

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ
SONUÇ RAPORU

Proje Başlığı

Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Virusuna Karşı Monoklonal Antikor Üretimi ve
Karakterizasyonu

Proje Yürütücüsünün İsmi

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Araştırmacıların İsmi

Alireza HANİFEHNEZHAD

Proje Numarası

18L0239020

Bařlama Tarihi

13.12.2018

Bitiř Tarihi

13.12.2020

Rapor Tarihi

23.04.2021

Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Ankara - " 2021 "

I. Projenin Türkçe İngilizce Adı ve Özetleri

Türkçe Adı:

Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Virusuna Karşı Monoklonal Antikor Üretimi ve Karakterizasyonu

Kırım Kongo kanamalı ateş virusu (KKKAV), insanlarda ciddi hemorajik ateş hastalığına neden olabilen ve yüksek mortalite ve bulaşma hızı ve geniş coğrafi dağılımı nedeniyle halk sağlığı için büyük bir tehdit oluşturan kene kaynaklı bir virustur. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA), Afrika, Ortadoğu, Doğu Avrupa ve Asya'daki birçok ülkede endemik olan ağır bir kene hastalığıdır. Şu anda KKKA'ya karşı onaylı bir aşı bulunmamaktadır ve spesifik bir antiviral tedavi mevcut değildir. Çalışma kapsamında KKKAV'nun olabilecek tüm immunojen bileşenlerine karşı monoklonal antikor üretilmesi ve karakterizasyonun yapılması gerçekleştirilecektir. Böylelikle çok farklı amaçlarla (tamsal, terapötik, pasif profilaktik) kullanım olasılığı olabilecek biyolojik maddelerin üretilmesine çalışılacaktır.

Anahtar Kelimeler: Kırım Kongo kanamalı ateş virusu, monoklonal antikor

İngilizce Adı:

Production and Characterization of Monoclonal Antibody against Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus

Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV) is a tick-borne virus capable of causing a severe hemorrhagic fever disease in humans and poses a great threat to public health due to its high mortality and transmission rate and wide geographical distribution. Crimean-Congo Haemorrhagic Fever (CCHF) is a severe tick-borne disease, endemic in many countries in Africa, the Middle East, Eastern Europe and Asia. There is no approved vaccine currently available against CCHF and there is currently no specific antiviral therapy for CCHF. In scope of our study, production and characterization of monoclonal antibodies against all possible immunogenic components of CCHFV will be performed. Given the circumstances, we will try to produce biological substances that can be used for a variety of purposes including diagnostic, therapeutic, passive and prophylactic ones.

Keywords: Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Monoclonal antibodies

II.Amaç ve Kapsam

Kırım-Kongo kanamalı ateş hastalığı (KKKAH) yüksek mortaliteye sahip ve zoonoz bir viral enfeksiyondur. Hastalık Afrika, Asya, Doğu Avrupa ve Orta Doğu bölgelerinde görülmektedir. KKKA virüsü, *Bunyaviridae* ailesindeki *Nairovirus* cinsine aittir ve insanlarda ciddi bir hastalığa neden olmakta ve mortalite oranı % 5-30 arasında değişilmektedir. İnsanlara virus kenelerin ısırması, enfeksiyonun akut fazında KKKA taşıyan bir hasta ile temasa geçerek veya viremi aşamasında olan hayvanlardan alınan kan veya dokular ile temas ederek bulaşmaktadır. KKKA'nın yaygın coğrafi dağılımı, yüksek mortalitede seyretmesi, şiddetli insan hastalığı oluşturma kabiliyeti ve bir biyoterörizm ajan olarak bilinmesi endişeler yaratmakla beraber, KKKA'ı önemli bir insan patojeni olarak sunmaktadır. Ayrıca, vektör kaynaklı hastalıkların ekolojik karmaşıklığı, terapötik tartışmalar ve zoonotik bir enfeksiyonun insandan insana bulaştırılması onu son derece önemli ve ilgi çekici bir araştırma konusu haline getirmektedir (Ergonul, 2012; Bente ve ark., 2013; Estrada-Pena ve ark., 2015; Papa ve ark., 2016).

ABD Ulusal Sağlık Enstitüsüne bağlı Allerji ve Enfeksiyon Hastalıkları Enstitüsüne göre hemorajik ateş virusleri Kategori A biyoterörizm ajanları olarak sınıflandırılmaktadır. Bunlar arasında arenaviruslar (Junivirus, Machupovirus, Guanarivirus, and Lassa fever virus) bunyaviruslar (Hantaviruslar ve Rift Vadisi ateşi), flaviviruslar (Dengue) ve filoviruslar (Ebola ve Marburg) bulunmaktadır. Bununla birlikte, KKKA'ı şu anda Kategori C'de yer almaktadır (CDC, 2005).

Etken *Bunyaviridae* ailesine mensup *Nairovirus* genusu içerisinde yer alan tek iplikli, negatif polariteli, üç segmentli RNA virusudur. Virus doğada kene-omurgalı-kene siklusuyla sirküle olmaktadır (Ergonul, 2012). Çok sayıda ixodid kene türünden virus izole edilmesine karşın *Hyalomma* spp. keneler virusun asıl vektörü ve rezervuarı konumundadır. Enfeksiyon sıklıkla virus ile enfekte kenelerin ısırması, çıplak elle ezilmeleri, virus ile enfekte akut fazdaki hastalarla temas ya da viremik fazdaki hayvanların kan ve dokuları ile olan temaslara gerçekleşmektedir (Nabet ve ark., 2004).

Nairovirüs genusunda yedi serogrup bulunmaktadır ve hepsinin ixodid ve argasid keneler tarafından taşındığı bilinmektedir. En önemli serogrup KKKAHV ve Hazara virüsün yer aldığı Kırım-Kongo kanamalı ateşi (KKKA) grubu ile Nairobi koyun hastalığı (NSD) virüsü ve Dugbe virüsün yer aldığı Nairobi koyun hastalığı virüs serogruplarıdır. Nairovirüs genusu içerisinde KKKAH virüsü, Dugbe virüsü ve Nairobi koyun hastalığı virüsü insanlarda hastalık oluşturan önemli viral etkenlerdir. Bu aile içerisindeki virüsler; ensefalit, kanamalı ateş ve kardiyopulmoner sendrom gibi önemli zoonoz hastalıklara neden olmaktadır. Serolojik yöntemler kullanarak, çeşitli coğrafi bölgelere ait

KKKAV'nun, başlangıçta çok benzer oldukları ancak nükleik asit sekans analiz tekniklerinin geliştirilmesi, kapsamlı genetik çeşitliliği ortaya çıkarmaktadır. Nükleik asit sekansı analizlerinin çoğunluğu S-segment RNA fragmanlarına dayanmaktadır; Ancak, yakın geçmişte bütün genom analizleri çeşitli suşlar üzerinde gerçekleştirilmiştir. Salgılardan sorumlu suşların filogenetik analizi, virüsün bulaşma dinamiğini anlamak için çok önemlidir (Whitehouse., 2004; Hoing ve ark.,2004).

KKKAV enfeksiyonu, kene vektörlerinin olgunlaşmamış aşamaları için konak olarak görev yapan tavşanlar ve kirpi gibi daha küçük vahşi yaşam türleri arasında daha yaygın olmasını gösterilmiştir. Ayrıca, Avrupa, Asya ve Afrika'daki çeşitli bölgelerdeki atların, eşeklerin, keçi, sığır, koyun ve domuzların serumlarında KKKAV'e karşı antikorlar tespit edilmiştir. Kırım-Kongo kanamalı ateşi hastalığının erken teşhis edilmesi, olası tedavi yöntemlerine başlanabilmesi ve kontrol altına alınması açısından çok önemlidir. Hastalığın erken teşhisinde, virüsün belirlenmesine yönelik testler önem arz etmektedir. Bu testler arasında, virüsün izolasyonuna yönelik hücre kültür sistemi, immünohistokimyasal boyamalar ve antijen belirlemeye yönelik enzim immün testler (EIA), tersine transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyon (RT-PCR) gibi testler yer almaktadır. Ayrıca enfeksiyondan ortalama 7 gün sonra KKKAH spesifik immüno globulin M (IgM) ve immüno globulin G(IgG) antikorları enzim ilintili immüno sorbent test (ELISA) ile belirlenebilir düzeye ulaşmaktadır (Ergonul, 2012;Hoing ve ark.,2004).

Hemorajiye ve plazmadan interstisyel bölgeye sıvı kaybına neden olan vasküler disfonksiyon, KKKAH hastalığının belirgin semptomlarıdır. Hastalar, dissemine intravasküler pıhtılaşma (DIC) ile karakterize erken bir hastalık evresindeki anormal pıhtılaşma parametrelerini gösteriyor. Bununla birlikte, vasküler disfonksiyonun doğrudan endotelin viral enfeksiyonu yoluyla mı yoksa dolaşımdaki pro-inflamatuar mediatörlerin etkileri yoluyla dolaylı olarak sağlanıp sağlanmadığı açık değildir(Dowal ve ark., 2017).

Tonbak ve ark. 2006 yılında Kelkit Vadisi olarak adlandırılan bölgede yaptıkları bir çalışmada sığır, koyun ve keçilerden elde ettikleri çok sayıda kenelerden virüs izolasyonu yapmışlardır. Virüs nükleoprotein gen bölgesine ait 212 bazlık kısmi parçanın filogenetik analiz sonucuna göre; Türkiye'deki KKKAH vakalarına sebep olan virusun Grup V içerisinde yer alan Kosova, Bulgaristan ve Rusya suşlarına genetik olarak yakın olduğunu göstermişlerdir (Tonbak ve ark., 2006).

