



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**EMBRİYONİK İNTERFERON (OTP-1) VE
İNTERFERON GAMMA EKSPRESYONUNUN
İN VİTRO ŞARTLARDA
PPRV VE PESTİVİRUS ORTAK ENFEKSİYONUNA
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hatice Mahur ALTAY

**VİROLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Aykut ÖZKUL**

2014- ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**EMBRYONİK İNTERFERON (OTP-1) VE
İNTERFERON GAMMA EKSPRESYONUNUN
İN VİTRO ŞARTLARDA
PPRV VE PESTİVİRUS ORTAK ENFEKSİYONUNA
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hatice Mahur ALTAY

**VİROLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Aykut ÖZKUL**

**Bu tez, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından
11B3338001 proje numarası ile desteklenmiştir.**

2014- ANKARA

KABUL VE ONAY SAYFASI

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xiii
1.GİRİŞ	1
1.1. PPRV ve Pestivirus Ortak Enfeksiyonları	1
1.2. Peste des Petits Ruminants Virus Enfeksiyonu	3
1.2.1. Genel Bilgiler	3
1.2.2. Etiyoloji	4
1.2.2.1. Replikasyon	6
1.2.2.2. Viral Proteinler	7
1.2.2.2.1 Yapısal Proteinler	7
1.2.2.2.1.1. N proteini	7
1.2.2.2.1.1. P proteini	9
1.2.2.2.1.2. M proteini	10
1.2.2.2.1.3. F proteini	10
1.2.2.2.1.4. HN proteini	11
1.2.2.2.1.5. L proteini	12
1.2.2.2.2. Yapısal Olmayan - Aksesuar Proteinler	12
1.2.2.2.2.1. C ve V proteinleri	12
1.2.3. Patogenez	13
1.2.4. İmmunopatogenez	15
1.3. Ruminant Pestivirus Enfeksiyonları	16
1.3.1. Genel Bilgiler	16
1.3.2. Etiyoloji	17

1.3.2.1. Replikasyon	19
1.3.2.2. Viral Proteinler	20
1.3.2.2.1. Yapısal Proteinler	21
1.3.2.2.2. Yapısal Olmayan Proteinler	22
1.3.3. Patogenez	24
1.3.4. İmmunopatogenez	26
1.4. İnterferonlar	27
1.4.1. Ovine Trophoblast Protein-1	31
1.4.2. İnterferon Gamma	34
1.5. Tezin Amacı	37
2. GEREÇ VE YÖNTEM	38
2.1. GEREÇ	38
2.1.1. Viruslar	38
2.1.2. Hücre Kültürleri	38
2.2. YÖNTEM	39
2.2.1. Primer Koyun Trofoblast (PKT) Hücre Kültürünün Hazırlanması	39
2.2.2. Virusların Enfeksiyözite Gücünün Tespiti	40
2.2.3. Virusların İnokulasyonları	41
2.2.3.1. SFT-R Hücre Hattına Tekli BVDV ve PPRV İnokulasyonu	41
2.2.3.2. SFT-R Hücre Hattına Eş Zamanlı BVDV ve PPRV İnokulasyonu	42
2.2.3.3. SFT-R Hücre Hattına Önce BVDV Sonra PPRV İnokulasyonları	42
2.2.3.4. PKT Hücre Kültürüne İnokulasyonlar	42
2.2.4. Gen İfadelerinin Sorgulanması	42
2.2.4.1. Örneklerin Hazırlanması	43
2.2.4.2. Mutlak Kantitasyon	45
2.2.4.2.1. Primer ve Prob Tasarımları ve Optimizasyonlar	45
2.2.4.2.2. Rekombinant DNA Standartlarının Hazırlanması ve Kantitasyonlar	48
2.2.4.2.2.1. Hedef Bölgelerin Eş Zamanlı RT-PCR ile Çoğaltılması	48
2.2.4.2.2.2. Eş Zamanlı RT-PCR Ürünlerinin Saflaştırılması	48
2.2.4.2.2.3. Saflaştırılan Ürünlerin Klonlanması	48
2.2.4.2.2.3. Standartların Kantitasyonları	49

2.2.4.3. Eş Zamanlı RT-PCR Kurulumu	50
2.2.5. İstatistik Analiz	51
3. BULGULAR	52
3.1. Hücre Kültürleri	52
3.2. SFT-R Hücre Hattına ve PKT Hücre Kültürüne Virusların İnokulasyonları	52
3.3. PCR Optimizasyonu	57
3.4. Hazırlanan DNA Standartlarının Kantitasyonu	58
3.5. Eş Zamanlı RT-PCR Sonuçları ve İstatiksel Analizleri	64
3.6. İstatistiksel Analizler Grafikleri ve İfade Değişimlerinin Yüzde Hesapları	70
3.6.1. Hücre Kültürlerinde Gen İfade Değişimleri	70
3.6.1.1 Hücre Kültürlerine Virus İnokulasyonu Olmaksızın Gen İfadelerinin Analizleri	70
3.6.1.1.1. OTP-1 İfadesinin Analizi	70
3.6.1.1.2. IFN γ İfadesinin Analizi	70
3.6.1.2. Hücre Kültürlerine BVDV İnokulasyonu Sonrası Gen İfadelerinin Analizleri	71
3.6.1.2.1. OTP-1 İfadesinin Analizi	71
3.6.1.2.2. IFN γ İfadesinin Analizi	72
3.6.1.2.3. BVDV-5'UTR İfadesinin Analizi	73
3.6.1.3. Hücre Kültürlerine PPRV İnokulasyonu Sonrası Gen İfadelerinin Analizleri	73
3.6.1.3.1. OTP-1 İfadesinin Analizi	73
3.6.1.3.2. IFN γ İfadesinin Analizi	74
3.6.1.3.3. PPRV-N İfadesinin Analizi	75
3.6.1.4. Hücre Kültürlerine Eş Zamanlı BVDV ve PPRV İnokulasyonu Sonrası Gen İfadelerinin Analizleri	75
3.6.1.4.1. OTP-1 İfadesinin Analizi	76
3.6.1.4.2. IFN γ İfadesinin Analizi	76
3.6.1.4.3. BVDV-5'UTR İfadesinin Analizi	77
3.6.1.4.4. PPRV-N İfadesinin Analizi	78
3.6.1.5. Hücre Kültürlerine Önce BVDV ve 6 saat Sonra PPRV İnokulasyonu Sonrası Gen İfadelerinin Analizleri	78

3.6.1.5.1 OTP-1 ifadesinin Analizi	79
3.6.1.5.2. IFN γ İfadesinin Analizi	79
3.6.1.5.3. BVDV-5'UTR İfadesinin Analizi	80
3.6.1.5.4. PPRV-N İfadesinin Analizi	81
3.6.1.6. Hücre Kültürlerine Önce BVDV ve 12 saat Sonra PPRV İnokulasyonu Sonrası Gen İfadelerinin Analizleri	81
3.6.1.6.1. OTP-1 İfadesinin Analizi	82
3.6.1.6.2. IFN γ İfadesinin Analizi	82
3.6.1.6.3. BVDV-5'UTR İfadesinin Analizi	83
3.6.1.6.4. PPRV-N İfadesinin Analizi	84
3.6.1.7. Hücre Kültürlerine Önce BVDV ve 24 saat Sonra PPRV İnokulasyonu Sonrası Gen İfadelerinin Analizleri	84
3.6.1.7.1. OTP-1 İfadesinin Analizi	85
3.6.1.7.2. IFN γ İfadesinin Analizi	85
3.6.1.7.3. BVDV-5'UTR İfadesinin Analizi	86
3.6.1.7.4. PPRV-N İfadesinin Analizi	87
4. TARTIŞMA	92
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	100
ÖZET	103
SUMMARY	104
KAYNAKLAR	105
EKLER	119
EK-1	119
EK-2	120
ÖZGEÇMİŞ	143

ÖNSÖZ

Peste des petits ruminants virus (PPRV) ve Ruminant Pestivirus enfeksiyonlarına Türkiye’de oldukça sık ve yaygın bir biçimde rastlanmaktadır. İki virusun ortak enfeksiyonunun, iki ayrı çalışma ile bildiri ve tespit edilen patolojiler, eş zamanlı enfeksiyonun ülkemiz için göz ardı edilemeyecek bir öneme sahip olduğunu düşündürmektedir. Ruminant pestivirusları, *Flaviviridae* familyasında yer alan Bovine Viral Diare Virus (BVDV) ve Border Disease (BD) virusları olup, hidraensafalopati, serebellar hipoplazi, arthrogripozis, ve anormal tüy yapısı gibi çok çeşitli konjenital anomalilerle karakterize hastalık tablosu oluştururlar. PPRV, *Paramyxoviridae* familyasının Morbillivirus genusuna dâhil olup, yüksek ateş, okulonazal akıntı, nekrotik-erosiv stomatit, enterit ve pnömoni ile karakterize, akut, oldukça bulaşıcı bir hastalık tablosu oluşturur. Bugüne değin yapılan çalışmalarda PPR virusun tek başına fetal patolojilerle herhangi bir ilişkisi ve pestiviruslarla ortak enfeksiyonu bildirilmemiştir. Bu çalışmada in vitro şartlarda gerçekleştirilecek eş zamanlı PPRV ve Pestivirus enfeksiyonu ile, gerek her iki virusun birbiri ve gerekse hücrel IFN-gamma ve koyunlarda embriyonik interferon olan Ovine Trophoblast Protein-1 ekspresyonu üzerine etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince, her aşamada yardım ve desteğini gördüğüm, bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren danışman hocam Prof. Dr. Aykut Özkul’a, yönlendirmeleri ve destekleri için Prof. Dr. Yılmaz Akça’ya, Prof. Dr. Feray Alkan’a, Prof. Dr. Seval BİLGE Dağalp’e, Doç. Dr. Taner Karaoğlu’na, çalışmamın laboratuvar aşamasında desteğini esirgemeyen ve tecrübelerini paylaşan Doç. Dr. Tuba Çiğdem Oğuzoğlu’na, Ondokuz Mayıs Üniversitesi’nde görev yaptığım sürede benimle bilgilerini paylaşan, çalışma ortamı sağlayan Doç. Dr. Harun Albayrak’a, son olarak çalışmam süresince birlikte görev yaptığım Araştırma Görevlisi ve doktora öğrencisi arkadaşlarım, Dr. Hümay Akın İleri, Dr. M. Özkan Timurkan, İlke Karayel, Nüvit Coşkun, Fırat Doğan, Taylan Koç, Sependar Gargari’ye ve tez çalışmamın istatistiksel analizlerini titizlikle yapan eşim Bora Altay’a, her konuda desteğim aileme sonsuz teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	: Adenin
aa	: Amino asit
ACTB	: Beta Aktin
ADAR	: adenosine deaminase, RNA-specific (RNA-spesifik adenozin deaminaz)
AGP	: Antigenom promotor
BDV	: Border Disease Virus
BHV	: Bovine Herpes Virus
bp	: Base pair
BTP-1	: Bovine Trophoblast Protein 1
BTV	: Blue Tongue Virus
BVDV	: Bovine Viral Diarrhea Virus
C	: Sitozin
Cp	: Sitopatojenik
CSFV	: Klasik Domuz Vebası Virüsü
ds	: Double stranded (çift iplikçikli)
DNA	: Deoksiribonükleik asit
G	: Guanin
GAF	: Gamma aktivasyon faktör
GP	: Genom promotor
GPV	: Goat Pox Virus
IFN	: İnterferon
IFNα	: İnterferon alfa
IFNβ	: İnterferon beta
IFNγ	: İnterferon gamma
IFNτ	: İnterferon tau
IFNω	: İnterferon omega
IL	: İnterlökin
IRES	: Internal ribosome entry site
IRF	: İnterferon Regulatory Faktör
JAK	: Janus Kinaz
MHC	: Major histocompatibility complex
MD	: Mucosal Disease
MeV	: Measles Virus
mRNA	: Messenger Ribonükleik asit
Ncp	: Non-sitopatojenik
NK	: Natural Killer
nm	: Nanometre
nt	: Nükleotit
PIV	: Parainfluenza Virus
PPRV	: Peste des Petits Ruminants Virus
OAS	: Oligoadenilat sentetaz
OIE	: World Organisation for Animal Health
ORF	: Open Reading Frame (Açık Okuma Çerçevesi)

OTP-1	: Ovine Trophoblast Protein 1
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PI	: Persiste Enfekte
PKR	: Protein Kinaz R
RdRp	: RNA bağımlı RNA polimeraz (RNA dependent RNA polymerase)
RT-PCR	: Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction
RNA	: Ribonükleik asit
RNP	: Ribonükleoprotein
RPV	: Rinderpest Virus
SLAM	: Signaling lymphocytic activation molecule
ss	: single stranded (tek iplikçikli)
STAT	: Signal Transducer and Activator of Transcription
T	: Timin
UTR	: Untranslated Region

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	PPRV proteinleri ve yerleşimleri	6
Şekil 1.2.	PPRV replikasyonunu şematik görüntüsü	8
Şekil 1.3.	N ^{pro} temel alınarak Pestivirusların Filogenetik Analizi ve Sınıflandırması	18
Şekil 1.4.	Pestivirus replikasyonunun şematik gösterimi	20
Şekil 1.5.	Pestivirusun proteinleri	22
Şekil 1.6.	İnterferon sisteminin şematik gösterimi	29
Şekil 1.7.	Jak-STAT yolağının şematik gösterimi	31
Şekil 1.8.	IFN γ etkisinin özeti	36
Şekil 2.1.	Gebe koyun uterusu, plasentolar, f \ddot{u} tal kotiledonlar	40
Şekil 3.1.	PKT h \ddot{u} cre k \ddot{u} lt \ddot{u} rlerinin doku k \ddot{u} lt \ddot{u} ru mikroskobu g \ddot{u} r \ddot{u} nt \ddot{u} leri	52
Şekil 3.2.	SFT-R h \ddot{u} cre hattına yapılan inokulasyonlar sonrası doku k \ddot{u} lt \ddot{u} ru mikroskobu g \ddot{u} r \ddot{u} nt \ddot{u} leri	53-54
Şekil 3.3.	PKT h \ddot{u} cre k \ddot{u} lt \ddot{u} r \ddot{u} ne yapılan inokulasyonlar sonrası doku k \ddot{u} lt \ddot{u} ru mikroskobu g \ddot{u} r \ddot{u} nt \ddot{u} leri	55-56
Şekil 3.4.	β -aktin, OTP-1, IFN γ , PPRV-N, BVDV 5' UTR i \ddot{c} in Gradyant PCR işlemi sonrası oluşan \ddot{u} r \ddot{u} nlerin agaroz jel g \ddot{u} r \ddot{u} nt \ddot{u} leri	57
Şekil 3.5.	β -aktin i \ddot{c} in oluşturulan kantitasyon verisi, standart eğri, kantitasyon analizi, agaroz jel g \ddot{u} r \ddot{u} nt \ddot{u} s \ddot{u}	59
Şekil 3.6.	OTP-1 i \ddot{c} in oluşturulan kantitasyon verisi, standart eğri, kantitasyon analizi, agaroz jel g \ddot{u} r \ddot{u} nt \ddot{u} s \ddot{u}	60
Şekil 3.7.	IFN γ i \ddot{c} in oluşturulan kantitasyon verisi, standart eğri, kantitasyon analizi, agaroz jel g \ddot{u} r \ddot{u} nt \ddot{u} s \ddot{u}	61
Şekil 3.8.	PPRV-N i \ddot{c} in oluşturulan kantitasyon verisi, standart eğri, kantitasyon analizi, agaroz jel g \ddot{u} r \ddot{u} nt \ddot{u} s \ddot{u}	62

Şekil 3.9.	BVDV-5'UTR için oluşturulan kantitasyon verisi, standart eğri kantitasyon analizi, agaroz jel görüntüsü	63
Şekil 3.10.	PKT hücre kültüründe virus inokulasyonu olmada β -aktin geni ifadesinde oluşan değişiklikler için kantitasyon verisi, standart eğri, Agaroz jel görüntüsü	64
Şekil 3.11.	PKT hücre kültürüne BVDV inokulasyonu sonrası 6.saatte PPRV inokulasyonu sonrası PPRV-N genom bölgesi ifadesinde oluşan değişiklikler için kantitasyon verisi, standart eğri, Agaroz jel görüntüsü	67
Şekil 3.12.	Hücre kültürlerine virus inokulasyonu olmaksızın IFN γ ifadesinin analizleri	71
Şekil 3.13.	PKT hücre kültürüne BVDV inokulasyonu sonrası OTP-1 ifadesinin analizi	72
Şekil 3.14.	SFT-R hücre hattına BVDV inokulasyonu sonrası IFN γ ifadesinin analizi	72
Şekil 3.15.	Hücre kültürlerine BVDV inokulasyonu sonrası BVDV-5'UTR ifadelerinin analizleri	73
Şekil 3.16.	PKT hücre kültürüne PPRV inokulasyonu sonrası OTP-1 ifadesinin analizi.	74
Şekil 3.17.	PKT hücre kültürüne PPRV inokulasyonu sonrası IFN γ ifadesinin analizi	74
Şekil 3.18.	Hücre kültürlerine PPRV inokulasyonu sonrası PPRV-N ifadelerinin analizleri	75
Şekil 3.19.	PKT hücre kültürüne eş zamanlı BVDV ve PPRV inokulasyonu sonrası OTP-1 ifadesinin analizi	76
Şekil 3.20.	Hücre kültürlerine eş zamanlı BVDV ve PPRV inokulasyonu sonrası IFN γ ifadesinin analizleri	77
Şekil 3.21.	Hücre kültürlerine eş zamanlı BVDV ve PPRV inokulasyonu sonrası BVDV-5'UTR ifadesinin analizleri	77
Şekil 3.22.	Hücre kültürlerine eş zamanlı BVDV ve PPRV inokulasyonu sonrası PPRV-N ifadesinin analizleri	78
Şekil 3.23.	PKT hücre kültürüne önce BVDV ve 6 saat sonra PPRV inokulasyonu sonrası OTP-1 ifadesinin analizi	79

Şekil 3.24.	Hücre kültürlerine önce BVDV ve 6 saat sonra PPRV inokulasyonu sonrası IFN γ ifadesinin analizleri.	80
Şekil 3.25.	Hücre kültürlerine önce BVDV ve 6 saat sonra PPRV inokulasyonu sonrası BVDV-5'UTR ifadesinin analizleri	80
Şekil 3.26.	PKT Hücre kültürüne önce BVDV ve 6 saat sonra PPRV inokulasyonu sonrası PPRV-N ifadesinin analizi	81
Şekil 3.27.	PKT hücre kültürüne önce BVDV ve 12 saat sonra PPRV inokulasyonu sonrası OTP-1 ifadesinin analizi	82
Şekil 3.28.	Hücre kültürlerine önce BVDV ve 12 saat sonra PPRV inokulasyonu sonrası IFN γ ifadesinin analizleri	83
Şekil 3.29.	Hücre kültürlerine önce BVDV ve 12 saat sonra PPRV inokulasyonu sonrası BVDV-5'UTR ifadesinin analizleri	83
Şekil 3.30.	Hücre kültürlerine önce BVDV ve 12 saat sonra PPRV inokulasyonu sonrası PPRV-N ifadesinin analizleri	84
Şekil 3.31.	PKT hücre kültürüne önce BVDV ve 24 saat sonra PPRV inokulasyonu sonrası OTP-1 ifadesinin analizi	85
Şekil 3.32.	Hücre kültürlerine önce BVDV ve 24 saat sonra PPRV inokulasyonu sonrası IFN γ ifadesinin analizleri	86
Şekil 3.33.	Hücre kültürlerine önce BVDV ve 24 saat sonra PPRV inokulasyonu sonrası BVDV-5'UTR ifadesinin analizleri	86
Şekil 3.34.	SFT-R hücre hattına önce BVDV ve 24 saat sonra PPRV inokulasyonu sonrası PPRV-N ifadesinin analizleri	87
Şekil. 3.35.	SFT-R hücre hattında yapılan testler sonucunda tüm gen/genom bölgesi ifadelerinde gerçekleşen değişimler	88
Şekil. 3.36.	PKT hücre kültüründe yapılan testler sonucunda tüm gen/genom bölgesi ifadelerinde gerçekleşen değişimler	89
Şekil. 3.37.	PKT Hücre Kültüründe gen/genom bölgeleri için ortalama mRNA kopya sayıları	90
Şekil. 3.38.	SFT-R Hücre Hattında gen/genom bölgeleri için ortalama mRNA kopya sayıları	91

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1.	Eş zamanlı PCR için reaksiyon karışımı bileşenleri	42
Çizelge 2.2.	Eş Zamanlı RT-PCR işleminde kullanılan ısı değerleri, zaman ve döngüleri	42
Çizelge 2.3.	Primer-prob tasarımı için kullanılan dizinler ve aksesyon numaraları	45
Çizelge 2.4.	Kullanılan primerler, genom lokalizasyonları ve ürün büyüklükleri	45
Çizelge 2.5.	Gradyant PCR miks bileşenleri ve döngü zaman/siklus bilgileri	46
Çizelge 2.6.	Real Time PCR işlemi için oluşturulan gruplar ve ifadesi sorgulanan genler	49
Çizelge 3.1.	Virusların hücre kültürlerinde hesaplanan DKID ₅₀ değerleri	54
Çizelge 3.2.	PKT hücre kültüründe virus inokulasyonu olmadan β-aktin geni ifadesinde oluşan değişiklikler için kantitasyon analizi	65
Çizelge 3.3.	PKT hücre kültüründe virus inokulasyonu olmadan β-aktin geni ifadesinde oluşan değişiklikler için Tukey ve Anova Analizleri	66
Çizelge 3.4.	PKT hücre kültürüne BVDV inokulasyonu sonrası 6.saatte PPRV inokulasyonu sonrası PPRV-N genom bölgesi ifadesinde oluşan değişiklikler için kantitasyon analizi	68
Çizelge 3.5.	PKT hücre kültürüne BVDV inokulasyonu sonrası 6.saatte PPRV inokulasyonu sonrası PPRV-N genom bölgesi ifadesinde oluşan değişiklikler için Tukey ve Anova Analizleri	69

1. GİRİŞ

İnsanlarda birden fazla virusun aynı anda enfeksiyona sebep olması sıklıkla gözlemlenen bir olgudur ve yapılan çalışmalarda bu durumun genellikle primer veya sekonder immun yetmezliklerle ilgili olduğu ortaya konulmuştur (Waner, 1994). Ruminantlarda gözlemlenen ortak viral enfeksiyonlarla ilgili bildirimlere Hindistan’da keçilerde Peste des Petits Ruminants Virus (PPRV), Bluetongue Virus (BTV) ve Goatpox (GP) Virusun (Malik ve ark., 2011) ortak enfeksiyonu ve Amerika Birleşik Devletleri’nde sığırlarda Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV), Parainfluenza tip 3 Virus (PIV-3) ve Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV) enfeksiyonlarının aynı anda tespiti örnek olarak verilebilir (Fulton ve ark., 2000). Ruminantlarda konak immun sistemi üzerinde oluşturduğu baskılayıcı etki sebebiyle BVD virusun diğer bazı viruslarla ortak enfeksiyonlarıyla ilgili deneysel çalışmalara rastlanmaktadır. Edwards ve Roeder (1983) Bovine Herpes Virus (BHV) – tip 1 ile latent enfekte sığırları deneysel olarak BVDV ile enfekte ettiklerinde ateş ve lenfopeni tespit etmişlerdir. Spilki ve ark., (2006) yalnızca BHV - 5 ile enfekte edilen sığırlarla karşılaştırıldığında, hem BHV hem BVDV ile enfekte edilen sığırların daha ciddi enfeksiyon bulguları sergilediğini ve BHV titresinin de yükseldiğini belirtmişlerdir. Bir başka deneysel çalışma sığırların akut BVDV ve Bovine Coronavirus (BCV) enfeksiyonu sonrası BCV spesifik klinik bulgular gösterdiğini, bulguların şiddetlendiğini ancak BVDV saçılımında artış olmadığını ortaya koymuştur (Niskanen ve ark., 2002). BVDV ve BRSV eş zamanlı enfeksiyonuyla ilgili gerçekleştirilen iki ayrı deneysel çalışma da yine BVDV varlığında BRSV spesifik klinik bulguların şiddetinin arttığını, BRSV’ye karşı oluşacak immun yanıtın zayıfladığını göstermiştir (Brodersen ve Kelling, 1998; Elvander ve ark., 1998).

1.1. PPRV ve Pestivirus Ortak Enfeksiyonları

PPRV ve BVDV enfeksiyonu aynı anda, literatürde ilk defa Türkiye’de ölü doğmuş iki kuzuda bildirilmiştir (Kul ve ark., 2008). Doğum kanalında ölen kuzulara nekropsi işlemi gerçekleştirilmiş, immunohistokimyasal testler için kesitler alınmış,

deri, dalak, lenf düğümleri, akciğer ve beyinden de virolojik analizler gerçekleştirilmiştir. Nekropside kuzularda deri ve kıl yapısında bozukluklar, serebellar hipoplazi, skoliozis, arthrogripoz, gingival hipertrofi gibi sinirsel ve konjenital anomaliler dışında, böbreklerde, akciğerlerde, kalpte ciddi lezyonlara rastlanmıştır. Kuzularda derinin epidermis tabakasında, böbreklerde, akciğerlerde PPRV antijenleri immunperoksidaz testiyle tespit edilebilmiştir. BVDV antijenlerine ise akciğerlerde, ruminal mukozada, böbreklerde rastlanırken, omurilik serebrokortikal ve motor nöronlarında immunreaktivitenin oldukça güçlü olduğu görülmüştür. Reverse Transcription-Polimerase Chain Reaction (RT-PCR) yöntemiyle de iki virus, dalak ve lenf düğümlerinde tespit edilebilmiştir. Elde edilen bu veriler kuzuların iki virusla da in utero enfekte olduklarını göstermiştir. Özellikle böbreklerde PPRV bulunması virusun fütal kan dolaşımına girdiğini göstermektedir ki, PPRV ile ilgili daha önce vertikal bulaşmayı veya fütal dokularda tespitini bildiren bir başka çalışma bulunmamaktadır. PPRV'nin vertikal bulaşmasının Pestivirusların plasental bariyerde sebep olduğu hücre yıkımıyla gerçekleşebileceğine ek olarak Pestivirusların immunosupresif etkilerinin de bu konuda katkısı olabileceği düşünülmüştür.

Türkiye'de, Karadeniz ve Ege Bölgesi'nde, 2004-2010 yılları arasında ortak PPRV ve BVDV enfeksiyonları tespit edilmesi üzerine bu enfeksiyonların patolojisini ve patogenezini tanımlayabilmek amacıyla iki bölgeden toplamda 11 sürüden, 26 adet (5 aborte fetüs, 19 yeni doğmuş kuzu, 2 yeni doğmuş oğlak) hayvan örneklenmiş ve enfeksiyon yönünden immunohistokimyasal ve RT-PCR teknikleriyle incelenmişlerdir (Toplu ve ark., 2012). Nekropside dil ve dudaklarda lezyonlar, sinir sistemi anomalileriyle karşılaşılmıştır. RT-PCR için, dalak, lenf düğümleri, akciğer, ince bağırsaklar ve beyinden alınan örnekler iki virus için de pozitif sonuç vermiştir. İmmunohistokimyasal inceleme Pestivirus antijeni için merkezi sinir sisteminde güçlü pozitiflik verirken, PPRV de Pestivirus kadar kuvvetli olmasa da pozitif sonuç vermiştir. Beyinden alınan örneklerin bazılarında PPRV RNA'sı da RT-PCR ile saptanabilmiştir.

Bu çalışmayla da bir kez daha PPRV'nin vertikal bulaşmasının mümkün olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca bu çalışma kapsamında PPRV'ye merkezi sinir sistemi

nöron ve glial hücrelerinde rastlanması ilk defa bildirilmiş olup, Pestivirusun plasenta, fetal kan hücreleri, endotelial hücreler, fetal mikroglia ve astrositler üzerinde farklı seviyelerde sitopatik etkiler göstermesi ile fetal beyine ulaşmasının ve kan-beyin bariyerine zarar vermesinin bu duruma zemin hazırlayabileceği ileri sürülmüştür.

Kul ve ark., (2008) tarafından yapılan çalışmada ölü doğan yavruları incelenen ve 33 gebe koyunun bulunduğu sürüde, hayvanların çoğunda PPRV ile ilişkili klinik bulguların bulunuşu ve kuzulama sezonunda 12 koyunun düşük yapması, doğan yavrularda zayıflık ve arthrogripoz gözlenmesi dahası 2 aylıkken ölen, körlük ve inkoordinasyon bulunan bir kuzuda Pestivirus tespiti, ortak enfeksiyonunun önemini gözler önüne sermektedir. Ayrıca Toplu ve ark., (2012) tarafından yapılan çalışmaya göre PPRV ve BVDV enfeksiyonlarına 2004-2010 yılları arasında aşısız sürülerde sıklıkla rastlanmıştır, bu durum, ortak enfeksiyonların özellikle ülkemiz için önemini bir kat daha arttırmaktadır.

1.2. Peste des Petits Ruminants Virus Enfeksiyonu

1.2.1. Genel Bilgiler

Peste des petits ruminants – PPR (Küçük Ruminant Vebası) virusu, özellikle koyun ve keçileri etkileyen, hayvancılıkta artan öneme sahip, akut bir hastalık etkenidir. Hastalık ateş, göz ve burun akıntısı, stomatitis, ishal ve pnömoniyle karakterizedir (Lefevre ve Diallo, 1990). Koyun ve keçilerdeki epidemiler, özellikle gelişmekte olan ülkelerde, enfeksiyondan arî populasyonlarda % 50-80 mortaliteye sebep olabilmektedir (Banyard ve ark., 2010).

Küçük Ruminant Vebası, *Paramyxoviridae* familyasında yer alan bir Morbillivirus tarafından oluşturulmaktadır. PPRV son otuz yıldır küçük ruminant sürülerinde pek çok ciddi epideminin sebebi olarak tanımlanmış olup, 1993'den beri Arap yarımadası, Orta Doğu ve Hindistan'da büyük salgınlara yol açmakta ve bu bölgelerde endemik kabul edilmektedir (Dhar ve ark., 2002). Türkiye'de batı

kesimlerde, Bursa (Yeşilbağ ve ark., 2005), Muğla ve Aydın'da (Toplu, 2004) sık sık virusa ait bildirimler olmaktadır. 2005 yılı boyunca, ülkenin farklı bölgelerinden 78 ayrı salgın kaydedilmiş, hastalığın yayılmasını önlemek için karantina ve aşı uygulamaları yapılmıştır (Tufan, 2006). 2007 yılında Kırıkkale'de ilk ölümcül salgın bildirilmiştir (Kul ve ark., 2007) ki bu virusun ülkenin orta kesimlerine doğru ilerlediğini göstermektedir. Albayrak ve Alkan tarafından da (2009), Orta ve Batı Karadeniz bölgesinde virusun varlığı gösterilmiştir.

PPR virusun bulaşıcılığı virulent izolatların ve ari populasyonların varlığında oldukça artmakta ve bu populasyonlarda ölüm oranı da oldukça yüksek olmaktadır. Bu sebeple çiftlik hayvanları özellikle yakın temas halinde yaşayan koyun ve keçiler salgınlara oldukça duyarlı olmaktadır (Anderson, 1995).

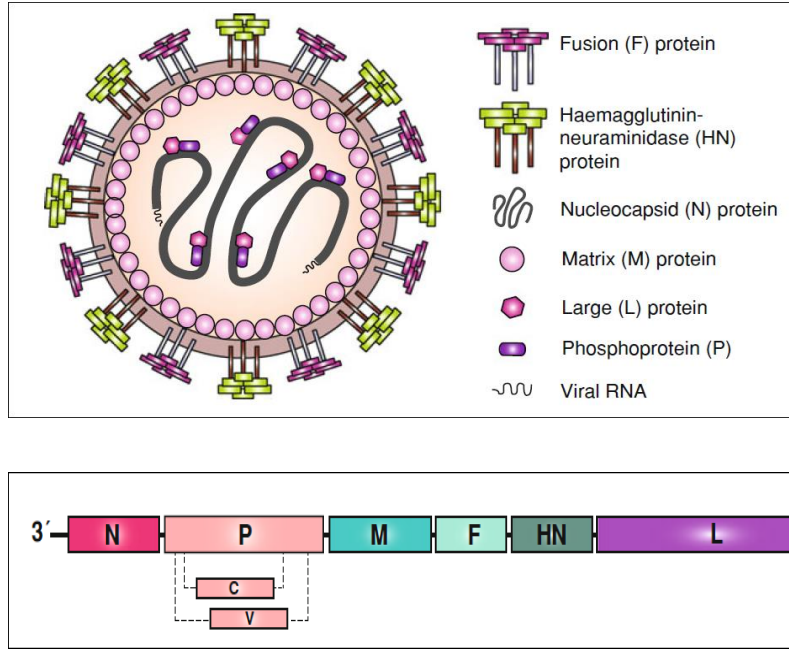
Enfeksiyon etkeninin soy ağacı düzeyinde hat ayrımı, F geninin (Forsyth ve Barrett, 1995) veya N geninin (Couacy-Hymann ve ark., 2002) küçük bir bölgesinin sekansı karşılaştırılarak yapılmaktadır. Son moleküler karakterizasyona göre PPR virus izolatları genetik olarak belirgin dört hatta ayrılmaktadır. Hat 1'de 1970'lerdeki Batı Afrika izolatları ve yakın zamandaki Orta Afrika izolatları; hat 2'de Ivory kıyısından, Gine ve Burkina Faso'dan Batı Afrika izolatları; hat 3'de Sudan, Yemen ve Oman'dan Doğu Afrika izolatları; hat 4'de ise Arap Yarımadası, Orta Doğu, güney Asya ve pek çok Afrika bölgesinden yakın zaman izolatları bulunmaktadır (Shaila ve ark., 1996; Dhar ve ark., 2002; Ozkul ve ark., 2002).

1.2.2. Etiyoloji

Sığır Vebası (RP), Köpek Gençlik Hastalığı, Kızamık ve deniz memelilerini etkileyen Phocine, Porpoise ve Dolphine Distemper viruslarıyla birlikte PPRV, *Mononegavirales* grubunda, *Paramyxoviridae* familyası, Morbillivirus generi içinde sınıflandırılmıştır (Gibbs ve ark., 1979; Barret 2001). PPRV diğer morbillivirüsler içinde antijenik olarak en yakın RPV ile ilişkilidir (Gibbs ve ark., 1979).

Yapısal olarak Morbilliviruslar, *Paramyxoviridae* ailesindeki diğer viruslar gibi hücre zarından köken alan zarf ile birlikte ortalama 400-500 nm büyüklüğünde pleomorfik partiküllerdir. Elektron mikroskop altında, viral proteinle ilişkili RNA genomu, balık sırtı görünümünde helikal bir yapı olarak gözlemlenir ve ribonükleoprotein (RNP) kompleks olarak adlandırılır (Crowley ve ark., 1988). PPRV, 15,948 nükleotid (nt) uzunlukta genoma sahiptir (Bailey et al. 2005).

Morbillivirus partikülleri birçok helikal ribonükleokapsit kopyalarının zarf tarafından paketlenmesiyle oluşur. Genom “altı kuralı”na uyar yani, altı adet devamlı, üst üste binmeyen, kısa intergenik bölgelerle birbirinden ayrılan ve altı yapısal proteini kodlayan, altı transkripsiyon birimine sahiptir (Crowley et al., 1988, Bailey et al., 2005). Sözü geçen altı yapısal protein; RNA’yı saran nükleokapsid proteini (N), viral RNA bağımlı RNA polimeraz (RdRp) diğer adıyla büyük protein (L) ile birleşen fosfoprotein (P), matriks (M) ve yüzey glikoproteinleri olan füzyon (F) ve hemaglutinin-neuroaminidase (HN) proteinleridir. Virusun bu altı proteini dışında iki adet yapısal olmayan proteini vardır. Bu proteinler, P geni açık okuma çerçevesinden farklı mekanizmalarla ifade olan (Bellini ve ark.,1985; Cattaneo ve ark., 1989; Mahapatra ve ark., 2003) C ve V proteinleridir (Şekil 1.1). Morbillivirus genomlarının tam olarak uzunlukları M ve F genlerinin aralarındaki bağlantı bölgesinin uzunluğuna göre değişiklik göstermektedir. Bu bölgenin dikkat çekici boyutta yüksek bir GC içeriği (%65’den fazla) bulunmaktadır, ancak replikasyonda açık bir rolü gösterilmemiştir (Bailey ve ark., 2005). Paramyxovirusların 3’ ve 5’ ifade olmayan bölgeleri (UTR: untranslated region) transkripsiyon ve replikasyon için esansiyel bölgelerdir ve sırasıyla genom promotor (GP) ve anti-genom promotor (AGP) olarak adlandırılırlar (Lamb ve Kolakofsky, 2001). PPR virusta genomun 3’ sonu RNA bağımlı RNA polimeraz (RdRp) için tutunma bölgesidir, N geninin 3’ sonu, 52 nt’lik lider bölge içerir ve 107 nt uzunluktadır. N geni açık okuma çerçevesinden (ORF: open reading frame) önceki bu bölge hem viral RNA sentezi hem de pozitif polariteli antijenom RNA kopyasının üretimi için promotor olarak görev yapar (Bailey ve ark., 2005).



Şekil 1.1. PPRV proteinleri ve yerleşimleri (Munir ve ark., 2013)

1.2.2.1.Replikasyon

Virusa ait HN proteininin konak hücre yüzeyindeki sialik asit ile etkileşime geçmesiyle replikasyon başlar. Yakın zamanda PPRV için SLAM (Signaling lymphocytic activation molecule)'in de ortak reseptör (co-receptor) olabileceği gösterilmiştir (Pawar ve ark., 2008). Bu virus-konak etkileşiminin ardından F proteini ile füzyon gerçekleşir ve nükleokapsit zarftan ayrılır. L proteini daha sonra RdRp olarak görev yapar ve sitoplazmada mRNA transkripsiyonunu başlatır. Diğer negatif polariteli RNA viruslarında olduğu gibi üretilen RNA konak ribozomlarında transle olabilmek için 5' kepleme ve 3' poliadenilasyona uğrar (Munir ve ark., 2013). Primer transkriplerin translasyonu ve viral proteinlerin birikiminden sonra viral RdRp, mRNA transkripsiyonu yapmayı durdurarak yerine tam uzunlukta antijenom RNA üretmeye başlar. Hem GP hem de AGP enkapsidasyon sinyali içerdiği için negatif polariteli RNA gibi bu pozitif polariteli RNA da N proteini ile enkapside olur, bu sebeple tam uzunlukta antijenom sentezi ile N proteini üretiminin birbirine bağlı olduğu düşünülmektedir (Gubbay ve ark., 2001),

Farklı aksesuar proteinlerin RdRp ile etkileşime geçerek, transkriptaz veya replikaz kompleksi oluşturduğu düşünülmektedir (Gupta ve ark., 2003; Kolakofsky ve ark., 2004). Gupta ve ark., (2003) yaptığı çalışmaya göre, transkriptaz kompleksi bazı konak hücre faktörleri ve L-Poligomer ile RdRp birleşiminden oluşur ve N-Poligomer eklenmesinden oluşan replikazdan ayrılır. Kolakofsky ve ark., (2004) tarafından yapılan çalışmaya göre ise transkriptaz kompleks RdRp ile L-Poligomer ve genomik RNA'ya direk bağlanan serbest bir poligomerden oluşurken, replikaz kompleks L-Poligomer ve N-Poligomerin birleşmesinden oluşur.

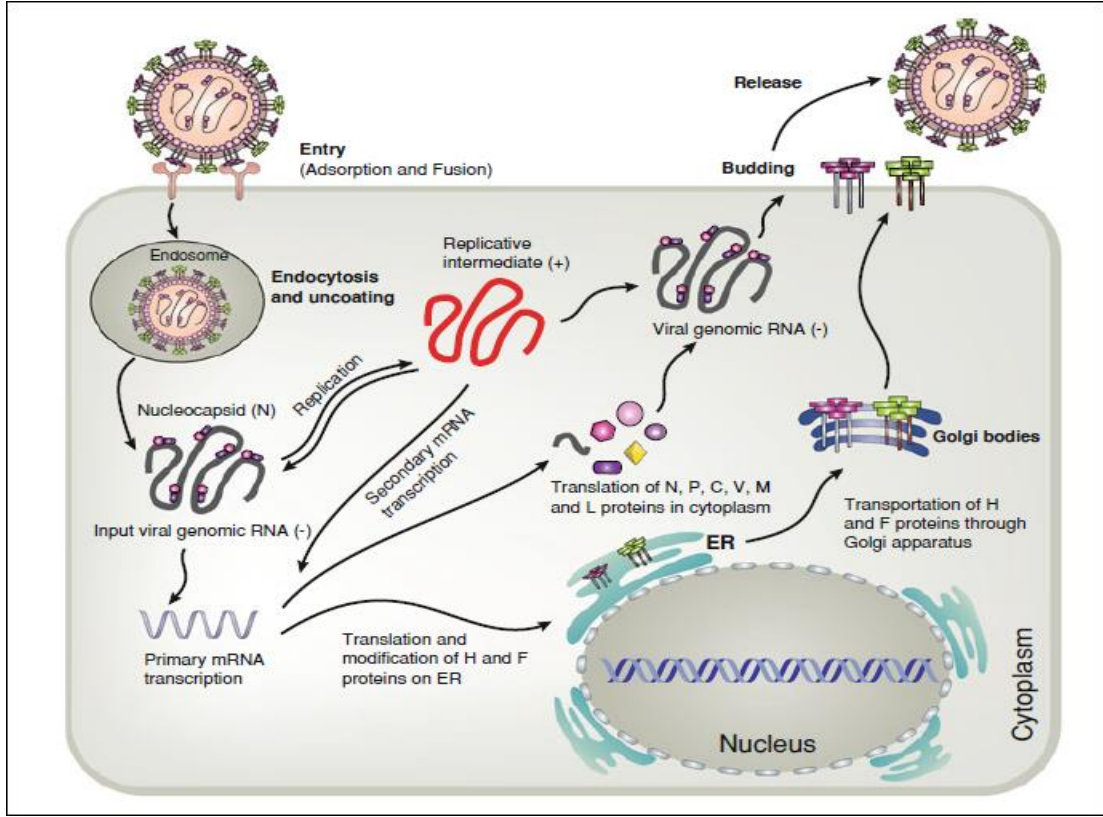
Nükleokapsitin bir araya gelmesi sitoplazmada gerçekleşir. Öncelikle serbest N alt üniteleri genomla birleşir, helikal ribonükleoprotein oluşur, daha sonra P-L protein kompleksi oluşur. Membran proteinleri endoplazmik retikulumda sentezlenir ve olgunlaşır. Golgi aygıtı üzerinden plazma membranına iletilir. Diğer yapısal proteinlerin toparlanması ve tomurcuklanmasında M proteini görev alır, sonrasında saçılım gerçekleşir (Fields ve ark., 2001).

1.2.2.2. Viral Proteinler

1.3.2.2.1. Yapısal Proteinler

1.2.2.2.1.1. N proteini

Nükleokapsit (N) açık okuma çerçevesi (ORF) UAC kodonu (108.nt) ile başlar ve AUU kodonu (1685. nt, pozitif polariteli transkriptte, AUG ve UAA) ile sonlanır. N proteininin tüm *Paramyxoviridae* familyasında benzer RNA enkapsidasyon fonksiyonu vardır. Genoma her 6 nükleotidde (hekzamer birim) bir bağlanarak ribonükleoprotein (RNP) kompleksi oluşturur. N proteini C-terminal rezidüleri P proteinine bağlanmada görev alır (Bankamp ve ark., 1996; Longhi ve ark., 2003; Bourhis ve ark., 2004). Aynı zamanda C-termininal bölgesi, İnterferon Regulatory Factor (IRF-3) gibi hücrel regülatör faktörlerle iletişime geçer. Bu etkileşimler replikasyon için hayati önem taşır. (tenOever ve ark., 2002; Zhang ve ark., 2002; Laine ve ark., 2003).



Şekil 1.2. PPRV replikasyonunu şematik görüntüsü (Munir ve ark., 2013)

N proteini, Paramyxovirüslerde çoğalma siklusunda pek çok aşamada görev alır. M proteini ile birleşmesi virus toparlanmasında, genomik RNA'nın kapsitlenmesinde, replikasyon ve transkripsiyon sırasında P-L polimeraz kompleksi içinde yer alır. N geninin susturulduğu çalışmalarda hem M proteininin hem de viral replikasyonunun 10,000 kat kadar azaldığı görülmüştür (Servan de Almeida ve ark., 2007; Keita ve ark., 2008).

N proteini Ncore (çekirdek) ve Ntail (kuyruk) olmak üzere iki kısma ayrılır. Ncore 420 amino asit uzunluktadır ve nükleokapsit oluşumundaki önemli rolüyle alakalı olarak yüksek seviyede korunmuştur. Ncore içinde 324. rezidüde bulunan dizin N-N birleşmesinde ve N-RNA etkileşiminde görev alır. Ntail ise en az korunmuş bölgedir ve P/P-L polimeraz kompleksle interaksiyona geçer (Kingston ve ark., 2004). Genoma N ve P proteinin bağlanması viral genom toparlanmasını başlatır ve bunu N-

N ve N-RNA etkileşimleri takip eder. En fazla ihtiyaç duyulan ve en fazla transkribe olan mRNA, N proteinine aittir ve genomun N-terminusunda bulunur (Horikami ve Moyer, 1995).

RNA-bağımlı RNA polimeraz tarafından oluşturulan pozitif polariteli transkriptlerin polyadenilasyonundan sorumlu bir poly A bölgesi (1739-1744 nt) N ORF stop kodonundan 52 baz sonra yer alır. Bu dizi (U6GAAUCC) Morbilliviruslarda yüksek oranda korunmuştur ve gen stop ve poliadenilasyon sinyalinin bir parçası olarak işlev görür. Bu sekans U serisinin bir G rezidüsü ile kesintiye uğrayarak UUUGUUUGAAUCC haline geldiği M/F ve F/H kesişimleri hariç tüm PPRV genomu boyunca sürer. Poli U bölgesinin hemen arkasından korunmuş bir triplet (GAA) gelir ki mRNA sentezi sırasında transkribe olmayan ancak viral polimerazın sinyal aktivitesi için gerekli intergenik bir bölgedir. Bu bölgedeki mutasyonlar veya delesyonlar replikasyonu azaltabilir, hatta durdurabilir (Kolakofsky et al., 1998).

1.3.2.2.1.1. P proteini

İntergenik üçlüyü fosfoprotein (P) geni start kodonu takip eder. Bu ikinci transkripsiyon birimi P, C ve V proteinlerini kodlar. P açık okuma çerçevesi 1807. nükleotidde başlar ve 509 amino asit (aa)'lik bir protein oluşturacak şekilde 3336. nükleotide kadar devam eder. P proteini Ribonükleoprotein (RNP) üç bileşeninden biridir ve RdRp için kofaktördür. N ve L proteinlerine bağlanır ve N'yi RNA'ya bağlanabilmek için çözünür formda korur. 1807. aa, aynı zamanda V proteini açık okuma çerçevesinin de başlangıcıdır (Diallo ve ark., 1987; Bolt ve ark., 1995; Baret ve ark., 2006). Fonksiyonel önemi henüz anlaşılamamış olmakla beraber, P proteininde; 151, 307, 348, 361 ve 470. aa'lere denk gelen 5 adet fosforilasyon bölgesi bulunmaktadır. PPRV için diğer Morbilliviruslarla 4 fosforilasyon bölgesi aynıken yalnızca 348. aa serin yerine threonindir (Blom ve ark., 1999). P proteininin aktif formu bir tetramerdir ve fosforilasyon yerine oligomerizasyonun, RdRp kompleks içinde replikasyon ve transkripsiyon aktivitesi için şart olduğu in vitro olarak gösterilmiştir (Rahaman ve ark., 2004).

Paramyxovirusların P proteini C-terminal bölgesi, N proteini C-terminali ile etkileşime geçmek için özel bir domaine sahiptir (Huber ve ark., 1991). N-P protein kompleksi yalnızca sitoplazmada bulunurken, tek başına P proteini hem sitoplazmada hem de çekirdekte bulunur (Huber ve ark., 1991; Gombart ve ark., 1993).

Paramyxoviruslarda P proteininin pek çok fonksiyonu vardır; L-polimeraz komplekste zaruri bir bileşen iken Morbillivirus patojenitesinde anahtar bileşen olduğu düşünülmektedir (Yoneda ve ark., 2004). N-P birleşmesi transkripsiyon ve translasyon regülasyonunda da kilit rol oynar (Johansson ve ark., 2003).

1.3.2.2.1.2. M proteini

Matriks (M) proteini açık okuma çerçevesinde 3438-4442. ntlar arasında yer alır. M geni 3406. nt'de karakteristik AGGA dizisiyle başlar ve AAACAAA dizisiyle biter. Bu gen sonu tüm PPRV suşlarında korunmuştur (Muthuchelvan ve ark., 2006). Paramyxovirus M proteinleri, lipid zarftaki yüzey glikoproteinleri ve virion RNP ile etkileşen basit membran molekülleridir. Matriks proteini viral zarfın iç yüzeyinde bulunup nükleokapsid ile sırasıyla ataçman ve penetrasyondan sorumlu olan virus dış glikoproteinleri HN ve F arasında bağ yapar. Virusun toparlanması ve F ve HN proteinleriyle ribonükleokapsitin bir araya getirilerek tomurcuklanmasında görev alır (Peeples, 1991; Mahapatra et al., 2006). Paramyxovirus ailesinde en korunmuş proteinlerdir. Bu yüksek orandaki korunma büyük ihtimalle M proteininin virion morfogenezindeki önemli göreviyle ilgilidir. M hem nükleokapsitle hem de F ve H glikoproteinlerinin sitoplazmik kuyruklarıyla etkileşir (Baron ve ark., 1994).

1.3.2.2.1.3. F proteini

Füzyon (F) zarf glikoproteini 5526–7166 ntlar arasına yerleşik ORFdan kodlanır. F proteini hem paramyxoviruslar içinde hem de PPRV suşları arasında yüksek oranda korunmuştur. Bu dizin homolojisi paramyxovirusların ortak füzyon özelliklerine de yansır (Dhar ve ark., 2006). F ve H proteinleri çift katmanlı lipid viral zarfa

gömülüdürler ve dışarı doğru çıkıntı yaparlar. Morbilliviruslarda F proteini H proteini yardımıyla memeli hücrelerine virus ve hücre membranını kaynaştırarak nötral pH'da viral penetrasyonu sağlar, sonrasında viral genom konak hücreye girmiş olur (Moll ve ark., 2002; Plemper ve ark., 2002). PPR virusta füzyon proteini hemolizin yapısındadır, hemolizde ve virusun sebep olduğu sitopatojenitede, özellikle dev hücresi (sinsityum) oluşumunda etkilidir (Devireddy ve ark., 1999). Paramyxoviruslar konak hücre enzimleriyle ayrılarak di sülfid bağlı aktif F1-F2 proteini halini alacak inaktif bir prekürsör (F0) oluştururlar, ayrılma bölgesi de korunmuş bir bölgedir. (Lamb and Kolakofsky, 2001). Prekürsör F0; paramyxovirus virulansında kilit moleküler belirleyicilerden biridir. Ayrılması virusun toparlanmasında zorunlu olmasa da viral enfektivite ve patogeneizde ön şarttır (Watanabe ve ark., 1995). F0 proteini Morbilliviruslar arasında oldukça korunmuştur ancak iki hidrofobik bölgesi değişkendir, birinci bölge N-terminal domain proteinleri translasyon için endoplazmik retikuluma getirmekle sorumluyken, ikincisi C-terminal domain proteini membrana sabitlemekle görevlidir (Meyer ve Diallo, 1995).

Paramyxoviruslarda F proteinleri lösin fermuar motifi içerir, PPR virusta 459-480. aa.'ler arasında yer alan bu motif oldukça korunmuştur ve F proteininin oligomerizasyon ve füzyon fonksiyonunu henüz belirlenememiş bir mekanizmayla sağlar (Plemper ve ark., 2001).

1.3.2.2.1.4. HN proteini

Morbilliviruslarda Hemagglutinin (H), PPR virusta Hemagglutinin-Neuroaminidaz (HN) proteini en az korunmuş proteindir (Blixenkron-Moller ve ark., 1996). Bu değişkenlik hücre tropizmi ve HN proteinine yönelik humoral immun yanıtın spesifikliğini yansıtır. Açık okuma çerçevesi, Nijerya 75/1 suşunda 7326–9152. ntlar arasında yer alır (Munir ve ark., 2013). MeV için H proteini hücre tropizminin major belirleyicisi, lapinize RP virusun türler arası patogenizinin temel sebebidir (Yoneda ve ark., 2002). Bu da H proteinin Morbilliviruslarda önemli bir antijenik determinant olduğunu göstermektedir.

Morbilliviruslar içinde yalnızca MeV ve PPRV, H proteininin hemagglutinasyon fonksiyonu bulunmaktadır. PPRV, neuroaminidaz aktivitesi olan tek virustur bu yüzden H yerine, HN proteini sahibidir (Varsanyi ve ark., 1984; Seth and Shaila, 2001).

H proteini ve F proteinleri endoplazmik retikulumun ribozomlarında transle olur, oligomerizasyon da burada gerçekleşir buradan hücre yüzeyine doğru Golgi kompleksi üzerinden hareket ederler (Blain ve ark., 1995; Plemper ve ark., 2001).

1.3.2.2.1.5. L proteini

PPRV genomundaki son ORF 2183 amino asitlik, en uzun (9288–15839. nt), protein olan large (L) proteini kodlar. L proteini viral transkriptaz ve replikazın enzimatik komponentidir. RdRp olan L proteini, genomik RNA'nın transkripsiyonu ve replikasyonundan sorumludur. L proteini Morbilliviruslarda ancak P proteini ile birleşirse polimeraz aktivitesi gösterebilir (Horikami ve ark., 1994). Paramyxovirus L proteinleri multi-fonksiyoneldir, polimerazın aktivitesinin yanı sıra metilasyon, kepleme ve poliadenilasyon aktiviteleri de vardır (Lamb and Kolakofsky, 2001). PPRV L geni başlangıç motifi (AGGAGCCAAG) diğer Morbilliviruslardakine benzer. L proteininin iki fonksiyonu; viral L geni mRNA'sını oluşturma ve kepleme için sinyal bu motifin tanınmasıyla başlar. MeV hariç tüm Morbilliviruslarda L geni başlangıç kodonu ökaryotik hücrelerde translasyonu başlatan "Kozak Dizin" motifiyle bitişiktir [(A/G)CCAUG][(A/G)CCAUG] (Kozak, 1986).

