

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ

DOKTORA TEZİ

İMMÜNOİNFORMATİK YAKLAŞIMLARLA KIRIM-KONGO KANAMALI
ATEŞİ'NE (KKKA) KARŞI AŞI TASARIMI VE ETKİNLİĞİNİN SORGULANMASI

Sümeyye Altunok

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Aykut Özkul

Eş-Danışman Öğretim Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Mutlu Erdoğan

Ocak

2024

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Sümeyye Altunok

ÖZET

Doktora Tezi

İmmünoinformatik Yaklaşımlarla Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi'ne (KKKA)
Karşı Aşı Tasarımı ve Etkinliğinin Sorgulanması

Sümeyye Altunok

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Aykut Özkul, Dr. Öğr. Üyesi Mutlu Erdoğan

Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA), yaygın coğrafi dağılımı ve ciddiyeti nedeniyle Dünya Sağlık Örgütü'nün öncelikli hastalıklar listesinde yerini almıştır. KKKA virüsü (KKKAV) için klinik öncesi aşı geliştirme çalışmaları, farklı platformlar kullanarak birden fazla antijeni hedef almalarına karşın, korumanın hücresel immün bağışıklıktaki rolü eksiktir. Ayrıca, aşılanmış hayvan modellerinde nötralize edici antikorların seviyeleri mutlak korumayla doğrudan ilişkili değildir; bu durum, T lenfosit yanıtlarının viral enfeksiyonlardan korunmada ve bunların ortadan kaldırılmasında rol oynadığı bilinmesi, CD8+ yanıtlarının önemini vurgulamış ve bu çalışmada antiviral sitokinlerin üretimi gibi KKKAV'ya özgü antiviral efektör yanıtların değerlendirilmesine yol açmıştır. Bu çalışma, hesaplamalı yöntemler kullanarak elde edilen verilerin farklı kombinasyonlarıyla, immünojenik olma potansiyeline sahip epitop tabanlı bir DNA tasarımları değerlendirilmiştir. Sitotoksik T hücresi epitopları, biyoinformatik sunucular kullanılarak KKKAV-NP için değerlendirildi. Biyoinformatik araçlar kullanılarak tahmin edilen epitoplar antijenite, toksisite, popülasyonda bulunma yüzdesi, korunmuşluk gibi çeşitli parametreler açısından değerlendirildikten sonra, 4 farklı aşı vektörü oluşturuldu ve in vitro ve in vivo analizlerle etkinlik testlerine tabi tutuldu. In vitro testlerde antijenleri ifadeleyen monosit kökenli THP-1 hücreleriyle, T lenfosit hücreleri olan Jurkat hücreleri birlikte kültüre edilmiş ve antijenlerin T hücre uyarımı kaynaklı sitokin üretimi değerlendirildi. Seçilen antijenleri ifadeleyen monosit kökenli THP-1 hücrelerinin T lenfosit Jurkat hücreleriyle birlikte kültürasyonu, TCR'nin THP-1 hücreleri tarafından sunulan MHC/antijen kompleksini tanıyarak T lenfositlerinin aktivasyonunu indükledi. In vivo testlerde iki farklı hayvan grubu kullanıldı. Serolojik yanıtın kontrolü amacıyla Balb/c fareler kullanılırken, hücresel bağışıklık parametrelerinin değerlendirilmesi amacıyla ise tip I interferon ifade etmeyen (IFN^{-/-}) transgenik fareler kullanıldı. İki farklı ELISA tekniği kullanılarak gerçekleştirilen ELISA testi (rekombinant NP proteini ve virüsle enfekte hücre lizati ile kaplanan ELISA tabletlerinde) ile IFNAR^{-/-} farelerde total IgG yanıtlarında negatif kontrole (backbone) kıyasla anlamlı bir artış görülmedi. Bu durumun gerek kullanılan hayvanın ırkından ve gerekse antijenik epitopların seçiminde T hücre reseptörlerine uyumlu olan motiflerin tercih edilmesiyle ilişkili olacağı sonucuna varıldı. IFN-I bloke hayvan modelinde (IFNAR^{-/-}) KKKAV-NP MHC-I epitoplarını içeren DNA bazlı aşılar kullanarak bu farelerde hücresel bağışıklığın rolü araştırıldı. Sentezlenen aşı formülasyonlarına karşı oluşan immün yanıtlar, fare aşılamalarının ardından ELISpot ve Th1 ve Th2 ilişkili sitokin yanıtları ile doğrulandı. Sonuç olarak; çalışmada öngörülen T hücre epitopları ile IFNAR^{-/-} farelerde hücresel bağışıklığın uyarıldığı ancak bu immünizasyonların koruyucu kapasitesinin araştırılması için daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu sonucuna varıldı.

2024, 156 sayfa

Anahtar kelimeler: Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi; Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü; Nükleoprotein; T hücre yanıtları; İmmünoinformatik analizler.

ABSTRACT

PhD Thesis

Evaluation Vaccine Design and Efficacy Against Crimean-Congo Hemorrhagic Fever (CCHF) with Immunoinformatic Approaches

Sümeyye Altunok

Ankara University, Biotechnology Institute

Prof. Aykut Özkul, Dr. Mutlu Erdoğan

Crimean-Congo Hemorrhagic Fever (CCHF) has been included in the World Health Organization's list of priority diseases due to its widespread geographical distribution and severity. Preclinical vaccine development efforts for CCHF virus (CCHFV) have targeted multiple antigens using different platforms, but the role of cellular immunity in protection is missing. Furthermore, the levels of neutralizing antibodies in vaccinated animal models do not directly correlate with absolute protection; this, coupled with the known role of T lymphocyte responses in protection from and elimination of viral infections, has highlighted the importance of CD8⁺ responses and led to the evaluation of CCHF-specific antiviral effector responses such as the production of antiviral cytokines in this study. This study evaluated epitope-based DNA designs with the potential to be immunogenic, with different combinations of the data obtained using computational methods. Cytotoxic T cell epitopes were evaluated for KKKAV-NP using bioinformatics servers. After the epitopes predicted using bioinformatics tools were evaluated in terms of various parameters such as antigenicity, toxicity, percentage of presence in the population, conservation, 4 different vaccine vectors were created and subjected to efficacy tests with in vitro and in vivo assays. In in vitro tests, monocyte-derived THP-1 cells expressing antigens and Jurkat cells, which are T lymphocyte cells, were co-cultured and cytokine production caused by T cell stimulation of antigens was evaluated. Co-cultivation of monocyte-derived THP-1 cells expressing selected antigens with Jurkat cells induced activation of T lymphocytes by TCR recognition of the MHC/antigen complex presented by THP-1 cells. Two different animal groups were used in in vivo tests. Balb/c mice were used to control serologic response, while transgenic mice that do not express type I interferon (IFN^{-/-}) were used to evaluate cellular immune response parameters. The ELISA test using two different ELISA techniques (ELISA tablets coated with recombinant NP protein and virus-infected cell lysate) showed no significant increase in total IgG responses in IFNAR^{-/-} mice compared to the negative control (backbone). It was concluded that this may be related to both the breed of animal used and the choice of antigenic epitopes that are compatible with T cell receptors. We investigated the role of cellular immunity in IFN-I blocked animal model (IFNAR^{-/-}) mice by using DNA-based vaccines containing CCHFV-NP MHC-I epitopes. Immune responses to the synthesized vaccine formulations were confirmed by ELISpot and Th1 and Th2-associated cytokine responses following mouse vaccinations. As a result, it was concluded that cellular immunity was stimulated in IFNAR^{-/-} mice with the T cell epitopes predicted in the study, but further studies are needed to investigate the protective capacity of these immunizations.

2024, 156 pages

Keywords: Crimean Congo Hemorrhagic Fever; Crimean Congo Hemorrhagic Fever Virus; Nucleoprotein; T cell responses; Immunoinformatic analysis.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması 121S289 nolu 1002 projesi kapsamında TÜBİTAK, TDK-2022-2308 nolu BAP öncelikli alan doktora tez projesi kapsamında Ankara Üniversitesi BAP birimi tarafından desteklenmiştir.

100/2000 YÖK ‘Aşı Çalışmaları’ konu başlığı altında 4 yıl boyunca YÖK tarafından burs ile desteklenmiş bulunmaktayım.

Bu kurumlara katkılarından dolayı teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1. KIRIM-KONGO KANAMALI ATEŞİ (KKKA)	3
2.1.1. EPİDEMİYOLOJİSİ	3
2.1.2. TEDAVİSİ.....	4
2.1.3. KIRIM-KONGO KANAMALI ATEŞİ VİRÜSÜ (KKKAV).....	5
2.1.4. AŞI HEDEFİ OLARAK NÜKLEOPROTEİNLER	6
2.1.5. AŞI HEDEFİ OLARAK GLİKOPROTEİNLER	7
2.1.6. PATOGENEZ.....	7
2.1.7. KKKA'YA KARŞI GELİŞEN İMMÜN YANIT	10
2.1.7.1. İnterferonların (IFN) Uyarılması ve anti-KKKAV Aktivitesi.....	12
2.1.7.2. Sitokin Değişimleri.....	13
2.2. KKKA İÇİN HAYVAN MODELLERİ.....	15
2.3. VİRAL HASTALIKLARA KARŞI DNA AŞILAMASI.....	16
2.4. VİRAL HASTALIKLARDA DEFENSİNLER	20
3. GEREKÇE VE AMAÇ	22
4. MATERYAL VE YÖNTEM	25
4.1. MATERYAL.....	25

4.1.1. IN SILICO ARAÇLAR	25
4.1.2. HÜCRELER	26
4.1.3. DENEY HAYVANLARI	26
4.1.4. BESİYERİ HAZIRLAMA	26
4.1.5. KOMPETAN BAKTERİ HAZIRLAMA.....	27
4.1.6. SLICE (SEAMLESS LIGATION CLONING EXTRACT) KLONLAMA LİZATININ HAZIRLANMASI.....	27
4.1.7. HOMEMADE GİBSON MASTER MİX HAZIRLAMA.....	28
4.2. YÖNTEM	29
4.2.1. PRİMER TASARIMI	29
4.2.2. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU	31
4.2.3. KLONLAMA VE TRANSFORMASYON.....	31
4.2.4. SPİN-KOLON BAZLI PLAZMİT DNA İZOLASYON YÖNTEMLERİ	32
4.2.5. HÜCRE KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI	32
4.2.5.1. Transfeksiyon	32
4.2.5.2. Ni-Rezin Aracılı Protein Saflaştırma.....	33
4.2.5.3. Bradford Testi ile Total Protein Miktar Tayini	33
4.2.5.3.1. Proteinlerin SDS-PAGE ile Ayrılması.....	34
4.2.5.3.2. Proteinlerin PVDF Membrana Transferi	34
4.2.5.3.3. Bloklama	34
4.2.5.3.4. Primer Antikor ile İşaretleme.....	34
4.2.5.3.5. Sekonder Antikor ile İşaretleme ve Görüntüleme	35
4.2.5.3.6. Coomassie Blue Boyaması	35
4.3. IFNAR^{-/-} ve BALB/C FARELERDE İMMÜNİZASYON VE VİRÜS TEHDİDİ ÇALIŞMALARI	35
4.4. q-PCR İLE DOKULARDAKİ VİRÜS YÜKÜNÜN TESPİTİ	36
4.5. SİTOKİN ANALİZİ	37
4.5.1. IFN-GAMA ELISPOT	37
4.5.2. AKIŞ SİTOMETRİSİ	38
4.5.3. ENZİM BAĞLANTILI İMMÜNOSORBENT ANALİZİ (ELISA).....	38
5. ARAŞTIRMA BULGULARI	40

5.1. BİYOİNFORMATİK ANALİZLERLE AŞI VEKTÖRLERİNİN BELİRLENMESİ	40
5.1.1. SİTOTOKSİK T LENFOSİT (CTL) EPİTOP TAHMİNİ	86
5.2. T HÜCRE YANITLARININ IN VITRO DEĞERLENDİRİLMESİ	87
5.2.1. Transfeksiyon ve Transdüksiyon	87
5.2.2. SDS-PAGE VE WESTERN BLOTLAMA	96
5.2.2.1. Nükleoprotein Saflaştırması	96
5.3. SEROLOJİK ANALİZLER	99
5.3.1. IFNAR ^{-/-} VE BALB/C farelerde antikor yanıtları	99
5.3.2. KKKAV'YE SPESİFİK T HÜCRE YANITLARI	100
5.4. AŞILANMIŞ VE VİRÜSLE TEHDİT EDİLMİŞ HAYVANLARDA VİRAL RNA TESPİTİ	102
5.5. VİRÜS TEHDİDİ ÇALIŞMALARI	103
6. TARTIŞMA	105
KAYNAKLAR	111
EKLER	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Ek1: Etik Kurul Kararı	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi'nin (KKKA) dünya üzerindeki dağılımı.	4
Şekil 2.2. KKKAV taksonomisi.	5
Şekil 2.3. KKKAV'nin genom yapısı.....	5
Şekil 2.4. KKKAV'nin yapısı.	6
Şekil 2.5. KKKAV'nin konak hücreye girişi, çoğalması ve yeni virionların oluşması.	9
Şekil 2.6. KKKA'nın patogenezi. Endotel, KKKAV'nin ana hedefidir ve doğrudan virüs tarafından ve/veya dolaylı olarak virüsün neden olduğu çözünür araçlar tarafından aktive edilebilir. Endotel hücrelerinin aktivasyonu, enflamatuar reaksiyonların başlaması, vasküler geçirgenliğin artması ve intrinsik pıhtılaşma kademesinin aktivasyonu için önemlidir.	10
Şekil 2.7. Patojen enfeksiyonları sonrasında başlatılan sitokin kaskadı.....	14
Şekil 4.1. THP-1 hücrelerinde ifade ettirilecek gen kasetleri. a) Antijenik epitoplari ifadeleyecek kaset. b) Negatif kontrol gen kaseti. c) Pozitif kontrol gen kaseti. CMV : memeli promotörü; p2A : p2A dizisi; hBD3_{Adj} : human β -3 defensin peptit adjuvan; L : AAY linker; NP_{Ag} : antijenik epitop; STOP : translasyon sonlanma sinyali; süper-agonist MTSAIGILPV peptidi.....	32
Şekil 5.1. Peptide 2.0 için amino asitlerin hidrofobisite değerleri (https://www.peptide2.com/N_peptide_hydrophobicity_hydrophilicity.php).	82
Şekil 5.2. E1'in THP-1 hücrelerine PEI aracılı transfeksiyonlarının 24 saat sonra floresan ışığa görüntüleri. A. 1:1, B. 1:1,25, C. 1:1,5, D. 1:1,75, E. 1:2, F. 1:2,5 DNA:PEI oranları, DNA konsantrasyonu 500 ng.	87
Şekil 5.3. E2'nin THP-1 hücrelerine PEI aracılı transfeksiyonlarının 24 saat sonra floresan ışığa görüntüleri. A. 1:1, B. 1:1,25, C. 1:1,5, D. 1:1,75, E. 1:2, F. 1:2,5 DNA:PEI oranları, DNA konsantrasyonu 500 ng.	88

Şekil 5.4. E3'ün THP-1 hücrelerine PEI aracılı transfeksiyonlarının 24 saat sonra floresan ışığa görüntüleri. A. 1:1, B. 1:1,25, C. 1:1,5, D. 1:1,75, E. 1:2, F. 1:2,5 DNA:PEI oranları, DNA konsantrasyonu 500 ng.	88
Şekil 5.5. E4'ün THP-1 hücrelerine PEI aracılı transfeksiyonlarının 24 saat sonra floresan ışığa görüntüleri. A. 1:1, B. 1:1,25, C. 1:1,5, D. 1:1,75, E. 1:2, F. 1:2,5 DNA:PEI oranları, DNA konsantrasyonu 500 ng.	88
Şekil 5.6. MTSAI'nın THP-1 hücrelerine PEI aracılı transfeksiyonlarının 24 saat sonra floresan ışığa görüntüleri. A. 1:1, B. 1:1,25, C. 1:1,5, D. 1:1,75, E. 1:2, F. 1:2,5 DNA:PEI oranları, DNA konsantrasyonu 500 ng.	89
Şekil 5.7. NP'nin THP-1 hücrelerine PEI aracılı transfeksiyonlarının 24 saat sonra floresan ışığa görüntüleri. A. 1:1, B. 1:1,25, C. 1:1,5, D. 1:1,75, E. 1:2, F. 1:2,5 DNA:PEI oranları, DNA konsantrasyonu 500 ng.	89
Şekil 5.8. Klonlanan vektörlerin HEKtrex hücrelerine transfeksiyonun 24 saat sonrasındaki floresan ışığa görüntüsü (10x); A. E1, B. E2, C. E3, D. E4, E. M1, F. MTSAI, G. NP, H. Negatif kontrol (HEKtrex hücreleri).	90
Şekil 5.9. Lentiviral vektörlerle PEI aracılı HEKtrex hücrelerinin transfeksiyonu. Sekans sonucu pozitif çıkan kolonilerin virüs üretiminden önce floresan ışıkları kontrol edilmiştir. A. E1, B. E2, C-D. E3, E-F. E4, G-H. M1, I-J. MTSAI, K-L. NP.....	91
Şekil 5.10. Thermo Scientific Neon transfeksiyon sistemiyle Şekil 4.1.'deki vektörün farklı parametrelerle transfeksiyonunun optimizasyon denemesi. A. 1200 V, 20 msec, 2 pulses; B. 1300 V, 20 msec, 2 pulses; C. 1400 V, 20 msec, 2 pulses; D. 1500 V, 20 msec, 2 pulses; E. 1600 V, 20 msec, 2 pulses; F. 2000 V, 10 msec, 3 pulses; G. 1600 V, 10msec, 3 pulses; H. 2500V, 10 msec, 3 pulses; I. 1600 V, 10 msec, 4 pulses; J. 1600 V, 20 msec, 4 pulses.....	92
Şekil 5.11. PMA ve ionomycinin T hücre uyarımının optimizasyonu. A. 4 saat PMA ile uyarım, B. ionomycin ile, C. PMA+ion ile; D. 6 saat PMA ile uyarım, E. ionomycin ile, F. PMA+ion ile; G. 8 saat PMA ile uyarım, H. ionomycin ile, I. PMA+ion ile, J. Negatif kontrol (sadece Jurkat hücreleri, uyarılma yok).....	93

Şekil 5.12. Ionomycin optimizasyonu. M1 A-B direct, C-D direct-ion, E-F spin, G-H spin-ion; MTSAl I-J direct, K-L direct-ion, M-N spin, O-P spin-ion; NP R-S direct, Ş-T direct-ion, U-V spin, Y-Z spin-ion; Negatif Kontrol NC1, NC2.....	94
Şekil 5.13. HEKtrex hücrelerinin antijen sunup sunmadığının kontrolü için ilgili plazmitlerle transfeksiyonu ve Jurkat hücreleriyle birlikte kültürasyonu. A-B M1; C-D NP; E, MTSAl; M1 Jurkat; G, negatif kontrol (Jurkat hücreleri 100 ng/ml PMA ile uyarım).	94
Şekil 5.14. Murin peritoneal makrofaj hücreleri ve Raw 264.7 hücrelerinin Lipofectamine300 aracılı transfeksiyonu (M1 plazmitiyle, Şekil 4.1.). A-B, Murin peritoneal makrofaj hücreleri, C-D, Raw 264.7 hücreleri.....	95
Şekil 5.15. Jurkat ve THP-1 hücrelerinin flow sitometri analizleri. a. THP-1+PMA, b. THP-1, c. uyarılmamış NF-Jurkat, d. 25 ng PMA ile uyarılmış NF-Jurkat, e. Grup 1 (peptit 1), f. Grup 2 (peptit 2), g. Grup 3 (peptit 3), h. Grup 4 (peptit 4), i. Grup 5 (MTSAILGILPV), j. Grup7 (boş vektör), k. Grup6 (tam uzunluklu NP). Analiz 2 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.	96
Şekil 5.16. 6X Histag CCHFV-NP'nin saflaştırıldıktan sonra SDS-PAGE görüntüsü. 1, total protein; 2, birinci yıkama elüatı; 3, ikinci yıkama elüatı; 4, üçüncü yıkama elüatı ve 5, elüe protein. Protein ladder, Prime-Step™ Prestained Broad Range Protein Ladder Katolog No. 773302.	97
Şekil 5.17. KKKAV-NP'nin immün blotlaması. 1, total protein; 2, kolondan geçirilen total protein; 3, birinci yıkama elüatı; ikinci yıkama elüatı; 4, üçüncü yıkama elüatı ve 5, elüe protein. Farede nükleoproteine karşı üretilen monoklonal antikor kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Protein ladder, Prime-Step™ Prestained Broad Range Protein Ladder Katolog No. 773302.	98
Şekil 5.18. Rekombinant NP'nin antijen olarak kullanıldığı ELISA sonuçları (IFNAR ^{-/-} farelerde). G1-4, peptit grupları; G5-MTSAILGILPV peptidi; G6, tam uzunluklu nükleoprotein; G7-antijen içermeyen vektör; G8-antijen/peptide aşılınmamış grup.	99

Şekil 5.19. Enfekte hücre lizatıyla ELISA sonuçları (Balb/c farelerde). G1-4, peptit grupları; G5-MTSAILGILPV peptidi; G6, tam uzunluklu nükleoprotein; G7-antijen içermeyen vektör; G8-antijen/peptitle aşılanmamış grup.	100
Şekil 5.20. Bağışıklanmış Balb/c farelerinin serum örneklerindeki sitokin yanıtları. A. IFN- γ ; B, TNF- α ; C, IL-6; D, IL-2.....	101
Şekil 5.21. Antijen kaynaklı T lenfositlerin uyarımı sonucunda indüklenen IFN- γ yanıtları. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$	101
Şekil 5.22. <i>In vitro</i> ELISPOT IFN- γ	102
Şekil 5.23. Aşılama sonrası virüsle tehdit edilen hayvanların karaciğer ve dalak dokularındaki RT-qPCR ile tespit edilen KKKAV-S segmenti RNA seviyeleri. İstatiksel analiz G8'e (negatif grup) göre yapılmıştır. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$	103
Şekil 5.24. Virüs tehdidi çalışması.	104

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Kullanılan çevrimiçi biyoinformatik araçlar.	25
Çizelge 4.2. 5x isothermal reaction buffer bileşenleri.	28
Çizelge 4.3. 1.33x assembly master miks bileşenleri.	28
Çizelge 4.4. Çalışmada kullanılan primer çiftleri.	30
Çizelge 4.5. SLiCE reaksiyonu bileşenleri ve şartları.	31
Çizelge 4.6. Klonlama reaksiyonu bileşenleri ve şartları.	31
Çizelge 5.1. KKKAV-NP karşı bağlanma afinitesi olan MHC-I epitoplarının NetMHC 4.0 veri tabanı aracılı tahmini.	40
Çizelge 5.2. KKKAV-NP karşı bağlanma afinitesi olan MHC-I epitoplarının Rankpep veri tabanı aracılı tahmini.	66
Çizelge 5.3. Tahmini MHC-I peptitlerinin VaxiJen ile çevrimiçi gerçekleştirilen antijenite skorları (Ağustos 2020).	75
Çizelge 5.4. Tahmini MHC-I peptitlerinin Predicted Antigenic Peptides çevrimiçi aracılı antijenite skorları (2020).	77
Çizelge 5.5. Tahmini MHC-I peptitlerinin ile çevrimiçi araçlarla yapılan alerjenite skorları.	77
Çizelge 5.6. Seçilen peptitlerin hidrofobisite skorları.	80
Çizelge 5.7. Seçilen peptitlerin toksisite değerleri.	83
Çizelge 5.8. İlgili peptitlerin popülasyonda korunmuşluk analizleri (IEDB). Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	
Çizelge 5.9. T hücre yanıtları için değerlendirilecek peptit grupları.	87

SİMGELER DİZİNİ

KKKA	Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi
KKKAV	Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü
ECDC	Avrupa Hastalık Kontrol Merkezi
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
EMA	Avrupa İlaç Ajansı
ICTV	Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi
NIAID	Ulusal Alerji ve Bulaşıcı Hastalıklar Enstitüsü
IEDB	İmmün Epitop Veri Tabanı
IC ₅₀	Yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu
NP	Nükleoprotein
GP	Glikoprotein
Gn-Gc	Olgun glikoproteinler
HIV	İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium (Dulbecco'nun modifiye eagle ortamı)
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
PBS	Fosfat buffer salin
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
mAb	Monoklonal antikor
RNP	Ribonükleoprotein
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
STAT1-2	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 1-2

IFN	İnterferon
NK	Doğal öldürücü hücre
PAMP	Patojen ilişkili moleküler patern
DAMP	Hasara bağlı moleküler patern
PRR	Patern tanıma reseptörü
TNF- α	Tümör Nekrozis Faktör- α
IL	İnterlökin
IFNAR ^{-/-}	Tip 1 interferon reseptörü A'dan yoksun
MHC	Majör histokompatibilite kompleksi
HLA	İnsan lökosit antijeni
IS	Bağıışıklığı baskılanmış
PEI	Polietilenimin
SLICE	Seamless Ligation Cloning Extract (Kesintisiz Ligasyon Klonlama ekstraktı)
ELISA	Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Testi
qPCR	Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin
OD	Optimal yoğunluk
HBD	İnsan beta defensin
NF-kB	Aktive edilmiş B hücrelerinin nükleer faktör kappa-hafif zincir arttırıcısı
SOB	Süper Optimal Broth
LB Broth	Luria-Bertoni Broth

1. “”GİRİŞ

Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA), Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü’nün (KKKAV) neden olduğu kene kaynaklı bir hastalıktır. Hastalığın birincil taşıyıcıları olan *Hyalomma* cinsi kenelerin dağılımıyla ilişkili olarak hastalık, Afrika, Avrupa, Asya ve Balkanlar gibi oldukça geniş bir coğrafyada gözlenmektedir. İklim değişiklikleri nedeniyle, hastalığın ana vektörü olan kenelerin, konakçı hayvanların ve insanların hareketi gibi bazı faktörlerin hastalığın yayılımını hızlandırarak virüsün endemik olmayan bölgelere de yayılmasına neden olacağı öngörülmektedir (1–3). Bu duruma yönelik olarak Avrupa Hastalık Kontrol Merkezi (ECDC) tarafından KKKAV’ye karşı bir Hızlı Risk Değerlendirmesi (Rapid Risk Assessment) yapılmış ve hastalığın çok yakından izlenmesi gerektiği rapor edilmiştir (4). %40’a varan ölüm oranına rağmen kendisine karşı mevcut önleyici veya tedavi edici herhangi bir onaylanmış aracın bulunmaması nedeniyle hastalık hala önemini korumaktadır ve bu sebeple, Dünya Sağlık Örgütü’nün (WHO) Öncelikli Hastalıklar listesinde Yeni Koronavirüs Hastalığı’ndan sonra ikinci sıraya yerleştirilmiştir (5). Buna ek olarak, KKKA vaka sayılarında ve ölüm oranlarında, günümüzde hızla devam eden bir artma eğiliminin olduğu tespit edilmiştir (6). Ayrıca, son birkaç yılda Avrupa Birliği ülkelerinden İspanya ve Yunanistan’ın da dahil olduğu dünyanın çeşitli yerlerinde uzun bir süre sonra hastalık sessizliğini bozmuştur (7). Afrika, Asya, Orta Doğu ve Doğu Avrupa’da otuzdan fazla ülkede endemik olan KKKA’nın en çok rapor edildiği ülke ise Türkiye’dir (8).

KKKAV üç segmentli (S, M ve L) negatif-iplikçikli RNA genomuna sahiptir. S segmenti viral nükleokapsidi, M segmenti zarf glikoproteinini (Gn ve Gc) ve L segmenti ise RNA-bağımlı RNA polimerazı kodlamaktadır. Yapılan karşılaştırmalı genomik analizler, nötralize edici antikorların genellikle ana hedefi olan M segmentinin, S ve L segmentleriyle karşılaştırıldığında, suşlar arası yüksek nükleotid ve aminoasit varyasyonuna sahip olduğunu göstermektedir. Geleneksel aşı çalışmaları çoğunlukla, enfeksiyona karşı koymak üzere B hücreleri yoluyla oluşturulan antikorların antijene yanıt vermesi ilkesine odaklanmaktadır. Aşıyla indüklenen bu tarz bir korumanın birincil bağlantısı, nötralize edici antikorların varlığıdır ve viral enfeksiyonlara karşı geliştirilen aşılardan birçoğu bu nötralize edici antikorların indüksiyonuna odaklanmıştır (9). Bununla birlikte bazı virüslere karşı “B hücresi aşısı” denemeleri tümünden başarısız olmuş veya bir dizi kronik viral enfeksiyonda gözlemlendiği gibi uzun vadeli etkinlik ve koruma sağlamada etkisiz kalmıştır. Bu kapsamda

Hepatit C Virüsü, Influenza ve İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü (HIV) gibi virüslerin fare, primat ve insan araştırmaları, antiviral aşılarda bazılarının B hücre ve antikor yanıtlarından ziyade, güçlü T hücre yanıtları aracılığıyla etkinlik sağladığını göstermektedir. Bu bağlamda son yıllarda T hücre yanıtlarını hedefleyen aşılarda geliştirilmesine yönelik çalışmalar artış göstermektedir (10–12). Ancak KKKAV virüsüne karşı bugüne kadar yapılmış herhangi bir T hücresi aşısı denemesi bulunmamakla birlikte, T hücre yanıtlarının bu hastalığa karşı korumadaki rolü gösterilmiştir (13). Buna ek olarak, T hücrelerinin KKKAV'ye ve onun potansiyel antijenik fragmanlarına karşı verdiği immün yanıtlar da bugüne kadar *in vitro* veya *in vivo* analizlerle gösterilmemiştir (14).

Günümüzde KKKAV'ye karşı klinik olarak onaylanmış herhangi bir aşı bulunmamaktadır. Bugüne kadar, farklı yaklaşımlar kullanan araştırmalar sonucunda birkaç aşı adayı ortaya çıksa da bu adayların etkinlikleri ve farklı virüs suşlarına karşı geçerlilikleri test edilmemiştir. Fakat yapılan araştırmalar, nükleoprotein temelli antijenlerin çoğunlukla T hücresi yanıtları üretirken, glikoprotein temelindeki antijenlerin immünoglobulin yanıtlarını tetiklediğini göstermektedir (10–13,15). Buna karşın, KKKAV aşılması amacıyla kullanılabilecek en etkili antijenik yapıların neler olduğu ve bunların korumadaki potansiyel etkinlikleri henüz netleşmemiştir. Bu noktada son yıllarda biyoinformatik hesaplamaların deneysel aşı araştırmalarına entegre edilmesiyle ortaya çıkan immünoinformatik yaklaşımların, antijenik bölgelerin tanımlanması ve potansiyel epitopların test edilmesini hızlandıracağı beklenmektedir (16). Ancak KKKAV'ye yönelik immünoinformatik analizleri içeren az sayıda araştırma vardır ve bu araştırmalar bilgisayar tabanlı başlamış olup deneysel bir çalışma içerenlerin sayısı sınırlıdır (17).

Aşı geliştirmede hesaplamalı yöntemler, hızlı, güvenilir ve etkili bir yaklaşımdır. Böylelikle, yüksek antijenite gösteren B ve T hücre epitoplarının tahminiyle onları birer aşı adayı haline getirir. Yüksek ölüm oranına rağmen KKKAV'ye yönelik hiçbir antiviral ilaç veya aşı onaylanmamıştır. Bu çalışma, KKKAV enfeksiyonlarına karşı koruyucu humoral ve hücresel bağışıklık tepkisi ortaya çıkarabilecek epitop aşı tasarlamak için *in silico* araçlarını kullanmayı ve bu adayları *in vitro* ve *in vivo* olarak değerlendirmeyi amaçlamaktadır.

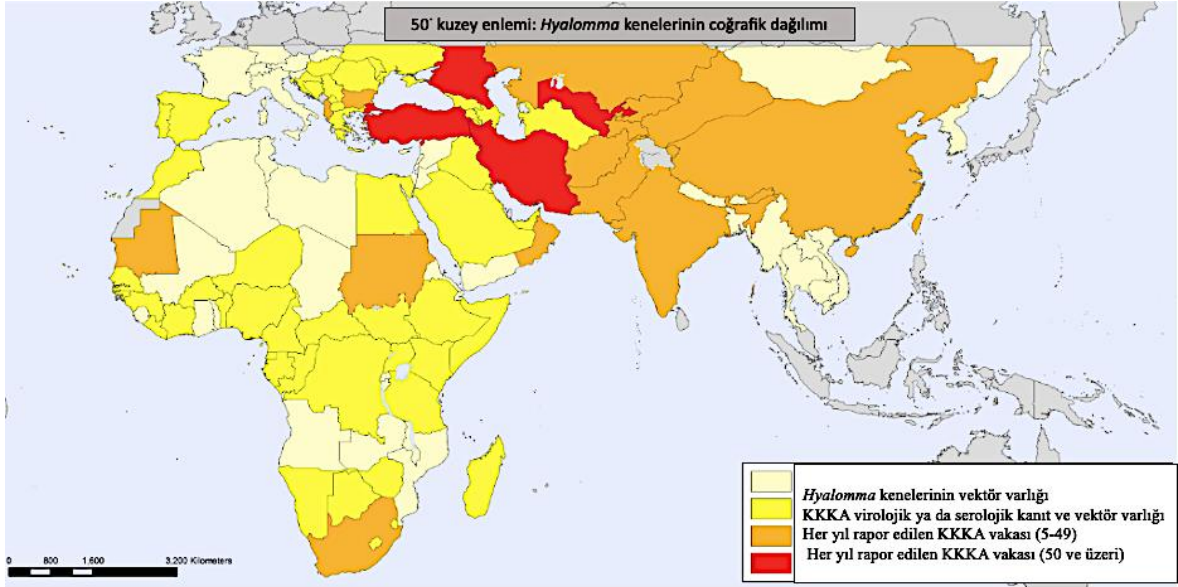
2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. KIRIM-KONGO KANAMALI ATEŞİ (KKKA)

2.1.1. EPİDEMİYOLOJİSİ

KKKA, halen dünya üzerinde kırka yakın ülkede endemik, akut ve ölümcül bir insan enfeksiyonu olması nedeniyle önemli bir sağlık tehdidi olan, kene kaynaklı viral zoonotik bir hastalıktır (18). Hastalığın ilk kanıtları 12.yy'a kadar dayansa da hastalık 1944 yılında Kırım'da karakterize edilmiş ve 'Kırım Kanamalı Ateşi' adını almıştır. Bunu takiben, sonraki birkaç on yıl boyunca Eski Sovyetler Birliği ve Bulgaristan'dan birkaç vaka bildirilmiştir. Daha sonra, 1969'da Kongo'da da aynı etmenin hastalık nedeni olduğunun anlaşılmasıyla hastalık bugünkü adını almıştır (19). 2000'lerin başında, Yunanistan, Hindistan, bazı Balkan ülkeleri, Pakistan (20,21), Türkiye (22), İspanya, Uganda, Gürcistan ve İran (23,24), gibi birçok ülkede epidemiler rapor edilmiştir. Ardından, Afrika'nın bazı bölgelerinden (19) ve bazı Orta Doğu ülkelerinden, Birleşik Arap Emirlikleri ve Suudi Arabistan (25), Rusya (26), Afrika (24), ve Umman'dan vakalar bildirilmeye devam edilmiştir. Bildirilen bu vakalarla, dünya çapında bu enfeksiyon 'yeniden ortaya çıkan bir enfeksiyon' olarak kabul edilmektedir. Kene kaynaklı hastalıkların en bilinenidir ve hastalığın ortaya çıktığı 2002'den sonra Türkiye'de on binden fazla vaka bildirilmiştir (27–30). Dünya üzerinde endemik ya da potansiyel ülkelere her yıl önemli sayıda vaka bildirilmektedir.

Hastalık virüsün konakçısı olan evcil ve yabani enfekte hayvanlarda genellikle asemptomatik olup, insanlarda ölümcüldür. Kene hastalığının bulaşmasında önemli bir vektör olmasına rağmen, virüsü içeren kan ve vücut sıvılarına maruziyet yoluyla insandan insana bulaşma nedeniyle ikincil vakalar da sıklıkla görülmektedir. Bu nadir görülen bulaşma, en çok hastane ortamlarında sağlık çalışanları arasında meydana gelmektedir ve bu nedenle önemli bir tehlike oluşturmaktadır (31). Birçok kene türü KKKAV ile ilişkilendirilse de, *Hyalomma* cinsinin üyeleri birincil vektörler olarak kabul edilmiştir ve virüsü insanlara taşıdığı bilinen en yaygın kenelerdir (32). Bu keneler kurak veya yarı kurak ortamlara adapte olmakta ve geniş coğrafi alanlarda yaşamlarını sürdürebilmektedirler. Ayrıca, parçalanmış ormanlık araziler, hayvanlarla yakın temas halinde çalışan çiftçiler, hayvanların bakımından sorumlu işçiler ve hatta iklim değişiklikleri ile KKKA insidansı arasında güçlü korelasyonlar bulunmuştur (6,33,34).



Şekil 2.1. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi'nin (KKKA) dünya üzerindeki dağılımı.

2.1.2. TEDAVİSİ

KKKA tedavisi öncelikle destekleyicidir. Destekleyici bu tedavi, bakım, sıvı dengesi ve elektrolit anormalliklerinin düzeltilmesi, oksijenasyon ve hemodinamik destek ve ikincil enfeksiyonların uygun tedavisini içermektedir. Virüs, *in vitro* antiviral ilaç olan ribavirine karşı duyarlıdır.

Ribavirin, bazı RNA ve DNA virüslerine karşı aktivite gösteren sentetik bir nükleosit analogudur. Hücre kültüründe veya hayvan modellerinde aktivitesi gösterilse de (35) çalışmaların birçoğunun gözleme dayalı olması, kontrol grubu içermemesi ya da randomize gruplardan oluşmaması gibi nedenlerle tedavideki etkinliği hala tartışmalıdır (36,37). WHO, KKKA için potansiyel bir terapötik ilaç olarak ribavirin kullanımını önerse de (38), Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) veya Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından kullanımı onaylanmamıştır. Ribavirinin *in vitro* viral aktiviteyi inhibe ettiği ve *in vivo* ölüm oranlarını azalttığı, organlarda gelişen patolojiyi önlediği fakat, viremiyi önleyemediği gösterilmiştir (36,39). KKKA'nın özellikle Türkiye'de ortaya çıkmasından bu yana ribavirin tedavisini değerlendiren birçok çalışma vardır, ancak bunların çoğu retrospektiftir. Dolayısıyla, bu çalışmaların çoğu, sonuç olarak birçok faktörden etkilenmiştir (40). Yapılan meta-analizlerle, kan ve kan ürünü ihtiyacı, ortalama hastanede kalış süresi ve ölüm oranları değerlendirildiğinde, ribavirin ile tedavi edilen hastalar ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark olmadığı gösterilmiştir (41,42) Bu çalışmalar ribavirinin KKKA tedavisinde

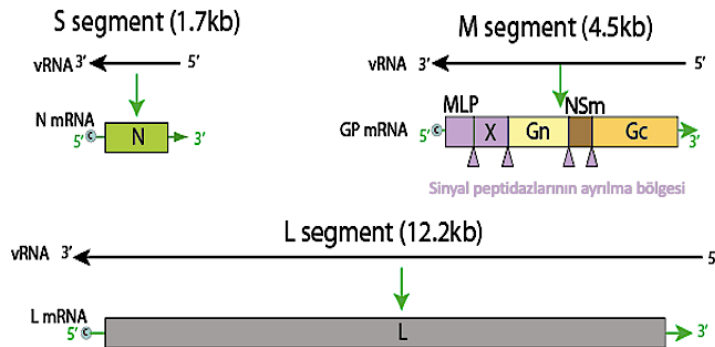
yararının bilinmediği sonucuna vararak, randomize olmayan gözlem çalışmalarının yanlışlık riski vurgulanmıştır (36). Aslında ribavirin, iğne batmasıyla yaralanma gibi yüksek riskli durumlarda sağlık çalışanları için maruziyet sonrası profilakside daha belirgin bir role sahiptir (43,44). Ribavirin tedavisine alternatif olarak favipiravirin kullanımı, ribavirine kıyasla daha iyi bir antiviral ilaç olabileceğini ortaya koysa da (45), insanlarda henüz test edilmemiştir.

2.1.3. KIRIM-KONGO KANAMALI ATEŞİ VİRÜSÜ (KKKAV)

KKKAV 2019 yılında, Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi (ICTV) tarafından *Bunyavirales* takımının *Orthonairovirus* cinsinin *Nairoviridae* ailesi içinde yeniden sınıflandırılmıştır (Şekil 2.2.).

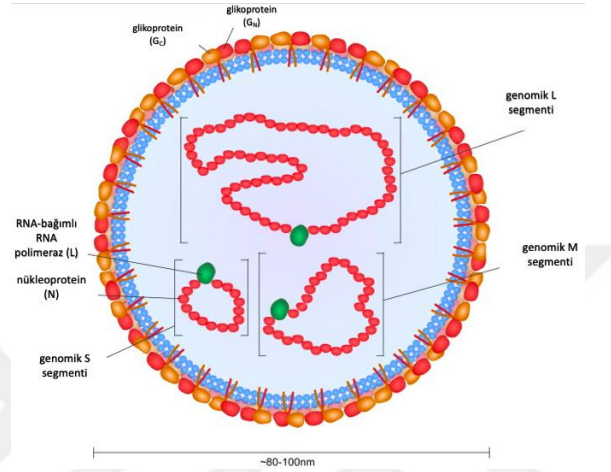
– Realm: <i>Riboviria</i>	2 kingdoms, 2 families, 4 genera
– Kingdom: <i>Orthornavirae</i> Realm: <i>Riboviria</i>	5 phyla, 2 families, 1 genus
+ Phylum: <i>Duplomaviricota</i> Kingdom: <i>Orthornavirae</i>	3 classes
+ Phylum: <i>Kitrinoviricota</i> Kingdom: <i>Orthornavirae</i>	4 classes
+ Phylum: <i>Lenarviricota</i> Kingdom: <i>Orthornavirae</i>	4 classes
– Phylum: <i>Negamaviricota</i> Kingdom: <i>Orthornavirae</i>	2 subphyla
+ Subphylum: <i>Haploviricota</i> Phylum: <i>Negamaviricota</i>	4 classes
– Subphylum: <i>Polyploviricota</i> Phylum: <i>Negamaviricota</i>	2 classes
– Class: <i>Ellioviricetes</i> Subphylum: <i>Polyploviricota</i>	1 order
– Order: <i>Bunyavirales</i> Class: <i>Ellioviricetes</i>	12 families
+ Family: <i>Arenaviridae</i> Order: <i>Bunyavirales</i>	4 genera
+ Family: <i>Crulviridae</i> Order: <i>Bunyavirales</i>	1 genus
+ Family: <i>Fimoviridae</i> Order: <i>Bunyavirales</i>	1 genus
+ Family: <i>Hantaviridae</i> Order: <i>Bunyavirales</i>	4 subfamilies
+ Family: <i>Leishbuviridae</i> Order: <i>Bunyavirales</i>	1 genus
+ Family: <i>Mypoviridae</i> Order: <i>Bunyavirales</i>	1 genus
– Family: <i>Nairoviridae</i> Order: <i>Bunyavirales</i>	3 genera
– Genus: <i>Orthonairovirus</i> Family: <i>Nairoviridae</i>	15 species
Species: <i>Artashat orthonairovirus</i> Genus: <i>Orthonairovirus</i>	
Species: <i>Chim orthonairovirus</i> Genus: <i>Orthonairovirus</i>	
Species: <i>Crimson-Congo hemorrhagic fever orthonairovirus</i> Genus: <i>Orthonairovirus</i>	

Şekil 2.2. KKKAV taksonomisi.



Şekil 2.3. KKKAV'nin genom yapısı.

KKKAV, zarflı, negatif tek iplikçikli, yaklaşık 80-100 nm çapındaki bir RNA virüsüdür (Şekil 2.3.). Virüs genomu nükleoproteinini kodlayan **Small (S)**, viral glikoproteinleri kodlayan **Medium (M)** ve RNA-bağımlı RNA polimerazı kodlayan **Large (L)** segmentlerinden oluşmaktadır (Şekil 2.4.). KKKAV'nin ana vektörleri *Hyalomma* cinsi kenelerdir, bu nedenle virüsün coğrafi dağılımı da bu kenelere bağlı olarak değişebilmektedir (46,47).



Şekil 2.4. KKKAV'nin yapısı.

2.1.4. AŞI HEDEFİ OLARAK NÜKLEOPROTEİNLER

Nükleoprotein (NP), KKKAV'nin esas bileşenidir çünkü viral yaşam döngüsünde kritik rol oynar. NP'nin temel fonksiyonu, viral RNA'yı kapsidlemek ve ribonükleoprotein (RNP) kompleksini oluşturmaktır. Ribonükleoprotein kompleksi, virüsün temel birimi olup, viral replikasyon ve transkripsiyon için gereklidir. KKKAV NP'leri, konak hücre bileşenleriyle etkileşimle ilgili bir dizi önemli fonksiyonda yer almaktadır. Bu etkileşimler, viral RNP'lerin taşınmasını, konak bağışıklık sisteminden kaçılmasını ve apoptozun düzenlenmesini kolaylaştırabilmektedir (3,48). NP, yüksek immünojenitesi nedeniyle KKKA için umut verici bir aşı hedefidir (49). NP, hem B hem de T hücre epitoplara içermesi nedeniyle, hem humoral hem de hücrel bağışıklık yanıtlarını uyarabilme yeteneğine sahiptir (50). Farklı küresel bölgelerde var olan farklı suşları, aşı geliştirme çalışmaları için önemli faktörlerdir. KKKAV-NP'nin, virüsün çeşitli suşları arasında dikkate değer bir derecede korunma sergilemesi, NP'nin birden fazla virüs suşuna karşı koruma sağlayabileceğini göstermektedir (51,52).

2.1.5. AŞI HEDEFİ OLARAK GLİKOPROTEİNLER

KKKAV M segmenti, PreGn (140 kDa) ve PreGc (85 kDa) glikoprotein öncüllerini oluşturacak şekilde post-translasyonel işleme tabi bir poliprotein kodlamaktadır. Bu öncül glikoproteinler daha sonra olgun zarf glikoproteinleri, yapısal olmayan M proteinini, salgılanmış yapısal olmayan proteinleri (GP160, GP85 ve GP38) ve musin benzeri alanı üretecek şekilde işlenmektedir (5,6,53,54). Gn ve Gc glikoproteinleri, virüsün konak hücrelere bağlanması ve zarf füzyonu için esastır (55,56). KKKAV aşısı geliştirmek için en umut verici yaklaşımlarından biri, Gn ve Gc glikoproteinlerini antijen olarak kullanmaktır. Bu glikoproteinler virüsün yüzeyinde bulunur ve konak hücrelere viral girişi kolaylaştırmaktan sorumludur. Aynı zamanda KKKAV enfeksiyonu sırasında bağışıklık yanıtlarının temel hedefleri oldukları için aşı geliştirmek için ideal adaylardır. Önceki çalışmalar, KKKAV'deki Gc glikoproteinini hedef alan antikorların nötralizan özelliklere sahip olduğunu göstermektedir, ancak Gn'yi hedef alan antikorlar için nötralize edici bir etki gözlenmemiştir (53). Neonatal farelerin, nötralizan olan ve olmayan monoklonal antikorlarıyla (mAb) ölümcül KKKAV enfeksiyonundan korunabileceği gözlemlenmiştir, ancak bu bulgular, bu farelerin KKKA hastalık için tam ir model olmaması nedeniyle sınırlıdır, bu da sonuçları yorumlamayı zorlaştırmaktadır. Ancak, son bir çalışma, mürin mAb'ın yetişkin fareleri KKKAV enfeksiyonundan koruma etkinliğini incelemiştir. Bulgular, hedeflenen GP38 proteinine nötralizan olmayan antikorların yetişkin hayvanlarda ölümcül KKKAV enfeksiyonuna karşı koruma sağladığını göstermiştir (57). Çalışma, antikor tabanlı KKKAV karşı önlemlerinin potansiyelini vurgulamaktadır.

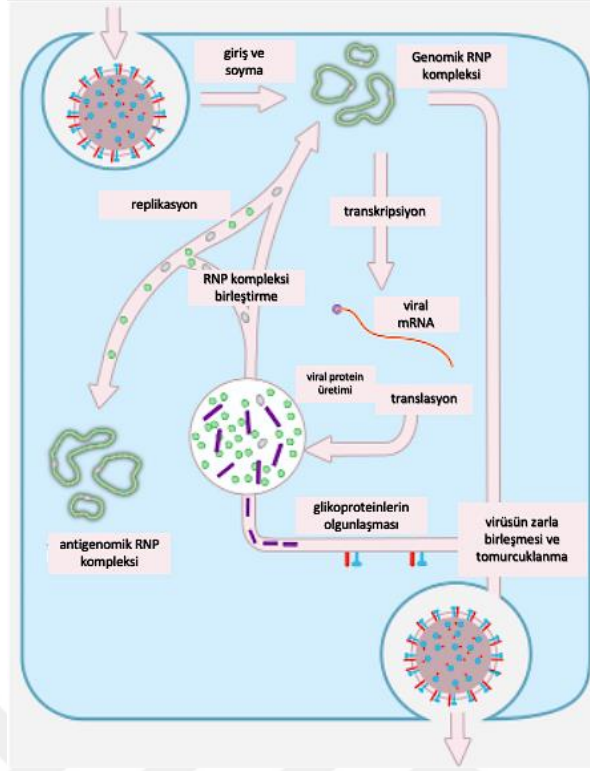
KKKAV-M segmentinin çeşitliliği, özellikle yapısal olmayan proteinlerini kodlayan bölgenin çeşitliliği, farklı suşlara karşı çapraz reaktiviteyi ve nihayetinde nötralizasyon yeteneğini etkileme şüphesiyle ilişkilendirilmiştir (58). Bu çeşitliliğin anlaşılması, aşıların, antiviral tedavilerin, virüsün evrimi ve patogenezinin bilinmeyenlerine ışık tutması açısından kritiktir. Bu çeşitliliğin altında yatan mekanizmaları tam olarak aydınlatmak için daha fazla çalışma gerekecektir.