RNA genomu segmentli ve negatif anlamlı olup küçük (S), orta (M) ve büyük (L) olarak üçe ayrılmaktadır. L-RNA segmenti viral RNA polimerazı, M-RNA segmenti Gc ve Gn glikoproteinlerini, S-RNA segmenti ise Nükleoprotein yapısını (NP) kodlamaktadır. Gc ve Gn glikoproteinleri virüse duyarlı hücrelerin üzerinde bulunan reseptörlerin tanınmasından sorumludur

(Whitehouse ve ark., 2004; Flik, 2007). KKKK nedenini ile de ölen hastalarda antikor yanıtının yetersiz olduğu bildirilmektedir (Peters ve ark., 2002). Ölümcül olgularda, inflamatuvar mediatörler önemli rol oynamaktadır (Ardalan ve ark., 2006). İnterlökin-6 (IL-6), IL-10, IL-12 ve tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) gibi sitokinlerin KKKK nedeniyle ölen hastalarda yaşayan hastalara göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Bino., 2006). KKKK'da virüsün esas hedef hücreleri monositler, endotel hücreler ve hepatositlerdir. Şu anda, KKKK hastalarının tedavisinde kullanılabilecek profilaktik ve terapötik seçenekler, tarihi meta analizlerde açık klinik yarar sağlamayan antiviral ilaç ribavirinin verilmesiyle sınırlıdır (Koksal ve ark., 2010; SoaresWeiser ve ark., 2010; Duygu ve ark., 2012).

KKKAV glikoproteinleri, olağandışı yapısal özelliklere sahiptir ve çeşitli işleme olaylarına maruz kalmaktadırlar. Birincisi, KKKAV glikoproteinleri, ortalama olarak, 78-80 sistein kalıntısı içerir ve bu da son derece fazla sayıda disülfür bağı ve kompleks bir sekonder yapı bulunduğunu gösterir. İkincisi, GN prekürsör (precursor) proteini (Pre-GN) amino terminalinde yüksek oranda serin, treonin ve prolin artıkları içeren oldukça değişken bir alan içermektedir ve ağır şekilde O-glikozile (heavily O glycosylated), edilmiş olduğu ve böylece diğer viral glikoproteinlerde en önemlisi Ebola virüsü glikoproteininde bulunan bir musin-like alana benzediği tahmin edilmektedir (Simmons ve ark., 2002). Ebola glikoproteininde musin-like bölge, hücre yuvarlama fenotipinde ve bağışıklık kazandırma için önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Nabel., 1999; simmons ve ark., 2002). Bu alanın, KKKAV patogeneğinde önemli bir rol oynayıp oynamadığı veya O'nun glikozile edilmiş olup olmadığı bilinmemektedir. GN glikoproteininin, muhtemelen musin-like alanı ve yaklaşık 35 kDa'lık ikinci bir N-terminal alanını (P35 ya da bağlayıcı alanını) serbest bırakan korunan RSKR ve RLLL motiflerinde iki posttranslasyonel proteolitik bölünme olayından geçebilir. Serbest bırakılan alanların salgılandığı takdirde bir hücre içi bölmeye giden yolda viral patojenez ve antijenik yapı üzerindeki etkileri bilinmiyor. Nairovirüs grubunun dışındaki diğer Bunyaviridae'ler için de benzer işleme stratejileri gözlenmemiştir (Vincent ve ark., 2003).

Viral olarak kodlanmış membran proteinleri GN ve GC, hücre yüzeyi reseptörleri ile etkileşime girmekte ve virüsün hücrelere girmesine aracılık eder ve antikorları nötralize etmek için hedefler olarak görev yapmaktadır ve iyileşmekte olan insan serumunun akut enfekte bireylerde bir miktar koruma sağlayabileceğine dair bir rapor vardır. Böylece, bu proteinlerin yapı ve işlevlerinin karakterize edilmesi KKKAV tropizmi ve patogenezinin yanı sıra aşı gelişimini anlamak için önemlidir (Simmons ve ark., 2003).

Son yıllarda, birkaç grup, poliklonal veya monoklonal antikörlerin kombinasyonlarının deneysel olarak hemorajik ateş virüsleriyle enfekte olan hayvanlara uygulandığında ölümcül hastalığı önleyebileceğini göstermiştir (Qiu et al., 2014; Cross ve ark., 2016; Zeitlin ve ark., 2016). Antikor tedavisi, insan KKKAV'nin birkaç örneğinde denenmeye çalışılmıştır (Kubar ve ark., 2011; Van Eeden ve ark., 1985). Bu tedavi küçük çalışmalarda ılımlı bir başarı göstermiş ancak etkinliği büyük veya klinik çalışmalarda değerlendirilmemiştir (Canakoglu ve ark., 2015; Dowall ve ark., 2016). Fare çalışmaları, tam Glikoprotein öncüsü olarak ifade edilen KKKAV glikoproteinlerine karşı bağışıklık tepkilerinin koruma için önemliyken, kısmi GPC alt birimlerine karşı bağışıklık yanıtları, ölüm zamanını geciktirmektedir (Kortekaas ve ark., 2015).

Kırım-Kongo kanamalı ateşi virusuna karşı virus-like particle (VLP) kullanarak hazırlanan, glikoprotein Gc'yi hedef alan nötralizan monoklonal antikörlerin, fareleri prototip KKKAV suşu olan IbAr10200'ye karşı koruduğu rapor edilmiştir. Bununla birlikte, KKKAV glikoproteinlerinin geniş dizi çeşitliliğinden dolayı, bu monoklonal antikörlerin diğer KKKAV suşlarını nötralize edip etmediği bilinmemektedir (Zivcec ve ark., 2017).

Bir başka çalışmada fareleri M-segment DNA aşısının kas elektroporasyonu ile aşılması neticesinde IFNAR-/- ve IS (immune-suppressed) C57BL/6 fare modellerinde üç aşılardan sonra nötrleştirici titrelere güçlü antijen spesifik humoral immün yanıtların ortaya çıkması rapor edilmiştir. Bu çalışmada orijinal vahşi tip KKKAV-M aşısına kıyasla, optimize edilmiş KKKAV-M aşısı arasında 2.5-7kat ekspresyon artışı rapor edilmiştir (Garrison ve ark., 2017).

KKKAV M segmenti tarafından kodlanan full-sekans glikoprotein prekürsörüne dayanılarak, KKKAV'a karşı bir MVA-vektörlü aday aşı geliştirilmişlerdir (MVA-GP) ve Kırım Kongo Kanamalı Ateşine Karşı fare modelinde Hayvanların % 100'ünü korumuştur (Buttigieg ve ark., 2014).

Virusun M segmenti, büyük bir glikoprotein öncüsü (GPC: glycoprotein precursor) proteinini kodlar ve yedi proteinden oluşmaktadır, bu proteinler içinde yapısal glikoproteinler Gn ve Gc viriyonun dış yüzeyini oluşturmaktadır. Bu yüzey glikoproteinleri umut verici aşı adayları olarak kabul edilmektedir. Çünkü her ikisi de daha nötralizan antikörlerin hedefi olarak bilinmektedir (Kortekaas ve ark., 2015).

Bilim adamları şimdi hastaların tedavisi için anti-KKKAV monoklonal antikor geliştirmek üzerinde çalışmaktadırlar. Şu anda KKKAV için FDA onaylı bir aşı ya da spesifik antiviral tedavi bulunmamaktadır. KKKAV'un Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından Grup V patojenleri içerisinde

ve risk grubunda sınıflandırılması ve uygun hayvan modellerinin olmaması için yeni profilaktik ve terapötik tedbirlerin geliştirilmesi üzerinde yoğunlaşmıştır. Ribavirin, in vitro olarak KKKAV'e karşı aktiftir, ancak insan tedavisi için etkinliği klinik çalışmalarla kesin olarak gösterilememiştir. KKKAV-immünoglobülin kullanımına ilgili olarak açık bir etkinlik kanıtı bulunmamaktadır (Keshtkar-Jahromi ve ark., 2011). Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) *Bunyvirales* takımı içinde *Nairoviridae* ailesi içinde sınıflandırılan bir Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Ortonairovirüsü (KKKAV) tarafından meydana getirilen, birçok hayvan türünde asemptomatik seyretmesine rağmen insanlarda ölümlerle sonuçlanabilen (%4-30) yaygın koagülopati ve organ yetmezlikleri ile karakterize bir hastalık olarak yılın belli dönemlerinde etkisini hissettirmektedir. Ülkemizin de yer aldığı coğrafyada önemli halk sağlığı sorunlarının başında gelen bu hastalık halen etkin bir tedavi rejimi ve korunmaya yönelik geliştirilmiş bir biyolojik ürün (aşı) olmaması sebebiyle önem arz etmektedir. Hastalık konak hücre ve konak immün sistem üzerindeki etkileşimi ağırlıklı olarak iki yüzey glikoproteini (GPC) olan Gn ve Gc ile virüs nükleik asitini çevreleyen Nükleoprotein (N) aracılığıyla olmaktadır. Yapılan birçok tedavi rejimi ve koruyucu ürün geliştirilmesine ilgili çalışmalar büyük oranda bu yapılar hedeflenerek gerçekleştirilmektedir.