1.3.2.2.2. Yapısal Olmayan - Aksesuar Proteinler

1.3.2.2.2.1. C ve V proteinleri

C proteini P geni açık okuma çerçevesinde ikinci başlangıç kodonundan (82.nt ATG) itibaren transle olur. P proteininin aksine C proteini fosforile değildir ve MeV ile

enfekte hücrelerde hem sitoplazmada hem de çekirdekte bulunur (Bellini ve ark., 1985).

V proteini de P geninden, transkripsiyon sırasında özel bir mRNA editing bölgesine bir Guanin rezidüsü eklenmesiyle, çerçeve kaymasıyla üretilir. Bu RNA editing bölgesi (5'TTAAAAGGGCACAG3') bütün morbilliviruslarda korunmuştur (Mahapatra ve ark., 2003). V proteini P gibi fosforiledir (Blom ve ark., 1999).

Paramyxovirusların C ve V proteinleri yapısal olmayan proteinler olmasına rağmen enfeksiyonda kritik rol oynamaktadırlar. Sığır Vebası virusunda replikasyon için önemli oldukları gösterilmiştir (Baron and Barrett, 2000). C-minus mutantlar in vitro üretimde hasarlar göstermiştir, bu durum mRNA transkripsiyon seviyesinin düşmesiyle ilişkilendirilmiştir. Bunun tersine V-minus mutantlar in vitro üretimde eksiklik göstermemiştir ancak değişen bir sitopatik etki ve artan genom/anti genom RNA üretimine sebep olmuşlardır (Tober ve ark., 1998).

Paramyxoviruların C ve V proteinleri aynı zamanda interferon (IFN) antagonistleri olarak etki gösterirler, hücrel immun yanıtı enfeksiyona çevirirler (Gotoh ve ark., 2001; Horvath, 2004). Yakın zamanda RPV C proteininin, IFN β üretimini inhibe ettiği tespit edilmiştir (Boxer ve ark., 2009). V proteini veya onun sistinden zengin domainini içermeyen rekombinant virusların in vivo olarak üreme zayıflığı gösterdiği belirlenmiş bunun sebebinin V proteininin IFN antagonistisi olmasıyla ilgili olduğu düşünülmüştür (Chambers ve Takimoto, 2009).

1.2.3. Patogenez

PPR virusun bulaşıcılığı oldukça yüksektir, genel olarak yakın temas halinde yaşayan hayvanlar arasında sekretler ve ekskretlerle direk temas ve aerosoller aracılığıyla bulaşır (Lefevre ve Diallo, 1990; Ezeibe ve ark., 2008). Hastalığın zaman zaman keçilerde daha ciddi bir seyre sahip olduğu söylene de yapılan çalışmalar, koyun ve keçilerde artan bir duyarlılıktan bahsetmektedir ve koyun-keçi popülasyonlarını etkileyen salgınlarla eşit derecede karşılaşılmaktadır (Roeder ve ark.,1994; Taylor

2002; Singh ve ark., 2004; Wang ve ark., 2009). Ancak bazı salgınlarda koyunlarda hastalık yüksek morbidite ve mortaliteyle seyrederken, keçilerin etkilenmediği görülmüştür (Yeşilbag ve ark., 2005). Bu değişkenliğin sebebi bilinmemektedir, ancak hem virus genomlarının hem de konak hayvan türlerinin etkili olduğu düşünülmektedir. Aynı cins koyunlarda farklı PPRV suşlarının farklı virulens gösterdikleri (Couacy-Hymann ve ark., 2007) ve aynı virusa farklı soylardan keçilerin değişen duyarlılıkları (Diop ve ark., 2005) deneysel olarak gösterilmiştir.

PPRV'nin bulaşıcılığı virulent izolatların ve ari popülasyonların varlığında oldukça artmakta ve bu popülasyonlarda ölüm oranı da oldukça yüksek olmaktadır. Bu sebeple çiftlik hayvanları özellikle yakın temas halinde yaşayan koyun ve keçiler salgınlara oldukça duyarlı olmaktadır (Kitching, 1988; Anderson, 1995). Virusun tek bir serotipi olmasına rağmen virulens, suştan suşa farklılık göstermektedir. Sıklıkla semptomlar, ikincil bakteriyel enfeksiyonlar ile karıştığı veya daha kötü duruma geldiği için PPRV karakterizasyonu, teşhisi ve tedavisi zor olan bir hastalıktır (Couacy-Hymann ve ark., 2005).

Enfeksiyonu takiben, virusun kan ve lenf yoluyla primer viral pnömoniye sebep olduğu akciğer de dâhil diğer doku ve organlara yayılmadan önce, oro-farengeal lenf nodlarında replike olduğu 3-4 günlük bir inkubasyon periyodu bulunur. Pnömoni sıklıkla sekonder bakteriyel enfeksiyonlarla birleşir ki bu genelde hastalığın temel patolojisidir. Diğer klinik bulgular genellikle mukopurulent göz ve burun akıntısı, konjunktivit, nekrotik stomatit ve şiddetli ishaldir (Gibbs et al., 1979).

Hastalık genellikle akut gelişen ve seröz göz ve burun akıntılılarıyla karakterizedir. Ateş, özellikle ağızda olmakla birlikte mukoz membranlarda erosiv lezyonlar, ishal gözlemlenmektedir. Hastalık pis kokulu bir solumaya sebep olan pnömoniyle karakterizedir. Oluşum mekanizması henüz anlaşılmamış olmakla birlikte bazı türlerde hastalığın asemptomatik seyredebildiği bilinmektedir (Bidjeh et al., 1995). Çoğu ölümcül enfeksiyonda ölüm primer viral bronkopnömoniye veya ishal sebepli ağır dehidrasyona bağlı oluşur. Gebe hayvanlarda enfeksiyon nadiren de olsa abortlarla ilişkilendirilmektedir. Bu durumun önemi ve oluşumundaki etkili mekanizmalar henüz bilinmemektedir (Abubakar et al., 2008). Morbillivirus

genusundaki bütün virusların, nörovirulanslar değişmekle birlikte, merkezi sinir sisteminde enfeksiyona sebep olabileceği gösterilmiştir (Galbraith ve ark., 2002). Nörovirulansın şiddeti konak bağışıklığına, reseptörlerin spesifikliğine ve sinir sistemi enfeksiyonunun ölçüsüne bağlıdır (Cosby ve ark., 2002; Kennedy ve ark., 1989; Yarım ve Kabakçı, 2003).

PPR virusun meningeal makrofajlar ve endotel hücrelerde tespiti, serobrospinal sıvıda da bulunabileceğini düşündürmüştür (Kul ve ark., 2007) ancak koyun ve keçilerde bugüne kadar enfeksiyon sırasında sinirsel bir bulgu gözlenmemiştir.

1.2.4. İmmunopatogenez

Morbilliviruslar yüksek seviyede immunosupresiftir. PPRV'nin lenfotropik yapısı lenfopeni oluşturarak immunosupresyona sebep olur (Kumar ve ark., 2001). PPRV'nin lökopeni, lenfopeni, ve spesifik ve non-spesifik antikor yanıtta düşüşe sebep olabildiği gösterilmiştir (Rajak ve ark., 2005). Morbillivirusların bağışıklık sistemini uyardırma ve düzenlemede görevli sitokinler üzerinde de değişen etkileri olduğu yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. MeV, V proteininin tip I interferon (IFN) sinyallerini inhibe ettiği gösterilmiştir (Caignard ve ark., 2009). RPV de ise C proteininin, tip I IFN indüklenmesini bloke ettiği belirlenmiştir (Boxer ve ark., 2009). Bu virus P proteini de tip I IFN sinyalini inhibe eder, ancak IFN sinyalini baskılayan temel protein V proteindir (Nanda ve Baron, 2006). Yakın zamanda yapılan bir çalışma ile de doğal olarak PPRV ile enfekte olan hayvanlarda ağız boşluğu, dil ve akciğer epitellerinde IFN gamma (γ)'nın yüksek seviyede indüklendiği gösterilmiştir (Atmaca ve Kul, 2012).

1.3. Ruminant Pestivirus Enfeksiyonları

1.3.1. Genel Bilgiler

Ruminant Pestivirusları; Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) ve Border Disease Virus (BDV), tüm dünyada ruminantları etkileyen oldukça önemli patojenlerdir (Nettleton ve Entrican, 1995). Bu virusların da içinde yer aldığı Pestivirus genusu çift tırnaklı hayvanları enfekte eder. Temelde sığır, koyun-keçi ve domuzları etkileseler de, yabani ruminantlar da enfeksiyon spektrumunda yer almaktadır (Anderson ve ark., 1998; Loken 1991; Paton ve ark., 1992). Koyunlardan sığırlara bulaşma bildirilse de hastalığın temel bulaşma yolunun sığırlardan diğer türler yönünde olduğu düşünülmektedir (Vilcek ve ark., 2000; Graham ve Calvert, 2001).

İlk defa 1946 yılında tanımlanan BVD virus, sığır popülasyonlarında en yaygın viruslardan biridir (Olafsn ve ark., 1946; Peterhans ve ark., 2010). Virusun iki tip enfeksiyon oluşturabilen, iki ayrı biyotipi vardır; biyotipler hücre kültürlerinde apoptozisi indüklemeye yetilerine göre sitopatik (cp) ve non-sitopatik (ncp) olarak isimlendirilirler (Corapi ve ark., 1988). Biyotiplerin isimleriyle sahadaki patojeniteleri paralel değildir, ncp suşlar gebeliğin ilk üçte birinde fötuslarda persiste enfeksiyon oluşturabilmekte ve immunotolerans gelişen bu hayvanlarda yaşamlarının ilerleyen dönemlerinde mukozal hastalık (MD) sebebiyle ciddi gastrointestinal bulgular ve ölümler gözlenmektedir (Roeder ve Drew, 1984). Yalnızca ncp suşların persiste enfeksiyon meydana getirebilme özelliği, doğal immun yanıtta sorumlu tip I IFN yanıtından kaçabilmesiyle, cp suşların ise IFN yanıtını tetiklemesiyle açıklanmıştır (Brownlie ve ark., 1989; Charleston ve ark., 2001; Peterhans ve ark., 2003). Sitopatojenite yapısal olmayan NS2/3 proteinini kodlayan bölgede oluşan insersiyon, duplikasyon gibi genetik değişimler sonucu gelişmektedir (Kummerer ve ark., 2000). BVDV ayrıca tip 1 ve tip 2 olmak üzere iki genotip olarak da sınıflandırılır (Pellerin ve ark., 1994; Ridpath ve ark., 1994). Genotip II'deki suşlar şiddetli akut salgınlara, hemorajik hastalığa sebep olabilmektedir (Ellis ve ark., 1998; Odeon ve ark., 1999; Ridpath ve ark., 2000).

BDV tarafından oluşturulan Border Disease ise ilk defa 1959'da İngiltere'de sınır bölgesinde tespit edildiği için bu isimle adlandırılmıştır. Bugün Avrupa- Asya ve

Japonya’da hastalıkla ilgili bildirimler olmaktadır (Hughes ve Kershaw, 1959; Oğuzoğlu, 2012). Klasik Domuz Vebası Virusunu (CSFV) ve BDV saha suşları çoğunlukla non-sitopatojeniktir (Meyers ve Thiel, 1996).

BVDV, küçük ruminantları ve sığırları enfekte edebilirken, BDV küçük ruminantları, sığırları ve domuzları enfekte edebilmektedir (Carlsson 1991; Schirmer ve ark., 1999; Rasmussen ve ark., 2010;). Sığırlarda ve koyunlarda persiste enfeksiyon ve MD gözlenmektedir (Hilbe ve ark., 2009) ancak gebe keçilerde BDV, BVDV-1 ve BVDV-2’nin abortlara, ölü doğumlara yol açtığı tespit edilse de (Depner ve ark., 1990; Loken ve ark., 1991) persiste enfeksiyon veya MD bildirilmemiştir.

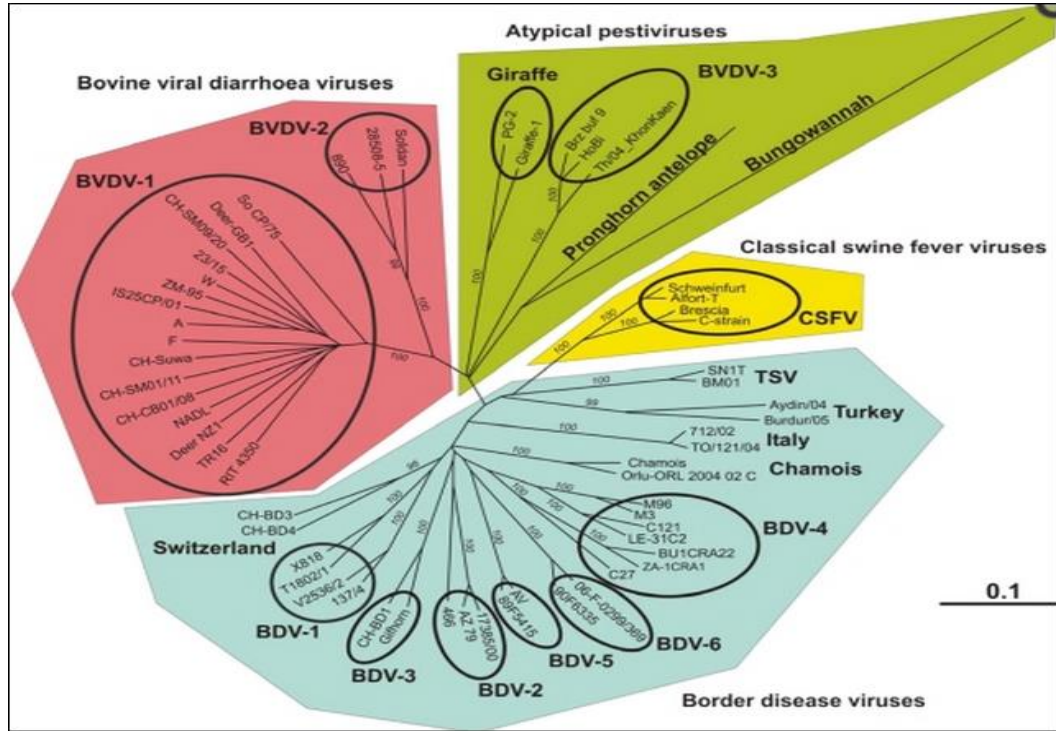
Türkiye’de Pestivirus varlığı ile ilgili bildirimler oldukça sık ve hemen hemen bütün bölgelerle ilgili olarak yapılmıştır (Alkan ve Burgu, 1993; Burgu ve Ozkul, 1993; Burgu ve ark., 2001; Ak ve ark., 2002; Ataseven ve ark., 2006; Yeşilbağ ve Güngör, 2008; Oğuzoğlu ve ark., 2010; Albayrak ve Özan, 2012; Yılmaz ve ark., 2012).

1.3.2. Etiyoloji

BVDV ve BDV, CSFV ile birlikte, *Flaviviridae* familyası içinde, Pestivirus genusunu oluşturur (Pletnev ve ark., 2011). Aynı familyada Tick-Borne Encephalitis Virus, Japanese Encephalitis Virus ve Hepatitis C Virus gibi oldukça önemli insan patojenleri de bulunmaktadır (Liu ve ark., 2009; Shepard ve ark., 2005). *Flaviviridae* familyası üyeleri genomik organizasyon ve temel moleküler biyolojik özellikleri açısından birbirine benzerdir (Lindenbach ve ark., 2007). Pestivirus taksonomisinde sürekli değişiklikler meydana gelmekle birlikte bugün için resmi olarak dört tür bu genusa dâhil edilmiştir (Şekil 1.3). Bunlar; BVDV-1 ve 2, CSFV ve BDV’dir, ayrıca bu genusta atipik suşlar da bulunmaktadır (Becher ve ark., 2003).

Pestiviruslar; Flaviviridae familyasındaki diğer viruslar gibi konak hücreden köken alan lipid zarfa sahip, tek iplikçikli (ss), pozitif polariteli RNA viruslarıdır. Genomları da diğer flaviviruslara benzer biçimde; iki ucunda keplenmemiş ve poliadenilasyona uğramamış ve viral replikasyon ve translasyon için esansiyel cis-

acting elemanlarını içeren 5' ve 3' untranslated region (UTR) bulunan tek bir açık okuma çerçevesine sahiptir (Peterhans ve ark., 2010). Genom 3' sonunda poly C kuyruğuna sahiptir. Pestiviruslarda en fazla nükleik asit dizin benzerliği 5' UTR bölgesinde bulunur (Ridpath ve Bolin, 1997). Pestiviruslar, Flaviviridae familyasındaki diğer viruslardan farklı olarak iki proteine sahiptirler, bunlar yapısal olmayan Npro ve Erns'dir.



Şekil 1.3. N^{pro} temel alınarak Pestivirusların Filogenetik Analizi ve Sınıflandırması (Peterhans ve ark., 2010)

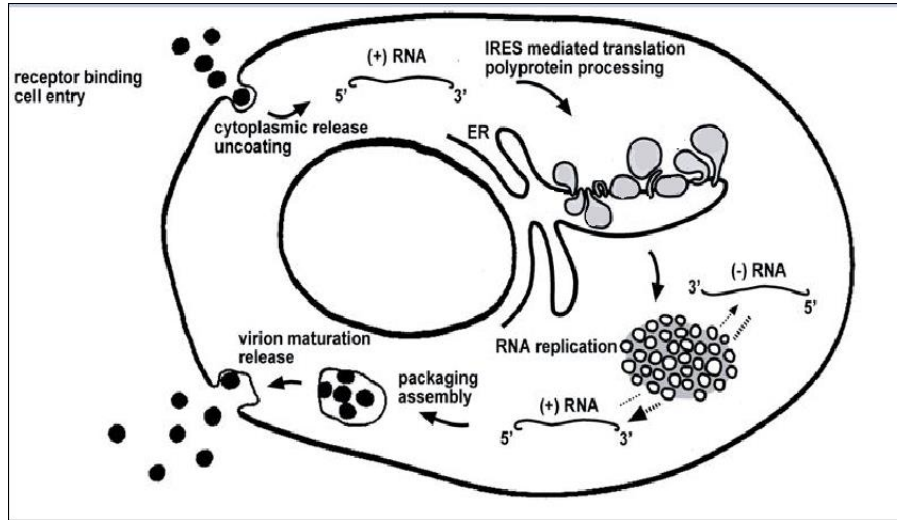
Pestivirus virionları küre biçiminde, 40-60 nm çapında, virusa ait C proteininden ve genomik RNA'dan oluşan merkezi bir kapside sahiptir. Erns, E1 ve E2 proteinleri çift katlı lipid zarf ile bağlantılıdır. Virionu çevreleyen zarf yüzük benzeri çıkıntılar yapan, pleomorfik bir yapıya sahiptir (Heinz ve ark., 2000).

1.3.2.1. Replikasyon

Çoğalmanın ilk aşamasında spesifik konak hücre resptörlerine bağlanma, viral zarfın ve hücre zarının pH bağımlı füzyonuyla virusun hücre içine girişi gerçekleşir (Hulst ve Moorman, 1997). Genomik RNA, endositozu takiben ayrılır ve mRNA olarak görev yapar. Translasyonun başlaması keplenmeden bağımsız internal başlatma mekanizması aracılığıyla gerçekleşir. Bu mekanizma internal ribozom giriş bölgesi (IRES: Internal ribosome entry site) gerektirmektedir. Pestiviruslarda 5' UTR bölgesi bu bölgeyi içerir (Deng ve Brock, 1993). Pestivirusların IRES yapısı hücrede ribozomal 40S alt ünitesine bağlanırlar. 5' UTR bölgesinde yer alan ikincil bu yapının viral RNA'nın translasyon için kalıpken, replikasyon için kalıp haline dönüşmesini sağladığı düşünülmektedir (Yu ve ark., 2000). Ancak bu fonksiyonun yalnızca IRES'e spesifik olmadığı, bazı regülatör proteinlerin de viral genom veya viral ve konak translasyon kompleksleriyle etkileşerek translasyondan replikasyona geçişi sağlayabildiği gösterilmiştir (Li ve McNally, 2001).

Genomun replikasyonu, translasyonu takiben konak hücrede endoplazmik retikulumun sitoplazmik kısmında gerçekleşir (Zhang ve ark., 2003). Viral RNA, hücresel bileşenler ve yapısal olmayan viral proteinler birlikte genomun 3' sonunda fonksiyonel bir replikaz kompleks oluşturur ve pozitif polariteli RNA'nın tam uzunlukta negatif polariteli komplementer RNA oluşturan transkripsiyonunu katalize eder. Komplementer RNA, replikaz kompleks için kalıp görevi görür ve yarı korunaklı, asimetrik bir replikasyon modeliyle ek pozitif polariteli RNA molekülleri sentezlenir (Gong ve ark., 1996 ve 1998). Bu model, çift iplikçikli (ds) replikatif form, kısmen ss, kısmen ds replikatif ara form ve ss viral RNA olmak üzere, üç virus spesifik RNA içerir (Warrilow ve ark., 2000). İplikçiklerin uzaması, replikatif ara formdan ayrılan viral polimerazla gerçekleştirilir. BVDV virionlarının golgi cisimciği veya endoplazmik retikulumda hücre içi veziküllerde olgunlaştığı düşünülmektedir. Virus olgunlaşması ve hücre yüzeyine taşınması konak hücre enzimleri ve süreçleri aracılığıyla gerçekleşir (Zitzmann ve ark., 1999; Durantel ve ark., 2001).

Olgunlaşmış virionlar endoplazmik retikulumun kesesine tomurcuklanır ve ekzositozla saçılırlar (Grummer ve ark., 2001). Replikasyon şematik olarak Şekil 1.4'de gösterilmiştir.



Şekil. 1.4. Pestivirus replikasyonunun şematik gösterimi. (Karami ve ark., 2006)

1.3.2.2. Viral Proteinler

Tek bir açık okuma çerçevesinden transle olan bir poliprotein, en az 11 adet viral protein oluşturacak proteolitik sürece tabi kalır (Meyers ve Thiel, 1996). Poliprotein proteolitik sürecinde hem konak hücreye ait hem de viral enzimler görev alır (Fields ve ark., 2001). Açık okuma çerçevesinin iki yanında kalan 3' ve 5' UTR bölgeleri oldukça korunmuş bölgelerdir, bu durumun bu bölgelerde pozitif polariteli iplikçığın sentezi, translyasyon ve viral genomun paketlenmesi için özel bölgeler içerdiğine işaret ettiği düşünülmüştür (Becher ve ark., 2000). Lindenbach ve ark., (2007) bu bölgelerdeki cis-acting faktörlerin viral replikasyon ve translyasyonda esansiyel olduğunu tespit etmiştir.

5' UTR, translyasyon ve replikasyonda görev alan IRES'i kodlamaktadır. Genomun 5' sonunda yer alan iki stem-loop yapısının ve N^{P_{ro}} bölgesini kodlayan nükleotidlerin verimli RNA replikasyonu için şart olduğu gösterilmiştir (Yu ve ark., 2000). Genomun bu kısmında BVD virusta, 4 adet ek nükleotidin replikasyon için esansiyel

bir sinyal içerdiği belirlenmiştir (Yu ve ark., 2000). BVDV, BDV, CSFV suşları arasında Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile ayırım 5'UTR bölgesinde yüksek oranda korunmuş dizinler üzerinden yapılmaktadır (Hofmann ve ark., 1994; Vilcek, 1994).

3' UTR bölgesi de iki saç tokası halka yapısını biririnden ayıran, negatif iplikçik sentezi ve replikasyon için kritik tek iplikçikli bir bölge dahil olmak üzere hayati öneme sahip pimer ve sekonder yapılar içerir (Fields ve ark., 2001; Yu ve ark., 1999).

Poliproteinde bulunan, yapısal ve yapısal olmayan proteinler sırasıyla; N^{pro}-C-E^{ms}-E1-E2-p7-NS2/3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B Şekil 1.5'te gösterilmiştir. C ve Npro, E1 ve E2, E2 ve p7 arasındaki ayrılmalar hücrel sinyal peptid peptidaz ve sinyal peptidazlarıyla gerçekleşir (Rumenapf ve ark., 1993; Stark ve ark., 1993; Elbers ve ark., 1996; Heiman ve ark., 2006).

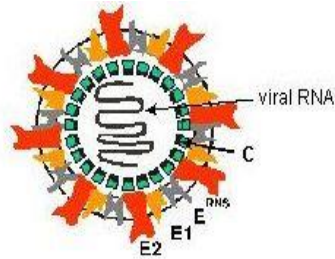
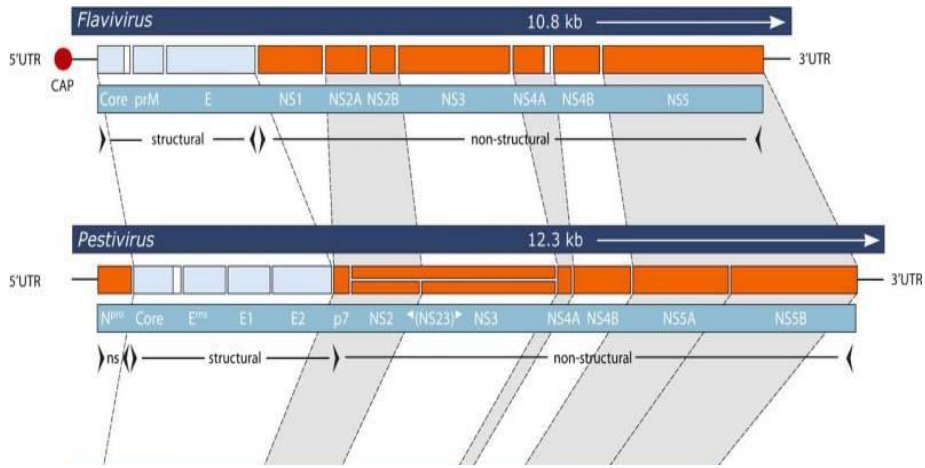
1.3.2.2.1. Yapısal Proteinler

Olgun proteinlerden virionla ilişkili olanlar; C, E^{ms}, E1 ve E2'dir. C, nükleokapsid proteinidir. Oldukça basit yapılıdır ve Pestiviruslar içinde nispeten genetik olarak korunmuştur. C terminusunda yapısal proteinlerin endoplazmik retikuluma taşınmasını yöneten internal sinyal sekansı bulunur (Heinz ve ark., 2000).

E^{ms} proteini glikolizedir ve disülfid bağlı homodimerler oluşturur (Weiland ve ark., 1990). Ribonükleaz aktivitesine sahiptir. Virusun bağlanmasında E2 ile birlikte görev aldığı düşünülmektedir (Iqbal ve McCauley, 2002). RNaz aktivitesi, yapısal bir viral glikoprotein için özgün bir özelliktir ve konağın doğal immun yanıtını değiştirdiği düşünülmektedir (Schneider ve ark., 1993; Iqbal ve ark., 2004).

E1 ve E2 proteinleri membrana yayılan domainler içerir ve bunlar glikolizedir, heterodimerler oluşturmak üzere etkileşim gösteren integral membran proteinleri oldukları düşünülmektedir (Weiland ve ark., 1990). E2 immunodominant yapısal proteindir ve nötralizan epitoplar içerir. Özellikle BVDV suşları arasında E2

antijenik varyasyonları aşı başarısızlıklarıyla sonuçlanmaktadır (Ridpath ve ark., 2000; Van Campen ve ark., 2000). Ayrıca BVD virusun oldukça farklı hücre kültürlerini enfekte edebilmesi, doku ve tür tropizmi de E2 zarf glikoproteini ile ilişkilendirilmiştir (Liang ve ark., 2003). Konak immun sisteminden kaçışta da görev alması muhtemel bir proteindir (Ridpath, 2003). Önceleri E2'nin füzyondan da sorumlu olduğu düşünülürken yeni çalışmalar böyle bir özelliğe sahip olmadığını onun yerine E1 proteininin füzyonu sağladığını belirtmektedir (El Omari ve ark., 2013).



Şekil 1.5. Pestivirusun proteinleri. (Peterhans ve ark., 2010; Ashley, 2007)

1.3.2.2.2. Yapısal Olmayan Proteinler

Pestivirus ORF'dan kodlanan ilk protein N^{pro}'dur. Pestivirus genusuna spesifik olan bu protein bir otoproteazdır, kendisini poliproteinden ayırır. Replikasyon için gerekli

olmadığı tespit edilmiştir (Tratschin ve ark., 1998). Ancak viral persistansın sağlanması ve devamında, büyük ihtimalle doğal immün sistem üzerindeki etkisi sayesinde çok önemli bir rol oynamaktadır (Baigent ve ark., 2002; Schweizer ve ark., 2006; Meyers ve ark., 2007).

Bir sonraki yapısal olmayan protein, p7'dir (viroporin) ve poliproteinde E2'yi takip eder (Elbers ve ark., 1996). Hücre ilişkili bu proteinin, RNA replikasyonunda değil ancak infeksiyöz virus partikülü oluşturmada görev aldığı düşünülmektedir (Harada ve ark., 2000).

Poliproteinde p7'yi takip eden NS2-3, bir serin proteazdır. Sitopatik suşlarda, NS2-3, NS2 ve NS3'e ayrılır. Serin proteaz aktivitesi NS3 kısmında kalır (Tautz ve ark., 1997a). NS2 proteininde zinc-finger motifleri ile homoloji gösteren dizinlerin bulunması DNA bağlama fonksiyonu olabileceğini düşündürmektedir (De Moerlooze ve ark., 1991). NS2 sistin proteaz domaini içerir ve NS2 ve NS3 arasındaki ayrılmayı katalize eder (Lackner ve ark., 2004). Hem NS2-3 hem de NS3 diğer yapısal olmayan proteinleri poliproteinden ayırırlar (Tautz ve ark., 1997a). Pürifiye edilmiş NS3'ün, virusun aktif hale geçebilmesi için esansiyel olan RNA helikaz ve RNA-uyarıcılı NTPaz aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir (Warrener ve Collett, 1995; Gu ve ark., 2000).

NS4A ve NS4B büyüklük, bileşim ve hidrofobik yapıları ile flavivirus familyası üyelerinde benzerlik gösterirler. NS4A, NS2-3 veya NS3'ün serin proteaz aktivitesinde ko-faktördür. NS4B ve NS5A'nın, replikaz kompleks bileşenlerinden oldukları düşünülmektedir (Lindenbach ve Rice, 2001).

NS5B, viral RNA bağımlı RNA polimerazdır (Zhong ve ark., 1998; Steffens ve ark., 1999). Ancak genom amplifikasyonu için NS3, NS4A, NS4B, NS5A ve NS5B'nin ortak işlev göstermesi gereklidir (Behrens ve ark., 1998; Grassman ve ark., 2001).

1.3.3. Patogenez

Pestivirusların bulaşmasında Persiste Enfekte (PI) hayvanlarla direkt temas en etkili yoldur. Primer olarak enfekte olan hayvanlarda virus saçılımı ve bu yolla bulaşma oranı oldukça düşüktür (Niskanen ve ark., 2000). Sitopatojenik suşlar genellikle gastrointestinal kanalda ve ovaryumda replike olurken, non-sitopatojenik suşlar, lökositler, lenfoid dokular, parotis bezi, proksimal kolon ve solunum yolu epitel hücrelerine affinite gösterir (Greiser-Wilke ve ark., 1993; Grooms ve ark., 1998).

Ruminant Pestiviruslarıyla oluşan post natal enfeksiyonun seyri genellikle hayvanın gebe olup olmasına ve daha önce bu enfeksiyonu geçirmesine bağlıdır. Genel olarak sığırlarda normal bir immun yanıtla enfeksiyon seyretti ise hayat boyu bağışıklık ve gelecekteki gebelikte fetal korunma oluşur (Moerman ve ark., 1993).

Gebe ve bağışık hayvanlarda çoğunlukla enfeksiyon subklinik seyreder (Houe, 1999), ancak nadiren genotipe veya suşa bağlı olarak şiddetli enfeksiyon da oluşabilir (Pellerin ve ark., 1994; Hamers ve ark., 2000). Virus lökopeni ve trombositopeniye sebep olur. Ateş, mukozal dokularda lezyonlar, solunum ve gastrointestinal sistem semptomları gözlemlenir (Potgieter ve ark., 1997). Erkeklerde sperm kalitesinde düşüş de bildirilmiştir, ayrıca sperm yoluyla bulaşma da söz konusudur (Voges ve ark., 1998).

Bağışık olmayan gebe hayvanlarda, virusun hızlı bölünen hücrelere tropizm göstermesi sebebiyle fetus replikasyon için öncelikli bölgedir. Enfeksiyonun sonuçları gebeliğin dönemine göre değişmektedir. Abortlar gebeliğin her döneminde gelişebilir, gebeliğin ilk 1/3'lük döneminde fetus immunkompeten hale gelmeden persiste enfekte olur (Lindberg, 2003). PI hayvanlarda virusa karşı antikor yanıt oluşmaz (Bruschke ve ark., 1998). Bu hayvanlarda genel olarak immun yanıtta bozukluk sebebiyle sekonder enfeksiyonlara da duyarlılık görülür (Potgieter ve ark., 1995). Eğer fetal enfeksiyon fetus immunkompeten hale geldikten sonra gelişirse, virusa özgül antikor üretimi olmasına karşın postnatal dönemde gelişme geriliği ve diğer enfeksiyonlara duyarlılık gözlenir (Moennig ve Liess, 1995). Bu durumun da sürekli IFN uyarımından kaynaklandığı düşünülmektedir (Smirnova ve ark., 2008; Shoemaker ve ark., 2009).

Son bulgulara göre persistans için anahtar oyuncular; doğal immun sistemi manipüle eden E^{ms} ve N^{pro}, kazanılmış bağışıklık sisteminden fütusta oluşan spesifik immuntolerans yoluyla kaçış ve ncp biyotipte sınırlı replikasyon oranıdır (Becher ve Tautz, 2011). Sonuç olarak PI hayvanlar vücut sıvıları ve dışkılarıyla tüm hayatları boyunca virüsü saçarlar. Bu hayvanlarda 1-2 yıl etkili viral replikasyonun sonrasında Mukozal Hastalık (Mucosal Disease-MD) oluşabilir. Akut, 2 gün – 3 hafta arası sürebilen MD tablosu ölümcüldür. Ateş, anoreksi, gastrointestinal yollar boyunca yaygın mukozal lezyonlar, yüksek miktarda ishal, ölüme sebep olur (Baker, 1995). Bu ölümcül hastalığın tetikleyicisi PI hayvanlarda cp biyotipin belirmesidir (Moenning ve ark., 1990). Antijenik olarak benzer bir cp suşu bu durumun oluşmasını sağlayabilir ancak genellikle cp biyotip PI hayvanda mutasyon (RNA rekombinasyonu) yoluyla, de novo oluşur (Meyers ve ark., 1992). Sitopatojen Pestivirus suşlarının moleküler analizleri, delesyonlar, viral sekansların insersiyonları, viral ve çeşitli hücresel protein kodlayan sekansların duplikasyonları gibi çok çeşitli genomik değişiklikleri ortaya koymuştur. Bu genomik düzenlemelerin hemen hemen hepsi homolog olmayan RNA rekombinasyonları sonucu oluşur (Becher ve Tautz, 2011). Pestiviruslarda bütün hücreden kaynaklanan insersiyonlar protein kodlayan mRNA'lerden oluşur, sıkça ubiquitin kodlayan sekanslar olmakla birlikte, en az sekiz farklı hücresel mRNA fragmanı cp genomlara dahil olur (Tautz ve ark., 1997b; Meyers ve ark., 1998; Becher ve ark., 1999). Sitopatojen biyotiple enfekte hücrelerde yüksek miktarda serbest NS3 en önemli ayırıcı özelliktir (Pocock ve ark., 1987). RNA rekombinasyonu ile oluşturulan cp viruslar, artmış NS3 sebebiyle viral RNA replikasyonu üzerindeki sınırlayıcı etkinin kalkmasıyla karakterize edilir (Meyers ve ark., 1996; Becher ve ark., 2001). Yakın zamanda NS3 ve viral sitopatojenite arasında daha net bir ilişki olduğu ortaya çıkmıştır; NS2-3'te olmayan serbest NS3'ün sahip olduğu serin proteaz aktivitesi apoptozise yol açmaktadır (Gamlen ve ark., 2010).

1.3.4. İmmunopatogenez

Pestiviruslar pek çok hücre tipi ve dokuyu enfekte edebilirken, genellikle T hücreleri, B hücreleri, monositler, makrofajlar, nötrofiller ve dendritik hücreler olmak üzere immun sistem hücrelerine tropizm gösterirler ve fonksiyonlarını bozarlar (Sopp ve ark., 1994; Glew ve ark., 2003). BVD virusun, kemik iliği, timüs, peyer plakları, dalakta immun sistem hücrelerini etkilediği ve immunsupresyona yol açtığı tespit edilmiştir (Kapil ve ark., 2005). Hem doğal hem de deneysel enfeksiyonlar, diğer enfeksiyöz ajanlarla ilişkisinde, BVD virusun immunsupresyonu uyardığını göstermiştir. Lenfosit ve nötrofil fonksiyonlarındaki bozukluk, dokulardaki immun hücrelerde düşüş ve sirkülasyonlarındaki azalma immunsupresyona katkıda bulunmaktadır (Potgieter, 1995). BVDV enfeksiyonu nötrofillerde sitotoksositeye (Potgieter, 1995), monositlerde apoptozise (Glew, 2003), alveolar makrofajlarda fagositozda düşüşe sebep olur (Peterhans ve ark., 2002). Alveolar makrofajların enfeksiyonu lipopolisakkarit uyarıcı prokoagulan aktiviteye sebep olur ki bu da bakteriyel kolonizasyona yol açar ve akciğerlerin savunma mekanizmasını bozar (Olchoway ve ark., 1997).

Antijen sunan hücreler (dendritik hücreler, makrofajlar ve monositler) viral antijeni içlerine alırlar ve yardımcı T hücrelerine, IFN γ ve İnterlökin (IL-12) yardımıyla sunarlar. Ancak bu hücrelerin BVDV ile enfekte olması fagositik aktivite için gerekli olan reseptörlerde azalmaya sebep olur (Welsh ve ark., 1995; Adler ve ark., 1996). Aynı zamanda monositlerin de antijen sunma yetisinde de düşüş gerçekleşir (Glew ve ark., 2003).

Yalnızca ncp biyotip viruslar oluşan genetik değişimler sonucu doğal bağışıklık sistemi üzerindeki kontrol yeteneğini kaybederek interferon alfa/beta üretimini indüklerler (Schweizer ve Peterhans, 2001, Baigent ve ark., 2002; Gallei ve ark., 2008). Sitopatojen olmayan suşların interferon yanıtı kontrol etmedeki yetersizliği büyük ihtimalle bu suşların yüksek oranda RNA replikasyonu ve ek olarak virus tarafından üretilen çift iplikçikli RNA gibi tip I interferon uyarıcısı sinyallerle ilgilidir (Becher ve Tautz, 2011). Yakın zamandaki çalışmalar viral persistansta ncp biyotip kadar, N^{pro} proteininin, İnterferon Regulatory Faktör 3 (IRF3)'ün

proteozomal degradasyonu ve E^{ms}'in RNAaz aktivitesinin de hayati önem taşıdığı ortaya koymuştur (Meyers ve ark., 2007).

1.4. İnterferonlar

İnterferonlar virus üremesinin durdurulmasıyla ilgili çalışmalar sırasında antiviral ajanlar olarak keşfedilmişlerdir. İlk defa 1957'de influenza virus ile enfekte tavuk hücrelerinin bir salgı ürettiklerini ve bu ürünün hücreleri hem homolog hem de heterolog virüslere karşı dayanıklı hale getirebildiği tespit edilmiştir (Samuel, 2001). İnterferonlar, tekrarlayan viral enfeksiyonlar sırasında hedef hücrelerde direnci indüklemeye kabiliyetleriyle tanımlanmış sitokinlerdir. Ancak antiviral aktivitelerine ilaveten pek çok kompleks ve düzenleyici etkileri olduğu da tespit edilmiştir. İnterferonlar önce hücresel orijinlerine ve serolojik karakterlerine göre alt tiplere ayrılmışlardır. Tip I interferonlar pek çok hücre tarafından eksprese olabilen, kümelenmiş, intronsuz genler tarafından kodlanan, sekans homolojisi gösteren heterojen bir gruptan oluşur. Tip II IFN veya IFN γ , intronlu, tek bir genden kodlanan ve ekspresyonu çoğunlukla aktive T ve Doğal Öldürücü (Naturel Killer; NK) hücrelere dayalı bir moleküldür (Hansen ve ark., 1991; Sen ve Lengyel, 1992).

Önceleri lökosit kaynaklı interferonlar IFN alfa (α) sınıfındayken, primer olarak fibroblast kaynaklı interferonlar IFN beta (β) ve T-hücre kaynaklılar IFN γ sınıfında tanımlanmışlardır. Ancak günümüzde hücre orijini, sınıflandırmada kesin bir çizgi olmaktan çıkmıştır. Gruplandırmada interferonların biyokimyasal, immünolojik ve yapısal özellikleri göze alınmaktadır. Viral enfeksiyon, in vivo ve in vitro, tip I interferonları tetikleyen temel biyolojik olay olarak tanımlanmıştır (Hansen ve ark., 1991). Virüsle indüklenen interferonlar sekans homolojileri ve antijenik özelliklerine göre; α , β ve omega (ω) olmak üzere 3 ayrı aileye ayrılmıştır. Yapılan çalışmalar tip-I interferonların hücre büyümesi ve farklılaşması sırasında da virüstan bağımsız olarak tetiklenebileceğini göstermiştir. IFN α 'nın 20 kadar alt tipi varken, IFN β ve IFN γ 'nın sadece bir alt tipi vardır (Lefevre ve Boulay, 1993).

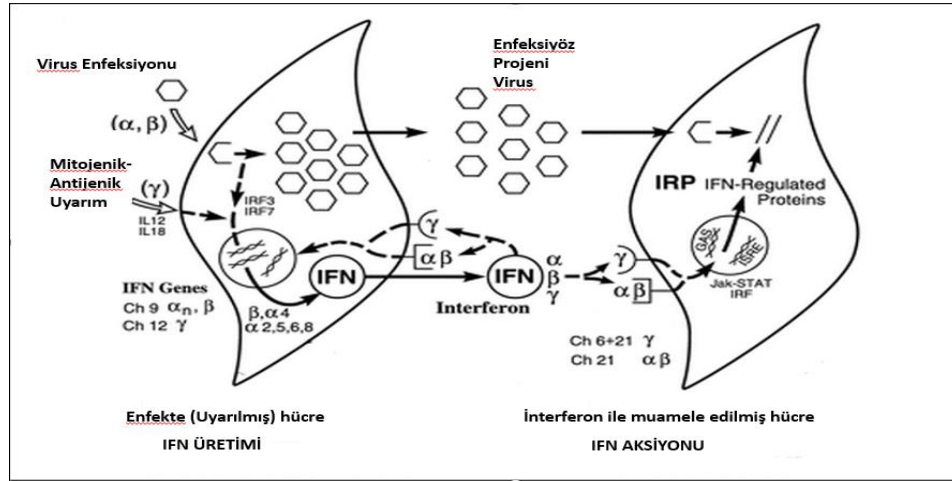
İnsanlarda IFN α_1 sınıfını oluşturan interferonlar, intronsuz kompleks bir gen ailesi tarafından kodlanan, 166-165 amino asitlik kısa proteinlerdir. Yapısal olarak benzeyen IFN β ile Tip-1 reseptöre bağlanırlar. (Rubenstein ve Ochansky, 1986). Sığırlarda da bulunan bu IFN α ürünleri farklı biyolojik aktiviteler göstermektedirler (Capon ve ark., 1985; Hansen ve ark., 1991).

Tip I interferonlar yapısal olarak benzer olan ve ortak heterodimerik bir reseptöre (IFNAR1 ve IFNAR2 zincirlerinden oluşan IFNAR) bağlanan pek çok IFN α alt tipi (türe göre 14-20 arasında) ile IFN β , IFN ω ve IFN- τ olmak üzere 4 tip interferondan oluşur. Tip I interferonlar tüm hücrelerden düşük seviyelerde salgılanırlar (Bach ve ark., 1997). IFN τ (tau) yalnızca ruminantlarda üretilir. Tip II interferon sınıfında yalnızca IFN γ bulunur. (Bazer ve ark., 1997).

Sığır, koyun ve insanlarda IFN α_I ile ilişkili farklı bir IFN grubu daha keşfedilmiştir. Bu gruptaki interferonlar 172-174 aa uzunluğundadır (Martal ve ark., 1979; Capon ve ark., 1985). IFN α_I ile benzerlikleri (%60-70) ve uzunlukları sebebiyle Capon ve ark., (1985) bu interferonları IFN α_{II} grubu olarak isimlendirmiş, ancak Hauptmann ve Swetly (1985), bu interferonları ayrı bir ailede, IFN ω olarak gruplandırmıştır. Sığırlardaki bu interferon daha sonra IFN τ olarak sınıflandırılmıştır (Roberts ve ark., 1992). Farklı türlerin IFN α_{II} genleri arasındaki yakınlık, aynı türün IFN α_I ve IFN α_{II} genleri arasındaki yakınlıktan daha fazladır, dahası IFN α_{II} serolojik olarak da farklıdır (Adolf ve ark., 1990). IFN α gibi IFN α_{II} grubu interferonlar da viruslar tarafından (Adolf ve ark., 1990; Capon ve ark., 1985).

IFN sistemi viral enfeksiyon gibi eksternal uyarılarda IFN sentezleyen hücreler ve IFN'lara cevap vererek antiviral ifade kuran hücrelerden oluşur (Stark ve ark.,1998). Hayvan virusları IFN uyarıcılarıdır ve aynı zamanda interferonlara ve antiviral etkilerine karşı duyarlıdırlar. Bazı hayvan virusları interferonların antiviral etkilerini etkisiz hale getirecek ürünler kodlarlar (Biron ve Sen, 2001). Viral interferonlar virus enfeksiyonuyla, tip II interferonlar mitojenik veya antijenik uyarılarla indüklenirler. İnterferonlar pek çok gen tarafından kodlanan, indüklenabilen sitokinlerdir (Blatt ve ark., 1996). İnterferon sistemi Şekil 1.6'da özetlenmiştir.

Pek çok farklı hayvan DNA ve RNA virusunun çoğalması hem hücre kültürlerinde hem de hayvanlarda IFNler tarafından inhibe edilir (Samuel, 1991; Stark ve ark., 1998). Hücre kültürü sistemlerinde IFN antiviral etkisine duyarlı pek çok virus için, antiviral etkinin birinci basamağı virus çoğalma siklusunun viral polipeptidlerin sentezinin inhibe edilmesi yoluyla durdurulmasıdır (Samuel, 1991; Biron ve Sen, 2001).



Şekil 1.6. İnterferon sisteminin şematik gösterimi. (Samuel 2001).

IFN α ve β indükleyicileri virus enfeksiyonu, ds RNA, LPS ve bazı bakteriyel bileşenlerdir. RNA viruslar en kuvvetli interferon uyarıcılarıdır. DNA virusları ise daha zayıf uyarıcılarıdır. IFN indükleyicilerle uyarılan hücrede IFN genleri aktive olur ve protein sentezi gerçekleşir, salgılanan IFN başka hücrelerdeki reseptöre bağlanır ve bu hücrede antiviral faz başlar.

İnterferonların reseptörlerine bağlanması antiviral proteini kodlayan genlerin transkripsiyonuyla sonuçlanır ve virusun bu hücrede replikasyonu engellenmiş olur. Hücreler bu proteinler degrade olana kadar virustan korunurlar. Antiviral fazdaki hücrelerden iki enzim sentezlenir bunlar da protein sentezini inhibe ederler. Bu enzimlerden biri 2',5'-oligoadenilat sentetaz (OAS) aktivasyonu için ds RNA gereklidir. OAS RNAaz L yi aktive eder ve viral mRNA yıkımlanır. Aktive olan Protein Kinaz R (PKR) ise protein oluşumunu engeller. Konak hücre protein sentezinin engellenmesiyle hücre ölümü de gerçekleşebilir ancak, enfeksiyon da durdurulmuş olur. İnterferonlar immün yanıtı sınıf I ve II MHC moleküllerininin

ekspresyonunu arttırarak, dolayısıyla T hücrelerinin antijeni tanınmasıyla modüle ederler (Samuel, 2001).

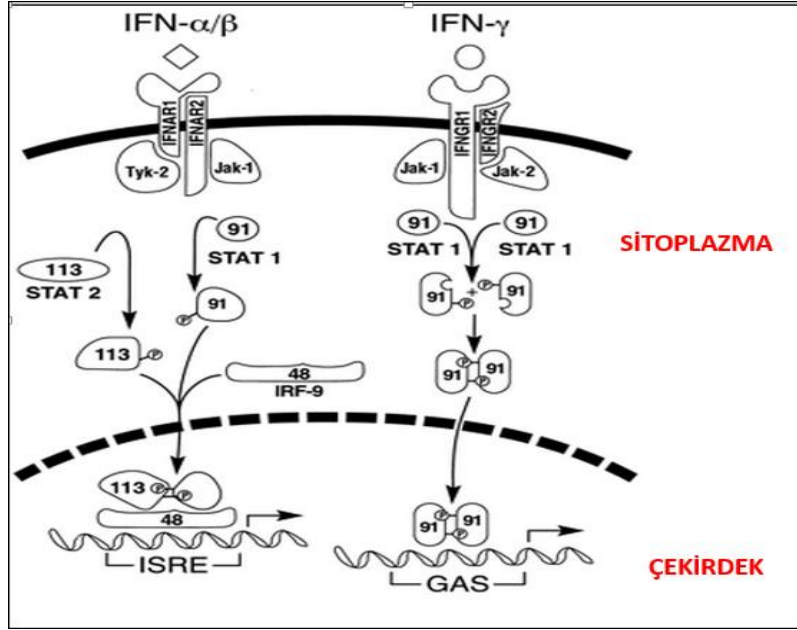
Virusla enfekte hücrelerde IFN'lerin antiviral etkilerinin bir parçası olan IFN indükte proteinler içinde PKR, OAS ve RNase L dışında RNA-spesifik adenozin deaminaz (ADAR) ve Mx protein GTPazlar da bulunur. Çift iplikçikli RNA protein fosforilasyonunun ve RNA degradasyonunun yönetiminde asıl rolü oynar ve RNA editing, IFN indükte proteinler tarafından (PKR kinaz, OAS synthetaz, ADAR1 deaminaz) katalize edilir (Jacobs ve Langland, 1996; Samuel, 2001). dsRNA gen susturmada da kalıp olarak kullanılır (Bass, 2000).

IFN aracılı sinyal ve hücrel genlerin ekspresyonunun transkripsiyonel aktivasyonu en iyi JAK-STAT yolağı proteinleri bağlamında değerlendirilebilir (Darnell ve ark., 1994; Samuel, 2001). Bu yolak Şekil 1.7'de özetlenmiştir. Sinyal transduktör ve aktivatör transkripsiyon (STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription) ailesi protenleri sitokin uyarısına yanıt olarak; tirozin kinaz Janus ailesi (JAK) enzimleriyle fosforlanmış tirozin haline gelen latent sitoplazmik transkripsiyon faktörleridir. JAK ve STAT ailesinin farklı üyelerinin farklı sitokin sinyal fonksiyonları vardır. Reseptör aracılı JAKlar interferonların transmembran reseptörlerine bağlanmasıyla aktive olurlar. Bilinen JAK ve STAT'lardan Jak-1, Jak-2, ve Tyk-2 kinazlar ve Stat-1, Stat-2 transkripsiyon faktörleri, antiviral form da olmak üzere IFN-bağımlı biyolojik yanıtlarda görev alır (Darnell, 1997; Horvath, 2000).

Sinyal süreci IFN'nin kendi özdeş reseptör alt ünitelerine bağlanmasıyla başlar. IFN bağlanması ve tirozin fosforlanmasıyla üst üste binen Jak ve Stat transkripsiyon faktörü çiftlerinin aktive olmasına sebep olur. Jak-1 ve Jak-2 kinazlar IFN- γ tarafından aktive edilir ve sonrasında Stat-1 proteinin fosforilasyonu, homodimerizasyonu ve çekirdeğin translokasyonu gerçekleşir. Stat-1 dimer kompleksi, gamma aktivasyon faktör (GAF) ve IFN- γ ile indüklenebilen genlerin transkripsiyonunu aktive eder (Samuel, 2001).

DNA ve RNA virusları, JAK-STAT sinyal yolağını bozan proteinler kodlarlar. Bu moleküler mekanizma IFN sinyal sürecine ve antiviral form oluşumuna antagonist

etki eder. Pek çok segmentsiz negatif polariteli RNA virusu genetik ürünleri IFN reseptör aracılı sinyal mekanizmasını, hem tip I α/β hem de tip II γ IFN reseptörleri için antagonize eder (Samuel, 2001).



Şekil 1.7. Jak-STAT yolağının şematik gösterimi. (Samuel 2001).

1.4.1. Ovine Trophoblast Protein-1

Koyun ve sığır plazentalarındaki trofoblast hücreleri tarafından fizyolojik olarak kısa bir süre boyunca salgılanan ve maternal tanınmayı sağlayan proteinler de tip-1 interferonlar olarak tanımlanmıştır (Martal ve ark., 1979; Imakawa ve ark., 1987; Imakawa ve ark., 1989). Bu moleküller, IFN ω ile yakın ilişkili olmalarına rağmen yeni bir tip 1 interferon ailesini temsil ettiği düşünülerek, ilk olarak trofoblastinler (Martal ve ark., 1979) ya da koyun ve sığır trofoblast protein-1 (OTP-1 ve BTP-1) olarak tanımlanmışlardır (Godkin ve ark., 1984). Daha sonraki dönemde IFN tau (τ) olarak adlandırılmış ve temel biyolojik görevi antiviral aktivite olmayan ilk tip 1 IFN ailesi olarak tanınmışlardır (Roberts ve ark., 1992). Görevlerinin corpus luteumu geriletmek olduğu bilinen bu proteinlerin interferon niteliğinde olduğunun tespiti şaşırtıcı olmuştur. Bu proteinler 172 amino asit uzunluğunda, antiviral etkilidirler

ancak üretim miktarlarının fazlalığı ve trofektoderimde lokalizasyonu ekspresyonlarının diğer tip I IFN'lerden farklı kontrol edildiğine işaretir (Hansen ve ark., 1991).