2.1.6. PATOGENEZ

KKKAV enfeksiyonundan sonra hastalık geliştirdiği bilinen tek konakçı insandır. Enfeksiyon, ateş, bitkinlik, şiddetli kanamalar ve potansiyel olarak ölümle karakterize

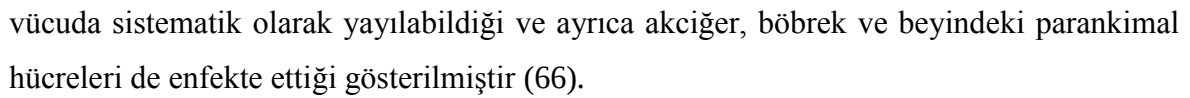
şiddetli hemorajik ateş KKKA ile sonuçlanabilir. Hastalığın ilerlemesi hızlıdır ve kuluçka, kanama öncesi, kanama ve iyileşme dönemi dört farklı döneme ayrılmaktadır. KKKA'nın patogenezi, enfeksiyonların sporadik olarak ortaya çıkması ve tam otopsi yapmak için tesislerin sınırlı olduğu alanlarda, en az biyogüvenlik seviyesi 3 laboratuvarlar gereksinimi ve bu laboratuvarların eksikliği, hayvan modelleri gibi çeşitli nedenlerden dolayı yetersiz şekilde karakterize edilmiştir.

KKKAV konakçı organizmaya deri, mukoza veya solunum yoluyla girebilir (59). Virüsün hücre içine girişi, replikasyonu ve tomurcuklanarak hücre dışına çıkışı kısaca Şekil 2.5.'te özetlenmiştir. Virüsün hücre yüzeyine ilk bağlanmasına olgun glikoproteinler aracılık ederken, bu proteinlerin viral bağlanma, içselleştirme ve füzyondaki rolleri tam olarak bilinmemektedir. Gc'yi hedefleyen mAb'lar memeli hücrelerinin KKKAV enfeksiyonunu nötralize edebildiğinden, Gc'nin hücre reseptörlere bağlanmaktan sorumlu olduğu düşünülmektedir (60). KKKAV girişi için gerekli hücre reseptörleri tanımlanmamıştır. Gc'nin, nükleolin ile arasında fonksiyonel bir etkileşim olduğu öne sürülmüştür (61). Nükleolin, bazı virüsler için giriş faktörü olarak işlev görmektedir, örneğin HIV'in hücre içine girişini arttırdığı bilinmektedir (58). Hücre yüzeyine bağlandıktan sonra KKKAV, klatriin aracılı bir endositoz mekanizması yoluyla içselleştirilmektedir. KKKAV girişi ayrıca kolesterole ve düşük pH'a da bağlıdır (62,63). Endositozun ardından, KKKAV partikülleri, erken endozomlara ve ardından multiveziküler cisimciklere taşınmaktadır. Hücreye girişi ve füzyonu takiben, genomik RNP'ler sitozole salınmakta ve kapsüllenmiş viral RNA, viral mRNA'yı sentezlemektedir. Genomik RNP'lerin replikasyonu, başlıksız, negatif zincirli viral RNA ve pozitif anlamda tamamlayıcı RNA'nın replikasyonunu ve kapsüllenmesini içeren bir süreçtir. RNP replikasyonunu, glikoprotein olgunlaşması takip etmektedir ve daha sonra viral protein işlenerek hücreden çıkmaktadır. Yeni virionların oluşması ve hücre dışına çıkışı konusunda bilgi sınırlıdır. Yeni virionların oluşmasının ardından, KKKA virionları polarize epitel hücrelerindeki bazolateral membrandan ekzositoz yoluyla salınmaktadır (64).



Şekil 2.5. KKKAV'nin konak hücreye girişi, çoğalması ve yeni virionların oluşması.

Kanamalı ateş virüsleri konakçı organizmaya girdikten sonra, monositler, makrofajlar ve dendritik hücreler gibi doğuştan gelen bağışıklık sistemi hücreleriyle karşılaşmaktadır. Viral glikoproteinler, duyarlı hücreler üzerindeki reseptörler tarafından tanınmakta ve nükleolin ile hücre içine girip endositozla içselleştirildikten sonra monositlere, makrofajlara ve dendritik hücrelere girerek, mikrotübüller aracılığıyla uygun hücre içi hedef bölgelere taşınmaktadır. Monositler, makrofajlar ve dendritik hücreler virüsleri başarılı bir şekilde ortadan kaldıramaz. Böylece virüsler, bu hücrelerin içinde çoğalabilir ve bölgesel lenf düğümlerine ve lenf ve kan yoluyla da tüm vücuda yayılabilmektedir (59). Virüsün bir diğer hedefi de endotel hücreleridir. Virüsün karaciğer, dalak ve endotel hücreleri, hem parankimal hücreler üzerinde doğrudan, hem de doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinden salgılanan faktörlere bağlı olarak sitopatik olmayan dolaylı etkileri vardır (65). Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 1 aktivatörü (STAT-1) nakavt fare modelinde, virüsün



Şekil 2.6. KKKK'nın patogenezi. Endotel, KKKAV'nin ana hedefidir ve doğrudan virüs tarafından ve/veya dolaylı olarak virüsün neden olduğu çözünür araçlar tarafından aktive edilebilir. Endotel hücrelerinin aktivasyonu, enflamatuvar reaksiyonların başlaması, vasküler geçirgenliğin artması ve intrinsik pıhtılaşma kademesinin aktivasyonu için önemlidir.

2.1.7. KKKA'YA KARŞI GELİŞEN İMMÜN YANIT

Doğuştan gelen bağışıklık tepkisi virüslere karşı savunmanın ilk adımıdır. Çalışmalar, KKKAV'nin doğuştan gelen bağışıklık sistemini bozarak, KKKAV'nin vücuttan temizlenmesi için kritik olan adaptif bağışıklık tepkisinde de gecikmeye neden olabileceğini göstermektedir (66,67). İnsan patogeneğinde KKKAV'ye karşı adaptif immün yanıtların rolü daha açık değildir. Düşük veya hiç olmayan anti-KKKAV antikor yanıtları şiddetli hastalık ve ölüm ile ilişkilendirilmiştir (68). Bununla birlikte, antikor tepkilerinin birincil KKKAV enfeksiyonunun kontrolüne katkıda bulunup bulunmadığı tam olarak bilinmemektedir ve hayatta kalanlarda bile nötralizan antikor tepkileri düşüktür. Türkiye ve Güney Afrika'da KKKAV'den sağ kalanlarda, GP38 ve Gn protein bölgelerindeki epitoplara karşı, nötralize edici antikor tepkileri tespit edilmiştir (60). Ayrıca, nötralizan olmayan antikorların bu

tehlide karşı koruyucu bir rol oynaması antikörlerin nötralizasyon dışındaki mekanizmalar yoluyla da koruyucu olabileceğini göstermiştir. KKKAV için modifiye edilmiş virüsü bazlı bir aşırı değerlendirilen çalışmalar, korumanın hem hücresel hem de humoral yanıtlar gerektirdiğini ortaya koymuştur, bu da T hücrelerinin KKKAV'ye karşı aşı aracılığı korumanın önemli bir bileşeni olabileceğini düşündürmüştür (69,70). Fakat, primer KKKAV enfeksiyonunun kontrolünde T hücrelerinin rolü net değildir. Periferik kanda dolaşan CD3+ CD8+ T hücre seviyelerinin, ölüm ile pozitif olarak ilişkili olduğu bulunmuştur ve sağ kalan insanların KKKAV'ye karşı uzun ömürlü CD8+ T hücresi tepkileri sergilediği gösterilmiştir (71). Ayrıca, insan lökosit antijen ailelerinin KKKAV'ye karşı koruma ile ilişkili olduğu bulunmuştur. KKKAV'nin insanlaştırılmış bir fare modeli, T hücrelerinin bu enfeksiyonunun ardından aktive edildiğini ve CD8+ T hücrelerinin, sitolitik aktivitenin bir belirteci olan yüksek perforin seviyelerine sahip olduğunu göstermiştir (72). Bununla birlikte, T hücre yanıtlarının enfeksiyonun ortadan kaldırılmasına nasıl katkıda bulunduğunu anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Birincil KKKAV enfeksiyonunun kontrolünde adaptif bağışıklık tepkisinin rolünün anlaşılması, uygun hayvan modellerinin olmaması nedeniyle sınırlandırılmıştır. Tip I interferon eksikliği olan farelerde, adaptif immün yanıtların gelişmesinden önce hastalık hızlıca ilerlemektedir ve bu, bu modelin adaptif immün yanıtları incelemek için uygunluğunu sınırlandırmaktadır. Bununla birlikte, STAT1 eksikliği olan farelerde yapılan çalışmalar, CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin erken aktive edildiğini göstermiştir, ancak bu hücreler enfeksiyondan sonraki 3. günde dalakta tükenmiş ve fareler, saptanabilir antikör yanıtlarından önce hastalığa yenik düşmüştür (66). Bir interferon blokaj antikoru ile tedavi edilen farelerin (adaptif immün tepkileri eksik olan farelerde) kullanıldığı bir çalışmada, enfeksiyondan sonra en az 2 hafta, kalıcı viral replikasyonu, dolayısıyla adaptif immün yanıtların farelerde KKKAV'yi kontrol edebileceğini göstermiştir. Bu model ayrıca, sitolitik T hücre aktivitesi gibi adaptif bağışıklık tepkilerinin, KKKAV enfeksiyonunu takiben hepatik hasar için gerekli olmadığını göstermiştir (73). Bu veriler, KKKAV'nin, konakçı adaptif immün tepkisinin viral replikasyonu kontrol etme girişimlerinden bağımsız olarak doğrudan karaciğer hasarına neden olabileceğini göstermektedir. Ayrıca, KKKAV'nin Cynomolgus makak modelinde, ne antikör titreleri ne de antikörlerin nötralize etme aktivitesi, hastalık seyri ile ilişkili olmadığını ortaya koymuştur (74).

2.1.7.1. İnterferonların (IFN) Uyarılması ve anti-KKKAV Aktivitesi

Virüslere karşı en etkili ve hızlı konak tepkisi, antiviral doğuştan gelen bağışıklık sisteminin önemli bir parçası olan tip I interferonların (IFN- α/β) üretilmesinden oluşmaktadır. Bilindiği kadarıyla tüm memeli çekirdekli hücreleri tip I IFN'leri sentezleyip salgılayabilmektedir. Bununla birlikte, salgılanan IFN tipi, hücre tipleri arasında farklılık gösterebilmektedir. Salgılanan IFN'ler, komşu hücreleri güçlü antiviral proteinleri eksprese etmeleri için uyarmaktadır. Viral ajanlarla ilk temasla tetiklenen IFN üretimi, virüsün çoğalmasını yavaşlatıp, hatta durdurup, organizmaya zaman kazandırmaktadır ve adaptif bir bağışıklık tepkisi oluşturmaya yardımcı olmaktadır.

IFN yanıtları, hastalık şiddetinin kritik bir belirleyeni olabilir. Toll-benzeri reseptör genlerindeki polimorfizmlerin, Türkiye'deki hastalık sonuçları ile ilişkilendiği bulunmuştur (75–77). Ancak bu bulguların diğer endemik bölgelerdeki popülasyonlara uygulanıp uygulanmadığını belirlemek için daha fazla çalışma gerekmektedir. Serolojik kanıtlar, KKKAV'nin birçok yabani ve evcil hayvanı enfekte edebildiğini göstermektedir ve insanlar enfekte olduklarında hafiften şiddetliye kadar hastalık geliştirirken, hayvanlar klinik belirtilere karşı genellikle dayanıklıdır. Birçok yabani ve evcil tür, çeşitli KKKAV suşlarıyla karşı karşıya kalmaktadır, ancak ciddi hastalık genellikle sadece bağışıklığı eksik laboratuvar hayvanlarında bildirilmiştir. Bunun yaşa (örneğin, yeni doğan fareler veya sıçanlar) veya hedeflenen IFN eksikliklerine dayandığı düşünülmektedir. Fareler ve hamsterlerde STAT-1, STAT-2 veya IFN- α , - β veya - γ reseptörlerini çıkartarak IFN sinyal iletim mekanizmasını ortadan kaldırmak ani ve şiddetli hastalığa yol açmaktadır (78–81). Ayrıca, IFNAR1'e karşı bir anti-IFNAR1 mAb ile geçici olarak baskılanmış yabanıl tip ve adaptif bağışıklık baskılanmış fare suşlarını kullanan çalışmalar, IFN'nin enfeksiyonu kontrol etmek ve hastalığı önlemek için bağışıklık sistemi eksik olan hayvanlarda bile önemli olduğunu göstermektedir (73). Şiddetli hastalığın diğer immünokompetan laboratuvar hayvan türlerinde modellenmesi zordur. Örneğin, Cynomolgus makakları insanlara benzer şekilde enfeksiyona yanıt vermektedir, semptomsuz enfeksiyondan, ciddi vakalarda ateş, döküntü, kanama ve hatta ölüme kadar bir hastalık şiddeti sergilemektedir. Ancak son zamanlarda immünokompetan bir fare modeli geliştirilmiş olup, bu modelde farelere ciddi hastalık yapabilen bir fare-adaptasyonlu KKKAV varyantı kullanılmıştır. Bununla birlikte, yabanıl tip farelerdeki enfeksiyonla karşılaştırıldığında, bu fare-

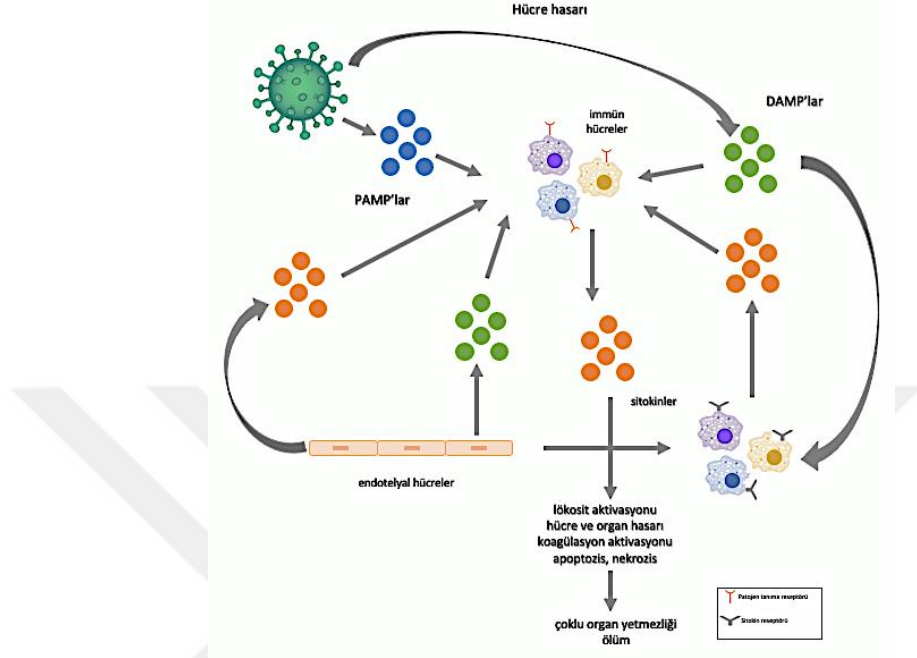
adaptasyonlu KKKAV varyantı ile IFNAR^{-/-} farelerdeki enfeksiyon hızla ölümcül olur, bu da tip I IFN'nin bu viral suş üzerinde kontrol sağladığını göstermektedir (82).

KKKAV, hücre kültüründe ve insan enfeksiyonunda bir IFN yanıtı tetiklemektedir (83,84). Hücre kültüründe, IFN ve IFN aracılı uyarılmış gen yanıtları 8 saat sonrasında görülmekte ve zamanla artmaktadır. Hastalarda IFN uyarımı rapor edilmiştir ve yüksek IFN- γ seviyeleri kötü sonuçlarla ilişkilendirilmiştir (67). İnsan olmayan primatlarda, sirküle IFN- γ hastalığın erken dönemlerinde artarak, yaklaşık olarak 7. günde zirveye ulaşmaktadır. Bu ifade, viral yükte keskin bir azalmaya yol açmaktadır (74,85,86) ve daha sonrasında IFN- γ yanıtları geliştiren hayvanların serumlarında 10 gün sonra seviyesi azalmaktadır (85,86). Ek olarak, IFN- γ sinyalini engellemek için KKKAV enfekte IFNAR^{-/-} antikor verildiğinde mortalite önemli ölçüde artmıştır (87). KKKAV ile enfekte immünokompetan farelerde, IFN- α 24 saat içinde uyarılmıştır. İlginç bir şekilde, IFN- β uyarımı sadece fare-adaptasyonlu KKKAV varyantı ile enfekte olan erkek farelerde görülmüş ve bu farelerde bu uyarımın daha ciddi hastalık sonuçlarıyla korele olduğu gösterilmiştir (82). Genel olarak, KKKAV IFN tedavisine duyarlıdır ve bütün bir IFN yanıtı varlığında virüs zayıflatılmaktadır. İnsanlarda KKKAV tedavisinde IFN kullanımı rapor edilmemiştir, ancak Hepatit C gibi diğer viral ajanlar için bildirilen tedavi yaklaşımlarına dayanarak, ribavirin ile birlikte kullanımı önerilmiştir (88).

2.1.7.2. Sitokin Değişimleri

KKKAV enfeksiyonunu takiben, hücresel ve humoral tepkileri içeren doğuştan gelen bağışıklık sistemi, bir enflamatuar tepki oluşturmak için harekete geçmektedir. İlgili anahtar hücreler, monositler/makrofajlar, nötrofiller, eozinofiller, bazofiller ve doğal öldürücü (NK) hücrelerdir. Bu lökositler, KKKAV'den patojenle ilişkili moleküler paternlerin (PAMP'ler) veya nekrotik hücrelerden hasara bağlı moleküler paternlerin (DAMP'ler) patern tanıma reseptörlerine (PRR'ler) bağlanmasıyla aktive edilmektedir. Toll benzeri reseptörler en iyi çalışılmış olan PRR'lerdendir ve inflammatuar sitokinlerin salınmasını sağlayan bir aktivasyonu tetiklemektedir. Sitokinler, immünomodülatör roller de dahil olmak üzere geniş bir fonksiyon yelpazesine sahip, hücre sinyallemede yer alan geniş bir küçük protein kategorisidir. İnterlökinler, kemokinler, interferonlar, tümör nekroz faktörü ve büyüme faktörleri gibi birkaç gruba ayrılabilirler. Sıkı düzenlenmiş bir sitokin ağı, patojenlerin

ortadan kaldırılması ve doku hasarının sınırlandırılması için oldukça önemlidir. Enflamatuvar sitokinlerin salınımı, yeni sitokin üretimini ve salınımını tetikler ve bu "sitokin fırtınası"nın başlatılmasına neden olmaktadır (Şekil 2.7.).



Şekil 2.7. Patojen enfeksiyonları sonrasında başlatılan sitokin kaskadı.

Viral kanamalı ateş hastalıklarının seyri boyunca, dolaşımda belirli sitokinler yer almaktadır. Enfeksiyonun erken döneminde (semptomların başlamasından sonraki ilk 4 gün), vireminin pik yapması ve ateşin gelişmesiyle, IFN- α ve β , tümör nekroz faktörü (TNF- α), interlökin (IL)-6 gibi sitokinlerde, oksijen ve nitrojen reaktif türler, lipid aracılı ve diğer çözünür faktörlerde bir artış olmaktadır (14). Bu inflamasyon araçları, antijen sunan hücreler, endotelial hücreler, polimorfonükleer hücreler ve NK hücreleri tarafından üretilmektedir ve antijen sunumu ve kostimülatör moleküller ile birlikte T hücrelerinin efektör profillere farklılaşmasını ve aktivasyonunu indükleyen T hücrelerinin polarizasyonunu teşvik ettiği bilinmektedir (89). Sonuç olarak, T hücresinden türetilen IFN- γ ve IL-2 seviyeleri, semptomların başlamasından sonraki 5. ve 10. günler arasında artmaktadır ve bu, en ciddi hastalık belirtilerini gösteren dönemdir. Düzenleyici sitokin IL-10 da bu aşamada zirveye ulaşmakta, böylelikle sitokin fırtınası başlamaktadır ve IL-10 şiddetli hastalık oluşumuyla ilişkilidir. Genellikle semptomların başlamasından 12 ila 14 gün sonra, sitokinler iyileşme evresindeki gibi bazal seviyelere dönmektedir (90). Hastalığın ilerlemesindeki kilit oyuncular sitokinler IL-10, -1, -6 ve TNF- α 'dır. Son zamanlarda, Ergönül ve arkadaşları

ölümcül olmayan vakalarla karşılaştırıldığında ölümcül sonucu olan KKKAV hastalarında önemli ölçüde daha yüksek IL-6 ve TNF- α düzeyleri saptamışlardır (91). Diğer bir gözlem ise hastalardaki yaygın intravasküler pıhtılaşmanın başlangıcı ile yüksek IL-6 ve TNF- α seviyeleri arasındaki korelasyondur. Ancak bu hastalarda yüksek IL-10 düzeyleri gözlenmemiştir ve IL-10 düzeyleri, yaygın damar içi pıhtılaşma skorları ile negatif korelasyona sahiptir. Başka bir çalışmada yüksek TNF- α düzeylerinin KKKAV'nın ciddiyeti ile ilişkili olduğunu doğrulanmıştır, ancak IL-6'nın hem hafif hem de ağır vakalarda bulunabileceği de iddia edilmiştir. Bu çalışmadaki tek ölümcül vakada yüksek seviyelerde hem IL-6 hem de TNF- α tespit edilmiştir (90).

2.2. KKKAV İÇİN HAYVAN MODELLERİ

KKKAV, immün sistemi yeterli yetişkin kemirgenlerde hastalığa neden olmaz (78). 2010 yılına kadar mevcut modeller arasında neonatal fare ve ratlar, ilk kez 1967'de kullanılmıştır (92). Tip I interferon reseptörü A'dan yoksun (IFNAR^{-/-}) olan 129 suşu farelerin KKKAV'ye duyarlı olduğu ve ölümcül/şiddetli bir hastalık modeli olabileceği bildirilmiştir (93). Bu çalışmalar daha sonra, tip I interferon (IFN-I) reseptörü olmayan C57BL/6 farelerde tekrarlanmış ve benzer sonuçlar elde edilmiştir (94). Ayrıca KKKAV, STAT-1^{-/-} farelerde, hem Tip-1 hem de Tip-2 IFN yanıtı olmadığından şiddetli hastalığa neden olmaktadır (66,95). Son zamanlarda, IFN-I reseptörü A'ya karşı bir antikor olan MAR1-5A3'ü kullanarak yeni bir fare modeli geliştirilmiştir. Bu antikor, farelerde geçici bir IFN-I engeliyle, ölümcül/şiddetli KKKAV enfeksiyonuna yol açmaktadır (73,96). Bu modelin avantajı, çapraz üreme ihtiyacı olmadan neredeyse her yabanıl tip veya transgenik farede IFN-I reseptörü nakavt edilmiş bir hayvanla aynı fenotipi oluşturabilmesidir. Antikor aracılı IFN-I engeli modelinde üretilen hastalık, genetik olarak knock-out hayvanlarda gözlemlenen hastalıkla aynıdır ve benzer ortalama ölüm sürelerine sahiptir. Geleneksel fare sistemlerine ek olarak, insan CD34+ kök hücrelerini, NOD-SCID-gama (NSG)-SGM3 farelere transfer ederek yeni bir humanize fare modeli geliştirilmiştir. Bu fareler, olgun B, T ve NK hücrelerden yoksun immün yetmez farelerdir. Bu fareler gama zincirindeki eksiklik nedeniyle sitokin sinyalizasyon bozukluklarına sahiptir. Bu farelerin KKKAV ile enfekte olmaları nörolojik hastalıklara neden olduğundan, bu çalışmalar için model olabilme potansiyeline sahip olduğu değerlendirilmiştir (72).

Son zamanlarda, Ulusal Alerji ve Bulaşıcı Hastalıklar Enstitüsü'ndeki (NIAID) bilim insanları, bazı insan olmayan primat türlerini KKKAV enfeksiyonlarına model olup olmayacağı açısından değerlendirmek bir pilot çalışma gerçekleştirmiştir (74). Çalışmanın, bu primatların arasında Cynomolgus makaklarının semptom göstermemesinden şiddetli hastalık geliştirmesine kadar geniş bir yelpazede sonuç göstermesinden, aşı çalışmalarına model olabileceği düşünülmüş ve bu anlamda çalışmalar devam etmektedir.

2.3. VİRAL HASTALIKLARA KARŞI DNA AŞILAMASI

Bir viral hastalık ortaya çıktıktan önce ya da sonra, virüs, viral vektör, nükleik asit, protein/peptit veya hücre tabanlı farklı metotlar kullanılarak aşı/aşı adayları geliştirilebilir. Fakat bu önleyici tedavi süreci, farklı metodolojiler kullanılarak farklı hastalık/patojenlere karşı olsa da bazı avantaj ve dezavantajlara sahiptir.

Nükleik asit tabanlı teknolojiler, mRNA veya viral replikonlar olarak antijen kodlayan plazmit DNA veya RNA kullanır. Hücresel alımları ve ekspresyonlarıyla birlikte, antijen kodlayan nükleik asitler hem humoral hem de hücresel immün tepkileri ortaya çıkarabilir. Bu teknolojinin bir avantajı, manipülasyonun kolaylığıdır. Hedef hücrelerde antijen üretimi, bir enfeksiyon sırasında protein sentezini taklit etme avantajını sunar. Daha da önemlisi, hangi patojenden türetildiğine bakılmaksızın, seçilen herhangi bir antijenin ifadesini ve dolayısıyla çok çeşitli patojenlere karşı aşı gelişimini destekler. Aşı özellikleri kodlanan proteinlerden bağımsız olduğundan, farklı aşılarda geliştirilmesinde farklı üretim tesislerinin kurulmasına gerek kalmadan gerçekleştirilebilir, yani hem maliyet hem de süreci önemli ölçüde kısaltmaktadır. Hatta, sentetik olduklarından büyük ölçekli üretimi de görece kolaylaştırmaktadır. Dolayısıyla nükleik asit tabanlı teknolojiler, hızlı ve esnek aşı geliştirme ve üretimini desteklemektedir.

DNA aşılı, genellikle seçilen antijen(ler)i kodlayan bir ökaryotik ekspresyon kasetinin bakteriden türetilmiş bir plazmit içerisine entegre edilmesiyle üretilmektedir ve enjeksiyon yoluyla 1990'ların başlarında uygulanmaya başlamıştır. Ancak, özellikle de büyük hayvan modelleri ve insanlarda, tek başına bir DNA vektörü ile aşılama genellikle nispeten düşük immünojenisiteye yol açmaktadır. Bu nedenle DNA alımını, ekspresyonunu ve immünojenisitesini artırabilen ek yöntemler geliştirilmiştir. Ayrıca, materyal-tabanlı formülasyonlar gibi farklı DNA formülasyonları da test edilmiştir. Bu yöntemler, büyük

ölçüde DNA molekülünün hücreye alımını iyileştirmeye ve böylece antijen ekspresyonunu artırmaya yöneliktir. Bunun için, PRR ligandları ve farklı sitokinler, immün cevabı artırmak amacıyla, kodlanan antijen(ler)i ilgili hücrelere yönlendirmek amacıyla "moleküler adjuvanlar" olarak verilmektedir. Ek olarak, DNA aşılı, prime-boost rejimi için, protein veya viral vektör bazlı aşılı gibi diğer aşı teknolojileriyle kombinasyon halinde başarıyla kullanılmıştır.

Çok sayıda çalışma, DNA aşılmasının ardından, sitotoksik ve yardımcı T hücrelerinin aktivasyonu yoluyla hem humoral hem de hücrel immün tepkileri ortaya çıkarmaktadır. DNA aşılı, HIV, İnfluenza Virüsü, Sıtma, Hepatit B Virüsü, Respiratuar Sinsisyal Virüs, Herpes Simpleks Virüsü gibi çok çeşitli insan patojenlerine karşı klinik denemelere kadar aşı geliştirmek için kullanılmıştır. Henüz hiçbir DNA tabanlı aşı insan kullanımı için onaylanmamıştır, ancak Batı Nil Virüsü'ne karşı at aşısı gibi bazı DNA tabanlı aşılı veteriner uygulamaları için ruhsatlandırılmıştır. Yüksek derecede çok yönlülükleri göz önüne alındığında, DNA aşılı, HIV, Orta Doğu Solunum Sendromu, Ebola ve Zika, Ağır Akut Solunum yolu Sendromu-Koronavirüs-19 (NCT04336410, NCT04447781, ChiCTR2000040146, NCT04642638, NCT04463472, NCT04655625, NCT04527081, CTRI/2020/07/026352, CTRI/2021/03/032051, NCT04591184, NCT04627675, NCT04673149, NCT04445389, NCT04715997, NCT04742842, NCT04788459) gibi son pandemik tehditlere karşı koruma açısından etkinlikleri açısından test edilmiştir.

Kanamalı ateş hastalıkları arasında en ölümcülü olan Ebola'ya karşı prelinik çalışmaları geliştirilen ilk etkili aşılı, DNA vektörüne dayalı antijen ekspresyonunu kullanmıştır. Bu yaklaşımlar, nükleoprotein ve glikoproteinlerin (GP) ekspresyonuna dayanmakta ve hem T hücre hem de nötralize edici antikor yanıtlarını hedef almaktadır. Aşı etkinliği üzerine ilk çalışmalar kemirgenler üzerinde gösterilmiştir (70,72). Bir dizi ümit verici klinik öncesi veriyle birlikte, Ebola'ya karşı bir DNA aşısı kullanan ilk faz I klinik çalışma (NCT00072605) 2003'te başlatılmıştır (53). NP ve transmembran bölgeleri silinmiş GP'leri kodlayan bu DNA aşısıyla aşılama sonucunda bu 3 antijenden en az birine spesifik antikor yanıtları elde edilmiştir, fakat nötralizasyon tepkisi ortaya çıkmamıştır. 2008-2009 yılları arasında yürütülen başka bir faz çalışması (NCT00605514) Adenoviral vektör yaklaşımıyla gerçekleştirilmiş olup, transmembran delesyonlarına kıyasla daha iyi yanıtlar ortaya çıkarmıştır (97). Aynı yıllarda, Uganda'da da biyogüvenlik düzeyi yüksek bir faz çalışması

gerçekleştirilmiştir (NCT00997607) (57). Fakat bu aşılar, düşük bağışıklık tepkilerini uyarmıştır. İlk nesilden sonra DNA aşıları, 2014 salgınının ardından daha iyi teknolojiler kullanılarak geliştirilmiştir. Bu çalışmalardan biri, 1976 ile 2008 yılları arasında gerçekleşen EBOV salgınlarında dolaşımdaki suşlarla yapılmış ve sentetik bir DNA aşısı ile tek bir aşılamadan sonra farelerde güçlü anti-Ebola hücresel ve humoral bağışıklığı indükleyerek hızlı bir koruma sağlamıştır. EBOV-GP DNA immünizasyonu ayrıca, makakları EBOV tehdidine karşı %100 korumuştur (98). Ayrıca bu yanıtlar, aşılamadan bir yıl sonrasına kadar kalıcılığını korumuştur ve bu zamana kadar güçlü bellek yanıtları ortaya çıkarmıştır (NCT02464670) (98). Bu çalışmalardan çıkan sonuçlar mevcut rekombinant vesicular stomatitis virüs–Zaire Ebola Virus (rVSV-ZEBOV) aşısı için destekleyici bir role sahip olmuştur. DNA aşıları, viral enfeksiyonlar gibi bağışıklık yanıtını başlatabilen özel bir antijeni ifade edebilen rekombinant DNA'yı kullanır. Taşınan DNA, hücre sitoplazmasında istenen proteine çevrilebilir ve peptit parçaları MHC Sınıf I ve/veya MHC Sınıf II molekülleri tarafından sunulabilir ve doğal ve adaptif bağışıklık yanıtlarının oluşturulmasına yardımcı olabilir. DNA aşıları, peptid tabanlı aşılarla ilişkilendirilen yanlış peptid katlama ve yüksek üretim maliyetleri gibi sorunlardan kaçınabilme avantajına sahiptir (99).

Başlangıçta, DNA aşıları intramusküler enjeksiyonlar aracılığıyla uygulanmıştır ve bağışıklık yanıtını başlatmak için sayıda doz ve minimum konsantrasyona ihtiyaç duymalarıyla avantajlıdır (100). Şu anda, DNA aşılarında gelen bağışıklığı artırmak için bir alternatif olarak gen tabancası teknolojisi kullanılmaktadır. DNA plazmitleri altın nanoparçacıkların üzerine kaplanmakta ve gen tabancası ile parçacıklar deri altına transfer edilmektedir (101). DNA aşıları şu anda insan kullanımı için onaylanmamış olsa da veteriner alanda köpek melanomu ve atlarda Batı Nil Virüsü'ne karşı kullanılmaktadır. Mevcut DNA aşı salım teknolojisi, salımın belirli bir hücreye spesifik olmamasıyla sınırlandırılmıştır. Ayrıca, çıplak plazmit enzimler tarafından parçalanabilir ve DNA'ya karşı antikor üretme olasılığı vardır, bu da aşı etkililiğini etkileyebilir (102) .

DNA aşıları, bağışıklık yanıtını tetikleme konusunda güvenli, etkili ve maliyet açısından avantajlı bir yöntemdir. Rekombinant DNA, antijenleri antijen sunan hücrelerde ifade etmek için kullanılır ve viral enfeksiyonlara benzer bir bağışıklık yanıtı oluşturur. Aktarılan DNA, hücre sitoplazmasında hedeflenen proteine çevrilir ve ortaya çıkan peptit parçaları, MHC Sınıf I ve/veya II molekülleri tarafından sunulularak doğal ve adaptif bağışıklık yanıtlarını

teşvik eder. DNA aşıları, diğer aşılarla göre birkaç avantaja sahiptir, bunlar arasında üretim kolaylığı, geliştirilmiş güvenlik ve basitleştirilmiş üretim bulunur. Bu yaklaşımın bazı potansiyel dezavantajları olsa da, örneğin otoimmün tepkiler ve düşük immünojenite, bunlar yenilikçi tasarım ile ele alınabilir (103,104). Genel olarak, DNA tabanlı aşılar, KKKAV'ye karşı aşı geliştirmek için önemli potansiyele sahiptir. KKKAV'ye karşı ilk DNA aşı geliştirme çalışması 2006'ya dayanmaktadır. Yapılan bir çalışmada IbAr10200 KKKAV'nin GPC'sini ifade etmek üzere geliştirilen DNA tabanlı vektör ile aynı zamanda Rift Vadisi Ateşi (RVF) virüsü, kenelerle bulaşan ensefalit virüsü ve Hantaan virüsüne karşı geliştirilen DNA aşıları birleştirilerek aşılama yapılmış, ancak aşılanan farelerin yalnızca %50'sinde NAb oluşturmuştur. Çalışma kapsamında hücresel bağışıklık yanıtları değerlendirilmemiş ve mevcut bir hayvan modelinin olmaması nedeniyle challenge çalışmaları yapılamamıştır (105).

KKKAV IbAr10200 suşunun Gn, Gc ve NP'sini içeren bir DNA vektörü, üç kez intradermal olarak aşılanan ardından, IFNAR^{-/-} fareler başarılı bir şekilde hem antikor hem de T hücre bağışıklık yanıtlarının oluşturarak ölümcül KKKAV tehdidine karşı koruma sağlamıştır (106). Aynı çalışmada, virüs benzeri partikül (VLP) yapısı alan fareler, KKKAV DNA aşısına kıyasla daha yüksek *in vitro* nötralizan antikorları oluşturmalarına rağmen kısmi koruma göstermişlerdir. Bu sonuçlar, nötralizan antikorların tek başına KKKAV'ye karşı koruma sağlamak için yeterli olmayabileceğini düşündürmektedir.

Garrison ve arkadaşları, KKKAV'nin M-segment glikoprotein öncü genini taşıyan bir DNA aşısının immünojenitesini ve koruyucu etkinliğini iki farklı ölümcül fare modelinde (IFNAR^{-/-} fareler ve geçici olarak bağışıklık baskılanmış (IS)) değerlendirmiştir (96). Çalışmada, kas elektroporasyonu yoluyla 25 µg dozunda uygulanan aşı, güçlü bir humoral bağışıklık yanıtını uyarmıştır. Üç aşılama sonrasında, nötralizan antikorlar her iki fare modelinde de tespit edilmiştir. İki fare modeli de çoğunlukla Th1 antikor yanıtları sergilese de IS modelinde Th1/Th2 oranı önemli ölçüde daha düşük tespit edilmiştir, bu immünokompetan farelerde daha dengeli bir antikor yanıtının göstergesidir. Her iki fare modelinde tam koruma sağlanamamıştır (IFNAR^{-/-}: %71,4; IS: %60). Aynı grubun 2021 yılındaki çalışmasında, KKKAV-M10200 ve KKKAV-MAfg09 adlı iki KKKAV DNA aşısının etkinliğini farelerde değerlendirilmiştir (107). Üç hafta arayla 3 kez 50 ug dozda uygulanan aşılardan homolog meydan okumada hayvanlarda %100, heterolog meydan

okumada ise %80 koruma sağlanmıştır. Aynı zamanda KKKAV-IbAr10200'nun GP38 bölgesini ifade eden bir DNA aşısının homolog meydan okumaya karşı kısmi koruma sağladığını ve yüksek düzeyde anti-GP38 antikörlerinin KKKAV meydan okumasından koruma sağladığı bildirilmiştir. Bu da aşılarda heterolog meydan okumaya karşı sağladığı korumanın azalmasından sorumlu olan GP38 bölgesinde genetik çeşitliliği göstermektedir.

KKKAV-NP'yi ve CD24'ü ifade eden bir DNA vektörünün farelerdeki koruma potansiyelini değerlendiren bir çalışma, CD24'ün B ve T hücre proliferasyonunu düzenleyerek indüklediği bir bağışıklık yanıtı ortaya koymuştur (95). Benzer diğer bir çalışma, NP tabanlı bir DNA vektörüyle aşılanmanın IFNAR^{-/-} farelerde tam koruma sağlandığını göstermiştir (106). Bu sonuçlar, hem NP'nin KKKA aşısı için potansiyeli yüksek bir aday olduğunu hem de uygun adjuvanlarla birlikte uygulandığında DNA aşılarının bağışıklık yanıtını ve aşılarda etkinliğini artırmak için umut vadeden bir yaklaşım olduğunu göstermektedir.

Son zamanlarda Hu ve arkadaşları, KKKAV-NP, Gn ve Gc kodlayan üç DNA aşısının etkinliğini test etmişlerdir (108). Bu aşılarda, lizozom ile ilişkilendirilmiş membran protein 1 (LAMP1) ile birleştirilmiş olup, insan MHC (HLA-A11/DR1) transgenik fare modelinde immunojenite ve koruyucu etkinlikleri için test edilmiştir. Araştırmacılar pVAX-LAMP1-KKKAV-NP aşısının üçünün arasında en etkili olduğu, dengeli Th yanıtlarını uyardığı ve enfeksiyona karşı koruma sağladığı sonuçlarına ulaşmıştır. Diğer taraftan Gc aşılamaından antikör yanıtları elde etmelerine rağmen bu aşı korumada başarısız olmuştur.

DNA tabanlı diğer bir aşı, KKKAV için bir Cynomolgus makak modelinde test edilmiştir (109). KKKAV Hoti NP ve GPC taşıyan plazmit DNA aşısı, intramusküler enjeksiyonlarla *in vivo* elektroporasyon yoluyla uygulanmıştır. Bu aşılama hem antikör hem T hücre yanıtlarını indüklemiştir ve düşük miktarda NAb üretmiştir. Ayrıca, KKKAV tehdidinden sonra aşılanmış grup kontrole kıyasla düşük viremi ve patoloji sergilemiştir. Bu DNA aşısı, KKKA'nın insan olmayan primat modelinde etkinliği gösterilen ilk çalışmadır ve aşının insan klinik denemelerine geçmesini destekler niteliktedir.

2.4. VİRAL HASTALIKLARDA DEFENSİNLER

Defensinler, ilk kez antimikrobiyal aktiviteye sahip küçük katyonik peptitler olarak tanımlanmıştır. Bakterilere, mantarlara, parazitlere ve virüslere karşı geniş

bir antimikrobiyal aktivite özgülüğüne sahiptir ve hem innate hem de adaptif immüniteyi düzenlemektedirler. Defensinler, immün hücreleri aktive ederek ve sitokin, kemokin gibi araçları indükleyerek immün yanıtları düzenlemek için C-C kemokin reseptörü tip 6 ya da Toll-benzeri reseptör ile etkileşmektedirler. T hücreleri, monositler ve olgunlaşmamış dendritik hücreler için kemoatraktan olarak da görev yapmaktadır. Ayrıca defensinlerin, antijen alımını ve işlenmesini geliştirdikleri ve monositler, makrofajlar ve mast hücrelerinin kemotaksisini uyardıkları gösterilmiştir (110). İnsan defensinleri, disülfid bağ eşleşme farklılıklardan dolayı alfa ve beta olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadırlar. İnsan β -defensinler (HBD)1-3, monosit, makrofaj ve monosit kökenli dendritik hücreler ve epitel hücreleri tarafından eksprese edilmektedir. HBD1 yapısal olarak eksprese edilirken, HBD2 ve HBD3 virüs, bakteri, mikrobiyal ürünler, TLR ligandları, epidermal büyüme faktörü ve pro-inflamatuar sitokinler (TNF- α ve IL-1) tarafından indüklenmektedir.

KKKAV ile enfekte olmuş hasta serumlarında hBD2 seviyeleri sağlıklı kontrollere kıyasla önemli ölçüde artarken, ayrıca ölümcül olmayan hastalarda ölümcül olanlara kıyasla 3 kat daha fazladır. Bu, enfeksiyon esnasında bu peptidin koruyucu bir rolünün olabileceğini göstermektedir.

3. GEREKÇE VE AMAÇ

KKKAV ile temas etmiş insanlar üzerinde yapılan araştırmalar, T hücreleri aracılığı ile edinilen bir bağışıklığa ve uzun dönemli T hücresi yanıtlarının etkin koruyucu rolüne işaret etmektedir (111,112). Güncel bulgular KKKAV glikoproteinlerinin çoğunlukla antikor aracılı immün mekanizmaları, nükleokapsid proteinlerin ise T hücresi aracılı olanları tetiklediğini göstermektedir ve glikoproteinleri hedefleyerek KKKAV'yi nötralize eden antikorların *in vivo* koruma sağlamada başarısız olabildiğini göstermektedir (14,50,113). Bunlara ek olarak, KKKAV genomunun S segmentinden kodlanan nükleokapsid proteini, suşlar-arası yüksek amino asit korunmuşluğu göstermekte ve enfekte hücrelerde sıkça tespit edilen başlıca antijenik proteinleri barındırmaktadır (114,115). Bu bulgulara dayanarak, KKKAV nükleoprotein antijenlerinin T hücresi aktivasyonu etkinliklerini *in vitro* olarak araştırılması amaçlanmıştır. Çeşitli hastalıklar için tasarlanmış aşılar çoğunlukla B hücresi-aracılı bağışıklığa dayanmakta, fakat özellikle sitotoksik T hücre aracılı hücresel bağışıklık yanıtları bazı durumlarda daha güçlü olabilmekte ve daha uzun süreli bağışıklık sağlayabilmektedir (10,12,116). Ayrıca, çoğunlukla viral yüzey proteinlerinin dış bölgelerini hedefleyen koruyucu antikorların aksine sitotoksik T hücreleri, MHC-I'ler tarafından sunulabilen yüzey veya içsel viral proteinlerin herhangi bir bölgesini hedefleyebilir (12). Tüm çekirdekli hücrelerin zarında bulunan MHC-I molekülleri, sitotoksik T hücrelerine geniş bir peptit epitop dizisi sunar ve bunların etkileşimi sonucu oluşan yanıtlar viral enfeksiyonların kontrolü ve temizlenmesi için gereklidir (117). T hücre yanıtlarını belirlemede rol oynayan MHC'ler, kaydedilmiş 6000'den fazla varyant ile omurgalılarda en çok polimorfizm gösteren proteinler arasındadır, dolayısıyla bu kompleks allel grubunun antijen bağlama eğilimlerinin tümüyle belirlenmesi, günümüz deneysel metodolojisinin kapasitesini aşmaktadır. İmmünoinformatik araçlar MHC'lerin bağlayabileceği potansiyel T hücresi epitoplarının hızla tanımlanmasına ve böylece yeni antijenlerin/aşı adaylarının daha verimli şekilde tasarlanarak test edilmesine yardımcı olabilir; bu anlamda sıtma, tüberküloz gibi çeşitli hastalıklarda immünoinformatik yaklaşımlar olumlu katkılar sunmuştur (118,119). Bununla birlikte KKKAV'ye yönelik immünoinformatik analizlerin yapıldığı, özellikle T hücresi epitoplarının belirlenmesine dönük çok az araştırma bulunmakta ve bunların hiçbirisi deneysel bir çalışma içermemektedir (17,120). Tüm bu durumları göz önüne alarak immünoinformatik araçlar ile NP üzerinde bulunan, sitotoksik T hücreleriyle ilişkili MHC-I'lere bağlanabilecek epitopları

belirlenmesi ve bu epitopların bu hücreler üzerindeki erken safha etkinliklerini *in vitro* test edilmesi hedeflenmiştir. T hücre bağışıklığının oluşması, vücuttaki enfeksiyonla ilişkili antijenlerin kanda dolaşan naif T hücreleri tarafından tanınmasına ve bu hücrelerin antijenle olan bu ilk temas sonrası aktivasyonlarına bağlıdır. Priming olarak adlandırılan bu olgu, etkin T hücresi cevaplarının üretilebilmesinin ilk ve en önemli immün aşamasıdır (121). İşlevsel T hücrelerinin üretilmesi ve çoğalmasıyla sonuçlanan etkin bir ilk temas sonrası T hücreleri efektör/hafıza T hücrelerine farklılaşır. Bu naif T hücresi uyarımı ve bunun sonucu olarak da farklılaşma ile işlevsel özelliklerin edinimi priming aşamasındaki Antijen-MHC etkileşiminin kuvveti/verimliliği ile doğrudan ilişkilidir (122). Priming süreci, ortaya çıkacak olan bağışıklık tepkisini şekillendirir ve bu anlamda T hücresi yanıtlarının nasıl geliştiğinin anlaşılabilmesi için önemli bir basamaktır. Bu duruma paralel olarak, T hücre yanıtlarını uyarması öngörülen antijenlerin ve bu yönde geliştirilmesi hedeflenen aşı adaylarının kuvvetli priming etkinliği göstermeleri ve adayların bu yöndeki etkinliklerinin araştırılması büyük önem arz etmektedir (10,123,124). Bu durumu göz önüne alarak, belirlenen antijenik yapıların priming kapasitelerini deneysel olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Priming etkinliğini *in vitro* test etmek mümkündür ve T hücreleri ile antijen sunan hücreleri birlikte kültüre etmeye dayanan protokoller bu uygulamalar için sıkça kullanılmaktadır (125,126). Yine aynı yöntemler aşı adaylarının immünojenitesini test etmek için de uygulanmaktadır (127). Bu bağlamda bu çalışmada da benzer bir yöntemi uygulanmış ve belirlenen antijenik fragmanların T hücre aktivasyonu kapasitelerini bu alanda en sık kullanılan model hücre olan immortalize Jurkat T lenfositleri (insan kökenli) üzerinde test edilmiştir (128–130). Primer T lenfositlerinde bulunan tüm sinyal iletim yollarına ve moleküler altyapısına sahip olan Jurkat T hücre hattı (131), yeni antijenlerin keşfi ve antijen etkinliklerinin araştırılması için sıkça kullanılmaktadır (132). Etkili bir priming ile birlikte kuvvetli immün yanıtların oluşabilmesi ve yine bu bağlamda etkili aşılarda geliştirilebilmesi için antijenlerin hücreler tarafından T lenfositlerine sunulması önem taşımaktadır (133). Araştırmalar özellikle monositler/makrofajlar KKKAV enfeksiyonu sırasında bu bağlamda önemli roller oynadığını ve virüsün enfekte ederek çoğaldığı temel konakçı hücre grupları olduklarını göstermektedir (134). Bu kapsamda T hücre aktivasyonunu *in vitro* olarak çalışmak için kullanılan farklı hücre modelleri bulunmakla birlikte bunların en sık kullanılanı ve çalışmanın kurgusu için en uygun olanı insan monosit kökenli bir immortalize hücre hattı olan THP-1'dir (56,135,136). Monositik

bir hücre hattı olan ve kolay ve kontrollü bir biçimde makrofajlara dönüştürülebilen THP-1 hücreleri, antijenik yapıların ve aşı adaylarının *in vitro* test edilmesi için T hücreleriyle birlikte yaygın şekilde kullanılmaktadır (56,137–139). Belirlenen antijenlerin T hücre aktivasyonunu değerlendirmek ve priming etkinliklerini test etmek için THP-1 hücrelerini monosit/makrofaj modeli olarak kullanılması ve antijenik epitopları bu hücrelerde ifadelendirilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda DNA-tabanlı ifadelendirme sistemleri (örn. antijen kodlayan plazmidler) antijenlerin ilgili hücrelere aktarılması ve bu hücrelerin antijenleri sürdürülebilir şekilde sunabilmeleri için ideal yapılardır; ayrıca DNA aşıları da özellikle viral patojenler için etkili bir yöntem olarak değerlendirilmekte ve THP-1 hücreleriyle birlikte *in vitro* olarak sıkça kullanılmaktadır (140,141). Diğer taraftan DNA aşıları T lenfosit aracılı edinilmiş bağışıklığı indükleyebilirken, istenmeyen bir virülans gelişmesi riskini de barındırmaz ve dolayısıyla daha güvenlidir. DNA aşıları, DNA-tabanlı ifadelendirme sistemleri sayesinde hedef antijenlerin spesifik şekillerde ifadelendirilebilmesine ve böylece daha etkin immün yanıtlar elde edilebilmesine imkân tanır (142,143). Sonuç olarak, bu çalışmada belirlenen antijenlerin T hücre yanıtlarını indükleme kapasitelerini, DNA-tabanlı ifadelendirme sistemleri kullanılarak test edilmesi planlanmıştır.

Aşıların geliştirilmesinde, hayvan modelleri kritik öneme sahiptir. Hayvan modelleri, aşılama karşı oluşan bağışıklık tepkisinin niteliğini ve miktarını belirlemek, aşı formülasyonlarının güvenliğini ve toksisitesini değerlendirmek, aşının enfeksiyona karşı koruma sağlamadaki etkinliğini belirlemek için kullanılırlar. Bu nedenle, bu çalışma için en uygun hayvan modelleri seçilmiş ve seçilen adayların etkinlik ve koruyucukları bu hayvan modellerinde değerlendirilmiştir.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

4.1.1. IN SILICO ARAÇLAR

Bu tez çalışmasında MHC bağlanma afinitesine sahip epitop bölgelerin tahmini ve bazı özelliklerinin belirlenmesinde kullanılan çevrimiçi biyoinformatik araçların kullanım amaçları ve web adresleri Çizelge 4.1.'de kısaca özetlenmiştir.

Çizelge 4.1. Kullanılan çevrimiçi biyoinformatik araçlar.