Monoklonal antikorlar (MAb) tek bir B hücre popülasyonu tarafından üretilen, dolayısıyla tek bir protein/peptit spesifitesine sahip olan özel antikorlardır. Dolayısıyla immunojen üzerinde etkin olan farklı domain ve/veya motiflere karşı reaktif olabilme özellikleri vardır. Bu noktadan hareketle MAb'ler tedavi edici, pasif koruyucu ve teşhise yardımcı süreçlerde geniş bir kullanım olasılığına sahip biyolojik moleküller olarak değerlendirilmektedirler.

Bu araştırmada da KKKA virüsünün S ve M segmentleri tarafından kodlanan proteinlerine karşı MAb üretimi amaçlanmıştır. Böyle bir çalışma kapsamında herhangi bir viral epitopa hedeflenmiş (konformasyon bağımlı ya da bağımsız) antikorların elde edilebilmesi mümkündür. Ancak temel hedef öncelikli olarak üretilebilecek antikorların nötralizan fonksiyonlarının olup olmadığını sorgulamak ve bu ana hedef paralelinde çalışma kapsamında elde edilebilecek tüm antikorların ağırlıklı olarak tanısal kullanım olasılıklarının değerlendirilmesi hedeflenmektedir.

III. Materyal ve Yöntem

Biyogüvenlik Bildirisi: Bulaşıcı KKKAV'ü içeren prosedürler, BSL-3+'da standart çalışma prosedürlerine göre yürütüldü ve diğer işlemler BSL-2 koşulları altında gerçekleştirildi. Bu çalışma ile ilgili işlemler *Yüksek Güvenlikli Viral Zoonozlar Tanı, İleri Araştırma (BSL-3)* ve *Hayvan laboratuvarları (ABSL-3)*, Viroloji Anabilim Dalı, Veteriner Fakültesi, Ankara Üniversitesinde yapıldı.

RNA İzolasyonu:

Hücre kültürü yapılan KKKAV virüsü Ank2 izolatından, High Pure Viral RNA Isolation Kiti (Roche Life Science, Almanya) kullanılarak genomik RNA izolasyonu yapıldı. İzolasyon sırasında üretici firma tarafından önerilen basamaklar izlendi.

Virüs gRNA'sından cDNA Sentezi ve hedef genlerin çoğaltılması:

Komplementer DNA (cDNA) sentezi, ThermoScientific RevertAid First Strand cDNA Syntehsis Kit'i kullanılarak yapıldı. Komplementer DNA sentezinde kullanılan reaksiyon karışımları aşağıda verildi;

Tablo 1. 1 KKKAV gRNA'sına ait cDNA sentezi için kullanılan reaksiyon karışımı ve uygulanan ısı döngüleri.

İçerik	Stok	Son Konsantrasyon	Hacim (µl)
Total RNA	340 ng/µl	340 ng/µl	4
Random Hexamer Primer	0.2 µg/ml	0.2 µg/ml	1
Water, nuclease free	—	—	To 12 µl
70°C' de 5 dk. RNA'nın denatürasyonu için inkübe edildi ve hemen buz üstüne alındı.			
Reaction Buffer	5(x)	1(X)	4
dNTPs	10mM	1mM	2
Ribolock RNase Inhibitor	20U/µl	1U	1
RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase	200U/µl	10U	1
25°C' de 10 dk.			
37°C' de 60 dk.			
70°C' de 5 dk.			

Yukarıdaki reaksiyon sonucunda 20µl cDNA sentezlendi. Elde edilen bu DNA daha önce ismarladığımız primer çiftleri ile N ve GPC genlerinin sentezi için kalıp olarak kullanıldı.

Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Virusunun S (Nucleocapsit-N) Segmentini kodlayan İfade**Plazmitinin hazırlanması:**

Virüsün N proteinini kodlayan genin amplifikasyonu amacıyla CLC Main Workbench (Qiagen, Almanya) yazılımı kullanılarak primerler tasarlandı. Bu kapsamda kullanılan primerler aşağıda sunuldu.

F-NC 5'-*Gaat*tcattggaaaacaagatcgagg-3'

R-NC 5'-*Ctc*gagaggaggagaaaagctgaa-3'

Primer sekanslarının 5' uçlarına yerleştirilen ve altı çizili olarak verilen diziler sırasıyla Eco RI ve Xho I restriksiyon enzimleri tanıma sekanslarıdır. pCDNA3.1/*myc-hisA* ökaryotik ifade vektörüne klonlaması için plazmit bu enzimlerle kesildi ve 1500 nükleotid uzunlukta çoğaltılan N (Nucleokapsit) geni bu vektöre klonlandı. Bu konstraktın doğrulaması için restriksiyon kesimi fastdigest XhoI ile yapıldı ve 6700 bp konstrakt jelde görüntüldü. Ayrıca pCDNA3.1 içinde koloni per yapılarak elde edilen DNA yapısı doğrulandı. Elde edilen ve doğrulanan nihai pcDNA-NC farelerin immünizasyonu için üretildi, saflaştırıldı ve endotoksin kontrolü yapılarak farelerin immünizasyonu için hazır hale getirildi.

Tablo 1. 2 KKKAV grNA'sına ait cDNA sentezi için kullanılan reaksiyon karışımı ve uygulanan ısı döngüleri.

İçerik		Hacim (µL)	
dH ₂ O		17,3	
10x PCR buffer (1.5 mM MgCl ₂)		2,5	
KAPA Taq DNA Polymerase B (5U/µL)		0,2	
dNTP (10 mM)		0,5	
Forward primer (10 mM)		1	
Reverse primer (10 mM)		1	
cDNA		2,5	
Basamak	Sıcaklık (°C)	Zaman (sn.)	Döngü Sayısı
İlk denatürasyon	95	180	1 kez
Denatürasyon	95	30	35 kez
Bağlanma	55	30	
Uzama	72	90	
Son Uzama	72	600	1 kez

Stabil olarak N (Nucleocapsit) Proteini ifade eden BHK-21 Hazırlanması:

Farelerden alınan kanların istenilen antijenlere karşı antikor üretim üretmediğini sorgulamak amacıyla KKKAV N proteinini ifade eden BHK-21 hazırlandı. Bu amaçla BHK-21 hücreleri Neomisin rezistans geni ve KKKAV N genini taşıyan plazmit lipofektamin (Thermo Scientific USA) yardımıyla transfekte edildi. Transfeksiyon sonrası BHK-21 hücreleri kültür medyumuna Geneticin (G418) içeren DMEM ile

kültüre edildi. Böylelikle Neomisin rezistan olmayan BHK-21 hücreleri öldürüldü ve rezistan olanların çoğalması sağlandı. Bu hücreler hem farelerde immünizasyon sonrası oluşan bağışık yanıtın ve hem de hybridoma hücrelerinden **KKKAV-N** proteinine karşı antikor üretilmesinin doğrulamasında kullanıldı.

Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Virusunun M (Glikoproteinleri kodlayan - GPC) Segmentini kodlayan İfade Plazmitinin Hazırlanması

Bu amaçla öncelikle M segmenti tarafından kodlanan GPC'nin fare için kodon optimizasyonu (<https://www.idtdna.com/CodonOpt>) yapıldı. Elde edilen nihai sekans, 5' ve 3' uçlarında sırasıyla Kpn I ve Eco RV olacak şekilde ticari olarak sentez ettirildi. Sentezlenen ürün laboratuvarımıza pUC19 plazmiti içinde ulaştırıldı. Daha sonra hedef gen verilen enzimler ile kesilerek aynı enzimlerle açılan pcDNA3.1myc.HisA (ThermoFisher, USA) ifade vektörü içine yerleştirilerek klonlandı. Elde edilen ifade plazmiti (pcDNA3.1_GPC) gerek restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek ve gerekse sekans analizi ile doğrulandı. Pozitif plazmid içeren bakteriler eşit miktarda 50% gliserol da -80°C de muhafaza edildi. Safılaştırılan ve endotoksin kontrolü yapılan plazmitler farelerin bağışıklanması amacıyla kullanıldı.

Farelerin Bağışıklanması

Bu amaçla Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan (HADYEK) izin alındı. Farelerin bağışıklanması anabilim dalı biyogüvenlikli hayvan laboratuvarında gerçekleştirildi. KKKAV'nün gerek N ve gerekse GPC'leri ile bağışıklama yapılacak fare grupları 10 haftalık erkek farelerden oluşturuldu. Her grupta 2 adet fare yer aldı. Farelerin bağışıklanması Velikovsky ve ark (2000)'nın bildirdiği yöntemle göre hazırlanan DNA yapılarının direkt fare dalağına enjekte edilmesi suretiyle gerçekleştirildi. Bu amaçla kullanılan immünizasyon protokolü aşağıda sunuldu.

Tablo 1. 3 Farelerde uygulanan bağışıklama programı

Zaman (Gün)	Adjuvan	İmmünojen (N veya GPC ifade eden plazmit - µg)	Uygulama Yolu
0	Freund's Complete	2	Dalak içi
4	Freund's Incomplete	1	Dalak içi
11	Freund's Incomplete	1	Dalak içi
13	Füzyon		

İmmünizasyonun 12. günü alınan kan serumu örneklerinde immünojene özgül antikor sentezlenip sentezlenmediği immünizasyonda kullanılan viral proteinleri sürekli ifade eden BHK-21 hücrelerinde gerçekleştirilen IIFT ile kontrol edildi. IIFT bilinen yöntemle göre gerçekleştirildi (Aligholipour Farzani ve ark, 2019).

