

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

**KIRIM-KONGO KANAMALI ATEŞİ HASTALIĞI
(KKKAH) VİRÜSÜ GLİKOPROTEİNLERİNE KARŞI
GELİŞTİRİLEN HİBRİDOMA HATLARININ
STABİLİTELERİNİN BELİRLENMESİ VE NÖTRALİZAN
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hazırlayan
Duygu Merve ÇALIŞKAN

Danışman
Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ

Yüksek Lisans Tezi

TEMMUZ 2016
KAYSERİ

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

**KIRIM KONGO HEMORAJİK (KANAMALI) ATEŞİ
HASTALIĞI (KKKAH) VİRÜSÜ GLİKOPROTEİNLERİNE
KARŞI GELİŞTİRİLEN HİBRİDOMA HATLARININ
STABİLİTELERİNİN BELİRLENMESİ VE NÖTRALİZAN
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hazırlayan

Duygu Merve ÇALIŞKAN

Danışman

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ

Yüksek Lisans Tezi

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TYL-2016-6386 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

Duygu Merve ÇALIŞKAN

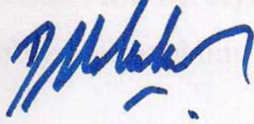
İmza



YÖNERGEYE UYGUNLUK

“Kırım-Kongo Kanamalı Ateş Hastalığı (KKKAH) Virüsü Glikoproteinlerine Karşı Geliştirilen Hibridoma Hatlarının Stabilitelerinin Belirlenmesi ve Monoklonal Antikorların Nötralizan Özelliklerinin Araştırılması” adlı Yüksek Lisans, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

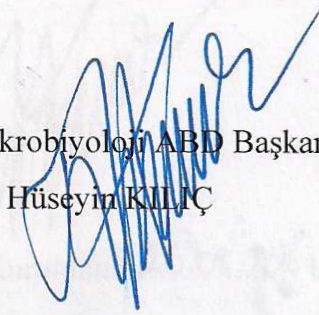
Tezi Hazırlayan
Duygu Merve ÇALIŞKAN



Danışman
Aykut ÖZDARENDELİ



Tıbbi Mikrobiyoloji ABD Başkanı
Hüseyin KILIÇ



KABUL VE ONAY

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ danışmanlığında **Duygu Merve ÇALIŞKAN** tarafından hazırlanan “Kırım-Kongo Kanamalı Ateş Hastalığı (KKKAH) Virüsü Glikoproteinlerine Karşı Geliştirilen Hibridoma Hatlarının Stabilitelerinin Belirlenmesi ve Monoklonal Antikorların Nötralizan Özelliklerinin 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:

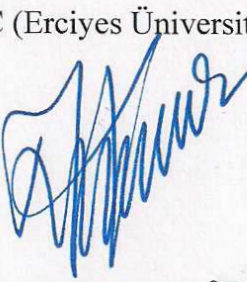
Danışman: Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ (Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı)



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 ve 744 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

25 / 08 / 2016

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ

Enstitü Müdürü



TEŞEKKÜR

Değerli bilgi ve yardımlarıyla çalışmalarımın yönlendirilmesi ve yürütülmesindeki tüm katkılarından dolayı sayın hocam Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ'ye,

Çalışmam boyunca hiçbir yardımı esirgemeyen, değerli hocalarım Yard. Doç. Dr. Nurettin ÇANAKOĞLU, Yard. Doç. Dr. Engin BERBER ve Yard. Doç. Dr. İbrahim SÖZDUTMAZ'a,

Yüksek Lisans eğitimim süresince desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen başta Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hüseyin KILIÇ olmak üzere tüm Tıbbi Mikrobiyoloji anabilim dalı öğretim üyelerine,

Deneyisel çalışmalarımı yürütebilmem için her türlü olanağı sağlayan ve bana her konuda yardımcı olan ERAGEM çalışanlarına,

Öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, beni yetiştiren ve bu günlere gelmemi sağlayan aileme,

Sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Duygu Merve ÇALIŞKAN

**KIRIM-KONGO KANAMALI ATEŞ HASTALIĞI (KKKAH) VİRÜSÜ
GLİKOPROTEİNLERİNE KARŞI GELİŞTİRİLEN HİBRİDOMA
HATLARININ STABİLİTELERİNİN BELİRLENMESİ VE MONOKLONAL
ANTİKORLARIN NÖTRALİZAN ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Duygu Merve ÇALIŞKAN

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Temmuz 2016

Danışman: Prof. Dr. Aykut ÖZDARENELİ

ÖZET

Kırım-Kongo Kanamalı Ateş Hastalığı (KKKAH), *Bunyaviridae* ailesinde *Nairovirus* genusunda bulunan, KKKAH virüsünün sebep olduğu kene kaynaklı bir hastalıktır. Virüs insanlara kene ısırması veya enfekte hastaların ya da hayvanların vücut sıvılarıyla temas ile bulaşmaktadır. Hastalığın mortalitesinin yüksek olması ve spesifik bir tedavisi olmaması nedeniyle, önemli bir halk sağlığı problemi olarak görülmektedir.

Bu çalışmanın amacı, daha önceki yıllarda, KKKAH virüsüne karşı üretilmiş olan hibridoma hatlarının stabilitelerinin saptanması ve bu hibridomaların ürettikleri monoklonal antikorların (mAb) nötralizan özellikte olup olmadığının belirlenmesidir. Bu amaçla 70 adet klon test edilmiştir. Bu klonlardan sadece 2 klon, 8H3 ve 3F2, stabil kalmıştır ve bu klonlara karşı Floresan Fokus Redüksiyon Nötralizasyon Testi (FFRNT) yapılarak nötralizan aktiviteleri ölçülmüştür. Klonlardan 8H3H5F8F8 (8H3 alt klonu), 3F2G8H4 ve 3F8E10H5 (3F2 alt klonları) nötralizan etki göstermezken, 8H3H5F8E8 klonunun kısmi nötralizan etkiye sahip olduğu görülmüştür. 8H3H5F8E8 klonunun gelecekte elde edilecek nötralizan özellikteki diğer mAb'larla birlikte terapötik amaçla kullanılabilme potansiyeli olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler : Kırım-Kongo Kanamalı Ateş Hastalığı (KKKAH), KKKAH virüsü glikoproteinleri, Nötralizan Monoklonal Antikorlar, Tedavi

**INVESTIGATION OF THE HYBRIDOMAS STABILITIES AND
NEUTRALIZATION CAPABILITIES OF MONOCLONAL ANTIBODIES
DEVELOPED AGAINST THE GLYCOPROTEINS OF CRIMEAN-CONGO
HEMORRHAGIC FEVER VIRUS (CCHFV)**

Duygu Merve ÇALIŞKAN

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 a tick-born disease caused by the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV), a member of the genus Nairovirus within the family Bunyaviridae. The virus is transmitted to humans by tick-bite or contact with body fluids from infected patients or livestock. CCHFV is seen today as a major public health problem due to the high mortality rate and the lack of specific treatment.

The aim of this study, testing the stability of hybridoma lines developed against CCHFV in previous studies, and determination of neutralization effect monoclonal antibodies produced by these hybridomas. For this purpose, 70 hybridoma clones were tested. Only two clones (8H3 and 3F2), were determined to protect their stability which was measured by Fluorescent Focus Reduction test (FFRNT). The subclone of 8H3 (8H3H5F8E8) has partial neutralizing activity. However, the subclones of 3F2 do not have any neutralizing activity. The result indicated that the 8H3H5F8E8 mAb might be used as a therapeutic agent with the other mAbs which would be generated in the future have neutralizing activities against CCHF virus.

Key Words : Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF), CCHFV glycoproteins, Neutralizing Monoclonal Antibodies, Treatment

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK.....	ii
KABUL VE ONAY	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiv
TABLolar LİSTESİ.....	xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kırım Kongo Kanamalı Ateş Hastalığı Virüsü ve Özellikleri	3
2.2. Virüs Replikasyonu	7
2.3. Epidemiyoloji	9
2.4. Viral Patogenez	10
2.5. Klinik Bulgular	10
2.6. Teşhis Yöntemleri	11
2.7. Tedavi	13
2.8. Dünyada ve Ülkemizde Kırım-Kongo Kanamalı Ateş Hastalığı	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
3.1. Vero E6 Hücrelerinde KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit06 Suşunun Üretilmesi	17
3.1.1. Vero E6 Hücrelerinin Çözdürülmesi ve Çoğaltılması	17

3.1.2.	Vero E6 Hücrelerinin Pasajlanması	18
3.1.3.	Vero E6 Hücrelerinin Döner Şişelerde Üretilmesi.....	19
3.1.4.	Döner Şişe ile Kültüre Edilen Vero E6 Hücrelerinin Pasajlanması.....	20
3.1.5.	Vero E6 Hücrelerinde KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit06 Suşunun Üretilmesi.....	21
3.1.6.	KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit06 Suşunun Konsantrasyonu, İnaktive Edilmesi ve Antijen Miktarının Belirlenmesi	22
3.1.6.1.	Polietilen Glikol (PEG) Yöntemiyle Virüs Konsantrasyonu.....	22
3.2.	Hibridomaların Elde Edilmesi	25
3.2.1.	HY-HAT Besin Ortamının Hazırlanması.....	25
3.2.2.	Dalak Hücrelerinin Hazırlanması.....	26
3.2.3.	Füzyon.....	28
3.3.	Hibridomaların Stabilitelerinin Belirlenmesi	29
3.3.1.	Test Edilecek Olan Hibridoma Hücrelerinin Çözdürülmesi	29
3.3.2.	Immun Floresan Testi (IFA)	30
3.3.3.	Enzime Bağlı Immunosorbent Testi (ELISA).....	32
3.3.4.	Immuno Blotlama (Western Blot).....	33
3.3.5.	Limiting Dilüsyon	36
3.3.6.	Monoklonal Hücrelerin Dondurulması, Ana ve Çalışma Stoklarının Oluşturulması.....	37
3.3.6.1.	Hücre Sayımı	37
3.3.6.2.	Dondurma işlemi	39
3.3.7.	Stabilite Testleri	40
3.4.	Monoklonal Hücrelerin Döner Şişe Sisteminde Kültüre Edilmesi, mAb Konsantrasyonu ve Saflaştırılması	40
3.4.1.	Monoklonal Hücrelerin Döner Şişe Sisteminde Kültüre Edilmesi.....	40
3.4.2.	Amonyum Sülfat Metoduyla Çöktürme İşlemi.....	41

3.4.3.	Diyaliz İşlemi	42
3.4.4.	Kolon Kromatografisi Yöntemi ile Monoklonal Antikor Pürifikasyonu..	42
3.5.	Antikor İzotiplendirme	43
3.6.	Floresan Fokus Redüksiyon Nötralizasyon Testi	44
4.	BULGULAR.....	47
4.1.	KKKAH Viral Antijenlerinin Elde Edilmesi	47
4.2.	Hibridomaların Test Edilmesi	48
4.2.1.	Antikor Sentezlemeye Devam Eden Hibridomaların Western Blot Deneyi ile Test Edilmesi	49
4.2.2.	Limiting Dilüsyon	53
4.3.	8H3H5F8E8 ve 8H3H5F8F8 mAb Klonlarının Döner Şişe Kültür Sisteminde Üretilmeleri ve Antikor Sentez Etmelerinin Teyit Edilmesi	53
4.3.1.	8H3H5F8E8 ve 8H3H5F8F8 mAb Klonlarının ELISA ile Test Edilmesi.....	53
4.3.2.	8H3H5F8E8 ve 8H3H5F8F8 mAb Klonlarının Western Blot ile Test Edilmesi	55
4.3.3.	8H3H5F8E8 ve 8H3H5F8F8 mAb klonlarının IFA ile Test Edilmesi	56
4.4.	3F2G8H4 ve 3F2E10H5 mAb Klonlarının Döner Şişe Kültür Sisteminde Üretilmeleri ve Antikor Sentez Etmelerinin Teyit Edilmesi	58
4.4.1.	3F2G8H4 ve 3F2E10H5 mAb Klonlarının ELISA ile Test Edilmesi.....	58
4.4.2.	3F2G8H4 ve 3F2E10H5 mAb Klonlarının Western Blot ile Test Edilmesi.....	60
4.4.3.	3F2G8H4 ve 3F2E10H5 mAb Klonlarının IFA ile Test Edilmesi	62
4.5.	Monoklonal Antikorların Üretilmesi, Saflaştırılması ve İzotiplendirilmesi.....	63
4.5.1.	Döner Şişe Hücre Kültür Kaplarında Üretilen Monoklonal Antikorların Amonyum Sülfat ile Çöktürülmesi	64
4.5.2.	Monoklonal Antikorların Protein G Kromatografisi ile Saflaştırılması ...	65
4.6.	Saflaştırılmış mAb'ların ELISA, Western Blot ve IFA ile Test Edilmesi	66

4.6.1.	Saflaştırılmış mAb'ların ELISA ile Test Edilmesi	66
4.6.2.	Saflaştırılmış Mab'ların Western Blot ile Test Edilmesi	67
4.6.3.	Saflaştırılmış mAb'ların IFA ile Test Edilmesi	68
4.6.4.	Saflaştırılmış mAb'ların SDS-PAGE ile Görüntülenmesi.....	70
4.6.5.	Pürifiye Monoklonal Antikorların İzotiplendirilmesi.....	71
4.7.	8H3H5F8E8, 8H3H5F8F8, 3F2G8H4 ve 3F2E10H5 mAb'ların Nötralizan Etkilerinin Araştırılması	72
4.8.	8H3H5F8E8, 8H3H5F8F8, 3F2G8H4 ve 3F2E10H5 Klonlarının Stabilite Değerlendirmesi	74
4.8.1.	8H3H5F8E8 ve 8H3H5F8F8 Klonları Stabilite Değerlendirmesi	74
4.8.2.	3F2G8H4 ve 3F2E10H5 Klonları Stabilite Değerlendirmeleri	77
5.	TARTIşMA	80
6.	KAYNAKLAR	87
	ÖZGEÇMİş	94

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar	Açıklamalar
°C	Santigrat derece
ALT	Alanin aminotransferaz
AST	Aspartat aminotransferaz
BALB/c	Bagg Albino, Inbred araştırma fare suşu
BSA	Sığır serum albumin
BHK-21	Yavru hamster böbrek hücresi
BSL	Biyogüvenlik seviye laboratuvar
cDNA	Kopya DNA
CO ₂	Karbondioksit
cRNA	Kopya ribonükleik asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetil sülfoksit
EBV	Epstein Barr virüsü
ELISA	Enzim ilintili immünosorbent testi
ER	Endoplazmik retikülüm
FACS	Floresan ile aktive edilmiş hücre sıralayıcı
FDA	Gıda ve İlaç Dairesi
FRNT	Flöresan redüksiyon nötralizasyon
Fc	İmmunoglobulin sabit kısmı
Fv	İmmunoglobulin değişken kısmı
G	Gram
Gc	Karboksi terminal uç glikoprotein
Gn	Amino terminal uç protein
GP	Glikoprotein
HAMA	İnsan anti fare antikoru
HAT	Hipoksantin-aminopterin-timidin

HEPES	[N-2-hidroksietilpiperazin-N] etensülfonik asit
HER2	İnsan epidermal büyüme faktörü
HPGRT	Hipoksantin-guanin-fosforibozil-transferaz
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
H ₂ SO ₄	Sülfürik asit
IFA	İndirekt İmmünfloresan test
IFN	İnterferon
IgG	İmmünoglobulin G
IgM	İmmünoglobulin M
kDa	Kilodalton
KKKA	Kırım-Kongo kanamalı ateşi
KKKAH	Kırım-Kongo kanamalı ateşi hastalığı
KKKAHV	Kırım-Kongo kanamalı ateşi hastalığı virüsü
L	Large segmenti
LDH	Laktat dehidrogenaz
Log	Logaritma
M	Medium segmenti
mAb	Monoklonal Antikor
Mg	Miligram
ml	Mililitre
MOI	Multiplicity of Infection
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
MWCO	Moleküler ağırlık cut-off
Nm	Nanometre
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
NP	Nükleoprotein
NSm	Yapısal olmayan M protein
NSs	Yapısal olmayan S protein
OD	Optik dansite
OTU	Ovaryan tümör proteini

PBS	Fosfat tamponlu tuz solüsyonu
PEG	Polietilen glikol
PreGc	Gc Prekürsörü
PreGn	Gn Prekürsörü
RdRP	Ribonükleik asit bağımlı ribonükleik asit polimeraz enzimi
RKPL	Aminoasit motifi
RNA	Ribonükleik asit
PMW	Şekerci boyası
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
Rpm	Dakikadaki devir sayısı
RRLL	Aminoasit motifi
RT-PCR	Tersine transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu
SW-13	İnsan böbreküstü bezi karsinoma hücresi
Vero E6	Afrika yeşil maymun böbrek hücre hattı
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1 : KKKAH virüsünün yapısı	4
Şekil 2 : KKKAH virüs glikoproteinlerinin işlenmesi	6
Şekil 3 : KKKAH virüsünün çoğalma stratejisi	8
Şekil 4 : KKKAH virüsünün doğadaki sirkülasyonu	9
Şekil 5 : KKKAH Coğrafi Dağılımı	15
Şekil 6 : Döner Şişe Kültür Sisteminde Kültüre Edilen Vero E6 Hücreleri	20
Şekil 7 : -80°C derin dondurucudan çıkarılan, KKKAH virüsü ile enfekte hücreleri içeren döner şişe kültür kapları	25
Şekil 8 : Hücre sayım aparatı	38
Şekil 9 : KKKAH virüs Kelkit06 suşuna spesifik viral antijenlerin ve büyüklüklerinin SDS-PAGE ve Western Blot ile görüntülenmesi	48
Şekil 11 : IFA deneyinde pozitif sonuç veren klonların Western Blot ile test edilmesi ..	51
Şekil 12 : IFA deneyinde pozitif sonuç veren klonların Western Blot ile görüntülenmesi	52
Şekil 13 : 8H3H5F8E8 ve 8H3H5F8F8 mAb klonlarının ve 8H3 hibridoma alt klonunun döner şişe kültür sistemi 6. gün süpernatantlarının indirekt ELISA ile test edilmesi	54
Şekil 14 : Döner şişe kültür sisteminde kültüre edilen 8H3H5F8E8 ve 8H3H5F8F8 klonları 6. gün süpernatantlarının Western Blot ile test edilmesi	55
Şekil 15 : 8H3H5F8E8 ve 8H3H5F8F8 klonlarının, döner şişe kültür sistemindeki 6. gün süpernatantlarının IFA ile test edilmesi.	57
Şekil 16 : 3F2 alt klonlarının, 3F2G8H4 ve 3F2E10H5, 6. gün süpernatantlarının İndirekt ELISA yöntemiyle test edilmesi	59
Şekil 17 : 3F2G8H4 ve 3F2E10H5 mAb klonlarının döner şişe kültür sistemi 6. gün süpernatantlarının Western Blot ile test edilmesi	61
Şekil 18 : 3F2G8H4 ve 3F2E10H5 klonları, döner şişe kültür sistemindeki 6. gün süpernatantlarının IFA ile test edilmesi.	63
Şekil 19 : Döner şişe kültür hücre kültür kaplarında üretim sonrasında amonyum sülfat çöktürme sonucu oluşan pelletin görünümü.	64
Şekil 20 : Saflaştırılmış mAb'lara yapılan ELISA testi görüntüsü	66
Şekil 21 : Saflaştırılmış mAb'lara karşı yapılan Western Blot deneyi	68

Şekil 22: Saflaştırılmış mAb'ların IFA ile test edilmesi.....	69
Şekil 23 : Saflaştırılmış mAb'ların SDS-PAGE görüntüsü.	70
Şekil 24 : Saflaştırılmış mAb'ların izotiplendirmesi	71
Şekil 25 : FRNT deneyi sonucunda 3F2G8H4, 3F2E10H5, 8H3H5F8E8 ve 8H3H5F8F8 mAb'ların 1/10, 1/20 ve 1/40 sulandırılmalardaki plak sayıları..	73
Şekil 26 : 8H3 alt klonlarının stabilite değerlendirmesi amacıyla yapılan IFA deneyleri.	76
Şekil 27 : 3F2 alt klonlarının stabilite değerlendirmesi amacıyla yapılan IFA deneyleri.	79

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1 : Amonyumsülfat çöktürme sonrası süpernatantlardan elde edilen antikor miktarları	65
Tablo 2: Protein G kolon pürifikasyonu sonrasında elde edilen antikor miktarları	65
Tablo 3 : Saflaştırılmış mAb'ların ELISA OD Değerleri	67

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tez çalışmasının amacı, daha önceki yıllarda Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı (KKKAH) virüsüne karşı üretilmiş olan hibridoma hatlarının stabilitelerinin saptanması ve bu hibridomaların ürettikleri monoklonal antikorların (mAb) nötralizan özellikte olup olmadığının belirlenmesidir.

Ülkemizde son 15 yıldır başta KKKAH olmak üzere, domuz gribi, kuş gribi, Hantavirüs, Sandfly Fever virüs ve Batı Nil humması gibi enfeksiyonlar görülmektedir. Bu tür yeni\yeniden ortaya çıkan ve halk sağlığını tehdit eden enfeksiyonlara karşı mücadele konusunda hazır olmak ve gerekli bilimsel alt yapıya sahip olmak büyük önem taşımaktadır. Gerek dünya gerekse ülkemizde ortaya çıkan ve halk sağlığını tehdit eden enfeksiyonlara karşı çeşitli stratejiler geliştirerek, hastalıklarla mücadele edilmesi gerekmektedir. Bu stratejilerin başında koruyucu ve terapötik aşılarda geliştirilmesi gelmektedir.

Bakteri, virüs ve parazitler gibi enfeksiyöz etkenlere karşı geliştirilen mAb'lar, bu hastalık etkenlerinin teşhisinde ve immunoterapi amacıyla kullanılmaktadırlar. mAb'lar aynı zamanda hastalık odaklarının, kanser hücrelerinin tümör belirteçlerinin ve metastazların teşhisinde, ayrıca süt, idrar, doku sıvıları vb. sıvılardaki hormon, enzim, ilaç, eriyebilir protein, metabolit gibi bazı kimyasal maddelerin tespitinde de kullanılmaktadır.

Yirminci yüzyılın son çeyreğinde hibridoma ve rekombinant DNA teknolojilerinin gelişmesi monoklonal antikorların önce diagnostik amaçlı *in-vitro* ve *ex-vivo* kullanımına, bunu izleyerek de hızla tedavi amaçlı klinik kullanıma girmelerine olanak sağlamıştır. Terapötik amaçlı mAb üretimi 1986 yılında başlamış, mürin mAb'lar insanlarda HAMA (Human anti mouse antibody) reaksiyonlarına sebep olduğundan, 1990'lı yıllarda ilk kimerik mAb'ın geliştirilmesine kadar yavaşlamıştır. Kimerik mAb'ların geliştirilmesini takiben humanize ve tamamen insan mAb'ları geliştirilmiş ve 2013 yılında terapötik mAb üretimi büyük hız kazanmıştır. 2014 yılında yaklaşık 300 terapötik mAb adayı geliştirilmiştir. 2014 yılına kadar 47 mAb onaylanmış ve pazara sunulmuştur. Klinik kullanımda olan mAb'ların en önemli örnekleri onkolojide kullanılmaktadır. Kanser tedavileri yanı sıra, otoimmün hastalıklarının tedavisinde kullanılmakta olan mAb'lar mevcuttur. Enfeksiyon hastalıklarının tedavisi amacıyla mAb'ların kullanımı da son derece önemli ve güncel bir konudur. 2015 yılına kadar, mikrobiyal hastalıkların tedavisinde kullanılabilecek, sadece 2 mAb onay alabilmiştir. Bu antikorlar, Respiratuar Sinsityal Virüs (RSV) tedavisinde kullanılan, humanize bir mAb olan Palivizumab'tır ve 1998 yılında onaylanmıştır. Mikrobiyal hastalıkların tedavisinde kullanılan diğer mAb ise, gram-pozitif bir bakteri olan *Bacillus anthracis* toksinine (protektif antijen) karşı geliştirilmiş Raxibacumab, 2012 yılında onaylanmıştır (1,2,3).

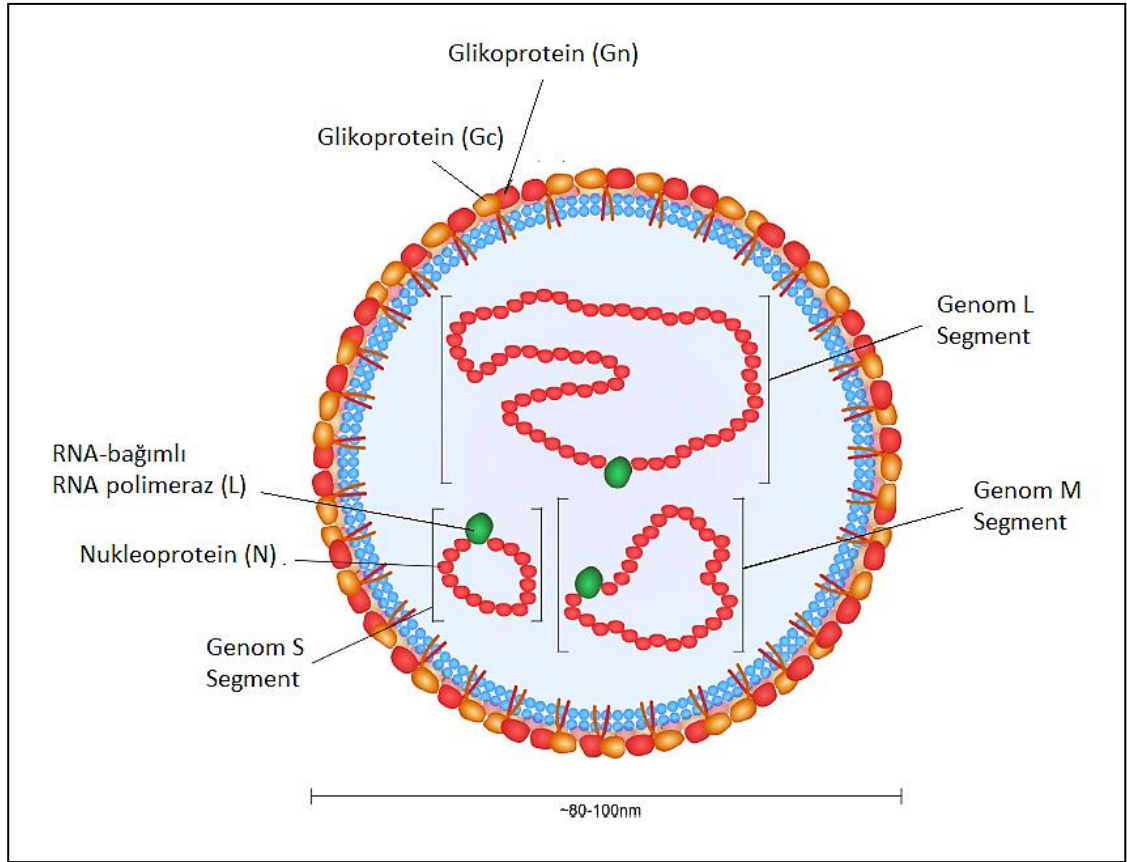
Virüsleri nötralize edebilecek antikorların geliştirilmesi de, viral hastalıklarla mücadele için terapötik aşılarda geliştirilmesini sağlamıştır. İlk onaylanmış nötralizan mAb olan Palivizumab'ın geliştirilmesi, diğer viral hastalıklar için benzer çalışmalar yapılabilceğini göstermiştir. Pek çok viral hastalığın tedavisinin olmaması, mAb ile tedavileri önemli bir hedef yapmaktadır (4). KKKAH'nin mortalitesinin yüksek olması ve spesifik bir tedavisi olmaması nedeniyle tedavide kullanılabilecek potansiyelinde olan mAb'ların elde edilmesi büyük önem taşımaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kırım Kongo Kanamalı Ateş Hastalığı Virüsü ve Özellikleri

Bunyaviridae ailesinde, *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus* ve bitkilerde enfeksiyon oluşturan; *Tospovirus* olmak üzere 5 genus yer almaktadır (5). *Nairovirus*, *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus* ve *Tospovirus* genusunda yer alan virüsler artropotlarla taşınırken, *Hantavirus* genusunda yer alan virüsler rodentlerle taşınmaktadır. *Nairovirüs* genusu ixodid veya argasid kenelerce taşınan, 7 serogruptan 34 virüs içermektedir. En önemli serogruplar, KKKAH virüsü ve Hazara virüsü içeren KKKA grubu ve Nairobi koyun hastalığı (NSD) ve Dugbe virüsleri içeren Nairobi koyun hastalığı grubudur (6,7,8).

KKKAH virüsü *Bunyaviridae* ailesinin *Nairovirüs* genusunda yer alan negatif anlamlı, tek iplikçikli ve 3 segmentten oluşan bir RNA virüsüdür. Yaklaşık 100 nm çapında, sferik yapıda, negatif polariteli RNA virüsüdür. Virüs konak hücreden köken alan 5-7 nm kalınlığında çift tabakalı lipid zar ile çevrilidir. Zarın üzerinde ise 8-10 nm çıkıntı yapan glikoproteinler bulunmaktadır (9, 10) (şekil 1). Segmentler Small (S), Medium (M) ve Large (L) olarak adlandırılmaktadır. Virüs 1673 nükleotid uzunluğunda S segmenti, 5364 nükleotid uzunluğunda M segmenti ve 12149 nükleotid uzunluğunda L segmenti olmak üzere 19186 nükleotid uzunluğuna sahiptir (11).