OTP-1, koyunlarda salgılanan antiluteolitik bir proteindir. Gebeliğin 13 ve 21. günleri arasında uterin prostoglandin $F_{2\alpha}$ salınımının inhibisyonundan sorumlu, majör konseptus salgı ürünüdür (Godkin ve ark., 1982). Bu OTP-1 kaynaklı inhibisyon, corpus luteumun dolayısıyla progesteron salgısının kalıcılığını diğer bir deyişle maternal tanınmayı sağlar. OTP-1 üretiminin gebeliğin 8. gününden itibaren başladığı (Ashwort ve Bazer, 1989; Farin ve ark., 1990), 13. günde önemli bir artış ve 23. günden itibaren dereceli bir düşüş gösterdiği tespit edilmiştir (Farin ve ark., 1989). 13. gündeki artışın, embriyonun 10-12. günler arası 1-2 mm çapındaki bir küreden, 13. günde 3-5 mm büyüklüğünde tubuler forma dönüşmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Farin ve ark., 1990).

OTP-1, gebeliğin 13-21. günleri arasında konseptuslar kültüre edildiğinde kültür sıvısına yayılan, düşük moleküler ağırlıklı asidik bir proteindir (Godkin ve ark., 1982). Diğer bir çok interferonun aksine IFN τ ekspresyonu, implantasyon periyodu sırasında trofoblast hücrelerinden salındığı için, süre ve miktar olarak sınırlıdır (Hansen ve ark., 1988; Farin ve ark., 1989). Ancak salgılandığı dönemde miktarları herhangi bir interferona göre çok yüksektir, gebeliğin 16. gününde 200 μ g (40.000.000 ünite) kadar salgılanır (Pontzer ve ark., 1991). Ekspresyon ilk olarak geç moruladan erken blastosist dönemine geçişte trofektoderm şekillenmesiyle tespit edilir (Anthony ve ark., 1988; Hernandez-Ledezma ve ark., 1992). Belirgin yükseliş siferik formdan filamantöz forma geçişte olur ve keskin düşüş de trofektodermin endometrial epitel hücreleriyle tam olarak teması oluştuğunda gerçekleşir (Hansen ve ark., 1988).

IFN τ 'nın yetersiz salınımı erken embriyonik kayıplara sebep olur (Mann ve Lamming., 2001). IFN τ , endometriyumda, uterin hassasiyet ve konseptusun implantasyonu gibi biyolojik görevleri olduğu düşünülen pek çok sayıda IFN-uyarıcılı geni (ISGs) uyarır veya indükler (Kim ve ark., 2003).

IFN τ 'nun ayrıca trofektoderimde hücre proliferasyonunu sağlayan otokrin bir regülatör olduğu da tespit edilmiştir. İnterferonlar genel olarak hücre büyümesi inhibitörü olarak bilinmektedir, ancak sığır embriyolarında IFN τ 'nin hücre büyümesini ve sayısının artışıını indüklediği belirlenmiştir (Kohara ve ark., 2012).

Trofoblastik interferonlar aynı zamanda güçlü 166 amino asitlik IFN α_{II} alt sınıf proteinlere benzeyen antiviral (Pontzer ve ark., 1988) aktiviteye ek olarak, antitümör (Pontzer ve ark., 1991) ve immunosupressif (Roberts ve ark., 1989) aktivitelere de sahiptirler. Pürifiye OTP-1'in diğer interferonlar kadar antiviral etkinliği olduğu (2-3 x 10⁸ ünite/mg protein) gösterilmiştir (Pontzer ve ark., 1988, 1990).

BTP-1'in, in vitro deneylerde 10²U/ml üzeri konsantrasyonda hem cp hem de ncp BVDV replikasyonunu tamamen baskıladıği tespit edilmiştir. Deneme hayvanları üzerinde gerçekleştirilen deneylerde persiste enfekte sığırlara haftada 5 kere olmak üzere 2 hafta subkutan uygulama yapılmış, sığırlarda fiziksel bir anormallik gözlenmemiş ve virus titresinde düşüş tespit edilmiş, ancak son uygulamadan sonra titre tekrar eski seviyesine dönmüştür (Kohara ve ark., 2012).

IFN τ molekülü, birden fazla farklı gen tarafından kodlanmaktadır (Nephew ve ark., 1993). Yapılan sekans çalışmalarında farklı cDNA tipleri olduğu belirlenmiş (Klemann ve ark., 1990) ve bu genlerin translasyonu ile proteinin farklı izoformları olduğu da gösterilmiştir (Godkin ve ark., 1982). Nükleik asit ve buna bağlı amino asit sekansı çalışmalarında elde edilen verilere göre insan, sığır, fare, rat ve domuza ait α ailesindeki interferonlarla %45-55 düzeyinde amino asit sekans benzerliği göstermektedir. Pek çok IFN α 'da görülen amino asit rezidüleri OTP-1'de de korunmuştur ve sekans boyunca başka benzerliklere de rastlanmaktadır. Bu interferonların kendi aralarında benzerlikleri azken OTP-1 ile benzerliklerinin bu kadar yüksek olması oldukça önemli görülmektedir (Imakawa ve ark., 1987). OTP-1'in en fazla sekans benzerliği gösterdiği molekül %70,3 benzerlikle sığır IFN α_{II} 'dir. (Capon ve ark., 1985). OTP-1 ve sığır trofoblast protein, cDNA düzeyinde ise sığır IFN α_{II} ile %85 benzerlik gösterir (Imakawa ve ark., 1989).

Trofoblast interferonlarının transkripsiyon başlangıç bölgesinden 100 baz öncesine kadar ki promotor bölgesi, farklı genlerde ve türlerde korunmuştur ancak IFN α_{II} ile

sınırlı bir dizi benzerliği göstermektedir. $IFN\alpha_I$ ve $IFN\beta$ ' da bulunan iki interferon düzenleyici faktör-1 (IRF-1) bağlanma bölgesi ve viral cevapla ilgili pek çok GAAANN motifi (N herhangi bir nt) bütün trofoblast genlerinde aynı bölgelerdedir. Sözü geçen iki bölge ve GAAANN motifleri $IFN\alpha_{II}$ genlerinde de bulunmaktadır ama trofoblastik interferon genlerine göre daha farklı organize olmuştur. AGAAATG motifi $IFN\alpha_{II}$ promotorlarında bulunur ancak trofoblastik interferon genlerinde yoktur. Yapılan analizlere göre trofoblastik interferonlar $IFN\alpha_I$ ve $IFN\alpha_{II}$ 'den farklı bir $IFN\alpha$ alt tipidir (Pontzer ve ark., 1990).

Yapılan çalışmalarda diğer interferon α tiplerinde sadece C terminal uç antiviral aktiviteden sorumluyken, OTP-1'de ağırlıklı olarak C terminal ucun bu aktiviteden sorumlu olduğu ancak N terminal ucun da etkili olduğu ve N terminal ucun temel olarak molekülün gebeliğin tanınmasıyla ilgili özgün özelliğinden ve hücreler üzerindeki düşük toksisiteden sorumlu olduğu gösterilmiştir (Pontzer ve ark., 1990).

1.4.2. İnterferon Gamma

$IFN\gamma$, tip II IFN sınıfının tek temsilcisi olup, yapısal olarak tip I interferonlarla yakınlık göstermez, farklı bir reseptöre bağlanır ve farklı bir kromozomal lokus tarafından kodlanır (Sen, 2001). Daha önceleri $IFN\gamma$ üretiminin yüksek miktarlarda CD4 T hücreleri, CD8 sitotoksik lenfositler ve NK hücreler tarafından olduğu düşünülmekteydi (Young, 1996; Bach ve ark., 1997). Ancak günümüzde B hücrelerinin, NKT hücrelerin ve profesyonel antijen sunucu hücrelerin de (monosit/makrofaj, dendritik hücreler) $IFN\gamma$ salgısı yaptığı bilinmektedir (Young, 1996; Carnaud ve ark., 1999; Flaishon ve ark., 2000). NK hücreleri ve antijen sunucu hücrelerden salınımın enfeksiyonda erken konakçı savunmasında, T lenfositlerden salınımına kazanılmış immün yanıtta önemli olduğu düşünülmektedir (Sen, 2001).

$IFN\gamma$ üretimi ASH'den salgılanan sitokinler tarafından (özellikle IL12 ve IL18) kontrol edilir. Bu sitokinler, doğal immün yanıt sırasında, enfeksiyon ve $IFN\gamma$ üretimi arasında bağlantı kurarlar (Schroder ve ark., 2004). Birçok patojenin makrofajlarca tanınması IL-12 ve kemokinlerin salgılanmasını indükler. Bu

kemokinler NK hücrelerini enflamasyon bölgesine çeker ve IL12 de bu hücrelerden IFN γ sentezini sağlar (Salazar-Mather ve ark., 2000; Pien ve ark., 2000).

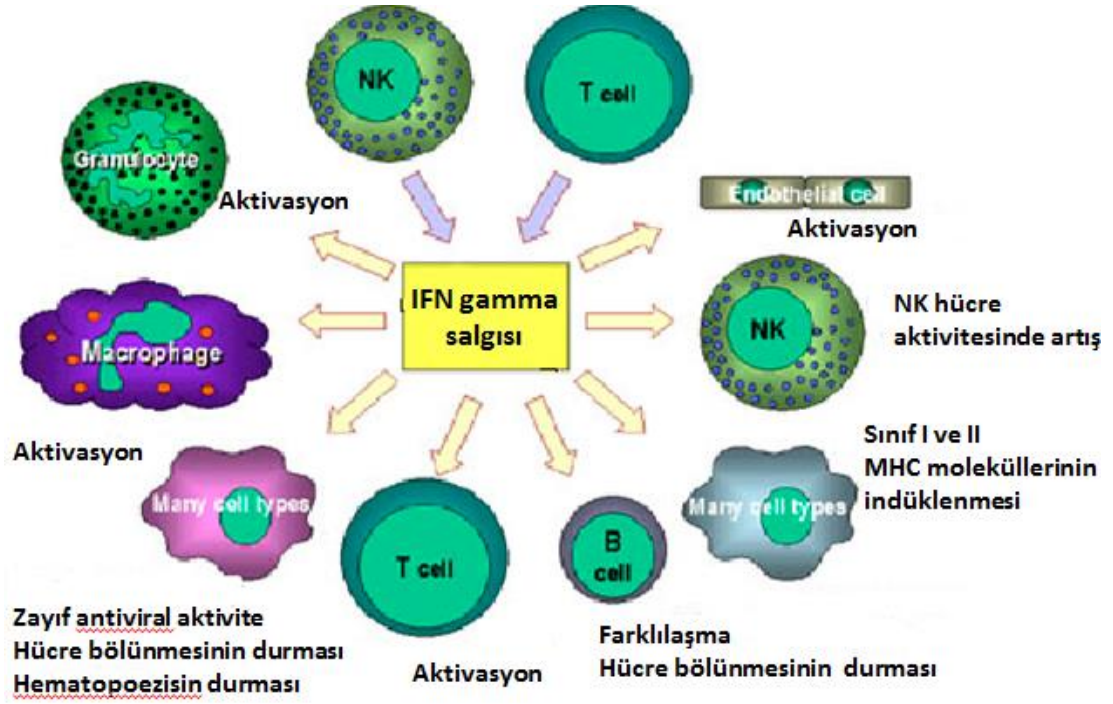
Biyolojik olarak aktif IFN- γ iki polipeptidin birleşmesiyle oluşan, nonkovalent homodimerdir (Ealick ve ark., 1991). IFN γ reseptörü IFNGR, sınıf II sitokin reseptör familyasındadır IFNGR1 ve IFNGR2 olmak üzere 2 zincirden oluşur (Bazan, 1990, Thoreau ve ark., 1991) İki zincir de intrinsik kinaz/fosfat aktivitesinden yoksun olduğundan sinyal transdüksiyonu için bir sinyal mekanizmasıyla birleşmesi gerekir. IFNGR1, Jak1 ve STAT 1 için bağlanma motifleri içerir (Schroder ve ark., 2004) IFNGR2, Jak2 kinaz için bağlanma motifi içerir. IFN γ ; IFNGR1 ve IFNGR2 etkileşimleri tür spesifiktir.

Hem tip I hem de tip II interferonlar, hem antiviral hem de immuno modülatör aktiviteye sahiptir (Biron, 2001). İki tipte de antiviral aktivite genellikle viral enfeksiyonun erken evrelerinde önem taşırken, immunomodülatör aktiviteleri kazanılmış immun yanıtın kritik olduğu enfeksiyonun geç safhalarında, uzun dönemli kontrolde antiviral etkinin devamı için önemli hale gelmektedir (Muller ve ark., 1994).

IFN- γ , NK hücreler aracılığıyla doğal bağışıklık sisteminde görev alırken spesifik sitotoksik immun sistemde ise hücre yüzeyine bağlı viral antijenlerin ekspresyonunun tanınmasını sağlar ve MHC proteinlerini ilişkilendirir ve makrofajları aktive eder (Bach, 1997; Boehm ve ark., 1997). IFN γ 'nın pleiotropik etkileri şekil 1.8'de özetlenmiştir.

IFN γ ile uyarılan antiviral mekanizmalar özellikle tip I ve tip II IFN uyarılmasıyla önemli ölçüde indüklenen Protein Kinaz R (PKR) başta olmak üzere anahtar antiviral enzimleri içerir. PKR'nin asıl hali inaktiftir ve otofosforilasyonu için aktivasyon sinyaline ihtiyaç vardır. RNA viruslarının çoğalması için mecburi ara form çift iplikçikli RNA, PKR için en iyi karakterize olmuş aktivatördür. PKR ayrıca bazı özel hücrel substratların dsRNA bağımsız fosforilasyonu için aktive olur. Bu substratlardan biri normal hücrel translasyon sisteminde oran-limitleyici faktör olan eIF-2 α alt ünitesidir. PKR ile fosforilasyon eIF-2-GTP'nin guanozin 5'-difosfat

bağlı halinden döngüsünü engeller, böylece viral ve hücresel protein sentezini inhibe eder (Schroder ve ark., 2004).



Şekil.1.8. IFN γ etkisinin özeti. (<http://pathmicro.med.sc.edu/bowers/ifn-6.jpg>)

1.5. Tezin Amacı

Eş zamanlı PPRV ve Pestivirus enfeksiyonunun tespitine ve enfeksiyonla birlikte oluşan patolojilere dair ülkemizde yapılmış çalışmalar bulunmaktadır. Söz konusu iki virusa Türkiye’de her bölgede sıklıkla rastlanması ve iki virüsle birlikte meydana gelen ortak enfeksiyonlarda şiddeti artan patolojiler, eş zamanlı enfeksiyonun da, önemli bir tehdit unsuru olduğunu düşündürmektedir. Bu tez çalışmasının amacı, iki virüsle birlikte meydana gelen ortak enfeksiyon sırasında virüslerin etkileşimi ve bazı hücresel bileşenler üzerindeki etkileri ile ilgili bilgi edinebilmektir. Ortak enfeksiyonda tespit edilenin aksine, PPR virusun tek başına fötal patolojilerle ilişkisini tespit eden bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışması ile hücresel antiviral ajanlardan OTP-1 ve IFN-gamma’nın ve Ruminant Pestiviruslarının önemli bir üyesi olan BVD virusun, PPR virusunun plasental bariyeri geçmesindeki olası rollerini in vitro şartlarda sorgulamak hedeflenmiştir. Bu bağlamda ve pestivirusların transplasental enfeksiyona yatkınlıkları bilgisinden hareketle, tez kapsamında yapılan tüm sorgulamalar BVDV enfeksiyonu önceliği dikkate alınarak modellenmiştir. Plasental enfeksiyonu temsil edebilmesi amacıyla Primer Koyun Trofoblast (PKT) hücre kültüründe ve ek olarak Fötal Koyun Timüs (SFT-R) hücre hattında, her iki virüsün ayrı ayrı ve birlikte inokulasyonları sonrasında OTP-1 ve IFN-gamma ekspresyonundaki ve viral gen ekspresyonlarındaki değişiklikler Eş Zamanlı RT-PCR yöntemi ile sorgulanmıştır. Çalışmadan elde edilen bulgularla iki ayrı virüsün iki farklı orijinli, primer ve devamlı hücre kültürlerinde, farklı iki tip interferon ekspresyonunu tek başlarına ve birlikleyken ne yönde etkiledikleri yönünde bilgi sağlanabilecek ayrıca iki virüsün birbirinin replikasyonu üzerinde etkileri hakkında da fikir edinilebilecektir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. GEREÇ

2.1.1. Viruslar

Çalışmada Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim dalı stoklarında bulunan PPRV saha izolatu (Tu00) ile BVDV'nin sitopatojenik izolatu (NADL) kullanıldı. Her ne kadar transplasental enfeksiyonlardan ncp Pestivirus biyotipleri sorumlu olarak kabul edilse de gerek yapılan çalışmalarda özellikle cp BVDV biyotiplerinin de transplasental enfeksiyon etkeni oldukları bilgisi ve gerekse in vitro olarak planlanan bu çalışmada transkript analizlerinin virus çoğalması ile paralelliğinin sorgulanma ihtiyacından hareketle, cp BVDV referenz suşu olan NADL tercih edildi. Viruslar araştırma kapsamında kullanılan Fötal Koyun Timüs (SFT-R) devamlı hücre hattına ve Primer Koyun Trofoblast (PKT) hücre kültürlerine adapte edildikten sonra, 500 µL hacimde porsiyonlandı, enfeksiyöziteleri tespit edildi ve kullanılana kadar -80°C'de saklandı.

2.1.2. Hücre Kültürleri

Devamlı hücre hattı olarak Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsünden temin edilen SFT-R hücre hattı kullanıldı. Hücrelerin üretilmesinde; 0,05µg/ml Linkomisin HCL, 0,1µg/ml Spektinomisin HCL (Lypectin, Vilsan, Türkiye) ve %10 Fötal Dana Serum (FDS, Biochrom Ag, Kat.No: S0113, Almanya) içeren Minimal Essential Medium-Eagle (MEM Eagle, Sigma, Kat.No: M4780, Almanya) kullanıldı.

Primer hücre kültürünün hazırlanmasında kesimhaneden alınan gebe koyunlara ait uteruslar kullanıldı. Bu hücrelerin enzimatik ayrıştırılması aşamasında tip 2 kollejenaz (Collagenase type II, Sigma, Kat. No: C6885-100mg, ABD),

kültivasyonunda 0,05µg/ml Linkomisin HCL, 0,1µg/ml Spektinomisin HCL ve %10 Fötal Dana Serumunu içeren Dulbecco'nun Modified Eagle Medium-F12 (DMEM-F12, PAA, Kat.No: G0014,3010, Avusturya) kullanıldı. SFT-R hücre hattı ve primer hücre kültürlerinin subkültürlerinin hazırlanmasında, hücreleri zeminden kaldırmak ve ayırmak amacıyla Versen-Tripsin (%0.25) (Ek-1) kullanıldı.

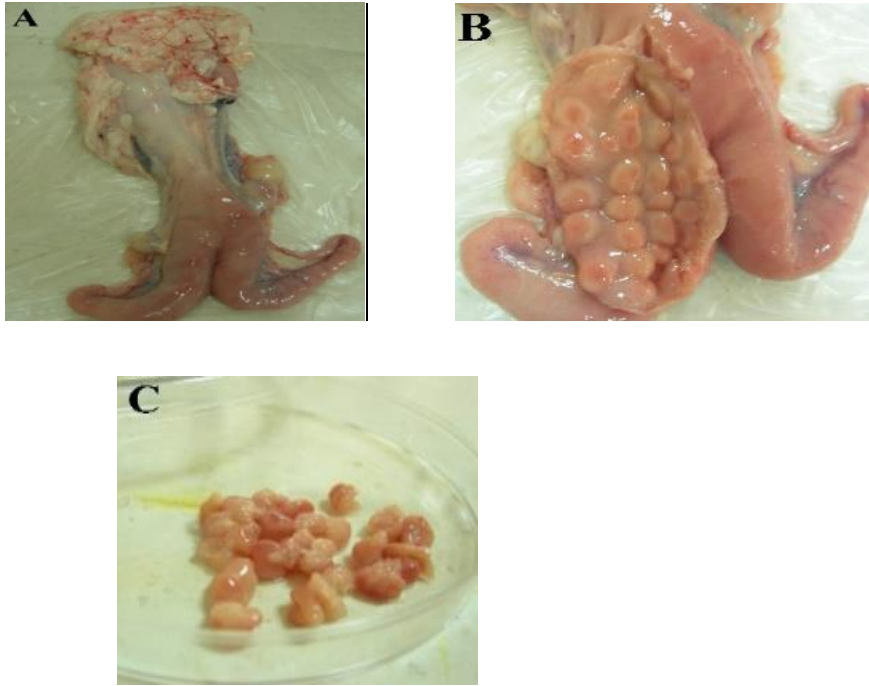
Virus inokulasyonları gerçekleştirilmeden önce kullanılacak hücreler; PPRV ve Pestivirus kontaminasyonu yönünden, kullanılan fötal dana serumları da Pestivirus kontaminasyonu yönünden kontrol edildi ve negatif bulundu. Özellikle tespitleri hedeflenen OTP-1 ve IFN γ ekspresyonlarının ilerleyen pasajlardan etkilenebileceği düşüncesi ile tüm testlerde ikinci pasajdaki PKT hücreleri kullanıldı.

2.2. YÖNTEM

2.2.1. Primer Koyun Trofoblast (PKT) Hücre Kültürünün Hazırlanması

PKT hücre kültürü Landim ve ark. (2007) tarafından sığır plasentomları kullanılarak tarif edilen yöntemde bazı değişiklikler yaparak hazırlandı. Kesimhaneden alınan gebe koyun uterusları (Şekil 2.1.A) aseptik şartlarda, soğuk zincirde laboratuvara getirildi. Plasentomlar steril şartlar altında açığa çıkarıldı (Şekil 2.1.B). Fötal kotiledonlar maternal karunkulden ayrılarak steril bir petri kutusuna alındı ve çift bistüri yöntemiyle doku homojenatı elde etmek üzere küçük parçalara ayrıldı (Şekil 2.1.C). PBS-M (Ek-1) ile 3 defa yıkanan homojenat %0,05'lik tip 2 kollejenaz ile enzimatik parçalanmaya tabi tutuldu. Hücre homojenatı ve kollejenaz karışımı 1000 rpm'de +4°C'de 20 dk. süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında dibe çöken hücre pelleti tekrar PBS-M ile yıkandı ve aynı şartlarda bir kez daha santrifüj edildi. Bu işlemde sonra oluşan pellet %10 FDS ve DMEMF12 kullanılarak süspansiyon elde edildi ve 8.000.000 hücre/ml yoğunluktaki sulandırmada hücre kültürü şişelerine (Orange, Kat. No:4410100, Belçika) aktarıldı. Hücreler 37°C'deki CO $_2$ 'li etüvde (Sanyo, Japonya) 24 saat inkubasyona bırakıldı. Süre sonunda hücreler doku kültürü

mikroskopunda (Olympus, CKX41, Filipinler) kontrol edildi ve vasatları %10 FDS içeren DMEMF12 ile değiştirildi. İnkubasyonu izleyen 48-72 saat sonunda monolayer tabakalanma gösteren hücrelerin 1:2 oranında subkültürleri yapıldı.



Şekil 2.1. A. Gebe koyun uterusu, B. Plasentomlar, C. Fötal kotiledonlar

2.2.2. Virusların Enfeksiyözite Gücünün Tespiti

Enfeksiyözite gücünün tespiti, inokulasyonlarda kullanılacakları için hem SFT-R hücre hattında hem de primer koyun trofoblast hücre kültürlerinde gerçekleştirildi. İki virusun da log10 tabanına göre sulandırmaları yapıldı. SFT-R için 100.000 hücre/ml, PKT için 200.000 hücre/ml olacak şekilde 24 saat önceden 24 gözlü hücre tabletleri (Orange, Kat.No:4430300, Belçika) hazırlandı. Her sulandırma basamağı için 4 göz kullanıldı. Hazırlanan virus sulandırmalarından tablet gözlerine 200µL hacminde inokule edildi. Virus kontrol için ayrılan gözlere 100µL vasat ve 100µL saf virus, hücre kontrol gözlerine 200µL %10 FDS'li vasat ilave edildi. Tabletler 1 saat süreyle etüvde adsorbsiyona bırakıldı. Süre sonunda gözlerdeki vasat miktarı

%2 FDS içeren vasatla 1ml'ye tamamlandı. Tabletler etüvde BVDV için 3-5 gün, PPRV için 5-7 gün süre ile inkubasyona bırakıldı. Tabletler her gün doku kültürü mikroskopunda sitopatik değişiklikler yönünden kontrol edildi. İnkubasyon süreleri sonunda virusların titresi Spearman-Kaerber'in (1964) bildirdiği yöntemle göre hesaplandı.

2.2.3. Virusların İnokulasyonları

Enfeksiyözite gücü belirlenen viruslar 1 MOI olacak şekilde sulandırılarak hücrelere inokule edildi. Bunun için öncelikle virusların enfeksiyözite gücü $DKID_{50}$ olarak hesaplandı, plak formasyon ünitesi/ml = $0,5 \times DKID_{50}$ formülü ile pfu değerine çevrildi. "MOI = pfu / inokule edilecek hücre sayısı" formülü ile virusların sulandırma oranları belirlendi. Virusların inokulasyonları enfeksiyözite gücünün tesbitinde tarif edilen yöntemle aynı şekilde; SFT-R için 100.000 hücre/ml, PKT için 200.000 hücre/ml olacak yoğunlukta hazırlandıktan 24 saat sonra, adsorbsiyona bağlı olarak ve 24 gözlü tabletlerde gerçekleştirildi. SFT-R için virus üretme vasatı olarak serum içermeyen MEM, PKT için %1-2 FDS içeren DMEM-F12 kullanıldı. İnokulasyonlar sonrası izolasyon için 0, 12, 24, 48, 72 ve 96 olmak üzere 6 adet zaman noktası belirlendi. Her bir zaman noktası için 24 gözlü tabletin 3 gözü ayrıldı. Bu amaçla inokulasyonlar tabletlerin 18'er gözüne yapıldı. Tabletlerin 3 gözü de negatif kontrol olarak inokulasyon yapılmadan ayrıldı. Her izolasyon öncesi doku kültürü mikroskobu ile sitopatik değişiklikler incelendi.

2.2.3.1. SFT-R Hücre Hattına Tekli BVDV ve PPRV İnokulasyonu

İki ayrı 24 gözlü tablettten birine BVDV diğereine PPRV 2.2.3.'te tarif edilen şekilde inokule edildi. Hücreler 96 saat süresince etüvde inkubasyona bırakıldı.

2.2.3.2. SFT-R Hücre Hattına Eş Zamanlı BVDV ve PPRV İnokulasyonu

24 gözlü tabletin 18 gözüne 100 μ L BVDV ve 100 μ L PPRV inokulasyonu aynı anda tarif edilen yönteme göre yapıldı.

2.2.3.3. SFT-R Hücre Hattına Önce BVDV Sonra PPRV İnokulasyonları

Üç adet 24 gözlü tabletin 18'er gözüne tarif edilen şekilde 100 μ L BVDV inokulasyonu yapıldı. Birinci tabletin 18 gözüne BVDV inokulasyonunu takiben 6.saatte, ikinci tabletin 18 gözüne BVDV inokulasyonunu takiben 12.saatte, üçüncü tabletin 18 gözüne BVDV inokulasyonunu takiben 24.saatte 100 μ L PPRV inokulasyonları yapıldı. Her bir tablet PPRV inokulasyonunu takiben 96 saat süresince inkubasyona bırakıldı.

2.2.3.4. PKT Hücre Kültürüne İnokulasyonlar

PKT hücre kültürlerinde tekli virus inokulasyonları, eş zamanlı ve önce BVDV sonra PPRV inokulasyonları SFT-R hücre hattında tarif edilen şekilde yapıldı.

2.2.4. Gen İfadelerinin Sorgulanması

PPRV için N geni, BVDV için genom 5' UTR bölgesi ve hücresel genlerden de koyun OTP-1, IFN γ , ve β -aktin (house keeping) hedef genlerinin ifadeleri sorgulandı. Gen ifadelerinin sorgulanması diğer bir ifadeyle mRNA kantitasyonu; mutlak kantitasyon yöntemine uygun olarak Eş Zamanlı RT-PCR işlemi ile yapıldı. Bu amaçla hidroliz problemleriyle kullanılmak üzere tasarlanan ticari kit (Rotor Gene Probe RT-PCR Kit, Qiagen, Kat. No:204574, Almanya) ile önerilen protokolda bazı değişiklikler yapılarak Çizelge 2.1' de tarif edilen karışım 50 μ L'lik eppendorf tüplerde hazırlandı ve Çizelge 2.2'de gösterilen ısı değerleri, zaman ve döngüleri ile işlem Eş Zamanlı PCR cihazında (Rotor Gene Q, Qiagen, Almanya) gerçekleştirildi.

Çizelge 2.1. Eş Zamanlı PCR için reaksiyon karışımı bileşenleri

Bileşen	Miktar	Son Konsantrasyon
2x Rotor-Gene Probe PCR Master Mix	12,5µL	1X
Primer -Forward	0,8µL	0,8 µM
Primer -Reverse	0,8µL	0,8 µM
Probe	0,4µL	0,4µM
Rotor-Gene RT Mix	0,25µL	
RNaze içermeyen su	5,25µL	
Kalıp RNA/ Standart DNA	5µL /5µL	50ng
Toplam	25µL	

Çizelge 2.2. Eş zamanlı RT-PCR işleminde kullanılan ısı değerleri, zaman ve döngüleri

İşlem	Zaman	Isı Değeri	Döngü Sayısı
Revers Transkripsiyon	10 dk	50°C	1
PCR başlangıç aktivasyonu	5 dk	95 °C	1
Denaturasyon	5sn	95 °C	40
Bağlanma/Uzama	10sn	PPRV-N, OTP-1, β-aktin için 60 °C, BVDV-UTR için 52 °C, IFNγ için 54°C	

2.2.4.1. Örneklerin Hazırlanması

Gen ifade analizlerinde ilk adım olan; örneklerden RNA izolasyonu enfekte edilmemiş hücre kültürleri ve virus ile enfekte hücre kültürü örneklerinden RNA ve DNA izolasyonu için uygun olan bir ticari kit (Geneall, Ribospin vRD, Kat.No: 302-150, Kore) kullanılarak gerçekleştirildi. Hücrelerden intrinsik RNA (total RNA) izolasyonu için, öncelikle tabletin hedeflenen gözlerindeki üst sıvılar aspire edilerek

uzaklaştırıldı. Tablette tabakalanmış hücrelerin üzerine 500µL Buffer VL eklenip, pipetasyon işlemi yapıldı ve 10 dk beklendi. Tabletlerin gözlerinden 1,5ml'lik santrifüj tüpüne aktarılan örneklerin üzerine 700µL Buffer RB1 eklendi ve vortekslendi. Karışım mini kolonlara aktarılıp 12.000 devirde 30sn santrifüj edildi. Bu işlemin ardından sırasıyla 500µL Buffer RBW ve Buffer RNW ile 12.000 devirde 30sn santrifüj ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Son olarak kalan tamponu uzaklaştırmak üzere 1dk 12.000 devirde santrifüj yapıldı. Mini kolon boş bir 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne yerleştirildi ve silika ped üzerine 30 µL nükleaz içermeyen su eklendi, 1dk beklendi, 1dk 12.000 devirde santrifüj yapıldı. Mini kolonlar atılırken elüe edilen RNA örnekleri, hemen test edilmediği durumda, -80°C'de muhafaza edildi.

İzolasyon işlemlerinde hücre kontrol olarak; SFT-R hücre hattından 100.000 hücre/ml yoğunlukta, PKT hücre kültüründen 200.000 hücre/ml yoğunlukta 24 gözlü tabletler hazırlandı ve hiçbir inokulasyon yapılmadan 24.saat; 0.saat kabul edilerek, 0, 12, 14, 48, 72, 96. saatlerde 3'er gözdeki hücrelerden izolasyon işlemi yapıldı. Virus inokule edilen tablerde de izolasyon için belirlenen her bir zaman noktasında inokulasyon yapılan gözlerden 3'er adet gözdeki hücreler kullanıldı. Bu sayede her bir örnek için 3 tekrar olması sağlandı. SFT-R hücre hattından tekli ve eş zamanlı BVDV ve PPRV inokulasyonu sonrasında 0, 12, 24, 48, 72, 96. saatlerde izolasyon yapıldı. İzolasyon işlemi SFT-R hücre hattında önce BVDV sonra PPRV inokulasyonları için PPRV inokulasyonlarını takiben 0, 12, 24, 48, 72, 96. saatlerde aynı şekilde gerçekleştirildi. PKT hücre kültürüne tekli PPRV inokulasyonu sonrasında 0, 12, 24, 48, 72, 96. saatlerde gerçekleştirilen izolasyon, tekli BVDV ve eş zamanlı BVDV ve PPRV inokulasyonları sonrasında 96. saatte gözlerdeki canlı hücre sayısındaki düşüş sebebiyle 12, 24, 48, 72. saatlerde, önce BVDV sonra PPRV inokulasyonları için PPRV inokulasyonlarını takiben 72 ve 96. saatte gözlerdeki canlı hücre sayısındaki düşüş sebebiyle 0, 12, 24, 48. saatlerde tarif edilen şekilde gerçekleştirildi.

2.2.4.2. Mutlak Kantitasyon

Gen ifadesinin sorgulanmasında örneklerdeki hedef dizinin kopya sayısını doğru ölçmek için mutlak kantitasyon yöntemi kullanıldı. Eş zamanlı PCR işlemi floresan prob teknolojisi temelli, dizin spesifik tespit yöntemiyle gerçekleştirildi. Testin normalizasyonu için β -aktin, housekeeping gen olarak seçildi ve her bir örnek için ifadesi, ayrı testlerde diğer genlere paralel olarak sorgulandı.

2.2.4.2.1. Primer ve Prob Tasarımları ve Optimizasyonlar

İfadesi sorgulanacak her bir gen bölgesine yönelik primer ve prob tasarımları CLCbio Main Workbench programı kullanılarak gerçekleştirildi. Tasarım için kullanılan dizinler ve gen bankası aksesyon numaraları Çizelge 2. 3'de verildi. Çalışmada 5' ucunda raportör, 3' ucunda baskılayıcı boya ile işaretli hidroliz problemleri diğer adıyla Taqman problemleri kullanıldı. Çizelge 2.3'de kullanılan primerler ile genom lokalizasyonları ve reaksiyon sonunda elde edilen ürün büyüklükleri gösterildi. Primer çiftlerinin en etkin çalıştıkları bağlanma sıcaklıklarını tespit etmek için primerler 50°C - 60°C sıcaklık aralığında gradyant termal çevirici cihaz (C1000 thermal cycler, Bio Rad, ABD) kullanılarak denendi. Bu amaçla öncelikle öncelikle β -aktin, OTP-1 ve IFN γ için PKT hücrelerinden total RNA izolasyon kiti (Total RNA purification Kit, Norgen Biotek. Corp., Kat.No:17200, Kanada) ile izolasyon işlemi yapıldı. PPRV-N bölgesi ve Pestivirus-5'UTR bölgesi için, stok viruslardan viral RNA izolasyonu kiti ile (Geneall, Ribospin vRD, Kat.No: 302-150, Kore) izolasyon işlemi yapıldı. İzole edilen RNA'lardan cDNA eldesi kit (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Scientific, Kat.No: K1622, Litvanya) ile önerilen protokol doğrultusunda gerçekleştirildi. Gradyant PCR işlemi Çizelge 2.4'de verilen primer çiftleriyle, polimeraz enzimi, tampon, MgCl₂ ve dNTP (Taq DNA polimeraz kit, Thermo Scientific, Kat.No: EP0071, Litvanya) kullanılarak gerçekleştirildi. Miks bileşenleri ve PCR döngüsüne ait zaman/siklus bilgileri Çizelge 2.5'de gösterildi.

Çizelge 2.3. Primer-prob tasarımı için kullanılan dizinler ve aksesyon numaraları

Hedef Gen /Genom	Kullanılan Dizin	Aksesyon Numarası
OTP-1	Ovis aries mRNA for trophoblast protein 1 interferon	X07920.1
IFN γ	Ovis aries interferon, gamma (IFNG), mRNA	NM_001009803.1
BVDV-5' UTR	Bovine viral diarrhoea virus 1, complete genome	NC_001461.1
PPRV-N	Peste des petits ruminants virus complete genome	AJ849636.2
β -aktin	Ovis aries beta actin mRNA, complete cds	U39357.1

Çizelge 2.4. Kullanılan primerler, genom lokalizasyonları ve ürün büyüklükleri

Gen adı	Primer –Prob Dizin (5'→3')	Lokalizasyon	Ürün (bp)
OTP-1	Forward: GGCCTTCGTGCTCTCTCTAC	197-216	118
	Reverse: GAGCCTGAGGTTCTCCCTGG	295-314	
	Prob: FAM-TGACCAGCACCAGGGCCATC-BHQ-1	218-237	
IFN γ	Forward: GAAAGCGGAAGAGAAGTCAGAATC	504-527	70
	Reverse: TGCAGGCAGGAGAACCAT	556-573	
	Prob: FAM-CTTTCGAGGCCGGAGAGCATCAA	529-551	
BVDV-5' UTR	Forward: GRAGTCGTCARTRGTTCAAC	187-206	209
	Reverse: TCAACTCCATGTGCCATGTAC	375-395	
	Prob: FAM-TGCYAYGTGGACGAGGGCATGC-BHQ1	231-252	
PPRV-N	Forward: GAGTCTAGTCAAAACCCTCGTGAG	1545-1568	98
	Reverse: TCTCCCTCCTCGGTCCTC	1623-1642	
	Prob: FAM-CGGCTGAGGCACTCTTCAGGCTGC-BHQ1	1579-1602	
β -aktin	Forward: GAAATCGTCCGTGACATCAA	705-724	109
	Reverse: GCAGCTCGTAGCTCTTCTCC	794-813	
	Prob: TexRed- CCTGCTCGAAGTCCAGGGCC- BHQ2	743-762	

Çizelge 2.5. Gradyant PCR miks bileşenleri ve döngü zaman/siklus bilgileri

Bileşen	Miktar (μL)	Döngü
10XTaq tamponu	3	95°C - 5 dk 95°C - 1 dk (*)°C - 1 dk 72°C - 2 dk 72°C - 10 dk
MgCl ₂	2,4	
10mM dNTP mix	0,5	
Forward Primer (10 pmol/ μL)	0,5	
Reverse Primer(10 pmol/ μL)	0,5	
Taq DNA polimeraz (5u/ μL)	0,5	
Deiyonize su	19,6	
cDNA	3	
Toplam	30	

(*): 50°C, 52°C, 54°C, 56°C, 60°C)

Oluşan ürünler, görüntülenmek amacıyla, agaroz jel elektroforeze tabi tutuldu. Bunun için %3' lük agaroz (Agarose low EEO, Appllichem, Kat. No: A2114, Almanya) 0,5X TAE (Ek-1) tamponu içinde ısı yardımıyla çözülerek hazırlandı. 50-55°C'ye soğutulan karışımın üzerine ethidium bromide (Sigma, Kat. No: E1510, Almanya) 0,5 $\mu\text{g/ml}$ yoğunlukta ilave edildi, jel bu haliyle tarak yerleştirilmiş olan jel taşıyıcısına döküldü. Katılaştıran agarozdaki tarak çıkartılıp jel taşıyıcısı elektroforez tankına yerleştirildi. Tank tamponu olarak da 0,5X TAE kullanıldı. Ürünler 5 kısım, 6X yükleme boyası (6X DNA Loading Dye, Thermo Scientific, Kat. No: R0611, Litvanya) 1 kısım karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Ürün büyüklüğünün belirlenmesi amacıyla 1 μL DNA merdiveni (GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder, Thermo Scientific, Kat. No: SM1213, Litvanya) de bir kuyucuğa yüklendi. Jel 8 volt/cm elektrik akımına tabi tutuldu. Yaklaşık 30 dk sonra jel görüntüleme sistemi (Kodak, Gel Logic 100, ABD) kullanılarak DNA bantları görüntülendi. Ürünlerin doğru bp'de bant oluşturduğu doğrulandıktan sonra her bir gen için en net ve büyük bandın olduğu derece Eş Zamanlı PCR işlemi için bağlanma/uzama derecesi olarak kullanıldı.

2.2.4.2.2. Rekombinant DNA Standartlarının Hazırlanması ve Kantitasyonlar

Mutlak kantitasyon yöntemi bilinen konsantrasyondaki standartların seri sulandırmalarını kullanarak standart kalibrasyon eğrisi oluşturma esasına (Reischl ve Kochanowski, 1995) dayandığı için ilk olarak söz konusu genler için standartlar oluşturuldu. Standartlar, amplifiye olmuş hedef gen/genom bölgelerinin plazmide klonlanması yoluyla rekombinant DNA eldesi yöntemi ile oluşturuldu.

2.2.4.2.2.1. Hedef Bölgelerin Eş Zamanlı RT-PCR ile Çoğaltılması

Hedeflenen viral ve hücresel gen bölgelerine ait transkriptlerin (total RNA'lar üzerinden) Eş Zamanlı RT-PCR ile çoğaltılması Çizelge 2.1'deki miks kullanılarak ve Çizelge 2.2'de verilen protokol doğrultusunda gerçekleştirildi.

2.2.4.2.2.2. Eş Zamanlı RT-PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

Ürünler agaroz jel elektroforeze tabi tutuldu. Bunun için %3' lük agaroz ile hazırlanan preparatif jel ve geniş taraklar kullanıldı. Kuyucuklara 25µL ürün, 5µL 6x yükleme boyası karıştırılarak yüklendi. Elektroforez işlemi daha önce tarif edildiği gibi gerçekleştirildi. İşlem sonrasında görüntülenen bantlar bir bisturi yardımıyla jelden kesilerek ayrıldı ve 1,5ml'lik tüplere konuldu. Bu jel parçaları ticari bir kit (High Pure PCR Product Purification Kit, Sigma, Kat.No:11732668001, Almanya) kullanılarak işlenmek suretiyle, çoğaltılmış DNA fragmanlarının önerilen protokol doğrultusunda agaroz jelden saflaştırılması işlemi tamamlandı.

2.2.4.2.2.3. Saflaştırılan Ürünlerin Klonlanması

Saflaştırılan ürünler, PCR ürünlerinin sonlarına Taq Polimeraz tarafından eklenen Adenin bazı sebebiyle, linearize 3' ucunda Timin rezidüsü taşıyan bir vektörle klonlama esasına dayalı TA klonlama kiti (Topo TA, Invitrogen, Kat.No:461020,

ABD) ile klonlandı. Klonlama reaksiyonu 3,5µL PCR ürünü, 1µL tuz solüsyonu, 1µL TOPO® vektör, 0,5µL su kullanılarak son hacim 6µL olacak şekilde hazırlandı. Reaksiyon nazikçe karıştırılıp, 5dk süreyle 22–23°C’de tutuldu. Süre sonunda reaksiyon karışımı buz üzerine alındı ve kit içeriğindeki kimyasal kompeten DH5α-T1 *Escherichia coli* bakterileri ile firmanın önerdiği protokole uygun şekilde transformasyon işlemi gerçekleştirildi ve bakteriler Luria Bertani (LB) agar (LB Agar-Powder, Applichem, Kat.No: A927, Almanya) yüzeyine yayıldı. Kültürde geçen 24 saat sonrasında, agarlardan istenen DNA dizisini taşıyan plazmidleri taşıyan beyaz koloniler her bir gen/genom bölgesi için 5 koloni olacak şekilde seçildi ve 1/1000 oranında ampisilin (Sigma, Kat.No: A9518, Almanya) içeren sıvı LB besi yerine (LB Broth, Sigma, Kat.No: L3022, Almanya) 10 ml’lik tüplerde ekildi. 24 saat süresince çalkalamalı etüvde (Benchtop Incubator Shaker, Zhwy 100B, Zhicheng, Çin) bekletilen tüplerdeki karışımdan süre sonunda plazmid DNA izolasyonu ticari bir kit (Plasmid DNA Purification Kit, Macherey-Nagel, Kat.No:740588, Almanya) ile önerilen protokol doğrultusunda gerçekleştirildi.

2.2.4.2.2.3. Standartların Kantitasyonları

İzole edilen plazmidler BamHI Restriksiyon Endonükleaz enzimi (FastDigest BamHI, Thermo Scientific, Kat.No: FD0054, Litvanya) ile linearize edildi. Bu amaçla 10µL plazmid, 1,5µL tampon, 1,5µL deiyonize su, 2µL BamHI ile hazırlanan karışım 20 dk süre ile 37°C’de bekletildi. İşlem sonrasında lineer hale gelen plazmidler %1’lik agaroz jelde daha önce tarif edilen şekilde elektroforeze tabi tutuldu oluşan bantlar ticari kit (High Pure PCR Product Purification Kit, Sigma, Kat.No:11732668001, Almanya) ile saflaştırıldı. Saflaştırma işlemi sonunda plazmidlerin yoğunlukları spektrofotometre (Picodrop, Picopet01, İngiltere) ile ölçüldü. Her bir gen/genom bölgesi için uygun yoğunluktaki birer plazmidten 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ve 10^{-6} oranlarında seri sulandırmalar yapıldı ve Çizelge 2’de belirtilen ısı değerleri, zaman ve döngüler kullanılarak analiz programıyla standart eğriler oluşturuldu.

2.2.4.3. Eş zamanlı RT-PCR Kurulumu

Çizelge 2.1. de tarif edilen miks ve Çizelge 2.2’de gösterilen ısı değerleri, zaman ve döngüleri ile Rotor Gene Probe RT-PCR Kit kullanılarak söz konusu genlerin ifadeleri sorgulandı. Her bir 24 gözlü tablette gerçekleştirilen inokulasyonlar için ayrı test grubu oluşturularak testlere tabi tutuldu. Gruplar ve ifadesi sorgulanan genler Çizelge 2.6’da verildi. Her bir gen ifadesi tek döngüde sorgulandı. Her döngüde ifadesi sorgulanan gen için hazırlanan seri standart sulandırmalarından 3’er adet ve 1 adet de hiçbir RNA veya DNA eklenmemiş, yalnızca miks içeren negatif kontrol kullanıldı.

Çizelge 2.6. Eş zamanlı PCR işlemi için oluşturulan gruplar ve ifadesi sorgulanan genler

24 gözlü tablette gerçekleştirilen test	İfadesi Sorgulanan Genler
SFT-R / PKT Hücre Kontrol	β -aktin
	OTP-1
	IFN γ
SFT-R / PKT BVDV inokulasyonu	β -aktin
	OTP-1
	IFN γ
	5' UTR
SFT-R / PKT PPRV inokulasyonu	β -aktin
	OTP-1
	IFN γ
	N
SFT-R / PKT Eş Zamanlı BVDV+PPRV inokulasyonu	β -aktin
	OTP-1
	IFN γ
	5' UTR
	N
SFT-R / PKT Önce BVDV sonra PPRV inokulasyonları (+6., +12., +24. Saatler)	β -aktin
	OTP-1
	IFN γ
	5' UTR
	N

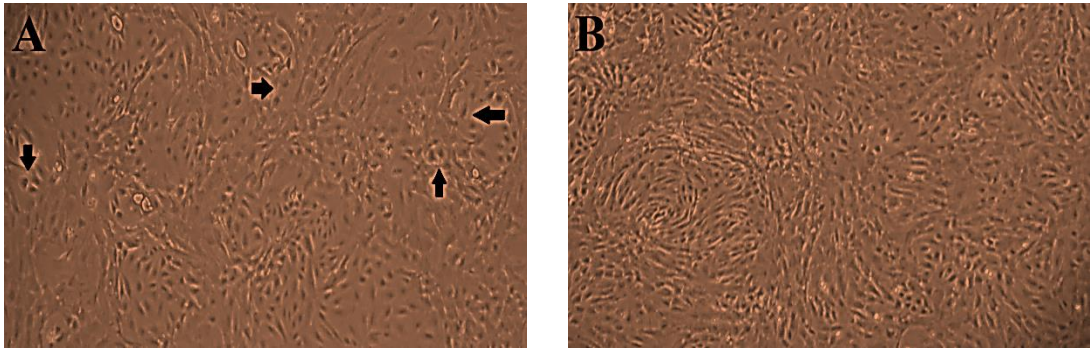
2.2.5. İstatistik Analiz

Eş zamanlı RT-PCR işlemi sonuçlarının değerlendirilebilmesi amacıyla, işlemin gerçekleştiği cihaza ait olan yazılım ile analiz verileri elde edildi. Analizler her bir test için ayrı oluşturuldu, termal döngüye tabi tutulan her örnek analizde yer aldı. İfadesi sorgulanması amaçlanan gen/genom bölgelerinin saatlere göre DNA kopya sayısındaki değişimi değerlendirebilmek için SPSS19 programı ile Tek Yönlü Varyans Analizi yapıldı. Varyansların Homojenite Testi ile testlerin homojen olduğu belirlendi. Descriptives seçeneği de dâhil edilerek tanımlayıcı istatistikler de hesaplandı. Sonrasında Post Hoc testlerinden Tukey testi ile %5 anlamlılık düzeyinde çoklu karşılaştırmalar yapıldı. Sonuçların Ewiev Programı ile analizleri tekrarlanarak sağlamaları yapıldı. Sonuçların kolay anlaşılabilirliği için Microsoft Excel Programı ile elde edilen analiz tabloları çizgi ve sütun grafiklerine dönüştürüldü.

3. BULGULAR

3.1. Hücre Kültürleri

Primer Koyun Trofoblast (PKT) hücre kültürleri hazırlandıktan itibaren on gün süreyle gerçekleştirilen doku kültürü mikroskobu gözlemlerinde, çift çekirdekli hücrelerin varlığı görüldü. Kültürlerdeki monolayer tabakalanma yaygınlaştıkça çift çekirdekli hücrelerin yerini tek çekirdekli hücrelerin aldığı gözlemlendi (Şekil 3.1.). Devamlı bir hat olan SFT-R hücrelerinin, virusların inokulasyonuna kadar olan süreci kültür ortamında sorunsuz bir şekilde tamamladı (Şekil 3.2.A).

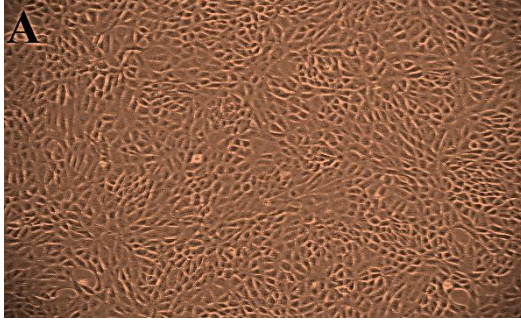


Şekil 3.1. PKT hücre kültürlerinin 40X büyütme ile doku kültürü mikroskobu görüntüleri; A: 10. gün. B: 14. gün. Oklar: Çift çekirdekli hücreler

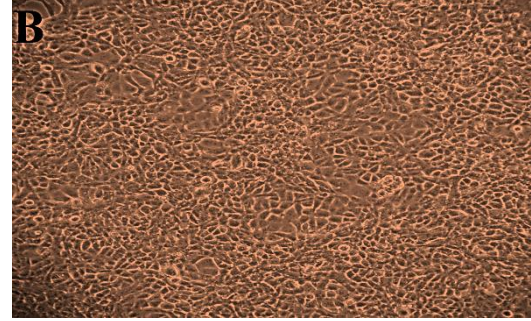
3.2. SFT-R Hücre Hattına ve PKT Hücre Kültürüne Virusların İnokulasyonları

SFT-R hücre hattına yapılan tüm inokulasyonlarda, izolasyon öncesi 0, 12, 24, 48, 72 ve 96. saatlerde mikroskop ile hücreler sitopatolojik etki (CPE) yönünden incelendi. Tekli virus inokulasyonlarında ilk CPE bulgusu PPRV için 96. saatte gözlenirken, BVDV için CPE oluşumunun 72. saatte başladığı ancak 96. saatte belirginleştiği görüldü. Eş zamanlı inokulasyon ve önce BVDV sonra 6. saat ve 12. saat PPRV inokulasyonları sonrasında 72. saatte BVDV spesifik CPE odakları oluşmaya başladığı görülürken 96. saatte iki virusa ait CPE gözlemlendi. Önce BVDV sonra 24. saat PPRV inokulasyonlarında ise 72. saatte BVDV spesifik CPE odakları

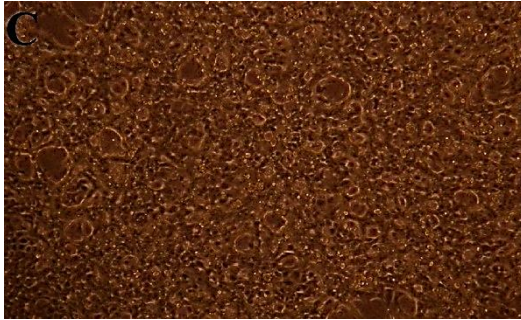
oluşmaya başladığı tespit edilirken, 96. saatte bu CPE oluşumunun çok belirginleştiği gözlemlendi. Bu kombine inokulasyonlarda PPRV spesifik CPE tespit edilemedi. Hücrelerde 96. saatte (son RNA izolasyonu öncesi) hücrelerin mikroskop görüntüleri Şekil 3.2.'de verildi.



