

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

**KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞ HASTALIĞI
(KKKAH) VİRÜSÜ NÜKLEOPROTEİNİN (NP)
PROKARYOTİK SİSTEMDE AÇIKLANMASI VE
BİYOLOJİK AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hazırlayan
Hazel YETİŞKİN

Danışman
Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ

Yüksek Lisans Tezi

TEMMUZ 2016
KAYSERİ

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

**KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞ HASTALIĞI
(KKKAH) VİRÜSÜ NÜKLEOPROTEİNİN (NP)
PROKARYOTİK SİSTEMDE AÇIKLANMASI VE
BİYOLOJİK AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Hazel YETİŞKİN**

**Danışman
Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ**

Yüksek Lisans Tezi

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TYL-2016-6399 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**TEMMUZ 2016
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

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

Adı-Soyadı

Hazel YETİŞKİN

İmza



YÖNERGEYE UYGUNLUK

“Kırım Kongo Kanamalı Ateş Hastalığı (KKKAH) Virüsü Nükleoproteininin (NP) Prokaryotik sistemde Açıklanması ve Biyolojik Aktivitesinin Araştırılması.” adlı Yüksek Lisans, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan
Hazel YETİŞKİN

İmza



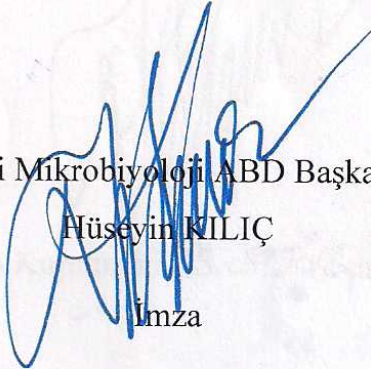
Danışman
Aykut ÖZDARENDELİ

İmza



Tıbbi Mikrobiyoloji ABD Başkanı
Hüseyin KILIÇ

İmza



KABUL VE ONAY

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ danışmanlığında **Hazel YETİŞKİN** tarafından hazırlanan “ Kırım Kongo Kanamalı Ateş Hastalığı (KKKAH) virüsü Nükleoprotein (NP) Prokaryotik Sistemde Açıklanması ve Biyolojik Aktivitesinin Araştırılması ” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında **yüksek lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

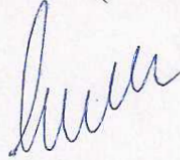
19/08/2016

JÜRİ:

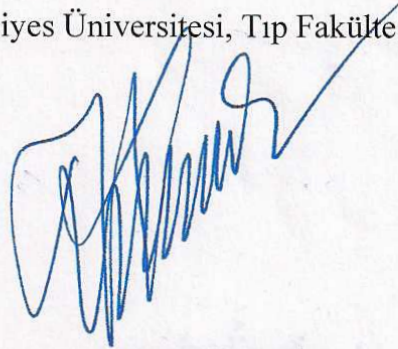
Danışman: Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ (Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı)



Üye: Prof. Dr. Zülal AŞÇI TORAMAN (Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı)



Üye: Prof. Dr. Hüseyin KILIÇ (Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı)



ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 25.08.2016 tarih ve744..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

25...../08...../2016.

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ
Enstitü Müdürü



TEŞEKKÜR

Yüksek lisansım süresince ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu sabrından ve hoşgörüsünden dolayı değerli hocam, Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ'ye, çalışmam boyunca desteğini ve yardımını esirgemeyen hocalarım Yard. Doç. Nurettin ÇANAKOĞLU, Yard. Doç. Engin BERBER ve Yard. Doç. İbrahim SÖZDUTMAZ'a, yüksek lisans eğitimimi aldığım Tıbbi Mikrobiyoloji bölümünün başta Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hüseyin KILIÇ olmak üzere saygıdeğer tüm öğretim üyelerine, çalışmalarım boyunca yardımlarını eksik etmeyen laboratuvar çalışanlarına, tüm hayatım boyunca hep arkamda durarak sevgilerini ve desteklerini esirgemeyen aileme, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hazel YETİŞKİN

**KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞ HASTALIĞI (KKKAH) VİRÜSÜ
NÜKLEOPROTEİNİN (NP) PROKARYOTİK SİSTEMDE AÇIKLANMASI VE
BİYOLOJİK AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hazel YETİŞKİN

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Temmuz 2016

Danışman: Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ

ÖZET

Kırım-Kongo kanamalı ateş hastalığı (KKKAH) *Bunyaviridae* ailesinin *Nairovirus* genusunda bulunan üç segmentli ve negatif anlamlı bir virüs tarafından oluşturulmaktadır. Virüs Asya, Afrika, Ortadoğu, ve Doğu Avrupa gibi geniş bir coğrafyada görülmektedir. Hastalığın taşınması kene ısırığı, viremik insan ve hayvanlarla direk temastır. KKKAH virüsü şimdiye kadar en az 31 kene türü türünden izole edildi. Mortalitesi 5% ile 50 % arasında değişen bu hastalık hemorajik ve toksik sendromlarla karakterizedir.

KKKAH virüsü ile yapılan çalışmaların yüksek güvenilirlikli laboratuvarlarda yapılması zorunludur. Bu kısıtlama KKKAH virüs enfeksiyonun teşhisinde kullanılacak diagnostik materyallerin hazırlanmasını güçleştirmektedir. Bu problemin üstesinden gelmek için son yıllarda rekombinant protein tabanlı teşhis sistemleri geliştirilmiştir. Bu çalışmanın amacı, KKKAH virüsü Turkey Kelkit06 suşu nükleoprotein (NP) *E. coli* sisteminde üretilmesi ve rekombinant proteinin biyolojik olarak aktif olup olmadığının saptanmasıdır. Bu amaçla, KKKAH virüsü S geni GenScript tarafından kodon optimize olarak sentez edilmiş ve pCOLDTF vektörü içerisine klonlanarak elde edilen pCOLDTF-NP plasmidi *E. Coli* BL21 C43(DE3) bakteriyel hücrelerinde üretilerek konfirme edilmiştir. Rekombinant NP, fare KKKAH ELISA geliştirilmesinde antijen olarak kullanılmış ayrıca rekombinant NP ile farelerin immünizasyonları sonucu hiperimmün serumlar elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, rekombinant NP'nin biyolojik olarak aktif olduğunu ve gelecekte KKKAH virüsü enfeksiyonun teşhisinde kullanılabilme potansiyeli olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Kırım-Kongo Kanamalı Ateş Hastalığı (KKKAH) virüsü, Nükleoprotein, Prokaryotik protein ekspresyon sistemi, Biyolojik aktivite.

**PROKARYOTIC EXPRESSION OF CRIMEAN-CONGO HEMORRHAGIC
FEVER(CCHF) VIRUS NUCLEOPROTEIN (NP) AND INVESTIGATION OF
ITS BIOLOGICAL ACTIVITY**

Hazel YETİŞKİN

**Erciyes University, Graduate School of Health Sciences
Department of Medical Microbiology
M.Sc. Thesis, July 2016**

Supervisor: Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ

ABSTRACT

Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) is caused by a trisegmented, negative-sense RNA virus of the genus of *Nairovirus*, of the family *Bunyaviridae*. This virus is found in various countries in Asia, Africa, Middle east and eastern Europe. The disease transmitted through tick bite or direct contact with viremic animals or humans. CCHFV has been isolated from at least 31 species of ticks. The disease is characterized by hemorrhagic and toxic syndrome, with case fatality rates ranging from 5 to 50%.

CCHF virus must be handled in a high-containment laboratory. This restriction makes it difficult to prepare diagnostic materials for CCHF virus infections. To overcome this problem, recombinant protein-based diagnostic systems have been recently developed. The aim of this study is to express of the nucleoprotein (NP) of CCHF virus Turkey Kelkit06 strain in *E. coli* system and investigation of the recombinant NP whether it is biologically active or not. For this purpose, the S gene of CCHF virus was optimized by GenScript to improve codon usage bias and synthesis, and the recombinant plasmid, pCOLDTF-NP, was constructed and expressed in *E. Coli* BL21 C43(DE3) which was purified and confirmed. The recombinant NP was used as a antigen to develop the CCCHF ELISA system for mice and hyperimmune serum was raised against the expressed protein in mice. These results indicated that the recombinant NP is biologically active and might be used the establishment of diagnostic systems for CCHFV infections in the future.

Key Words : Crimean-Congo Hemorrhagic Fever (CCHF) Virus, Nucleoprotein, Prokaryotic protein expression system, Biological activity.

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK.....	ii
KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
KISALTMALAR ve SİMGELER	x
TABLolar LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kırım-Kongo Kanamalı Ateş Hastalığının Tarihçesi ve Ülkemizdeki Durumu.....	3
2.2. Viral Taksonomi.....	4
2.3.Viral Yapı ve Özellikleri	7
2.4.Viral Çoğalma	9
2.5.Epidemiyoloji	11
2.6. Klinik Bulgular ve Patogenez	13
2.7.Teşhis Yöntemleri	14
2.8. Tedavi ve Korunma	16
3.GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1. KKKAH Virüsü Turkey Kelkit06 Suşu Nükleoprotein (NP) Kodon Optimizasyonu,, pUC57 Vektörüne Yerleştirilmesi ve pMALp5x Plasmidine Klonlanması	18

3.1.1. pUC57 ve pMALp5x Plasmidlerinin TOP10 Kompetan Hücrelerine Transforme Edilmesi	18
3.1.1.1 Materyal.....	18
3.1.1.2. Metot.....	19
3.1.2. pUC57-NP ve pMALp5x Plasmidlerinden DNA Elde Edilmesi .	19
3.1.2.1. Materyal.....	19
3.1.2.2. Metot.....	20
3.1.3. pUC57-NP Plasmidi Kullanılarak NP Geninin PCR ile Çoğaltılması.....	21
3.1.3.1 Materyal.....	21
3.1.3.2 Metot.....	21
3.1.4. NP Geni PCR Ürünün Pürifikasyonu	21
3.1.4.1. Materyal.....	21
3.1.4.2. Metot.....	22
3.1.5. NP Geni ve pMALp5x Plasmidinin Kesim Enzimleriyle Kesilmesi.	22
3.1.5.1. Materyal.....	22
3.1.5.2. Metot.....	22
3.1.6. pMALP5x Vektörüne NP Geninin Klonlaması.....	23
3.1.6.1. Materyal.....	23
3.1.6.2 Metot.....	23
3.1.7. Koloni PCR	23
3.1.7.1. Materyal.....	23
3.1.7.2. Metot.....	24
3.2. pMALp5x-NP Açıklama Vektörünün IPTG ile Tetiklenmesi	24
3.2.1. Materyal.....	24
3.2.2. Metot.....	25
3.3. pMALp5x-NP Rekombinant Proteinin SDS-PAGE ile Analizi	25

3.3.1. Materyal.....	25
3.3.2. Metot.....	26
3.4. pMALp5x-NP Vektörü Kullanılarak Rekombinat NP Proteinin Üretilmesi ve Saflaştırılması	27
3.4.1. Materyal;.....	27
3.4.2. Metod.....	27
3.5. pCOLDTF Vektörüne NP Geninin Klonlaması	28
3.5.1. pUC57-NP ve pCOLDTF Plasmidlerinin TOP10 Kompetan Hücrelerine Transforma Edilmesi	28
3.5.1.1. Materyal.....	28
3.5.1.2. Metot.....	29
3.5.2. pUC57-NP ve pCOLDTF plasmid DNA'ların Elde Edilmesi	30
3.5.2.1. Materyal.....	30
3.5.2.2. Metot.....	30
3.5.3. pUC57-NP ve pCOLDTF Plasmidinin Kesim Enzimleriyle Kesilmesi.	31
3.5.3.1. Materyal.....	31
3.5.3.2. Metot.....	31
3.5.4.. NP Geninin pCOLDTF Vektörüne Ligasyonu.....	31
3.5.4.1. Materyal.....	31
3.5.4.2. Metot.....	32
3.5.5. Koloni PCR ile Pozitif Klonların Belirlenmesi	32
3.5.5.1. Materyal.....	32
3.5.5.2. Metot.....	32
3.6. pCOLDTF-NP Açıklama Vektörünün IPTG ile Tetiklenmesi	33
3.6.1. Materyal.....	33
3.6.2. Metot.....	33
3.7. pCOLDTF-NP Rekombinant Proteinin SDS-PAGE ile Analizi.....	34

3.7.1. Materyal.....	34
3.7.2. Metot.....	35
3.8. pCOLDTF-NP Vektörü Kullanılarak Rekombinat NP Proteinin Üretilmesi ve Saflaştırılması	35
3.8.1. Materyal.....	35
3.8.2. Metot.....	36
3.9. Fare immünizasyonları	37
3.10. pCOLDTF-NP Rekombinant Proteinin, İnaktif KKKAH Virüsü Turkey Kelkit06 Suşuyla İmmünize Edilen Fare Serumların Anti-KKKAH IgG Belirlenmesi Amacıyla ELISA Testinde Kullanılması	37
3.10.1. Materyal.....	37
3.10.2. Metot.....	38
3.11. pCOLDTF-NP Rekombinant Proteinin, KKKAH Yönünden IgG Pozitif İnsan Serumlarında Anti-KKKAH IgG Belirlenmesi Amacıyla ELISA Testinde Kullanılması	39
3.11.1. Materyal.....	39
3.11.2. Metot.....	39
3.12. pCOLDTF-NP Rekombinant Proteinin, KKKAH Yönünden IgM Pozitif İnsan Serumlarında Anti-KKKAH IgM Belirlenmesi Amacıyla ELISA Testinde Kullanılması	40
3.12.1. Materyal.....	40
3.12.2. Metot.....	41
3.13. Immuno Blotlama (Western Blot).....	42
3.13.1. Materyal.....	42
3.13.2. Metot.....	43
4.BULGULAR.....	46
4.1. KKKAH Virüsü Kelkit06 Suşu NP Kodon Optimizasyonu ve Puc57 Vektörü.....	46
4.2. Puc57-NP ve pMALp5x Plasmid DNA eldesi	47

4.3.Kodon Optimize NP geninin pMALp5x Vektörüne Klonlanması Amacıyla PCR ile Çoğaltılması.....	49
4.4.Kodon Optimize NP PCR Ürünün Jel Pürifikasyonu	49
4.5.Kodon Optimize NP PCR Ürünün ve pMALp5x Plasmidinin Kesim Enzimleriyle Kesilmesi ve Ligasyonu.....	50
4.6. pMALp5x-NP Plasmidinin Prokaryotik Sistemde Üretilmesi	51
4.7. pMALp5x-NP Vektörü Kullanılarak Rekombinat NP Proteinin Üretilmesi ve Saflaştırılması İşlemleri	53
4.8.pCOLDTF vektörü ve plasmid DNA Eldesi	53
4.9. pUC57-NP plasmidinden DNA elde edilmesi	54
4.10.pUC57-NP ve pCOLDTF Plasmidinin Kesim Enzimleriyle Kesilmesi ve Ligasyon İşlemi	55
4.11.pCOLDTF-NP Plasmidinin Prokaryotik Sistemde Üretilmesi	57
4.12. pCOLDTF-NP Vektörü Kullanılarak Rekombinat NP Proteinin Üretilmesi ve Saflaştırılmasının SDS-PAGE ile Analizi	58
4.13.İnsert İçermeyen Boş pCOLDTF Vektörü Kullanılarak Trigger Faktörünün SDS-PAGE ile Görüntülenmesi	59
4.14.Saflaştırılan Rekombinat NP Proteinin Miktarının Belirlenmesi.....	60
4.15.Saflaştırılan boş pCOLDTF Proteinin Miktarının Belirlenmesi	61
4.16.pCOLDTF-NP Rekombinant antijeni Kullanarak ELISA Geliştirilmesi ...	62
4.17.pCOLDTF-NP Rekombinant Antijenin KKKAH virüsü IgG Pozitif Farklı Fare Serum Sulandırılmalarındaki Etkinliğinin Saptanması	64
4.18.Rekombinant pCOLDTF-NP Antijeni ile Farelerin İmmünizasyonu ve ELISA ile Test Edilmesi	65
4.19.pCOLDTF-NP Rekombinant Proteinin, KKKAH Yönünden IgG Pozitif İnsan Serumlarında Anti-KKKAH IgG Belirlenmesi Amacıyla ELISA Testinde Kullanılması	67
5.TARTIŞMA ve SONUÇ	68
6.KAYNAKLAR	77
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR ve SİMGELER

Kısaltmalar	Açıklamalar
BHK-21	Yavru hamster böbrek hücresi
BALB/c	Bagg Albino, Inbred araştırma fare suşu
BSA	Sığır serum albumin
cRNA	Kopya ribonükleik asit
dH₂O	Distile su
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
DIC	Disemine intravasküler koagülasyon
EDTA	Etilen-diamin-tetra asetik asit
ELISA	Enzim ilintili immünosorbent deneyi
FDA	Gıda ve İlaç Dairesi
g	Gram
Gc	Karboksi terminal uç glikoprotein
Gn	Amino terminal uç protein
GP	Glikoprotein
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside
IFA	İmmünfloresan test
IgG	İmmünoglobulin G
IgM	İmmünoglobulin M
IL	İnterlökin
kDa	Kilodalton
KKKA	Kırım-Kongo kanamalı ateşi
KKKAH	Kırım-Kongo kanamalı ateşi hastalığı
KKKAHV	Kırım-Kongo kanamalı ateşi hastalığı virüsü
LLC-MK2	Macaca mulatta maymun böbrek epitel hücresi
L	Large segmenti
M	Medium segmenti
mAb	Monoklonal Antikor
mg	Miligram
ml	Mililitre
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit

mM	Milimolar
nm	Nanometre
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
NP	Nükleoprotein
NSm	Yapısal olmayan M protein
NSs	Yapısal olmayan S protein
OD	Optik dansite
°C	Santigrat derece
OTU	Ovaryan tümör proteini
PBS	Fosfat tamponlu tuz solüsyonu
PEG	Polietilen glikol
PreGc	Gc prekürsörü
PreGn	Gn prekürsörü
pH	Hidrojen iyon konsantrasyonu
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RdRP	Ribonükleik asit bağımlı ribonükleik asit polimeraz enzimi
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Dakikadaki devir sayısı
RT-PCR	Tersine transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu
S	Small segmenti
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SKI-1	Subtilisin/keksin-izozim-1 proteini
SW-13	İnsan böbreküstü bezi karsinoma hücresi
TBST	Tris tampon solüsyonu
TEMED	Tetra metil etilen diamin
TMB	Tetra metil etilen diamin
TNF-α	Tümör nekrozis faktör alfa
U	ünite
VeroE6	Yeşil maymun böbrek hücresi

TABLolar LİSTESİ

- Tablo 1 : Fare IgG ELISA geliştirilmesinde pCOLDTF-NP rekombinant antijeni, ve inaktif KKKAH virüsü antijeni kullanılarak yapılan ELISA ve OD değerleri. 64
- Tablo 2 : pCOLDTF-NP rekombinant antijeni ve inaktif kısmi pürifiye KKKAH virüs antijenleri kullanılarak yapılan IgG pozitif olduğu bilinen farklı fare serum sulandırılmalarındaki ELISA OD değerleri. 65
- Tablo 3 : Rekombinant pCOLDTF-NP antijeni ile farelerin immünizasyonunun ELISA OD değerleri..... 66

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. KKKAH virüsü S gen bölgesine ait 212 bazlık kısmı parçanın filogenetik analizi	6
Şekil 2. KKKAH virüsü Kelkit06 suşu tam büyüklükteki S geninin filogenetik analizi ..	7
Şekil 3. KKKAH virüsünün şematik görünümü ve gen segmentleri	8
Şekil 4. KKKAH Virüsünün Çoğalma Stratejisinin Şematik Görünümü	11
Şekil 5. KKKAH virüsünün doğadaki döngüsü	13
Şekil 7: Kodon optimize NP geninin yerleştirildiği pUC57 vektörünün haritası.	47
Şekil 8: pMALp5x vektör haritası.	48
Şekil 9: pUC57-NP ve pMALp5x purifiye plasmid DNA'larının agaroz jel görüntüsü.	48
Şekil 10 :1500 bp büyüklüğündeki PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	49
Şekil 11: Kodon optimize NP geninin PCR ürünün agaroz jel görüntüsü.....	49
Şekil 12 : pMALp5x vektörünün EcorI ve NdeI kesim enzimleriyle kesimi sonucunun agaroz jel görüntüsü	50
Şekil 13: Kodon optimize NP PCR ürünün EcorI kesimi (Şekil 13A) ve NdeI kesiminin agaroz jel görüntüsü.	50
Şekil 14 : Rekombinant pMALp5x-NP plasmid DNA agaroz jel görüntüsü.....	51
Şekil 15 : Rekombinant NP proteinin IPTG ile tetiklenmesinin SDS-PAGE analizi.	52
Şekil 16 : pCOLDTF vektörü haritası.	54
Şekil 17: QIAGEN plasmid DNA purifikasyon kiti ile elde edilmiş pCOLDTF plasmid DNA'sının agaroz jel görüntüsü.	54
Şekil 18 : pUC57-NP plasmidinin DNA eldesinin agaroz jel görüntüsü.....	55
Şekil 19: Koloni PCR ile 1500 bp büyüklüğündeki spesifik kolonilerin belirlenmesi. ...	56
Şekil 20 : Rekombinant pCOLD-NP plasmid DNA agaroz jel görüntüsü.....	56
Şekil 21 : Rekombinant pCOLDTF-NP proteinin IPTG ile tetiklenmesinin SDS-PAGE analizi.	57
Şekil 22 : Rekombinant pCOLDTF-NP proteinin saflaştırılmasının basamakları.....	59

Şekil 23 : Boş pCOLDTF proteinin saflaştırılmasının basamakları.	60
Şekil 24 : Saflaştırılan rekombinant NP proteinin miktarının belirlenmesi.	61
Şekil 25 : Saflaştırılan trigger faktör protein miktarının belirlenmesi.	62
Şekil 26 : Fare IgG ELISA geliştirilmesinde pCOLDTF-NP rekombinant antijeni, ve inaktif KKKAH virüsü antijeni kullanılarak yapılan ELISA sonuçlarının görünümü.	63

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Tez çalışmasının amacı, Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı (KKKAH) virüsü nükleoprotein (NP) prokaryotik sistemde açıklanması ve rekombinant NP'nin KKKAH IgG ELISA tabanlı test sistemi kullanılarak biyolojik aktivitesinin belirlenmesidir.

KKKAH yönünden ülkemiz dünyadaki en büyük salgınları yaşamakta ve hastalık giderek artan bir coğrafyaya yayılma eğilimi göstermektedir. Hastalığın zoonotik bir karakterde olması, vahşi yaşamdan, tarım ve hayvancılığın yapıldığı kırsal bölgelere ve hatta gelişen taşımacılık sayesinde büyük şehirlere kadar geniş bir alanda aktivite göstermektedir. Virüs, insanlara enfekte kenelerin ısırması, viremik hayvanlarla veya insanlarla olan direkt temaslarla bulaşmaktadır. KKKAH virüsünün en önemli vektörü *Hyalomma* cinsi keneler olmasına rağmen en az 31 kene türünde virüs tespit edilmiştir. Hastalık Asya, Orta Doğu, Afrika ve güneydoğu Avrupa gibi geniş bir coğrafyaya yayılmıştır (1). Türkiye'de KKKAH'nın insanlar arasındaki serolojik bulguları 1970'lerden beri rapor edilse de ilk klinik KKKAH enfeksiyonu 2002 yılında tanımlanmıştır. Bugüne kadar en büyük salgınları yaşayan Türkiye'de 9,000'den fazla KKKAH vakası bildirilmiş olup halk sağlığı açısından ciddi sağlık tehdidi oluşturmaktadır (2).

KKKAH virüsünün oldukça patojenik bir karakterde olması ve oluşan hastalıkta mortalite oranının yüksek olması KKKAH virüsünün potansiyel bir biyolojik silah adayı olabileceğini gündeme getirmiştir. Bu nedenle CDC (Centers for Disease Control and Prevention) tarafından kategori C virüsü sınıflandırması yapılmıştır (1,3). Bu nedenle KKKAH virüsü gibi yüksek güvenli laboratuvarlarda çalışılması gereken viral ajanların gerek teşhis metodlarının geliştirilmesinde gerekse de yapısal viral

proteinlerinin moleküler düzeyde çalışılması için rekombinant tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır.

Viral hastalıklarda rekombinant yollarla teşhis kit geliştirilmesinde kural olarak virüsün en çok korunmuş bölgesi seçilir. KKKAH virüsünün en korunmuş bölgesi S genidir ve nükleoproteini şifrelemektedir. KKKAH virüsü NP'ni viral RNA'larla etkileşime girerek ribonükleoprotein kompleksini meydana getirmektedir. Bu kompleks viral genomik RNA'nın transkripsiyonu ve replikasyonunda görev almaktadır. KKKAH virüsü NP'nin konak hücre kaspaz-3 tarafından kesilmesi, viral RNA sentezinin kontrol edilmesi ve KKKAH enfeksiyonuna karşı konakçı savunma mekanizmasının gelişmesi açısından önemli olduğu bildirilmiştir (4).

Bu tez ile virüsün internal bir proteini olan ve viral yaşam döngüsünde en çok açıklanan NP'nin prokaryotik sistem olarak açıklanması ve elde edilen rekombinant NP'nin biyolojik aktivitesinin test edilmesi amaçlanmıştır. Prokaryotik sistemde üretilen KKKAH virüsü rekombinant NP'nin doğal yapısını koruması ve biyolojik olarak aktif olması durumunda gelecekte gerek hastalığın teşhisinde kullanılacak viral antijen üretimi ile yüksek güvenilirlikte laboratuvarlara ihtiyaç kalmayacak gerekse de virüsün NP proteininin özelliklerinin aydınlatılması açısından önemli bir mesafe alınacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kırım-Kongo Kanamalı Ateş Hastalığının Tarihçesi ve Ülkemizdeki Durumu

Hastalık ilk olarak 12. yüzyılda Tacikistan'da tanımlanmıştır. Hastalarda kanlı idrar, kusma ve balgam ile rektum, barsaklar, diş etleri ve abdominal boşlukta kanamalar bildirilmiştir (1-3). Hastalığa başlangıçta bit veya karatavuk kuşlarında sıklıkla bulunan *Hyalomma* türü kene larvalarının neden olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca Özbekistan yerel halkı tarafından *khungribta* (kanama), *khunymuny* (burun kanaması) ve *karakhalak* (kara ölüm) olarak adlandırılmıştır. Orta Asya'da akut enfeksiyöz kapillarotoksikozis, akut enfeksiyöz kanamalı hastalık ve Özbekistan hemorajik ateşi KKKAH'na benzer seyrettiği için uzun bir süre aynı isimlerle anılmıştır (3). Modern tıbbin gelişmesiyle birlikte, ikinci dünya savaşı sırasında Kırım bölgesindeki köylülere yardım eden 200 kadar Sovyet askerinin enfekte olmasıyla hastalık klinik olarak tanımlanmıştır. Bundan kısa bir süre sonra tedavi gören psikiyatri hastalarına Kırım hemorajik ateşi (KHA) hastalarından akut fazda alınan kan örneklerinin filtratları inoküle edilmiş ve ateşli sendromların gözlenmesiyle hastalığın viral kaynaklı olduğu gösterilmiştir (1-3,5). Sovyetler Birliği'nde yapılan çalışmalarda hastalığı taşıyan vektör olduğundan şüphe edilen *Hyalomma marginatum* kene türlerinin nimfal dönemdeki süspansiyonlarının filtratları hazırlanıp ve sağlıklı gönüllü insanlara inoküle edilmiştir. Hastalığa ait karakteristik semptomlar inokülasyondan iki gün sonra deneysel olarak gösterilip, viral etiyoloji ve taşıyıcı kene türü ortaya konulmuştur. Daha sonra, Drosdov adlı hastadan alınan akut kan örneklerinin Chumakov ve ark. tarafından yeni doğan beyaz farelere intraserebral olarak inoküle edilmesiyle 1967 yılında Sovyetler Birliği'nde ilk etken ilk kez izole edilmiş ve Drosdov suşu olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra, hastalık vakaların çıktığı yer ve virüs izolasyonun yapıldığı yerin coğrafi konumundan uygun olarak Kırım kanamalı ateşi (KKA) olarak adlandırılmıştır (1-3, 6-8). Bir kaç yıl sonra Belçika Kongo'sunda ateşli bir çocuktan izole edilen virüs ile antijenik, fizikokimyasal ve morfolojik olarak benzer olduğu ortaya konulmuştur. Takip

eden epidemilerde de izole edilen virüs suşları geliştirilen serolojik ve antijenik testler ile doğrulanarak iki coğrafik yerin ismine uygun olarak Kırım-Kongo kanamalı ateş hastalığı (KKKAH) ismi verilmiştir (9-11).