Biyoinformatik araç	Kullanım amacı	Web adresi
NCBI	İlgili sekansların eldesi ve korunmuşluk analizi	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
IEDB	MHC-I ve/veya MHC-II epitoplarının tahmini	http://tools.iedb.org/processing/
NetMHC 4.0	MHC-I ve/veya MHC-II epitoplarının tahmini	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/
Rankpep	MHC-I ve/veya MHC-II epitoplarının tahmini	http://imed.med.ucm.es/Tools/rankpep.html
VaxiJen	Tahmini epitopların antijenitesinin belirlenmesi	http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html
Predicted Antigenic Peptides	Tahmini epitopların antijenitesinin belirlenmesi	http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl

NCBI veri tabanından KKKAV-Ank-2 suşu ve diğer suşlara ait nükleoprotein sekansları FASTA (protein) formatında elde edilmiştir ve BioEdit v7.2.5 çoklu dizi hizalama programı sekanslar arasında korunmuş bölgenin tanımlanması için kullanılmıştır. Öncelikle MHC-I bağlama yeteneği olan peptitler, yarı maksimum inhibitör konsantrasyon (IC₅₀) eşik değeri 0,5 olarak belirlenerek immün epitop veri tabanı (IEDB) online aracıyla tahmin edilmiştir. Eşik değerinin üstünde kalan peptitler ayrılmıştır. Ayrıca, tahmini epitopların belirlenmesi, Rankpep ve NetMHC 4.0 çevrimiçi araçlarıyla da tekrarlanmıştır. Ortak olarak belirlenen peptitler, VaxiJen, Predicted Antigenic Peptides gibi çevrimiçi araçlar kullanılarak antijenite ve popülasyon sıklığı analizlerine tabi tutulmuştur.

4.1.2. HÜCRELER

Çalışmada kullanılan THP-1 hücreleri Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Hastanesi öğretim üyesi Prof. Dr. Güneş Esendağlı'dan, Jurkat hücreleri Adnan Menderes Üniversitesi öğretim üyesi Doç. Dr. Mehtap Kılıç-Eren'den temin edildi.

Hektrex, Jurkat flp-in hücreleri Dr. Öğr. Üyesi Mutlu Erdoğan'nın, Hek293 ve Vero-E6 hücreleri ise Prof. Dr. Aykut Özkul'un laboratuvarından temin edildi.

4.1.3. DENEY HAYVANLARI

Çalışma kapsamında kullanılacak deney hayvanları için Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınan izin ve çalışmayı yürüten tez öğrencisinin Hayvanları Kullanım Sertifikası ekte sunuldu.

Deney hayvanlarıyla yapılan bütün çalışmalar, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi bünyesinde bulunan Yüksek Güvenlikli Viral Zoonozlar Tanı, İleri Araştırma ve Hayvan Laboratuvarları'nda (BSL-3+, ABSL-3+) gerçekleştirildi.

4.1.4. BESİYERİ HAZIRLAMA

500 ml SOB (Super Optimal Broth) için; 10 g tripton/pepton, 5 g maya özütü ve 5 g NaCl son hacmin yaklaşık %80'i kadar dH₂O içinde çözündükten sonra, 1,25 ml 1M KCl ve 5 ml 5M MgCl₂ eklenmiştir ve son hacme dH₂O ile tamamlandı. 20 dakika boyunca 121°C ve 1 atm basınç altında otoklavlanarak sterilize edildi.

1L LB (Luria-Bertani) Broth için; 10 g tripton/pepton, 5 g maya özütü ve 5 g NaCl son hacmin yaklaşık %80'i kadar dH₂O içinde çözündükten sonra (eğer agarlı olacaksa 15g agar ilave edildi) son hacme dH₂O ile tamamlandı. 20 dakika boyunca 121°C ve 1 atm basınç altında otoklavlanarak sterilize edildi. Eğer ampisilinli bir besiyeri hazırlanacaksa, besiyeri soğutulduktan sonra antibiyotik (100 mg/ml, A9393 Sigma) eklendi.

1L 2X YT (Maya-Tripton) Broth için; 10 g tripton/pepton, 5 g maya özütü ve 5 g NaCl son hacmin yaklaşık %80'i kadar dH₂O içinde çözündükten sonra son hacme dH₂O ile tamamlandı. 20 dakika boyunca 121 °C ve 1 atm basınç altında otoklavlanarak sterilize edildi.

4.1.5. KOMPETAN BAKTERİ HAZIRLAMA

5 ml SOB besiyerine 5 µl *E. coli* DH5α suşu inoküle edilerek bakteri ön kültürü hazırlandı ve kültür 220 rpm ve 37°C'de gece boyu (16 saat) çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi. Ertesi gün, 1 ml önkültür 50 ml SOB besiyerine inoküle edildi ve kültür 180 rpm ve 18-23 °C'de gece boyu (16 saat) inkübe edildi. OD₆₀₀ değeri 0,5-0,6'ya ulaşana kadar 37°C'de çalkalamalı inkübasyona devam edildi ve OD₆₀₀ değerinin yakalanmasıyla erlen 10 dakika boyunca buzda bekletildi. Hücreler, 2500 g'de 4 °C'de 10 dakika santrifüjleyerek çöktürüldü ve süpernatantın uzaklaştırılmasının ardından hücreler 10 ml soğuk Inoue tamponunda yavaşça resüspanse edildi. Bu basamak, santrifüjün ardından 4 ml Inoue tamponuyla hücrelerin yeniden süspanse edilmesiyle tekrarlandı. Tamponun üzerine 300 µl DMSO eklendi ve falkon çalkalanarak DMSO ve bakteri süspansiyonunun iyice karışması sağlandı. Karışım 15 dakika buzda bekletildi. 100 µl süspansiyon alikotları önceden soğutulmuş, steril mikrofüj tüplerine dağıtıldı ve sıvı azot içinde hızlıca donduruldu. Hücreler kullanılıncaya kadar -80 °C'de saklandı. Kullanılmadan 10 dakika önce hücreler dolaptan çıkarılarak buzda çözündürüldü.

4.1.6. SLICE (SEAMLESS LIGATION CLONING EXTRACT) KLONLAMA LİZATININ HAZIRLANMASI

DH5α gliserollü stoğu veya taze bakteri kültürünün bir LB agar besiyerine yayma metodu kullanılarak ekimi yapıldı. Agar gece boyu (16 saat) 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün, tek bir koloni seçilerek 5 ml 2X YT besiyeri içine inoküle edildi ve gece boyunca 37 °C ve 220 rpm'de inkübe edildi. Ertesi gün, 50 ml 2X YT besiyeri bir gün önce hazırlanan önkültür ile inoküle edildi ve 37°C ve 220 rpm'de inkübasyona bırakıldı. Takip eden gün, OD₆₀₀ değeri ölçüldü ve bu değer 3-5 arasına gelene kadar inkübasyona devam edildi. OD değeri yakalanınca kültür 50 ml'lik falkon tüpüne alındı ve 4°C'de 15 dakika boyunca 2500 x g'de santrifüjlenerek hücreler çöktürüldü. Hücre peleti steril dH₂O ile yıkandıktan sonra Slice tamponunda (500 mM Tris-CI (25°C, pH 7.5), 100 mM MgCl₂, 10 mM ATP, 10 mM DTT) hücre peleti süspanse edildi ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Hücre lizatını, herhangi bir çözünmeyen materyali peletlemek için oda sıcaklığında 2 dakika boyunca 14000 x g'de santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant eşit hacimde steril %86'lık

gliserol ile karıştırıldıktan sonra 50-100 µl hacimlerde olacak şekilde 1,5 ml ependorflara bölündü.

4.1.7. HOMEMADE GIBSON MASTER MIX HAZIRLAMA

Aşağıda bileşenleri verilen Gibson master mix Bilkent Üniversitesi'nden Doç. Dr. Urartu Özgür Şafak Şeker'den temin edildi.

dNTP'ler, NAD⁺, Tris-HCl, MgCl₂ ve DTT karıştırıldı. Bu karışıma yavaş yavaş PEG-8000 eklendi ve tamamen eriyene kadar iyice karıştırıldı. Karışım on hacim olan 4 ml'ye suyla tamamlandı (Çizelge 4.3.) ve alikotlanarak -20 °C'de saklandı.

Çizelge 4.2. 5x isothermal reaction buffer bileşenleri.

Bileşen	Konsantrasyon	Miktar	Son konsantrasyon
Tris-HCl, pH 7.5	1 M	2 ml	500 mM
MgCl ₂	1 M	200 µl	50 mM
dATP	100 mM	40 µl	1 mM
dCTP	100 mM	40 µl	1 mM
dGTP	100 mM	40 µL	1 mM
dTTP	100 mM	40 µL	1 mM
DTT	1 M	200 µL	50 mM
PEG-8000	-	1 g	%25
NAD ⁺	100 mM	200 µL	5 mM
H ₂ O	-	4 ml'ye tamamla	

Assembly master miks karışımı hazırlandıktan sonra 7,5 µl alikotlanarak kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi. İzotermal 5X tampona Çizelge 4.3.'teki enzimler eklendi ve kullanılıncaya kadar bu karışımlar -20 °C'de saklandı. Ardından, vektör ve insert DNA'ları bu karışıma eklendi ve bakteriyel transformasyon aşamasıyla devam edildi.

Çizelge 4.3. 1.33x assembly master miks bileşenleri.

Bileşen	Konsantrasyon	Miktar	Son konsantrasyon (+DNA)
5x isothermal rxn buffer	5x	100 µl	1x
Taq DNA Ligase	40 U/µl	50 µl	4U/µl
T5 Exonuclease	1 U/µl	2 µl	4U/ml
Q5 Hi-Fi DNA Polymerase	2 U/µl	6.25 µl	5U/ml
H ₂ O		216.75 µl	
Toplam		375 µl	

4.2. YÖNTEM

4.2.1. PRİMER TASARIMI

Primerler 5' uçlarından vektör veya inserte uygun yaklaşık 50 bp homolojiye sahiptir ve 3' uçlarından amplifikasyon için DNA fragmanına özgü yaklaşık 25 bp içermektedir (Çizelge 4.4.). SLiCE benzeri bu klonlama için kullanılacak vektör ve insert DNA'ları PCR amplifikasyonu ile lineerize edildi. PCR ürünleri DpnI sindiriminden sonra klonlama öncesinde saflaştırıldı.



Çizelge 4.4. Çalışmada kullanılan primer çiftleri.

Primer	5'-3' sekans
pcDNA3_F	TCGCGAAGGAGGAAGGAGGCTGAGG
pcDNA3_R	GAATTCGCTTAAGTTTAAACGCTAGG
68_pcDNA3_F	CTAGCGTTTAACTTAAGCGAATTCCTGAGGCCCTGAGTCAG
68_pcDNA3_R	CCTCGATCTTGTTTTCCATGGTGGCAGCGCTATGGCTGAACCGCCTC
CCHFV_NP_F	GCCACCATGGAACAAGATCGAGG
CCHFV_NP_R	CCTCAGCCTCCTTCCTTCGCGAAGGAGGAGAAAAGCTGAA
seqinsert_pcDNA3_F	AAACAAATAGGGGTTCCGCG
seqinsert_pcDNA3_R	CTGGCAACTAGAAGGCACAG
hbd_vec_R	GCTAGCCAGCTTGaGTCTaactgacgggcaccggag
hbd_cmv_F	ttAGACtCAAGCTGGCTAGCcttcgcatgtacgggcc
car_ruby_hpgk_F	taacgcgttaagtcgaca
hbd_ins_R	attgtcgacttaacgcgttagggtttaacgggcctc
cmv_prpmoter_3'_R	gagctctgcttatatagacc
seq_hbd_F	cgtttcagaccacctcc
h3bd1	aagctggagacgtggaggagaacctggacctggcatcatcaacacctgcagaagtactactgcagggtgag gggcggcagggtgcgccg
h3bd2	gcagcacttctgccccctgtgctgcacttgcgatctgctcctctgggcaggcagctcagcacggcgacactg ccgccccctcacct
hbd3	cagcaccaggggcaggaagtgtcgcaggaggaagaaggccgctacagcgcttaagatatcgcgccgctc gagcctagaggccccgtt
MTSAIGILPV_ins	ctgcaggaggaagaaggccgctacatgaccagcgccatcgccatcctgcccgtgtaaagatatcgcgccgct cgagcc
E1_SLi_F	aggaggaagaaggccgctacgccacagatgatgcac
E1_SLi_R	ctcgagcggccgcgatatctttacatgtctgacagcatttctt
E2_ins_1	aggaggaagaaggccgctacgccacagatgatgcacagaaggactccatctatgcatcggtctagtgaagc aaccaagtaaagatatcgcgccgctcgag
E2_ins_2	ctcgagcggccgcgatatctttacttggttgcttcactagagccgatgcatagatggagtcttctgtgcatcatctg tggcgtaggcgcccttctcctcct
E3_SLi_F	aggaggaagaaggccgctacttccgtgtcaacgaaac
E3_SLi_R	ctcgagcggccgcgatatctttacatgtctgacagcatttctt
E4_ins_1	aggaggaagaaggccgctacgaaattgtgatgtctgttaaagaaatgtaaagatatcgcgccgctcgag
E4_ins_2	ctcgagcggccgcgatatctttacatttcttaacagacatcacaatttcgtaggcggccttctcctcct
NP_SLi_F	ggaggaagaaggccgctacatggaaaacaagatcgaggt
NP_SLi_R	gagcggccgcgatatctttagatgatgttggcactgg
seq_NPattern_R	gctggccatctggaacac
seq_E2_R	cttggttgcttcactagagc
seq_E3_R	catgtctgacagcatttcttaacag
seq_E4_R	catttcttaacagacatcacaatttc
seq_MTSAl_R	cacgggcaggatgccgat
seq_carruby_F	ggtggtcatggaagggtcgg
seq_bgh_R	gcctgctattgtctccc
seq_Cas13U6_F	ggtaggcgttttgcgc

4.2.2. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

Klonlama için tasarlanan ve Çizelge 4.5.'te verilen primer çiftleri kullanılarak vektör ve insertler uygun şartlarda amplifiye edildi. Reaksiyon şartları, bileşenlere ve kullanılan düşük hata oranına sahip DNA polimerazlara (NEB M0491 ve M0530) bağlı olarak standart protokoller doğrultusunda optimize edildi.

4.2.3. KLONLAMA VE TRANSFORMASYON

İnsertler uygun primerlerle amplifiye edildikten sonra klonlama için uygun hale getirildi. Ardından SLiCE (Çizelge 4.6.) ve Gibson reaksiyonları (Çizelge 4.7.) uygun inkübasyonların ardından, ligasyon ürünlerinden 1 µl, 100 µl DH5a kompetan hücreye transforme edildi ve Amp⁺ LB agara ekildi.

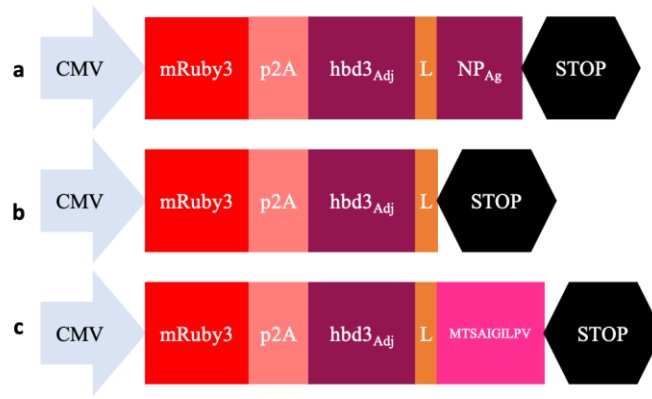
Çizelge 4.5. SLiCE reaksiyonu bileşenleri ve şartları.

Bileşenler	Çalışan miktarlar
Vektör DNA'sı (saflaştırılmış)	50-100 ng
İnsert DNA'sı (varsa birden fazla)	vektör/insert oranına göre (1:1-5:1)
SLiCE lizati	1 µl
T4 DNA Ligaz tampon (NEB B0202S)	1 µl
Total hacim	10 µl
37°C'de 20 dakika inkübasyon	

Çizelge 4.6. Klonlama reaksiyonu bileşenleri ve şartları.

Bileşenler	Çalışan miktarlar
Vektör DNA'sı	100 ng ($\leq 1\mu\text{l}$)
İnsert DNA'ları	Kalan hacim
Gibson master mix	7,5 µl
Total hacim	10 µl
50°C'de 15-60 dakika aralığında inkübasyon	

Şekil 4.1.'de şematize edilen vektörlere benzer şekilde yine CMV promotorunun kontrolü altında, Lentivirüs üretiminde kullanılacak olan vektörler Gibson klonlama yöntemi kullanılarak klonlandı.



Şekil 4.1. THP-1 hücrelerinde ifade ettirilecek gen kasetleri. a) Antijenik epitoplari ifadeleyecek kaset. b) Negatif kontrol gen kaseti. c) Pozitif kontrol gen kaseti. **CMV**: memeli promotörü; **p2A**: p2A dizisi; **hbd3_{Adj}**: human β -3 defensin peptit adjuvan; **L**: AAY linker; **NP_{Ag}**: antijenik epitop; **STOP**: translasyon sonlanma sinyali; süper-agonist MTSAIGILPV peptidi.

4.2.4. SPİN-KOLON BAZLI PLAZMİT DNA İZOLASYON YÖNTEMLERİ

Hücreye ve hayvanlara verilecek olan plazmit DNA'ların saf ve yüksek konsatrasyonda olması gereksinimleri nedeniyle, MN (740588) ve QIAGEN mini ve midi skala plazmit izolasyon kitleri üretici protokolüne uygun olarak kullanıldı. Elde edilen pDNA'lar uygun enzimlerle linearize edildikten sonra agaroz jelde kontrol edildi.

4.2.5. HÜCRE KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI

4.2.5.1. Transfeksiyon

Süspanse hücreler olarak THP-1 ve Jurkat hücrelerinin transfeksiyonu oldukça zordur. Bu hücrelere ilgili plazmit DNA'larının aktarımında birçok metot denendikten sonra, Lentiviral plazmit sistemiyle hücrelere aktarım gerçekleştirildi. Lentivirüs sisteminde kullanılan envelope ve packaging vektör (gag-pol) DNA'larının (Addgene #135992) hedef hücre olan HEKtrex'e transfeksiyonun ardından üretilen Lentivirüs'ler toplanıp konsantre edildikten sonra THP-1 hücrelerine verildi. NF-kB ifadeleyen Jurkat hücrelerinin uyarımı ise sadece ionomycin (25 ng, optimizasyonun ardından seçilen en düşük konsantrasyon) ile sağlandı.

HEKtrex hücreleri için, adherent hücreleri verimli bir şekilde transfekte edebilen PEI kullanıldı. DNA:PEI oranı, yapılan optimizasyonların ardından 1:3 olarak tespit edildi ve çalışma süresince bu oran bu hücrelerin transfeksiyonu için kullanıldı.

4.2.5.2. Ni-Rezin Aracılı Protein Saflaştırma

BL21 hücrelerinde protein izolasyonu için kültüre edilen pET28+-N₁ bakteri hücrelerinin peletlenmesinin ardından, RİPA buffer ile lize edilerek total protein elde edildi. Buz ile soğutulan sonik su banyosunda hücrelerin 10 kez 30'ar saniye aralıklarla sonikasyonu yapıldı. Elde edilen lizat 14.000 rpm 4 °C'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant yeni ependorf tüpe aktarıldı. Bu aşamada SDS-PAGE için örnek ayrıldı. Protein saflaştırılması için HisPure Ni-NTA Purification Kit (Thermo Scientific) kullanıldı. Bir kolon için 6 ml equilibration buffer (1 ml 10X PBS, 50 µl 2M imidazol, 8,95 ml ddH₂O) ve 1,5 ml wash buffer (1 ml 10X PBS, 125 µl 2M imidazol, 8,875 ml ddH₂O) kullanıldı. Kolonun alt emzik kısmı açılarak 50 ml falkon tüpe oturtuldu ve kolon 700g 4°C'de 2 dakika santrifüj edilerek içindeki buffer uzaklaştırıldı. Ardından kolona 6 ml dengeleme tamponu eklendi. Buffer eklendikten ve santrifüje koymadan önce kolon altından ilk damlanın geldiği gözlemlendi. Kolon 700 g 4 °C'de 2 dakika santrifüj edildi. Bu esnada 5 ml protein örneği üzerine 50 µl 2 mM imidazol ve 100 µl 10X PBS eklendi. Santrifüj sonrası kolon alındı ve altları emzikle kapatıldı. Kolona protein örnekleri eklendi ve kolon buz içerisinde 45 dakika sallanmaya bırakıldı. Ardından kolon temiz 50 ml falkon tüpe oturtuldu. Kolon 700 g 4 °C'de 2 dakika santrifüj edildi. Bu aşamada santrifüj sonrası falkon tüpe inen eluattan SDS-PAGE için örnek ayrıldı ve kalan eluat uzaklaştırıldı. Kolon üzerine yıkama için 1.5 ml wash buffer eklendi. Kolon 700 g 4°C'de 2 dakika santrifüj edildi. Bu aşama 2 kez daha tekrar edildi. Her yıkamadan sonra santrifüj sonrası falkon tüpe inen eluattan SDS-PAGE için örnek ayrıldı ve kalan eluat uzaklaştırıldı. Bir kolon için 500 µl elution buffer (1 ml 10X PBS, 1,25 ml 2M imidazol, 7,75 ml ddH₂O) kolona eklendi ve kolon yeni ve temiz 50 ml falkon tüpe oturtuldu. Kolon 700 g 4 °C'de 2 dakika santrifüj edildi. İkinci kez aynı elüat kolondan geçirildi. Santrifüj sonrası falkon tüpe inen eluattan SDS-PAGE için ve Bradford testi için örnek ayrıldı.

4.2.5.3. Bradford Testi ile Total Protein Miktar Tayini

Standart olarak, bakteriden elde edilen protein ölçümleri için BSA kullanıldı. BSA'dan 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,0625 mg/ml ve 0,03125 mg/ml'lik standart protein çözeltileri steril su ile hazırlandı. Konsantrasyonu ölçülecek protein örnekleri uygun konsantrasyonda dilüe edildi. Dilüsyonu yapılan örnekler 96 kuyulu

plakanın her bir kuyusuna 20 µl olacak şekilde üç tekrarlı olarak eklendi. Aynı şekilde standart protein çözeltileri de üç tekrarlı olarak her kuyuya 20 µl dağıtıldı. Bradford reaktifinden (5X) steril suyla hazırlanan 1X hazırlanan kullanıl dilüsyonundan her kuyuya 100 µl ilave edildi. Plate 37 °C’de 30 dakika karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 595 nm’de spektrofotometrik ölçüm yapıldı. Sonuçlar standart eğrilerle analiz edilerek protein konsantrasyonları belirlendi.

4.2.5.3.1. Proteinlerin SDS-PAGE ile Ayrılması

SDS jel elektroforezi için Thermo Scientific firmasının PageRuler Prestained Protein Ladder (Kat. No: 26616) markeri kullanıldı. Hazırlanan örnekten 20 µl, markerden 5 µl kuyucuklara yüklendi. Jel önce proteinlerin ayırma jeline kadar yığılması için 50 voltta 1 saat, sonra proteinin moleküler ağırlığına göre ayrılması için 100 voltta birkaç saat daha yürütüldü.

4.2.5.3.2. Proteinlerin PVDF Membrana Transferi

Yarı kuru transfer işlemleri için BioRad Trans-Blot Modülü kullanıldı. SDS-PAGE sonrası jel bulunduğu kasetten dikkatlice ayrıldı. Ayrılan jel kurumaması için 1X ıslak transfer tamponu içerisine bırakıldı. PVDF membran jel boyutlarında kesilip %100 metanol içerisinde 1-2 dakika aktifleştirildi. Ardından 1X ıslak transfer tamponundan geçirildi. Bu sırada transfer sandviçi hazırlandı. Sandviç üzerinden merdane ile geçilerek olası hava kabarcıkları giderildi. Sonrasında sisteme 25 V’da 1,5 saat süre elektrik uygulanarak proteinlerin PVDF membrana transferi sağlandı.

4.2.5.3.3. Bloklama

Transfer işlemi sonrasında membran temiz ve boş cam kaba alındı. Üzerine 50 ml %5 BSA (%0,025 Tween-20 içeren 1X TBS’de hazırlanmış) solüsyonu eklendi. Membran çalkalayıcı üzerinde 4°C’de gece boyunca inkübe edildi. Sonunda bloklama solüsyonu membran üzerinden uzaklaştırıldı.

4.2.5.3.4. Primer Antikor ile İşaretleme

Bloklama sonrası membranı primer antikor ile işaretleme için, uygun primer antikor (insan KKKA konvalesan serumu) %5 BSA solüsyonu içerisinde 1:10 dilüsyonda hazırlanarak

toplam 10 ml hacimde membran üzerine eklendi ve 4°C’de orbital çalkalayıcıda düşük devirde gece boyu inkübe edildi.

4.2.5.3.5. Sekonder Antikor ile İşaretleme ve Görüntüleme

Gece boyu primer antikor ile işaretleme sonrası ertesi gün primer antikor membran üzerinden uzaklaştırıldı. Membran 3 kez 5’şer dakika 1X TBS-T solüsyonu ile çalkalayıcı üzerinde çalkalanarak yıkandı. Sonrasında, uygun sekonder antikor (anti-human IgG) 1:1000 dilüsyonda hazırlanarak toplam 10 ml hacimde membran üzerine eklendi ve oda ısısında ve karanlıkta çalkalayıcıda bir saat inkübe edildi. Inkübasyon sonrası membran 3 kez 5’şer dakika 1X TBS-T solüsyonu ile çalkalayıcı üzerinde çalkalanarak yıkandı. Yıkama sonrası membran kemiluminesans solüsyon ile kaplandı ve BioRad ChemiDoc sisteminde Chemi kanalında kemiluminesans görüntüleme yapıldı.

4.2.5.3.6. Coomassie Blue Boyaması

SDS-PAGE ile yürütülen jel temiz ve boş cam bir kaba alındı. Jelin üzerine 20 ml fiksasyon solüsyonu (%40 ddH₂O, %10 asetik asit, %50 metanol) eklendi ve 45 dakika oda ısısında düşük devirde çalkalanarak inkübe edildi. Ardından jel üzerinden fiksasyon solüsyonu uzaklaştırıldı. Jel üzerine 20 ml Coomassie Blue boya solüsyonu (%40 ddH₂O, %10 asetik asit, %50 metanol, %0,25 Coomassie Brilliant Blue R-250) eklendi. Oda sıcaklığında çalkalayıcıda düşük devirde birkaç saat inkübe edildi. Boya jel üzerinden uzaklaştırıldı. Jel, oda ısısında çalkalayıcı üzerinde bantlar net olarak görülene kadar boya giderici solüsyon (%67,5 ddH₂O, %7,5 asetik asit, %25 metanol) ile yıkandı. Bantlar belirginleşince jel görüntülendi.

4.3. IFNAR^{-/-} VE BALB/C FARELERDE İMMÜNİZASYON VE VİRÜS TEHDİDİ ÇALIŞMALARI

Enfektif KKKAV ile yapılan tüm çalışmalar Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yüksek Güvenlikli Viral Zoonozlar Tanı ve İleri Araştırma Laboratuvarı bünyesindeki ABSL3 laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Araştırma kapsamında yapılan hayvan deneyleri, Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul tarafından 18.03.2020 tarihli 2020-6-54 karar numarasıyla onaylandı. Bu çalışmada, 40 adet 8-10 haftalık IFNAR^{-/-} dişi fare ve

16 adet 8-10 haftalık Balb/c dişi fare kullanıldı. Hayvanlar, kontrollü nem, sıcaklık ve ışık koşulları (8 saat aydınlık/16 saat karanlık döngüsü) altında, ticari olarak temin edilebilen fare yemi ve yeterince suyla hepa filtreli giriş ve çıkış hava beslemeli bir izolator-kafes sistemi içinde gruplar halinde ABSL3+ laboratuvarında barındırıldı. Hayvanların vücut ağırlıkları gruplar içinde birbirine çok yakın tutularak, virüs tehdidinden sonra vücut ağırlığı değişimleri her gün kaydedildi. Hayvanlar günde en az iki kez (ilaveten enfeksiyon öncesi ve sonrası) izlendi. Deney sonlandırma çalışmaları insani uygulamayla gerçekleştirildi.

Aşılama sırasında hayvanlara ketamin-HCl ile ksilazin-HCl kombinasyonunu içeren anestezi uygulandı. Aşılama, enjeksiyon bölgesinin dezenfekte edilmesi ve ardından nükleaz içermeyen suyla seyreltilmiş 50 ug plazmid DNA'nın kuadriseps kasına enjeksiyonu yoluyla gerçekleştirildi. Hayvanlara 2 hafta aralıklarla toplam 2 kez aşılama uygulandı. Hayvanlar, aşılamalardan sonra gün boyunca kontrol edildi ve davranışları takip edildi. Negatif grup hayvanları sadece nükleaz içermeyen suyla aşılandı. Her aşılama öncesinde yeterli miktarda hayvanlardan kan örnekleri alındı.

Aşılanmış gruplara, aşılama sonrası virüs tehdidi, KKKAV-Ank-2 suşu (Acc No MK309333) ile gerçekleştirildi. Bu amaçla hayvanlara 100 LD₅₀ titre değerinde KKKAV 100 µl hacimde subkutan yolla verildi.

4.4. Q-PCR İLE DOKULARDAKİ VİRÜS YÜKÜNÜN TESPİTİ

Virüs tehdidiyle zorlanan IFNAR^{-/-} fare organlarından (dalak ve karaciğer) toplam RNA'lar, üreticinin talimatlarına uygun olarak PureZOL kullanılarak ekstre edildi. Kısaca, homojenizatörle mekanik olarak parçalanmış doku örnekleri bir trizol reaktifinde (1 mL/50-100 mg doku) homojenleştirildi ve ardından 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra 0.2 mL kloroform ilave edildi ve 15 saniye boyunca kuvvetlice karıştırıldı. Elde edilen karışım oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi ve 12.000 g'de 15 dakika 4°C'de santrifüj edildi. Üst faz yeni bir tüpe aktarıldı ve RNA'lar, 0,5 ml izopropanol ile karıştırılarak çöktürüldü. Numuneler daha sonra oda sıcaklığında 5 dakika süreyle inkübasyonun ardından 12.000 x g'de 10 dakika boyunca 4 °C'de santrifüj edildi. RNA peleti 1 ml %75 etanol ile yıkandı ve 7500 g'de 5 dakika boyunca 4 °C'de santrifüjlendi ve moleküler kalitede ultrasaf su içerisinde çözüldü. Kantitatif PCR (qPCR) analizleri, Rotor-Gene Q cihazı ve Luna® Universal One-Step RT-qPCR Kit kullanılarak gerçekleştirildi. Nihai ana karışım (20 µl),

10 µl 2X reaksiyon karışımı, 1 µl enzim, primerlerden 0.8 µl (0.4 µM son konsantrasyonda) ve 1 ug total RNA olarak hazırlandı. Reaksiyon, 10 dakika boyunca 55°C (revers transkripsiyon), 1 dakika boyunca 95°C (başlangıç denatürasyon), ardından 10 saniye boyunca 95°C (denatürasyon) ve 30 saniye boyunca 60 °C'lik (uzama) 40 döngü olarak gerçekleştirildi.

4.5. SİTOKİN ANALİZİ

Üç hafta arayla iki kez bağışıklanmış Balb/c farelerden alınan dalaklardan izole edilen splenositler, kuyucuk başına 1×10^6 hücre olacak şekilde 6-kuyucuklu hücre kültürü plakalarına dağıtıldı. Splenosit hücreleri inkubasyonun başlangıcından 1 saat sonra 10 moi dozda KKKAV Ank-2 suşu ile enfekte edildi. Enfekte olmuş hücreler 24-72 saat aralığında 37 °C'de ve %5 CO₂ atmosferinde inkübe edildi ve bu saat aralıklarında kültür süpernatantları toplandı ve kullanıma kadar -80 °C'de saklandı.

4.5.1. IFN-GAMA ELISPOT

IFN- γ yanıtlarının değerlendirilmesi için Mabtech Mouse IFN- γ (HRP) (3321-4HPW-2) kiti kullanıldı ve analiz üreticinin yönergelerine uygun olarak gerçekleştirildi.

ELISPOT test tableti, steril koşullarda olmak şartıyla, 4 kez 200 µl/kuyucuk olacak şekilde steril PBS ile yıkandı. Yıkamanın ardından %10 FBS içeren besiyeri 200 µl/kuyucuk olacak şekilde kuyucuklara dağıtıldı ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından, besiyerinin kuyucuklardan uzaklaştırılmasıyla 100'er µl kuyucuklara eklendi. Test Tableti, 48 saat boyunca 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatöre inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra, hücrelerin kuyucuklardan uzaklaştırılmasıyla plate 5 kez steril PBS ile (200 µl/kuyucuk) ile yıkandı. FBS (%0,5) içeren PBS'te hazırlanan saptama antikoru (R4-6A2-biotin) 1 µg/ml konsantrasyonda hazırlanıp, her kuyuya 100 µl olarak dağıtıldı. Tablet, oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakıldı ve ardından test tableti 5 kez steril PBS ile (200 µl/kuyucuk) ile yıkandı. Yıkamadan sonra, her kuyuya 100'er µl kullanıma hazır TMB substratı eklendi. Yarım saat süre ile oda sıcaklığında yapılan inkübasyonun ardından renk oluşumunu durdurmak için tablet yeterince steril deiyonize suyla yıkandı. Test tableti gece boyu laminar kabin içerisinde kurumaya bırakıldı. Ertesi

gün, Agilent BioTek Cytation 7 cihazında 450 nm dalga boyunda okutuldu ve spotların mikroskop görüntüleri 4X büyütmede görüntülendi.

4.5.2. AKIŞ SİTOMETRİSİ

Biolegend LEGENDplex Mu Th1/Th2 Panel (8-plex) kiti kullanılarak IFN- γ , IL-5, TNF- α , IL-2, IL-6, IL-4, IL-10, IL-13 sitokinleri bu çalışma kapsamında değerlendirildi. Analiz üretici yönergelerine uygun şekilde gerçekleştirildi.

Analiz V-tabanlı tablet içinde gerçekleştirildi. Deney başlangıcından önce standartlar ve 1X yıkama tamponu hazırlandı. Sonik su banyosunda 1 dakika bekletilen sitokin boncukları 30 saniye vortekslendikten sonra ve assay buffer ile 13X'den 1X'e seyreltilerek hazırlandılar. Ayrıca standart koktely de çözüldükten sonra 10 dakika kadar oda sıcaklığında bekletildi. Standart tüplerine 75 μ l assay buffer eklendi ve seri dilüsyonla standart tüpleri hazırlandı. 25 μ l assay buffer içeren kuyucuklara örneklerden 25 μ l iki tekrarlı olacak şekilde eklendi ve yeniden vortekslenen 1X sitokin boncuklarından 25 μ l de her göze eklendikten sonra 2 saat oda sıcaklığında plateler çalkalandı (orbital shaker, 800 rpm). Çalkalamanın ardından tabletler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Tabletler ters çevrilerek kuyucuklardaki örnekler uzaklaştırıldı. Peçete üzerine yavaş vurmalarla tabletler tamamen kurutuldu. Kuyucuk başına 150 μ l 1X yıkama tamponu eklendi ve ardından santrifüj (1000 rpm'de 5 dakika) yapıldı ve tampon uzaklaştırıldı. Bu basamak 2 kez tekrarlandı. Kuyucuk başına 25 μ l saptama antikoru eklendi ve tabletler kaplanarak 1 saat oda sıcaklığında çalkalandı. İnkübasyonun ardından, yıkama yapılmadan her kuyucuğa 25 μ l SA-PE eklendi ve yarım saat daha oda sıcaklığında çalkalanmaya terk edildi. Tabletler 1X yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra 150 μ l 1X yıkama tamponu kuyucuklara eklendi ve iyi bir pipetasyonun ardından okuma öncesi tüplere alındı. Beckman Cytoflex cihazında örnekler okutuldu ve LEGENDplex Data Analysis Software Suite kullanılarak analiz edildi.

4.5.3. ENZİM BAĞLANTILI İMMÜNOSORBENT ANALİZİ (ELISA)

Aşılama gruplarıyla aşılınmış IFNAR^{-/-} ve Balb/c farelerde spesifik antikor yanıtlarını indüklemeye potansiyelini tespit etmek için enzim bağlantılı immünosorbent (ELISA) geliştirildi. Kısaca, 1 moi Ank-2 suşu içeren enfekte Vero-E6 hücreleri, inokulasyondan 4 gün sonra toplandı ve hücre lizatu, ELISA antijeni olarak kullanıldı. Ayrıca, rekombinant olarak üretilen KKKAV NP'i de ELISA antijeni olarak kullanıldı. PBS içinde hazırlanan 1

μg rekombinant protein ya da enfekte hücre lizatı düz tabanlı 96 oyuklu tablet gözlerine 50 μg miktarda ilave edildi ve gece boyunca 4°C'de inkübe edildi. Ertesi gün, bağışıklanmış IFNAR^{-/-} farelerinden 2 kat hazırlanan seri dilüsyonlarla seyreltilmiş serum örnekleri (14 ve 28. günde) her bir test gözüne ilave edildi. ELISA tableti 1,5 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra 1/15.000 seyreltilmiş anti-fare IgG-HRP antikoru eklendi ve oda sıcaklığında 1 saat daha inkübe edildi. İnkubasyon sonrasında 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin substratı eklendi (TMB). Son olarak reaksiyon 2M sülfirik asit eklenerek durduruldu. Test tabletleri 450 nm spektrometrede okunarak OD değerleri her örnek için değerlendirilmek üzere kaydedildi.



5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. BİYOİNFORMATİK ANALİZLERLE AŞI VEKTÖRLERİNİN BELİRLENMESİ

Aşı adayı olarak değerlendirilecek MHC-I epitoplarının seçimi için, skorlarıyla ve HLA tipleriyle sunulan tahmini MHC-I epitoplarına ait veriler Çizelge 5.1. ve 5.2.'de gösterildi.

Çizelge 5.1. KKKAV-NP karşı bağlanma afinitesi olan MHC-I epitoplarının NetMHC 4.0 veri tabanı aracılığı tahmini.

Allele	Peptide	Score	Percentile Rank
HLA-A*01:01	LVDTFTNSY	0.993204	0.01
HLA-A*01:01	IDTAFSSYY	0.493413	0.39
HLA-A*01:01	QIDTAFSSY	0.970015	0.02
HLA-A*01:01	LSNKVLAEY	0.896224	0.08
HLA-A*01:01	KTVEALNGY	0.607245	0.28
HLA-A*01:01	HIAKAQELY	0.702644	0.2
HLA-A*01:01	GLVDTFTNSY	0.905531	0.07
HLA-A*01:01	QIDTAFSSYY	0.959414	0.04
HLA-A*01:01	LVDTFTNSYS	0.586191	0.3
HLA-A*01:01	AQIDTAFSSY	0.850279	0.11
HLA-A*01:01	ALSNKVLAEY	0.549241	0.33
HLA-A*01:01	GTIKSWDESY	0.440396	0.47
HLA-A*01:01	DTAFSSYYWLY	0.509498	0.37
HLA-A*01:01	ATDDAQKDSIY	0.987467	0.01
HLA-A*01:01	NGLVDTFTNSY	0.830019	0.12
HLA-A*01:01	SAQIDTAFSSY	0.796317	0.14
HLA-A*02:01	YLDKHKDEV	0.899315	0.04
HLA-A*02:01	YMHPAVLTA	0.881028	0.06
HLA-A*02:01	NLDRFVFQM	0.587772	0.28
HLA-A*02:01	NLLKHIKA	0.538669	0.33
HLA-A*02:01	KTIVKLFEV	0.494662	0.38
HLA-A*02:01	VTPETFPTV	0.488594	0.38
HLA-A*02:06	YMHPAVLTA	0.820639	0.08
HLA-A*02:06	VTPETFPTV	0.787122	0.09
HLA-A*02:06	YLDKHKDEV	0.742005	0.11
HLA-A*02:06	KTIVKLFEV	0.72414	0.12
HLA-A*02:06	TVSQFLFEL	0.486154	0.32
HLA-A*02:06	LVATGLAKL	0.429845	0.41
HLA-A*02:06	KVPGEIVMSV	0.578689	0.23
HLA-A*02:06	GVTETFPTV	0.501617	0.31
HLA-A*03:01	ALVATGLAK	0.852154	0.04

Çizelge 5.1. (devam)

HLA-A*03:01	LLHQSLVGK	0.786364	0.08
HLA-A*03:01	VSSTGIVKK	0.699535	0.14
HLA-A*03:01	SQFLFELGK	0.45137	0.39
HLA-A*03:01	KALLSTPMK	0.571541	0.25
HLA-A*03:01	ASALVEATK	0.536735	0.29
HLA-A*03:01	IVKLFEVQK	0.529966	0.3
HLA-A*03:01	ALNGYLDKHK	0.50004	0.33
HLA-A*03:01	HLLHQSLVGK	0.483692	0.34
HLA-A*03:01	HIAKAQELYK	0.644565	0.18
HLA-A*03:01	AWVSSTGIVK	0.586723	0.23
HLA-A*03:01	IALVATGLAK	0.416852	0.43
HLA-A*03:01	ALSNKVLAEY	0.39939	0.48
HLA-A*03:01	ALSNKVLAEYK	0.386307	0.49
HLA-A*03:01	ALLSTPMKWGK	0.541885	0.28
HLA-A*11:01	VSSTGIVKK	0.860106	0.04
HLA-A*11:01	ASALVEATK	0.785538	0.08
HLA-A*11:01	ALVATGLAK	0.716099	0.13
HLA-A*11:01	KALLSTPMK	0.667678	0.17
HLA-A*11:01	IAKAQELYK	0.424309	0.45
HLA-A*11:01	SQFLFELGK	0.655228	0.18
HLA-A*11:01	KTVEALNGY	0.616912	0.22
HLA-A*11:01	AAQGSHTK	0.605948	0.23
HLA-A*11:01	IVKLFEVQK	0.599784	0.23
HLA-A*11:01	WVSSTGIVK	0.500201	0.33
HLA-A*11:01	FSSYYWLYK	0.498112	0.34
HLA-A*11:01	LLHQSLVGK	0.453419	0.39
HLA-A*11:01	WVSSTGIVKK	0.430911	0.45
HLA-A*11:01	HIAKAQELYK	0.591108	0.24
HLA-A*11:01	AWVSSTGIVK	0.659144	0.18
HLA-A*11:01	AWVSSTGIVKK	0.408575	0.48
HLA-A*23:01	GYQQAALKW	0.826919	0.09
HLA-A*23:01	ALLSTPMKW	0.416076	0.47
HLA-A*23:01	TFPTVSQFL	0.68308	0.17
HLA-A*23:01	KWGKKLYEL	0.550427	0.29
HLA-A*23:01	SWDESYTEL	0.496271	0.37
HLA-A*23:01	TFPTVSQFLF	0.87924	0.07
HLA-A*23:01	KWGKKLYELF	0.550539	0.29
HLA-A*23:01	TGYQQAALKW	0.490539	0.38
HLA-A*23:01	LYELFADDSF	0.485294	0.38
HLA-A*23:01	KYIMAFNPPW	0.422782	0.45
HLA-A*23:01	LYKAGVTPETF	0.649055	0.19
HLA-A*24:02	GYQQAALKW	0.833483	0.09
HLA-A*24:02	KWGKKLYEL	0.669753	0.21

Çizelge 5.1. (devam)

HLA-A*24:02	TFPTVSQFL	0.768682	0.13
HLA-A*24:02	SWDESYTEL	0.589548	0.29
HLA-A*24:02	KWGKKLYELF	0.666664	0.21
HLA-A*24:02	KYIMAFNPPW	0.453057	0.45
HLA-A*24:02	TGYQQAALKW	0.565447	0.31
HLA-A*24:02	LYELFADDSF	0.505421	0.39
HLA-A*24:02	TFPTVSQFLF	0.928261	0.04
HLA-A*24:02	LYKAGVTPETF	0.749375	0.15
HLA-A*25:01	ETFPTVSQF	0.925043	0.01
HLA-A*25:01	DTFTNSYSF	0.686178	0.01
HLA-A*25:01	KTVEALNGY	0.420014	0.05
HLA-A*25:01	DTAFSSYYW	0.386981	0.06
HLA-A*25:01	ESVPNLDRF	0.342815	0.09
HLA-A*25:01	EIVMSVKEM	0.304987	0.1
HLA-A*25:01	DSFQQNRIY	0.284774	0.12
HLA-A*25:01	HIAKAQELY	0.283293	0.12
HLA-A*25:01	LTAGRISEM	0.278739	0.12
HLA-A*25:01	TIKSWDESY	0.204059	0.19
HLA-A*25:01	ELYKNSSAL	0.152088	0.27
HLA-A*25:01	QIDTAFSSY	0.144207	0.28
HLA-A*25:01	LVDTFTNSY	0.143071	0.28
HLA-A*25:01	QSAQIDTAF	0.180153	0.22
HLA-A*25:01	EAKKTVEAL	0.136675	0.29
HLA-A*25:01	LSNKVLAHEY	0.125323	0.33
HLA-A*25:01	YIMAFNPPW	0.120317	0.34
HLA-A*25:01	DSIYASALV	0.097201	0.44
HLA-A*25:01	DIVASEHLL	0.094896	0.46
HLA-A*25:01	ETFPTVSQFL	0.169234	0.24
HLA-A*25:01	PETFPTVSQF	0.155208	0.26
HLA-A*25:01	FVKGKYIMAF	0.142267	0.28
HLA-A*25:01	AQIDTAFSSY	0.09107	0.48
HLA-A*25:01	DVPKIEQLTGY	0.247579	0.14
HLA-A*25:01	ETFPTVSQFLF	0.182726	0.22
HLA-A*26:01	ETFPTVSQF	0.966343	0.01
HLA-A*26:01	DTFTNSYSF	0.8193	0.03
HLA-A*26:01	KTVEALNGY	0.714531	0.05
HLA-A*26:01	EIVMSVKEM	0.637006	0.08
HLA-A*26:01	HIAKAQELY	0.624127	0.08
HLA-A*26:01	LTAGRISEM	0.623531	0.08
HLA-A*26:01	DTAFSSYYW	0.310478	0.26
HLA-A*26:01	ESVPNLDRF	0.494652	0.13
HLA-A*26:01	DSFQQNRIY	0.451591	0.16
HLA-A*26:01	TIKSWDESY	0.419654	0.17

Çizelge 5.1. (devam)

HLA-A*26:01	ELYKNSSAL	0.186386	0.47
HLA-A*26:01	QIDTAFSSY	0.365394	0.21
HLA-A*26:01	QSAQIDTAF	0.254385	0.35
HLA-A*26:01	LVDTFTNSY	0.341931	0.22
HLA-A*26:01	LSNKVLAEY	0.297681	0.27
HLA-A*26:01	SVKEMLSDM	0.242781	0.37
HLA-A*26:01	FVKGKYIMAF	0.293824	0.28
HLA-A*26:01	KKTVEALNGY	0.273882	0.31
HLA-A*26:01	GLVDTFTNSY	0.259804	0.34
HLA-A*26:01	ETFPTVSQFL	0.297154	0.27
HLA-A*26:01	AQIDTAFSSY	0.202594	0.43
HLA-A*26:01	PETFTVSQF	0.351657	0.22
HLA-A*26:01	DVPKIEQLTGY	0.810356	0.03
HLA-A*26:01	ETFPTVSQFLF	0.40578	0.18
HLA-A*26:01	AKKTVEALNGY	0.239018	0.37
HLA-A*29:02	AFSSYYWLY	0.92803	0.02
HLA-A*29:02	HIAKAQELY	0.880607	0.04
HLA-A*29:02	LVDTFTNSY	0.783188	0.09
HLA-A*29:02	KTVEALNGY	0.755513	0.11
HLA-A*29:02	QIDTAFSSY	0.671297	0.15
HLA-A*29:02	LSNKVLAEY	0.650917	0.16
HLA-A*29:02	KQSPFQNAY	0.613644	0.17
HLA-A*29:02	TIKSWDESY	0.4615	0.26
HLA-A*29:02	IDTAFSSYY	0.303281	0.43
HLA-A*29:02	IVASEHLLH	0.286904	0.46
HLA-A*29:02	ALSNKVLAEY	0.351189	0.36
HLA-A*29:02	QIDTAFSSYY	0.280555	0.47
HLA-A*29:02	AQIDTAFSSY	0.596303	0.17
HLA-A*29:02	GLVDTFTNSY	0.522089	0.22
HLA-A*29:02	TAFSSYYWLY	0.468821	0.25
HLA-A*29:02	AQIDTAFSSYY	0.451504	0.26
HLA-A*30:01	KALLSTPMK	0.56122	0.05
HLA-A*30:01	AAQSGHTK	0.528262	0.07
HLA-A*30:01	RVNANTAAL	0.487045	0.1
HLA-A*30:01	IAKAQELYK	0.466083	0.1
HLA-A*30:01	IVKLFEVQK	0.395324	0.16
HLA-A*30:01	RIYMHPAVL	0.380876	0.18
HLA-A*30:01	VSSTGIVKK	0.364222	0.21
HLA-A*30:01	KMKKALLST	0.349765	0.24
HLA-A*30:01	ASALVEATK	0.339134	0.27
HLA-A*30:01	LGKQPRGTK	0.329555	0.28
HLA-A*30:01	SGRSGIALV	0.324287	0.29
HLA-A*30:01	ALVATGLAK	0.263382	0.47

Çizelge 5.1. (devam)

