran heliks sayılarının 0 olduğu tespit edilmiştir. Böylelikle pre-klinik çalışmalarda protein sentezinde saflaştırma zorlukları yaşanmayacağı ön görülmektedir. Hücre altı lokalizasyonuna bakıldığında konakçı sitoplazmasında bulunabileceği tahmin edilmiştir. Bu durumda immün sistem hücreleri tarafından kolaylıkla tanınabilecek bir bölgededir. BetaWrap motifleri ve sinyal peptit, multi-epitop aşısı konstraktında gözlenmemiştir (Tablo 4.2). Ayrıca multi-epitop aşısı konstraktının, suda çözünür, toksik ve alerjen olmadığı tahmin edilmiştir. Son olarak multi-epitop aşısı konstraktını oluşturan epitoplar arasında, B hücre epitoplarının amino asitlerinin daha solvent ekspoze bir alanda ve daha erişilebilir olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.1. Multi epitop aşısı konstraktının şematik olarak görselleştirilmesi. Multi epitop aşısı konstraktı, 5 adet MHC-I epitopu, 7 adet MHC-II epitopu, 7 adet B hücre epitopu olmak üzere toplam 19 adet epitop ile tasarlanmıştır. Adjuvan, N-terminade bir EAAAK linker dizisi ile MHC-I epitopuna bağlanmıştır. MHC-I epitopları AAY linkerleri ile birbirine bağlanırken, MHC-II epitopları GP GPG ile ve B hücre epitopları KK linkerleri ile birbirine bağlanmıştır. Aşısı konstraktının C-terminaline 6xHis eklenmiştir. Multi epitop aşısı konstraktı 432 amino asitten oluşmaktadır.



Şekil 4.02. Sekonder yapı özelliklerine ilişkin grafik. Alfa sarmal yapıları pembe renkle, beta strand yapıları sarı renkle ve coil yapıları gri renkle gösterilmiştir.



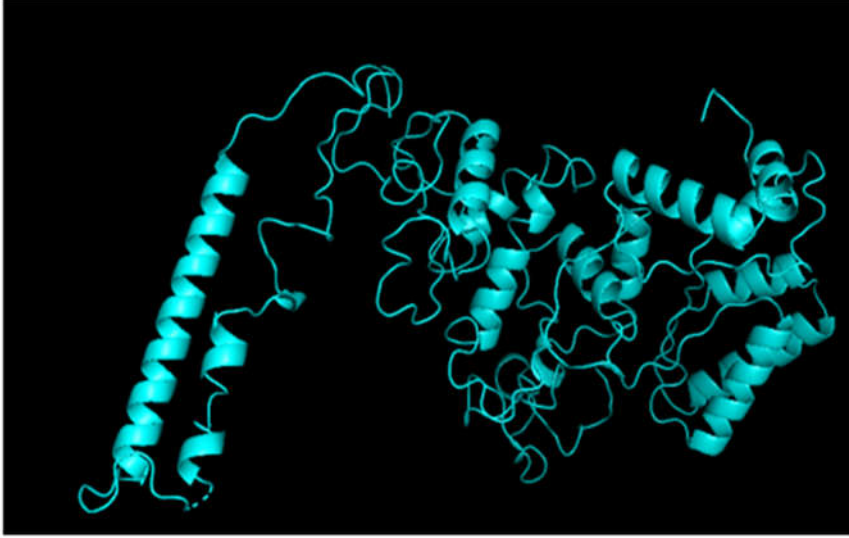
Şekil 4.3. Multi epitop aşısı konstraktının her bir amino asidinin solvent ekspozite alan grafiği. En iyi solvent ekspozite alanlar kırmızı ile orta derecede ekspozite alanlar sarı ile ekspozite olmayan alanlar ise mavi ile gösterilmiştir.

4.14 Multi-epitop aşı konstraktının 3D görüntüsünün iyileştirilmesi ve doğrulanması.

Multi-epitop aşı konstraktının 3D tersiyer yapı modeli RaptorX programı ile çizildikten sonra (Şekil 4.8), GalaxyRefine programı ile yapının iyileştirilmesi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonucun GDT-HA skoru 0.9485 olarak saptanmıştır. Bu değer ne kadar 1'e yakınsa yapının doğruluğunun o kadar iyi olduğu bilinmektedir (Şekil 4.9).

GalaxyRefine ile iyileştirilmesi yapılan modelin doğrulanması için iki farklı program kullanılmıştır. ProSA programı ile yapılan analizde yapının deforme olabilirliği hesaplanmıştır. Elde edilen Z-skoru -6.64 değerinde bulunmuştur. Bu sayının negatif değerlerde olması yapının o kadar zor deforme olacağını temsil eder. Ayrıca proteinin lokal model kalite grafiği, elde edilen yapının doğru tahmin edilen amino asit bölgelerinin gösteririr. Grafikte pik değerlerin çizginin altında kalması amino asit bölgelerinin çoğunun doğru tahmin edildiği anlamına gelmektedir (Şekil 4.10). Diğer yandan, iyileştirilmiş 3D yapısının stereokimyasal kalitesi Ramachandran Plot programı ile test edilmiştir. Yapılan analizde protein kalıntılarının, %84,9'u most favored bölgede, %13,2'si additional allowed bölgede, %1,1'i generously allowed bölgede ve %0,9'u disallowed bölgede olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.10).

A

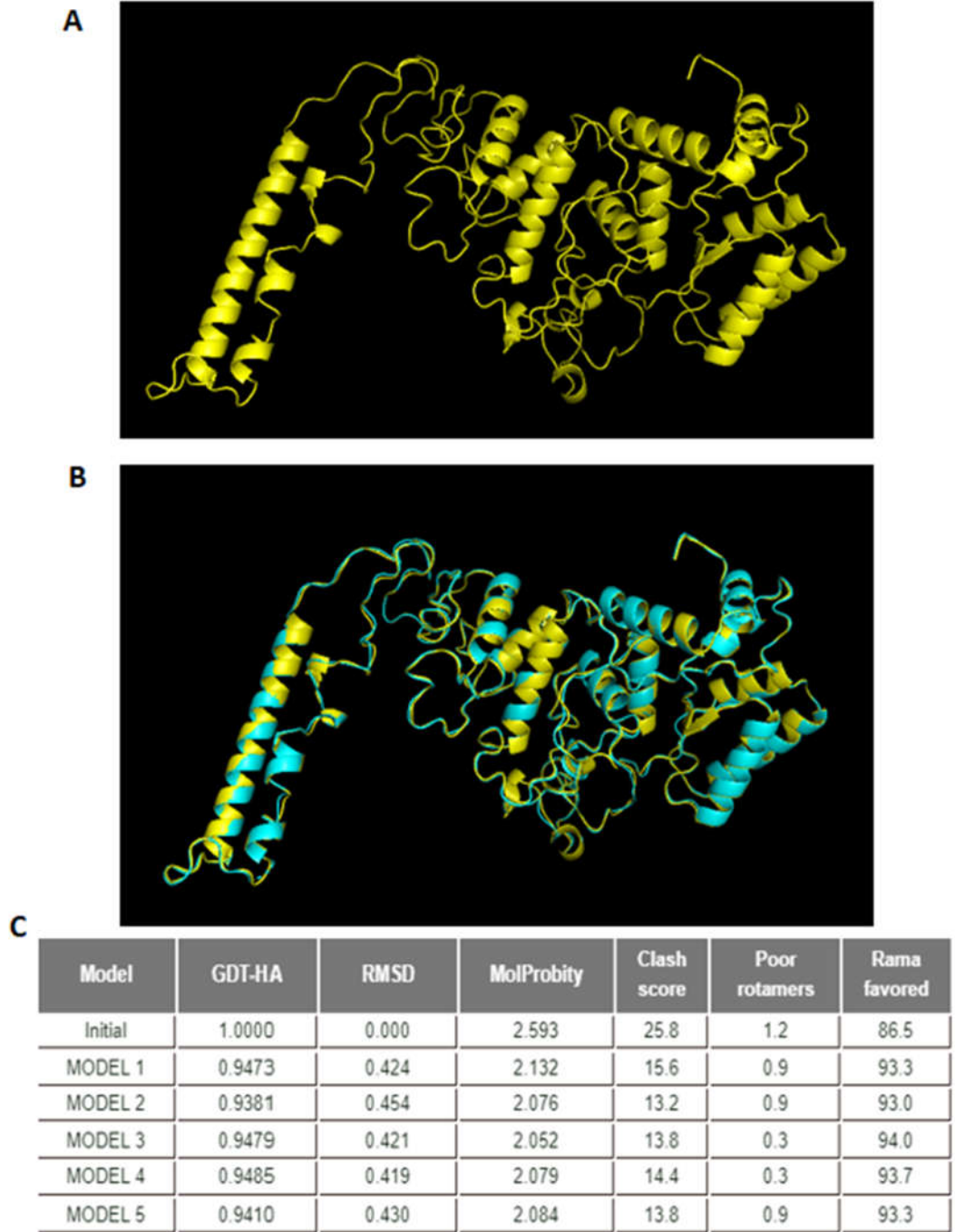


B

MAKLSTDELLDAFKEMTLLELSDFVKKFEETFEVTAAAPVAVAAAGAAPAGAAVEAAEEQS
 EFDVILEAAGDKKIGVIKVVREIVSGLGLKEAKDLVDGAPKPLLEKVAKEAADEAKAKLEAA
 GATVTVK**AAAA****L****VKQKNTES****Y****AA****Y****G****A****Y****P****D****P****E****L****E****Y****AA****Y****G****R****K****G****S****Q****R****D****S****L****AA****Y****K****M****P****L****A****A****V****Q****R**
V**AA****Y****Q****R****D****S****L****Y****I****A****G****R****G****P****G****P****G****E****T****S****K****R****E****F****A****S****L****Q****A****T****L****A****G****P****G****P****G****P****M****L****V****K****Q****K****N****T****E****S****Y****E****D****F****G****P****G****P****G****E****G****F**
K**M****Q****L****L****A****Q****A****L****R****P****Q****G****P****G****P****G****F****K****M****Q****L****L****A****Q****A****L****R****P****Q****G****K****G****P****G****P****G****N****P****M****L****V****K****Q****K****N****T****E****S****Y****E****D****G****P****G****P****G****E****G****N**
L**S****L****L****L****R****E****A****A****L****Q****V****G****P****G****P****L****G****Y****N****I****S****S****N****P****E****R****G****I****C****D****G****P****G****P****G****R****P****Q****G****K****A****G****H****K****G****K****P****G****N****R****A****Q****K****E****K****K****Q****G**
S**K****E****K****K****V****K****R****Q****Q****E****E****E****E****Q****Q****L****V****S****G****K****K****K****S****K****E****H****E****R****R****T****S****H****R****S****K****K****W****E****K****E****D****E****E****S****M****K****K****K****Y****S****C****E****S****N****H**
H**H****H****H****H**

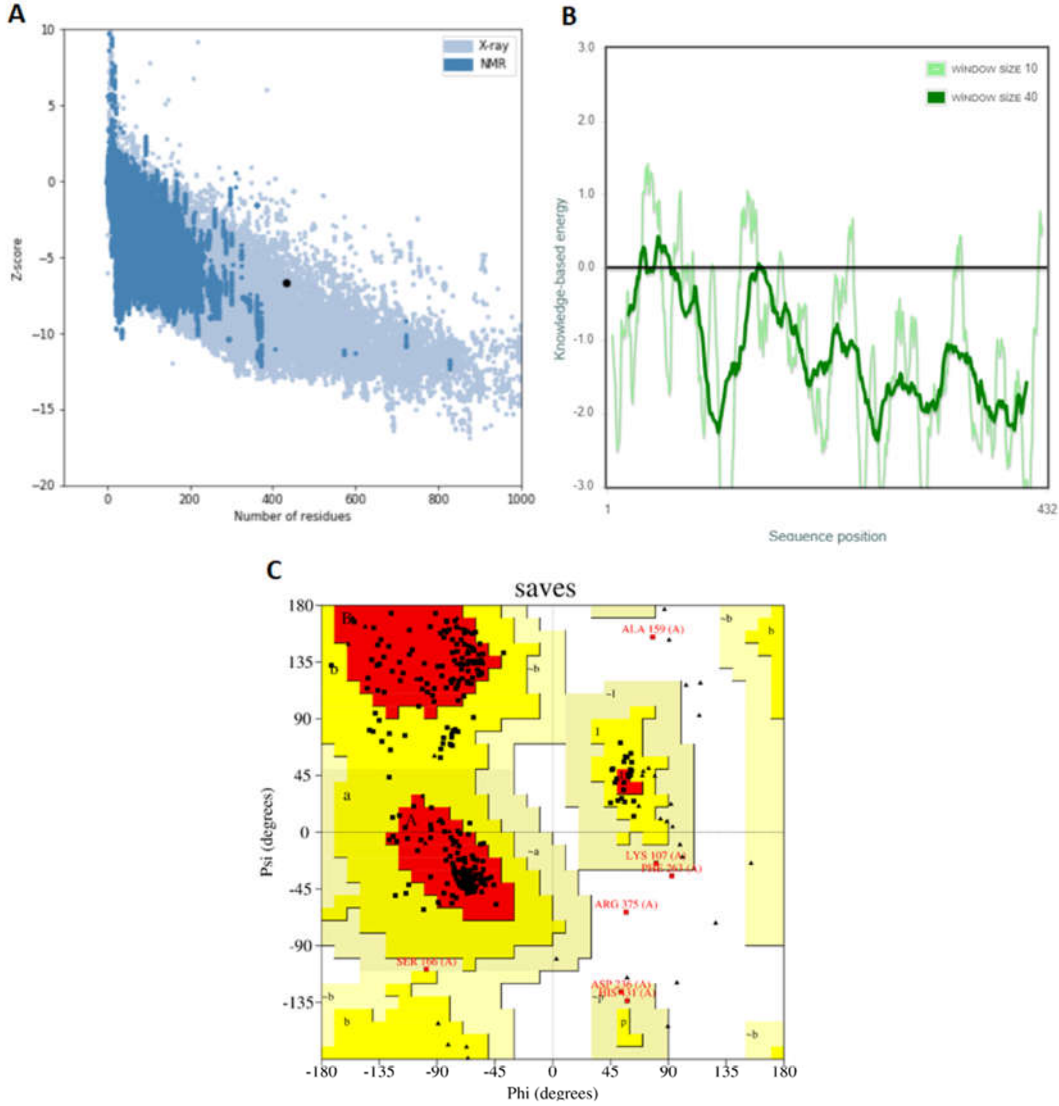
Şekil 4.1. Multi-epitop aşısı konstraktının 3 boyutlu yapı tahmini ve amino asit sekansı. (A)