Hibridoma Elde edilmesi

İmmünize edilen farelerin dalaklarının alınmasından 3 gün önce sağlıklı farelerden peritoneal makrofaj hücreleri toplanarak feeder-layer oluşturmak üzere 12- veya 24-gözlü tabletlerde %10 FDS içeren DMEM içinde kültüre edildi. Aynı zaman zarfında füzyon için kullanılacak fare myeloma hattı F0'lar da çözülerek HT besi yerinde 3 gün süreyle kültüre edildi. İmmünizasyonun 13. gününde ötanazi edilen farelere ait dalaklar kapsülaları zarar görmeksizin vücut dışına alındı. Hücre parçalayıcısından (0.4 µm çaplı) geçirilerek dalak hücreleri bireysel olarak ayrıştırıldı. Bir santrifüj tüpünde ve Polietilen glikol varlığında F0 (1 kısım) ve dalak hücreleri (5 kısım) karıştırılarak 2000 rpm'de santrifüj edildi. Hücre peleti daha sonra HAT içeren besi yeri ile resüspanse edilerek kültüre edilen peritoneal makrofaj hücrelerinin üzerine dağıtıldı. Dört gün süreyle %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edilen hücreler, süre sonunda mikroskop kontrolüne alındı ve hücre bölünmesi yönünden kontrol edildi. Oluşan koloniler takip edilerek 16-32 hücreli koloniler 24-gözlü tablettten alınarak her koloni bir göze yerleşecek şekilde 96-göz tablete aktarıldı. Medyum pH'sına göre antikor üretimleri kontrol edildi. Yeterince düşük pH gösteren tablet gözlerinden alınan süpernatant örnekleri immünizasyonda kullanılan antijenlere spesifik antikor içerikleri açısından kontrol edildi.

Hibrit Hücrelerin Antikor Üretim Potansiyellerinin Sorgulanması

Hücre süpernatantları Antikor üretim açısından teste alındı. Bu kapsamda öncelikle füzyon sonrası çoğalan kolonilerin immunojenlere karşı antikor üretip üretmedikleri test edildi. Bunun için 96-göz pletlerde üretilen ve KKKAV'nin N ve GPC proteinleri ifade eden BHK-21 hücrelerinde IIFT yapıldı. Kültürün 48. saatinde fikze edilen hücrelere, kültürdeki hibridoma kolonilerinden alınan süpernatantlar ilave edildi ve 1 saat süreyle inkübe edildi. Süre sonunda yıkanan hücre yüzeylerine anti-fare IgG-FITC ilave edildi ve tekrarlayan 1 saatlik inkubasyon sonunda test gözleri floresan mikroskop ile kontrol edildi.

Üretilen antikorların hedef protein spesifitesi ayrıca Western Blot (WB) tekniği ile kontrol edildi. Bu amaçla KKKAV ile enfekte Vero E6 hücreleri ve/veya immunojen proteinleri ifade eden prokaryotik sistemler (pET28a-N ve pET28a-GPC) uygun şartlarda kültüre edilip parçalandıktan sonra denatüran ortamda SDS-PAGE tekniği ile proteinler ayrıştırıldı. Ayrıştırılan proteinler nitroselülüz membran üzerine aktarıldı ve 3 saat süreyle süt tozu (%3) ile blokladı. Üretilen antikorların her birisi ile membranlar 1 saat süreyle muamele edilmek süratiyle antikorların N veya GPC bağlanması sağlandı. Süre sonunda yıkanan membranlar ikincil antikorla (Streptoavidin işaretli anti-Fare-IgG antikoru) muamele edildi. Süre sonunda ECL substrat ile yüksek hassasiyetle görüntüleme yapıldı.

Diğer taraftan üretildiği tespit edilen antikorların izotiplendirilmesi yapıldı. Bu amaçla Rapid-ELISA Mouse mAb Isotyping Kit (Pierce, USA) kullanıldı. Test üretici firmanın yönergesi doğrultusunda uygulandı.

Virüs Nötralizasyon Testi:

Araştırma kapsamında üretilen MAb'ların KKKAV'ünü nötralize etme yeteneği sorgulandı. Virüs Nötralizasyon testi 24 kuyucuklu hücre kültürü tabletlerinde gerçekleştirildi. Bu amaçla;

- Vero E6 hücreleri 24-kuyucuklu hücre kültürü tabletinin gözlerinde 24 saat süreyle üretildi.
- Süre sonunda $1000DKID_{50}$ (10^3 /ml) oranında sulandırılmış 200 μ L hacimdeki KKKAV-Ank2 izolatu ile eşit hacimdeki MoAB'lar ependorf tüp içinde karıştırıldı.
- Karışım $37^{\circ}C$ 'de 1 saat süreyle nötralizasyon için inkübe edildi.
- Bu işlem sonunda her nötralizasyon karışımı medyumunu aspire edilmiş Vero E6 hücreleri üzerine her birisi 200 μ L olacak şekilde 2 adet göze inokule edildi.
- İnokulasyon işlemleri tamamlandıca 24 kuyucuklu tabletler $5\% CO_2$ etüvde $37^{\circ}C$ 'de 1 saat bekletildi.
- Süre sonunda kullanılan tüm kuyucuklara 1 ml DMEM ilave edilerek virüs kontrol olarak ayrılan gözlerde $\%100$ CPE gözlenene kadar aynı şartlarda inkübe edildi.

IV: Analiz ve Bulgular

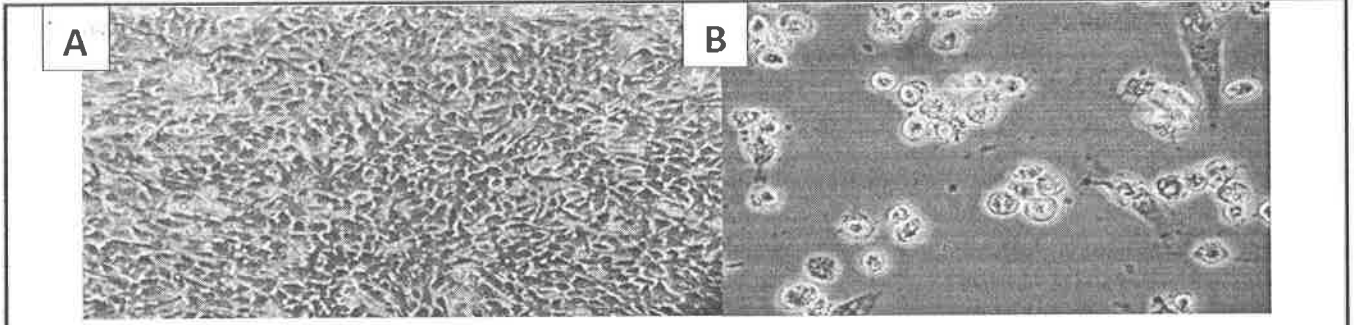
Farelerin İmmünizasyonu

Farelerin immünizasyonu izleyen 14. günde kuyruk ucundan alınan kan örneklerinde her iki immünizasyon protokolündeki hayvanlarda immunojenlere karşı antikor geliştiği IIFT ile tespit edildi.

Stabil olarak N (Nucleocapsit) ve GPC (Glikoprotein Kompleks) Proteini ifade eden BHK-21

Hücrelerinin Hazırlanması:

Serolojik testlerde kullanılmak üzere virüsün N ve GPC proteinlerini stabil olarak ifade eden BHK-21 hücreleri hazırlandı. Genetisine dirençli hücrelerin konfluent olarak kullanıma hazır olması yaklaşık 18-20 gün arasında zaman aldı (Şekil 2.1).

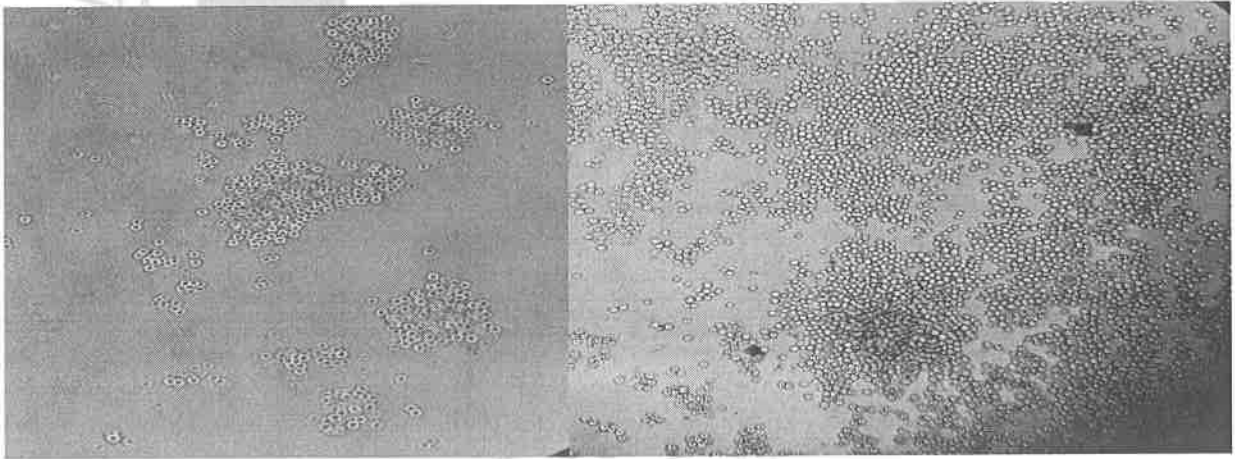


Şekil 2. 1 Stabil KKKAV-N ifade eden (A) ve etmeyen (B) BHK-21 hücrelerinin Genetisin (G418) altında görünümü.