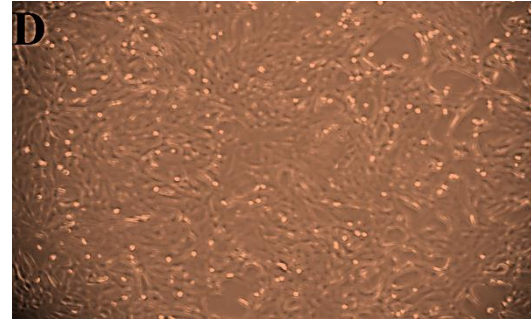
A: SFT-R hücre hattı



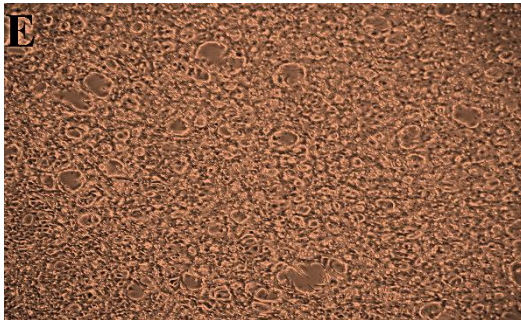
B: PPRV inokulasyonu sonrası 96. Saat



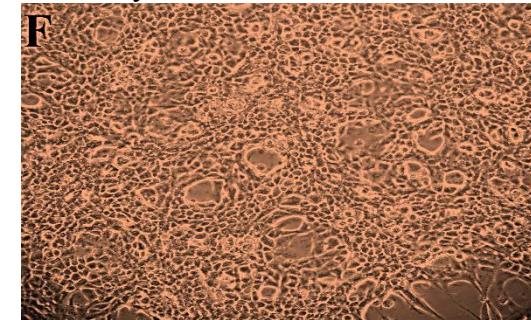
C: BVDV inokulasyonu sonrası 96. Saat



D: Eş zamanlı PPRV ve BVDV inokulasyonu sonrası 96. Saat



E: BVDV inokulasyonunu takiben 6. saatte PPRV inokulasyonu sonrası 96. Saat



F: BVDV inokulasyonunu takiben 12. saatte PPRV inokulasyonu sonrası 96. Saat

Şekil 3.2. SFT-R hücre hattına yapılan inokulasyonlar sonrası 40X büyütme ile doku kültürü mikroskobu görüntüleri.



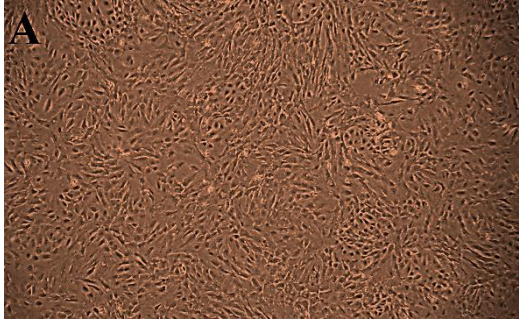
G: BVDV inokulasyonunu takiben
24. saatte PPRV inokulasyonu
sonrası 96. Saat

Şekil 3.2. SFT-R hücre hattına yapılan inokulasyonlar sonrası 40X büyütme ile doku kültürü mikroskopu görüntüleri (devam).

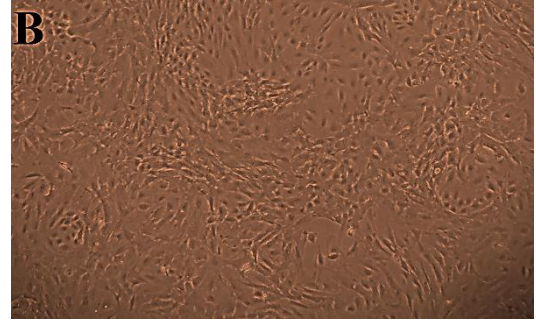
PKT hücre kültürüne yapılan tüm inokulasyonlarda da total RNA izolasyonu öncesi mikroskop ile hücreler CPE yönünden incelendi. Tekli virus inokulasyonlarında PPRV için ilk CPE 96. saatte gözlemlenirken, BVDV için CPE oluşumunun 72. saatte belirginleştiği 96. saatte ise canlı hücre sayısının oldukça azaldığı görüldü. Eş zamanlı inokulasyon ve önce BVDV sonra PPRV inokulasyonu sonrası 72. saatte her iki virusa ait CPE görülürken 96. saatte yine canlı hücre sayısının oldukça azaldığı saptandı. Önce BVDV sonra 12. saat ve 24. saat PPRV inokulasyonları sonrasında 48. saatte her iki virusa ait kuvvetli CPE görülürken 72. saatte canlı hücre sayısının oldukça azaldığı gözlemlendi. Son RNA izolasyonu zamanı öncesi ve canlı hücre sayısının yetersizliği sebebiyle izolasyon yapılmaya uygun bulunmayan hücrelerin mikroskop görüntüleri Şekil 3.3.'de verildi. Virusların iki hücre kültüründe hesaplanan enfeksiyözite güçleri Çizelge 3.1'de verildi.

Çizelge 3.1. Virusların hücre kültürlerinde hesaplanan DKID₅₀ değerleri

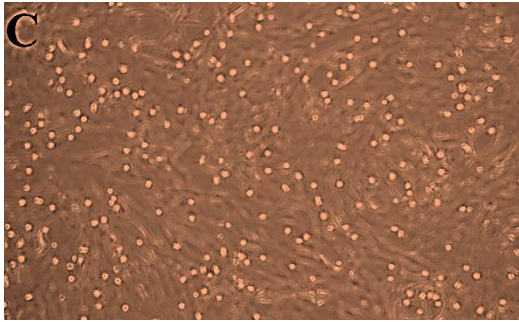
	SFT-R	PKT
BVDV	10 ⁻⁶	10 ⁻⁸
PPRV	10 ⁻³	10 ⁻⁴



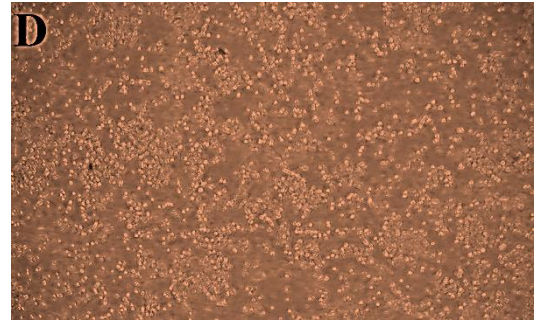
A: PKT hücre kültürü



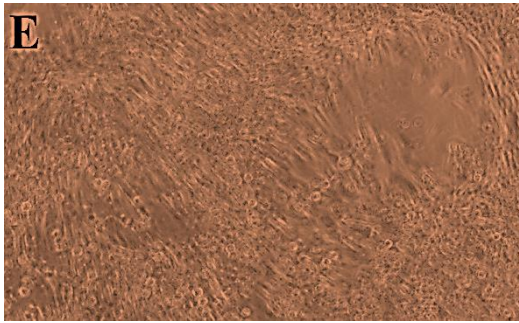
B: PPRV inokulasyonu sonrası 96. Saat



C: BVDV inokulasyonu sonrası 72. Saat



D: BVDV inokulasyonu sonrası 96. Saat

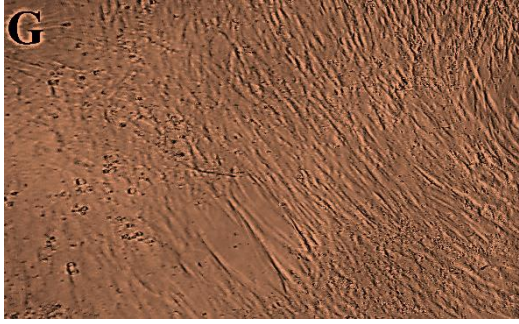


E: Eş zamanlı PPRV ve BVDV inokulasyonu sonrası 72. Saat

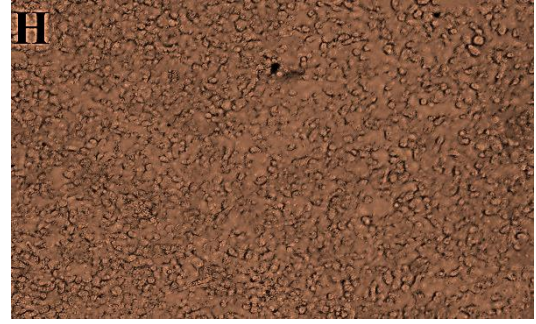


F: Eş zamanlı PPRV ve BVDV inokulasyonu sonrası 96. Saat

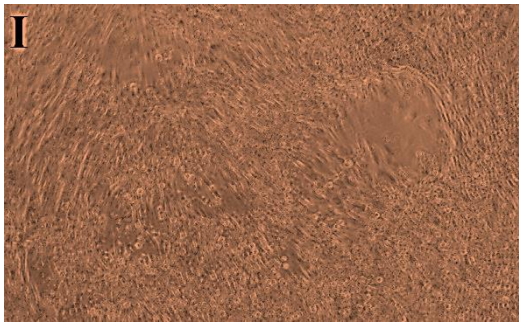
Şekil 3.3. PKT hücre kültürüne yapılan inokulasyonlar sonrası 40X büyütme ile doku kültürü mikroskobu görüntüleri.



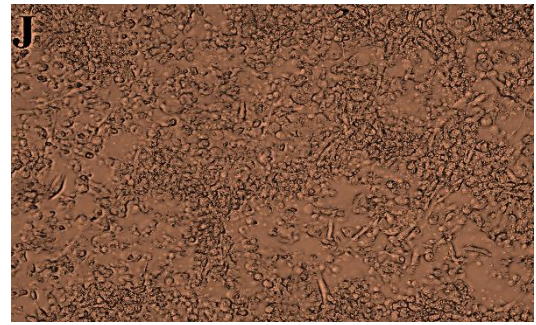
G: BVDV inokulasyonunu takiben 6. saatte PPRV inokulasyonu sonrası 72. Saat



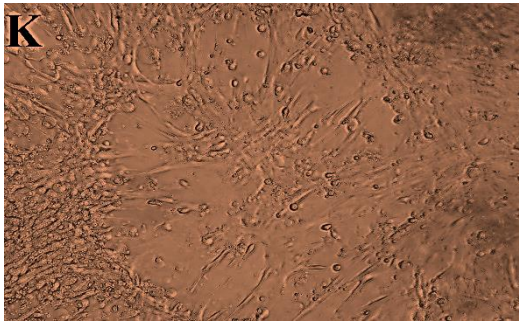
H: BVDV inokulasyonunu takiben 6. saatte PPRV inokulasyonu sonrası 72. Saat



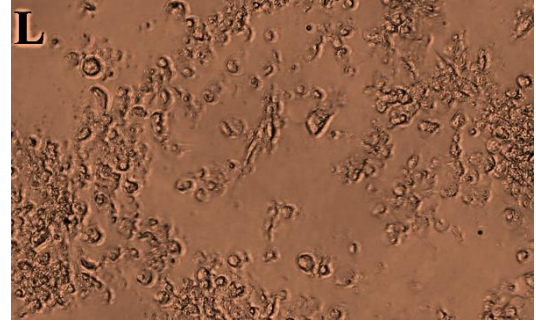
I: BVDV inokulasyonunu takiben 12. saatte PPRV inokulasyonu sonrası 48. Saat



J: BVDV inokulasyonunu takiben 12. saatte PPRV inokulasyonu sonrası 72. Saat



K: BVDV inokulasyonunu takiben 24. saatte PPRV inokulasyonu sonrası 48. Saat

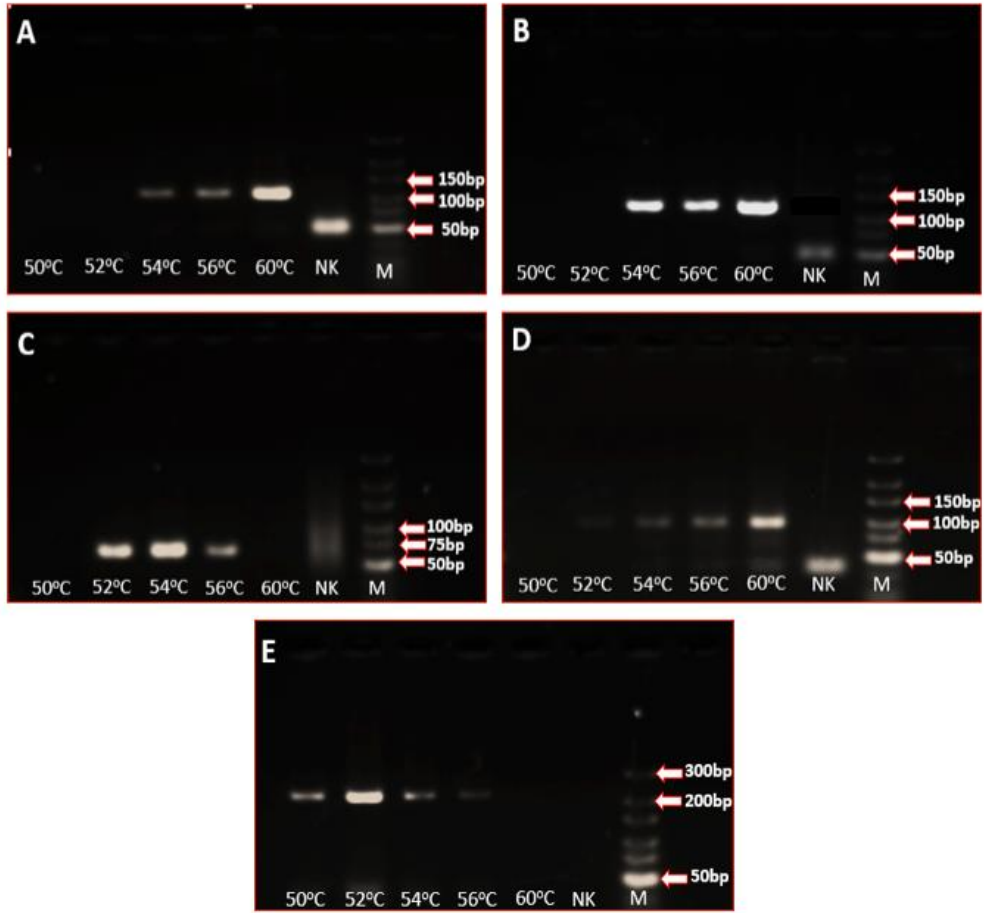


L: BVDV inokulasyonunu takiben 24. saatte PPRV inokulasyonu sonrası 72. Saat

Şekil 3.3. PKT hücre kültürüne yapılan inokulasyonlar sonrası 40X büyütme ile doku kültürü mikroskobu görüntüleri (devam).

3.3. PCR Optimizasyonu

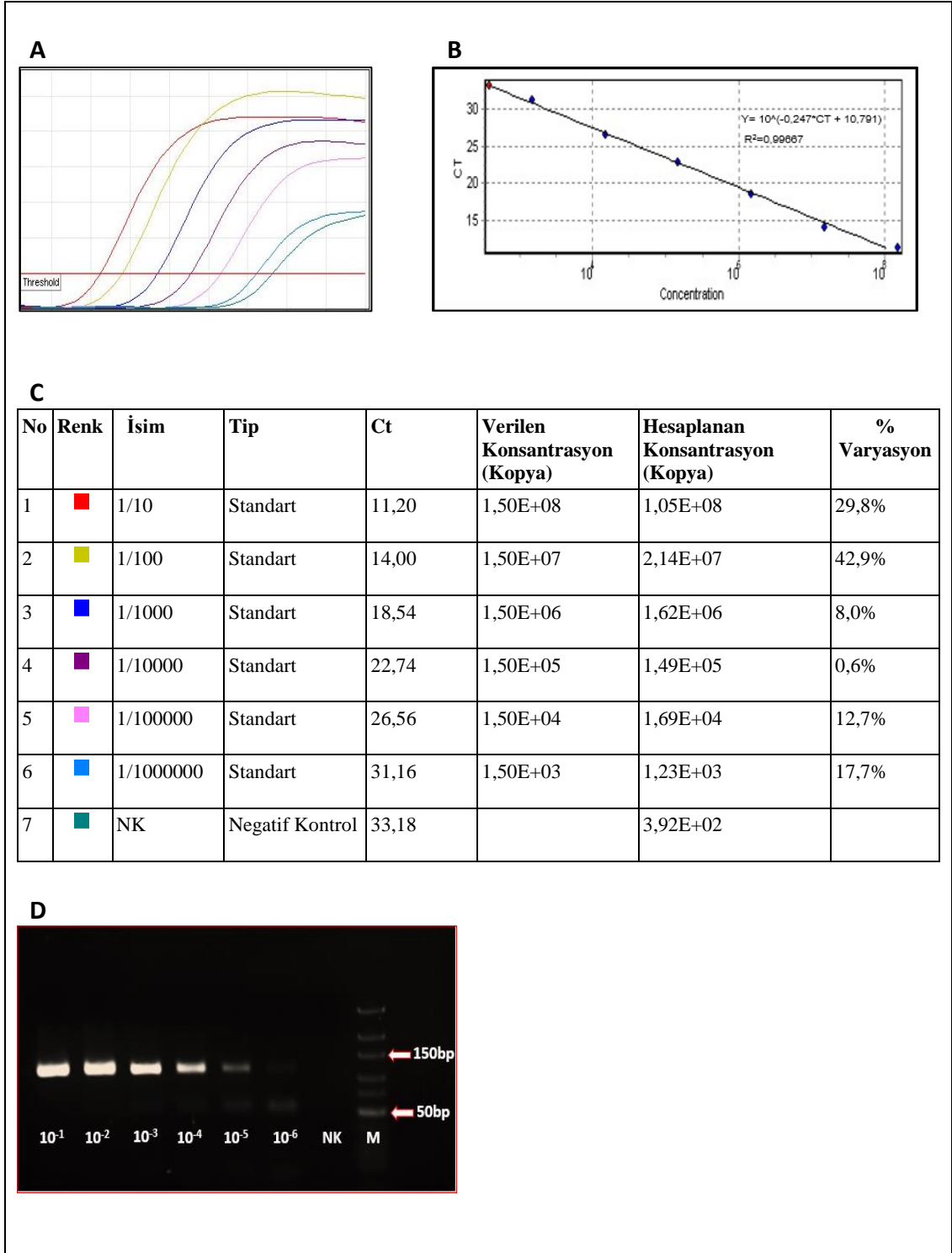
Araştırmada kantitasyonu çalışılacak viral ve hüresel transkriptlere yönelik olarak tasarlanan primer çiftlerinin en etkin çalıştıkları bağlanma sıcaklıklarını bulmak amacıyla Gradyant PCR işlemi gerçekleştirildi. Bu çalışma sonunda β -aktin, OTP-1, IFN γ , PPRV-N ve BVDV 5' UTR için yapılacak PCR uygulamalarında Tm değerleri sırasıyla 60°C, 60°C, 54°C, 60°C ve 52°C olarak tespit edildi. Reaksiyon sonrası agaroz jelde görüntüleri Şekil 3.4.'de sunuldu.



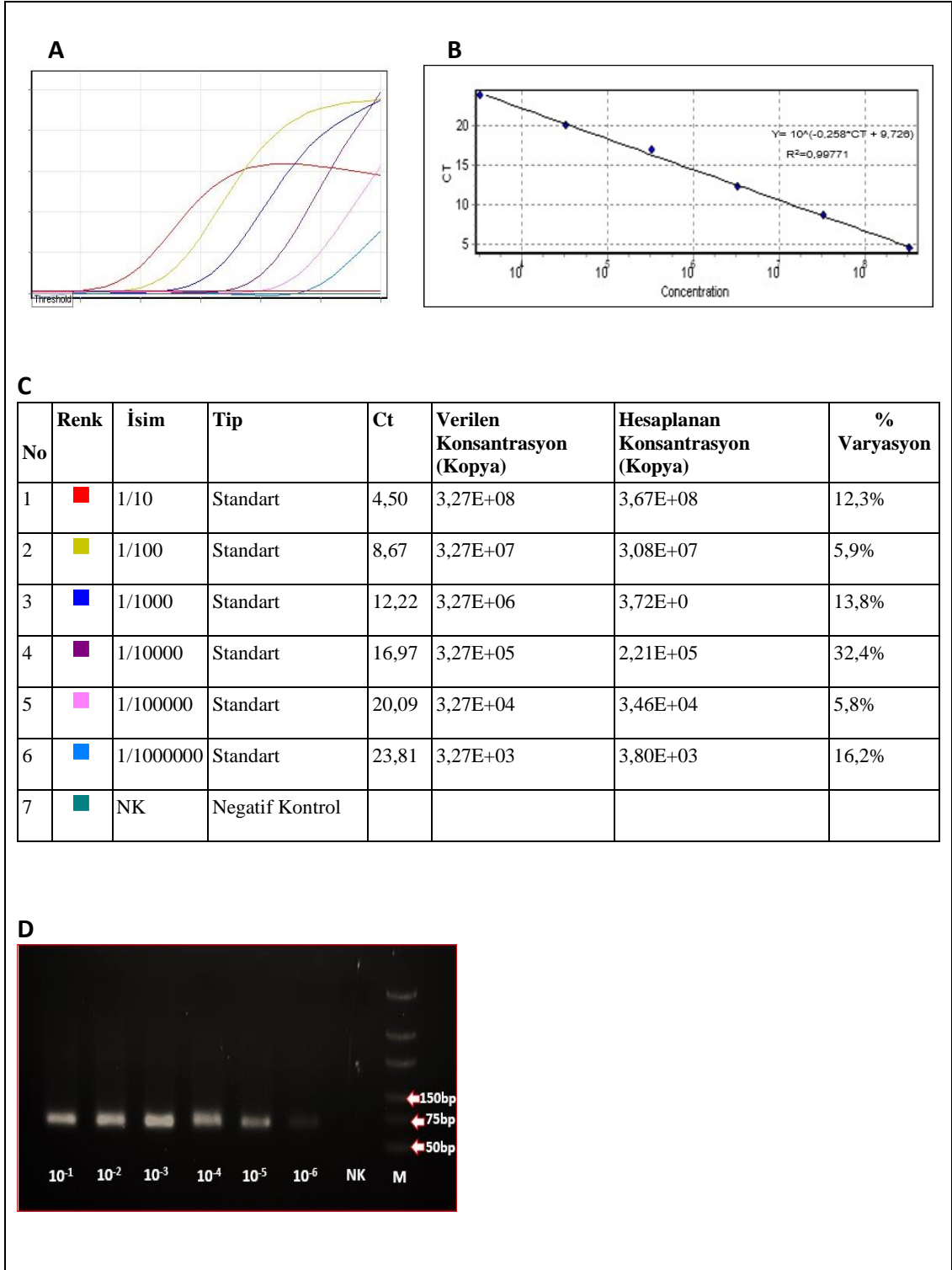
Şekil 3.4. A: β -aktin, B: OTP-1, C: IFN γ , D: PPRV-N, E: BVDV 5' UTR için Gradyant PCR işlemi sonrası oluşan ürünlerin agaroz jel görüntüleri. NK: Negatif Kontrol, M: DNA Merdiveni

3.4. Hazırlanan DNA Standartlarının Kantitasyonu

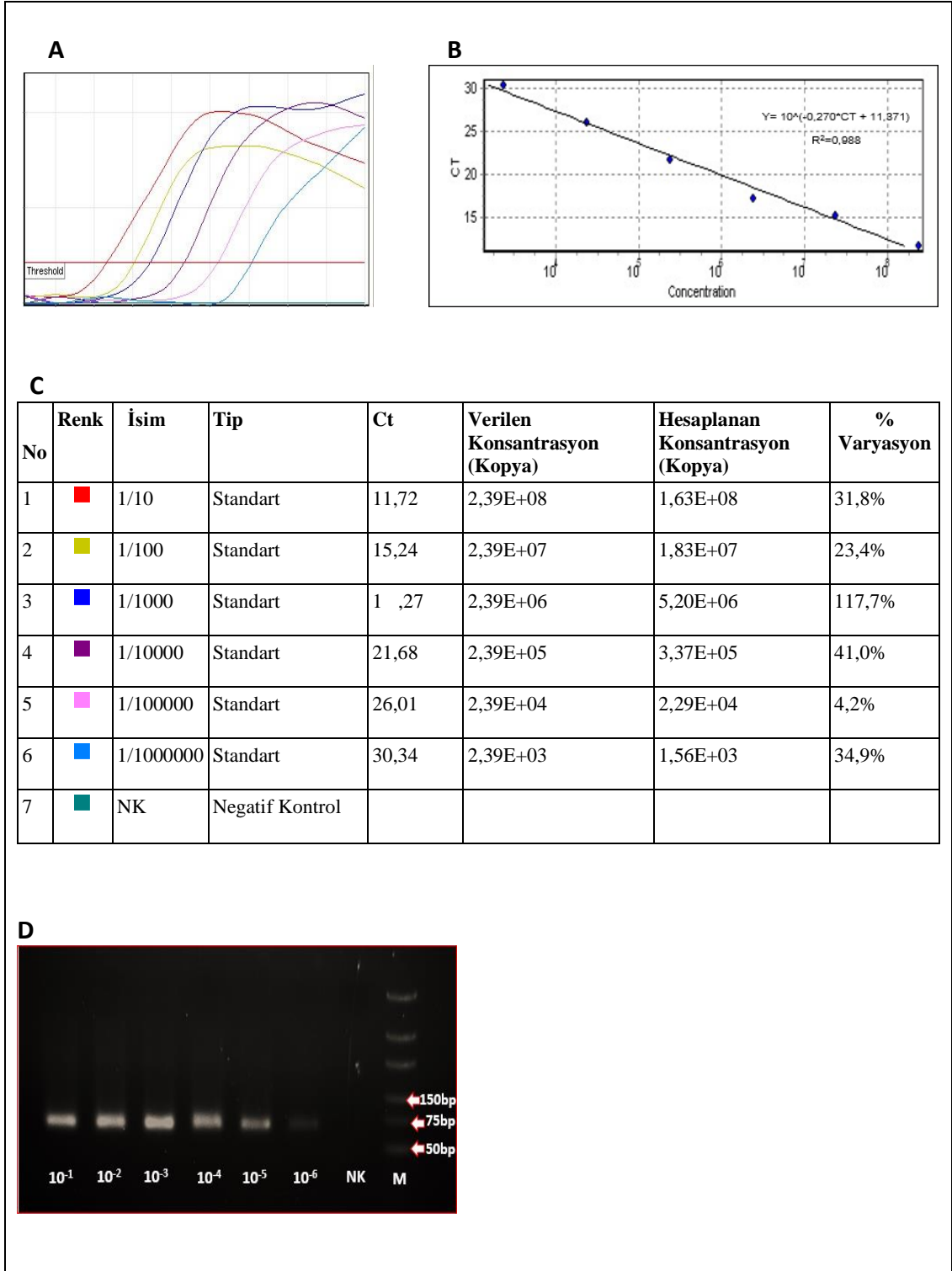
Rekombinant plazmid DNA standartlarının seri sulandırmaları ile yapılan Eş zamanlı RT-PCR işlemi ile her bir gen bölgesi için kantitasyon işlemi gerçekleştirildi. Tüm gen bölgeleri için standartların sulandırmaları 10^{-1} ve 10^{-6} arasında yapıldı, Eş Zamanlı PCR işlemi sonunda tüm bölgeler için olması gerektiği gibi standart eğriler oluştu. β -aktin için reaksiyonun etkinliği 0,76; DNA kopya sayısı 10^{-1} sulandırmada $1,05 \times 10^8$, 10^{-6} sulandırmada $1,23 \times 10^3$ olarak hesaplandı, CT değerleri 11 ve 31. siklus arasında kaldı. Aynı değerler OTP-1 için reaksiyon etkinliği 0,81; DNA kopya sayısı 10^{-1} sulandırmada $3,67 \times 10^8$, 10^{-6} sulandırmada $3,80 \times 10^3$; CT değerleri 4 ve 28. siklus arasında değişti. IFN γ için reaksiyon etkinliği 0,86; DNA kopya sayısı 10^{-1} sulandırmada $1,63 \times 10^8$, 10^{-6} sulandırmada $1,56 \times 10^3$ olarak hesaplandı, CT değerleri 11 ve 30. siklus arasında değişiklik gösterdi. PPRV N gen bölgesi için reaksiyon etkinliği 0,81; 10^{-1} sulandırmada DNA kopya sayısı $2,87 \times 10^8$ olarak hesaplanırken 10^{-6} sulandırmada kopya tespit edilemedi, CT değerleri 16 ve 32. siklus arasında değişti. BVDV 5'UTR gen bölgesi için reaksiyon etkinliği 0,82; 10^{-1} sulandırmada DNA kopya sayısı $1,48 \times 10^8$ olarak hesaplanırken PPRV N için olduğu gibi 10^{-6} sulandırmada kopya tespit edilemedi, CT değerleri 18 ve 33. siklus arasında değişti. Tüm standartlarla yapılan Eş Zamanlı PCR işlemi sonunda oluşan kantitasyon verisi, standart eğriler, kantitasyon analizleri ve ürünlerin agaroz jel görüntüleri aşağıda verildi (Şekil 3.5 – 3.9).



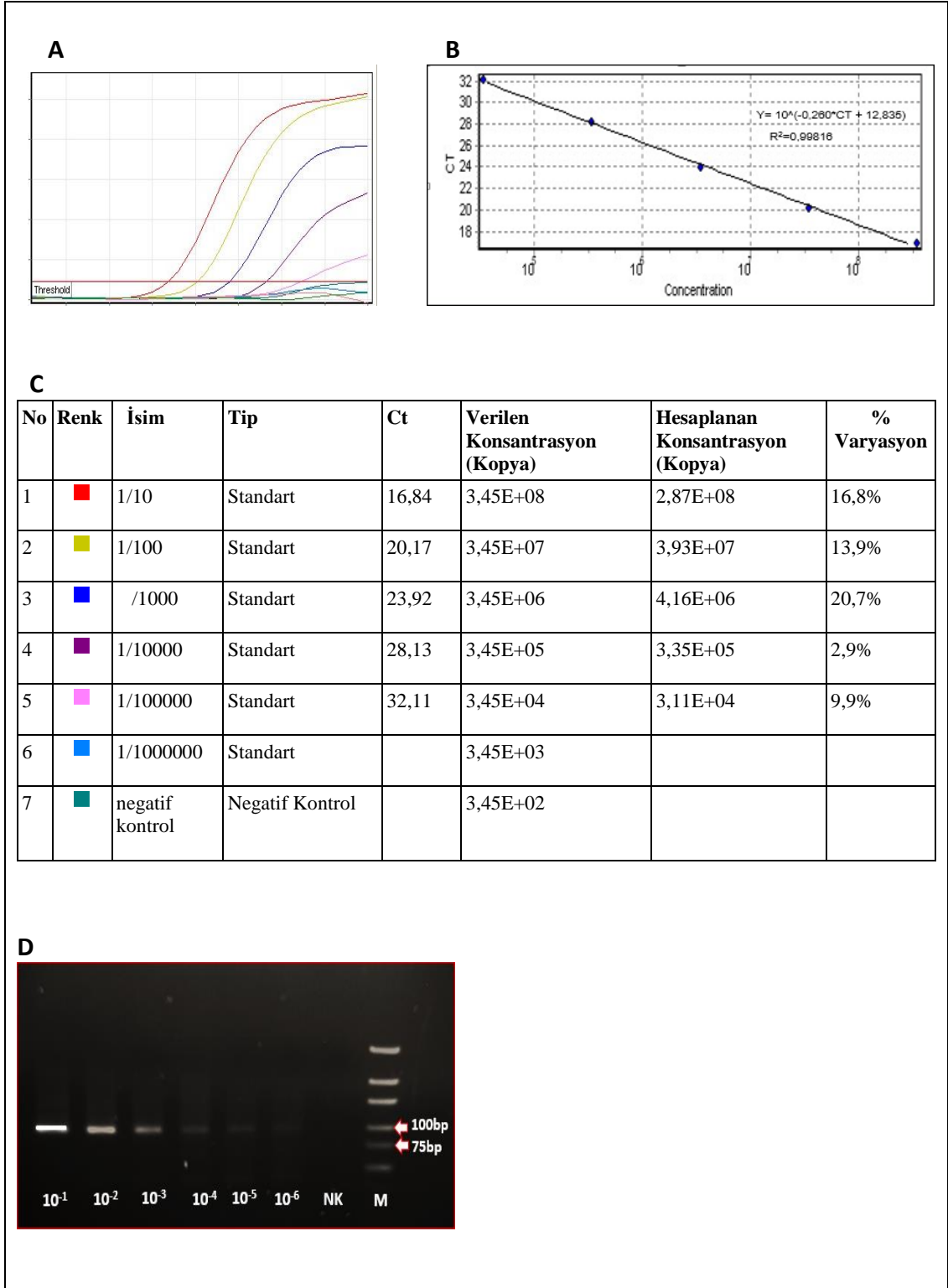
Şekil 3.5. β -aktin için oluşturulan kantitasyon verisi (A), standart eğri (B), kantitasyon analizi (C), agaroz jel görüntüsü (D) için; 10^{-1} - 10^{-6} arası sulandırmalar, N: negatif kontrol, M: 10-300bp DNA merdiveni.



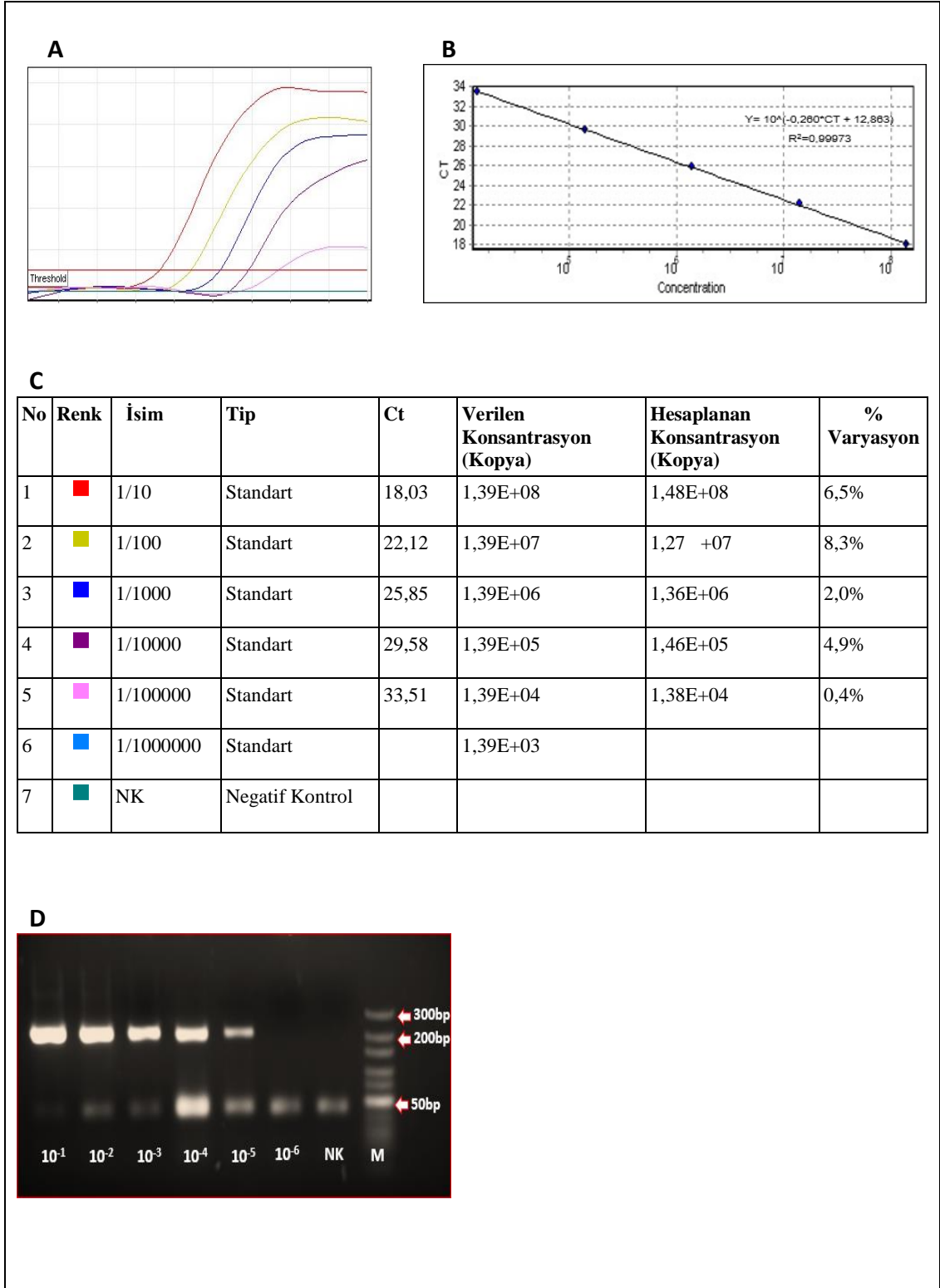
Şekil 3.6. OTP-1 için oluşturulan kantitasyon verisi (A), standart eğri (B), kantitasyon analizi (C), agaroz jel görüntüsü (D) için; 10^{-1} - 10^{-6} arası sulandırmalar, N: negatif kontrol, M: 10-300bp DNA merdiveni.



Şekil 3.7. IFN γ için oluşturulan kantitasyon verisi (A), standart eğri (B), kantitasyon analizi (C), agaroz jel görüntüsü (D) için; 10^{-1} - 10^{-6} arası sulandırılmalar, N: negatif kontrol, M: 10-300bp DNA merdiveni.



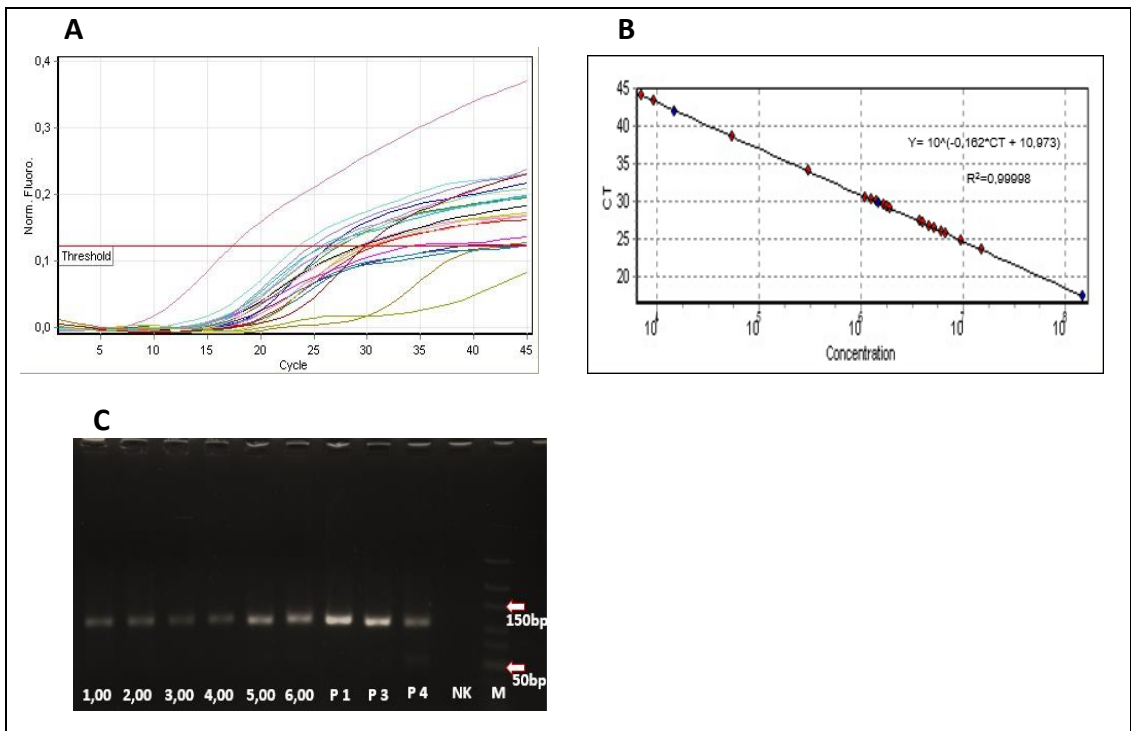
Şekil 3.8. PPRV-N için oluşturulan kantitasyon verisi (A), standart eğri (B), kantitasyon analizi (C), agaroz jel görüntüsü (D) için; 10^{-1} - 10^{-6} arası sulandırmalar, N: negatif kontrol, M: 10-300bp DNA merdiveni.



Şekil 3.9. BVDV-5'UTR için oluşturulan kantitasyon verisi (A), standart eğri (B), kantitasyon analizi (C), agaroz jel görüntüsü (D) için; 10^{-1} - 10^{-6} arası sulandırmalar, N: negatif kontrol, M: 10-300bp DNA merdiveni.

3.5. Eş Zamanlı RT-PCR Sonuçları ve İstatistiksel Analizleri

Eş zamanlı PCR işlemi sonunda oluşan analiz verilerinin Tek Yönlü Varyans Analizi ile değerlendirilmesi yapıldı. Oluşturulan Anova tablosunda "önem" değeri $p=0.000<0.05$ olduğunda tek yönlü varyans analizi için olan H_0 hipotezi reddedildi. Yani %95 güvenle, grupların ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır sonucuna varıldı. Hangi grupların ortalamaları arasında farklılıklar olduğunu görmek için çoklu karşılaştırma tablosu incelendi. Elde edilen sonuçlardan istatistik analiz sonucu istatistiksel olarak anlamlı farklılık olan ve olmayan birer testin sonuçları verildi (Şekil 3.10, 3.11 ve Çizelge 3.2, 3.3, 3.4, 3.5). Diğer tüm gen/genom bölgesi analizleri Ek-2’de verildi.



Şekil 3.10. PKT hücre kültüründe virus inokulasyonu olmadan β -aktin geni ifadesinde oluşan değişiklikler için kantitasyon verisi (A), standart eğri (B), Agaroz jel görüntüsü (C) için 1,00: 0.saat; 2,00: 12.saat; 3,00: 24.saat; 4,00: 48.saat; 5,00: 72.saat; 6,00: 96.saat havuzlanmış ürünleri, P1: plazmid 10-1; P2: plazmid 10-2; P3: plazmid 10-3; P4 plazmid 10-4; sulandırılmaları, M: DNA merdiveni.

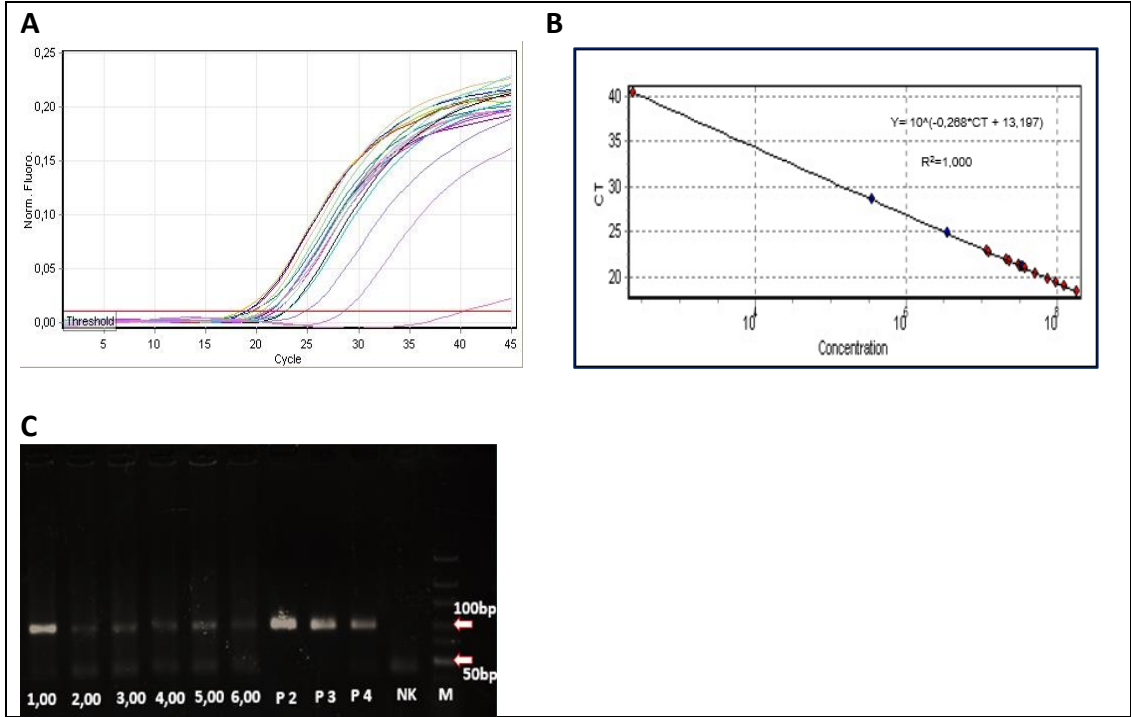
Çizelge 3.2. PKT hücre kültüründe virus inokulasyonu olmadan β -aktin geni ifadesinde oluşan değişiklikler için kantitasyon analizi.

No	Renk	İsim	Tip	Ct	Verilen Konsantrasyon (Kopya)	Hesaplanan Konsantrasyon (Kopya)	% Varyasyon
1	■	0.saat	Unknown	30,53		1,10E+06	
2	■	0.saat	Unknown	29,43		1,66E+06	
3	■	0.saat	Unknown	26,35		5,22E+06	
4	■	12.saat	Unknown	38,61		5,47E+04	
5	■	12.saat	Unknown	29,05		1,91E+06	
6	■	12.saat	Unknown	44,11		7,06E+03	
7	■	24.saat	Unknown	43,33		9,43E+03	
8	■	24.saat	Unknown	30,15		1,27E+06	
9	■	24.saat	Unknown	27,25		3,73E+06	
10	■	48.saat	Unknown	33,97		3,07E+05	
11	■	48.saat	Unknown	29,21		1,80E+06	
12	■	48.saat	Unknown	25,94		6,08E+06	
13	■	72.saat	Unknown	29,86		1,41E+06	
14	■	72.saat	Unknown	27,02		4,07E+06	
15	■	72.saat	Unknown	23,49		1,51E+07	
16	■	96.saat	Unknown	25,64		6,79E+06	
17	■	96.saat	Unknown	24,74		9,49E+06	
18	■	96.saat	Unknown	26,65		4,67E+06	
19	■	plazmid 1/10	Standart	17,29	1,50E+08	1,52E+08	1,3%
20	■	plazmid 1/1000	Standart	29,77	1,50E+06	1,46E+06	2,5%
21	■	plazmid 1/100000	Standart	42,05	1,50E+04	1,52E+04	1,3%
22	■	NK	Negatif Kontrol				

Çizelge 3.3. PKT hücre kültüründe virus inokulasyonu olmadan β -aktin geni ifadesinde oluşan değişiklikler için Tukey ve Anova Analizleri.

TUKEY								
	S	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata	95% Güven Aralığı		Minimum	Maksimum
					Alt sınır	Üst sınır		
1,00	3	1094000,0000	569023, 72534	328526, 00100	-319533,2950	2507533, 2950	522000, 00	1660000, 00
2,00	3	1054333,3333	745281, 37863	430288, 40457	-797048,2452	2905714, 9119	547000, 00	1910000, 00
3,00	3	1981000,0000	1523477, 27256	879580, 01342	-1803527,3458	5765527, 3458	943000, 00	3730000, 00
4,00	3	1826000,0000	1231205, 91292	710837, 06525	-1232485,0392	4884485, 0392	608000, 00	3070000, 00
5,00	3	6860000,0000	7258932, 42839	4190946, 59156	-11172187,7924	24892187, 7924	1410000, 00	15100000, 00
6,00	3	2099333,3333	2230352, 06488	1287694, 36505	-3441168,3415	7639835, 0082	679000, 00	4670000, 00
Total	18	2485777,7778	3401066, 81456	801639, 13595	794467,0410	4177088, 5146	522000, 00	15100000, 00

ANOVA					
	Karaler Toplamı	df	Ortalama Kare	F	Önem
Gruplar içi	1,083E14	5	2,166E13	1,682	,213
Gruplar arası	1,545E14	12	1,288E13		
Toplam	2,628E14	17			



Şakil 3.11. PKT hücre kültürüne BVDV inokulasyonu sonrası 6.saatte PPRV inokulasyonu sonrası PPRV-N genom bölgesi ifadesinde oluşan değişiklikler için kantitasyon verisi (A), standart eğri (B), Agaroz jel görüntüsü (C) için 1,00: 0.saat; 2,00: 12.saat; 3,00: 24.saat; 4,00: 48.saat; 5,00: 72.saat; 6,00: 96.saat havuzlanmış ürünleri, P1: plazmid 10-1; P2: plazmid 10-2; P3: plazmid 10-3; P4 plazmid 10-4; sulandırılmaları, M: DNA merdiveni.

Çizelge 3.4. PKT hücre kültürüne BVDV inokulasyonu sonrası 6.saatte PPRV inokulasyonu sonrası PPRV-N genom bölgesi ifadesinde oluşan değişiklikler için kantitasyon analizi.

No	Renk	İsim	Tip	Ct	Verilen Konsantrasyon (Kopya)	Hesaplanan Konsantrasyon (Kopya)	% Varyasyon
1	■	0:saat	Unknown	19,04		1,23E+08	
2	■	0:saat	Unknown	18,43		1,80E+08	
3	■	0:saat	Unknown	19,03		1,24E+08	
4	■	12:saat	Unknown	21,27		3,11E+07	
5	■	12:saat	Unknown	21,13		3,40E+07	
6	■	12:saat	Unknown	21,22		3,21E+07	
7	■	24:saat	Unknown	19,45		9,58E+07	
8	■	24:saat	Unknown	20,97		3,75E+07	
9	■	24:saat	Unknown	21,15		3,36E+07	
10	■	48:saat	Unknown	21,89		2,13E+07	
11	■	48:saat	Unknown	22,85		1,17E+07	
12	■	48:saat	Unknown	22,77		1,23E+07	
13	■	72:saat	Unknown	19,88		7,36E+07	
14	■	72:saat	Unknown	20,47		5,11E+07	
15	■	72:saat	Unknown	21,73		2,35E+07	
16	■	plazmid 1/100	Standart	21,11	3,45E+07	3,45E+07	0,0%
17	■	plazmid 1/1000	Standart	24,83	3,45E+06	3,45E+06	0,1%
18	■	plazmid 1/10000	Standart	28,57	3,45E+05	3,45E+05	0,0%
19	■	NK	Negatif Kontrol	40,34		2,41E+02	

Çizelge 3.5. PKT hücre kültürüne BVDV inokulasyonu sonrası 6.saatte PPRV inokulasyonu sonrası PPRV-N genom bölgesi ifadesinde oluşan değişiklikler için Tukey ve Anova Analizleri.

TUKEY								
	S	Ortalama	Std. Sapma	Std.Hata	95% Güven Aralığı		Minimum	Maksimum
					Alt sınır	Üst sınır		
1,00	3	1,423300000	32624121,9549	18835545,5927	61290521,672	2,2338E8	1,230000000	1,800000000
		000	8	8	2		0	0
2,00	3	32400000,00	1473091,98627	850490,05481	28740636,644	36059363,3560	31100000,00	34000000,00
		00			0			
3,00	3	55633333,33	34839967,4703	20114864,5975	- 30913943,735	1,42180000000	33600000,00	95800000,00
		33	3	5	9	0		
4,00	3	15100000,00	5377731,86390	3104834,93925	1740973,4732	28459026,5268	11700000,00	21300000,00
		00						
5,00	3	49400000,00	25093226,1776	14487580,8884	- 12935029,457	1,11740000000	23500000,00	73600000,00
		00	0	7	2	0		
Total	15	58973333,33	49947078,6599	12896280,2561	31313563,116	86633103,5503	11700000,00	1,800000000
		33	8	2	3			0

ANOVA					
	Karelerin toplamı	df	Ortalama kare	F	Önem
Gruplar içi	2,905E16	4	7,262E15	12,355	,001
Gruplar arası	5,878E15	10	5,878E14		
Toplam	3,493E16	14			

3.6. İstatistiksel Analizler Grafikleri ve İfade Değişimlerinin Yüzde Hesapları

Araştırma bulguları kullanılarak yapılan değerlendirmeler ile gerçekleştirilen İstatistiksel analizler, seri grafikler halinde sunuldu. Bu dik eksen kopya sayısını; yatay eksen zaman 1: 0.saat, 2: 12.saat, 3: 24.saat, 4: 48.saat, 5: 72.saat, 6: 96.saat değerlerinin ortalamalarını gösterecek şekilde grafik haline getirildi. Tukey testinde aynı zaman noktalarının ortalamaları alındı, farklı zaman noktaları ortalamalarındaki değişimler yüzde olarak hesaplandı. Tüm testlerde β -aktin ifadesindeki değişimler Anova analizine göre önemsiz çıktığı için grafikleri oluşturulmadı. Diğer 4 gen/genom bölgeleri içinden de testlere göre istatistiki olarak önemsiz sonuçlar grafik olarak gösterilmedi.

3.6.1. Hücre Kültürlerinde Gen İfade Değişimleri

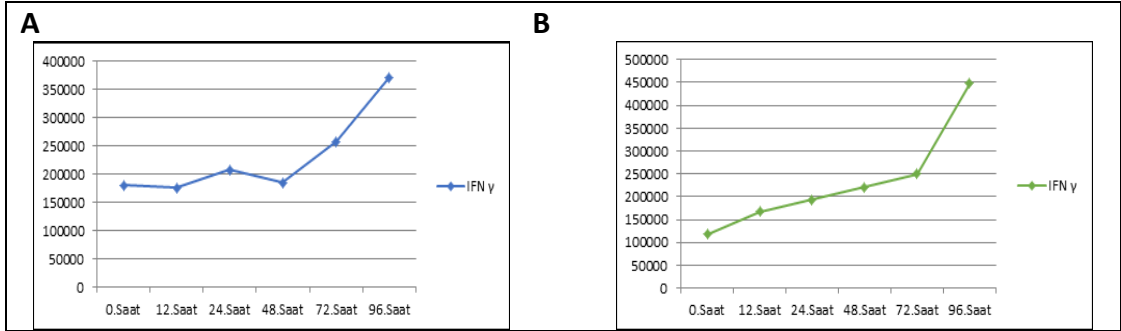
3.6.1.1 Hücre Kültürlerine Virus İnokulasyonu Olmaksızın Gen İfadelerinin Analizleri

3.6.1.1.1. OTP-1 İfadesinin Analizi

0.-96. saatler arasında OTP-1 ifadesindeki değişim SFT-R hücre hattında ($p= 0,724$) ve PKT hücre kültüründe ($p= 0,771$) önemsiz bulundu.