KKKAH Afrika (Demokratik Kongo Cumhuriyeti, Uganda, Moritanya, Güney Afrika, Tanzanya, Nijerya, Senegal vb.), güneydoğu Avrupa (Rusya, Bulgaristan, Kosova, Yunanistan vb.), Orta Doğu (Birleşik Arap Emirliği, Irak, İran, Afganistan, Suudi Arabistan, Umman vb.) ve Asya (Çin, Kazakistan, Tacikistan, Özbekistan, Pakistan, Hindistan vb.) kıtalarında 30'dan fazla ülkede rapor edilmiştir (2,3). Ülkemizdeki KKKAH ile ilgili ilk serolojik veriler 1970'li yıllarda Ege bölgesinde yapılan serolojik bir çalışmada elde edilmiştir. Bununla beraber 2002-2003 yıllarında kanamalı ateş belirtileri gösteren hastalar özellikle Tokat ve Sivas illerindeki hastanelere başvurmuşlar, aynı zamanda Ankara'daki hastanelere de benzer şekilde hasta başvuruları olmuştur. Sağlık Bakanlığı Temmuz 2003'de epidemiyolojik bir inceleme başlatmış ve bu rapora göre benzer hastaların birçoğunun geçmişinde hayvan çiftliklerinde çalışmış olmaları, rahatsızlıkların kene ısırması ile başladığı, klinik olarak tipik viral kanamalı ateş tablosu görüldüğü belirlenmiştir. Hasta kan serumları Fransa, Lyon kentindeki Pastör Enstitüsü'ne daha detaylı çalışılmak amacıyla gönderilmiştir. Ağustos 2003 tarihinde Pastör Enstitüsü, serolojik ve moleküler incelemeler sonucunda etkenin KKKAH virüsü olduğunu bildirmiştir. Böylece, Türkiye'de bildirilen ilk KKKAH vakaları olarak kesinleşmiştir. Daha sonraki yıllarda KKKAH vakaları her geçen yıl artmış ve Türkiye'nin farklı coğrafik alanlarına yayılmıştır. Ülkemizde 2015 yılı itibari ile 9.000'in üzerinde konfirme vaka bildirilmiş olup mortalite oranı yaklaşık %4,5'tir (2,12-14).

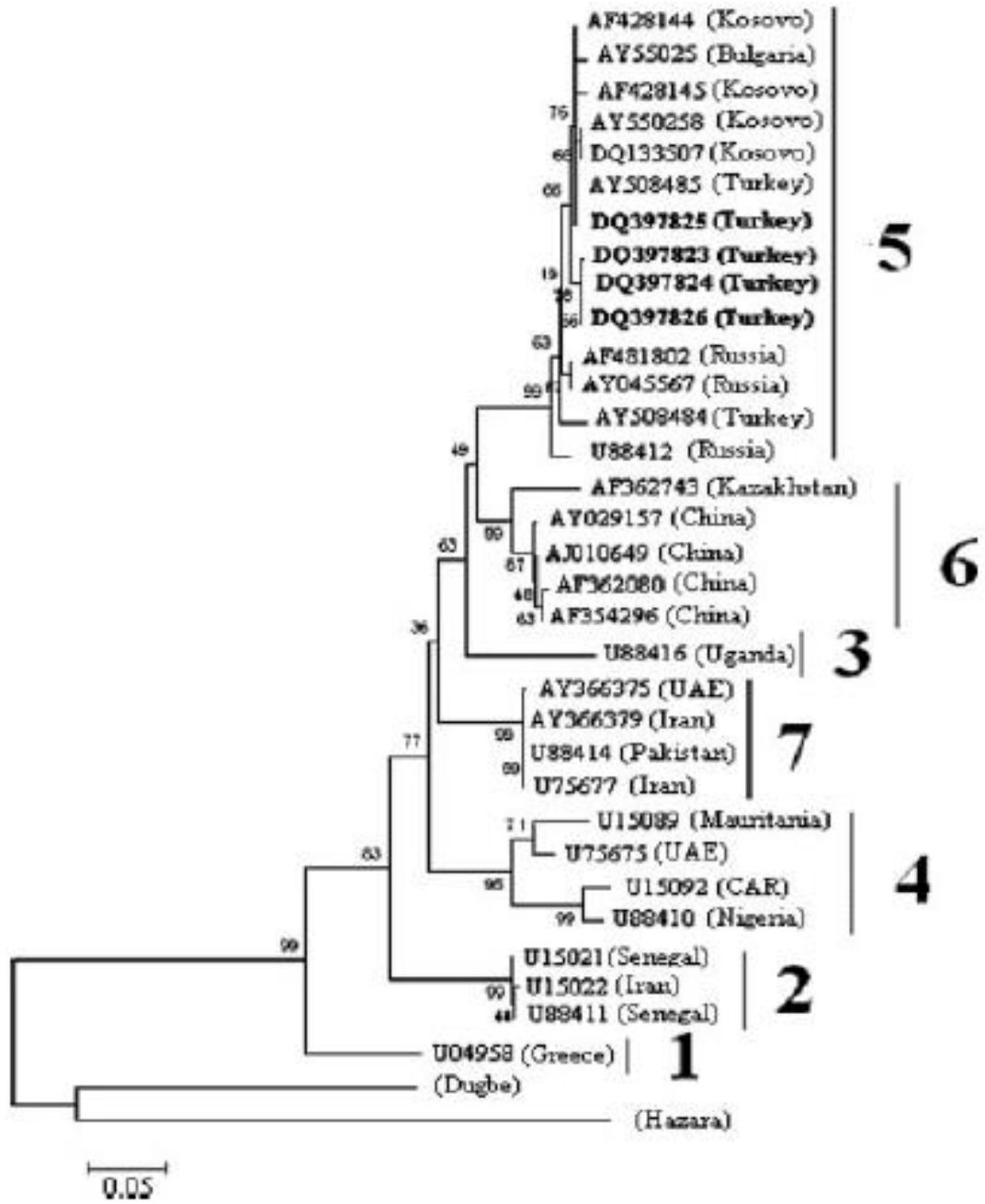
2.2. Viral Taksonomi

KKKAH virüsü *Bunyaviridae* ailesinin *Nairovirus* genusunda yer almaktadır. *Bunyaviridae* ailesinde *Nairovirus* genusu dışında *Orthobunyavirus*, *Hantavirus*, *Phlebovirus* ve *Tospovirus* genusları bulunmaktadır. Uluslararası Viral Taksonomi Komitesi'ne (ICTV) göre *Orthobunyavirus* genusunda 48, *Hantavirus* genusunda 24, *Phlebovirus* genusunda 9, *Tospovirus* genusunda 8 ve *Nairovirus* genusunda ise 7 tür bulunmaktadır. *Hantavirus* genusunda yer alan virüsler rodentlerle taşınırken diğer genuslarda yer alan virüsler artropotlarla taşınır (15, 16). *Nairovirus* genusunda bulunan

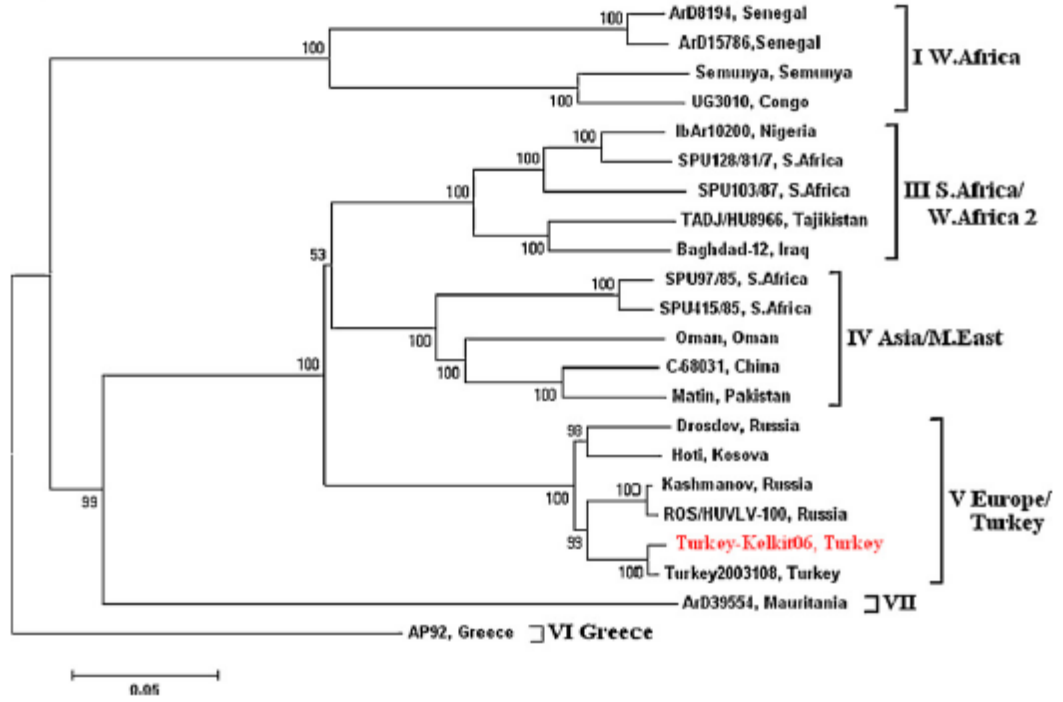
virüsler ixodid ve argasid keneler tarafından taşınmaktadır. *Nairovirus* genusunda yer alan en önemli serogrup KKKAH virus ve Hazara virüsün yer aldığı KKKA serogrubu ile Nairobi koyun hastalığı (NSD) virüsü ve Dugbe virüsün yer aldığı Nairobi koyun hastalığı virüs serogruplarıdır. Sadece KKKAH virüsü, Nairobi Koyun Hastalığı virüsü ve Dugbe virüsü insanlar için patojen etkilendirler (1,3).

Önceki yıllarda serolojik testlere (Agar Jel Difüzyon, Komplement Fiksasyon, Nötralizasyon vb.) bağlı olarak yapılan çalışmalarda KKKAH virüs suşları arasında önemli farklılıklar ortaya konulamadı (10, 17). Bununla beraber, DNA dizilimine dayanan nükleik asit sekans analizleri KKKAH virüsünün oldukça değişkenlik gösterdiğini ortaya koydu. Bu konuyla ilgili ilk rapor Çin'deki bir koyun izolatının S geninin DNA diziliminin yapılmasıyla yayınlandı (18). Daha sonraki yıllarda dünyanın birçok bölgesindeki farklı izolatların viral nükleoproteini kodlayan S geni temelli DNA dizi analizleri KKKAH virüs izolatlarının 7 farklı gruba ayrıldığını ortaya koyan çalışmalar yapıldı(19-22).

Ülkemizde ilk kez Kartı ve ark. KKKAH vakalarından elde edilen serum örneklerinden Turkey Gumushane200310845 ve Turkey Gumushane200310849 olarak isimlendirdikleri izolatların virüs S gen bölgesine ait kısmi bir parçasını sekanslamışlardır. Yapılan filogenetik analizler Türkiye'de iki farklı KKKAH virüs izolatın sirküle olduğu ve bunların sırasıyla Kosova ve Güneybatı Rusya izolatlarına genetik olarak çok benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.(14). Tonbak ve ark.'nın 2006 yılında ülkemizde KKKAH yönünden endemik bir bölge olan Kelkit vadisinde evcil hayvanlardan toplanan kenelerden virüs izolasyonu yapmışlardır. KKKAH virüsü S genine ait kısmi bir parçanın filogenetik haritası çıkarılmış ve ülkemizde sirküle olan KKKAH virüsünün Grup V içerisinde yer alan Kosova, Bulgaristan ve Rusya suşlarına genetik olarak yakın olduğunu göstermişlerdir (Şekil 1) (23). Özdarendeli ve ark. 2010 yılında yaptıkları başka bir çalışmada bir hastadan KKKAH virüsünün izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. Turkey-Kelkit06 adı verilen KKKAH virüs izolatının, tüm genomunu sekanslayarak filogenetik analizini yapmışlardır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre Turkey-Kelkit06 virüs izolatı Grup V içerisinde yer alan diğer izolatlar ile hem nükleotid hem de aminoasit dizilimi yönünden yüksek oranda benzerlik göstermiştir (Şekil 2) (24).



Şekil 1. KKKAH virüsü S gen bölgesine ait 212 bazlık kısmının filogenetik analizi (23).

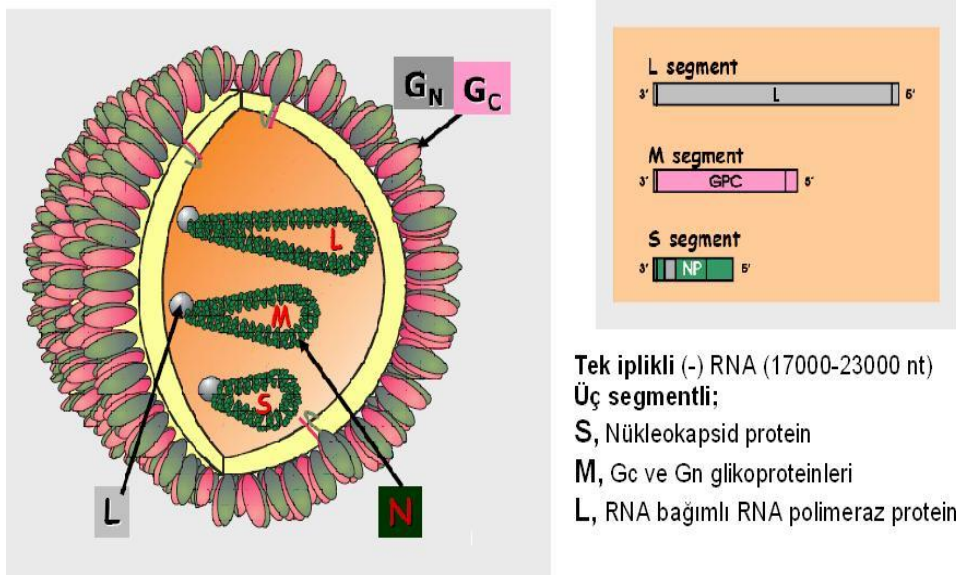


Şekil 2. KKKAH virüsü Kelkit06 suşu tam büyüklükteki S geninin filogenetik analizi (24).

2.3.Viral Yapı ve Özellikleri

KKKAH virüsünün yapısal özellikleriyle ilgili çalışmalar oldukça azdır. Bununla beraber, Murphy ve arkadaşları 1973 yılında yaptıkları çalışmalarda KKKAH virüsü ile infekte edilen yeni doğmuş fare yavrularının beyinlerindeki virüs morfolojisinin *Bunyaviridae* ailesindeki diğer üyelere benzerliğini ortaya koymuşlardır (25). Daha sonraki yapılan çalışmalarla birlikte KKKAH virüsünün fizikokimyasal özellikleri, replikasyon siklüsü, morfogenezisi ve temel yapısı itibarı ile *Nairovirus* genusundaki virüslerle çok benzer olduğu ortaya konulmuştur (26-29).

Bunyavirüsler zarlı, tek iplikli, 3 segmentli ve negatif polariteli bir RNA virüs ailesidir. Virion partikülleri viral RNA polimeraz (L segment), yüzey glikoproteinleri olan Gn ve Gc (M segment) ve nükleokapsit proteininden (S segment) oluşmaktadır (Şekil 3) (30).



Şekil 3. KKKAH virüsünün şematik görünümü ve gen segmentleri (30).

Virionlar küresel yapıda ve yaklaşık 100 nm büyüklüğündedir. 5-7 nm kalınlığında konakçı hücrelerinden köken alan lipit bilayer yapısındaki zar bölümü viral glikoproteinlerin çıkıntılarını ihtiva etmektedir (18, 28, 29). Virüsün genom büyüklüğü 17 kilobaz ile 23 kilobaz arasında değişmektedir. Üç segmentli genom dört yapısal proteini sentezler.

S geni 1673 nükleotidden meydana gelmekte ve 482 aminoasitlik ve 55 kDA büyüklüğündeki nükleokapsit proteinini kodlamaktadır. Enfekte hücrelerde, nükleokapsit proteininin perinükleolar bölgede lokalize olduğu bildirilmiştir. Nükleokapsit proteininin oluşum aşamasında golgi ve endoplazmik retikulum üzerinden gelişmediği bununla birlikte hücresel aktin ile etkileştiği yapılan deneyler ile gösterilmiştir (1, 30, 31). NP, viral RNA ile etkileşime girerek ribonükleoprotein kompleksini meydana getirmektedir. Bu kompleks viral genomik RNA'nın transkripsiyonu ve replikasyonunda görev almaktadır (32). KKKAH virüsü NP'nin konak hücre kaspaz-3 tarafından kesilmesi, viral RNA sentezinin kontrol edilmesi ve KKKAH enfeksiyonuna karşı konakçı savunma mekanizmasının gelişmesi açısından önemli olduğu bildirilmiştir (33).

Nairovirus M segmenti 3.5 ile 6 kb büyüklüğündedir ve diğer genlerden 30-50% daha büyüktür (1). KKKAH virüsü M gen segmenti (önceleri G₁ ve G₂ olarak bilinen) Gn ve

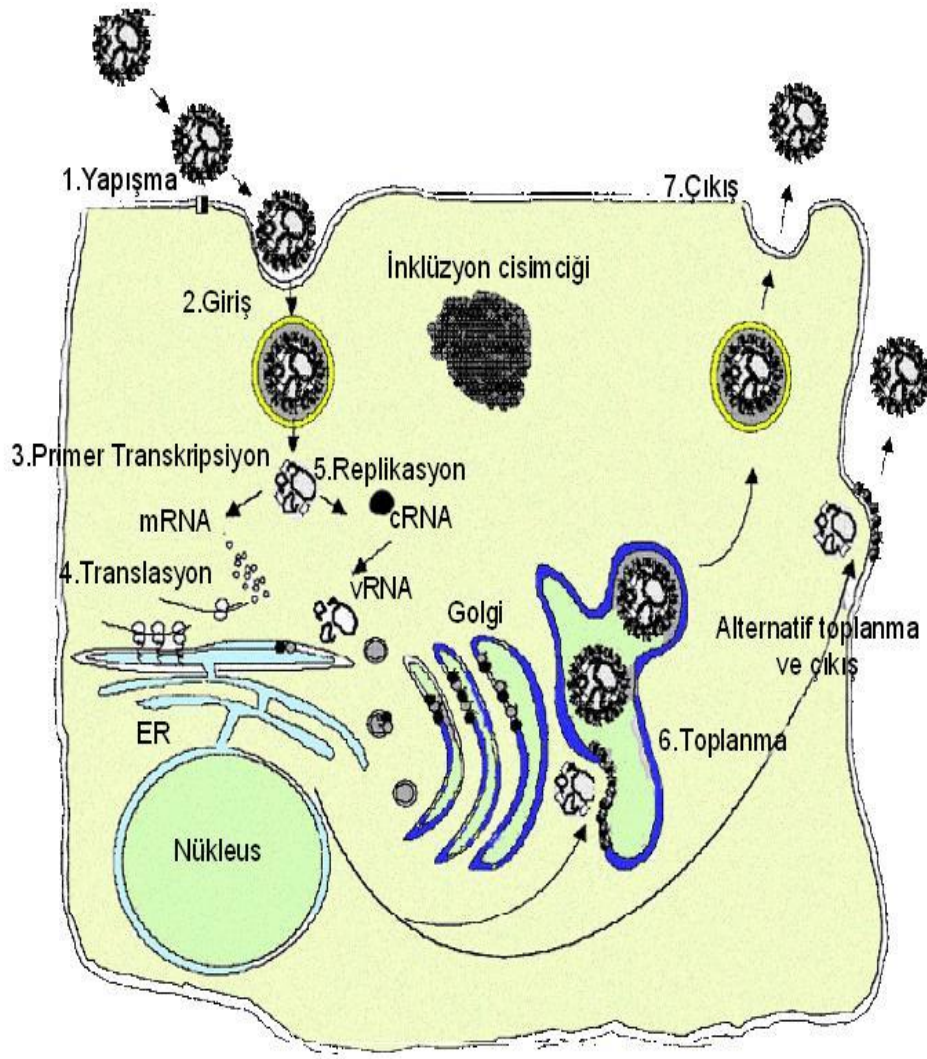
Gc diye isimlendirilen iki yüzey glikoproteinini sentezlemektedir. M geni öncelikle SK-1 benzeri proteazlar ile proteolitik bir kesim aşamasına giren 684 aminoasit uzunluğunda bir poliprotein sentezlemektedir. Öncelikle preGn (140 kDa) ve preGc (85kDa) iki farklı prekürsör protein oluşturur. Bu prekürsör proteinler proteolitik işlemler neticesinde Gn (37 kDa) ve Gc (75 kDa) olarak adlandırılan iki yapısal protein ve musin, GP160, GP85, GP38 ve NSm gibi yapısal olmayan proteinler sentez edilmektedir. Bu işlemler golgi ve endoplazmik retikulumda gerçekleşmektedir (34-38). Kesim işlemi sırasında görev alan SKI-1 benzeri proteazlar Lassavirus ve lenfatik koriomenengitis virüsünde de rol oynamaktadırlar. M geni üzerinde aşırı değişken N-terminal bölgesi ile korunmuş olup kodlama yapmayan bölgelerin varlığı rapor edilmiştir. Musin benzeri bölge özellikle Ebola virüsündeki glikoprotein (GP) yapısı ile homolog bir yapı içermektedir (36, 37).

Bunyaviridae ailesi içerisindeki L segmenti 6.3 ile 12 kb arasında değişen büyüklüklere sahiptir. DNA dizi analizlerine göre *Nairovirus* genusunda yer alan virüslerdeki L segmenti diğer genuslardaki L segmentlerinden yaklaşık iki kat daha büyüktür. L segmenti tarafından yalnızca 450 kDa büyüklüğünde RNA bağımlı RNA polimeraz (RdRp) enzimi sentez edilmektedir. Viral RNA (vRNA) ve kopya RNA (cRNA)'ların replikasyon/transkripsiyonlarını sağlamaktadır. *Nairovirus* L gen segmentinin analizlerinde, amino (N) terminal ucunda genus içinde korunmuş ovarian tümör (OTU) benzeri proteaz bölgesi tespit edilmiştir (1, 24, 39-41).

2.4.Viral Çoğalma

KKKAH virüsün hücre yüzeyine tutunmasında virüsün yapısal glikoproteinleri olan Gn ve Gc'nin rol oynadığı bilinmektedir. Virüsün hücreye girişinde hangi hücrel reseptörlerin rol oynadığı tam olarak bilinmemekle beraber Dimitrov ve ark.yaptıkları bir çalışmada virüse duyarlı hücrelerin yüzeyinde nükleolin reseptörleri bulunduğunu saptamışlar ve bu reseptörlerin virüsün hücreye girişinde rol oynayabileceğini belirtmişlerdir (42). KKKAH virüsünün hücre içerisine alınması ise klatriin aracılı endositoz ile gerçekleşmekte ve asidik pH'da glikoproteinlerin konformasyonel değişiklikler ile birlikte internalizasyona uğradığı bildirilmiştir (43-45). Endozomal ve viral membranların füzyonu sonucunda nükleokapsitler sitoplazma içerisinde serbest kalırlar ve genom replikasyonu sitoplazmada gerçekleşir. L proteinin endonükleaz

aktivitesi sayesinde konakçı hücre sitoplazmasında bulunan mRNA'lara ait oligonükleotid parçaları kullanılarak viral mRNA sentezi başlatılır. Bu mekanizmaya “şapka çalma” adı verilir (46). Viral RNA, mRNA sentezi, viral protein translasyonunun sağlanması ve yeni viral RNA'ların üretilmesinde kullanılacak komplementer RNA (cRNA)'ların oluşmasında kalıp olarak kullanılırlar. Primer transkripsiyon ve translasyon sonucu virüsün replikasyonu ve transkripsiyonu için gerekli olan erken proteinler sentezlenir. Virüsün genlerinin replikasyonu ve virionu oluşturacak viral proteinlerin sentezlenmesini takiben hücrenin plazma membranında yada golgi aygıtında bu viral unsurların bir araya geldiği viral toplanma aşaması gerçekleştirilir (1, 43, 45, 47). Virüs hücreyi plazma membranından tomurcuklanarak yada alternatif olarak golgi aygıtından ekzositoz yoluyla terk ederek viral replikasyonunu tamamlar (Şekil 4) (29).



Şekil 4. KKKAH Virüsünün Çoğalma Stratejisinin Şematik Görünümü (29).

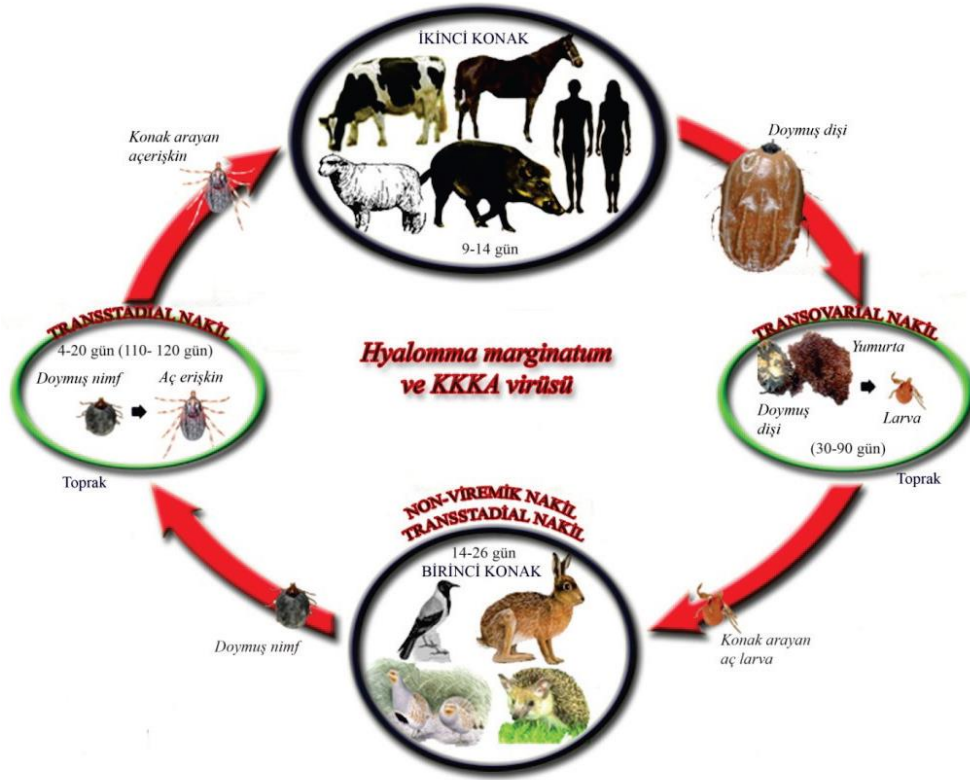
2.5.Epidemiyoloji

KKKAH sporadik olarak görülmekte ve doğada kene→omurgalı→kene siklusunu takip etmektedir. Enfeksiyon omurgalılarda geçici bir viremi şeklinde gizli olarak seyretmekte ve sadece insanlarda klinik tablo oluşturmaktadır (48). Keneler virüsün rezervuarı olarak rol oynamaktadır. *Ixodidae* ve *Argasidae* ailesine bağlı 30'dan fazla kene türünden virüs izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Özellikle *Hyalomma* türü kenelerin hastalığın bulaşında önemli rol oynadığı bilinmektedir (1-3, 8, 48, 49). Bugüne kadar KKKAH virüsü için bazı kene türlerinin vektörlük potansiyeli kanıtlanabilmiştir (1, 2, 8). Bunlardan *Hyalomma marginatum marginatum*, *Hyalomma anatolicum anatolicum* ve *Dermacentor marginatus* ülkemizde de yaygın olarak bulunan kene türlerindendir (2,

3). Vektör kenelerin dişi erişkin formları, enfekte bir konaktan viremik dönemde kan emdiği sırada etkeni alır ve yumurtalarına transovariyal olarak nakleder. Böylece yeni nesiller, etkenle enfekte olarak gelişmeye başlar. Kenelerin gerçek anlamda vektör olabilmesi için bir gelişme döneminde kan emdiği viremik bir konaktan virüsü alabilmesi (larva→nimf), sonraki gelişme döneminde gömlek değiştirme sırasında etkeni taşıması (nimf→erişkin), duyarlı başka konaklardan kan emerken etkeni transtadiyal olarak aktarabilmesi ve etkeni yumurtalarına (erişkin→yumurta) transovariyal olarak nakledebilmesi gerekmektedir (Şekil 5). KKKAH keneler ile nakledilen viral hastalıklar içinde en geniş yayılım alanına sahiptir. Vektör keneler, hastalığı nakletmeleri yanında, virüsün doğadaki esas rezervuarı olmaları bakımından da önemlidirler (50-54).

Hastalığın keneler vasıtası ile insanlara bulaşmasında temel yol, enfekte kenenin konaktan kan emmesi esnasında tükürük salgısı ile birlikte virüsü konağa nakletmesi ile olmaktadır. Bulaşma, enfekte kenelerin çıplak elle toplanması esnasında patlaması veya ezilmesi durumunda da olabilmektedir. Bunun dışında virüs ile enfekte kenelerin el ile ezilmesi, viremik hayvanların kesimi esnasında vücut sıvıları ve dokuları ile temas, hasta insanların vücut sıvıları ile temas sonucu da bulaşma olabilmektedir. Ayrıca nozokomiyal hastane enfeksiyonlarına da rastlanmaktadır (1, 2, 5, 7, 55).

Endemik bölgelerde tarım ve hayvancılıkla uğraşan insanlar kenelerin tesadüfî konakları konumundadır. Bu grupta yer alanların büyük çoğunluğunu tarım çalışanları, hayvan sahipleri ve çobanlar, kesimhane çalışanları ile veteriner hekimler oluşturmaktadır. Bu gruptaki çalışanlar aynı zamanda risk altındaki gruplar sınıfında değerlendirilmektedir. Bunlara ilaveten endemik bölgelerde kamp, piknik, yürüyüş ve avcılık yapan kişiler de risk altında bulunmaktadır. Türkiye'deki endemik vakaların %90 gibi büyük bir bölümünü çiftçiler oluşturmaktadır (2, 3, 5, 55).



Şekil 5. KKKAH virüsünün doğadaki döngüsü (1).