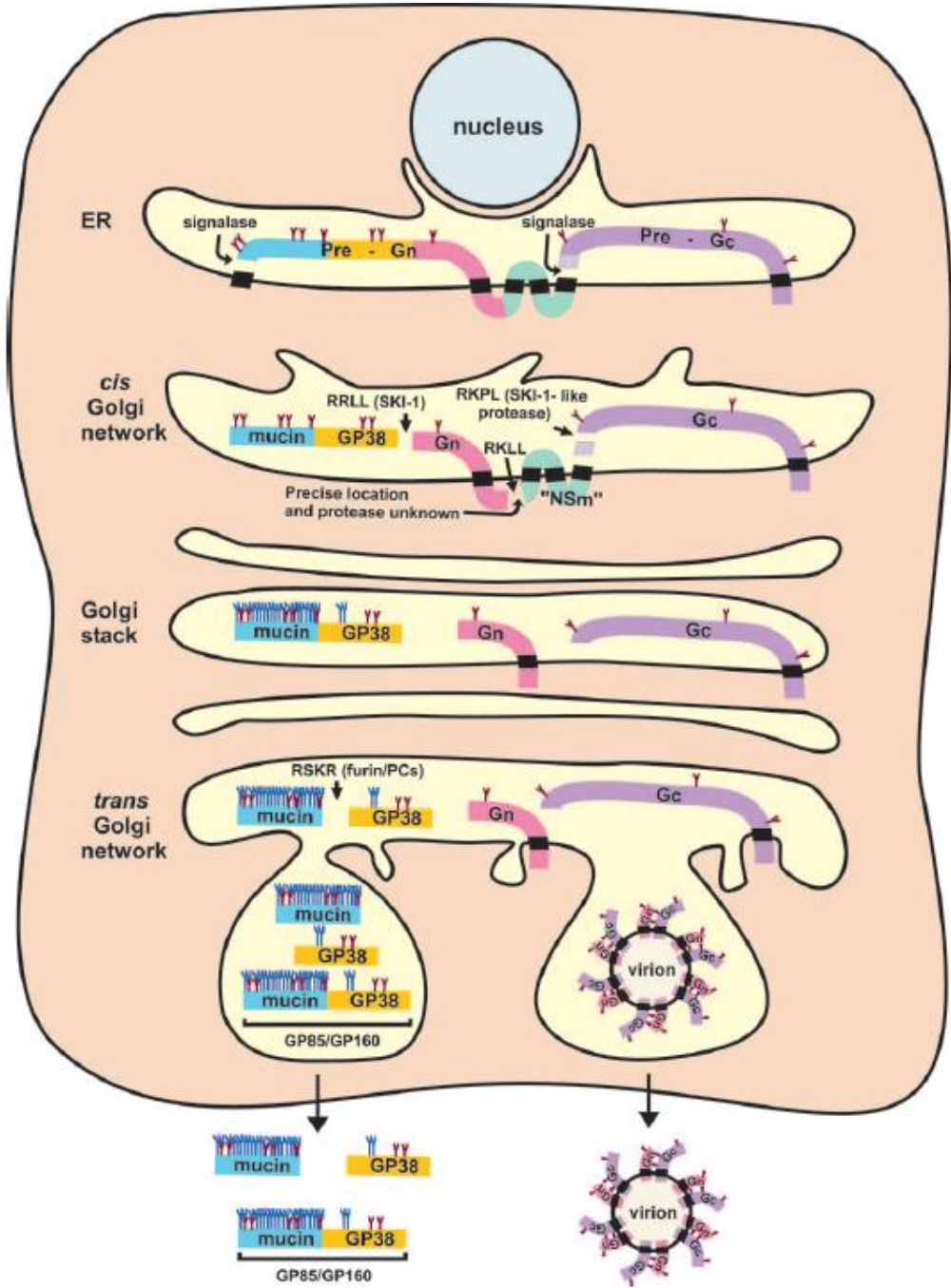
Şekil 1 : KKKAH virüsünün yapısı (17)

S segmenti, 482 aminoasitlik nükleoproteini (NP) kodlamaktadır. NP, viral RNA'lar ile etkileşime girerek, viral genomik RNA'nın replikasyonunda rol oynayan, ribonükleoprotein kompleksini oluşturmaktadır (12). Ancak NP'nin viral RNA ile etkileşim mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Ayrıca insan MxA proteininin NP ile etkileşime girerek replikasyonu inhibe ettiği ve interferon indükleyici MxA GTPase ile ilişkili interferon-alfa ile insan hücrelerinde virüsün gelişmesini inhibe ettiği bilinmektedir (13,14).

M segmenti, 1688 aminoasitlik, 240 kDa büyüklüğünde bir poliprotein kodlar. Bu poliprotein, Endoplazmik Retikulumda (ER) başlayan ve golgi aygıtında biten, kotranslasyonel kesim ve post-translasyonel işlemeye tabi tutulur (7).

Poliprotein ER'yi hedeflemekte ve burada ilk olarak konak sinyal peptidazı ve intramembrane cleaving proteaz (I-CLiPs) aracılığıyla 140 kDa büyüklüğündeki PreGn, 85 kDa büyüklüğündeki PreGc protein prekürsörlerine ve NSm'e kesilmektedir (15,16). Prekürsör proteinlerin oluşumunun ardından bu proteinler *cis*Golgi'ye transfer olmaktadır. PreGn, ER ve *cis*Golgi'de, SKI-1 (subtilisin kexin isozyme-1/site-1 protease, S1P (site-1 proteaz) olarakta bilinir) proteaz aracılığıyla RRL motifinden, fűrın benzeri proteaz ile de RSKR motifinden kesilerek, Gn ve műrın-GP38 (yapısal olmayan glikoprotein)'i oluşturur. Hücreselerde SKI-1 eksikliğinde, PreGn ve PreGc'nin golgide birikme gösterdiği ve enfekte hücrelerin, yüzey glikoproteinleri içermeyen virüs partikülleri salgıladıkları bildirilmiştir. Műrın-GP38'in de fűrın ile kesilmesi sonucunda GP38, GP160 ve GP85 proteinleri oluşmaktadır. PreGc'de yine SKI-1 proteaz ile RKPL motifinden kesilerek Gc oluşturulur (şekil 2) (17-24).

Gn ve Gc yapısal zarf proteinleridir ve virionun hücresel reseptörlere bağlanmasında rol oynamaktadır. Aynı zamanda bu iki glikoprotein nötralizan antikörlerin da hedefidir. Ancak viral tutunma, hücre içine giriş ve fűrıyon tam olarak aydınlatılamamıştır. Gc glikoproteinin hücresel reseptörlere bağlanmadan sorumlu olduğu, özellikle nötralizan antikörlerinde hedefi olduğu bilinmekte, aynı zamanda fűrıyona da aracılık ettiği düşünülmektedir (18,20). Gn proteininin virüs glikoproteinlerinin lokalizasyonu ve transportunda da oldukça önemli olduğu gösterilmiştir (21). Görevleri tam olarak aydınlatılamamış olsada; Gn'nin, Gc için şaperon benzeri bir görev üstlenerek, doğru katlanmaların olmasını sağladığı düşünülmektedir (22,25). Aynı zamanda Gn'nin sitoplazmik kuyruğunun, RNA'ya bağlanan 'zinc finger' domain içerdiği bilinmektedir. Bu durum da Gn'nin, viral RNA ile etkileşimde olarak, matrix-protein benzeri fonksiyonlara sahip olabileceğini düşündürmektedir (26).



Şekil 2 : KKKAH virüs glikoproteinlerinin işlenmesi (27).

PreGn ve PreGc'nin golgide lokalize oldukları, bu pekürsör proteinlerin doğru işlenmesinin enfeksiyöz virüs oluşumunda oldukça önemli oldukları bilinmektedir. Bu proteinlerin Golgi'yi hedeflemesini sağlayan sinyal dizisinin ise Gn'nin N-terminal bölgesinde bulunduğu bildirilmiştir (25,28). Gn'nin doğru katlanma ve glikolizasyonları

gerçekleştirememesi halinde, Gc ve diğer glikoproteinlerin ER’de biriktikleri görülmüştür. Virüsün tomurcuklanmasının da, özellikle Gn ve Gc proteinlerinin lokalize olduğu golgi kısımlarından gerçekleşmektedir (16,29).

L segmenti RNA bağımlı RNA polimerazı kodlamaktadır, bu polimeraz viral RNA’nın replikasyonu ve transkripsiyonunu sağlar (7,12). L segmenti, amino (N) terminal ucunda genus içinde korunmuş ovaryan tümör (OTU) benzeri proteaz bölgesi içermektedir (9,11).

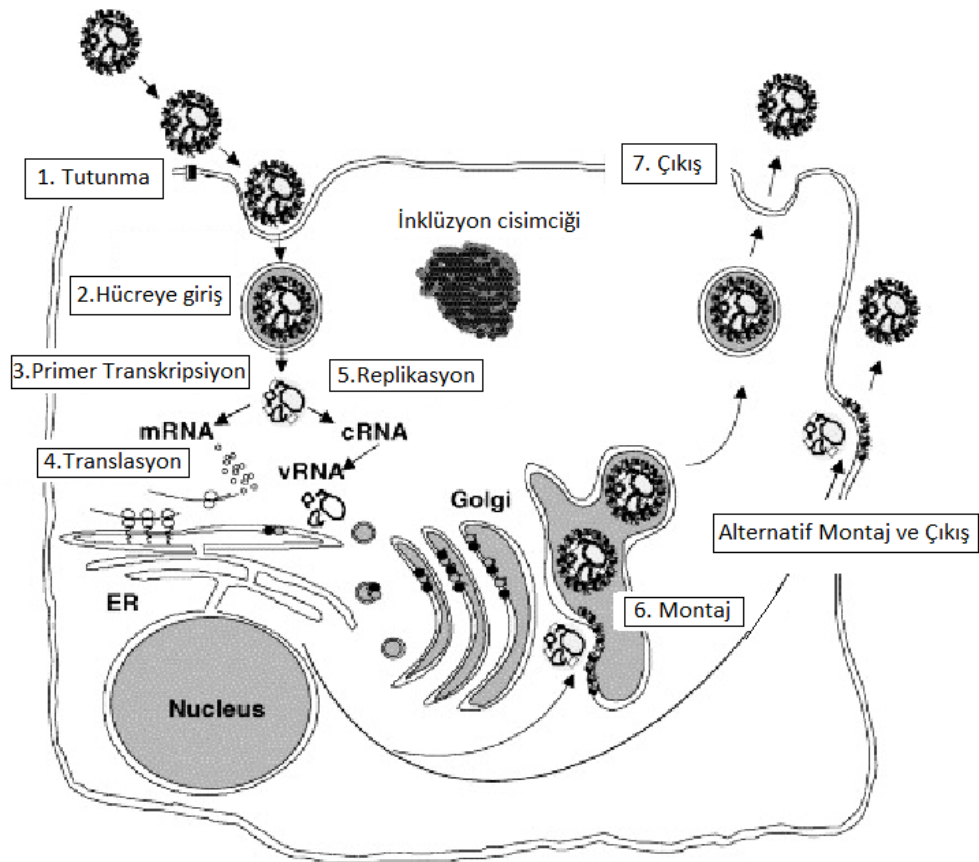
Gp160, Gp85, Gp38 ve NSm yapısal olmayan proteinlerdir. Gp160, Gp85 ve Gp38 proteinlerinin fonksiyonları tam olarak aydınlatılamamıştır. *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus* ve *Tospovirus* genuslarında görülen 14 kDa büyüklüğündeki NSm adlı protein, pürifiye virüslerde görülmemesine rağmen, enfekte hücrelerde sentezlenmektedir. Bu proteinin hücrede anti-apoptotik rol oynadığı bildirilmiştir (23, 30).

2.2.Virus Replikasyonu

KKKAH virüsünün hücreye tutunmasından, Gn ve Gc glikoproteinlerinin sorumlu olduğu bilinmektedir. Ancak, virüsün hücre içerisine alınmasında rol oynayan hücresele reseptörler tam olarak belirlenememiştir. Gc glikoproteininin hücresele reseptörlere bağlanmadan sorumlu olduğu, özellikle nötralizan antikorların hedefi olduğu bilinmekte, aynı zamanda füzyona da aracılık ettiği düşünülmektedir. Bununla beraber, hücresele nükleolin proteininin reseptör olabileceği yönünde tespitler söz konusudur. Nükleolinin aynı zamanda, RSV, HIV ve Japon ensefalit virüsü için reseptör görevi gördüğü bilinmektedir. Ancak KKKAH virüsü için bağlanma veya füzyonda rolü olup olmadığının aydınlatılması için daha detaylı çalışmalar gerekmektedir (26). Hücre yüzeyine tutunmanın ardından KKKAH virüsü, kalatrin aracılı endositoz ile hücre içerisine alınır. Giriş, kalatrin ve kalatrin çukur adaptör protein-2 kompleksi gerektirmektedir. Virüsün hücreye girişi aynı zamanda kolesterol ve düşük pH’ya da bağlıdır (12,26,31). Hücreye tutunma ve füzyonun ardından, genomik RNP’ler sitozole salınır, enkapside vRNA, viral mRNA’ların sentezi için L proteinine bir şablon oluştururlar. L proteini, konakçı hücre sitoplazmasında bulunan mRNA’lara ait oligonükleotit parçalarını kullanarak viral mRNA sentezini başlatır. Bu mekanizmaya

“şapka çalma” adı verilir. Viral RNA’lar, cRNA’ların oluşmasında kalıp olarak kullanılırlar. cRNA’lar ise mRNA sentezi, virüse ait protein translasyonun sağlanması ve yeni viral RNA’ların üretilmesinde kalıp olarak kullanılırlar (25,26,31,32).

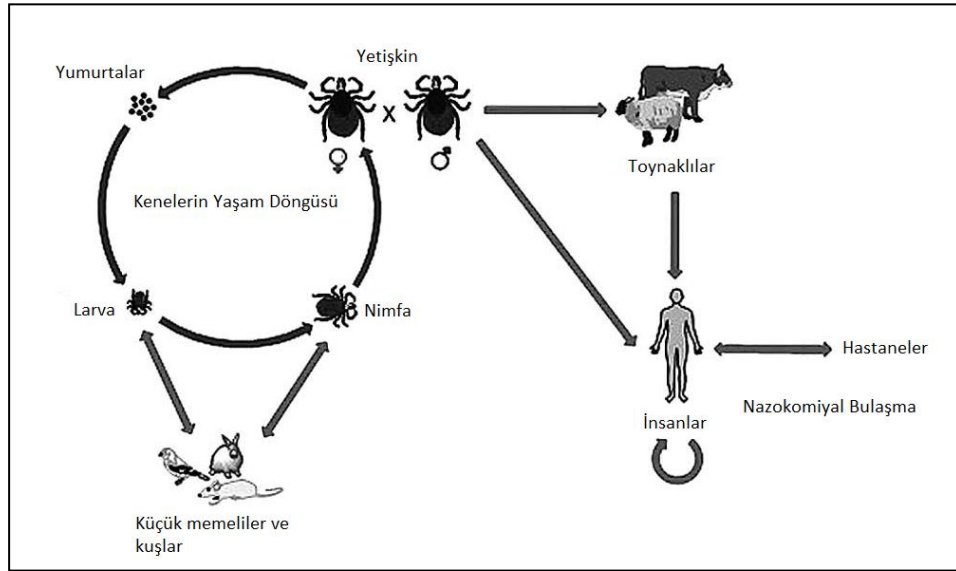
M segmentinin translasyonu ER’deki ribozomlarda olur ve önce poliproteininin sentezi gerçekleştirilir. Poliprotein posttranslasyonel modifikasyonlar geçirir, böylece önce prekürsör proteinler (PreGn ve PreGc), ardından Gn ve Gc yapısal glikoproteinleri, GP160, GP85, GP38 ve müsin benzeri glikoproteinler meydana gelir (7). KKKAH virüsü RNP’leri çoğunlukla sitoplazmada yer alır, NP ise Golgi kompleksine yakın yerde perinükleer bölgede bulunur. Viral glikoproteinlerin lokalize olduğu bölge virüsün tomurcuklanacağı bölgeyi belirler. Viral glikoproteinlerin lokalize olduğu Golgi kompleks ve transGolgi ile NP’nin lokalize olduğu perinükleer bölge birbirine uyumludur ve virüsün olgunlaşma aşamaları tam olarak aydınlatılamamış olsa da, golgiden çıkan viriyonların hücreden ekzositoz yoluyla serbest kaldıkları bilinmektedir (13,26,33) (Şekil 3).



Şekil 3 : KKKAH virüsünün çoğalma stratejisi (9)

2.3.Epidemiyoloji

KKKAH, ülkemizin de içinde bulunduğu geniş bir coğrafyada görülmektedir. Afrika, Asya, Balkanlar ve Ortadoğu'da bulunan 30'dan fazla ülkede hastalığın varlığı rapor edilmiştir. Hastalık sporadik olarak görülmekte ve doğada kene→omurgalı→kene döngüsü ile sirküle olmaktadır (şekil 4). Omurgalı canlılar ve keneler hastalığın rezervuarı olarak rol oynarlar (7, 9).



Şekil 4 : KKKAH virüsünün doğadaki sirkülasyonu (34).

Enfeksiyon, insanlar dışındaki omurgalılarda geçici bir viremi şeklinde seyreder. Hastalığın insanlara bulaşında, özellikle *Hyalomma* kene türleri önemli bir yer tutmaktadır. Bugüne kadar KKKAH virüsü için bazı kene türlerinin vektörlük potansiyeli ortaya konabilmiştir. Vektörlük potansiyeli olan kene türleri; *Hyalomma marginatum marginatum*, *Hyalomma anatolicum anatolicum* ve *Dermacentor marginatus* olarak sıralanabilir. KKKAH virüsü insanlara sıklıkla enfekte kene tutunmasıyla bulaşır. Aynı zamanda enfekte kenenin çıplak elle ezilmesi ile ve akut dönemdeki hastalarla ve viremik hayvanların doku sıvılarıyla direk temas sonrası enfeksiyonun olduğu da bildirilmiştir (7,9).

Endemik bölgelerde, tarım ve hayvancılıkla uğraşan insanlar kenelerin tesadüfi konakları durumundadır. Tarım çalışanları, çobanlar, hayvan sahipleri, kesimhane çalışanları ve veteriner hekimler risk grubunda yer almaktadır. Ayrıca, endemik bölgelerde kamp, piknik, yürüyüş ve avcılık yapan kişilerde risk altındadır. Türkiye'deki KKKAH vakalarının büyük bölümünü, endemik bölgede çiftçilik yapanlar oluşturmaktadır (6,35,36).

2.4. Viral Patogenez

KKKAH patogenezi, klinik patoloji uygulamalarının ve merkezlerinin sınırlı olması, ölen hastalara otopsi yapılamaması, virüsün yüksek güvenli laboratuvarlarda çalışma zorunluluğu gibi nedenlerden dolayı tam olarak aydınlatılamamıştır. Patogenezin anlaşılması, tedavinin planlanması açısından önemlidir. Viral kanamalı ateş etkenleri, mikrovasküler hasar ve hemostazın bozulması gibi temel ortak özelliklere sahiptirler. İleri derecedeki vakalarda genellikle bütün vücut boşluklarında kanamalar, septik şok ve çoklu organ yetmezliğine bağlı ölümler görülmektedir (16,37,38).

KKKAH virüsü, vücuda girdikten sonra, tipik olarak bölgesel lenf bezlerinde ve yerel dokularda çoğalır, sonra lenf ve monositler yoluyla başta dalak, karaciğer, lenf bezleri, akciğer, adrenal bezler ve endotel olmak üzere vücuda yayılır. Endotel hasarı, dolaylı olarak virüsün aktive ettiği konak kökenli faktörler aracılığıyla ya da virüsün direkt endotel hücrelerinde çoğalmasıyla şekillenebilir. Endotel hasarı, trombosit agregasyonu ve degranülasyonunun stimülasyonu ile intrinsek koagülasyon kaskadını aktive ederek hemostatik yetmezliğe sebep olur. Hastalığın erken evrelerinden başlayarak koagülasyon bozukluğu ve dissemine intravasküler koagülasyon (DİK) görülür. Ölen hastalarda anlamlı olarak daha belirgin DİK saptanmıştır. Ayrıca, ölen hastalarda IL-1, IL-6 ve TNF- α düzeylerinin sağ kalan hastalara göre daha fazla olduğu saptanmıştır (16,39,40,41).

2.5. Klinik Bulgular

Klinik belirtiler spesifik olmayan grip benzeri semptomlarla başlamaktadır. Genel olarak halsizlik, baş ağrısı, kas ağrıları, göğüs ağrısı görülmekte, ağır vakalarda ise vasküler bozukluklar ve hematemez, melena, hematokezya, metroraji, peteşi, purpura, epistaksis, diş eti ve ponksiyon yapılan yerlerde kanamalar görülür. Kanamalar

çoğunlukla 48. saatten sonra başlar. Nadir olarak hemotoraks ve intrakranial kanamalar da bildirilmiştir. Hepatosplenomegali yaygındır (7,37,38).

Hastalığın tipik seyri, inkübasyon, prehemorajik, hemorajik ve konvelesan evre olmak üzere 4 evreden oluşur (9). İnkübasyon süresi, ortalama 3-7 gün sürmektedir. Virüsün bulaş yolu bu inkübasyon süresinde etkili olabilmektedir. Prehemorajik evrede, ani ateş yükselmesi, baş ağrısı, miyalji ve baş dönmesi görülmektedir. Ortalama 4-5 gün ateşle birlikte, ishal, bulantı ve kusma belirtileri de görülebilir. Bu evre, 1-7 gün sürmektedir ve yüz, boyun, göğüste hiperemi ve konjunktivite bu evrede görülür. Hemorajik evre, ortalama olarak hastalığın 5. gününde başlar ve hızlı gelişir. Çoğunlukla, burun kanamaları, gastrointestinal sistem kanamaları, genital ve üriner sistem kanamaları ve solunum yolu kanamaları görülmektedir. Konvelesan dönem, hastalığın görülmesinden 10-20 gün sonra başlar. Bu dönemde değişken nabız, taşikardi, geçici saç dökülmesi, polinörit, solunum güçlüğü, kserostomi, zayıf görme, işitme ve hafıza kaybı olabilmektedir (9,12,36,37). Enfeksiyonda trombositopeni, lökopeni, aspartat transferaz (AST), Alanin Transferaz (ALT), Laktat dehidrogenaz (LDH) ve kreatinin fosfokinaz seviyelerinde artış görülmektedir (6,7).

Viral hemorajilerde klinik seyir son derece hızlıdır ve 7-10 gün içerisinde ölümle sonuçlanabilir. Virüs suşunun farklılığı, sağlık hizmetlerindeki farklılıklar, hastalardan kaynaklı sebepler nedeniyle, fatalite hızı değişkenlik gösterebilir. Olguların hafif yada ciddi seyretmelerinin sebepleri tam olarak bilinmemekle beraber, genetik faktörler, viral yük, enfeksiyon yolu ve altta yatan başka hastalıkların etkili olabileceği düşünülmektedir (18,41-44).

2.6. Teşhis Yöntemleri

Hastalığın laboratuvar tanı yöntemleri, doğrudan (direkt) yöntemler ve dolaylı yöntemler olarak ikiye ayrılabilir. Doğrudan yöntemler ile etken direkt gösterilirken, dolaylı yöntemler ile etkene karşı oluşmuş antikor yanıtı araştırılarak teşhis konulmaktadır. Virüsün izolasyonu, virüse spesifik antijen aranması ve viral nükleik asidin spesifik primerlerle çoğaltılması doğrudan yöntemlerdir. ELISA, immunofloresan, ve nötralizasyon testleri gibi etkene karşı oluşmuş antikor yanıtını arayan testler hastalığın teşhisinde kullanılan dolaylı yöntemlerdir (9,40,45).

KKKAH virüs izolasyonu, yeni doğmuş farelere şüpheli materyalin intrakraniyal inokulasyonu ile yapılmaktadır. Virüs inokule edilen fare yavruları 4-6 gün içerisinde ölürlür (46). Aynı zamanda hücre kültürlerinde de virüsün izolasyonu mümkündür. Primer tavuk embriyo, embriyonik fibroblast (CF-1), Afrika yeşil maymun böbrek hücresi (Vero, Vero E6), human caucasian adrenal cortex adenocarcinoma (SW-13), hibrit böbrek/fibroblast (CER) ve maymun böbrek (LLC-MK2), Madin-Darby köpek böbrek 1 (MDCK-1) epitelyal hücreleri, KKKAH virüsünün izolasyonunda kullanılan devamlı hücre hatlarıdır. KKKAH virüsünün bazı suşları hücre kültüründe fark edilebilir sitopatik etki göstermeyebilir (47). KKKAH virüsünün izolasyonu yüksek güvenli laboratuvarlarda çalışmayı gerektirmektedir (16).

Virüsün nükleokapsid proteinine karşı geliştirilen mAb'lar yada virüse karşı elde edilen asidez sıvı ile indirekt immunofloresan veya antijen-ELISA yöntemleriyle virüs spesifik antijenlerin hastalığın akut döneminde alınan örneklerden tespit edilebilir (44,48).

Virüse ait nükleik asidin belirlenmesi esasına dayanan tersine transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), yüksek spesifite göstermesi nedeniyle en çok tercih edilen metotlardan birisidir. Uygun koşullarda saklanmış klinik örneklerde de kullanılabilmektedir. Hastalığın ilk haftasından sonra, enfektif virüs miktarının azalmasına karşılık, 16. güne kadar viral RNA'nın saptanabildiği bilinmektedir. Günümüzde düşük kontaminasyon riski ve hızlı sonuç vermesi sebebiyle real-time PCR'da sıklıkla kullanılmaktadır (12,40,49,50).

Hastalığın 7. gününden itibaren, KKKAH virüsüne spesifik antikorlar ELISA ve IFA ile belirlenebilmektedir (6). Belirli periyotlarla alınan iki kan örneğinin antikor titresindeki 4 kat artış, akut enfeksiyon olduğunu göstermektedir. Enfeksiyondan 4 ay sonra IgM belirlenebilir düzeyin altına düşerken, IgG yanıtı ise azalma olmasına karşın uzun süre belirlenebilir seviyede kalmaktadır (12). KKKAH virüsünün serolojik tanısında kopleman fikzasyon, immunodifüzyon ve hemaglutinasyon inhibisyon testleri de kullanılmış, ancak testlerin hassasiyetleri yeterli bulunmamıştır (49).

2.7. Tedavi

KKKAH'nın spesifik bir tedavisi yoktur. Ancak destekleyici tedaviler, ribavirin kullanımı, antikör tedavileri ve diğer antivirallerin kullanımları güncel yaklaşımlardır. Hastanın yaşamsal bulguları, laboratuvar değerleri dikkate alınarak, trombosit süspansiyonu, taze donmuş plazma ve eritrosit süspansiyonu gibi kan ürünleri verilerek destek tedavisi uygulanmaktadır. Ayrıca, sıvı-elektrolit dengesinin sürekli olarak kontrol edilmesi gerekmektedir.

Etki mekanizması tam olarak bilinmemesine rağmen, KKKAH tedavisinde kullanılan tek antiviral ribavirindir. Ribavirin, guanozin analogudur ve *in vitro* olarak bazı RNA virüslerinin replikasyonunu inhibe ettiği bilinmektedir (51). Etkin olarak hepatit C (HCV), RSV, Lassa ateşi gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. İntravenöz, oral ve aerosol formları bulunmaktadır (37). Yapılan çalışmalarda, ribavirinin *in vitro* olarak hücrelerde virüs çoğalmasını inhibe ettiği gösterilmiştir. Bununla beraber ribavirinin hastalarda kullanıldığındaki etkisi günümüzde halen tartışmalı bir konudur (37,41,51). Tip I interferon yanıtı silinmiş olan IFNAR farelerinde yapılan uygulamalarında, virüs çoğalmasını kısmi olarak engellediği ancak ölüm zamanını geciktirdiği halde koruyuculuğunun olmadığı saptanmıştır. Aynı çalışmada kullanılan geniş spektrumlu bir antiviral olan favipiravir'in KKKAH IFNAR farelerinde etkin olduğunu gösterilmiştir (52). Ancak konuyla ilgili klinik çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

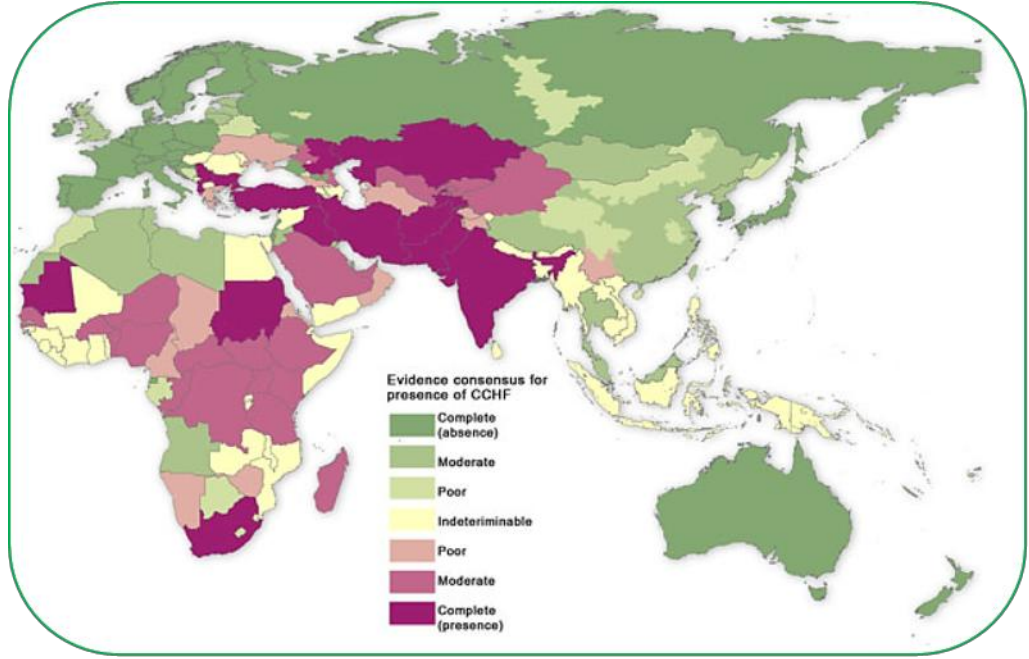
KKKAH'a karşı Bulgaristan'da 1970'li yıllarda fare beyni kullanılarak hazırlanan "Bulgar Aşısı" aşısı dışında bir aşı yoktur. Bununla beraber, Bulgar Aşısı Bulgaristan dışında hiçbir ülkede ruhsatlanmamış olup, güvenilirliği ve potensi hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Bulgar aşısı antijeni, fare yavrularının beyninden hazırlanmakta olup, kloroform ve ısı (58 °C) yoluyla inaktive edilmektedir. Alüminyum hidroksit ile adjuvanize edilerek insanlara subkutan olarak uygulanmaktadır. Aşı 0., 30. günlerde ve ilk immunizasyondan 1 yıl sonra uygulanmakta, 5 yıl sonra bir doz daha yapılmaktadır. Ancak aşı antijenin fare beyninde üretilmiş olması sebebiyle bazı otoimmün ve alerjik reaksiyonlara sebep olabileceği bildirilmiştir (16,41).

Son yıllara kadar KKKAH virüsüne karşı erişkin laboratuvar hayvan modeli olmadığı için deneysel aşı çalışmaları da oldukça az olup, yapılan aşı çalışmaları da *in vivo* olarak aşı koruyuculuğunu ortaya koyamamıştır (16). Bununla beraber 2010 yılında, İsveç ve Kanada grupları, interferon alfa ve beta genleri çıkarılmış IFNAR ve interferon gama geni çıkarılmış STAT-1 farelerinin KKKAH virüsü ile infekte olduğunu ve virüsün bu farelerde letal etki gösterdiğini ortaya koymuşlardır (53, 54). Bu gelişme KKKAH karşı aşı çalışmalarının önünü açmıştır (38, 55).