3.6.1.1.2. IFN γ İfadesinin Analizi

SFT-R hücre hattında 0.-72. saatler arasında IFN γ ifadesindeki değişim önemsizken ($p=0,136$), 72.-96. saatler arasında %43 oranında artış oluştu. Toplamda 0.-96. saatler arasındaki artış %206 olarak hesaplandı. PKT hücre kültüründe 0.-96. saatler arasında IFN γ ifadesindeki artış ortalama %27 iken, 72.-96. saatler arasında %79'luk bir artış oluştu. Toplamda 0.-96. saatler arasındaki artış %379 olarak bulundu (Şekil 3.12).



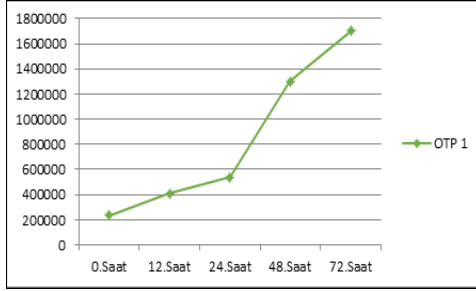
Şekil 3.12. Hücre kültürlerine (A: SFT-R, B: PKT) virus inokulasyonu olmaksızın IFN γ ifadesinin analizleri.

3.6.1.2. Hücre Kültürlerine BVDV İnokulasyonu Sonrası Gen İfadelerinin Analizleri

PKT hücrelerinde BVDV virüs inokulasyonu sonrasında, kültürdeki hücrelerin virüs enfeksiyonuna verdiği cevabın 72 saatten sonra hücre dejenerasyonuna bağlı olarak değerlendirilememesi nedeniyle, inokulasyonu izleyen ilk 72 saat içinde değerlendirildi.

3.6.1.2.1. OTP-1 İfadesinin Analizi

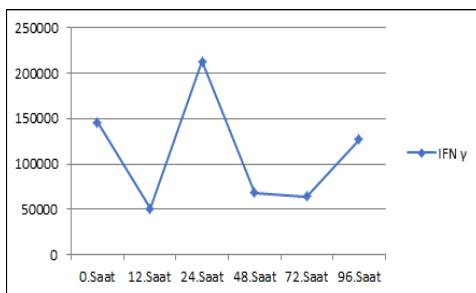
0.-96. saatler arasında OTP-1 ifadesindeki değişim SFT-R hücre hattında önemsiz ($p= 0,185$) bulundu. PKT hücre kültüründe 0.-72. saatler arasında OTP-1 ifadesinde sürekli artış gözlemlendi, bu artış 0.-12. saatler arasında %72, 12.-24. saatler arasında %30, 24.-48. saatler arasında %242, 48.-72. saatler arasında %31 oranlarında hesaplandı. Toplamda 0.-72. saatler arasındaki artış 7 kat olarak bulundu (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. PKT hücre kültürüne BVDV inokulasyonu sonrası OTP-1 ifadesinin analizi.

3.6.1.2.2. IFN γ İfadesinin Analizi

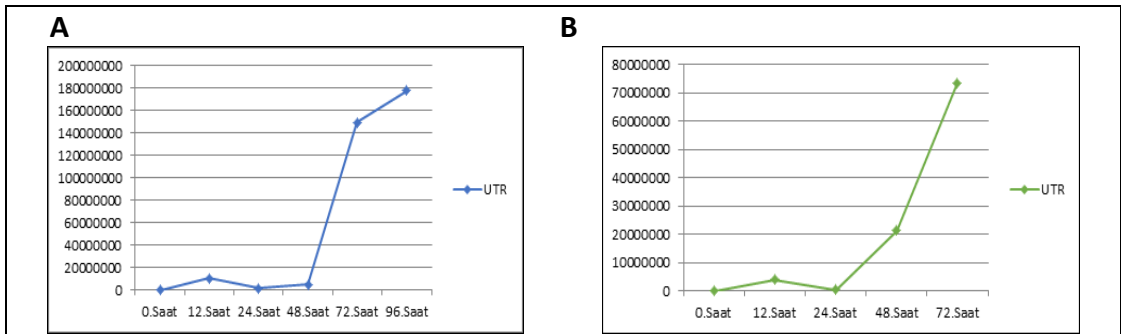
SFT-R hücre hattında 0.-96. saatler arasında IFN γ ifadesinde dalgalanmalar gözlemlendi. Yapılan değerlendirmelerde, 0.-12. saatler arasında %284 azalma, 12.-24. saatler arasında %416 artış, 24.-48. saatler arasında %313 azalma gözlenirken, 48.-72. saatler arasındaki değişim anlamsız hesaplandı. 72.-96. saatler arasında %200 artış gözlemlendi. Toplamda 0.-96. saatler arasındaki azalma %13 olarak bulundu. PKT hücre kültüründe 0.-72. saatler arasında IFN γ ifadesindeki değişim önemsiz ($p= 0,219$) bulundu (Şekil 3.14).



Şekil 3.14. SFT-R hücre hattına BVDV inokulasyonu sonrası IFN γ ifadesinin analizi.

3.6.1.2.3. BVDV-5'UTR İfadesinin Analizi

SFT-R hücre hattında 0.-96. saatler arasında 5'UTR ifadesinde dalgalanma gözlemlendi, 0.-12. saatler arası neredeyse 25 katlık artış olurken 12.-24. saatler arasında ifadede %85 oranında azalma görüldü. 24.-48. saatler arasında %307, 48.-72. saatler arasında ise 31 katlık artış hesaplandı. 72.-96. saatler arasındaki değişim önemsiz ($p= 0,577$) bulundu. Toplamda 0.-72. saatler arasındaki artış 18 kattan fazla olarak bulundu. PKT hücre kültüründe 0.-72. saatler arasında 5'UTR ifadesinde sürekli dalgalanma gözlemlendi, 0. saatte hiç kopya tespit edilemezken, 12. saatte kopya sayısının 4 milyona çıktığı görüldü, 12.-24. saatler arasında ifade %91 oranında azalma olurken, 24.-48. saatler arasında %5514, 48.-72. saatler arasında %347 oranlarında artış hesaplandı. Toplamda 0.-72. saatler arasındaki artış 18,3 kat olarak bulundu (Şekil 3.15).



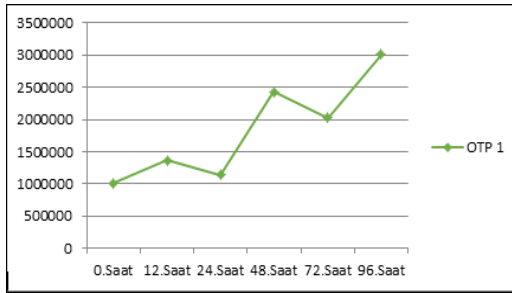
Şekil 3.15. Hücre kültürlerine (A: SFT-R, B: PKT) BVDV inokulasyonu sonrası BVDV-5'UTR ifadelerinin analizleri.

3.6.1.3. Hücre Kültürlerine PPRV İnokulasyonu Sonrası Gen İfadelerinin Analizleri

3.6.1.3.1. OTP-1 İfadesinin Analizi

SFT-R hücre hattında 0.-96. saatler arasında OTP-1 ifadesindeki değişim SFT-R hücre hattında önemsiz ($p= 0,452$) bulundu. PKT hücre kültüründe 0.-96. saatler

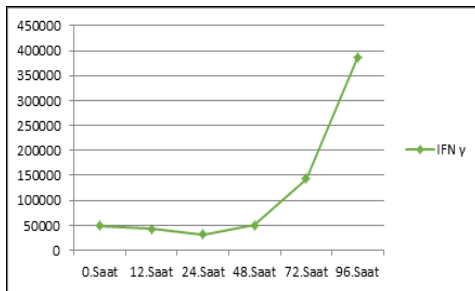
arasında OTP-1 ifadesinde dalgalanma gözlemlendi, 0.-12. saatler arasında %35 artış, 12.-24. saatler arasında %17 azalma, 24.-48. saatler arasında %213 artış, 48.-72. saatler arasında önemsiz değişim ($p= 0,133$), 72.-96. saatler arasında %48 artış hesaplandı. Toplamda 0.-96. saatler arasındaki artış neredeyse 3 kat olarak bulundu (Şekil 3.16).



Şekil 3.16. PKT hücre kültürüne PPRV inokulasyonu sonrası OTP-1 ifadesinin analizi.

3.6.1.3.2. IFN γ İfadesinin Analizi

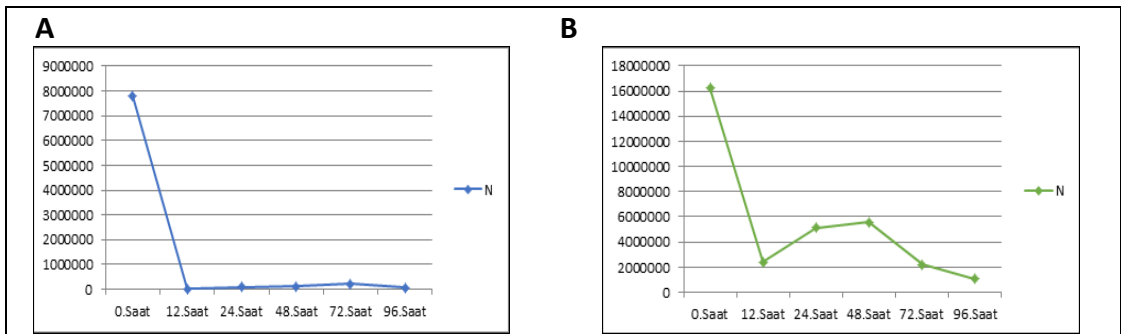
SFT-R hücre hattında 0.-96. saatler arasında IFN γ ifadesindeki değişim önemsiz ($p= 0,312$) bulundu. PKT hücre kültüründe 0.-48. saatler arasında IFN γ ifadesinde önemli bir değişim ($p= 0,833$) gözlenmezken, 48.-72. saatler arasında %183, 72.-96. saatler arasında %169'luk bir artış oluştu. Toplamda 0.-96. saatler arasındaki artış neredeyse 8 kat olarak bulundu (Şekil 3.17).



Şekil 3.17. PKT hücre kültürüne PPRV inokulasyonu sonrası IFN γ ifadesinin analizi.

3.6.1.3.3. PPRV-N İfadesinin Analizi

SFT-R hücre hattında 0.-96. saatler arasında N ifadesinde dalgalanma gözlemlendi, 0.-12. saatler arasında %99,7 oranında azalma olurken, 12.-24. saatler arasında ifadede %298; 24.-48. saatler arasında %28; 48.-72. saatler arasında %98 oranında artış, 72.-96. saatler arasında %75 oranlarında azalma hesaplandı. Toplamda 0.-96. saatler arasındaki azalma %99,3 olarak bulundu. PKT hücre kültründe 0.-96. saatler arasında N ifadesinde sürekli dalgalanma gözlemlendi, 0.-12. saatler arasında %86 oranında azalma olurken, 12.-24. saatler arasında ifade %214 oranında artış hesaplandı, 24.-48. saatler arasındaki değişim önemsiz ($p= 0,904$) bulundu. 48.-72. saatler arasında %60, 72.-96. saatler arasında %53 oranlarında azalma hesaplandı. Toplamda 0.-96. saatler arasındaki azalma %93 olarak bulundu.



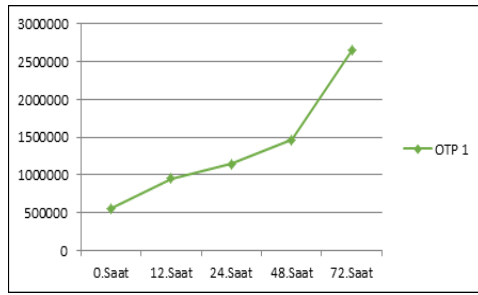
Şekil 3.18. Hücre kültürlerine (A: SFT-R, B: PKT) PPRV inokulasyonu sonrası PPRV-N ifadelerinin analizleri (Şekil 3.18).

3.6.1.4. Hücre Kültürlerine Eş Zamanlı BVDV ve PPRV İnokulasyonu Sonrası Gen İfadelerinin Analizleri

PKT hücrelerinde eş zamanlı virüs inokulasyonları sonrasında, kültürdeki hücrelerin virüs enfeksiyonuna verdiği cevabın 72 saatten sonra hücre dejenerasyonuna bağlı olarak değerlendirilememesi nedeniyle, inokulasyonu izleyen ilk 72 saat içinde değerlendirildi.

3.6.1.4.1. OTP-1 İfadesinin Analizi

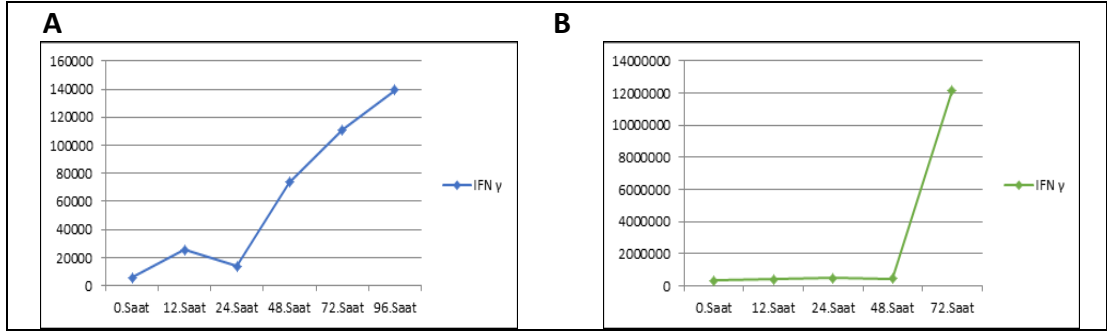
SFT-R hücre hattında 0.-96. saatler arasında OTP-1 ifadesindeki değişim SFT-R hücre hattında önemsiz ($p= 0,812$) bulundu. PKT hücre kültüründe 0.-72. saatler arasında OTP-1 ifadesinde sürekli artış gözlemlendi, 0.-12. saatler arasında %69, 12.-48. saatler arasında ortalama %24, 48.-72. saatler arasında %81 artış hesaplandı. Toplamda 0.-96. saatler arasındaki artış neredeyse 5 kat olarak bulundu (Şekil 3.19).



Şekil 3.19. PKT hücre kültürüne eş zamanlı BVDV ve PPRV inokulasyonu sonrası OTP-1 ifadesinin analizi.

3.6.1.4.2. IFN γ İfadesinin Analizi

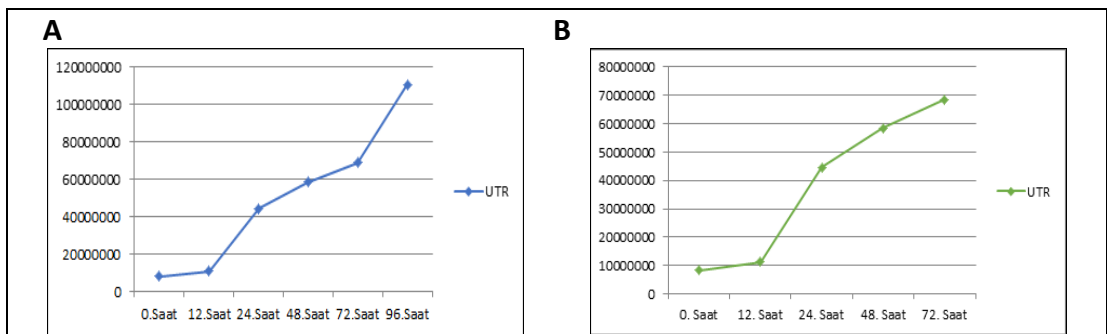
SFT-R hücre hattında 0.-12. saatler arasında %455 oranında artış olurken, 12.-24. saatler arasında ifadede %83 azalma görüldü. 24.-48. saatler arasında %526; 48.-72. saatler arasında %50; 72.-96. saatler arasında %25 oranlarında artış hesaplandı. Toplamda 0.-96. saatler arasında 24 katlık artış bulundu. PKT hücre kültüründe 0.-48. saatler arasında IFN γ ifadesinde önemli bir değişim ($p= 0,8971$) gözlenmezken, 48.-72. saatler arasında 5 katlık bir artış hesaplandı. Toplamda 0.-72. saatler arasındaki artış neredeyse 8 kat olarak bulundu.



Şekil 3.20. Hücre kültürlerine (A: SFT-R, B: PKT) eş zamanlı BVDV ve PPRV inokulasyonu sonrası IFN γ ifadesinin analizleri.

3.6.1.4.3. BVDV-5'UTR İfadesinin Analizi

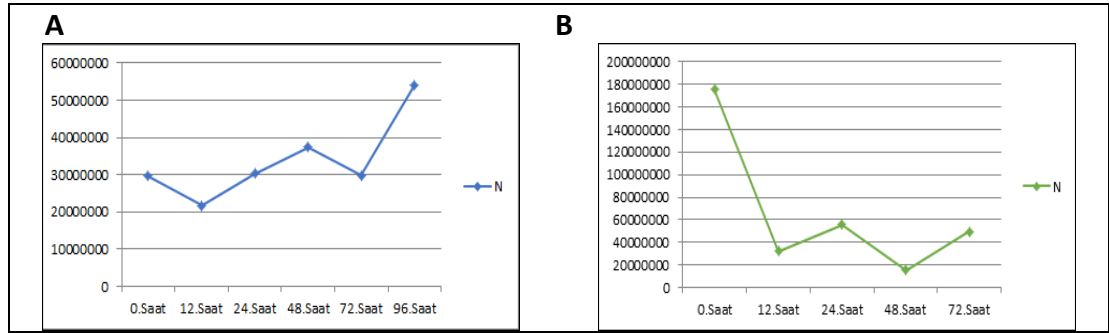
SFT-R hücre hattında 0.-96. saatler arasında 5'UTR ifadesinde 0.-12. saatler arasında %31; 12.-24. saatler arasında %408, 24.-48. saatler arasında %31 azalma artış gözlenirken, , 48.-72. saatler arasındaki değişim önemsiz ($p=0,777$) hesaplandı. 72.-96. saatler arasında %60 artış gözlemlendi. Toplamda 0.-96. saatler arasındaki artış 13 kat olarak bulundu. PKT hücre kültüründe 0.-94. saatler arasında 5'UTR ifadesinde 0.-12. saatler arasında %34; 12.-24. saatler arasında %397; 24.-48. saatler arasında %31; 48.-72. saatler arasında %54 artış hesaplandı. Toplamda 0.-72. saatler arasında 10 katlık artış bulundu.



Şekil 3.21. Hücre kültürlerine (A: SFT-R, B: PKT) eş zamanlı BVDV ve PPRV inokulasyonu sonrası BVDV-5'UTR ifadesinin analizleri.

3.6.1.4.4. PPRV-N İfadesinin Analizi

SFT-R hücre hattında N ifadesinde 0.-72. saatler arasında önemli bir değişim ($p=0,627$) olmazken, 72.-96. saatler arasında %81 artış gözlemlendi. Toplamda 0.-96. saatler arasındaki artış %82 olarak bulundu. PKT hücre kültüründe 0.-72. saatler arasında N ifadesinde dalgalanma gözlemlendi, 0.-12. saatler arasında %82 oranında azalma olurken, 12.-24. saatler arasında ifade %71 oranında artış hesaplandı, 24.-48. saatler arasında %73 azalmaya karşın, 48.-72. saatler arasında %319 artış bulundu. Toplamda 0.-72. saatler arasındaki azalma %72 olarak bulundu.



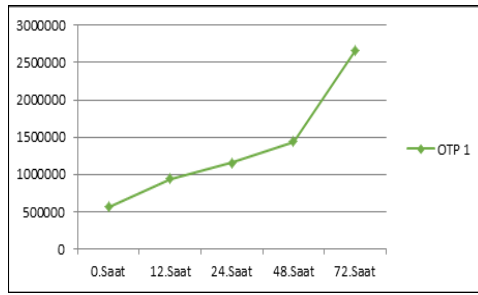
Şekil 3.22. Hücre kültürlerine (A: SFT-R, B: PKT) eş zamanlı BVDV ve PPRV inokulasyonu sonrası PPRV-N ifadesinin analizleri.

3.6.1.5. Hücre Kültürlerine Önce BVDV ve 6 saat Sonra PPRV İnokulasyonu Sonrası Gen İfadelerinin Analizleri

PKT hücrelerinde önce BVDV ve 6 saat sonra PPRV inokulasyonu sonrasında, kültürdeki hücrelerin virüs enfeksiyonuna verdiği cevabın 72 saatten sonra hücre dejenerasyonuna bağlı olarak değerlendirilememesi nedeniyle, inokulasyonu izleyen ilk 72 saat içinde değerlendirildi.

3.6.1.5.1 OTP-1 ifadesinin Analizi

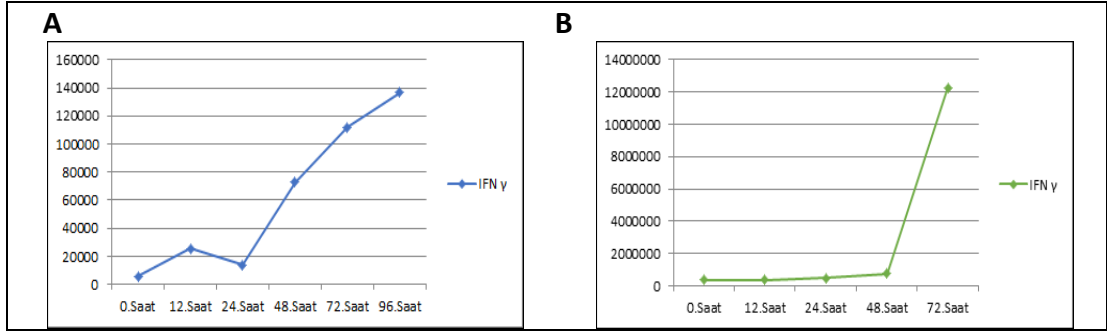
SFT-R hücre hattında 0.-96. saatler arasında OTP-1 ifadesindeki değişim SFT-R hücre hattında önemsiz ($p= 0,567$) bulundu. PKT hücre kültüründe 0.-72. saatler arasında OTP-1 ifadesinde sürekli artış gözlemlendi, 0.-12. saatler arasında %66, 12.-48. saatler arasında ortalama %24, 48.-72. saatler arasında %85 artış hesaplandı. Toplamda 0.-72. saatler arasındaki artış neredeyse 5 kat olarak bulundu.



Şekil 3.23. PKT hücre kültürüne önce BVDV ve 6 saat sonra PPRV inokulasyonu sonrası OTP-1 ifadesinin analizi.

3.6.1.5.2. IFN γ İfadesinin Analizi

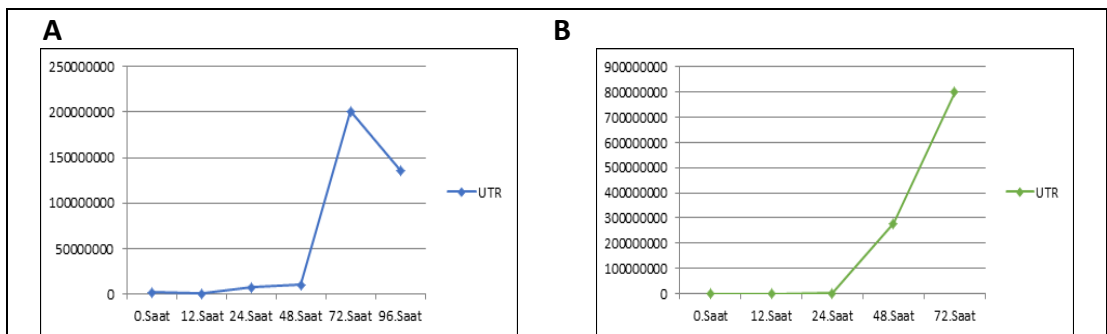
SFT-R hücre hattında IFN γ ifadesinde 0.-12. saatler arasında %441 artış, 12.-24. saatler arasında %85 azalma, 24.-48. saatler arasında %526; 48.-72. saatler arasında %53, 72.-96. saatler arasında %22 artış hesaplandı. Toplamda 0.-96. saatler arasındaki artış 23,5 kat olarak bulundu. PKT hücre kültüründe 0.-48. saatler arasında IFN γ ifadesinde ortalama %25; 48.-72. saatler arasında %297 oranında bir artış hesaplandı. Toplamda 0.-72. saatler arasındaki artış 6 kat olarak bulundu.



Şekil 3.24. Hücre kültürlerine (A: SFT-R, B: PKT) önce BVDV ve 6 saat sonra PPRV inokulasyonu sonrası IFN γ ifadesinin analizleri.

3.6.1.5.3. BVDV-5'UTR İfadesinin Analizi

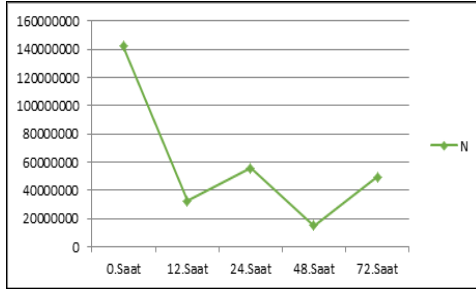
SFT-R hücre hattında 5'UTR ifadesinde 0.-12. saatler arasında %79 azalma, 12.-24. saatler arasında 21,5 katlık artış, 24.-48. saatler arasında %36 azalma, 48.-72. saatler arasında 20 kat oranlarında artış gözlenirken 72.-96. saatler arasında %33 azalma hesaplandı. Toplamda 0.-96. saatler arasındaki artış neredeyse 9 kat olarak bulundu. PKT hücre kültüründe 0.-72. saatler arasında 5'UTR ifadesinde sürekli artış gözlemlendi. 0.-12. saatler arasında %42000, 12.-24. saatler arasında %433, 24.-48. saatler arasında %24571, 48.-72. saatler arasında %287 oranlarında artış görüldü. Toplamda 0.-72. saatler arasındaki artış % 129×10^6 olarak bulundu.



Şekil 3.25. Hücre kültürlerine (A: SFT-R, B: PKT) önce BVDV ve 6 saat sonra PPRV inokulasyonu sonrası BVDV-5'UTR ifadesinin analizleri.

3.6.1.5.4. PPRV-N İfadesinin Analizi

SFT-R hücre hattında N ifadesinin 0.- 96.saatler arasındaki değişimi önemsiz ($p=0,557$) bulundu. PKT hücre kültüründe 0.-72. saatler arasında N ifadesinde dalgalanma gözlemlendi, 0.-12. saatler arasında %78 oranında azalma olurken, 12.-24. saatler arasında ifade %71 oranında artış hesaplandı, 24.-48. saatler arasında %73 azalmaya karşın, 48.-72. saatler arasında %327 artış bulundu. Toplamda 0.-72. saatler arasındaki azalma %66 olarak bulundu.



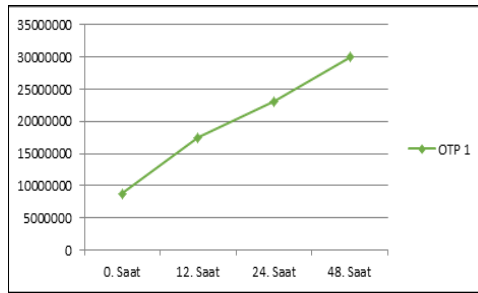
Şekil 3.26. PKT Hücre kültürüne önce BVDV ve 6 saat sonra PPRV inokulasyonu sonrası PPRV-N ifadesinin analizi.

3.6.1.6. Hücre Kültürlerine Önce BVDV ve 12 saat Sonra PPRV İnokulasyonu Sonrası Gen İfadelerinin Analizleri

PKT hücrelerinde önce BVDV ve 12 saat sonra PPRV inokulasyonu sonrasında, kültürdeki hücrelerin virüs enfeksiyonuna verdiği cevabın 48 saatten sonra hücre dejenerasyonuna bağlı olarak değerlendirilememesi nedeniyle, inokulasyonu izleyen ilk 48 saat içinde değerlendirildi.

3.6.1.6.1. OTP-1 İfadesinin Analizi

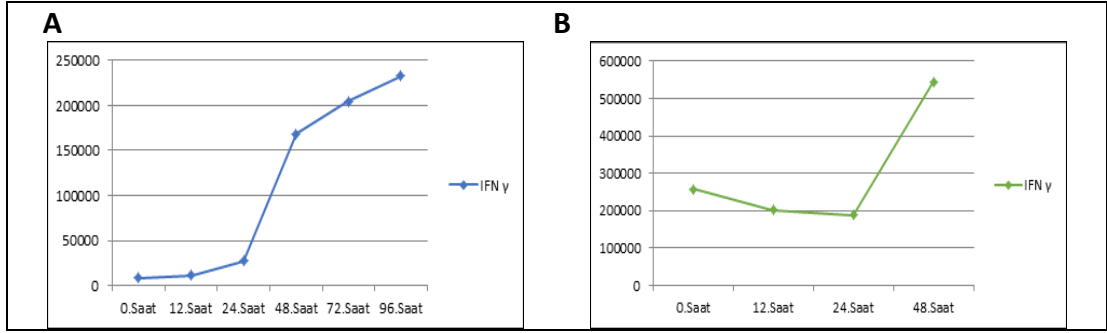
SFT-R hücre hattında 0.-96. saatler arasında OTP-1 ifadesindeki değişim SFT-R hücre hattında önemsiz ($p= 0,733$) bulundu. PKT hücre kültüründe 0.-48. saatler arasında OTP-1 ifadesinde sürekli artış gözlemlendi, 0.-12. saatler arasında %99, 12.-48. saatler arasında ortalama %31 artış hesaplandı. Toplamda 0.-48. saatler arasındaki artış %341 olarak bulundu.



Şekil 3.27. PKT hücre kültürüne önce BVDV ve 12 saat sonra PPRV inokulasyonu sonrası OTP-1 ifadesinin analizi.

3.6.1.6.2. IFN γ İfadesinin Analizi

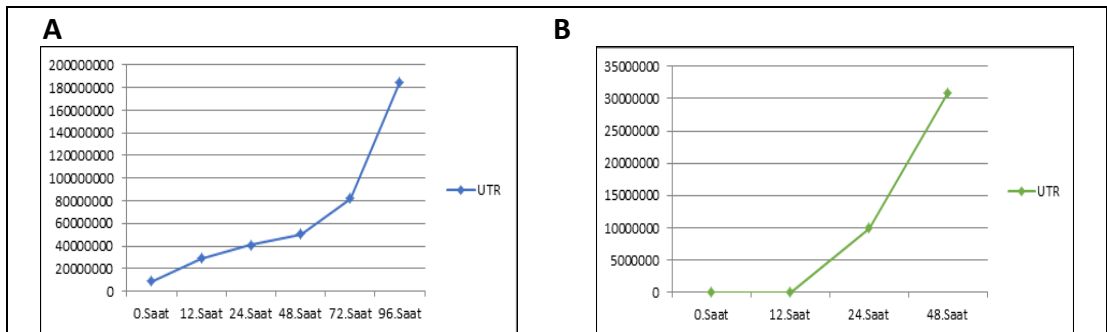
SFT-R hücre hattında 0.-96. saatler arasında ifadede sürekli artış gözlemlendi, 0.-12. saatler arasında %35; 12.-24. saatler arasında %260; 24.-48. saatler arasında %618; 48.-96. saatler arasında ortalama %18 oranında bir artış hesaplandı. Toplamda 0.-96. saatler arasında neredeyse 3 katlık artış bulundu. PKT hücre kültüründe 0.-24. saatler arasında IFN γ ifadesindeki değişim önemsizken ($p= 0,927$), 24.-48. saatler arasında %358 oranında bir artış hesaplandı. Toplamda 0.-48. saatler arasındaki artış 2,5 kat olarak bulundu.



Şekil 3.28. Hücre kültürlerine (A: SFT-R, B: PKT) önce BVDV ve 12 saat sonra PPRV inokulasyonu sonrası IFN γ ifadesinin analizleri.

3.6.1.6.3. BVDV-5'UTR İfadesinin Analizi

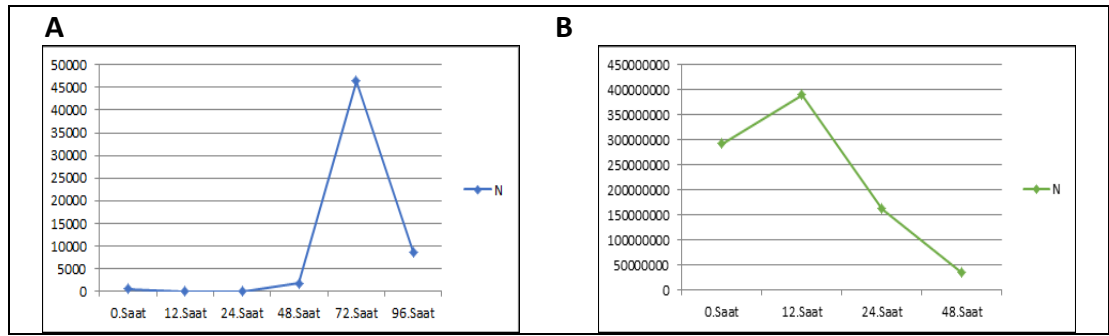
SFT-R hücre hattında 5'UTR ifadesinde sürekli artış görüldü. 0.-72. saatler arasında ortalama 7 kat; 72.-96. saatler arasında %19 oranlarında artış hesaplandı. Toplamda 0.-96. saatler arasında artış 42 katlık artış bulundu. PKT hücre kültüründe 0.-72. saatler arasında 5'UTR ifadesinde sürekli artış gözlemlendi. 0.-12. saatler arasında neredeyse 30 katlık, 12.-24. saatler arasında neredeyse 53 katlık, 24.-48. saatler arasında %311 oranlarında artış görüldü. Toplamda 0.-48. saatler arasındaki artış % 49×10^5 olarak bulundu.



Şekil 3.29. Hücre kültürlerine (A: SFT-R, B: PKT) önce BVDV ve 12 saat sonra PPRV inokulasyonu sonrası BVDV-5'UTR ifadesinin analizleri.

3.6.1.6.4. PPRV-N İfadesinin Analizi

SFT-R hücre hattında N ifadesinde 0.-12. saatler arasında %98,2 azalma, 12.-24. saatler arasında %28, 24.-48. saatler arasında 145 katlık, 48.-72. saatler arasında 26 katlık artış, 72.-96. saatler arasında %82 oranında azalma hesaplandı. Toplamda 0.-96. saatler arasındaki artış 17,5 kat olarak bulundu. PKT hücre kültüründe 0.-48. saatler arasında N ifadesinde dalgalanma gözlemlendi, 0.-12. saatler arasında %33 oranında artış olurken, 12.-24. saatler arasında %59 oranında; 24.-48. saatler arasında %79 azalma hesaplandı. Toplamda 0.-48. saatler arasındaki azalma %89 olarak bulundu.



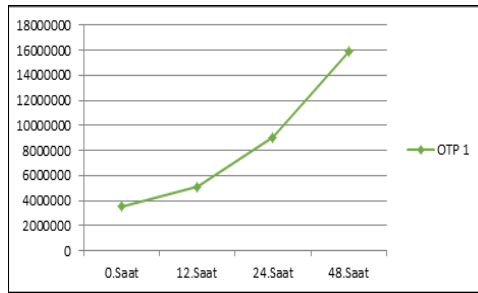
Şekil 3.30. Hücre kültürlerine (A: SFT-R, B: PKT) önce BVDV ve 12 saat sonra PPRV inokulasyonu sonrası PPRV-N ifadesinin analizleri.

3.6.1.7. Hücre Kültürlerine Önce BVDV ve 24 saat Sonra PPRV İnokulasyonu Sonrası Gen İfadelerinin Analizleri

PKT hücrelerinde önce BVDV ve 24 saat sonra PPRV inokulasyonu sonrasında, kültürdeki hücrelerin virüs enfeksiyonuna verdiği cevabın 48 saatten sonra hücre dejenerasyonuna bağlı olarak değerlendirilememesi nedeniyle, inokulasyonu izleyen ilk 48 saat içinde değerlendirildi.

3.6.1.7.1. OTP-1 İfadesinin Analizi

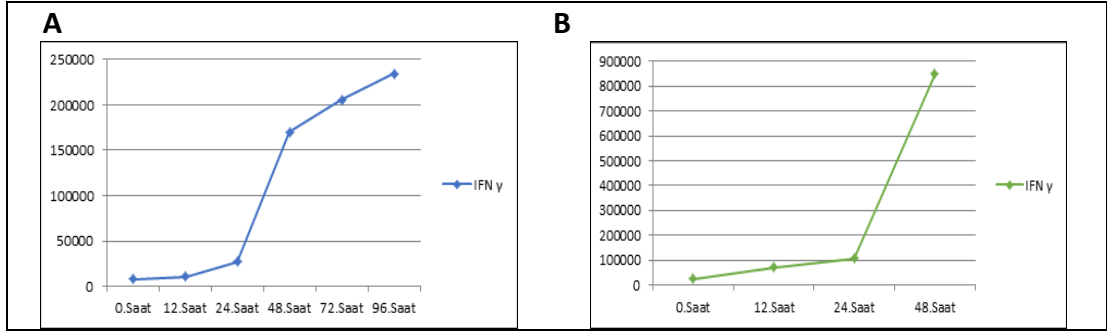
SFT-R hücre hattında 0.-96. saatler arasında OTP-1 ifadesindeki değişim SFT-R hücre hattında önemsiz ($p= 0,706$) bulundu. PKT hücre kültüründe 0.-48. saatler arasında OTP-1 ifadesinde sürekli artış gözlemlendi, 0.-12. saatler arasında %44, 12.-48. saatler arasında ortalama %76 artış hesaplandı. Toplamda 0.-48. saatler arasındaki artış %448 olarak bulundu.



Şekil 3.31. PKT hücre kültürüne önce BVDV ve 24 saat sonra PPRV inokulasyonu sonrası OTP-1 ifadesinin analizi.

3.6.1.7.2. IFN γ İfadesinin Analizi

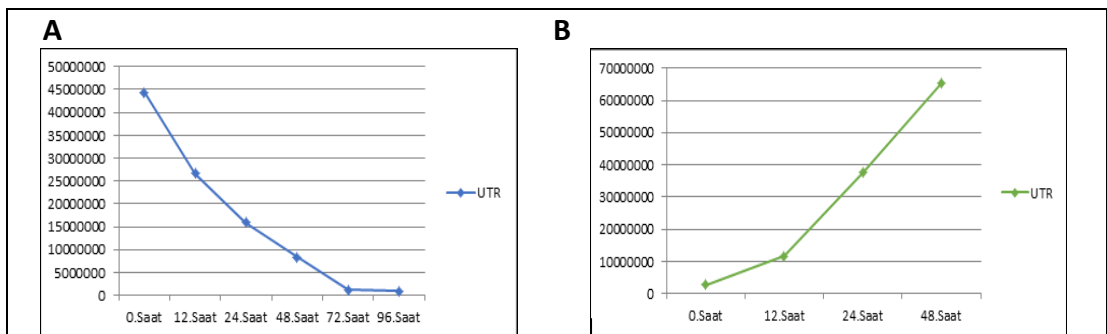
SFT-R hücre hattında 0.-96. saatler arasında IFN γ ifadesinde artış gözlemlendi. 0.-12. saatler arasında %35, 12.-24. saatler arasında %249, 24.-48. saatler arasında %620, 48.-72. saatler arasında %20 oranında bir artış hesaplandı. 72.-96. saatler arası değişim önemsiz ($p= 0,591$) bulundu. Toplamda 0.-96. saatler arasındaki artış neredeyse 30 kat olarak bulundu. 0.-48. saatler arasında IFN γ ifadesinde artış gözlemlendi. 0.-12. saatler arasında %284, 12.-24. saatler arasında %148, 24.-48. saatler arasında oranında bir artış hesaplandı. Toplamda 0.-48. saatler arasındaki artış %3362 olarak bulundu.



Şekil 3.32. Hücre kültürlerine (A: SFT-R, B: PKT) önce BVDV ve 24 saat sonra PPRV inokulasyonu sonrası IFN γ ifadesinin analizleri.

3.6.1.7.3. BVDV-5'UTR İfadesinin Analizi

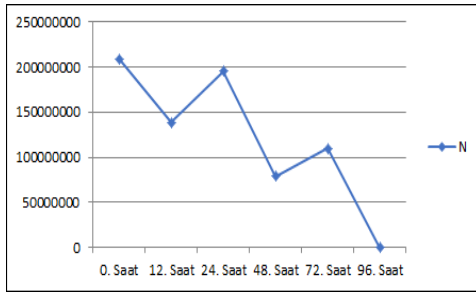
SFT-R hücre hattında 0.-96. saatler arasında 5'UTR ifadesinde sürekli azalma gözlemlendi. 0.-12. saatler ve 12.-24. saatler arasında %41, 24.-48. saatler arasında %48, 48.-72. saatler arasında %85, 72.-96. saatler arasında %32 oranlarında azalma görüldü. Toplamda 0.-96. saatler arasındaki azalma %98 olarak bulundu. PKT hücre kültüründe 0.-72. saatler arasında 5'UTR ifadesinde sürekli artış gözlemlendi. 0.-12. saatler arasında %425, 12.-24. saatler arasında %320, 24.-48. saatler arasında %174 oranlarında artış görüldü. Toplamda 0.-48. saatler arasındaki artış 23,5 kat olarak bulundu.



Şekil 3.33. Hücre kültürlerine (A: SFT-R, B: PKT) önce BVDV ve 24 saat sonra PPRV inokulasyonu sonrası BVDV-5'UTR ifadesinin analizleri.

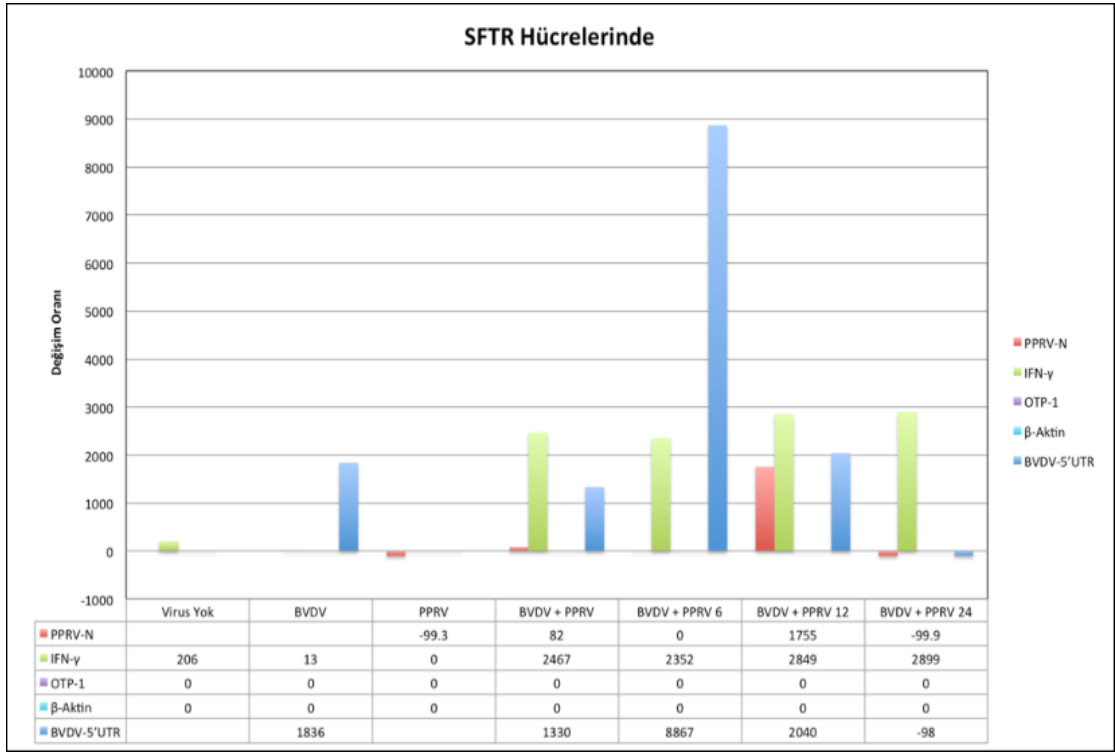
3.6.1.7.4. PPRV-N İfadesinin Analizi

SFT-R hücre hattında N ifadesinde 0.-12. saatler arasında %34 azalma, 12.-24. saatler arasında %40 artış, 24.-48. saatler arasında %60 azalma, 48.-72. saatler arasında %38 artış, 72.-96. saatler arasında %99,95 oranında azalma hesaplandı. Toplamda 0.-96. saatler arasındaki azalma %99,98 olarak bulundu. PKT hücre kültüründe 0.-48. saatler arasında N ifadesindeki değişim önemsiz ($p= 0,224$) bulundu.

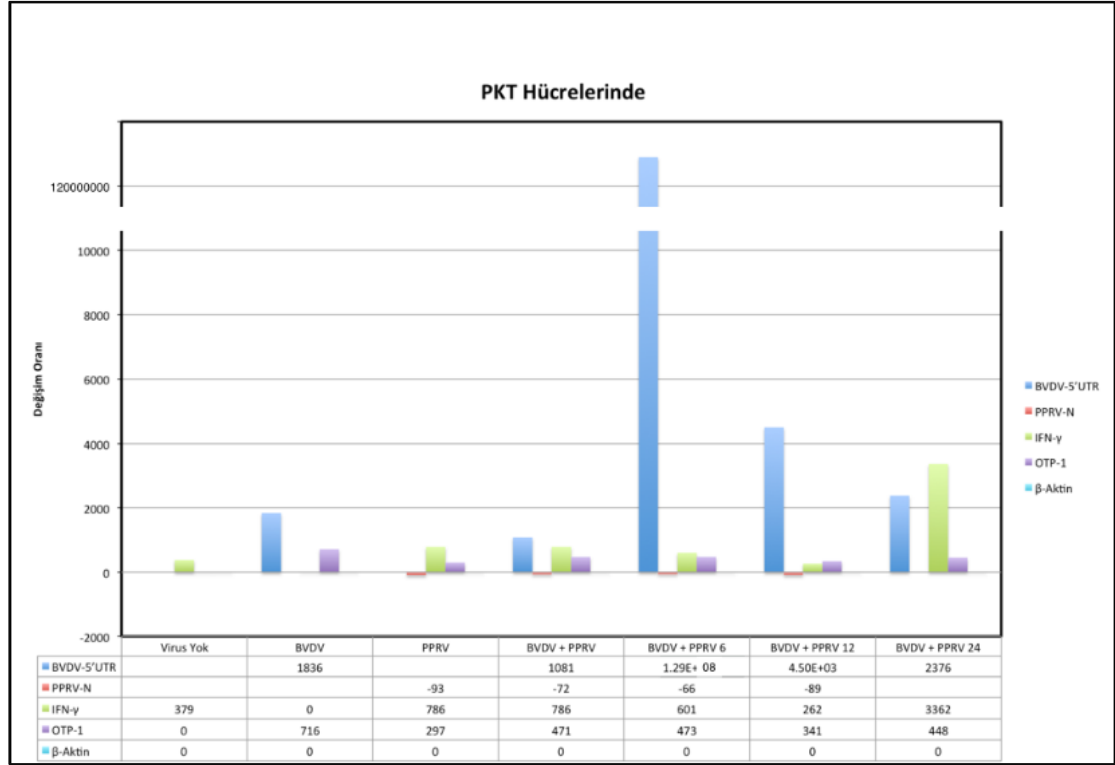


Şekil 3.34. SFT-R hücre hattına önce BVDV ve 24 saat sonra PPRV inokulasyonu sonrası PPRV-N ifadesinin analizleri.

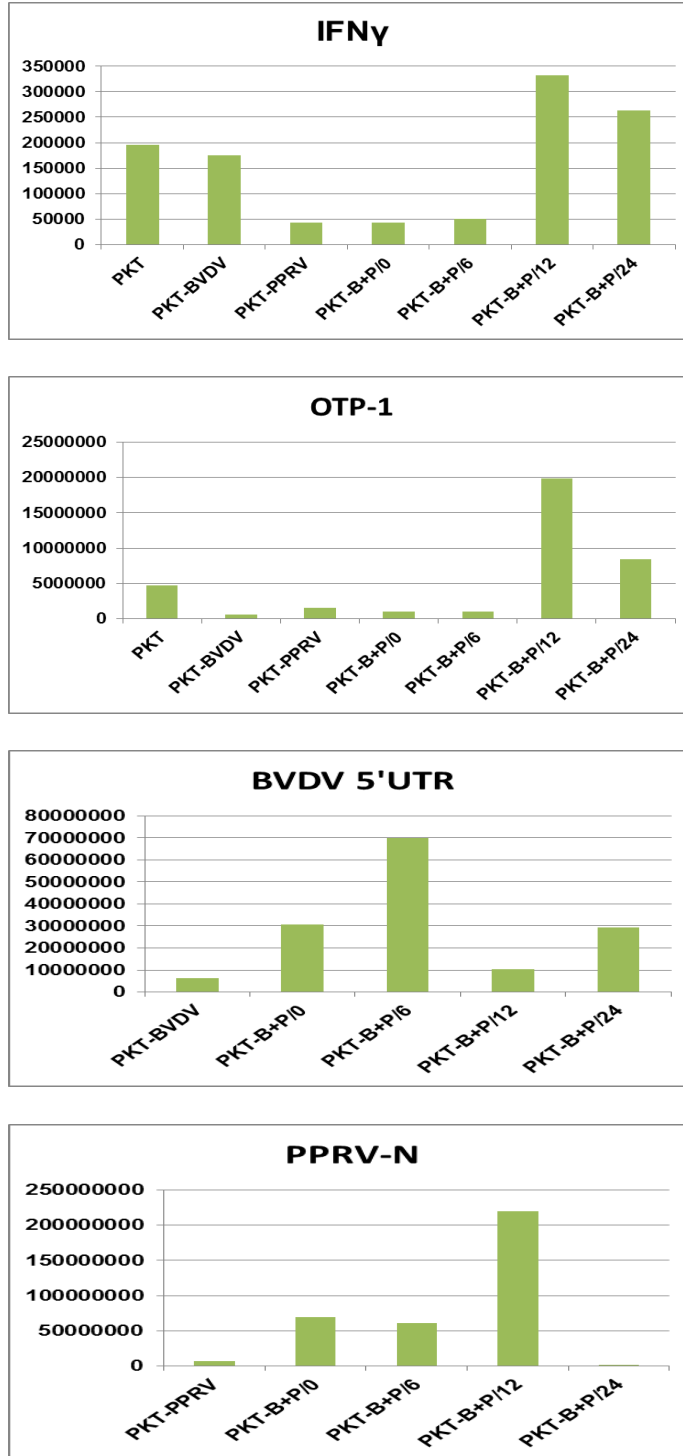
PKT hücre kültürlerinde ve SFT-R hücre hattında yapılan testler sonucunda tüm gen/genom bölgesi ifadelerinde gerçekleşen değişimler Şekil 3.35 ve 3.36'da özetlendi. Ek olarak SFT-R hücre hattında ve PKT hücre kültüründeki Eş zamanlı RT-PCR sonrasında gen/genom bölgeleri için tespit edilen ortalama mRNA kopya sayıları Şekil 3.37 ve 3.38'de verildi.



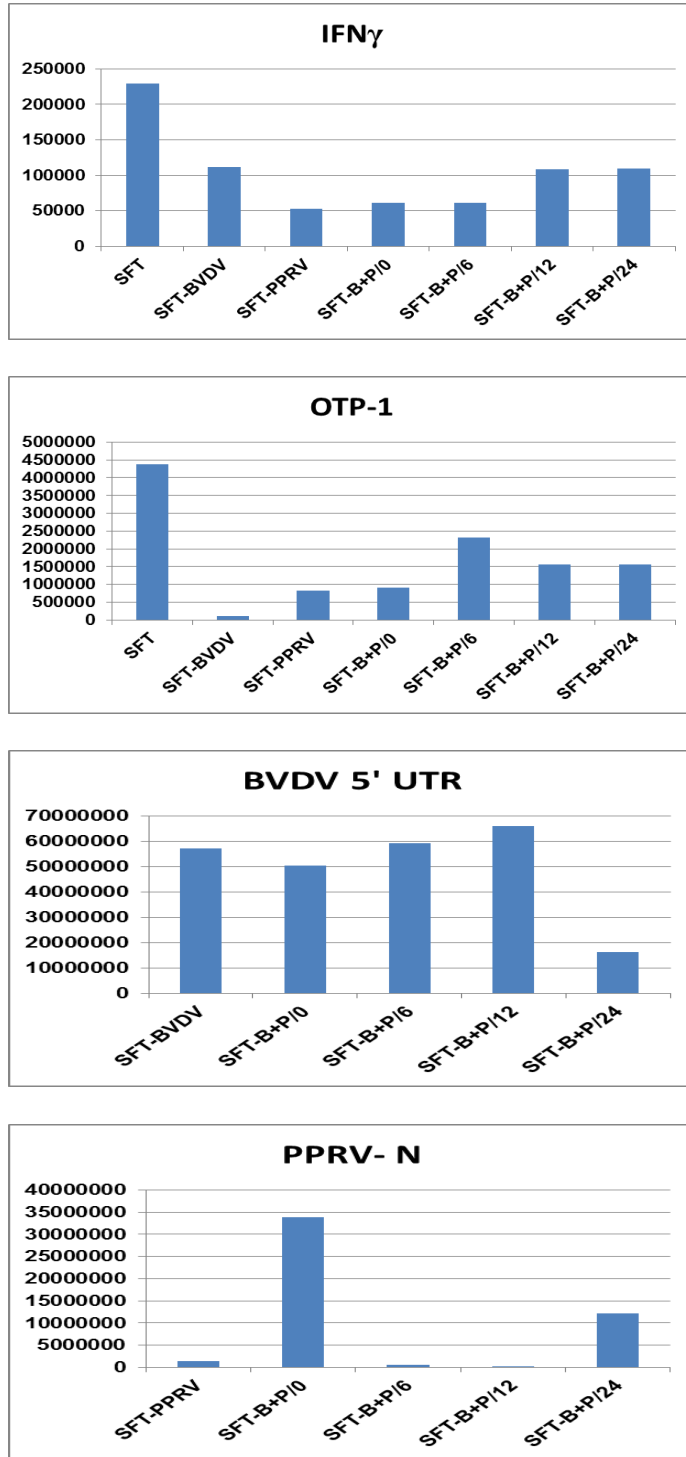
Şekil. 3.35. SFT-R hücre hattında yapılan testler sonucunda tüm gen/genom bölgesi ifadelerinde gerçekleşen değişimler.



Şekil. 3.36. PKT hücre kültüründe yapılan testler sonucunda tüm gen/genom bölgesi ifadelerinde gerçekleşen değişimler.