Multi-epitop aşısı konstraktının RaptorX programı ile 3 boyutlu yapı tahmini. (B) Multi-epitop aşısı konstraktının amino asit sekansı. N terminaldeki adjuvan siyah renk ile, EAAAK linkerleri lacivert ile, MHC-I gag epitopları pembe ile, AAY linkerleri gri ile, MHC-I env epitopları kahverengi ile, MHC-II gag proteini turuncu ile, MHC-II env epitopları yeşil ile, B hücre gag epitopları siyah ile, B hücre env epitopları kırmızı ile ve son olarak 6 adet histidin mavi ile gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Multi-epitop aşı konstraktının iyileştirilmiş yapıları. (A) Multi-epitop aşı konstraktının GalaxyRefine.programı ile iyileştirilmiş görüntüsü. (B) Aşı konstraktının iyileştirilmiş (sarı) yapısı ile RaptorX tarafından elde edilen 3 boyutlu yapı tahmininin farklılıklarını saptamak için Pymol kullılarak yapıların üst üste getirilmiş hali. (C) GalaxyRefine sonuçları.

Z-Score: -6.64



Şekil 4.3. Multi-epitop aşısı konstraktının validasyonu. (A) ProSA-web kullanılarak iyileştirilmiş 3D tersiyer yapının validasyonu. İyileştirilmiş modelin Z-skoru -6.64 olarak saptanmıştır. (B) İyileştirilmiş modelde doğru tahmin edilen amino asit bölgelerinin gösterildiği ProSA-web grafiği (C) Ramachandran plot ile gösterilen multi- epitop aşısı konstraktının iyileştirilmiş modelinin stereokimyasal özelliği.

4.15 B hücre epitoplarının peptit ELISA ile immünojenite tayini

B hücre analizleri sonucunda elde edilen toplam 7 adet peptidin her birinin immünojenite tayini için ELISA testi uygulanmıştır. Kullanılan serum

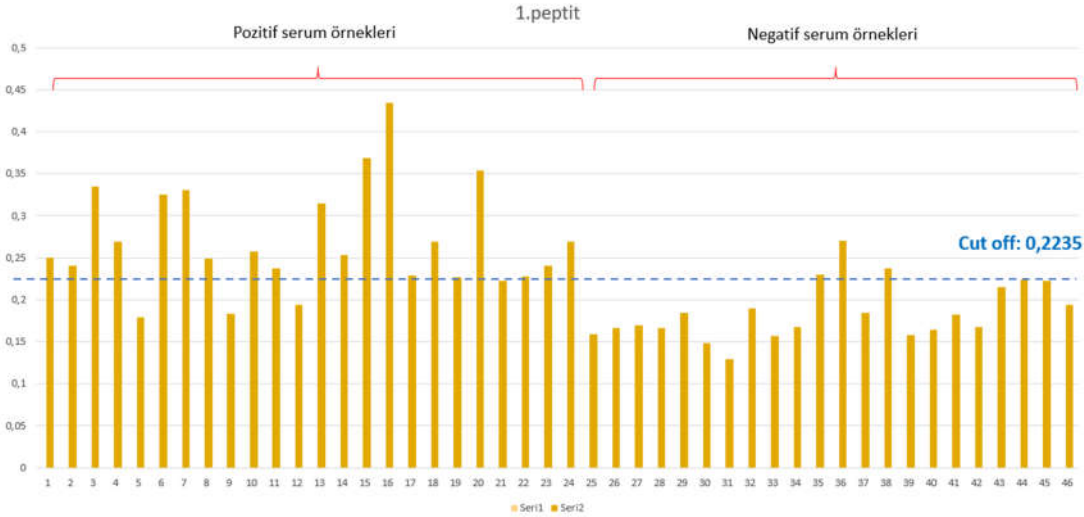
örneklerinden MVV ile enfekte olduğu tespit edilen 24 pozitif ve MVV ile enfekte olmadığı tespit edilen 23 negatif örnek kullanılmıştır. İlk olarak her bir peptitin immünojenikliği test edildikten sonra gag peptitleri ve env peptitleri ayrı birer miks oluşturularak test edilmiştir. ELISA sonucunda elde edilen değerler ROC analizi ile test edilip sensitivite, spesifite ve cut-off değerleri saptanmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre, gag proteini için en iyi peptit adayı olarak CKQGSKE amino asit dizisine sahip peptit seçilmiştir. Bu peptitin pozitif örnekler içerisinde en yüksek absorbans değeri 0,520 ve en düşük absorbans değeri 0,153 olarak saptanmıştır (Şekil 16). Serum örneklerinden elde edilen absorbans değerinin, pozitif değerlerin ortalaması 0,364 ve negatif değerlerin ortalaması 0,219 oranlarında hesaplanmıştır (Şekil 25). ROC analizi sonucunda sensitivite değeri %91,7, spesifite değeri ise %90,9 oranında saptanmıştır. Ayrıca peptidin cut-off değeri 0,2855 olarak bulunmuş ve absorbans değeri grafiklerinde her bir serum üzerinde gösterilmiştir. ROC analizi ile elde edilen ROC curve grafiğinde AUC değeri 0,942 olarak saptanmıştır. Ayrıca t-testi ile yapılan analizde testin p-değeri 0,035 olarak saptanmıştır. Bu değer 0.05'ten küçük olduğu için testin anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır.

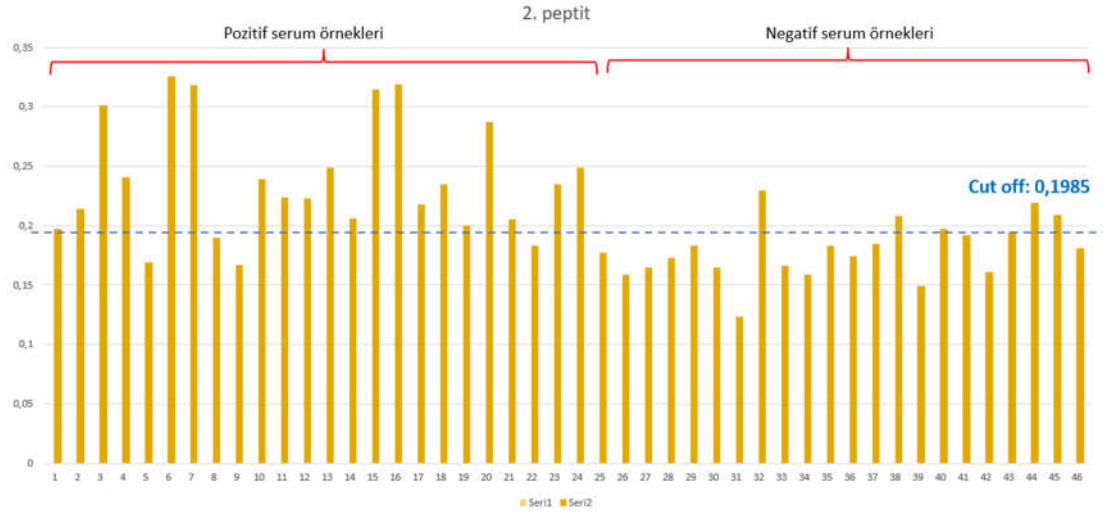
Öte yandan env proteini için en iyi peptit adayı olarak CEHERRTSHRS amino asit dizisine sahip peptit seçilmiştir. Bu peptidin pozitif örnekler içerisinde en yüksek absorbans değeri 1,730 ve en düşük absorbans değeri 0,233 olarak saptanmıştır (Şekil.18). Serum örneklerinden elde edilen absorbans değerinin, pozitif değerlerin ortalaması 0,781 ve negatif değerlerin ortalaması 0,372 oranlarında hesaplanmıştır (Şekil 27). ROC analizi sonucunda 5. peptitin sensitivite değeri %87.5, spesifite değeri ise % 87 oranında saptanmıştır. Ayrıca peptidin cut-off değeri 0,4535 olarak bulunmuş ve absorbans değeri grafiklerinde her bir serum üzerinde gösterilmiştir. ROC analizi ile elde edilen ROC curve grafiğinde 5. peptit için AUC değeri 0,942 olarak saptanmıştır. Ayrıca t-testi ile yapılan analizde testin p-değeri 0,003 olarak saptanmıştır. Bu değer 0,05'den küçük olduğu için testin anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca, tüm peptitlerin sensitivite, spesifite, cut-off, AUC ve p-değeri bilgileri tablo 6'da verilmiştir.

Protein	Peptit ismi	Sensitivite (%)	Spesifite (%)	Cut-off değeri	AUC	p-değeri
Gag	CRPQGKAGHKG	83,3	81,8	0,2235	0,902	0,026
	CPGNRAQKE	79,2	81,8	0,1985	0,874	0,008
	CKQGSKE	91,7	90,9	0,2855	0,942	0,035
Env	CVKRQQEEEEQ QGLVSGKKKS	83,0	82,0	0,389	0,937	0,000
	CEHERRTSHRS	87,5	87	0,4535	0,942	0,035
	CWEKEDEESMK	70,8	77,3	0,2305	0,838	0,874
	CKYSCESN	58,3	59,1	0,2305	0,683	0,007

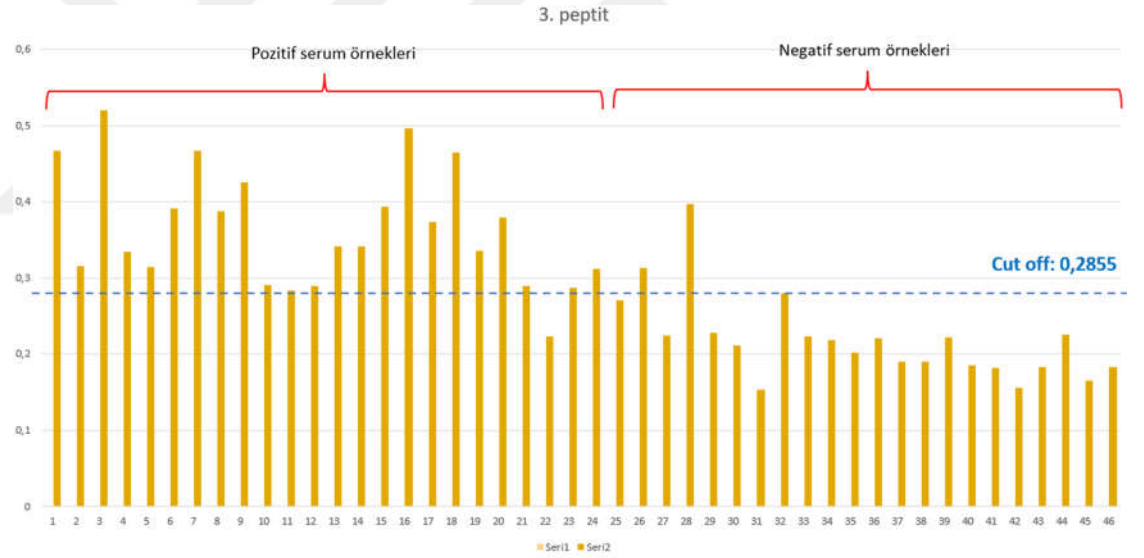
Tablo 4.6. Her bir peptidin ROC analizi ve t-testi ile elde edilen sonuçları.