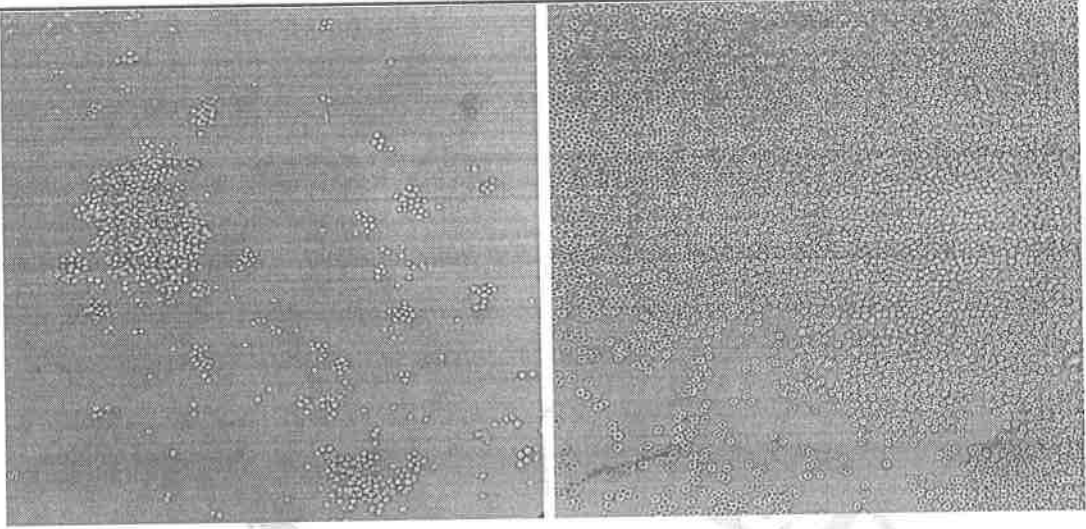
İfade Plazmitleri ile İmmünize Edilen Farelerde Antikor Üretimi:

Elde edilen plazmidler ile fareler immunize edildikleri doğrulandıktan sonra alınan dalaklardan sağlıklı lenfosit izolasyonu ve F0 myeloma hücreleri ile başarılı füzyon gerçekleştirildi. HAT içeren besi yeri ile yapılan seleksiyon sonrasında hem N proteinine (Şekil 2.2) karşı ve hem de GPC'ye (Şekil 2.3) karşı stabil hibrit hücre kolonilerinin oluştuğu tespit edildi.

Bu işlemin ardından koloniler için alt klonlama (subcloning) işlemi ve kolonilerin antijenlere karşı spesifik antikor üretmesi doğrultusunda testler yapıldı. Yapılan IIFT ile Antikor üreten hücre kolonileri MAAb antikor üreten hücreler olarak değerlendirildi ve pozitif olan klonlar -80°C 'de muhafaza edildi.

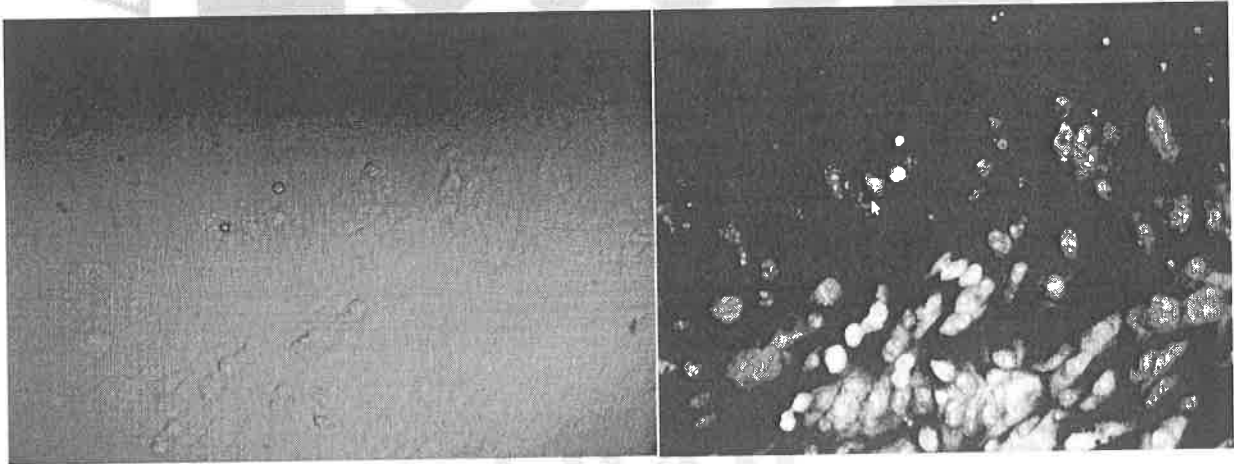


Şekil 2. 2 KKKAV N (Nükleokapsit) proteinini ifade eden plazmid ile immünize edilen farelerin dalaklarından hibridoma teknolojisi kullanarak elde edilen hibrit hücreler.