KKKAH virüsüne karşı monoklonal antikorlar ilk olarak 1987 yılında diagnostik amaçla geliştirilmiştir. Ancak günümüzde tedavi amaçlı nötralizan antikor geliştirme çalışmaları mevcuttur (41). Berlotti-Ciarlet ve ark., KKKAH virüsün Gn ve Gc glikoproteinlerine karşı monoklonal antikorlar geliştirmiş ve *in vitro* nötralizasyon ve *in vivo* koruma deneyleri yapmışlardır. SW-13 hücre hattında gerçekleştirdikleri nötralizasyon testlerinde, Gc'ye karşı geliştirilen mAb'ların nötralizan etkiye sahip olduklarını ancak Gn'e karşı geliştirilen mAb'ların nötralizan etkisinin olmadığını göstermişlerdir. Ancak yavru farelerde yaptıkları *in vivo* koruma deneylerinde, Gc'nin aksine Gn'e karşı geliştirilen antikorların fareleri öldürücü dozdan koruduğu görülmüştür (25). Çalışma, bu iki glikoproteine karşı geliştirilecek mAb'ların KKKAH tedavisinde kullanılabilme potansiyeli olduğunu göstermektedir.

2.8. Dünyada ve Ülkemizde Kırım-Kongo Kanamalı Ateş Hastalığı

Hastalık ilk olarak 12. Yüzyılda Tacikistan'da tanımlanmıştır. İkinci Dünya Savaşı sırasında Kırım'da 200 asker hastalığa yakalanmış ve 1956 yılında da Kongo ve Zaire'de de benzer kanamalı ateşli hastalık görülmüştür. Kırım ve Kongo'dan izole edilen virüs suşlarının antijenik olarak aynı olduğu belirlenince, hastalık Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi olarak adlandırılmıştır (6). 1940'lı yıllarda Rusya'da salgınlara sebep olmuş, daha sonra Asya, Avrupa ve Afrika'da sporadik vakalar görülmüştür. Virüs CDC\NIAID tarafından C sınıfı patojen olarak sınıflandırılmıştır (7). Daha sonraki yıllarda KKKAH, Afrika (Demokratik Kongo Cumhuriyeti, Uganda, Moritanya, Güney Afrika, Tanzanya, Nijerya, Senegal vb.), güneydoğu Avrupa (Rusya, Bulgaristan, Kosova, Türkiye, Yunanistan vb.), Orta Doğu (Birleşik Arap Emirliği, Irak, İran, Suudi Arabistan, Umman) ve Asya (Çin, Kazakistan, Tacikistan, Özbekistan, Pakistan, Hindistan) kıtalarında ve çok sayıda ülkede rapor edilmiştir (Şekil 5)(56).



Şekil 5 : KKKAH Coğrafi Dağılımı, koyu yeşilden (KKKAH görülmediği konusunda fikir birliğine varılmış bölgeler) mora (KKKAH görüldüğü konusunda fikir birliğine varılmış bölgeler) kadar değişen yoğunluklarda renklerle KKKAH'nın coğrafi dağılımını göstermektedir. Sarı renkli bölgeler için ise KKKAH varlığı şüphelidir (56).

Ülkemizde ilk vakalar 2001 yılında bildirilmiştir (5). Ertesi yıl, 17 kişi hastanelere başvurmuş ve bu hastalarda ortak olarak grip benzeri belirtiler, peteşiyal döküntüler, trombositopeni, lökopeni ve karaciğer enzimlerinde (AST, LDH vb.) yükselme görülmüştür. Hastadan alınan serum örnekleri, Fransa Ulusal Referans ve DSÖ İşbirliği Merkezine gönderilmiş, arbovirüs ve viral hemorajik ateş açısından değerlendirilmiştir. Ağustos 2003 tarihinde Pastör Enstitüsü, serolojik ve moleküler incelemeler sonucunda etkenin KKKAH virüsü olduğunu bildirmiştir. Bu durum Türkiye’de bildirilen ilk KKKAH vakasıdır (35,36).

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 yaklaşık %5 civarındadır (57). Ülkemizde, son 15 yıldır bildirilen ve dünyanın en büyük KKKAH salgınları şeklinde seyreden hastalık önemli sağlık problemlerinden biri olarak değerlendirilmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Vero E6 Hücrelerinde KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit06 Suşunun Üretilmesi

3.1.1. Vero E6 Hücrelerinin Çözdürülmesi ve Çoğaltılması

3.1.1.1. Materyal

- 37°C Su Banyosu
- Sınıf 2 Biyogüvenlik Kabini (ADS Laminare Optimale)
- Santrifüj (Beckman Coulter, Allegra X-22)
- DMEM/F-12 Ham (D8900, Sigma)
- NCS (Newborn Calf Serum) (N4762, Sigma)
- Sodyum Bikarbonat (S5761, Sigma)
- Antibiyotik (Penisilin/streptomisin/amfoterisin B) (A5955, Sigma)
- Hücre kültür vasatı: %10 NCS ve %1 antibiyotik içeren DMEM/F-12 Ham
- Hücre: Vero E6 (ERAGEM Hücre Kültür Stoğu)
- 25 cm² hücre kültür kabı (3056, Corning)
- %5 CO₂'li İnkübatör (MCO-18AC-PE, Panasonic)

3.1.1.2. Yöntem

Donmuş hücreleri içeren (1x10⁶ hücre/ml) kriyovialler sıvı azottan çıkarılarak bekletilmeksizin 37°C su banyosunda, kapak kısmından tutulup hafifçe sallanarak, içerisinde az miktarda (%70'i çözününceye kadar) buz kalıncaya kadar çözdürüldü. Daha sonra biyogüvenlik kabinine alınıp ve %70 etanol ile dezenfekte edilen hücre viali içerisindeki hücre süspansiyonu, 37°C'ye ısıtılmış hücre kültür vasatı içerisine damla

damla ilave edildi. Hücre süspansiyonu 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek elde edilen pellet homojenize edildi ve üzerine besin ortamı ilave edildi. Hücre süspansiyonu 25 cm² hücre kültür kabına alınarak 37°C, %5 CO₂'li inkübatörde üremeye bırakıldı.

3.1.2. Vero E6 Hücrelerinin Pasajlanması

3.1.2.1. Materyal

- Sınıf 2 Biyogüvenlik Kabini (**ADS Laminare Optimale**)
- Santrifüj (**Beckman Coulter, Allegra X-22**)
- DMEM/F-12 Ham (**D8900, Sigma**)
- NCS (**N4762, Sigma**)
- Antibiyotik (Penisilin/streptomisin/amfoterisin B) (**A5955, Sigma**)
- Tripsin-EDTA (**T4049, Sigma**)
- Hücre kültür vasatı: %10 NCS ve %1 antibiyotik içeren DMEM/F-12 Ham
- Hücre: Vero E6 (**ERAGEM Hücre kültür stoğu**)
- 25 cm² hücre kültür kabı (**3056, Corning**)
- 75 cm² hücre kültür kabı (**430720, Corning**)
- 175 cm² hücre kültür kabı (**431079, Corning**)
- 15 ml'lik santrifüj tüpü (**E1460-0200-15, Starlab**)
- %5 CO₂'li İnkübatör (**MCO-18AC-PE, Panasonic**)

3.1.2.2. Metot

Vasat uzaklaştırıldıktan sonra kültür kabı yüzeyindeki hücreler Tripsin/EDTA ile yıkandı. Yıkama solüsyonu kültür kabından uzaklaştırıldı. Önceden 37°C'ye ısıtılmış Tripsin/EDTA solüsyonu diğer yüzeyden hücre kültür kabına eklendi (175cm² için 3 ml) ve dikkatlice tripsinin yüzeye yayılması sağlanarak yaklaşık 2 dk 37°C inkübatörde bekletildi. Hücrelerin yüzeyden ayrılıp ayrılmadıkları mikroskop ile kontrol edildi. Hücrelerin %90'ı kalktıktan sonra, önceden ısıtılmış besin ortamı (kullanılan Tripsin/EDTA solüsyonu hacminin 2 katı hacimde) kültür kabına ilave edildi. Hafif pipetlemelerle hücre grupları dağıtıldı. Hücre süspansiyonu, 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı ve 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Hücre pelleti 5 ml besin ortamı ile

resüspanse edildi ve küçük bir örnek alınarak hücre sayımı yapıldı. Hücre sayısı ve canlılık oranı belirlendikten sonra gerekli seyreltmeler yapılarak uygun sayıda hücre (3×10^6 - 4×10^6 hücre) 75 cm^2 kültür kabına aktarıldı. Kültür 37°C , CO_2 'li inkübatöre kaldırıldı. Aynı şekilde 75 cm^2 kültür kabında çoğalan ve %80 monolayer olan hücreler 175 cm^2 kültür kabına pasajlandı.

3.1.3. Vero E6 Hücrelerinin Döner Şişelerde Üretilmesi

3.1.3.1. Materyal

- Sınıf 2 Biyogüvenlik Kabini (**ADS Laminare Optimale**)
- Santrifüj (**Beckman Coulter, Allegra X-22**)
- DMEM/F-12 Ham, (**D8900, Sigma**)
- NCS (**N4762, Sigma**)
- Antibiyotik (Penisilin/streptomisin/amfoterisin B) (**A5955, Sigma**)
- Tripsin-EDTA (**T4049, Sigma**)
- Hücre kültür vasatı: %10 NCS ve %1 antibiyotik içeren DMEM/F-12 Ham
- Hücre: Vero E6 (**ERAGEM Hücre kültür stoğu**)
- 175 cm^2 hücre kültür kabı (**431079, Corning**)
- Döner Şişeler (**680-065 Grainer**)
- 15 ml'lik santrifüj tüpü (**E1460-0200-15, Starlab**)
- %5 CO_2 'li Inkübatör (**MCO-18AC-PE, Panasonic**)
- Döner şişe inkübatör (**I057606-C, Wheaton Industries Inc., Roll-In CO_2 Incub.**)

3.1.3.2. Metot

İki adet 175 cm^2 kültür kabında üretilen monolayer durumdaki Vero E6 hücresinin vasatı dökülerek hücreler 3 ml Tripsin-EDTA ile bir kez yıkandı. Hücre kültür kaplarına 5'er ml Tripsin-EDTA ilave edildi ve 37°C etüvde hücreler tamamen kalkıncaya kadar beklendi (3-5 dk). Hücreler, 10 ml hücre üretme vasatı ile resüspanse edilerek 15 ml falcon tüpe geçildi. Daha sonra 1000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilip üst sıvı döküldükten sonra, hücre peleti önce parmak vuruşları ile çözündürüldü, ardından 1 ml

hücre üretme vasatı ile resüspanse edilerek pelet çözdürölüp, 5 ml'ye tamamlandı. Bir adet döner şişe (850 cm²) içerisine 25 ml hücre üretme vasatı ilave edildi. Resüspanse edilen hücreler döner şişeye ilave edilerek 30 ml'ye tamamlandı. Döner şişe, inkübatör içerisinde bulunan rotatör cihazına yerleştirildi ve rotatörün dönüş hızı 0,17 rpm'e ayarlanarak, 37⁰C, %5 CO₂'li inkübatörde bir gece hücrelerin şişe yüzeyine tutunması sağlandı. Ertesi gün döner şişe içerisindeki hücre üretme vasat miktarı 100 ml'ye tamamlandı ve rotatörün hızı 0.6 rpm'e çıkarıldı (Şekil 6). Hücreler mikroskop altında incelenerek %80 monolayer olana kadar (ortalama 5 gün) kültüre edildi ve bu süre içerisinde, kültür pH'sı 7,2-7,4 arasında sabit tutuldu.



Şekil 6 : Döner Şişe Kültür Sisteminde Kültüre Edilen Vero E6 Hücreleri

3.1.4. Döner Şişe ile Kültüre Edilen Vero E6 Hücrelerinin Pasajlanması

3.1.4.1. Materyal

- Sınıf 2 Biyogüvenlik Kabini (ADS Laminare Optimale)
- Santrifüj (Beckman Coulter, Allegra X-22)
- DMEM/F-12 Ham, (D8900, Sigma)
- NCS (N4762, Sigma)
- Antibiyotik (Penisilin/streptomisin/amfoterisin B) (A5955, Sigma)

- Tripsin-EDTA (**T4049, Sigma**)
- Hücre kültür vasatı: %10 NCS ve %1 antibiyotik içeren DMEM/F-12 Ham
- Hücre: Vero E6 (**ERAGEM Hücre kültür stoğu**)
- Döner Şişeler (**680-065 Grainer**)
- 50 ml'lik santrifüj tüpü (**S00935, Starlab**)
- %5 CO₂'li İnkübatör (**MCO-18AC-PE, Panasonic**)
- Döner Şişe inkübatör (**I057606-C, Wheaton Industries Inc., Roll-In CO₂ Incub.**)

3.1.4.2. Metot

Döner şişe içindeki hücre üretme vasatı dökülerek uzaklaştırıldı ve şişenin içine 10 ml Tripsin-EDTA solüsyonu konularak şişe yıkandı. Ardından, yıkama amaçlı konulan Tripsin-EDTA döküldükten sonra, şişe içine 15 ml taze Tripsin-EDTA konuldu ve şişe 37⁰C'de 5 dakika rotatörde inkübe edildi. Şişenin yüzeyindeki hücrelerin, yüzeyden ayrıldığı gözle görüldükten sonra, şişe içerisine 15 ml hücre üretme vasatı ilave edildi ve hücreler resüspanse edilerek 50 ml falcon tüpe alındı. Hücreler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Hücre peleti sarsılmadan dikkatli bir şekilde süpernatant döküldü. Pellet 3 ml hücre üretme vasatı ile pipete edilerek resüspanse edildi ve hücre külür vasatı ile 20 ml'ye tamamlandı. 1 döner şişe, 2 döner şişeye (pasaj oranı 1:2) pasajlanarak toplamda 10 döner şişe kültüre alındı.

3.1.5. Vero E6 Hücrelerinde KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit06 Suşunun Üretilmesi

3.1.5.1. Materyal

- Sınıf 2 Biyogüvenlik Kabini (**ADS Laminare Optimale**)
- Virüs : KKKAHV Turkey-Kelkit06 3. Pasaj (8x10⁷ PFU/ml) (**ERAGEM Stoğu**)
- DMEM/F-12 Ham, (**D8900, Sigma**)
- NCS (**N4762, Sigma**)
- Antibiyotik (Penisilin/streptomisin/amfoterisin B) (**A5955, Sigma**)
- Hücre kültür vasatı: %10 NCS ve %1 antibiyotik içeren DMEM/F-12 Ham

- Virüs ekim vasatı : DMEM/F-12 + % 1 antibiyotik
- Virüs üretim vasatı: DMEM/F-12 + %2 NCS + % 1 antibiyotik
- Hücre: Vero E6 (**ERAGEM Hücre kültür stoğu**)
- 25 cm² hücre kültür kabı (**3056, Corning**)
- 75 cm² hücre kültür kabı (**430720, Corning**)
- 175 cm² hücre kültür kabı (**431079, Corning**)
- Döner Şişeler (**680-065 Grainer**)
- 15 ml'lik santrifüj tüpü (**E1460-0200-15, Starlab**)
- %5 CO₂'li İnkübatör (**MCO-18AC-PE, Panasonic**)
- Döner şişe inkübatörü (**I057606-C, Wheaton Industries Inc., Roll-In CO₂ Incub.**)

3.1.5.2. Metot

On adet Vero E6 döner şişe hücre kültürü hazırlandı. Hücreler yeterli sayıya ulaştıktan sonra (yaklaşık %80 monolayer) kullanıldı. Hücre vasatı uzaklaştırıldıktan sonra, KKKAH virüsü ile, MOI= 0,01 olacak şekilde, 15 ml vasat içerisinde hazırlanarak döner şişelere ekim yapıldı. Kültürler 1 saat virüs ekim vasatı ile 0,2 rpm'de, 37°C'de inkübe edildikten sonra virüs ekim vasatı uzaklaştırıldı ve döner şişelere 50 ml virüs üretim vasatı ilave edildi. Kültürün 3., 5., 7., 11. ve 13. günlerinde 50 ml süpernatant toplanıp, yerine 50 ml taze virüs üretim vasatı eklendi. Toplanan süpernatantlar -80°C derin dondurucuda muhafaza edildi. Kültürün 15. gününde tüm döner şişeler, içindeki süpernatantı ile birlikte -80°C derin dondurucuya kaldırıldı.

3.1.6. KKKAH Virüsü Turkey-Kelkit06 Suşunun Konsantrasyonu, İnaktif Edilmesi ve Antijen Miktarının Belirlenmesi

3.1.6.1. Polietilen Glikol (PEG) Yöntemiyle Virüs Konsantrasyonu

3.1.6.1.1. Materyal

- Sınıf 2 Biyogüvenlik Kabini (**ADS Laminare Optimale**)
- 50 ml'lik santrifüj tüpü (**E1460-0200-15, Starlab**)

- Santrifüj (**Beckman Coulter, Allegra X-22**)
- PEG 8000 aseptik şartlarda tartılmış ve steril distile suda çözündürülerek %50 (w/v) PEG solüsyonu steril olarak hazırlanmıştır.
- %23 (w/v) NaCl çözeltisi hazırlanmış ve 121°C’de 15 dk otoklavlanarak steril edilmiştir.
- SW 28 Polyallomer tüpler (**326823, Beckman, Polyallomer**) : (121°C’de 15 dk otoklavlanarak steril edildi)
- SW 41 ultra clear tüpler (**344059, Beckman, Ultraclear**) : (%10 H₂O₂ ile 30 dk muamele edilip ve steril 1X PBS ile yıkanarak steril edildi.)
- Santrifüj (**Beckman Coulter, Optima XPN-100**)
- Santrifüj (**Beckman Coulter, Allegra X-22**)
- 10X ten buffer: 0,1 M Tris-Cl (pH: 8) + 0,01 M EDTA (pH: 8) + 1M NaCl
- 1X Ten Buffer: 10X ten buffer dilüe edilerek hazırlandı.
- %37 Formaldehit (**Sigma F8775**): 1:40 oranında PBS içerisinde sulandırıldıktan sonra 0.22 µm filtre ile sterilize edildi.
- Sodyum bisülfat (**Merck, S6058956 018**): % 3.75 oranında PBS içerisinde dilüe edilerek 0.22 µm filtre ile sterilize edildi.
- 20.000 MWCO diyaliz kaseti (**Thermo, 66003**)
- 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5 ve 20 mg/ml BSA standartları
- 96 well dilüsyon pleyti
- Reagent A (**500-0113, Biorad Dc Protein Assay**)
- Reagent B (**500-0114 Biorad Dc Protein Assay**)
- Pleyt Okuyucu (**Thermo Scientific Multiscan FC**)

3.1.6.2. Metot

Derin dondurucuya kaldırılmış olan ve virüs içeren üst sıvılar +4°C’de çözündürüldü. Aynı zamanda, 15. gün üst sıvılarını içeren ve -80°C ye kaldırılmış olan döner şişelere, 3 kez dondur-çöz işlemi yapılarak (Şekil 7) hücrelerin parçalanıp virüsün açığa çıkması sağlandı. 3000 rpm’de 30 dakika +4°C’de santrifüj edilerek hücresel bileşenler çöktürüldü. Santrifüj işlemlerinin ardından süpernatantlar, içinde manyetik karıştırıcı

barı içeren erlenmayerde birleştirildi ve PEG çöktürme işlemine alındı. Toplanan süpernatantın %15'i kadar %50 PEG solüsyonundan, ardından PEG solüsyonu ilavesinden sonra elde edilen toplam hacmin %10'u kadar da %23 NaCl solüsyonundan ilave edilip, 1 gece +4°C'de 150 rpm'de manyetik karıştırıcı ile karıştırmaya bırakıldı. Bir gece karıştırıcı üzerinde kalan virüs-PEG karışımı, 35'er ml SW 28 ultrasantrifüj tüplerine paylaştırıldı ve ultrasantrifüjde, +4°C'de 12000 rpm'de 30 dk süreyle santrifüj edildi. Elde edilen pellet 1X TEN solüsyonu ile çözündürülüp tek tüpte birleştirildi. Çözdürülen peletler, +4°C'de 5500 rpm'de 20 dk süreyle santrifüj edildi. Daha sonra 1X TEN solüsyonu ile dilüe edilip, 12'şer ml SW 41 ultrasantrifüj tüplerinde paylaştırıldı ve +4°C'de 24000 rpm'de, 2 saat süreyle ultrasantrifüj edildi. Üst sıvı alınarak virüs inaktivasyonu amacıyla 1:40 oranında dilüe edilen %37 formaldehitten, 1:50 oranında pürifiye virüse ilave edilerek final konsantrasyonu % 0.05 formaldehit kullanıldı. Karışım 7 gün süreyle oda ısısında inkübe edildi. Formaldehidin nötralize edilmesi için % 3.75 sodyum bisülfattan 1:100 oranında inaktive edilen virüse ilave edildi. Formaldehit ve sodyum bisülfatın uzaklaştırılması amacıyla karışım inaktif virüs diyaliz edildi.

Konsantre edilen antijen miktarı standart Lowry deneyi belirlenmiştir. Bu amaçla 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5 ve 20 mg/ml BSA standartları hazırlanmıştır. Standartlardan ve miktarı ölçülecek olan örneklerden 5'er µl 96 kuyucuklu mikroyetkin gözlerine bırakılmıştır. Standartlar ve test edilecek örneklerin üzerlerine, Reagent A'dan 25 µl, Reagent B'den 200 µl eklendi ve oda ısısında 10 dk inkübe edildi. Kuyucuklardaki renk değişiklikleri standartlar ile karşılaştırılarak örneklerin protein miktarı kalitatif ve pleyt okuyucuda 650 nm dalga boyunda kantitatif olarak okundu. Örneklerle standartlar karşılaştırılarak protein miktarları hesaplandı.



Şekil 7 : -80°C derin dondurucudan çıkarılan, KKKAH virüsü ile enfekte hücreleri içeren döner şişe kültür kapları

3.2. Hibridomaların Elde Edilmesi

108G126 nolu ve 'Kırım-Kongo Kanamalı Ateş Hastalığı Virüsünün Epidemiyolojisi, Moleküler Karakterizasyonu, Antijen-ELISA Geliştirilmesi ve Koruyucu Aşı Çalışmaları` isimli TUBİTAK 1007 KAMAG projesi kapsamında yapılan toplam 6 füzyon sonucunda elde edilen hibridomalardan, glikoproteinlere karşı olabileceği düşünülenler dondurulmuştur. Hibridomaların elde edildiği füzyon protokolü aşağıdaki gibidir.

3.2.1. HY-HAT Besin Ortamının Hazırlanması

3.2.1.1. Materyal

- | | |
|--|--------|
| • RPMI 1640 (SIGMA, Cat No: R8005) | 60 ml |
| • NCTC-135 (SIGMA, Cat No: N3262) | 16 ml |
| • FCS (SIGMA, Cat No: N4637) | 20 ml |
| • %45 D-glikoz (0.2 micron filtered)(SIGMA, G8270) | 1 ml |
| • 200 mM L-glutamin (SIGMA, Cat No:G2150) | 0,1 ml |
| • 0.1 mM Na ₂ SeO ₃ (0.2 micron filtered)(SIGMA, Cat No:00163) | 0,1 ml |
| • Gentamisin (50 mg/mL) (SIGMA, G1522) | 0,1 ml |

- LPS konsentrat (**SIGMA, Cat No:L770**) 1,5 ml
- Dekstran Sülfat (0.45 micron filtered) (**SIGMA, Cat No:D4911**) 0,5 ml
- HAT (1x) (**SIGMA, Cat No:H10262**) 2 ml

3.2.1.2. Metot

16,4 gr liyofilize RPMI 1640 medium 1 litre distile suda çözündürüldü. Vasatın içine 2 gr sodyum bikarbonat ilave edildi. 0,22 µm filtreden geçirilerek steril edildi ve +4°C’de saklandı.

9,3 gr liyofilize NCTC-135 medium 1 litre distile suda çözündürüldü. Vasatın içine 2,2 gr sodyum bikarbonat ilave edildi. 0,22 µm filtreden geçirilerek steril edildi ve +4°C’de saklandı.

45 gr D-Glucose tartılarak 100 ml distile su içerisinde çözündürüldü. 0,22 µm filtreden geçirilerek steril edildi ve +4°C’de saklandı.

HAT solüsyonu 1 tüpe 10 ml steril RPMI-1640 edium ilave edilerek 1X olacak şekilde hazırlandı.

Materyal kısmında belirtilen bileşenler, aseptik koşullar altında, belirtilen miktarlarda bir araya getirilerek Hy-HAT vasatı hazırlandı.

3.2.2. Dalak Hücrelerinin Hazırlanması

3.2.2.1. Materyal

- RPMI 1640 (**R8005, Sigma**)
- D-Glikoz (**G5146, SIGMA**)
- Antibiyotik (Penisilin/streptomisin/amfoterisin B) (**A5955, Sigma**)
- Ketamin (**Ketalar, Pfizer**) (10mg/ml)
- Rompun (**Rompun, Bayer**) (50 mg/ml)
- Doku grinder (**CD1-1KT, Sigma**)
- Tris (**1083870500, Merck**)

- NH_4Cl (A0171, Sigma)
- Soğutmalı Santrifüj (Allegra, Beckman)
- M-0 medium : RPMI-1640 + %1 , %45 D-Glikoz
- M-10 medium : M-0 medium + %10 FBS
- Hemolitik Solüsyonu : (0,2 gr Tris + 0,83 gr NH_4Cl + 100ml distile su, pH : 7,2, 0,2 μm 'lik filtre ile steril edilir.)

3.2.2.2. Metot

Anestezi için 0.3 cc Ketamin ve 0.1 cc Rompun karışımı farelere intramuskular verilerek anestezi sağlandı. Anesteziye alınan farelerden, 2 ml enjektör ya da 26 gauge iğne ile direkt kalpten 500-1000 μl kan alındı. Kan alımı tamamlandıktan sonra servikal dislokasyon uygulandı ve %70 alkol içerisinde kısa süre bekletilen fareler, otoklav edilmiş peçete ile kurulandı ve biyogüvenlik kabinine alındı. Makas seti yardımıyla üst deri dikey olarak kesildi ve 4 tarafa açıldı. İkinci makas seti ile periton zarı kesildi ve dalak açığa çıkarıldı. Son makas seti ile dalak dikkatlice çıkarıldı ve bağ ve yağ dokulardan temizlendi. Dalak ilk olarak 60 mm çaplı ve içerisinde 10 ml M10 besin ortamı içeren petriye alındı ve yıkama yapıldı. Bu ön yıkamanın ardından dalak 3 ml M10 besin ortamı içeren petriye alındı. Daha sonra enjektöre alınan 10 ml M10 besin ortamı, dalakta delikler açarak dalak içerisine verildi. Petride toplanan sıvı santrifüj tüpüne toplandı. Dalak süzgeç içine alındı ve cam baget yardımıyla süzgeçten geçirildi. Petride toplanan sıvı santrifüj tüplerinde toplandı. Toplanan süspansiyon, oda ısısında, 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Pellet 5 ml buz içerisinde soğutulmuş hemolitik reaktif ile resüspanse edildi ve 10 dk oda ısısında inkübe edildi. 5 ml buz içerisinde soğutulmuş M10 besin ortamı ilave edildikten sonra, süspansiyon oda ısısında 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Pelletin eritrosit içermemesine dikkat edildi. Pellet 2 ml M0 ortamı ile resüspanse edildi ve dalak hücresi miktarının belirlenmesi amacıyla hücre sayımı yapıldı.

Mikrolitredeki hücre sayısı şu formüle göre hesaplandı:

$$\frac{\text{Hücre}}{\mu\text{l}} = \text{bir küçük griddeki ortalama hücre sayısı} * 90 * \text{dilüsyon faktörü}$$

3.2.3. Füzyon

3.2.3.1. Materyal

- Hy-HAT Besin Ortamı
- PEG 1500 (**P7306, Sigma**)
- Soğutmalı Santrifüj (**Allegra, Beckman**)
- 37°C Su Banyosu
- M-0 medium : RPMI-1640 + %1 oranında %45'lik D-Glikoz
- M-10 medium : M-0 medium + %10 FBS

3.2.3.2. Metot

Yaklaşık 120×10^6 dalak hücrelerine karşılık, 40×10^6 myeloma hücresi füzyon için kullanıldı. Oda ısısında 5 dk 1000 rpm'de santrifüj edilen myeloma hücreleri, 2 ml M0 ortamı ile resüspanse edildi. Dalak hücre süspansiyonu ile myeloma hücre süspansiyonu birleştirildi. Birleştirilen hücre süspansiyonu M0 ortamı ile 15 ml'ye tamamlandı. Süspansiyon oda ısısında 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Tüm işlemler steril su banyosunda, 37°C'de yapıldı. Pellet hafif parmak vuruşlarıyla resüspanse edilerek biyogüvenlik kabini içerisindeki 37°C su banyosuna alındı. Önceden ısıtılmış 0,5 ml PEG solüsyonu, damla damla ve karıştırılarak, 45 sn içerisinde tüpe ilave edildi. Tekrar önceden ısıtılmış 0,5 ml PEG solüsyonu, damla damla ve karıştırılarak, 45-50 sn içerisinde tüpe ilave edildi. Önceden ısıtılmış 1 ml M0 ortamı karıştırılarak, 1dk içerisinde damla damla tüpe ilave edildi. 3 ml M0 ortamı karıştırılarak, 3dk içerisinde damla damla tüpe ilave edildi. 10 ml M0 ortamı karıştırılarak, 1-2 dk içerisinde damla damla tüpe ilave edildi. Tüp, 37°C su banyosunda 10 dk inkübe edildi. Oda ısısında 750-900 rpm'de 5 dk santrifüj edildi, üst sıvı döküldü ve 15 ml HAT içeren besin ortamı, pellet resüspanse edilmeden pelletin üzerine ilave edilerek 37°C su banyosunda 10 dk inkübe edildi. Süspansiyon

üzerine 35 ml HAT içeren besin ortamı ilave edildikten sonra 100 µl olacak şekilde 5 adet 96 gözlü pleyte aktarıldı. Pleytler 37°C , %5 CO₂'li inkübatöre kaldırıldı.

3.3. Hibridomaların Stabilitelerinin Belirlenmesi

3.3.1. Test Edilecek Olan Hibridoma Hücrelerinin Çözdürülmesi

3.3.1.1. Materyal

- 37°C Su Banyosu
- Sınıf 2 Biyogüvenlik Kabini (ADS Laminare Optimale)
- Santrifüj: **Beckman Coulter, Allegra X-22**
- Hy-HAT Besiyeri
- Hücre: **ERAGEM Hücre Kültür Stoğu Hibridomalar**
- 24 Well Plate (**3526, Costar**)
- %5 CO₂'li İnkübatör (**MCO-18AC-PE, Panasonic**)

3.3.1.2. Metot

Daha önceden yapılan füzyon deneyleri sonucu elde edilen ve -80°C'de saklanmakta olan, KKKAH virüsü glikoproteinlerine karşı olduğu düşünülen klonlar, 24'lü gruplar halinde çözdürüldü. -80°C'den çıkarılan donmuş hücreleri içeren (1x10⁶ hücre/ml) kriyovialler bekletilmeksizin 37°C su banyosunda çözdürüldü. Çözdürülen hücreler önceden 37°C'ye getirilmiş HY-HAT seçici besin ortamı içerisine damla damla ilave edildi. Hücre süspansiyonu 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant, pellete zarar verilmeden dikkatlice döküldü. Pellet homojenize edildi ve üzerine besin ortamı ilave edildi. Hücre süspansiyonu 6 well pleytin bir gözüne aktarıldı ve pleyt 37°C, %5 CO₂'li inkübatöre kaldırıldı. 7 günlük kültür süresinden sonra hibridoma süpernatantları toplandı, öncelikle IFA deneyi ile hala antikor sentezleme yeteneğinde oldukları doğrulandıktan sonra Western Blot ve ELISA ile test edildi.