HLA-A*30:01	MIRRRNLIL	0.261043	0.48
HLA-A*30:01	KTIVKLFEV	0.260166	0.48
HLA-A*30:01	ALRAQSAQI	0.257547	0.5
HLA-A*30:01	KSGRSGIALV	0.354021	0.23
HLA-A*30:02	KQSPFQNAY	0.888079	0.01
HLA-A*30:02	KTVEALNGY	0.881236	0.01
HLA-A*30:02	LSNKVLAIEY	0.784321	0.03
HLA-A*30:02	HIAKAQELY	0.75729	0.04
HLA-A*30:02	IDTAFSSYY	0.313314	0.47
HLA-A*30:02	LVDTFTNSY	0.663553	0.09
HLA-A*30:02	QIDTAFSSY	0.656045	0.09
HLA-A*30:02	ATKFCAPIY	0.532165	0.18
HLA-A*30:02	AFSSYYWLY	0.524186	0.18
HLA-A*30:02	TIKSWDESY	0.507009	0.19
HLA-A*30:02	GKQSPFQNAY	0.505504	0.19
HLA-A*30:02	GLVDTFTNSY	0.494166	0.21
HLA-A*30:02	KHIAKAQELY	0.486286	0.22
HLA-A*30:02	GTIKSWDESY	0.421056	0.29
HLA-A*30:02	QIDTAFSSYY	0.353227	0.39
HLA-A*30:02	AQIDTAFSSY	0.716541	0.06
HLA-A*30:02	ALSNKVLAIEY	0.576576	0.13
HLA-A*30:02	KKTVEALNGY	0.568572	0.14
HLA-A*30:02	AQIDTAFSSYY	0.489847	0.21
HLA-A*31:01	HTKSILNLR	0.903229	0.01
HLA-A*31:01	MLSDMIRRR	0.577589	0.17
HLA-A*31:01	KWRKDIFGR	0.554062	0.19
HLA-A*31:01	LYKNSSALR	0.550176	0.19
HLA-A*31:01	IVKLFIEVQK	0.373139	0.43
HLA-A*31:01	GHTKSILNLR	0.556538	0.19
HLA-A*32:01	RIYMHPAVL	0.786003	0.02
HLA-A*32:01	ALLSTPMKW	0.779898	0.03
HLA-A*32:01	RVNANTAAL	0.630148	0.07
HLA-A*32:01	KTVEALNGY	0.617783	0.08
HLA-A*32:01	RISEMGVCF	0.605153	0.09
HLA-A*32:01	YIMAFNPPW	0.564707	0.1
HLA-A*32:01	KQSPFQNAY	0.554599	0.1
HLA-A*32:01	ETFPTVSQF	0.436286	0.16
HLA-A*32:01	GIVKKGLEW	0.433896	0.16
HLA-A*32:01	IVMSVKEML	0.285936	0.36
HLA-A*32:01	KTIVKLFIEV	0.275418	0.39
HLA-A*32:01	KGNGLVDTF	0.27011	0.4
HLA-A*32:01	QSAQIDTAF	0.238621	0.46

Çizelge 5.1. (devam)

HLA-A*32:01	DTFTNSYSF	0.237373	0.46
HLA-A*32:01	SLVGKQSPF	0.233629	0.47
HLA-A*32:01	KNAGTIKSW	0.232305	0.47
HLA-A*32:01	KALLSTPMKW	0.388658	0.22
HLA-A*32:01	KLFEVQKTGF	0.659254	0.07
HLA-A*33:03	HTKSILNLR	0.873108	0.01
HLA-A*33:03	MLSDMIRRR	0.592986	0.08
HLA-A*33:03	EMLSDMIRR	0.516757	0.12
HLA-A*33:03	LYKNSSALR	0.475072	0.16
HLA-A*33:03	ELYKNSSALR	0.450381	0.18
HLA-A*33:03	GHTKSILNLR	0.346745	0.31
HLA-A*33:03	EMLSDMIRRR	0.297489	0.4
HLA-A*68:01	HTKSILNLR	0.893497	0.02
HLA-A*68:01	DSMITNLLK	0.726496	0.13
HLA-A*68:01	MLSDMIRRR	0.615473	0.25
HLA-A*68:01	EMLSDMIRR	0.613473	0.25
HLA-A*68:01	WVSSTGIVK	0.560866	0.32
HLA-A*68:01	ASALVEATK	0.505761	0.43
HLA-A*68:01	HIAKAQELY	0.502075	0.44
HLA-A*68:01	YASALVEATK	0.607334	0.26
HLA-A*68:01	EVNNKDEMNR	0.489421	0.46
HLA-A*68:01	HIAKAQELYK	0.485734	0.47
HLA-A*68:01	ELYKNSSALR	0.518295	0.41
HLA-A*68:02	NTAALSNKV	0.919226	0.01
HLA-A*68:02	DSIYASALV	0.748586	0.06
HLA-A*68:02	VTPETFPTV	0.649326	0.12
HLA-A*68:02	RIYMHPAVL	0.559589	0.17
HLA-A*68:02	ETFPTVSQF	0.555803	0.18
HLA-A*68:02	EVQKTGFNI	0.519972	0.21
HLA-A*68:02	NSYSFCESV	0.493978	0.24
HLA-A*68:02	DIVASEHLL	0.431374	0.31
HLA-A*68:02	LVATGLAKL	0.412724	0.33
HLA-A*68:02	LTAGRISEM	0.387389	0.37
HLA-A*68:02	TAFSSYYWL	0.354847	0.42
HLA-A*68:02	IVMSVKEML	0.327198	0.47
HLA-A*68:02	DTFTNSYSF	0.324275	0.48
HLA-A*68:02	SVPNLDRFV	0.318417	0.49
HLA-A*68:02	ETFPTVSQFL	0.687784	0.1
HLA-A*68:02	MAFNPPWGDI	0.370823	0.39
HLA-A*68:02	KVPGEIVMSV	0.321838	0.48
HLA-A*68:02	DTAFSSYYWL	0.321577	0.48
HLA-A*74:01	MLSDMIRRR	0.325371	0.1

Çizelge 5.1. (devam)

HLA-A*74:01	HTKSILNLR	0.304353	0.11
HLA-A*74:01	IVKLFEVQK	0.20942	0.22
HLA-A*74:01	ALVATGLAK	0.163822	0.32
HLA-A*74:01	KTVEALNGY	0.162817	0.32
HLA-A*74:01	ASALVEATK	0.140242	0.38
HLA-A*74:01	LLHQSLVGK	0.133903	0.42
HLA-A*74:01	VSSTGIVKK	0.119236	0.49
HLA-A*74:01	SQFLFELGK	0.118239	0.49
HLA-A*74:01	KEMLSDMIRR	0.197532	0.23
HLA-B*07:02	VPNLDRFVF	0.879983	0.04
HLA-B*07:02	RVNANTAAL	0.711955	0.09
HLA-B*07:02	VPGEIVMSV	0.579712	0.17
HLA-B*07:02	SPFQNAYNV	0.497413	0.21
HLA-B*07:02	RIYMHPAVL	0.412342	0.29
HLA-B*07:02	MIRRRNLIL	0.269744	0.49
HLA-B*07:02	STPMKWGKKL	0.628812	0.13
HLA-B*07:02	SVPNLDRFVF	0.520456	0.2
HLA-B*07:02	NPCAKTIVKL	0.34777	0.37
HLA-B*08:01	MIRRRNLIL	0.843307	0.02
HLA-B*08:01	ELYKNSSAL	0.666044	0.07
HLA-B*08:01	DMIRRRNLI	0.654187	0.07
HLA-B*08:01	RIYMHPAVL	0.650904	0.07
HLA-B*08:01	EAKKTVEAL	0.645122	0.08
HLA-B*08:01	TKKMKKALL	0.577123	0.13
HLA-B*08:01	SDMIRRRNL	0.512174	0.18
HLA-B*08:01	TPMKWGKKL	0.371205	0.35
HLA-B*08:01	RVNANTAAL	0.313655	0.46
HLA-B*08:01	DMIRRRNLIL	0.332455	0.42
HLA-B*13:01	AEYKVPGEI	0.645042	0.04
HLA-B*13:01	YELFADDSF	0.549116	0.07
HLA-B*13:01	REFVKGKYI	0.526011	0.09
HLA-B*13:01	KQSPFQNAY	0.345844	0.29
HLA-B*13:01	SEHLLHQSL	0.467475	0.12
HLA-B*13:01	ALLSTPMKW	0.435005	0.16
HLA-B*13:01	VDVPKIEQL	0.396103	0.21
HLA-B*13:01	AETEGKGIF	0.379428	0.23
HLA-B*13:01	ADSMITNLL	0.379057	0.23
HLA-B*13:01	ETFPTVSQF	0.310978	0.36
HLA-B*13:01	AQIDTAFSSY	0.315299	0.36
HLA-B*13:01	AQSAQIDTAF	0.477505	0.12
HLA-B*13:01	AEYKVPGEIVM	0.371302	0.25
HLA-B*13:02	AEYKVPGEI	0.637517	0.02

Çizelge 5.1. (devam)

HLA-B*13:02	REFVKGKYI	0.507264	0.05
HLA-B*13:02	SEHLLHQSL	0.317865	0.25
HLA-B*13:02	ADSMITNLL	0.30441	0.28
HLA-B*13:02	VDVPKIEQL	0.30375	0.28
HLA-B*13:02	YELFADDSF	0.272974	0.35
HLA-B*13:02	MDIVASEHL	0.232451	0.49
HLA-B*13:02	YMHPAVLTA	0.232206	0.49
HLA-B*13:02	AEYKVPGEIV	0.445502	0.08
HLA-B*13:02	TELKVDVPKI	0.313882	0.27
HLA-B*13:02	SEMGVCFGTI	0.261895	0.38
HLA-B*13:02	AEYKVPGEIVM	0.250303	0.41
HLA-B*14:02	NRIYMHPAV	0.537404	0.03
HLA-B*14:02	KHIAKAQEL	0.359757	0.09
HLA-B*14:02	ELYKNSSAL	0.359362	0.09
HLA-B*14:02	RIYMHPAVL	0.312425	0.13
HLA-B*14:02	EHLLHQSL	0.245915	0.23
HLA-B*14:02	YKVPGEIVM	0.24544	0.23
HLA-B*14:02	WRKDIGFRV	0.223236	0.26
HLA-B*14:02	EHVDWCREF	0.206874	0.3
HLA-B*14:02	EAKKTVEAL	0.193562	0.34
HLA-B*14:02	RVNANTAAL	0.180019	0.4
HLA-B*14:02	EEFKKGNGL	0.179874	0.4
HLA-B*14:02	MIRRRNLIL	0.175651	0.41
HLA-B*14:02	SEHLLHQSL	0.166128	0.45
HLA-B*14:02	GHTKSILNL	0.165922	0.45
HLA-B*14:02	DRASADSMI	0.1643	0.45
HLA-B*14:02	DTFTNSYSF	0.164271	0.45
HLA-B*14:02	EHLLHQSLV	0.154524	0.49
HLA-B*14:02	NRIYMHPAVL	0.518583	0.03
HLA-B*14:02	FRVNANTAAL	0.256374	0.2
HLA-B*15:01	KQSPFQNAY	0.967003	0.01
HLA-B*15:01	KTVEALNGY	0.77272	0.06
HLA-B*15:01	LVDTFTNSY	0.379346	0.43
HLA-B*15:01	HIAKAQELY	0.689374	0.11
HLA-B*15:01	TIKSWDESY	0.659396	0.12
HLA-B*15:01	LSNKVLAEY	0.576094	0.18
HLA-B*15:01	SLVGKQSPF	0.568106	0.18
HLA-B*15:01	RISEMGVCF	0.547378	0.21
HLA-B*15:01	QSAQIDTAF	0.529831	0.22
HLA-B*15:01	ETFPTVSQF	0.51832	0.23
HLA-B*15:01	IVKKGLEWF	0.334293	0.5
HLA-B*15:01	QIDTAFSSY	0.33233	0.5
HLA-B*15:01	RVNANTAAL	0.409552	0.39

Çizelge 5.1. (devam)

HLA-B*15:01	AQIDTAFSSY	0.972483	0.01
HLA-B*15:01	AQSAQIDTAF	0.869577	0.02
HLA-B*15:01	GKQSPFQNAY	0.794087	0.05
HLA-B*15:01	GLVDTFTNSY	0.775425	0.05
HLA-B*15:01	KQSPFQNAYN	0.47561	0.28
HLA-B*15:01	ALSNKVLAEY	0.435359	0.35
HLA-B*15:01	KLFEVQKTGF	0.423335	0.37
HLA-B*15:01	AQIDTAFSSYY	0.72617	0.09
HLA-B*15:01	SAQIDTAFSSY	0.349218	0.48
HLA-B*15:02	ETFPTVSQF	0.676925	0.04
HLA-B*15:02	KQSPFQNAY	0.621983	0.07
HLA-B*15:02	HIAKAQELY	0.555913	0.09
HLA-B*15:02	LVDTFTNSY	0.53782	0.1
HLA-B*15:02	TIKSWDESY	0.529061	0.1
HLA-B*15:02	DTFTNSYSF	0.514862	0.11
HLA-B*15:02	QIDTAFSSY	0.483204	0.13
HLA-B*15:02	QSAQIDTAF	0.482008	0.13
HLA-B*15:02	SLVGKQSPF	0.409944	0.17
HLA-B*15:02	KTVEALNGY	0.387077	0.19
HLA-B*15:02	DSFQQNRIY	0.358501	0.21
HLA-B*15:02	ELYKNSSAL	0.315088	0.26
HLA-B*15:02	SALVEATKF	0.268244	0.34
HLA-B*15:02	LSNKVLAEY	0.256062	0.37
HLA-B*15:02	VPNLDRFVF	0.255121	0.37
HLA-B*15:02	RISEMGVCF	0.242382	0.39
HLA-B*15:02	RVNANTAAL	0.228644	0.42
HLA-B*15:02	YMHPAVLTA	0.214688	0.45
HLA-B*15:02	AQIDTAFSSY	0.670976	0.05
HLA-B*15:02	GLVDTFTNSY	0.415316	0.16
HLA-B*15:02	AQSAQIDTAF	0.231749	0.4
HLA-B*15:25	KQSPFQNAY	0.95598	0.01
HLA-B*15:25	KTVEALNGY	0.735181	0.07
HLA-B*15:25	HIAKAQELY	0.601339	0.14
HLA-B*15:25	SLVGKQSPF	0.568706	0.17
HLA-B*15:25	LVDTFTNSY	0.558209	0.18
HLA-B*15:25	RISEMGVCF	0.539432	0.19
HLA-B*15:25	ETFPTVSQF	0.533035	0.19
HLA-B*15:25	TIKSWDESY	0.521363	0.2
HLA-B*15:25	QSAQIDTAF	0.470684	0.26
HLA-B*15:25	LSNKVLAEY	0.467246	0.27
HLA-B*15:25	RVNANTAAL	0.451961	0.28
HLA-B*15:25	RIYMHPAVL	0.434502	0.3
HLA-B*15:25	QIDTAFSSY	0.425149	0.32

Çizelge 5.1. (devam)

HLA-B*15:25	KLFEVQKTGF	0.404208	0.34
HLA-B*15:25	YMHPAVLTA	0.392537	0.37
HLA-B*15:25	ALSNKVLAEY	0.3859	0.38
HLA-B*15:25	AQIDTAFSSY	0.933595	0.01
HLA-B*15:25	GLVDTFSTNSY	0.72341	0.07
HLA-B*15:25	AQSAQIDTAF	0.709704	0.08
HLA-B*15:25	GKQSPFQNAV	0.6194	0.13
HLA-B*15:25	AQIDTAFSSYY	0.593236	0.15
HLA-B*18:01	YELFADDSF	0.829831	0.03
HLA-B*18:01	SEHLLHQSL	0.645047	0.07
HLA-B*18:01	EEFKKGNGL	0.629917	0.07
HLA-B*18:01	AETEGKGIF	0.473549	0.14
HLA-B*18:01	IEVNNKDEM	0.271684	0.31
HLA-B*18:01	DEAKKTVEA	0.241134	0.36
HLA-B*18:01	KQSPFQNAV	0.20455	0.41
HLA-B*18:01	DESYTELKV	0.199122	0.43
HLA-B*18:01	DENPRGPVS	0.189331	0.46
HLA-B*18:01	DDAQKDSIY	0.173229	0.5
HLA-B*18:01	REFVKGKYIM	0.171882	0.5
HLA-B*18:01	DEMNRWFEEF	0.526751	0.12
HLA-B*18:01	HEHVDWCREF	0.267204	0.31
HLA-B*18:01	AQIDTAFSSY	0.183185	0.47
HLA-B*27:02	WRKDIGFRV	0.744194	0.2
HLA-B*27:02	GRISEMGVCF	0.924559	0.07
HLA-B*27:05	WRKDIGFRV	0.801681	0.12
HLA-B*27:05	RRRNLIILNR	0.737118	0.16
HLA-B*27:05	NRWFEEFKK	0.691859	0.2
HLA-B*27:05	GRSGIALVA	0.567518	0.33
HLA-B*27:05	GRISEMGVCF	0.830032	0.1
HLA-B*35:01	VPNLDRLFVF	0.949747	0.02
HLA-B*35:01	FPTVSQFLF	0.885602	0.04
HLA-B*35:01	DTFTNSYSF	0.822763	0.07
HLA-B*35:01	LVDTFTNSY	0.799865	0.08
HLA-B*35:01	ESVPNLDRF	0.314239	0.47
HLA-B*35:01	ETFPTVSQF	0.686051	0.14
HLA-B*35:01	QSAQIDTAF	0.625987	0.16
HLA-B*35:01	HIAKAQELY	0.609979	0.17
HLA-B*35:01	DSFQQNRIY	0.556877	0.21
HLA-B*35:01	QIDTAFSSY	0.521556	0.23
HLA-B*35:01	SPFQNAVNV	0.463726	0.28
HLA-B*35:01	SALVEATKF	0.445074	0.3

Çizelge 5.1. (devam)

HLA-B*35:01	TPMKWGKKL	0.438916	0.3
HLA-B*35:01	LSNKVLA EY	0.408802	0.34
HLA-B*35:01	TIKSWDESY	0.370699	0.38
HLA-B*35:01	VPGEIVMSV	0.362666	0.39
HLA-B*35:01	TPMKWGKKLY	0.420601	0.33
HLA-B*35:01	SVPNLDRFVF	0.300518	0.49
HLA-B*35:01	VPKIEQLTGY	0.711541	0.13
HLA-B*35:01	TPETFPTVSQF	0.293903	0.5
HLA-B*35:03	FPTVSQFLF	0.625123	0.06
HLA-B*35:03	SPFQNA YNV	0.604668	0.07
HLA-B*35:03	VPNLDRFVF	0.589899	0.07
HLA-B*35:03	VPGEIVMSV	0.524912	0.09
HLA-B*35:03	TPMKWGKKL	0.509342	0.09
HLA-B*35:03	DTFTNSYSF	0.209614	0.27
HLA-B*35:03	SADSMITNL	0.208245	0.28
HLA-B*35:03	EAKKTVEAL	0.190728	0.31
HLA-B*35:03	TAALSNKVL	0.188568	0.31
HLA-B*35:03	NPCA K TIVKL	0.211735	0.27
HLA-B*37:01	SEHLLHQSL	0.808322	0.02
HLA-B*37:01	VDVPKIEQL	0.803617	0.02
HLA-B*37:01	REFVKGKYI	0.761916	0.03
HLA-B*37:01	ADSMITNLL	0.661958	0.06
HLA-B*37:01	AEYKVPGEI	0.628043	0.07
HLA-B*37:01	SDMIRRRNL	0.555155	0.1
HLA-B*37:01	MDIVASEHL	0.532036	0.11
HLA-B*37:01	KDSIYASAL	0.508781	0.13
HLA-B*37:01	EEFKKG NGL	0.508627	0.13
HLA-B*37:01	YELFADDSF	0.404353	0.25
HLA-B*37:01	AETEGKGIF	0.341347	0.36
HLA-B*37:01	IEVNNKDEM	0.302454	0.43
HLA-B*37:01	REFVKGKYIM	0.349868	0.34
HLA-B*37:01	FEEFKKG NGL	0.339128	0.36
HLA-B*37:01	AEYKVPGEIV	0.30728	0.42
HLA-B*37:01	AEYKVPGEIVM	0.320323	0.39
HLA-B*38:01	YKVPGEIVM	0.507224	0.08
HLA-B*38:01	EHVDWCREF	0.498152	0.08
HLA-B*38:01	GHTKSILNL	0.451051	0.1
HLA-B*38:01	KHIAKAQEL	0.370727	0.15
HLA-B*38:01	YELFADDSF	0.344886	0.19
HLA-B*38:01	DRASADSMI	0.301365	0.25
HLA-B*38:01	NKDEMNRWF	0.282858	0.28
HLA-B*38:01	SEHLLHQSL	0.256306	0.34

Çizelge 5.1. (devam)

HLA-B*38:01	NRIYMHPAV	0.23936	0.37
HLA-B*38:01	WRKDIGFRV	0.226584	0.41
HLA-B*38:01	EEFKKGNGL	0.19533	0.49
HLA-B*38:01	EHLLHQSLV	0.192929	0.49
HLA-B*38:01	YKAGVTPETF	0.297379	0.25
HLA-B*38:01	FRVNANTAAL	0.229397	0.4
HLA-B*38:01	NRIYMHPAVL	0.217337	0.43
HLA-B*39:01	YKVPGEIVM	0.84043	0.02
HLA-B*39:01	NRIYMHPAV	0.634529	0.09
HLA-B*39:01	KHIAKAQEL	0.560471	0.13
HLA-B*39:01	GHTKSILNL	0.477567	0.18
HLA-B*39:01	FRVNANTAA	0.392938	0.25
HLA-B*39:01	WRKDIGFRV	0.341913	0.31
HLA-B*39:01	EHVDWCREF	0.313976	0.36
HLA-B*39:01	DRASADSMI	0.312141	0.36
HLA-B*39:01	SEHLLHQSL	0.283286	0.42
HLA-B*39:01	FRVNANTAAL	0.714795	0.06
HLA-B*39:01	NRIYMHPAVL	0.563923	0.12
HLA-B*40:01	SEHLLHQSL	0.97911	0.02
HLA-B*40:01	AEYKVPGEI	0.95336	0.04
HLA-B*40:01	AEYKVPGEIVM	0.949875	0.04
HLA-B*40:01	YELFADDSF	0.814979	0.14
HLA-B*40:01	EEFKKGNGL	0.804566	0.14
HLA-B*40:01	REFVKGKYI	0.774839	0.16
HLA-B*40:01	IEVNNKDEM	0.727465	0.21
HLA-B*40:01	AETEGKGIF	0.830949	0.12
HLA-B*40:01	SEMGVCFGTI	0.458744	0.45
HLA-B*40:01	FEEFKKGNGL	0.7693	0.17
HLA-B*40:01	AEYKVPGEIV	0.756592	0.18
HLA-B*40:01	ASEHLLHQSL	0.681625	0.23
HLA-B*40:01	GEIVMSVKEM	0.66486	0.25
HLA-B*40:01	QELYKNSSAL	0.662732	0.25
HLA-B*40:01	REFVKGKYIM	0.842075	0.12
HLA-B*40:01	GEIVMSVKEML	0.614287	0.3
HLA-B*40:02	SEHLLHQSL	0.974194	0.01
HLA-B*40:02	AEYKVPGEI	0.92572	0.04
HLA-B*40:02	REFVKGKYI	0.855261	0.07
HLA-B*40:02	EEFKKGNGL	0.659994	0.19
HLA-B*40:02	AETEGKGIF	0.594656	0.23
HLA-B*40:02	YELFADDSF	0.592274	0.24
HLA-B*40:02	VDVPKIEQL	0.521687	0.31
HLA-B*40:02	IEVNNKDEM	0.515372	0.32

Çizelge 5.1. (devam)

HLA-B*40:02	ADSMITNLL	0.481942	0.35
HLA-B*40:02	QELYKNSSAL	0.480457	0.36
HLA-B*40:02	REFVKGKYIM	0.822275	0.08
HLA-B*40:02	AEYKVPGEIV	0.728446	0.15
HLA-B*40:02	ASEHLLHQSL	0.622591	0.22
HLA-B*40:02	FEEFKKGNGL	0.593571	0.23
HLA-B*40:02	GEIVMSVKEM	0.535028	0.3
HLA-B*40:02	AEYKVPGEIVM	0.899805	0.05
HLA-B*44:02	AETEGKGIF	0.818123	0.06
HLA-B*44:02	SEHLLHQSL	0.768253	0.08
HLA-B*44:02	AEYKVPGEI	0.640658	0.14
HLA-B*44:02	EEFKKGNGL	0.605275	0.17
HLA-B*44:02	REFVKGKGYI	0.55652	0.21
HLA-B*44:02	YELFADDSF	0.432347	0.3
HLA-B*44:02	DEMNRWFEEF	0.376527	0.36
HLA-B*44:02	GEIVMSVKEM	0.316976	0.42
HLA-B*44:02	ASEHLLHQSL	0.289371	0.47
HLA-B*44:02	AEYKVPGEIV	0.267181	0.5
HLA-B*44:02	HEHVDWCREF	0.51084	0.25
HLA-B*44:02	FEKNAGTIKSW	0.771651	0.08
HLA-B*44:03	AETEGKGIF	0.828911	0.07
HLA-B*44:03	SEHLLHQSL	0.780718	0.08
HLA-B*44:03	AEYKVPGEI	0.689508	0.13
HLA-B*44:03	EEFKKGNGL	0.669183	0.13
HLA-B*44:03	YELFADDSF	0.557171	0.21
HLA-B*44:03	REFVKGKGYI	0.526104	0.23
HLA-B*44:03	HEHVDWCREF	0.487668	0.25
HLA-B*44:03	GEIVMSVKEM	0.330432	0.42
HLA-B*44:03	DEMNRWFEEF	0.320789	0.42
HLA-B*44:03	AQIDTAFSSY	0.297057	0.45
HLA-B*44:03	AEYKVPGEIV	0.293366	0.46
HLA-B*44:03	FEKNAGTIKSW	0.641026	0.15
HLA-B*46:01	RVNANTAAL	0.140177	0.05
HLA-B*46:01	ETFPTVSQF	0.132715	0.06
HLA-B*46:01	KTVEALNGY	0.109293	0.08
HLA-B*46:01	LSNKVLAEY	0.102225	0.09
HLA-B*46:01	LTAGRISEM	0.101381	0.09
HLA-B*46:01	QSAQIDTAF	0.100611	0.09
HLA-B*46:01	RIYMHPAVL	0.070555	0.15
HLA-B*46:01	KQSPFQNAY	0.05887	0.18
HLA-B*46:01	YMHPAVLTA	0.057598	0.19
HLA-B*46:01	LVDTFTNSY	0.048211	0.24

Çizelge 5.1. (devam)

HLA-B*46:01	RISEMGVCF	0.043614	0.27
HLA-B*46:01	SLVGKQSPF	0.03679	0.32
HLA-B*46:01	DTFTNSYSF	0.03546	0.33
HLA-B*46:01	HIAKAQELY	0.034288	0.34
HLA-B*46:01	SVKEMLSDM	0.028383	0.39
HLA-B*46:01	ELYKNSSAL	0.027607	0.4
HLA-B*46:01	LVATGLAKL	0.023238	0.47
HLA-B*46:01	KGNGLVDTF	0.022761	0.48
HLA-B*46:01	TIKSWDESY	0.022526	0.49
HLA-B*46:01	SALVEATKF	0.022051	0.5
HLA-B*46:01	AQIDTAFSSY	0.032908	0.36
HLA-B*48:01	SEHLLHQSL	0.407021	0.06
HLA-B*48:01	YKVPGEIVM	0.38759	0.06
HLA-B*48:01	RIYMHPAVL	0.324508	0.1
HLA-B*48:01	AEYKVPGEI	0.302675	0.11
HLA-B*48:01	KHIAKAQEL	0.206942	0.22
HLA-B*48:01	REFVKGKYI	0.198171	0.24
HLA-B*48:01	RVNANTAAL	0.184375	0.26
HLA-B*48:01	KQSPFQNAY	0.138568	0.4
HLA-B*48:01	GHTKSILNL	0.122251	0.48
HLA-B*48:01	REFVKGKYIM	0.194871	0.25
HLA-B*48:01	AQSAQIDTAF	0.15461	0.35
HLA-B*48:01	AEYKVPGEIVM	0.168575	0.3
HLA-B*48:01	AQKDSIYASAL	0.130657	0.44
HLA-B*49:01	AEYKVPGEI	0.921745	0.01
HLA-B*49:01	REFVKGKYI	0.915219	0.01
HLA-B*49:01	AETEGKGIF	0.261661	0.44
HLA-B*49:01	SEHLLHQSL	0.65429	0.07
HLA-B*49:01	YELFADDSF	0.314022	0.34
HLA-B*49:01	EEFKKGNGL	0.307844	0.34
HLA-B*49:01	LAEYKVPGEI	0.277486	0.4
HLA-B*49:01	SEHLLHQSLV	0.241119	0.48
HLA-B*49:01	TELKVDVPKI	0.468106	0.17
HLA-B*49:01	REFVKGKYIM	0.322146	0.31
HLA-B*49:01	SEMGVCFGTI	0.376272	0.25
HLA-B*49:01	AEYKVPGEIV	0.777758	0.04
HLA-B*49:01	AEYKVPGEIVM	0.347394	0.28
HLA-B*50:01	AETEGKGIF	0.246749	0.47
HLA-B*50:01	REFVKGKYI	0.699562	0.09
HLA-B*50:01	SEHLLHQSL	0.660641	0.1
HLA-B*50:01	KDIGFRVNA	0.283065	0.42
HLA-B*50:01	QELYKNSSA	0.58235	0.14
HLA-B*50:01	IEQLTGYQQA	0.375333	0.3

Çizelge 5.1. (devam)

HLA-B*50:01	REFVKGKYIM	0.334048	0.35
HLA-B*50:01	AQELYKNSSA	0.281985	0.42
HLA-B*50:01	FDEAKKTVEA	0.28175	0.43
HLA-B*50:01	AEYKVPGEIV	0.641747	0.11
HLA-B*50:01	AEYKVPGEIVM	0.389252	0.28
HLA-B*51:01	VPGEIVMSV	0.916995	0.01
HLA-B*51:01	SPFQNAYNV	0.870618	0.03
HLA-B*51:01	FPTVSQFLF	0.468091	0.25
HLA-B*51:01	TPMKWGKKL	0.453414	0.27
HLA-B*51:01	DSIYASALV	0.405425	0.34
HLA-B*51:01	VTPETFPTV	0.39236	0.36
HLA-B*51:01	TAFSSYYWL	0.347784	0.43
HLA-B*51:01	DTFTNSYSF	0.341316	0.44
HLA-B*52:01	REFVKGKYYI	0.446634	0.03
HLA-B*52:01	AEYKVPGEI	0.408146	0.04
HLA-B*52:01	VTPETFPTV	0.304903	0.11
HLA-B*52:01	RIYMHPAVL	0.228733	0.23
HLA-B*52:01	VPGEIVMSV	0.18976	0.35
HLA-B*52:01	ETFPTVSQF	0.181658	0.38
HLA-B*52:01	VDVPKIEQL	0.166593	0.45
HLA-B*52:01	SPFQNAYNV	0.161148	0.47
HLA-B*53:01	FPTVSQFLF	0.902706	0.02
HLA-B*53:01	VPNLDRFVF	0.876382	0.02
HLA-B*53:01	DTAFSSYYW	0.679754	0.07
HLA-B*53:01	DTFTNSYSF	0.627497	0.09
HLA-B*53:01	VPGEIVMSV	0.599842	0.1
HLA-B*53:01	ETFPTVSQF	0.588548	0.11
HLA-B*53:01	SPFQNAYNV	0.545388	0.12
HLA-B*53:01	ALLSTPMKW	0.219828	0.5
HLA-B*53:01	TAFSSYYW	0.445175	0.18
HLA-B*53:01	TPMKWGKKL	0.42359	0.2
HLA-B*53:01	SALVEATKF	0.403159	0.22
HLA-B*53:01	YIMAFNPPW	0.401953	0.22
HLA-B*53:01	ESVPNLDRF	0.30916	0.32
HLA-B*53:01	DSFQQNRIY	0.279023	0.37
HLA-B*53:01	LVDTFSTNSY	0.26757	0.39
HLA-B*53:01	QSAQIDTAF	0.246773	0.44
HLA-B*53:01	SVPNLDRFVF	0.240451	0.45
HLA-B*53:01	TPMKWGKKLY	0.238952	0.45
HLA-B*53:01	GPVSHEHVDW	0.53515	0.13
HLA-B*53:01	VPKIEQLTGY	0.357042	0.27
HLA-B*53:01	TPETFPTVSQF	0.341648	0.27

Çizelge 5.1. (devam)

HLA-B*55:01	VPGEIVMSV	0.680768	0.02
HLA-B*55:01	SPFQNAYNV	0.646542	0.03
HLA-B*55:01	TPMKWGKKL	0.388501	0.15
HLA-B*55:01	VPNLDRFVF	0.294079	0.22
HLA-B*55:01	RIYMHPAVL	0.233288	0.35
HLA-B*55:01	RVNANTAAL	0.220227	0.39
HLA-B*55:01	YMHPAVLTA	0.183425	0.5
HLA-B*56:01	SPFQNAYNV	0.728571	0.01
HLA-B*56:01	VPGEIVMSV	0.724602	0.01
HLA-B*56:01	TPMKWGKKL	0.356552	0.16
HLA-B*56:01	VPNLDRFVF	0.33844	0.18
HLA-B*56:01	FPTVSQFLF	0.303136	0.23
HLA-B*56:01	IPVANPDDA	0.198996	0.44
HLA-B*56:01	IPVANPDAA	0.182751	0.5
HLA-B*57:01	KTVEALNGY	0.838909	0.05
HLA-B*57:01	KNAGTIKSW	0.804793	0.06
HLA-B*57:01	ALLSTPMKW	0.698228	0.11
HLA-B*57:01	KAGVTPETF	0.684575	0.12
HLA-B*57:01	ETFPTVSQF	0.664528	0.14
HLA-B*57:01	GIVKKGLEW	0.6479	0.15
HLA-B*57:01	DTAFSSYYW	0.567722	0.21
HLA-B*57:01	LSNKVLA EY	0.543075	0.23
HLA-B*57:01	QSAQIDTAF	0.493442	0.28
HLA-B*57:01	SALVEATKF	0.476072	0.29
HLA-B*57:01	YIMAFNPPW	0.393343	0.37
HLA-B*57:01	KGNGLVDTF	0.37135	0.4
HLA-B*57:01	KSWDESYTEL	0.360359	0.42
HLA-B*57:01	TGIVKKGLEW	0.308434	0.5
HLA-B*57:01	KALLSTPMKW	0.912069	0.02
HLA-B*57:01	IDTAFSSYYW	0.483515	0.28
HLA-B*57:01	KKTVEALNGY	0.407539	0.36
HLA-B*57:01	TGYQQAALKW	0.388491	0.38
HLA-B*57:01	STGIVKKGLEW	0.490844	0.28
HLA-B*58:01	ESVPNLDRF	0.422305	0.43
HLA-B*58:01	KTVEALNGY	0.848598	0.06
HLA-B*58:01	KAGVTPETF	0.837066	0.07
HLA-B*58:01	ALLSTPMKW	0.828102	0.08
HLA-B*58:01	KNAGTIKSW	0.810218	0.09
HLA-B*58:01	LSNKVLA EY	0.717778	0.15
HLA-B*58:01	ETFPTVSQF	0.705206	0.16
HLA-B*58:01	DTAFSSYYW	0.700418	0.16
HLA-B*58:01	QSAQIDTAF	0.69214	0.16

Çizelge 5.1. (devam)

HLA-B*58:01	GIVKKGLEW	0.673267	0.17
HLA-B*58:01	SALVEATKF	0.6486	0.19
HLA-B*58:01	YIMAFNPPW	0.59352	0.23
HLA-B*58:01	KGNGLVDTF	0.582222	0.25
HLA-B*58:01	KQSPFQNAY	0.389652	0.5
HLA-B*58:01	IDTAFSSYYW	0.615357	0.22
HLA-B*58:01	KALLSTPMKW	0.941314	0.01
HLA-B*58:01	KSWDESYTEL	0.508142	0.34
HLA-B*58:01	TGYQQAALKW	0.480327	0.37
HLA-B*58:01	ASALVEATKF	0.410109	0.45
HLA-B*58:01	KKTVEALNGY	0.406408	0.47
HLA-B*58:01	STGIVKKGLEW	0.476171	0.37
HLA-B*58:01	RAQSAQIDTAF	0.412114	0.45
HLA-B*58:02	ESVPNLDRF	0.080094	0.44
HLA-B*58:02	YIMAFNPPW	0.103609	0.34
HLA-B*58:02	DTFTNSYSF	0.087876	0.41
HLA-B*58:02	KTVEALNGY	0.311873	0.06
HLA-B*58:02	KAGVTPETF	0.305257	0.07
HLA-B*58:02	ALLSTPMKW	0.27744	0.08
HLA-B*58:02	KNAGTIKSW	0.260243	0.1
HLA-B*58:02	ETFPTVSQF	0.231871	0.11
HLA-B*58:02	LSNKVLA EY	0.174753	0.18
HLA-B*58:02	QSAQIDTAF	0.164275	0.19
HLA-B*58:02	KGNGLVDTF	0.14393	0.23
HLA-B*58:02	GIVKKGLEW	0.14388	0.23
HLA-B*58:02	SALVEATKF	0.141864	0.23
HLA-B*58:02	KQSPFQNAY	0.133968	0.25
HLA-B*58:02	KSWDESYTEL	0.120851	0.28
HLA-B*58:02	IDTAFSSYYW	0.115599	0.3
HLA-B*58:02	TGYQQAALKW	0.087198	0.41
HLA-B*58:02	KKTVEALNGY	0.073701	0.48
HLA-B*58:02	KALLSTPMKW	0.501683	0.02
HLA-C*01:02	RIYMHPAVL	0.303314	0.17
HLA-C*01:02	RVNANTAAL	0.278227	0.2
HLA-C*01:02	SADSMITNL	0.373972	0.13
HLA-C*01:02	VTPETFPTV	0.7889	0.02
HLA-C*01:02	SWDESYTEL	0.339613	0.14
HLA-C*01:02	ELYKNSSAL	0.171248	0.37
HLA-C*01:02	LVATGLAKL	0.08252	0.76
HLA-C*01:02	LTAGRISEM	0.122202	0.54
HLA-C*01:02	YMHPAVLTA	0.057833	1,1
HLA-C*01:02	YLDKHKDEV	0.126111	0.52
HLA-C*01:02	IVMSVK EML	0.05245	1.2

Çizelge 5.1. (devam)

HLA-C*02:02	RVNANTAAL	0.084331	0.74
HLA-C*02:02	KTVEALNGY	0.330517	0.17
HLA-C*02:02	LTAGRISEM	0.574525	0.07
HLA-C*02:02	RIYMHPAVL	0.162072	0.44
HLA-C*02:02	YMHPAVLTA	0.10382	0.63
HLA-C*02:02	LVDTFTNSY	0.253311	0.24
HLA-C*02:02	ETFPTVSQF	0.596043	0.06
HLA-C*02:02	LSNKVLA EY	0.592847	0.06
HLA-C*02:02	KQSPFQNAY	0.512795	0.08
HLA-C*02:02	LVATGLAKL	0.113352	0.6
HLA-C*02:02	SADSMITNL	0.232305	0.27
HLA-C*02:02	QSAQIDTAF	0.153079	0.46
HLA-C*02:02	RISEMGVCF	0.106852	0.62
HLA-C*02:02	HIAKAQELY	0.131447	0.52
HLA-C*02:02	VTPETFPTV	0.127743	0.52
HLA-C*02:09	RVNANTAAL	0.084331	0.74
HLA-C*02:09	KTVEALNGY	0.330517	0.17
HLA-C*02:09	LTAGRISEM	0.574525	0.07
HLA-C*02:09	RIYMHPAVL	0.162072	0.44
HLA-C*02:09	YMHPAVLTA	0.10382	0.63
HLA-C*02:09	LVDTFTNSY	0.253311	0.24
HLA-C*02:09	ETFPTVSQF	0.596043	0.06
HLA-C*02:09	LSNKVLA EY	0.592847	0.06
HLA-C*02:09	KQSPFQNAY	0.512795	0.08
HLA-C*02:09	LVATGLAKL	0.113352	0.6
HLA-C*02:09	SADSMITNL	0.232305	0.27
HLA-C*02:09	QSAQIDTAF	0.153079	0.46
HLA-C*02:09	RISEMGVCF	0.106852	0.62
HLA-C*02:09	HIAKAQELY	0.131447	0.52
HLA-C*02:09	VTPETFPTV	0.127743	0.52
HLA-C*03:02	RVNANTAAL	0.295069	0.45
HLA-C*03:02	RIYMHPAVL	0.359952	0.35
HLA-C*03:02	ETFPTVSQF	0.638901	0.11
HLA-C*03:02	QSAQIDTAF	0.41976	0.27
HLA-C*03:02	LTAGRISEM	0.65171	0.1
HLA-C*03:02	YMHPAVLTA	0.192294	0.7
HLA-C*03:02	LSNKVLA EY	0.701601	0.08
HLA-C*03:02	LVDTFTNSY	0.653167	0.1
HLA-C*03:02	YKVPGEIVM	0.230368	0.58
HLA-C*03:02	KQSPFQNAY	0.624259	0.12
HLA-C*03:02	KTVEALNGY	0.405564	0.28
HLA-C*03:02	SADSMITNL	0.314099	0.42
HLA-C*03:02	SALVEATKF	0.600363	0.14

Çizelge 5.1. (devam)

HLA-C*03:02	LVATGLAKL	0.138755	0.95
HLA-C*03:02	RISEMGVCF	0.251313	0.54
HLA-C*03:02	YIMAFNPPW	0.090208	1,4
HLA-C*03:02	IVMSVKEML	0.119402	1,1
HLA-C*03:03	RVNANTAAL	0.344089	0.2
HLA-C*03:03	RIYMHPAVL	0.409238	0.16
HLA-C*03:03	SADSMITNL	0.617927	0.07
HLA-C*03:03	LVATGLAKL	0.16394	0.42
HLA-C*03:03	TAALSNKVL	0.753266	0.04
HLA-C*03:03	LTAGRISEM	0.464482	0.12
HLA-C*03:03	ELYKNSSAL	0.153883	0.44
HLA-C*03:03	YMHPAVLTA	0.068273	0.83
HLA-C*03:03	IVMSVKEML	0.163322	0.42
HLA-C*03:03	ETFPTVSQF	0.155636	0.44
HLA-C*03:03	YKVPGEIVM	0.136982	0.49
HLA-C*03:03	TAFSSYYWL	0.189497	0.36
HLA-C*03:03	QSAQIDTAF	0.111817	0.59
HLA-C*03:03	VTPETFPTV	0.12378	0.53
HLA-C*03:04	RVNANTAAL	0.344089	0.2
HLA-C*03:04	RIYMHPAVL	0.409238	0.16
HLA-C*03:04	SADSMITNL	0.617927	0.07
HLA-C*03:04	LVATGLAKL	0.16394	0.42
HLA-C*03:04	TAALSNKVL	0.753266	0.04
HLA-C*03:04	LTAGRISEM	0.464482	0.12
HLA-C*03:04	ELYKNSSAL	0.153883	0.44
HLA-C*03:04	YMHPAVLTA	0.068273	0.83
HLA-C*03:04	IVMSVKEML	0.163322	0.42
HLA-C*03:04	ETFPTVSQF	0.155636	0.44
HLA-C*03:04	YKVPGEIVM	0.136982	0.49
HLA-C*03:04	TAFSSYYWL	0.189497	0.36
HLA-C*03:04	QSAQIDTAF	0.111817	0.59
HLA-C*03:04	VTPETFPTV	0.12378	0.53
HLA-C*04:01	SWDESYTEL	0.985106	0.01
HLA-C*04:01	IFDEAKKTV	0.881367	0.02
HLA-C*04:01	YLDKHKDEV	0.47002	0.07
HLA-C*04:01	TFPTVSQFL	0.343864	0.11
HLA-C*04:01	SFQQNRIYM	0.111717	0.41
HLA-C*04:01	LFEVQKTGF	0.200133	0.23
HLA-C*04:01	WFEKNAGTI	0.059495	0.69
HLA-C*04:01	SADSMITNL	0.4651	0.08
HLA-C*04:01	NLDRFVFQM	0.190982	0.24
HLA-C*04:01	AFNPPWGDI	0.017669	1.7

Çizelge 5.1. (devam)

HLA-C*04:01	KSWDESYTEL	0.469634	0.07
HLA-C*04:01	SWDESYTELK	0.205432	0.22
HLA-C*04:01	IKSWDESYTEL	0.392693	0.1
HLA-C*05:01	YLDKHKDEV	0.936415	0.04
HLA-C*05:01	SADSMITNL	0.969829	0.02
HLA-C*05:01	NLDRFVFQM	0.487646	0.23
HLA-C*05:01	IFDEAKKTV	0.3478	0.31
HLA-C*05:01	LVDTFTNSY	0.407043	0.28
HLA-C*05:01	RVNANTAAL	0.080548	0.92
HLA-C*05:01	SWDESYTEL	0.569742	0.17
HLA-C*05:01	VTPETFPTV	0.212265	0.47
HLA-C*05:01	KVDVPKIEQL	0.519538	0.21
HLA-C*05:01	KSWDESYTEL	0.671896	0.14
HLA-C*05:01	SADSMITNLL	0.68731	0.13
HLA-C*06:02	WRKDIGFRV	0.536749	0.04
HLA-C*06:02	NRIYMHPAV	0.193432	0.28
HLA-C*06:02	RIYMHPAVL	0.068421	0.76
HLA-C*06:02	KHIAKAQEL	0.193099	0.28
HLA-C*06:02	ETFPTVSQF	0.18699	0.3
HLA-C*06:02	YKVPGEIVM	0.162499	0.34
HLA-C*06:02	TFPTVSQFL	0.144465	0.38
HLA-C*06:02	SFQQNRIYM	0.048424	1,1
HLA-C*06:02	YMHPAVLTA	0.076117	0.71
HLA-C*06:02	FRVNANTAAL	0.009815	2,9
HLA-C*06:02	NRIYMHPAVL	0.072897	0.73
HLA-C*07:01	WRKDIGFRV	0.117822	0.16
HLA-C*07:01	NRIYMHPAV	0.025969	0.77
HLA-C*07:01	RIYMHPAVL	0.033783	0.62
HLA-C*07:01	YKVPGEIVM	0.049556	0.45
HLA-C*07:01	KHIAKAQEL	0.126428	0.15
HLA-C*07:01	ETFPTVSQF	0.096438	0.22
HLA-C*07:01	SFQQNRIYM	0.037442	0.56
HLA-C*07:01	FRVNANTAAL	0.01775	1,1
HLA-C*07:01	NRIYMHPAVL	0.285657	0.22
HLA-C*07:02	SFQQNRIYM	0.184632	0.18
HLA-C*07:02	RIYMHPAVL	0.051205	0.7
HLA-C*07:02	SWDESYTEL	0.38543	0.06
HLA-C*07:02	WRKDIGFRV	0.056625	0.63
HLA-C*07:02	KHIAKAQEL	0.220904	0.14
HLA-C*07:02	TFPTVSQFL	0.210181	0.15
HLA-C*07:02	RVNANTAAL	0.006187	2,7
HLA-C*07:02	YKVPGEIVM	0.203113	0.16

Çizelge 5.1. (devam)

HLA-C*07:02	NRIYMHPAV	0.331522	0.18
HLA-C*07:02	FRVNANTAAL	0.042519	0.81
HLA-C*07:04	SWDESYTEL	0.292426	0.02
HLA-C*07:04	SFQQNRIYM	0.053104	0.41
HLA-C*07:04	IFDEAKKTV	0.269055	0.03
HLA-C*07:04	TFPTVSQFL	0.094353	0.2
HLA-C*07:04	RIYMHPAVL	0.043099	0.52
HLA-C*07:04	RVNANTAAL	0.01555	1,4
HLA-C*07:04	KHIAKAQEL	0.193258	0.06
HLA-C*07:04	SADSMITNL	0.132583	0.12
HLA-C*07:04	WRKDIGFRV	0.030178	0.74
HLA-C*07:04	IYMHPAVL	0.043455	0.51
HLA-C*07:04	YLDKHKDEV	0.184856	0.07
HLA-C*07:04	YMHPAVLTA	0.066028	0.32
HLA-C*07:04	WFEKNAGTI	0.004299	3,4
HLA-C*07:04	YYWLYKAGV	0.006095	2,7
HLA-C*07:04	SFCESVPNL	0.040722	0.53
HLA-C*07:04	FRVNANTAAL	0.013525	1,5
HLA-C*08:01	SADSMITNL	0.804813	0.01
HLA-C*08:01	RVNANTAAL	0.076462	0.44
HLA-C*08:01	RIYMHPAVL	0.070643	0.47
HLA-C*08:01	YLDKHKDEV	0.244297	0.15
HLA-C*08:01	YMHPAVLTA	0.055305	0.57
HLA-C*08:01	VTPETFPTV	0.150586	0.25
HLA-C*08:01	IVMSVKEML	0.02501	1
HLA-C*08:01	NLDRFVFQM	0.074625	0.44
HLA-C*08:01	SWDESYTEL	0.218178	0.16
HLA-C*08:01	TVSQFLFEL	0.080771	0.42
HLA-C*08:01	YKVPGEIVM	0.051053	0.61
HLA-C*08:02	SADSMITNL	0.977696	0.01
HLA-C*08:02	YLDKHKDEV	0.831114	0.07
HLA-C*08:02	RVNANTAAL	0.108121	0.69
HLA-C*08:02	RIYMHPAVL	0.036847	1,3
HLA-C*08:02	SWDESYTEL	0.617637	0.14
HLA-C*08:02	NLDRFVFQM	0.302266	0.32
HLA-C*08:02	LVDTFFTNSY	0.314319	0.31
HLA-C*08:02	IFDEAKKTV	0.350618	0.28
HLA-C*08:02	YMHPAVLTA	0.019115	2
HLA-C*08:02	VTPETFPTV	0.104076	0.7
HLA-C*08:02	SADSMITNLL	0.64571	0.13
HLA-C*12:02	RVNANTAAL	0.135487	0.48

Çizelge 5.1. (devam)

HLA-C*12:02	RIYMHPAVL	0.213749	0.32
HLA-C*12:02	YMHPAVLTA	0.187153	0.36
HLA-C*12:02	ETFPTVSQF	0.55293	0.06
HLA-C*12:02	LTAGRISEM	0.482225	0.09
HLA-C*12:02	KTVEALNGY	0.231956	0.27
HLA-C*12:02	KQSPFQNAY	0.52096	0.07
HLA-C*12:02	YKVPGEIVM	0.269833	0.21
HLA-C*12:02	LSNKVLA EY	0.465.18	0.1
HLA-C*12:02	LVDTFTNSY	0.314608	0.18
HLA-C*12:02	QSAQIDTAF	0.142111	0.46
HLA-C*12:02	LVATGLAKL	0.077703	0.82
HLA-C*12:02	SADSMITNL	0.227361	0.28
HLA-C*12:02	ELYKNSSAL	0.074394	0.85
HLA-C*12:02	RISEMGVCF	0.072178	0.87
HLA-C*12:03	RVNANTAAL	0.057429	0.81
HLA-C*12:03	RIYMHPAVL	0.183156	0.32
HLA-C*12:03	LTAGRISEM	0.586705	0.04
HLA-C*12:03	ETFPTVSQF	0.436026	0.09
HLA-C*12:03	YMHPAVLTA	0.161911	0.36
HLA-C*12:03	SADSMITNL	0.137897	0.41
HLA-C*12:03	LVATGLAKL	0.030888	1,4
HLA-C*12:03	KTVEALNGY	0.109866	0.52
HLA-C*12:03	IVMSVK EML	0.038686	1,2
HLA-C*12:03	LSNKVLA EY	0.299341	0.17
HLA-C*12:03	LVDTFTNSY	0.066203	0.73
HLA-C*12:03	VTPETFTPTV	0.229054	0.25
HLA-C*12:03	QSAQIDTAF	0.046067	0.99
HLA-C*12:03	YKVPGEIVM	0.109873	0.52
HLA-C*12:03	KQSPFQNAY	0.194657	0.3
HLA-C*14:02	SFQQNRIYM	0.888976	0.03
HLA-C*14:02	SWDESYTEL	0.683506	0.1
HLA-C*14:02	RIYMHPAVL	0.13154	0.65
HLA-C*14:02	RVNANTAAL	0.083204	0.92
HLA-C*14:02	TFPTVSQFL	0.848016	0.04
HLA-C*14:02	IYMHPAVL	0.850381	0.04
HLA-C*14:02	IFDEAKKTV	0.39511	0.25
HLA-C*14:02	SFCESV PNL	0.477453	0.2
HLA-C*14:02	KHIAKAQEL	0.160159	0.55
HLA-C*14:02	LFEVQKTGF	0.279379	0.35
HLA-C*14:02	YMHPAVLTA	0.048797	1,4
HLA-C*14:02	LVDTFTNSY	0.093799	0.84
HLA-C*14:02	KQSPFQNAY	0.113871	0.72