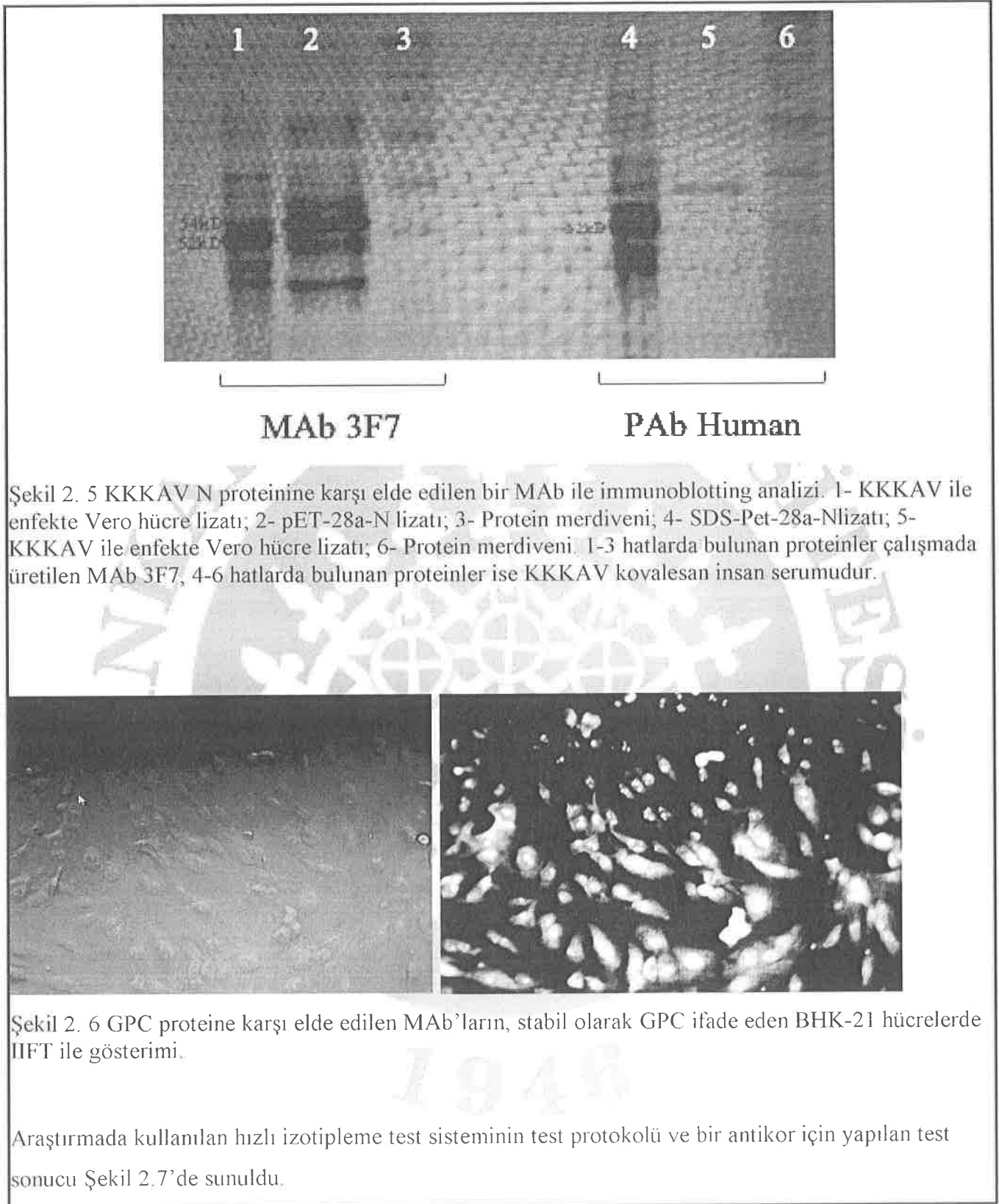


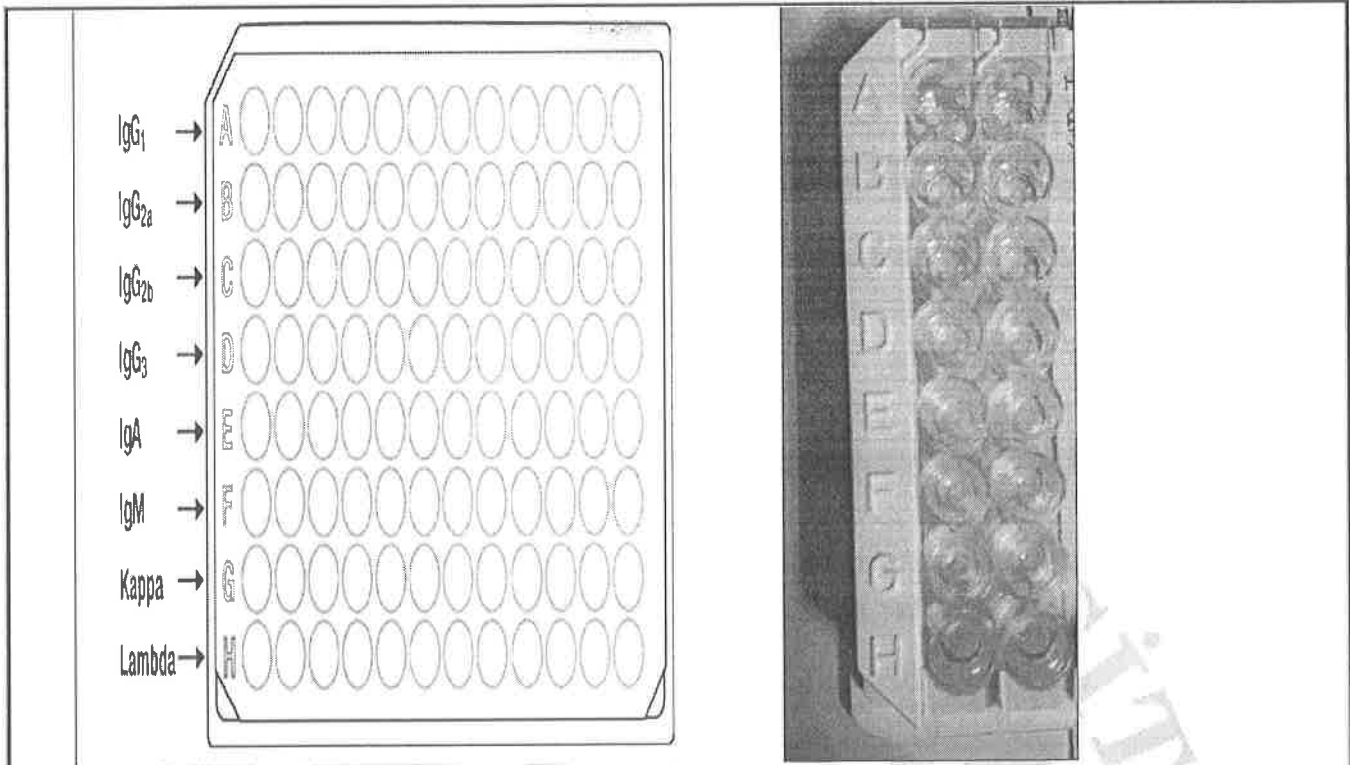
Şekil 2. 3 GPC (Glikoprotein kompleks) ifade eden plasmid ile immünize edilen farelerin dalaklarından hibridoma teknolojisi kullanarak elde edilen hibrit hücreler.

Elde edilen hybridoma hücreleri derin dondurucudan (-80°C) alınarak medium içerisinde çözüldü, hücre supernatantı saf antikor elde edilmesi için kiti kullanarak antikor saflaştırılma işlemine alındı ve saflaştırılan antikorun istediğimiz antijene karşı spesifik olması doğrultusunda SDS-PAGE ve Western Blot, ve stabil BHK-21 kullanarak üretilen antikorların reaktiviteleri doğruluğu tespit edilerek tüm testler başarılı olarak sonuçlandı (Şekil 2.4 – Şekil 2.6).



Şekil 2. 4 KKKAV N proteinine karşı elde edilen spesifik antikorların, stabil olarak N proteini ifade eden BHK-21 hücrelerinde IIFT ile tespiti.





Şekil 2. 7 Antikorların izotiplenmesi için kullanılan Rapid ELISA Mouse mAb Isotyping Kit protokolü (Pierce, USA) ve yapılan test sonucu.

N proteinine karşı elde edilen antikorların izotiplendirme ve genel karakterizasyon sonuçları Tablo2.1’de sunuldu. Üretilen antikorlardan 3 adeti IgG2a izotipinde bulunurken 1’er adet antikorun IgG1, IgG2b ve IgG3 formatında oldukları gözlemlendi. Ayrıca beklenildiği üzere bu antikorların hiç birisinin KKKAV’unu in vitro şartlarda nötralize etmediği görüldü.

Tablo 2. 1 Araştırma kapsamında üretilen KKKAV-N proteinine spesifik MoAb’ların izotiplendirme ve serolojik değerlendirme sonuçları.

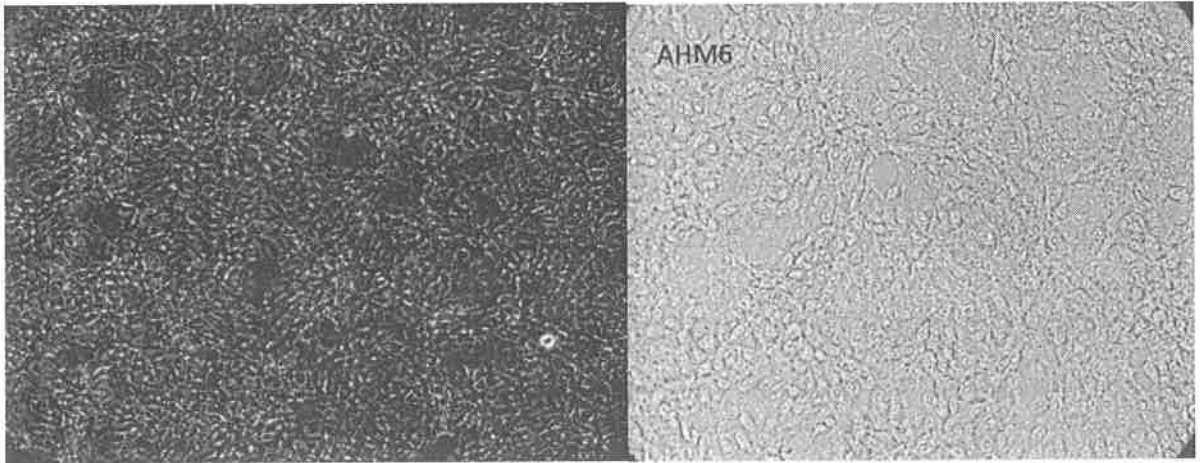
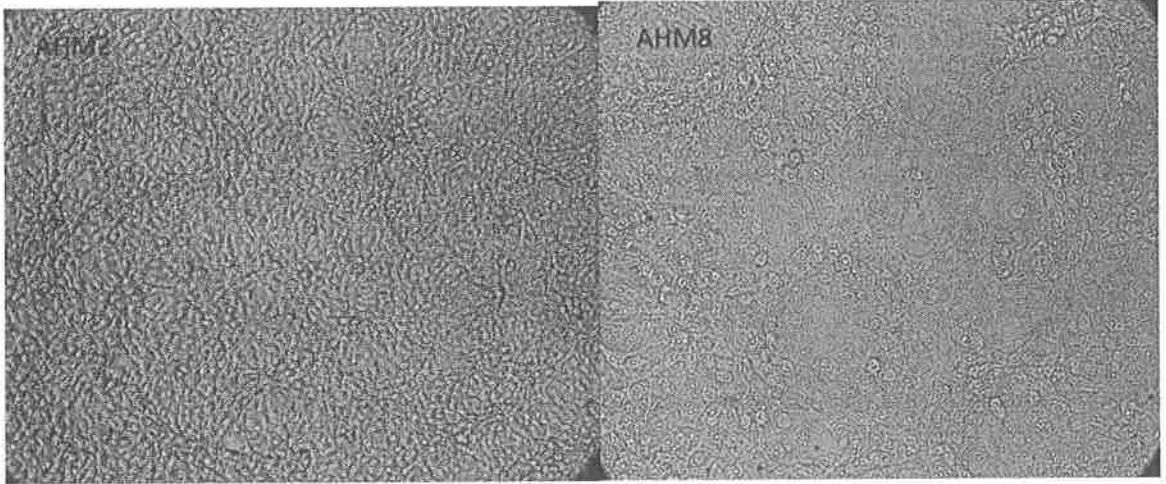
MoAB Klon #	İzotip	Hafif Zincir	Test Yöntemi		
			Natif NP- Bağlanma	Western- Blot	Virüs Nötralizasyon
N Proteinine Özgül MAb’lar					
AHN1	IgG2a	λ	+	+	Neg
AHN2	IgG3	λ	+	+	Neg
AHN3	IgG2a	λ	+	+	Neg
AHN4	IgG1	κ	+	+	Neg
AHN5	IgG2a	κ	+	+	Neg
AHN6	IgG2b	λ	+	+/-	Neg