3.3.2. Immun Floresan Testi (IFA)

3.3.2.1. Materyal

- Sınıf 2 Biyogüvenlik Kabini (**ADS Laminare Optimale**)
- Hücre: Vero E6 (**ERAGEM Hücre kültür stoğu**)
- 96 well Plate (**3596, Costar**)
- DMEM/F-12 Ham, (**D8900, Sigma**)
- NCS (**N4762, Sigma**)
- Antibiyotik (Penisilin/streptomisin/amfoterisin B) (**A5955, Sigma**)
- Sodyum fosfat monobazik (**K91348245 738, Merck**)
- Sodyum fosfat dibazik (**S0876, Sigma**)
- %37'lik formaldehit (**F8775, Sigma**)
- Triton X-100 (**T9284, Sigma**)
- Süt Tozu (**Pınar**)
- NaCl (**K92033000 546, Merck**)
- Tween 20 (**8.22184.0500, Merck**)
- Tis-HCl (**T3253, Sigma**)
- Hücre kültür vasatı: %10 NCS +%1 antibiyotik + DMEM/F-12 HAM
- Virüs ekim vasatı: DMEM/F-12 + % 1 antibiyotik
- Virüs üretim vasatı: DMEM/F12 + %2 NCS + % 1 antibiyotik
- %2 karboksi metil selüloz (CMC): 4 gr karboksi metil selüloz (CMC) 200 ml dH₂O içerisinde, ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda 300°C ve 500 rpm hızda karıştırılarak çözdürüldü. 121°C'de 15 dakika süreyle otoklav edilerek steril edildi.
- Overlay Vasat: İki kat yoğunlukta hazırlanan DMEM/F-12 Ham ile 1:1 oranında % 2 FBS ve % 1 antibiyotik ilave edilip homojenize edilerek hazırlanır.
- Permeabilizasyon Solüsyonu: % 0.1 Triton X-100 içeren PBS
- Nötral buffer
- formalin solüsyonu: 1 L için: 4 gr sodyum fosfat monobazik + 6.5 gr sodyum fosfat dibazik + 100 ml % 37'lik formaldehit

- Bloklama solüsyonu: %5 yağsız süt tozu içeren PBS
- TBST: 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl , % 0.1 Tween-20
- Goat Anti-Mouse IgG, Human ads-FITC (**Southern Biotech, 1010-02**)
- %20 glycerol (**G5516, Sigma**) içeren PBS solüsyonu

3.3.2.2. Metot

Vero E6 hücreleri 96 kuyucuklu pleytin her bir kuyucuğuna $1,5 \times 10^4$ hücre olacak şekilde 100 µl içerisinde geçildi. Özellikle ilk bir saatte hücrelerin kuyucuğun ortasında toplanmaması için birkaç kez sallama işlemi yapıldı. Ertesi gün, hücreler mikroskop altında incelenerek %80-90 monolayer oldukları teyit edildikten sonra, virüs dilüsyonları virüs ekim vasatı içerisinde hazırlandı ve her bir kuyucukta 100 PFU olacak şekilde, hücreler enfekte edildi. Pleyt, 37°C'de %5 CO₂'li inkübatöre konuldu ve 1 saat süreyle her 15 dakika bir çalkalanarak adsorbsiyona bağlı ekim yapıldı. 1 saatin sonunda kuyucuklardaki inokulum atıldı ve 37°C su banyosunda ısıtılan overlay vasatından her kuyucuğa 100 µl eklendi. Pleyt 37°C'de nemlendirilmiş, %5 CO₂'li etüvde 2 gün inkübe edildi. Enfeksiyondan sonraki 2. gün kuyucuklara steril kabinde, direkt overlay vasat üzerine nötral buffer formalin solüsyonundan 100 µl kondu ve hücreler oda ısısında 30 dakika fikse edildi. Kuyucuklar 1 kez 1X PBS ile yıkandı ve permeabilizasyon solüsyonundan 100 µl ilave edilip 4 kez 5 dakika süreyle, oda ısısında 50 rpm hızdaki çalkalayıcı üzerinde hücreler permeabilize edildi. Son permeabilizasyon işleminin ardından kuyucuklar bloklama solüsyonu (%5 yağsız süt tozu içeren PBS) ile 30 dakika oda ısısında, çalkalayıcı üzerinde 50 rpm hızda inkübe edilerek bloklandıktan sonra, 100 µl PBS ile bir kez yıkandı. Test edilecek hibridomaların, 6. gün süpernatantlarından 100 µl ilave edilerek oda ısısında çalkalayıcıda 50 rpm hızda 1 saat inkübe edildi. Pozitif kontrol olarak, KKKAH virüsü NP proteinine karşı elde edilmiş olan 6B9F9D12 klonu 6. gün süpernatantı ve negatif kontrol olarakta Ag8 myeloma hücre hattı 6. gün kültür süpernatantı kullanıldı. Kuyucuklar 10 dakika aralıklarla üç kez 100 µl TBST ile yıkandıktan sonra 1/2000 oranında TBST içerisinde sulandırılan Goat anti-mouse IgG, human ads-FITC ile 1 saat süreyle oda ısısında 50 rpm hızda çalkalayıcıda inkübe edildi. Daha sonra %20 gliserol içeren PBS damlatıldıktan sonra Leica DM IL Led immunfloresan mikroskop altında incelendi.

3.3.3. Enzime Bağlı Immunosorbent Testi (ELISA)

3.3.3.1. Materyal

- NaCl (S3014, Sigma)
- Na₂HPO₄ (Merck,9003145354)
- KH₂PO₄ (1048731000, Merck)
- Na₂CO₃ (A836892 707, Merck)
- TMB (T3405-100TAP,Sigma)
- NaHCO₃ (K36375029 645, Merck)
- Tween 20 (8.22184.0500, Merck)
- Sitrik asit (Sigma,S4000)
- H₂SO₄ (1090734000, Merck)
- TMB (3,3',5,5'-Tetramehtylbenzidine tableti (Sigma,T4041)
- 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 , distile 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: 1 TMB (3,3',5,5'-Tetramehtylbenzidine tableti tableti 4 ml 0,1 M sitrik asit ve 6 ml 0,2 M Na₂HPO₄ içerisinde çözdürüldü ve kullanılmadan hemen önce 100 µl H₂O₂ ilave edildi
- Stop Solüsyonu: 1N H₂SO₄

3.3.3.2. Metot

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) yıkamanın ardından test edilecek hibridomaların 7. gün süpernatantlarından her bir kuyucuğa 100 µl geçildi. Pozitif kontrol olarak, KKKAH virüsüne karşı elde edilmiş olan fare poliklonal serumu (1/2000 sulandırma ile), KKKAH virüsü NP'ye karşı elde edilmiş olan 6B9F9D12 klonu süpernatantı, negatif kontrol olarakta Ag8 myeloma hattı kültür süpernatantı kullanıldı. Bir saat 37°C'de inkübe edildikten sonra pleyt 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı. Daha sonra Goat anti-mouse 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 çözdürüldü ve 100 µl H₂O₂ ilave edildi. Hazırlanan substrat solüsyonundan her bir kuyucuğa 100 µl eklendi. Daha sonra 15 dakika karanlık ortamda inkübe edildikten sonra durdurma solüsyonu (1 N sülfirik asit) ilave edilerek ELISA pleyt okuyucuda 450 nm dalga boyunda okundu.

3.3.4. Immuno Blotlama (Western Blot)

3.3.4.1. Materyal

- 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: 29 g Akrilamid + 1 g Bisakrilamid karıştırıldı dH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı. 37°C su banyosunda 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 + 2,5 ml 1,5 M Tris + 0,1 ml %10 SDS + 0,1 ml %10 Amonyum persülfat + 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
- BME (2-Mercaptoethanol) (**161-0710 Biorad**)
- Laemli Sample Buffer (**161-0737, Biorad**)
- Örnek Tamponu: 950 µl Laemli sample buffer + 50 µl BME
- Glisin (C₂H₅NO₂) (**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 (**Immobilon-NY+, INYC00010 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 (**Merck,9003145354**)
- 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 , distile 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**)
- Görüntüleme filmi (**F5763, Sigma**)
- Görüntüleme solüsyonu (**P7042, Sigma**)
- Fiksasyon solüsyonu (**P7067, Sigma**)

3.3.4.2. 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. Jelin üzerine pipet yardımıyla 1 ml dH₂O ilave edildi ve 15 dakika oda ısısında donması bekledi. 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 KKKAH virüs antijen örnekleri 4x Laemli Sample Buffer ile 3:1 oranında karıştırılıp kaynar suda 5 dakika 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 örnekleri her bir kuyucuğa yüklendi. Güç kaynağı tanka bağlanarak 100 voltta 1.5 saat süreyle örnekler yürütüldü. Proteinleri membrana transfer etmek amacıyla, jel büyüklüğünde membran kesildi, aktif olan yüzeyi işaretlendi ve methanol içerisinde aktive edildi. Transfer tampon içerisinde cam pleytlerden çıkartılan jel, süngerler ve transfer kağıtları 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 ve 100 voltta 60 dakika süreyle transfer işlemi yapıldı. Transfer işleminin ardından membran kasetten alındı ve bloklama solüsyonu içerisinde çalkalayıcıda 30 dakika bloklandı. Membran 3 kez 10 dk süreyle PBST-20 solüsyonu ile çalkalayıcıda yıkandı. Yıkama solüsyonu döküldü ve membran test edilmek istenen her hibridoma için 1 strip olacak şekilde kesildi. Test edilecek hibridomaların 7. gün süpernatant örnekleri 1/10 oranında bloklama solüsyonu

içerisinde hazırlandı. Pozitif kontrol olarak fare poliklonal serum 1/3000 dilüsyonda ve negatif kontrol olarakta Ag8 myeloma hücresi süpernatantı 1/10 dilüsyonda hazırlandı. Her süpernatant örneği ve kontroller, farklı kaplara alınan striplerin üzerine ilave edilerek 1 saat çalkalayıcıda inkübe edildi. Bir saatin sonunda hibridoma süpernatant dilüsyonları döküldü ve membran 10 dakika süreyle 3 kez PBST-20 ile çalkalayıcıda yıkandı. Konjugat olarak Goat anti-mouse HRP, 1/10000 oranında bloklama solüsyonu içerisinde sulandırılıp membranlar üzerine döküldü ve oda ısısında 1 saat süreyle çalkalayıcıda inkübe edildi. Membran 10 dakika arayla 3 kez PBST-20 ile çalkalayıcıda yıkandı. Membran üzerine görüntüleme substratı 1:1 oranında karıştırılarak yayıldı ve 5 dakika 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 dakika süreyle developer solüsyonunda bekletildi, daha sonra dH₂O kabında yıkandıktan sonra 1 dakika da fiksasyon solüsyonunda bekletildi. Tekrar su kabında yıkandıktan sonra film karanlık odadan çıkartılarak ışık kaynağı üzerinde incelendi.

3.3.5. Limiting Dilüsyon

3.3.5.1. Materyal

- Sınıf 2 Biyogüvenlik Kabini (**ADS Laminare Optimale**)
- 96 well pleyt
- Hy-HAT Besin Ortamı
- %5 CO₂'li İnkübatör (**MCO-18AC-PE, Panasonic**)

3.3.5.2. Metot

Limiting dilüsyon işlemi yapılmadan önce, 96 kuyucuklu bir pleytin sağ-sol ve yukarı-aşağı ilk sıra boş bırakılacak şekilde, 60 kuyucuğuna daha önceden kültüre edilmiş myeloma hücrelerinin 2 günlük şartlandırılmış vasatından 100'er µl kondu. Dilüsyona başlanacak olan 2B-2G nolu kuyucuklara 100 µl daha vasat ilave edilerek toplam hacim 200 µl'ye çıkartıldı. 24 kuyucuklu pleytlerde çoğaltılan ve limiting dilüsyon için seçilen

hücreler mikropipet yardımıyla tabandan kaldırıldı ve 100 µl hücre 2B nolu kuyucuğa bırakıldı. Mikropipet yardımıyla önce 2B-2G nolu kuyucuklar yukardan aşağı doğru, daha sonra çok kanallı pipet yardımıyla 2B-2G hattından 11B-11G hattına doğru soldan sağa dilüsyon yapıldı ve son kuyucukta 100 µl süpernatant atılarak uzaklaştırıldı. Hücreler 37°C'deki CO₂'li etüve kaldırıldı.

Limiting dilüsyon işleminden 3 gün sonra kuyucuklar tek tek kontrol edilerek tek klon ve iki klon düşen kuyucuklar işaretlendi ve her kuyucuğa 100 µl Hy-HAT vasatından ilave edildi. Yaklaşık 8-10 gün sonra tek klon olarak işaretlenen kuyucuklardaki hücreler büyüdüklüklerinde IFA testi yapıldı. Pozitif olarak belirlenen tek klonlar 96 kuyucuklu pleytten mikropipet yardımıyla kaldırılarak 24 kuyucuklu pleyte geçildi.

Birinci limiting dilüsyondan seçilen, tek klon olduğu düşünülen ve IFA deneyinde pozitif sonuç veren klonlar, tekrar 24 well pleytin bir gözünde büyütüldükten sonra 2. limiting dilüsyona alındı. Klonların monoklonal olduğundan emin oluncaya kadar (en az 3 kez) limiting dilüsyon işlemi tekrarlandı.

3.3.6. Monoklonal Hücrelerin Dondurulması, Ana ve Çalışma Stoklarının Oluşturulması

Limiting dilüsyon işlemlerinin ardından, tek klondan geldiği düşünülen klonlar, sırasıyla önce 24 kuyucuklu pleytin bir gözüne, 6 kuyucuklu pleytin bir gözüne, 25 cm² hücre kültür kabına, 75 cm² hücre kültür kabına ve 175 cm² hücre kültür kabına pasajlanarak büyütüldü. Tüm pasajlama işlemlerinden önce alınan süpernatant örnekleri antikor varlığı yönünden IFA ile test edildi. Hücrelerin pasajlama süresince stabil kaldıklarından emin olunduktan sonra, her klondan 15'er kriyovial donduruldu.

3.3.6.1. Hücre Sayımı

3.3.6.1.1. Materyal

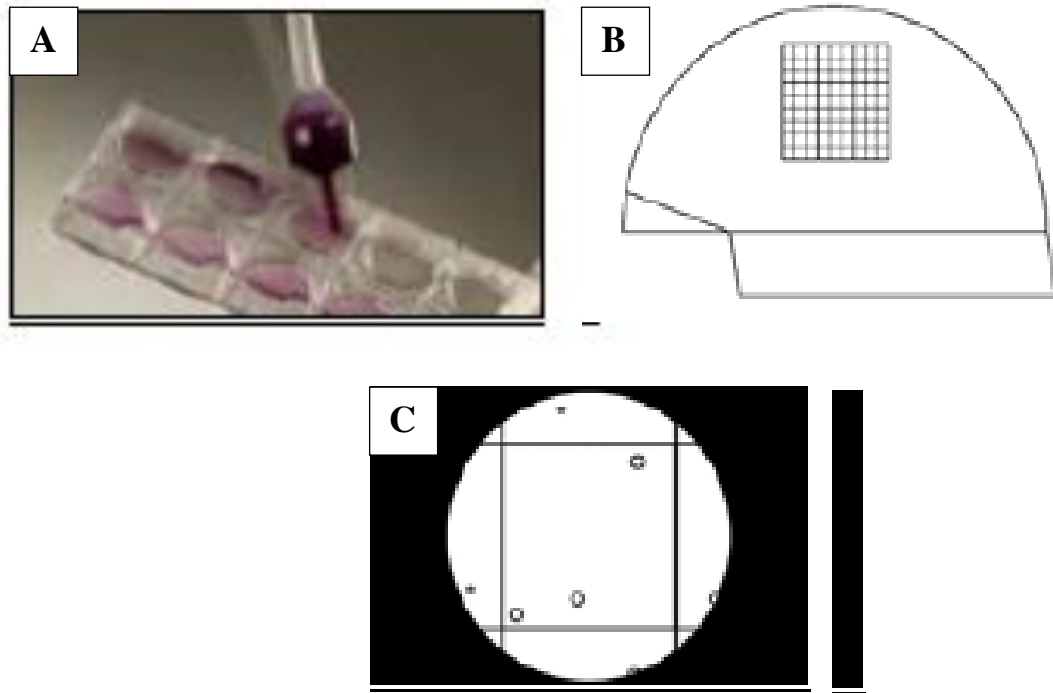
- Sayım Aparatı (138495, Hycor)
- Tripan Blue (T8154, Sigma)
- Mikroskop (Leica)

3.3.6.1.2. Metot

Kültür kabı içerisinde üretilen süspanse monoklonal hücrelerden 10 µl örnek alınarak 990 µl tripan blue (%0,4) ve kültürden alınan 10 µl hücre süspansiyonu karıştırıldı. On mikrolitre boyanmış hücre solüsyonu sayım aparatının lam ile lameli arasına pipetlendi. Mikroskop yardımıyla 10X objektif kullanılarak, yoğun hücre içeren süspansiyon için 9 küçük kare, hücre yoğunluğu az olan süspansiyonlar için ise 4x9 (36) küçük kare sayıldı (şekil 8).

Mikrolitredeki canlı ve ölü hücre sayılarını belirlemek için aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\text{Canlı ya da ölü hücre yoğunluğu (hücre/}\mu\text{l)} = \frac{\text{Küçük karede sayılan canlı hücre sayısı} \times 90 \times \text{seyreltme faktörü}}{10}$$



Şekil 8 : Hücre sayım aparatı (A), Hücre sayım aparatı karelerinin mikroskop görüntüleri (B,C)

3.3.6.2. Dondurma işlemi

3.3.6.2.1. Materyal

- Sınıf 2 Biyogüvenlik Kabini (**ADS Laminare Optimale**)
- Hücre: Hibridoma
- 24 Kuyucuklu pleyt (**3526, Costar**)
- 6 kuyucuklu pleyt (**3516, Costar**)
- Kriyovial (**377224, Thermo Scientific**)
- 25 cm² hücre kültür kabı (**3056, Corning**)
- 75 cm² hücre kültür kabı (**430720, Corning**)
- 175 cm² hücre kültür kabı (**431079, Corning**)
- DMSO (**D2650, Sigma**)
- FBS (**F2442, Sigma**)
- Hücre Dondurma Vasatı : %90 FBS + %10 DMSO
- 15 ml'lik santrifüj tüpü (**E1460-0200-15, Starlab**)
- -80°C Derin Dondurucu (**SRL611W, Panasonic**)
- Sıvı Azot Tankı

3.4.6.1.2. Metot

Bir adet 175 cm² hücre kültür kabında kültüre edilen monoklonal hücreler sayım aparatı ile sayıldı. Ortalama bir 175 cm² hücre kültür kabında 20-25x10⁶ hücre bulunduğu görüldü. Sayım sonuçlarına göre her 175 cm² hücre kültür kabından, mililitresinde 1,5x10⁶ hücre bulunacak şekilde, 15 kriyovial dondurulmuştur. 175 cm² kültür kabındaki süspanse monoklonal hücreler santrifüj tüpüne aktarıldı ve +4°C, 1000 rpm'de, 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet dondurma vasatı ile resüspanse edildi. 1'er ml hücre süspansiyonu, etiketlenmiş kriyoviallere aktarıldı. Hazırlanan kriyovialler, öncelikle -70°C derin dondurucuya kaldırıldı. Uzun süreli saklama amacıyla hücreler, 1 hafta sonra sıvı azot tanklarına aktarıldı.

3.3.7. Stabilité Testleri

Dondurulup sıvı azot tankında saklanmakta olan hücreler her ay çözündürülmüş ve antikor üretip üretmedikleri ELISA, Western Blot ve IFA deneyleriyle test edilmiştir.

3.4. Monoklonal Hücrelerin Döner Şişe Sisteminde Kültüre Edilmesi, mAb Konsantrasyonu ve Saflaştırılması

3.4.1. Monoklonal Hücrelerin Döner Şişe Sisteminde Kültüre Edilmesi

3.4.1.1. Materyal

- Sınıf 2 Biyogüvenlik Kabini (**ADS Laminare Optimale**)
- Santrifüj (**Beckman Coulter, Allegra X-22**)
- DMEM/F-12 Ham (**D8900, Sigma**)
- NCS (**N4762, Sigma**)
- Antibiyotik (Penisilin/streptomisin/amfoterisin B) (**A5955, Sigma**)
- Tripsin-EDTA (**T4049, Sigma**)
- Hücre kültür vasatı: **%10 NCS +%1 antibiyotik + DMEM/F-12 HAM**
- Hücre: Hibridoma (**ERAGEM Hücre kültür stoğu**)
- 175 cm² hücre kültür kabı (**431079, Corning**)
- Döner şişe (**680-065 Grainer**)
- 15 ml'lik santrifüj tüpü (**E1460-0200-15, Starlab**)
- %5 CO₂'li İnkübatör (**MCO-18AC-PE, Panasonic**)
- Döner şişe inkübatör (**I057606-C, Wheaton Industries Inc., Roll-In CO₂ Incub.**)

3.4.1.2. Metot

İki adet 175 cm²'lik hücre kültür kabında kültüre edilen, DMEM/F12 vasatında kültüre adapte hibridoma hücreleri kaldırılarak hücre sayımı yapıldı. Sayım işlemi yapıldıktan sonra 1 adet döner şişe hücre kültürü kabı için 50x10⁶ hücre, 250 ml hücre üretme vasadı içerisinde döner şişe hücre kültürü kabına geçilerek, 0.9 rpm'e ayarlanmış rotatöre bırakıldı. Hücreler günlük olarak kontrol edildi ve 3 gün sonra hücrelere 250 ml

hücre üretme vasadı ilave edildi. 3 gün sonra ikinci kez 250 ml hücre üretme vasadı ilave edildi ve 3 gün daha beklendi. İşlem sonunda hücreler sayıldıktan sonra santrifüj edilerek süpernatant amonyum sülfat ile antikor çöktürme işlemi için kullanıldı.

3.4.2. Amonyum Sülfat Metoduyla Çöktürme İşlemi

3.4.2.1. Materyal

- Amonyum Sülfat (**A4418-1KG, Sigma**)
- Manyetik Karıştırıcı (**505-20000-00-4, Heidolph**)
- 1L Erlenmayer
- Ultrasantrifüj (**Beckman Coulter, Optima XPN-100**)
- SW19 Tip Rotor (**325632, Beckman Coulter**)
- SW19 Rotor Tüpleri (**334205, Beckman Coulter**)

3.4.2.2. Yöntem

Döner şişe hücre kültürü kabında üretilen monoklonal hibridomalar 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldükten sonra, süpernatant dereceli silindire alınarak tam miktarı belirlendi. Toplamda 750 ml süpernatant çöktürme işlemine alındı. Miktarı belirlenen süpernatant içerisinde manyetik karıştırıcı barı bulunan bir erlene alındı. Erlen seçimi yapılırken toplam miktarın en az iki katı volümde erlen seçilmesine dikkat edildi. Erlenmayer manyetik karıştırıcıya yerleştirildi ve toplam 750 ml süpernatant için 235,37 gram amonyum sülfat eklenerek saturasyon işlemi yapıldı (Saturasyon işlemi sonunda final saturasyonu %50 olmuştur). Tartılan 273,37 g amonyum sülfat, küçük miktarlarda eklendi ve tamamen çözünmesi sağlandı. Bu işlem yaklaşık 35-40 dk tamamlandı. Bu adımda yüksek hızda karıştırma işlemi yapılmamasına dikkat edildi. Ekleme işlemi bittikten sonra, 1 saat daha +4°C'de karıştırma işlemine devam edildi. Karışım SW-19 tip rotora alındıktan sonra, 10000 rpm'de, 20 dakika, +4°C'de santrifüj edildi. Süperanant uzaklaştırıldıktan sonra pellet toplam miktarın 1-2 katı kadar PBS ile sulandırıldı. PBS içerisindeki protein diyaliz kaset kullanılarak PBS solüsyonuna karşı diyaliz edildi.

3.4.3. Diyaliz İşlemi

3.4.3.1. Materyal

- 20 kDa Diyaliz Kasetleri (**66030, Thermo Scientific**)
- NaCl (**S3014, Sigma**)
- KCl (**9933, Sigma**)
- Na₂HPO₄ (**Merck,9003145354**)
- KH₂PO₄ (**1048731000, Merck**)
- PBS : 8 gr NaCl, 2g of KCl, 1.44g of Na₂HPO₄, 0.24g of KH₂PO₄, distile su ile 1 litreye tamamlandı. pH, HCl kullanılarak 7,2'ye ayarlandı.
- Manyetik Karıştırıcı (**505-20000-00-4, Heidolph**)

3.4.3.2. Metot

Diyaliz kasedi diyaliz tampnu (1X PBS) içerisine daldırılıp 1-2 dakika beklenerek hidrasyon işlemi yapıldı. Kaset tampondan çıkartılıp örnek şırınga ile çekildikten sonra, kaset üzerinde bulunan portlardan birinden yavaşça içeri verildi. Örnek diyaliz tamponuna bırakıldıktan sonra 2 saatte bir, iki kez tampon yenilendi ve son yenilemenin ardından 24 saat karıştırıcıda bırakıldı. 24 saat sonra örnek uygulama yapılan porttan direkt olarak şırınga ile geri alınarak diyaliz işlemi tamamlandı.

3.4.4. Kolon Kromatografisi Yöntemi ile Monoklonal Antikor Pürifikasyonu

3.4.4.1. Materyal

- Mabtrap Antibody Kit (**GE Healthcare, 17-1128-01**)
- Luer-lock şırınga

3.4.4.2. Metot

Mabtrap Antibody Kit 30 dakika önceden oda ısısına çıkartılıp, kalibre edildi. 10X binding buffer ve elüsyon buffer distile su ile dilüe edilerek 1X miktarında hazırlandı. Kolon luer-lock şırınga yardımıyla en az 5 ml distile su ile yıkanarak içerisindeki etanol çözeltisi uzaklaştırıldı.

Kolon 3 ml binding buffer ile kalibre edildi. Örnek bir şırınga yardımıyla kolondan geçirildi. Kolon 7,5 ml binding buffer ile yıkandı, 5 ml elüsyon buffer ile sulandırma işlemi yapıldı ve ml başına 100 µl nötralizasyon solüsyonu ilave edildi. Kolon %20 etanol içeren saklama solüsyonu ile dolduruldu ve +4°C'ye kaldırıldı. Elde edilen elüsyon buffer içerisindeki monoklonal antikörler tekrar PBS'e karşı diyaliz edildi. Diyalizden alınan örnekler 0,22 µm filtreden geçirilerek steril edildi ve -20°C'ye kaldırıldı.

3.5. Antikör İzotiplendirme

3.5.1. Materyal

- ISO-2 izotiplendirme kiti (Sigma-Aldrich, Almanya)
- ELISA pleytleri (**473768 nunc, Thermoscientific**)
- Pleyt Okuyucu (**Thermo Scientific Multiscan FC**)
- NaCl (**S3014, Sigma**)
- Na₂HPO₄ (**Merck, 9003145354**)
- KH₂PO₄ (**1048731000, Merck**)
- Na₂CO₃ (**A836892 707, Merck**)
- TMB (**T3405-100TAP, Sigma**)
- NaHCO₃ (**K36375029 645, Merck**)
- Tween 20 (**8.22184.0500, Merck**)
- Sitrik asit (**Sigma, S4000**)
- H₂SO₄ (**1090734000, Merck**)
- TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine tableti (**Sigma, T4041**)
- 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, distile 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: 1 TMB (3,3',5,5'-Tetramehtylbenzidine tableti 4 ml 0,1 M sitrik asit ve 6 ml 0,2 M Na₂HPO₄ içerisinde çözündürüldü ve kullanılmadan hemen önce 100 µl H₂O₂ ilave edildi.
- Stop Solüsyonu: 1N H₂SO₄

3.5.2. Metot

İzotip spesifik antikorlar 1/1000 oranında seyreltildi. Her seyreltilmiş izotip spesifik antikordan, pleytin 2 gözüne 100'er µl konuldu. İzotip spesifik antikorla kaplı pleyt 1 saat 37°C'de inkübe edildi. Bu süre sonunda kaplama solüsyonu döküldü ve gözler 200 µL PBST ile 5 kez yıkandı. Her kuyucuğa 100 µl pürifiye mAb (1/1000 dilüe edildi) eklenerek 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra kuyucuklar 200 µl PBST ile 5 kez yıkandı. Her kuyucuğa 100 µl konjugat solüsyonu eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. PBST ile 5 kez yıkandı ve her kuyucuğa 100 µl substrat solüsyonu eklendi. Daha sonra 100 µl stop solüsyonu ilave edilerek absorbands değerleri 450 nm de ölçüldü.