Çizelge 5.1. (devam)

HLA-C*15:02	RVNANTAAL	0.10376	1.6
HLA-C*15:02	RIYMHPAVL	0.502089	0.14
HLA-C*15:02	KTIVKLFEV	0.804631	0.02
HLA-C*15:02	SADSMITNL	0.478278	0.16
HLA-C*15:02	LTAGRISEM	0.585874	0.09
HLA-C*15:02	VTPETFPTV	0.467707	0.16
HLA-C*15:02	LVATGLAKL	0.134285	0.73
HLA-C*15:02	IVMSVKEML	0.191032	0.52
HLA-C*15:02	YMHPAVLTA	0.09988	0.93
HLA-C*15:02	YLDKHKDEV	0.058935	1,4
HLA-C*15:02	KVDVPKIEQL	0.134781	0.73
HLA-C*16:01	RVNANTAAL	0.144389	0.65
HLA-C*16:01	RIYMHPAVL	0.248505	0.38
HLA-C*16:01	LTAGRISEM	0.721824	0.04
HLA-C*16:01	SADSMITNL	0.224132	0.43
HLA-C*16:01	IVMSVKEML	0.084388	1,1
HLA-C*16:01	YMHPAVLTA	0.070683	1,12
HLA-C*16:01	LVATGLAKL	0.037975	1,8
HLA-C*16:01	ETFPTVSQF	0.245786	0.38
HLA-C*16:01	KSGRSGIAL	0.092765	0.95
HLA-C*16:01	RISEMGVCF	0.055127	1,4
HLA-C*16:01	TAALSNKVL	0.657969	0.07
HLA-C*16:01	KGNGLVDTF	0.03475	1,9
HLA-C*16:01	KAGVTPETF	0.242351	0.39
HLA-C*16:01	SALVEATKF	0.388382	0.22
HLA-C*16:01	QSAQIDTAF	0.168323	0.56
HLA-C*16:01	TVSQFLFEL	0.117503	0.78
HLA-C*17:01	SADSMITNL	0.870763	0.02
HLA-C*17:01	YLDKHKDEV	0.405748	0.26
HLA-C*17:01	RVNANTAAL	0.387789	0.28
HLA-C*17:01	RIYMHPAVL	0.594509	0.11
HLA-C*17:01	VTPETFPTV	0.474787	0.19
HLA-C*17:01	YMHPAVLTA	0.209866	0.64
HLA-C*17:01	NLDRFVFQM	0.312571	0.41
HLA-C*17:01	LVATGLAKL	0.42735	0.23
HLA-C*17:01	TVSQFLFEL	0.58443	0.12
HLA-C*17:01	IVMSVKEML	0.358419	0.33
HLA-C*17:01	LTAGRISEM	0.425724	0.23
HLA-C*17:01	KTIVKLFEV	0.284723	0.45
HLA-C*17:01	SWDESYTEL	0.276751	0.47
HLA-E*01:01	RIYMHPAVL	0.298321	0.02
HLA-E*01:01	VTPETFPTV	0.238479	0.03

Çizelge 5.1. (devam)

HLA-E*01:01	RVNANTAAL	0.211718	0.05
HLA-E*01:01	SADSMITNL	0.153482	0.1
HLA-E*01:01	SWDESYTEL	0.121994	0.15
HLA-E*01:01	TFPTVSQFL	0.094267	0.23
HLA-E*01:01	IVMSVKEML	0.06817	0.36
HLA-E*01:01	YLDKHKDEV	0.066049	0.38
HLA-E*01:01	MIRRRNLIL	0.063059	0.39
HLA-E*01:01	KVDVPKIEQL	0.060781	0.41
HLA-G*01:01	TFPTVSQFL	0.686275	0.01
HLA-G*01:01	SWDESYTEL	0.617221	0.03
HLA-G*01:01	VTPETFPTV	0.496746	0.11
HLA-G*01:01	KWGKKLYEL	0.496243	0.11
HLA-G*01:01	RVNANTAAL	0.445052	0.17
HLA-G*01:01	SFQQNRIYM	0.430164	0.18
HLA-G*01:01	RIYMHPAVL	0.354299	0.34
HLA-G*01:01	SADSMITNL	0.347672	0.36
HLA-G*01:01	ETFPTVSQF	0.339252	0.38
HLA-G*01:01	KGNGLVDTF	0.331135	0.41
HLA-G*01:01	SFCESVPNL	0.330922	0.41
HLA-G*01:01	IVMSVKEML	0.329213	0.42
HLA-G*01:01	IFDEAKKTV	0.324607	0.43
HLA-G*01:01	QSAQIDTAF	0.304129	0.5
HLA-G*01:01	RISEMGVCF	0.319818	0.45
HLA-G*01:01	TFPTVSQFLF	0.503224	0.1
HLA-G*01:01	KSWDESYTEL	0.364337	0.32
HLA-G*01:01	SVPNLDRFVF	0.324432	0.43
HLA-G*01:02	TFPTVSQFL	0.686275	0.01
HLA-G*01:02	SWDESYTEL	0.617221	0.03
HLA-G*01:02	VTPETFPTV	0.496746	0.11
HLA-G*01:02	KWGKKLYEL	0.496243	0.11
HLA-G*01:02	RVNANTAAL	0.445052	0.17
HLA-G*01:02	SFQQNRIYM	0.430164	0.18
HLA-G*01:02	RIYMHPAVL	0.354299	0.34
HLA-G*01:02	SADSMITNL	0.347672	0.36
HLA-G*01:02	ETFPTVSQF	0.339252	0.38
HLA-G*01:02	KGNGLVDTF	0.331135	0.41
HLA-G*01:02	SFCESVPNL	0.330922	0.41
HLA-G*01:02	IVMSVKEML	0.329213	0.42
HLA-G*01:02	IFDEAKKTV	0.324607	0.43
HLA-G*01:02	RISEMGVCF	0.319818	0.45
HLA-G*01:02	QSAQIDTAF	0.304129	0.5
HLA-G*01:02	TFPTVSQFLF	0.503224	0.1
HLA-G*01:02	KSWDESYTEL	0.364337	0.32

Çizelge 5.1. (devam)

HLA-G*01:02	SVPNLDRFVF	0.324432	0.43
HLA-G*01:03	TFPTVSQFL	0.686275	0.01
HLA-G*01:03	SWDESYTEL	0.617221	0.03
HLA-G*01:03	VTPETFPTV	0.496746	0.11
HLA-G*01:03	KWGKKLYEL	0.496243	0.11
HLA-G*01:03	RVNANTAAL	0.445052	0.17
HLA-G*01:03	SFQQNRIYM	0.430164	0.18
HLA-G*01:03	RIYMHPAVL	0.354299	0.34
HLA-G*01:03	SADSMITNL	0.347672	0.36
HLA-G*01:03	ETFPTVSQF	0.339252	0.38
HLA-G*01:03	KGNGLVDTF	0.331135	0.41
HLA-G*01:03	SFCESVPLN	0.330922	0.41
HLA-G*01:03	IVMSVKEML	0.329213	0.42
HLA-G*01:03	IFDEAKKTV	0.324607	0.43
HLA-G*01:03	RISEMGVCF	0.319818	0.45
HLA-G*01:03	TFPTVSQF	0.313963	0.46
HLA-G*01:03	QSAQIDTAF	0.304129	0.5
HLA-G*01:03	TFPTVSQFLF	0.503224	0.1
HLA-G*01:03	KSWDESYTEL	0.364337	0.32
HLA-G*01:03	SVPNLDRFVF	0.324432	0.43
HLA-G*01:04	TFPTVSQFL	0.686275	0.01
HLA-G*01:04	SWDESYTEL	0.617221	0.03
HLA-G*01:04	VTPETFPTV	0.496746	0.11
HLA-G*01:04	KWGKKLYEL	0.496243	0.11
HLA-G*01:04	RVNANTAAL	0.445052	0.17
HLA-G*01:04	SFQQNRIYM	0.430164	0.18
HLA-G*01:04	RIYMHPAVL	0.354299	0.34
HLA-G*01:04	SADSMITNL	0.347672	0.36
HLA-G*01:04	ETFPTVSQF	0.339252	0.38
HLA-G*01:04	KGNGLVDTF	0.331135	0.41
HLA-G*01:04	SFCESVPLN	0.330922	0.41
HLA-G*01:04	IVMSVKEML	0.329213	0.42
HLA-G*01:04	IFDEAKKTV	0.324607	0.43
HLA-G*01:04	RISEMGVCF	0.319818	0.45
HLA-G*01:04	QSAQIDTAF	0.304129	0.5
HLA-G*01:04	TFPTVSQFLF	0.503224	0.1
HLA-G*01:04	KSWDESYTEL	0.364337	0.32
HLA-G*01:04	SVPNLDRFVF	0.324432	0.43
HLA-G*01:06	TFPTVSQFL	0.686275	0.01
HLA-G*01:06	SWDESYTEL	0.617221	0.03
HLA-G*01:06	VTPETFPTV	0.496746	0.11
HLA-G*01:06	KWGKKLYEL	0.496243	0.11

Çizelge 5.1. (devam)

HLA-G*01:06	RVNANTAAL	0.445052	0.17
HLA-G*01:06	SFQQNRIYM	0.430164	0.18
HLA-G*01:06	RIYMHPAVL	0.354299	0.34
HLA-G*01:06	SADSMITNL	0.347672	0.36
HLA-G*01:06	ETFPTVSQF	0.339252	0.38
HLA-G*01:06	KGNGLVDTF	0.331135	0.41
HLA-G*01:06	SFCESVPNL	0.330922	0.41
HLA-G*01:06	IVMSVKEML	0.329213	0.42
HLA-G*01:06	IFDEAKKTV	0.324607	0.43
HLA-G*01:06	RISEMGVCF	0.319818	0.45
HLA-G*01:06	QSAQIDTAF	0.304129	0.5
HLA-G*01:06	TFPTVSQFLF	0.503224	0.1
HLA-G*01:06	KSWDESYTEL	0.364337	0.32
HLA-G*01:06	SVPNLDRFVF	0.324432	0.43

Çizelge 5.2. KKKAV-NP karşı bağlanma afinitesi olan MHC-I epitoplarının Rankpep veri tabanı aracılı tahmini.

HLA tipi	Peptit	1-log50k(aff)	Afinite(nM)	% Değer
HLA-A0101	LVDTFTNSY	0.844	5,43	0.01
HLA-A0101	LSNKVLAEY	0.550	130.88	0.17
HLA-A0101	QIDTAFSSY	0.502	219.78	0.25
HLA-A0101	FSSYYWLYK	0.446	399.72	0.40
HLA-A0101	QIDTAFSSYY	0.707	23.85	0.04
HLA-A0101	GLVDTFTNSY	0.686	29.76	0.05
HLA-A0101	FSSYYWLYKA	0.539	146.71	0.20
HLA-A0101	LVDTFTNSYS	0.536	152.06	0.20
HLA-A0101	TAFSSYYWLY	0.458	353.32	0.30
HLA-A0101	AQIDTAFSSY	0.388	750.71	0.50
HLA-A0101	AQIDTAFSSYY	0.574	99.96	0.15
HLA-A0101	DTAFSSYYWLY	0.565	111.02	0.15
HLA-A0101	NGLVDTFTNSY	0.548	133.52	0.17
HLA-A0101	ATDDAQKDSIY	0.521	178.57	0.20
HLA-A0101	QIDTAFSSYYW	0.407	613.21	0.50
HLA-A0101	AFSSYYWLYKA	0.391	723.93	0.50
HLA-A0201	YMHPAVLTA	0.750	15.00	0.20
HLA-A0201	KTIVKLFEV	0.688	29.19	0.40
HLA-A0202	TVSQFLFEL	0.743	16.13	0.50
HLA-A0203	YMHPAVLTA	0.867	4,21	0.06
HLA-A0203	ALVATGLAKL	0.753	14.48	0.40
HLA-A0205	YLDKHKDEV	0.442	417.30	0.09
HLA-A0205	YYWLYKAGV	0.410	593.60	0.12
HLA-A0205	VTPETFPTV	0.409	596.53	0.12
HLA-A0205	ALRAQSAQI	0.339	1279.63	0.30
HLA-A0205	WFEKNAGTI	0.282	2370.46	0.50
HLA-A0206	KTIVKLFEV	0.838	5,78	0.07
HLA-A0206	VTPETFPTV	0.827	6,53	0.08
HLA-A0206	TVSQFLFEL	0.729	18.79	0.40
HLA-A0206	AQIDTAFSS	0.726	19.39	0.40
HLA-A0206	GVTPEFPTV	0.711	22.87	0.50
HLA-A0207	YLDKHKDEV	0.197	5918.30	0.15
HLA-A0207	YYWLYKAGV	0.184	6856.21	0.20
HLA-A0207	VTPETFPTV	0.181	7084.55	0.20
HLA-A0207	HVDWCREFV	0.141	10918.51	0.50
HLA-A0207	GVTPEFPTV	0.191	6357.35	0.17

Çizelge 5.2. (devam)

HLA-A0207	KVPGEIVMSV	0.176	7413.28	0.25
HLA-A0207	AGVTPETFPTV	0.143	10595.44	0.50
HLA-A0207	GVTPETFPTVS	0.143	10685.35	0.50
HLA-A0211	YMHPAVLTA	0.890	3.28	0.09
HLA-A0211	YLDKHKDEV	0.851	5.01	0.20
HLA-A0211	NLDRFVFQM	0.750	14.93	0.50
HLA-A0211	VTPETFPTV	0.742	16.37	0.50
HLA-A0212	YMHPAVLTA	0.795	9.15	0.12
HLA-A0212	YLDKHKDEV	0.718	21.15	0.25
HLA-A0212	KTIVKLFEV	0.613	65.74	0.50
HLA-A0216	YLDKHKDEV	0.828	6.4	0.07
HLA-A0216	YMHPAVLTA	0.764	12.88	0.15
HLA-A0216	NLDRFVFQM	0.633	53.00	0.50
HLA-A0216	NLLKHIKA	0.628	56.25	0.50
HLA-A0217	YIMAFNPPW	0.609	68.47	0.10
HLA-A0217	TVSQFLFEL	0.509	203.57	0.40
HLA-A0219	NLDRFVFQM	0.620	60.88	0.30
HLA-A0219	YLDKHKDEV	0.605	71.60	0.30
HLA-A0250	YMHPAVLTA	0.823	6,8	0.10
HLA-A0250	YYWLYKAGV	0.731	18.27	0.30
HLA-A0250	YLDKHKDEV	0.720	20.58	0.30
HLA-A0250	WRKDIGFRV	0.652	43.27	0.50
HLA-A0301	ALVATGLAK	0.658	40.52	0.20
HLA-A0301	FSSYYWLYK	0.648	45.23	0.25
HLA-A0301	KALLSTPMK	0.613	65.96	0.30
HLA-A0301	LLHQSLVGK	0.596	79.43	0.40
HLA-A0301	HLLHQSLVGK	0.740	16.71	0.06
HLA-A0301	HIKAQELYK	0.725	19.56	0.08
HLA-A0301	LLSTPMKWGK	0.706	24.20	0.12
HLA-A0301	AFSSYYWLYK	0.702	25.26	0.12
HLA-A0301	LTGYQQAALK	0.658	40.68	0.20
HLA-A0301	IALVATGLAK	0.639	49.60	0.25
HLA-A0301	ADSMITNLLK	0.629	55.30	0.25
HLA-A0301	LSNKVLAEYK	0.587	87.04	0.40
HLA-A0301	ALNGYLDKHK	0.576	98.74	0.50
HLA-A0301	ALSNKVLAEY	0.567	108.47	0.50
HLA-A0301	ALSNKVLAEYK	0.594	80.51	0.40

Çizelge 5.2. (devam)

HLA-A1101	FSSYYWLYK	0.814	7,5	0.01
HLA-A1101	SQFLFELGK	0.742	16.28	0.08
HLA-A1101	VSSTGIVKK	0.705	24.27	0.15
HLA-A1101	KALLSTPMK	0.655	41.72	0.30
HLA-A1101	ASALVEATK	0.629	55.34	0.40
HLA-A1101	ALVATGLAK	0.622	59.83	0.50
HLA-A1101	AFSSYYWLYK	0.815	7,44	0.01
HLA-A1101	ADSMITNLLK	0.751	14.73	0.06
HLA-A1101	VSQFLFELGK	0.705	24.35	0.15
HLA-A1101	LSNKVLAEYK	0.675	33.81	0.25
HLA-A1101	ITNLLKHIK	0.627	56.52	0.40
HLA-A1101	HIKAQELYK	0.618	62.16	0.50
HLA-A1101	TAFSSYYWLYK	0.730	18.64	0.10
HLA-A1101	SADSMITNLLK	0.695	27.15	0.17
HLA-A1101	TVSQFLFELGK	0.623	58.93	0.40
HLA-A2301	GYQQAALKW	0.565	110.82	0.40
HLA-A2301	KWGKKLYELF	0.732	18.22	0.06
HLA-A2301	KYIMAFNPPW	0.696	26.81	0.10
HLA-A2301	LYELFADDSF	0.664	37.96	0.15
HLA-A2301	TFPTVSQFLF	0.630	54.52	0.20
HLA-A2402	TFPTVSQFL	0.549	132.30	0.25
HLA-A2402	GYQQAALKW	0.477	285.85	0.50
HLA-A2402	KWGKKLYEL	0.476	288.57	0.50
HLA-A2402	TFPTVSQFLF	0.737	17.13	0.02
HLA-A2402	KWGKKLYELF	0.723	19.96	0.03
HLA-A2402	KYIMAFNPPW	0.640	49.11	0.09
HLA-A2402	TGYQQAALKW	0.540	145.01	0.30
HLA-A2402	ETFTVSQFLF	0.556	122.19	0.25
HLA-A2402	TFPTVSQFLFE	0.539	146.95	0.30
HLA-A2402	MKWGKKLYELF	0.526	168.13	0.30
HLA-A2402	KWGKKLYELFA	0.509	203.63	0.40
HLA-A2403	GYQQAALKW	0.877	3,78	0.03
HLA-A2403	KWGKKLYEL	0.789	9,8	0.10
HLA-A2403	TFPTVSQFL	0.714	22,12	0.20
HLA-A2403	KYIMAFNPP	0.605	71.85	0.40
HLA-A2403	AFSSYYWLY	0.588	85.86	0.50
HLA-A2403	AFNPPWGDI	0.562	114.84	0.50
HLA-A2403	KYIMAFNPPW	0.575	99.12	0.50
HLA-A2501	ETFTVSQF	0.600	75.80	0.01
HLA-A2501	KTVEALNGY	0.521	177.89	0.02
HLA-A2501	DTFTNSYSF	0.392	718.04	0.08

Çizelge 5.2. (devam)

HLA-A2501	ESVPNLDRF	0.344	1211.18	0.12
HLA-A2501	SVKEMLSDM	0.323	1525.10	0.17
HLA-A2501	EIVMSVKEM	0.302	1911.55	0.20
HLA-A2501	ELYKNSSAL	0.286	2271.83	0.25
HLA-A2501	PKIEQLTGY	0.257	3098.97	0.40
HLA-A2501	LTAGRISEM	0.247	3471.55	0.40
HLA-A2501	TIKSWDESY	0.232	4076.25	0.50
HLA-A2501	QIDTAFSSY	0.229	4180.27	0.50
HLA-A2501	FVFQMASAT	0.225	4393.22	0.50
HLA-A2501	QSAQIDTAF	0.218	4744.93	0.50
HLA-A2501	ETFPTVSQFL	0.229	4176.16	0.50
HLA-A2501	PETFPTVSQF	0.217	4753.31	0.50
HLA-A2501	DVPKIEQLTGY	0.251	3313.84	0.40
HLA-A2601	ETFPTVSQF	0.822	6,83	0.01
HLA-A2601	DTFTNSYSF	0.560	116.85	0.12
HLA-A2601	LTAGRISEM	0.537	149.39	0.15
HLA-A2601	HIAKAQELY	0.495	234.91	0.20
HLA-A2601	EIVMSVKEM	0.465	326.49	0.25
HLA-A2601	SVKEMLSDM	0.421	523.64	0.40
HLA-A2601	ESVPNLDRF	0.410	594.56	0.40
HLA-A2601	KTVEALNGY	0.408	606.12	0.40
HLA-A2601	FVKGKYIMAF	0.597	78.61	0.10
HLA-A2601	ETFPTVSQFL	0.489	251.60	0.20
HLA-A2601	EATKFCAPIY	0.405	628.05	0.40
HLA-A2601	PETFPTVSQF	0.403	637.61	0.40
HLA-A2601	QIDTAFSSYY	0.358	1043.46	0.50
HLA-A2601	DVPKIEQLTGY	0.626	57.24	0.08
HLA-A2601	DTAFSSYYWLY	0.488	254.10	0.20
HLA-A2601	ETFPTVSQFLF	0.396	689.25	0.40
HLA-B0702	TPMKWGKKL	0.776	11,35	0.05
HLA-B0702	RVNANTAAL	0.748	15.22	0.07
HLA-B0702	MIRRRNLIL	0.615	64.31	0.30
HLA-B0702	VPNLDRFVF	0.564	111.94	0.50
HLA-B0702	STPMKWGKKL	0.723	19.95	0.10
HLA-B0702	TPMKWGKKLY	0.553	125.97	0.50
HLA-B0801	MIRRRNLIL	0.883	3,54	0.01
HLA-B0801	ELYKNSSAL	0.566	109.27	0.30
HLA-B0801	RIYMHPAVL	0.555	123.73	0.40
HLA-B0801	DMIRRRNLIL	0.827	6.49	0.01
HLA-B0801	MIRRRNLILN	0.746	15.69	0.04
HLA-B0801	FVKGKYIMAF	0.548	133.21	0.40
HLA-B0801	SDMIRRRNLIL	0.673	34.48	0.10

Çizelge 5.2. (devam)

HLA-B0801	MLSDMIRRRNL	0.589	85.37	0.25
HLA-B0801	DMIRRRNLILN	0.556	121.55	0.40
HLA-B0802	MIRRRNLIL	0.302	1912.50	0.01
HLA-B0802	DMIRRRNLI	0.229	4206.36	0.05
HLA-B0802	EMNRWFEEF	0.209	5204.32	0.07
HLA-B0802	TKKMKKALL	0.166	8257.08	0.20
HLA-B0802	WGKKLYELF	0.161	8752.28	0.20
HLA-B0802	FQQNRIYMH	0.152	9638.98	0.30
HLA-B0802	FPTVSQFLF	0.149	9973.27	0.30
HLA-B0803	MIRRRNLIL	0.236	3882.37	0.06
HLA-B0803	ALRAQSAQI	0.200	5750.58	0.15
HLA-B0803	KMKKALLST	0.191	6362.99	0.20
HLA-B0803	DMIRRRNLI	0.180	7122.22	0.25
HLA-B0803	YMHPAVLTA	0.175	7500.91	0.30
HLA-B0803	EMNRWFEEF	0.172	7793.78	0.30
HLA-B0803	FQQNRIYMH	0.166	8311.30	0.40
HLA-B0803	WGKKLYELF	0.161	8804.61	0.40
HLA-B0803	TKKMKKALL	0.157	9174.25	0.50
HLA-B0803	ELYKNSSAL	0.154	9456.04	0.50
HLA-B1402	ELYKNSSAL	0.406	618.59	0.08
HLA-B1402	MIRRRNLIL	0.396	686.49	0.10
HLA-B1402	DMIRRRNLI	0.343	1217.58	0.25
HLA-B1402	LTAGRISEM	0.326	1465.05	0.30
HLA-B1402	SSALRAQSA	0.313	1698.78	0.40
HLA-B1402	DIGFRVNAN	0.308	1786.28	0.40
HLA-B1402	RVNANTAAL	0.298	1989.24	0.50
HLA-B1501	LSNKVLAEY	0.652	43.41	0.40
HLA-B1501	RISEMGVCF	0.629	55.47	0.50
HLA-B1501	AQIDTAFSSY	0.896	3,09	0.01
HLA-B1501	AQSAQIDTAF	0.798	8,91	0.04
HLA-B1501	GLVDTFTNSY	0.780	10,86	0.06
HLA-B1501	FVKGKYIMAF	0.697	26.51	0.25
HLA-B1501	ALSNKVLAEY	0.641	48.55	0.50
HLA-B1501	SAQIDTAFSSY	0.655	41.91	0.40
HLA-B1502	SLVGKQSPF	0.634	52.62	0.02
HLA-B1502	YIMAFNPPW	0.532	157.64	0.09
HLA-B1502	ELYKNSSAL	0.503	217.23	0.12
HLA-B1502	KQSPFQNAY	0.421	527.68	0.30
HLA-B1502	TIKSWDESY	0.406	619.00	0.40
HLA-B1502	YELFADDSF	0.400	662.31	0.40
HLA-B1502	PMKWGKKLY	0.391	723.52	0.40

Çizelge 5.2. (devam)

HLA-B1502	QSAQIDTAF	0.370	911.11	0.50
HLA-B1503	KQSPFQNAY	0.866	4,26	0.03
HLA-B1503	VKGGYIMAF	0.827	6,47	0.07
HLA-B1503	KKALLSTPM	0.766	12,58	0.17
HLA-B1503	LKWRKDIGF	0.759	13.53	0.20
HLA-B1503	RIYMHPAVL	0.720	20.70	0.30
HLA-B1503	ETFPTVSQF	0.711	22.86	0.40
HLA-B1503	SALVEATKF	0.676	33.47	0.50
HLA-B1503	YKVPGEIVM	0.674	34.17	0.50
HLA-B1503	KAGVTPETF	0.666	37.02	0.50
HLA-B1509	KHIAKAQEL	0.517	185.75	0.03
HLA-B1509	YKVPGEIVM	0.459	349.62	0.05
HLA-B1509	EHVDWCREF	0.393	711.49	0.12
HLA-B1509	TPMKWGKKL	0.385	773.42	0.12
HLA-B1509	EHLHQSLV	0.357	1048.91	0.15
HLA-B1509	ELYKNSSAL	0.353	1094.44	0.17
HLA-B1509	NRIYMHPAV	0.302	1914.77	0.30
HLA-B1509	RIYMHPAVL	0.257	3110.86	0.50
HLA-B1509	KKALLSTPM	0.248	3412.52	0.50
HLA-B1517	KTVEALNGY	0.921	2,35	0.03
HLA-B1517	ETFPTVSQF	0.882	3,59	0.08
HLA-B1517	LTAGRISEM	0.857	4,72	0.12
HLA-B1517	LSNKVLA EY	0.849	5,1	0.15
HLA-B1517	QSAQIDTAF	0.726	19.46	0.40
HLA-B1517	RVNANTAAL	0.705	24.45	0.50
HLA-B1517	ATKFCAPIY	0.704	24.49	0.50
HLA-B1517	LTGYQQAAL	0.696	26.76	0.50
HLA-B1517	KTIVKLF EV	0.689	28.97	0.50
HLA-B1517	RISEMGVCF	0.687	29.51	0.50
HLA-B1517	SALVEATKF	0.680	31.81	0.50
HLA-B1517	KTGFNIQDM	0.679	32.30	0.50
HLA-B1801	YELFADDSF	0.692	27.94	0.12
HLA-B1801	SEHLLHQSL	0.620	60.81	0.20
HLA-B1801	DTFTNSYSF	0.514	192.80	0.40
HLA-B1801	DEMNRWFEEF	0.615	64.56	0.20
HLA-B1801	KDEMNRWFEEF	0.504	213.99	0.50
HLA-B2705	RRRNILNR	0.655	41.98	0.17
HLA-B2705	NRWFEEFKK	0.562	113.86	0.50
HLA-B2705	RRRNILNRG	0.598	77.15	0.40
HLA-B2705	FRVNANTAAL	0.587	87.35	0.40

Çizelge 5.2. (devam)

HLA-B2720	KKALLSTPM	0.736	17.39	0.08
HLA-B2720	NRIYMHPAV	0.690	28.50	0.12
HLA-B2720	KQPRGTTKM	0.603	73.10	0.25
HLA-B2720	YYWLYKAGV	0.561	115.35	0.30
HLA-B2720	RIYMHPAVL	0.535	153.63	0.40
HLA-B2720	REFVKGKYY	0.531	160.06	0.40
HLA-B2720	ELYKNSSAL	0.511	198.69	0.40
HLA-B2720	YIMAFNPPW	0.481	273.85	0.50
HLA-B3501	FPTVSQFLF	0.788	9.93	0.06
HLA-B3501	LVDTFTNSY	0.717	21.27	0.12
HLA-B3501	MASATDDAQ	0.668	36.41	0.20
HLA-B3501	VPNLDRFVF	0.665	37.52	0.25
HLA-B3501	QSAQIDTAF	0.639	49.70	0.30
HLA-B3501	FVFQMASAT	0.616	63.40	0.40
HLA-B3501	LSNKVLAEY	0.597	78.36	0.40
HLA-B3501	YKVPGEIVM	0.562	114.36	0.50
HLA-B3503	FPTVSQFLF	0.595	80.12	0.01
HLA-B3503	VPNLDRFVF	0.344	1215.61	0.04
HLA-B3503	YKVPGEIVM	0.177	7343.91	0.40
HLA-B3503	VPKIEQLTG	0.162	8680.69	0.40
HLA-B3503	FPTVSQFLFE	0.353	1099.65	0.04
HLA-B3503	TFPTVSQFLF	0.339	1281.07	0.05
HLA-B3503	FPTVSQFLFEL	0.379	829.91	0.03
HLA-B3503	ETFTVSQFLF	0.305	1837.49	0.07
HLA-B3503	TFPTVSQFLFE	0.301	1930.11	0.07
HLA-B3801	DRASADSMI	0.356	1063.42	0.40
HLA-B3801	EHLHQLSLV	0.345	1199.50	0.40
HLA-B3801	GHTKSILNL	0.325	1490.13	0.50
HLA-B3901	NRIYMHPAV	0.599	76.39	0.15
HLA-B3901	YKVPGEIVM	0.571	103.53	0.20
HLA-B3901	ELYKNSSAL	0.526	168.37	0.25
HLA-B3901	SEHLHQLSL	0.473	298.25	0.40
HLA-B3901	TPMKWGKKL	0.462	336.78	0.40
HLA-B3901	KHIAKAQEL	0.437	443.06	0.50
HLA-B3901	FRVNANTAA	0.428	487.44	0.50
HLA-B3901	FRVNANTAAL	0.474	295.33	0.40
HLA-B4001	SEHLHQLSL	0.748	15.35	0.07
HLA-B4001	AETEGKGIF	0.686	29.95	0.15
HLA-B4001	YELFADDSF	0.669	36.08	0.17
HLA-B4001	AEYKVPGEI	0.618	62.10	0.25
HLA-B4001	IEVNNKDEM	0.558	118.95	0.40

Çizelge 5.2. (devam)

HLA-B4001	SEMGVCFGTI	0.630	54.86	0.25
HLA-B4001	ASEHLLHQSL	0.596	79.36	0.30
HLA-B4001	AEYKVPGEIV	0.571	103.66	0.40
HLA-B4001	REFVKGKYIM	0.566	109.76	0.40
HLA-B4001	GEIVMSVKEM	0.565	110.79	0.40
HLA-B4001	FEVQKTGFNI	0.554	124.19	0.40
HLA-B4001	QELYKNSSAL	0.540	145.28	0.50
HLA-B4001	FEFFKKGNGL	0.535	153.19	0.50
HLA-B4001	GEIVMSVKEML	0.514	192.04	0.50
HLA-B4002	SEHLLHQSL	0.753	14.51	0.01
HLA-B4002	AEYKVPGEI	0.656	41.13	0.10
HLA-B4002	REFVKGKYI	0.652	43.35	0.12
HLA-B4002	YECAWSST	0.565	111.13	0.40
HLA-B4002	SEMGVCFGT	0.552	127.28	0.40
HLA-B4002	REFVKGKYIM	0.671	35.20	0.08
HLA-B4002	ASEHLLHQSL	0.661	39.27	0.09
HLA-B4002	SEMGVCFGTI	0.661	39.27	0.09
HLA-B4002	QELYKNSSAL	0.618	62.22	0.20
HLA-B4002	GEIVMSVKEM	0.606	71.25	0.25
HLA-B4002	SEHLLHQSLV	0.590	84.66	0.25
HLA-B4002	FEVQKTGFNI	0.560	116.80	0.40
HLA-B4013	TAFSSYYWL	0.504	213.29	0.07
HLA-B4013	REFVKGKYI	0.445	405.91	0.15
HLA-B4013	YIMAFNPPW	0.423	516.47	0.20
HLA-B4013	RIYMHPAVL	0.412	581.73	0.25
HLA-B4013	DMIRRRNLI	0.398	675.75	0.25
HLA-B4013	DTFTNSYSF	0.343	1218.91	0.50
HLA-B4013	YYWLYKAGV	0.323	1519.86	0.50
HLA-C0303	ELYKNSSAL	0.781	10,72	0.08
HLA-C0303	RVNANTAAL	0.753	14.48	0.12
HLA-C0303	TAFSSYYWL	0.748	15.34	0.12
HLA-C0303	YKVPGEIVM	0.723	20,12	0.17
HLA-C0303	VANPDDAAQ	0.602	74.07	0.40
HLA-C0303	EATKFCAPI	0.599	76.42	0.40
HLA-C0303	RIYMHPAVL	0.587	87.46	0.40
HLA-C0303	TAALSNKVL	0.543	141.12	0.50
HLA-C0401	TFPTVSQFL	0.319	1580.85	0.02
HLA-C0401	SWDESYTEL	0.292	2133.18	0.05
HLA-C0401	WFEKNAGTI	0.265	2836.69	0.08
HLA-C0401	LYKNSSALR	0.240	3729.97	0.17
HLA-C0401	FEKNAGTIK	0.229	4205.73	0.25

Çizelge 5.2. (devam)

HLA-C0401	TVEALNGYL	0.226	4322.58	0.25
HLA-C0401	RIYMHPAVL	0.219	4657.95	0.30
HLA-C0401	TPMKWGKKL	0.219	4687.67	0.40
HLA-C0401	YIMAFNPPW	0.206	5377.76	0.50
HLA-C0501	FADDSFQQN	0.626	56.91	0.09
HLA-C0501	LVDTFTNSY	0.607	70.26	0.10
HLA-C0501	YLDKHKDEV	0.579	95.18	0.12
HLA-C0501	SADSMITNL	0.546	136.66	0.15
HLA-C0501	NKDEMNRWF	0.527	166.53	0.17
HLA-C0501	HVDWCREFV	0.518	184.07	0.17
HLA-C0501	SWDESYTEL	0.415	558.00	0.40
HLA-C0501	RISEMGVCF	0.404	633.79	0.40
HLA-C0602	SFQQNRIYM	0.421	525.32	0.30
HLA-C0702	YYWLYKAGV	0.459	349.63	0.12
HLA-C0702	YKVPGEIVM	0.435	453.95	0.15
HLA-C0702	RIYMHPAVL	0.377	845.85	0.30
HLA-C0702	KQSPFQNAY	0.366	950.36	0.40
HLA-C0702	AFSSYYWLY	0.322	1529.83	0.50
HLA-C0802	YLDKHKDEV	0.420	533.21	0.03
HLA-C0802	FADDSFQQN	0.330	1402.25	0.12
HLA-C0802	LTGYQQAAL	0.265	2841.30	0.30
HLA-C0802	SADSMITNL	0.264	2863.34	0.30
HLA-C0802	IFDEAKKTV	0.241	3680.78	0.50
HLA-C0802	LVDTFTNSY	0.232	4050.71	0.50
HLA-C0802	FADDSFQQNRI	0.356	1060.32	0.08
HLA-C1203	YKVPGEIVM	0.612	66.65	0.25
HLA-C1203	YIMAFNPPW	0.585	89.11	0.30
HLA-C1203	FVFQMASAT	0.580	94.54	0.30
HLA-C1203	YMHPAVLTA	0.573	101.12	0.30
HLA-C1203	RIYMHPAVL	0.552	127.85	0.40
HLA-C1203	NSYSFCESV	0.548	133.40	0.40
HLA-C1203	ETFPTVSQF	0.536	151.76	0.40
HLA-C1203	LVDTFTNSY	0.515	189.88	0.50
HLA-C1402	YIMAFNPPW	0.738	17,04	0.06
HLA-C1402	YYWLYKAGV	0.698	26.33	0.09
HLA-C1402	ELYKNSSAL	0.668	36.19	0.12
HLA-C1402	RVNANTAAL	0.665	37.62	0.12
HLA-C1402	SFQQNRIYM	0.624	58.49	0.20
HLA-C1402	TFPTVSQFL	0.623	59.37	0.20

Çizelge 5.2. (devam)

HLA-C1402	RIYMHPAVL	0.618	62.48	0.20
HLA-C1402	SYYWLYKAG	0.547	133.79	0.40
HLA-C1402	YMHPAVLTA	0.544	139.61	0.40
HLA-C1402	VTPETFPTV	0.518	184.57	0.50
HLA-C1402	SWDESYTEL	0.511	198.68	0.50
HLA-C1402	KQPRGTTKKM	0.506	210.32	0.50
HLA-C1502	KTIVKLFV	0.660	39.49	0.02
HLA-C1502	RIYMHPAVL	0.625	57.76	0.04
HLA-C1502	NSYSFCESV	0.597	78.35	0.07
HLA-C1502	DSIYASALV	0.522	176.92	0.17
HLA-C1502	RVNANTAAL	0.472	302.66	0.30
HLA-C1502	NTAALSNKV	0.461	339.42	0.30
HLA-C1502	LTAGRISEM	0.455	363.49	0.40
HLA-C1502	KHIAKAQEL	0.422	522.19	0.50
HLA-E0101	MIRRRNLIL	0.223	4465.05	0.08

Çizelge 5.3. Tahmini MHC-I peptitlerinin VaxiJen ile çevrimiçi gerçekleştirilen antijenite skorları (Ağustos 2020).

Peptide	VaxiJen
ALVATGLAK	0,6524
AQIDTAFSSY	0,4241
AQSAQIDTAF	0,5474
ASALVEATK	0,6406
DMIRRRNLIL	0,9159
DTAFSSYWLY	0,4672
EIVMSVKEM	1,1743
FVKGKYIMAF	0,4541
GYQQAALKW	0,4828
IALVATGLAK	0,9752
KHIAKAQEL	0,4875
KQSPFQNAV	0,4510
KWGKKLYEL	0,4993
KYIMAFNPPW	0,3023
LTAGRISEM	1,1429
MIRRRNLIL	1,4458
NRIYMHPAV	0,3896
QIDTAFSSY	0,4380
QIDTAFSSYY	0,3701
QSAQIDTAF	0,5882
REFVKGKYI	0,3071
RISEMGVCF	1,1847
RIYMHPAVL	0,5250
RRRNILNR	0,9350
SAQIDTAFSSY	0,4124
SLVGKQSPF	1,2622
STPMKWGKKL	1,1821
SWDESYTEL	0,4271
TAALSNKVL	0,5152
TGYQQAALKW	0,5764
TIKSWDESY	0,4218
VSSTGIVKK	0,6587
VTPETFPTV	0,6477
YMHPAVLTA	0,8430
ADSMITNLLK	-0,4609
AEYKVPGEI	-0,0062
ALNGYLDKHK	-0,4939
ALSNKVLAEY	0,1692
ASEHLLHQSL	-0,0660
ATDDAQKDSY	-0,0242
DEMNRWFEEF	-1,2820
DRASADSMI	-0,0211
DTFTNSYSF	-0,6681

Çizelge 5.3. (devam)

DVPKIEQLTGY	-0,3344
EHLLHQSLV	-0,0526
ELYKNSSAL	-0,3171
ESVPNLD RF	-0,5398
ETFP TVSQF	0,2140
ETFP TVSQFL	-0,0621
ETFP TVSQFLF	0,0571
FPTV SQFLF	0,0669
FRVNANTAA	-0,2638
FRVNANTAAL	-0,1279
FSSYYWLYK	0,0300
GHTKSILNL	0,1211
GLVDTFTNSY	-0,5851
HIAKAQELY	0,2572
HIAKAQELYK	-0,0899
HLLHQSLVGK	0,2662
IFDEAKKTV	0,0398
KALLSTPMK	-0,2636
KTIVKLFEV	-0,4941
KTVEALNGY	0,2957
KWGKKLYELF	0,1699
LLHQSLVGK	0,1809
LSNKVLA EY	0,1183
LVDFTFTNSY	-0,7712
LVDFTFTNSYS	-0,7375
LYELFADDSF	-0,4497
NGLVDFTFTNSY	-0,9160
NRWFEEFKK	-1,1625
PETFP TVSQF	0,2373
QELYKNSSAL	-0,2640
RVNANTAAL	-0,0917
SADSMITNL	0,0149
SEHLLHQSL	-0,0428
SFQQNRIM	0,2415
SQFLFELGK	0,0968
SVKEMLSDM	-0,1763
TFPTV SQFL	-0,0424
TFPTV SQFLF	0,0905
TVSQFLFEL	0,0184
VPNLD RFV	-0,8266
WFEKNAGTI	0,1982
YELFADDSF	-0,2713
YKVPGEIVM	-0,1450
YLDKHKDEV	-0,1799

VaxiJen, hizalamaya bağlı yöntemlerin sınırlamalarının üstesinden gelmek için, protein dizilerinin ana amino asit özelliklerinin tekdüze vektörlerine otomatik çapraz kovaryans (ACC) dönüşümüne dayanan antijen tahmini için yeni bir hizalama içermeyen yaklaşım olarak önerilmiştir. Her birinde 100 bilinen antijen ve 100 antijen olmayan sekans içeren viral, bakteriyel ve tümör protein veri kümeleri, 2 validasyon ile doğrulanmış ve %70-%89 doğrulukta olduğu gösterilmiştir. Predicted Antigenic Peptides, proteinler üzerindeki antijenik determinantları tahmin etmek için amino asit kalıntılarının fizikokimyasal özelliklerinden ve bunların deneysel olarak bilinen segmental epitoplardaki oluşum sıklıklarından yararlanan yarı ampirik bir yöntem olarak bildirilen Kolaskar ve Tongaonkar (1990) yöntemine dayalıdır ve yaklaşık %75 doğruluktadır. VaxiJen analizlerine göre değerlendirilen 88 peptidin 35'i antijenik özelliktedir. Fakat, veri setine gelen güncellemeyle 16'sı antijenik özellikte 23 peptit daha listeye eklenmiştir. Buradan, ortalama 9-mer (nonamer) uzunluğundaki peptitler yerine bu çalışmada da olduğu gibi birçok peptidi içinde barındıran bölgelere odaklanılabileceği sonucuna varabiliriz. Predicted Antigenic Peptides'a

göre, tam uzunlukta verilen protein dizisinin üzerinde 15 antijenik peptit bölgesi bulunmaktadır.

Çizelge 5.4. Tahmini MHC-I peptitlerinin Predicted Antigenic Peptides çevrimiçi aracılı antijenite skorları (2020).

PREDICTED ANTIGENIC PEPTIDES		
Başlangıç	Sekans	Bitiş
32	NSYSFCESVPLNDRFVFQ	91
59	KDSIYASALVEATKFCAPIYECWVSSTGIVKK	120
111	TELKVDVPKI	131
122	QLTGYQQAAL	168
147	ALSNKVLAIEYKVPGEIVMSVKE	203
190	RGPVSHVDWCRE	237
226	SGIALVATGLAK	259
252	KTVEALNG	289
277	ITNLLKHIAKAQE	321
295	SALRAQSAQIDTAFSSYYWLYKAGVTP	334
323	TFPTVSQFLFEL	382
374	YMHFAVLTA	399
387	EMGVCFGTIPVAN	437
426	CAKTIVKLFVQ	463
445	DMDIVASEHLLHQSLVGKQ	91

* 2020 ve 2022 yıllarında yapılan 2 analiz sonucunu da aynıdır.

Çizelge 5.5. Tahmini MHC-I peptitlerinin ile çevrimiçi araçlarla yapılan alerjenite skorları.

Peptide	AllerTOP v2.0	Algpred2	AllergenFP v1.0
ALSNKVLAIEYK	Probable Allergen	Allergen	Probable Allergen
ALVATGLAK	Probable Non-Allergen	Allergen	Probable Allergen
AQIDTAFSSY	Probable Non-Allergen	Allergen	Probable Allergen
AQSAQIDTAF	Probable Allergen	Allergen	Probable Non-Allergen
ASALVEATK	Probable Non-Allergen	Allergen	Probable Non-Allergen
DMIRRRNLIL	Probable Non-Allergen	Non-Allergen	Probable Non-Allergen
DTAFSSYYWLY	Probable Non-Allergen	Allergen	Probable Allergen
EIVMSVKEM	Probable Allergen	Non-Allergen	Probable Allergen
FKGKYIMAF	Probable Non-Allergen	Allergen	Probable Allergen
GYQQAALKW	Probable Non-Allergen	Allergen	Probable Allergen
IALVATGLAK	Probable Non-Allergen	Allergen	Probable Allergen
KHIAKAQEL	Probable Allergen	Allergen	Probable Allergen
KQSPFQNAV	Probable Allergen	Allergen	Probable Non-Allergen
KWKGKLYEL	Probable Non-Allergen	Allergen	Probable Allergen
KYIMAFNPPW	Probable Non-Allergen	Allergen	Probable Non-Allergen
LTAGRISEM	Probable Allergen	Non-Allergen	Probable Allergen
MIRRRNLIL	Probable Non-Allergen	Non-Allergen	Probable Allergen
NRIYMHFAVL	Probable Allergen	Allergen	Probable Non-Allergen
QIDTAFSSY	Probable Non-Allergen	Allergen	Probable Allergen
QIDTAFSSYY	Probable Non-Allergen	Allergen	Probable Non-Allergen
QSAQIDTAF	Probable Allergen	Allergen	Probable Non-Allergen
REFVKGYI	Probable Non-Allergen	Allergen	Probable Non-Allergen
RISEMGVCF	Probable Allergen	Allergen	Probable Allergen
RIYMHFAVL	Probable Non-Allergen	Non-Allergen	Probable Non-Allergen
RRRNLILNR	Probable Non-Allergen	Allergen	Probable Allergen
SAQIDTAFSSY	Probable Allergen	Allergen	Probable Non-Allergen
SLVGKQSPF	Probable Non-Allergen	Allergen	Probable Allergen
STPMKWGKKL	Probable Non-Allergen	Allergen	Probable Non-Allergen
SWDESYTEL	Probable Non-Allergen	Allergen	Probable Allergen
TAALSNKVL	Probable Non-Allergen	Allergen	Probable Allergen
TGYQQAALKW	Probable Allergen	Allergen	Probable Allergen
TIKSWDESY	Probable Allergen	Allergen	Probable Allergen
VSSSTGIVKK	Probable Allergen	Allergen	Probable Allergen
VTPTFTPTV	Probable Allergen	Allergen	Probable Allergen
YMHFAVLTA	Probable Non-Allergen	Allergen	Probable Allergen
ADSMITNLLK	Probable Allergen	Allergen	Probable Non-Allergen
AEYKVPGEI	Probable Allergen	Allergen	Probable Non-Allergen
ALNGYLDKHK	Probable Allergen	Allergen	Probable Allergen
ALSNKVLAIEY	Probable Non-Allergen	Allergen	Probable Allergen
ASEHLLHQSL	Probable Allergen	Allergen	Probable Allergen
ATDDAQKDSIY	Probable Allergen	Allergen	Probable Non-Allergen
DEMNRWFEEF	Probable Allergen	Non-Allergen	Probable Allergen
DRASADSMI	Probable Non-Allergen	Allergen	Probable Allergen
DTFTNSYSF	Probable Allergen	Allergen	Probable Allergen
DVPKIEQLTGY	Probable Allergen	Allergen	Probable Allergen
EHLHQSLV	Probable Allergen	Allergen	Probable Allergen
ELYKNSSAL	Probable Non-Allergen	Allergen	Probable Non-Allergen
ESVPLNDRF	Probable Non-Allergen	Allergen	Probable Non-Allergen

Çizelge 5.3. (devam)

ETFPTVSQF	Probable Non-Allergen	Allergen	Probable Allergen
ETFPTVSQFL	Probable Non-Allergen	Allergen	Probable Allergen
ETFPTVSQFLF	Probable Allergen	Allergen	Probable Allergen
FPTVSQFLF	Probable Allergen	Allergen	Probable Non-Allergen
FRVNANTAA	Probable Allergen	Allergen	Probable Allergen
FRVNANTAAL	Probable Allergen	Allergen	Probable Allergen
FSSYYWLYK	Probable Allergen	Non-Allergen	Probable Allergen
GHTKSILNL	Probable Allergen	Allergen	Probable Allergen
GLVDTFTNSY	Probable Non-Allergen	Allergen	Probable Allergen
HIAKAQELY	Probable Non-Allergen	Allergen	Probable Allergen
HIAKAQELYK	Probable Non-Allergen	Allergen	Probable Allergen
HLLHQSLVGK	Probable Allergen	Allergen	Probable Non-Allergen
IFDEAKKTV	Probable Non-Allergen	Allergen	Probable Allergen
KALLSTPMK	Probable Allergen	Allergen	Probable Allergen
KTIVKLFEV	Probable Non-Allergen	Allergen	Probable Allergen
KTYEALNGY	Probable Non-Allergen	Allergen	Probable Non-Allergen
KWGKKLYELF	Probable Non-Allergen	Allergen	Probable Non-Allergen
LLHQSLVGK	Probable Allergen	Allergen	Probable Allergen
LSNKVLAAY	Probable Allergen	Allergen	Probable Non-Allergen
LVDTFTNSY	Probable Non-Allergen	Allergen	Probable Non-Allergen
LVDTFTNSYS	Probable Non-Allergen	Allergen	Probable Non-Allergen
LYELFADDSF	Probable Allergen	Allergen	Probable Non-Allergen
NGLVDTFTNSY	Probable Non-Allergen	Allergen	Probable Allergen
NRWFEEFKK	Probable Allergen	Allergen	Probable Allergen
PETFTVSQF	Probable Allergen	Allergen	Probable Allergen
QELYKNSSAL	Probable Non-Allergen	Allergen	Probable Non-Allergen
RVNANTAAL	Probable Allergen	Allergen	Probable Allergen
SADSMITNL	Probable Non-Allergen	Allergen	Probable Allergen
SEHLLHQSL	Probable Allergen	Allergen	Probable Allergen
SFQQNRIMY	Probable Allergen	Allergen	Probable Allergen
SQFLFELGK	Probable Allergen	Allergen	Probable Allergen
SVKEMLSDM	Probable Non-Allergen	Non-Allergen	Probable Non-Allergen
TFPTVSQFL	Probable Allergen	Allergen	Probable Allergen
TFPTVSQFLF	Probable Allergen	Allergen	Probable Non-Allergen
TVSQFLFEL	Probable Allergen	Allergen	Probable Non-Allergen
VPNLDRFVF	Probable Non-Allergen	Allergen	Probable Allergen
WFEKNAGTI	Probable Non-Allergen	Allergen	Probable Non-Allergen
YELFADDSF	Probable Allergen	Allergen	Probable Non-Allergen
YKVPGEIVM	Probable Non-Allergen	Allergen	Probable Allergen
YLDKHKDEV	Probable Non-Allergen	Allergen	Probable Allergen

* AllerTOP 11-mer peptitler için analiz sonucu verdi. 3 çevrimiçi araç için decalerjen olmayan peptitler açık yeşille gösterilmiştir.