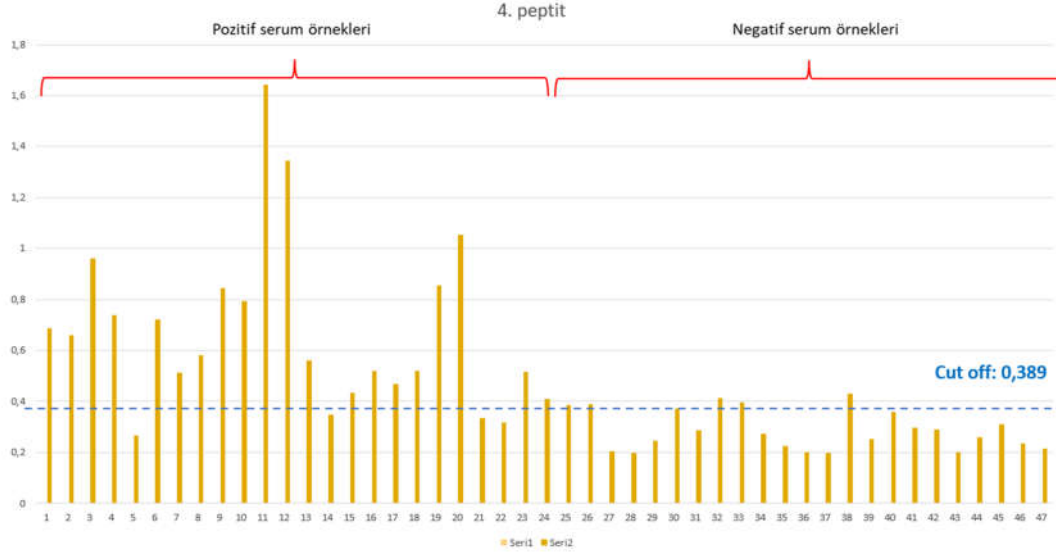
Şekil 4. 1. 1. peptit' in (CRPQGKAGHKG) pozitif ve negatif serum örnekleri ile absorbans değerlerinin grafikleştirilmesi.



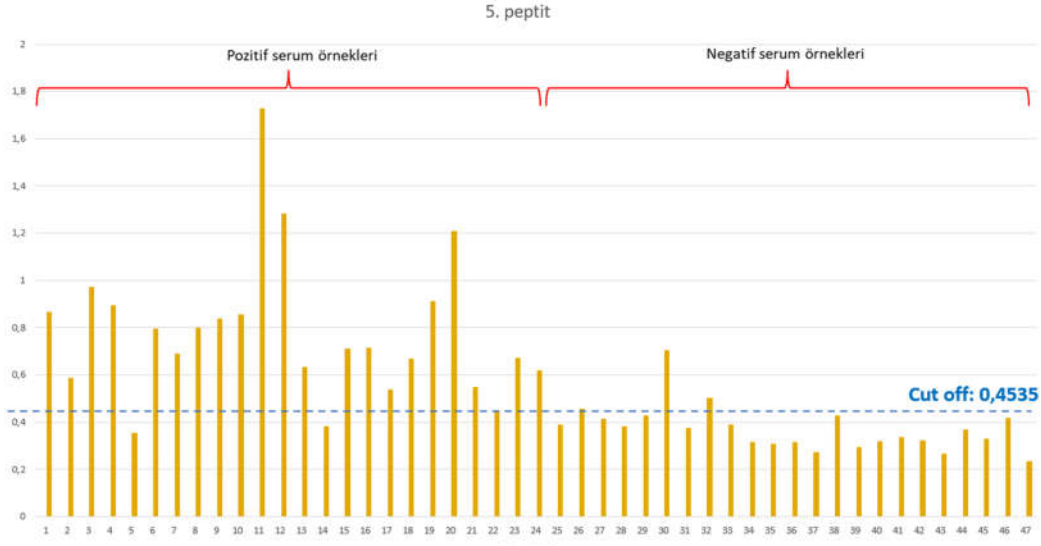
Şekil 4.2. 2. peptit' in (CPGNRAQKE) pozitif ve negatif serum örnekleri ile absorban değerlerinin grafikleştirilmesi.



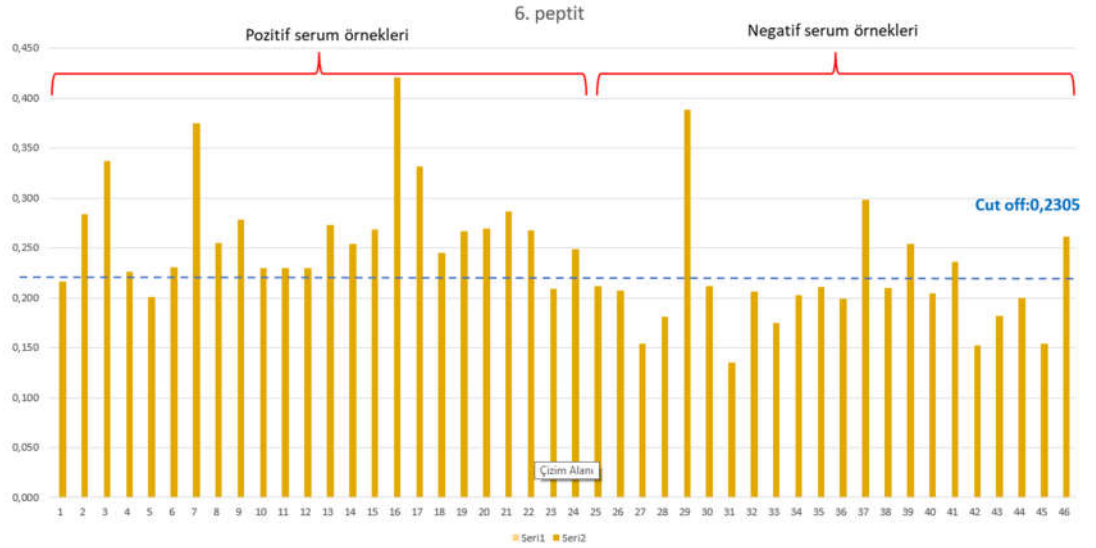
Şekil 4.3. 3. peptit' in (CKQGSKE) pozitif ve negatif serum örnekleri ile absorban değerlerinin grafikleştirilmesi.



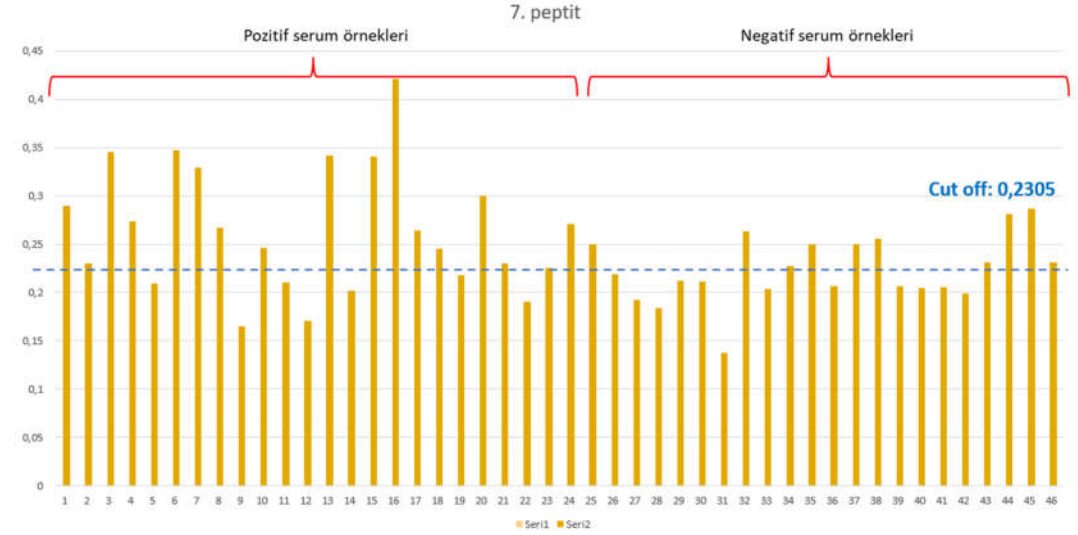
Şekil 4.4. 4. peptit' in (CVKRQQEEEEQQGLVSGKKKS) pozitif ve negatif serum örnekleri ile absorbans değerlerinin grafikleştirilmesi.



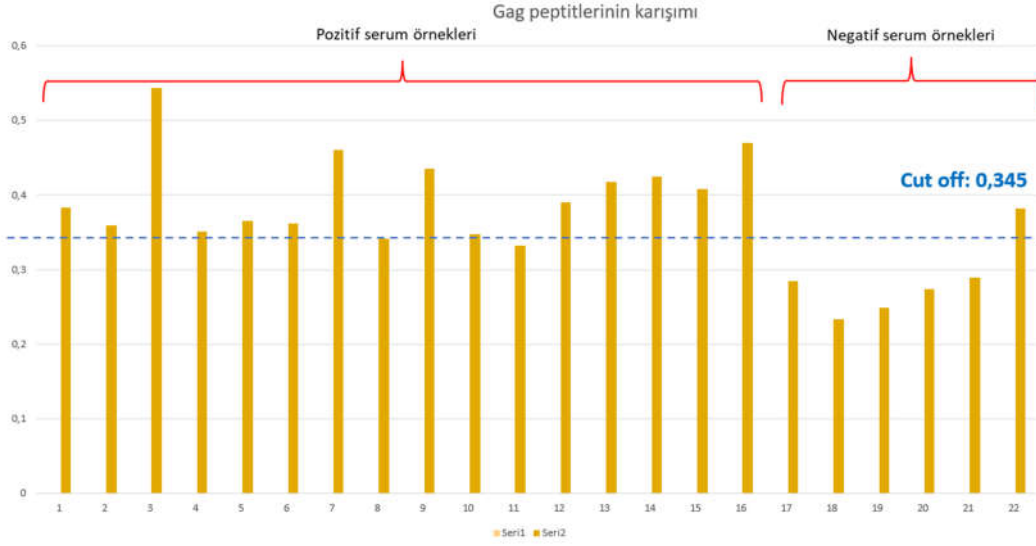
Şekil 4.5. 5. peptit' in (CEHERRTSHRS) pozitif ve negatif serum örnekleri ile absorbans değerlerinin grafikleştirilmesi.



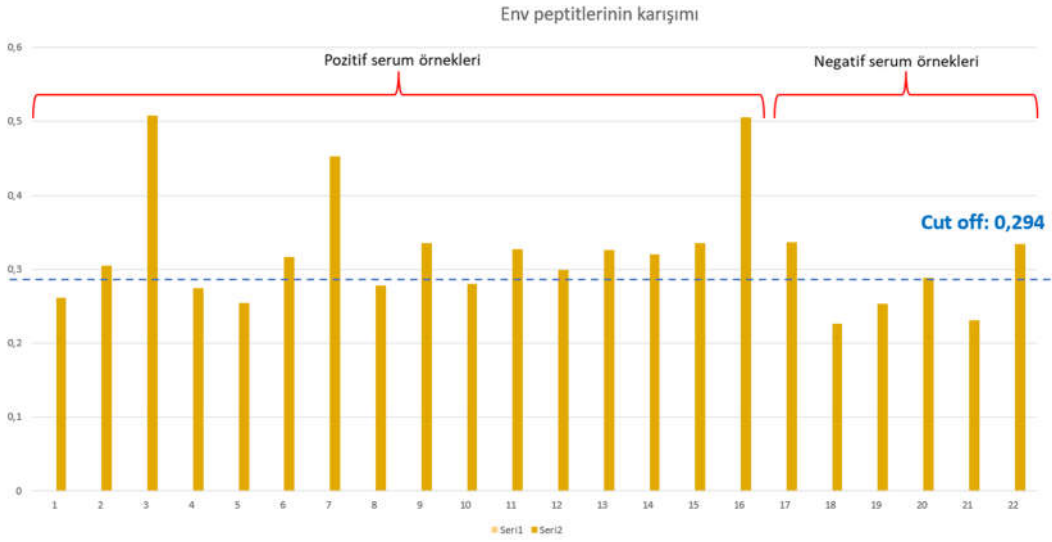
Şekil 4.6. 6. peptit' in (CWEKEDEESMK) pozitif ve negatif serum örnekleri ile absorbans değerlerinin grafikleştirilmesi.