3.6. Floresan Fokus Redüksiyon Nötralizasyon Testi

3.6.1. Materyal

- Sınıf 2 Biyogüvenlik Kabini (**ADS Laminare Optimale**)
- Mikropipet
- Hücre: Vero E6 (**ERAGEM Hücre kültür stoğu**)
- 96 well Plate (**3596, Costar**)
- DMEM/F-12 Ham, (**D8900, Sigma**)
- NCS (**N4762, Sigma**)
- Antibiyotik (Penisilin/streptomisin/amfoterisin B) (**A5955, Sigma**)
- Sodyum fosfat monobazik (**K91348245 738, Merck**)
- Sodyum fosfat dibazik (**S0876, Sigma**)
- %37'lik formaldehit (**F8775, Sigma**)
- Triton X-100 (**T9284, Sigma**)
- Süt Tozu (**Pınar**)

- NaCl (**K92033000 546, Merck**)
- Tween 20 (**8.22184.0500, Merck**)
- Tris-HCl (**T3253, Sigma**)
- Hücre kültür vasatı: %10 NCS +%1 antibiyotik + DMEM/F-12 HAM
- Virüs ekim vasatı: DMEM/F-12 + %1 antibiyotik
- Virüs üretim vasatı: DMEM/F-12 + %2 NCS + %1 antibiyotik
- %2 karboksi metil selüloz (CMC): 4 gr karboksi metil selüloz (CMC) 200 ml dH₂O içerisinde ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda 300°C ve 500 rpm hızda karıştırılarak çözündürüldü. 121°C’de 15 dakika süreyle otoklav edilerek steril edildi.
- Overlay Vasat: İki kat yoğunlukta hazırlanan DMEM/F-12 Ham ile 1:1 oranında %2 FBS ve %1 antibiyotik ilave edilerek homojenize edilerek hazırlanır)
- Permeabilizasyon Solüsyonu: % 0.1 Triton X-100 içeren PBS
- Nötral buffer formalin solüsyonu: 4 gr sodyum fosfat monobazik, 6.5 gr sodyum fosfat dibazik ve 100 ml % 37’lik formaldehit
- Bloklama solüsyonu :%5 yağsız süt tozu içeren PBS
- TBST : 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, % 0.1 Tween-20
- Goat Anti-Mouse IgG, Human ads-FITC (**Southern Biotech, 1010-02**)
- %20 glycerol (**G5516, Sigma**) içeren PBS solüsyonu

3.6.2. Metot

Vero E6 hücreleri 48 well pleyte göz başına $1,5 \times 10^4$ hücre olacak şekilde 500 µl içerisinde geçildi. İlk bir saatte hücrelerin kuyucuğun ortasında toplanmaması için birkaç kez sallama işlemi yapıldı. Ertesi gün hücreler mikroskop altında incelenerek %80-90 monolayer hale geldikleri teyit edildikten sonra, 1/10, 1/20 ve 1/40 oranlarında hazırlanan antikor dilüsyonları, 96 kuyucuklu dilüsyon pleytinin 1 kuyucuğuna 100 µl olacak şekilde hazırlandı. Aynı şekilde, nötralizan titresi bilinen KKKAH virüsüne karşı elde edilmiş fare poliklonal serumu ve negatif serum ve yine negatif kontrol olarak KKKAH virüsü NP’ye karşı elde edilmiş 6B9G10G11 mAb’ı aynı oranlarda dilüe edildi.

Antikor ve kontrol dilüsyonları üzerine 100 PFU olacak şekilde virüs dilüsyonları ilave edildi. Antikor virüs karışımları, dilüsyon pleytleri içerisinde, +4°C’de 16 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda antikor-virüs karışımları, 48 kuyucuklu pleytte inkübe edilen Vero E6 hücrelerinin üstüne ilave edilerek, 37°C’de, %5 CO₂’li inkübatöre konuldu ve 1 saat süreyle her 15 dakika bir çalkalanarak adsorbsiyona bağlı ekim yapıldı. Bir saat inkubasyonun ardından kuyucuklardaki inokulum atıldı ve 37°C su banyosunda ısıtılan overlay vasatından her kuyucuğa 100 µl eklendi. Pleyt 37°C’de nemlendirilmiş %5 CO₂’li etüvde 4 gün inkübe edildi.

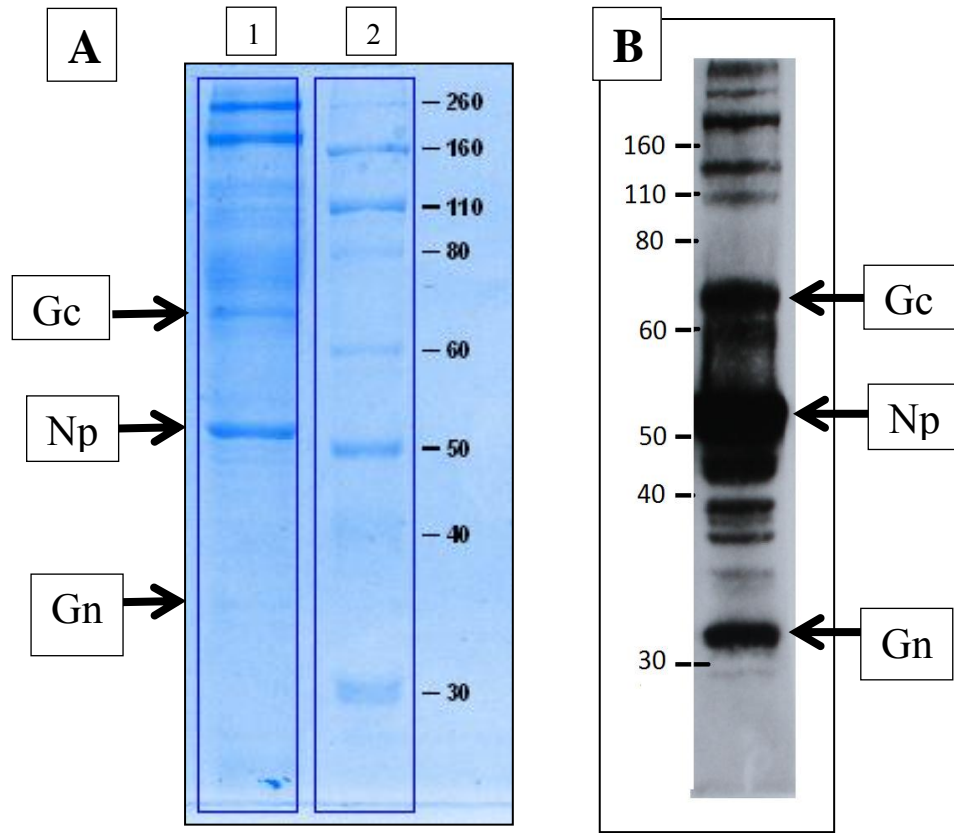
Enfeksiyondan sonraki 4. gün kuyucuklara steril kabinde, direkt overlay vasat üzerine nötral buffer formalin solüsyonundan 200 µl kondu ve hücreler oda ısısında 30 dakika fikse edildi. Kuyucuklar 1 kez 1X PBS ile yıkandı ve permeabilizasyon solüsyonundan 250 µl ilave edilip 4 kez 5 dakika süreyle, oda ısısında, 50 rpm hızdaki çalkalayıcı üzerinde hücreler permeabilize edildi. Son permeabilizasyon işleminin ardından kuyucuklar bloklama solüsyonu (%5 yağsız süt tozu içeren PBS) ile 30 dakika oda ısısında, çalkalayıcı üzerinde 50 rpm hızda inkübe edilerek bloklanarak bir kez 250 µl PBS ile yıkandı. KKKAH virüsü NP antijenine karşı geliştirilmiş olan pürifiye 6B9C1G11 monoklonal antikor (1 mg/ml) 1/2000 oranında dilüe edildi ve kuyucuklara 200 µl ilave edilerek oda ısısında çalkalayıcıda, 50 rpm hızda 1 saat inkübe edildi. Kuyucuklar 10 dakika aralıklarla üç kez 250 µl TBST ile yıkandıktan sonra, 1/2000 oranında TBST içerisinde sulandırılan Goat anti-mouse IgG, Human ads-FITC ile 1 saat süreyle oda ısısında 50 rpm hızda çalkalayıcıda inkübe edildi. Daha sonra %20 gliserol içeren PBS damlatıldıktan sonra Leica DM IL Led immunfloresan mikroskop altında incelendi. Kuyucuklardaki plaklar sayıldı. Plak sayıları negatif kontrol kuyucuklarındaki plak sayısına göre değerlendirilerek, pürifiye monoklonal antikorların nötralizan etkileri değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. KKKAH Viral Antijenlerinin Elde Edilmesi

Western Blot, ELISA ve IFA testlerinde kullanılması amacıyla KKKAH virüsü Kelkit06 suşu, döner şişe hücre kültür sistemi kullanılarak üretilen Vero E6 hücresine adsorbsiyona bağlı ekim yapıldı. $MOI=0,01$ olacak şekilde Vero E6 hücreleri enfekte edildi. On beş günlük enfeksiyon sonunda PEG çöktürme ile kısmi olarak pürifiye edilen KKKAH virüsüne spesifik viral antijenlerin SDS-PAGE ve Western Blot testleri ile konfirme edildi (Şekil 9).

Viral antijen miktarı Lowry metodu ile ölçüldü ve toplam 10 döner şişe hücre kültüründen yapılan virüs üretimi sonunda 15 mg kısmi pürifiye viral antijen elde edildi (1,5 mg/döner şişe). Elde edilen viral antijenler 1 mg/ml olacak şekilde 1X TEN Buffer ile dilüe edildi, 15 kriyoviale 1'er ml aliquat yapıldı ve -80°C 'de saklandı.



Şekil 9 : KKKAH virüs Kelkit06 suşuna spesifik viral antijenlerin ve büyüklüklerinin SDS-PAGE (A) ve Western Blot (B) ile görüntülenmesi (Gn; 37 kDa), NP; 55 kDa, Gc; 75 kDa).

4.2. Hibridomaların Test Edilmesi

108G126 nolu ve ‘Kırım-Kongo Kanamalı Ateş Virüsünün Epidemiyolojisi, Moleküler Karakterizasyonu, Antijen-ELISA Geliştirilmesi ve Koruyucu Aşı Çalışmaları’ isimli TÜBİTAK 1007 KAMAG projesi kapsamında glikoproteinlerce zenginleştirilmiş antijen ile immunize edilen fare ile yapılan füzyondan elde edilen hibridomalar, IFA, ELISA ve Western Blot deneyleri ile test edilmiştir.

KKKAH karşı pozitif hibridoma klonlarının tarama testi olan IFA testi ile pozitif veren klonlar 3 kategoriye ayrılmıştır:

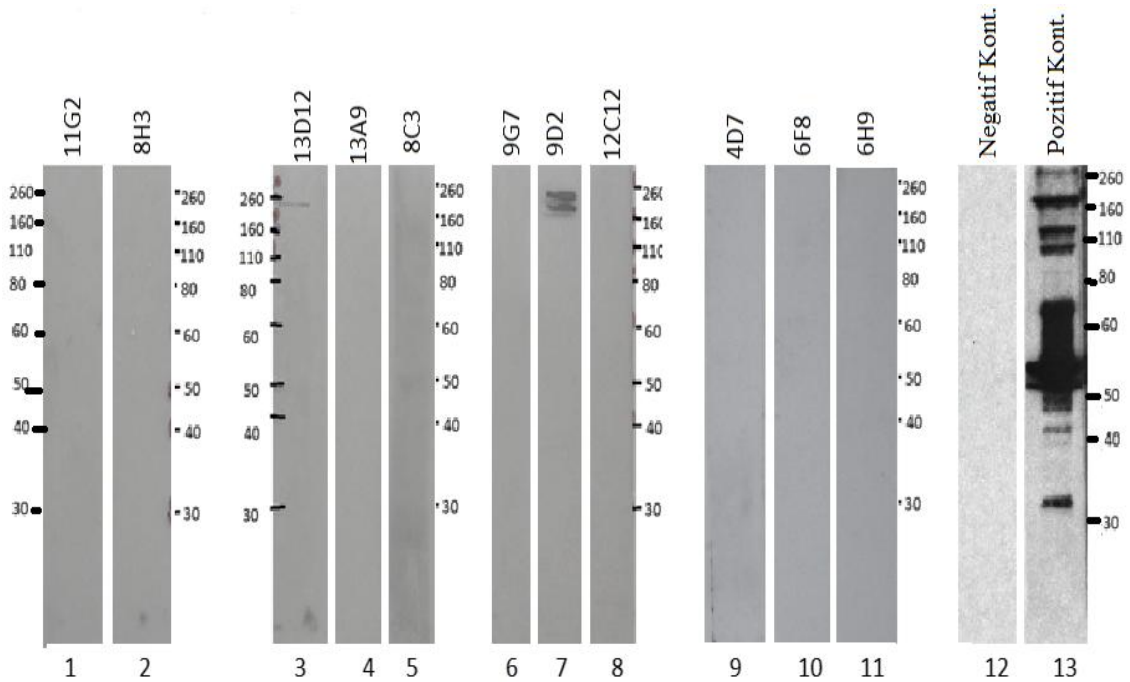
- ELISA ve Western Blot deneylerinde negatif sonuç verenler,
- ELISA testinde pozitif ve Western Blot analizi negatif sonuç verenler,
- ELISA testinde zayıf pozitiflik veren, Western Blot deneyinde KKKAH virüsüne spesifik glikoproteinler saptanan klonlar

Bu şekilde 3 kategoriye ayrılan ve -80°C’de saklanmakta olan 70 adet hibridomanın, bu tez çalışması kapsamında, stabiliteleri değerlendirilmiş, stabil olan klonların nötralizasyon etkileri araştırılmıştır. Dondurulmuş olan hibridomalar, 24’erli gruplar halinde, her biri 24 kuyucuklu pleytin bir kuyucuğuna çözdürülmüştür. Çözdürüldükten sonraki 7. günde süpernatantları alınarak, KKKAH virüsüne spesifik antikor sentezleyip sentezlemediklerinin doğrulanması amacıyla IFA ile test edilmiştir.

Yedinci gün süpernatantları ile eş zamanlı olarak ELISA ve IFA deneyleri yapılmıştır. Yapılan IFA deneyi sonucunda, dondurulan toplam 70 adet hibridoma klonundan 25 adedinin IFA testi sonucunda pozitif sonuç verdiği, geri kalan 45 adet klonun antikor sentezleme yeteneğini kaybettiği, dolayısıyla IFA deneyinde negatif sonuç verdiği tespit edilmiştir.

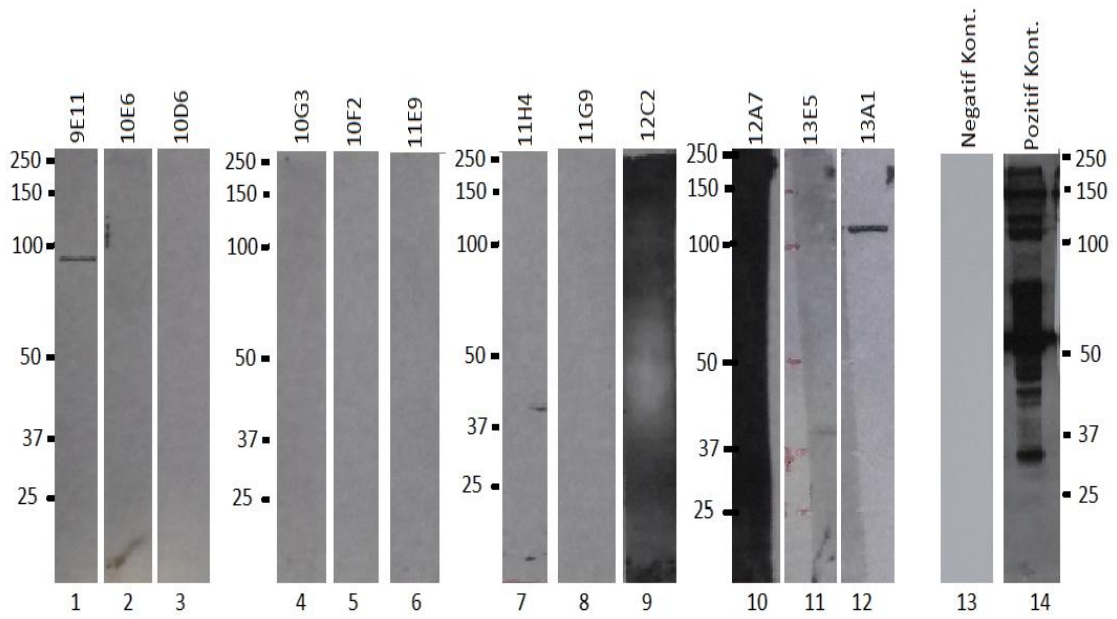
4.2.1. Antikor Sentezlemeye Devam Eden Hibridomaların Western Blot Deneyi ile Test Edilmesi

IFA testi sonucunda pozitif olarak belirlenen 25 adet klon 3 ayrı Western Blot deneyi ile test edilmiştir.



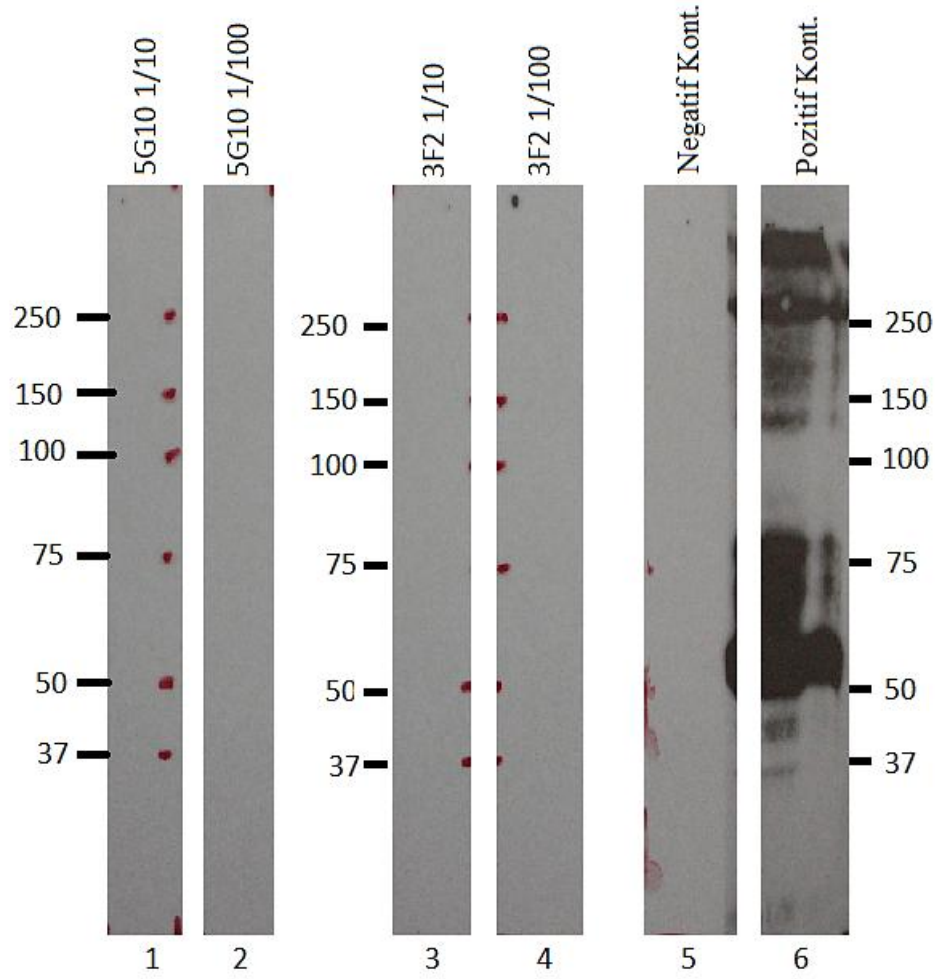
Şekil 10 : IFA deneyinde pozitif sonuç veren klonların Western Blot ile test edilmesi, Lane 1 : 11G2, Lane 2: 8H3, Lane 3: 13D12, Lane 4: 13A9, Lane 5: 8C3, Lane 6: 9G7, Lane 7: 9D2, Lane 8: 12C12 , Lane 9: 4D7, Lane 10: 6F8, Lane 11: 6H9, Lane 12: Negatif kontrol; Ag8 myeloma kültürü süpernatantı, Lane 13: Pozitif kontrol; KKKAH virüsüne karşı elde edilmiş fare poliklonal serum (1/3000 dilüsyon).

On bir klon için yapılan bu Western Blot deneyinde, 13D12 klonu 160-260 kDa arasında tek bant, 9D2 klonu ise yine aynı aralıkta çift bant vermiştir (Şekil 10). Bu klonların, virüsün yapısal olmayan glikoproteinlerinin lineer epitoplarına karşı antikor ürettiği düşünülmektedir. Ancak bu büyüklükte hangi glikoprotein olduğu tam olarak ortaya konamamıştır. Diğer 9 klon ise negatif sonuç vermiş, hiçbir bant göstermemiştir (Şekil 10). Bu klonların ise virüs glikoproteinlerinin konformasyonel epitoplarına karşı antikor ürettikleri, bu sebeple Western Blot testinde denatüre edilmiş antijeni tanıyamadığı düşünülmektedir.



Şekil 11 : IFA deneyinde pozitif sonuç veren klonların Western Blot ile test edilmesi, Lane 1: 9E11, Lane 2: 10E6, Lane 3 : 10D6, Lane 4: 10G3, Lane 5: 10F2, Lane 6 : 11E9, Lane 7: 11H4, Lane 8: 11G9 , Lane 9 : 12C2, Lane 10 : 12A7, Lane 11: 13E5, Lane 12: 13A1, Lane 13: Negatif kontrol; Ag8 myeloma kültürü süpernatantı, Lane 14: Pozitif kontrol; KKKAH virüsüne karşı elde edilmiş fare poliklonal serum (1/3000 dilüsyon).

On iki klonun test edildiği 2. Western Blot deneyinde, 9E11 klonu 80 kDa civarında, 11H4 klonu 40 kDa civarında, 13A1 ise 100-150 kDa civarında bant göstermiştir (Şekil 11). Bu sonuçlar, 9E11 klonunun, KKKAH virüsü glikoproteinini Gc'ye (75kDa), 11H4 klonunun ise yine virüse ait glikoprotein Gn'e (37 kDa) karşı, 13A1 klonunun ise Gn prekürsörü PreGn (140 kDa)'e karşı antikor ürettiği düşünülmüştür (Şekil 11). Diğer klonlar beklendiği şekilde negatif sonuç vermiştir. Bu klonların KKKAH virüsü glikoproteinlerinin konformasyonel epitoplarına karşı olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 12 : IFA deneyinde pozitif sonuç veren klonların Western Blot ile görüntülenmesi, Lane 1 : 5G10 (1/10 dilüsyon), Lane 2: 5G10 (1/100 dilüsyon), Lane 3: 3F2 (1/10 dilüsyon), Lane 4: 3F2 (1/100 dilüsyon), Lane 5: Negatif kontrol; Ag8 myeloma kültürü süpernatantı, Lane 6: Pozitif kontrol; KKKAH virüsüne karşı elde edilmiş fare poliklonal serum (1/3000 dilüsyon).

Yapılan 3. Western Blot deneyinde, IFA pozitif olan iki klon farklı dilüsyonlarda test edilmiş ve negatif sonuç vermiştir (Şekil 12). Klonların KKKAH virüsü glikoproteinlerinin konformasyonel epitopuna karşı olduğu düşünülmüştür.

4.2.2. Limiting Dilüsyon

IFA testinde pozitif sonuç veren ve Western Blot analizleri yapılan 25 klona limiting dilüsyon yapılmıştır. Yapılan 3 limiting dilüsyon sonucunda 8H3 ve 3F2 klonlarının antikor sentezlemeye devam ettikleri IFA testiyle belirlenmiştir. 13E5 ve 13A1 klonları 2. limiting dilüsyon işlemi esnasında, diğer klonlar ise ilk limiting dilüsyonda antikor sentezleme yeteneklerini kaybetmişlerdir.

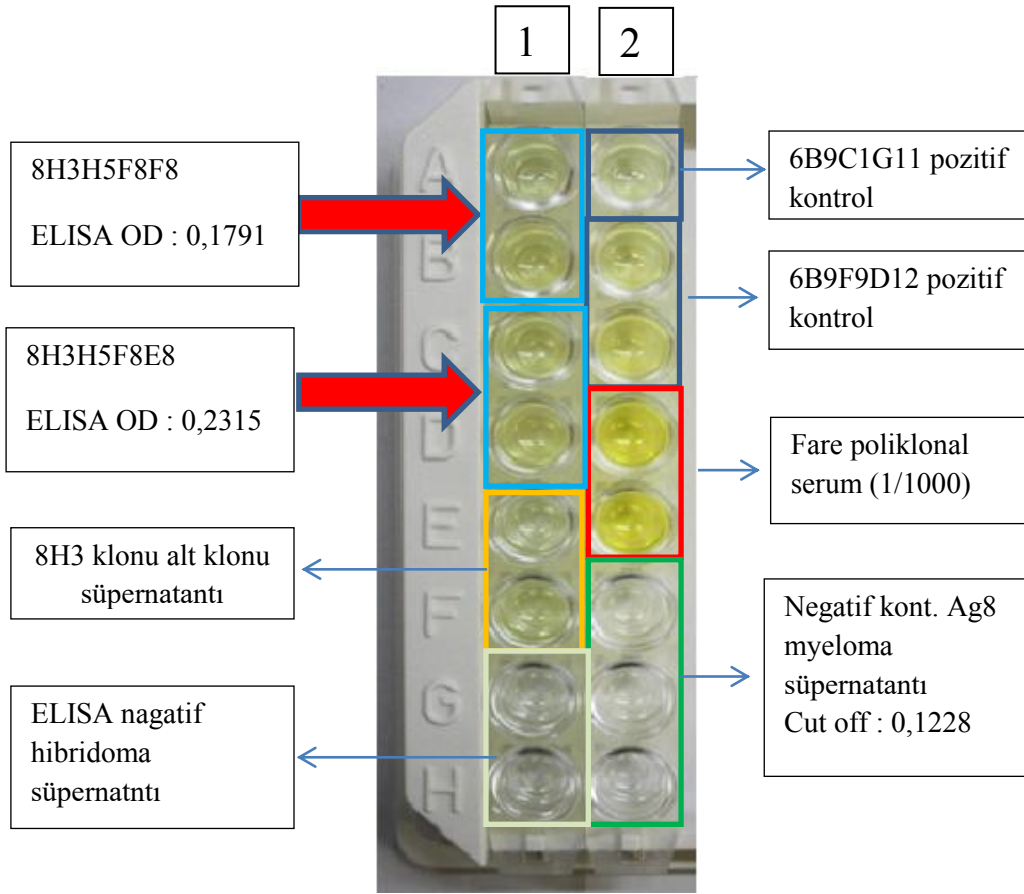
8H3 klonu için 1. limiting dilüsyon sonucunda H5, 2. limiting dilüsyon sonucunda F8 ve 3. limiting dilüsyon sonucunda da F8 ve E8 klonları seçilmiş, 8H3H5F8E8 ve 8H3H5F8F8 şeklinde adlandırılmışlardır. 3F2 klonu için limiting dilüsyon sonucu seçilen klonları 3F2G8H4 ve 3F2E10H5 şeklinde adlandırılmışlardır. Böylece 8H3H5F8E8, 8H3H5F8F8, 3F2G8H4 ve 3F2E10H5 monoklonal antikorları limiting dilüsyon sonrası elde edilmiştir.

4.3. 8H3H5F8E8 ve 8H3H5F8F8 mAb Klonlarının Döner Şişe Kültür Sisteminde Üretilmeleri ve Antikor Sentez Etmelerinin Teyit Edilmesi

Bu amaçla, 8H3H5F8E8 ve 8H3H5F8F8 mAb klonları döner şişe sisteminde üretilmiş ve 6. gün sonunda alınan kültür süpernatantları ELISA, Western Blot ve IFA testleriyle kontrol edilmiştir.

4.3.1. 8H3H5F8E8 ve 8H3H5F8F8 mAb Klonlarının ELISA ile Test Edilmesi

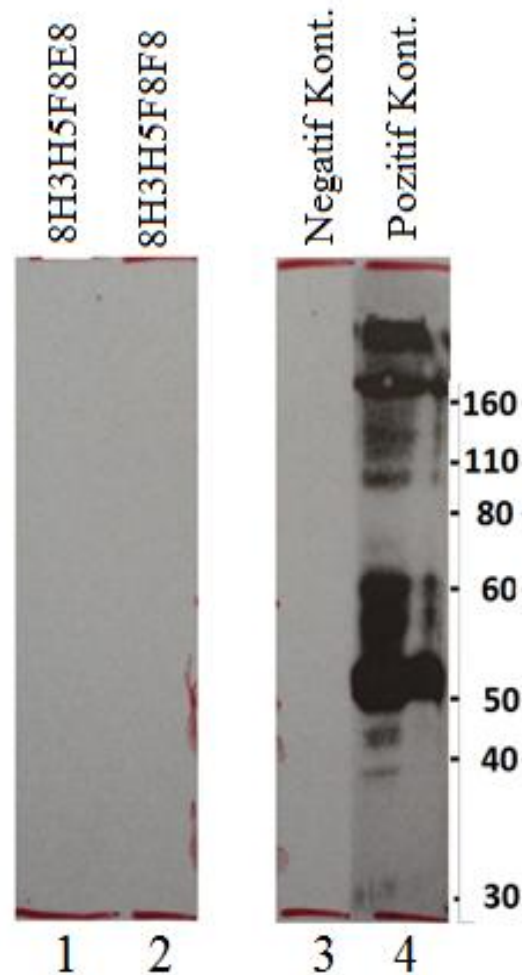
8H3 alt klonlarının döner şişe kültür sistemi 6. gün süpernatantları, indirekt ELISA ile test edilmiştir. Deney sonucunda cut off değeri 0,1228 olarak hesaplanmış ve bu değerin üstünde OD değerine sahip olan klonlar pozitif olarak kabul edilmiştir. Döner şişe kültür sisteminde kültüre edilen 8H3H5F8E8 ve 8H3H5F8F8 klonları 6. gün süpernatantları da cut off değerinin üstünde OD değeri vermiş ve ELISA pozitif olarak kabul edilmiştir (Şekil 13).



Şekil 13 : 8H3H5F8E8 (A1, B1) ve 8H3H5F8F8 (C1, D1) mAb klonlarının ve 8H3 hibridoma alt klonunun (E1, F1) döner şişe kültür sistemi 6. gün süpernatantlarının indirekt ELISA ile test edilmesi. Deneyde pozitif kontrol olarak KKKAH virüsü nükleoproteinine karşı geliştirilmiş olan 6B9C1G11 (A2) ve 6B9F9D12 (B2, C2) monoklonal antikoru ve KKKAH virüsü fare poliklonal serumu (D2, E2) kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak Ag8 myeloma hattı süpernatantı (F2, G2, H2) kullanılmıştır.