AllerTOP, protein dizilerinin tekdüze eşit uzunluklu vektörlere ACC dönüşümüne dayanır. (Wold vd., 1993). Farklı uzunluktaki peptitlerin kantitatif yapı-aktivite ilişkileri (QSAR) çalışmalarına uygulanmıştır. Amino asitler hidrofobikliklerine, moleküler boyutlarına, sarmal oluşturma eğilimlerine, bulunma miktarlarına ve β -tabaka oluşturma eğilimlerine göre tanımlanırlar. Proteinler, farklı türlerden bilinen 2427 alerjen ve 2427 alerjen olmayan sekans içeren sete dayalı olarak en yakın komşu algoritmasına (kNN, k=1) göre sınıflandırılır. AllergenFP, ACC dönüşümüne dayanmasının yanı sıra, setteki tüm proteinler için Tanimoto katsayıları hesaplanır. Bir protein, en yüksek Tanimoto katsayısına sahip proteine göre alerjen veya alerjen olmayan olarak sınıflandırılır. Algpred ise, alerjenlerin ve alerjen olmayan protein dizisinin amino asit/dipeptit bileşimi kullanan SVM modülüne dayanır. Kullanılan eşik değeri -0,4'tür. Bu değerde, bu yöntemin duyarlılığı ve özgüllüğü, beş katlı çapraz doğrulama kullanılarak sırasıyla %88,87 ve %81,86 olarak hesaplanır. Dipeptit bileşimi kullanılırsa eşik değeri -0,2'dir ve bu değerde, bu yöntemin duyarlılığı ve özgüllüğü, sırasıyla %82,78 ve %85,00 olarak hesaplanır. Tam uzunluklu protein dizisi çevrimiçi araçlara verildiğinde, AllerTOP ve AllergenFP alerjen olmayan, Algpred ise

alerjen olarak sınıflandırmaktadır. Hem tam uzunluklu protein dizisi hem de peptitler için farklı algoritma/yaklaşımlar farklı sonuçlar doğurmaktadır. Literatür araştırması yapılan özellikle sadece in silico tabanlı çalışmaların, epitop tahmininde sayıları az da olsa birden fazla çevrimiçi araç/veri tabanı kullandığını, fakat antijenite, alerjenite, hidrofobisite gibi diğer parametreleri değerlendirirken tek bir algoritmayı tercih ettiklerini göstermektedir.



Çizelge 5.6. Seçilen peptitlerin hidrofobisite skorları.

Peptide	Peptide v2.0 (%)	ToxinPred	CSM-Toxin
ALSNKVLAEYK	45.45	-0.15	-0.14
ALVATGLAK	66.67	0.14	1.36
AQIDTAFSSY	40	-0.02	0.03
AQSAQIDTAF	50	-0.04	0.07
ASALVEATK	55.56	-0.04	0.5
DMIRRRNLIL	50	-0.39	-0.2
DTAFSSYYWLY	36.36	0.04	-0.2
EIVMSVKEM	55.56	-0.03	0.56
FVKGKYIMAF	60	0.10	0.85
GYQQAALKW	44.44	-0.10	-0.68
IALVATGLAK	70	0.20	1.67
KHIAKAQEL	44.44	-0.24	-0.68
KQSPFQNAV	33.33	-0.29	-1.5
KWGKKLYEL	33.33	-0.26	-1.13
KYIMAFNPPW	70	0.04	-0.18
LTAGRISEM	44.44	-0.10	0.23
MIRRRNLIL	55.56	-0.35	0.17
NRIMHPAV	55.56	-0.12	-0.19
QIDTAFSSY	33.33	-0.06	-0.17
QIDTAFSSYY	30	-0.05	-0.28
QSAQIDTAF	44.44	-0.08	-0.12
REFVKGKYI	33.33	-0.28	-0.67
RISEMGVCF	44.44	-0.03	0.74
RIYMHPAVL	66.67	0.01	0.62
RRRNLILNR	33.33	-0.73	-1.43
SAQIDTAFSSY	36.36	-0.05	-0.05
SLVGKQSPF	44.44	-0.06	-0.02
STPMKWGKKL	40	-0.25	-1.04
SWDESYTEL	22.22	-0.19	-1.24
TAALSNKVL	55.56	-0.01	0.72
TGYQQAALKW	40	-0.11	-0.68
TIKSWDESY	22.22	-0.22	-1.21
VSTGIVKK	33.33	-0.10	0.27
VTPTVFPTV	55.56	0.04	0.27
YMHFAVLTA	66.67	0.13	0.74
ADSMITNLLK	50	-0.06	0.34
AEYKVPGEI	44.44	-0.08	-0.41
ALNGYLDKHK	30	-0.25	-1.03
ALSNKVLAEY	50	-0.05	0.24
ASEHLLHQSL	40	-0.08	-0.18
ATDDAQKDSIY	27.27	-0.29	-1.15
DEMNRWFEEF	40	-0.31	-1.54
DRASADSMI	44.44	-0.25	-0.34
DTFTNSYSF	22.22	-0.11	-0.63
DVPKIEQLTGY	36.36	-0.13	-0.54
EHLHQSLV	44.44	-0.03	0.16
ELYKNSSAL	33.33	-0.17	-0.49
ESVPNLDRF	44.44	-0.27	-0.73
ETFTVSQF	44.44	-0.03	-0.11
ETFTVSQFL	50	0.03	0.28
ETFTVSQFLF	54.55	0.08	0.51
FPTVSQFLF	66.67	0.19	1.09
FRVNANTAA	55.56	-0.15	0.02
FRVNANTAAL	60	-0.08	0.4
FSSYYWLYK	33.33	-0.01	-0.41
GHTKSILNL	33.33	-0.07	-0.04
GLVDFTFTNSY	30	-0.01	-0.01
HIKAQELY	44.44	-0.11	-0.39
HIKAQELYK	40	-0.21	-0.74
HLLHQSLVGK	40	-0.06	0.06
IFDEAKKTV	44.44	-0.18	-0.24
KALLSTPMK	55.56	-0.13	0.04
KTIVKLFEV	55.56	-0.01	0.83
KTVEALNGY	33.33	-0.12	-0.39
KWGKKLYELF	40	-0.17	-0.74
LLHQSLVGK	44.44	-0.02	0.42
LSNKVLAEY	44.44	-0.08	0.07
LVDFTFTNSY	33.33	-0.03	0.03
LVDFTFTNSYS	30	-0.05	-0.05
LYELFADDSF	50	0.02	0.24
NGLVDFTFTNSY	27.27	-0.07	-0.33
NRWFEEFKK	33.33	-0.47	-2.01
PETFTVSQF	50	-0.03	-0.26
QELYKNSSAL	30	-0.22	-0.79
RVNANTAAL	55.56	-0.16	0.13
SADSMITNL	44.44	-0.03	0.3
SEHLLHQSL	33.33	-0.12	-0.4
SFQQNRIM	33.33	-0.27	-0.88
SQFLFELGK	44.44	-0.03	0.12
SVKEMLSDM	44.44	-0.15	-0.08

Çizelge 5.6. (devam)

TFPTVSQFL	55.56	0.10	0.7
TFPTVSQFLF	60	0.15	0.91
TVSQFLFEL	55.56	0.12	0.99
VPNLDREVF	66.67	-0.04	0.52
WFEKNAGTI	44.44	-0.05	-0.42
YELFADDSF	44.44	-0.03	-0.16
YKVPGEIVM	55.56	0.05	0.46
YLDKHKDEV	22.22	-0.40	-1.64

* Eşik değeri Peptide 2.0 için, tam uzunluklu proteinin hidrofobisite değeri olan %40,46 kabul edildi.

Antijen sunumu doğal olarak bir protein içindeki hidrofobik bölgeleri desteklemektedir. Antijenik özellik ve hidrofobisite arasındaki bağlantıyı inceleyen bir çalışma, yüksek derecede açık bir hidrofobiklik, ani bozunma ve dolayısıyla peptit sunumu için bir sinyal görevi gördüğü kavramını desteklemektedir. Ayrıca merkezi bir hidrofobik çekirdeğe sahip sitozolik proteinlerin, proteasomal bozunmanın ana substratları olmasıyla, immünojenik CTL epitoplarının da konumsal olarak antijenlerinin merkezine doğru eğilimli olması tutarlıdır. Bu nedenle protein hidrofobikliği, hem antijen sunumunu hem de immünojenisiteyi artırabilir. Peptide'a göre, hidrofobiklik indeksi, bağlı hidrofobiklik veya bir amino asidin suda ne kadar çözünür olduğunun bir ölçüsüdür. Bir proteinde, hidrofobik amino asitler muhtemelen iç kısımda bulunurken, hidrofilik amino asitler muhtemelen sulu ortamla temas halindedir. Şekil 5.1.'de gösterilen değerler, nötr (0 değeri) olarak kabul edilen glisine göre en hidrofobik kalıntıya 100 değeri verilecek şekilde amino asitler normalize edilmiştir. Yüzde değerleri, glisinden daha hidrofilik olan tortulara göre tahmin edilmiştir.

At pH 2 [^]		At pH 7 [^]	
Very Hydrophobic			
Leu	100	Phe	100
Ile	100	Ile	99
Phe	92	Trp	97
Trp	84	Leu	97
Val	79	Val	76
Met	74	Met	74
Hydrophobic			
Cys	52	Tyr	63
Tyr	49	Cys	49
Ala	47	Ala	41
Neutral			
Thr	13	Thr	13
Glu	8	His	8
Gly	0	Gly	0
Ser	-7	Ser	-5
Gln	-18	Gln	-10
Asp	-18		
Hydrophilic			
Arg	-26	Arg	-14
Lys	-37	Lys	-23
Asn	-41	Asn	-28
His	-42	Glu	-31
Pro	-46	Pro	-46 (used pH 2)
		Asp	-55

[^]pH 2 values: Normalized from Sereda et al., J. Chrom. 676: 139-153 (1994).

^{*}pH 7 values: Monera et al., J. Protein Sci. 1: 319-329 (1995).

Şekil 5.1. Peptide 2.0 için amino asitlerin hidrofobisite değerleri (https://www.peptide2.com/N_peptide_hydrophobicity_hydrophilicity.php).

Çizelge 5.7. Seçilen peptitlerin toksisite değerleri.

Peptide Sequence	Toxinpred		ToxIBTL		CSM-Toxin	
	Prediction	SVM Score	Result	Score	Prediction	Probability
ALSNKVLAEYK	Non-toxin	-0.42	toxic	0.99999607	Non-toxic	0.49
ALVATGLAK	Non-toxin	-0.94	non-toxic	7,87E+00	Toxic	0.52
AQIDTAFSSY	Non-toxin	-0.67	non-toxic	8,52E-22	Toxin	0.55
AQSAQIDTAF	Non-toxin	0.53	non-toxic	6,09E-31	Non-toxic	0.02
ASALVEATK	Non-toxin	-1.25	non-toxic	3,45E-13	Non-toxic	0.12
DMIRRRNLIL	Non-toxin	-0.45	toxic	0.99999833	Non-toxic	0.47
DTAFSSYYWLY	Non-toxin	-0.65	non-toxic	1,83E-09	Non-toxic	0.0
EIVMSVKEM	Non-toxin	-0.26	non-toxic	3,68E-13	Toxic	0.52
FVKGKYIMAF	Non-toxin	-0.68	non-toxic	6,37E-06	Toxic	0.6
GYQQAALKW	Non-toxin	-0.97	toxic	0.9999995	Non-toxic	0.47
IALVATGLAK	Non-toxin	-0.97	non-toxic	5,46E-04	Toxic	0.77
KHIAKAQEL	Non-toxin	-0.43	non-toxic	1,04E-26	Non-toxic	0.3
KQSPFQNAV	Non-toxin	-0.69	non-toxic	0.029409789	Non-toxic	0.03
KWGGKKLYEL	Non-toxin	-0.90	non-toxic	3,79E+00	Non-toxic	0.49
KYIMAFNPPW	Non-toxin	-0.46	toxic	0.9999738	Toxic	0.53
LTAGRISEM	Non-toxin	-1.07	non-toxic	0.007647459	Non-toxic	0.02
MIRRRNLIL	Non-toxin	-0.50	non-toxic	1,41E-01	Toxic	0.69
NRIYMHPAV	Non-toxin	-1.18	non-toxic	3,78E-28	Non-toxic	0.35
QIDTAFSSY	Non-toxin	-0.79	non-toxic	3,26E-20	Non-toxic	0.01
QIDTAFSSYY	Non-toxin	-0.68	non-toxic	1,24E-04	Non-toxic	0.07
QSAQIDTAF	Non-toxin	-0.62	non-toxic	6,78E-24	Non-toxic	0.13
REFVKGKYI	Non-toxin	-0.38	non-toxic	4,24E-03	Non-toxic	0.09
RISEMGVCF	Non-toxin	-1.24	toxic	0.6393609	Non-toxic	0.1
RIYMHPAVL	Non-toxin	-1.29	non-toxic	0.0	Non-toxic	0.39
RRRNLLILNR	Non-toxin	-0.92	non-toxic	1,18E-16	Non-toxic	0.46
SAQIDTAFSSY	Non-toxin	-0.66	non-toxic	6,77E-30	Non-toxic	0.0
SLVGKQSPF	Non-toxin	-0.68	non-toxic	1,73E+01	Non-toxic	0.24
STPMKWGKKL	Non-toxin	-0.73	toxic	0.9999999	on-toxic	0.03
SWDESYTEL	Non-toxin	-1.16	non-toxic	1,40E-02	Non-toxic	0.09
TAALSNKVL	Non-toxin	-0.75	non-toxic	1,64E-04	Toxic	.67
TGYQQAALKW	Non-toxin	-0.91	toxic	0.9877087	Non-toxic	0.49
TIKSWDESY	Non-toxin	-0.79	non-toxic	7,09E-11	Non-toxic	0.28
VSTGIVKK	Non-toxin	-0.56	non-toxic	5,84E-14	Non-toxic	0.35
VTPETFTPV	Non-toxin	-1.23	non-toxic	5,43E-21	Toxic	0.91
YMHFAVLTA	Non-toxin	-0.72	non-toxic	1,74E-23	Toxic	0.57
ADSMITNLLK	Non-toxin	-1.03	non-toxic	2,95E-04	Non-toxic	0.35
AEYKVPGEI	Non-toxin	-0.44	toxic	0.9999784	Non-toxic	0.32
ALNGYLDKHK	Non-toxin	-1.08	non-toxic	3,16E-07	Toxic	0.67
ALSNKVLAEY	Non-toxin	-0.59	toxic	0.99998665	Non-toxic	0.25
ASEHLLHQSL	Non-toxin	-0.59	non-toxic	0.00027193959	Non-toxic	0.0
ATDDAQKDSIY	Non-toxin	-1.25	non-toxic	1,58E-23	Non-toxic	0.15
DEMNRWFEEF	Non-toxin	-0.61	non-toxic	3,02E-28	Toxic	0.73
DRASADSMI	Non-toxin	-0.84	non-toxic	1,54E-05	Non-toxic	0.47
DTFTNSYSF	Non-toxin	-0.87	non-toxic	0.006997126	Non-toxic	0.04
DVPKIEQLTGY	Non-toxin	-1.21	non-toxic	1,54E-07	Non-toxic	0.32
EHLHQSLV	Non-toxin	-0.55	non-toxic	3,30E-01	Non-toxic	0.21
ELYKNSSAL	Non-toxin	-0.19	non-toxic	6,74E-18	Toxic	0.61
ESVPNLDRF	Non-toxin	-1.07	non-toxic	3,27E-14	Non-toxic	0.02
ETFPTVSQF	Non-toxin	-1.15	non-toxic	8,86E-32	Non-toxic	0.01
ETFPTVSQFL	Non-toxin	-1.10	non-toxic	1,62E-30	Non-toxic	0.49
ETFPTVSQFLF	Non-toxin	-1.11	non-toxic	1,60E-19	Non-toxic	0.41
FPTVSQFLF	Non-toxin	-0.98	non-toxic	0.0	Toxic	0.61
FRVNANTAA	Non-toxin	-0.93	non-toxic	0.00045994582	Non-toxic	0.36
FRVNANTAAL	Non-toxin	-0.93	non-toxic	5,37E+01	Non-toxic	0.34
FSSYYWLYK	Non-toxin	-0.41	non-toxic	5,74E-09	Non-toxic	0.36
GHTKSILNL	Non-toxin	-1.20	non-toxic	5,10E-17	Non-toxic	0.43
GLVDFTFTNSY	Non-toxin	-0.76	toxic	0.9999229	Non-toxic	0.42
HIAKAQELY	Non-toxin	-0.53	non-toxic	1,63E-24	Non-toxic	0.09
HIAKAQELYK	Non-toxin	-0.39	non-toxic	3,95E-15	Non-toxic	0.28
HLLHQSLVGK	Non-toxin	-0.74	non-toxic	2,83E-07	Toxic	0.65
IFDEAKKTV	Non-toxin	-0.92	non-toxic	2,74E-18	Toxic	0.63
KALLSTPMK	Non-toxin	-1.11	toxic	0.99974245	Non-toxic	0.27
KTIVKLFV	Non-toxin	-0.64	non-toxic	2,08E-13	Non-toxic	0.06

Çizelge 5.7. (devam)

KTVEALNGY	Non-toxin	-0.78	non-toxic	2,92E-03	Toxic	0.69
KWGKKLYELF	Non-toxin	-0.93	non-toxic	3,38E+01	Non-toxic	0.23
LLHQSLVGK	Non-toxin	-0.78	non-toxic	2,05E-03	Toxic	0.65
LSNKVLA EY	Non-toxin	-0.68	toxic	0.9833066	Non-toxic	0.05
LVDFTNSY	Non-toxin	-0.69	toxic	0.9999889	Non-toxic	0.08
LVDFTNSYS	Non-toxin	-0.77	toxic	0.99998355	Non-toxic	0.35
LYELFADDSF	Non-toxin	-0.87	non-toxic	2,53E-16	Non-toxic	0.33
NGLVDFTNSY	Non-toxin	-0.63	toxic	1.0	Toxic	0.62
NRWFEEFKK	Non-toxin	-0.82	non-toxic	3,28E-12	Toxic	0.65
PETFTVSQF	Non-toxin	-1.20	non-toxic	7,70E-27	Non-toxic	0.1
QELYKNSSAL	Non-toxin	-0.09	non-toxic	1,86E-15	Non-toxic	0.01
RVNANTAAL	Non-toxin	-0.72	non-toxic	8,57E-08	Toxic	0.53
SADSMITNL	Non-toxin	-0.82	non-toxic	2,10E-17	Toxic	0.51
SEHLLHQSL	Non-toxin	-0.60	toxic	0.8242968	Non-toxic	0.29
SFQQNRIYM	Non-toxin	-1.63	non-toxic	0.0	Non-toxic	0.15
SQFLFELGK	Non-toxin	-0.92	non-toxic	9,47E-10	Non-toxic	0.0
SVKEMLSDM	Non-toxin	-0.67	non-toxic	4,76E-04	Non-toxic	0.07
TFPTVSQFL	Non-toxin	-1.07	non-toxic	0.0	Toxic	0.54
TFPTVSQFLF	Non-toxin	-1.07	non-toxic	0.0	Non-toxic	0.39
TVSQFLFEL	Non-toxin	-1.02	non-toxic	0.0	Non-toxic	0.04
VPNLDRFVF	Non-toxin	-1.04	non-toxic	1,95E-18	Non-toxic	0.31
WFEKNAGTI	Non-toxin	-0.70	non-toxic	3,75E-16	Toxic	1.0
YELFADDSF	Non-toxin	-0.98	non-toxic	1,17E-03	Toxic	0.58
YKVPGEIVM	Non-toxin	-0.59	non-toxic	4,42E-09	Non-toxic	0.02
YLDKHKDEV	Non-toxin	-1.30	non-toxic	6,49E-27	Toxic	0.61

Çizelge 5.8. İlgili peptitlerin popülasyonda korunmuşluk analizleri (IEDB).

Epitop	Allel	coverage ^a	average_hit ^b	pc90 ^c
ADSMITNLLK	A0301,A1101	30.92%	0.32	0.14
AEYKVPGEI	B1301,B1302,B3701,B4001,B4002,B4402,B4403,B4801,B4901,B5201	37.39%	0.41	0.16
ALNGYLDKHK	A0301	16.81%	0.17	0.12
ALSNKVLAEY	A0101,A0301,B1501,B1525,A2902,A3002	43.89%	0.5	0.18
ALSNKVLAEYK	A0301	16.81%	0.17	0.12
ALVATGLAK	A0301,A1101,A3001,A7401	35.91%	0.38	0.16
AQIDTAFSSY	A0101,A2501,A2601,A2902,A3002,B1501,B1502,B1525,B1801,B4403,B4601	49.89%	0.62	0.2
AQSAQIDTAF	B1301,B1501,B1502,B1525,B4801	16.1%	0.17	0.12
ASALVEATK	A0301,A1101,A3001,A6801,A7401	40.56%	0.44	0.17
ASEHLLHQSL	B4001,B4002,B4402	18.29%	0.19	0.12
ATDDAQKDSIY	A0101	17.34%	0.17	0.12
DEMNRWFEEF	B1801,B4402,B4403	20.42%	0.21	0.13
DMIRRRNLIL	B0801	10.55%	0.11	0.11
DRASADSMI	B1402,B3801,B3901	8.72%	0.09	0.11
DTAFSSYYWLY	A0101,A2601	22.62%	0.23	0.13
DTFTNSYSF	A0101, A2501, A2601, A2902, B5101, B5301, B5802	23.55%	0.26	0.13
DVPKIEQLTGY	A2501,A2601	9.07%	0.09	0.11
EHLHQSLV	B1402,B1509,B3801	6.16%	0.06	0.11
EIVMSVKEM	A2501,A2601	9.07%	0.09	0.11
ELYKNSSAL	A2501,B0801,B0803,B1402,B1502,B1509,B2720,B3901,C0303,C1402	29.75%	0.33	0.14
ESVPNLDRF	A2501,A2601,B3501,B5301,B5801,B5802	23.96%	0.26	0.13
ETFTPTVSQF	A2501,A2601,B1503,B1517,C1203	19.99%	0.21	0.12
ETFTPTVSQFL	A2501,A2601	9.07%	0.09	0.11
ETFTPTVSQFLF	A2402,A2601,B3503	28.99%	0.31	0.14
FPTVSQFLF	B0802,B3501,B3503	11.75%	0.12	0.11
FRVNANTAA	B3901	2.75%	0.03	0.1
FRVNANTAAL	B2705,B3901	7.46%	0.08	0.11
FSSYYWLYK	A0101,A0301,A1101	45.19%	0.5	0.18
FVKGYIMAF	A2501,A2601,B0801,B1501	25.92%	0.28	0.13
GHTKSILNL	B1402,B3801,B3901,B4801	10.35%	0.11	0.11
GLVDFTNSY	A0101,A2601,A2902,A3002,B1501,B1502,B1525	36.95%	0.42	0.16
GYQQAALKW	A2301,A2402,A2403	26.6%	0.27	0.14
HIAKAQELY	A2601	5.82%	0.06	0.11
HIAKAQELYK	A0301,A1101	30.92%	0.32	0.14
HLLHQSLVGK	A0301	16.81%	0.17	0.12
IALVATGLAK	A0301	16.81%	0.17	0.12
IFDEAKKTV	C0401,C0501,C0704,C0802,C1402,G0101,G0102,G0103,G0104	99.58%	1.79	1,26
KALLSTPMK	A0301,A1101,A3001	34.14%	0.36	0.15
KHIAKAQEL	B1402,B3801,B3901,BB4801,C0602,C0701,C0702,C0704	57.78%	0.7	0.24
KQSPFQNAV	A2902,A3002,A3201,B1301,B1501,B1502,B1503,B1525,B1801,B4601,B4801,B5801,B5802,C0202,C0209,C0302,C0702,C1202,C1203,C1402	67.89%	0.98	0.31
KTIVKLFEV	A0201,A0206,A0212,A3001,A3201,B1517,C1502,C1701	51.5%	0.58	0.21
KTVEALNGY	A0101,A2501,A2601,A2902,A3002,A3201,A7401,A1101,B1501,B1517,B1525,B4601,B5701,B5801,B5802	60.22%	0.79	0.25
KWGKKLYEL	A2301,A2402,A2403,G0101,G0102,G0103,G0104,G0106	99.86%	1,75	1,26
KWGKKLYELF	A2301,A2402	26.18%	0.27	0.14
KYIMAFNPPW	A2301,A2402,A2403	26.6%	0.27	0.14
LLHQSLVGK	A0301,A1101,A7401	32.73%	0.35	0.15
LSNKVLAEY	A0101,A0301,B1501,B1517,B3501	44.01%	0.52	0.18
LTAGRISEM	A2501,A2601,B1402,B1517,C1502	16.06%	0.17	0.12
LVDTFTNSY	A0101,B3501,C0501,C0802,C1203	40.63%	0.48	0.17
LVDTFTNSYS	A0101,B3501,C0501,C0802,C1203	40.63%	0.48	0.17
LYELFADDSF	A2301,A2402	26.18%	0.27	0.14
MIRRRNLIL	A3001,B0702,B0801,B0802,B0803,B1402,E0101	81.91%	1,05	0.55
NGLVDFTNSY	A0101	17.34%	0.17	0.12
NRIYMHPAV	B1402,B1509,B2720,B3801,B3901,C0701,0702	44.0%	0.5	0.18
NRWFEEFKK	B2705	4.78%	0.05	0.11
PETFTPTVSQF	A2501,A2601	9.07%	0.09	0.11
QELYKNSSAL	B4001,B4002	11.13%	0.11	0.11
QIDTAFSSY	A0101,A2501,A2601,A2902,A3002,B1501,B1502,B1525,B3501	44.88%	0.54	0.18
QIDTAFSSYY	A0101,A2601,A2902,A3002	28.12%	0.29	0.14
QSAQIDTAF	A2501,B1502,B1517,B3501	14.26%	0.15	0.12
REFVKGKYY	B2720,B4002,B4013	3.45%	0.03	0.1
RISEMGVCF	A3201,B1501,B1502,B1517,B1525,B4601,C0202,C0209,C0302,C0501,C1202,C1601	42.77%	0.51	0.17
RIYMHPAVL	B0801,B1503,B1509,B2720,B4013,B4601,C0303,C0401,C0702,C1203,C1402,C1502,C1601,C1701,E0101	92.06%	1,65	1,06
RRRNLILNR	B2705	4.78%	0.05	0.11
RVNANTAAL	A3001, A3201, B0702, B1402, B1517, B1525, B1501, B0801, B5501, B4801, B4601, C0303, C1402, C1502, C1202, C0702, C0704, C1601, C1701, C0102, C0202, C0209,	99.99%	3,38	2,5

	C0302, C0303, C0304,C0501,C0801, C0802, C1203, E0101,G0101, G0102, G0103, G0104, G0106			
SADSMITNL	B3503, E0101, G0101, G0102, G0103, G0104, G0106, C0102, C0202, C0209, C0302, C0303, C0304, C0401, C0501, C0704, C0801, C0802, C1202, C1203, C1502, C1601, C1701	99.99%	3,38	2,5
SAQIDTAFSSY	A0101, B1501	24.32%	0.26	0.13
SEHLLHQSL	B1301, B1302, B1402, B1801, B3901, B4001,B4002,B3701,B3801,B4402,B4403,B4801,B4901,B5001	48.77%	0.56	0.2
SFQQNRIYM	G0101, G0102, G0103, G0104, G0106, C0602,C1402,C0401,C0701,C0702,C0704	99.94%	2,31	1,06
SLVGKQSPF	B1501,B1502,B1525,B4601,A3201	19.07%	0.2	0.12
SQFLFELGK	A0301, A1101, A7401	32.73%	0.35	0.15
STPMKWGKKL	B0702	12.78%	0.13	0.11
SVKEMLSDM	A2501, A2601, B4601	11.86%	0.12	0.11
SWDESYTEL	A2301,A2402,E0101,G0101,G0102,G0103,G0104,G0106,C0102,C0401,C0501,C1402,C0702,C0704,C0801,C0802,C1701	99.99%	3,28	2,34
TAALSNKVL	B3503,C0303,C0304,C1601	27.1%	0.29	0.14
TFPTVSQFL	A2301,A2402,A2403,E0101,C0401,C1402,G0101,G0102,G0103,G0104,G0106	99.97%	2,73	2,07
TFPTVSQFLF	A2301,A2402,B3503,G0101,G0102,G0103,G0104,G0106	99.86%	1,78	1,27
TGYQQAALKW	A2301, A2402,B5701,B5801,B5802	33.31%	0.37	0.15
TKSWDESY	A2501,A2601,A2902,A3002,B1501,B1502,B1525,B3501,B4601	34.49%	0.39	0.15
TVSQFLFEL	A0202,A0206,A0217,A6802,C0801,C1601,C1701	16.86%	0.18	0.12
VPNDRFVF	B0702,B1502,B3501,B3503,B5301,B5501,B5601	31.1%	0.33	0.15
VSTGIVKK	A0301,A1101,A3001,A7401	35.91%	0.38	0.16
VTPETFPTV	A0205,A0206,A0207,0211,C1402	7.39%	0.08	0.11
WFEKNAGTI	A0205,C0401,C0704	23.86%	0.24	0.13
YELFADDSF	B1301,B1302,B1502,B1801,B3701,B3801,B4002,B4901,B4402,B4403	37.81%	0.42	0.16
YKVPGEIVM	B1402,B1503,B1509,B3501,B3503,B3801,B3901,B4801,C0302,C0303,C0304,C0602,C0701,C0702,C0801,C1202,C1203	81.71%	1,23	0.55
YLDKHKDEV	A0201,A0205,A0206,A0207,A0211,A0212,A0216,A0219,A0250,C0102,C0401,C0501,C0704,C0801,C0802,C1502,C1701,E0101	92.96%	1,77	1,09
YMHPAVLTA	A0201,A0203,A0211,A0212,A0216,B0802,B0803,C1203,C1402	48.19%	0.54	0.19

Yukarıda sonuçları verilen, ilgili peptitlerin antijenite, alerjenite ve toksisite analizlerinin üst üste karşılaştırılarak yani ilgili analiz grubundaki farklı çevrimiçi araçlardan elde edilen ortak verilerle yola çıkılması planlansa da çizelgelerde görüldüğü üzere farklı algoritmalarından ortak oldukça az veri elde edilmiştir. Bunun, antijen değeri olan peptitlerin deneysel değerlendirmeye girmeden elenebilecek olması kaygısıyla çevrimiçi araçlardan çıkan ortak peptitler yerine eşik değeri üstünde kalan bütün peptitler diğer analizlere tabi tutulmuştur. Aşı tasarımına yönelik hesaplamalı bu yaklaşımlar, hücresel bağışıklıkta T hücre epitoplarının seçimiyle başlamaktadır. Bu yaklaşımlar, aşı bilimin ilerlemesinde kendini kanıtlamış olsa da tür bazında hala sınırlamalar mevcuttur. Bunun en büyük nedeni, deneysel çalışmaların yetersizliği olabilir. Yeni çalışmalarla, hem araçların güvenilirliği test edilmiş olacaktır hem de bu alandaki eksikliklerin giderilmesine katkı sağlayacaktır. Yapılan bu çalışma, bu analizlerin aşı gelişim sürecine katkısının bir parçası olmuştur.

5.1.1. SİTOTOKSİK T LENFOSİT (CTL) EPİTOP TAHMİNİ

Metotta detaylandırılan immünoinformatik analizler sonucu MHC-I epitopları tahmin edildi. Bu değerlendirme yapılırken bunların arasından bu epitopların antijenik, immünojenik ve toksik olmadığı alternatifler üzerinde duruldu. Bunlardan, insan MHC-I alellerinin aşı yapımına yönelik CTL epitopları olarak yüksek immünojenite skorlarına göre aşı adayı

olarak değerlendirilmek üzere gruplandırıldı (Çizelge 5.11.).

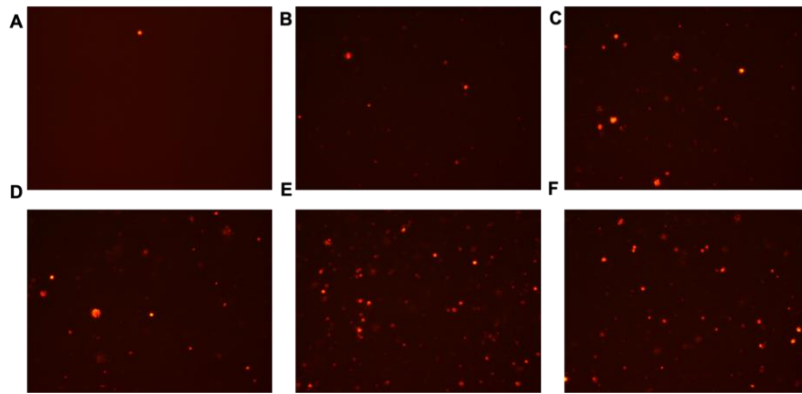
Çizelge 5.9. T hücre yanıtları için değerlendirilecek peptit grupları.

	Peptit grupları
E	Full-length NP (Ank-2)
E1	ATDDAQKDSIYASALVEATKFCAPIYECAWVSSTGIVKKGLEWFEKNSGTIKSWDENYAELKVDVPKIEQLANYQQAALKWRKDIGFRVNANTAALSNKVLAEYKVPGEIVMSVKEMLSDM(stop)
E2	ATDDAQKDSIYASALVEATK(stop)
E3	FRVNANTAALSNKVLAEYKVPGEIVMSVKEMLSDM(stop)
E4	EIVMSVKEM(stop)

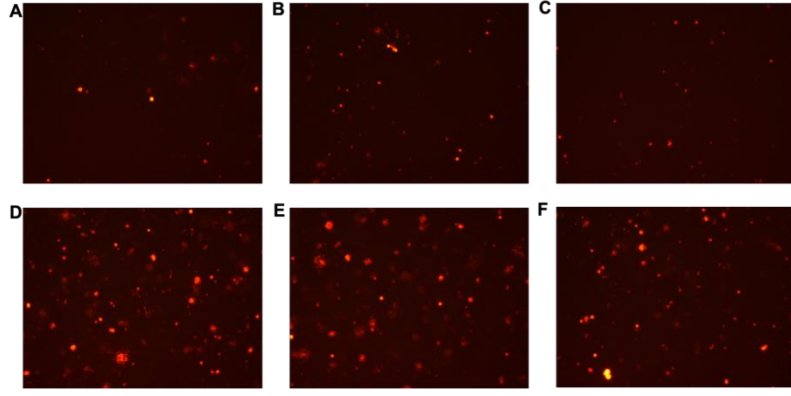
5.2. T HÜCRE YANITLARININ *IN VITRO* DEĞERLENDİRİLMESİ

5.2.1. TRANSFEKSİYON VE TRANSDÜKSİYON

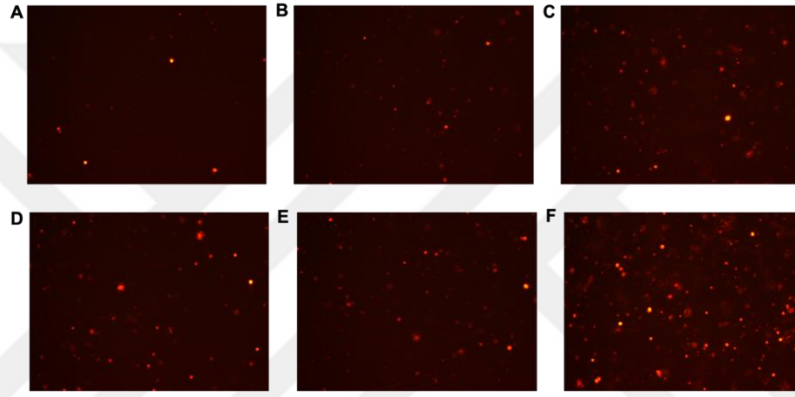
Lipofectamine 3000'nin standart protokolü ve PEI'nin HEK293 hücreleri için uygulanan 1:3 (DNA:PEI) oranının hücrelere toksik gelebileceği düşünülerek, farklı DNA:PEI oranlarında bir optimizasyon denemesi yapıldı. Birleştirme oranları, DNA miktarı 500 ng olarak sabit tutulmak şartıyla, 1:1'den başlayarak 1:2,5'e kadar (1:1, 1:1,25, 1:1,5, 1:1,75, 1:2 ve 1:2,5 olarak) olmak üzere 6 farklı oranda PEI aracılı transfeksiyon denemesi yapıldı. PEI konsantrasyonu arttıkça, ışımaya genel olarak artıyor gibi görünse de bu durumun ölü hücrelerin de hatalı ışımaya vermesinden kaynaklandığı saptandı. Canlı ve ışımaya hücreler göz önünde bulundurulduğunda, 1:1,25- 1:1,75 oran aralığının etkin transfeksiyon için uygun olduğu sonucuna varıldı (Şekil 5.2. - Şekil 5.7.). Bu çalışma döneminde, transfekte edilen hücreler aynı kültür şartlarında uzun süre yaşatılamadı.



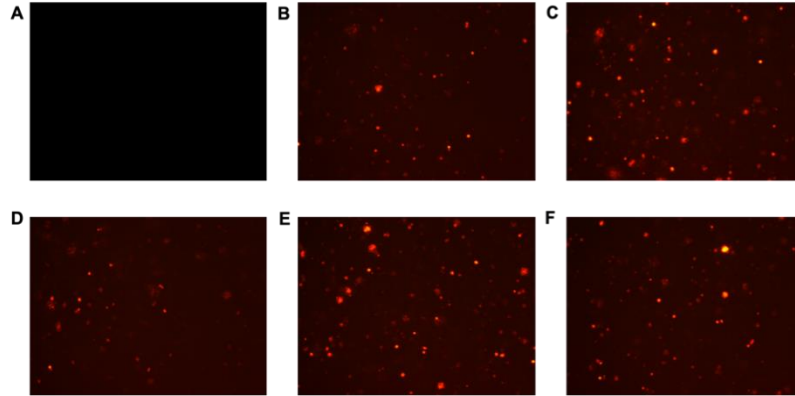
Şekil 5.2. E1'in THP-1 hücrelerine PEI aracılı transfeksiyonlarının 24 saat sonra floresan ışımaya görüntüleri. A. 1:1, B. 1:1,25, C. 1:1,5, D. 1:1,75, E. 1:2, F. 1:2,5 DNA:PEI oranları, DNA konsantrasyonu 500 ng.



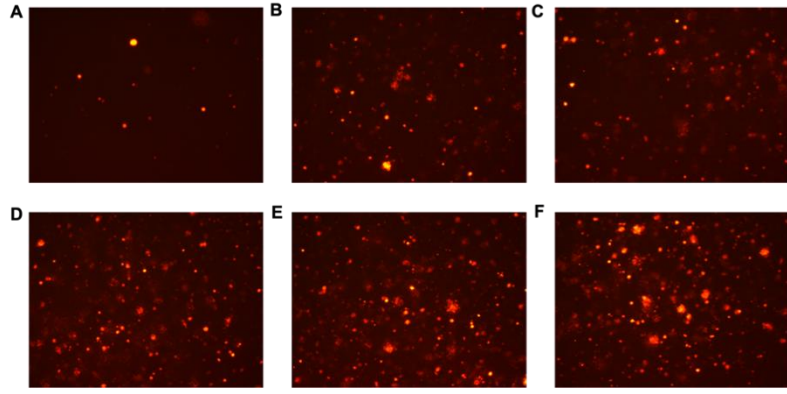
Şekil 5.3. E2'nin THP-1 hücrelerine PEI aracılı transfeksiyonlarının 24 saat sonra floresan ışığa görüntüleri. A. 1:1, B. 1:1,25, C. 1:1,5, D. 1:1,75, E. 1:2, F. 1:2,5 DNA:PEI oranları, DNA konsantrasyonu 500 ng.



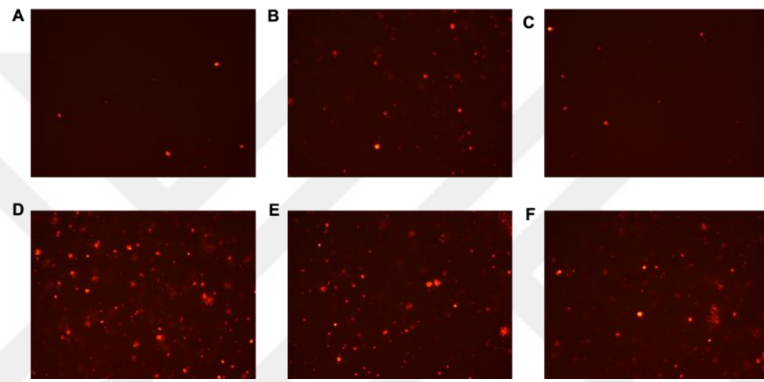
Şekil 5.4. E3'ün THP-1 hücrelerine PEI aracılı transfeksiyonlarının 24 saat sonra floresan ışığa görüntüleri. A. 1:1, B. 1:1,25, C. 1:1,5, D. 1:1,75, E. 1:2, F. 1:2,5 DNA:PEI oranları, DNA konsantrasyonu 500 ng.



Şekil 5.5. E4'ün THP-1 hücrelerine PEI aracılı transfeksiyonlarının 24 saat sonra floresan ışığa görüntüleri. A. 1:1, B. 1:1,25, C. 1:1,5, D. 1:1,75, E. 1:2, F. 1:2,5 DNA:PEI oranları, DNA konsantrasyonu 500 ng.



Şekil 5.6. MTSAI'nın THP-1 hücrelerine PEI aracılı transfeksiyonlarının 24 saat sonra floresan ışığa görüntüleri. A. 1:1, B. 1:1,25, C. 1:1,5, D. 1:1,75, E. 1:2, F. 1:2,5 DNA:PEI oranları, DNA konsantrasyonu 500 ng.

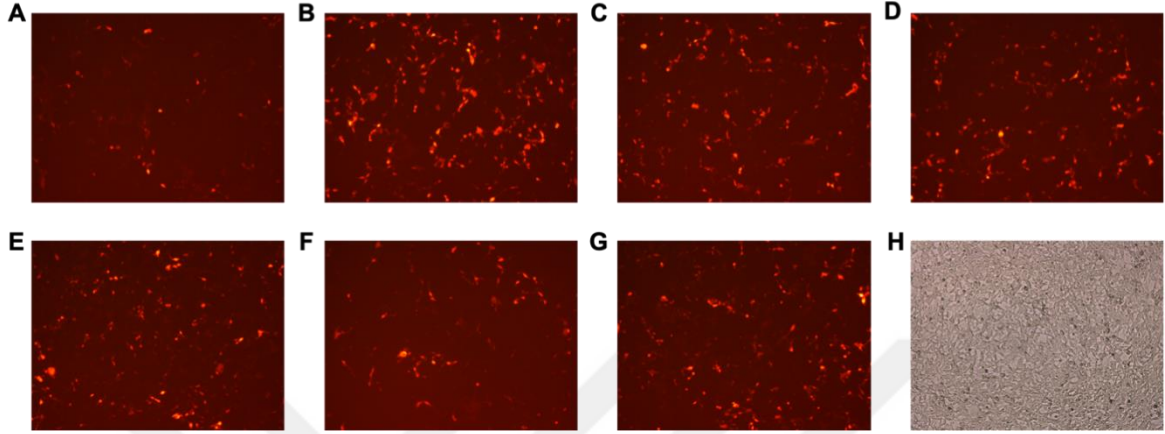


Şekil 5.7. NP'nin THP-1 hücrelerine PEI aracılı transfeksiyonlarının 24 saat sonra floresan ışığa görüntüleri. A. 1:1, B. 1:1,25, C. 1:1,5, D. 1:1,75, E. 1:2, F. 1:2,5 DNA:PEI oranları, DNA konsantrasyonu 500 ng.

THP-1 hücrelerinin PEI aracılı transfeksiyonları her denemede aynı etkinlikle sonuçlanmadı. Sayıları sabit tutulmuş sağlıklı hücreler ve enzim kesimleri ile doğrulanmış olan vektörler kullanılmasına karşın, tekrarlamaların aynı sonuçları vermemesi ve ışımaların bir kısmının da ölü hücrelerden alınmasının ardından literatürde transfeksiyonu zor hücreler için etkin bir yöntem olarak değerlendirilen Nucleofection yöntemi ikinci kez değerlendirildi. THP-1 hücreleri için üreticinin önerdiği tamponun SG olmasına rağmen, tamponun deneme için temin edilememesi nedeniyle mevcut SE, SF ve P3 primer hücre hatları için olan tamponlar hücre tipi için tanımlanan pre-set şartlarına uygun olarak denendi. Hiç floresan ışığa alınamaması, protokol şartlarının (uygun buffer) tam olarak sağlanamamasından kaynaklanabileceği düşünülerek bu yöntemle çalışma sonlandırıldı.

Eş zamanlı olarak, klonlama sonucu elde edilen vektörlerin transfeksiyon etkinliği laboratuvarımızda mevcut olan HEKtrex hücrelerinde denendi. Şekil 5.7.'de görüldüğü

üzere, vektörler adherent bir hücre olan HEKtrex hücrelerini etkin bir şekilde transfekte edebilmektedir. Işıma miktar ve şiddeti 36. ve 48. saatlerde daha da artmakta ve hücreler PBS ile yıkamayla uzaklaştırılmayan transfeksiyon mixine rağmen sağlıklı görünmektedirler.



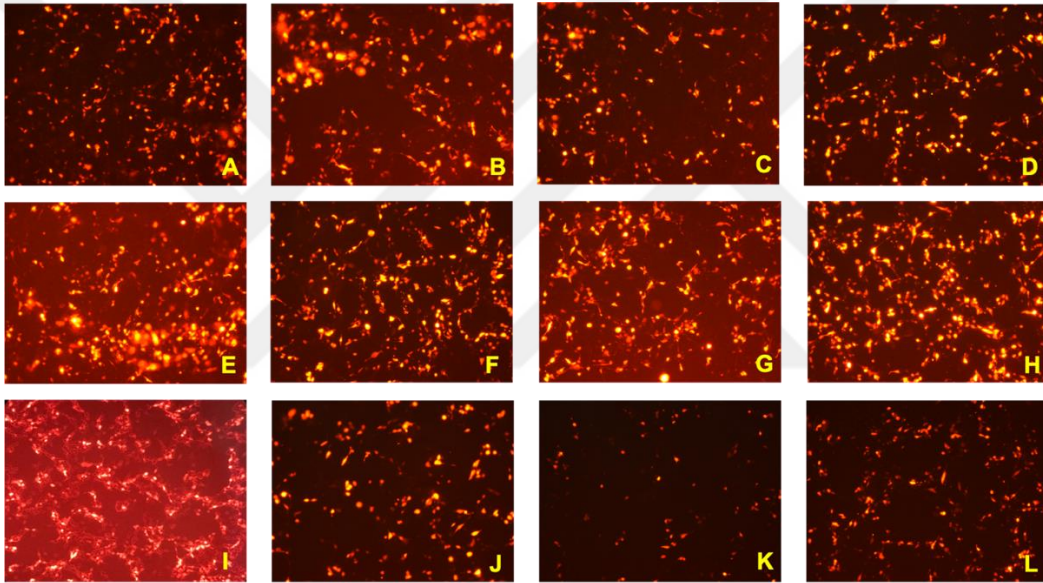
Şekil 5.8. Klonlanan vektörlerin HEKtrex hücrelerine transfeksiyonun 24 saat sonrasındaki floresan ışına görüntüsü (10x); A. E1, B. E2, C. E3, D. E4, E. M1, F. MTSAL, G. NP, H. Negatif kontrol (HEKtrex hücreleri).

İlgili DNA'ların kimyasal ya da elektriksel akım kaynaklı hücrelere aktarılmasından elde edilen sonuçlar ya tekrarlandığında tutarlılık göstermedi ya da tamamen başarısız oldu. Bunun nedeni de tam olarak anlaşılamamıştır. Bu nedenle, transgenlerin memeli hücrelerine iletilmesi için etkili bir yöntem olan lentiviral transdüksiyon bu amaçla kullanılan bir diğer yöntem oldu. İlgili DNA'yı taşıyan transfer plazmitleri klonlandıktan sonra, lentiviral genleri kodlayan plazmiti (başka bir çalışma kapsamında Dr. Öğr. Üyesi Mutlu Erdoğan'ın laboratuvarında yürütücünün de katkılarıyla klonlanmıştır) ile HEKtrex hücrelerinde virüs üretildi (15 µg transfer plazmiti, 10 µg lentiviral vektör, PEI aracılı transfeksiyon (1:3)). Hücrelerden toplanan virüsler THP-1 hücrelerine transdükse edildi. Transdüksiyondan 48 saat sonra NF-kB ifadeleyen raportör Jurkat hücreleriyle birlikte kültüre edildi. Ertesi gün flow sitometri analizleri gerçekleştirilerek, mRuby ışması yayan THP-1 hücrelerinin aktive ettiği GFP ışması yayan Jurkat hücrelerinin sayısı bu analizle kantitatif veriye dönüştürüldü.