2.6. Klinik Bulgular ve Patogenez

Hastalığın inkübasyon periyodu, virüs ile olan temas şekline ve virüs yüküne göre değişmektedir. Enfekte kene tarafından ısırılma vakalarında inkübasyon periyodu 1-3 gün olarak belirlenmiştir ancak 9 güne kadar uzayabildiği de bildirilmiştir. Hastalık inkübasyon, prehemorajik, hemorajik ve konvelsan olmak üzere dört klinik faza ayrılmıştır (1-3, 5, 6). Klinik belirtiler başlangıçta hastalığa özgül olmayıp grip benzeri semptomlarla seyretmektedir. Prehemorajik evre, ani ateş yükselmesi, miyalji, baş dönmesi, halsizlik, baş ağrısı, göğüs ağrısı ve abdominal hassasiyet ile karakterizedir. Bu dönem ortalama 1-7 gün devam eder. Hemorajik faz, genellikle hastalığın 4-5. günlerinde hızla gelişmektedir. Hemorajik semptomlar peteşi ile yaygın hematomlar şeklinde seyretmektedir. En sık kanamalara burun, gastrointestinal, üriner ve solunum kanallarında rastlanmaktadır. Ağır vakalarda bütün vücut boşluklarında kanamalara rastlanmaktadır. Konvelsan evre ortalama olarak hastalık belirtilerinin ortaya

çıkmasından 10-15 gün sonra başlamakta ve bu dönemde taşikardi, düşük kan basıncı gibi belirtilerin olduğu çeşitli vakalarda rapor edilmiştir (2, 3, 56-58).

KKKAH patogenezi ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bununla beraber KKKAH patogenezi diğer kanamalı viral hastalıklara oldukça benzerlik göstermektedir. Damar endotel hücrelerinin virüs tarafından enfekte edilmesi KKKAH patogenezinde önemli rol oynamakta ve vasküler endotelde hasar meydana gelmektedir. Endotel hasar platelet agregasyonu ve degranülasyonun uyarılmasına neden olarak intrinsik koagülasyon kaskatların aktivasyonu ile hemostazın bozulmasına neden olur. Endotel hücrelerin enfekte olması ve enflamatuvar bölgeye çeşitli sitokinlerin birikmesi sonucu aşırı aktive olan sitokinlerin etkileri hastalığın patogenezinde önem arz etmektedir (59-62). KKKAH vakalarında, hastalığın erken safhasında anormal koagülasyon sistem indikatörlerin artması ve dissemine intravasküler koagülasyonların (DIC) görülmesi hastalığın seyri hakkında önemli bilgiler vermektedir. Trombositopeni ve platelet sayısının, ölümcül vakalarda son derece düşük olması ayrıca IL-6 ve TNF α seviyeleri düzeylerinde artış görülmektedir (2, 3, 63-65).

2.7. Teşhis Yöntemleri

Hastalığın spesifik bir tedavisi olmadığı için erken teşhis büyük önem taşımaktadır. Hastalıkta ilk klinik belirtiler grip benzeri olduğu için klinik olarak erken teşhis koymak oldukça güçtür. Bununla beraber ani ateş ve halsizlik gibi grip benzeri klinik semptomlar ve hastanın endemik bölgede bulunması, kene ısırması ya da enfekte kan, doku ya da hasta biriyle teması KKKAH için şüphelenilmesi gereken durumlardır. Hastalığın başlangıcında benzer semptomlarla seyreden riketsiyoz, leptospiroz, boreliyo, meningokokkal enfeksiyonlar, hantavirüs, malarya, sarıhumma, Dengue humması, Omsk kanamalı hastalığı, Lassa ateşi, Ebola, Marburg gibi kanamalı ve ateşli seyreden hastalıklar mutlaka göz önünde bulundurulmalıdır (2, 6, 16) .

Kesin teşhis laboratuvar yöntemleriyle konulmaktadır. Doğrudan laboratuvar tanı yöntemleriyle etken direkt olarak gösterilirken, dolaylı yöntemler ile etkene karşı oluşmuş antikor yanıtı araştırılarak teşhis konulmaktadır. Doğrudan laboratuvar tanı yöntemleri arasında virüsün izolasyonu, virüse spesifik antijen aranması ve viral nükleik asidin spesifik primerlerle çoğaltılması sayılabilir. Virüs nötralizasyon testi, ELISA ve

immunofloresan gibi teknikler hastalığın tanısında kullanılan dolaylı yöntemlerdir (1, 3, 5, 46).

Virüs izolasyonun yapılması yüksek güvenli laboratuvar şartlarını gerektirmesi ve hassasiyetinin düşük olması nedeniyle çok tercih edilen bir metot değildir. Virüs izolasyonu, viremik akut fazdaki hasta serumu, doku ya da endemik bölgelerden toplanan kene süspansiyonlarının 1-2 günlük yavru fare beyinlerine intrakraniyal (i.c.) ya da intraperitoneal (i.p.) yolla inoküle edilmesiyle yapılmaktadır. Virüs izolasyonu aynı zamanda Vero, SW-13, BHK-21, LLC-MK2 gibi hücre hatları kullanılarak da yapılmaktadır. Doğrudan tanı yöntemlerin olan tersine transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) hızlı olması açısından KKKAH virüsün laboratuvar teşhisi için en sık kullanılan yöntemdir (2, 3, 5). Akut dönemde alınan klinik örneklerden viral nükleik asidin spesifik primerler çoğaltılması esasına dayanmaktadır. Canlı virüs ile çalışılmasına gerek duyulmaması ve yüksek güvenli laboratuvar şartları gerektirmemesi açısından son derece pratik bir yöntemdir. Klasik RT-PZR testinin daha gelişmiş olanı ve kantitatif değer veren otomatize real-time PZR testi son yıllarda oldukça geniş kullanım alanı bulmuştur. Kontaminasyon riskinin klasik RT-PCR göre çok daha az olması, daha yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olmasından dolayı virüs suşları arasındaki varyasyonları belirleyebilmesi, dakikalar içerisinde sonuçlanması, viral nükleik asit hakkında kantitatif olarak bilgi vermesi ve monitörize edilebilmesi gibi bir çok avantaj sağlamaktadır. Doğrudan tanı yöntemlerinden olan Antijen-ELISA ve IFA temelli testler RT-PZR kadar duyarlı olmasa da pratik ve kolay uygulanabilir olması nedeniyle tercih edilen metotlar arasındadır (2, 5, 46, 66-69).

Geçmiş yıllarda, KKKAH virüsünün serolojik tanısında kopleman fiksasyon, immunodifüzyon ve hemaglutinasyon inhibisyon testleri kullanılmış ancak bu testlerin yeterli duyarlılıkta olmaması nedeniyle son yıllarda kullanım alanı yoktur. Hastalık belirtileri ortaya çıktıktan yaklaşık 1 hafta sonra spesifik IgM ve kısa süre sonra da IgG antikorlar ELISA ve IFA testleri ile belirlenebilmektedir. Yeni bir enfeksiyon ise çift örnekli serumda 4 kat titre artışı veya tek bir örnekte IgM antikorlarının saptanması ile tanımlanır. Enfeksiyondan 4 ay sonra spesifik IgM belirlenebilir düzeyin altına düşerken IgG en az 5 yıla kadar belirlenebilir düzeyde kalmaktadır. Son yıllarda gelişen rekombinant DNA teknolojisiyle rekombinant KKKAH virüs nükleoprotein (rNP) ve

monoklonal antikorlar kullanılarak geliştirilen ELISA ve IFA testleri antikor tespiti yapılmaktadır (70-73).

2.8. Tedavi ve Korunma

KKKAH'na karşı geliştirilen FDA tarafından onaylanmış bir aşı mevcut değildir. Maalesef KKKAH'nın spesifik bir tedavisi de yoktur. Hastalığın tedavisindeki yaklaşımlar destekleyici tedaviler, ribavirin uygulaması ve antikor tedavileri olarak sayılabilir (2, 3). Destekleyici tedavi günümüzde en çok uygulanan tedavi yöntemi olup hastaya trombosit, taze donmuş plazma ve eritrosit infüzyonlarını içermektedir. Sıvı ve elektrolit dengesi dengede tutularak ve platelet takviyesi ile trombositopeni ve oluşan kanamalar kontrol altına alınabilmektedir. Taze donmuş plazma infüzyonu ile koagülasyon faktör bozuklukların, protrombin ve kısmi tromboplastin zamanının normale dönmesine yardımcı olmaktadır (74).

Ribavirin sentetik pürin nükleozit analogudur ve birçok RNA virüsünün çoğalmasını inhibe ettiği *in vitro* olarak gösterilmiştir (75). Ribavirinin KKKAH'ndaki etki mekanizması tam olarak bilinmemesine rağmen hastalığın erken dönemlerinde etkili olduğu bilinmektedir. Bununla beraber hastalığın tedavisinde ribavirin kullanımı ile ilgili tartışmalar devam etmektedir (76, 77). Konuyla ilgili kontrol gruplarında bulunduğu daha çok klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KKKAH'nı geçiren insanlardan elde edilen hiperimmün serumların hasta bireylere pasif bağışıklama yoluyla verildiği bilinmektedir. Serum ile tedavi uygulamaları ilk olarak Chumakov tarafından 1944-1945 yıllarında görülen vakalarda kullanılmıştır ve az da olsa faydalı olduğu bildirilmiştir. Sonraki yıllarda intramusküler kullanım için "CCHF-bulin" ve intravenöz kullanım için "CCHF-venin" olmak üzere iki farklı immunglobulin geliştirilerek Bulgaristan'daki vakalarda denenmiştir. Bu şekilde yapılan tedavi uygulamalarında hastaların daha hızlı iyileştikleri bildirilmiş ancak kontrol grupları oluşturulmamıştır. Kubar ve ark. Türkiye'de hastalığı atlatan insanlardan elde edilen hiperimmün serumlar ile şiddetli vakalarda yapılan tedavi uygulamalarında serum tedavisinin umut verici olduğunu bildirmiştir. Ancak bu çalışmada kontrol grubu oluşturulmamıştır (74, 78).

Hastalıktan korunmada, risk altında bulunan meslek gruplarının bilgilendirilmesi oldukça önemlidir. Enfeksiyonla mücadelede keneler en önemli basamağı oluşturmaktadır. Özellikle endemik bölgelerde yetiştirilen çiftlik hayvanları kenelere konaklık etmeleri ve enfeksiyonun yayılmasına neden olmalarından dolayı uygun akarisitlerle düzenli olarak ilaçlanmalıdır. Endemik bölgelerde yaşayan ya da bu gibi yerlere seyahat amacıyla gidenlerin kişisel önlemler alması gerekmektedir. Repellent kullanmak, koruyucu elbiseler giymek, şüpheli hayvanlarla temastan kaçınmak, doku ve doku sıvılarıyla temas etmemek ve vücutlarında sürekli kene kontrolü yapmaları gerekmektedir (5, 12).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. KKKAH Virüsü Turkey Kelkit06 Suşu Nükleoprotein (NP) Kodon Optimizasyonu, pUC57 Vektörüne Yerleştirilmesi ve pMALp5x Plasmidine Klonlanması

Bu amaçla, GenBankasında kayıtlı olan GQ337053 KKKAH virüsü Turkey-Kelkit06,suşuna ait NP DNA dizilimi temel alınmıştır. GenScript şirketinden hizmet alımı yoluyla kodon optimizasyonu yapılan 1458 nükleotidlik sentetik KKKAH virüsü NP DNA'sı pUC57 taşıyıcı vektörü içerisine yerleştirilmiş ve elde edilen plasmid pUC57-NP olarak isimlendirilmiştir.

3.1.1. pUC57 ve pMALp5x Plasmidlerinin TOP10 Kompetan Hücrelerine Transforme Edilmesi

3.1.1.1 Materyal

- One Shot TOP10 kimyasal kompetan hücre (C4040-03, Invitrogen)
- pUC57 plasmid
- pMALp5x plasmid (E8200S, Neb)
- Su banyosu (WNB10, Memmert)
- Mikropipet
- Luria Broth Sıvı besi yeri
Yeast (1037530500, Merck)
Pepton (1072131000, Merck)
NaCl (K92033000 546, Merck)
Distile su

- Ampisilin (**A0166, Sigma**)
- Luria Broth Katı besi yeri
Yeast (**1037530500, Merck**)
Pepton (**1072131000, Merck**)
NaCl (**K92033000 546, Merck**)
Agar agar (**1016130500, Merck**)
Distile su
- Sarf malzemeleri (cam şişeler, erlen mayer, petriler)
- Etüv (**Memmert**)
- Çalkalayıcı inkübatör (**IKA KS 4000i**)
- Otoklav (**Hirayama-Hiclave HVE-85L**)

3.1.1.2. Metot

One Shot TOP10 kimyasal kompetan hücrelerine transforme edilecek pUC57-NP ve pMALp5x plasmidlerinden 10 ng ilave edilerek buzda 30 dk inkübe edildi. Daha sonra, 45 saniye 42 °C'ye ayarlanmış su banyosunda bekletilerek hücreler buza alınarak 2 dk inkübe edildi. Hücrelere 250 µl LB besi yeri eklendi. 37 °C'ye ayarlanmış çalkalayıcıya bırakılarak 1-1.5 saat inkübe edildi. Daha sonra transformasyon ürününden 50-150 µl alınarak ampisilin antibiyotiği ile hazırlanmış katı besi yeri pleytlerine ekilerek 37 °C'ye ayarlanmış etüvde bir gece bekletildi. Ertesi gün ampisilin içeren katı besi yerinde gözlenen kolonilerden biri seçilerek plasmid DNA elde edilmek üzere 5 ml LB içerisindeki başlangıç kültürlerine ekimi gerçekleştirildi.

3.1.2. pUC57-NP ve pMALp5x Plasmidlerinden DNA Elde Edilmesi

3.1.2.1. Materyal

- Plasmid DNA kiti (**12145, Qiagen**)
- Santrifüj (**Mikro220R, Hettich**)
- Sarf malzemeleri (falkonlar, erlen)
- Mikropipet
- Etanol (**34870, Sigma**)
- Propanol-2 (**109634, Merck**)

- Luria Broth
- Çalkalayıcı inkübatör (**IKA KS 4000i**)
- Agarose (**3153131, Fisherbrand**)
- Ethidium Bromide (**H5041, Promega**)
- TAE çözeltisi (**50X için 242g Tris, 57.1 ml Asetic acid, 0.5 M EDTA**)
- TE çözeltisi (**10 mM Tris-Cl pH 7.5, 1 mM EDTA**)
- Nanodrop (**2000c, Thermo Scientific**)

3.1.2.2. Metot

pUC57-NP ve pMALp5x plasmidlerini taşıyan hücreler 5 ml LB içerisinde ve ampicilin varlığında 1 gece boyunca 37°C’de büyütüldükten sonra 250 ml hacmindeki ampicilin içeren LB varlığında bir gece 37°C’de büyütüldü. İnkubasyon süresi bittikten sonra kültürler 6000g, +4°C’de 20 dk santrifüj edilerek çöktürüldü. Bakteriyel pellet 4ml P1 buffer ile resüspanse edildi. 4ml P2 Buffer ilave edildi ve karışması sağlandı. Solüsyon oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi. 4 ml P3 buffer ilave edildi. Hafifçe çalkalanarak karışması sağlandı. Bu aşamada solüsyon renksizleşerek ve partiküllü bir solüsyon oluşturuldu. Solüsyon 15 dk buz içerisinde inkübe edildi. +4°C’de, 6000rpm’de 30 dk santrifüj sonrasında Qiagen kolon 4 ml QBT buffer ile yıkanarak hazır hale getirildi. QBT buffer uygulaması bittikten sonra elde edilen süpernatant kolondan geçirildi. Qiagen kolon 2 kez 10’ar ml QC Buffer ile yıkandı. DNA, 5 ml QF Buffer ile kolondan alındı ve 3,5 ml izopropanol ilave edilerek DNA’nın çökmesi sağlandı. Daha sonra 15000g’de, +4°C’de 30 dk santrifüj edilerek üst sıvı atıldı. DNA pelleti 1 ml oda sıcaklığındaki %70 etanol ile yıkandı ve 15000g de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılarak elde edilen pelletin 5-10 dk kuruması beklendi. Pellet uygun hacimde (100-200µl) TE çözeltisi ile tekrar çözdürüldü ve nanodrop cihazında elde edilen plasmid DNA miktarı belirlendi. Elde edilen plasmid DNA’sı %1 agaroz jelde etidyum bromür boyama ile görüntülendi. Jel hazırlanması için 100 ml 1X TAE için 1 gr agaroz tartıldı ve mikrodalga fırında 3 dk çözdürüldükten sonra musluk altında soğutuldu. Soğuma işlemi jel donmadan önce sonlandırıldı ve 100 ml için 5 µl etidyum bromür jele bırakılarak karıştırılarak taraklarıyla beraber kasete döküldü. Daha sonra, 150V’ta yürütme işlemi yapılarak UV ışıktaki görüntülendi.

3.1.3. pUC57-NP Plasmidi Kullanılarak NP Geninin PCR ile Çoğaltılması

3.1.3.1 Materyal

- 0.2 ml mikrosantrifüj tüpleri (**3412A, Molecular Bio Products**)
- Thermal cycler cihazı (**Applied Biosystem Geneamp PCR System 2700**)
- Phusion High Fidelity PCR Kit (**F553S, Thermo Scientific**)
- Distile su

3.1.3.2 Metot

Bu amaçla, 10 µl 5X HF Phusion Buffer, 2µl pMAL forward primer (20pmol) (CCCATATGGAAAACAAAATCGAAGT), 2µl pMAL reverse primer (20pmol) (CCGAATTCTCAATTGATGAATATTCGCTGAGGT), 1.5µl 10mM dNTP karışımı, 1µl Phusion DNA polymerase, 100ng pUC57 template, 31.5µl dH₂O konularak toplam hacim 50µl'e tamamlanarak PCR cihazına yerleştirildi. PCR döngüsü 98 °C'de 30 saniye ön ısıtma, 98°C' de 10 saniye denatürasyon, 55 °C'de 20 saniye bağlanma ve 72 °C'de 1 dk uzatma olarak toplam 35 siklus ve son uzatma işlemi için 72 °C'de 7 dk olarak ayarlandı. PCR ürünleri %1 agaroz jelde etidyum bromür boyama ile görüntülendi. Agaroz jel hazırlanması için 100 ml 1X TAE için 1 gr Agaroz tartıldı ve mikrodalga fırında 3 dk çözdürüldükten sonra musluk altında soğutuldu. Soğuma işlemi jel donmadan önce sonlandırıldı ve EtBr'den 100 ml için 5 µl jele bırakılarak karıştırılarak taraklarıyla beraber kasete döküldü 150V'da yürütme işlemi yapıldı ve UV ışık altında görüntülendi.

3.1.4. NP Geni PCR Ürünün Pürifikasyonu

3.1.4.1. Materyal

- Jel pürifikasyon kiti (**28106, Qiagen**)
- Isıtıcı blok (**Benchmark**)
- Mikropipet
- 1.5 ml Eppendorf tüp (**S1615-5500 Starlab**)
- Bistüri (**Broche**)
- Propanol-2 (**109634, Merck**)

3.1.4.2. Metot

Agaroz jelde yürütülmüş olan NP geni PCR ürünleri U.V altında jelden kesilerek mikrotüplere alındı. Tartılan jel miktarının üç hacim katı kadar buffer QG ilave edildi (100µl=100 mg). 50°C’de çözünmesi için 10 dk beklendi. Jel tamamen çözüldükten sonra karışımın renginin sarı olup olmadığına bakıldı. Bir jel hacmi kadar izopropanol eklenerek örnek karıştırıldı. Karışım Qiaquick spin kolona alınarak 13000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi ve flow through (alt akım) uzaklaştırıldı. Daha sonra, 500 µl buffer QG eklendi ve 13000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi. Yıkama işlemi için; 750 µl buffer PE kolona eklendi ve 1 dk 13000rpm’de santrifüj edildi. Alt akım atılarak 13000 devirde 1 dk santrifüj edildi. Kolona 20 µl buffer EB eklenir ve 2 dk beklenilerek ardından 13000 devirde 1 dk santrifüj edildi. Nanodrop cihazında elde edilen jel pürifiye PCR ürün miktarı ölçüldü.

3.1.5. NP Geni ve pMALp5x Plasmidinin Kesim Enzimleriyle Kesilmesi.

3.1.5.1. Materyal

- NdeI (R0111S, Neb)
- EcorI (R0101S, Neb)
- Neb buffer 2.1 (B7202S, Neb)
- BSA (B9000S, Neb)
- Su banyosu (WNB10, Memmert)
- 1.5 ml Eppendorf tüp (S1615-5500, Starlab)

3.1.5.2. Metot

Klonlama işleminin gerçekleştirilmesi için hem jel pürifiye pUC57-NP PCR ürünü hem de pMALp5X plasmidi EcorI ve NdeI kesim enzimleriyle kesildi. Bunun için, 1.5 ml santrifüj tüpüne, 2µl 10X BSA, 2 µl NEB buffer 2.1, 1 µl NdeI enzimi ve 1 µl EcorI enzimi ve 5µg pMALp5x plasmid DNA’sı eklendi ve diğer tüpde de aynı şekilde hazırlanmış enzim kesim reaksiyonuna 5µg pürifiye pUC57-NP DNA’sı konularak toplam hacim 20µl olacak şekilde dH₂O ilave edildi. Kesim işlemi, 37°C’de su banyosunda bir gece boyunca gerçekleştirildi.

3.1.6. pMALP5x Vektörüne NP Geninin Klonlaması

3.1.6.1. Materyal

- T4 Ligase (**M0202S, Neb**)
- T4 Ligase Buffer (**B0202S, Neb**)
- Su Banyosu (**WNB10, Memmert**)
- Thermal cycler cihazı (**Applied Biosystem Geneamp PCR System 2700**)
- 0.2 ml mikrosantrifüj tüpleri (**3412A, Molecular Bio Products**)

3.1.6.2 Metot

Kesimi gerçekleştirilmiş PCR ürününün pMALp5x vektörü içerine klonlanması amacıyla 0.2ml'lik mikrotüplerine 2 μ l (80ng) vektör DNA'sı ve 2 μ l (50ng) PCR ürünü, 1 μ l T4 ligase enziminden, 1 μ l 10X T4 Ligase Buffer konularak kalan hacim dH₂O ile 20 μ l'ye tamamlandı ve 16°C'de bir gece klonlama işlemi gerçekleştirildi. Ertesi gün klonlama ürünlerinin one shot TOP10 kompetan hücrelerine transformasyonu yapılarak ampisilin içeren katı besi ortamlarını ekimi gerçekleştirildi.

3.1.7. Koloni PCR

3.1.7.1. Materyal

- 0.2 ml mikrosantrifüj tüpleri (**3412A, Molecular Bio Products**)
- Thermal cycler cihazı (**Applied Biosystem Geneamp PCR System 2700**)
- 5X Colorless GoTaq Buffer (**M792A, Promega**)
- 25mM MgCl₂ (**A3511, Promega**)
- dNTP set (**U1240, Promega**)
- Gotaq DNA Polymerase (**M3008, Promega**)
- Agarose (**3153131, Fisherbrand**)
- Ethidium Bromide (**H5041, Promega**)
- TAE çözeltisi(**50X için 242g Tris, 57.1 ml Asetic acid, 0.5 M EDTA**)
- 1.5 ml Eppendorf tüp (**S1615-5500 Starlab**)
- Distile su

3.1.7.2. Metot

Koloni PCR protokolü için 0.2 ml mikrosantrifüj tüplerine 10 koloni örneği için; her tüpe 10 µl 5X PCR Buffer, 2µl pMAL forward primer (20pmol) (CCCATATGGAAAACAAAATCGAAGT), 2µl pMAL reverse primer (20pmol) (CCTCTAGATCAATTGTGATTATTCGCTGAGGT), 1µl 10mM dNTP karışımı, 1µl 25mM MgCl₂, 14 µl dH₂O konularak toplam hacim 25µl'e tamamlandı. Seçilen koloniler pipet ucu yardımıyla alınarak tüplerin içerisindeki karışıma bırakıldı. Tüpler thermal cycler cihazına yerleştirildi. Tüpler 95 °C'de 10 dk inkübe edildi ve ardından +4 °C'de tutuldu. Başka bir tüpe 30µl dH₂O içersine 3 µl (5u/hµl) taq polimeraz enziminden konularak polimeraz enzimi hazırlandı ve her tüpe 3 µl olacak şekilde taq polimeraz enziminden konuldu. PCR siklusları 95 °C'de 1 dk ön ısıtma, 95°C' de 45 saniye denatürasyon, 55 °C'de 45 saniye bağlanma ve 72 °C'de 1 dk uzatma olarak toplam 30 siklus olarak ayarlandı ve son uzatma işlemi için 72 °C'de 7 dk olarak gerçekleştirildi. Koloni PCR ürünleri %1 agaroz jelde etidyum bromür boyama ile görüntülendi. Jel hazırlanması için 100 ml 1X TAE için 1 gr Agaroz tartıldı ve mikrodalga fırında 3 dk çözdürüldükten sonra musluk altında soğutuldu. Soğuma işlemi jel donmadan önce sonlandırıldı ve EtBr'den 100 ml için 5 µl jele bırakılarak karıştırılır ve taraklarıyla beraber kasete döküldü 150V'ta yürütme işlemi yapıldı. UV ışıktaki görüntülendi. İçerisinde NP içeren koloniler seçilerek klonlanmış DNA elde edilmek üzere LB içerisinde büyütülmeye bırakıldı.

3.2. pMALp5x-NP Açıklama Vektörünün IPTG ile Tetiklenmesi

3.2.1. Materyal

- Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (**I5502, Sigma**)
- Overexpress BL21 C43(DE3) kompetan hücre (**60446-1, Lucigen**)
- Ampisilin (**A0166, Sigma**)
- Luria Broth
- Santrifüj (**Mikro220R, Hettich**)
- Çalkalayıcı inkübatör (**IKA KS 4000i**)

3.2.2. Metot

Rekombinant plasmid (pMALp5x-NP), *E. coli* BL21 C43(DE3) hücresine transforme edilerek, tek koloniler alındı ve 5ml LB besi ortamı içerisinde 37°C’de bir gece boyunca başlangıç kültürü olarak üretildi. Bununla birlikte içerisinde rekombinant NP’nin bulunmadığı boş pMALp5x vektöründe aynı şekilde *E. coli* BL21 C43(DE3) hücresine aktarıldı ve 5ml LB besi ortamı içerisinde 37°C’de bir gece boyunca başlangıç kültürü olarak üretildi. Başlangıç kültürlerinden 2ml miktarında alınan hücreler ayrı ayrı 250ml 100 µg/mL ampisilin içeren LB içerisinde 37°C’de kültür ortamında OD₆₀₀~0,6 ulaşıncaya kadar büyütüldü, kültürlerden 1ml kadar tetiklenmemiş kontrol örneği alındıktan sonra 1mM isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) eklenerek kültür sıcaklığı 37°C olan bu ortamda 6 saat boyunca proteinin üretilmesinin tetiklenmesi sağlandı. 1ml kadar tetiklenmiş kontrol örneği alındıktan sonra toplanan hücreler +4°C’de 6000 rpm’de 20 dk santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant atılarak pellet alındı ve pellet -20°C’de diğer işlemleri yapmak üzere saklandı.

3.3. pMALp5x-NP Rekombinant Proteinin SDS-PAGE ile Analizi

3.3.1. Materyal

- Commassie blue (**61-0436, Biorad**)
- ChemiDoc MP (**Biorad**)
- 1.5 ml Eppendorf tüp (**S1615-5500, Starlab**)
- Mini-PROTEAN Tetra Cell sistem (**165-8000, Biorad**)
- Akrilamid (C₃H₅NO) (**800830, Merck**)
- Bisakrilamid (C₇H₁₀N₂O₂) (**V3143, Promega**)
- Tris ((HOCH₂)₃CNH₂) (**K37266187 725, Merck**)
- SDS (CH₃(CH₂)₁₁OSO₃Na) (**L5750, Sigma**)
- Amonyum persülfat/APS ((NH₄)₂S₂O₈) (**A2941,0250 Applichem**)
- Tetramethylethylenediamine/TEMED((CH₃)₂NCH₂CH₂N(CH₃)₂)(**M1107320 100, Merck**)
- **%30 akrilamid karışımı** 29g Akrilamid + 1g bisakrilamid karıştırıldı dH₂O ile 100 ml’ye tamamlandı. 37°C benmaride çözdürüldükten sonra 0.45 µm filtreden süzüldü ve ışık geçirmeyen cam şişede muhafaza edildi.