4.3.2. 8H3H5F8E8 ve 8H3H5F8F8 mAb Klonlarının Western Blot ile Test Edilmesi

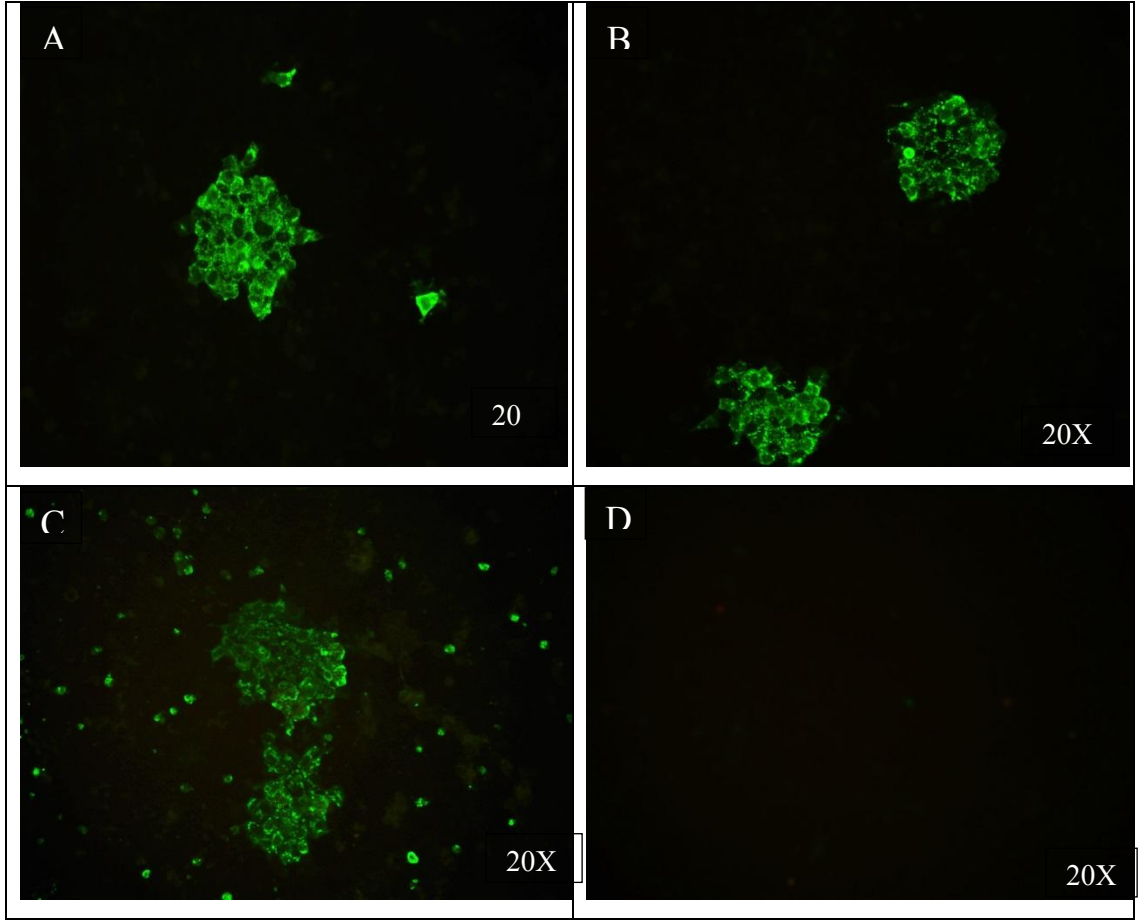
Döner şişe kültür sisteminde kültüre edilen 8H3H5F8E8 ve 8H3H5F8F8 klonları 6. gün süpernatantları, KKKAH virüsü nükleoproteinine spesifik olmadığıının gösterilmesi amacıyla Western Blot ile test edilmiştir. Daha önce elde edilen sonuçlarla uyumlu olarak iki alt klonda Western Blot testinde negatif sonuç vermiştir (Şekil 14).



Şekil 14 : Döner şişe kültür sisteminde kültüre edilen 8H3H5F8E8 ve 8H3H5F8F8 klonları 6. gün süpernatantlarının Western Blot ile test edilmesi, Lane 1 : 8H3H5F8E8 (1/10 dilüsyon), Lane 2 : 8H3H5F8F8 (1/10 dilüsyon), Lane 3 : Negatif kontrol; Ag8 myeloma kültürü süpernatantı, Lane 4: Pozitif kontrol; KKKAH virüsüne karşı elde edilmiş fare poliklonal serum (1/3000 dilüsyon).

4.3.3. 8H3H5F8E8 ve 8H3H5F8F8 mAb klonlarının IFA ile Test Edilmesi:

Yapılan IFA deneyinde, 8H3H5F8E8 ve 8H3H5F8F8 klonları, döner şişe kültür sistemindeki 6. gün süpernatantları test edilmiştir. 8H3H5F8E8 ve 8H3H5F8F8 klonlarının IFA sonucu Şekil 15'te görüldüğü gibi pozitifdir. Böylece, döner şişe kültürlerinde üretilen 8H3H5F8E8 ve 8H3H5F8F8 mAb klonlarının IFA ve ELISA testleriyle KKKAH virüsüne spesifik olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, Western Blot negatif olduğunun bulunması ve KKKAH virüsü NP proteinine karşı olmadığını göstermektedir. Bunun yanında Western Blotlama sonucu, KKKAH virüsü glikoproteinlerine karşı spesifik bant görülmemesi bu mAb'ların KKKAH virüsü glikoproteinlerinin lineer epitoplarına karşı olmadığını, ancak muhtemelen KKKAH virüsü glikoproteinlerinin konformasyonel epitoplarına karşı geliştirilmiş mAb'lar olduğunu göstermektedir.



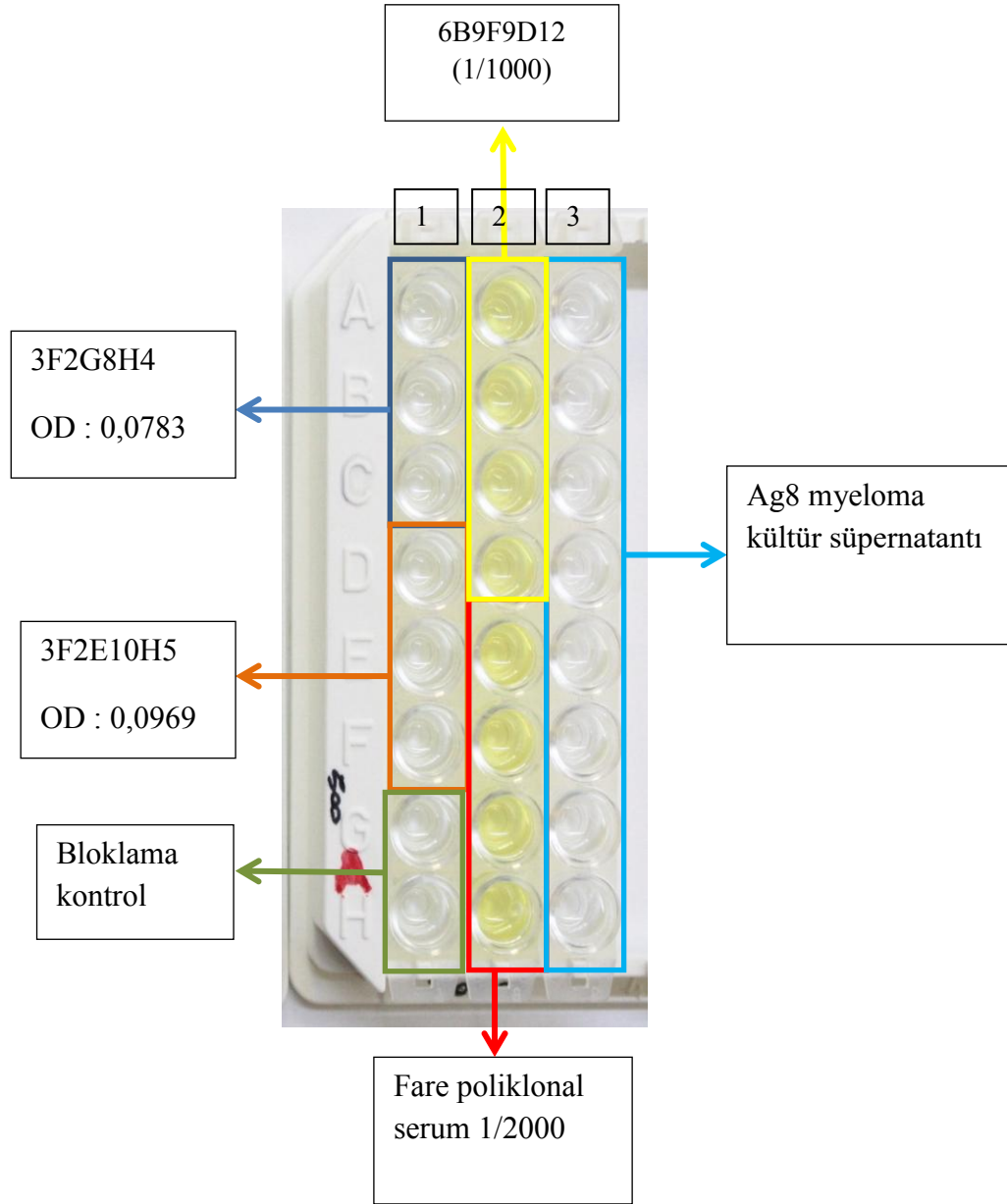
Şekil 15 : 8H3H5F8E8 ve 8H3H5F8F8 klonlarının, döner şişe kültür sistemindeki 6. gün süpernatantlarının IFA ile test edilmesi. 8H3H5F8E8 (A) ve 8H3H5F8F8 (B) klonlarının IFA sonuçlarını göstermektedir. Pozitif kontrol olarak KKKAH virüsü NP proteinine karşı geliştirilmiş 6B9F9D12 mAb'ın 6. gün süpernatantı kullanılmıştır (C). Negatif kontrol olarak Ag8 myeloma hattı süpernatantı kullanılmıştır (D). (Resimler 20X objektif büyütmesiyle çekilmiştir.)

4.4. 3F2G8H4 ve 3F2E10H5 mAb Klonlarının Döner Şişe Kültür Sisteminde Üretilmeleri ve Antikor Sentez Etmelerinin Teyit Edilmesi

Bu amaçla, 3F2G8H4 ve 3F2E10H5 klonları döner şişe kültür sisteminde üretilmiş ve 6. gün sonunda alınan kültür süpernatantları ELISA, Western Blot ve IFA testleriyle kontrol edilmiştir.

4.4.1. 3F2G8H4 ve 3F2E10H5 mAb Klonlarının ELISA ile Test Edilmesi

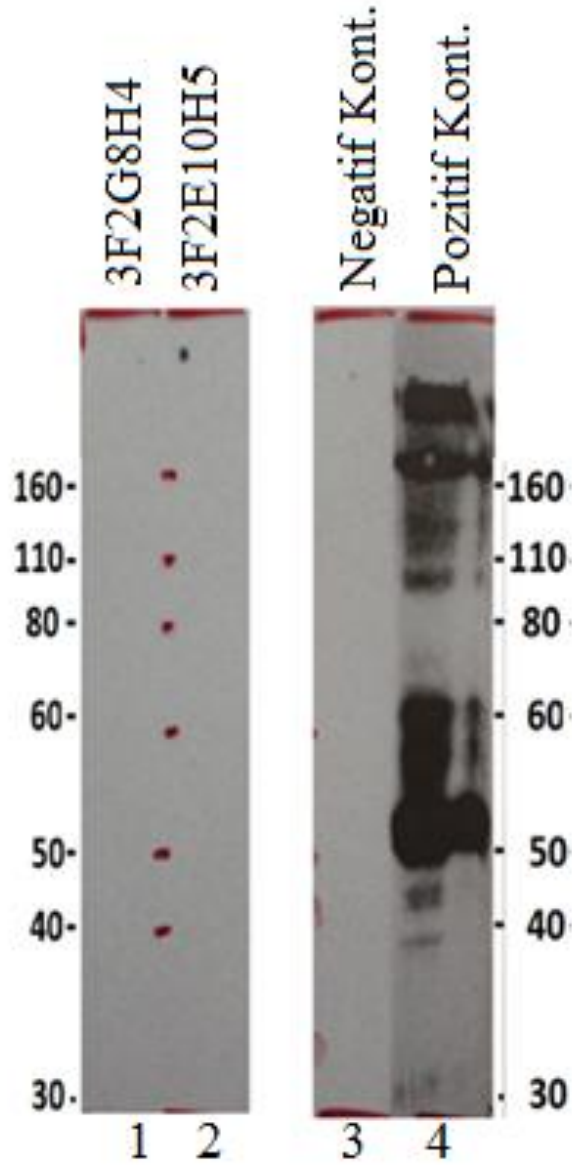
3F2 alt klonlarının, döner şişe kültür sistemi 6. gün süpernatantları indirekt ELISA yöntemiyle test edilmiştir. Deneyde pozitif kontroller olarak KKKAH virüsü nükleoproteinine karşı geliştirilmiş olan mAb 6B9F9D12 ve fare poliklonal serumu; negatif kontrol olarak da Ag8 myeloma hattı süpernatantı ve herhangi bir antikor içermeyen bloklama solüsyonu kullanılmıştır. Deney sonucunda cut off değeri 0,1771 olarak hesaplanmış ve bu değerin üstünde OD değerine sahip klonlar pozitif kabul edilmiştir. Döner şişe kültür sisteminde kültüre edilen, 3F2G8H4 ve 3F2E10H5 klonları cut off değeri altında OD değeri vermiş ve ELISA negatif olarak kabul edilmiştir (Şekil 16). Sonuç olarak 3F2G8H4 ve 3F2E10H5 klonları ELISA deneyinde, KKKAH viral antijenlerini tanıyamamaktadır.



Şekil 16 : 3F2 alt klonlarının, 3F2G8H4 (A1-C1) ve 3F2E10H5 (D1-F1), 6. gün süpernatantlarının İndirekt ELISA yöntemiyle test edilmesi. Pozitif kontroller olarak KKKAH virüsü nükleoproteinine karşı geliştirilmiş olan 6B9F9D12 (mAb) (A2-D2) ve fare poliklonal serumu (E2-H2); negatif kontrol olarak da Ag8 myeloma hattı süpernatantı (A3-H3) ve herhangi bir antikor içermeyen blokla solüsyonu (G1-H1) kullanılmıştır. Cut off değeri 0,1771 olarak hesaplanmış ve bu değerin üstünde OD değerine sahip klonlar pozitif kabul edilmiştir.

4.4.2. 3F2G8H4 ve 3F2E10H5 mAb Klonlarının Western Blot ile Test Edilmesi

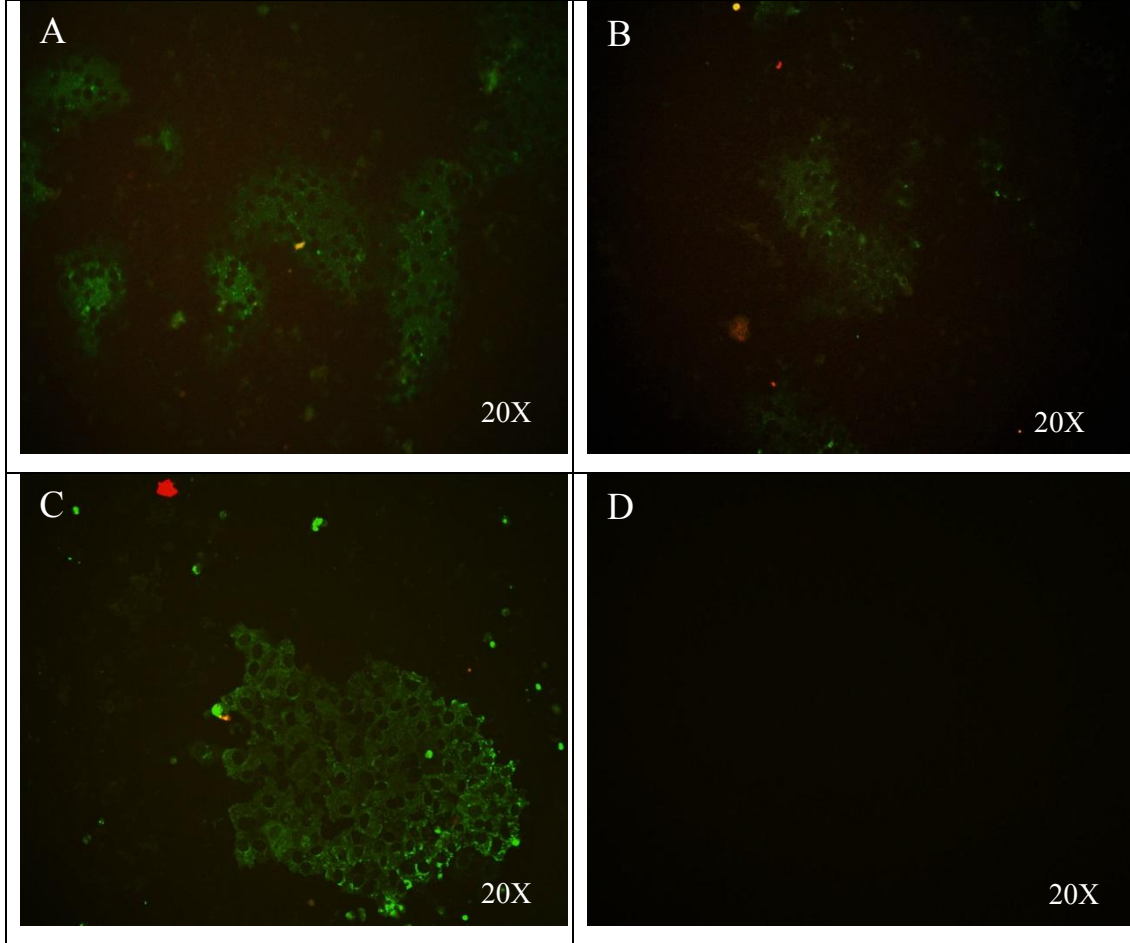
3F2G8H4 ve 3F2E10H5 mAb klonlarının KKKAH virüsü NP'ne karşı spesifik olmadığının gösterilmesi amacıyla Western Blot ile test edilmiştir. İki alt klonda Western Blot testinde negatif olarak bulunmuştur (Şekil 17, Lane 1-2). Deneyde negatif kontrol olarak kullanılan Ag8 süpernatantında (şekil 17, Lane 3) bant gözlenmemiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan KKKAH virüsüne karşı elde edilen fare poliklonal serumu ile yapılan probamada ise KKKAH virüsüne spesifik bantlar elde edilmiştir (Şekil 17, Lane 4). 3F2G8H4 ve 3F2E10H5 klonlarının Western Blot negatif olduğunun bulunması, KKKAH virüsü NP proteinine karşı mAb olmadığını, virüs glikoproteinlerinin konformasyonel epitoplarına karşı olabileceğini göstermektedir.



Şekil 17 : 3F2G8H4 ve 3F2E10H5 mAb klonlarının döner şişe kültür sistemi 6. gün süpernatantlarının Western Blot ile test edilmesi. Lane 1 : 3F2G8H4, Lane 2: 3F2E10H5, Lane 3 : Negatif kontrol; Ag8 myeloma hattı süpernatantı, Lane 4: Pozitif kontrol; KKKAH virüsüne karşı elde edilmiş fare poliklonal serumu (1/3000 dilüsyon).

4.4.3. 3F2G8H4 ve 3F2E10H5 mAb Klonlarının IFA ile Test Edilmesi

3F2G8H4 ve 3F2E10H5 klonlarının döner şişe kültür sistemindeki 6. gün süpernatantları IFA ile test edilmiştir. 3F2G8H4 (Şekil 18-A) ve 3F2E10H5 (Şekil 18-B) klonlarının pozitif olduğu görülmüştür. Deneyde pozitif kontrol olarak KKKAH virüsü NP proteinine karşı geliştirilmiş olan mAb 6B9F9D12 (Şekil 18-C) ve negatif kontrol olarak Ag8 myeloma hücre hattı süpernatantı (Şekil 18-D) kullanılmıştır. Böylece, döner şişe kültürlerinde üretilen 3F2G8H4 ve 3FE10H5 mAb klonlarının IFA testiyle KKKAH virüsüne spesifik olduğu belirlenmiştir.



Şekil 18 : 3F2G8H4 ve 3F2E10H5 klonları, döner şişe kültür sistemindeki 6. gün süpernatantlarının IFA ile test edilmesi. 3F2G8H4 (A) ve 3F2E10H5 (B) klonlarının IFA sonuçlarını göstermektedir. Pozitif kontrol olarak KKKAH virüsü NP proteinine karşı geliştirilmiş 6B9F9D12 mAb'ın 6. gün süpernatantı kullanılmıştır (C). Negatif kontrol olarak Ag8 myeloma hattı süpernatantı kullanılmıştır (D). (Resimler 20X objektif büyütmesiyle çekilmiştir.)

4.5. Monoklonal Antikorların Üretilmesi, Saflaştırılması ve İzotiplendirilmesi

8H3H5F8E8, 8H3H5F8F8, 3F2G8H4 ve 3F2E10H5 klonlarının her birinin, döner şişe hücre kültür kabında 9 gün süresince 750 ml hacimde üretimi gerçekleştirildi. Daha sonra, süpernatantlar alınıp önce santrifüj işlemiyle hücreler uzaklaştırıldı, ardından pürifikasyon işlemleri gerçekleştirildi.

4.5.1. Döner Şişe Hücre Kültür Kaplarında Üretilen Monoklonal Antikorların Amonyum Sülfat ile Çöktürülmesi

Kolon pürifikasyonu öncesi, pürifikasyon verimini arttırmak amacıyla öncelikle amonyum sülfat çöktürme işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 19). Elde edilen pelletler PBS ile çözdürülmüş ve yine PBS'e karşı diyaliz edilmiştir. Amonyum sülfat çöktürme sonrası elde edilen antikor miktarları Lowry metodu ile belirlenmiştir (Tablo 1).



Şekil 19 : Döner şişe kültür hücre kültür kaplarında üretim sonrasında amonyum sülfat çöktürme sonucu oluşan pelletin görünümü.

Tablo 1: Amonyum sülfat çöktürme sonrası süpernatantlardan elde edilen antikor miktarları (mg/ml).

Monoklonal Antikor	ml'deki Protein Miktarı	Toplam Protein miktarı
8H3H5F8E8	27 mg	540 mg
8H3H5F8F8	25 mg	500 mg
3F2G8H4	22 mg	440 mg
3F2E10H5	20 mg	400 mg

4.5.2. Monoklonal Antikorların Protein G Kromatografisi ile Saflaştırılması

Diyaliz işleminin ardından daha ileri pürifikasyon amacıyla Protein G kromatografisi yapılmıştır. Bunun içinde Hitrap protein G kolonu (1 ml) kullanılmıştır. Kolonlardan 70 mg protein içeren antikor solüsyonları geçirilmiştir. Daha sonra pürifiye mAb'lar PBS'e karşı diyaliz edilmiş, diyaliz sonunda 0,22 µm filtreden geçirilerek steril edilmiştir. Saflaştırılan mAb'ların ml'deki ortalama miktarları 2,7-4,7 mg arasında değiştiği belirlenmiştir (Tablo 2).

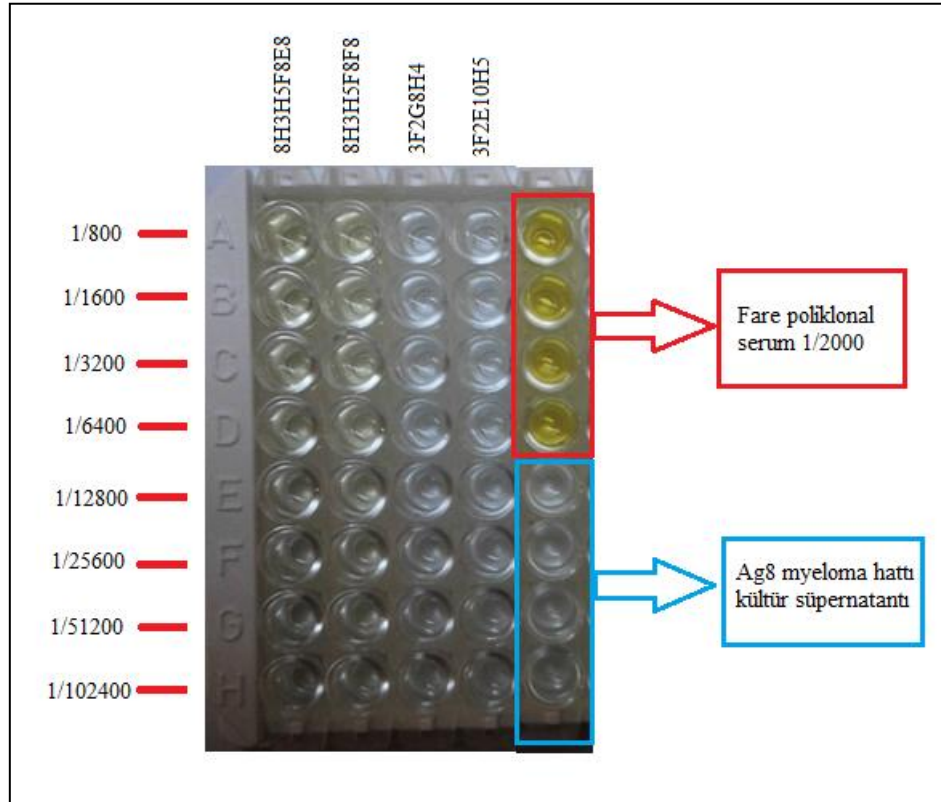
Tablo 2: Protein G kolon pürifikasyonu sonrasında elde edilen antikor miktarları (mg/ml)

Monoklonal Antikor	ml'deki Protein Miktarı	Toplam Protein miktarı
8H3H5F8E8	4,7 mg	23,5 mg
8H3H5F8F8	4 mg	20 mg
3F2G8H4	2,7 mg	13,5 mg
3F2E10H5	3 mg	15 G

4.6. Saflaştırılmış mAb'ların ELISA, Western Blot ve IFA ile Test Edilmesi

4.6.1. Saflaştırılmış mAb'ların ELISA ile Test Edilmesi

Pürifiye edilen mAb'lar ELISA ile test edilmiştir. Saflaştırma öncesi ELISA pozitif olduğu bilinen 8H3 klonlarının titrelerinin görülmesi amacıyla 1/800-1/102400'e kadar dilüsyonları yapılmıştır. Antikor titresi her iki alt klon içinde (8H3H5F8E8 ve 8H3H5F8F8) 1/12800 bulunmuştur (Şekil 20). ELISA sonucunda beklendiği gibi 3F2 klonları negatif sonuç vermiştir. ELISA deneyinde elde edilen OD değerleri Tablo 3'te verilmiştir.



Şekil 20 : Saflaştırılmış mAb'lara yapılan ELISA testi görüntüsü.

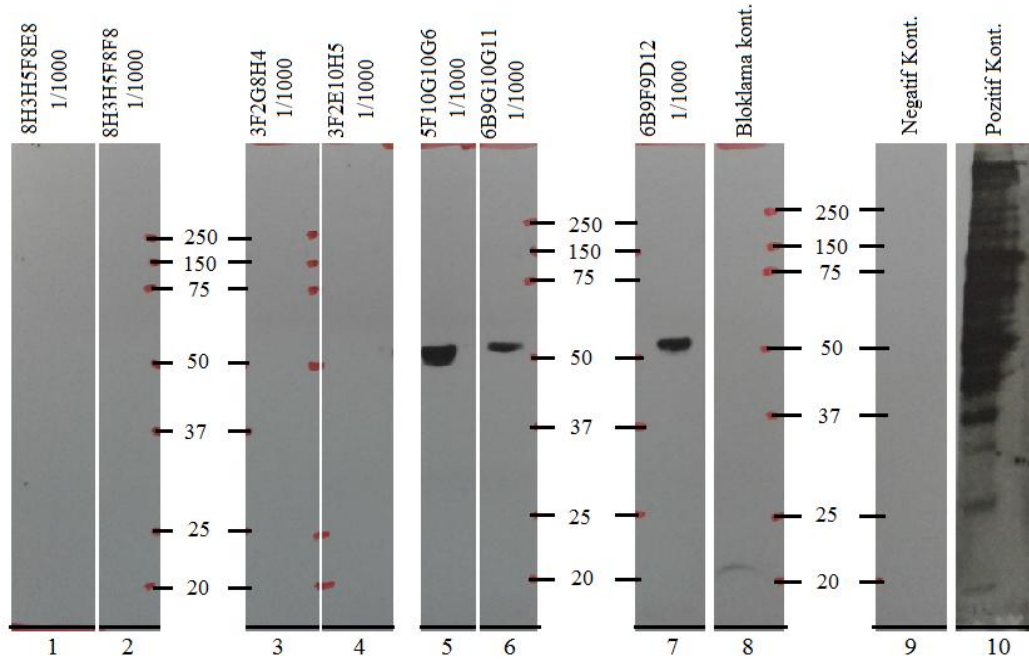
Tablo 3 : Saflaştırılmış mAb'ların ELISA OD Değerleri

		8H3H5F8E8	8H3H5F8F8	3F2G8H4	3F2E10H5	
		1	2	3	4	8
1/800	A	0,1669	0,1456	0,0556	0,0607	0,5963
1/1600	B	0,1352	0,1237	0,0514	0,0546	0,5496
1/3200	C	0,1204	0,1252	0,0472	0,0485	0,5415
1/6400	D	0,1109	0,1179	0,0523	0,0517	0,5986
1/12800	E	0,0935	0,1044	0,0542	0,0600	0,0511
1/25600	F	0,0755	0,0877	0,0525	0,0504	0,0488
1/51200	G	0,0769	0,0806	0,0519	0,0495	0,0479
1/102400	H	0,0629	0,0670	0,0564	0,0473	0,0486

cut off 0,0894

4.6.2. Saflaştırılmış Mab'ların Western Blot ile Test Edilmesi

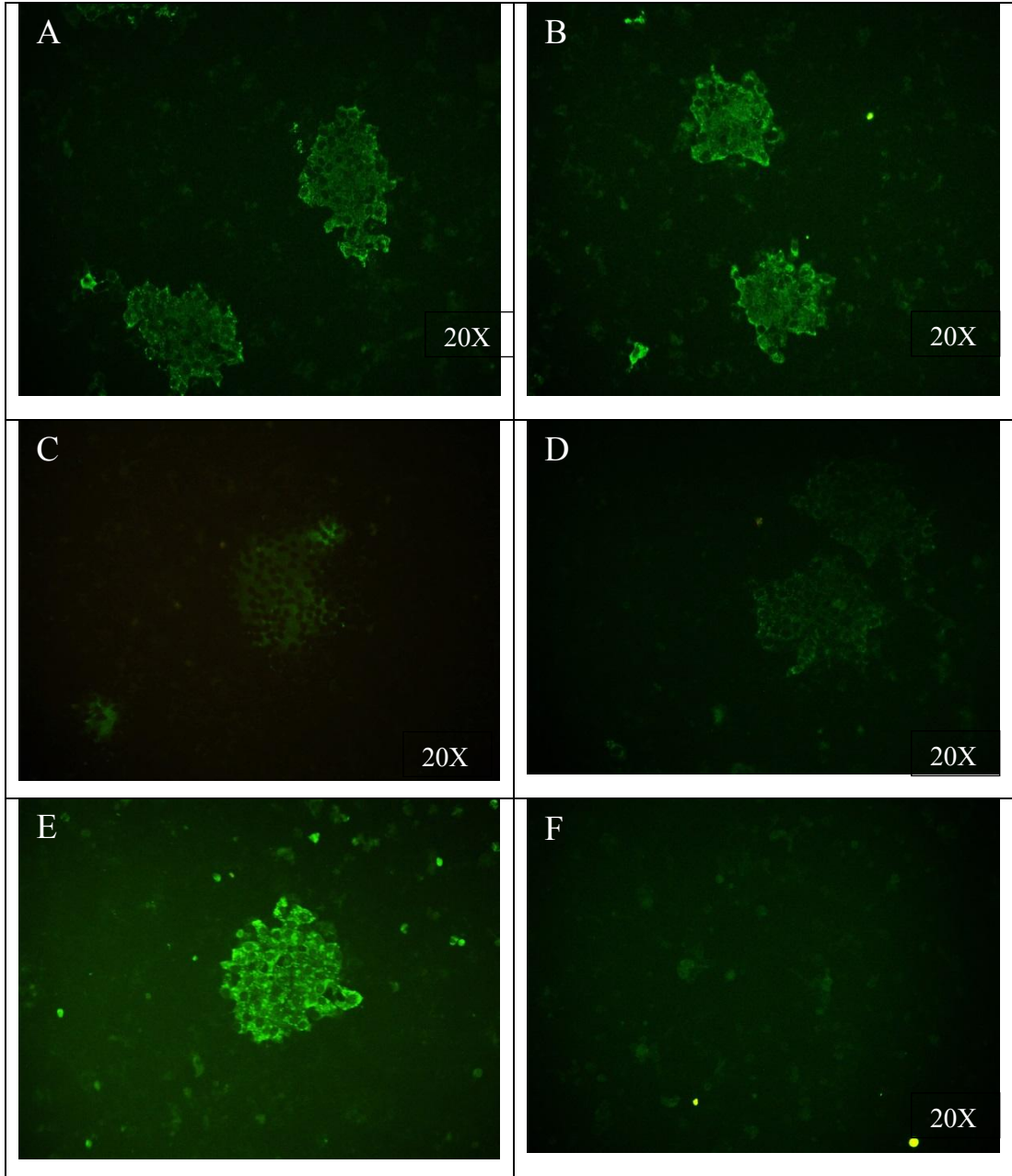
Saflaştırılmadan önce, Western Blot ile test edilen ve negatif sonuç veren 8H3H5F8E8, 8H3H5F8F8, 3F2G8H4 ve 3F2E10H5 mAb'ların saflaştırma yapıldıktan sonra da Western Blot deneyinde beklendiği gibi negatif sonuç vermiştir (Şekil 21, Lane1-4). KKKAH virüsü NP proteinine karşı geliştirilmiş olan ve deneyde pozitif kontrol olarak kullanılan ve aynı yöntemle saflaştırılmış 5F10G10G6, 6B9G10G11 ve 6B9F9D12 (Şekil 21, Lane 5-7) mAb'ları beklendiği gibi 55 kDa civarında bant vermişlerdir. Deneyde negatif kontrol olarak Ag8 süpernatantı (Şekil 21, Lane 9) ve pozitif kontrol olarak da KKKAH virüsüne karşı geliştirilmiş fare poliklonal serumu kullanılmış ve virüse spesifik bantlar elde edilmiştir (Şekil 21, Lane 10).