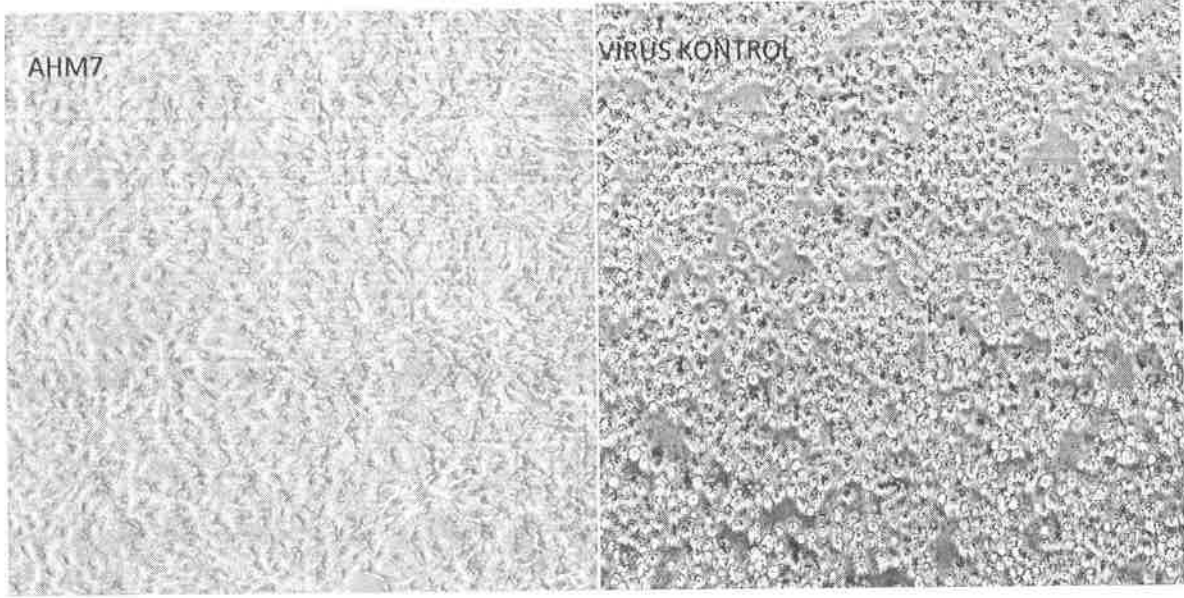
M proteinine karşı elde edilen antikorların izotiplendirme ve genel karakterizasyon sonuçları Tablo2.2’de sunuldu. Üretilen antikorlardan 2 adeti IgG2a izotipinde ve 2adet IgG1 bulunurken 1’er

adet antikorun, IgG2b ve IgG3 formatında oldukları gözlemlendi. Ayrıca beklenildiği üzere bu antikorların hiç birisinin KKKAV'unu in vitro şartlarda nötralize etmediği görüldü.

MoAB Klon #	İzotip	Hafif Zincir	Test Yöntemi		
			Natif MP- Bağlanma	Western- Blot	Virüs Nötralizasyon
M Proteinine Özgül MAb'lar					
AHM1	IgG2a	λ	+	+	Neg
AHM2	IgG3	λ	+	+	Poz
AHM3	IgG2a	λ	+	+	Neg
AHM8	IgG1	κ	+	+	Poz
AHM5	IgG2a	κ	+	+	Poz
AHM6	IgG2b	λ	+	+	Poz
AHM7	IgG1	κ	+	+	Poz

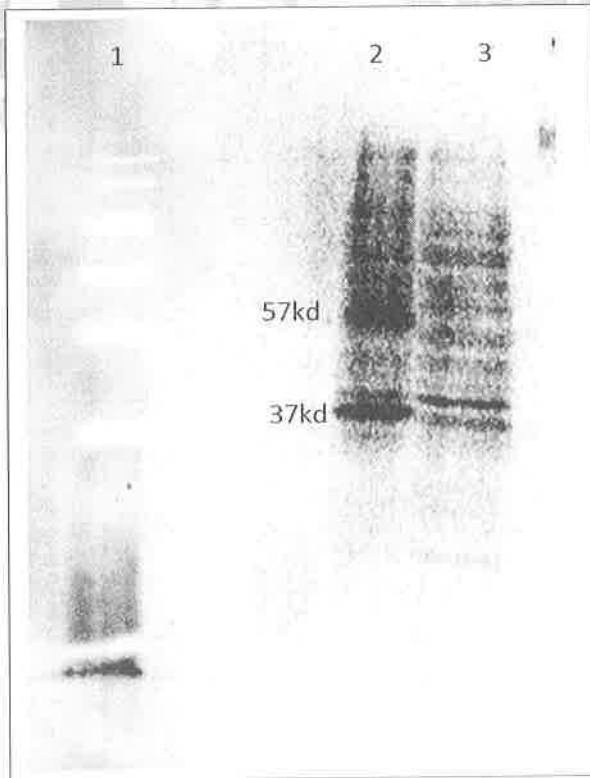
M proteinine karşı elde edilen antikorların Virüs Nötralizasyon Testi:





Western blot sonuçları

KKKAV M proteinine karşı elde edilen MAb ile immunoblotting analizi



- 1: Protein merdiveni,
- 2: hatlarda bulunan proteinler çalışmada üretilen MAb.
3. KKKAV ile enfekte Vero hücre lizati

V. Sonuç ve Öneriler

Bu tez çalışmasında, KKKA virüsüne karşı hybridoma teknolojisi kullanarak monoklonal antikorların üretimi amaçlandı. Böyle bir çalışma kapsamında herhangi bir viral epitopa hedeflenmiş (konformasyon bağımlı ya da bağımsız) antikorların elde edilebilmesi mümkündür. Ancak temel hedef öncelikli olarak nötralizan antikorların elde edilebilme potansiyelini sorgulamak ve bu ana hedef yanında çalışma kapsamında elde edilebilecek tüm antikorların ağırlıklı olarak tanısal kullanım olasılıkları yönünden sorgulamak da hedeflendi ve istenilen amaçlar elde edildi.

VI. Geleceğe İlişkin Öngörülen Katkılar

Elde edilen monoklonal antikorlar çok farklı amaçlarla (tanısal, terapötik, pasif profilaktik) kullanım olasılığı olabilecek biyolojik maddelerin üretilmesine çalışılacaktır.

VII. Sağlanan Altyapı Olanaklarının Varsa Gerçekleştirilen Projeler

VIII. Sağlanan altyapı Olanaklarının Varsa Bilim/Hizmet ve eğitim Alanlarındaki Katkıları

IX. Kaynaklar

- ARDALAN, M. R., TUBBS, R.S., CHINIKAR, S. SHOJA, M. M.(2006).Crimean-Congohaemorrhagicfeverpresenting as tromboticmicroangiopathyandacuterenalfailure. *Nephrol Dial Transplant.* **21(8)**: 2304-2307.
- BENTE, D.A., FORRESTER, N.L., WATTS, D.M., MCAULEY, A.J., WHITEHOUSE, C.A., BRAY, M.(2013). Crimean-Congohemorrhagicfever: history, epidemiology, pathogenesis, clinicalsyndromeandgeneticdiversity. *Antivir. Res.* **100**, 159e189. <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.07.006>.
- BİNO, S., PAPA, A., VELO, E.(2016).Cytokinelevels in Crimean- Congohemorrhagicfever. *J ClinViro***36(4)**: 272-276.
- BUTTİGİEG, K.R., DOWALL, S.D., FINDLAY-WILSON, S., MIŁOSZEWSKA, A.(2014).A novelvaccineagainstCrimean-Congohaemorrhagicfeverprotects 100% of animalsagainstlethalchallenge in a mouse model. *PLoSOne*; **9**:e91516.
- CANAKOGLU, N., BERBER, E., TONBAK, S., ERTEK, M., SOZDUTMAZ, I., AKTAS, M., KALKAN, A., OZDARENDELİ, A.(2015). Immunization of knock-out a/b interferon receptormiceagainsthighlethaldoseof Crimean-Congohemorrhagicfeverviruswith a cellculturebasedvaccine. *PLoSNegl. Trop. Dis.* **1e14**. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003579>.

CDC (2005) Bioterrorism<http://www.btcdcgov/Agent/Agentlist.asp>

CLETON, N., KOOPMANS, M., REİMERİNK, J., GODEKE, G. J. AND REUSKEN, C.(2012).“Come fly with me: review of clinically important arboviruses for global travelers,” *Journal of Clinical Virology*, vol. 55, no.3, pp. 191–203.

Cross, R.W., Mire, C.E., Branco, L.M., Geisbert, J.B., Rowland, M.M., Heinrich, M.L., Goba, A., Momoh, M., Grant, D.S., Fullah, M., Khan, S.H., Robinson, J.E., Geisbert, T.W., Garry, R.F., (2016). Treatment of Lassa virus infection in outbred Guinea pigs with first-in-class human monoclonal antibodies. *Antivir. Res.* **133**; 218 e 222. <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.08.012>.

DOWALL, S.D., GRAHAM, V.A., RAYNER, E., HUNTER, L., WATSON, R., TAYLOR, I., RULE, A., CARROLL, M.W.(2016). Protective effects of a modified Vaccinia Ankara-based vaccine candidate against Crimean-Congo Hemorrhagic Fever virus require both cellular and humoral responses. *PLoS One* **11**, 1e13. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0156637>.

DUYGU, F., KAYA, T., BAYSAN, P.,(2012). Re-evaluation of 400 Crimean-Congo hemorrhagic fever cases in an endemic area: is ribavirin treatment suitable? *Vector Borne Zoonotic Dis.* **12**, 812e816. <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2011.0694>.

ERGONUL, O.(2012).Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: new outbreaks, new discoveries. *Curr. Opin. Virol.* **2**, 215e220. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2012.03.001>.