- **%10 Çözdürme jeli (10 ml için):** 4ml Distile su + 3,3 ml %30 akrilamid karışımı + 2,5ml 1,5 M Tris + 0,1 ml %10 SDS + 0,1 ml %10 amonyum persulfat + 0,008 ml TEMED
- **%5 Yığınlama Jeli (3 ml için):** 2,1 ml dH₂O +0,5 ml akrilamid karışımı + 0,38 ml 0,1 M Tris+ 0,03 ml %10 SDS + 0,03 ml %10 APS +0,003 ml TEMED
- 2-Mercaptoethanol (**161-0710, Biorad**)
- Laemli Sample Buffer (**161-0737, Biorad**)
- Örnek Tamponu : 950 µl Laemli sample buffer + 50 µl 2-Mercaptoethanol
- 10X Tris/Glisin Stok Yürütme Tamponu (**161-0771, Biorad**)
- 1X Tris/Glisin Yürütme Tamponu: 10X Stok Solüsyondan dilüe edilerek 1X olarak hazırlandı.
- Güç kaynağı (**164-5052, Biorad**)

3.3.2. Metot

Mini-PROTEAN Tetra Cell sistem kurulumu yapıldıktan sonra her cam pleyt için 7.5 ml % 10'luk çözdürme jeli hazırlandı ve cam pleytler arasından döküldü ve jelin üzerine pipet yardımıyla 1 ml dH₂O ilave edildi ve 15 dk oda ısısında donması beklendi. Daha sonra hazırlanan 2 ml %5'lik yığınlama jeli çözdürme jelinin üzerine eklenerek tarak takıldı ve 20 dk oda ısısında donması için bekletildi. Jelde yürütülecek örnekler hazırlanırken ilk olarak kültürden 100 µl alınarak steril eppendorf tüpüne tetiklenmemiş kontrol olarak bırakıldı ve SDS jel analizi yapılmak üzere -20 °C'de bekletildi. Kültürün geri kalanına final konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde IPTG eklenerek 6 saat 220-250 rpm'de 37°C'de inkübasyon gerçekleştirildi. İnkübasyon periyodundan sonra tetiklenmiş örnekten 100 µl alındı ve SDS analizi için 20 µl örnek ve 20 µl 2x'lik SDS jel örnek tamponu olacak şekilde alınarak örnek yeni eppendorf tüplerinde hazırlandı ve -20 °C'de saklandı. Kuyucuklara yüklenmek üzere her örnekten; 20 µl örnek ve 20 µl 2x'lik SDS jel örnek tamponu olacak şekilde alınarak örnekler yeni eppendorf tüplerine buz içerisinde hazırlandı. Tetiklenmemiş örnek de tetiklenmiş örnek gibi 20 µl örnek ve 20 µl 2x'lik SDS jel örnek tamponu alınarak buz üzerinde yeni eppendorf tüplerinde hazırlandı. Örneklerin 95°C'de 5 dk boyunca denatürasyon işlemi gerçekleştirildi. Tetiklenmemiş ve tetiklenmiş örnekler SDS-PAGE jeline yüklendi Güç kaynağı tanka

bağlanarak 100 voltta 1.5 saat süreyle örnekler yürütüldü. Comassie Brilliant Blue ile 3 saat boyanarak ChemiDoc MP cihazı ile analiz edildi.

3.4. pMALp5x-NP Vektörü Kullanılarak Rekombinat NP Proteinin Üretilmesi ve Saflaştırılması

3.4.1. Materyal;

- pMAL protein fusion & purification system (E8200S, Neb)
- Column buffer : (1 litre için; 20mM Tris-HCl, 200mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM azide, 10mM β -mercaptoethanol ya da 1 mM DTT)

3.4.2. Metot

Yukarıda anlatıldığı gibi 6 saat tetiklenerek üretilen ve santrifüj edilerek -20 °C’de saklanan hücre pelleti tartılarak her 1 gram pellete 5ml 1X bugbuster solüsyonu eklendi. Daha sonra pellet 1ml bugbuster solüsyonunda 25 unite benzeonaz, ve 1KU lizozim olan tampon çözeltiyle parçalanıp, toplanan protein çözeltisi karıştırıcı üzerinde 20 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından 6000 rpm’de 20 dk +4°C’de santrifüjü gerçekleştirilerek kolon pürifikasyonları işlemine için üst sıvı alındı ve elde edilen pellet inklüzyon cisimciği protokolü ve kolon pürifikasyonları işlemleri için -20°C’de saklandı.

İnklüzyon cisimciği protokolü için; pellet bir gece -20°C’de bekletildikten sonra aynı şekilde 1gram pellete 5ml 1X bugbuster solüsyonuna karşı gelecek şekilde solüsyonda çözdürüldü. Daha sonra pellet 1 ml bugbuster solüsyonuna 1KU lizozim olan tampon çözeltiyle vortekslenerek 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu işlemin ardından su ile 1:10 oranında dilüe edilmiş bugbuster solüsyonu eklenerek süspansiyon 1 dk vortekslenerek 5000g’de 15 dk boyunca +4°C’de santrifüj edildi. Üst sıvı atılarak pellet alındı ve su ile 1:10 oranında dilüe edilmiş bugbuster solüsyonu eklenerek süspansiyon vorteklendi ve bir önceki adım iki kez tekrar edilerek en son aşamada 18000rpm’de 15 dk +4°C’de santrifüj edildi, elde edilen pellet kolon pürifikasyonları için -20°C’de saklandı.

Saklanan pellet 5 ml kolon buffer ile süspanse edildi. Ardından 1 ml amiloz resin 0.5x10 cm büyüklüğündeki kolona konularak kolon 5 kez kolon buffer ile yıkanarak hazır hale getirildi. Süspansiyon amiloz resin kolona yüklenerek örneğin geçişi sağlandı. Daha sonra diğer bir yıkama işlemi için kolon 12 kat ful kolon hacmiyle kolon buffer ile yıkandı. Son adımda ise 10mM maltoz içeren kolon buffer ile elüsyon gerçekleştirilerek içerisindeki maltoz yardımıyla 1 ml 5 fraksiyon ile alt akım akışı sağlanarak kolona tutunan proteinin saflaştırılması gerçekleştirildi. Yıkama basamaklarında ve elüsyon fraksiyonlarından alınan örneklerin SDS-PAGE yöntemi ile analizi gerçekleştirildi.

Santrifüj sonrası da alınan üst sıvı örneği (soluble) de aynı şekilde kolon buffer ile dilüe edilerek aynı kolon pürifikasyon işlemlerine tabi tutuldu. Yıkama basamaklarında ve elüsyon fraksiyonlarından alınan örneklerin SDS-PAGE yöntemi ile analizi gerçekleştirildi.

3.5. pCOLDTF Vektörüne NP Geninin Klonlaması

3.5.1. pUC57-NP ve pCOLDTF Plasmidlerinin TOP10 Kompetan Hücrelerine Transforme Edilmesi

3.5.1.1. Materyal

- One Shot TOP10 kimyasal kompetan hücre (**C4040-03, Invitrogen**)
- pUC57 plasmid
- pCOLD plasmid (**3365, Takara**)
- Su banyosu (**WNB10, Memmert**)
- Mikropipet
- Luria Broth Sıvı besi yeri
Yeast (**1037530500, Merck**)
Pepton (**1072131000, Merck**)
NaCl (**K92033000 546, Merck**)
Distile su
- Ampisilin (**A0166, Sigma**)
- Luria Broth Katı besi yeri

Yeast (**1037530500, Merck**)

Pepton (**1072131000,Merck**)

NaCl (**K92033000 546, Merck**)

Agar agar (**1016130500, Merck**)

Distile su

- Sarf malzemeleri (cam şişeler, erlen mayer, petriler)
- Etüv (**MEMMERT**)
- Çalkalayıcı inkübatör (**IKA KS 4000i**)
- Otoklav (**Hirayama-Hiclave HVE-85L**)

3.5.1.2. Metot

One Shot TOP10 kimyasal kompetan hücreleri -80°C'den çıkartılarak buza alındı. Transforma edilecek pUC57 plasmid ve pCOLDTF plasmidlerinden örneğinden 2 µl alınarak kompetan hücreye bırakıldı ve pipetasyon yapılmadan parmakla 1-2 kez sallama işlemi uygulandı.. Buzda 30 dk inkübe edildi. Süre sonunda hücreler alınarak 45 saniye 42°C'ye ayarlanmış su banyosunda bekletildi. Hücreler buza alınarak 2 dk inkübe edildi.Hücrelere 250 µl LB besi yeri eklendi. 37°C'ye ayarlanmış çalkalayıcıya bırakıldı ve 1-1.5 saat inkübe edildi. Süre sonunda transformasyon ürününden 50-150 µl alınarak ampisilin antibiyotiği ile hazırlanmış katı besi yeri pleytlerine ekim yapılarak 37°C'ye ayarlanmış etüvde bir gece bekletildi. Ertesi gün ampisilin içeren katı besi yerinde gözlenen kolonilerden biri seçilerek plasmid DNA elde edilmek üzere 5 ml LB içerisindeki başlangıç kültürlerine ekimi gerçekleştirildi.

3.5.2. pUC57-NP ve pCOLDTF plasmid DNA'ların Elde Edilmesi

3.5.2.1. Materyal

- Plasmid DNA kiti (12145, Qiagen)
- Santrifüj (Mikro220R, Hettich)
- Sarf malzemeleri (falkonlar, erlen)
- Mikropipet
- Etanol (34870, Sigma)
- Propanol-2 (109634, Merck)
- Luria Broth
- Çalkalayıcı inkübatör (IKA KS 4000i)
- Agarose (3153131, Fisherbrand)
- Ethidium Bromide (H5041, Promega)
- TAE çözeltisi (50X için 242g Tris, 57.1 ml Asetik acid, 0.5M EDTA)
- TE çözeltisi (10mM Tris-Cl pH 7.5, 1mM EDTA)
- Nanodrop (2000c, Thermo Scientific)

3.5.2.2. Metot

Transformasyon sonrası elde edilen pUC57-NP ve pCOLDTF plasmidlerini içeren bakteriyel koloniler, 5 ml LB içerisindeki başlangıç kültürlerine ekildi ve 1 gün boyunca 37°C'de büyütüldükten sonra 40 ml hacmindeki ampisilin içeren LB içerisine aktarılarak bir gece 37°C'de inkübe edildi. Daha sonra, kültürler 6000g, +4°C'de 20 dk santrifüj edilerek çöktürüldü. Bakteriyel pellet 4ml P1 Buffer ile resüspanse edildi. 4ml P2 Buffer ilave edildi ve karışması sağlandı. Solüsyon oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilerek 4 ml P3 buffer ilave edildi. Hafifçe çalkalanarak karışması sağlandı. Bu aşamada solüsyon renksizleşerek ve partiküllü bir solüsyon oluşturuldu. Solüsyon 15 dk buz içerisinde inkübe edilerek +4°C'de, 6000rpm'de 30 dk santrifüj edildi. Qiagen kolon 4 ml QBT buffer ile yıkanarak hazır hale getirildi. QBT buffer uygulaması bittikten sonra elde edilen süpernatant kolondan geçirildi. Qiagen kolon 2 kez 10'ar ml QC Buffer ile yıkandı. DNA, 5 ml QF Buffer ile kolondan alınarak 3,5 ml izopropanol ilave edildi ve DNA'nın çökmesi sağlandı. Daha sonra 15000g'de, +4°C'de 30 dk santrifüj edildi ve süpernatant döküldü. DNA pelleti 1 ml oda sıcaklığındaki %70 etanol

ile yıkandı ve 15000g de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant döküldü ve pelletin 5-10 dk kuruması beklendi. Pellet uygun hacimde (100-200µl) TE çözeltisi ile tekrar çözündürüldü ve nanodrop cihazında elde edilen plasmid DNA miktarı belirlendi. Elde edilen plasmid DNA'sı %1 agaroz jelde etidyum bromür boyama ile görüntülendi.

3.5.3. pUC57-NP ve pCOLDTF Plasmidinin Kesim Enzimleriyle Kesilmesi.

3.5.3.1. Materyal

- NdeI (**R0111S, Neb**)
- XbaI (**R0145S, Neb**)
- Neb buffer 2.1 (**B7202S, Neb**)
- BSA (**B9000S, Neb**)
- Su banyosu (**WNB10, Memmert**)
- 1.5 ml Eppendorf tüp (**S1615-5500 Starlab**)

3.5.3.2. Metot

Klonlama işleminin gerçekleştirilmesi için hem NP içeren jel pürifiye pUC57-NP plasmid DNA'sı hem de pCOLDTF plasmid DNA'sı NdeI ve XbaI kesim enzimleriyle kesildi. Bunun için, 1.5 ml santrifüj tüpünden birine, 2µl 10X BSA, 2 µl NEB buffer, önce 1 µl NdeI enzimi ile kesilerek ve sonra jel pürifikasyonunun ardından 1 µl XbaI enzimi ile 5µg pCOLDTF plasmid DNA'sının tek enzim kesimi toplam hacim 20µl olacak şekilde dH₂O konularak 37°C'de su banyosunda bir gece boyunca gerçekleştirildi. Diğer tüpe de 5µg pUC57-NP plasmid DNA'sı ilave edilerek önce NdeI daha sonra XbaI enzimleri ile yapılan kesim işlemi 37°C'de su banyosunda bir gece boyunca gerçekleştirildi.

3.5.4.. NP Geninin pCOLDTF Vektörüne Ligasyonu

3.5.4.1. Materyal

- T4 Ligase (**M0202S, Neb**)
- T4 Ligase Buffer (**B0202S, Neb**)
- Su Banyosu (**WNB10, Memmert**)
- Thermal cycler cihazı (**Applied Biosystem Geneamp PCR System 2700**)

- 0.2 ml mikrosantrifüj tüpleri (**3412A, Molecular Bio Products**)
- One Shot TOP10 kimyasal kompetan hücre (**C4040-03, Invitrogen**)
- Ampisilin (**A0166, Sigma**)

3.5.4.2. Metot

Kesimi gerçekleştirilmiş NP'yi içeren pUC57 plasmidinin pCOLDTF vektörü içine klonlanması amacıyla 0.2ml'lik mikrosantrifüj tüplerine 2µl (80ng) vektör DNA'sından ve 2µl (50ng) pUC57-NP plasmidi içerisinden kesilmiş NP DNA'sından, 1 µl T4 ligase enziminden, 1 µl 10X T4 ligase buffer konularak kalan hacim dH₂O ile 20 µl'ye tamamlandı ve 16°C'de bir gece ligasyon işlemi gerçekleştirildi. Ertesi gün klonlama ürünlerinin one shot TOP10 kompetan hücrelerine transformasyonu yapılarak ampisilin içeren katı besi ortamlarını ekimi gerçekleştirildi.

3.5.5. Koloni PCR ile Pozitif Klonların Belirlenmesi

3.5.5.1. Materyal

- 0.2 ml mikrosantrifüj tüpleri (**3412A, Molecular Bio Products**)
- Thermal cycler cihazı (**Applied Biosystem Geneamp PCR System 2700**)
- 5X Colorless GoTaq Buffer (**M792A, Promega**)
- 25mM MgCl₂ (**A3511, Promega**)
- dNTP set (**U1240, Promega**)
- Gotaq DNA Polymerase (**M3008, Promega**)
- Agarose (**3153131, Fisherbrand**)
- Ethidium Bromide (**H5041, Promega**)
- TAE çözeltisi (**50X için 242g Tris, 57.1 ml Asetic acid, 0.5 M EDTA**)
- 1.5 ml Eppendorf tüp (**S1615-5500, Starlab**)
- Distile su

3.5.5.2. Metot

Bu amaçla, 0.2 ml mikrosantrifüj tüplerine 10 bakteriyel koloni örneği için; her tüpe 10 µl 5X PCR Buffer, 2µl pMAL forward primer (20pmol) (CCCATATGGAAAACAAAATCGAAGT), 2µl pMAL reverse primer (20pmol)

(CCTCTAGATCAATTGTGATTATTCGCTGAGGT), 1µl 10mM dNTP karışımı, 1µl 25mM MgCl₂, 14 µl dH₂O konularak toplam hacim 25µl'e tamamlandı. Seçilen koloniler pipet ucu yardımıyla alınarak tüplerin içerisindeki karışıma bırakıldı. Tüpler thermal cycler cihazına yerleştirildi. Tüpler 95 °C'de 10 dk inkübe edildi ve ardından +4 °C'de tutuldu. Başka bir tüpe 30µl dH₂O içersine 3µl (5u/µl) taq polimeraz enziminden konularak polimeraz enzimi hazırlandı ve her tüpe 3 µl olacak şekilde taq polimeraz enziminden konuldu. PCR siklusları 95 °C'de 1 dk ön ısıtma, 95°C' de 45 saniye denatürasyon, 55 °C'de 45 saniye bağlanma ve 72 °C'de 1 dk uzatma olarak toplam 30 siklus olarak ayarlandı ve son uzatma işlemi için 72 °C'de 7 dk olarak gerçekleştirildi. Koloni PCR ürünleri %1 agaroz jelde etidyum bromür boyama ile görüntülendi. İçerisinde NP genini içeren koloniler seçilerek LB içerisinde büyütüldü ve rekombinant plasmid DNA'sı ekstrakte edildi. Elde edilen rekombinant vektör pCOLDTF-NP olarak isimlendirildi.

3.6. pCOLDTF-NP Açıklama Vektörünün IPTG ile Tetiklenmesi

3.6.1. Materyal

- Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (**I5502, Sigma**)
- Overexpress BL21 C43(DE3) kompetan hücre (**60446-1, Lucigen**)
- Ampisilin (**A0166, Sigma**)
- Luria Broth
- Santrifüj (**Mikro220R, Hettich**)
- Çalkalayıcı inkübatör (**IKA KS 4000İ**)
- 1.5 ml Eppendorf tüp (**S1615-5500, Starlab**)

3.6.2. Metot

pCOLDTF-NP plasmidi, *E. coli* BL21 C43(DE3) kompetan hücrelerine aktararak 5ml LB besi ortamı içerisinde başlangıç kültürü olarak üretildi. Başlangıç kültüründen 2ml miktarında alınan hücreler 40 ml 100 µg/mL ampicillin içeren LB içerisinde 37°C'de kültür ortamında OD600 ~0,6 ulaşınca kadar büyütüldü, kültürden belirli miktarda kontrol örneği alındıktan sonra 1mM IPTG eklenerek kültür sıcaklığı 16°C indirilip bu ortamda 18 saat boyunca proteinin üretilmesi sağlandı. Daha sonra, belirli miktarda

örnek alınarak SDS-PAGE ile analizi için saklandı. Toplanan bakteri hücreleri +4 °C’de 6000 rpm’de 20 dk santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant atılarak pellet alındı ve daha sonraki işlemler için -20°C’de saklandı.

3.7. pCOLDTF-NP Rekombinant Proteinin SDS-PAGE ile Analizi

3.7.1. Materyal

- Commassie blue (**61-0436, Biorad**)
- ChemiDoc MP (**Biorad**)
- 1.5 ml Eppendorf tüp (**S1615-5500 Starlab**)
- Mini-PROTEAN Tetra Cell sistem (**165-8000 ,Biorad**)
- Akrilamid (C_3H_5NO) (**800830, Merck**)
- Bisakrilamid ($C_7H_{10}N_2O_2$) (**V3143, Promega**)
- Tris ($(HOCH_2)_3CNH_2$) (**K37266187 725, Merck**)
- SDS ($CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$) (**L5750, Sigma**)
- Amonyum persülfat/APS ($(NH_4)_2S_2O_8$) (**A2941,0250 Applichem**)
- Tetramethylethylenediamine/TEMED($(CH_3)_2NCH_2CH_2N(CH_3)_2$)(**M1107320 100, Merck**)
- **%30 akrilamid karışımı** 29 g Akrilamid + 1 g Bisakrilamid karıştırıldı dH₂O ile 100 ml’ye tamamlandı. 37°C benmaride çözdürüldükten sonra 0.45 µm filtreden süzüldü ve ışık geçirmeyen cam şişede muhafaza edildi.
- **%10 Çözdürme jeli (10 ml için):** 4ml Distile su + 3,3 ml %30 akrilamid karışımı + 2,5ml 1,5 M Tris + 0,1 ml %10 SDS + 0,1 ml %10 Amonyum persulfat + 0,008 ml TEMED
- **%5 Yığınlama Jeli (3 ml için):** 2,1 ml dH₂O +0,5 ml akrilamid karışımı + 0,38 ml 0,1 M Tris+ 0,03 ml %10 SDS + 0,03 ml %10 APS +0,003 ml TEMED
- 2-Mercaptoethanol (**161-0710 Biorad**)
- Laemli Sample Buffer (**161-0737, Biorad**)
- Örnek Tamponu: 950 µl Laemli sample buffer + 50 µl 2-Mercaptoethanol
- 10X Tris/Glisin Stok Yürütme Tamponu (**161-0771, Biorad**)
- 1X Tris/Glisin Yürütme Tamponu: 10X Stok Solüsyondan dilüe edilerek 1X olarak hazırlandı

- Güç kaynağı (**164-5052, Biorad**)

3.7.2. Metot

Mini-PROTEAN Tetra Cell sistem kurulumu yapıldıktan sonra her cam pleyt için 7.5 ml % 10'luk çözündürme jeli hazırlandı ve cam pleytler arasından döküldü ve jelin üzerine pipet yardımıyla 1 ml dH₂O ilave edildi ve 15 dk oda ısısında donması beklendi. Daha sonra hazırlanan 2 ml %5'lik yığınlama jeli çözündürme jelinin üzerine eklenerek tarak takıldı ve 20 dk oda ısısında donması için bekletildi. Jelde yürütülecek örnekler hazırlanırken ilk olarak kültürden 100 µl alınarak steril eppendorf tüpüne tetiklenmemiş kontrol olarak bırakıldı ve SDS jel analizi yapılmak üzere -20 °C'de bekletildi. Kültürün geri kalanına final konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde IPTG eklendi ve 18 saat 220-250 rpm'de 16°C'de inkübasyon gerçekleştirildi. Inkübasyon periyodundan sonra tetiklenmiş örnekten 100 µl alınarak SDS analizi için 20 µl örnek ve 20 µl 2x'lik SDS jel örnek tamponundan örnekler hazırlandı ve -20 °C'de saklandı. Kuyucuklara yüklenmek üzere her örnekten; 20 µl örnek ve 20 µl 2x'lik SDS jel örnek solusyonu eklenerek hazırlanan örnekler yeni eppendorf tüplerine buz içerisine bırakıldı. Tetiklenmemiş örnek de tetiklenmiş örnek gibi 20 µl örnek ve 20 µl 2x'lik SDS jel örnek bufferından alınarak buz üzerinde yeni eppendorf tüplerinde hazırlandı.. Örneklerin 95°C'de 5 dk boyunca denatürasyon işlemi gerçekleştirildi. Tetiklenmemiş ve tetiklenmiş örnekler SDS-PAGE jeline yüklenerek güç kaynağı tanka bağlandı ve 100 voltta 1.5 saat süreyle örnekler yürütüldü. Comassie Brilliant Blue ile 3 saat boyandı ve ChemiDoc MP cihazı analizi edildi.

3.8. pCOLDTF-NP Vektörü Kullanılarak Rekombinat NP Proteinin Üretilmesi ve Saflaştırılması

3.8.1. Materyal

- Bugbuster (**70921-3, Novagen**)
- rLysozyme (**71110-3, Novagen**)
- Benzonase (**70746, Novagen**)
- Ni-NTA column (**31014, Qiagen**)
- BUFFER B: (7M urea, 0.1M NaH₂PO₄, 0.01M Tris.Cl; pH 8.0)

- BUFFER C: (8M urea, 0.1M NaH₂PO₄, 0.01M Tris.Cl; pH 6.3)
- BUFFER E: (8M urea, 0.1M NaH₂PO₄, 0.01M Tris.Cl; pH 4.5)
- Urea (**U5378, Sigma**)
- Tris ((HOCH₂)₃CNH₂) (**K37266187 725, Merck**)
- NaH₂PO₄ (**S3139, Sigma**)
- Platform Çalkalayıcı (**unimax1010, Heidolph**)
- 1.5 ml Eppendorf tüp (**S1615-5500, Starlab**)
- NaOH (**S8045, Sigma**)

3.8.2. Metot

Santrifüj işleminden sonra -20 °C’de saklanan hücre pelleti tartılarak her 1 gram pellete 5ml 1X bugbuster solüsyonuna karşı gelecek şekilde çözündürülmüştür. Daha sonra pellet 1ml bugbuster solüsyonunda 25 unite benzeonaz, 1 ml bugbuster solüsyonuna 1KU lizozim olan tampon çözeltiyle parçalanıp, toplanan protein çözeltisi karıştırıcı üzerinde 20 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından 6000 rpm’de 20 dk +4°C’de santrifüjü gerçekleştirilerek süpernatant atılmıştır ve elde edilen pellet bir gece -20°C’de tutulmuştur. Pellet bir gece -20°C’de bekletildikten sonra Ni-NTA kolonları ile pürifikasyonu gerçekleştirilmek üzere işlemleri başlatılmıştır. Ticari kitin donmuş pelletlere uygulanan protokolüne takip edilerek bufer B, bufer C, bufer E hazırlanarak uygun pH’lara ayarlanmıştır. Pellet 700 µl bufer B ile önce muamele edilerek oda sıcaklığında karıştırıcı ile 15 dk karıştırıldı. Elde edilen lizat 6000 rpm’de 30 dk oda sıcaklığında santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant alınarak daha önce 600 µl bufer B ile şartlanmış olan Ni-NTA kolonlarına 600µl yüklendi ve 5 dk 1600 rpm’de oda sıcaklığında santrifüj gerçekleştirildi. Elde edilen alt akım alınarak SDS-PAGE analizi için saklandı. Kolonun 600 µl iki kez buffer C ile 2 dk 2900 rpm’de oda sıcaklığında yıkama işlemi gerçekleştirildi. Yıkama fraksiyonları da aynı şekilde SDS-PAGE analizi için saklandı. Son olarak elüsyon adımında 200 µl bufer E ile kolonun tuttuğu proteinlerin alt akıma geçmesi 2900 rpm’de 2 dk santrifüj ile sağlandı. Alınan elüsyon fraksiyonları saklanarak SDS-PAGE ile analizi gerçekleştirildi. SDS sonrası analizi yapılmış olan rekombinant proteininin diğer işlemlerde kullanılmak üzere -20°C’de uzun dönem saklanması gerçekleştirildi.

3.9. Fare immünizasyonları

108G126 nolu ve 'Kırım-Kongo Kanamalı Ateş Virüsünün Epidemiyolojisi, Moleküler Karakterizasyonu, Antijen-ELISA Geliştirilmesi ve Koruyucu Aşı Çalışmaları' isimli TÜBİTAK 1007 KAMAG projesi kapsamında pCOLDTF-NP vektörü kullanılarak rekombinat NP proteini üretilip saflaştırıldıktan sonra Balb/c farelerine verilmiştir. Bu amaçla, 5 adet 8-10 haftalık Balb/c farelerinden biri kontrol grubu olmak üzere boş 100µg pCOLDTF-NP antijeni ve diğer dört fareye 100µg pCOLDTF-NP rekombinant antijeni intramusküler olarak 3 hafta aralıklar ile 3 defa olmak üzere verilmiştir. Her immunizasyondan önce farelerin gözünden kan alınarak fare serumları ELISA ile test edilmek üzere saklanmıştır. Yine aynı proje kapsamında elde edilen inaktif KKKAH virüsü Turkey Kelkit06 suşuyla immünize edilen fare serumları kullanılmıştır.

3.10. pCOLDTF-NP Rekombinant Proteinin, İnaktif KKKAH Virüsü Turkey Kelkit06 Suşuyla İmmünize Edilen Fare Serumların Anti-KKKAH IgG Belirlenmesi Amacıyla ELISA Testinde Kullanılması

3.10.1. Materyal

- NaCl (S3014, Sigma)
- Na₂HPO₄ (9003145354, Merck)
- KH₂PO₄ (1048731000, Merck)
- Na₂CO₃ (A836892 707, Merck)
- TMB (T3405-100TAP, Sigma)
- NaHCO₃ (K36375029 645, Merck)
- Tween 20 (8.22184.0500, Merck)
- Sitrik asit (S4000, Sigma)
- H₂SO₄ (1090734000, Merck)
- TMB (3,3',5,5'-Tetramehtylbenzidine tableti (T4041, Sigma)
- Karbonat tampon solüsyonu: 1,59 gr Na₂CO₃ + 2,3 gr NaHCO₃ , pH 9.6
- PBS : 8 gr NaCl, 2g of KCl, 1.44g of Na₂HPO₄, 0.24g of KH₂PO₄ , ditile su ile 1 litreye tamamlandı. pH, HCl kullanılarak 7,2'ye ayarlandı.
- Yıkama Solüsyonu : %0,05 Tween 20 içeren PBS

- Konjugat Solüsyonu Anti Mouse IgG HRP (Novex) 1/15000 oranında PBST solüsyonu içerisinde dilüe edilerek kullanıldı.
- Substrat Solüsyonu: 1 TMB (3,3',5,5'-Tetramehtylbenzidine tableti tableti 4 ml 0,1 M sitrik asit ve 6 ml 0,2 M Na₂HPO₄ içerisinde çözündürüldü ve daha sonra 100 µl H₂O₂ ilave edildi
- Stop Solüsyonu : 1N H₂SO₄

3.10.2. Metot

Rekombinant pCOLDTF-NP antijeni kuyucuk başına 100 ng ve 250ng olacak şekilde ve PEG pürifiye KKKAH antijeni kuyucuk başına 1 µg olacak şekilde pH 9.6 karbonat tampon kullanılarak 1 gece + 4 °C'de 96 kuyucuklu ELISA pleytlerine bağlandı. Ertesi gün bağlanmayan antijenler yıkama solüsyonu (% 0,05 PBS-Tween 20) ile pleytten uzaklaştırıldı ve bloklama işlemi için %0,05 PBS-Tween 20 içerisinde hazırlanmış %5'lik süt tozundan oluşan bloklama solüsyonundan, her bir kuyucuğa 100 µl bırakıldı ve pleyt 37 °C' de 1 saat inkübe edildi. Bir kez yıkama solüsyonu ile (%0,05 PBS-Tween 20) yıkanarak test edilecek fare serumlarından her bir kuyucuğa 1/25-1/50-1/100 sulandırma ile 100 µl geçildi. Pozitif kontrol olarak, inaktif KKKAH virüsü ile immünize edilmiş fare poliklonal serumu (1/2000), KKKAH virüsü NP proteinine karşı elde edilmiş olan monoklonal antikorlar, negatif kontrol olarak da immünize edilmemiş fare serumları kullanılmıştır.