Şekil 3.37. PKT Hücre Kültüründeki Eş zamanlı RT-PCR sonrasında gen/genom bölgeleri için ortalama mRNA kopya sayıları.



Şekil 3.38. SFT-R Hücre Hattındaki Eş Zamanlı RT-PCR sonrasında gen/genom bölgeleri için ortalama DNA kopya sayıları

4. TARTIŞMA

PPRV ve Pestivirus ortak enfeksiyonu, ilk defa 2008 yılında ölü doğmuş iki kuzuda pek çok doku ve organda hem immunohistokimyasal yöntemle hem de RT-PCR ile gösterilmiştir. Daha önce başka bir virusla ortak enfeksiyonu, dahası konjenital bulaşması tespit edilmemiş PPRV için bu durumun Pestivirusun plasental hücrelere verdiği zarardan ve/veya interferon baskılayıcı mekanizmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür (Kul ve ark., 2008). Ardından 2012 yılında koyun ve keçilerde fetal ve neotal olarak BDV ve PPRV yine immunohistokimyasal ve RT-PCR yöntemiyle tespit edilmiştir (Toplu ve ark., 2012). İki çalışmada da, iki virusa spesifik lezyonlar pek çok doku ve organda gözlemlenmiştir. Konjenital bulaşma sonucu oluşan ciddi lezyonlar ve gözlemlenen fetal kayıplar iki virusun eş zamanlı enfeksiyonunun önemini arttırmaktadır.

Sığırlarda BVD virus varlığının Bovine Herpes Virus tip 1'in çoğalmasını arttırdığı yapılan in vivo çalışmalar da tespit edilmiştir (Potgieter ve McCracken 1984). Daha yakın zamanda yine sığırlarda yapılan bir in vivo çalışmada da BVD virusun Bovine Herpes Virus tip 5 ile ortak enfeksiyonlarında virolojik, patolojik ve klinik bulguların şiddetini arttırdığı ortaya konmuş, bu durumun Pestivirusların konak immun sistemi üzerindeki baskılayıcı etkilerinin bir sonucu olabileceği ileri sürülmüştür (Spilki ve ark, 2006).

Bu çalışmada, BVDV ve PPRV ortak enfeksiyonlarında gerçekleşen viruslar arası ve hücrel etkileşimler hakkında fikir edinilebilmesi amacıyla dört genin ifadesindeki değişiklikler 96 saat süre ile iki farklı hücre kültüründe, tek tek ve birlikte inokulasyonlar sonunda eş zamanlı RT-PCR yöntemi ile sorgulanmıştır.

Sözü geçen hücre kültürlerinden SFT-R hücre hattında daha önce BVDV üretimi için çeşitli çalışmalar yapılmış, sığır orijinli akciğer, türbinata ve böbrek hücreleriyle kıyaslandığında koyun orijinli olmasına rağmen SFT-R hücrelerinin cp suşlar için diğer hücrelere yakın bir duyarlılık gösterdiği, ncp suşlara ise çok daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Pollakova ve ark., 2009). Ancak koyun orijinli SFT-R hücre

hattının daha önce PPRV üretilmesinde kullanıldığına dair yayınlanmış bir çalışma bulunmamaktadır.

Morbillivirusların kültivasyonu, izolasyonu ve hatta PPRV aşısı üretimi için Vero hücre hattı yaygın olarak tercih edilmektedir. Marmoset kökenli B- lenfoblastoid hücre kültürünün Vero hücre hattına göre PPR virus için daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Sreenivasa ve ark., 2006).

İnokulasyonların gerçekleştirildiği PKT hücre kültüründe iki virusun da üretilmesi ile ilgili literatürde her hangi bir bilgi bulunmamaktadır. Gerçekleştirilen inokulasyonlar sonunda iki hücre kültüründe de hem BVDV hem de PPRV replikasyonu etkili bir şekilde gözlenmiş, oluşan sitopatolojik etkilerin şiddeti, oluşum süreleri ve titrasyon testi sonuçları değerlendirildiğinde PKT hücre kültürünün iki virusa da daha duyarlı olduğu görülmüştür (Çizelge 3.1 ve Şekil 3.37).

Çalışmada ifadesi sorgulanan dört gen bölgesi; BVDV-5'UTR, PPRV-N, IFN γ ve OTP-1'dir. Eş zamanlı PCR, gen ifadelerinin sorgulanmasında günümüzde en uygun ve hassas yöntem olarak görülmektedir (Larinov ve ark., 2005). Kantitasyon yöntemi mRNA gen ifadesinin tespitinde çok önemli bir faktördür. Genetik kantitasyon için iki yöntem bildirilmiştir. Bunlar; rölatif ve mutlak kantitasyondur (Pfaffl, 2001; Bustin, 2002). Hedef dizin kopya sayısını kesin tespiti için, bilinen kopya sayısında standartların dahil edildiği mutlak kantitasyon en uygun yöntem olarak tanımlanmaktadır (Peirson ve ark; 2003). Bu çalışmada mutlak kantitasyon standartları hedef RNA dizinlerinin plazmidlere klonlanmasıyla elde edilmiş ve seri sulandırmaları her testte kullanılmıştır. Hedef gen ekspresyonunun kantitasyonunda bir ileri aşama verilerin normalizasyonudur (Pfaffl 2001; Bustin 2002). Eş zamanlı PCR sırasında oluşabilecek hataları düzeltmek için uygun bir normalizasyon yöntemi tercih edilmelidir (Wong ve Medrano, 2005). İn vitro modellerde mRNA düzeyleri hücre sayısı ile standardize edilebilmektedir. Bir housekeeping gen kullanılarak yapılan normalizasyon en güvenilir ve kolay tekniktir (Huggett ve ark., 2005). Housekeeping genler bir türe ait tüm hücrelerden ve dokulardan eksprese olan ve ekspresyon düzeyi değişkenliği biyolojik olaylardan ve deney şartlarından mümkün olduğunca etkilenmeden stabil kalan genlerdir (Thellin ve ark., 1999; Vandesompele

ve ark., 2002). Bu çalışmada hem testlerin tamamı 24 gözlü hücre tabletlerinde bir gen ifadesi için üçer gözden olmak üzere hücre sayısı düzeyinde, hatta sitopatolojik etki dolayısıyla hücre sayısı azalan gözler test dışı bırakılarak, standardize edilmiştir. Ek olarak koyunlarda bir housekeeping gen olan Beta-aktin (β -aktin, ACTB) genomuna dahil bir dizin ile oluşturulan rekombinant plazmid sulandırılmaları her bir tekli ve çoklu inokulasyon testi sonrası eş zamanlı PCR'da normalizasyon için kullanılmıştır. Testlerin tamamında β -aktin ifadesindeki değişimler istatistiki olarak önemsiz ($p>0,05$) bulunmuş ve diğer genlerin ifadelerindeki değişimler değerlendirilmiştir.

Sığır türbinata ve kuzu testis hücre kültürü modelleri kullanılarak yapılan bir çalışmada, BVDV replikasyonunun enfeksiyonu takiben 4-6 saat içinde gerçekleştiği ve titresinin inokulasyon sonrası 12-24 saat içinde en üst seviyeye ulaştığı tespit edilmiştir (Gong ve ark., 1996). Bu çalışmada kullanılan iki hücre kültüründe de 5' UTR ekspresyonu, enfeksiyonu takip eden 96 saat içinde hızla artarken özellikle 48-72. saatler arasında en üst seviyede gözlenmiştir (Şekil 3.15). SFT-R hücre hattında inokulasyonu takiben 72. saat itibariyle mikroskop altında gözlemlenebilen cpe 96. saat itibariyle oldukça belirginleşirken, PKT hücre kültüründe 96. saat itibariyle canlı hücre sayısında oldukça ciddi bir düşüş olduğu saptanmıştır (Şekil 3.2 ve 3.3). Gerçekleştirilen bir in vivo çalışmada inokulasyonu takiben 4 saat içinde BVD virusun gebe koyunlarda plazentaya ulaştığı tespit edilmiştir. Plazentada yer alan çift çekirdekli trofoblast hücrelerin ve IFN sisteminin virus bulaşmasındaki etkileri anlaşılacakla beraber; maternal dokulardakine göre fetal dokularda daha fazla antijene rastlanmasının fetal dokuların virusla daha hızlı enfekte olmasından, replikasyona daha duyarlı olmasından veya dişi üreme kanalındaki IFN sistemine daha az duyarlı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür (Swadipan ve ark., 2001). Bu çalışmayla da koyun timüs hücrelerine göre trofoblast hücrelerinin virusla daha hızlı enfekte olduğu düşüncesini destekleyen bulgular elde edilmiştir.

Testlerde PPRV replikasyonunu takip edebilmek amacıyla seçilen N geni, genomda N-terminusta yer alır, mRNA'sı en fazla transkribe olan proteindir ve esansiyel N proteinini kodlar. MeV için N proteininin %100 üretildiği var sayılırsa, P; %81, M; %67, F; 49 ve H; %39 olarak kantitiye edilmiştir. (Horikami and Moyer 1995).

PPRV için, negatif iplikçikli RNA genomda hem mono- hem de polisistronik mRNA üretimiyle gelişen dengesiz transkripsiyon sebebiyle genom bölgelerinin transkripsiyon etkinliği tahmin edilememiştir. Yakın zamanda Vero hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada inokulasyon sonrası 24. saatte N proteini ekspresyonunda önemli bir artış olduğu gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2013). Bu tez çalışmasında ise yalnız PPRV inokulasyonu sonrası 'N' ekspresyon oranlarının saatler bazında seyri her iki hücre kültüründe de benzer şekilde gözlenmiş, 12. saatte neredeyse 1/8 oranında bir düşüş izlenirken, PKT hücre kültüründe sonraki saatlerde kısmen artışlar izlense de toplam 96 saatlik inkubasyon sonunda N geni ilgili ekspresyonda %90 oranında azalma gözlenmiştir (Şekil 3.18).

PKT hücre kültüründe ortalama kopya sayısının mililitrede 7,5 milyona yakınken, SFT-R hücre hattında 1,5 milyon kopyanın altında kalması (Şekil 3.38), PKT hücre kültürünün SFT-R hücre hattına göre PPRV replikasyonu için de daha uygun olduğu görüşünü desteklemektedir. Çalışmanın gerçekleştiği süreçte N protein transkriptlerinde gözlenen genel düşüşün, N proteini sentezinin replikasyonun ilerleyen dönemlerinde ve özellikle L gen ürünü olan RdRp sentezi tamamlandıktan sonra meydana gelecek olması (Horikami and Moyer 1995) ile ilişkili olduğu düşünülmüştür.

Ortak enfeksiyon mekanizmasında etkili olduğu ön görülen immun sistemin önemli üyelerinden interferonlar, hem doğal hem de kazanılmış bağışıklıkta rol oynayan, antiviral etkili sitokinlerdir (Samuel, 2001). Virusla inokulasyon olmaksızın ilk pasaj anında PKT hücre kültüründe IFN γ ile kıyaslandığında OTP-1 ekspresyonu 3 kat daha fazladır (Şekil 3.37). Takip eden saatlerde de OTP-1 ekspresyonu hızla yükselmekte ve ortalama DNA kopya sayısı değerlendirildiğinde aradaki farkın oldukça arttırdığı görülmektedir. Bu bulgu OTP-1 salgısından sorumlu trofoblast hücreleri (Martal ve ark., 1979) için beklenen bir sonuçtur. Yapılan tüm testlerde diğer gen/genom bölgesi ekspresyonları ile kıyaslandığında IFN γ ekspresyonlarının oldukça düşük olması (Şekil 3.37 ve 3.38), testlerin gerçekleştirildiği hücrelerin IFN γ üretiminde görev alan temel hücreler olmamasından kaynaklanıyor olabileceğini düşündürmektedir. IFN γ üretimini temel olarak CD4 T hücreleri, CD8 sitotoksik lenfositler, Natural Killer hücreler, B hücreleri, NKT hücreleri ve profesyonel antijen

sunucu hücrelerin (monosit/makrofaj, dendritik hücreler) yaptığı bilinmektedir (Schroder ve ark, 2004).

BVDV cp biyotiple enfeksiyonun makrofajlarda IFN tip I (α/β) sentezini indüklediği tespit edilmiş ve bu durumun apoptozisle sonuçlandığı, cp ve ncp tipler arasındaki farkın da bu sebeple olduğu Adler ve ark. (1997) tarafından yapılan çalışma ile ileri sürülmüştür. Daha sonraki yıllarda Schweizer ve Peterhans (2001) tarafından yapılan in vitro çalışmada, bu teoriyi destekler şekilde ncp biyotip BVD virusun dsRNA indükte apoptozisi ve interferon üretimini inhibe ettiği bulunmuştur. Aynı yıl yayınlanan bir başka çalışmada ncp biyotip BVD virusun tip I interferon üretimini engellediği in vivo olarak tespit edilmiştir (Charleston ve ark., 2001). Ancak bir yıl sonra gnotobiyotik sığırlarda yürütülen in vivo bir çalışmada önceki sonuçların aksine hem tip I hem de tip II interferonların indüklendiği ve ncp BVDV temelli immunosupresyonun düşük IFN yanıtından kaynaklanmadığı öne sürülmüştür (Charleston ve ark., 2002). Diğer taraftan cp BVDV'nin de ncp biyotip gibi interferon düzenleyici faktör, IRF-3 (Interferon regulatory factor 3) fonksiyonunu bloke ederek IFN α/β transkripsiyonunu engellediği de bildirilmiştir (Baigent ve ark., 2002; 2004).

Sitopatojen biyotip için in vitro şartlarda tip I IFN'leri hem indüklediğine hem de inhibe ettiğine dair çalışma sonuçları elde edilmiştir. Kültüre edilmiş fibroblast ve epitelyal hücrelerde yapılan bazı çalışmalarda, cp biyotipin IFN α/β 'yi oldukça yetersiz indüklemesi üzerine, virusun bazı mutantları yapılmış ve IFN α/β yanıtının virusun replikasyonuna değil, N^{pro} ekspresyonuna bağlı olduğu tespit edilmiştir (Gil ve ark., 2006). Daha sonraki çalışmalarda yalnızca N^{pro} değil, zarf glikoproteinini E^{rms}'in de IFN α/β sentezini inhibe ettiği tespit edilmiştir (Magkouras ve ark., 2008; Matzener ve ark., 2009). Son yıllarda yapılan çalışmalarda ncp BVDV'nin, tip I interferon salınımını indüklediği in vivo olarak ve IFN uyarıcı genlerin uyarılmasını arttırdığı da microarray yöntemiyle gösterilmiştir. Persiste enfeksiyonun sürekli bir doğal immun yanıt uyarıcısı olduğu ve büyüme geriliği ile immunosupresyonun bu kronik IFN uyarımının bir neticesi olduğu fikri öne sürülmüştür (Smirnova ve ark., 2008; Shoemaker ve ark., 2009).

Sığırlarda gebelikte etkili, yapısı ve görevleri OTP-1 ile aynı, yine tip 1 interferon olan BTP-1 ekspresyonu BVDV enfeksiyonu sonrasında üreme kanalı ve bazı fetal dokularda tespit edilmiş (Swasdipan ve ark., 2001) ancak miktarlarındaki değişim üzerine bir çalışma yapılmamıştır.

Bu çalışmada PKT hücre kültüründe BVDV inokulasyonu sonrası IFN γ ekspresyonuyla ilgili 72 saat içindeki değişim, analizde önemsiz görünse de ortalama kopya sayıları göz önüne alındığında kısmen düşüş gözlenmektedir. Öte yandan OTP-1 ekspresyonunda 0-72.saatler arası sürekli artış gözlemlense de ortalama kopya sayısı virus inokule edilmeyen hücreyle kıyaslandığında 1/7 oranında daha düşüktür (Şekil 3.37). SFT-R hücre hattında da durum farklı değildir. Ortalama kopya sayıları değerlendirildiğinde BVDV varlığında IFN γ ekspresyonu yarıya kadar, OTP-1 ekspresyonu ise, ciddi biçimde, 1/43'lük azalma göstermiştir (Şekil 3.38).

İnterferonlar üzerine olan etki mekanizmalarıyla ilgili olarak PPRV ile az sayıda çalışma bulunmaktadır. PPRV'nin genellikle MeV'le benzer olarak; C ve V proteinleri sayesinde IFN α/β inhibisyonuna yol açtığı tahmin edilmektedir (Palosaari ve ark., 2003; Ohno ve ark., 2004; Fontana ve ark., 2008; Ramachandran ve ark., 2008; Caignard ve ark., 2009). Hücre kültüründe yapılan bir çalışmada MeV'nin tip I interferonları inhibe ettiği doğrulanmış ancak virusun IFN γ üzerinde böyle bir etkiye sahip olmadığı belirtilmiştir (Takeuchi ve ark., 2003). Öte yandan RPV ile yapılan bir in vitro çalışmada virusun hem IFN α/β hem de IFN γ üzerine antagonist etkisi olduğu bulunmuştur (Nanda ve ark., 2006). PPRV ile ilgili ise ilk defa alveolar makrofajlarda ve sinsityal hücrelerde IFN γ ekspresyonu Atmaca ve Kul (2012) tarafından yapılan bir çalışmayla gösterilmiş; IFN γ yanında TNF- α miktarlarının da yüksekliğiyle, PPRV patogenezinin MEV'den farklı olduğu düşüncesi ileri sürülmüştür. Morbillivirus ailesinden MEV, RPV, CDV ve PPRV V proteinleri karşılaştırıldığında 4 virusun da V proteininin tip I IFN etkisini bloke ettiği, ancak tip II IFN etkisini bloke etmede değişiklik gösterdikleri belirtilmiştir. Aynı çalışmada bu viruslar içinde IFN α ile indüklenen STAT1 fosforilasyonunu bloke etmede RPV ve PPRV'nin diğer iki virusa göre çok daha etkili olduğu, IFN γ ile indüklenen

STAT1 fosforilasyonu engellemede ise oransal olarak RPV %90, PPRV %55 MeV %16, ve CDV %11 etkili olduğu belirlenmiştir (Chinnakannan ve ark., 2013).

Bu tez çalışmasında, PKT hücre kültüründe PPRV inokulasyonu sonrası IFN γ ve OTP-1 ekspresyonuyla ilgili 96 saat içinde artış görülse de ortalama kopya sayıları değerlendirildiğinde, IFN γ ekspresyonu için neredeyse 1/5 oranında OTP-1 ekspresyonunda da 1/3'lük bir düşüş gözlemlenmektedir (Şekil 3.36). SFT-R hücre hattında ise IFN γ ekspresyonunda yaklaşık 4,5 kat; OTP-1 ekspresyonunda ise yaklaşık 5,5 kat azalma olmuştur (Şekil 3.38). PPRV inokulasyonu iki hücrede de hem IFN γ hem de OTP-1 ekspresyonunda düşüşe sebep olmuştur. PPRV'nin, PKT hücre kültüründe IFN γ üzerindeki düşürücü etkisi daha fazla iken SFT-R hücre hattında OTP-1 üzerindeki etkisi daha fazla gibi görünmektedir.

Virusların interferonlar üzerindeki etkileri BVDV ve PPRV arasında karşılaştırıldığında, BVD virusun OTP-1 üzerindeki etkisinin PPRV'a göre PKT hücre kültüründe, 2,5 kat daha fazla, SFT-R hücre hattında da 8,5 kat fazla olduğu tespit edilmiştir. IFN γ için PKT hücre kültüründe PPRV'nin etkisinin BVDV'nin neredeyse 4,5 katı, SFT-R hücre hattında da 2 katı olduğu görülmüştür. Bu bilgilere dayanarak BVD virusun PPR virusa kıyasla OTP-1 üzerindeki etkisinin; PPR virusun da IFN γ üzerindeki etkisinin daha fazla olduğu söylenebilir (Şekil 3.37 ve 3.38).

Çoklu inokulasyonlarda, IFN γ ekspresyonu üzerindeki azaltıcı etki, SFT-R hücre hattında hiçbir zaman yalnız PPRV inokulasyonundaki kadar olmamış, PKT hücre kültüründe de eş zamanlı inokulasyon sonrası yalnız PPRV inokulasyonu sonrasındaki etkiyle hemen hemen aynı iken, diğer tüm çoklu inokulasyonlarda yine düşük düzeyde kalmıştır. BVD virusun da IFN γ ekspresyonu üzerinde negatif bir etkisi olmasına rağmen iki virus birlikte olduğunda etkinin yalnız PPRV inokulasyonlarındaki kadar kuvvetli olmaması, PPRV'nin IFN γ ekspresyonu üzerindeki etki mekanizmasının BVDV varlığında farklılaştığını düşündürmektedir (Şekil 3.37 ve 3.38).

Söz konusu durum OTP-1 ve BVDV için de geçerlidir. Çoklu inokulasyonlarda, OTP-1 ekspresyonu üzerindeki azaltıcı etki, iki hücre kültüründe de hiçbir zaman yalnız BVDV inokulasyonundaki kadar olmamış; PPR virusun da IFN γ ekspresyonu

üzerinde negatif bir etkisi olmasına rağmen iki virus birlikte olduğunda etkinin yalnız BVDV inokulasyonlarındaki kadar kuvvetli olmaması (Şekil 3.37 ve 3.38), BVDV'nin OTP-1 ekspresyonu üzerindeki etki mekanizmasının iki virusun etkileşimiyle farklılaştığına işaret ediyor olabileceğini düşündürmektedir. İki virusun birlikte enfeksiyonlarında etkileşimlerinin daha net anlaşılabilmesi için daha fazla hücrel ve viral parametrenin değerlendirilmesi gerektiği düşünülmektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada ülkemiz için önemli bir tehdit olduğu düşünülen PPRV ve Pestivirus ortak enfeksiyonlarında rol aldığı düşünülen mekanizmalardan olan hücresel antiviral bileşenlerden IFN gamma ve tip I interferon sınıfına dahil olan, embriyonik interferon, Ovine Trophoblast Protein-1 (OTP-1) ekspresyonunun sorgulanması ve söz konusu iki virusun hem SFT-R hücre hattında hem de plasental dokuyu temsil etmesi amacıyla primer koyun trofoblast (PKT) hücre kültüründe ayrı ayrı ve birlikte üretilmeleriyle eş zamanlı enfeksiyonda virusların etkileşimi ile ilgili fikir edinilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda yapılan testlerden elde edilen sonuçlara göre;

- Testlerde kullanılan iki hücre kültüründe de BVDV ve PPRV üremesi etkili bir biçimde gerçekleştiği, gerek oluşan sitopatik etkinin şiddeti ve oluşum zamanı, gerekse de BVDV- 5'UTR ve PPRV-N ekspresyon oranları kıyaslandığında, iki virusun da replikasyonları için PKT hücre kültürünün, SFT-R hücre hattına göre daha uygun olduğu tespit edildi.
- İki hücre kültüründe de 5' UTR ve N ekspresyonlarındaki değişimlerin benzer seyir izlediği dolayısıyla her iki hücrenin virus üremelerine eşit oranda hizmet ettiği belirlendi.
- BVD Virusun her iki hücrede de en yüksek replikasyon aktivitesini PPRV varlığında ve inokulasyon sonrası 6. saatte sergilediği tespit edildi.

- BVDV inokulasyonunun iki hücre kültüründe de hem IFN γ hem de OTP-1 ekspresyonunda düşüşe sebep olduğu ancak bu etkinin OTP-1 üzerinde çok daha kuvvetli olduğu belirlendi.
- PPRV inokulasyonunun iki hücre kültüründe de hem IFN γ hem de OTP-1 ekspresyonunda düşüşe sebep olduğu, ancak bu etkinin IFN γ üzerinde daha kuvvetli olduğu belirlendi.
- Çoklu virus inokulasyonlarında PPRV'nin IFN γ üzerindeki, BVDV'nin de OTP-1 üzerindeki baskılayıcı etkilerinde azalma olduğu tespit edildi.
- PKT hücre kültüründe önce BVDV, 12 saat sonra PPRV inokulasyonunda diğer çoklu inokulasyonlara göre oldukça farklı bir sonuç alındı. PPRV-N kopya sayısının diğer tüm testlere göre en yüksek miktarda, BVDV-5'UTR kopya sayısının çoklu inokulasyon yapılan diğer tüm testlere göre en düşük miktarda ve IFN γ ve OTP-1 kopya sayıları da diğer bütün testlere göre en yüksek miktarda tespit edildi.
- PKT hücrelerinde normalde tespit edilemeyen OTP-1 ekspresyonunda BVDV enfeksiyonu ile birlikte bariz bir oluşum ve stabil bir seyir olduğu, IFN γ ekspresyonunun ise PPRV enfeksiyonu varlığında tespit edilebildiği ve önce BVDV 24 saat sonra PPRV inokulasyonu denemesinde en yüksek seviyeye ulaştığı belirlendi.
- Sonuç olarak; BVDV enfeksiyonu sonrasında doğal ve edinilmiş bağışık yanıtın iki önemli bileşeni olan IFN γ ve OTP-1 düzeyinde kritik düşüşlerin gerçekleştiği ve bu süreçte meydana gelebilecek olası PPRV enfeksiyonu ile IFN γ düzeyindeki daha ileri düşüşlerin PPRV yönünden fetal enfeksiyon riskini arttırabileceği sonucuna varıldı.

Bu bilgilere dayanarak;

Söz konusu iki virusun birlikte üremesi ve etkileşimi ile ilgili gelecekte yapılacak olan çalışmalarda ortak enfeksiyonun gelişim mekanizmasını anlama konusunda daha aydınlatıcı olması amacıyla; çoklu inokulasyonların yapılacağı saat aralıklarının fazlalaştırılması, farklı kökenli hücre tiplerinin de kullanılması ve daha fazla hücresel ürünün ifadesindeki değişikliklerin sorgulanması ayrıca in vivo çalışmaların da dahil edilmesi önerilmektedir.

ÖZET

Embriyonik İnterferon (OTP-1) ve İnterferon Gamma Ekspresyonunun in vitro Şartlarda PPRV ve Pestivirus Ortak Enfeksiyonuna Etkisinin Araştırılması.

Türkiye’de son yıllarda önemi artan eş zamanlı PPRV ve Pestivirus enfeksiyonlarında, bazı hücrel ve enfeksiyöz nitelikli (ruminant Pestivirus) unsurların PPR virusunun plasental bariyeri geçmesindeki olası rollerini ve virusların interferonlar üzerindeki etki mekanizmalarını in vitro şartlarda sorgulamak amacıyla koyun primer trofoblast (PKT) ve fotal koyun timüs (SFT-R) hücrelerinde her iki virusun ayrı ayrı ve birlikte, farklı zaman noktalarında inokulasyonları sonrasında OTP-1 ve IFN-gamma ekspresyonundaki ve viral gen ekspresyonlarındaki değişiklikler Eş Zamanlı RT-PCR yöntemi ile sorgulandı.

İki hücre kültüründe de BVDV ve PPRV üremesi etkili bir biçimde gerçekleşti, gerek oluşan sitopatik etkinin şiddeti ve oluşum zamanı gerekse de BVDV- 5’UTR ve PPRV-N ekspresyon oranları kıyaslandığında, iki virusun da replikasyonları için PKT hücre kültürünün SFT-R hücre hattına göre daha uygun olduğu tespit edildi. Hem BVDV hem de PPRV inokulasyonunun, iki hücre kültüründe de, 96 saatlik test süresinde hem IFN-gamma hem de OTP-1 ekspresyonunda düşüşe sebep olduğu ancak BVD virusun OTP-1 üzerinde, PPR virusun da IFN-gamma üzerindeki azaltıcı etkisinin daha kuvvetli olduğu belirlendi. Çoklu virus inokulasyonlarının virusların etkilerinde değişikliklere sebep olduğu belirlendi.

Eş zamanlı PPRV ve Pestivirus enfeksiyonları sırasında viruslar arasındaki etkileşimin ve virusların hücrel mekanizmalar üzerindeki etkilerinin daha net anlaşılabilmesi için yapılacak in vitro çalışmalarda farklı kökenli hücre tiplerinin dâhil edilmesi, inokulasyonların yapılacağı saat aralıklarının arttırılması ve daha fazla hücrel ürünün ifadesindeki değişikliklerin sorgulanması önerildi.

Anahtar Sözcükler: Embriyonik interferon, Eş Zamanlı RT-PCR, İnterferon gamma, PPR Virus, Ruminant Pestivirusları,

SUMMARY

In vitro Investigation of The Effects of Embryonic Interferon (OTP-1) and Interferon Gamma Expressions on Concurrent PPRV And Pestivirus Infections.

To investigate the role of some cellular and infectious (ruminant Pestivirus) components for the occurrence of transplacental PPRV infection and the effects of BVDV and PPRV on interferons during the concurrent infections, both viruses were inoculated separately and together at different time points in primary ovine trophoblast and sheep fetal thymus (SFT-R) cell cultures, OTP-1, IFN γ and viral gene expression levels quantified by Real Time RT-PCR.

Replication of both BVDV and PPRV were efficient in the cell cultures, when the severity and the origin time of the cytopathic effects as well as BVDV-5' UTR and PPRV-N expression levels evaluated, primary ovine trophoblast cell culture was more permissive than SFT-R. Both viruses caused lower expression levels of OTP-1 and IFN gamma in both of the cell cultures in 96 hours. Moreover, BVDV had a stronger effect on OTP-1 whereas PPRV on IFN-gamma. Simultaneous inoculations caused changes on the courses of these effects.

For a better understanding of the interactions of the viruses and the effects of them on cellular mechanisms during concurrent infections; different cell types, more cellular components and more time points of inoculations should be included in the future in vitro studies.

Key Words: Embryonic interferon, Interferon gamma, PPR Virus, Real Time RT-PCR, Ruminant Pestiviruses

KAYNAKLAR

- ABUBAKAR, M., ALI, Q., KHAN, H. A. (2008). Prevalence and mortality rate of peste des petits ruminant (PPR): possible association with abortion in goat. *Trop Anim Health Prod* **40**: 317–321.
- ADLER, H., JUNGI, T.W., PFISTER, H. (1996). Cytokine regulation by virus infection: bovine viral diarrhoea virus, a flavivirus, downregulates production of tumor necrosis factor alpha in macrophages in vitro. *J Virol.* **70**:2650–2653.
- ADLER, B., ADLER, H., PFISTER, H., JUNGI, T. W., PETERHANS, E.(1997). Macrophages infected with cytopathic bovine viral diarrhoea virus release a factor(s) capable of priming uninfected macrophages for activation-induced apoptosis. *Journal of Virology* **71**: 3255-3258.
- ADOLF, G.R., MAURER-FOGY, I., KALSNER, I., CANTELL, K. (1990). Purification and characterization of natural human interferon omega 1. Two alternative cleavage sites for the signal peptidase. *J Biol Chem.* **265(16)**:9290-5.
- AK, S., FIRAT, İ., BOZKURT, H.H., GÜLYAZ, V., AK, K. (2002). The Prevalence of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) Infections in Cattle and Existence of Persistently Infected Cattle in the Trakya Region *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* **26**: 245-248.
- ALBAYRAK, H., ALKAN, F. (2009). PPR virus infection of sheep in black sea region of Turkey: epidemiology and diagnosis by RT-PCR and virus isolation. *Vet Res Commun* **33**: 241–249.
- ALBAYRAK, H., ÖZAN, E. (2012).The Investigation of Pestivirus and Rift Valley Fever Virus Infections in Aborted Ruminant Foetuses in the Blacksea Region in Turkey. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi.* **29 (4)**:457-461.
- ALKAN, F., BURGU, I. Investigation on the incidence of bovine viral diarrhoea virus in calves born with encephalopathy in Turkey. (1993). *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* **100(3)**:107-9.
- ANDERSON, E. C. (1995). Morbilliviruses in wildlife (in relation to their population biology and disease control in domestic animals). *Vet Microbiol.* **44**: 319–332.
- ANDERSON, E. C., ROWE, L.W. (1998).The prevalence of antibody to the viruses of bovine virus diarrhoea, bovine herpes virus 1, rift valley fever, ephemeral fever and bluetongue and to *Leptospira* sp in free-ranging wildlife in Zimbabwe. *Epidemiology and Infection* **121**:441-449.
- ASHWORTH, C.J., BAZER, F.W. (1989). Changes in ovine conceptus and endometrial function following asynchronous embryo transfer or administration of progesterone. *Biology of Reproduction.* **40**: 425-433.
- ASHLEY,B. VirologyStudyPages,Online;<http://homepage.usask.ca/~vim458/virology/studpages2007/AshleyB/>. Erişim tarihi: 2.6.2014.
- ATASEVEN, V.S., ATASEVEN, L., TAN, T., BABÜR, C., OĞUZOĞLU, T.Ç. (2006). Seropositivity of agents causing abortion in local goat breeds in Eastern and South-eastern Anatolia, Turkey., *Revue de Médecine Vétérinaire.* **157(11)**:545-550.
- ATMACA, H.T., KUL, O. (2012). Examination of epithelial tissue cytokine response to natural peste des petits ruminants virus (PPRV) infection in sheep and goats by immunohistochemistry. *Histol Histopathol* **27**: 69-78.
- BACH, E. A., AGUET, M., SCHREIBER, R. D. (1997) The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu. Rev. Immunol* **15**:563–591.
- BAIGENT, S.J., ZHANG, G., FRAY, M. D., FLICK-SMITH, H., GOODBOURN, S, MCCAULEY, J.W. (2002). Inhibition of beta interferon transcription by noncytopathogenic bovine viral diarrhoea virus is through an interferon regulatory factor 3-dependent mechanism. *J Virol.* **76(18)**:8979-88.
- BAIGENT, S.J., GOODBOURN, S., MCCAULEY, J.W. (2004). Differential activation of interferon regulatory factors-3 and -7 by non-cytopathogenic and cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus. *Vet Immunol Immunopathol.* **100(3-4)**:135-44.
- BAILEY, D., BANYARD, A., DASH, P., OZKUL, A., BARRETT, T. (2005) Full genome sequence of peste des petits ruminants virus, a member of the Morbillivirus genus. *Virus Res.* **110(1–2)**:119–124.
- BAKER, J.C. (1995). The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. *Vet Clin North Am FoodAnim Pract* **11**:425–445.

- BANKAMP, B., HORIKAMI, S.M., THOMPSON, P.D., HUBER, M., BILLETER, M. MOYER, S.A. (1996) Domains of the measles virus N-protein required for binding to P-protein and selfassembly. *Virology*. **216**: 272–7.
- BANYARD, A. C., PARIDA, S., BATTEN, C., OURA, C., KWIAATEK, O., LIBEAU, G. (2010). Global distribution of peste des petits ruminants virus and prospects for improved diagnosis and control. *J. Gen. Virol.* **91**:2885-2897.
- BARON, M. D., GOATLEY, L., BARRETT, T. (1994) Cloning and sequence analysis of the matrix (M) protein gene of rinderpest virus and evidence for another bovine morbillivirus. *Virology*. **200(1)**:121–129.
- BARON, M. D., BARRETT, T. (2000) Rinderpest viruses lacking the C and V proteins show specific defects in growth and transcription of viral RNAs. *J Virol* **74(6)**:2603–2611.
- BARRETT, T. (2001). Morbilliviruses: dangers old and new. New challenges to health: The threat of virus infection Society for general microbiology, Symposium 60. Cambridge University Press, 155-178.
- BARRETT, T., ASHLEY, C. B., DIALLO, A. (2006) Molecular biology of the morbilliviruses. In: Rinderpest and Peste des Petits Ruminants Virus Plagues of Large and Small Ruminants, 2nd edn. Elsevier, Academic Press, London.
- BASS, B. L. (2000). Double-stranded RNA as a template for gene silencing. *Cell*. **101**:235-238.
- BAZAN, J. F. (1990) Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 6934–6938.
- BAZER, F.W., SPENCER, T.E., OTT, T.L. (1997). Interferon tau: a novel pregnancy recognition signal. *Am.J Reprod Immunol.* **37(6)**:412-20.
- BECHER, P., ORLICH, M., KONIG, M., THIEL, H.J. (1999). Nonhomologous RNA recombination in bovine viral diarrhoea virus: molecular characterization of a variety of subgenomic RNAs isolated during an outbreak of fatal mucosal disease. *J Virol.* **73**:5646-5653.
- BECHER, P., ORLICH, M., THIEL, H. (2000). Mutations in the 5' nontranslated region of bovine viral diarrhoea virus result in altered growth characteristics. *J Virol.* **74**:7884–7894.
- BECHER, P., AVALOS-RAMIREZ, R., ORLICH, M., ROSALES, S.C., KÖNIG, M., SCHWEIZER, M. (2003). Genetic and antigenic characterization of novel Pestivirus genotypes: implications for classification, *Virology*. **311**:96–104.
- BECHER, P., TAUTZ, N. (2011). RNA recombination in Pestiviruses. Cellular RNA sequences in viral genomes highlight the role of host factors for viral persistence and lethal disease *RNA Biology* **8**:2, 216-224.
- BEHRENS, S.E., GRASSMANN, C.W., THIEL, H.J. (1998). Characterization of an autonomous subgenomic Pestivirus RNA replicon. *J Virol* **72**:2364–2372.
- BELLINI, W. J., ENGLUND, G., ROZENBLATT, S., ARNHEITER, H., RICHARDSON, C. D. (1985) Measles virus P gene codes for two proteins. *J Virol* **3(3)**:908–919.
- BIDJEH, K., BORNAREL, P., IMADINE, M., LANCELOT, R. (1995). First-time isolation of the peste des petits ruminants (PPR) virus in Chad and experimental induction of the disease. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* **48**: 295–300.
- BIRON, C.A., SEN, G.C. (2001) Interferons and other cytokines. in Fields virology, eds Knipe D. M., Howley P. M., Griffin D. E., Martin M., Roizman B., Straus S. E. (Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa), 4th ed. pp 321–351.
- BIRON, C. A. (2001) Interferons alpha and beta as immune regulators—a new look. *Immunity*. **14**: 661–664.
- BLAIN, F., LISTON, P. AND BRIEDIS, D.J. (1995) The carboxy-terminal 18 amino acids of the measles virus hemagglutinin are essential for its biological function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **214**: 1232–8.
- BLATT, L. M., DAVIS, J. M., KLEIN, S. B., TAYLOR, M. W. (1996) The biologic activity and molecular characterization of a novel synthetic interferon-alpha species, consensus interferon. *J. Interferon Cytokine Res.* **16**:489–499.
- BLIXENKRONE-MOLLER, M., SVANSSON, V. (1990) Phocid distemper virus – a threat to terrestrial mammals? *Vet. Rec.* **127 (10)**: 263–4.
- BLOM, N., GAMMELTOFT, S., BRUNAK, S. (1999) Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* **294(5)**:1351–1362.
- BOEHM, U., KLAMP, T., GROOT, M., HOWARD, J.C. (1997). Cellular responses to interferon-gamma. *Annu. Rev. Immunol.* **15**:749-795.

- BOURHIS, J. M., JOHANSSON, K., RECEVEUR-BRECHOT, V., OLDFIELD, C.J., DUNKER, K.A., CANARD, B. LONGHI, S. (2004) The C-terminal domain of measles virus nucleoprotein belongs to the class of intrinsically disordered proteins that fold upon binding to their physiological partner. *Virus Res.* **99**: 157–67.
- BOLT, G., ALEXANDERSEN, S., BLIXENKRONE-MOLLER, M. (1995). The phosphoprotein gene of a dolphin morbillivirus isolate exhibits genomic variation at the editing site. *J. Gen. Virol.* **76**: 3051–8.
- BOXER, E. L., NANDA, S. K., BARON, M. D. (2009) The rinderpest virus non-structural C protein blocks the induction of type 1 interferon. *Virology* **385(1)**:134–142.
- BRODERSEN, B.W., KELLING, C.L. (1998). Effect of Concurrent Experimentally Induced Bovine Respiratory Syncytial Virus and Bovine Viral Diarrhoea Virus Infection on Respiratory Tract and Enteric Diseases in Calves. *American Journal of Veterinary Research.* **59(11)**:1423-1430.
- BROWNLIE, J., CLARKE, M. C., HOWARD, C. J. (1989). Experimental infection of cattle in early pregnancy with a cytopathic strain of bovine virus diarrhoea virus. *Research in Veterinary Science.* **46**:307-311.
- BRUSCHKE, C.J.M., WEERDMEESTER, K., VAN DIRSCHOT, J.T. (1998). Distribution of bovine virus diarrhoea virus in tissues and white blood cells of cattle during acute infection. *Vet Microbiol* **64**:23–32.
- BURGU, I., OZKUL, A. (1993). Detection by cultural isolation of bovine virus diarrhoea (BVD) virus following field infections in cattle and their fetuses. *Dtsch.tierärztl.Wschr.*,**100**:361-363.
- BURGU, I., AKÇA, Y., ALKAN, F., ÖZKUL, A., KARAOĞLU, T., BİLGE-DAĞALP, S., OĞUZOĞLU, T.Ç., YEŞİLBAĞ, K. (2001). Koyunlarda doğum öncesi ve sonrası dönemlerde Bovine Viral Diarrhoea (BVD) virus enfeksiyonunun serolojik, virolojik ve patogenezi yönünden araştırılması. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science.* **25(4)**:551-558.
- BUSTIN, S.A. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* **29(1)**:23-29
- CAIGNARD, G., BOURAI, M., JACOB, Y., TANGY, F., VIDALAIN, P.O. (2009). Inhibition of IFN-alpha/beta signaling by two discrete peptides within measles virus V protein that specifically bind STAT1 and STAT2. *Virology.* **383**:112-120.
- CAPON, D.J., SHEPARD, H.M., GOEDEL, D.V., (1985). Two distinct families of human and bovine interferon-alpha genes are coordinately expressed and encode functional polypeptides. *Mol. Cell. Biol.* **5**: 768-779.
- CARLSSON U (1991). Border disease in sheep caused by transmission of virus from cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *The Veterinary Record.* **128**:145-147.
- CARNAUD, C., LEE, D., DONNARS, O., PARK, S. H., BEAVIS, A., KOEZUKA, Y., BENDELAC, A. (1999). Cutting edge: cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J. Immunol.* 163:4647–4650.
- CATTANEO, R., KAELIN, K., BACZKO, K., BILLETER, M.A. (1989) Measles virus editing provides an additional cysteine-rich protein. *Cell* **56**: 759–64.
- CELL-MEDIATED IMMUNITY: Cell interactions in specific immune responses. <http://pathmicro.med.sc.edu/bowers/ifn-6.jpg>. Erşim tarihi: 02.06.2014.
- CHAMBERS, R., TAKIMOTO, T. (2009) Antagonism of innate immunity by paramyxovirus accessory proteins. *Viruses* 1(3):574–593.
- CHARLESTON, B., FARY, M.D., BAIGENT, S., CARR, B.V., MORRISON, W.I. (2001). Establishment of persistent infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus in cattle is associated with a failure to induce type I interferon. *Journal of General Virology.* **82**:1893-1897.
- CHARLESTON, B., BRACKENBURY, L. S., CARR, B. V., FRAY, M. D., HOPE, J. C., HOWARD, C. J., MORRISON, W. I. (2002). Alpha/Beta and Gamma Interferons Are Induced by Infection with Noncytopathic Bovine Viral Diarrhoea Virus in vivo. *J Virol.* **76**: 923–927.
- CHINNAKANNAN, S. K., NANDA, S.K., BARON, M. D. (2013). Morbillivirus V Proteins Exhibit Multiple Mechanisms to Block Type 1 and Type 2 Interferon Signalling Pathways. *PLoS One.* **8**:e57063.
- CORAPI, W. V., DONIS, R. O., DUBOVI, E. J. (1988). Monoclonal antibody analyses of cytopathic and noncytopathic viruses from fatal bovine viral diarrhoea virus infections. *Journal of Virology.* **62**:2823-2827.

- COUACY-HYMAN, E., ROGER, F., HURARD, C., GUILLOU, J. P., LIBEAU, G., DIALLO, A. (2002). Rapid and sensitive detection of peste des petits ruminants virus by a polymerase chain reaction assay. *J Virol Methods*. **100**:17–25.
- COUACY-HYMAN, E., BODJO, C., DANHO, T., LIBEAU, G., DIALLO, A. (2005). Surveillance of wildlife as a tool for monitoring rinderpest and peste des petits ruminants in West Africa. *Rev Sci Tech* **24**, 869–877.
- COUACY-HYMAN, E., BODJO, S. C., DANHO, T., KOFFI, M. Y., LIBEAU, G., DIALLO, A. (2007) Early detection of viral excretion from experimentally infected goats with peste-des-petits ruminants virus. *Prev Vet Med* **78**(1):85–88.
- COSBY, S. L., DUPREX, W. P., HAMILL, L. A., LUDLOW, M., MCQUAID, S. (2002). Approaches in the understanding of morbillivirus neurovirulence. *J Neurovirol* **8**(2):85–90.
- CROWLEY, J.C., DOWLING, P.C., MENONNA, J., SILVERMAN, J.I., SCHUBACK, D., COOK, S.D., BLUMBERG, B.M. (1988). Sequence variability and function of measles virus 3' and 5' ends and intercistronic regions. *Virology* **164**: 498–506.
- DARNELL, J. E. JR., KERR, I. M., STARK, G. M. (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* **264**:1415–1421.
- DARNELL, J. E. JR. (1997) STATs and gene regulation. *Science*. **277**:1630–1635.
- DENG, R., BROCK, K.V. (1992) Molecular cloning and nucleotide sequence of a Pestivirus genome, noncytopathic bovine viral diarrhoea virus strain SD-1. *Virology* **191**:867–869.
- DE MOERLOOZE, L., RENARD, A., LECOMTE, C., MARTIAL, J.A. (1991) A “zinc finger-like” domain in the 54KDA protein of several Pestiviruses. *Arch Virol Suppl.***3**:41–46.
- DEPNER, K.R., HÜBSCHLE, O.J., LIESS, B. (1990). Transplacental BVD virus transmission after experimental inoculation of goats in different pregnancy stages. *Dtsch Tierärztl Wochenschr.* **97**:421-423.
- DEVIREDDY, I.R., RAGHAVAN, R., RAMACHANDRAN, S., SHAILA, M.S. (1999). The fusion protein of peste des petits ruminants virus is a hemolysin. *Arch. Virol.* **144**: 1241-1247
- DIALLO, A., BARRETT, T., LEFEVRE, P. C., TAYLOR, W. P. (1987) Comparison of proteins induced in cells infected with rinderpest and peste des petits ruminants viruses. *J Gen Virol* **68**:2033–2038
- DIOP, M., SARR, J., LIBEAU, G. (2005). Evaluation of novel diagnostic tools for peste des petits ruminants virus in naturally infected goat herds. *Epidemiol Infect.* **133**(4):711-7
- DHAR, P., SREENIVASA, B.P., BARRETT, T., CORTEYN, M., SINGH, R.P., YOPADHYAY, S.K. (2002) Recent epidemiology of peste des petits ruminants virus (PPRV). *Vet Microbiol* **88**(2):153–159
- DHAR, P., MUTHUCHELVAN, D., SANYAL, A., KAUL, R., SINGH, R. P., SINGH, R. K., BANDYOPADHYAY, S.K. (2006) Sequence analysis of the haemagglutinin and fusion protein genes of peste-des-petits ruminants vaccine virus of Indian origin. *Virus Genes* **32**(1):71–78.
- DURANTEL, D., BRANZA-NICHITA, N., CARROUEE-DURANTEL, S. (2001) Study of the mechanism of antiviral action of imino sugar derivatives against bovine viral diarrhoea virus. *J Virol* **75**:8987–8998.
- EALICK, S. E., COOK, W. J., VIJAY-KUMAR, S., CARSON, M., NAGABHUSHAN, T. L., TROTTA, P. P., BUGG, C. E. (1991). Three-dimensional structure of recombinant human interferon-gamma. *Science*. **252**: 698–702.
- EL OMARI, K., IOURIN, O., HARLOS, K., GRIMES, J. M., STUART, D. I. (2013). Structure of a Pestivirus Envelope Glycoprotein E2 Clarifies Its Role in Cell Entry. *Cell Rep.* **3**(1):30-35.
- ELBERS, K., TAUTZ, N., BECHER, P. (1996). Processing in the Pestivirus E2-NS2 region: Identification of proteins p7 and E2p7. *J Virol* **70**:4131–4135
- ELLIS, J.A., WEST, K.H., CORTESE, V.S., MYERS, S.L., CARMAN, S., MARTIN, K.M. HAINES, D.M. (1998). Lesions and distribution of viral antigen following an experimental infection of young seronegative calves with virulent bovine virus diarrhoea virus-type II. *Canadian Journal of Veterinary Research.* **62**:161-169
- ELVANDER, M., BAULE, C., PERSSON, M., EGYED, L., BALLAGI-PORDANY. A., BELAK. S., ALENIUS, S. (1998). An experimental study of a concurrent primary infection with bovine respiratory syncytial virus (BRSV) and bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in calves. *Acta Veterinaria Scandinavica.* **39**(2):251-264.
- EVIEWS 8.0., Windows, 2014.

- EZEIBE, M.C., OKOROAFOR, O.N., NGENE, A. A., EZE, J. I., EZE, I.C., UGONABO, J. A. (2008). Persistent detection of peste de petits ruminants antigen in the faeces of recovered goats. *Trop Anim Health Prod* **40(7)**:517–519.
- FARIN, C.E., IMAKAWA, K., ROBERTS, R.M. (1989). In situ localization of mRNA for the interferon, ovine trophoblast protein-1, during early embryonic development of the sheep. *Mol. Endocrinol.* **3**: 1099-1107.
- FARIN, C. E, IMAKAWA, K., HANSEN,R., MCDONNELL, J.J., MURPHY, C.N. FARIN, P.W., ROBERTS, R.M. (1990) Expression of Trophoblastic Interferon Genes in Sheep and Cattle. *Biology of Reproduction.* **43**: 210-218.
- FIELDS, B.N., KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M., GRIFFEN, D.E. (2001) *Fields' Virology*, 4th ed., Vol.1. Lippincott, Williams, and Wilkins, Philadelphia, PA.
- FLAISHON, L., HERSHKOVIZ, R., LANTNER, F., LIDER, O., ALON, R., LEVO, Y., FLAVELL, R. A., SHACHAR, I. (2000). Autocrine secretion of interferon gamma negatively regulates homing of immature B cells. *J. Exp. Med.* **192**: 1381–1388.
- FONTANA, J.M., BANKAMP, B., BELLINI, W.J., ROTA, P.A. (2008). Regulation of interferon signaling by the C and V proteins from attenuated and wild-type strains of measles virus. *Virology.* **374**:71-81.
- FORSYTH, M. A., BARRETT, T. (1995). Evaluation of polymerase chain reaction for the detection and characterisation of rinderpest and peste des petits ruminants viruses for epidemiological studies. *Virus Res.* **39**: 151–163.
- FULTON, R.W., PURDY, C.W., CONFER, A.W., SALIKI, J.T., LOAN, R.W., BRIGGS, R.E., BURGE, L.J. (2000). Bovine Viral Diarrhoea Viral Infections in Feeder Calves with Respiratory Disease: Interactions with Pasteurella Spp., Parainfluenza 3 Virus, and Bovine Respiratory Syncytial Virus. *Can. J. Vet. Res.* **64(3)**:151-159
- GALBRAITH, S. E., MCQUAID, S., HAMILL, L., PULLEN, L., BARRETT, T., COSBY, S.L. (2002). Rinderpest and peste des petits ruminants viruses exhibit neurovirulence in mice. *J Neurovirol* **8(1)**:45–52.
- GALLEI, A., BLOME, S., GILGENBACH, S., TAUTZ, N., MOENNIG, V., BECHER, P. (2008). Cytopathogenicity of classical swine fever virus correlates with attenuation in the natural host. *J. Virol.* **82**:9717–9729.
- GAMLEN, T., RICHARDS, K.H., MANKOURI, J., HUDSON, L., MCCAULEY, J., HARRIS, M., MACDONALD, A. (2010). Expression of the NS3 protease of cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus results in the induction of apoptosis but does not block activation of the beta interferon promoter. *J. Gen. Virol.* **91**:133-144
- GIBBS, E. P., TAYLOR, W. P., LAWMAN, M. J., BRYANT, J. (1979). Classification of peste des petits ruminants virus as the fourth member of the genus Morbillivirus. *Intervirology* **11(5)**:268–274.
- GIL, L.H.V.G., ANSARI, I.H., VASSILEV, V., LIANG, D., LAI, V.C. H., ZHONG, W., HONG, Z., DUBOVI, E.J., DONIS, R.O. (2006). The amino-terminal domain of bovine viral diarrhoea virus Npro protein is necessary for alpha/beta interferon antagonism. *J Virol.* **80**: 900–911.
- GLEW, E.J., CARR, B.V., BRACKENBURY, L.S. (2003). Differential effects of bovine viral diarrhoea virus on monocytes and dendritic cells. *J Gen Virol.* **84**:1771–1780.
- GODKIN, J.D., BAZER, F.W., MOFFATT, J., SESSIONS, F., ROBERTS, R.M., (1982). Purification and properties of a major, low molecular weight protein released by the trophoblast of sheep blastocysts at Day 13-21. *J Reprod Fertil* **65**:141-50.
- GOMBART, A. F., HIRANO, A., WONG, T. C. (1993) Conformational maturation of measles virus nucleocapsid protein. *J Virol* **67(7)**:4133–4141.
- GONG, Y., TROWBRIDGE, R., MACNAUGHTON, T.B. (1996). Characterization of RNA synthesis during a onestep growth curve and of the replication mechanism of bovine viral diarrhoea virus. *J Gen Virol* **77**:2729–2736.
- GONG, Y., SHANNON, A., WESTAWAY, E.G., GOWANS, E.J. (1998). The replicative intermediate molecule of bovine viral diarrhoea virus contains multiple nascent strands. *Arch Virol* **143**:399–404.
- GOTOH, B., KOMATSU, T., TAKEUCHI, K., YOKOO, J. (2001). Paramyxovirus accessory proteins as interferon antagonists. *Microbiol Immunol.* **45(12)**:787-800.
- GRAHAM, D. A., CALVERT, V., GERMAN, A., MCCULLOUGH, S. J. (2001). Pestiviral infections in sheep and pigs in Northern Ireland. *Veterinary Record.* **148**: 69-72

- GRASSMANN, C.W., ISKEN, O., TAUTZ, N., BEHRENS, S.E. (2001). Genetic analysis of the Pestivirus nonstructural coding region: defects in the NS5A unit can be complemented in trans. *J Virol.* **75**:7791-802
- GREISER-WILKE, I., LIEBLER, E., HAAS, L. (1993). Distribution of cytopathogenic and noncytopathogenic bovine virus diarrhoea virus in tissues from a calf with experimentally induced mucosal disease using antigenic and genetic markers. *Arch Virol Suppl* **7**:295-302.
- GROOMS, D.L., BROCK, K.V., PATE, J.L., DAY, M.L. (1998). Changes in ovarian follicles following acute infection with bovine viral diarrhoea virus. *Theriogenology* **49**:595-605.
- GU, B., LIU, C., LIN-GOERKE, J. (2000). The RNA helicase and nucleotide triphosphatase activities of the bovine viral diarrhoea virus NS3 protein are essential for viral replication. *J Virol* **74**:1794-1800.
- GRUMMER, B., BEER, M., LIEBLER-TENORIO. (2001). Localization of viral proteins in cells infected with bovine viral diarrhoea virus. *J Gen Virol* **82**:2597-605
- GUBBAY, O., CURRAN, J., KOLAKOFSKY, D. (2001) Sendai virus genome synthesis and assembly are coupled: a possible mechanism to promote viral RNA polymerase processivity. *J Gen Virol* **82(12)**:2895-2903
- GUPTA, A. K., SHAJI, D., BANERJEE, A. K. (2003) Identification of a novel tripartite complex involved in replication of vesicular stomatitis virus genome RNA. *J. Virol.* **77**:732-8
- HAMERS, C., COUVREUR, B., DEHAN, P. (2000). Differences in experimental virulence of bovine viral diarrhoea virus strains isolated from haemorrhagic syndromes. *Vet J* **160**:250-258.
- HANSEN, T.R., IMAKAWA, K., POLITES, H.G., MAROTTI, K.R., ANTHONY, R.V., ROBERTS, R.M. (1988). Interferon RNA of embryonic origin is expressed transiently during early pregnancy in the ewe. *Journal of Biological Chemistry.* **263**:12801-12804.
- HANSEN, T.R., LEAMAN, D.W., CROSSL, J.C., MATHIALAGAN, N., BIXBY, J.A., ROBERT, M. (1991). The Genes for the Trophoblast Interferons and the Related Interferon γ Possess Distinct 5'-Promoter and 3' Flanking Sequences. *The Journal Of Biological Chemistry.* **5(15)**: 3060-3067.
- HARADA, T., TAUTZ, N., THIEL, H.J. (2000). E2-p7 region of the bovine viral diarrhoea virus polyprotein: Processing and functional studies. *J Virol* **74**:9498-9506.
- HAUPTMANN, R., SWETLY, P. (1985). A novel class of human type I interferons. *Nucleic Acids Research.* **(13)**: 4739-4749.
- HEIMANN, M., ROMAN-SOSA, G., MARTOGLIO, B., THIEL, H.J., RUMENAPF, T. Core protein of Pestiviruses is processed at the C terminus by signal peptide peptidase. *J Virol* **2006**; **80**:1915-21.
- HEINZ, F.X., COLLETT, M.S., PURCELL, R.H. (2000) Family Flaviviridae. In: *Virus Taxonomy.* pp. 859-879. Academic Press, San Diego, CA.
- HILBE, M., CAMENISCH, U., BRAUN, U., PETERHANS, E., STALDER, H., ZLINSZKY, K., EHRENSPERGER, F. (2009). Mucosal lesions in a sheep infected with the Border Disease Virus (BDV). *Schweizer Archives Tierheilkunde.* **151**:391-396
- HOFMANN, M.A., BRECHTBUHL, K., STAUBER, N. (1994). Rapid characterization of new Pestivirus strains by direct sequencing of PCR-amplified cDNA from the 5' noncoding region. *Arch Virol* **139**:217-229.
- HORIKAMI, S. M., SMALLWOOD, S., BANKAMP, B., MOYER, S. A. (1994) An amino-proximal domain of the L protein binds to the P protein in the measles virus RNA polymerase complex. *Virology.* **205(2)**:540-545.
- HORIKAMI, S. M., MOYER, S. A. (1995) Structure, transcription, and replication of measles virus. *Curr Top Microbiol Immunol* **191**:35-50.
- HORVATH, C. M. (2000) STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *Trends Biochem. Sci.* **25**:496-502.
- HORVATH, C. M. (2004). Weapons of STAT destruction. Interferon evasion by paramyxovirus V protein. *Eur J Biochem.* **271**:4621-4628.
- HOUE, H. (1999). Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet Microbiol* **64**:89-107.
- HUBER, M., CATTANEO, R., SPIELHOFER, P., ORVELL, C., NORRBY, E., MESSERLI, M., PERRIARD, J.C., BILLETER, M.A. (1991) Measles virus phosphoprotein retains the nucleocapsid protein in the cytoplasm. *Virology* **185(1)**:299-308.
- HUGGET, J., DHEDA, K., BUSTIN, S., ZUMLA, A. (2005). Real-time RT-PCR normalization; strategies and considerations. *Genes Immun.* **6(4)**:279-284.