ERGÖNÜL, Ö. (2006). Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Lancet Infect Dis*; **6**: 203-214

ESTRADA-PEÑA, A., DE LA FUENTE, J., LATAPÍA, T., ORTEGA, C.(2015). The impact of climate trends on a tick affecting public health: a retrospective modeling approach for *Hyalomma marginatum* (ixodidae). *PLoS One* **10**, 1e16. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0125760>.

FLICK, R. MOLECULAR BIOLOGY OF THE CRIMEAN-CONGO HEMORRHAGIC FEVER VIRUS. IN: ERGÖNÜL Ö, WHITEHOUSE CA (2007).Crimean-Congo Hemorrhagic Fever A Global Perspective. Dordrecht, Netherlands: *Springer*;35-44.

GARRISON A. R., SHOEMAKER, C.J., GOLDEN J.W., COLLIN J. FITZPATRICK C.J., SUSCHAK, J., MICHELLE J. RICHARDS, M.J AND ET AL.(2017). A DNA vaccine for Crimean-Congo hemorrhagic fever protects against disease and death in two lethal mouse models. *PLoS Negl Trop Dis* **11(9)**: e0005908. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005908>.

HONIG JE, OSBORNE JC, NICHOL ST(2004).The high genetic variation of viruses of the genus *Nairovirus* reflects the diversity of their predominant tick hosts; **318(1)**: 10-16.

KESHTKAR-JAHROMI M., KUHN B, J.H., CHRISTOVAC, I., BRADFUTE, S.B., JAHRLING B., BAVARI S.(2011). Crimean-Congo hemorrhagic fever: Current and future prospects of vaccines and therapies. *Antiviral Research.* **90**:85–92.

- KOKSAL, I., YILMAZ, G., AKSOY, F., AYDIN, H., YAVUZ, I., ISKENDER, S., AKCAY, K., ERENŞOY, S., CAYLAN, R., AYDIN, K.(2010).** The efficacy of ribavirin in the treatment of Crimean- Congo hemorrhagic fever in Eastern Black Sea region in Turkey. *J. Clin. Virol.* 47;65e68. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2009.11.007>.
- KORTEKAAS, J., VLOET, R.P.M., MCAULEY, A.J., SHEN, X., BOSCH, B.J., DE VRIES, L., MOORMANN, R.J.M., BENTE, D.A., (2015).** Crimean-Congo hemorrhagic fever virus subunit vaccines induce high levels of neutralizing antibodies but no protection in STAT1 knockout mice. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 15, 759e764. <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2015.1855>.
- KUBAR, A., HACIOMEROGLU, M., OZKUL, A., BAGRIACIK, U., AKINCI, E., SENER, K., BODUR, H., (2011).** Prompt administration of Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) virus hyperimmunoglobulin in patients diagnosed with CCHF and viral load monitorization by Reverse Transcriptase-PCR. *Jpn. J. Infect. Dis.* 64, 439e443.
- MAMMEN, E. F.(2000).** Disseminated Intravascular coagulation. *Clin Lab Sci*; 13: 233-245.
- NABEL, G. J. (1999).** Surviving Ebola virus infection. *Nat. Med.* 5:373-374.
- NABETH P, CHEIKH DO, LO B (2004).** Crimean-Congo Hemorrhagic Fever, Mauritania. *Emerg Infect Dis*;10(12): 2143-2149.
- PAPA, A., TSERGOULI, K., ÇA GLAYIK, D., BİNO, S., COMO, N., UYAR, Y., KORUKLUOĞLU, G., (2016).** Cytokines as biomarkers of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *J. Med. Virol.* 88, 21e27. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.24312>.
- PETERS, C. J. AND ZAKI, S. R.(2002).** Role of endothelium in viral haemorrhagic fevers. *Crit Care Med.* 30(5): Supp 268-273.
- QIU, X., WONG, G., AUDET, J., BELLO, A., FERNANDO, L., ALIMONTI, J.B., FAUSTHER-BOVENDO, H., WEI, H., AVILES, J., HIATT, E., JOHNSON, A., MORTON, J., SWOPE, K., BOHOROV, O., BOHOROVA, N., GOODMAN, C., KIM, D., PAULY, M.H., VELASCO, J., PETTITT, J., OLINGER, G.G., WHALEY, K., XU, B., STRONG, J.E., ZEITLIN, L., KOBINGER, G.P.(2014).** Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp. *Nature* 514: 47e53. <http://dx.doi.org/10.1038/nature13777>.
- SIMMONS, G., R. J. WOOL-LEWIS, F. BARIBAUD, R. C. NETTER, AND P. BATES. (2002).** Ebola virus glycoproteins induce global surface protein down-modulation and loss of cell adherence. *J. Virol.* 76:2518-2528.
- SOARES-WEISER, K., THOMAS, S., THOMSON, G., GARNER, P., (2010).** Ribavirin for Crimean- Congo hemorrhagic fever: systematic review and meta-analysis. *bmc infect. dis.* 10; 207. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-10-207>
- TONBAK S, AKTAS M, OZDARENDELI A (2006).** Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus: Genetic Analysis and Tick Survey in Turkey. *J Clin Microbiol*;44(11): 4120-4124.

VAN EEDEN, P.J., VAN EEDEN, S.F., JOUBERT, J.R., KING, J.B., VAN DE WAL, B.W., MICHÉLL, W.L., JOUBERT, J.R., VAN EEDEN, P.J., KING, J.B., (1985). A nosocomial outbreak of Crimean-Congo haemorrhagic fever at Tygerberg Hospital Part II. Management of patients. *South Afr. Med. J.* **68**; 718e721.

VELÍKOVSKY CA, CASSATARO J, SANCHEZ M, FOSSATI CA, FAÏNBOÏM L, SPÍTZ M. Single-shot plasmid DNA intrasplenic immunization for the production of monoclonal antibodies. Persistent expression of DNA. *J Immunol Methods*. 2000;244(1-2):1-7. doi:10.1016/s0022-1759(00)00244-1

VINCENT, M. J., A. J. SANCHEZ, B. R. ERICKSON, A. BASAK, M. CHRETIEN, N. G. SEÏDAH, AND S. T. NICHOL. (2003). Crimean-Congo hemorrhagic fever virus glycoprotein proteolytic processing by subtilase SKI-1. *J. Virol.* **77**:8640–8649.

WHITEHOUSE, C. A. (2004). Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Antiviral Res.* **64**(3): 145-160.

WHITEHOUSE CA (2007). Crimean-Congo Hemorrhagic Fever A Global Perspective. Dordrecht, Netherlands: *Springer*. 35-44.

ZIVCEC, M., GUERRERO, L., ALBARINO, C.G., STUART T.B., CHRISTINA F.N., (2017). Identification of broadly neutralizing monoclonal antibodies against Crimean-Congo hemorrhagic fever virus . *Antiviral Research* **146** :112e120.

ZEITLÍN, L., GEISBERT, J.B., DEER, D.J., FENTON, K.A., BOHOROV, O., BOHOROVA, N., GOODMAN, C., KIM, D., HIATT, A., PAULY, M.H., VELASCO, J., WHALEY, K.J., ALTMANN, F., GRUBER, C., STEINKELLNER, H., HONKO, A.N., KUEHNE, A.I., AMAN, M.J., SAHANDI, S., ENTERLEIN, S., ZHAN, X., ENRIA, D., GEISBERT, T.W. (2016). Monoclonal antibody therapy for Junin virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**; 4458e4463. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1600996113>.

X. Ekler**a. Mali Bilanço ve Açıklamaları**

Detaylar													
Bütçe Kodu	Açıklama	Önceki Yıllan Devir	Başlangıç Ödeneği	Eklene Aktarma	Düğülen Aktarma	Eklene Ödenek	Düğülen Ödenek	Net Ödenek	Harcanan (Mahsup)	Harcanan (Diğer)	Bloke Edilen (Avans)	Bloke Edilen (Diğer)	Kalen
03.2	TÜKETİME YÖNELİK MAL VE MALZEME ALIMLARI	0,00	12.098,00	0,00	0,00	0,00	0,00	12.098,00	0,00	0,00	0,00	0,00	12.098,00
	Toplam	0,00	12.098,00	0,00	0,00	0,00	0,00	12.098,00	0,00	0,00	0,00	0,00	12.098,00
Bütçe Kodu	Açıklama	Önceki Yıllan Devir	Başlangıç Ödeneği	Eklene Aktarma	Düğülen Aktarma	Eklene Ödenek	Düğülen Ödenek	Net Ödenek	Harcanan (Mahsup)	Harcanan (Diğer)	Bloke Edilen (Avans)	Bloke Edilen (Diğer)	Kalen
03.2	TÜKETİME YÖNELİK MAL VE MALZEME ALIMLARI	12.098,00	3.402,00	0,00	0,00	0,00	0,00	15.500,00	0,00	14.904,00	0,00	0,00	596,00
	Toplam	12.098,00	3.402,00	0,00	0,00	0,00	0,00	15.500,00	0,00	14.904,00	0,00	0,00	596,00

b. Makine ve Teçhizatın Konumu ve İlerideki Kullanımına Dair Açıklamalar**c. Teknik ve Bilimsel Ayrıntılar****d. Sunumlar (bildiriler ve teknik raporlar) (Altyapı ve Yönlendirilmiş Projeler için uygulanmaz)****e. Yayınlar (hakemli bilimsel dergiler) ve tezler (Altyapı ve Yönlendirilmiş Projeler için uygulanmaz)**

1946