Bir saat 37 °C' de inkübe ardından pleyt 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkanarak keçi anti-fare konjugatı 1/10000 oranında bloklama solüsyonu ile sulandırıldı ve her bir kuyucuğa 100 µl geçildi. Pleyt 1 saat 37 °C' de inkübe edildi ve 100 µl yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı. Görüntüleme amacıyla 3,3',5,5'-Tetramehtylbenzidine tableti, 4 ml 0,1 M sitrik asit ve 6 ml 0,2 M Na₂HPO₄ içerisinde çözündürüldü ve 100 µl H₂O₂ ilave edildi. Hazırlanan substrat solüsyonundan her bir kuyucuğa 100 µl eklendi. Daha sonra 15 dk karanlık ortamda inkübe edildikten sonra durdurma solüsyonu (1 N sülfirik asit) ilave edilerek ELISA pleyt okuyucuda 450 nm dalga boyunda okundu.

3.11. pCOLDTF-NP Rekombinant Proteinin, KKKAH Yönünden IgG Pozitif İnsan Serumlarında Anti-KKKAH IgG Belirlenmesi Amacıyla ELISA Testinde Kullanılması

3.11.1. Materyal

- Na_2CO_3 (A836892 707, Merck)
- KH_2PO_4 (1048731000, Merck)
- NaCl (S3014, Sigma)
- Na_2HPO_4 (9003145354, Merck)
- TMB (T3405-100TAP, Sigma)
- NaHCO_3 (K36375029 645, Merck)
- Tween 20 (8.22184.0500, Merck)
- Sitrik asit (S4000, Sigma)
- H_2SO_4 (1090734000, Merck)
 - TMB (3,3',5,5'-Tetramehtylbenzidine tableti (T4041, Sigma)
 - Karbonat tampon solüsyonu :1,59 gr Na_2CO_3 + 2,3 gr NaHCO_3 , pH 9.6
 - PBS : 8 gr NaCl , 2g of KCl , 1.44g of Na_2HPO_4 , 0.24g of KH_2PO_4 , 1 litre distile su içerisinde hazırlandı. pH, HCl kullanılarak 7,2 'ye ayarlandı.
 - Yıkama Solüsyonu : %0,05 Tween 20 içeren PBS
 - Konjugat Solüsyonu Rabbit-Anti Human Fd (Southern Biotech 2046-05) 1/2000 oranında PBST solüsyonu içerisinde dilüe edilerek kullanıldı.
 - Substrat Solüsyonu : 1 TMB (3,3',5,5'-Tetramehtylbenzidine tableti tableti 4 ml 0,1 M sitrik asit ve 6 ml 0,2 M Na_2HPO_4 içerisinde çözdürüldü ve daha sonra 100 μl H_2O_2 ilave edildi
 - Stop Solüsyonu : 1N H_2SO_4
 - Süt tozu (Pınar)

3.11.2. Metot

Rekombinant pCOLDTF-NP antijeni kuyucuk başına 200 ng ve 400ng olacak şekilde, ve PEG pürifiye KKKAH antijeni kuyucuk başına 1 μg olacak şekilde pH 9.6 karbonat tampon kullanılarak 1 gece + 4 °C'de 96 kuyucuklu ELISA pleytlerine bağlandı. Ertesi

gün bağlanmayan antijenler yıkama solüsyonu (% 0,05 PBS-Tween 20) ile pleytten uzaklaştırıldı ve bloklama işlemi için %0,05 PBS-Tween 20 içerisinde hazırlanmış %5'lik süt tozundan oluşan bloklama solüsyonundan, her bir kuyucuğa 100 µl bırakıldı ve pleyt 37 °C' de 1 saat inkübe edildi. Bir kez yıkama solüsyonu ile (%0,05 PBS-Tween 20) yıkanarak test edilecek ve daha önceden KKKAH yönünden güçlü,orta ,zayıf IgG pozitif olduğu bilinen serumlarından her bir kuyucuğa 1/100 sulandırma ile 100 µl geçildi. Pozitif kontrol olarak, inaktif KKKAH virüsü ile immünize edilmiş fare poliklonal serumu (1/2000), negatif kontrol olarak da immünize edilmemiş fare serumları kullanılmıştır.

Bir saat 37 °C' de inkübe edildikten sonra pleyt 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı. Daha sonra tavşan anti-insan Fd konjugatı 1/2000 oranında bloklama solüsyonu ile sulandırıldı ve her bir kuyucuğa 100 µl geçildi. Pleyt 1 saat 37 °C' de inkübe edildi ve 100 µl yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı. Görüntüleme amacıyla 3,3',5,5'-Tetramehtylbenzidine tableti, 4 ml 0,1 M sitrik asit ve 6 ml 0,2 M Na₂HPO₄ içerisinde çözdürüldü ve 100 µl H₂O₂ ilave edildi. Hazırlanan substrat solüsyonundan her bir kuyucuğa 100 µl eklendi. Daha sonra 15 dk karanlık ortamda inkübe edildikten sonra durdurma solüsyonu (1 N sülfirik asit) ilave edilerek ELISA pleyt okuyucuda 450 nm dalga boyunda okundu.

3.12. pCOLDTF-NP Rekombinant Proteinin, KKKAH Yönünden IgM Pozitif İnsan Serumlarında Anti-KKKAH IgM Belirlenmesi Amacıyla ELISA Testinde Kullanılması

3.12.1. Materyal

- Süt tozu (Pınar)
- µChain (10759-1, Sigma)
- NaCl (S3014, Sigma)
- Na₂HPO₄ (9003145354, Merck)
- KH₂PO₄ (1048731000, Merck)
- Na₂CO₃ (A836892 707, Merck)
- TMB (T3405-100TAP, Sigma)
- NaHCO₃ (K36375029645, Merck)

- Tween 20 (**8.22184.0500, Merck**)
- Sitrik asit (**S4000, Sigma**)
- H₂SO₄ (**1090734000, Merck**)
- Karbonat tampon solüsyonu: 1,59 gr Na₂CO₃ + 2,3 gr NaHCO₃, pH 9.6
- PBS : 8 gr NaCl, 2g of KCl, 1.44g of Na₂HPO₄, 0.24g of KH₂PO₄ , ditile su ile 1 litreye tamamlandı. pH, HCl kullanılarak 7,2 'ye ayarlandı.
- Yıkama Solüsyonu: %0,05 Tween 20 içeren PBS
- Konjugat Solüsyonu: Anti Mouse IgG HRP (Novex) 1/10000 oranında PBST solüsyonu içerisinde dilüe edilerek kullanıldı.
- Substrat Solüsyonu: TMB Sens (**4850L, Kementec**)
- Stop Solüsyonu : 1N H₂SO₄

3.12.2. Metot

Pürifiye anti human IgM antikorları(μchain) her bir kuyucuğa 100ng antikor düşecek şekilde pH 9.6 karbonat tampon içerisinde 1/1000 konsantrasyonunda dilüe edilerek her kuyucuğa 100μl miktarında kullanılarak 96 kuyucuklu ELISA pleytlerine bağlandı ve 1 gece + 4 °C'de bekletildi. Ertesi gün yıkama solüsyonu (% 0,05 PBS-Tween 20) ile yıkama işlemi yapıldı ve bloklama için %0,05 PBS-Tween 20 içerisinde hazırlanmış %5'lik süt tozundan oluşan bloklama solüsyonundan, her bir kuyucuğa 100 μl bırakıldı ve pleyt 37 °C' de 1 saat inkübe edildi. Bir kez yıkama solüsyonu ile (%0,05 PBS-Tween 20) yıkanarak daha önceden KKKAH yönünden IgM pozitif olduğu bilinen serumlarından her bir kuyucuğa 1/100 sulandırma ile 100 μl geçildi. Bir saat 37 °C' de inkübe edildikten sonra pleyt 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı. Daha sonra inaktive edilerek pürifiye edilmiş KKKAH virüs antijeni ve rekombinant pCOLDTF-NP antijeni 5ng/μl olacak şekilde PBS ile dilüe edildi ve her bir kuyucuğa 100 μl geçildi. Pleyt 1 saat 37 °C' de inkübe edildi ve 100 μl yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı. KKKAH virüsü NP antijenine özgü pürifiye monoklonal antikor 1/1000 oranında bloklama solüsyonu içerisinde sulandırılarak her bir kuyucuğa 100 μl geçildi. Pleyt 1 saat 37 °C' de inkübe edildi ve 100 μl yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı. Daha sonra keçi anti-fare konjugatı 1/10000 oranında bloklama solüsyonu ile sulandırıldı ve her bir kuyucuğa 100 μl geçildi. Pleyt 1 saat 37 °C' de inkübe edildi ve 100 μl yıkama solüsyonu ile 5 kez

yıkandı. Görüntüleme amacıyla TMB sense substrat solüsyonundan her bir kuyucuğa 100 µl eklendi. Daha sonra 15 dk karanlık ortamda inkübe edildikten sonra durdurma solüsyonu (1 N sülfirik asit) ilave edilerek ELISA pleyt okuyucuda 450 nm dalga boyunda okundu.

3.13. Immuno Blotlama (Western Blot)

3.13.1. Materyal

- Mini-PROTEAN Tetra Cell sistem (**165-8000 ,Biorad**)
- Akrilamid (C_3H_5NO) (**800830, Merck**)
- Bisakrilamid ($C_7H_{10}N_2O_2$) (**V3143, Promega**)
- Tris ($(HOCH_2)_3CNH_2$) (**K37266187 725, Merck**)
- SDS ($CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$) (**L5750, Sigma**)
- Amonyum persülfat/APS ($(NH_4)_2S_2O_8$) (**A2941,0250 Applichem**)
- Tetramethylethylenediamine/TEMED($(CH_3)_2NCH_2CH_2N(CH_3)_2$) (**M1107320 100, Merck**)
- **%30 akrilamid karışımı** : 29 g Akrilamid + 1 g Bisakrilamid karıştırıldı dH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı. 37°C benmaride çözdürüldükten sonra 0.45 µm filtreden süzüldü ve ışık geçirmeyen cam şişede muhafaza edildi.
- **%10 Çözdürme jeli (10 ml için)**: 4ml Distile su + 3,3 ml %30 akrilamid karışımı + 2,5ml 1,5 M Tris + 0,1 ml %10 SDS + 0,1 ml %10 Amonyum persulfat + 0,008 ml TEMED
- **%5 Yığınlama Jeli (3 ml için)**: 2,1 ml dH₂O +0,5 ml akrilamid karışımı + 0,38 ml 0,1 M Tris+ 0,03 ml %10 SDS + 0,03 ml %10 APS +0,003 ml TEMED
- 2-Mercaptoethanol (**161-0710 Biorad**)
- Laemli Sample Buffer (**161-0737, Biorad**)
- Örnek Tamponu : 950 µl Laemli sample buffer + 50 µl 2-Mercaptoethanol
- Glisin (**K40427490 940, Merck**)
- 10X Tris/Glisin Stok Yürütme Tamponu (**161-0771, Biorad**)
- 1X Tris/Glisin Yürütme Tamponu: 10X Stok Solüsyondan dilüe edilerek 1X olarak hazırlandı

- Güç kaynağı (**164-5052, Biorad**)
- Transfer sistemi (**170-3930 Biorad, mini transblot**)
- Transfer membran (**Millipore**)
- **Transfer Tamponu** : 3.3 g Tris+ 14.4 g Glisin + 200 ml Methanol + 800 ml dH₂O karıştırılarak hazırlandı.
- NaCl (**S3014, Sigma**)
- KCl (**P9333, Sigma**)
- Na₂HPO₄ (**9003145354, Merck**)
- KH₂PO₄ (**1048731000, Merck**)
- Na₂CO₃ (**A836892 707, Merck**)
- Tween 20 (**8.22184.0500, Merck**)
- Karbonat tampon solüsyonu :1,59 gr Na₂CO₃ + 2,3 gr NaHCO₃ , pH 9.6
- PBS : 8 gr NaCl, 2g of KCl, 1.44g of Na₂HPO₄, 0.24g of KH₂PO₄ , ditile su ile 1 litreye tamamlandı. pH, HCl kullanılarak 7,2 'ye ayarlandı.
- Yıkama Solüsyonu : %0,1 Tween 20 içeren PBS
- Konjugat Solüsyonu : Anti Mouse IgG HRP (**Novex**) 1/10000 oranında PBST solüsyonu içerisinde dilüe edilerek kullanıldı.
- Substrat Solüsyonu (**32106, Thermo pierce**)
- Görüntüleme kaseti (**FBCS 810, Fisher pierce**)
- Görüntüleme filmi (**F5763, Sigma**)
- Görüntüleme solüsyonu (**P7042, Sigma**)
- Fiksasyon solüsyonu (**P7067, Sigma**)

3.13.2. Metot

Mini-PROTEAN Tetra Cell sistem kurulumu yapıldıktan sonra her cam pleyt için 7.5 ml % 10'luk çözündürme jeli hazırlandı ve cam pleytler arasından döküldü ve jelin üzerine pipet yardımıyla 1 ml dH₂O ilave edildi ve 30 dk oda ısısında donması beklendi. Daha sonra hazırlanan 3 ml %5'lik yığınlama jeli çözündürme jelinin üzerine eklenerek tarak takıldı ve 15 dk oda ısısında donması için bekletildi. Jelde yürütülecek rekombinant pCOLDTF-NP antijeni ve pozitif kontrol olarak inaktive edilerek pürifiye edilmiş KKKAH virüs antijen örnekleri 4x Laemli Sample Buffer ile 3:1 oranında karıştırılıp

kaynar suda 5 dk süreyle denatüre edildi ve yükleninceye kadar buz kabında bekletildi. Önceden hazırlanmış jelin bulunduğu cam pleyt jel yürütme tankına yerleştirildi. 1 litre Tris/Glisin yürütme tamponu cam pleytlerin arasına dolduruldu ve kalanı tankın içerisine boşaltıldı. Taraklar çıkartıldıktan sonra 15 µg KKKAH virüs antijen örneği, 7.5 µg rekombinant pCOLDTF-NP antijeni ve 7.5 µg negatif kontrol olarak pCOLDTF antijeni kuyucuğa yüklendi. Güç kaynağı tanka bağlanarak 100 voltta 1.5 saat süreyle örnekler yürütüldü. Proteinler membrana transfer edilmek üzere jel büyüklüğünde membran kesildi aktif olan yüzeyi işaretlendi ve methanol içerisinde aktive edildi. Transfer tampon içerisinde cam pleytlerden çıkartılan jel, süngerler ve transfer kâğıtları ıslatıldı. Transfer tampon içerisinde kasetin üzerine sırasıyla sünger, kurutma kağıdı, membran, jel, kurutma kağıdı ve sünger yerleştirildikten sonra kasetin kapağı kapatıldı. Kaset transfer sistem aparatına yerleştirildikten sonra tank transfer tamponu ile dolduruldu ve içerisine buz aküsü ile manyetik karıştırıcı barı yerleştirildi. Tank manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirildikten sonra 100 rpm’de karıştırılmaya başlandı. Güç kaynağı transfer sisteme bağlandıktan sonra 100 voltta 60 dk süreyle transfer işlemi yapıldı. Transfer işlemi bittikten sonra membran kasetten alındı ve bloklama solüsyonu içerisinde çalkalayıcıda 30 dk blokladı. Membran 3 kez 10 dk süreyle PBST-20 solüsyonu ile çalkalayıcıda yıkandı. Yıkama solüsyonu döküldü ve membran 6B9G9F11 monoklonal antikoru ile virüs için 1/200 rekombinant protein için 1/50 oranında bloklama solüsyonu içerisinde hazırlandı 1 saat çalkalayıcıda inkübe edildi. Bir saatin sonunda solüsyonlar döküldü ve membran 10 dk süreyle 3 kez PBST-20 ile çalkalayıcıda yıkandı. Konjugat olarak Goat anti Mouse HRP (Novex) 1/10000 oranında bloklama solüsyonu içerisinde sulandırılıp membranlar üzerine döküldü ve oda ısısında 1 saat süreyle çalkalayıcıda inkübe edildi. Membran 10 dk arayla 3 kez PBST-20 ile çalkalayıcıda yıkandı. Membran üzerine görüntüleme substratı 1:1 oranında karıştırılarak yayıldı ve 5 dk süreyle bütün membranın üzerine yayılması sağlandı. Membran bu solüsyonlardan çıkartılıp üzerine streç film örtülerek görüntüleme kasetine yerleştirildi.

Karanlık bir odada üzerine görüntüleme filmi örtüldü ve kasetin kapağı kapatılarak 3 dk beklendi. Film kasetten çıkartılıp önce 1 dk süreyle developer solüsyonunda bekletildi, daha sonra dH₂O kabında yıkandıktan sonra 1 dk da fiksasyon solüsyonunda bekletildi.

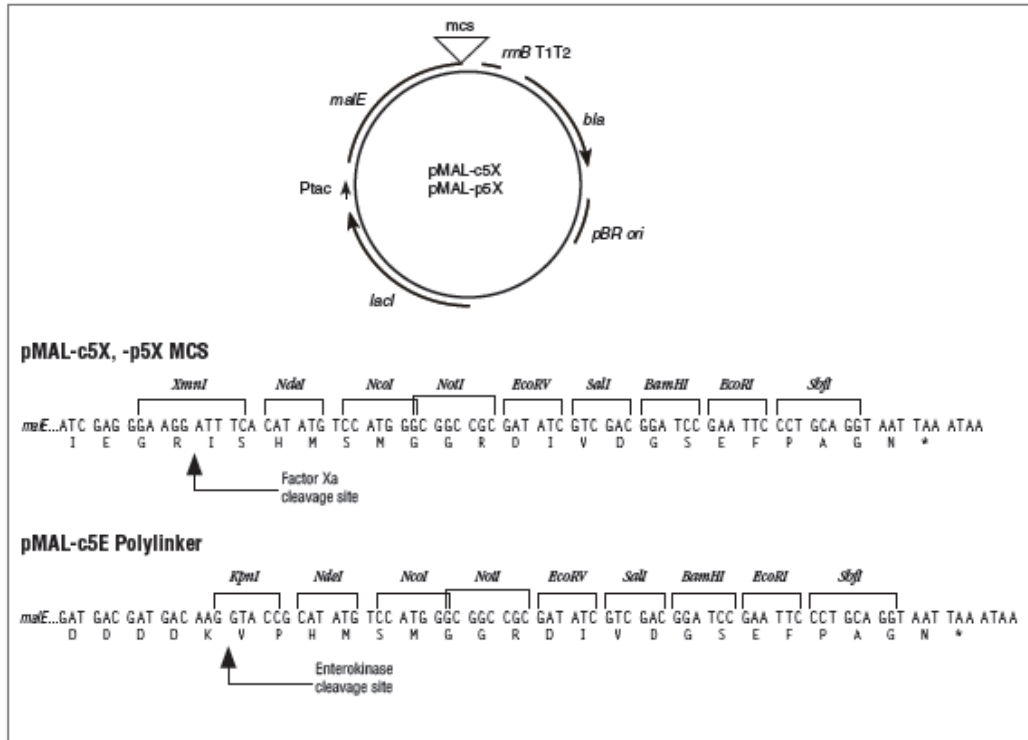
Tekrar su kabında yıkandıktan sonra film karanlık odadan çıkartılarak ışık kaynağı üzerinde incelendi.

4.BULGULAR

4.1. KKKAH Virüsü Kelkit06 Suşu NP Kodon Optimizasyonu ve Puc57 Vektörü

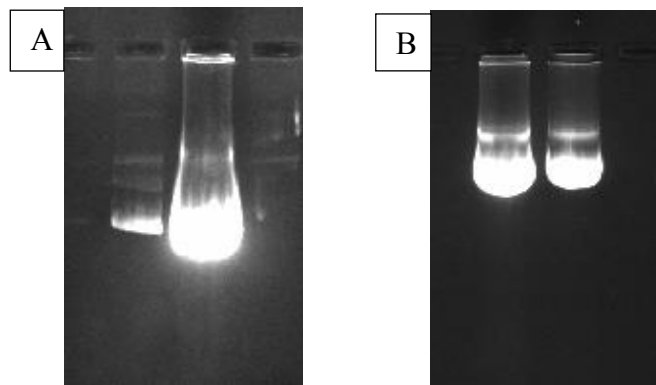
Bu amaçla, GenBankasında kayıtlı olan GQ337053 KKKAH virüsü Turkey-Kelkit06, suşuna ait NP DNA dizilimi temel alınmıştır. GenScript şirketinden hizmet alımı yoluyla kodon optimizasyonu yapılan 1458 nükleotidlik sentetik KKKAH virüsü NP DNA'sı pUC57 taşıyıcı vektörü içerisine yerleştirilmiş ve elde edilen plasmid pUC57-NP olarak isimlendirilmiştir.

```
ATGGAACAAATCGAAGTGAACAGCAAAGATGAAATGAACAAATGGTT
TGAAGAATTAAAAAGGCAACGGTCTGATGGATACCTTTACCAACAGCTA
TTCTTTCTGCGAAAACGTTCCGAATCTGGATAAATTTGTCTTCCAGATGG
CATCCGCTACGGATACGCACAGAAAGACAGCATCTATGCGTCTGCCCTGG
TGGAAGCTACCAAATTTTGC GCGCCGATTTACGAATGTGCGTGGGTGAGC
AGCACCGGCATCGTTAAAAAGGTCTGGAATGGTTCGAAAAAGATATGGC
ACCATTAATCCTGGGACGAAACTATGCCGAAGTGGATGTTCC
GAAACGAACAGCTGGCAAATTACCAGCAAGCGGCCCTGAAATGGCGCAA
AGATATTGGCTTTCGTGTGAACGCTAATACCGCAGCTCTGAGTAACAAAG
TCCTGGCGGAATATAAAGTGCCGGTGAAATCGTCATGAGCGTGAAAGAAA
TGCTGTCTGATATGATTCGTGTGAATGGTGTGCTGAATTTGTGAAAGGC
AAATACATTATGGCCTTCAACCCGCGGTGGGGTGATATTAATAAAAGTGG
CCGCTCCGGTATCGCACTGGTTGCTACCGGCCTGGCGAACTGGCCGAAA
CGGAAGGCAAAGGTGTCTTTGATGAAGCGAAGAAAACCGTGGAAGCACTG
AATGGTTATCTGGTAAACATCGCGATGAAGTGGATAAAGCATCAGCTGAC
TCGATGATTACGAACCTGCCGAACACATCGCGAAAGCCCAGGAAGTGTAC
AAAAATAGTTCCGCACTGCGTGCTCAGGGCGGCAAATCGATACCCCGTTT
TCATCGTTCTATTGGCTGTACAAGCCGGTGTTACGCCGGAACCTTTCCG
ACGATTTCTCAGTTTCTGTTCGAACTGGGCGAACAACCGCGTGGCACCAA
GAAAATGAAAAAGCTCTGCTGTCAACGCCGATGAAATGGGGCAAAAAC
TGTATGAACGTTTGCAGATGACTCGTTCCAGCAAACCGCATCTACATGC
```

Şekil 8: pMALp5x vektör haritası.

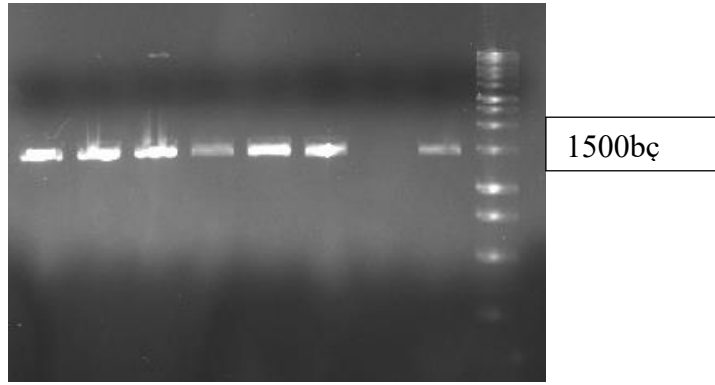
pMALp5x plasmid DNA elde edildi ve elde edilen miktar 447 ng/μl olarak belirlendi. TOP10 kompetan hücrelerine transformasyonu gerçekleştirilen pUC57-NP plasmid DNA eldesi gerçekleştirildi. Elde edilen plasmid DNA miktarı 356 ng/μl olarak olarak belirlendi. Ede edilen plasmid DNA'ların jel görüntüsü Şekil 9'de görülmektedir.



Şekil 9: A. pUC57-NP B.pMALp5Xx purifiye plasmid DNA'larının agaroz jel görüntüsü.

4.3.Kodon Optimize NP geninin pMALp5x Vektörüne Klonlanması Amacıyla PCR ile Çoğaltılması

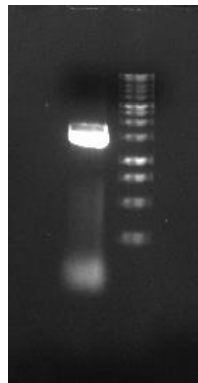
Bu amaçla pUC57-NP plasmidi templeyt olarak kullanılarak kodon optimize NP geni PCR ile çoğaltıldı. pMALp5x vektörünün klonlama bölgesine uygun olarak primer çiftlerine EcorI ve NdeI enzim kesim bölgeleri eklendi. PCR sonucunda beklenildiği gibi 1500 baz çifti (bç) büyüklüğündeki PCR ürünü elde edildi. (Şekil 10)



Şekil 10:1500 bç büyüklüğündeki PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.

4.4.Kodon Optimize NP PCR Ürünün Jel Pürifikasyonu

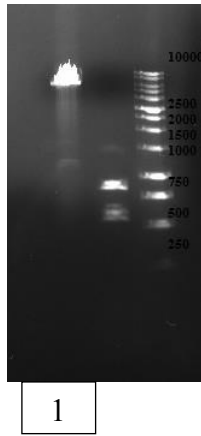
PCR ürünleri birleştirilerek agaroz jelde yürütüldü ve jel pürifikasyonu gerçekleştirildi (Şekil 11). Elde edilen miktar $3.86\mu\text{g}/\mu\text{l}$ olarak belirlendi.



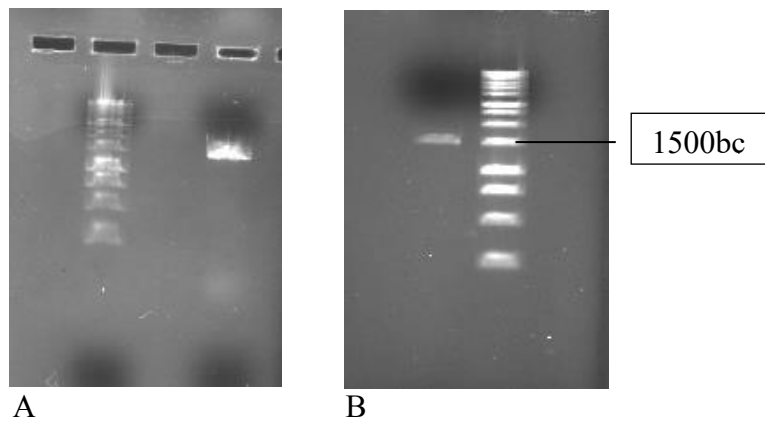
Şekil 11: Kodon optimize NP geninin PCR ürünün agaroz jel görüntüsü

4.5.Kodon Optimize NP PCR Ürünün ve pMALp5x Plasmidinin Kesim Enzimleriyle Kesilmesi ve Ligasyonu.

Klonlama işleminin gerçekleştirilmesi için hem pMALp5x plasmidi (Şekil 12) hem de jel pürifiye ve kodon optimize NP PCR ürününün EcorI (Şekil 13A) ve NdeI (Şekil 13B) kesim enzimleriyle kesildi. Kesim reaksiyonuna 5µg pMALp5x plasmid DNA'sı eklendi ve diğer tüpte de aynı şekilde hazırlanmış 5µg pürifiye pUC57-NP DNA'sı ve aynı konularak kesim işlemi, 37°C'de su banyosunda bir gece boyunca gerçekleştirildi.

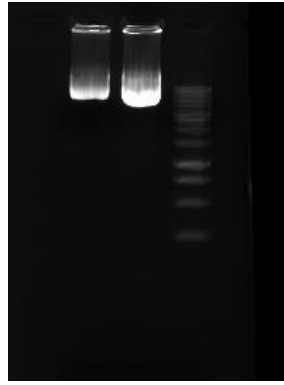


Şekil 12: Lane 1: pMALp5x vektörünün EcorI ve NdeI kesim enzimleriyle kesimi sonucunun agaroz jel görüntüsü. Lane 3: DNA ladder.



Şekil 13: Kodon optimize NP PCR ürünün EcorI kesimi (Şekil 13A) ve NdeI kesiminin (Şekil13B) agaroz jel görüntüsü.