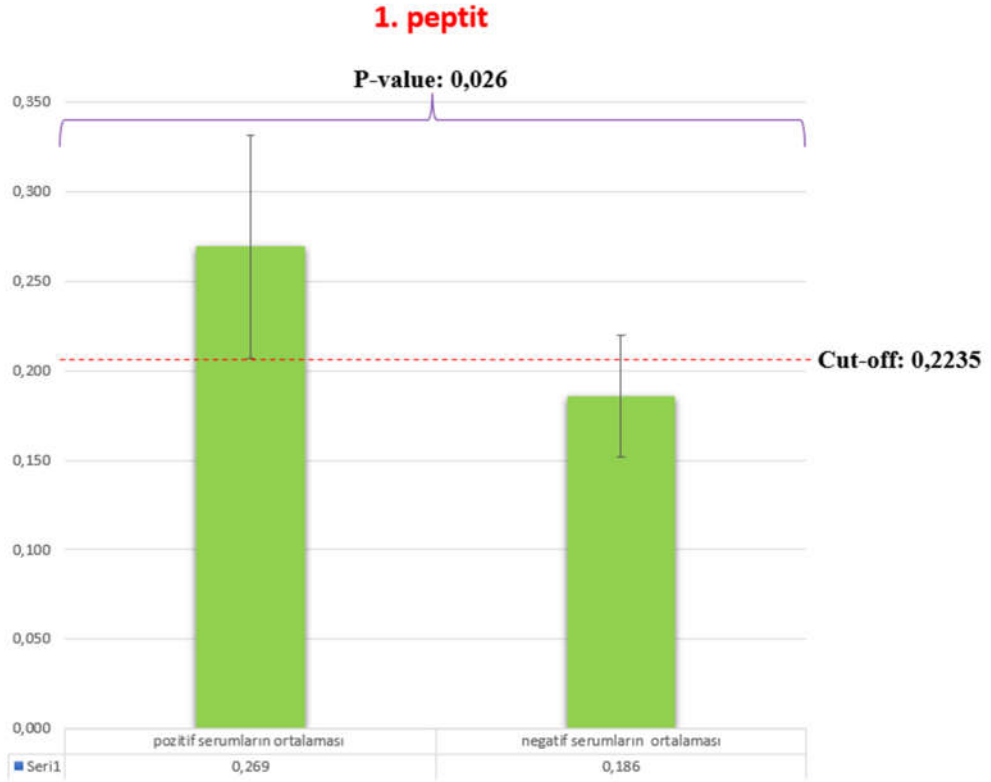
Şekil 4.07. 7. peptit' in (CKYSCESN) pozitif ve negatif serum örnekleri ile absorbans değerlerinin grafikleştirilmesi.



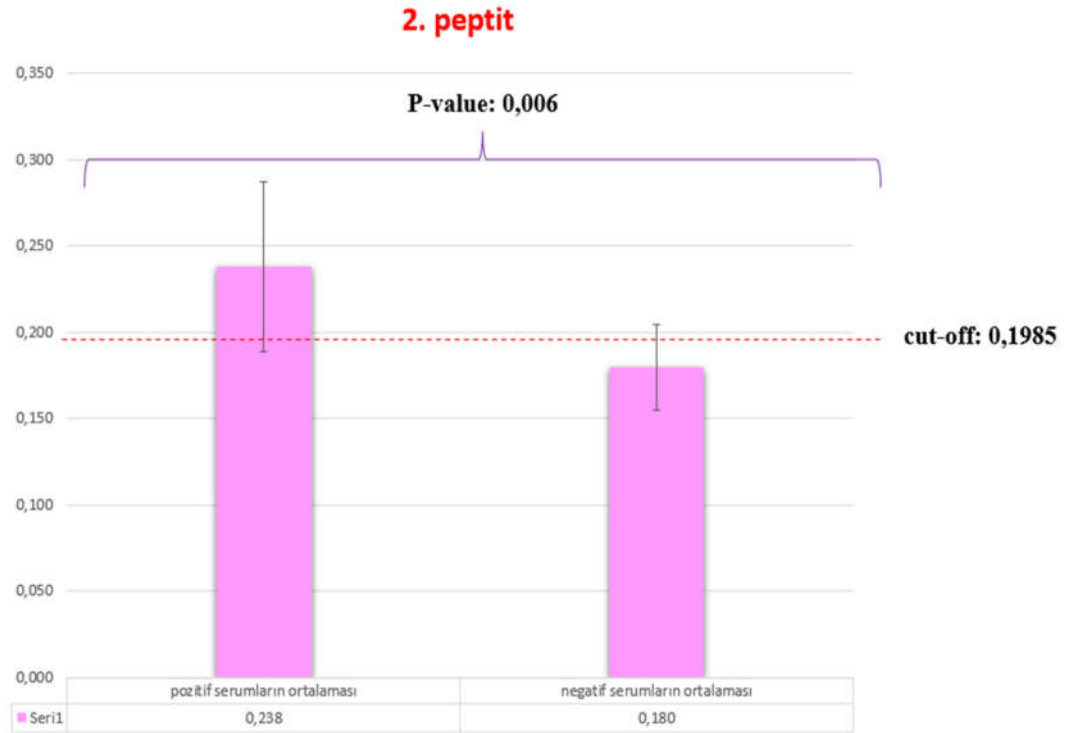
Şekil 4.8. Gag peptitlerinin karışımının (CRPQGKAGHKG, CPGNRAQKE, CKQGSKE) pozitif ve negatif serum örnekleri ile absorbans değerlerinin grafikleştirilmesi.



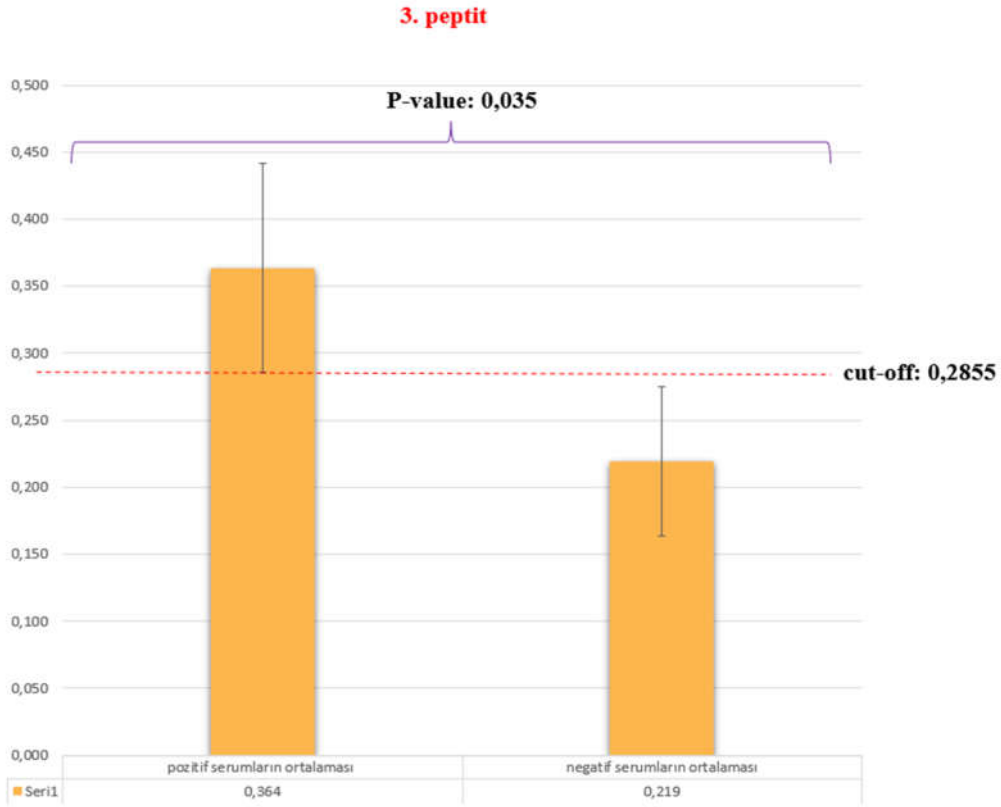
Şekil 4.9. Env peptitlerinin karışımının (CVKRQQEEEEQQGLVSGKKKS, CEHERRTSHRS, CWEKEDEESMK, CKYSCESN) pozitif ve negatif serum örnekleri ile absorbans değerlerinin grafikleştirilmesi.



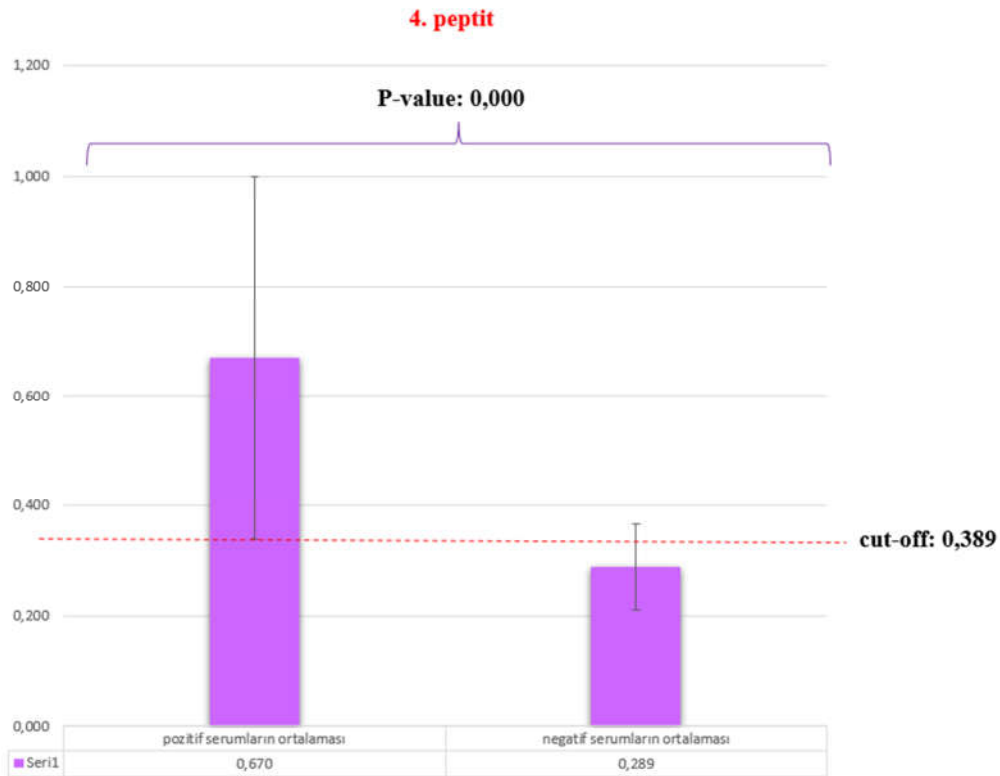
Şekil 4.10. 1. peptit' in (CRPQGKAGHKG) pozitif ve negatif serum örnekleri ile absorbans değeri ortalamalarının grafikleştirilmesi.



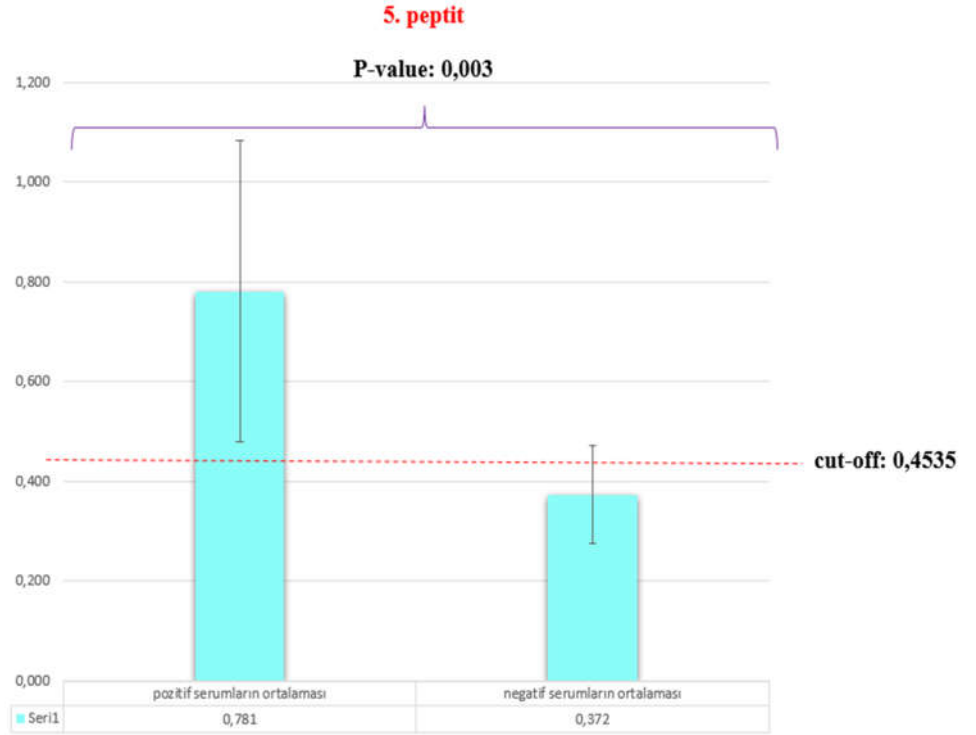
Şekil 4.11. 2. peptit' in (CPGNRAQKE) pozitif ve negatif serum örnekleri ile absorbans değeri ortalamalarının grafikleştirilmesi.