Şekil 21 : Saflaştırılmış mAb'lara karşı yapılan Western Blot deneyi. 8H3H5F8E8 (lane 1), 8H3H5F8F8 (lane 2), 3F2G8H4 (lane 3) ve 3F2E10H5 (lane 4) mAb'lar saflaştırıldıktan sonra 1/1000 oranında sulandırılarak deneyde kullanılmışlardır. KKKAH virüsü NP antijenine spesifik mAb'lar 5F10G10G6 (lane 5), 6B9G10G11 (lane 6) ve 6B9F9D12 (lane 7) aynı şekilde 1/1000 oranında sulandırılmış ve virüsün NP proteinine spesifik olarak 55 kDa büyüklüğünde bant vermişlerdir. Negatif kontrol olarak Ag8 süpernantantı (Şekil 30, lane 9) ve pozitif kontrol olarak da KKKAH virüsüne karşı geliştirilmiş fare poliklonal serumu kullanılmıştır (Şekil 30, lane 10).

4.6.3. Saflaştırılmış mAb'ların IFA ile Test Edilmesi

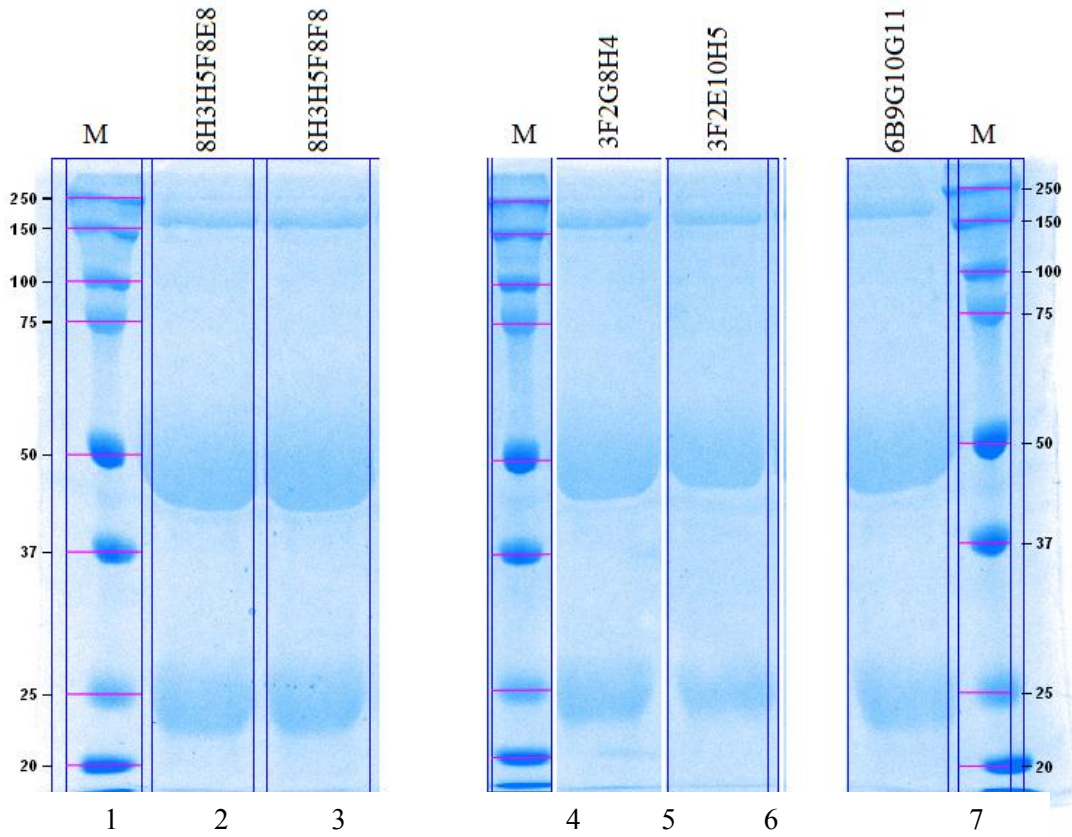
Protein G kolonu yöntemiyle saflaştırılan 8H3H5F8E8, 8H3H5F8F8, 3F2G8H4 ve 3F2E10H5 klonları IFA ile test edilmiştir ve pozitif sonuç vermişlerdir. Deneyde pozitif kontrol olarak KKKAH virüsü NP proteinine karşı geliştirilmiş olan 6B9F9D12 ve negatif kontrol olarak Ag8 myeloma hücre hattı kültür süpernatantı kullanılmıştır. Kontroller beklenen şekilde sonuç vermiştir (Şekil 22).



Şekil 22: Saflaştırılmış mAb'ların IFA ile test edilmesi. 8H3H5F8E8 (A), 8H3H5F8F8 (B), 3F2G8H4 (C) ve 3F2E10H5 (D) IFA sonuçlarını göstermektedir. Pozitif kontrol olarak KKKAH virüsü NP proteinine karşı geliştirilmiş 6B9F9D12 mAb kullanılmıştır (E). Negatif kontrol olarak Ag8 myeloma hattı süpernatantı kullanılmıştır (F). (Resimler 20X objektif büyütmesiyle çekilmiştir.)

4.6.4. Saflaştırılmış mAb'ların SDS-PAGE ile Görüntülenmesi

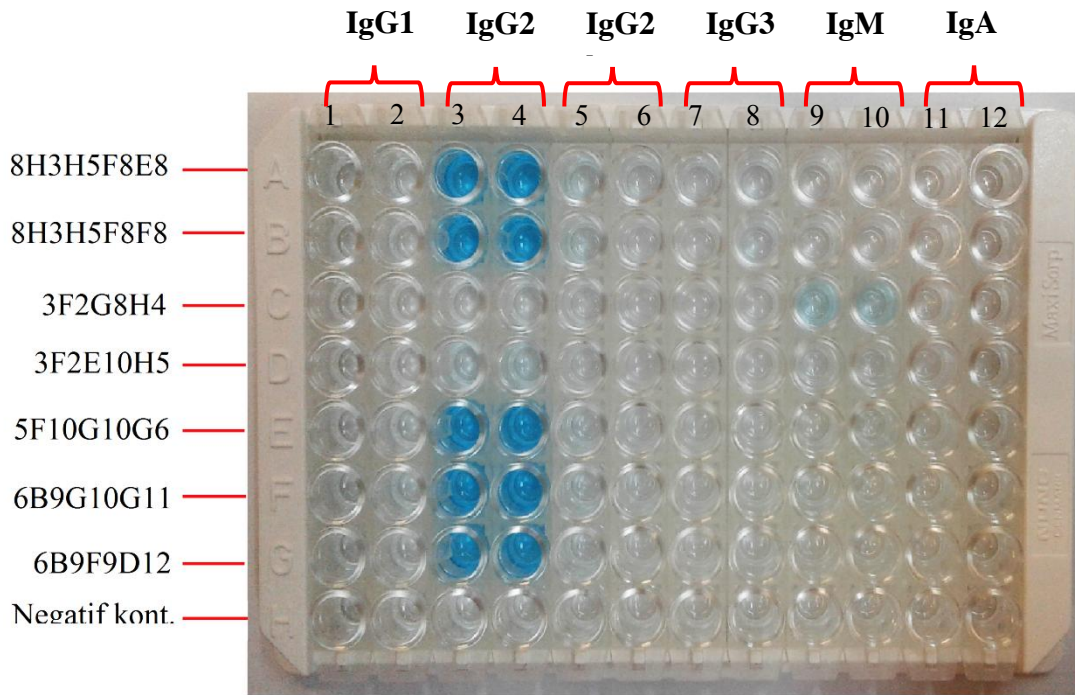
Saflaştırılan mAb'ların pürifikasyonlarının değerlendirilmesi amacıyla SDS-PAGE yapılmış ve Coomassie Blue boyası ile 3 saat boyanmıştır. SDS-PAGE sonucunda, 50kDa ve 25 kDa büyüklüklerde bantlar görülmüştür. İmmunoglobuline ait karakteristik 50 kDa'luk ağır zincir ve 25 kDa'luk hafif zincire ait bantlar, saflaştırılmış olan mAb'larda görülmektedir (Şekil 23).



Şekil 23 : Saflaştırılmış mAb'ların SDS-PAGE görüntüsü. Lane 1: Protein marker, Lane 2: 8H3H5F8E8, Lane 3 : 8H3H5F8F8, Lane 4 : Protein Marker, Lane 5 : 3F2G8H4, Lane 6 : 3F2E10H5, Lane 7 : 6B9G10G11, Lane 8 : Protein Marker.

4.6.5. Pürifiye Monoklonal Antikorların İzotiplendirilmesi

Elde edilen mAb'ların izotiplendirilmesi amacıyla, 2 mg/ml konsantrasyonundaki saflaştırılmış mAb'lar 1/1000 sulandırılmıştır. İzotiplendirme amacıyla 8H3H5F8E8, 8H3H5F8F8, 3F2G8H4 ve 3F2E10H5 mAb'ları kullanılmış ve kontrol olarak, IgG2a izotipinde olduğu bilinen 6B9G10G11, 6B9F9D12 ve 5F10G10G6 pürifiye mAb'ları, negatif kontrol olarakta PBS kullanılmıştır. Her bir örnek 2 kuyucukta test edilmiştir. Testin cut off değeri 0,1284 olarak belirlenmiş ve bu değerin üzerinde OD veren kuyucuklar pozitif olarak değerlendirilmiştir. Antikor izotiplendirme sonucunda, 3F2G8H4 mAb'ın IgM, 8H3H5F8E8, 8H3H5F8F8 ve 3F2E10H5 mAb'ların ise IgG2a izotipine ait olduğu belirlenmiştir (Şekil 24).



Şekil 24 : Saflaştırılmış mAb'ların izotiplendirmesi, cut off : 0,1284 olarak hesaplanmıştır.

4.7. 8H3H5F8E8, 8H3H5F8F8, 3F2G8H4 ve 3F2E10H5 mAb'ların Nötralizan Etkilerinin Araştırılması

8H3H5F8E8, 8H3H5F8F8, 3F2G8H4 ve 3F2E10H5 mAb'ların nötralizan aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla Floresan Fokus Redüksiyon Nötralizasyon Testi (FFRNT) yapıldı. 1/10, 1/20, 1/40 oranlarında antikor dilüsyonları hazırlandı ve antikor dilüsyonları üzerine yaklaşık 110 PFU olacak şekilde virüs dilüsyonu ilave edildi. Metot bölümünde detaylı olarak anlatıldığı şekilde yapılan deneyin görüntülenmesinde 1/2000 oranında TBST içerisinde sulandırılan Goat anti-mouse IgG, Human ads-FITC kullanıldı. Pozitif kontrol olarak, inaktive edilmiş KKKAH virüsü Kelkit06 suşu ile immunize edilen 2 fare serumu kullanılmıştır. Bunlar, FFRNT₅₀ titresi 1/640 olan fare serum 1 ve FFRNT₅₀ titresi 1/20 olan fare serum 2 olarak isimlendirilmiştir. Negatif kontrol olarak, nötralizan olmayan (Np'ye karşı olduğu bilinen) mAb 6B9G10G11 ve PBS kullanılmıştır. Deneyde virüs miktarı 110 FFU olarak sabit tutulmuştur. Kuyucuklardaki plak sayıları (floresan fokus sayısı) negatif kontrol kuyucuklarındaki plak sayısına göre değerlendirilmiş ve saflaştırılmış mAb'ların nötralizan etkileri değerlendirilmiştir. Şekil 25'de 1/10 dilusyondan 1/40 dilüsyona kadar olan sulandırmalardaki plak sayıları verilmiştir.

8H3H5F8E8 klonunun nötralizan etkisi negatif kontrollere göre belirlenmiştir. Deney sonucuna göre, 8H3H5F8E8 klonu için FFRNT₅₀ değeri görülememiştir. Ancak bu mAb'ın 1/10 dilüsyonunda %28 nötralizan etki görülmüştür. 8H3H5F8F8, 3F2G8H4 ve 3F2E10H5 mAb'larının nötralizan aktivitesinin olmadığı belirlenmiştir (Şekil 25). FFRNT deneyi 3 kez tekrarlanarak sonuçlar teyit edilmiştir.

		3F2G8H4		3F2E10H5		8H3H5F8E8		8H3H5F8F8	
		1	2	3	4	5	6	7	8
1/10	A	111	102	100	104	75	86	92	101
1/20	B	104	108	117	108	107	97	90	103
1/40	C	102	105	110	115	95	101	108	106

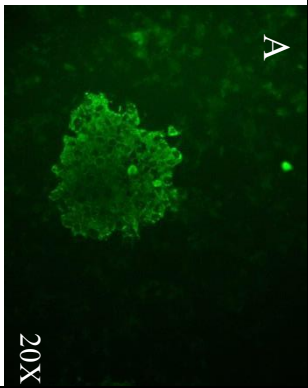
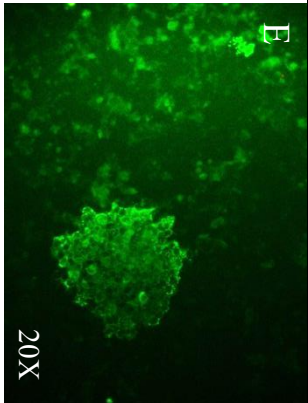
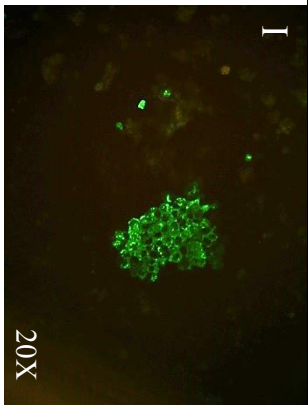
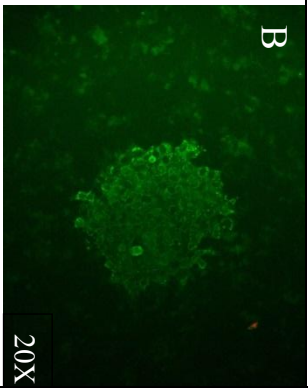
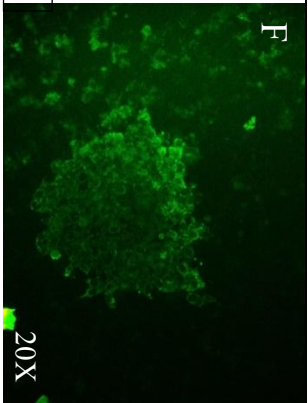
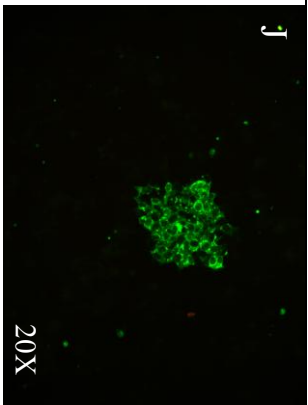
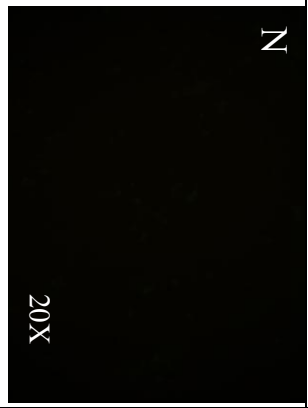
		6B9G10G11		PBS		Pozitif Kontrol 1		Pozitif Kontrol 2	
1/10	D	116	109	116	117	0	0	23	14
1/20	E	109	108	112	115	16	15	35	41
1/40	F	106	113	109	118	35	33	64	68

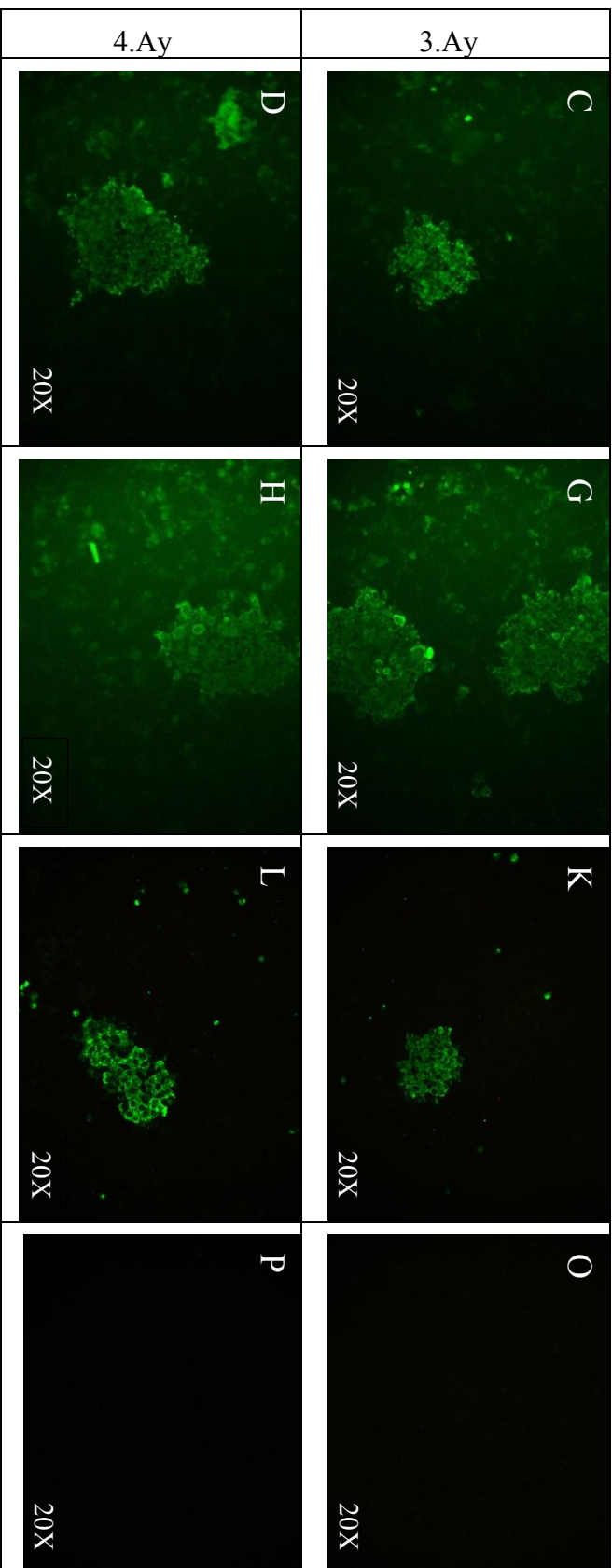
Şekil 25 : FRNT deneyi sonucunda 3F2G8H4, 3F2E10H5, 8H3H5F8E8 ve 8H3H5F8F8 mAb'ların 1/10, 1/20 ve 1/40 sulandırılmalardaki plak sayıları. Pozitif kontrol olarak, inaktive edilmiş KKKAH virüsü Kelkit06 suşu ile immunize edilen 2 fare serumu kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak, nötralizan olmayan (Np'ye karşı olduğu bilinen) mAb 6B9G10G11 ve PBS kullanılmıştır.

4.8. 8H3H5F8E8, 8H3H5F8F8, 3F2G8H4 ve 3F2E10H5 Klonlarının Stabilit  Değerlendirmesi

4.8.1. 8H3H5F8E8 ve 8H3H5F8F8 Klonları Stabilit  Değerlendirmesi

Dondurulmuş ve sıvı azotta (-196 C) saklanmakta olan klonlardan her ay bir kriyovial            ve 7 gün kültüre edilmiştir. Yedi günlük kültür süpernatantları, klonların antikör sentezleyip sentezlemediklerinin görülmesi amacıyla IFA testi ile test edilmiştir. Deneyde pozitif kontrol olarak, KKKAH virüsü NP proteinine karşı geliştirilmiş 6B9F9D12 klonu süpernatantı, negatif kontrol olarakta Ag8 myeloma hücre hattı kültür süpernatantı kullanılmıştır. Her ay     r len 8H3 alt klonları için yapılan IFA sonuçları 4 ay boyunca pozitif çıkmıştır (şekil 26, A-H). Klonlar dondurularak saklandığı 4 ay boyunca antikör sentezleme yeteneğini kaybetmemiş, stabil kalmıştır.

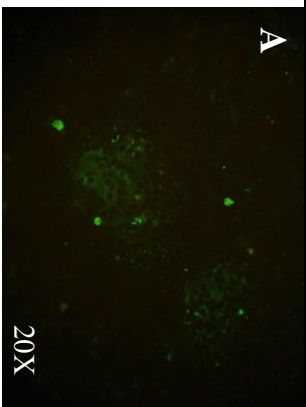
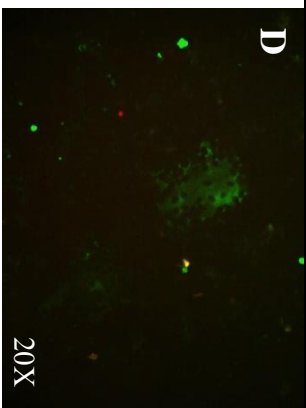
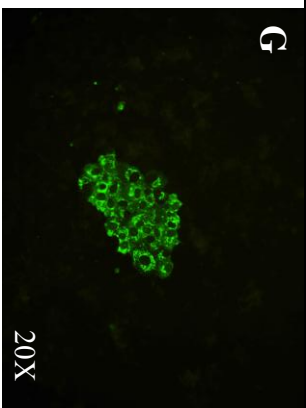
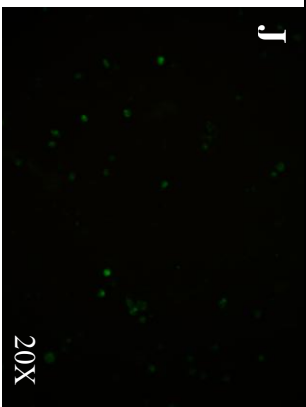
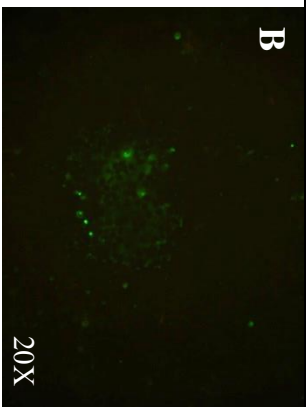
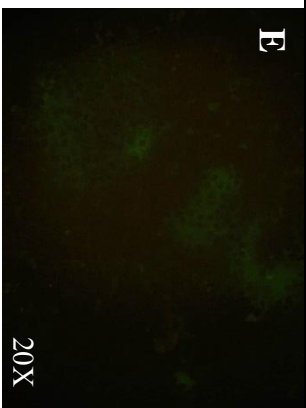
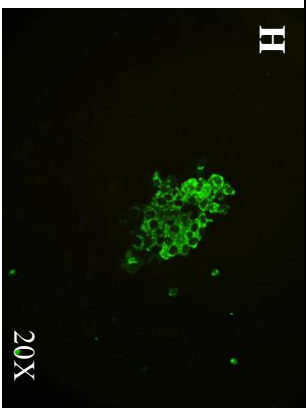
	8H3H5F8E8	8H3H5F8F8	Pozitif Kontrol	Negatif Kontrol
1.Ay	A  20X	E  20X	I  20X	M  20X
2. Ay	B  20X	F  20X	J  20X	N  20X

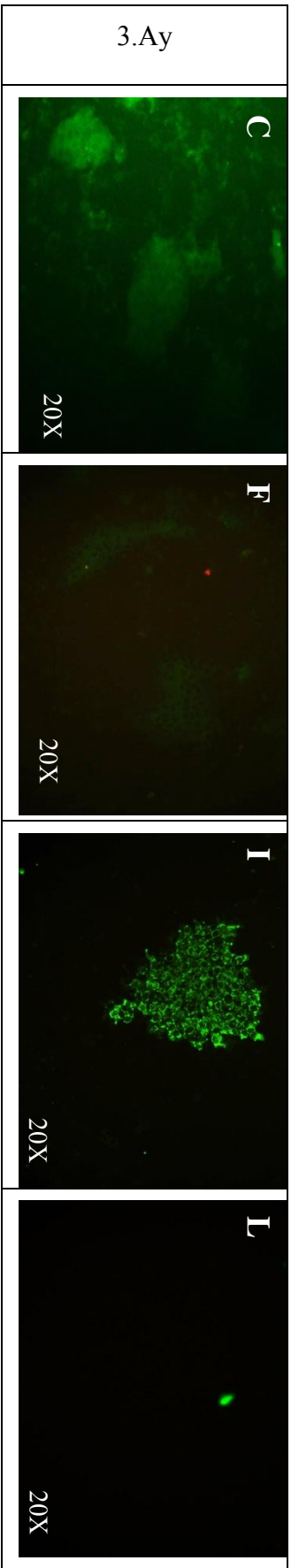


Şekil 26 : 8H3 alt klonlarının stabilite değerlendirmesi amacıyla yapılan IFA deneyleri. 8H3H5F8E8 (A-D), 8H3H5F8F8 (E-H) klonlarının 4 aylık IFA deneyi sonuçlarını göstermektedir. Her IFA deneyinde pozitif kontrol olarak KKKAH virüsü NP proteinine karşı geliştirilmiş 6B9F9D12 klonu süpernatantı (I-L), negatif kontrol olarak Ag8 myeloma hücre hattı kültür süpernatantı (M-P) kullanılmıştır. (Resimler 20X objektif büyütmesiyle çekilmiştir.)

4.8.2. 3F2G8H4 ve 3F2E10H5 Klonları Stabilite Değerlendirmeleri

Dondurulmuş ve sıvı azotta (-196°C) saklanmakta olan klonlardan her ay bir kriyovial çözündürülmüş ve 7 gün kültüre edilmiştir. Yedi günlük kültür süpernatantları, klonların hala antikor sentezleyip sentezlemediklerinin görülebilmesi amacıyla IFA testi ile test edilmiştir. Deneyde pozitif kontrol olarak, KKKAH virüsü NP proteinine karşı geliştirilmiş 6B9F9D12 klonu süpernatantı, negatif kontrol olarakta Ag8 myeloma hücre hattı kültür süpernatantı kullanılmıştır. Her ay çözödürölen 3F2 alt klonları için yapılan IFA sonuçları 3 ay boyunca pozitif çıkmıştır (Şekil 27, A-F). Klonlar dondurularak saklandığı 3 ay boyunca antikor sentezleme yeteneğini kaybetmemiş, stabil kalmıştır.

	3F2G8H4	3F2E10H5	Pozitif Kontrol	Negatif Kontrol
1.Ay	 A 20X	 D 20X	 G 20X	 J 20X
2.Ay	 B 20X	 E 20X	 H 20X	 K 20X



Şekil 27 : 3F2 alt klonlarının stabilite değerlendirmesi amacıyla yapılan IFA deneyleri. 3F2G8H4 klonu (A-C), 3F2E10H5 klonu (D-F), pozitif kontrol olarak KKKAH virüsü NP proteinine karşı geliştirilmiş 6B9F9D12 klonu süpermatantı (G-I), negatif kontrol olarak Ag8 myeloma hücre hattı kültür süpermatantı (J-L) kullanılmıştır. (Resimler 20X objektif büyütmesiyle çekilmiştir)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Enfeksiyöz hastalıklar, halk sağlığı yönünden en önemli morbidite ve mortalite nedenlerinden olmaya devam etmektedirler. Viral kanamalı hastalıklar, birçok ülkede olduğu gibi son yıllarda ülkemizde de ortaya çıkmakta ve hem toplum genelini hem de halk sağlığı çalışanlarını tehdit etmektedir. Önemli viral kanamalı hastalığa neden olan viral ajanlar arasında Lassa Ateşi, Marburg, Ebola, Dengue, Hanta ve KKKAH sayılabilir. Enfeksiyon ajanları olarak toplum sağlığını tehdit ederken aynı zamanda biyolojik silah olarak kullanılma potansiyelinde olmaları bu patojenlere ayrı bir önem atfedilmesine neden olmaktadır (58). Ülkemizde son 15 yıldır başta KKKAH olmak üzere domuz gribi, kuş gribi, Hanta virüs, Sandfly Ateş virüs ve Batı Nil humması gibi, toplum sağlığını tehdit eden enfeksiyon hastalıkları görülmektedir (59).