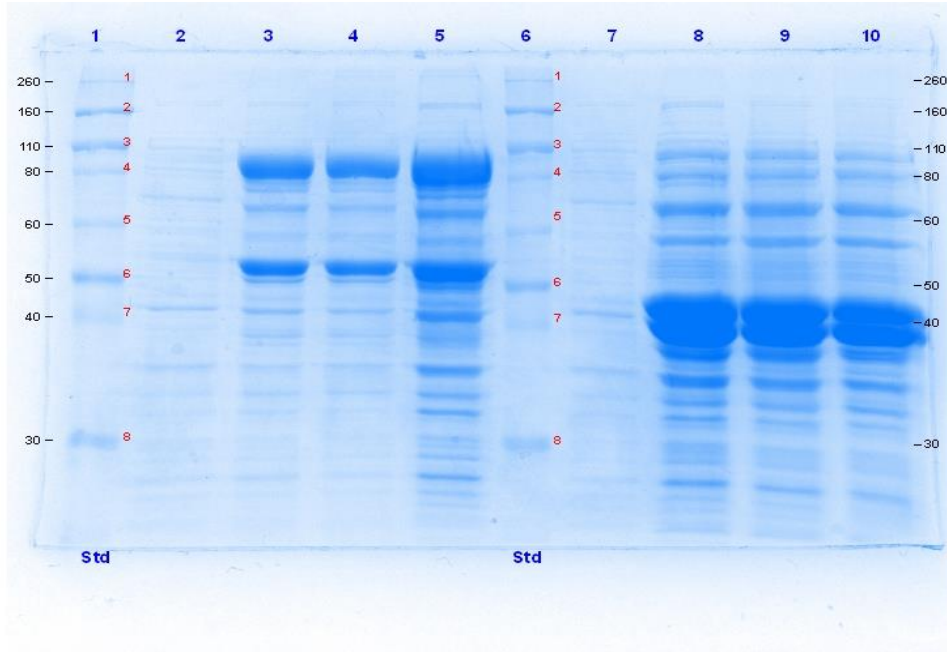
EcoRI ve NdeI ile kesimi gerçekleştirilmiş olan pMALp5x plasmidi ve kodon optimize NP PCR ürününün jel pürifikasyonu yapılarak ligasyon işlemi amacıyla pMALp5x vektöründen 80 ng ve kodon optimize NP PCR ürününden 50ng miktarı kullanılarak ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi. Daha sonra, ligasyon ürünlerinin kompetant hücrelerine transformasyonu yapıldı. Transformasyon sonucu alınan kolonilerin istenilen gen bölgesine sahip oldukları koloni PCR ile belirlenerek pozitif sonuç veren kolonilerden plasmid DNA'sı elde edildi (Şekil 9) ve pMALp5x-NP olarak isimlendirildi.



Şekil 14 : Rekombinant pMALp5x-NP plasmid DNA agaroz jel görüntüsü.

4.6. pMALp5x-NP Plasmidinin Prokaryotik Sistemde Üretilmesi

Bu amaçla pMALp5x-NP ve boş pMALp5x vektörleri *E. coli* BL21 C43(DE3) kompetan hücrelerine aktararak 5ml LB besi ortamı içerisinde başlangıç kültürü olarak üretildi. Başlangıç kültüründen 2ml miktarında alınan hücreler 250ml 100 µg/mL ampicilin içeren LB içerisinde 37°C'de kültür ortamında OD₆₀₀ 0,6 ulaşmaya kadar büyütüldü, kültürden belirli miktarda tetiklenmemiş kontrol örneği alındıktan sonra 1mM IPTG eklenerek kültür sıcaklığı 37°C olan ortamda 6 saat boyunca proteinin üretilmesi sağlandı. Daha sonra, belirli miktarda tetiklenmiş örnek alınarak SDS-PAGE ile analizi için saklandı.



Şekil 15: Rekombinant NP proteinin IPTG ile tetiklenmesinin SDS-PAGE analizi. Lane 1: marker, Lane 2: pMALp5x-NP vektörünün tetiklenmemiş örneği, Lane 3: pMALp5x-NP 2 saat IPTG ile tetiklenmiş örneği, Lane 4: 4 saat IPTG ile tetiklenmiş pMALp5x-NP, Lane 5: 6 saat IPTG ile tetiklenmiş pMALp5x-NP, Lane 6 : marker, Lane 7 : boş pMALp5x vektörünün tetiklenmemiş örneği, Lane 8 : 2 saat IPTG ile tetiklenmiş boş pMALp5x, Lane 9 : 4 saat IPTG ile tetiklenmiş boş pMALp5x örneği, Lane 10 : 6 saat IPTG ile tetiklenmiş boş pMALp5x örneği.

Rekombinant pMALp5x-NP vektöründe bulunan maltose binding füzyon proteini büyüklüğü 42.5 kDa ve NP proteinin büyüklüğü ise yaklaşık olarak 55 kDa olması sebebiyle üretilmesi beklenen rekombinant proteinin büyüklüğü 100 kDa'dur. Tetiklenmemiş pMALp5x-NP vektörünün rekombinant protein üretmediği görülmektedir. (Şekil 15, Lane 2). 1mM IPTG ile 2, 4, ve 6 saat yapılan tetikleme sonucunda üretilmesi beklenen rekombinant pMALp5x-NP proteini beklendiği şekilde ortalama 100 kDa büyüklüğünde bulunmuştur ve 6 saat tetikleme sonucunda daha yüksek miktarda rekombinant proteinin üretildiği belirlenmiştir. (Şekil 15, Lane 3-5). Kontrol olarak kullanılan ve KKKAH virüsü kodon optimize NP geni içermeyen boş pMALp5x plasmidinin tetiklenmemiş örneğinde protein üretimi gözlenmezken (Şekil 15, Lane 7) tetiklenmiş örneklerde boş pMALp5x'de bulunan yaklaşık 40-50 kDa büyüklüğündeki maltose binding füzyon protein üretimi beklendiği şekilde

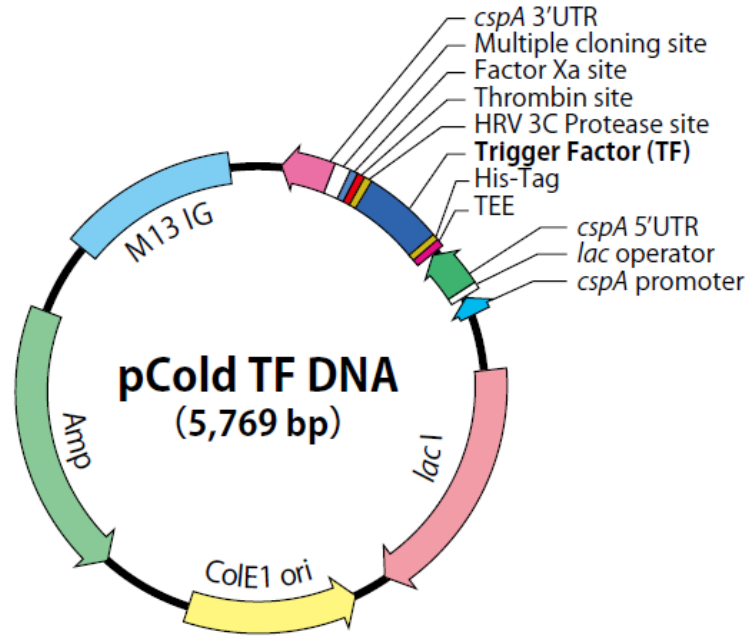
gerçekleşmiştir (Şekil 15, Lane 8-10). Bu sonuçlar KKKAH virüsü rekombinant NP proteinin pMALp5x sisteminde spesifik şekilde üretildiğini göstermektedir.

4.7. pMALp5x-NP Vektörü Kullanılarak Rekombinat NP Proteinin Üretilmesi ve Saflaştırılması İşlemleri

Rekombinant pMALp5x-NP proteinin üretilmesinin tetiklenmesi IPTG ile sağlandıktan sonra elde edilen proteinin saflaştırılması basamakları NEB amiloz resin kolonları ile gerçekleştirildi. Üretilen proteinin saflaştırılmasında amiloz resin kullanıldı. Saflaştırılmak istenilen proteindeki maltose binding protein amiloza affinite göstermekte ve geri döndürülebilir şekilde bağlanması sağlandı. Sonrasında kolon birkaç defa yıkandıktan sonra kolon tamponu içerisine eklenen maltoz ile MBP aracılığıyla resine bağlı olan protein kolondan ayrılması ve elde edilmesi çalışıldı. Bu çalışmada tetiklenen proteinin amiloz resinle saflaştırılması sırasında tetiklenme işleminden sonra pellet olarak alınan inklüzyon cisimciği ve süpernatant olarak alınan üst sıvının ayrı ayrı saflaştırılma işlemleri uygulandı. Ancak bu işlemlerin ardından istenilen rekombinant protein amiloz resin kolondan alınamadı ve protein saflaştırılması gerçekleştirilmedi. Defalarca üretilen rekombinat NP proteinin saflaştırılması denendiği halde yeterli miktarda saf rekombinant protein elde edilemedi. Bu sebeple de rekombinant pMALp5x-NP proteinin biyolojik aktivitesi belirlenemedi.

4.8.pCOLDTF vektörü ve plasmid DNA Eldesi

pMALp5x sistemi kullanılarak istenilen miktarda rekombinat NP proteini saflaştırılmadığı için, rekombinant NP proteinin istenilen miktarda üretilerek saflaştırılması için bir başka plasmid olan pCOLDTF vektörü seçildi (Şekil 16). pCOLDTF vektörü TOP10 kompetan hücrelerine transformasyonu gerçekleştirilerek plasmid DNA eldesi yapıldı (Şekil 17).



Şekil 16 : pCOLDTF vektörü haritası.

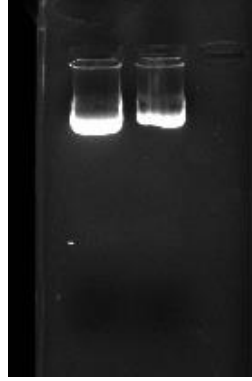
pCOLDTF plasmid DNA elde edildi ve elde edilen miktar $2.83\mu\text{g}/\mu\text{l}$ olarak belirlendi.



Şekil 17: QIAGEN plasmid DNA purifikasyon kiti ile elde edilmiş pCOLDTF plasmid DNA'sının agaroz jel görüntüsü.

4.9. pUC57-NP plasmidinden DNA elde edilmesi

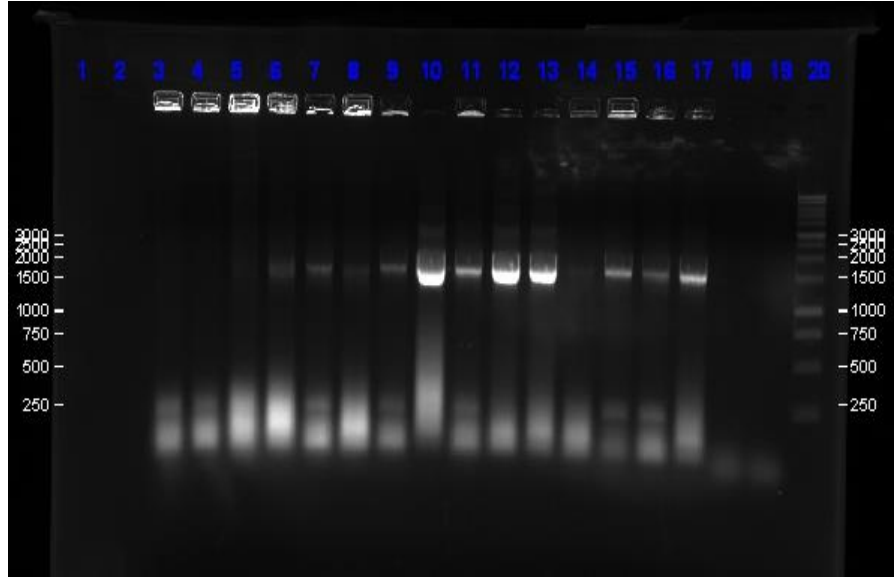
Kodon optimize NP genini içeren pUC57-NP plasmid DNA eldesi gerçekleştirildi (Şekil 18). Elde edilen plasmid DNA miktarı $1.65\mu\text{g}/\mu\text{l}$ olarak belirlendi.



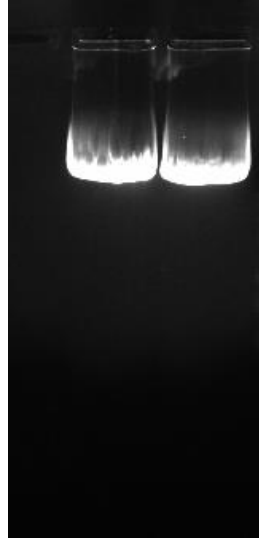
Şekil 18: pUC57-NP plasmidinin DNA eldesinin agaroz jel görüntüsü.

4.10.pUC57-NP ve pCOLDTF Plasmidinin Kesim Enzimleriyle Kesilmesi ve Ligasyon İşlemi

Klonlama işleminin gerçekleştirilmesi için hem pUC57-NP plasmid DNA'sı hem de pCOLDTF plasmid DNA'sı NdeI ve XbaI kesim enzimleriyle kesildi. Bunun için, pCOLDTF plasmid DNA'sı NdeI enzimi ile kesilerek ve sonra jel pürifikasyonu yapıldı ardından XbaI enzimi tek enzim kesimi 37°C'de su banyosunda bir gece boyunca gerçekleştirildi. Aynı işlemler pUC57-NP plasmidi için de uygulandı. NdeI ve XbaI ile kesimi gerçekleştirilmiş olan pCOLDTF plasmidinin jel pürifikasyonu yapıldı ve aynı şekilde pUC57-NP plasmidinden kesilen 1.5 kb büyüklüğündeki kesim ürününe jel pürifikasyonu yapıldı. pCOLDTF vektöründen 45 ng, purifiye edilmiş kodon optimize NP geninden ise 100ng kullanılarak ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi. Daha sonra, ligasyon ürünlerinin kompetant hücrelerine transformasyonu gerçekleştirildi. Transformasyon sonucu alınan kolonilerin istenilen gen bölgesine sahip oldukları koloni PCR ile belirlenerek (Şekil 19) pozitif sonuç veren kolonilerden plasmid DNA'sı elde edildi (Şekil 20) ve elde edilen rekombinant plasmid pCOLD-NP olarak isimlendirildi.



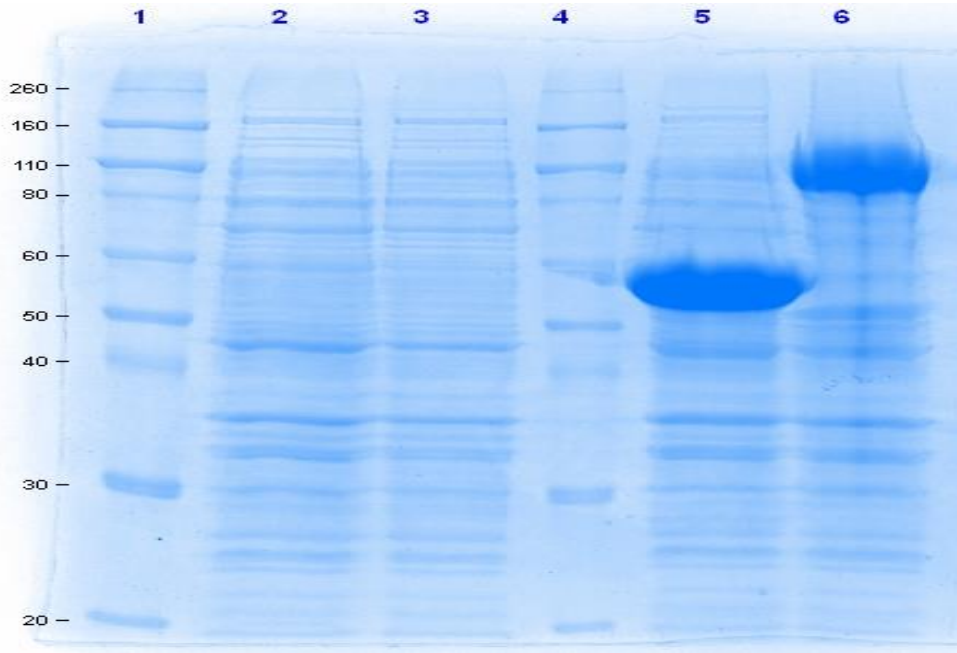
Şekil 19: Koloni PCR ile 1500 bp büyüklüğündeki spesifik kolonilerin belirlenmesi.



Şekil 20: Rekombinant pCOLD-NP plasmid DNA agaroz jel görüntüsü.

4.11.pCOLDTF-NP Plasmidinin Prokaryotik Sistemde Üretilmesi

pCOLDTF-NP ve boş pCOLDTF plasmidleri, *E. coli* BL21 C43(DE3) kompetan hücrelerine aktarılarak 5ml LB besi ortamı içerisinde başlangıç kültürü olarak üretildi. Başlangıç kültüründen 2ml miktarında alınan hücreler 40ml 100 µg/mL ampicilin içeren LB içerisinde 37°C’de kültür ortamında OD₆₀₀ ~0,6 ulaşınca kadar büyütüldü ve kültürden belirli miktarda tetiklenmemiş kontrol örneği alındıktan sonra 1mM IPTG eklenerek kültür sıcaklığı 16°C indirilip bu ortamda 18 saat boyunca proteinin üretilmesi sağlandı. Daha sonra, belirli miktarda tetiklenmiş örnek alınarak SDS-PAGE ile analizi için saklandı.



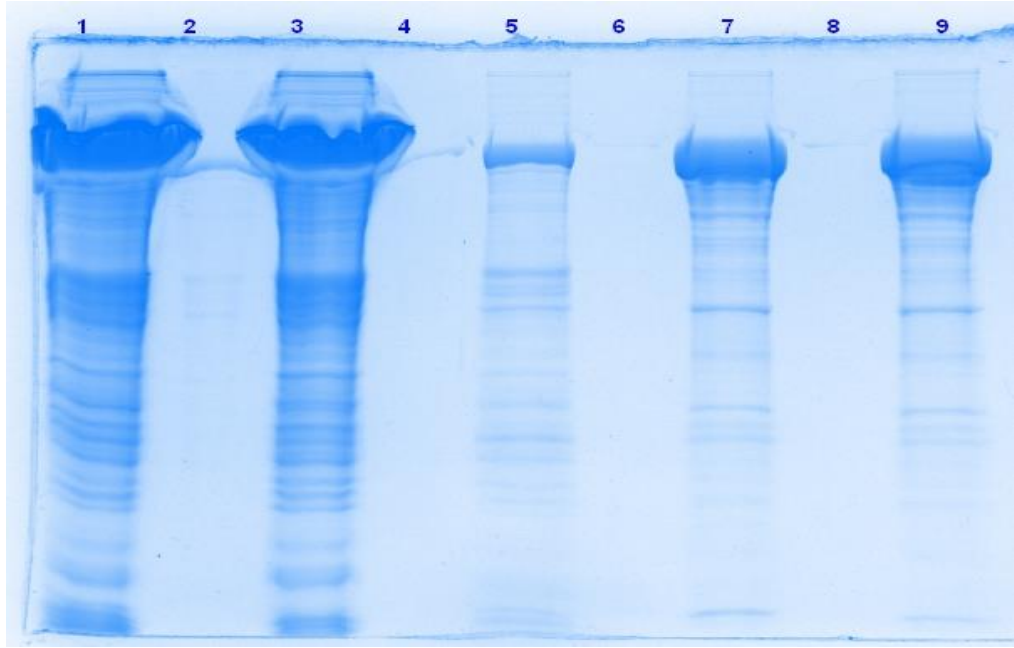
Şekil 21: Rekombinant pCOLDTF-NP proteinin IPTG ile tetiklenmesinin SDS-PAGE analizi.

Lane 1: marker, Lane 2 Boş pCOLDTF vektörünün tetiklenmemiş örneği, Lane 3: pCOLDTF-NP tetiklenmemiş örneği, Lane 4: Marker, Lane 5: Boş pCOLDTF vektörünün 18 saat IPTG ile tetiklenmesi, Lane 6: pCOLDTF-NP 18 saat IPTG ile tetiklenmiş örneği.

Rekombinant pCOLDTF-NP vektöründe bulunan trigger faktörünün büyüklüğü 48kDa ve NP proteinin büyüklüğü ise yaklaşık olarak 55 kDa olması sebebiyle üretilmesi beklenen rekombinant proteinin büyüklüğü 110 kDa'dur. Tetiklenmemiş pCOLDTF-NP ve boş pCOLDTF vektörlerinin rekombinant protein üretmediği görülmektedir (Şekil 21, Lane 2,3) IPTG ile 16°C'de 18 saat süreyle rekombinant pCOLDTF-NP vektörün tetiklenmesi sonucunda üretilmesi beklenen rekombinant pCOLDTF-NP proteini beklendiği şekilde ortalama 110 kDa büyüklüğünde bulunmuştur (Şekil 21, Lane 6). Aynı şekilde kontrol amacıyla IPTG ile 16°C'de 18 saat süreyle boş pCOLDTF vektör de bulunan ve 48 kDa olan trigger faktör proteinin üretildiği görülmektedir (Şekil 21, Lane 5). Elde edilen sonuçlar KKKAH virüsü rekombinant NP proteinin pCOLDTF sisteminde spesifik şekilde üretildiğini göstermektedir (Şekil 21, Lane 6).

4.12. pCOLDTF-NP Vektörü Kullanılarak Rekombinat NP Proteinin Üretilmesi ve Saflaştırılmasının SDS-PAGE ile Analizi

Rekombinant pCOLDTF-NP proteinin üretilmesinin tetiklenmesi IPTG ile sağlandıktan sonra elde edilen proteinin saflaştırılması basamakları Qiagen Ni-NTA kolonları ile gerçekleştirildi. Üretilen proteinin saflaştırılmasında Ni-NTA ile konjuge edilmiş agaroz küreciklerden oluşan resin kullanıldı. Saflaştırılmak istenilen proteindeki His-Tag Nikel atomlarına affinite göstermekte ve geri döndürülebilir şekilde bağlanmaktadır. Sonrasında kolon birkaç defa yıkandıktan sonra pH'ın kademeli olarak düşürülmesiyle kolona His-Tag aracılığıyla bağlı olan protein kolondan ayrılarak ve saf olarak elde edildi. Bu çalışma prensibine göre üretilen rekombinant pCOLDTF-NP proteinin saflaştırılması hazırlanan farklı pH'lardaki tampon solüsyonları ile gerçekleştirildi. Son basamak olan elüsyon basamağında istenilen proteinin mümkün olabildiğince diğer kontaminantlardan arınmış şekilde alınması sağlandı. SDS-PAGE yöntemi ile üretilen rekombinant pCOLDTF-NP protein örneğinin kolona uygulanmasının öncesi ve kolona uygulandıktan sonraki alt akım, yıkama ve elüsyon adımları tek tek analiz edildi ve protein marker yardımıyla proteinin büyüklüğü belirlendi. Saflaştırılması beklenen rekombinant pCOLDTF-NP proteinin büyüklüğü pCOLD-TF vektöründe bulunan trigger faktörünün büyüklüğü 48kDa olmak üzere rekombinant proteinin büyüklüğü beklendiği gibi yaklaşık olarak 110kDa civarında bulundu.

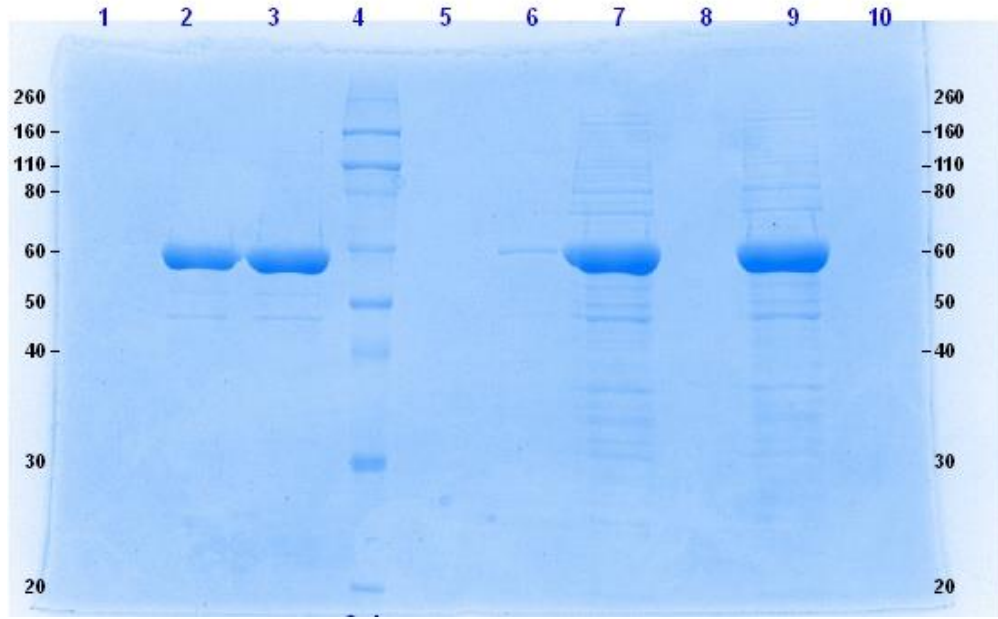


Şekil 22: Rekombinant pCOLDTF-NP proteinin saflaştırılmasının basamakları. Lane 1: Üretilen rekombinant proteinin kolon işlemi öncesi, Lane 3: Örnek kolona uygulandıktan sonraki alt akım, Lane 5: Kolon yıkama adımı, Lane 7 ve 9: Elüsyon adımları, Lane 2,4,6,8: boş kuyucuklar.

Proteinin saflaştırılmasının SDS-PAGE ile analizinde görüldüğü üzere; istenilen mümkün olduğunca saflaştırılması sağlandı ve elüsyon adımlarında yaklaşık 110 kDa büyüklüğünde rekombinant protein elde edildi (Şekil 22, Lane 7, 9).

4.13.İnsert İçermeyen Boş pCOLDTF Vektörü Kullanılarak Trigger Faktörünün SDS-PAGE ile Görüntülenmesi

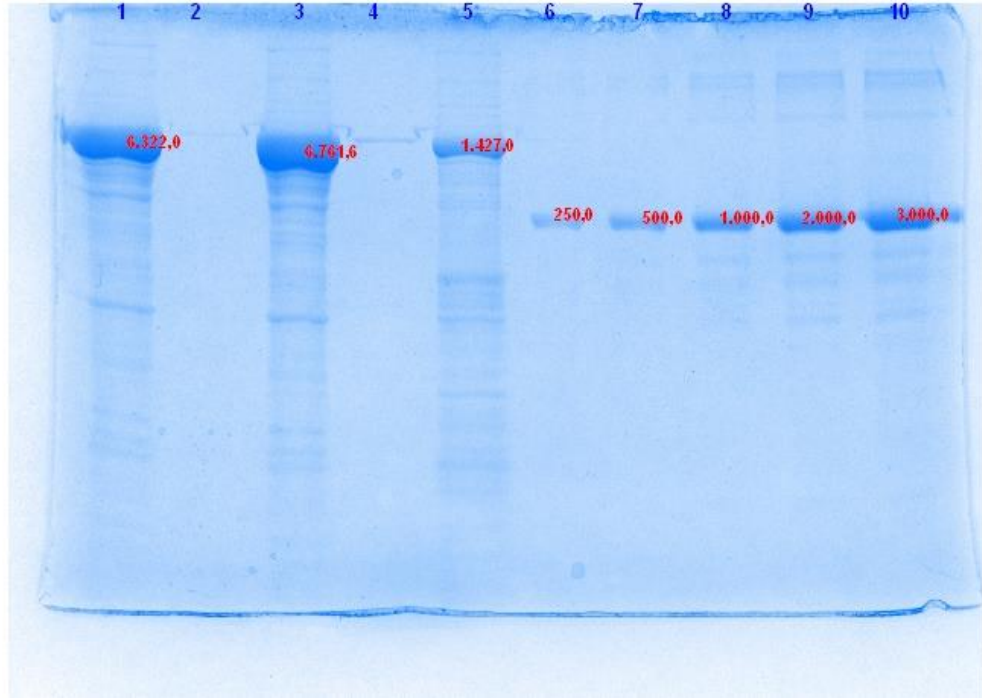
pCOLDTF vektörünün istenilen gen bölgesini içermeyen sadece vektörün kendisinde bulunan trigger şaperon proteinin üretimi IPTG ile tetiklenerek gerçekleştirildi ve kontrol grubu olması amacıyla rekombinant gen bölgesini içermeyen proteinin elde edilmesi ve saflaştırılması yapıldı. Bu sebeple saflaştırılan boş pCOLDTF tarafından üretilen trigger şaperon protein 50-60kDa civarında bulunduğu belirlendi (Şekil 23, Lane 7, 9).



Şekil 23: Boş pCOLDTF proteinin saflaştırılmasının basamakları. Lane 2: Üretilen proteinin kolon işlemi öncesi, Lane 3: Örnek kolona uygulandıktan sonraki alt akım, Lane 6 : Kolon yıkama adımı, Lane 7 ve 9 : Elüsyon adımları, Lane 4 : marker. Lane 1,5,8,10: Boş kuyucuklar.

4.14.Saflaştırılan Rekombinat NP Proteinin Miktarının Belirlenmesi

Rekombinant pCOLDTF-NP proteinin üretimi sonrasında proteinin biyolojik aktivitesinin belirlenmesi işlemleri için ne kadar proteinin saflaştırıldığı hesaplandı. SDS-PAGE analizi yöntemiyle miktarı bilinen kontrol BSA proteini farklı konsantrasyonlarda kuyucuklara yüklenerek, saflaştırılmış rekombinant pCOLDTF-NP proteinin relatif olarak miktarı Chemidoc cihazındaki program ile analiz edildi (Şekil 24).