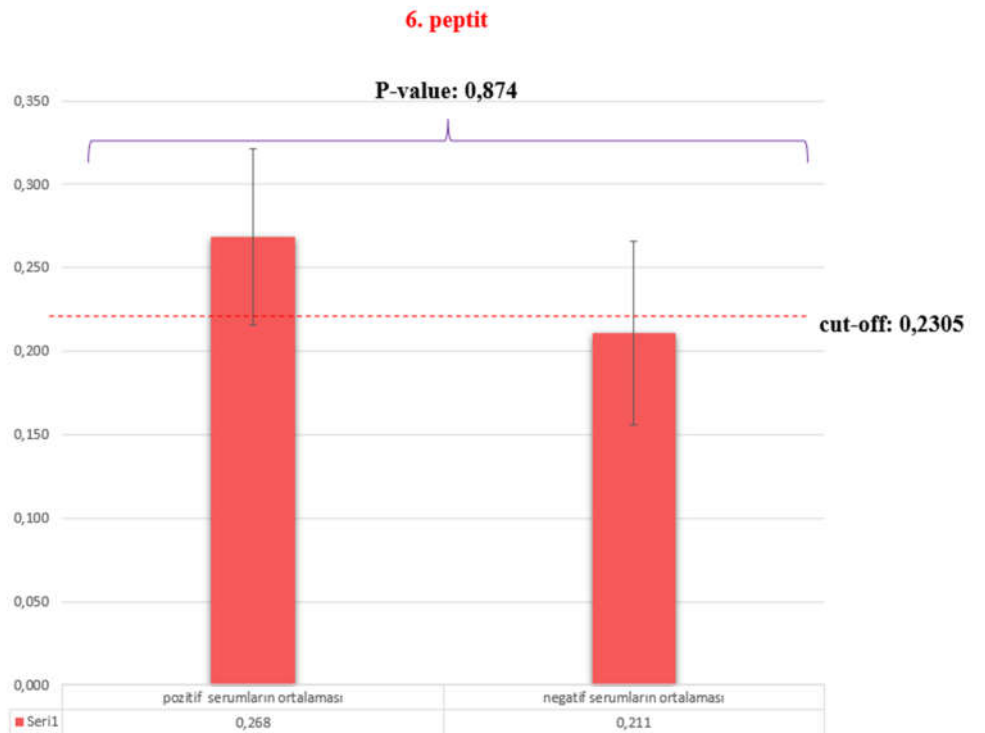
Şekil 4.12. 3.peptit' in (CKQGSKE) pozitif ve negatif serum örnekleri ile absorbans değeri ortalamalarının grafikleştirilmesi.



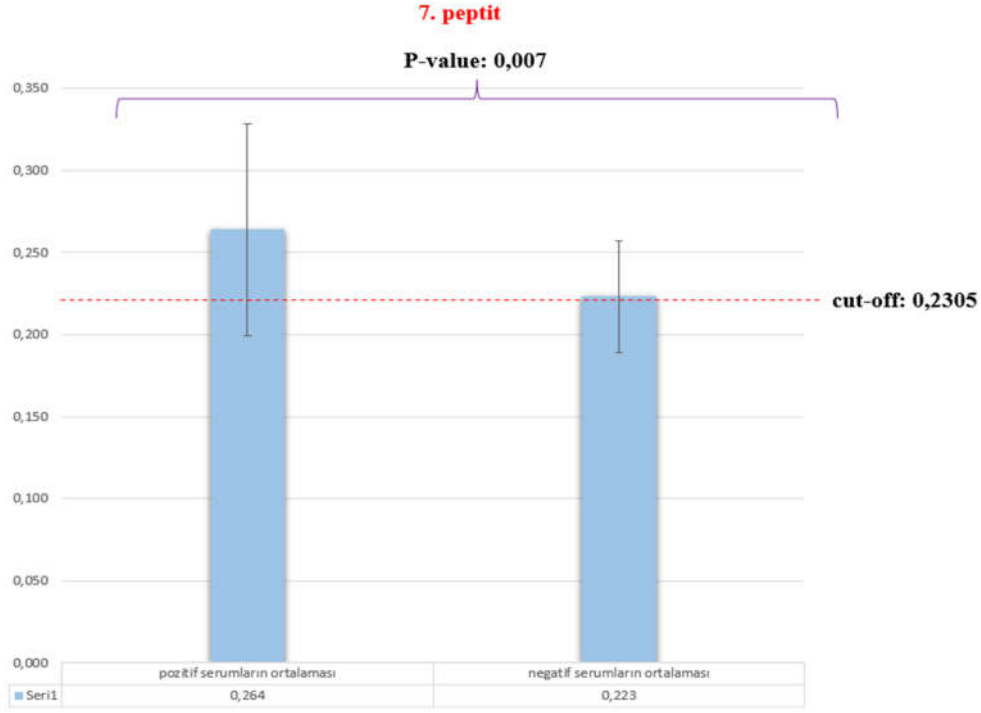
Şekil 4.13. 4. peptit' in (CVKRQQEEEEQQGLVSGKKKS) pozitif ve negatif serum örnekleri ile absorbans değeri ortalamalarının grafikleştirilmesi.



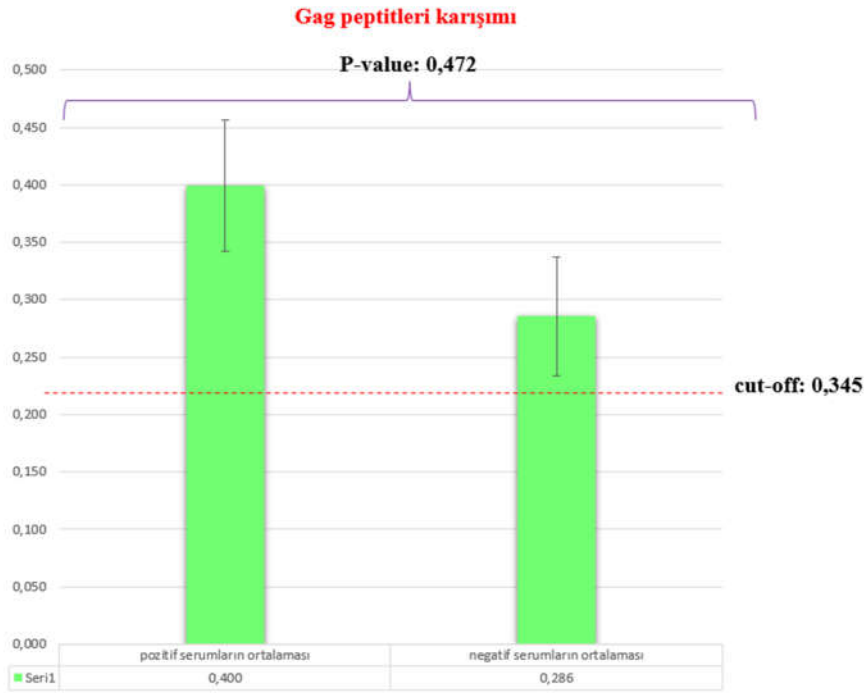
Şekil 4.14. 5.peptit' in (CEHERRTSHRS) pozitif ve negatif serum örnekleri ile absorbans değeri ortalamalarının grafikleştirilmesi.



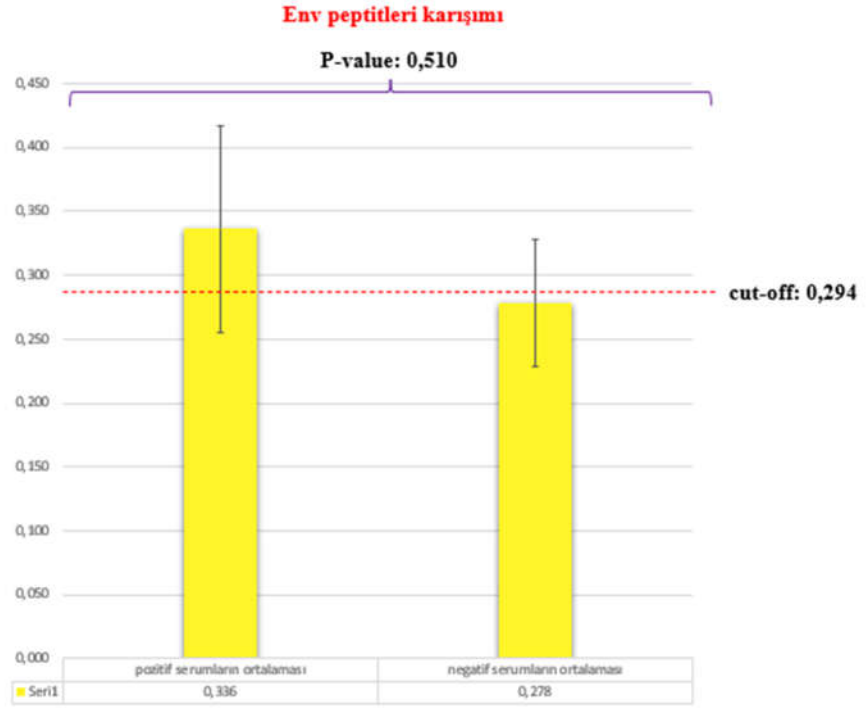
Şekil 4.15. 6. peptit' in (CWEKEDEESMK) pozitif ve negatif serum örnekleri ile absorbans değeri ortalamalarının grafikleştirilmesi.



Şekil 4.16. 7. peptit' in (CKYSCESN) pozitif ve negatif serum örnekleri ile absorbans değeri ortalamalarının grafikleştirilmesi.



Şekil 4.17. Gag peptitlerinin karışımının (CRPQGKAGHKG, CPGNRAQKE, CKQGSKE) pozitif ve negatif serum örnekleri ile absorbans değeri ortalamalarının grafikleştirilmesi.



Şekil 4.18. Env peptitlerinin karışımının (CVKRQQEEEEQQGLVSGKKKS, CEHERRTSHRS, CWEKEDEESMK, CKYSCESN) pozitif ve negatif serum örnekleri ile absorbans değeri ortalamalarının grafikleştirilmesi.

5. TARTIŞMA

MVV, koyunlarda büyük ekonomik kayıplara sebep olan koyunculuk sektöründe önemli bir viral hastalıktır. Viral hastalıkla mücadelede aşılama iyi bir seçenek olsa da ne yazık ki günümüzde halen MVV'ye karşı umut vadeden bir aşı geliştirilememiştir. Bugüne kadar, MVV'ye karşı sınırlı sayıda aşı çalışması yapılmıştır ve bu çalışmalarda farklı aşı geliştirme yöntemleri test edilmiştir (Cutlip et al., 1987; Pétursson et al., 2005; Henriques et al., 2007; Torsteinsdóttir et al., 2007). İlk aşı çalışması Cutlip et al. (1987) tarafından adjuvanlı/ adjuvansız inaktive virüs kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ancak koyunlarda antikor tespit edilse de canlı MVV uygulandığında inaktif aşının koyunları korumadığı bildirilmiştir (Cutlip et al., 1987). Ardından Petursson et al. (2005) MVV'nin attenüe moleküler klonunu kullanarak aşılama gerçekleştirmiştir. 10 ay sonra deneysel enfeksiyon sırasında patojenik klon ile koyunlar muamele edildiğinde koyunların enfekte olduğu gözlenmiştir (Pétursson et al., 2005). Bu çalışmayı takiben, virüse karşı DNA aşı çalışmaları gerçekleşmiş ancak onlardan da virüse karşı korunmaya yönelik bir yanıt alınamamıştır. Örneğin Henriques et al. (2007) tarafından, gag poliproteini ile gag proteini p16 ve p25'i kodlayan üç farklı DNA aşı modeli oluşturulmuştur. Koyun hücrelerinin transfeksiyonundan sonra, gag proteini p16'nın güçlü bir protein ekspresyonu olduğu saptanmıştır. Böylelikle koyunlar p16'yı kodlayan DNA aşısı ve ardından protein takviyesi olarak saflaştırılmış MVV ile aşılanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, geliştirilen DNA aşısı farelerde güçlü bir humoral yanıt oluştursa da bir deneysel enfeksiyon modeli olarak koyunlarda test edilmemiştir (Henriques et al., 2007). Aynı yıl gerçekleştirilen bir başka çalışmada, gag proteini kodlayan gen iki farklı memeli ekspresyon sistemine yerleştirildikten sonra koyunlara bu DNA aşı yapıları ve ardından ikinci doz olarak rekombinant gag proteini aşılanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, aşılanan koyunlara intratrakeal olarak MVV ile muamele edildiğinde immün yanıt oluşmasına rağmen geçen süre ile paralel aşının, aşılanan koyunları korumadığı bildirilmiştir. Virüs izolasyonu ve lezyon sorunları nedeniyle deneyler daha fazla devam ettirilmemiştir. (Torsteinsdóttir et al., 2007). Bu başarısız aşı deneylerinin yanında efektif bir aşının ihtiyacının bir önemi daha bulunmaktadır o da virüsün HIV ile ortak olan pek çok özelliğe sahip olmasıdır. Aynı ailede bulunan bu iki virüs neredeyse aynı genomik yapıya sahip, genetik

yapısında yüksek mutasyon biriktiren, immün sistem hücrelerini enfekte eden, erken dönemde akciğer inflamasyonları yaratan virüslerdir. Bu özelliklerin yanı sıra HIV'in evrimsel tarihine bakıldığında maymunlardaki SIV'den evrimleşerek insanlara bulaştığı bilinmektedir. Böylelikle insanlarla iç içe bir yaşam gösteren koyunların, enfekte olduğu MVV'nin geçirdiği mutasyonlar ve sonucunda ki evrimle “ MVV insanlara bulaşabilir mi?” sorusunu doğurmaktadır. Bu sonuçlar ve teorilerle beraber, MVV ile mücadele için yeni aşı tasarımlarına ihtiyaç kaçılmazdır.