Kırım-Kongo kanamalı ateş hastalığı diğer memelilerin aksine sadece insanlarda ciddi klinik semptomlarla seyreder. İnsanlardaki kanamalı hastalık tablosu peteşi, yaygın ekimoz, kanama ve karaciğerdeki fonksiyon bozukluğu şeklinde kendini gösterir ve mortalite oranı %30'lara kadar çıkabilir. KKKAH virüsü kenelerle, taşınan coğrafik olarak en yaygın olarak görülen viral ajandır. Son yıllarda vaka sayılarının artması ve yeni coğrafik bölgelerde hastalığın ortaya çıkması, hastalığın kontrol altına alınması için acil kontrol stratejilerinin geliştirilmesini gerektirmektedir (60,61). Ülkemizdeki KKKAH ile ilgili ilk klinik vakalar 2002 yılında Tokat'da bildirilmiştir ve şu ana kadar 9000'in üzerinde vaka görülmüş olup, ülkemiz ciddi bir KKKAH salgını ile karşı karşıyadır. 2015 yılında 900'ün üzerinde vaka bildirilmiş ve mortalite oranı yaklaşık %5'dir (35,43).

Kırım-Kongo kanamalı ateş hastalığı için tedavi seçenekleri sınırlıdır. Destek tedavisi, hastalara en çok uygulanan tedavi şekli olup trombosit uygulaması, dondurulmuş taze plazma ve eritrosit uygulamaları gibi replasman yöntemler hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (30). Enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde, çok uzun yıllardan bu yana uygulanmakta olan ancak son yıllarda terk edilmeye başlanmış bir tedavi yöntemi olan hiperimmun serum uygulaması KKKAH'in tedavisinde de denenmiştir. Bu tedavi yöntemi, hastalıktan iyileşen bireylerden veya KKKAH virüs ile immünize edilen hayvanlardan elde edilen serum antikorları kullanılarak hastalara pasif transfer yoluyla yapılan immünoterapiyi içermektedir (26,30,37). Bunyaviridae ailesindeki virüslerin genel olarak ribavirine karşı hassas olduğu bilinmektedir ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) KKKAH'in tedavisinde bir antiviral olan ribavirini önermektedir (37,44,51). Ribavirin pürin nükleozid analogu ve geniş spektrumlu bir antiviraldir. Direkt (inozin monofosfar dehidrogenaz inhibisyonu ve immunomodülatör etki) ve indirekt (mRNA capping'in engellenmesi, polimeraz inhibisyonu, letal mutagenез) etki göstermektedir (41). Ribavirinin KKKAH'da etkili olduğu, yavru farelerde yapılan çalışmalarda ölüm oranını azalttığı, ölüme kadar olan ortalama süreyi uzattığı, karaciğer, beyin ve kalp dokularında viral replikasyonu azalttığı bildirilmiştir (9,44). Literatürde yer alan bu bilgilere karşılık Bodur ve ark.'nın (51) yaptığı çalışmada ribavirinin belirgin bir etkisinin olmadığı belirtilmiştir. Aynı şekilde Ceylan ve ark. (62) ve Çevik ve ark.'da (63) ribavirinin etkili olmadığını belirtmişlerdir. Bu sebeple her ne kadar ribavirin uygulamasının *in vitro* olarak virüs çoğalmasını inhibe ettiği ortaya konulmuş olsada, yapılan klinik çalışmalarda ribavirinin etkisi halen tartışmalı bir konudur (34,37,41,43,44,51).

Projenin amacı, 108G126 nolu ve 'Kırım-Kongo Kanamalı Ateş virüsünün Epidemiyolojisi, Moleküler Karakterizasyonu, Antijen-ELISA Geliştirilmesi ve Koruyucu Aşı Çalışmaları' isimli TUBİTAK 1007 KAMAG projesi kapsamında üretilmiş olan hibridomaların limiting dilüsyonlarının yapılması, stabiliteilerinin test edilmesi ve elde edilen mAb'ların nötralizan aktivite gösterip göstermediklerinin belirlenmesidir. Bu çalışma, KKKAH tedavisinde kullanılabilecek nötralizan özellikteki terapötik mAb'ların geliştirilmesini sağlayacak ilk verilerin elde edilmesi açısından önem taşımaktadır. Daha sonra yapılacak çalışmalarla elde edilmesi planlanan nötralizan özellikteki diğer mAb'larla birlikte gerek klinik öncesi denemeler gerekse de

gönüllü insanlarda faz çalışmaları yapılarak elde edilen ürün/ürünlerin pratikte KKKAH'nin tedavisi amacıyla kullanılması söz konusu olabilecektir.

Klinikte mAb kullanımı son dönemlerde oldukça yaygınlaşmıştır. Özellikle kanser ve inflamatuvar hastalıkların tedavisinde kullanımda olan pekçok mAb tabanlı terapötikler mevcuttur. Bunların başlıca örnekleri, Non-Hodgkin lenfoma tedavisinde kullanılan Rituximab (Rituxan, MabThera), göğüs kanseri tedavisinde kullanılan Transtzumab (Herceptin), Crohn hastalığı tedavisinde kullanılan infliximab olarak verilebilir (64,65). Enfeksiyon hastalıklarının tedavisi amacıyla 2015 yılına kadar sadece 2 mAb tedavide kullanılmak üzere onay alabilmiştir. Bu antikolar, RSV tedavisinde kullanılan, humanize bir mAb olan Palivizumab'tır ve gram-pozitif bir bakteri olan *Bacillus anthracis* toksinine (protektif antijen) karşı geliştirilmiş, Raxibacumab'tır (14,64-66). Mikrobiyal hastalıkların tedavisinde mAb'ların kullanımının kısıtlı olmasının sebepleri arasında, serum tedavilerinin günümüzde halen kullanılıyor olması ve antimikrobiyal ilaçların daha düşük maliyetlerle üretiliyor olması sayılabilir. Günümüzde, mikrobiyal hastalıklar için mAb geliştirilmesinin önündeki en önemli engel ekonomik sebeplerdir. Bir mikrobiyal hastalık için etkin bir mAb kokteylinin hazırlanması yüksek maliyetli ve uzmanlık isteyen bir teknoloji gerektirmektedir (67). Tüm bunlara rağmen, dünya genelinde antibiyotik direncinin ortaya çıkması, viral enfeksiyonlarda tedavi seçeneklerinin kısıtlı olması, yeni/yeniden ortaya çıkan ve tedavisi olmayan mikrobiyal hastalıkların toplum sağlığını tehdit etmesi, araştırmacıları mAb tedavileri üzerinde çalışmaya yöneltmiştir. Ayrıca immunokonjugatların ve radyoimmunotdavilerin de mikrobiyal hastalıklarla mücadelede mAb'lar için yeni bir adım olmuştur (66,67).

Virüsleri nötralize edebilecek antikoların geliştirilmesi de, viral hastalıklarla mücadele için koruyucu aşılarda geliştirilmesi açısından son derece önemlidir. Palivizumab ve Raxibacumab'ın geliştirilmesinin ardından pek çok mikrobiyal ve viral hastalık için monoklonal antikor geliştirme çalışmaları başlamıştır. Yine *B.Anthraxis* sporlarına karşı geliştirilmiş Obiltoxaximab'da 2016 yılında onay almıştır. Pek çok viral hastalık için de geliştirilen monoklonal antikolar faz 2 ve faz 3 aşamasına gelmiştir (67). KKKAH virüsü yapısal glikoproteinleri olan Gn ve Gc'ye karşı oluşan antikoların koruyucu ve virüsü nötralize edici antikolar olduğu bilinmektedir (25). Aynı zamanda KKKAH virüsü NP'ye karşı oluşan antikoların ise nötralizan aktiviteye sahip olmadıkları saptanmıştır. Tez projesi kapsamında KKKAH virüsünü nötralize

edebilecek mAb'ların geliştirilmesi amaçlanmıştır. Daha önceki çalışmalarda KKKAH virüsüne karşı elde edilen hibridomaların test edilmesinde proje kapsamında 3 farklı metot kullanılmıştır. Tarama testi olarak IFA testi kullanılmıştır. Bir başka deyişle hibridomaların KKKAH virüsüne spesifik antikor salgılayıp salgılamadıkları IFA testi ile analiz edilmiştir. IFA testi ile KKKAH virüsüne özgül antikor salgıladığı belirlenen hibridomalardan, NP'ye karşı oluşanlarının belirlenip ayıklanması için Western Blot testi yapılmıştır (Şekil 10, 11, 12). Çünkü, KKKAH virüsü NP antijenine karşı oluşan antikorlar Western Blot deneyinde yaklaşık 55 kDa büyüklükte bant vermektedirler. Bunun yanında KKKAH virüsün glikoproteinlerine karşı oluşan mAb'ların ancak lineer epitopuna özgül olanları Western Blotlama ile KKKAH virüsü glikoproteinlerine karşı spesifik bant oluşturmaları beklenmektedir. Böylece, Western Blot testi ile NP'ye özgü mAb'lar ayıklanırken aynı zamanda KKKAH virüsü glikoproteinleri lineer epitoplarına karşı oluşan mAb'ların belirlenmesi de amaçlanmıştır. Bununla birlikte viral glikoproteinlere özgü oluşan mAb'ların büyük çoğunluğu konformasyonel epitoplara karşı geliştiği için IFA testi sonucu pozitif, Western Blot analizi neticesinde negatif sonuç veren klonlar, KKKAH virüsü glikoproteinlerine karşı oluşmuş potansiyel mAb'lar olarak değerlendirilmiştir.

Proje kapsamında hibridomaların test edilmesinde kullanılan üçüncü test olan ELISA testi glikoproteinlerin seleksiyonundan ziyade KKKAH virüsüne karşı salgılanan antikorların diagnostik amaçla kullanılma potansiyeli açısından değerlendirilmiştir (Şekil 13, 16, 20, Tablo 3).

Tez projesi kapsamında test edilen hibridomalardan 9D2 klonunun ürettiği monoklonal antikor 160-260 kDa arasında çift bant, 13D12 klonu yine aynı aralıkta tek bant, 13A1 klonu 100-150 kDa arasında tek bant göstermiştir (Şekil 19). Virüsün bu büyüklükte bilinen proteinleri yoktur. Ancak IFA deneyinde pozitif sonuç vermiş olması virüse spesifik olduğunu göstermektedir. Bu antikorların virüsün yapısının anlaşılmasında faydalı olabileceği düşünülmüş, nötralizan etki gösterip göstermediği test edilmek istenmiştir. Ancak 2 klonda limiting dilüsyon işlemine alınamadan antikor sentezleme yeteneğini kaybetmiştir.

Western Blot ile test edilen klonlardan 9E11 ve 11H4 KKKAH virüsü glikoproteinleri lineer epitoplarına karşı olduğu anlaşılmaktadır (Şekil 10). 9E11 klonunun ürettiği mAb yaklaşık 80kDa büyüklüğünde ve 11H4 klonunun ürettiği mAb'da 40 kDa

büyükliğüde tek bant göstermektedir. Bu mAb'ların virüsün 80 kDa büyüklüğünde PreGc ve ortalama 37 kDa büyüklüğünde Gn glikoproteinlerinin lineer epitoplarına karşı oldukları düşünülmüştür. Ancak bu klonlarda stabilitelelerini koruyamamış ve antikor sentezleme yeteneklerini kaybettikleri görülmüştür. Dolayısıyla nötralizan etkileri araştırılamamıştır.

Tez projesi kapsamında incelenen 70 hibridoma klonundan sadece 2 tanesi stabil kalmış ve bu klonlardan antikor üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu klonlar 8H3 ve 3F2 klonlarıdır. Elde edilen diğer hibridomaların stabilitesinin yapılan çalışmada oldukça düşük olduğu belirlenmiştir. Hibridomalar, B-lenfositler ve myeloma hücrelerinin birleştirilmesiyle elde edilmekte, dolayısıyla elde edilen bu hibrit hücreler füzyon işlemi ardından tetraploid yapıya sahip olmaktadır ve bu durum sonucunda hibridomalar kromozom kaybedebilmektedir. Bu sebeple klonlar antikor sentezleme yeteneklerini bir başka deyişle stabilitelelerini kaybedebilmektedirler (8, 64).

Seçilen füzyon partneri hücrelerin de stabilizeyi etkilediği düşünülmektedir. Bu çalışmada kullanılan Ag8 myeloma hücrelerinin füzyon sonrası oluşan hibrit hücrelerin stabilitesi konusunda iyi bir füzyon partneri olmadığı anlaşılmaktadır. Farklı füzyon partneri hücrelerin kullanılmasının stabilitenin arttırılması konusunda çözüm olabileceği düşünülmektedir. Hibridomaların stabilitelelerini etkileyen bir başka faktör, hibridoma kültürlerinin son derece kırılgan olmalarıdır. Hibridomaların stabilitesini, kültür koşulları, ortamın pH'sı, çözünmüş oksijen oranı, metabolik atık birikimi ve uzun süre pasajlamalar etkilemektedir. Ozturk ve ark. uzun süreli kültürlerde antikor üretiminin düştüğünü, antikor salgılama yeteneğini kaybetmiş hücrelerin kültürde çoğalmasıyla da antikor üretim veriminin düştüğü ve özellikle düşük serum oranının hibridoma stabilitesi olumsuz olarak etkilediği belirtilmiştir (65).

Stabil olduğu belirlenen 8H3 ve 3F2 klonlarından 8H3H5F8E8, 8H3H5F8F8, 3F2G8H4 ve 3F2E10H5 seçilen 4 alt klon döner şişe hücre kültürü sisteminde 500 ml ölçekte mAb üretimi gerçekleştirilmiş ve elde edilen antikorlar pürifiye edilmiştir. 8H3H5F8E8 ve 8H3H5F8F8 klonlarının ürettikleri mAb'ların Western blot deneyinde negatif (Şekil 14), IFA (Şekil 15) ve ELISA'da (Şekil 13) pozitif sonuç verdikleri görülürken, 3F2G8H4 ve 3F2E10H5 klonlarının ürettikleri mAb'lar ELISA (Şekil 16) ve Western Blot deneylerinde (Şekil 17) negatif, IFA'da (Şekil 18) pozitif sonuç vermiştir. IFA deneyinde pozitif sonuç veriyor olması elde edilmiş olan 8H3 ve 3F2

klonları ve alt klonlarının, virüse spesifik olduğunu göstermektedir. Western Blot deneyinde olduğu gibi, ELISA deneylerinde de antijenin pleyte bağlanması aşamasında kullanılan karbonat tamponunun 9,6 pH değerinde olmasının da virüsün konformasyonel epitoplarında değişikliklere sebep olabileceği düşünülmektedir. Bu sebeple monoklonal antikorların IFA'da pozitif ancak ELISA'da negatif sonuç verebilirler. Nitekim tez projesi kapsamında elde edilen 8H3 klonları ELISA pozitif sonuç verirken 3F2 klonları negatif sonuç vermiştir.

8H3 ve 3F2 monoklonal antikorları pürifiye edildikten sonra immunoglobulin alt sınıfları belirlenmiştir. 3F2G8H4 alt klonu IgM diğer klonlar ise IgG2a türünde antikor üretmektedir (Şekil 24). Aynı zamanda pürifiye edilen monoklonal antikora yapılan SDS-PAGE (Şekil 23) sonucunda da 50 kDa'da ağır zincire ait ve 25 kDa da hafif zincire ait bantlar görülmüştür. Başka bant görülmemesi aynı zamanda pürifikasyonun etkin şekilde gerçekleştiğini de göstermektedir.

Pürifiye antikorların nötralizan etkilerinin araştırılması amacıyla nötralizasyon deneyleri yapılmıştır. Yapılan deneyde mAb'ların 1/10, 1/20 ve 1/40 dilüsyonları hazırlanmış ve üzerine 110 PFU sabit olacak şekilde virüs geçilmiştir. Nötralizasyon deneyi sonucunda 3F2 klonlarının *in vitro* olarak herhangi bir nötralizan etkisinin olmadığı bulunmuştur. Aynı şekilde, 8H3H5F8F8 klonu da nötralizan etki göstermezken, 8H3H5F8E8 klonunda yaklaşık %28 nötralizan etki saptanmıştır (Şekil 25). Berlotti-Ciarlet ve ark., KKAH virüsün Gn ve Gc glikoproteinlerine karşı geliştirdikleri mAb'lar için *in vitro* nötralizasyon testlerinin yanı sıra *in vivo* koruyuculuk testleri yapmışlardır. Berlotti-Ciarlet ve ark.'ın yaptıkları çalışmanın sonucunda Gc'ye karşı geliştirilen mAb'ların nötralizan etkiye sahip oldukları, Gn'e karşı geliştirilen mAb'ların ise *in vitro* sistemde nötralizan etki göstermediği görülmüştür. Ancak aynı çalışmada gerçekleştirilen *in vivo* koruyuculuk testlerinde Gc'ye karşı geliştirilen mAb'ların aksine Gn'e karşı geliştirilen mAb'ların fareleri öldürücü dozdan koruduğu saptanmıştır (25). 8H3H5F8E8'de düşük düzeyde bir nötralizan etki görülmüş olması klonun Gc glikoproteinine karşı mAb üretiyor olabileceğini, yine diğer klonların *in vitro* da nötralizan etki göstermiyor olmaları virüsün zarf glikoproteinleri dışındaki bazı glikoproteinlere karşı geliştirilmiş olabileceğinin yanı sıra Gn'e karşı olabileceğini düşündürmektedir. Tez projesi kapsamında elde edilen mAb'ların virüsün hangi glikoproteinine yönelik olduğunun

belirlenmesi için epitop haritalama yapılması gerekmektedir. Ayrıca, gelecekte bu antikorlar için uygun fare modeli ile koruyuculuk çalışmalarının yapılması planlanmaktadır. Pelegrin ve ark. mAb'ların sadece virüs nötralizasyonunda değil aynı zamanda farklı immün mekanizmaları aktive ederek enfeksiyonu durdurmada rol oynadığını ortaya koymuşlardır (65). Bu durum mAb'ların nötralizan etkileri olmasa dahi *in vivo* koruyuculuk sağlayabileceğini desteklemektedir.

Ülkemizde, son 15 yıldır bildirilen ve dünyanın en büyük KKKAH salgınları şeklinde seyreden hastalık günümüzde önemli halk sağlığı sorunlarından biridir. Spesifik bir tedavisi olmayan KKKAH karşı yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi oldukça önem taşımaktadır. Bu çalışmada stabil olduğu belirlenmiş ve nötralizan aktiviteye sahip olan mAb'ların elde edilmesine çalışılmıştır. KKKAH tedavisinde kullanılabilecek nötralizan özellikteki terapötik mAb'ların geliştirilmesini sağlayacak ilk verilerin elde edilmesi açısından önem taşımaktadır. Sonraki çalışmalarda elde edilecek nötralizan özellikteki diğer mAb'larla birlikte gerek hayvan denemeleri gerekse de gönüllü insanlarda faz çalışmaları yapılarak elde edilen ürün/ürünlerin pratikte KKKAH'nin tedavisi amacıyla kullanılması söz konusu olabilecektir.

6. KAYNAKLAR

1. Yamada T. Therapeutic Monoclonal Antibodies. Keio J Med 2011; 60 (2) : 37-46.
2. Web 2 (2015), Antibody Society Web site, http://www.antibodysociety.org/news/approved_mabs.php (25.08.2015).
3. Breedveld FC. Therapeutic monoclonal antibodies. Lancet 2000; 355: 735-40.
4. Saylor C, Dadachova E, Casadevall A. Monoclonal antibody-based therapies for microbial disease. Vaccine 2009; G38-G46.
5. Berber E, Çanakoğlu N, Yörük MD, et al. Application of the pseudo-plaque assay for detection and titration of Crimean-Congo hemorrhagic fever virüs. J Virol Methods 2013; 187:26-31.
6. Ergonul O. Crimean-Congo haemorrhagic fever. Lancet Infect Dis 2006; 6(4): 203-214.
7. Morikawa S, Saijo M, Kurane I. Recent Progress in molecular biology of Crimean-Congo hemorrhagic fever. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2013; 30: 375-389.
8. Kessler N, Bertrand S, Aymard M. Stability of murine hybridoma is dependent on the clonal line and culture media. In Vitro Cell Dev. Biol. 1993;29A: 203-207.
9. Whitehouse CA. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever. Antiviral Res 2004; 64:145-160.
10. Connolly-Andersen AM, Moll G, Andersson C, Åkerström S, et al. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Activates Endothelial Cells. J Virol 2011; 85: 7766-7774.
11. Özdamar A, Çanakoğlu N, Berber E et al. The complete genome analysis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus isolated in Turkey. Virus Res 2010; 147: 288-293.

12. Berber E. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığına Karşı Koruyucu Aşı Geliştirilmesi. Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2014: 5-49.
13. Andersson I, Simon M, Lundkvist A, 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: 83–93.
14. Andersson I, Bladh L, Mousavi-Jazi M, Magnusson KE, Lundkvist A, Haller O, et al. Human MxA protein inhibits the replication of Crimean–Congo hemorrhagic fever virus. *J Virol* 2004;78(8):4323–9.
15. Vincet, M.J., Sanchez, A.J., Erickson, B.R, et al. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Glycoprotein Proteolytic Processing by Subtilase SKI-1, *J Virol* 2003; 77:8640-8649.
16. Bente DA, Forrester NL, Watts DM, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever: History, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity. *Antiviral Res* 2013; 100 : 159-189.
17. Goedhals D, Bester PA, Paweska JT, Swanepoel R, Burt FJ. Comparative Analysis of the L, M and S RNA Segments of Crimean-Congo Haemorrhagic Fever Virus Isolates From Southern Africa. *J Med Virol* 2015; 87:717-724.
18. Bergeron É, 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: 13271-13276.
19. Sanchez AJ, Vincent MJ, Nichol ST. Characterization of the Glycoproteins of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. *J Virol* 2002; 76 : 7263-7275.
20. Bergeron É, Zivcec M, Chakrabarti AK, et al. Recovery of Recombinant Crimean Congo Hemorrhagic Fever Virus Reveals a Function for Non-structural Glycoproteins Cleavage by Furin. *PLoS Pathog* 2015; 1-19.
21. Erickson BR, Deyde V, Sanches AJ, Vincent MJ, Nichol ST. N-linked glycosylation of Gn (but not Gc) is important for Crimean Congo hemorrhagic fever virus glycoprotein localization and transport. *Virology* 2007; 361: 348-355.

22. Ahmed AA, McFalls JM, Hoffmann C, et al. Presence of broadly reactive and group-specific neutralizing epitopes on newly described isolates of *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus*. J Gen Virol 2005; 86 : 3327-3336.
23. 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 : 6632-6642.
24. Kortekaas J, Vloet RPM, McAuley AJ, et al. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Subunit Vaccines Induce High Levels of Neutralizing Antibodies but No Protection in STAT1 Knockout Mice. Vector Borne Zoonotic Dis 2015; 15 : 759-764.
25. 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: 6152–6161.
26. Zivcec M, Scholte FEM, Spiropoulou CF, Spengler JR, Bergeron É. Molecular Insights into Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. Viruses 2016; 8: 1-21.
27. Sanchez AJ, Vincent MJ, Erickson BR, Nichol ST. 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 Methods 2006; 80: 514-525.
28. Haferkamp S, Fernando L, Schwarz TF, Feldman H, Flick R. Intracellular Localization of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever (CCHF) virus Glycoproteins. Virol J 2005 ;2:4.
29. Bridgen A, Weber F, Fazakerley JK, et al. Bunyamwera bunyavirus nonstructural protein NSs is a nonessential gene product that contributes to viral pathogenesis. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98(2): 664-669.
30. Bouloy M, Flick R. Reverse genetics technology for Rift Valley fever virus: current and future applications for the development of therapeutics and vaccines. Antiviral Res 2009; 84(2): 101–118.
31. 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 :210-215.

32. Devignot S, Bergeron E, Nichol S, Mirazimi A, Weber FA. Virus-like particle system identifies the endonuclease domain of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J Virol*, 2015; 89: 5957–5967.
33. Connolly-Andersen AM, Magnusson KE, Mirazimi A, Basolateral entry and release of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in polarized MDCK-1 cells. *J Virol* 2007; 81: 2158–2164.
34. Aslam S, Latif MS, Daud M, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever: Risk factors and control measures for the infection abatement. *Biomedical Reports* 2016; 4 : 15-20.
35. Karti SS, Odabası Z, Korten V, et al. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Turkey. *Emerg Infect Dis* 2004; 10(8): 1379-1384.
36. Aker S, Akıncı H, Kılıçoğlu C, Leblebicioğlu H. The geographic distribution of cases of Crimean- Congo hemorrhagic fever: Kastamonu, Turkey. *Ticks and Tick-borne Dis* 2015; 2-7.
37. Ergonul O. Treatment of Crimean-Congo Hemorrhagic fever. *Antiviral Research* 2007; 78 : 125-131.
38. Canakoğlu, N., Berber, E., Tonbak, S., et al. Immunization of Knock-Out α/β Interferon Receptor Mice against High Lethal Dose of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus with a Cell Culture Based Vaccine, *Plos Neg An Trop Dis* 2015.
39. Ergonul O, Tuncbilek S, Baykam N, Celikbas A, Dokuzoguz B. Evaluation of serum levels of interleukin (IL)-6, IL-10, and tumor necrosis factor-alpha in patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 2006; 193: 941-4.
40. Drosten C, Götting S, Schilling S, et al. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 2002;40(7):2323-2330.
41. Keshtkar-Jahromi M, Kuhn JH, Christova I, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever: Current and future prospects of vaccines and therapies. *Antiviral Research* 2011; 90: 85-92.
42. Türk Tabipleri Birliği, Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Bilimsel Değerlendirme Raporu, TTB ISBN 978-605-5867-30-0, Ankara, 2010: 7-38.

43. 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.
44. Kamboj A, Pathak H, Crimean-Congo hemorrhagic fever: a comprehensive review. *Veterinary World* 2013, 6 (10): 812-817.
45. Saluzzo JF, Le B, Rapid diagnosis of human Crimean-Congo hemorrhagic fever and detection of the virus in naturally infected ticks. *J Clin Microbiol* 1987;25(5):922-4.
46. Mourya DT, Yadav PG, Shete AM, et al. Detection, isolation and confirmation of Crimen-Congo hemorrhagic fever virus in human, ticks and animals. *Plos Neg An Trop Dis* 2012; 6(5):1653.
47. Cagatay A, Kapmaz M, Karadeniz A, et al. Hemophagocytosis in patient with Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in human, ticks and aanimals. *J Med Virol* 2007; 56: 1126-1128.
48. 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(2):154-9.
49. Çanakoğlu N. Kırım Kongo Hemorajik Ateşi Virüsü Enfeksiyonuna Karşı Serolojik Teşhis Yöntemleri Geliştirilmesi. Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2012: 1-25.
50. Burt FJ, Leman PA, Smith JF, Swanepoel R. The use of a reverse transcription polymerase chain reaction for the detection of viral nucleic acid in the diagnosis of Crimean-Congo haemorrhagic fever. *J Virol Methods* 1998; 70(2): 129-37.
51. Bodur H, Erbay A, Akıncı E, et al. Effect of ribavirin treatment on the viral load and disease progression in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *International J Infect Dis* 2011; 15; 44-47.
52. Oestereich L, Rieger T, Neumann M, et al. Evaluation of Antiviral Efficacy of Ribavirin, Arbidol, and T-705 (Favipiravir) in a Mouse Model for Crimean-Congo Hemorrhagic Fever. *Plos Neg Trop Dis* 2014; 8(5): e2804.

53. Bente DA, Alimonti JB, Shieh W, et al. Pathogenesis and Immune Response of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in STAT-1 Knockout Mouse Model. *J Virol* 2010; 84 (21): 11089-11100.
54. Bereczky S, Lindegren G, Karlberg H, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever virüs infection is lethal for adult type 1 interferon receptor-knockout mice. *J Gen Virol* 2010; 91: 1473-1477.
55. Buttigieg KR, Dowall SD, Findlay-Wilson S, et al. A Novel Vaccine against Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Protectes 100% of Animals against Lethal Challenge in a Mouse Model. *Plos One* 2014; 9 (3): e91516.
56. Messina JP, Pigott DM, Golding N, et al. The global distribution of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2015; 109: 503–513.
57. Ser Ö, Çetin H. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi'nin güncel durumu. *TAF Prev Med Bull* 2016; 15 (1): 58-68.
58. Moran G, Talan DA, Abrahamian FM. Biological Terrorism. *Infect Dis Clin North Am* 2008; 22 (1): 145-187.
59. Erdem H, Akova M. Leading infectious diseases problems in Turkey. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18 (11): 1056-1067.
60. Ser Ö, Çetin H. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi'nin güncel durumu. *TAF Prev Med Bull* 2016; 15 (1): 58-68.
61. Ozsoy S, Gokmen A, Ozdemir M, et al. Medical examiners and Crimean-Congo hemorrhagic fever contamination risk. *J Forensic Leg Med* 2015; 36: 32-36.
62. Ceylan B, Calica A, Ak O, Akkoyunlu Y, Turhan V. Ribavirin is not effective against Crimean-Congo hemorrhagic fever: observations from the Turkish experience. *International Journal of Infectious Diseases* 2013; 17: e799-e801.
63. Cevik MA, Erbay A, Bodur H, et al. Viral load as a predictor of outcome in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Clin Infect Dis*, 2007; 45: e96e100.

64. Rosa EA, Lanza SR, Zanetti CR, Pinto AR. Immunophenotyping of Classic Murine Myeloma Cell Lines Used for Monoclonal Antibody Production. *Hybridoma* 2012; 31(1) : 1-5.
65. Ozturk SS, Palsson BØ. Loss of Antibody Productivity During Long-Term Cultivation of a Hybridoma Cell Line in Low Serum and Serum-Free media. *Hybridoma* 1990; 9(2) : 167-175.
66. Reichert JM. Antibodies watch in 2016. *MABS* 2016; 0: 1-8.
67. Pelegrin M, Naranjo-Gomez M, Piechaczyk M. Antiviral Monoclonal Antibodies : Can They be More Than Simple Neutralizing Agents?. *Trends in Microbiology* 2015 :23 (10) ; 653-665.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Duygu Merve ÇALIŞKAN

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 19 Ekim 1990, Edirne

Medeni Durumu: Bekâr

Tel: 05071129747

email: d.merve.caliskan@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	Amasya Anadolu Öğretmen Lisesi, Amasya	2008

DENEYİMLER

Yıl	Kurum	Görev
-----	-------	-------

2009-2011	Ege Üniversitesi Yüzey Modifikasyon Laboratuvarı	Stajyer
Haziran-Temmuz 2012	Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Genetik Laboratuvarı	Stajyer
2014-Halen	Erciyes Üniversitesi, Aşı Araştırma ve Geliştirme Merkezi (ERAGEM)	Bursiyer Öğrenci

YABANCI DİL

İngilizce, Almanca

YAYINLAR

1. Çalışkan, D.M., Özen, M.Ö., Gürhan, S.İ., , Characterization of Hybridoma (Poster), International Biomedical Engineering Congress 2015, North Cyprus.
2. Berber, E., Çanakoğlu, N., Sözdutmaz, I., Çalışkan, M., Özdarendeli, A., Investigation of IFN- γ Response to the Inactivated Vaccine developed against Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus (Poster), 9th Vaccine & ISV Congress 2015, Korea.