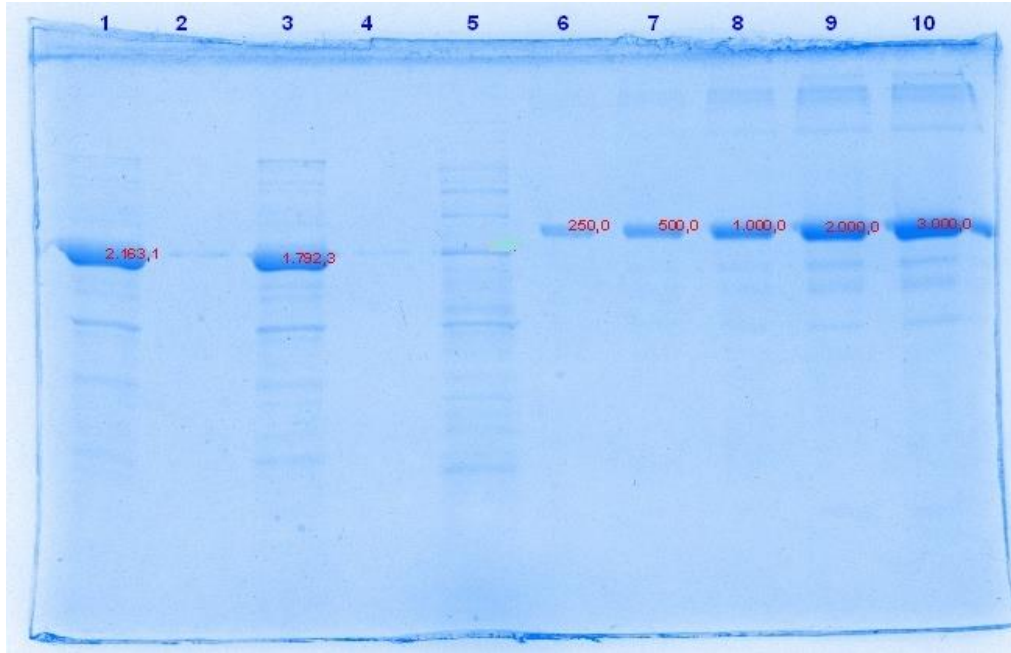
Şekil 24: Saflaştırılan rekombinant NP proteinin miktarının belirlenmesi Lane 1: Elüsyonu yapılmış rekombinant NP proteini, Lane 3 : Elüsyonun 2.adımındaki rekombinant NP proteini, Lane 5 : Yıkama adımındaki rekombinant NP proteini, Lane 6,7,8,9,10 : sırasıyla 250 ng, 500 ng, 1000 ng, 2000 ng, 3000 ng BSA, Lane 2,4 : boş kuyucuklardır.

Chemidoc cihazının kantitatif olarak miktarı belirli olan proteine göre saflaştırılmış proteinin miktarının belirlenmesinde; ilk elüsyon adımında yaklaşık 6000 ng, ikinci elüsyon adımında da yaklaşık 6000 ng olarak hesaplandı. Ancak kayıplarında olduğu düşünülerek 5000 ng olarak hesaplanmasına karar verildi. Kuyucuklara yüklenen rekombinant protein miktarı 10µl olduğu için hesaplama sonucu elde edilen protein 500 ng/µl bulundu.

4.15.Saflaştırılan boş pCOLDTF Proteinin Miktarının Belirlenmesi

Kontrol amacıyla üretilen boş pCOLDTF proteinin negatif kontrol olarak kullanılmak üzere ne kadar proteinin saflaştırıldığı hesaplandı. SDS-PAGE analizi yöntemiyle miktarı bilinen kontrol BSA proteini bazı kuyucuklara yüklenerek, saflaştırılmış boş pCOLDTF proteinin de diğer kuyucuklara yüklenmesiyle Chemidoc cihazındaki

program ile kantitatif analizi gerçekleştirildi. Bu şekilde ne kadar μg protein saflaştırıldığı belirlendi.



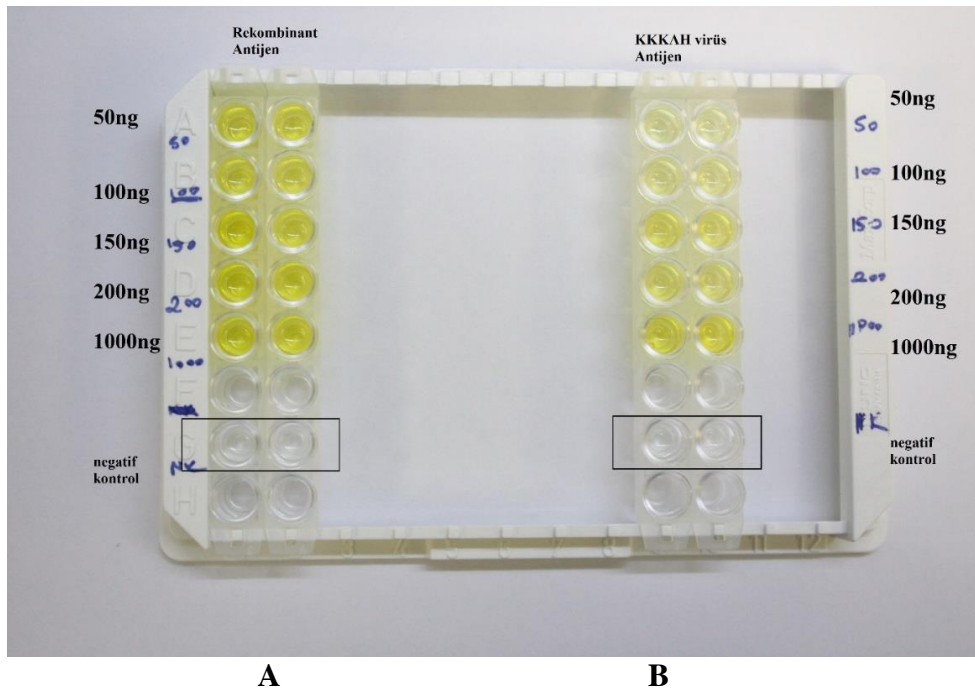
Şekil 25: Saflaştırılan trigger faktör protein miktarının belirlenmesi. Lane 1: Elüsyonu yapılmış trigger faktör protein, Lane 3 : Elüsyonun 2.adımındaki trigger faktör protein , Lane 5 : Yıkama adımındaki trigger faktör protein, Lane 6,7,8,9,10 : sırasıyla 250 ng, 500 ng, 1000 ng, 2000 ng, 3000 ng BSA, Lane2,4 :boş kuyucuklardır.

Chemidoc cihazının kantitatif olarak miktarı belirli olan proteine göre saflaştırılmış proteinin miktarının belirlenmesinde; ilk elüsyon adımında yaklaşık 2000 ng, ikinci elüsyon adımında da yaklaşık 1700 ng olarak hesaplandı. Bunun sonucunda protein miktarının ortalamaya göre 2000 ng olarak hesaplanmasına karar verildi. Kuyucuklara yüklenen rekombinant protein miktarı $10\mu\text{l}$ olduğu için hesaplama sonucu elde edilen protein $200\text{ ng}/\mu\text{l}$ bulundu.

4.16.pCOLDTF-NP Rekombinant antijeni Kullanarak ELISA Geliştirilmesi

Grubumuz tarafından 108G126 nolu TÜBİTAK projesi kapsamında inaktif KKKAH virüs antijeni kullanılarak fare IgG ELISA sistemi daha önce geliştirilmişti. Bu çalışmayla pCOLDTF vektör sisteminde üretilen ve daha sonra saflaştırılan

rekombinant NP antijenin, fare IgG ELISA sisteminde antijen olarak kullanılması ve biyolojik olarak aktif olup olmadığının saptanması amacıyla ELISA testi yapıldı. Bu amaçla, ELISA pleytlerine rekombinat NP antijeni ve inaktif KKKAH virüsü antijeninden sırasıyla 50 ng, 100 ng, 150 ng, 200 ng ve 1000 ng miktarlarında bağlandı. 108G126 nolu TÜBİTAK projesi kapsamında yapılan çalışmalarda elde edilen KKKAH virüsü IgG pozitif olduğu bilinen fare serumu ve negatif fare serumları ELISA testinde primer serumlar olarak 1/100 oranında sulandırılarak kullanıldı. Konjugat olarak keçi anti-fare IgG konjugatı 1/10000 oranında kullanıldı ve daha sonra görüntüleme işlemi yapıldı.



Şekil 26: Fare IgG ELISA geliştirilmesinde pCOLDTF-NP rekombinant antijeni, ve inaktif KKKAH virüsü antijeni kullanılarak yapılan ELISA sonuçlarının görünümü. Şekil 26A A1-A2 50 ng rekombinant NP antijeni, B1-B2 100 ng rekombinant NP antijeni, C1-C2 150 ng rekombinant NP antijeni, D1-D2 200 ng rekombinant NP antijeni ve E1-E2 1000 ng miktarında rekombinant NP antijeni bağlanmıştır. Şekil 26B A1-A2 50 ng inaktif KKKAH virüsü antijeni, B1-B2 100 ng inaktif KKKAH virüsü antijeni, C1-C2 150 ng inaktif KKKAH virüsü antijeni, D1-D2 200 ng inaktif KKKAH virüsü antijeni ve E1-E2 1000 ng miktarında inaktif KKKAH virüsü antijeni bağlanmıştır. KKKAH virüsü IgG negatif olduğu bilinen serumun test edildiği Şekil 26A G1-G2 kuyucuklarına 1000 ng miktarında rekombinant NP antijeni ve Şekil 26B G1-G2 kuyucuklarına 1000 ng miktarında inaktif KKKAH virüsü antijeni bağlanmıştır.. Cut off değeri: 0.112 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 1: Fare IgG ELISA geliştirilmesinde pCOLDTF-NP rekombinant antijeni, ve inaktif KKKAH virüsü antijeni kullanılarak yapılan ELISA ve OD değerleri.

	Rekombinant antijen		KKKAH virüs antijeni	
	1	2	3	4
A	0.6352	0.6355	0.2210	0.2175
B	0.5961	0.5711	0.2789	0.2722
C	0.8639	0.5937	0.4854	0.4287
D	0.8459	0.7503	0.3881	0.3586
E	0,8350	0.7937	0.6422	0.6967
F				
G (Kontrol)	0.0617	0.0562	0.0575	0.545
H				

Tablo 1’de verilen ELISA OD değerleri incelendiğinde pCOLDTF-NP antijenin 200 ng bağlandığı OD sonucu 0.8459 ve 0.7503’tür. Bununla birlikte 1000 ng bağlanan KKKAH virüs antijeni OD değerleri 0.6422 ve 0.6967 olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar rekombinant NP antijenin KKKAH virüs antijeni ile karşılaştırıldığında daha az miktarlarda kullanılması durumunda pozitif kontrol olarak kullanılan KKKAH virüs antijeni ile benzer sonuçları verdiği belirlenmiştir (Tablo 1) Bu sonuçlar aynı zamanda rekombinant NP proteinin biyolojik olarak aktif olduğunu ve IgG pozitif fare serumu ile spesifik olarak reaksiyona girdiğini göstermektedir.

4.17.pCOLDTF-NP Rekombinant Antijenin KKKAH virüsü IgG Pozitif Farklı Fare Serum Sulandırılmalarındaki Etkinliğinin Saptanması

Bu amaçla, KKKAH virüsü IgG pozitif olduğu bilinen 4 fare seçildi ve serumların 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200, 1/6400, 1/12800, 1/25600, 1/51200 sulandırılmaları ELISA ile test edildi. ELISA testinde antijen olarak 200 ng rekombinant pCOLDTF-NP ve 1000 ng inaktif KKKAH virüsü antijenleri kullanılarak farklı serum sulandırılmalarının değerlendirilmesi amacıyla ELISA pleytlerine bağlandı. Konjugat olarak keçi anti-fare IgG konjugatı 1/10000 oranında kullanıldı ve daha sonra görüntüleme işlemi yapıldı.

Tablo 2: pCOLDTF-NP rekombinant antijeni ve inaktif kısmi pürifiye KKKAH virüs antijenleri kullanılarak yapılan IgG pozitif olduğu bilinen farklı fare serum sulandırılmalarındaki ELISA OD değerleri. (Cut off değeri 0.058 olarak hesaplanmıştır)

		Rekombinant antijen 200ng			
Serum sulandırılmaları		Serum 1	Serum 2	Serum 3	Serum 4
A	1/400	0,1596	0,3317	0,1295	0,1377
B	1/800	0,1124	0.2110	0.0953	0.1098
C	1/1600	0,0889	0.1460	0.0770	0.0991
D	1/3200	0,0693	0.1044	0.0656	0.0760
E	1/6400	0,0760	0.0792	0.0607	0.0627
Serum sulandırılmaları		KKKAH virüs antijeni 1µg			
		Serum 1	Serum 2	Serum 3	Serum 4
A	1/400	0.8626	0.9412	0.9782	0.9837
B	1/800	0.7201	0.8276	0.7615	0.9059
C	1/1600	0.6150	0.6704	0.6432	0.7525
D	1/3200	0.4722	0.6253	0.5080	0.8693
E	1/6400	0.3395	0.4444	0.3382	0.4419

Tablo 2 verilen OD değerleri incelendiğinde 1000 ng olarak bağlanan KKKAH virüsü antijenin rekombinant NP antijeni karşılaştırıldığında daha yüksek serum sulandırılmalarında pozitif reaksiyon verdiği anlaşılmaktadır. Bununla beraber rekombinant NP antijeni kullanıldığında yüksek serum sulandırılmalarında elde edilen OD değerlerinin azaldığı görülmektedir. Bu sonuçlar rekombinant NP antijenin spesifik olarak reaksiyona girdiğini ve biyolojik olarak aktif olduğunu göstermektedir.

4.18.Rekombinant pCOLDTF-NP Antijeni ile Farelerin İmmünizasyonu ve ELISA ile Test Edilmesi

ELISA testi ile pCOLD vektörü kullanılarak prokaryotik sistemde üretilen ve daha sonra saflaştırılan rekombinant NP proteinin biyolojik olarak aktif olduğu ve KKKAH virüsü fare ELISA sisteminde spesifik olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. Rekombinant NP proteinin biyolojik olarak aktif oduğunun teyit edilmesi ve antijenik

özelliğinin araştırılması amacıyla rekombinat NP proteini ile Balb/c fareleri immünize edilmiştir. Bu amaçla, 5 adet 8-10 haftalık dişi Balb-C farelerinden biri kontrol grubu olmak üzere 100 µg pCOLDTF antijeni ve diğer dört fareye 100 µg pCOLDTF-NP rekombinant antijeni intramusküler olarak 3 hafta aralıklar ile 3 defa olmak üzere verilmiştir. İmmünizasyonlarda adjuvant olarak Freund adjuvant sistemi kullanılmıştır. Son immünizasyondan 2 hafta sonra alınan fare kan serumları ELISA ile test edilmiştir. pCOLDTF-NP rekombinant antijeni ile immünize edilen 4 farklı fareden alınan serumlar ile boş pCOLDTF antijeni ile immünize edilen kontrol fare serumu immünizasyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek üzere test edildi. Rekombinant pCOLDTF-NP antijeninden kuyucuklara 200 ng bağlandı ve immünize farelerden alınan serumlar 1/100 oranında sulandırıldı. Keçi anti-fare konjugatı 1/10000 oranında bloklama solüsyonu ile sulandırıldı ve daha sonra görüntülendi.

Tablo 3 Rekombinant pCOLDTF-NP antijeni ile farelerin immünizasyonunun ELISA OD değerleri. A: boş pCOLDTF antijeni ile immünize edilen fare serumları OD değerleri. (cut off değeri 0.0415 olarak hesaplanmıştır.) B: pCOLDTF-NP antijeni ile immünize edilen 1.fare serumu. C: pCOLDTF-NP antijeni ile immünize edilen 2.fare serumu. D: pCOLDTF-NP antijeni ile immünize edilen 3.fare serumu. E: pCOLDTF-NP antijeni ile immünize edilen 4.fare serumu. Lane 5: immünizasyon öncesi alınan serum.

		1	2	3	4	5(Kontrol)
A		0.6108	0.5370	0.6204	0.0526	0.0434
B	Serum 1	0.4780	0.4227	0.5497	0.5951	0.0393
C	Serum 2	0.5743	0.6578	0.4499	0.4105	0.0435
D	Serum 3	0.4879	0.3402	0.4212	0.3373	0.0393
E	Serum 4	0,4455	0.4242	0.4171	0.3736	0.0420

Tablo 3’de görüldüğü gibi kontrol grubuyla karşılaştırıldığında pCOLDTF-NP rekombinant antijeni ile immünize edilen farelerin tümü ELISA testinde pozitif olarak bulundu. Bu sonuçlar pCOLDTF-NP rekombinant proteinin antijenik özellikte olduğunu göstermektedir. Bununla beraber yapılan Western Blotlama deneyi sonrasında da pCOLDTF-NP proteini ile KKKAH virüsü NP’ye karşı geliştirilmiş 6B9G9F11 monoklonal antikoru arasında bir reaksiyon olmadığı belirlendi.

4.19.pCOLDTF-NP Rekombinant Proteinin, KKKAH Yönünden IgG Pozitif İnsan Serumlarında Anti-KKKAH IgG Belirlenmesi Amacıyla ELISA Testinde Kullanılması

Rekombinant pCOLDTF-NP proteinin KKKAH yönünden IgG pozitif olduğu bilinen insan serumlarının ELISA ile test edilmesi için 100 ng, 200 ng, 250 ng, 400 ng gibi değişik miktarlarda pCOLDTF-NP antijeni pleytlere bağlandı ve KKKAH yönünden IgG pozitif serumlar güçlü, orta, zayıf olarak gruplandırıldı. Serumların 1/100 sulandırması yapılarak ELISA testi yapıldı. Ancak pozitif ve negatif kontrol sonuçlarında farklılık bulunamadı ve negatif serumların bazılarında cut off değerinin üzerinde yalancı pozitiflikler saptandı. Metot kısmında ayrıntılı bir şekilde anlatıldığı gibi gerçekleştirilen KKKAH yönünden IgM pozitif olduğu bilinen insan serumlarının ELISA ile test edilmesi sonucunda pozitif ve negatif olduğu bilenen bütün insan serumlarında herhangi bir renk değişimi ve OD yanıtı şekillenmemiştir

5.TARTIŞMA ve SONUÇ

Viral enfeksiyöz hastalıklar, geçmişten günümüze değin halk sağlığını tehdit eden en önemli nedenlerin başında gelmektedir. Viral patojenlerin mutasyonlara bağlı genetik yapılarının değişmesi, iklim değişiklikleri, ekolojik dengelerin bozulması ve gelişen teknoloji sayesinde dünyanın her noktasına insan hareketlerinin olması gibi faktörler viral enfeksiyonların daha önce görülmeyen coğrafyalarda görülmesini sağlamaktadır (80). Özellikle ekolojik dengelerin değişmesi, hızlı mobilizasyon, küresel ısınma gibi faktörler son yıllarda insan sağlığının tehdit eden mikrobiyal patojenlerin önemini arttırmıştır. Sadece ülkemiz için insan sağlığını tehdit patojenlerin değil aynı zamanda dünyada bu konudaki gelişmelerin ve tehditlerin iyi değerlendirilmesi ve risk analizlerinin yapılması gerekmektedir.

Kırım-Kongo kanamalı ateş hastalığı (KKKAH) *Bunyaviridae* ailesinin *Nairovirus* genusunda bulunan üç segmentli negatif polariteli bir RNA virüsü tarafından meydana getirilmektedir. Hastalığı oluşturan virüs Asya, Afrika, Ortadoğu ve Doğu Avrupa'yı içerisine alan geniş bir coğrafyada görülmektedir. Hemoraji ve toksik belirtilerle seyreden hastalığın mortalitesi %5-30 arasındadır. KKKAH virüsü insanlara, enfekte kenelerin ısırmasıyla bulaşır. Aynı zamanda enfekte kenenin çıplak elle ezilmesi, akut enfekte fazdaki hastalarla temas yada viremik çiftlik hayvanlarıyla temas sonrası enfeksiyonun oluştuğu bildirilmiştir. Endemik bölgelerde tarım ve hayvancılıkla uğraşan insanlar kenelerin tesadüfi konakları konumundadır. Endemik bölgelerde yaşayanlar dışında hastane ve sağlık çalışanları da yüksek risk grubunu oluşturmaktadır. Özellikle KKKAH enfekte hastaların hospitalize edildiği hastanelerden çok sayıda nozokomiyal bulaş vakaları rapor edilmiştir (2, 3, 5).

KKKAH, birçok evcil ve yabani hayvanlarda asemptomatik olarak görülürken sadece insanlarda klinik belirtilerle seyretmektedir. Hastalık inkübasyon, prehemorajik,

hemorajik ve konvelasan olmak üzere 4 evreye ayrılır. Ortalama kuluçka süresi 3-9 gündür ve enfeksiyona maruz kalma yoluna göre değişiklik göstermektedir. Başlangıçta spesifik olmayan ateş, kas ağrısı, baş dönmesi, kırılganlık, sırt ve baş ağrısı, fotofobi, mide bulantısı ve karın ağrısı gibi belirtiler görülür. Hemorajik evre ise peteşi, ekimoz ve vücut boşluklarında yaygın kanamalar ile karakterizedir (1, 5, 6).

KKKAH ülkemizin en önemli zoonotik hastalıklarından birisidir. Ülkemizdeki ilk konfirme KKKAH vakaları Tokat ve çevresinde 2002 yılında tespit edilmiş olup yoğun olarak Kelkit vadisi ve çevresindeki kırsal alanlarda çiftçilik ve hayvancılıkla uğraşan kesimde görülmektedir (14). Ülkemizde 2002-03 yıllarında toplam 150 vaka görülmüş mortalite oranı %4,5 olarak belirlenmiştir. 2004-05, vaka sayısı 515, mortalite oranı %5,04 olarak bulunmuştur. 2006 yılında vaka sayısı 341'e yükselirken %7,91 mortalite oranı saptanmıştır. Takip eden yıllarda vaka sayılarında artışlar gözlenmiş olup 2015 yılı sonu itibari ile toplam konfirme KKKAH vaka sayısı 9000'in üzerinde ve mortalite oranı %4-5 oranındadır (T.C. Sağlık Bakanlığı verileri). Viral hastalıklardan korunmada koruyucu aşılama çok önemli bir yer tutmaktadır. Bununla beraber, KKKAH'na karşı FDA tarafından onaylanmış henüz etkili bir aşı yoktur. Sadece fare beyinlerinden üretilerek inaktive edilip hazırlanan anti-KKKAH aşısı Bulgaristan'da Bul Bio Enfeksiyöz ve Parazitik Hastalıklar Ulusal Merkezi (Bul Bio NCIPD) tarafından üretilmektedir. Ancak aşının deneysel olarak virüse karşı koruyucu olduğu belirlenmemiştir. Ayrıca aşının fare beyinlerinden elde edilmesi, insanlarda otoimmün hastalıklar oluşturma riski taşımaktadır ve birçok ülkede kullanımına izin verilmemiştir (2, 3).

Hastalığın spesifik bir tedavisi de yoktur. Destek tedavisi olarak yapılan histamin reseptör blokörlerinin kullanılması, sıvı ve elektrolit dengesinin sürekli olarak izlenmesi, trombosit solüsyonlarının verilmesi, taze donmuş plazma verilmesi ve antikor tedavileri daha çok hastalığın erken teşhisinde olumlu sonuçlar vermektedir. Bu nedenle hastalığın erken teşhis edilmesi oldukça önem taşımaktadır (3, 16)

KKKAH akut vakaların teşhisi amacıyla diğer viral kanamalı hastalıklarda olduğu gibi virus izolasyonu yapılabilmektedir. Bu amaçla, şüpheli örnek yeni doğmuş fare yavruların beynine intrakranial olarak verilmekte ve virüsün izolasyonuna çalışılmaktadır. Bir diğer yöntem hücre kültür sistemi kullanarak virüsün izole edilmesidir. Bu amaçla, Vero-E6, BHK-21, SW-13 ve LLC-MK2 gibi hücre hatları

kullanılmaktadır. Virüsün hücre kültüründen izolasyonu yeni doğmuş fare beyinlerinden yapılan izolasyonlara göre duyarlılığı daha düşüktür ve yüksek virüs konsantrasyonu gerektirmektedir (1, 16, 18). Bununla birlikte KKKAH virüsünün spesifik bir tedavisinin ve koruyucu aşısının olmaması aynı zamanda yüksek derecede patojenitesi nedeniyle bioterorizmde kullanılabileceği nedeniyle CDC (the Centers for Disease Control and Prevention) tarafından kategori C virüsü sınıflandırması nedeniyle yüksek güvenli laboratuvarlarda çalışılması zorunludur (30). Bu nedenlerden dolayı virüsün izole edilmesi pratikte pek kullanılan bir metot değildir. Hastalığın erken teşhisi için kullanılan tersine transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyon (RT-PCR) oldukça hassas ve yaygın olarak kullanılan metotlardan birisidir. Bununla beraber KKKAH virüsünün 7 genotipinin olması ve genetik varyasyonlar göstermesi RT-PCR ile çoğaltılacak gen bölgesini seçilmesi ve primer dizaynı önem taşımaktadır. Yapılan çalışmalarda KKKAH virüsünün 7 genotipi için korunmuş bölgelerin bulunduğu ve primer dizaynlarının bu korunmuş bölgelere uygun olarak yapıldığı bilinmektedir (20). Son yıllarda geliştirilen ve sayısal olarak virüs yükü tespit edilmesinde kullanılan real-time PCR testi in-house PCR testine oranla kontaminasyon riskinin az olması, hızlı ve daha güvenilir sonuçlar vermesi sebebiyle daha avantajlıdır. Hastalığın erken teşhisinde kullanılan indirekt IFA ve antijen-ELISA testleri moleküler tekniklere oranla daha düşük duyarlılığa sahiptirler (2, 3, 30).

KKKAH'nın serolojik tanısının yapılabilmesi için daha önceki yıllarda komplement fiksasyon, immündefüzyon ve ters pasif hemaglutinasyon testi (RPHA) testi gibi testler kullanılmıştır. Bununla beraber bu testlerin duyarlılıklarının çok düşük olması nedeniyle günümüzde uygulama alanı yoktur (1, 6, 30). Aynı şekilde KKKAH'na karşı oluşan nötralizan antikor yanıtını tespit edecek yöntemler son yıllara kadar geliştirilememiştir.

Günümüzde, serolojik yöntemlerden en yaygın olarak kullanılan ELISA ve IFA yöntemleridir. Hastalık semptomları ortaya çıktıktan sonraki ilk bir hafta sonrasında spesifik IgM yanıtı ve daha sonraki süreçte IgG antikorları bu yöntemlerle saptanabilmektedir. Yeni bir enfeksiyon ise çift örnekli serumda 4 kat titre artışı veya tek bir örnekte IgM antikorlarının saptanması ile tanımlanır. Enfeksiyondan 4 ay sonra spesifik IgM belirlenebilir düzeyin altına düşerken IgG en az 5 yıla kadar belirlenebilir düzeyde kalmaktadır (2, 5, 6, 30).

Viral kanamalı hastalıklar son yıllarda geniş bir coğrafyada görülmektedir. Bunun nedenleri arasında küresel ısınma ve buna bağlı olarak iklim şartlarının değişmesi, vejetasyon ve nem gibi faktörlerdeki değişimler, gelişen teknoloji ile birlikte çok uzak coğrafyalara ulaşımın kolaylaşması ve buna bağlı olarak arthropod kaynaklı etkenlerin kolaylıkla bir bölgeden diğer bölgelere kolaylıkla taşınması gibi faktörler sayılabilir. Viral kanamalı hastalıkların büyük bir çoğunluğuna karşı ruhsatlanmış koruyucu aşılar mevcut değildir. Viral kaynaklı hastalıklar oldukları için tedavide kullanılan antivirallerin çoğu kısmi etkili yada hiç etkili değildir. Bu nedenle viral kanamalı hastalıkların erken teşhislerinin çok önemli olması yanında alınması gereken koruyucu tedbirler de bir o kadar önem taşımaktadır. Özellikle Kırım-Kongo kanamalı ateş hastalığı gibi viral kanamalı hastalıklar vahşi yaşamla yakın temasın olduğu bölgelerde ortaya çıkması ve virüsün enzootik döngüsünde virüsün rezervuarı olan kenelerin yanında yabani tavşan ve domuzların bulunması önem taşımaktadır. Ayrıca, evcil hayvanlardan özellikle sığırlar, koyun ve keçilerin virüsle enfekte olmaları ve 1 hafta süreyle viremik olmaları virüsün yaşam döngüsünde oldukça önem taşımaktadır. Hastalığın görüldüğü endemik bölgelerde yaşayan ve vahşi yaşamla yakın teması olan bireylerde risk altındadır (5, 11, 53, 54).

Özellikle virüsün yaşam siklusunda arthropod vektörler, yaban hayatı ve evcil hayvanların olduğu bir zincirde viral kanamalı hastalıklarla mücadele etmek için hastalığın görüldüğü endemik bölgelerde serolojik yöntemlerle sürveyans yapılması, verilerin düzenli olarak toplanması ve analiz edilmesi gerekmektedir. Böylece elde edilen veriler doğrultusunda oluşturulacak risk haritaları viral kanamalı hastalıklara karşı alınması gereken tedbirlerle konusunda ve yapılması gereken mücadele anahtar rol oynamaktadır. Endemik bölgelerde serolojik yöntemlerle sürveyans yapılmasında kullanılan en pratik ve kolay uygulanabilir metotlardan birisi ELISA testidir. ELISA testinin geliştirilmesinde kullanılan viral antijenler, genellikle canlı virüsün hücre kültürlerinde yada deney hayvanlarında üretilmesiyle elde edilmektedir. Ancak Kırım-Kongo kanamalı ateş hastalığı, Ebola ve Marburg gibi viral etkenlerin patojenitesinin yüksek olması, koruyucu aşısı ve spesifik tedavisinin olmaması nedeniyle canlı virüs ile çalışmak için yüksek güvenilirlikli laboratuvarlara ihtiyaç vardır. Bu sebeple ELISA gibi sürveyans testlerinin geliştirilmesinde kullanılan viral antijenlerin canlı virüs yerine

rekombinant yöntemlerle elde edilmesi ve standart laboratuvarlarda bu işlemlerin yapılması büyük önem taşımaktadır (1-3, 5, 30, 46, 64).