- HUGHES, L.E., KERSHAW, G.F. (1959). "B" or Border disease, an undescribed disease of sheep. *Veterinary Record*. **71**: 313–317.
- HULST, M.M., MOORMAN, R.J.M. (1997). Inhibition of Pestivirus infection in cell culture by envelope proteins Erns and E2 of classical swine fever virus: Erns and E2 interact with different receptors. *J Gen Virol* **78**:2779–2787.
- IMAKAWA, K., ANTHONY, R.V., KAZEMI, M., MAROTTI, K.R., POLITES, H.G., ROBERTS, R.M., (1987). Interferon-like sequence of ovine trophoblast protein secreted by embryonic trophoblast. *Nature*.330(6146):377-9.
- IMAKAWA, K., HANSEN, T.R., MALATHY, P.V., ANTHONY, R.V., POLITES, H.G., MAROTTI, K.R., ROBERTS, R.M., (1989). Molecular cloning and characterization of complementary deoxyribonucleic acids corresponding to bovine trophoblast protein-1: a comparison with ovine trophoblast protein-1 and bovine interferon- α_{II} . *Mol. Endocrinol.* 3:127-139.
- IQBAL, M., MCCAULEY, J.W. (2002). Identification of the glycosaminoglycan-binding site on the glycoprotein E(rns) of bovine viral diarrhoea virus by site-directed mutagenesis. *J Gen Virol* **83**:2153–2159.
- IQBAL, M., POOLE, E., GOODBURN, S., MCCAULEY, J.W. (2004). Role for bovine viral diarrhoea virus Erns glycoprotein in the control of activation of beta interferon by double-stranded RNA. *J. Virol.* **78**:136-145.
- JACOBS, B. L., LANGLAND, J. O. (1996) When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA. *Virology*. **219**:339–349.
- JOHANSSON, K., BOURHIS, J. M., CAMPANACCI, V., CABBILLAU, C., CANARD, B., LONGHI, S. (2003). Crystal structure of the measles virus phosphoprotein domain responsible for the induced folding of the C-terminal domain of the nucleoprotein. *J Biol Chem* **278(45)**:44567–44573.
- KAPIL, S., WALZ, P.H., WILKERSON, M., MINOCHA, H.C. (2005). Immunity and immunosuppression. In: Bovine Viral Diarrhoea Virus e Diagnosis, Management and Control, SM Goyal, JF Ridpath, Eds., Blackwell Publishing, Ames, pp. 157-170.J.
- KARAMI, A., ALAVIAN, S.M., NAJAFI, A., HOSSEINI, M. (2006). Molecular aspects of Hepatocellular Carcinoma Caused by Hepatitis C Virus. *Hepatitis Monthly*. 6(2):75-82.
- KEITA, D., SERVAN DE ALMEIDA, R., LIBEAU, G., ALBINA, E. (2008) Identification and mapping of a region on the mRNA of Morbillivirus nucleoprotein susceptible to RNA interference. *Antiviral Res* **80(2)**:158–167
- KENNEDY, S., SMYTH, J.A., CUSH, P.F., DUIGNAN, P., PLATTEN, M., MCCULLOUGH, S. J., ALLAN, G. M. (1989) Histopathologic and immunocytochemical studies of distemper in seals. *Vet Pathol* **26(2)**:97–103.
- KIM, S., CHOI, Y., SPENCER, T.E., BAZER, F.W. (2003). Effects of the estrous cycle, pregnancy and interferon tau on expression of cyclooxygenase two (COX-2) in ovine endometrium. *Reproductive Biology and Endocrinology*. **1**:58, 1-9.
- KINGSTON, R. L., BAASE, W. A., GAY, L.S. (2004) Characterization of nucleocapsid binding by the measles virus and mumps virus phosphoproteins. *J Virol* **78(16)**:8630–8640
- KITCHING, R. P. (1988). The economic significance and control of small ruminant viruses in North Africa and West Asia. In *Increasing small ruminant productivity in semi-arid areas*, pp. 225–236. Kluwer Academic Publishers-Dordrecht.
- KLEMANN, S.W., LI, J.Z., IMAKAWA, K., CROSS, J.C., FRANCIS, H., ROBERTS, R.M. (1990). The production, purification, and bioactivity of recombinant bovine trophoblast protein-1 (bovine trophoblast interferon). *Mol Endocrinol.* **4(10)**:1506-14.
- KOHARA, J., NISHIKURA, Y., KONNAI, S., TAJIMA, M., ONUMA, M. (2012). Effects of interferon- τ on cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Japanese Journal of Veterinary Research*. **60(2&3)**: 63-70.
- KOLAKOSKY, D., PELET, T., GARCIN, D., HAUSMANN, S., CURRAN, J., ROUX, L. (1998). Paramyxovirus RNA synthesis and the requirement for hexamer genome length: the rule of six revisited. *J Virol* **72(2)**:891–899.
- KOLAKOSKY, D., LE MERCIER, P., ISENI, F., GARCIN, D. (2004) Viral DNA polymerase scanning and the gymnastics of Sendai virus RNA synthesis. *Virology* **318**:463–73.
- KOZAK, M. (1986). Regulation of protein synthesis in virus-infected animal cells. *Adv Virus Res.* 31:229–292.

- KUL, O., KABAKCI, N., ATMACA, H. T. OZKUL, A. (2007). Natural peste des petits ruminants virus infection: novel pathologic findings resembling other morbillivirus infections. *Vet Pathol* **44**: 479–486.
- KUL, O., KABAKCI, N., OZKUL, A., KALENDER, H., ATMACA, H.T. (2008). Concurrent Peste des Petits Ruminants Virus and Pestivirus Infection in Stillborn Twin Lambs. *Vet Pathol.*, **45**:191-196.
- KUMAR, A., SINGH, S. V., RANA, R., VAID. R. K., MISRI, J., VS, V. (2001). PPR outbreak in goats: Epidemiological and therapeutic studies. *Indian J Anim Sci* **71**:815–818
- KUMMERER, B.M., TAUTZ, N., BECHER, P., THIEL, H., MEYERS, G. (2000). The Genetic Basis for Cytopathogenicity of Pestiviruses. *Veterinary Microbiology*. **77**:117-128.
- LACKNER, T., MULLER, A., PANKRAZ, A., BECHER, P., THIEL, H.J., GORBALENYA, A.E., TAUTZ, N. (2004). Temporal modulation of an autoprotease is crucial for replication and pathogenicity of an RNA virus. *J Virol*. **78**:10765-75.
- LAINE, D., TRESCOL-BIEMONT, M.C. (2003) Measles virus (MV) nucleoprotein binds to a novel cell surface receptor distinct from FcγRII via its C-terminal domain: role in MV-induced immunosuppression. *J. Virol.* **77** (21): 11332–46.
- LAMB, A., KOLAKOFSKY, D. (2001) Paramyxoviridae: the viruses and their replication. Fields virology, 4th edn. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
- LANDIM JR, L. P., MIGLINO, M. A., PFARRER, C., AMBROSIO, C. E., GARCIA, J. M. (2007). Culture of mature trophoblastic giant cells from bovine placentomes. *Animal Reproduction Science*. **98**:357-364.
- LARINOV, A., KRAUSE, A., MILLER, W. (2005). A standart curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics*. **6**: 62-77
- LEFEVRE, F., BOULAY, V. (1993). A novel and atypical type one interferon gene expressed by trophoblast during early pregnancy. *J. Biol. Chem.* **268**(26):19760-8.
- LEFEVRE, P.C, DIALLO, A. (1990). Peste des Petits Ruminants. *Rev. Sci. Tech.* **9**(4):935-981.
- LI, Y., MCNALLY, J. (2001). Characterization of RNA synthesis and translation of bovine viral diarrhoea virus (BVDV). *Virus Genes* **23**:149–155.
- LIANG, D., SAINZ, I.F., ANSARI, I.H. (2003). The envelope glycoprotein E2 is a determinant of cell culture tropism in ruminant Pestiviruses. *J Gen Virol* **84**:1269–1274.
- LINDENBACH, B., RICE, C. (2001). Flaviviridae: The viruses and their replication. In: *Field's Virology*, 4th ed. pp. 991–1042. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
- LINDENBACH, B. D., THIEL, H.-J., RICE, C. M. (2007). *Flaviviridae*: the viruses and their replication, in: Knipe D.M., Howley P.M. (Eds.), *Fields Virology*, 5th ed., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. pp. 1101–1152
- LIU, L., KAMPA, J., BELAK, S., BAULE, C. (2009). Virus recovery and full-length sequence analysis of atypical bovine Pestivirus Th/04_KhonKaen. *Vet. Microbiol.* **138**:62–68.
- LOKEN, T., BJERKAS, I. (1991). Experimental Pestivirus infections in pregnant goats. *J Comp Pathol* **105**:123-140
- LOKEN, T. (1995). Ruminant Pestivirus infections in animals other than cattle and sheep. *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice.* **11**:597-614
- LONGHI, S., RECEVEUR-BRECHOT, V., KARLIN, D., JOHANSSON, K., DARBON, H., BHELLA, D., YEO, R., FINET, S., CANARD, B. (2003) The C-terminal domain of the measles virus nucleoprotein is intrinsically disordered and folds upon binding to the C-terminal moiety of the phosphoprotein. *J. Biol. Chem.* **278**, 18638–48.
- MAGKOURAS, I., MÄTZENER, P., RÜMENAPF, T., PETERHANS, E., SCHWEIZER, M. (2008). RNase-dependent inhibition of extracellular, but not intracellular, dsRNA-induced interferon synthesis by Erns of Pestiviruses. *J Gen Virol.* **89**:2501-2506.
- MAHAPATRA, M., PARIDA, S., EGZIABHER, B.G., DIALLO, A., BARRETT, T. (2003) Sequence analysis of the phosphoprotein gene of peste des petits ruminants (PPR) virus: editing of the gene transcript. *Virus Res.* **96**: 85–98.
- MAHAPATRA, M., PARIDA, S., BARON, M. D., BARRETT, T. (2006) Matrix protein and glycoproteins F and H of Peste-des-petits-ruminants virus function better as a homologous complex. *J Gen Virol* **87**(7):2021–2029
- MALIK, Y. S., SINGH, D., CHANDRASHEKAR, K. M., SHUKLA, S., SHARMA, K., VAID, N., CHAKRAVARTI, S. (2011). Occurrence of Dual Infection of Peste-Des-Petits-Ruminants and Goatpox in Indigenous Goats of Central India. *Transboundary and Emerging Diseases*. **58**:268-273.

- MARTAL, J., LACROIX, M.C., LOUDES, C., SAUNIER, M., WINTENBERGER-TORRES, S. (1979). Trophoblastin, an antiluteolytic protein present in early pregnancy in sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*. **56**:63–73.
- MATZENER, P., MAGKOURAS, I., RÜMENAPF, T., PETERHANS, E., SCHWEIZER, M. (2009). The viral RNase E(rns) prevents IFN type-I triggering by pestiviral single- and double-stranded RNAs. *Virus Res.* **140**:15-23.
- MEYERS, G., TAUTZ, N., STARK, R., BROWNLIE, J., DUBOVI, E.J., COLLETT, M.S., THIEL, H.J. (1992). Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic Pestiviruses. *Virology*. **191**:368-86.
- MEYERS, G., DIALLO, A. (1995) The nucleotide sequence of the fusion protein gene of the peste des petits ruminants virus: the long untranslated region in the 50-end of the F-protein gene of morbilliviruses seems to be specific to each virus. *Virus Res* **37**(1):23–35
- MEYERS, G., THIEL, H.-J. (1996). Molecular characterization of Pestiviruses, *Adv. Virus. Res.* **47**:53–118
- MEYERS, G., STOLL, D., GUNN, M. (1998). Insertion of a sequence encoding light chain 3 of microtubule-associated proteins 1A ve 1B in a Pestivirus genome: connection with virus cytopathogenicity and induction of lethal disease in cattle. *J. Virol.* **71**:4139-4148.
- MEYERS, G., EGE, A., FETZER, C., VON FREYBURG, M., ELBERS, K., CARR, V. (2007). Bovine viral diarrhoea virus: prevention of persistent fetal infection by a combination of two mutations affecting Erns RNase and N pro protease. *J Virol.* **81**:3327-38.
- MOENNIG, V., FREY, H.R., LIEBLER, E., POLENZ, P., LIESS, B. (1990). Reproduction of mucosal disease with cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus selected in vitro. *Vet Rec.* **127**:200-203.
- MOENNIG, V., LIESS, B. (1995). Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* **11**:477–487.
- MOERMAN, A., STRAVER, P.J., DE JONG, M.C.M. (1993). A long term epidemiological study of bovine viral diarrhoea infections in a large herd of dairy cattle. *Vet Rec* **132**:622–626.
- MOLL, M., KLENK, H. D., MAISNER, A. (2002) Importance of the cytoplasmic tails of the measles virus glycoproteins for fusogenic activity and the generation of recombinant measles viruses. *J Virol.* **76**(14):7174–7186
- MUHAMMAD, M., SIAMAK, Z., MIKAEL, B. (2013). Molecular Biology and Pathogenesis of Peste des Petits Ruminants Virus. Springer Heidelberg New York Dordrecht London.
- MULLER, U., STEINHOFF, U., REIS, L.F., HEMMI, S., PAVLOVIC, J., ZINKERNAGEL, R. M. AGUET, M. (1994). Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science.* **264**:1918-1921.
- MUTHUCHELVAN, D., SANYAL, A., SREENIVASA, B. P., SARAVANAN, P., DHAR, P., SINGH, R. P., SINGH, R K., BANDYOPADHYAY, S. K. (2006) Analysis of the matrix protein gene sequence of the Asian lineage of peste-des-petits ruminants vaccine virus. *Vet Microbiol* **113**(1–2):83–87
- NANDA, S. K., BARON, M. D. (2006). Rinderpest virus blocks type I and type II interferon action: role of structural and nonstructural proteins. *J Virol* **80**: 7555–7568.
- NEPHEW, K. P., WHALEY, A. E., CHRISTENSON, R. K., IMAKAWA, K. (1993). Differential expression of distinct mRNAs for ovine trophoblast protein-I and related sheep type I interferons. *Biol. Reprod.* **48**:768-778.
- NETTLETON, P. F., ENTRICAN, G. (1995). Ruminant Pestiviruses. *Br Vet J.* **151**(6):615-42.
- NISKANEN, R., LINDBERG, A., LARSSON, B., ALENIUS, S. (2000). Lack of virus transmission from bovine viral diarrhoeavirus infected calves to susceptible peers. *Acta Vet Scand* **41**:93–99.
- NISKANEN, R., LINDBERG, A., TRAVEN, M. (2002). Failure to Spread Bovine Virus Infecton from Primarily Infected Calves Despite Concurrent Infection with Bovine Coronavirus. *The Veterinary Journal.* **163** (3):251-259
- ODEON, A.C., KELLING, C.L., MARSHALL, D.J., ESTELA, E.S., DUBOVI, E.J., DONIS, R.O. (1999). Experimental infection of calves with bovine viral diarrhoea virus genotype II. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* **11**:221-228.
- OHNO, S., ONO, N., TAKEDA, M., TAKEUCHI, K., YANAGI, Y. (2004). Dissection of measles virus V protein in relation to its ability to block alpha/beta interferon signal transduction. *J Gen Virol.* **85**:2991-2999.
- OLAFSON, P., MACCALLUM, A.D., FOX, F.H. (1946). An apparently new transmissible disease of cattle, *Cornell Vet.* **36**:205–213.

- OLCHOWY, T.W.J., SLAUSON, D.O., BOSCHSLER, P.N. (1997). Induction of procoagulant activity in virus infected bovine alveolar macrophages and the effect of lipopolysaccharide. *Vet Immunol Immunopath.* **58**:27–37.
- OGUZOGLU, T.C., MUZ, D., YILMAZ, V., ALKAN, F., AKÇA, Y., BURGU, I. (2010). Molecular Characterization of Bovine Viral Diarrhoea Virus Species 2 (BVDV-2) from cattle in Turkey. *Trop.Anim.Health Prod.* **42**:1175-1180.
- OGUZOGLU, T.C. (2012). A review of Border Disease Virus Infection in Ruminants. Molecular Characterization, Pathogenesis, Diagnosis and Control. *Animal Health, Prod. and Hyg.* **1**:1-9.
- OZKUL, A., AKÇA, Y., ALKAN, F., BARRETT, T., KARAOGLU, T., DAGALP, S. B., ANDERSON, J., YESILBAG, K., COKCALISKAN, C. (2002). Prevalence, distribution, and host range of Peste des petits ruminants virus, Turkey. *Emerg Infect Dis.* **8**:708–712.
- PALOSAARI, H., PARISIEN, J.P., RODRIGUEZ, J.J., ULANE, C.M., HORVATH, C.M. (2003). STAT Protein Interference and Suppression of Cytokine Signal Transduction by Measles Virus V Protein. *J Virol.* **77**: 7635–7644.
- PATON, D. J., SIMPSON, V., DONE, S. H. (1992). Infection of pigs and cattle with bovine viral diarrhoea virus on a farm in England. *Veterinary Record.* **131**:185-188.
- PAWAR, R. M., RAJ, G. D., KUMAR, T. M., RAJA, A., BALACHANDRAN, C. (2008) Effect of siRNA mediated suppression of signaling lymphocyte activation molecule on replication of peste des petits ruminants virus in vitro. *Virus Res* **136(1–2)**:118–123.
- PEEPLER, M. E. (1991) Paramyxovirus M proteins: pulling it all together and taking it on the road. In: David W. Kingsbury (ed.), *The Paramyxoviruses*. New York: Plenum Press, pp. 427–456.
- PEIRSON, S.N., BUTLER, J.N., FOSTER, R.G. (2003). Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Res.* **31(14)**:e73.
- PELLERIN, C., VAN DEN HURK, J., LECOMTE, J., TUSSEN, P. (1994). Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology* **203**:260-268.
- PETERHANS, E., JUNGI, T.W., SCHWEIZER, M. (2002). BVD virus and innate immunity. *Biologicals.* **31**:107–112.
- PETERHANS, E., JUNGI, T.W., SCHWEIZER, M. (2003). BVDV and innate immunity. *Biologicals* **31**:107-111.
- PETERHANS, E., BACHOVEN, C., STALDER, H., SCHWEISER, M. (2010). Cytopathic bovine viral diarrhoea viruses (BVDV): emerging Pestiviruses doomed to extinction. *Vet Res.* **41(6)**:44.
- PIEN, G.C., SATOSKAR, A.R., TAKEDA, K., AKIRA, S., BIRON, C.A. (2000). Cutting edge: selective IL-18 requirements for induction of compartmental IFN-gamma response during viral infection. *J. Immunol.* **165**: 4787-4791.
- PFÄFFL, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**,9 e45.
- PLEMPER, R.K., HAMMOND, A.L., CATTANEO, R. (2001) Measles virus envelope glycoproteins heterooligomerize in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **276(47)**:44239–44246
- PLETNEV, A., GOULD, E., HEINZ, F. X., MEYERS, G., THIEL, H-J., BUKH, J., STIASNY, K., COLLETT, M.S., BECHER, P., SIMMONDS, P., RICE, C. M., MONATH, P. (2011). Flaviviridae. In *Virus Taxonomy*. 9th edition. Edited by King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. Oxford: Academic Press; 1003-1020.
- POLLAKOVA, J., CSANK, T., PILIPCINCOVA, I., PISTL, J. (2009). Comparative study of various cell lines susceptibility to cytopathic and non- cytopathic strains of Bovine viral diarrhoea virus 1 and 2. *Acta Virologica.* **52**:287-289
- PONTZER, C.H., TORRES, B.A., VALLET, J.L., BAZER, F.W., JOHNSON, H.M. (1988). Antiviral activity of the pregnancy recognition hormone ovine trophoblast protein-1. *Biochem Biophys Res Commun.* **29**;152(2):801-807.
- PONTZER, C.H., OTT, T.L., BAZER, F.W., JOHNSON, H.M. (1990). Localization of an antiviral site on the pregnancy recognition hormone, ovine trophoblast protein 1. *Proc Natl Acad Sci USA.* **87**: 5945–5949.
- PONTZER, C.H., BAZER, F.W., JOHNSON, H.M. (1991). Antiproliferative activity of a pregnancy recognition hormone, ovine trophoblast protein-1. *Cancer Res.* **51(19)**:5304-7.

- POTGIETER, L.N.D., MCCRACKEN, M.D., HOPVINS, F.M. (1984). Experimental production of bovine respiratory tract disease with bovine viral diarrhoea virus. *Am. J. Vet. Res.* **45**:1582–1585.
- POTGIETER, L.N.D. (1995). Immunology of bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* **11**:501–520.
- POTGIETER, L.N.D. (1997) Bovine respiratory tract disease caused by bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* **13**:471–481.
- RAHAMAN, A., SRINIVASAN, N., SHAMALA, N., SHAILA, M. S. (2004) Phosphoprotein of the rinderpest virus forms a tetramer through a coiled coil region important for biological function.. A structural insight. *J Biol Chem* **279(22)**:23606–23614
- RAJAK, K. K., SREENIVASA, B. P., HOSAMANI, M., SINGH, R. P., SINGH, S. K., SINGH, R. K., BANDYOPADHYAY, S. K. (2005) Experimental studies on immunosuppressive effects of peste des petits ruminants (PPR) virus in goats. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **28(4)**:287–296.
- RAMACHANDRAN, A., PARISIEN, J.P., HORVATH, C.M. (2008). STAT2 Is a Primary Target for Measles Virus V Protein-Mediated Alpha/Beta Interferon Signalling Inhibition. *J Virol.* **82**: 8330–8338.
- RASMUSSEN, T.B., REIMANN, I., UTTENTHAL, A., LEIFER, I., DEPNER, K., SCHIRRMEIER, H., BEER, M. (2010). Generation of recombinant Pestiviruses using a full-genome amplification strategy. *Veterinary Microbiology.* **142**:13-17
- REISCHL, U., KOCHANOWSKI, B. (1995). Quantative PCR. A survey of the present technology. *Mol. Biotechnol.* **3(1)**: 55-71.
- RIDPATH, J.F., BOLIN, S.R., DUBOVI, E.J. (1994). Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology.* **205**: 66-74
- RIDPATH, J.F., BOLIN, S.R. 1997. Comparison of the complete genomic sequence of the border disease virus, BD31, to other Pestiviruses. *Virus Res* **50**:237–243.
- RIDPATH, J.F., NEILL, J.D., FREY, M., LANDGRAF, J.G. (2000). Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. *Veterinary Microbiology* **77**: 145-155.
- RIDPATH, J.F. (2003). BVDV genotypes and biotypes: Practical implications for diagnosis and control. *Biologicals.* **31**:127–131.
- ROEDER, P.L., EDWARDS, S. (1983). Attempted Reactivation of Latent Bovine Herpesvirus 1 Infection in Calves By Infection with Ruminant Pestiviruses. *Vet. Microbiol.* **8(6)**:563-569.
- ROEDER, P. L., DREW, T. W. (1984). Mucosal disease of cattle: a late sequel to fetal infection. *Veterinary Record.* **114**: 309-313.
- ROEDER, P. L., ABRAHAM, G., KENFE, G., BARRETT, T. (1994) PPR in Ethiopian goats. *Trop Anim Health Prod* **26**:69–73.
- ROMELO, G., FIORUCCI, G., ROSSI, G.B. (1989). Interferons in cell growth and development. *Trends in genetics.* **5**:19-24.
- RUBENSTEIN, M., ORCHANSKY, R. (1986). The interferon receptors. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* **21(3)**:249-275.
- RUMENAPF, T., UNGER, G., STRAUSS, J.H., THIEL, H.J. (1993). Processing of the envelope glycoproteins of Pestiviruses. *J Virol.* **67**:3288–3294.
- SALAZAR-MATHER, T.P., HAMILTON, T.A., BIRON, C.A. (2000). A chemokine-to-cytokine cascade critical in antiviral defense. *J. Clin. Invest.* **105**: 985-993.
- SAMUEL, C. E. (1991) Antiviral actions of interferon. Interferon-regulated cellular proteins and their surprisingly selective antiviral activities. *Virology.* **183**:1–11.
- SAMUEL, C.E. (2001). Antiviral Actions of Interferons. *Clin. Microbiol.* **4**:778-809.
- SCHIRRMEIER, H., DEPNER, K., STREBELOW, G., BUETTNER, M. (1999). Border disease antibodies in German pig herds. In: Report of the Annual Meeting of National Swine Fever Laboratories, Ploufragan. Commission of the European Community, Brussels, pp. 60–62
- SCHNEIDER, R., UNGER, G., STARK, R. (1993). Identification of a structural glycoprotein of an RNA virus as a ribonuclease. *Science.* **261**:1169–1171.
- SCHRODER, K., HERTZOG, P. J., RAVASI, T., HUME, D. A. (2004). Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology.* **75**:163-189.

- SCHWEIZER, M., PETERHANS, E. (2001). Noncytopathic Bovine Viral Diarrhoea Virus Inhibits Double-Stranded RNA-Induced Apoptosis and Interferon Synthesis. *Journal of Virology* **75**: 4692-4698.
- SCHWEIZER, M., MATZENER, P., PFAFFEN, G., STALDER, H., PETERHANS, E. (2006). "Self" and "nonself" manipulation of interferon defense during persistent infection: bovine viral diarrhoea virus resists alpha/beta interferon without blocking antiviral activity against unrelated viruses replicating in its host cells. *J Virol.* **80**:6926-6935.
- SEN, G.C., LENGYEL, P. (1992). The interferon system. A bird's eye view of its biochemistry. *J Biol Chem.* **267**(8):5017-20.
- SEN, G. C. (2001) Viruses and interferons. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**: 255–281.
- SERVAN DE ALMEIDA, R., KEITA, D., LIBEAU, G., ALBINA, E. (2007) Control of ruminant morbillivirus replication by small interfering RNA. *J Gen Virol* **88**(8):2307–2311.
- SETH, S., SHAILA, M. S. (2001) The hemagglutinin-neuraminidase protein of peste des petits ruminants virus is biologically active when transiently expressed in mammalian cells. *Virus Res* **75**(2):169–177.
- SHAILA, M. S., SHAMAKI, D., FORSYTH, M. A., DIALLO, A., GOATLEY, L., KITCHING, R. P. & BARRETT, T. (1996). Geographic distribution and epidemiology of peste des petits ruminants virus. *Virus Res.* **43**:149–153.
- SHEPARD, C. W., FINELLI, L., ALTER, M. (2005). Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect. Dis.* **5**:558–567.
- SHOEMAKER M.L., SMIRNOVA N.P., BIELEFELDT-OHMANN H., AUSTIN K.J., VAN OLPHEN A., CLAPPER J.A., HANSEN T.R. (2009) Differential expression of the type I interferon pathway during persistent and transient bovine viral diarrhoea virus infection, *J. Interferon Cytokine Res.* **29**:23–35.
- SINGH, R. P., SARAVANAN, P., SREENIVASA, B. P., SINGH R. K., BANDYOPADHYAY, S. K. (2004). Prevalence and distribution of peste des petits ruminants virus infection in small ruminants in India. *Rev Sci Tech* **23**(3):807–819.
- SMIRNOVA, N.P., BIELEFELDT-OHMANN, H., VAN CAMPEN, H., AUSTIN, K.J., HAN, H., MONTGOMERY, D.L., SHOEMAKER, M.L., VAN OLPHEN, A.L., HANSEN, T.R. (2008). Acute non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus infection induces pronounced type I interferon response in pregnant cows and fetuses. *Virus Res.* **132**:49-58.
- SOPP, P., HOOPER, L.B., CLARKE, M.C. (1994), Detection of bovine viral diarrhoea virus p80 protein in subpopulations of bovine leukocytes. *J Gen Virol.* **75**:1189–1194.
- SREENIVASA, B.P., SINGH, R.P., MONDAL, B., DHAR, P., BANDYOPADHYAY, S.K. (2006). Marmoset B95 Cells: A sensitive System for Cultivation of Peste des Petits Ruminants Virus. *Veterinary Research Communications.* **30**:103-108.
- SPIELKI, F.R., SILVA, T.C., ESTEVES, P.A., TEIXEIRA, M.B., BATISTA, H.B.C.R., CHIMINAZZO, C., DRIEMEIER D., FRANCO, A.C., ROEHE, P.M. (2006). Co-infections with bovine herpes virus type 5 and bovine viral diarrhoea virus. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia.* **58**:699-707.
- SPSS19, IBM Enterprise, Agosto 2010.
- STARK, R., MEYERS, G., RUMENAPF, T., THIEL, H.J. (1993). Processing of Pestivirus polyprotein: Cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus. *J Virol* **67**:7088–7095.
- STARK, G.R., KERR, I. M., WILLIAMS, B. R., SILVERMAN, R. H., SCHREIBER, R. D. (1998) How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.* **67**:227–264.
- STEFFENS, S., THIEL, H.J., BEHRENS, S.E. (1999). The RNA-dependent RNA polymerases of different members of the family Flaviviridae exhibit similar properties in vitro. *J Gen Virol.* **80**:2583-90.
- SUMMARY OF PLEIOTROPIC ACTIVITY OF INTERFERON GAMMA (IFN- γ). <http://www.immunoweb.com/images/15/15-15.htm>. Erişim tarihi: 2.6.2014.
- SWASDIPAN, S., BIELEFELDT-OHMANN, H., PHILLIPS, N., KIRKLAND, P. D., MCGOWAN, M. R. (2001). Rapid Transplacental Infection with Bovine Pestivirus Following Intranasal Inoculation of Ewes in Early Pregnancy. *Veterinary Pathology.* **38**: 275-280.
- TAKEUCHI, K., KADOTA, S.I., TAKEDA, M., MIYAJIMA, N., NAGATA, K. (2003) Measles virus V protein blocks interferon (IFN)-alpha/beta but not IFN-gamma signaling by inhibiting STAT1 and STAT2 phosphorylation. *FEBS Lett.* **545**:177-82.

- TAUTZ, N., ELBERS, K., STOLL, D. (1997a). Serine protease of Pestiviruses: Determination of cleavage sites. *J Virol* **71**:5415–5422.
- TAUTZ, N., MEYERS, G., STOLL, D. (1997b). Processing of poly-ubiquitin in the polyprotein of an RNA virus. *Virology*. **197**:74-85.
- TENOEVER, B. R., SERVANT, M. J., GRANDVAUX, N., LIN, R., HISCOTT, J. (2002). Recognition of the measles virus nucleocapsid as a mechanism of IRF-3 activation. *J. Virol.* **76**: 3659–69.
- THELLIN, O., ZORZI, W., LAKAYE, B., DE BORMAN, B., COUMANS, B., HENNEN, G., GRISAR, T., IGOUT, A., HEINEN, E. (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J. Biotechnol.* **75**(2-3):291-295.
- THOREAU, E., PETRIDOU, B., KELLY, P. A., DJIANE, J., MORNON, J. P. (1991). Structural symmetry of the extracellular domain of the cytokine/growth hormone/prolactin receptor family and interferon receptors revealed by hydrophobic cluster analysis. *FEBS Lett.* **282**: 26–31.
- TOBER, C., SEUFERT, M., SCHNEIDER, H., BILLETER, M. A., JOHNSTON, I.C., NIEWIESK, S., TER MEULEN, V., SCHNEIDER-SCHAULIES, S. (1998). Expression of measles virus V protein is associated with pathogenicity and control of viral RNA synthesis. *J Virol.* **72**(10):8124–8132
- TOPLU, N. (2004). Characteristic and non-characteristic pathological findings in peste des petits ruminants (PPR) of sheep in the Ege district of Turkey. *J Comp Pathol* **131**:135–141.
- TOPLU, N., OĞUZOĞLU, T.Ç., ALBAYRAK, H. (2012). Dual Infection of Fetal and Neonatal Small Ruminants with Border Disease Virus and Peste des Petits Ruminants Virus (PPRV): Neuronal Tropism of PPRV as a Novel Finding. *J. Comp. Path.* **146**:289-297.
- TRATSCHIN, J.D., MOSER, C., RUGGLI, N., HOFMANN, M.A. (1998). Classical swine fever virus leader proteinase N pro is not required for viral replication in cell culture. *J Virol.* **72**:7681-4.
- TUFAN, M. (2006). Animal health authorities and transboundary animal diseases in Turkey. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **53**(1): 35–37.
- WANER, J.L. (1994). Mixed Viral Infections; Detection and Management. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**(2):143-151
- WANG, Z., BAO, J., WU, X., LIU, Y., LI, L., LIU, C., SUO, L., XIE, Z., ZHAO, W., ZHANG, W., YANG, N., LI, J., WANG, S., WANG, J. (2009). Peste des petits ruminants virus in Tibet, China. *Emerg Infect Dis* **15**(2):299–301
- WARRENER, P., COLLETT, M.S. (1995). Pestivirus NS3 (p80) protein possesses RNA helicase activity. *J Virol.* **69**:1720–1726.
- WARRILOW, D., LOTT, W.B., GREIVE, S. (2000). Properties of the bovine diarrhoea virus replicase in extracts of infected MDBK cells. *Arch Virol* **145**: 2163–2171.
- WATANABE, M., HIRANO, A., STENGLEIN, S., NELSON, J., THOMAS, G., WONG, T. C. (1995). Engineered serine protease inhibitor prevents furin-catalyzed activation of the fusion glycoprotein and production of infectious measles virus. *J Virol* **69**(5):3206–3210.
- WEILAND, E., STARK, R., HAAS, B. (1990). Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer. *J Virol* **64**:3563–3569.
- WEISSMANN, C., WEBER, H. (1986). The interferon genes. *In Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology.* **33**:251-300.
- WELSH, M.D., ADAIR, B.M. (1995). Prostaglandin E2 production by bovine virus diarrhoea virus infected cell culture and monocytes. In: Immunobiology of viral infections: *Proc. 3rd Congress of the European Society of Veterinary Virology*, Interlaken, Switzerland, pp. 63–6.
- WONG, M.L., MEDRANO, M.G. (2005). Real Time PCR for RNA quantitation. *Biotechniques.* **22**(1): 130-138.
- VAN CAMPEN, H., VORPAHL, P., HUZURBAZAR, S. (2000). Evidence for bovine viral diarrhoea virus type 2 (BVDV)-associated disease in beef herds vaccinated with a modified-live type 1 BVDV vaccine. *J. Vet. Diagn. Invest.* **12**:263–265.
- VANDESOMPELE, J., DE PRETER, K., PATTYN, F., POPPE, B., VAN ROY, N., DE PAEPE, A., SPELEMAN, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**(7):
- VARSANYI, T. M., UTTER, G., NORRBY, E. (1984). Purification, morphology and antigenic characterization of measles virus envelope components. *J Gen Virol* **65**(2):355–366

- VILCEK, S. (1994). Development of PCR tests for the detection of bovine herpesvirus-1, bovine respiratory syncytial viruses and Pestiviruses. *Vet Med* **39**:687–700.
- VOGES, H., HORNER, G.W., ROWE, S., WELLENBERG, G.J. (1998). Persistent bovine Pestivirus infection localized in the testes of an immuno-competent, non-viraemic bull. *Vet Microbiol* **61**:165–175
- YARIM, M., KABAKCI, N. (2003). The comparison of histo-pathological and immunohistochemical findings in natural canine distemper virus infection. *Folia Veterinaria*. **47(2)**:86–90
- YESILBAG, K., YILMAZ, Z., GOLCU, E., OZKUL, A. (2005) Peste des petits ruminants outbreak in western Turkey. *Vet Rec* **157(9)**:260–261
- YESILBAG, K., GUNGOR, B. (2008). Seroprevalence of bovine respiratory viruses in North-Western Turkey. *Tropical Animal Health and Production*. **40(1)**:55-60
- YILMAZ, H., ALTAN, E., RIDPATH, J., TURAN, N. (2012). Genetic diversity and frequency of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) detected in cattle in Turkey. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. **35(5)**:411-416
- YONEDA, M., BANDYOPADHYAY, S. K., SHIOTANI, M., FUJITA, K., NUNTAPRASERT, A., MIURA, R., BARON, M. D, BARRETT, T., KAI, C. (2002). Rinderpest virus H protein: role in determining host range in rabbits. *J Gen Virol* **83(6)**:1457–1463
- YONEDA, M., MIURA, R., BARRETT, T., TSUKIYAMA-KOHARA, K., KAI, C. (2004). Rinderpest virus phosphoprotein gene is a major determinant of species-specific pathogenicity. *J Virol* **78(12)**:6676–6681.
- YOUNG, D.F., DIDCOCK, L., GOBOURN, S., RANDALL, R.E. (2000) *Paramyxoviridae* use distinct virus-specific mechanisms to circumvent the interferon response. *Virology*. **269**:383-390.
- YU, H., GRASSMANN, C.W., BEHRENS, S.E. (1999). Sequence and structural elements at the 3' terminus of bovine viral diarrhoea virus genomic RNA: Functional role during RNA replication. *J Virol*. **73**:3638–3648.
- YU, H., ISKEN, O., GRASSMANN, C.W., BEHRENS, S.E. (2000). A stem-loop motif formed by the immediate 5' terminus of the bovine viral diarrhoea virus genome modulates translation as well as replication of the viral RNA. *J Virol*. **74**:5825–5835.
- ZHANG, X., GLENDENING, C., LINKE, H., PARKS, C. L., BROOKS, C., UDEM, S. A. OGLESBEE, M. (2002) Identification and characterization of a regulatory domain on the carboxyl terminus of the measles virus nucleocapsid protein. *J. Virol*. **76**: 8737–46.
- ZHANG, G., FLICK-SMITH, H., MCCAULEY, J.W. (2003). Differences in membrane association and sub-cellular distribution between NS2-3 and NS3 of bovine viral diarrhoea virus. *Virus Res*. **97**:89–102.
- ZHANG, Y., WU, S., L, J., FENG, C., DENG, J., WANG, C., YUAN, X., ZHANG, T. LIN, X. (2013). Peste des Petits Ruminants virus exploits cellular autophagy machinery for replication. *Virology*. **437(1)**: 28-38.
- ZHONG, W., GUTSHALL, L., DEL VECCHIO, A.M. (1998). Identification and characterization of an RNAdependent RNA polymerase activity within the nonstructural protein 5B of bovine viral diarrhoea virus. *J Virol*. **72**:9365–9369.
- ZITZMANN, N., MEHTA, A.S., CARROUEE, S. (1999). Imino sugars inhibit the formation and secretion of bovine viral diarrhoea virus, a Pestivirus model of hepatitis C: implications for development of broadspectrum anti-hepatitis virus agents. *Proc. Natn. Acad. Sci*. **96**:11878–11882.

EKLER

EK-1 Çalışmada kullanılan bazı solüsyonların bileşimleri

PBS-M

Karışım	Bileşen	gr/lt.
A Karışımı	NaCl	8.0
	KCl	0.2
	Na ₂ HPO ₄ -12H ₂ O	2.37
	KH ₂ PO ₄	0.2
B Karışımı	Dekstroz	1.0
	Fenol Red	0.02

TRİS-ASETİK ASİT-EDTA (TAE 10X)

Bileşen	Miktar/lt
Tris base	24.2 gr
0,5M EDTA	10 ml
Asetik asit	5.71 ml

VERSEN-TRİPSİN

Karışım	Bileşen	gr/lt.
A Karışımı	NaCl	8.0
	KCl	0.2
	Na ₂ HPO ₄ -12H ₂ O	2.37
	KH ₂ PO ₄	0.2
B Karışımı	Titriplex III	1.0
C Karışımı	Tripsin	1.25

EK-2. Eş Zamanlı PCR İşlemi Sonuçlarının İstatistiksel Analizleri

SFT-R Hücre Hattına Virus İnokulasyonu Olmaksızın Gen İfadelerinin Analizleri

1. β -aktin

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	3588833,3333	3082384,48013	1779615,50935	-4068234,1959	11245900,8625	46500,00	5660000,00
2,00	3	2924000,0000	2185083,06478	1261558,29565	-2504047,2445	8352047,2445	402000,00	4250000,00
3,00	3	3807566,6667	3256515,43269	1880150,06168	-4282066,1286	11897199,4619	52700,00	5860000,00
4,00	3	3333000,0000	2501263,08093	1444104,91309	-2880481,9463	9546481,9463	449000,00	4910000,00
5,00	3	2553300,0000	2177495,04477	1257177,35026	-2855897,5579	7962497,5579	39900,00	3870000,00
6,00	3	3577000,0000	2664274,19760	1538219,42518	-3041424,0087	10195424,0087	501000,00	5160000,00
Total	18	3297283,3333	2292016,12643	540233,38186	2157490,5286	4437076,1381	39900,00	5860000,00

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3,353E12	5	6,707E11	,094	,992
Within Groups	8,595E13	12	7,163E12		
Total	8,931E13	17			

2. IFN γ

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	180000,0000	26627,05391	15373,13674	113854,7312	246145,2688	155000,00	208000,00
2,00	3	175666,6667	72472,98347	41842,29652	-4366,2047	355699,5380	111000,00	254000,00
3,00	3	208000,0000	9643,65076	5567,76436	184043,8435	231956,1565	201000,00	219000,00
4,00	3	184666,6667	30892,28598	17835,66963	107925,9741	261407,3593	149000,00	203000,00
5,00	3	258333,3333	28290,16319	16333,33333	188056,6721	328609,9946	227000,00	282000,00
6,00	3	371333,3333	90743,22748	52390,62681	145914,6599	596752,0068	277000,00	458000,00
Total	18	229666,6667	83451,99395	19669,82361	188166,9664	271166,3669	111000,00	458000,00

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8,631E10	5	1,726E10	6,455	,004
Within Groups	3,209E10	12	2,674E9		
Total	1,184E11	17			

3. OTP-1

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	2214000,0000	1638794,67902	946158,54908	-1856991,6640	6284991,6640	322000,00	3190000,00
2,00	3	1032000,0000	141953,93619	81957,14327	-249433,1262	455833,1262	16000,00	267000,00
3,00	3	5042000,0000	8450823,80600	4879085,39927	-15951010,1118	26035010,1118	113000,00	14800000,00
4,00	3	6974000,0000	11800471,68549	6813005,50418	-22339996,7304	36287996,7304	146000,00	20600000,00
5,00	3	767000,0000	1015981,79118	586577,36063	-1756838,6819	3290838,6819	164000,00	1940000,00
6,00	3	11180333,3333	18809783,42069	10859833,52133	-35545759,0119	57906425,6785	317000,00	32900000,00
Total	18	4380088,8889	9090301,62063	2142604,63966	-140411,7570	8900589,5348	16000,00	32900000,00

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2,683E14	5	5,367E13	,567	,724
Within Groups	1,136E15	12	9,470E13		
Total	1,405E15	17			

SFT-R Hücre Hattına BVDV İnokulasyonu Sonrası Gen İfadelerinin Analizleri

1. β -aktin

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	625666,6667	2907444,46780	1678613,84614	-965825,7806	13479159,1139	3010000,00	8620000,00
2,00	3	5023333,3333	285365,26301	164755,71142	4314446,7219	5732219,9448	4730000,00	5300000,00
3,00	3	3793333,3333	3740432,23884	2159539,55998	-5498415,4494	13085082,1161	1510000,00	8110000,00
4,00	3	4070000,0000	1480776,82316	854926,89746	391546,4509	7748453,5491	3000000,00	5760000,00
5,00	3	2803333,3333	991581,22881	572489,68938	340109,0086	5266557,6581	1700000,00	3620000,00
6,00	3	3796666,6667	664253,96750	383507,20694	2146568,3358	5446764,9975	3180000,00	4500000,00
Total	18	4290555,5556	2082813,34687	490923,81384	3254796,8456	5326314,2655	1510000,00	8620000,00

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2,146E13	5	4,293E12	,985	,466
Within Groups	5,229E13	12	4,357E12		
Total	7,375E13	17			

2. IFN γ

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	145666,6667	44410,95961	25640,67948	35343,7271	255989,6062	112000,00	196000,00
2,00	3	51166,6667	6634,25454	3830,28865	34686,2648	67647,0686	43900,00	56900,00
3,00	3	213333,3333	55175,47764	31855,57687	76269,8486	350396,8181	150000,00	251000,00
4,00	3	68133,3333	5604,75988	3235,90963	54210,3379	82056,3287	62400,00	73600,00
5,00	3	63966,6667	4178,91533	2412,69789	53585,6655	74347,6678	59400,00	67600,00
6,00	3	127333,3333	24006,94344	13860,41526	67696,7798	186969,8869	112000,00	155000,00
Total	18	111600,0000	64203,92145	15133,00941	79672,1410	143527,8590	43900,00	251000,00

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5,870E10	5	1,174E10	12,390	,000
Within Groups	1,137E10	12	9,476E8		
Total	7,008E10	17			

3. OTP-1

Descriptives

CALCULATED

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	142033,3333	67971,34200	39243,27260	-26816,8406	310883,5073	73100,00	209000,00
2,00	3	112600,0000	45769,85908	26425,24046	-1098,6330	226298,6330	59800,00	141000,00
3,00	3	95966,6667	17352,90562	10018,70473	52859,6594	139073,6739	85600,00	116000,00
4,00	3	103333,3333	5033,22296	2905,93263	90830,1144	115836,5523	98000,00	108000,00
5,00	3	91866,6667	8463,05697	4886,14822	70843,2677	112890,0657	82400,00	98700,00
6,00	3	59033,3333	14785,24039	8536,26252	22304,7601	95761,9066	46000,00	75100,00
Total	18	100805,5556	38914,48350	9172,23172	81453,8382	120157,2729	46000,00	209000,00

ANOVA

CALCULATED

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1,108E10	5	2,216E9	1,814	,185
Within Groups	1,466E10	12	1,222E9		
Total	2,574E10	17			

4. 5' UTR

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	4170,0000	183,30303	105,83005	3714,6500	4625,3500	4010,00	4370,00
2,00	3	10256666,6667	5513586,24974	3183270,50549	-3439840,8633	23953174,1966	4370000,00	15300000,00
3,00	3	1563666,6667	884307,82725	510555,36211	-633075,7558	3760409,0891	631000,00	2390000,00
4,00	3	4803333,3333	1218209,06799	703333,33333	1777134,2467	7829532,4199	3960000,00	6200000,00
5,00	3	1,4933E8	44433470,86750	25653676,36638	38954472,6874	2,5971E8	1,17E8	2,00E8
6,00	3	1,7783E8	68103475,19278	39319559,73530	8654922,3057	3,4701E8	99500000,00	2,23E8
Total	18	57299083,8889	82732879,85407	19500326,79064	16156990,6532	98441177,1246	4010,00	2,23E8

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1,031E17	5	2,061E16	18,613	,000
Within Groups	1,329E16	12	1,108E15		
Total	1,164E17	17			

SFT-R Hücre Hattına PPRV İnokulasyonu Sonrası Gen İfadelerinin Analizleri

1. β -aktin

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	2066666,6667	220075,74454	127060,79035	1519968,2102	2613365,1231	1850000,00	2290000,00
2,00	3	2836666,6667	1143517,96371	660210,40417	-3989,4311	5677322,7644	1830000,00	4080000,00
3,00	3	5923333,3333	3610295,46344	2084405,05767	-3045137,7780	14891804,4446	1760000,00	8190000,00
4,00	3	2993333,3333	896679,05815	517697,89560	765859,0696	5220807,5970	2130000,00	3920000,00
5,00	3	4953333,3333	3219383,99905	1858712,21848	-3044059,8673	12950726,5340	1270000,00	7230000,00
6,00	3	2483333,3333	2239962,79731	1293243,12400	-3081042,7244	8047709,3910	1000000,00	5060000,00
Total	18	3542777,7778	2381645,02110	561359,11493	2358413,5723	4727141,9832	1000000,00	8190000,00

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3,528E13	5	7,055E12	1,384	,297
Within Groups	6,115E13	12	5,096E12		
Total	9,643E13	17			

2. IFN γ

Descriptives

CALCULATED

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	45100,0000	15282,66992	8823,45359	7135,7433	83064,2567	28100,00	57700,00
2,00	3	45266,6667	13661,74708	7887,61336	11329,0055	79204,3278	33200,00	60100,00
3,00	3	36766,6667	16184,66352	9344,21984	-3438,2663	76971,5997	24100,00	55000,00
4,00	3	86400,0000	44954,75503	25954,63992	-25273,8023	198073,8023	55700,00	138000,00
5,00	3	26433,3333	9952,05171	5745,81974	1711,0664	51155,6003	18500,00	37600,00
6,00	3	78933,3333	70219,75031	40541,39174	-95502,1965	253368,8632	37000,00	160000,00
Total	18	53150,0000	37655,03247	8875,37627	34424,5929	71875,4071	18500,00	160000,00

ANOVA

CALCULATED

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8,638E9	5	1,728E9	1,341	,312
Within Groups	1,547E10	12	1,289E9		
Total	2,410E10	17			

3. OTP-1

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	33000,0000	7357,30929	4247,74450	14723,4305	51276,5695	24600,00	38300,00
2,00	3	122133,3333	87440,11284	50483,57269	-95079,9485	339346,6152	67800,00	223000,00
3,00	3	4067000,0000	6697022,99533	3866528,02912	-12569327,3792	20703327,3792	175000,00	11800000,00
4,00	3	437666,6667	495728,08407	286208,74278	-793790,1617	1669123,4951	143000,00	1010000,00
5,00	3	237000,0000	8888,19442	5131,60144	214920,5011	259079,4989	230000,00	247000,00
6,00	3	72400,0000	13743,72584	7934,94381	38258,6923	106541,3077	57100,00	83700,00
Total	18	828200,0000	2747079,30676	647492,80209	-537890,4004	2194290,4004	24600,00	11800000,00