Yenilikçi bir *in silico* yaklaşım olan reverse vaccinology, esas olarak proteinlere çevrilebilen genom analizine dayanır ve doğru bir analiz akışıyla uygulandığında aşı adayları antijenik proteinleri ve epitopları tahmin etmemizi sağlar (Hasan et al., 2019; Basak et al., 2021). Bu yaklaşımla klinik deneylere ulaşan birçok peptit bazlı aşı çalışması da gerçekleştirilmiştir (Akıl et al., 2022). Reverse vaccinology uygulamalarının ilk başarılı örneği *Neisseria meningitidis* (MenB) serogrup B'ye karşı geliştirilmiştir. 350 adet rekombinant protein, *E. coli*'de başarılı bir şekilde ifade edilmiş ve fareleri aşılama için kullanılmıştır. Sonuç olarak, dört bileşenli bir MenB (4CMenB) aşısı formüle edilmiştir. NHBA-GNA1030, GNA2091-fHbp füzyon proteinlerinden, NadA olarak adlandırılan üç rekombinant protein antijeninden ve Yeni Zelanda OMV aşısı için kullanılan suşaya ait bir dış zar vezikülünden oluşturulmuştur (PorA 1.4 içerir) (Seib et al., 2012).

Bu bilgilerin ışığında, ilk kez bu çalışmada MVV'ye karşı bir aşı geliştirmek için *in silico* yaklaşımlar uygulanmıştır. MVV'nin iki yapısal proteini (gag ve env proteinleri), bir multi-epitop aşı adayları oluşturmak için analiz edilmiştir. Bu iki protein arasında gag proteininin env'ye göre daha korunmuş ve daha antijenik olduğu tespit edilmiştir. Bu iki bulgu, aşı çalışmaları için önemli olan hangisinin daha korunmuş ve daha antijenik olduğu sorularına cevap vermesi açısından önemli görülmüştür. Ayrıca, sekonder yapı tahminlerinde tespit edilen alfa heliks sayısının gag proteininde daha fazla olması, protein yapısının korunduğunu ve gag proteini ile antikorlar arasındaki ilişkinin daha güçlü olacağını gösteren bir diğer önemli bulgu olarak görülmüştür (Di Natale et al., 2020). Ayrıca transmembran heliksler env proteininde saptanmasına rağmen gag proteininde saptanmamıştır. Bu durum, gag proteinini env'den daha uygun bir antijen adayları yapmaktadır çünkü ikiden az transmembran heliks sayısına sahip

olma durumu klonlama, ekspresyon ve saflaştırma aşamalarında kolaylık sağladığı bilinmektedir (Shaddel et al., 2018). Proteinlerin fizikokimyasal özelliklerine bakıldığında ise env proteininin instabilite indeksinin 40'ın üzerinde bulunup stabil olmadığı ve suda çözünür özellik göstermediği saptanmıştır (Tablo 1 ve 2). Bu sonuçlara göre gag'ın aşı çalışmaları için daha uygun bir antijen olduğu tespit edilmiştir. Aslında bu *in silico* bulgular, önceki rekombinant aşı çalışmalarında env proteini yerine gag proteininin yaygın olarak kullanılması tarafından da desteklenmiştir (Henriques et al., 2007; Torsteinsdóttir et al., 2007; Pérez 2010).

Bu çalışmada B hücresi ve MHC-I/II epitop tahmini için iki yapısal protein gag ve env analiz edilmiştir. İki proteinden pek çok epitop elde edilse de kapsamlı analiz sonucundan toplam 19 adet epitop seçilmiştir. Bu epitoplardan 7'si B hücre ve 12'si MHC-I/II epitopları olarak saptanmıştır. Seçilen epitopların hepsi antijenik, suda çözünür, alerjenik olmayan, toksik olmayan ve hemolitik olmayan özellikler göstermiştir. Özellikle B hücre epitoplarından RPQKGAGHKG ve VKRQQQEEEEQQGLVSGKKKS diğer epitoplara göre daha yüksek antijenite değerine sahip olarak saptanmıştır (Tablo 4.3). Ayrıca yüksek antijenite değerine sahip bu iki B hücre epitopunun hemen hemen tüm amino asitleri, solvent ekspoz alan içerisinde gözlenmiştir (Tablo 4.3).

B hücre epitoplarının göreceli olarak daha iyi özellik gösterdiği bu çalışmanın yanı sıra yapılan başka çalışmalarda da B hücre epitoplarının aşı ve serolojik çalışmalarda kullanılabilecek immünojenik antijenler olduğu bildirilmiştir. Örneğin Fantin ve ark. (2021), bir apicomplexan paraziti olan *Plasmodium vivax*'ta Apikal membran antijeninde üç farklı B hücre epitopunu biyoinformatik yöntemler kullanarak tahmin etmiş ve ardından bu epitopların immünojenitesi, *Plasmodium vivax* ile enfekte olanların serumlarıyla test etmiştir. Elde edilen sonuçlara göre bu epitoplar serum örnekleri ile %32.2 ile %48.7 arasında değişen oranlarda reaksiyona girmiştir (Fantin ve ark, 2021). Diğer bir çalışmada, başka bir apikompleksan parazit *Toxoplasma gondii*'deki GRA7 proteinleri, biyoinformatik yöntemlerle tahmin edilmiş ve bu B hücre epitoplarından birçoğu, *T. gondii* ile enfekte olmuş kedilerden toplanan serum örnekleri ile reaksiyona girmiştir (Can et al., 2022).

Öte yandan, antijenite değeri yüksek üç farklı MHC-I/II epitopu (GAYPDPELEY, QRDSLYIAGR ve PMLVKQKNTESYEDF) tespit edilmiştir. Docking analizleri ayrıca bu epitoplar ile Ovine MHC-I/II alelleri arasındaki bağlanma afinitesi doğrulamıştır (Şekil 4.2 ve 4.3). Böylelikle epitopların, antijen sunan hücrelerde bulunan MHC-I veya MHC-II molekülleri tarafından sunulurken, CD4⁺ ve CD8⁺ T hücreleri tarafından tanınabildiği de dolaylı olarak gösterilmiştir.

Viral enfeksiyonda, CD4⁺ T hücreleri genellikle, Th1 hücrelerine farklılaşır. Farklılaşmayla birlikte Th1 hücreleri, virüs bulaşmış hücrelerin temizlenmesi için CD8⁺ T hücre yanıtına yardımcı olur veya B hücre farklılaşmasına ve antikor yanıtına aracılık etmek için T foliküler yardımcı hücrelerine (Tfh) dönüşür (Snell et al., 2016). B hücresi ve MHC-I/II epitoplarının potansiyel etkilerine bağlı olarak, bu epitopların MVV'ye karşı peptit aşısının geliştirilmesinde de kullanılabileceği düşünülmüştür.

Bu çalışmada antijenik, alerjenik olmayan, toksik olmayan, suda çözünür, stabil, alifatik indeks değeri iyi, yeterli moleküler ağırlığa (>5 kDa) sahip, alfa heliks ile random coil içeren ve ayrıca GRAVY değeri negatif olan bir multi-epitop aşısı kontraktı tasarlanmıştır. Negatif GRAVY değeri, multi-epitop aşısı kontraktının çevredeki su molekülleri ile daha iyi etkileşime sahip olabileceğini göstermiştir. İyi bir alifatik indeks değeri, multi-epitop aşısı kontraktının geniş bir sıcaklık spektrumunda stabil olabileceğini göstermiştir. Proteinin iç kısmında bulunan alfa sarmalı, proteinin yapısının korunur ve antijen ile antikor arasında güçlü bir ilişkinin indüklenebilir olduğunu göstermiştir. Ayrıca yüksek oranda random coil içeren multi-epitop aşısı kontraktının antikor tarafından tanınabilirliği artacağı sonucuna varılmıştır.

Tasarlanan ve üç boyutlu yapısı elde edilen multi-epitop aşısı kontraktının, çoğunlukla doğuştan gelen bağışıklık sisteminin üyeleri makrofaj ve dentritik hücrelerde eksprese edilen, TLR-2 ve TLR-4 reseptörlerine yüksek bir afinite ile bağlandığı docking analizleri ile tespit edilmiştir (Şekil 7). Böylelikle multi-epitop aşısı kontraktının, TLR-2 ve 4 aktivasyonları ile olası bir inflammatuar yanıtı indükleyebileceği sonucuna varılan önemli bir bulguya ulaşılmıştır. Bu sonuçla uyumlu olarak, akut viral enfeksiyon sırasında, respiratuar sinsityal virüs, dang

virüsü ve veziküler stomatit virüsü gibi birçok virüsün, TLR'ler tarafından inflamatuvar yanıtı indüklediği bildirilmiştir (Boehme and Compton 2004; Olejnik et al., 2018).

In silico analizler ile en iyi epitop adayları seçildikten sonra B hücre epitoplarının immünojenitelerini test etmek için peptit-ELISA yöntemi ile *in vitro* analizler gerçekleştirilmiştir. ELISA, antijen-antikor reaksiyonlarının renk değişimine bağlı olarak gözlenmesi ve elde edilen absorbans değerleri ile kantitatif olarak ölçülmesine dayanan, yaygın olarak kullanılan bir analizdir. Bu analizin çalışma prensibi enzim işaretli antikorun/antijenin, serbest antijen/antikor ile reaksiyona girmesiyle oluşan kompleksin aktivitesinin, substrat varlığında tespit edilmesine dayanmaktadır (Boonham et al., 2014). Bu analiz ışığında gag proteininden elde edilen 3 adet epitop ve env proteininden elde edilen 4 adet epitop başlarına bir sistein amino asidi eklenerek sentezlenmiştir. Sentezlenen toplam 7 adet peptidin, peptit-ELISA ile immünojenite tayini gerçekleştirilmiştir. Analiz sonunda elde edilen absorbans değerleri incelendiğinde pozitif serum değerlerinin negatif serum değerlerinden gözle görülür farklarla yüksek olduğu peptitler gag proteini için 3. peptit (CKQGSKE) ve env proteini için 5. peptit (CEHERRTSHRS) olarak gözlenmiştir. Ayrıca absorbans değerleri ile korale olarak pozitif serum örneklerinin ortalaması ve negatif serum örneklerinin ortalaması arasındaki fark yine bu iki peptitte fazla olarak saptanmıştır (Şekil 4.22 ve 4.24).

İstatistiksel analizlerden ROC curve analizinin ışığında testin pozitifleri negatiflerden ayırma yeteneği, cut-off değeri, sensitivite ve spesifite değerleri gibi pek çok bulgu da analiz edilmiştir. İlk olarak, cut-off değeri test sonucuna göre pozitif grup ve negatif grup değişkenlerinin birbirinden ayrıldığı ölçüm noktasıdır. ROC analizi ile elde edilen cut-off değerleri sonucunda gag proteini için en düşük değer 0,1985 olarak 2. peptitte ve en yüksek değer 0,2855 olarak 3. peptitte bulunmuştur. Env proteininde ise en düşük değer 0,2305 olarak 6. ve 7. peptitte ve en yüksek değer 0,4535 olarak 5. peptitte bulunmuştur. Ardından, sensitivite değeri gag proteini için en yüksek olan peptit %91,7 oranıyla 3. peptit olarak gözlenmiştir. Env proteini içinse en yüksek olan peptit %87,5 oranıyla 5. peptit olarak gözlenmiştir. Öte yandan spesifite değeri gag proteini için en yüksek olan peptit %90,9 oranıyla 3. peptit olarak gözlenmiştir. Env proteini içinse en yüksek

olan peptit %87 oranıyla 5. peptit olarak gözlenmiştir. AUC değeri en yüksek olan peptit gag proteini için 0,942 oranıyla 3. peptit ve env proteini için 0,942 oranıyla 5. peptittir. Elde edilen verilerin ışığında gag proteini için en iyi özelliklere sahip immünjenik peptidin 3. peptit ve env proteini için en iyi özelliklere sahip immünjenik peptidin 5. peptit olduğu tespit edilmiştir. İstatistiksel analizlerin ışığında 6. peptidin, gag peptitlerinin karışımının ve env peptitlerinin karışımının p değerleri 0,05 den büyük olduğu için bu peptitlerle yapılan deneylerde testin anlamsız olduğu sonucuna varılmıştır



6. SONUÇ

Sonuç olarak, günümüzde tedavisi olmayan, aşı geliştirilmesindeki çalışmaların çok sınırlı olması sebebiyle tatmin edici sonuçların alınamadığı ve ciddi sosyo-ekonomik kayıplara sebep olan Maedi-Visna virülansının gag ve env proteinleri hem *in silico* hem *in vitro* analizlerle B hücre ve MHC-I/II epitoplarını saptamak ve multi-epitop aşı adayı geliştirmek için ilk kez analiz edilmiştir. Varyasyon analizi sırasında gag proteininin, env proteinine kıyasla MVV suşları arasında daha fazla korunduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, gag ve env proteinlerinden birçok epitopun, reverse vaccinology tekniğinin ışığında tahminleri gerçekleşmiştir. Bu epitoplardan bazılarının (RPQ GKAGHKG, VKRQQEEEEQQGLVSGKKKS, GAYPDPELEY, QRDSLVIAGR ve PMLVKQKNTESYEDF) daha antijenik olduğu tespit edilmiştir. En iyi özelliklere sahip epitoplar seçildikten sonra, antijenik, alerjik ve toksik olmayan, suda çözünür ve TLR-2/4 reseptörleriyle afiniteye sahip olan, multi epitop aşı konstraktı tasarlanarak 3 boyutlu yapısı elde edilmiştir. Ayrıca epitopların immünojenik doğaları, peptit-ELISA ile test edilmiştir. Yapılan analizlerin ışığında peptitlerin immünojenik olduğu ve bunlardan iki peptidin (3. ve 5. peptit) en iyi özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir. Böylelikle analiz edilen epitopların/peptitlerin MVV' ye karşı geliştirilecek bir peptit tabanlı aşı uygulamasında deneysel enfeksiyon modeli ile test edilmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Abbas A.K., Lichtman A.H., and Pober J.S., 2000, B cell activation and antibody production, *In Cellular and Molecular Immunology*.4th ed. Philadelphia, W.B Saunders Company,pp192-207.