Bu tez çalışmasında, KKKAH virüsü NP proteinin prokaryotik sistemde üretilerek biyolojik aktivitesinin saptanması ve ELISA geliştirilmesinde antijen olarak kullanılabilme potansiyelinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, kodon optimizasyonu yapılan KKKAH virüsü NP geni iki farklı prokaryotik vektöre klonlanarak rekombinant NP proteinin üretilmesi ve daha sonra saflaştırılarak biyolojik olarak aktif olup olmadığı belirlenmiştir. Üretilen rekombinant NP proteinin saflaştırılmasına çalışılmış ve ELISA sisteminde viral antijen olarak kullanılabilme potansiyeli belirlenmesi için çalışmalar yapılmıştır.

Rekombinant DNA teknolojisiyle KKKAH tanısı için yapılan ilk çalışma 1994 yılında Marriott ve ark. tarafından gerçekleştirilmiştir (79). Bu çalışmada, KKKAH virüsü AP92 suşunun NP geni baculovirüs insekt sistemine aktararak rekombinant yollardan NP proteini elde edilmiş ve ELISA sisteminde viral antijen olarak kullanılmıştır. Saijo ve ark. 2002 yılında Çin izolatu olan suş 8402 kullanarak yine baculovirüs insekt sisteminde NP geninin ekspresyonu yapmışlardır (70). Ancak yapılan bu çalışmada toplam 4 insan serumu kullanıldığı için geliştirilen rekombinant ELISA'nın duyarlılığı ve özgüllüğü hakkında yeterli veri söz konusu değildir. Dowall ve ark. yine baculovirüs insekt sistemini kullanarak KKKAH virüsü Bağdat suşunu kullanarak rekombinant NP proteini üretmişlerdir (81). Diğer çalışmalara oranla elde edilen NP protein miktarı ve saflaştırma oranı oldukça yüksek bulunmuştur. Geliştirilen ELISA sisteminde insan serumlarında KKKAH karşı oluşan IgG antikorlarının yanı sıra IgM antikorlarının da teşhisini gerçekleştirmişlerdir. Baculovirüs ekspresyon sistemi kullanılarak rekombinant olarak üretilen NP proteini koyunlarda hem ELISA hem de indirekt IFA yöntemiyle KKKAH virüsü IgG antikorlarının deteksiyonunda başarı ile kullanılmıştır (71). Bu çalışmada Çin'in KKKAH yönünden endemik bir bölgesinden alınan 80 koyun serum örneği ve endemik olmayan bir başka bölgeden alınan 39 koyun serum örneği ELISA ile test edilmiştir. Rekombinant NP temelli indirekt IFA testinin duyarlılığı %94 ve özgüllüğü %97 olarak belirlenmiştir. ELISA testinin indirekt IFA testi ile karşılaştırıldığında elde edilen sonuçların oldukça benzer olduğu ELISA testinin duyarlılığı %92 ve özgüllüğü %100 olarak bulunmuştur. Araştırmacılar çok daha ucuz ve

hızlı sonuç veren ELISA testi ile koyunlarda KKKAH karşı oluşan IgG yanıtının belirlenmesinin indirekt IFA testine oranla daha pratik olduğu sonucuna varmışlardır.

Bouloy ve ark. 2006 yılında Semliki Forest alpha virüs sistemini kullanarak KKKAH protip virüsü olan IbAr10200 NP genini klonlanmışlar ve BHK-21 hücrelerinde NP genini açıklayan rekombinant Semliki Forest alpha virüs elde etmişlerdir. İndirekt IFA testi için BHK-21 hücreleri ve ELISA testinde kullanılmak üzere BSR hücreleri IbAr10200 NP genini açıklayan rekombinant Semliki Forest alpha virüs ile infekte edilmiştir. Her iki sistemde de test edilen ve KKKAH IgG pozitif olduğu bilinen insan ve hayvan serumlarının deteksiyonu yapılmıştır. Sonuç olarak rekombinant Semliki Forest alpha virüs sisteminin KKKAH serolojik tanısında kullanılabileceği gösterilmiştir (82).

Bununla beraber detayları yukarıda anlatılan ve KKKAH hastalığının serolojik teşhisinde kullanılan rekombinant NP tabanlı ELISA ve indirekt IFA yöntemlerinde hücre kültür sistemleri kullanılarak yapılmıştır. Baculovirüs, memeli hücre temelli açıklama vektörleri ve virüs tabanlı rekombinant açıklama sistemlerinin bütünü hücre kültürleriyle yapıldığı için elde edilen rekombinant proteinler doğal yapısına oldukça yakın konformasyondadır. Bu nedenle elde edilen rekombinant proteinlerin yer aldığı diagnostik ayraçların yüksek oranda özgüllük ve duyarlık gösterdikleri bilinmektedir. Ancak hücre kültür sisteminin kullanılması oldukça pahalı olduğu gibi steril koşulların sağlandığı gelişmiş laboratuvarlarda yapılması ve teknik olarak yetişmiş personele ihtiyaç duyması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Bu tez çalışmasında belirtilen dezavantajlara sahip ökaryotik sistem yerine çok daha ucuz, komplike laboratuvar cihazlarına ihtiyaç duymayan ve kısa sürede yüksek miktarlarda rekombinant proteinlerin üretilbildiği prokaryotik sistem tercih edilmiştir.

KKKAH virüsü Turkey Kelkit06 suşu NP geni kodon optimize olarak sentez edilmiş (Şekil 6) ve pUC57 plasmidi içine yerleştirilmiştir (Şekil 7). Son yıllarda rekombinant proteinlerin daha yüksek miktarda elde edilmesi için rekombinant sistemlerde açıklatılacak genlerin kodon optimizasyonu yapılmaktadır (83). Çalışmada kullanılan ilk prokaryotik vektör pMALp5x olarak belirlenmiştir (Şekil 8). pMALp5x vektörü maltoz bağlanma protein gen bölgesi içeren ve bu sayede prokaryotik sistemde üretilen rekombinant proteinlerin biyolojik aktivitesini koruyan formda üretilmesine yardımcı olan bir faktördür. KKKAH virüsü Turkey Kelkit06 suşu NP geni pMALp5x vektörüne

klonlanarak elde edilen rekombinant pMALp5x-NP vektörünün *E. coli* BL21 C43(DE3) hücrelerine aktararak ve IPTG ile tetiklenerek üretimi gerçekleştirilmiştir. Şekil 15’de görüldüğü gibi 1mM IPTG tetikleme sonucunda üretilmesi beklenen rekombinant pMALp5x-NP proteini beklendiği şekilde ortalama 100 kDa büyüklüğünde bulunmuştur ve 6 saat tetikleme sonucunda daha yüksek miktarda rekombinant proteinin üretiliği belirlenmiştir. Daha sonra saflaştırılarak biyolojik aktivitesi konusunda çalışmalar yapılması planlanmış ancak rekombinant pMALp5x-NP proteini yeterli miktarda saf olarak elde edilememiştir. Saflaştırma amacıyla maltose binding protein affinite gösteren amiloz resin kullanılmış ve üretici firmanın prosedürü takip edildiği halde istenilen miktarlarda saf rekombinant protein elde edilememiştir. Bunun nedenleri arasında pMALp5x vektöründe bulunan ve saflaştırma işleminde amiloz içeren kolonlara bağlanması beklenen maltose binding protein biyolojik olarak aktif olmaması ve amiloza bağlanacak kısmının reaksiyona girmemesi olabileceği düşünülmektedir. Bir başka ihtimal KKKAH virüsü NP proteini ile birlikte üretilen maltose binding protein amiloza bağlanma bölgesinin NP proteini tarafından maskelenmesi sonucunda maltose binding proteini amiloz resin ile istenilen reaksiyona girememiş olmasıdır.

pMALp5x sistemi kullanılarak yeterli miktarda rekombinant NP proteini saflaştırılmadığından dolayı rekombinant NP proteinin istenilen miktarda üretilerek saflaştırılması için pCOLDTF vektörü seçildi (Şekil 16). Bu vektör seçiminin nedeni Samudzi ve ark. KKKAH virüsü rekombinant NP protein prokaryotik ekspresyon sistemi kullanılarak pCOLDTF vektöründe üretmeleridir. Literatür bilgisine dayanarak bu çalışma KKKAH virüsü NP proteinin prokaryotik ekspresyon sistemi kullanılarak üretildiği ilk ve tek makaledir (84). Çalışmada, KKKAH virüsü SPU 415/85 Güney Afrika suşunun NP geni kodon optimize edilerek pCOLDTF vektörü içerisine yerleştirilmiştir. Daha sonra *E. coli* sisteminde üretilerek saflaştırılan rekombinant NP antijeni KKKAH serolojik tanısında kullanılmak üzere ELISA sisteminde kullanılmıştır. Toplam KKKAH geçiren konfirme vakalardan alınan 17 insan serumu test edilmiş ve geliştirilen ELISA sistemiyle hepsi pozitif olarak saptanmıştır.

Tez çalışmasında, KKKAH virüsü Turkey Kelkit06 suşunun kodon optimize NP geni pCOLDTF vektörüne klonlanmış ve elde edilen rekombinant vektör pCOLDTF-NP *E.coli* BL21 C43(DE3) 1mM IPTG varlığında 16°C’de 18 saat boyunca üretilmesi

sağlanmıştır. Yapılan SDS-PAGE analizi sonucunda şaperon görevi yapan trigger faktörüyle birlikte açıklanan rekombinant NP proteini beklendiği gibi 110 kDa büyüklüğünde üretimi gerçekleşmiştir (Şekil 21, Lane 6).

KKKAH virüsü rekombinant NP proteinin prokaryotik sistemde üretimi teyit edildikten sonra saflaştırma işlemine geçildi. pCOLDTF vektöründe bulunan ve rekombinant NP proteini ile birlikte açıklanan HisTag kurucuğuna bağlanan Ni-NTA ile konjuge edilmiş agaroz küreciklerden oluşan resin kullanıldı. Şekil 22’de görüldüğü gibi elüsyon aşamasından sonra SDS-PAGE yüklenen örnekler %100 olmasa bile büyük oranda saflaştırıldığı anlaşılmaktadır. Relatif olarak Chemidoc cihazı ile yapılan miktar tayininde saflaştırılmış olarak elde edilen rekombinant NP proteini ortalama 1mg/100ml olarak hesaplanmıştır. Genel anlamda, ökaryotik sistemle elde edilen rekombinant protein miktarlarıyla karşılaştırıldığında oldukça yüksek miktarda rekombinant protein elde edildiği görülmektedir.

Saflaştırılan rekombinant NP antijenin, fare IgG ELISA sisteminde antijen olarak kullanılması ve biyolojik olarak aktif olup olmadığının saptanması amacıyla yapılan ELISA testinde rekombinant NP antijenin KKKAH virüs antijeni ile karşılaştırıldığında daha az miktarlarda kullanılması durumunda pozitif kontrol olarak kullanılan KKKAH virüs antijeni ile benzer sonuçları verdiği belirlenmiştir (Tablo 1). Elde edilen bu sonuç rekombinant NP antijenin biyolojik olarak aktif olduğunu göstermektedir. Elde edilen rekombinant NP proteinin biyolojik olarak aktif olduğunun ve immunojenitesinin belirlenmesi amacıyla yapılan fare immunizasyon deneyleri (Tablo 3) teyit etmektedir. Bununla beraber KKKAH virüsü NP’ye karşı elde edilmiş 6B9G9F11 mAb ile yapılan Western Blotlama deneyinde rekombinant NP proteinin 6B9G9F11 mAb ile reaksiyona girmedeği tespit edilmiştir.

Rekombinant pCOLDTF-NP proteinin KKKAH yönünden IgM pozitif olduğu bilinen insan serumlarının ELISA ile test edilmesi sonucunda beklendiği gibi negatif sonuçlar alınmıştır. Rekombinant pCOLDTF-NP proteinin KKKAH yönünden IgG pozitif olduğu bilinen insan serumlarının ELISA ile test edilmesi sonucunda bazı serumlarda pozitif ve negatif kontrol sonuçlarında farklılık bulunmaması ve negatif serumların bazılarında cut off değerinin üzerinde görülen OD değerleri yalancı pozitifliklerin olduğunu göstermiştir. Ancak, benzer sonuçlar inaktive edilen ve kısmi olarak saflaştırılan KKKAH virüsü Turkey Kelkit06 suşu antijeni ile yapılan ELISA testinde

alınmıştır. Rekombinant pCOLDTF-NP'nin biyolojik olarak aktif olduğu halde insan KKKAH IgG ELISA testinin standardize edilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. Özellikle ELISA testinde farklı ticari konjugatların denenmesi ve rekombinant proteinin daha yüksek düzeyde saflaştırılarak kullanılması gelecekte denenecektir. Ayrıca gelecekte prokaryotik sistemle elde edilen rekombinant NP antijen kullanılarak evcil hayvanlarda ELISA geliştirilmesi ve sürveyans çalışmalarının yapılması önem taşımaktadır.

6.KAYNAKLAR

- 1- Whitehouse, CA. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever. Antiviral Research 2004; 64:145-160.
- 2- Leblebicioglu, H, Ozaras R, Irmak H, Sencan I. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey: Current status and future challenges, Antiviral Res 2016; 126: 21-34.
- 3- Ergonul O. Treatment of Crimean-Congo Hemorrhagic fever. Antiviral Res 2007; 78: 125-131.
- 4- Wang YI, Dutta S, Karlberg H, et al. Structure of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Nucleoprotein: Superhelical Homo-Oligomers and the Role of Caspase-3 Cleavage. J Virol 2012; 86: 12294-12303.
- 5- Ergonul O. Crimean–Congo hemorrhagic fever virus: new outbreaks, new discoveries. Curr Opin Virol 2012; 2 (2): 215-220
- 6- Chinikar S, Mirahmadi R, Moradi M, et al. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever (CCHF). In: Lorenzo-Morales J (Editor). Zoonosis. Chapter 11. ISBN: 978-953-51-0479-7, InTech. 2012; 193-212.
- 7- Morikawa S, Saijo M, Kurane I. Recent progress in molecular biology of Crimean–Congo hemorrhagic fever. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2007; 30: 375-389.
- 8- Hoogstraal H, Kaiser MN, Traylor MA, et al. Ticks (Ixodidae) on Birds Migrating from Europe and Asia to Africa. Bull World Health Organ 1961; 24: 197–212.
- 9- Korolev MB, Donets MA, Rubin SG, et al. Morphology and morphogenesis of Crimean Hemorrhagic Fever Virus. Arch Virol 1976; 50: 169-172.
- 10- Casals J. Antigenic Similarity between the Virus Causing Crimean Hemorrhagic Fever and Congo Virus. Proc Soc Exp Biol Med 1969; 131: 233-236.
- 11- Hoogstraal H. The epidemiology of tick-borne Crimean-Congo hemorrhagic fever in Asia, Europe, and Africa. Rev. J Med Entomol 1979; 15: 307-417.
- 12- Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Bilimsel Değerlendirme Raporu, Ankara: TTB yayınları 2010.

- 13- Vatansever Z, Uzun R, Estrada-Pena A. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Turkey. In: Ergonul O, Whitehouse CA (Editors). A Global Perspective. Section III Crimean-Congo Hemorrhagic Fever. 1st Edition, Netherlands: Springer 2007; 59-74.
- 14- Karti SS, Odabasi Z, Kortan V, et al. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Turkey. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 1379-1384.
- 15- King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz E. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 1st Edition, San Diego: Elsevier Academic Press, 2012.
- 16- Elliott RM. Emerging viruses: the Bunyaviridae. *Mol Med* 1997; 3: 572–577.
- 17- Chumakov MP, Smirnova SE, Tkachenko EA. Antigenic relationships between Soviet strains of Crimean hemorrhagic fever virus and the Afro-Asian Congo virus strains. *Mater 16 Nauchn Sess Inst Poliovirus Ensefalitov* 1969; 2: 152-154.
- 18- Marriott AC, Nutfall PA. Molecular biology of Nairoviruses. In: Elliott RM. (Editor). The Bunyaviridae. New York: Plenum Press 1996: 91-104.
- 19- Rodriguez LL, Maupin GO, Ksiazek TG, et al. Molecular investigation of multisource outbreak of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J Trop Med Hyg* 1997; 57: 512-518.
- 20- Deyde VM, Krishtova ML, Rollin PE, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus genomics and global diversity. *J Virol* 2006; 80: 8834-8842.
- 21- Yashina L, Petrova I, Seregin SV, et al. Genetic variability of Crimean-Congo hemorrhagic virus in Russia and Central Asia. *J Gen Virol* 2003; 84: 1199-1206.
- 22- Papa A, Bino S, Llagami A, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Albania. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 2; 603-606.
- 23- Tonbak S, Aktas M, Ozdarendeli A, et al. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus: Genetic Analysis and Tick Survey in Turkey. *J Clin Microbiol* 2006; 44 (11): 4120-4124.

- 24- Ozdarendeli A, Canakoglu N, Berber E, et al. The complete genome analysis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus isolated in Turkey. *Virus Res* 2010; 147: 288–293.
- 25- Murphy FA, Harrison AK, Whitfield SG. Bunyaviridae: Morphologic and Morphogenetic Similarities of Bunyamwera Serologic Supergroup Viruses and Several Other Arthropod-Borne Viruses. *Intervirology* 1973; 1(4) :297-316.
- 26- Donets MA, Chumakov MP, Korolev MB, et al. Physicochemical characteristics, morphology and morphogenesis of virions of the causative agent of Crimean hemorrhagic fever. *Intervirology* 1977; 8: 294-308.
- 27- Ellis DS, Southee T, Lloyd G, et al. Congo/Crimean haemorrhagic fever virus from Iraq 1979: I. Morphology in BHK21 cells. *Arch Virol* 1981; 70: 189-198.
- 28- Swanepoel R. Nairovirus infections. In: Porterfield JS. (Editor). *Exotic viral infections*. London: Chapman-Hall 1995: 285-293.
- 29- Schmaljohn CS, Hooper JW. Bunyaviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe DM, Howley PM. (Editors). *Fields Virology Vol 1. 4th Edition*, Philedelphia: Lippincott 2001: 1581-1602.
- 30- Ergonul O. Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Rev. Lancet Infect Dis* 2006; 6: 203-214.
- 31- Andersson I, Simon M, Lundkvist Å, et al. Role of actin filaments in targeting of Crimean Congo hemorrhagic fever virus nucleocapsid protein to perinuclear regions of mammalian cells. *J Med Virol* 2004; 72(1): 83-93.
- 32- Mirazimi A, Simon M, Johansson C. Microtubule dependent and microtubule independent steps in Crimean-Congo hemorrhagic fever virus replication cycle. *Virology* 2009; 385: 313-22.
- 33- Schmaljohn CS. Bunyaviriade family: viruses and their replication. In: H. J. Hawk (Editor). *Bunyaviridae 2nd ed*. Philedelphia: Lippincott 1991; 303-329.
- 34- Bertolotti-Ciarlet A, Smith J, Strecker K, et al. Cellular localization and antigenic characterization of crimean-congo hemorrhagic fever virus glycoproteins. *J Virol* 2005; 79: 652-61.

- 35- Bergeron E, Vincent MJ, Nichol ST. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Glycoprotein Processing by the Endoprotease SKI-1/S1P Is Critical for Virus Infectivity. *J Virol* 2007; 81(23): 13271-13276.
- 36- Sanchez AJ, Vincent MJ, Erickson BR, et al. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Glycoprotein Precursor Is Cleaved by Furin-Like and SKI-1 Proteases To Generate a Novel 38-Kilodalton Glycoprotein. *J Virol* 2006; 80(1): 514-525.
- 37- Vincent MJ, Sanchez AJ, Erickson BR, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus glycoprotein proteolytic processing by subtilase SKI-1. *J Virol* 2003; 77(16): 8640-8649.
- 38- Altamura LA, Bertolotti-Ciarlet A, Teigler J, et al. Identification of a Novel C-Terminal Cleavage of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus PreGN That Leads to Generation of an NSM Protein. *J Virol* 2007; 81(12): 6632-6642.
- 39- Honig JE, Osborne JC, Nichol ST. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus genome L RNA segment and encoded protein. *Virology* 2004; 321(1): 29-35.
- 40- Bergeron E, Albariño CG, Khristova ML, et al. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus-Encoded Ovarian Tumor Protease Activity Is Dispensable for Virus RNA Polymerase Function. *J Virol* 2010; 84(1): 216-226.
- 41- Kinsella E, Martin SG, Grolla A, et al. Sequence determination of the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus L segment. *Virology* 2004; 321: 23-28.
- 42- Dmitrov DS, Xiao X, Feng Y. Identification of a putative Crimean-Congo hemorrhagic virus entry factor. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 411: 213-18.
- 43- Haferkamp S, Fernando L, Schwarz TF, et al. Intracellular localization of crimean-congo hemorrhagic fever virus glycoproteins. *Virol J* 2005; 2: 42-46.
- 44- Simon M, Johansson C, Mirazimi A. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus entry and replication is clathrin-, pH- and cholesterol-dependent. *J Gen Virol* 2009; 90(1):210-215.
- 45- Schmaljohn CS, Patterson JL. Bunyaviridae and Their Replication. Fields BN, Knipe DM. (Editors). *Virology. Part II, Chapter 41. Replication of Bunyaviridae* 2nd Edition, New York: Raven Press 1990: 1175-1194.

- 46- Zivcec M, Scholte FEM, Spiropoulou CF, Spengler JR, Bergeron E. Molecular Insights into Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus, *Viruses* 2016; 8: 1-21.
- 47- Simon M. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: Interaction with host cell structures in viral replication. Doc Thesis, Sweden, Karolinska Institutet 2008.
- 48- Watts DM, Ksizaek TG, Hoogstral H. Crimean-Congo hemorrhagic fever In: Monath TP (Editor) In: *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology* vol II. Boca Raton: CRC Pres 1989; 177-222.
- 49- Berezin VV, Chumakov MP, Reshetnikov IA, et al. Study of the role of birds in the ecology of Crimean hemorrhagic fever virus. *Virus Ekol* 1971; 6; 94-95.
- 50- Shepherd AJ, Swanepoel R, Cornel AJ. Experimental studies on the replication and transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in some African tick species. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 40; 326-31.
- 51- Gonzalez JP, Camicas JL, Faye O. Sexual and transovarian transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in *Hyalomma Marginatum*. *Res Virol* 92:143; 23-28.
- 52- Durden LA, Logan TM, Wilson ML. Experimental vector incompetence of a soft tick for Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J Med Entomol* 1993; 30; 493-496.
- 53- Gordon SW, Linthicum KJ, Moulton JR. Transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in two tick species. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 48; 576-580.
- 54- Shepherd AJ, Swanepoel R, Shepherd SP. Viraemic transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus to ticks. *Epidemiol Infect* 1991; 106; 373-382.
- 55- Ergonul O. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi. *ANKEM Derg* 2009; 23: 234-240.
- 56- Bente DA, Forrester NL, Watts DM, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever: History, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity. *Rev. Antiviral Res* 2013; 100: 159-189.

- 57-Jamila B, Hasan RS, Sarwaric AR, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever: experience at a tertiary care hospital in Karachi, Pakistan. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2005; 9: 577-584.
- 58-Cevik MA, Bodur H, Gülderen E, et al. Clinical and laboratory features of Crimean-Congo hemorrhagic fever: predictors of fatality. *Int J Infect Dis* 2008; 12: 374–379.
- 59-Peters CJ, Zaki SR. Role of the endothelium in viral hemorrhagic fevers. *Crit Care Med* 2002; 30: 268-273.
- 60-Aleksandrowicz P, Wolf K, Falzarano D, et al. Viral haemorrhagic fever and vascular alterations. *Hamostaseologie* 2008; 28: 77-84.
- 61-Connolly-Andersen AM, Moll G, Andersson C, et al. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Activates Endothelial Cells. *J Virol* 2011; 85: 7766–7774.
- 62-Bodur H, Akıncı E, Öngürü P, et al. Evidence of vascular endothelial damage in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Int J Infect Dis* 2010; 14: e704-e707.
- 63-Ergonul O. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi. *ANKEM Derg* 2009; 23: 234-240.
- 64-Kraus AA, Mirazimi A. Molecular Biology and Pathogenesis of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. *Future Virol* 2010; 5: 469-479.
- 65-Ergonul O, Tuncbilek S, Baykam N, et al. 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: 941-944.
- 66-Drosten C, Kümmerer BM, Schmitz H, et al. Molecular diagnostics of viral hemorrhagic fevers. *Antiviral Res* 2003; 57: 61-87.
- 67-Mehravarani A, Moradi M, Telmadarraiy Z, et al. Molecular detection of Crimean-Congo haemorrhagic fever (CCHF) virus in ticks from southeastern Iran. *Ticks Tick Borne Dis* 2013; 4: 35-38.
- 68-Duh D, Saksida D, Petrovec M, et al. Novel one-step real-time RT-PCR assay for rapid and specific diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever encountered in the Balkans. *Journal of Virological Methods* 2006; 133: 175-179.
- 69-Atkinson B, Chamberlain J, Logue CH, et al. Development of a Real-Time RT-PCR Assay for the Detection of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2012; 12: 786-793.
- 70-Saijo M, Qing T, Niikura M, et al. Recombinant Nucleoprotein-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Immunoglobulin G Antibodies to

- Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. *J Clin. Microbiol* May 2002; 40: 1587-1591.
- 71- Qing T, Saijo M, Zhang Y, et al. A Patient with Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Serologically Diagnosed by Recombinant Nucleoprotein-Based Antibody Detection Systems. *Clin and Vac Immunol* 2003; 10: 489-491.
- 72- Saijo M, Qing T, Shimayi B, et al. Antigen-Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Diagnosis of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Using a Novel Monoclonal Antibody. *J Med Virol* 2005; 77: 83-88.
- 73- Burt FJ, Leman PA, Abbott C, et al. Serodiagnosis of Crimean-Congo Haemorrhagic Fever. *Epidemiol and Infect* 1994; 113: 551-562.
- 74- Keshtkar-Jahromi M, Kuhn JH, Christova I, et al. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever: Current and Future Prospects of Vaccines and Therapies. *Antivir Res* 2011; 90: 85-92.
- 75- Watts DM, Ussery MA, Nash D, et al. Inhibition of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Viral Infectivity Yields in vitro by Ribavirin. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 41(5): 581-585.
- 76- Yılmaz G, Aksoy F, Aydin H, et al. The Efficacy of Ribavirin in the Treatment of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Eastern Black Sea region in Turkey. *J Clin Virol* 2010; 47:65-68.
- 77- Ergonul O, Celikbas A, Dokuzoguz B, et al. 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: 284-287.
- 78- Kubar A, Hacıömeroğlu M, Özkul A, et al. Prompt Administration of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever (CCHF) virus Hyperimmunoglobulin in Patients Diagnosed with CCHF and Viral Load Monitorization by Reverse Transcriptase-PCR. *Jpn J Infect Dis* 2011; 64: 439-443.
- 79- Marriott AC, Polyzoni T, Antoniadis A, Nuttall. Detection of human antibodies to Crimean-Congo haemorrhagic fever virus using expressed viral nucleocapsid protein. *J Gen Virol* 1994; 75:2157-2161.
- 80- Miller BR. Arboviruses. In: Mahy BWJ, Regenmortel MHVV. (Editors). *Desk Encyclopedia of Human and Medical Virology. Section III. Exotic Virus Infections* 1st Edition, San Diego: Academic Press 2009: 24.

- 81- Dowall SD, Richards KS, Graham VA, Chamberlain J, Hewson R. Development of an indirect ELISA method for the parallel measurement of IgG and IgM antibodies against Crimean-Congo haemorrhagic fever (CCHF) virus using recombinant nucleoprotein as antigen. *J Virol Methods* 2012; 179:335-341.
- 82- Garcia, S, Chinikar S, Coudrier D, et al. Evaluation of a Crimean-Congo hemorrhagic fever virus recombinant antigen expressed by Semliki Forest suicide virus for IgM and IgG antibody detection in human and animal sera collected in Iran. *J Clin Virol* 2006; 35:154-159.
- 83- Elena C, Ravasi P, Castelli ME, Peiru S, Menzella HG. Expression of codon optimized in microbial systems: current applications and perspectives. *Front Microbiol* 2014; 5:000021.
- 84- Samudzi RR, Patricia AL, Paweska JT, Swanepoel R, Burt FJ. Bacterial expression of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus nucleoprotein and its evaluation as a diagnostic reagent in an indirect ELISA. *J Virol Methods* 2012; 179:70-76.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Hazel YETİŞKİN

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 11 Temmuz 1990, Adana

Medeni Durumu: Bekâr

Tel: 0506 6188950

email: hazelyetiskin@gmail.com

Yazışma Adresi: Erciyes Üniversitesi, Aşı Araştırma ve Geliştirme Merkezi 38039
Talas/KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Ege Üniversitesi, Biyomühendislik	2013
Lise	Adana Anadolu Lisesi	2008

DENEYİMLER

Yıl	Kurum	Görev
2012	Zentiva Sanofi Aventis	Staj
2012	Çukurova Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilimdalı	Staj
2014-Halen	Erciyes Üniversitesi, Aşı Araştırma ve Geliştirme Merkezi.	Bursiyer Öğrenci

YABANCI DİL

İngilizce, Almanca