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3,808E13	5	7,616E12	1,013	,452
Within Groups	9,021E13	12	7,517E12		
Total	1,283E14	17			

4. N

Descriptives

CALCULATED

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	7786666,6667	907872,97202	524160,70479	5531385,1794	10041948,1540	6840000,00	8650000,00
2,00	3	28833,3333	12716,26255	7341,73761	-2755,6140	60422,2807	14200,00	37200,00
3,00	3	86166,6667	24777,87992	14305,51564	24615,0007	147718,3326	62600,00	112000,00
4,00	3	110800,0000	48693,73676	28113,34203	-10161,9478	231761,9478	81200,00	167000,00
5,00	3	220466,6667	108557,14317	62675,49583	-49204,2266	490137,5599	96400,00	298000,00
6,00	3	56966,6667	34076,43369	19674,03817	-27683,8874	141617,2207	28200,00	94600,00
Total	18	1381650,0000	2964824,31287	698815,79222	-92722,4445	2856022,4445	14200,00	8650000,00

ANOVA

CALCULATED

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1,478E14	5	2,955E13	210,993	,000
Within Groups	1,681E12	12	1,401E11		
Total	1,494E14	17			

SFT-R Hücre Hattına Eş Zamanlı BVDV ve PPRV İnokulasyonu Sonrası Gen İfadelerinin Analizleri

1. β -aktin

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	2219626,6667	3810883,25853	2200214,47516	-7247132,1509	11686385,4843	280,00	6620000,00
2,00	3	5356333,3333	3958368,39283	2285365,05715	-4476798,8683	15189465,5350	809000,00	8030000,00
3,00	3	6380000,0000	911482,30921	526244,55658	4115752,4221	8644247,5779	5720000,00	7420000,00
4,00	3	1733700,0000	2889322,61439	1668151,18919	-5443775,2678	8911175,2678	62100,00	5070000,00
5,00	3	2368000,0000	2378123,63009	1373010,31800	-3539586,5927	8275586,5927	4000,00	4760000,00
6,00	3	681053,3333	1151018,70034	664540,95648	-2178235,6271	3540342,2938	160,00	2010000,00
Total	18	3123118,8889	3137319,99511	739473,41443	1562966,3597	4683271,4181	160,00	8030000,00

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7,463E13	5	1,493E13	1,932	,162
Within Groups	9,270E13	12	7,725E12		
Total	1,673E14	17			

2. IFN γ

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	5646,6667	3002,93745	1733,74675	-1813,0435	13106,3768	2240,00	7910,00
2,00	3	25710,0000	20696,31127	11949,02088	-25702,4873	77122,4873	4630,00	46000,00
3,00	3	14010,0000	4475,07542	2583,68600	2893,2964	25126,7036	9230,00	18100,00
4,00	3	73700,0000	43370,84274	25040,16773	-34039,1460	181439,1460	35800,00	121000,00
5,00	3	111000,0000	30199,33774	17435,59577	35980,6862	186019,3138	83000,00	143000,00
6,00	3	139333,3333	12342,33905	7125,85278	108673,2634	169993,4032	129000,00	153000,00
Total	18	61566,6667	55700,99777	13128,85108	33867,2121	89266,1212	2240,00	153000,00

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4,594E10	5	9,188E9	16,201	,000
Within Groups	6,805E9	12	5,671E8		
Total	5,274E10	17			

3. OTP-1

Descriptives

CALCULATED

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	471633,3333	643215,51857	371360,65280	-1126202,5931	2069469,2598	32900,00	1210000,00
2,00	3	963333,3333	1164424,46442	672280,77798	-1929257,3912	3855924,0579	169000,00	2300000,00
3,00	3	651000,0000	426489,15578	246233,62890	-408457,7955	1710457,7955	170000,00	983000,00
4,00	3	1296333,3333	1173392,65949	677458,56782	-1618535,6228	4211202,2895	279000,00	2580000,00
5,00	3	1149666,6667	654209,70134	377708,14718	-475480,3238	2774813,6572	459000,00	1760000,00
6,00	3	972666,6667	324692,67521	187461,40343	166085,3475	1779247,9859	724000,00	1340000,00
Total	18	917438,8889	733271,37031	172833,71947	552791,6152	1282086,1626	32900,00	2580000,00

ANOVA

CALCULATED

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1,417E12	5	2,834E11	,440	,812
Within Groups	7,724E12	12	6,436E11		
Total	9,141E12	17			

4. 5'UTR

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	8329333,3333	6972788,63392	4025741,39480	-8992033,8683	25650700,5349	288000,00	12700000,00
2,00	3	10925333,3333	10174179,34446	5874065,18331	-14348729,2624	36199395,9290	476000,00	20800000,00
3,00	3	44600000,0000	20347235,68449	11747481,99970	-5945335,4937	95145335,4937	25100000,00	65700000,00
4,00	3	58566666,6667	25155980,07102	14523811,86573	-3924252,1038	1,2106E8	30700000,00	79600000,00
5,00	3	68970000,0000	54040768,86944	31200452,45398	-65274711,9206	2,0321E8	7110000,00	1,07E8
6,00	3	1,1083E8	41068032,98593	23710639,89951	8814683,8456	2,1285E8	63500000,00	1,37E8
Total	18	50370777,7778	44648013,62363	10523637,73326	28167842,9527	72573712,6029	288000,00	1,37E8

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2,228E16	5	4,455E15	4,604	,014
Within Groups	1,161E16	12	9,677E14		
Total	3,389E16	17			

5. N

Descriptives

CALCULATED

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	29633333,3333	3407834,11177	1967513,94178	21167804,1009	38098862,5658	26100000,00	32900000,00
2,00	3	21700000,0000	6643041,47210	3835361,78215	5197770,1584	38202229,8416	14100000,00	26400000,00
3,00	3	30366666,6667	2107921,56717	1217009,08424	25130299,2083	35603034,1251	29100000,00	32800000,00
4,00	3	37333333,3333	14407405,50319	8318119,44559	1543353,9944	73123312,6723	20800000,00	47200000,00
5,00	3	29833333,3333	20460775,48221	11813034,23248	-20994050,6537	80660717,3203	16600000,00	53400000,00
6,00	3	54033333,3333	11754715,36590	6786588,08075	24833001,6020	83233665,0647	40500000,00	61700000,00
Total	18	33816666,6667	14325306,69007	3376507,16771	26692859,2456	40940474,0878	14100000,00	61700000,00

ANOVA

CALCULATED

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1,839E15	5	3,679E14	2,677	,075
Within Groups	1,649E15	12	1,374E14		
Total	3,489E15	17			

SFT-R Hücre Hattına Önce BVDV ve 6 Saat Sonra PPRV İnokulasyonu Sonrası Gen İfadelerinin Analizleri

1. β -aktin

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	3203333,3333	2148542,14139	1240461,38370	-2133941,2254	8540607,8920	1740000,00	5670000,00
2,00	3	3223333,3333	1616240,49366	933136,88409	-791630,6282	7238297,2949	1370000,00	4340000,00
3,00	3	5730000,0000	3817237,22082	2203882,93700	-3752542,9349	15212542,9349	2450000,00	9920000,00
4,00	3	5703333,3333	2150031,00753	1241320,98096	362360,2261	11044306,4406	3560000,00	7860000,00
5,00	3	4513333,3333	1275630,56303	736485,64895	1344491,3455	7682175,3212	3550000,00	5960000,00
6,00	3	5420000,0000	3698661,92021	2135423,45527	-3767985,5590	14607985,5590	1170000,00	7910000,00
Total	18	4632222,2222	2479337,09251	584385,35699	3399276,8926	5865167,5519	1170000,00	9920000,00

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2,104E13	5	4,208E12	,605	,698
Within Groups	8,346E13	12	6,955E12		
Total	1,045E14	17			

2. IFN γ

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	5810,0000	3487,67831	2013,61201	-2853,8732	14473,8732	1940,00	8710,00
2,00	3	25656,6667	20768,54914	11990,72744	-25935,2695	77248,6028	4670,00	46200,00
3,00	3	13810,0000	4541,94892	2622,29543	2527,1734	25092,8266	9130,00	18200,00
4,00	3	72700,0000	41877,08204	24177,74459	-31328,4387	176728,4387	35400,00	118000,00
5,00	3	111700,0000	32472,60384	18748,06657	31033,5802	192366,4198	83100,00	147000,00
6,00	3	136666,6667	13428,82472	7753,13557	103307,6168	170025,7166	127000,00	152000,00
Total	18	61057,2222	55183,97197	13006,98693	33614,8786	88499,5659	1940,00	152000,00

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4,486E10	5	8,973E9	15,593	,000
Within Groups	6,905E9	12	5,754E8		
Total	5,177E10	17			

3. OTP-1

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	1047000,0000	141417,82066	81647,61683	695698,6586	1398301,3414	957000,00	1210000,00
2,00	3	1200000,0000	113578,16692	65574,38524	917856,1923	1482143,8077	1120000,00	1330000,00
3,00	3	4546666,6667	5763907,81791	3327793,73025	-9771674,1108	18865007,4442	1070000,00	11200000,00
4,00	3	864666,6667	80835,22335	46670,23796	663860,8399	1065472,4934	817000,00	958000,00
5,00	3	1483333,3333	180092,56879	103976,49307	1035958,5916	1930708,0751	1300000,00	1660000,00
6,00	3	4713333,3333	6310470,13568	3643351,63155	-10962743,5096	20389410,1763	1050000,00	12000000,00
Total	18	2309166,6667	3390020,18474	799035,42033	623349,2896	3994984,0437	817000,00	12000000,00

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4,913E13	5	9,827E12	,806	,567
Within Groups	1,462E14	12	1,219E13		
Total	1,954E14	17			

4. 5'UTR

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	1537333,3333	1522294,75902	878897,28890	-2244256,4859	5318923,1526	212000,00	3200000,00
2,00	3	335666,6667	435057,74712	251180,70742	-745076,6898	1416410,0231	79900,00	838000,00
3,00	3	7253333,3333	4482692,64319	2588083,80424	-3882292,5118	18388959,1785	3460000,00	12200000,00
4,00	3	9926333,3333	11846451,38146	6839551,89403	-19501883,2938	39354549,9604	149000,00	23100000,00
5,00	3	2,0067E8	25890796,30551	14948058,21652	1,3635E8	2,6498E8	1,81E8	2,30E8
6,00	3	1,3633E8	12662279,94215	7310570,73315	1,0488E8	1,6779E8	1,22E8	1,46E8
Total	18	59342111,1111	82470310,34100	19438438,56289	18330590,6224	1,0035E8	79900,00	2,30E8

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1,136E17	5	2,273E16	137,240	,000
Within Groups	1,987E15	12	1,656E14		
Total	1,156E17	17			

5. N

Descriptives

CALCULATED

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	229666,6667	40673,49669	23482,85427	128628,0997	330705,2337	187000,00	268000,00
2,00	3	561333,3333	526362,35934	303895,44986	-746223,2536	1868889,9202	136000,00	1150000,00
3,00	3	346333,3333	88556,94966	51128,37873	126345,6750	566320,9916	256000,00	433000,00
4,00	3	665000,0000	119678,73662	69096,55081	367701,5371	962298,4629	566000,00	798000,00
5,00	3	608000,0000	661310,81951	381807,97966	-1034787,1459	2250787,1459	184000,00	1370000,00
6,00	3	289333,3333	17616,28035	10170,76420	245572,0670	333094,5997	273000,00	308000,00
Total	18	449944,4444	341546,04758	80503,17544	280097,5908	619791,2981	136000,00	1370000,00

ANOVA

CALCULATED

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5,061E11	5	1,012E11	,822	,557
Within Groups	1,477E12	12	1,231E11		
Total	1,983E12	17			

SFT-R Hücre Hattına Önce BVDV ve 12 Saat Sonra PPRV İnokulasyonu Sonrası Gen İfadelerinin Analizleri

1. β -aktin

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	3903333,3333	3723121,45025	2149545,17153	-5345413,0667	13152079,7333	1630000,00	8200000,00
2,00	3	6970000,0000	2426252,25399	1400797,39196	942855,2776	12997144,7224	4240000,00	8880000,00
3,00	3	4376666,6667	1108211,77278	639826,36533	1623716,0093	7129617,3240	3130000,00	5250000,00
4,00	3	4590000,0000	2407882,88752	1390191,83329	-1391512,6864	10571512,6864	2860000,00	7340000,00
5,00	3	5546666,6667	749021,58402	432447,81316	3685993,9029	7407339,4305	5070000,00	6410000,00
6,00	3	4110000,0000	2701906,73414	1559946,58028	-2601908,4119	10821908,4119	1000000,00	5880000,00
Total	18	4916111,1111	2292420,09005	540328,59700	3776117,4200	6056104,8022	1000000,00	8880000,00

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2,007E13	5	4,013E12	,695	,637
Within Groups	6,927E13	12	5,773E12		
Total	8,934E13	17			

2. IFN γ

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	8176,6667	6444,87652	3720,95119	-7833,2941	24186,6275	4010,00	15600,00
2,00	3	11076,6667	5024,20475	2900,72596	-1404,1498	23557,4831	5730,00	15700,00
3,00	3	27233,3333	25268,42562	14588,73233	-35536,9157	90003,5823	10500,00	56300,00
4,00	3	168333,3333	37527,76750	21666,66667	75109,1909	261557,4758	125000,00	190000,00
5,00	3	204333,3333	14011,89970	8089,77407	169525,8449	239140,8218	193000,00	220000,00
6,00	3	233000,0000	87538,56293	50540,41287	15542,1546	450457,8454	144000,00	319000,00
Total	18	108692,2222	103815,21319	24469,48041	57066,1313	160318,3132	4010,00	319000,00

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1,633E11	5	3,265E10	19,646	,000
Within Groups	1,995E10	12	1,662E9		
Total	1,832E11	17			

3. OTP-1

Descriptives

CALCULATED

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	1710000,0000	603986,75482	348711,91548	209613,7249	3210386,2751	1150000,00	2350000,00
2,00	3	1306666,6667	198578,28011	114649,22348	813370,8723	1799962,4610	1150000,00	1530000,00
3,00	3	1473333,3333	241108,55093	139204,08679	874386,4893	2072280,1773	1220000,00	1700000,00
4,00	3	1736666,6667	590112,98353	340701,88989	270744,7501	3202588,5833	1140000,00	2320000,00
5,00	3	1496666,6667	162583,31198	93867,51894	1092787,3301	1900546,0032	1370000,00	1680000,00
6,00	3	1573333,3333	28867,51346	16666,66667	1501622,4545	1645044,2122	1540000,00	1590000,00
Total	18	1549444,4444	348314,80390	82098,58661	1376231,5675	1722657,3214	1140000,00	2350000,00

ANOVA

CALCULATED

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3,868E11	5	7,735E10	,554	,733
Within Groups	1,676E12	12	1,396E11		
Total	2,062E12	17			

4. 5'UTR

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	9060000,0000	5999233,28435	3463658,95165	-5842921,6432	23962921,6432	2180000,00	13200000,00
2,00	3	28920000,0000	19857925,36999	11464978,55791	-20409821,2887	78249821,2887	6560000,00	44500000,00
3,00	3	40800000,0000	26989627,63730	15582468,78172	-26245951,8399	1,0785E8	18000000,00	70600000,00
4,00	3	50500000,0000	28517538,46320	16464608,50835	-20341492,7427	1,2134E8	24500000,00	81000000,00
5,00	3	81800000,0000	36232168,02787	20918651,96422	-8205694,9765	1,7181E8	54900000,00	1,23E8
6,00	3	1,8490E8	1,39016E8	80261094,76785	-1,6044E8	5,3024E8	29700000,00	2,98E8
Total	18	65996666,6667	78537486,66570	18511463,13289	26940893,3804	1,0505E8	2180000,00	2,98E8

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5,964E16	5	1,193E16	3,165	,047
Within Groups	4,522E16	12	3,768E15		
Total	1,049E17	17			

5. N

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	494,6667	627,04492	362,02455	-1062,9993	2052,3326	40,00	1210,00
2,00	3	9,2900	7,07865	4,08686	-8,2943	26,8743	1,37	15,00
3,00	3	11,9000	3,65923	2,11266	2,8100	20,9900	8,40	15,70
4,00	3	1733,3333	317,85741	183,51506	943,7318	2522,9349	1370,00	1960,00
5,00	3	46433,3333	15234,60972	8795,70602	8588,4648	84278,2019	32500,00	62700,00
6,00	3	8683,3333	9801,45057	5658,87013	-15664,8197	33031,4863	2890,00	20000,00
Total	18	9560,9761	18336,72562	4322,00768	442,3370	18679,6152	1,37	62700,00

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5,059E9	5	1,012E9	18,470	,000
Within Groups	6,573E8	12	54776008,138		
Total	5,716E9	17			

SFT-R Hücre Hattına Önce BVDV ve 24 Saat Sonra PPRV İnokulasyonu Sonrası Gen İfadelerinin Analizleri

1. β -aktin

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	3753333,3333	3846119,25625	2220557,98793	-5800956,5550	13307623,2217	1230000,00	8180000,00
2,00	3	6996666,6667	2426630,03635	1401015,50471	968583,4809	13024749,8524	4250000,00	8850000,00
3,00	3	4586666,6667	855940,02905	494177,20618	2460393,7615	6712939,5718	3630000,00	5280000,00
4,00	3	4756666,6667	2444224,48505	1411173,66441	-1315123,5526	10828456,8860	2960000,00	7540000,00
5,00	3	5606666,6667	782453,40649	451749,68487	3662944,6519	7550388,6814	5140000,00	6510000,00
6,00	3	4180000,0000	2730000,00000	1576166,23489	-2601695,9531	10961695,9531	1030000,00	5860000,00
Total	18	4980000,0000	2317874,27969	546328,20704	3827348,2382	6132651,7618	1030000,00	8850000,00

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2,043E13	5	4,085E12	,691	,640
Within Groups	7,091E13	12	5,909E12		
Total	9,133E13	17			

2. IFN γ

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	8093,3333	6252,71408	3610,00616	-7439,2695	23625,9362	4110,00	15300,00
2,00	3	10986,6667	4835,13530	2791,56666	-1024,4753	22997,8086	5760,00	15300,00
3,00	3	27433,3333	25268,42562	14588,73233	-35336,9157	90203,5823	10700,00	56500,00
4,00	3	170333,3333	41932,48542	24209,73174	66167,2650	274499,4017	122000,00	197000,00
5,00	3	205333,3333	15947,83162	9207,48488	165716,7234	244949,9433	192000,00	223000,00
6,00	3	234666,6667	85582,31905	49410,97494	22068,4005	447264,9329	147000,00	318000,00
Total	18	109474,4444	104571,83145	24647,81705	57472,0961	161476,7928	4110,00	318000,00

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1,658E11	5	3,316E10	19,824	,000
Within Groups	2,008E10	12	1,673E9		
Total	1,859E11	17			

3. OTP-1

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	1713333,3333	568711,99507	328346,02344	300574,4193	3126092,2474	1230000,00	2340000,00
2,00	3	1323333,3333	200333,05602	115662,34382	825678,4340	1820988,2327	1170000,00	1550000,00
3,00	3	1483333,3333	253245,59884	146211,41466	854236,3909	2112430,2758	1210000,00	1710000,00
4,00	3	1756666,6667	575007,24633	331980,58846	328269,4815	3185063,8518	1180000,00	2330000,00
5,00	3	1473333,3333	192959,40851	111405,16645	993995,5898	1952671,0769	1320000,00	1690000,00
6,00	3	1566666,6667	32145,50254	18559,21454	1486812,8116	1646520,5218	1530000,00	1590000,00
Total	18	1552777,7778	341894,47212	80585,29990	1382757,6567	1722797,8988	1170000,00	2340000,00

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3,940E11	5	7,879E10	,593	,706
Within Groups	1,593E12	12	1,328E11		
Total	1,987E12	17			

4. 5'UTR

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	44333333,3333	28719389,50140	16581147,25960	-27009585,1855	1,1568E8	11200000,00	62100000,00
2,00	3	26583333,3333	21181143,34339	12228938,81105	-26033543,6240	79200210,2906	9550000,00	50300000,00
3,00	3	15863333,3333	8276233,04006	4778285,37355	-4695969,2727	36422635,9394	6590000,00	22500000,00
4,00	3	8360000,0000	6727228,25538	3883967,04414	-8351361,4047	25071361,4047	3920000,00	16100000,00
5,00	3	1257666,6667	593377,05831	342586,40435	-216363,6612	2731696,9945	713000,00	1890000,00
6,00	3	867666,6667	713096,30018	411706,34087	-903762,7447	2639096,0781	420000,00	1690000,00
Total	18	16210888,8889	20340922,21835	4794401,34539	6095586,2440	26326191,5338	420000,00	62100000,00

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4,258E15	5	8,515E14	3,681	,030
Within Groups	2,776E15	12	2,313E14		
Total	7,034E15	17			

5. N

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	20880000,0000	13767977,33874	7948945,42272	-13321551,7217	55081551,7217	7740000,00	35200000,00
2,00	3	13866666,6667	4534681,17218	2618099,39545	2601894,1561	25131439,1772	10100000,00	18900000,00
3,00	3	19533333,3333	6151693,53376	3551681,91769	4251679,4350	34814987,2317	13300000,00	25600000,00
4,00	3	7893333,3333	2444838,09962	1411527,93494	1820018,8110	13966647,8557	5140000,00	9810000,00
5,00	3	10950000,0000	6301436,34420	3638135,96960	-4703635,6608	26603635,6608	6790000,00	18200000,00
6,00	3	6216,6667	760,02193	438,79887	4328,6675	8104,6658	5340,00	6690,00
Total	18	12188258,3333	9360066,85338	2206188,91479	7533606,5933	16842910,0734	5340,00	35200000,00

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9,021E14	5	1,804E14	3,686	,030
Within Groups	5,873E14	12	4,894E13		
Total	1,489E15	17			

PKT Hücre Kültürüne Virus İnokulasyonu Olmaksızın Gen İfadelerinin Analizleri

1. β -aktin

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	1094000,0000	569023,72534	328526,00100	-319533,2950	2507533,2950	522000,00	1660000,00
2,00	3	1054333,3333	745281,37863	430288,40457	-797048,2452	2905714,9119	547000,00	1910000,00
3,00	3	1981000,0000	1523477,27256	879580,01342	-1803527,3458	5765527,3458	943000,00	3730000,00
4,00	3	1826000,0000	1231205,91292	710837,06525	-1232485,0392	4884485,0392	608000,00	3070000,00
5,00	3	6860000,0000	7258932,42839	4190946,59156	-11172187,7924	24892187,7924	1410000,00	15100000,00
6,00	3	2099333,3333	2230352,06488	1287694,36505	-3441168,3415	7639835,0082	679000,00	4670000,00
Total	18	2485777,7778	3401066,81456	801639,13595	794467,0410	4177088,5146	522000,00	15100000,00

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7,188E13	5	1,438E13	1,383	,298
Within Groups	1,248E14	12	1,040E13		
Total	1,966E14	17			

2. IFN γ

Descriptives

CALCULATED

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	117933,3333	38691,25655	22338,40738	21818,9238	214047,7428	77800,00	155000,00
2,00	3	167666,6667	20305,99255	11723,67026	117223,7848	218109,5485	154000,00	191000,00
3,00	3	194000,0000	22869,19325	13203,53488	137189,7746	250810,2254	168000,00	211000,00
4,00	3	221666,6667	44003,78772	25405,59868	112355,1981	330978,1352	178000,00	266000,00
5,00	3	250000,0000	39837,16857	23000,00000	151038,9872	348961,0128	227000,00	296000,00
6,00	3	448000,0000	81853,52772	47258,15626	244664,5650	651335,4350	378000,00	538000,00
Total	18	233211,1111	114359,40193	26954,76953	176341,5185	290080,7038	77800,00	538000,00

ANOVA

CALCULATED

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1,970E11	5	3,940E10	18,681	,000
Within Groups	2,531E10	12	2,109E9		
Total	2,223E11	17			

3. OTP-1

Descriptives

CALCULATED

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	3170666,6667	2641477,11202	1525057,52168	-3391126,2420	9732459,5754	422000,00	5690000,00
2,00	3	3406833,3333	5496689,05645	3173514,90639	-10247699,2416	17061365,9082	43500,00	9750000,00
3,00	3	4556666,6667	1981270,63606	1143887,13507	-365082,4376	9478415,7709	2280000,00	5890000,00
4,00	3	4886666,6667	3159752,09998	1824283,72550	-2962592,6847	12735926,0180	1250000,00	6960000,00
5,00	3	5953433,3333	5212604,94986	3009498,87098	-6995395,1991	18902261,8657	10300,00	9750000,00
6,00	3	7116666,6667	1868163,09067	1078584,46329	2475892,2814	11757441,0519	5540000,00	9180000,00
Total	18	4848488,8889	3408987,34522	803506,02293	3153239,3648	6543738,4129	10300,00	9750000,00

ANOVA

CALCULATED

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3,404E13	5	6,807E12	,500	,771
Within Groups	1,635E14	12	1,363E13		
Total	1,976E14	17			

PKT Hücre Kültürüne BVDV İnokulasyonu Sonrası Gen İfadelerinin Analizleri

1. β -aktin

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	1094000,0000	569023,72534	328526,00100	-319533,2950	2507533,2950	522000,00	1660000,00
2,00	3	1054333,3333	745281,37863	430288,40457	-797048,2452	2905714,9119	547000,00	1910000,00
3,00	3	1981000,0000	1523477,27256	879580,01342	-1803527,3458	5765527,3458	943000,00	3730000,00
4,00	3	1826000,0000	1231205,91292	710837,06525	-1232485,0392	4884485,0392	608000,00	3070000,00
5,00	3	6860000,0000	7258932,42839	4190946,59156	-11172187,7924	24892187,7924	1410000,00	15100000,00
6,00	3	2099333,3333	2230352,06488	1287694,36505	-3441168,3415	7639835,0082	679000,00	4670000,00
Total	18	2485777,7778	3401066,81456	801639,13595	794467,0410	4177088,5146	522000,00	15100000,00

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7,188E13	5	1,438E13	1,383	,298
Within Groups	1,248E14	12	1,040E13		
Total	1,966E14	17			

2. **IFN γ**

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	145666,6667	8621,67810	4977,72817	124249,2309	167084,1024	138000,00	155000,00
2,00	3	177666,6667	13316,65624	7688,37506	144586,2587	210747,0746	163000,00	189000,00
3,00	3	189000,0000	14730,91986	8504,90055	152406,3664	225593,6336	176000,00	205000,00
4,00	3	190666,6667	15044,37880	8685,87615	153294,3580	228038,9754	181000,00	208000,00
5,00	3	177000,0000	46184,41296	26664,58325	62271,5581	291728,4419	138000,00	228000,00
Total	15	176000,0000	26158,85537	6754,18741	161513,7087	190486,2913	138000,00	228000,00

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3,924E9	4	9,810E8	1,734	,219
Within Groups	5,656E9	10	5,656E8		
Total	9,580E9	14			

3. **OTP-1**

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	237733,3333	311247,43105	179698,78810	-535448,1478	1010914,8145	49700,00	597000,00
2,00	3	410000,0000	54781,38370	31628,04663	273915,4989	546084,5011	365000,00	471000,00
3,00	3	536666,6667	566583,91553	327117,37615	-870805,8048	1944139,1381	112000,00	1180000,00
4,00	3	1300000,0000	1043264,10846	602328,81386	-1291611,7151	3891611,7151	120000,00	2100000,00
5,00	3	1703333,3333	166232,76853	95974,53366	1290388,2441	2116278,4226	1550000,00	1880000,00
Total	15	837546,6667	749452,42188	193507,78325	422513,7491	1252579,5842	49700,00	2100000,00

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4,790E12	4	1,197E12	3,895	,037
Within Groups	3,074E12	10	3,074E11		
Total	7,864E12	14			

4. **5' UTR**

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	,0000	,00000	,00000	,0000	,0000	,00	,00
2,00	3	4010666,6667	4081504,78786	2356457,88797	-6128353,2975	14149686,6309	502000,00	8490000,00
3,00	3	384866,6667	437945,94796	252848,21094	-703051,3784	1472784,7117	75600,00	886000,00
4,00	3	21223333,3333	28386944,76927	16389210,20401	-49293746,6894	91740413,3560	2650000,00	53900000,00
5,00	3	73666666,6667	29890522,46672	17257301,19238	-585507,4168	1,4792E8	39600000,00	95500000,00
Total	15	19857106,6667	32947987,45945	8507133,78143	1611119,3799	38103093,9534	,00	95500000,00

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1,177E16	4	2,941E15	8,570	,003
Within Groups	3,432E15	10	3,432E14		
Total	1,520E16	14			

PKT Hücre Kültürüne PPRV İnokulasyonu Sonrası Gen İfadelerinin Analizleri

1. β -aktin

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	4771333,3333	6190203,98156	3573915,93509	-10605985,8207	20148652,4874	754000,00	11900000,00
2,00	3	6366666,6667	4706265,32755	2717163,55374	-5324344,5150	18057677,8483	1360000,00	10700000,00
3,00	3	6251333,3333	8324120,69430	4805933,32362	-14426928,8005	26929595,4672	524000,00	15800000,00
4,00	3	8126000,0000	9701953,82384	5601425,65186	-15974989,3715	32226989,3715	688000,00	19100000,00
5,00	3	3116666,6667	1047489,06120	604768,09146	514559,5871	5718773,7462	2030000,00	4120000,00
6,00	3	2520333,3333	1972427,52296	1138781,56134	-2379448,2601	7420114,9268	691000,00	4610000,00
Total	18	5192055,5556	5562187,36567	1311020,13483	2426044,8522	7958066,2589	524000,00	19100000,00

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6,820E13	5	1,364E13	,358	,868
Within Groups	4,577E14	12	3,815E13		
Total	5,259E14	17			

2. IFN γ

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	49033,3333	39723,58661	22934,42342	-49645,5262	147712,1929	23500,00	94800,00
2,00	3	42966,6667	11895,09703	6867,63747	13417,6076	72515,7258	30300,00	53900,00
3,00	3	31366,6667	5391,04195	3112,51952	17974,5760	44758,7573	26400,00	37100,00
4,00	3	50433,3333	3256,27599	1880,01182	42344,2953	58522,3713	47300,00	53800,00
5,00	3	143066,6667	89992,29597	51957,07630	-80486,5895	366619,9228	71200,00	244000,00
6,00	3	385666,6667	290606,83635	167781,93519	-336240,7348	1107574,0681	174000,00	717000,00
Total	18	117088,8889	166768,15851	39307,63192	34157,0347	200020,7430	23500,00	717000,00

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2,842E11	5	5,684E10	3,616	,032
Within Groups	1,886E11	12	1,572E10		
Total	4,728E11	17			

3. OTP-1

Descriptives

CALCULATED

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	1010333,3333	61419,32378	35460,46312	857759,2749	1162907,3918	964000,00	1080000,00
2,00	3	1370000,0000	36055,51275	20816,65999	1280433,1410	1459566,8590	1340000,00	1410000,00
3,00	3	1140000,0000	103923,04845	60000,00000	881840,8362	1398159,1638	1020000,00	1200000,00
4,00	3	2430000,0000	95393,92014	55075,70547	2193028,3655	2666971,6345	2320000,00	2490000,00
5,00	3	2023333,3333	361708,90690	208832,73477	1124798,5970	2921868,0696	1790000,00	2440000,00
6,00	3	3010000,0000	298663,69046	172433,56209	2268078,2634	3751921,7366	2790000,00	3350000,00
Total	18	1830611,1111	764583,63440	180214,09089	1450392,6148	2210829,6074	964000,00	3350000,00

ANOVA

CALCULATED

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9,448E12	5	1,890E12	46,275	,000
Within Groups	4,900E11	12	4,083E10		
Total	9,938E12	17			

4. N

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	1623333,3333	723417,81381	417665,46954	14436263,8607	18030402,8060	15400000,00	16700000,00
2,00	3	2400666,6667	3005388,71585	1735161,98411	-5065132,7808	9866466,1142	4320000,00	5860000,00
3,00	3	5140066,6667	5757889,02406	3324318,77800	-9163322,5981	19443455,9314	702000,00	11400000,00
4,00	3	5576666,6667	1104279,55398	637556,09775	2833484,1823	8319849,1510	4710000,00	6820000,00
5,00	3	2237333,3333	2005393,06205	1157814,22421	-2744339,1990	7219005,8657	422000,00	4390000,00
6,00	3	1069600,0000	1327870,12919	766646,17654	-2229012,2642	4368212,2642	858000,00	2580000,00
Total	18	5442944,4444	5765135,83649	1358855,54815	2576009,8409	8309879,0480	702000,00	16700000,00

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4,656E14	5	9,312E13	11,239	,000
Within Groups	9,943E13	12	8,286E12		
Total	5,650E14	17			

PKT Hücre Kültürüne Eş Zamanlı BVDV ve PPRV İnokulasyonu Sonrası Gen İfadelerinin Analizleri

1. β -aktin

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	8693333,3333	3958993,97996	2285726,24005	-1141352,9129	18528019,5795	4350000,00	12100000,00
2,00	3	51543333,3333	44374718,40286	25619755,61511	-	1,6178E8	5630000,00	94200000,00
3,00	3	41233333,3333	13212620,22966	7628309,84630	58689578,0995	8411365,1498	27700000,00	54100000,00
4,00	3	51933333,3333	22989200,36307	13272821,01807	-5175006,2516	1,0904E8	25400000,00	65900000,00
5,00	3	6743333,3333	1627154,98135	939438,36650	2701256,2813	10785410,3854	5070000,00	8320000,00
Total	15	32029333,3333	28682892,22981	7405890,92847	16145277,0578	47913389,6089	4350000,00	94200000,00

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6,137E15	4	1,534E15	2,851	,082
Within Groups	5,381E15	10	5,381E14		
Total	1,152E16	14			

2. IFN γ

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	345000,0000	65825,52696	38004,38571	181480,3261	508519,6739	269000,00	384000,00
2,00	3	429333,3333	128414,69282	74140,25747	110333,5521	748333,1145	323000,00	572000,00
3,00	3	481666,6667	229656,99060	132592,52535	-88832,9245	1052166,2578	312000,00	743000,00
4,00	3	450666,6667	359029,71093	207285,90025	-441212,5779	1342545,9112	89000,00	807000,00
5,00	3	12190000,0000	18196980,51876	10506031,60094	-33013805,5466	57393805,5466	1430000,00	33200000,00
Total	15	2779333,3333	8429533,09728	2176496,08680	-1888786,4999	7447453,1666	89000,00	33200000,00

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3,321E14	4	8,303E13	1,253	,350
Within Groups	6,627E14	10	6,627E13		
Total	9,948E14	14			

3. OTP-1

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	562333,3333	78748,54496	45465,49363	366711,1031	757955,5636	511000,00	653000,00
2,00	3	950666,6667	131393,81010	75860,25163	624266,3479	1277066,9854	829000,00	1090000,00
3,00	3	1146666,6667	81445,27815	47022,45327	944345,3798	1348987,9536	1090000,00	1240000,00
4,00	3	1463333,3333	30550,50463	17638,34207	1387441,6727	1539224,9940	1430000,00	1490000,00
5,00	3	2650000,0000	222710,57451	128582,01015	2096756,2630	3203243,7370	2450000,00	2890000,00
Total	15	1354600,0000	743215,58111	191897,43788	943020,9298	1766179,0702	511000,00	2890000,00

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7,572E12	4	1,893E12	117,383	,000
Within Groups	1,613E11	10	1,613E10		
Total	7,733E12	14			

4. 5'UTR

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	8328666,6667	6881458,08193	3973011,67602	-8765822,8665	25423156,1998	386000,00	12500000,00
2,00	3	11191333,3333	10663415,27529	6156525,67967	-15298058,6881	37680725,3547	474000,00	21800000,00
3,00	3	44533333,3333	19988580,07296	11540412,08584	-5121052,2303	94187718,8969	25300000,00	65200000,00
4,00	3	58400000,0000	24809070,92174	14323523,77501	-3229148,6702	1,2003E8	30900000,00	79100000,00
5,00	3	68493333,3333	53420184,69954	30842158,01644	-64209762,0475	2,0120E8	7180000,00	1,05E8
6,00	3	1,1497E8	44700149,14218	25807643,14006	3925340,4617	2,2601E8	63900000,00	1,47E8
Total	18	50985555,5556	45861384,70271	10809632,03930	28179225,4884	73791885,6227	386000,00	1,47E8

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2,370E16	5	4,740E15	4,718	,013
Within Groups	1,206E16	12	1,005E15		
Total	3,576E16	17			

5. N

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	1,7567E8	56083271,42146	32379691,85222	36348097,1303	3,1499E8	1,27E8	2,37E8
2,00	3	32400000,0000	9637945,83923	5564470,62472	8458015,2770	56341984,7230	23600000,00	42700000,00
3,00	3	55700000,0000	34646211,91415	20002999,77503	-30365961,5852	1,4177E8	35100000,00	95700000,00
4,00	3	15566666,6667	5345403,00944	3086169,86643	2287949,4664	28845383,8669	11900000,00	21700000,00
5,00	3	49700000,0000	21665410,21998	12508530,42261	-4119862,5680	1,0352E8	32400000,00	74000000,00
Total	15	65806666,6667	64412537,22980	16631245,59853	30136192,5034	1,0148E8	11900000,00	2,37E8

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4,821E16	4	1,205E16	12,208	,001
Within Groups	9,873E15	10	9,873E14		
Total	5,809E16	14			

PKT Hücre Kültürüne Önce BVDV ve 6 Saat Sonra PPRV İnokulasyonu Sonrası Gen İfadelerinin Analizleri

1. β -aktin

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	5495666,6667	5053697,29340	2917753,49275	-7058413,3636	18049746,6970	887000,00	10900000,00
2,00	3	18930666,6667	31497521,00298	18185102,22988	-59313513,0835	97174846,4168	528000,00	55300000,00
3,00	3	2492333,3333	1951647,08217	1126783,96825	-2355826,7835	7340493,4502	527000,00	44300000,00
4,00	3	1200333,3333	952500,04374	549926,15666	-1165807,9458	3566474,6124	633000,00	2300000,00
5,00	3	682000,0000	146256,62378	84441,30111	318678,4053	1045321,5947	531000,00	823000,00
6,00	3	2520333,3333	1972427,52296	1138781,56134	-2379448,2601	7420114,9268	691000,00	4610000,00
Total	18	5220222,2222	12767461,31915	3009319,49244	-1128886,9216	11569331,3660	527000,00	55300000,00

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7,186E14	5	1,437E14	,840	,546
Within Groups	2,053E15	12	1,710E14		
Total	2,771E15	17			

2. IFN γ

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	369333,3333	2516,61148	1452,96631	363081,7239	375584,9428	367000,00	372000,00
2,00	3	370666,6667	23028,96727	13295,78045	313459,5406	427873,7927	347000,00	393000,00
3,00	3	507333,3333	160481,56696	92654,07588	108675,0208	905991,6459	389000,00	690000,00
4,00	3	750666,6667	122484,01256	70716,17762	446399,5120	1054933,8214	656000,00	889000,00
5,00	3	12250000,0000	18318075,77231	10575945,97818	-33254622,8327	57754622,8327	1430000,00	33400000,00
Total	15	2849600,0000	8463597,04685	2185291,36076	-1837383,8198	7536583,8198	347000,00	33400000,00

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3,317E14	4	8,292E13	1,235	,356
Within Groups	6,712E14	10	6,712E13		
Total	1,003E15	14			

3. OTP-1

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	563666,6667	75956,12769	43853,29077	374981,1854	752352,1479	513000,00	651000,00
2,00	3	940333,3333	116629,04155	67335,80854	650610,7329	1230055,9337	827000,00	1060000,00
3,00	3	1156666,6667	68068,59286	39299,42041	987574,9082	1325758,4252	1080000,00	1210000,00
4,00	3	1440000,0000	34641,01615	20000,00000	1353946,9454	1526053,0546	1400000,00	1460000,00
5,00	3	2670000,0000	196723,15573	113578,16692	2181312,5901	3158687,4099	2490000,00	2880000,00
Total	15	1354133,3333	748790,82208	193336,95892	939466,7976	1768799,8691	513000,00	2880000,00

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7,722E12	4	1,930E12	151,041	,000
Within Groups	1,278E11	10	1,278E10		
Total	7,850E12	14			

4. 5'UTR

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	617,3333	359,08959	207,32047	-274,6947	1509,3613	376,00	1030,00
2,00	3	261100,0000	269988,38864	155877,86886	-409588,3380	931788,3380	30300,00	558000,00
3,00	3	1132233,3333	990276,20558	571736,23386	-1327749,1340	3592215,8007	96700,00	2070000,00
4,00	3	2,7821E8	3,83348E8	2,21326E8	-6,7408E8	1,2305E9	2640000,00	7,16E8
5,00	3	7,9900E8	5,13290E8	2,96348E8	-4,7608E8	2,0741E9	2,66E8	1,29E9
Total	15	2,1572E8	4,02690E8	1,03974E8	-7280666,0577	4,3872E8	376,00	1,29E9

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1,449E18	4	3,623E17	4,414	,026
Within Groups	8,208E17	10	8,208E16		
Total	2,270E18	14			

5. N

Descriptives

CALCULATED

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	1,4233E8	32624121,95498	18835545,59278	61290521,6722	2,2338E8	1,23E8	1,80E8
2,00	3	32400000,0000	1473091,98627	850490,05481	28740636,6440	36059363,3560	31100000,00	34000000,00
3,00	3	55633333,3333	34839967,47033	20114864,59755	-30913943,7359	1,4218E8	33600000,00	95800000,00
4,00	3	15100000,0000	5377731,86390	3104834,93925	1740973,4732	28459026,5268	11700000,00	21300000,00
5,00	3	49400000,0000	25093226,17760	14487580,88847	-12935029,4572	1,1174E8	23500000,00	73600000,00
Total	15	58973333,3333	49947078,65998	12896280,25612	31313563,1163	86633103,5503	11700000,00	1,80E8

ANOVA

CALCULATED

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2,905E16	4	7,262E15	12,355	,001
Within Groups	5,878E15	10	5,878E14		
Total	3,493E16	14			

PKT Hücre Kültürüne Önce BVDV ve 12 Saat Sonra PPRV İnokulasyonu Sonrası Gen İfadelerinin Analizleri

1. β -aktin

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	2580000,0000	520480,54719	300499,58403	1287054,6445	3872945,3555	2250000,00	3180000,00
2,00	3	4163333,3333	859437,80074	496196,64561	2028371,4816	6298295,1850	3240000,00	4940000,00
3,00	3	4610000,0000	2071545,31691	1196007,24635	-536003,8433	9756003,8433	2450000,00	6580000,00
4,00	3	2993333,3333	510816,34012	294919,95147	1724395,1991	4262271,4676	2420000,00	3400000,00
Total	12	3586666,6667	1326617,93728	382961,61160	2743773,8426	4429559,4907	2250000,00	6580000,00

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8,236E12	3	2,745E12	1,974	,196
Within Groups	1,112E13	8	1,390E12		
Total	1,936E13	11			

2. IFN γ

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	257500,0000	188825,97809	109018,72928	-211569,7331	726569,7331	39500,00	370000,00
2,00	3	202233,3333	230261,29361	132941,41985	-369767,4297	774234,0963	35700,00	465000,00
3,00	3	189000,0000	53702,88633	31005,37588	55594,6348	322405,3652	141000,00	247000,00
4,00	3	544000,0000	317472,83348	183293,02587	-244646,2381	1332646,2381	332000,00	909000,00
Total	12	298183,3333	240136,72936	69321,50267	145607,7347	450758,9320	35700,00	909000,00

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2,496E11	3	8,321E10	1,730	,238
Within Groups	3,847E11	8	4,809E10		
Total	6,343E11	11			

3. OTP-1

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	8770000,0000	2692006,68647	1554230,78509	2082684,6699	15457315,3301	6020000,00	11400000,00
2,00	3	17466666,6667	152752,52317	88191,71037	17087208,3633	17846124,9700	17300000,00	17600000,00
3,00	3	23063333,3333	12188274,41984	7036903,51725	-7214018,7942	53340685,4608	8990000,00	30200000,00
4,00	3	29966666,6667	5669509,09104	3273292,59988	15882825,3265	44050508,0068	25700000,00	36400000,00
Total	12	19816666,6667	9996723,40259	2885805,47375	13465051,6440	26168281,6893	6020000,00	36400000,00

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7,233E14	3	2,411E14	5,131	,029
Within Groups	3,759E14	8	4,699E13		
Total	1,099E15	11			

4. 5'UTR

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	631,3333	380,71818	219,80774	-314,4231	1577,0897	387,00	1070,00
2,00	3	18810,0000	14297,38787	8254,60074	-16706,6804	54326,6804	2330,00	27900,00
3,00	3	9927333,3333	10398549,96302	6003605,62033	-15904096,7773	35758763,4440	532000,00	21100000,00
4,00	3	30966666,6667	7596271,01500	4385709,11535	12096483,3696	49836849,9637	23900000,00	39000000,00
Total	12	10228360,3333	14297789,83067	4127416,40378	1143978,0791	19312742,5876	387,00	39000000,00

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1,917E15	3	6,390E14	15,413	,001
Within Groups	3,317E14	8	4,146E13		
Total	2,249E15	11			

5. N

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	2,9200E8	1,04130E8	60119325,78908	33327418,7829	5,5067E8	1,85E8	3,93E8
2,00	3	3,9000E8	2,28237E8	1,31773E8	-1,7697E8	9,5697E8	1,68E8	6,24E8
3,00	3	1,6267E8	80785724,81159	46641659,96665	-38016198,9089	3,6335E8	1,05E8	2,55E8
4,00	3	34633333,3333	351188,45843	202758,75101	33760932,8398	35505733,8268	34300000,00	35000000,00
Total	12	2,1982E8	1,79423E8	51794925,05414	1,0583E8	3,3382E8	34300000,00	6,24E8

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2,152E17	3	7,173E16	4,131	,048
Within Groups	1,389E17	8	1,737E16		
Total	3,541E17	11			

PKT Hücre Kültürüne Önce BVDV ve 24 Saat Sonra PPRV İnokulasyonu Sonrası Gen İfadelerinin Analizleri

1. β -aktin

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	3243333,3333	85049,00548	49103,06621	3032059,8915	3454606,7752	3180000,00	3340000,00
2,00	3	483000,0000	199451,74855	115153,52072	-12465,6102	978465,6102	268000,00	662000,00
3,00	3	1846666,6667	1253568,24040	723747,96104	-1267369,4736	4960702,8069	1030000,00	3290000,00
4,00	3	1773666,6667	1727544,59663	997398,33790	-2517792,0145	6065125,3479	551000,00	3750000,00
Total	12	1836666,6667	1370179,04161	395536,61926	966096,4374	2707236,8959	268000,00	3750000,00

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1,145E13	3	3,815E12	3,315	,078
Within Groups	9,206E12	8	1,151E12		
Total	2,065E13	11			

2. IFN γ

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	25240,0000	19905,54697	11492,47290	-24208,1199	74688,1199	8620,00	47300,00
2,00	3	71700,0000	38857,81775	22434,57154	-24828,1705	168228,1705	33300,00	111000,00
3,00	3	106566,6667	76911,39924	44404,81706	-84491,8407	297625,1740	19700,00	166000,00
4,00	3	848666,6667	239061,35893	138022,13993	254805,3295	1442528,0038	641000,00	1110000,00
Total	12	263043,3333	370718,06389	107017,08699	27500,3130	498586,3537	8620,00	1110000,00

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1,382E12	3	4,606E11	28,357	,000
Within Groups	1,299E11	8	1,624E10		
Total	1,512E12	11			

3. OTP-1

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	3537333,3333	3995782,94372	2306966,35818	-6388741,7651	13463408,4318	212000,00	7970000,00
2,00	3	5104000,0000	4130935,48727	2384996,71558	-5157812,6287	15365812,6287	902000,00	9160000,00
3,00	3	9056666,6667	5336987,28997	3081311,04853	-4201144,7275	22314478,0608	4990000,00	15100000,00
4,00	3	15866666,6667	2990540,64231	1726589,44486	8437751,8786	23295581,4548	13200000,00	19100000,00
Total	12	8391166,6667	6127351,58321	1768814,04299	4498033,2071	12284300,1263	212000,00	19100000,00

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2,721E14	3	9,069E13	5,149	,028
Within Groups	1,409E14	8	1,761E13		
Total	4,130E14	11			

4. 5'UTR

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	2750466,6667	4667642,46738	2694864,63503	-8844600,0115	14345533,3449	15900,00	8140000,00
2,00	3	11703333,3333	12700300,52138	7332521,92481	-19845962,1424	43252628,8091	3180000,00	26300000,00
3,00	3	37464666,6667	45611793,92803	26333981,50257	-75841310,7305	1,5077E8	394000,00	88400000,00
4,00	3	65366666,6667	2793444,70741	1612796,05379	58427365,3233	72305968,0100	62900000,00	68400000,00
Total	12	29321283,3333	32597548,19740	9410101,61334	8609789,3274	50032777,3393	15900,00	88400000,00

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7,146E15	3	2,382E15	4,195	,047
Within Groups	4,543E15	8	5,678E14		
Total	1,169E16	11			

5. N

Descriptives

Results

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	3	1630000,0000	65574,38524	37859,38897	1467104,1967	1792895,8033	1560000,00	1690000,00
2,00	3	1010000,0000	756042,32686	436501,24093	-868113,2558	2888113,2558	150000,00	1570000,00
3,00	3	1456666,6667	49328,82862	28480,01248	1334127,0632	1579206,2701	1400000,00	1490000,00
4,00	3	1650000,0000	98488,57802	56862,40703	1405340,8092	1894659,1908	1570000,00	1760000,00
Total	12	1436666,6667	423413,25898	122228,87952	1167642,7167	1705690,6166	150000,00	1760000,00

ANOVA

Results

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7,960E11	3	2,653E11	1,805	,224
Within Groups	1,176E12	8	1,470E11		
Total	1,972E12	11			

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Hatice Mahur
 Soyadı: Altay
 Doğum yeri ve tarihi: Düzce- 28.07.1983
 Uyruğu: T.C.
 Medeni Durumu: Evli
 İletişim Adresi ve telefonu: 21. Sokak 20/9 Emek/ANKARA- 0555 415
 43 04

II- Eğitimi

2001-2006: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
 1994-2001: Ankara Gazi Anadolu Lisesi
 1989-1994: Ankara Hamdullah Suphi İlkokulu

Yabancı dili: İngilizce

III- Ünvanları

2006: Veteriner Hekim

IV- Mesleki Deneyimi

2006-2007: Wildlife Rescue Centre, Ostend Belçika, Yardımcı Veteriner Hekim
 2010-2014: Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi

V- Üye Olduğu Kuruluşlar

ESCMID: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınlar

1. Ergunay K., Kasap O.E., Tufan Z.K., Turan H.M., Ozkul A., Alten B. (2012). Molecular Evidence Indicates That *Phlebotomus major sensu lato* (Diptera: Psychodidae) Is the Vector Species of the Recently-Identified Sandfly Fever Sicilian Virus Variant: Sandfly Fever Turkey Virus. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 12(8):690-698.

2. Turan H.M., Ozan E., Albayrak H., Cavunt A., Memis Y.S. (2012). Efficiency of Three PPRV Vaccines Commercially Available in Turkey. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.* 7(1): 1-6.
3. Ozan E., Turan H.M., Albayrak H., Cavunt A. (2012). Serological Determination of Pestivirus, Bluetongue Virus and Peste Des Petits Ruminants Virus in Small Ruminants in Samsun Province of Turkey. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.* 7(1): 27-33.
4. Ergünay, K., Saygan, M.B., Aydoğan, S., Turan, H.M., Menemenlioğlu, D., Özkul, A., Us D. (2010). West Nile Virus (WNV) seroprevalence in blood donors from Central Anatolia, Turkey, *Vector Borne and Zoonotic Diseases.* 10(8): 771-775.

Bildiriler

1. Alkan, F., Oğuzoğlu, T.C., Karaoğlu, M.T., Muz, D., Karapınar, Z., Timurkan, M.O., Akkutay A.Z., Turan H.M., Burgu, I. Investigation of BVDV infection in herds as first step of the control/eradication program., 8th ESVV Pestivirus Symposium 25-28 September 2011 University of Veterinary Medicine, Hannover, Almanya (Poster sunumu)
2. Özkul, A., Turan, H.M., Menemenlioğlu, D., Karaoğlu, T., Alkan, F., Purali, N. RNA İnterferans (Rnai) Tekniği ile Peste des Petits Ruminants Virus (PPRV) Replikasyonunun İnhibe Edilmesi., IX. Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi Girne, Kıbrıs. (Sözlü sunum).
3. Özkul, A., Turan, H.M., Menemenlioğlu, D., Karaoğlu, T., Alkan, F., Purali, N. Inhibition of Peste des Petits Ruminants Virus (PPRV) Replication by RNA Interference (RNAi) Technique-A Model Study. RNAi & miRNA World Congress 5-7 May 2010, Boston, MA, USA. (Poster Sunumu).

Projeler

1. Özkul, A., Turan, H.M. Embriyonik interferon (OTP-1) ve interferon gamma ekspresyonunun in vitro şartlarda PPRV ve Pestivirus ortak enfeksiyonuna etkisinin araştırılması. A.Ü. BAP No: 11B3338001, 2010-2014 (Yardımcı Araştırmacı).

VII- Bilimsel Etkinlikleri

1. Erasmus LLP, Staj Programı, Almanya Georg August Üniversitesi Tıp Fakültesi Viroloji Bölümü, “Kırım Kongo Hemorajik Ateş Virusunun teşhisinde RCA metodu geliştirilmesi” projesinde 01.06.2012 – 30.08.2014 (3 ay) süreyle araştırmacı.
2. Biyogüvenlik Seviyesi 3 Laboratuvar Eğitim Kursu, 12-15. Haziran 2012, George August Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Göttingen, Almanya.

3. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası Eğitim Programı, 26 Aralık 2011- 06 Ocak 2012, Ankara Üniversitesi Sürekli Eğitim Merkezi (ANKÜSEM), Ankara/Türkiye.
4. An Infection That Will Never Be Out Of Date; Influenza, ESCMID-Postgraduate Education Course 2-4 Eylül 2010, İstanbul/Türkiye.
5. TÜBİTAK-MAM-Genetik Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü 'Moleküler Biyoloji Teknikleri' eğitim kursu Mayıs 2008.