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., and Pillai, S., 2019, *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System, 6e: Sae-E-Book*. Elsevier India.

Akıl, M., Aykur, M., Karakavuk, M., Can, H., and Döşkaya, M., 2022, Construction of a multiepitope vaccine candidate against *Fasciola hepatica*: an in silico design using various immunogenic excretory/secretory antigens. *Expert review of vaccines*, 21(7), 993-1006.
Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity *Cell* 2006; 124: 783-801.

Al-Baroodi, S. Y., Mossa, D. A., and Al-Attar, M. Y., 2022, Detection of Maedi-visna virus in sheep in Nineveh province. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 36(1), 61-64.

Andresson, Ó. S., Elser, J. E., Tobin, G. J., Greenwood, J. D., Gonda, M. A., Georgsson, G., and Pétursson, G., 1993, Nucleotide sequence and biological properties of a pathogenic proviral molecular clone of neurovirulent visna virus. *Virology*, 193(1), 89-105.

Arnarson, H., Pálsson, A., Guðnadóttir, M., and Andrésdóttir, V., 2017, Maedi-visna virus persistence: Antigenic variation and latency. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 55, 6-12.

Arora, S. K., and Aryandra, A., 2020, Epitope Based Vaccine Designing—A mini review. *J. Vaccines Immunol*, 6, 038-041.

Azim, K. F., Hasan, M., Hossain, M. N., Somana, S. R., Hoque, S. F., Bappy, M. N. I., and Lasker, T., 2019, Immunoinformatics approaches for designing a novel multi epitope peptide vaccine against human norovirus (Norwalk virus). *Infection, Genetics and Evolution*, 74, 103936.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Basak, S., Deb, D., Narsaria, U., Kar, T., Castiglione, F., Sanyal, I., and Srivastava, A. P., 2021, In silico designing of vaccine candidate against *Clostridium difficile*. *Scientific Reports*, 11(1), 14215.

Berriatua, E., Alvarez, V., Extramiana, B., González, L., Daltauit, M., and Juste, R., 2003. Transmission and control implications of seroconversion to Maedi-Visna virus in Basque dairy-sheep flocks. *Prev. Vet. Med.* 60, 265–279. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(03\)00163-6](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(03)00163-6).

Blacklaws, B. A., 2012, Small ruminant lentiviruses: Immunopathogenesis of visna-maedi and caprine arthritis and encephalitis virus. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 35(3), 259-269.

Blacklaws, B. A., Berriatua, E., Torsteinsdottir, S., Watt, N. J., De Andres, D., Klein, D., and Harkiss, G. D., 2004, Transmission of small ruminant lentiviruses. *Veterinary Microbiology*, 101(3), 199-208.

Boehme, K. W., and Compton, T., 2004, Innate sensing of viruses by toll-like receptors. *Journal of virology*, 78(15), 7867-7873.

Bonanni, P., and Santos, J. I., 2011, Vaccine evolution. *Perspectives in Vaccinology*, 1(1), 1-24.

Boonham, N., Kreuze, J., Winter, S., van der Vlugt, R., Bergervoet, J., Tomlinson, J., and Mumford, R., 2014, Methods in virus diagnostics: from ELISA to next generation sequencing. *Virus research*, 186, 20-31.

Bouazzaoui, A., Abdellatif, A. A., Al-Allaf, F. A., Bogari, N. M., Al-Dehlawi, S., and Qari, S. H., 2021, Strategies for vaccination: conventional vaccine approaches versus new-generation strategies in combination with adjuvants. *Pharmaceutics*, 13(2), 140.

Broughton-Neiswanger, L. E., White, S. N., Knowles, D. P., Mousel, M. R., Lewis, G. S., Herndon, D. R., and Herrmann-Hoesing, L. M., 2010, Non-maternal transmission is the major mode of ovine lentivirus transmission in a ewe

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

flock: A molecular epidemiology study. *Infection, Genetics and Evolution*, 10(7), 998-1007.

Can, H., Aksoy Gökmen, A., Döşkaya, M., Erkunt Alak, S., Değirmenci Döşkaya, A., Karakavuk, M., and Ün, C., 2022, Development of a new serotyping ELISA for *Toxoplasma gondii* type II, type III and Africa 1 lineages using in silico peptide discovery methods, well categorized feline and human outbreak serum samples. *BMC Infectious Diseases*, 22(1), 1-14.

Can, H., Aksoy Gökmen, A., Döşkaya, M., Erkunt Alak, S., Değirmenci Döşkaya, A., Karakavuk, M., and Ün, C., 2022, Development of a new serotyping ELISA for *Toxoplasma gondii* type II, type III and Africa 1 lineages using in silico peptide discovery methods, well categorized feline and human outbreak serum samples. *BMC Infectious Diseases*, 22(1), 1-14.

Caroline, L., Minardi, C. J. C., Jean-Francois, M., 2010, SRLVs: A genetic continuum of lentiviral species in sheep and goats with cumulative evidence of cross species transmission. *Current HIV research*, 8(1), 94-100.

Christodouloupoulos, G., 2006, Maedi–Visna: Clinical review and short reference on the disease status in Mediterranean countries. *Small Ruminant Research*, 62(1-2), 47-53.

Crilly, J. P., Rzechorzek, N., and Scott, P., 2015, Diagnosing limb paresis and paralysis in sheep. *In practice*, 37(10), 490-507.

Crowe, J., Masone, B. S., and Ribbe, J., 1995, One-step purification of recombinant proteins with the 6xHis tag and Ni-NTA resin. *Molecular biotechnology*, 4, 247-258.

Cutlip, R. C., Lehmkuhl, H. D., Brogden, K. A., and Schmerr, M. J. F., 1987, Failure of experimental vaccines to protect against infection with ovine progressive pneumonia (maedi-visna) virus. *Veterinary microbiology*, 13(3), 201-204.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Di Natale, C., La Manna, S., De Benedictis, I., Brandi, P., and Marasco, D., 2020, Perspectives in peptide-based vaccination strategies for syndrome coronavirus 2 pandemic. *Frontiers in pharmacology*, 11, 578382.

Doytchinova, I. A., ve Flower, D. R., 2007, VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC bioinformatics*, 8(1), 1-7.

Fantin, R. F., Fraga, V. G., Lopes, C. A., de Azevedo, I. C., Reis-Cunha, J. L., Pereira, D. B., and Bueno, L. L., 2021, New highly antigenic linear B cell epitope peptides from Pv AMA-1 as potential vaccine candidates. *Plos one*, 16(11), e0258637.

Feverheiro M., 1995, Prevalance of maedi-visna infection in sheep in Portugal. *Rev. Port. Cienc Vet.*, 90:66-70.

Finberg, R. W., Wang, J. P., and Kurt Jones, E. A., 2007, Toll like receptors and viruses. *Reviews in medical virology*, 17(1), 35-43.

Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S. E., Wilkins, M. R., Appel, R. D., and Bairoch, A., 2005, *Protein identification and analysis tools on the ExPASy server* (pp. 571-607). Humana press.

Georgsson, G., 1990, Maedi-visna. Pathology and pathogenesis. *Maedi-visna and related diseases*, 19-54.

Glaria, I., Reina, R., Ramirez, H., De Andres, X., Crespo, H., Jauregui, P., and De Andrés, D., 2012, Visna/Maedi virus genetic characterization and serological diagnosis of infection in sheep from a neurological outbreak. *Veterinary microbiology*, 155(2-4), 137-146.

Gomez-Lucia, E., Barquero, N., and Domenech, A., 2018, Maedi-Visna virus: current perspectives. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, 11-21.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Grego, E., Bertolotti, L., Carrozza, M. L., Profiti, M., Mazzei, M., Tolari, F., and Rosati, S., 2005, Genetic and antigenic characterization of the matrix protein of two genetically distinct ovine lentiviruses. *Veterinary microbiology*, 106(3-4), 179-185.

Gürçay, M., and Parmaksız, A., 2013, An investigation of Visna-Maedi virus infection in Şanlıurfa Province, Southeast Anatolia, Turkey. *AVKAE Derg*, 3(1), 46-50.

Hasan, M., Ghosh, P. P., Azim, K. F., Mukta, S., Abir, R. A., Nahar, J., and Khan, M. M. H., 2019, Reverse vaccinology approach to design a novel multi-epitope subunit vaccine against avian influenza A (H7N9) virus. *Microbial pathogenesis*, 130, 19-37.

Henriques, A. M., Fevereiro, M., Prazeres, D. M., and Monteiro, G. A., 2007, Development of a candidate DNA vaccine against Maedi-Visna virus. *Veterinary immunology and immunopathology*, 119(3-4), 222-232.

Herrmann-Hoesing, L. M., 2010, Diagnostic assays used to control small ruminant lentiviruses. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 22(6), 843-855.

Hollingsworth, S. A., ve Karplus, P. A., 2010, A fresh look at the Ramachandran plot and the occurrence of standard structures in proteins.

Hüttner, K., Seelmann, M., and Feldhusen, F., 2010, Prevalence and risk factors for Maedi-Visna in sheep farms in Mecklenburg-Western-Pomerania. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr*, 123(9-10), 10-14.

Jr Janeway C.A., Travers P., Walport M., and Shlomchik M.J., 2005, .Antigen recognition by B-cell and T-cell receptors. Immunobiology. 6th edition. NewYork USA: Garland Science; pp:103-134.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Kaba, J., Czopowicz, M., Ganter, M., Nowicki, M., Witkowski, L., Nowicka, D., and Szaluś-Jordanow, O., 2013, Risk factors associated with seropositivity to small ruminant lentiviruses in goat herds. *Research in veterinary science*, 94(2), 225-227.

Kalogianni, A. I., Bossis, I., Ekateriniadou, L. V., and Gelasakis, A. I., 2020, Etiology, epizootiology and control of maedi-visna in dairy sheep: a review. *Animals*, 10(4), 616.

Kappeler, A., Müller, C., 2000, The role of activated cytotoxic T cells in inflammatory bowel disease. *Histology and histopathology*, 15(1), 167-172.

Karr, B. M., Chebloune, Y., Leung, K., and Narayan, O., 1996, Genetic characterization of two phenotypically distinct North American ovine lentiviruses and their possible origin from caprine arthritis-encephalitis virus. *Virology*, 225(1), 1-10.

Kozakov, D., Hall, D. R., Xia, B., Porter, K. A., Padhorny, D., Yueh, C., Vajda, S., 2017, The ClusPro web server for protein–protein docking. *Nature protocols*, 12(2), 255-278.

Lee, N. H., Lee, J. A., Park, S. Y., Song, C. S., Choi, I. S., Lee, J. B., 2012, A review of vaccine development and research for industry animals in Korea. *Clinical and experimental vaccine research*, 1(1), 18-34.

Lee, S. J., Shin, S. J., Lee, M. H., Lee, M. G., Kang, T. H., Park, W. S., Park, Y. M., 2014, A potential protein adjuvant derived from Mycobacterium tuberculosis Rv0652 enhances dendritic cells-based tumor immunotherapy. *PloS one*, 9(8), e104351.

Levinson, W., Jawetz, E., 1996, *Medical microbiology and immunology: examination and board review*. Appleton & Lange.