Birlikte kültüre edilmeden önce çalışmada kullanılan hücreler (THP-1, Jurkat, NF-kB ifadeleyen Jurkat) flow sitometri analizinde bir optimizasyona tabi tutuldu. Bu kapsamda, araştırma verileri, sayılan hücrelerin iki farklı popülasyona ayrıldığını gösterdi. Fakat PMA ile uyarılan Jurkat hücrelerinin iki hücrenin etkileşiminden hariç hücreleri de uyarması

negatif kontrol olarak değerlendirilen M1 plazmitinin (mRuby ve hBD3 içeren) blank olarak alınması hatalı yeşil ışmaları da cihazın okuması kaynaklı epitopik grupların uyardığı hücrelerin düşük yüzde de kalmasına neden olmuştur (Şekil 5.8.).

Bu hatalı uyarımlar için B planı olarak lipopolisakkarit değerlendirmektedir. TNFa, IL-1, IL-6 gibi sitokinleri CD14 reseptörüyle etkileşime girerek uyaran lipopolisakkaritlerin, Jurkat hücrelerinin uyarımında PKC aktivasyonu yoluyla T hücrelerini aktive eder ve düşük bir IL-2 üretime yol açan PMA yerine alternatif olarak kullanılması planlanmıştır. Ön sonuçlar, LPS'nin Jurkat hücrelerini uyurabildiğini göstermiştir. Fakat manuel olarak *E. coli*'den izole edilen LPS çok saf bir halde elde edilemediğinden ve ticari olarak temini için bütçe bulunmadığından denemelerde bu aşamaya geçilemedi.



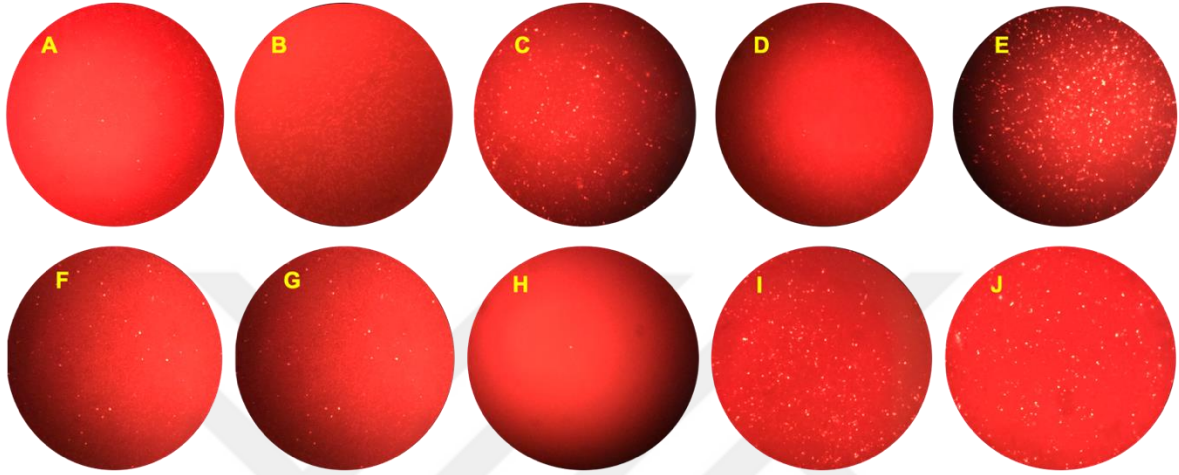
Şekil 5.9. Lentiviral vektörlerle PEI aracılı HEK293T hücrelerinin transfeksiyonu. Sekans sonucu pozitif çıkan kolonilerin virüs üretiminden önce floresan ışmaları kontrol edilmiştir. A. E1, B. E2, C-D. E3, E-F. E4, G-H. M1, I-J. MTSAI, K-L. NP.

Şekil 5.8.'de E1 ve E2 haricinde diğer lentiviral vektörlerden pozitif sekansa sahip ikişer tane vektör elde edildi. Bu vektörlerin floresan mRuby ışmaları THP-1 hücrelerine verilmeden önce HEK293T hücrelerinde kontrol edildi.

Alternatif olarak, Thermo Scientific Neon Transfection System kullanılarak THP-1 hücrelerine ilgili vektörlerin aktarılması denenmektedir. Ede edilen ön veriler, başarılı bir transfeksiyon etkinliğiyle sonuçlandı (Şekil 5.9.). Sarf malzeme teminiyle birlikte, Şekil

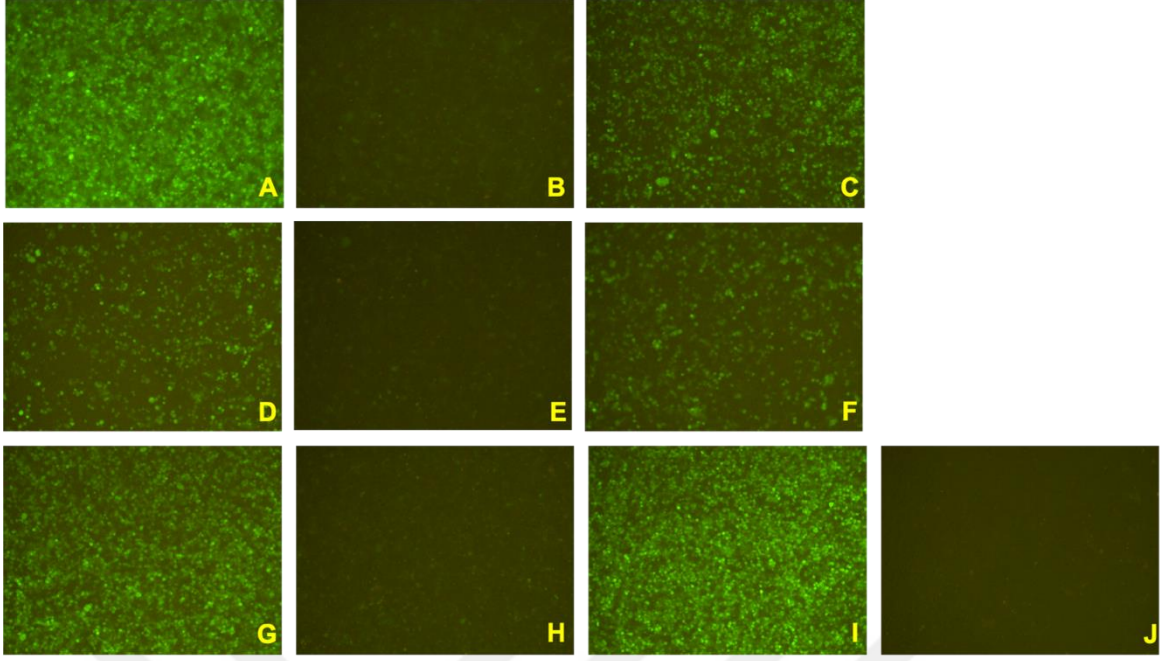
4.1.'deki vektör yapılarının THP-1 hücrelerine transfeksiyonu ardından da Jurkat hücreleriyle birlikte kültüre edilmesiyle T hücre aktivasyonu değerlendirilecektir.

Seçilen antijenleri ifadeleyen hücre hatlarının oluşturulmasında, transfeksiyonu zor olan THP-1 ve Jurkat hücre hatlarının kullanımı, *in vitro* çalışmaların tamamlanma sürecini oldukça uzatmıştır.



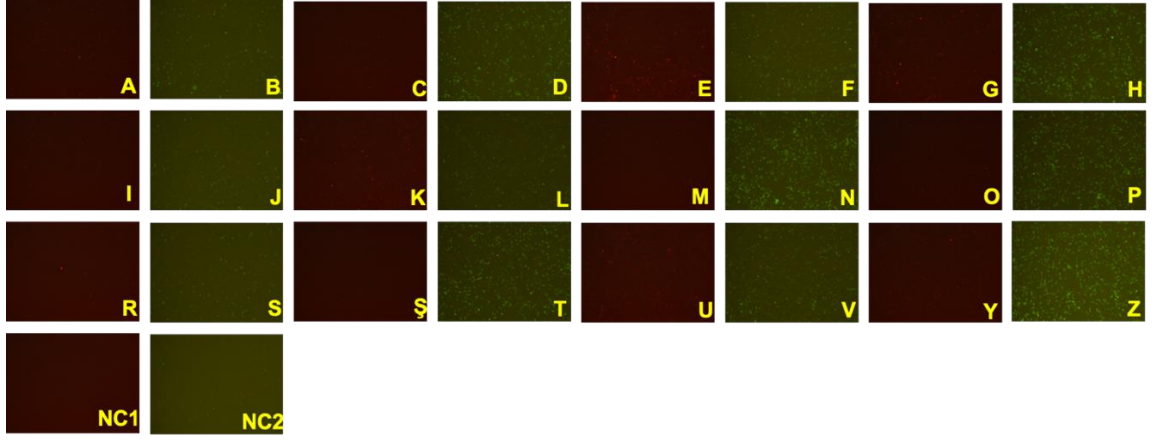
Şekil 5.10. Thermo Scientific Neon transfeksiyon sistemiyle Şekil 4.1.'deki vektörün farklı parametrelerle transfeksiyonunun optimizasyon denemesi. A. 1200 V, 20 msec, 2 pulses; B. 1300 V, 20 msec, 2 pulses; C. 1400 V, 20 msec, 2 pulses; D. 1500 V, 20 msec, 2 pulses; E. 1600 V, 20 msec, 2 pulses; F. 2000 V, 10 msec, 3 pulses; G. 1600 V, 10msec, 3 pulses; H. 2500V, 10 msec, 3 pulses; I. 1600 V, 10 msec, 4 pulses; J. 1600 V, 20 msec, 4 pulses.

Ön sonuçlar, 10 µl pipet ucu içinde gerçekleşen transfeksiyon için 1600 V, 20 msec, 2 pulses parametrelerinin en iyi sonucu verdiğini göstermiştir. Fakat, deney tekrarlandığında aynı sonuçların elde edilememesi nedeniyle yöntemle devam edilmemiştir.



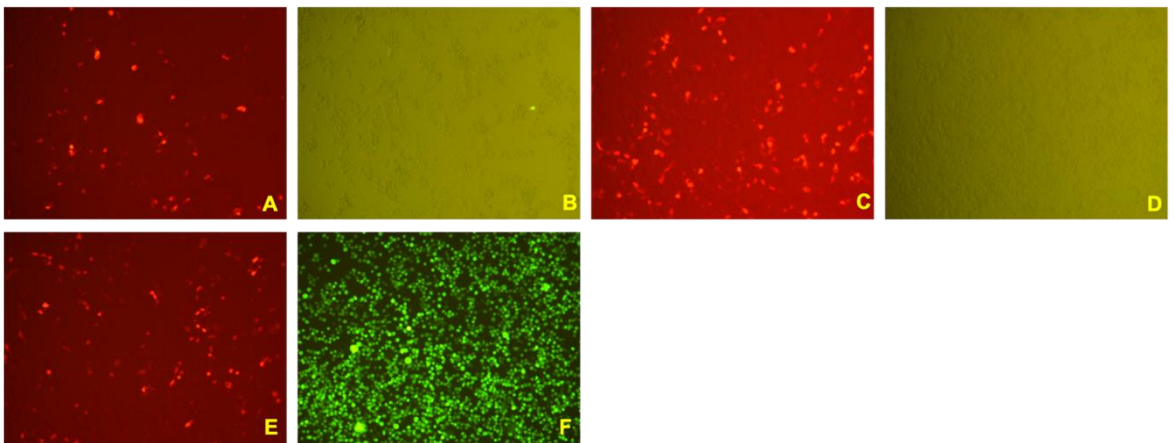
Şekil 5.11. PMA ve ionomycinin T hücre uyarımının optimizasyonu. A. 4 saat PMA ile uyarım, B. ionomycin ile, C. PMA+ion ile; D. 6 saat PMA ile uyarım, E. ionomycin ile, F. PMA+ion ile; G. 8 saat PMA ile uyarım, H. ionomycin ile, I. PMA+ion ile, J. Negatif kontrol (sadece Jurkat hücreleri, uyarılma yok).

Şekil 5.11.'de de görüldüğü gibi PMA ve PMA+ion ile uyarım arasında floresan ışıma benzerdir. Dolayısıyla önce sadece PMA ile uyarım denenmiştir, fakat PMA ile uyarımın ardından hücrelerden yıkama yoluyla uzaklaştırılamamıştır ve THP-1 ile birlikte kültürasyonunun ardından THP-1 ile etkileşmeyen yani antijen kaynaklı olmayan T hücre aktivasyonları flow sitometri analizinde hücre sayımına girdiği için ayırt edilemediği için sadece ionomycin ile uyarımla devam edilmiştir. Çok güçlü bir ekspresyon görülmesi de ionomycin tek başına T hücrelerini uyarabilmektedir. T hücrelerinin uyarımı için 4 saat gibi bir süre yeterli olmuştur.



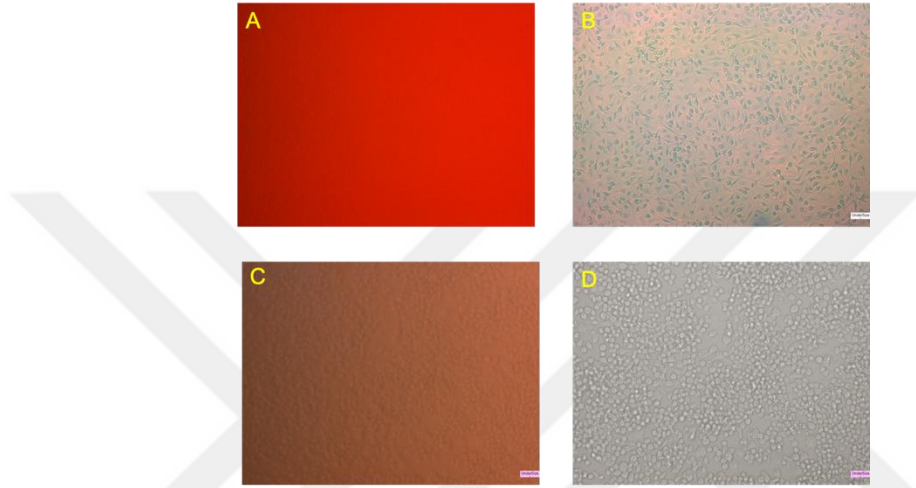
Şekil 5.12. Ionomycin optimizasyonu. M1 A-B direct, C-D direct-ion, E-F spin, G-H spin-ion; MTSAI I-J direct, K-L direct-ion, M-N spin, O-P spin-ion; NP R-S direct, Ş-T direct-ion, U-V spin, Y-Z spin-ion; Negatif Kontrol NC1, NC2.

Şekil 5.12.'de görülmektedir ki, ionomycin verilmeyen wellerde bile T hücrelerinin uyarımı söz konusudur. Ionomycin verilen wellerde uyarım daha fazladır. Hatta negatif kontrolde dahi, GFP ışmasıyla T hücre uyarımı gözlenmektedir. Bunun sebebi kırmızı floresan kanala göre yeşil floresan kanalın daha non-spesific ışımlara vermesinden kaynaklı olabilir. Tek başına PMA'in 25 ve 100 ng/ml (yaklaşık 3 saate uyarım %50'nin üzerine çıkıyor) konsantrasyonlarda T hücrelerini antijen bağımsız uyardığı bilinmektedir ve ionomycin de tek başına bu uyarımı yaptığından literatürün de katkısıyla düşük konsantrasyonlarda ve farklı zaman aralıklarından PMA ile uyarım denenmiştir. 0-2-4-6-8-12-24 saat aralığında, 2,5-20 ng/ml PMA NF-kB ifadeleyen Jurkat hücrelerine verildiğinde 6 saatten sonra 5 ng/ml ve üzeri kuyucuklardan GFP ışması alınmaya başlanmıştır.



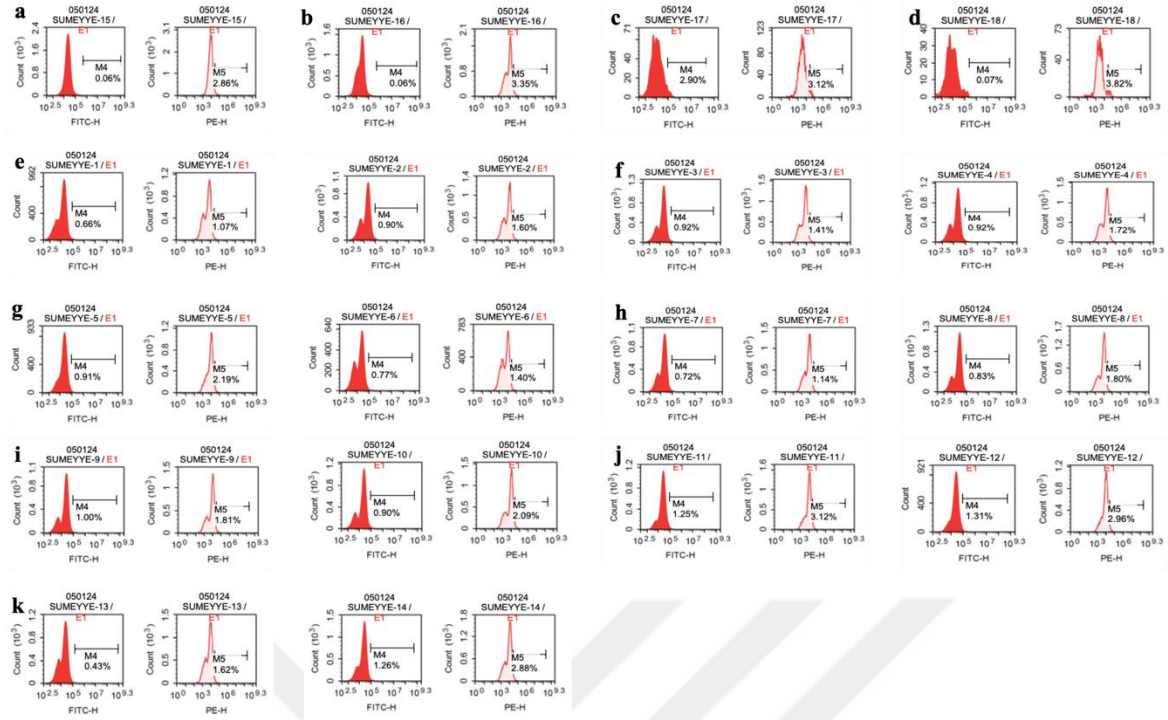
Şekil 5.13. HEKtrex hücrelerinin antijen sunup sunmadığının kontrolü için ilgili plazmitlerle transfeksiyonu ve Jurkat hücreleriyle birlikte kültüvasyonu. A-B M1; C-D NP; E, MTSAI; M1 Jurkat; G, negatif kontrol (Jurkat hücreleri 100 ng/ml PMA ile uyarım).

THP-1 hücrelerinin yerine antijen sunabilecek mevcut hücremizin olup olmadığını anlamak için HEKtrex hücrelerine PEI aracılı transfeksiyon yapılmıştır. Kırmızı floresan ışımlar gözlenirken, HEKtrex hücrelerinin Jurkat'larla kültüre edilmesinin ardından T hücre aktivasyonu gerçekleşmemiştir. Ayrıca, Balb/c farelerden toplanan peritoneal makrofaj hücreleri ve yine murin makrofoj hücre hattı olan Raw 264.7 hücrelerinin antijen sunup sunmadığı test edilmiştir. Fakat, hücrelerin ilgili plazmitle transfeksiyonu dahi başarılı olmamıştır (Şekil 5.14.).



Şekil 5.14. Murin peritoneal makrofaj hücreleri ve Raw 264.7 hücrelerinin Lipofectamine300 aracılı transfeksiyonu (M1 plazmitiyle, Şekil 4.1.). A-B, Murin peritoneal makrofaj hücreleri, C-D, Raw 264.7 hücreleri.

Flow sitometri analizinden beklenen sonuçlar, kırmızı floresan ışımasıyla antijen sunan THP-1 hücrelerinin, uyarıldığında GFP ışıması yayan Jurkat hücreleriyle birlikte kültüre edildiğinde, antijen bağımlı uyarılan T hücrelerinden yayılan GFP ışımasının takibi şeklindedir. Floresan mikroskop yardımıyla da bu süreç takip edilmiştir. Fakat, PMA kaynaklı da uyarılan Jurkat hücreleri bu sistemin birinci engeli, hücrelerin bu kültivasyon süresince canlı olarak sürdürülememesi ise bu ikinci engeli olmuştur.



Şekil 5.15. Jurkat ve THP-1 hücrelerinin flow sitometri analizleri. a. THP-1+PMA, b. THP-1, c. uyarılmamış NF-Jurkat, d. 25 ng PMA ile uyarılmış NF-Jurkat, e. Grup 1 (peptit 1), f. Grup 2 (peptit 2), g. Grup 3 (peptit 3), h. Grup 4 (peptit 4), i. Grup 5 (MTSAILGILPV), j. Grup7 (boş vektör), k. Grup6 (tam uzunluklu NP). Analiz 2 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

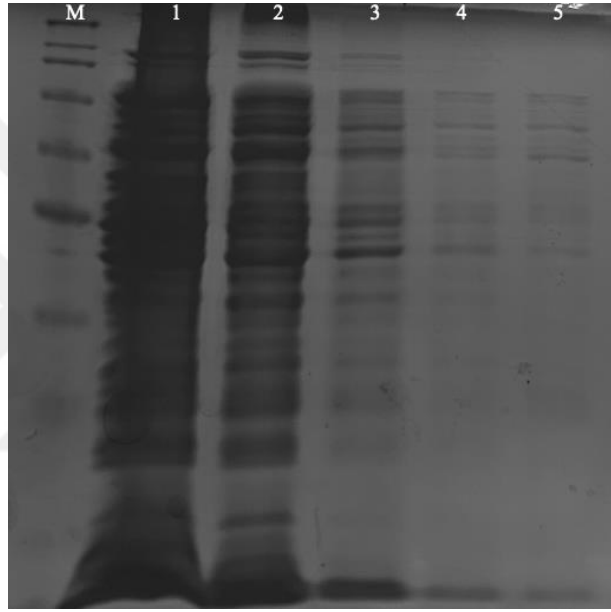
In vitro deney tasarımı, antijen ifadeleyen monosit kökenli makrofaj hücrelerinin T lenfosit hücrelerini uyarımını kapsamaktadır. Antijen ifadeleyen vektörleri kırmızı floresanla, GFP taşıyan T hücrelerinin uyarımından sonra yeşil floresanla bu uyarımı takip ettik. PMA uyarımı monosit kökenli hücrelerin makrofaja farklılaşması için kullanılsa da, T lenfositlerini her iki hücre grubunun birlikte kültürasyonu sırasında da antijen bağımsız uyarabilmektedir (Şekil 5.15c). Uyarılmamış Jurkat hücrelerinden GFP ışıması alınmamıştır (Şekil 5.15.). Negatif kontrol olarak seçilen antijen ifadelemeyen, PMA ile uyarılmış THP-1 hücreleriyle birlikte kültürlenen NF-Jurkat hücrelerine kıyasla, diğer gruplarda GFP uyarımı gözlenmemiştir.

5.2.2. SDS-PAGE VE WESTERN BLOTLAMA

5.2.2.1. Nükleoprotein Saflaştırması

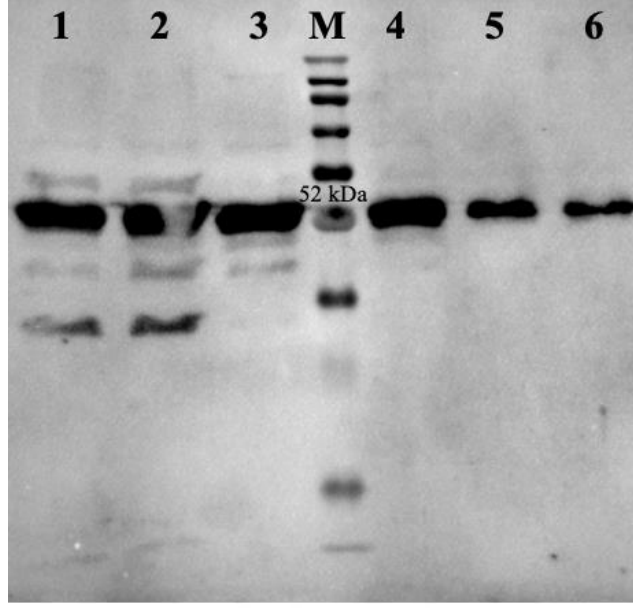
Üretilen bakteriyel kültürden protein saflaştırmak için HisPur Ni-NTA Purification Kit (Thermo Scientific) kullanılmıştır. Bakteriyel pelletin Materyal ve Yöntem bölümünde belirtildiği şekilde lizisini takiben kit yönergeleri takip edilerek protein saflaştırması

yapılmıştır. Saflaştırma sırasında da kolon sonrası ve elüsyon aşamalarında SDS-PAGE için protein örneği ayrılmıştır. Elüsyonu takiben imidazol ve diğer küçük molekülleri uzaklaştırmak için diyaliz işlemi gerçekleştirilmiştir. Fakat, elde edilen proteinin konsantrasyonu jelde proteini görüntülemek için yeterli olmamıştır. Daha sonra bu örnekler (saflaştırma sırasında toplanan elüatlar) denatüre edilip SDS-PAGE jelde ayrıştırılmış ve Coomassie blue ile boyanarak analiz edilmiştir. Örneğin konsantrasyonları Bradford testi ile belirlenmiştir (826 µg/ml). Her kuyuya 20 µl örnek üzerine 4X Laemmli tamponu eklenerek yüklenmiştir. Rekombinant olarak üretilen bu protein ELISA için kullanılmadan önce Western Blotlama aracılı olarak kontrol edilmiştir.



Şekil 5.16. 6X Histag CCHFV-NP'nin saflaştırıldıktan sonra SDS-PAGE görüntüsü. 1, total protein; 2, birinci yıkama elüatı; 3, ikinci yıkama elüatı; 4, üçüncü yıkama elüatı ve 5, elüe protein. Protein ladder, Prime-Step™ Prestained Broad Range Protein Ladder Katolog No. 773302.

Coomassie blue boyaması ve Western Blotlama için aynı anda yapılan SDS-PAGE analizinden bir jel antikorlanmıştır. 54 kDa büyüklüğe sahip protein, sadece total protein içinde gösterilmiştir (Şekil 5.16.).

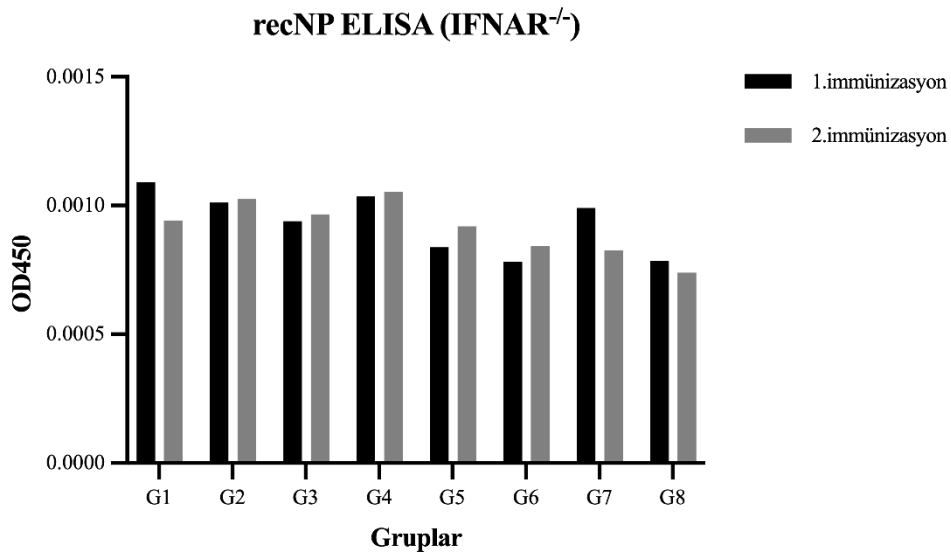


Şekil 5.17. KKKAV-NP'nin immün blotlaması. 1, total protein; 2, kolondan geçirilen total protein; 3, birinci yıkama elüatı; ikinci yıkama elüatı; 4, üçüncü yıkama elüatı ve 5, elüe protein. Farede nükleoproteine karşı üretilen monoklonal antikor kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Protein ladder, Prime-Step™ Prestained Broad Range Protein Ladder Katolog No. 773302.

5.3. SEROLOJİK ANALİZLER

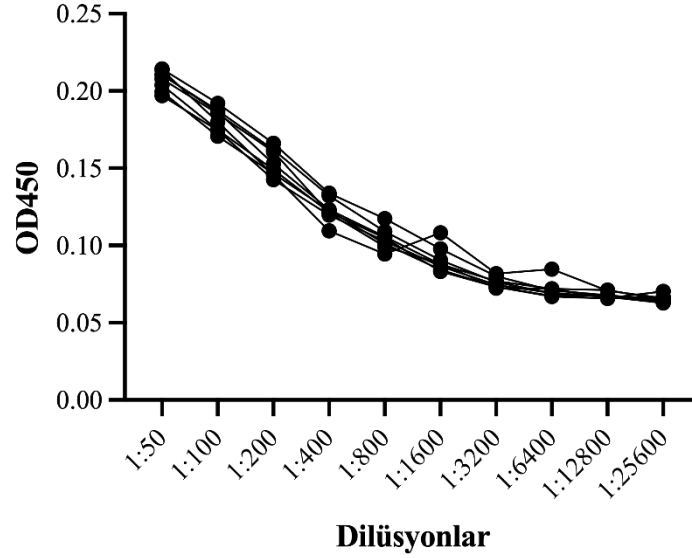
5.3.1. IFNAR^{-/-} VE BALB/C FARELERDE ANTİKOR YANITLARI

Peptit gruplarıyla immünize edilen IFNAR^{-/-} farelerde negatif kontrolle (aşılanmamış grup) kıyaslandığında, total IgG seviyeleri nerdeyse ayıdır (Şekil 5.17.). Antikor yanıtlarının bu derece düşük olmasının sebebinin, bu hayvanların IFN cevabının olmamasından kaynaklanabileceği şeklinde yorumlandı. Bu nedenle, immün sistemi yeterli olan Balb/c fare modelinde bu analizler tekrarlandı (Şekil 5.18.). Fakat, yine de negatif kontrole göre anlamlı antikor yanıtları saptanamadı.



Şekil 5.18. Rekombinant NP'nin antijen olarak kullanıldığı ELISA sonuçları (IFNAR^{-/-} farelerde). G1-4, peptit grupları; G5-MTSAILGILPV peptidi; G6, tam uzunluklu nükleoprotein; G7-antijen içermeyen vektör; G8-antijen/peptide aşılanmamış grup.

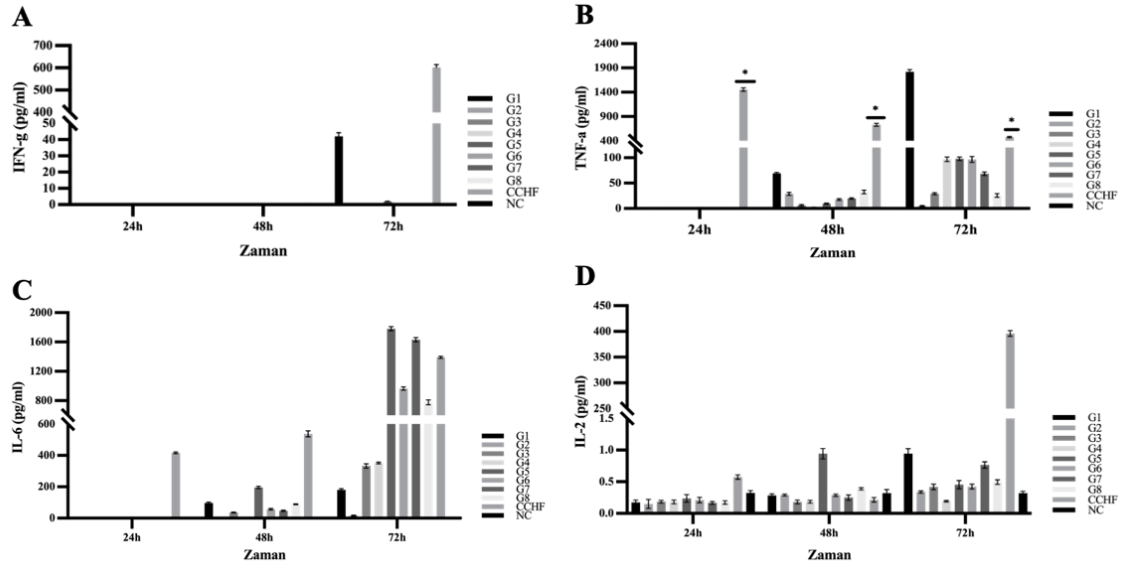
2 kez aşılanmış IFNAR^{-/-} veya Balb/c farelerin, rekombinant protein ve enfekte hücre lizatıyla gerçekleştirilen ELISA analizi, aşılama gruplarının negatif kontrollerle kıyaslandığında, total IgG yanıtlarının olmadığını gösterdi. Ayrıca, 2 immünizasyon arasında antikor yanıtları arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. Her 2 hayvan modeli de benzer sonuçlara sahip olduğundan, antikor yanıtı alınamamasının sebebinin aşılama dizaynıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir.



Şekil 5.19. Enfekte hücre lizatıyla ELISA sonuçları (Balb/c farelerde). G1-4, peptit grupları; G5-MTSAILGILPV peptidi; G6, tam uzunluklu nükleoprotein; G7-antijen içermeyen vektör; G8-antijen/peptide aşılanmamış grup.

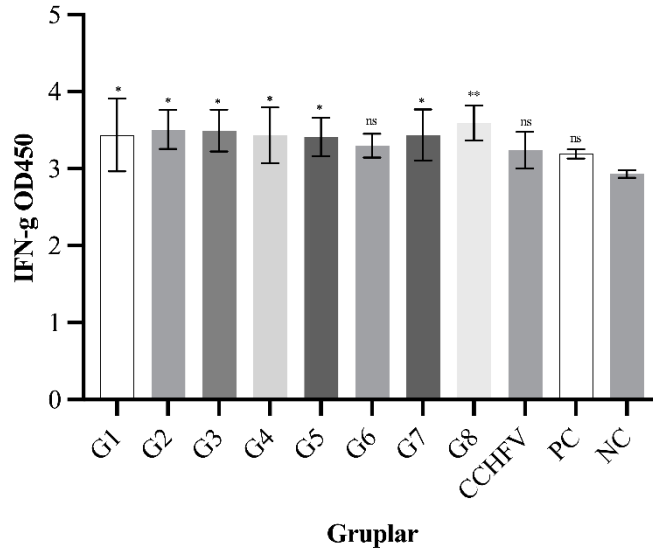
5.3.2. KKKAV'YE SPESİFİK T HÜCRE YANITLARI

KKKAV'ye karşı koruma mekanizması henüz netleşmemiştir. Bu nedenle, bütün aşı vektörleri, KKKAV'ye spesifik hücresel tepkileri indükleyip indüklediği test edilmiştir. IFN- γ , yaygın olarak kullanılan ve birçok hücresel bağışıklık tepkisiyle geniş ölçüde ilişkili olan bir belirteç olduğundan seçildi ve ELISPOT analizi aracılığıyla T hücre yanıtları değerlendirildi. Bu amaçla, 2. bağışıklamadan 2 hafta sonra aşılanmış farelerden splenositler toplandı ve KKKAV ile indüklendi. 24, 48 ve 72. saatlerde hücre süpernatantları toplandı. Aşılama gruplarında, hem 450 nm ölçümleri uyarılmayan splenosit grubuna kıyasla çok düşük tespit edildi hem de çok az sayıda IFN- γ spotları tespit edildi. Bütün gruplarda, 48. saatlerde yanıtlarda artış gözlemlendi. Uyarılmayan splenositlere kıyasla, peptit gruplarında düşük IFN- γ yanıtları alındı. Fakat mock aşılanmış gruba (G8) kıyaslandıklarında, gruplar arasında anlamlı farklar yoktu.

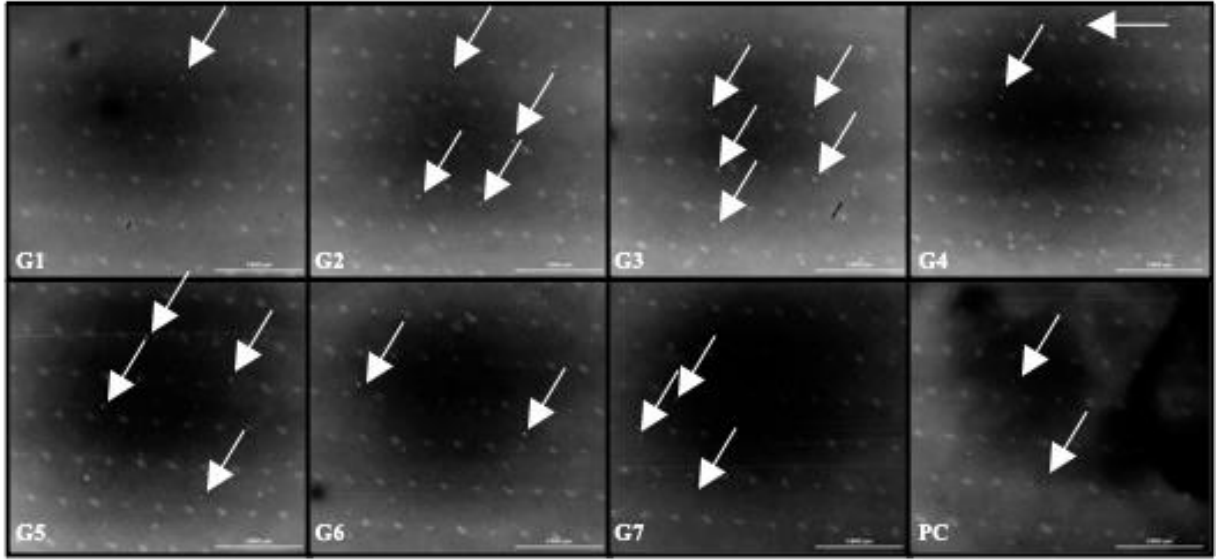


Şekil 5.20. Bağışıklanmış Balb/c farelerinin serum örneklerindeki sitokin yanıtları. A. IFN- γ ; B, TNF- α ; C, IL-6; D, IL-2.

Ayrıca, antijen ifadeleyen THP-1 hücrelerinin T hücreleriyle birlikte kültürasyonu sonucu, T hücrelerinin uyarımı test edilmiştir. *In vitro* negatif kontrollere (antijen taşımayan THP-1, THP-1+NF-Jurkat, NF-Jurkat ion uyarımlı ve NF-Jurkat uyarılmamış) kıyasla 450 nm ölçümleri ve spot oluşumları arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür.



Şekil 5.21. Antijen kaynaklı T lenfositlerin uyarımı sonucunda indüklenen IFN- γ yanıtları. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

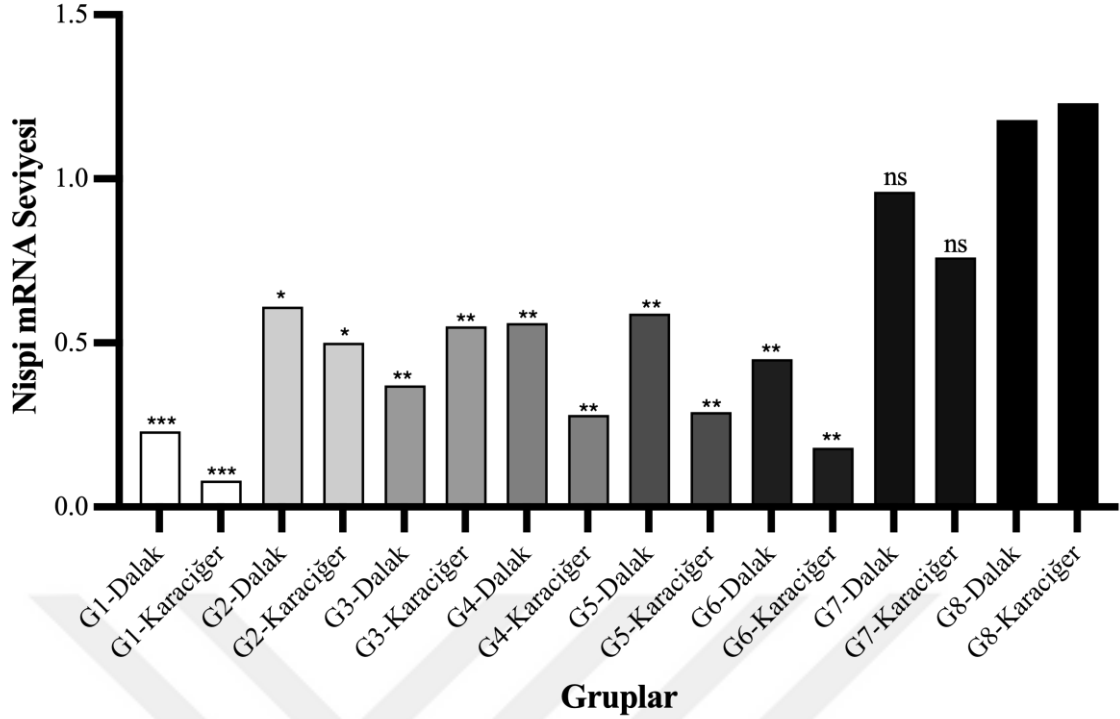


Şekil 5.22. *In vitro* ELISPOT IFN- γ .

Splenositler tarafından üretilen IFN- γ miktarına ilaveten ve KKKAV enfeksiyonlarında değerlendirilen IL-2, IL-6 ve TNF- α sitokinlerinin üretilip üretilmediğini incelemek için aşılanmış farelerden alınan splenositlerden elde edilen süpernatantlar, multipleks sitokin tahlili ile analiz edildi. ELISpot'ta görüldüğü gibi, KKKAV ile uyarılan splenositler IFN- γ üretmemiştir, sadece pozitif kontrolde 72.saatte bir artış görülmüştür. Bununla birlikte, uyarılan splenositlerde nerdeyse hiç IL-2 yanıtı da alınamamıştır. Bütün gruplarda 24.saatten 72.saate bir artış olmakla birlikte, MTSAILGILPV peptidini ve antijen taşımayan vektörle aşılanmış gruplarda pozitif kontrole kıyasla, bir artış gözlenmektedir. NP ile aşılanmış ve mock aşılanmış gruplarda, diğerlerine kıyasla daha fazla bir artış görülmektedir. Bu nedenle, KKKAV-NP'ye karşı hücresel bağışıklık tepkilerine bakarak, bu aşılarda KKKAV'a karşı korumada etkin bir rol oynamadığı sonucuna varıldı.

5.4. AŞILANMIŞ VE VİRÜSLE TEHDİT EDİLMİŞ HAYVANLARDA VİRAL RNA TESPİTİ

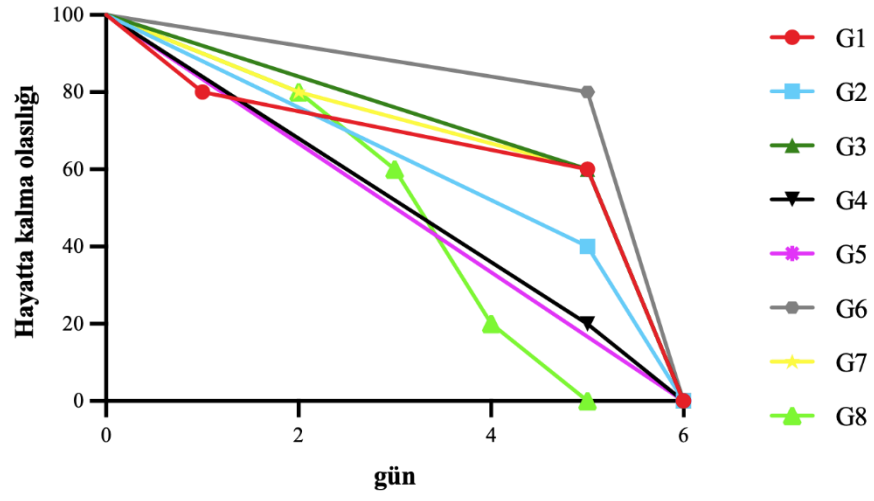
Virüs tehdidinden sonra, KKKAV-NP peptitleriyle aşılanmış IFNAR^{-/-} farelerin dalak ve karaciğer dokularında viral RNA'nın tespit edilip edilemeyeceğini araştırmak için, qPCR ile KKKAV-S segmenti analiz edildi. 2. aşılardan 2 hafta sonra virüsle zorlanan hayvanlardan öldükten hemen sonra toplanan dokularda negatif kontrole (G7, antijen içermeyen vektör; G8 aşılanmamış grup) kıyasla daha düşük viral RNA tespit edildi (Şekil 5.19.).



Şekil 5.23. Aşılama sonrası virüsle tehdit edilen hayvanların karaciğer ve dalak dokularındaki RT-qPCR ile tespit edilen KKKAV-S segmenti RNA seviyeleri. İstatiksel analiz G8'e (negatif grup) göre yapılmıştır. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

5.5. VİRÜS TEHDİDİ ÇALIŞMALARI

Yerel bir KKKAV Ank-2 suşu, IFNAR^{-/-} fare modelinde mortaliteye neden oldu (Şekil 5.20.). Bu çalışma için daha önceden TCID50 analizi yapılan hazır virüs stokları (100 LD) kullanıldı. Virüs tehdidi, bağışıklanmış IFNAR^{-/-} farelerinde, 28. günde ikinci dozdan iki hafta sonra gerçekleştirildi. Deney sonlandırılıncaya kadar hayvanların vücut ağırlıkları ve ateş kayıtları tutuldu. Ve bütün gruplarda virüs tehdidinden sonra kilo kayıpları ve hafif ateş gözlemlendi. Ayrıca, özellikle G3 (3. peptit grubu) ve G6 (tam uzunluklu NP taşıyan) gruplarında hayvanlarda alerji gözlemlendi. Mock aşılanmış hayvanlarla (G8) diğer grupların ölüm süreleri arasında fark gözlenmedi (Şekil 5.20.).



Şekil 5.24. Virüs tehdidi çalışması.

6. TARTIŞMA

Aşılar, bulaşıcı hastalıkların kontrolünde ve halk sağlığının korunmasında önemli bir potansiyele sahip araçlardır. Geleneksel aşı geliştirme yaklaşımları yoğun iş gücü, para ve zaman gerektirmektedir. Ayrıca, yapılan denemelerde başarısızlık riski de taşımaktadır. Bu nedenle, aşı geliştirme sürecinde yeni nesil yaklaşımlara odaklanılmış durumdadır. Özellikle immünoinformatik yaklaşımlar, çeşitli veri tabanları ve sunucular kullanarak aşı tasarımı için en uygun patojen proteinlerini tanımlanmasına ve dolayısıyla, yüksek düzeyde antijenik, toksik olmayan, alerjik olmayan ve güvenli aşı aday epitoplarının tahminine imkân sağlamaktadır. Aşılar, viral enfeksiyonlarla mücadele aşı, önleyici bir yöntem olup, birçok viral hastalıkla mücadelede başarıyla uygulansa da gerek yüksek biyogüvenlikli laboratuvar alt yapısı gereksinimi, uygun hayvan modellerinin eksikliği gibi nedenlerden dolayı KKKAV enfeksiyonlarıyla mücadelede onaylı önleyici bir tedavi bulunmamaktadır. Bu, özellikle de maruziyet riski popülasyonlar için oldukça kritiktir. DNA aşıları, yüksek düzeyde humoral ve hücrel bağışıklık ortaya çıkararak, DNA aşısını yeni ortaya çıkan bulaşıcı hastalıklarla mücadelede ideal bir platform haline getirmektedir. KKKAV enfeksiyonuyla mücadelede de hem humoral hem de hücrel immün yanıtların gerekli olduğu bilinmektedir ki, bu çalışmada T hücre yanıtlarını indükleyen bir DNA aşısının etkinliğinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Fareleri homolog KKKAV tehdidine karşı koruyan koruyabilen 3 ayrı plazmit formülasyonundan (G_N , G_C ve NP) oluşan bir DNA aşısı bildirilmiştir. Başka bir çalışmada ise, farklı 2 suşa ait full-length M-segmentini ifade eden bir DNA aşısı test edilmiştir. GP38'e odaklanan bu çalışma, bu bölgenin hedeflenmesinin enfeksiyonla mücadelede kritik olduğu düşündürse de, genetik çeşitliliğe bağlı olarak aşı etkinliğinin azalmasına yol açmıştır (124).

Şu anda lisanslı KKKA aşıları bulunmadığı gibi koruyucu epitoplar da hala belirsizliğini korumaktadır. KKKA, 2015 yılı itibarıyla Dünya Sağlık Örgütü tarafından ilk on öncelikli ortaya çıkan bulaşıcı hastalık olarak sınıflandırıldığından beri, koruyucu bir KKKA aşısının geliştirilmesine daha fazla odaklanılmıştır. Yakın zamanlı bazı çalışmalar, NP ve/veya GPC'yi içeren vektörlerle aşılanan farklı hayvan modellerinde (fare, primat), KKKA tehdidine karşı koruma sağlayabileceği gösterilmiştir. Bu çalışmalar, antikor cevaplarına odaklanmakla birlikte, nötralize edici olmayan antikorların koruyucu etkisini ortaya koymaktadır ve NP ile birlikte aşılandığında koruyucu bağışıklık etkisini artırsa da, M

segmentinin koruyucu bağışıklık tepkisinde yeterli olabileceğini öne sürmektedir. Yapısal proteinler arasında en düşük sekans korunmuşluğu sergilemektedir. Bu da, varyasyonların antikör aracılı nötralizasyonu bozulmasıyla veya virüs suşuyla aşı antijenlerinin eşleşmemesi durumunda yetersiz bir korumayla sonuçlanabilir. Daha yüksek sekans korunmuşluğuna sahip NP'nin aşı vektörlerine dahil edilmesi, koruyuculuğu artırılmasına önemli katkı sağlayabilir.

Sitokin titreleri, anti-GPC'ye özgü T hücre popülasyonları ile hayatta kalma arasında doğrudan bir korelasyon tespit edilemediğinden, KKKA tehdidine karşı koruma hala belirsizliğini korumaktadır. KKKA tehdidine karşı yeterli/tam korumada hem B hem de T hücre yanıtlarının her ikisi de gerekli olduğunu düşündürmektedir.

Polietilenimin (PEI), sentetik, suda çözünür, doğrusal veya dallı bir polimerdir. DNA ile kompleks oluşturma ve “proton sünger etkisi” ile endozomal salınımını destekleme özelliğinden dolayı gen taşıma sisteminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca hücre içi çekirdeğe taşınmasını kolaylaştırır.

KKKAV'nin coğrafi yayılımı, önleyici veya tedavi edici önlemlerin yetersizliği, yaygın bir salgın potansiyeli taşımaktadır. Bu çalışmada, 1) *in silico* olarak KKKAV-NP'ye ait MHC-I epitopları aşı adayı olma potansiyellerine göre test edilmiştir; 2) T hücre aktivasyonunun gösterilebilmesi için, antijenleri ifadeleyen makrofajlarla T hücrelerinin birlikte kültivasyonunu içeren *in vitro* bir dizayn yapılmıştır; 3) *in silico* araçlarla analizin ardından tasarlanan aşı adaylarını homolog prime-boost ile 2 doz aşılmasının Balb/c ve IFNAR^{-/-} fare modellerinde humoral ve hücrel bağışık yanıtları değerlendirilmiştir.

Çalışmanın ilk basamağı, *in silico* tasarımlarla aşı adaylarını oluşturmaktır. Yani, seçilen hedef proteine (KKKKAV-NP) ait T hücre yanıtlarını indükleyerek adaptif bağışık yanıt oluşturan peptit adaylarının belirlenmesidir. Literatüre girmiş birçok biyoinformatik araç vardır ve bu araçların kullanım sıralaması sadece informatik yaklaşım kullanan araştırmalarla sınırlı olduğundan, bu standart bir yol olarak kabul görmektedir (120,145–147). Hem buradaki sıralama hem de kullanılan araçlar farklı parametreleriyle beraber peptit tahminlerini çok etkilemektedir. Bu nedenle bu çalışmada, aynı amaca hizmet eden birden fazla araç kullanılmıştır. Aynı amaçla kullanılan her araçta ortak bulunan peptitlerin seçilmesi hedeflenmiştir, fakat bu araçlar benzer algoritmalara sahip olsalar da yapılan

analizler çok az ortak peptitle sonuçlanmıştır. Ayrıca, bütün bu araçlar bir eşik değerine ve bazı başka parametrelere de bağlıdır. Filtrelemek, potansiyel adayların yanlışlıkla elenmesine sebep olabilir. Bu nedenle, eleme yapılmaksızın, her analizin sonunda çıkan peptitler diğer bir analize tabi tutuldu. Fakat yine de yapılan analizler bir eşik değeri üzerinden gerçekleştirildi. Suşlar arası genetik çeşitlilik ise, başka bir dezavantajdır. Bunu önlemek adına, veri tabanlarından erişilebilir protein sekansları hizalanmıştır ve korunan bölgelere gelen peptitler aday olarak değerlendirilmiştir. Literatürde az sayıda çalışmanın yer alması ve beraberinde deneysel çalışmaların da yetersizliği bu sistemin en büyük dezavantajı olmuştur. Çalışmada seçilen peptitler ilk kez değerlendirilmektedir.

Çalışmanın deneysel ilk basamağını ise, seçilen peptitlerin T hücre aktivasyon yeteneğinin *in vitro* tasarımıyla test edilmesi oluşturmaktadır. THP-1 hücrelerinin seçilen antijenik bölgeleri ifadelemesi için Yöntem kısmında da belirtildiği üzere birçok farklı yöntem denenmiştir. Fakat, yöntemler ya düşük etkinlik göstermiş ya da tümünden başarısız olmuştur. Bu nedenle, Lentiviral vektörler (LV'ler), büyük paketleme kapasiteleri, gen transfer etkinlikleri ve kalıcı transgenik ekspresyonları nedeniyle bir araştırma aracı olarak kullanılmaktadır (148). Psödotipli Ebola virüsü (EBOV), hantavirüs (HNTV) ve Marburg virüsü (MARV), reseptör bağlanma ve giriş analizlerinin yanı sıra nötralizasyon analizleri için de uygulanmıştır (149–151). Hatta bir çalışmada, KKKAV-GP taşıyan psödotipli bir LV oluşturulmuş ve bunun nötralizasyon analizleri için bir araç olarak uygulanabilirliği değerlendirilmiştir (152). Bu kapsamda, THP-1 hücrelerinin antijenik bölgeleri ifadelemesi için Dr. Öğr. Üyesi Mutlu Erdoğan'ın laboratuvarında tasarlamış olduğumuz LV vektöre ilgili bölgeler klonlanmıştır ve öncelikle Hek293 hücrelerinde antijenleri ifadeleyen Lentivirüs'ler üretilmiş ve THP-1 hücreleri bu virüslerle spin aracılı enfekte (spinection) edilmiştir. Antijen-spesifik efektör T hücre yanıtlarını test etmek için virüs enfekte THP-1 hücreleri Jurkat hücreleriyle (T lenfosit) birlikte kültürlenmiştir ve floresan proteinler aracılı transfeksiyonlar takip edilmiştir. Akış sitometrisi sonuçları, boş vektör, MTSAILGILPV peptidi ve tam uzunluklu NP ile aşılanmış gruplarda, negatif olarak belirlenen gruba kıyasla

M segmenti 25 µg kas içi elektroporasyon aracılı olarak IFNAR farelere verilmiş ve spesifik immün yanıtlar alındığı gösterilmiştir (96,153). Yine benzer şekilde elektroporasyon yönteminin kullanıldığı bir çalışma, VLP tabanlı bir DNA aşısının (NP-Gc-Gn) 3 aşılamanın ardından virüs tehdidinden 10 gün sonra biri hariç bütün IFNAR'ların hayatta kaldığını

raporlamıştır (106). Ayrıca, 2 ve 3. immünizasyonların arasında IFN- γ , TNF- α ve IL-2 yanıtlarında artış görülmüştür. Bu artış, hem 2 güçlendirici dozun uygulanması hem de DNA'nın hayvana verilmiş yönteminden kaynaklı olabilir.

KKKAV-NP'nin enfeksiyona karşı oynadığı rol hala belirsizliğini korumaktadır. Buna karşın, yapılan bazı çalışmalar bu proteinin enfeksiyon sırasında yüksek seviyelerde üretildiği ve hem T hem B hücre epitopları içerdiğinden yüksek immünojeniteye sahip olduğu gösterilen KKKAV-NP (112,115)m, IFNAR farelerde KKKAV enfeksiyonlarına karşı tam koruma sağlamak için yapılan çalışmalarda kullanılmıştır (95).

Prime-boost rejimleri, aşı tarafından uyarılan humoral ve hücrel yanıtların artan etkinliğini ve daha uzun süreli bağışıklık yanıtlarını elde etmek için kullanılan bir aşı stratejisi olarak kabul edilmektedir. Aşılama stratejisi, ilk doz viral vektörün ikinci doz homolog prime-boost kullanılmasını içermektedir. Tam uzunluklu NP de dahil olmak üzere, hiçbir aşı rejimi mock aşılanmış gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı antikor yanıtları sergilememiştir. KKKAV enfeksiyonlarından sonra ölüm daha çok düşük antikor yanıtlarıyla ilişkilendirilmiş olup, birçok çalışma hayvan modellerinde hastalığa karşı korumada antikor yanıtlarının önemini vurgulamıştır. Bu çalışmada değerlendirilen antikor yanıtlarıyla hayvanların hayatta kalma süreleri tutarlıdır.

T hücrelerinin, doğal enfeksiyon sonrasında insanlarda enfeksiyonu çözme sürecindeki rolü hala belirsizdir. Ancak, KKKA'dan kurtulan insanlar, enfeksiyondan birkaç yıl sonra algılanabilen hafıza CD8⁺ T hücreleri sergilemiştir ve akut KKKAV enfeksiyonunun hayatta kalma açısından hem CD4⁺ hem de CD8⁺ T hücrelerinin önemli olduğu gösterilmiştir. Çalışmanın asıl amacı antikor yanıtlarına ilaveten korumaya destek olan adaptif bağışık yanıtlarının değerlendirilmesidir. Test edilen bütün vektörler, Balb/c farelerde IFN- γ hücrel bağışık yanıtlarını da uyarmamıştır. IFN- γ dışında değerlendirilen diğer Th1/Th2 (TNF- α , IL-6, IL-10) yanıtlarına yönelik değerlendirmelerden de anlamlı sonuçlar elde edilememiştir. İnsanlarda, hayatta kalan hastalarla kıyaslandığında ölümcül hastalarda IL-6 ve TNF- α seviyelerinde önemli yüksek artışlar saptanmıştır. Bu artışlar, viral yük ve intravasküler pıhtılaşma ve KKKAV'ye spesifik bağışıklığın yokluğuyla birlikte değerlendirildiğinde KKKA'da ölümle güçlü bir şekilde ilişkilidir (154). Yakın tarihli bir çalışmada ayrıca IL-1, IL-6 ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin artan düzeylerinin

KKKA hastalarının mortalitesinde önemli bir rol oynadığı ileri sürülmüştür (91). Türkiye'de yapılan bir çalışmada artan TNF- α ve IL-6 seviyelerinin, intravasküler koagülasyon ve ölümcül sonuçlarla güçlü bir ilişkisinin olduğu gösterilmiştir; bu çalışmada IL-10'un ölümcül ve ölümcül olmayan vakalar arasında anlamlı bir fark göstermediği de belirtilmiştir. Kosova'da yapılan bir sonraki çalışmada, IL-10, TNF- α ve IFN- γ yüksek seviyelerinin ölümcül sonuçlarla ilişkilendirildiği bildirilmiştir (67). Bu, Türkiye'de yapılan başka bir çalışma tarafından doğrulanmamıştır; sadece TNF- α ve IL-6'nın ölümle ilişkilendirilmiş olup, IL-10 ve IFN- γ seviyelerinin ölümcül ve ölümcül olmayan vakalarda karşılaştırılabilir olduğu belirtilmiştir (155).

İnsanlarda yapılan birçok çalışma, enfeksiyona karşı düşük veya hiç olmayan antikor yanıtlarının kötü sonuçlarla ilişkili ilişkilendirmiştir (82). Hayatta kalanlar arasında bile antikor yanıtları zayıf nötralizan olabilir ve farelerde nötralizan antikor yanıtlarını ortaya çıkaran bir aşı bile, ölümcül virüs tehdidine karşı koruma sağlamada başarısız olmuştur (156). Ayrıca, aşı aracılı koruma için hem humoral hem de hücrel aracılı bağışıklık gereklidir (22). Bununla birlikte, enfeksiyona karşı bir antikor tepkisi oluşturmadaki başarısızlığın, kontrolsüz viral enfeksiyon ve ölümle sonuçlanıp sonuçlanmadığı veya yalnızca etkisiz bir bağışıklık tepkisiyle korelasyon gösterip göstermediği belirsizliğini korumaktadır. Bu bulgular, antikor yanıtlarının tek başına KKKAV enfeksiyonunu kontrol etmede yetersiz olabileceğini düşündürmektedir. T hücrelerinin KKKAV'nin kontrolüne katkıda bulunup bulunmadığı veya nasıl katkıda bulunduğu da benzer şekilde tam olarak anlaşılamamıştır. Hayatta kalanlar hafıza T hücresi tepkileri üretirken (112), ölümcül vakalarda dolaşımdaki CD8+ T hücrelerinin seviyeleri yükselmiştir (157).

Hayvan çalışmalarının zorluğu, aşı üretim maliyeti, aşının zayıflatılmasıyla ilgili sorunlar ve bu aşılarda olumsuz etkileri, hesaplamalı yöntemleri kullanan alt birim aşılarda geliştirilmesinde yol açmıştır. Bu yaklaşım, hastalık aşısının geliştirilmesine hızlı, güvenilir, uygun maliyetli ve etkili bir yaklaşım sağlar⁹³. Model hayvanların KKKAV'ye karşı bağışıklık yeterliliği ve mevcut aşılarda genişletilebilirlik ve güvenlik sorunları, üretimi geciktirmiş ve mevcut aşılarda yaygın kullanımını engellemiş, bu sorunlardan arınmış olabilecek yeni bir aşının geliştirilmesini zorunlu kılmıştır. Epitop bazlı peptid aşılarda geliştirilmesinde, hücre reseptörü ve virüs arasındaki etkileşimde rol oynayan, transkripsiyonu ve replikasyonu dolayısıyla hastalığın patogeneğinde önemli bir rol oynayan

yapısal proteinler odak noktası olarak kabul edilmektedir. NP'ye ait peptitlerin (MHC-I epitopları) fizikokimyasal özellikleri, dizilerinin antijenik belirlenmesinden önce tahmin edildi. Belirlenen eşik değerlerinin üstünde kalan adaylar test edilen bütün parametrelere tabi tutularak *in vitro* ve *in vivo* analizlere tabi tutulmak üzere seçilmiştir.

Etkili bir aşı, stabil bir adaptif bağışıklık ile antijen yoluyla bağışıklık oluşturabilmeli ve konağın bağışıklık tepkisini ortaya çıkarmak için önemli olan antijenik özelliklere sahip olmalıdır. CTL epitopları, antijenite, alerjenite, immünojenite, toksisite ve korunmuşluk değerlerine göre hücrel bağışık tepkilerini indükleyen adaylar birçok sunucu kullanılarak seçildi. Aşı vektöründe, adjuvan olarak değerlendirilen hBD3 sekansı ile epitop arasında minimal bağlantısal immünojeniteyi ve yüksek seviyede ekspresyonu teşvik ettiği ve aşının biyoaktivitesini arttırdığı gösterilen kısa peptit (AAY) yerleştirildi. Bu çalışmanın amacı, birden fazla T hücre epitopunu içeren potansiyel peptit grupları bağışık yanıt oluşturmalarına karşı test etmektir. KKKAV-NP epitopları içerdiği göz önüne alındığında, bu aşı vektörlerine karşı profilaktik bir etki görülmesi muhtemel olarak düşünülmüştür. Yüksek bir afiniteye ve bağlanma potansiyeline sahip olsa da, bağışıklık uyarımında, etkin bağışık yanıtlar alınamadı. Bunun muhtemel sebepleri arasında, humoral ve hücrel bağışıklığı indükleyen tam uzunluklu NP grubunun da diğer aşı gruplarından fark göstermemesi nedeniyle bu vektörlerin tasarımı kaynaklı yanıt alınamadığı düşünülmektedir. Olası diğer bir sebep ise, bu peptit adayları, birçok benzer algoritmalara sahip araç kullanılarak seçilse de, etkin yanıtlar için doğru adaylar olmamasıdır. Ayrıca, vektörlerin tasarımından, DNA'nın veriliş yönteminden konsantrasyonuna, uygun adjuvan seçimine, kullanılan hayvan modeline kadar birçok parametrenin alınacak yanıtları etkilediği kompleks bir sistemdir. Bu nedenle, *in silico* yöntemin doğruluğu daha fazla araç ve parametreye tabi tutularak değerlendirilebilir.

KAYNAKLAR

1. Ansari H, Shahbaz B, Izadi S, Zeinali M, Tabatabaee SM, Mahmoodi M, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever and its relationship with climate factors in southeast Iran: a 13-year experience. *J Infect Dev Ctries*. 2014;8(06):749–57.
2. Mostafavi E, Haghdoost A, Khakifirouz S, Chinikar S. Spatial analysis of Crimean Congo hemorrhagic fever in Iran. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;89(6):1135.
3. Vescio FM, Busani L, Mughini-Gras L, Khoury C, Avellis L, Taseva E, et al. Environmental correlates of crimean-congo haemorrhagic fever incidence in Bulgaria. *BMC Public Health*. 2012 Dec;12(1):1116.
4. Hutchings K. RAPID RISK ASSESSMENT-Crimean–Congo haemorrhagic fever in Spain-8 September 2016. 2016 [cited 2023 Nov 20]; Available from: <https://policycommons.net/artifacts/3740943/rapid-risk-assessment/4546789/>
5. WHO. Prioritizing diseases for research and development in emergency contexts. WHO Geneva, Switzerland; 2020.
6. Nasirian H. New aspects about Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) cases and associated fatality trends: A global systematic review and meta-analysis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2020;69:101429.
7. Fillâtre P, Revest M, Tattevin P. Crimean-Congo hemorrhagic fever: An update. *Med Mal Infect*. 2019;49(8):574–85.
8. Gozdas HT. Evaluation of Crimean-Congo hemorrhagic fever suspected cases admitted to a secondary care hospital in Kastamonu, Turkey between 2014-2017. *Afr Health Sci*. 2019;19(1):1433–40.
9. Siegrist CA, Aspinall R. B-cell responses to vaccination at the extremes of age. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(3):185–94.
10. Panagioti E, Klenerman P, Lee LN, Van der Burg SH, Arens R. Features of effective T cell-inducing vaccines against chronic viral infections. *Front Immunol*. 2018;9:276.
11. Gilbert SC. T cell-inducing vaccines – what’s the future. *Immunology*. 2012 Jan;135(1):19–26.
12. Robinson HL, Amara RR. T cell vaccines for microbial infections. *Nat Med*. 2005;11(Suppl 4):S25–32.
13. Golden JW, Fitzpatrick CJ, Suschak JJ, Clements TL, Ricks KM, Sanchez-Lockhart M, et al. Induced protection from a CCHFV-M DNA vaccine requires CD8⁺ T cells. *Virus Res*. 2023;334:199173.
14. Perdomo-Celis F, Salvato MS, Medina-Moreno S, Zapata JC. T-cell response to viral hemorrhagic fevers. *Vaccines*. 2019;7(1):11.

15. Tipih T, Burt FJ. Crimean–Congo Hemorrhagic Fever Virus: Advances in Vaccine Development. *BioResearch Open Access*. 2020 May 1;9(1):137–50.
16. Backert L, Kohlbacher O. Immunoinformatics and epitope prediction in the age of genomic medicine. *Genome Med*. 2015 Dec;7(1):119.
17. Raoufi E, Hemmati M, Eftekhari S, Khaksaran K, Mahmodi Z, Farajollahi MM, et al. Epitope Prediction by Novel Immunoinformatics Approach: A State-of-the-art Review. *Int J Pept Res Ther*. 2020 Jun;26(2):1155–63.
18. Whitehouse CA. Crimean–Congo hemorrhagic fever. *Antiviral Res*. 2004;64(3):145–60.
19. Hoogstraal H. The epidemiology of tick-borne Crimean-Congo hemorrhagic fever in Asia, Europe, and Africa. *J Med Entomol*. 1979;15(4):307–417.
20. Ahmad K. Cases of Congo haemorrhagic fever in Pakistan. *The Lancet*. 2000;356(9244):1831.
21. Athar MN, Khalid MA, Ahmad AM, Bashir N, Baqai HZ, Ahmad M, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever outbreak in Rawalpindi, Pakistan, February 2002: contact tracing and risk assessment. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;72(4):471–3.
22. Karti SS, Odabasi Z, Korten V, Yilmaz M, Sonmez M, Caylan R, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(8):1379.
23. Chinikar S, Persson S, Johansson M, Bladh L, Goya M, Houshmand B, et al. Genetic analysis of crimean–congo hemorrhagic fever virus in Iran. *J Med Virol*. 2004 Jul;73(3):404–11.
24. Mardani M, Jahromi MK, Naieni KH, Zeinali M. The efficacy of oral ribavirin in the treatment of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Iran. *Clin Infect Dis*. 2003;36(12):1613–8.
25. Madani TA. Alkhumra virus infection, a new viral hemorrhagic fever in Saudi Arabia. *J Infect*. 2005;51(2):91–7.
26. Yashina L, Vyshemirskii O, Seregin S, Petrova I, Samokhvalov E, Lvov D, et al. Genetic Analysis of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Russia. *J Clin Microbiol*. 2003 Feb;41(2):860–2.
27. Ertugrul B, Uyar Y, Yavas K, Turan C, Oncu S, Saylak O, et al. An outbreak of Crimean-Congo hemorrhagic fever in western Anatolia, Turkey. *Int J Infect Dis*. 2009;13(6):e431–6.
28. Vatansever Z, Dvm RU, Estrada-Pena A, Ergonul O. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Turkey. In: Ergonul O, Whitehouse CA, editors. *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2007 [cited 2023 Nov 20]. p. 59–74. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4020-6106-6_6

29. Yilmaz GR, Buzgan T, Irmak H, Safran A, Uzun R, Cevik MA, et al. The epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey, 2002–2007. *Int J Infect Dis.* 2009;13(3):380–6.
30. Yilmaz GR, Buzgan T, Torunoglu MA, Safran A, Irmak H, Com S, et al. A preliminary report on Crimean-Congo haemorrhagic fever in Turkey, March - June 2008. *Eurosurveillance* [Internet]. 2008 Aug 14 [cited 2023 Nov 20];13(33). Available from: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/ese.13.33.18953-en>
31. Tsergouli K, Karampatakis T, Haidich AB, Metallidis S, Papa A. Nosocomial infections caused by Crimean–Congo haemorrhagic fever virus. *J Hosp Infect.* 2020;105(1):43–52.
32. Spengler JR, Estrada-Peña A. Host preferences support the prominent role of *Hyalomma* ticks in the ecology of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12(2):e0006248.
33. Hasan Z, Jamil B. Robust rapid diagnostics for CCHF in endemic seasons. 2023 [cited 2023 Nov 20]; Available from: <https://gh.bmj.com/content/robust-rapid-diagnostics-cchf-endemic-seasons>
34. Ak Ç, Ergönül Ö, Gönen M. A prospective prediction tool for understanding Crimean–Congo haemorrhagic fever dynamics in Turkey. *Clin Microbiol Infect.* 2020;26(1):123–e1.
35. Arab-Bafrani Z, Jabbari A, Mostakhdem Hashemi M, Arabzadeh AM, Gilanipour A, Mousavi E. Identification of the crucial parameters regarding the efficacy of ribavirin therapy in Crimean–Congo haemorrhagic fever (CCHF) patients: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74(12):3432–9.
36. Johnson S, Henschke N, Maayan N, Mills I, Buckley BS, Kakourou A, et al. Ribavirin for treating Crimean Congo haemorrhagic fever. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2018 [cited 2023 Nov 20];(6). Available from: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD012713.pub2/abstract>
37. Ceylan B, Calica A, Ak O, Akkoyunlu Y, Turhan V. Ribavirin is not effective against Crimean–Congo hemorrhagic fever: observations from the Turkish experience. *Int J Infect Dis.* 2013;17(10):e799–801.
38. WHO. Crimean-Congo haemorrhagic fever. [Internet]. 2020. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/crimean-congo-haemorrhagic-fever>.
39. Carrillo-Bustamante P, Nguyen THT, Oestereich L, Günther S, Guedj J, Graw F. Determining Ribavirin’s mechanism of action against Lassa virus infection. *Sci Rep.* 2017;7(1):11693.
40. Duygu F, Kaya T, Baysan P. Re-Evaluation of 400 Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Cases in an Endemic Area: Is Ribavirin Treatment Suitable? *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 2012 Sep;12(9):812–6.

41. Ozkurt Z, Kiki I, Erol S, Erdem F, Yılmaz N, Parlak M, et al. Crimean–Congo hemorrhagic fever in Eastern Turkey: clinical features, risk factors and efficacy of ribavirin therapy. *J Infect.* 2006;52(3):207–15.
42. Ergönül Ö, Çelikbaş A, Dokuzoğuz B, Eren Ş, Baykam N, Esener H. Characteristics of patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever in a recent outbreak in Turkey and impact of oral ribavirin therapy. *Clin Infect Dis.* 2004;39(2):284–7.
43. Guven G, Talan L, Altintas ND, Memikoglu KO, Yoruk F, Azap A. An unexpected fatal CCHF case and management of exposed health care workers. *Int J Infect Dis.* 2017;55:118–21.
44. Guner R, Hasanoglu I, Tasyaran MA, Yapar D, Keske S, Guven T, et al. Is Ribavirin Prophylaxis Effective for Nosocomial Transmission of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever? *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 2014 Aug;14(8):601–5.
45. Hawman DW, Haddock E, Meade-White K, Nardone G, Feldmann F, Hanley PW, et al. Efficacy of favipiravir (T-705) against Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infection in cynomolgus macaques. *Antiviral Res.* 2020;181:104858.
46. Messina JP, Pigott DM, Duda KA, Brownstein JS, Myers MF, George DB, et al. A global compendium of human Crimean-Congo haemorrhagic fever virus occurrence. *Sci Data.* 2015;2(1):1–6.
47. Ergönül Ö. Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Lancet Infect Dis.* 2006;6(4):203–14.
48. Skwarczynski M, Toth I. Peptide-based synthetic vaccines. *Chem Sci.* 2016;7(2):842–54.
49. Bibi S, Ullah I, Zhu B, Adnan M, Liaqat R, Kong WB, et al. In silico analysis of epitope-based vaccine candidate against tuberculosis using reverse vaccinology. *Sci Rep.* 2021;11(1):1249.
50. Hawman DW, Meade-White K, Haddock E, Habib R, Scott D, Thomas T, et al. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Mouse Model Recapitulating Human Convalescence. García-Sastre A, editor. *J Virol.* 2019 Sep 15;93(18):e00554-19.
51. Enayatkhani M, Hasaniazad M, Faezi S, Gouklani H, Davoodian P, Ahmadi N, et al. Reverse vaccinology approach to design a novel multi-epitope vaccine candidate against COVID-19: an *in silico* study. *J Biomol Struct Dyn.* 2021 May 24;39(8):2857–72.
52. Ullah MA, Sarkar B, Islam SS. Exploiting the reverse vaccinology approach to design novel subunit vaccines against Ebola virus. *Immunobiology.* 2020;225(3):151949.
53. Martin JE, Sullivan NJ, Enama ME, Gordon IJ, Roederer M, Koup RA, et al. A DNA Vaccine for Ebola Virus Is Safe and Immunogenic in a Phase I Clinical Trial. *Clin Vaccine Immunol.* 2006 Nov;13(11):1267–77.

54. Schwende H, Fitzke E, Ambs P, Dieter P. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1, 25-dihydroxyvitamin D3. *J Leucoc Biol.* 1996;59(4):555–61.
55. Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MK, Dockrell DH. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PloS One.* 2010;5(1):e8668.
56. Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol.* 2014;23(1):37–45.
57. Kibuuka H, Berkowitz NM, Millard M, Enama ME, Tindikahwa A, Sekiziyivu AB, et al. Safety and immunogenicity of Ebola virus and Marburg virus glycoprotein DNA vaccines assessed separately and concomitantly in healthy Ugandan adults: a phase 1b, randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *The Lancet.* 2015;385(9977):1545–54.
58. Malik MT. Nucleolin: role in bacterial and viral infections. *EC Microbiol.* 2018;14:631–40.
59. Pshenichnaya NY, Nenadskaya SA. Probable Crimean-Congo hemorrhagic fever virus transmission occurred after aerosol-generating medical procedures in Russia: nosocomial cluster. *Int J Infect Dis.* 2015;33:120–2.
60. Bertolotti-Ciarlet A, Smith J, Strecker K, Paragas J, Altamura LA, McFalls JM, et al. Cellular Localization and Antigenic Characterization of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Glycoproteins. *J Virol.* 2005 May 15;79(10):6152–61.
61. Xiao X, Feng Y, Zhu Z, Dimitrov DS. Identification of a putative Crimean-Congo hemorrhagic fever virus entry factor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;411(2):253–8.
62. Garrison AR, Radoshitzky SR, Kota KP, Pegoraro G, Ruthel G, Kuhn JH, et al. Crimean–Congo hemorrhagic fever virus utilizes a clathrin-and early endosome-dependent entry pathway. *Virology.* 2013;444(1–2):45–54.
63. Simon M, Johansson C, Mirazimi A. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus entry and replication is clathrin-, pH- and cholesterol-dependent. *J Gen Virol.* 2009 Jan 1;90(1):210–5.
64. Connolly-Andersen AM, Magnusson KE, Mirazimi A. Basolateral Entry and Release of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Polarized MDCK-1 Cells. *J Virol.* 2007 Mar;81(5):2158–64.
65. Arasli M. Pathogenesis of Crimean–Congo Hemorrhagic Fever From an Immunological Perspective. *Curr Trop Med Rep.* 2016;3(1):14–9.
66. Bente DA, Alimonti JB, Shieh WJ, Camus G, Ströher U, Zaki S, et al. Pathogenesis and Immune Response of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in a STAT-1 Knockout Mouse Model. *J Virol.* 2010 Nov;84(21):11089–100.

67. Saksida A, Duh D, Wraber B, Dedushaj I, Ahmeti S, Avšič-Županc T. Interacting Roles of Immune Mechanisms and Viral Load in the Pathogenesis of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever. *Clin Vaccine Immunol*. 2010 Jul;17(7):1086–93.
68. Raabe VN. Diagnostic Testing for Crimean-Congo Hemorrhagic Fever. Kraft CS, editor. *J Clin Microbiol*. 2020 Mar 25;58(4):e01580-19.
69. Buttigieg KR, Dowall SD, Findlay-Wilson S, Miloszezewska A, Rayner E, Hewson R, et al. A novel vaccine against Crimean-Congo Haemorrhagic Fever protects 100% of animals against lethal challenge in a mouse model. *PloS One*. 2014;9(3):e91516.
70. Dowall SD, Graham VA, Rayner E, Hunter L, Watson R, Taylor I, et al. Protective effects of a Modified Vaccinia Ankara-based vaccine candidate against Crimean-Congo Haemorrhagic Fever virus require both cellular and humoral responses. *PloS One*. 2016;11(6):e0156637.
71. Van Gorp ECM, Suharti C, Ten Cate H, Dolmans WMV, van der Meer JW, Ten Cate JW, et al. Infectious diseases and coagulation disorders. *J Infect Dis*. 1999;180(1):176–86.
72. Spengler JR, Kelly Keating M, McElroy AK, Zivcec M, Coleman-McCray JD, Harmon JR, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever in humanized mice reveals glial cells as primary targets of neurological infection. *J Infect Dis*. 2017;216(11):1386–97.
73. Lindquist ME, Zeng X, Altamura LA, Daye SP, Delp KL, Blancett C, et al. Exploring Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus-Induced Hepatic Injury Using Antibody-Mediated Type I Interferon Blockade in Mice. Dermody TS, editor. *J Virol*. 2018 Nov;92(21):e01083-18.
74. Haddock E, Feldmann F, Hawman DW, Zivcec M, Hanley PW, Saturday G, et al. A cynomolgus macaque model for Crimean–Congo haemorrhagic fever. *Nat Microbiol*. 2018;3(5):556–62.
75. Arslan S, Engin A, Özbilüm N, Bakır M. Toll-like receptor 7 Gln11Leu, c.4-151A/G, and +1817G/T polymorphisms in Crimean Congo hemorrhagic fever: TLR 7 Polymorphisms in CCHF. *J Med Virol*. 2015 Jul;87(7):1090–5.
76. Engin A, Arslan S, Kizildag S, Oztürk H, Elaldi N, Dökmetas I, et al. Toll-like receptor 8 and 9 polymorphisms in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Microbes Infect*. 2010;12(12–13):1071–8.
77. Engin A, Arslan S, Özbilüm N, Bakır M. Is there any relationship between Toll-like receptor 3 c.1377C/T and –7C/A polymorphisms and susceptibility to Crimean Congo hemorrhagic fever? *J Med Virol*. 2016 Oct;88(10):1690–6.
78. Garrison AR, Smith DR, Golden JW. Animal models for Crimean-Congo hemorrhagic fever human disease. *Viruses*. 2019;11(7):590.
79. Ranadheera C, Valcourt EJ, Warner BM, Poliquin G, Rosenke K, Frost K, et al. Characterization of a novel STAT 2 knock-out hamster model of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus pathogenesis. *Sci Rep*. 2020;10(1):12378.

80. Spengler JR, Welch SR, Scholte FE, Coleman-McCray JD, Harmon JR, Nichol ST, et al. Heterologous protection against Crimean-Congo hemorrhagic fever in mice after a single dose of replicon particle vaccine. *Antiviral Res.* 2019;170:104573.
81. Spengler JR, Estrada-Peña A, Garrison AR, Schmaljohn C, Spiropoulou CF, Bergeron É, et al. A chronological review of experimental infection studies of the role of wild animals and livestock in the maintenance and transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Antiviral Res.* 2016;135:31–47.
82. Hawman DW, Meade-White K, Leventhal S, Carmody A, Haddock E, Hasenkrug K, et al. T-cells and interferon gamma are necessary for survival following Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infection in mice. *Microorganisms.* 2021;9(2):279.
83. Andersson I, Karlberg H, Mousavi Jazi M, Martínez Sobrido L, Weber F, Mirazimi A. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus delays activation of the innate immune response. *J Med Virol.* 2008 Aug;80(8):1397–404.
84. Weber F, Mirazimi A. Interferon and cytokine responses to Crimean Congo hemorrhagic fever virus; an emerging and neglected viral zoonosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008;19(5–6):395–404.
85. Cross RW, Prasad AN, Borisevich V, Geisbert JB, Agans KN, Deer DJ, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus strains Hoti and Afghanistan cause viremia and mild clinical disease in cynomolgus monkeys. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020;14(8):e0008637.
86. Smith DR, Shoemaker CJ, Zeng X, Garrison AR, Golden JW, Schellhase CW, et al. Persistent Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infection in the testes and within granulomas of non-human primates with latent tuberculosis. *PLoS Pathog.* 2019;15(9):e1008050.
87. Hawman DW, Meade-White K, Leventhal S, Feldmann F, Okumura A, Smith B, et al. Immunocompetent mouse model for Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Elife.* 2021;10:e63906.
88. Ergonul O. Treatment of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Antiviral Res.* 2008;78(1):125–31.
89. Kaiko GE, Horvat JC, Beagley KW, Hansbro PM. Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T cell response? *Immunology.* 2008 Mar;123(3):326–38.
90. Papa A, Bino S, Velo E, Harxhi A, Kota M, Antoniadis A. Cytokine levels in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *J Clin Virol.* 2006;36(4):272–6.
91. Ergonul O, Tuncbilek S, Baykam N, Celikbas A, Dokuzoguz B. Evaluation of serum levels of interleukin (IL)–6, IL-10, and tumor necrosis factor– α in patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever. *J Infect Dis.* 2006;193(7):941–4.

92. Chumakov MP, Butenko AM, Shalunova NV, Mart'ianova LI, Smirnova SE, Bashkirtsev IN, et al. [New data on the viral agent of Crimean hemorrhagic fever]. *Vopr Virusol.* 1968;13(3):377.
93. Bereczky S, Lindegren G, Karlberg H, Åkerström S, Klingström J, Mirazimi A. Crimean–Congo hemorrhagic fever virus infection is lethal for adult type I interferon receptor-knockout mice. *J Gen Virol.* 2010;91(6):1473–7.
94. Zivcec M, Safronetz D, Scott D, Robertson S, Ebihara H, Feldmann H. Lethal Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Infection in Interferon α/β Receptor Knockout Mice Is Associated With High Viral Loads, Proinflammatory Responses, and Coagulopathy. *J Infect Dis.* 2013 Jun 15;207(12):1909–21.
95. Aligholipour Farzani T, Hanifehnezhad A, Földes K, Ergünay K, Yilmaz E, Hashim Mohamed Ali H, et al. Co-Delivery Effect of CD24 on the Immunogenicity and Lethal Challenge Protection of a DNA Vector Expressing Nucleocapsid Protein of Crimean Congo Hemorrhagic Fever Virus. *Viruses.* 2019 Jan 17;11(1):75.
96. Garrison AR, Shoemaker CJ, Golden JW, Fitzpatrick CJ, Suschak JJ, Richards MJ, et al. A DNA vaccine for Crimean-Congo hemorrhagic fever protects against disease and death in two lethal mouse models. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(9):e0005908.
97. Sarwar UN, Costner P, Enama ME, Berkowitz N, Hu Z, Hendel CS, et al. Safety and immunogenicity of DNA vaccines encoding Ebolavirus and Marburgvirus wild-type glycoproteins in a phase I clinical trial. *J Infect Dis.* 2015;211(4):549–57.
98. Patel A, Reuschel EL, Kraynyak KA, Racine T, Park DH, Scott VL, et al. Protective efficacy and long-term immunogenicity in cynomolgus macaques by Ebola virus glycoprotein synthetic DNA vaccines. *J Infect Dis.* 2019;219(4):544–55.
99. Vaughn DW, Whitehead SS, Durbin AP. Dengue. In: *Vaccines for Biodefense and Emerging and Neglected Diseases* [Internet]. Elsevier; 2008 [cited 2023 Nov 21]. p. 287–324. Available from: <https://jhu.pure.elsevier.com/en/publications/dengue-4>
100. Faurez F, Dory D, Le Moigne V, Gravier R, Jestin A. Biosafety of DNA vaccines: New generation of DNA vectors and current knowledge on the fate of plasmids after injection. *Vaccine.* 2010 May;28(23):3888–95.
101. Lim M, Badruddoza AZM, Firdous J, Azad M, Mannan A, Al-Hilal TA, et al. Engineered Nanodelivery Systems to Improve DNA Vaccine Technologies. *Pharmaceutics.* 2020 Jan 1;12(1):30.
102. García-Rendón A, Garibay-Escobar A, Guzmán R, Tejeda-Mansir A. Plasmid-DNA lipid nanovaccines: An innovative approach for a better world health. In: *Lipid Nanocarriers for Drug Targeting* [Internet]. Elsevier; 2018 [cited 2023 Nov 21]. p. 231–67. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128136874000062>
103. Robinson HL, Pertmer TM. DNA vaccines for viral infections: basic studies and applications. 2000 [cited 2023 Nov 21]; Available from:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065352700550015/pdf?md5=8d6e85385ee658a1f06a3012750c4939&pid=1-s2.0-S0065352700550015-main.pdf>

104. Qin F, Xia F, Chen H, Cui B, Feng Y, Zhang P, et al. A guide to nucleic acid vaccines in the prevention and treatment of infectious diseases and cancers: from basic principles to current applications. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:633776.
105. Spik K, Shurtleff A, McElroy AK, Guttieri MC, Hooper JW, Schmaljohn C. Immunogenicity of combination DNA vaccines for Rift Valley fever virus, tick-borne encephalitis virus, Hantaan virus, and Crimean Congo hemorrhagic fever virus. *Vaccine.* 2006;24(21):4657–66.
106. Hinkula J, Devignot S, Åkerström S, Karlberg H, Wattrang E, Bereczky S, et al. Immunization with DNA Plasmids Coding for Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Capsid and Envelope Proteins and/or Virus-Like Particles Induces Protection and Survival in Challenged Mice. García-Sastre A, editor. *J Virol.* 2017 May 15;91(10):e02076-16.
107. Suschak JJ, Golden JW, Fitzpatrick CJ, Shoemaker CJ, Badger CV, Schmaljohn CS, et al. A CCHFV DNA vaccine protects against heterologous challenge and establishes GP38 as immunorelevant in mice. *Npj Vaccines.* 2021;6(1):31.
108. Hu YL, Zhang LQ, Liu XQ, Ye W, Zhao YX, Zhang L, et al. Construction and evaluation of DNA vaccine encoding Crimean Congo hemorrhagic fever virus nucleocapsid protein, glycoprotein N-terminal and C-terminal fused with LAMP1. *Front Cell Infect Microbiol.* 2023;13:1121163.
109. Hawman DW, Ahlén G, Appelberg KS, Meade-White K, Hanley PW, Scott D, et al. A DNA-based vaccine protects against Crimean-Congo haemorrhagic fever virus disease in a *Cynomolgus* macaque model. *Nat Microbiol.* 2021;6(2):187–95.
110. Barabas N, Röhl J, Holler E, Hehlhans T. Beta-defensins activate macrophages and synergize in pro-inflammatory cytokine expression induced by TLR ligands. *Immunobiology.* 2013 Jul;218(7):1005–11.
111. Mousavi-Jazi M, Karlberg H, Papa A, Christova I, Mirazimi A. Healthy individuals' immune response to the Bulgarian Crimean-Congo hemorrhagic fever virus vaccine. *Vaccine.* 2012;30(44):6225–9.
112. Goedhals D, Paweska JT, Burt FJ. Long-lived CD8+ T cell responses following Crimean-Congo haemorrhagic fever virus infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(12):e0006149.
113. Sorvillo TE, Rodriguez SE, Hudson P, Carey M, Rodriguez LL, Spiropoulou CF, et al. Towards a sustainable one health approach to crimean–congo hemorrhagic fever prevention: Focus areas and gaps in knowledge. *Trop Med Infect Dis.* 2020;5(3):113.
114. Deyde VM, Khristova ML, Rollin PE, Ksiazek TG, Nichol ST. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Genomics and Global Diversity. *J Virol.* 2006 Sep;80(17):8834–42.

115. Moming A, Tuoken D, Yue X, Xu W, Guo R, Liu D, et al. Mapping of B-cell epitopes on the N-terminal and C-terminal segment of nucleocapsid protein from Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *PLoS One*. 2018;13(9):e0204264.
116. Sahrawat TR, Checkervarty AK. Identification of epitopes for vaccine design against Crimean-Congo Haemorrhagic fever virus (CCHFV): an immuno-informatics approach. *JRAR-Int J Res Anal Rev*. 2019;6:807–11.
117. Comber JD, Philip R. MHC class I antigen presentation and implications for developing a new generation of therapeutic vaccines. *Ther Adv Vaccines*. 2014 May;2(3):77–89.
118. Patronov A, Doytchinova I. T-cell epitope vaccine design by immunoinformatics. *Open Biol*. 2013 Jan;3(1):120139.
119. Zaharieva N, Dimitrov I, Flower D, Doytchinova I. Immunogenicity prediction by VaxiJen: A ten year overview. *J Proteom Bioinform* [Internet]. 2017 [cited 2023 Dec 6];10(11). Available from: http://www.ddg-pharmfac.net/ddg/publications_files/2017_JProtBioinf.pdf
120. Nosrati M, Behbahani M, Mohabatkari H. Towards the first multi-epitope recombinant vaccine against Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: A computer-aided vaccine design approach. *J Biomed Inform*. 2019;93:103160.
121. Prlic M, Williams MA, Bevan MJ. Requirements for CD8 T-cell priming, memory generation and maintenance. *Curr Opin Immunol*. 2007;19(3):315–9.
122. Franco A, Tilly DA, Gramaglia I, Croft M, Cipolla L, Meldal M, et al. Epitope affinity for MHC class I determines helper requirement for CTL priming. *Nat Immunol*. 2000;1(2):145–50.
123. Zanetti M, Franchini G. T cell memory and protective immunity by vaccination: is more better? *Trends Immunol*. 2006;27(11):511–7.
124. Woolard SN, Kumaraguru U. Viral vaccines and CTL response. *BioMed Res Int* [Internet]. 2010 [cited 2023 Dec 6];2010. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2010/141657/abs/>
125. Ho WY, Nguyen HN, Wolfl M, Kuball J, Greenberg PD. In vitro methods for generating CD8⁺ T-cell clones for immunotherapy from the naive repertoire. *J Immunol Methods*. 2006;310(1–2):40–52.
126. Wölfl M, Greenberg PD. Antigen-specific activation and cytokine-facilitated expansion of naive, human CD8⁺ T cells. *Nat Protoc*. 2014;9(4):950–66.
127. Kangethe RT, Pichler R, Chuma FN, Cattoli G, Wijewardana V. Bovine monocyte derived dendritic cell based assay for measuring vaccine immunogenicity in vitro. *Vet Immunol Immunopathol*. 2018;197:39–48.
128. Pedersen AE, Jacoby BF, Skov S, Claesson MH. MHC class I is functionally associated with antigen receptors in human T and B lymphomas. *Cell Immunol*. 1996;173(2):295–302.

129. Abraham RT, Weiss A. Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(4):301–8.
130. Kaizuka Y, Douglass AD, Varma R, Dustin ML, Vale RD. Mechanisms for segregating T cell receptor and adhesion molecules during immunological synapse formation in Jurkat T cells. *Proc Natl Acad Sci.* 2007 Dec 18;104(51):20296–301.
131. Rydzek J, Nerreter T, Peng H, Jutz S, Leitner J, Steinberger P, et al. Chimeric antigen receptor library screening using a novel NF- κ B/NFAT reporter cell platform. *Mol Ther.* 2019;27(2):287–99.
132. Jutz S, Leitner J, Schmetterer K, Doel-Perez I, Majdic O, Grabmeier-Pfistershammer K, et al. Assessment of costimulation and coinhibition in a triple parameter T cell reporter line: Simultaneous measurement of NF- κ B, NFAT and AP-1. *J Immunol Methods.* 2016;430:10–20.
133. Shedlock DJ, Weiner DB. DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. *J Leukoc Biol.* 2000;68(6):793–806.
134. Welch SR, Ritter JM, McElroy AK, Harmon JR, Coleman-McCray JD, Scholte FE, et al. Fluorescent Crimean-Congo hemorrhagic fever virus illuminates tissue tropism patterns and identifies early mononuclear phagocytic cell targets in IFNAR $^{-/-}$ mice. *PLoS Pathog.* 2019;15(12):e1008183.
135. Haslberger AG, Kohl G, Felnerova D, Mayr UB, Fürst-Ladani S, Lubitz W. Activation, stimulation and uptake of bacterial ghosts in antigen presenting cells. *J Biotechnol.* 2000;83(1–2):57–66.
136. Berges C, Naujokat C, Tinapp S, Wieczorek H, Höh A, Sadeghi M, et al. A cell line model for the differentiation of human dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;333(3):896–907.
137. Hu PQ, Tuma-Warrino RJ, Bryan MA, Mitchell KG, Higgins DE, Watkins SC, et al. Escherichia coli expressing recombinant antigen and listeriolysin O stimulate class I-restricted CD8 $^{+}$ T cells following uptake by human APC. *J Immunol.* 2004;172(3):1595–601.
138. Hershkovitz O, Zilka A, Bar-Ilan A, Abutbul S, Davidson A, Mazzon M, et al. Dengue Virus Replicon Expressing the Nonstructural Proteins Suffices To Enhance Membrane Expression of HLA Class I and Inhibit Lysis by Human NK Cells. *J Virol.* 2008 Aug;82(15):7666–76.
139. Bettencourt P, Müller J, Nicastri A, Cantillon D, Madhavan M, Charles PD, et al. Identification of antigens presented by MHC for vaccines against tuberculosis. *Npj Vaccines.* 2020;5(1):2.
140. Wang Y, Guo Y, Wang X, Huang J, Shang J, Sun S. Serum amyloid P component facilitates DNA clearance and inhibits plasmid transfection: implications for human DNA vaccine. *Gene Ther.* 2012;19(1):70–7.

141. Almeida AM, Costa D, Simões AR, Queiroz JA, Sousa F, Sousa A. Enhancement of a biotechnological platform for the purification and delivery of a human papillomavirus supercoiled plasmid DNA vaccine. *New Biotechnol.* 2020;59:1–9.
142. Flingai S, Czerwonko M, Goodman J, Kudchodkar SB, Muthumani K, Weiner DB. Synthetic DNA vaccines: improved vaccine potency by electroporation and co-delivered genetic adjuvants. *Front Immunol.* 2013;4:354.
143. Zhou X, Jiang X, Qu M, Aninwene GE, Jucaud V, Moon JJ, et al. Engineering Antiviral Vaccines. *ACS Nano.* 2020 Oct 27;14(10):12370–89.
144. Dimitrov I, Flower DR, Doytchinova I. AllerTOP - a server for in silico prediction of allergens. *BMC Bioinformatics.* 2013 Apr 17;14(Suppl 6):S4.
145. Omoniyi AA, Adebisi SS, Musa SA, Nzalak JO, Bauch ZM, Bako KW, et al. In silico design and analyses of a multi-epitope vaccine against Crimean-Congo hemorrhagic fever virus through reverse vaccinology and immunoinformatics approaches. *Sci Rep.* 2022;12(1):8736.
146. Alam R, Samad A, Ahammad F, Nur SM, Alsaiani AA, Imon RR, et al. In silico formulation of a next-generation multiepitope vaccine for use as a prophylactic candidate against Crimean-Congo hemorrhagic fever. *BMC Med.* 2023 Feb 1;21(1):36.
147. Imran MdA, Islam MdR, Saha A, Ferdousee S, Mishu MA, Ghosh A. Development of Multi-epitope Based Subunit Vaccine Against Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Using Reverse Vaccinology Approach. *Int J Pept Res Ther.* 2022 Jun 24;28(4):124.
148. Mild M, Simon M, Albert J, Mirazimi A. Towards an understanding of the migration of Crimean–Congo hemorrhagic fever virus. *J Gen Virol.* 2010;91(1):199–207.
149. Kondratowicz AS, Lennemann NJ, Sinn PL, Davey RA, Hunt CL, Moller-Tank S, et al. T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 (TIM-1) is a receptor for Zaire Ebola virus and Lake Victoria Marburgvirus. *Proc Natl Acad Sci.* 2011 May 17;108(20):8426–31.
150. Brindley MA, Hunt CL, Kondratowicz AS, Bowman J, Sinn PL, McCray PB, et al. Tyrosine kinase receptor Axl enhances entry of Zaire ebolavirus without direct interactions with the viral glycoprotein. *Virology.* 2011 Jul 5;415(2):83–94.
151. Cifuentes-Muñoz N, Darlix JL, Tischler ND. Development of a lentiviral vector system to study the role of the Andes virus glycoproteins. *Virus Res.* 2010 Oct 1;153(1):29–35.
152. Vasmehjani AA, Salehi-Vaziri M, Azadmanesh K, Nejati A, Pouriayevali MH, Gouya MM, et al. Efficient production of a lentiviral system for displaying Crimean-Congo hemorrhagic fever virus glycoproteins reveals a broad range of cellular susceptibility and neutralization ability. *Arch Virol.* 2020 May 1;165(5):1109–20.
153. Suschak JJ, Golden JW, Fitzpatrick CJ, Shoemaker CJ, Badger CV, Schmaljohn CS, et al. A CCHFV DNA vaccine protects against heterologous challenge and establishes GP38 as immunorelevant in mice. *NPJ Vaccines.* 2021 Mar 2;6:31.

154. Kaya S, Elaldi N, Kubar A, Gursoy N, Yilmaz M, Karakus G, et al. Sequential determination of serum viral titers, virus-specific IgG antibodies, and TNF- α , IL-6, IL-10, and IFN- γ levels in patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever. *BMC Infect Dis*. 2014 Jul 28;14(1):416.
155. Kaya A, Engin A, Güven AS, İçağasıoğlu FD, Cevit Ö, Elaldı N, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever disease due to tick bite with very long incubation periods. *Int J Infect Dis*. 2011;15(7):e449–52.
156. Kortekaas J, Vloet RPM, McAuley AJ, Shen X, Bosch BJ, de Vries L, et al. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Subunit Vaccines Induce High Levels of Neutralizing Antibodies But No Protection in STAT1 Knockout Mice. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2015 Dec;15(12):759–64.
157. Akıncı E, Yılmaz M, Bodur H, Öngürü P, Bayazıt FN, Erbay A, et al. Analysis of lymphocyte subgroups in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Int J Infect Dis*. 2009 Sep 1;13(5):560–3.