Li, W., Joshi, M. D., Singhania, S., Ramsey, K. H., Murthy, A. K., 2014, Peptide vaccine: progress and challenges. *Vaccines*, 2(3), 515-536.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Lopez, A., Martinson, S. A., 2017, Respiratory system, mediastinum, and pleurae. *Pathologic basis of veterinary disease*, 471.

Lujan, L., Garcia Marin, J.F., Fernandez de Luco, D., Vargas, A., Badiola, J.J., 1991, Pathological changes in the lungs and mammary glands of sheep and their relationship with Maedi-Visna infection. *Vet. Rec.* 129, 51-54.

McNab, F., Mayer-Barber, K., Sher, A., Wack, A., O'garra, A., 2015, Type I interferons in infectious disease. *Nature Reviews Immunology*, 15(2), 87-103.

Minas, A., Koutsoukou-Hartona, E., Papasavas, M., and Tsantas, H.,1994, Survey of sheep and goats flocks of North Sporades for the presence of paratuberculosis and Maedi-Visna. *Bulletin Hellenic Veterinary Medical Society*, 45(1), 25-30.

Minguijón, E., Reina, R., Pérez, M., Polledo, L., Villoria, M., Ramírez, H., Juste, R. A., 2015, Small ruminant lentivirus infections and diseases. *Veterinary Microbiology*, 181(1-2), 75-89.

Moser, M., Leo, O., 2010, Key concepts in immunology. *Vaccine*, 28, C2-C13.

Narayan, O., Clements, J. E., 1989, Biology and pathogenesis of lentiviruses. *Journal of General Virology*, 70(7), 1617-1639.

Norouzi, B., Razavizadeh, A. T., Azizzadeh, M., Mayameei, A., Mashhadi, V. N. N., 2015, Serological study of small ruminant lentiviruses in sheep population of Khorasan-e-Razavi province in Iran. In *Veterinary Research Forum* (Vol. 6, No. 3, p. 245). Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

Oguma, K., Tanaka, C., Harasawa, R., Kimura, A., Sasaki, J., Goryo, M., & Sentsui, H., 2014, Isolation of Maedi/Visna virus from a sheep in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 76(2), 211-218.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Olejnik, J., Hume, A. J., & Mühlberger, E., 2018, Toll-like receptor 4 in acute viral infection: Too much of a good thing. *PLoS pathogens*, 14(12), e1007390.

Palatnik-de-Sousa, C. B., Soares, I. D. S., Rosa, D. S., 2018, Epitope discovery and Synthetic Vaccine design. *Frontiers in immunology*, 9, 826.

Pancer, Z., Cooper, M. D., 2006, The evolution of adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, 24, 497-518.

Pépin, M., Vitu, C., Russo, P., Mornex, J. F., Peterhans, E., 1998, Maedi-visna virus infection in sheep: a review. *Veterinary research*, 29(3-4), 341-367.

Pérez, M., Biescas, E., De Andrés, X., Leginagoikoa, I., Salazar, E., Berriatua, E., Luján, L., 2010, Visna/maedi virus serology in sheep: Survey, risk factors and implementation of a successful control programme in Aragón (Spain). *The Veterinary Journal*, 186(2), 221-225.

Peterhans, E., Greenland, T., Badiola, J., Harkiss, G., Bertoni, G., Amorena, B., Pépin, M., 2004, Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. *Veterinary research*, 35(3), 257-274.

Pétursson, G., Matthíasdóttir, S., Svansson, V., Andrésdóttir, V., Georgsson, G., Martin, A. H., Torsteinsdóttir, S., 2005, Mucosal vaccination with an attenuated maedi-visna virus clone. *Vaccine*, 23(24), 3223-3228.

Plotkin, S. L., and Plotkin, S. A., 2004, A short history of vaccination. *Vaccines*, 5, 1-16.

Preziuso, S., Renzoni, G., Allen, T. E., Taccini, E., Rossi, G., DeMartini, J. C., Braca, G., 2004, Colostral transmission of maedi visna virus: sites of viral entry in lambs born from experimentally infected ewes. *Veterinary microbiology*, 104(3-4), 157-164.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Preziuso, S., Taccini, E., Rossi, G., Renzoni, G., Braca, G., 2003, Experimental Maedi Visna Virus Infection in sheep: a morphological, immunohistochemical and PCR study after three years of infection. *European Journal of Histochemistry*, 47(4), 373-378.

Pritchard, G. C., McConnell, I., 2007, Maedi-visna. *Diseases of sheep*, 3, 187-191.

Querat, G., Audoly, G., Sonigo, P., Vigne, R., 1990, Nucleotide sequence analysis of SA-OMVV, a visna-related ovine lentivirus: phylogenetic history of lentiviruses. *Virology*, 175(2), 434-447.

Radwan, J., Babik, W., Kaufman, J., Lenz, T. L., Winternitz, J., 2020, Advances in the evolutionary understanding of MHC polymorphism. *Trends in Genetics*, 36(4), 298-311.

Rappuoli, R., 2004, From Pasteur to genomics: progress and challenges in infectious diseases. *Nat. Med.* 10, 1177–1185.

Reina, R., de Andrés, D., Amorena, B., 2013, Immunization against small ruminant lentiviruses. *Viruses*, 5(8), 1948-1963.

Robert, X., and Gouet, P., 2014, Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic acids research*, 42(W1), W320-W324.

Ryan, S., Tiley, L., McConnell, I., and Blacklaws, B., 2000, Infection of dendritic cells by the Maedi-Visna lentivirus. *Journal of Virology*, 74(21), 10096-10103.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Shimizu, J., Yamazaki, S., Sakihama, T., Itoh, M., and Takahashi, T., 2001, Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunological reviews*, 182(1), 18-32.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Sakhaee, E., and Khalili, M., 2010, Serological study of Maedi-Visna virus among sheep flocks in Kerman province of Iran. *Iranian Society for Virology*, 4:29-33.

Sargan, D. R., Bennet, I. D., Cousens, C., Roy, D. J., Blacklaws, B. A., Dalziel, R. G., and, McConnell, I., 1991, Nucleotide sequence of EV1, a British isolate of maedi-visna virus. *Journal of General Virology*, 72(8), 1893-1903.

Schaller, P., Vogt, H. R., Strasser, M., Nettleton, P. F., Peterhans, E., and Zanoni, R., 2000, Seroprevalence of maedi-visna and border disease in Switzerland. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde*, 142(4), 145-153.

Seib, K. L., Zhao, X., and Rappuoli, R., 2012, Developing vaccines in the era of genomics: a decade of reverse vaccinology. *Clinical Microbiology and Infection*, 18, 109-116.

Sette, A., and Rappuoli, R., 2010, Reverse vaccinology: developing vaccines in the era of genomics. *Immunity*, 33(4), 530-541.

Shaddel, M., Ebrahimi, M., and Tabandeh, M. R., 2018, Bioinformatics analysis of single and multi-hybrid epitopes of GRA-1, GRA-4, GRA-6 and GRA-7 proteins to improve DNA vaccine design against *Toxoplasma gondii*. *Journal of Parasitic Diseases*, 42, 269-276.

Sigurdsson, B., 1954, Maedi, a slow progressive pneumonia of sheep: an epizootological and a pathological study. *British Veterinary Journal*, 110(7), 255-270.

Sigurdsson, B., Grímsson, H., and Pálsson, P. A., 1952, Maedi, a chronic, progressive infection of sheep's lungs. *The Journal of infectious diseases*, 90(3), 233-241.

Sigurdsson, B., Pálsson, P. A., and Grímsson, H., 1957, Visna, a demyelinating transmissible disease of sheep. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 16(3), 389-403.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Snell, L. M., Osokine, I., Yamada., D. H., De la Fuente, J. R., Elsaesser, H. J., and Brooks, D. G., 2016, Overcoming CD4 Th1 cell fate restrictions to sustain antiviral CD8 T cells and control persistent virus infection. *Cell reports*, 16(12), 3286-3296.

Sonigo, P., Alizon, M., Staskus, K., Klatzmann, D., Cole, S., Danos, O., and Wain-Hobson, S., 1985, Nucleotide sequence of the visna lentivirus: relationship to the AIDS virus. *Cell*, 42(1), 369-382.

Staskus, K. A., Retzel, E. F., Lewis, E. D., Silsby, J. L., Cyr, S. S., Rank, J. M., and Zachow, K. R., 1991, Isolation of replication-competent molecular clones of visna virus. *Virology*, 181(1), 228-240.

Straub, O. C., 2004, Maedi-Visna virus infection in sheep. History and present knowledge. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 27(1), 1-5.

Tabet, E., Tlaige, R., El Hage, J., and Abi-Rizk, A., 2017, The occurrence of maedi-visna virus in Lebanon. *Rev. Sci. Tech*, 36(3), 899-903.

Thormar H., 2005, Maedi-visna virus and its relationship to human immunodeficiency virus. *AIDS Rev*. 7: 233-245.

Thormar, H., 2013, The origin of lentivirus research: Maedi-visna virus. *Current HIV research*, 11(1), 2-9.

Tolari F., 2000, Maedi Visna in sheep. Etiology-diagnosis-prevention and eradication. Summa (Italy).

Torsteinsdóttir, S., Carlsdóttir, H. M., Svansson, V., Matthíasdóttir, S., Martin, A. H., and Pétursson, G., 2007, Vaccination of sheep with Maedi-visna virus gag gene and protein, beneficial or harmful?. *Vaccine*, 25(37-38), 6713-6720.

Vita R., Mahajan S., Overton J. A., Dhanda S. K., Martini S., Cantrell J. R., and Peters B., 2019, The immune epitope database (IEDB): 2018 update. *Nucleic acids research*, 47(D1), D339-D343.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Wu, C., Barbezange, C., McConnell, I., and Blacklaws, B. A., 2008, Mapping and characterization of visna/maedi virus cytotoxic T-lymphocyte epitopes. *Journal of general virology*, 89(10), 2586-2596.

Yaman, Y., Keleş, M., Aymaz, R., Sevim, S., Sezenler, T., Önalı, A. T., and Heaton, M. P., 2019 Association of TMEM154 variants with visna/maedi virus infection in Turkish sheep. *Small Ruminant Research*, 177, 61-67.

Yaman, Y., Bay, V., Aymaz, R., Keleş, M., Öner, Y., Teferedegn, E. Y., and Ün, C., 2021, A novel 2 bp deletion variant in Ovine-DRB1 gene is associated with increased Visna/maedi susceptibility in Turkish sheep. *Scientific Reports*, 11(1), 14435.

Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., and Zhang, Y., 2015, The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature methods*, 12(1), 7-8.

Zhou, X., Hu, J., Zhang, C., Zhang, G., and Zhang, Y., 2019, Assembling multidomain protein structures through analogous global structural alignments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(32), 15930-15938.

TEŞEKKÜR

Yıllar boyunca sevgi ve emek vererek okuduğum bu alanda öz veriyle hazırladığım yüksek lisans tezimi tamamlamanın heyecanını ve gururunu yaşıyorum. Bu bölümü bana yardımlarını esirgememiş ve teşvik etmiş insanlara teşekkür etmek için fırsat olarak kullanacağım.

Çalışmam süresince TGA-2022-23604 kodlu proje ile maddi destek sağlayan Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi'ne teşekkür ederim.

Öncelikle, lisans ve yüksek lisans eğitimim sürecinde, akademik hayatımın basamaklarını çıkarken beni sınırlamayıp özgürce bilim yapmamı sağlayan hem bilimsel hem felsefi konular başta olmak üzere hayata dair her tür konuda bana yol gösteren ve yardımcı olan değerli danışmanım Prof. Dr. Cemal Ün hocama teşekkür ederim. Ayrıca, yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca gerek laboratuvar gerek biyoinformatik başta olmak üzere pek çok alanda beni eğiten, desteğini esirgemeyen ve yol gösteren Doç. Dr. Hüseyin Can hocama teşekkür ederim. Bandırma Koyunculuk Araştırma Enstitüsün 'den koyun serumlarını temin ederek tezimi gerçekleştirilebilir kılan Doç. Dr. Yalçın Yaman hocama teşekkür ederim. Bir ekip olmanın güzel duygusunu yaşatan, destek ve yardımlarını esirgemeyen ekip arkadaşlarım Sedef Erkunt Alak, Ecem Sürgeç ve Mervenur Güvendi'ye teşekkür ederim.

Hayalim olan mesleği yapmam için beni küçüklüğümde beri destekleyen ve bu günlere gelmemi sağlayan, varlıklarından güç aldığım annem Kibar Koçkaya ve babam Metin Koçkaya'ya teşekkür ederim. Bir abla olmanın yanında en iyi arkadaşım olan, hayatımın her anında bana destek olduğu gibi tez çalışmam boyunca yanımda olup bana her zaman huzur ve güven veren ablam Özlem Koçkaya'ya teşekkür ederim. Bugün ki ben olmamda payı olan, bana sevginin ve iyiliğin dilini öğreten anneannem Bessey Koçkaya'ya teşekkür ederim. Çocukluktan beri her düştüğümde elimden tutan mutluluğumdaysa yanımda olan sevgili arkadaşım Sedef Yorgun'a teşekkür ederim.