



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



# **KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞ VİRUSUNUN İNSAN VE HAYVAN KAYNAKLI HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE MİKRORNA YOLAKLARIYLA İLGİLİ ANAHTAR PROTEİN EKSPRESYONU**

**Katalin Földes**

**VİROLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Aykut ÖZKUL**

**ANKARA  
2021**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞ VİRUSUSNUN İNSAN VE  
HAYVAN KAYNAKLI HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE  
MİKRO RNA YOLAKLARIYLA İLGİLİ ANAHTAR  
PROTEİN EKSPRESYONU**

**Katalin Földes**

**VİROLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Aykut ÖZKUL**

**ANKARA  
2021**

## ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Kırım Kongo Kanamalı Ateş Virusunun İnsan ve Hayvan Kaynaklı Hücre Kültürlerinde MicroRNA Yolaklarıyla İlgili Anahtar Protein Ekspresyonu.” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Katalin Földes

Tarih:

İmza

## KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

.....Viroloji..... Anabilim Dalında

.....Katalin FÖLDES..... tarafından hazırlanan “Kırım  
Kongo Kanamalı Ateş Virusunun İnsan ve Hayvan Kaynaklı Hücre Kültürlerinde  
MicroRNA Yolaklarıyla İlgili Anahtar Protein Ekspresyonu..” adlı tez çalışması

aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ  
/ OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Jüri Başkanı

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Raportör

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Üye

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Üye

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

# İÇİNDEKİLER

|                                                                                                       |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Etik Beyan                                                                                            | ii        |
| Kabul ve Onay                                                                                         | iii       |
| İçindekiler                                                                                           | iv        |
| Önsöz                                                                                                 | vii       |
| Simgeler ve Kısaltmalar                                                                               | viii      |
| Şekiller                                                                                              | xii       |
| Çizelgeler                                                                                            | xiv       |
| <br>                                                                                                  |           |
| <b>1. GİRİŞ</b>                                                                                       | <b>1</b>  |
| 1.1. Kırım-Kongo Kanamalı Ateş Virusu                                                                 | 2         |
| 1.1.1. Tarihçe ve Coğrafi Yayılım                                                                     | 2         |
| 1.1.2. Sınıflandırma ve Filogenetik                                                                   | 4         |
| 1.1.3. Zoonotik Siklus                                                                                | 5         |
| 1.1.4. Aşılama                                                                                        | 6         |
| 1.1.5. KKKAV'un Virionu, Genomu ve Moleküler Biyolojisi                                               | 7         |
| 1.1.5.1. Hücreye Giriş                                                                                | 8         |
| 1.1.5.2. Transkripsiyon ve Genom Replikasyonu                                                         | 9         |
| 1.1.5.3. Glikoprotein Olgunlaşması, Viral Birleşme ve Çıkış                                           | 9         |
| 1.1.5.4. Viral Proteinlerin Fonksiyonu                                                                | 10        |
| 1.1.6. İnsan ve Rezervuar Konakçılarında KKKAV'un Patogenezi ve İmmünolojisi                          | 11        |
| 1.1.6.1. İnsanlarda KKKA Patogenezi                                                                   | 12        |
| 1.1.6.2. İnsanlarda KKKA immünolojisi                                                                 | 16        |
| 1.1.6.3. Hayvanlarda enfeksiyonun patogenezi                                                          | 18        |
| 1.2. MikroRNA (miRNA)                                                                                 | 19        |
| 1.2.1. MikroRNA'ların biogenezisi                                                                     | 20        |
| 1.2.2. Sığırlarda miRNA yapısı                                                                        | 23        |
| 1.2.3. miRNA dayalı antiviraller                                                                      | 24        |
| 1.2.4. MiRNA'lar ve Virusların Etkileşimi                                                             | 25        |
| 1.2.5. Hedef Gen Tahmini                                                                              | 27        |
| 1.2.5.1. TargetScan (Hedef Tarama)                                                                    | 29        |
| 1.2.5.2. DIANA-microT                                                                                 | 30        |
| 1.2.5.3. MirTarget miRDB                                                                              | 30        |
| 1.2.5.4. miRanda                                                                                      | 30        |
| 1.2.6. Gen Ontolojisi ve Pathway Analizi                                                              | 31        |
| 1.2.6.1. PANTHER                                                                                      | 32        |
| 1.2.6.2. Reactome                                                                                     | 33        |
| 1.3. İnsan ve Rezervuar Hayvanların Zoonotik Viruslara Karşı Biyolojik Tepkilerinin Karşılaştırılması | 33        |
| 1.3.1. Hücreden Hücreye Temas Yoluyla Virus Yayılımı                                                  | 35        |
| 1.3.2. Kombinasyonel Çeşitlilikteki Farklılıklar                                                      | 37        |
| 1.3.3. Sitopatogenez                                                                                  | 39        |
| 1.3.4. Transkripsiyon Faktörleri                                                                      | 39        |
| 1.4. Amaç                                                                                             | 40        |
| <br>                                                                                                  |           |
| <b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b>                                                                             | <b>42</b> |
| 2.1. Etik Açıklama                                                                                    | 42        |
| 2.2. Hücreler ve Kültür Koşulları                                                                     | 42        |

|                                                                                                                                                              |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.3. Araştırmada Kullanılan Virus Suşu                                                                                                                       | 43  |
| 2.4. Hücre Hatlarında KKKAV Virüsü Çoğalma Kinetiğinin Analizi                                                                                               | 44  |
| 2.5. Konvansiyonel RT-PCR                                                                                                                                    | 45  |
| 2.6. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)                                                                                         | 45  |
| 5.7. İndirekt İmmüno Floresan Testi (IIFT):                                                                                                                  | 46  |
| 2.8. LDH Deneyi                                                                                                                                              | 47  |
| 2.9. Apoptosis ve Nekrosis Saptanması                                                                                                                        | 48  |
| 2.9.1. Akış Sitometri Protokolü                                                                                                                              | 48  |
| 2.9.2. Annexin V-FITC Apoptosis Kit                                                                                                                          | 48  |
| 2.10. MiRNA İzolasyonu                                                                                                                                       | 49  |
| 2.11. MiRNA'dan cDNA Elde Edilmesi                                                                                                                           | 50  |
| 2.12. SyberGreen Real-time MiRNA PCR Array                                                                                                                   | 50  |
| 2.13. Diferansiyel Olarak İfade Edilen MiRNA'ların Hedef Genleri                                                                                             | 52  |
| 2.14. Gen Ontolojisi Zenginleştirme Analizi ve KEGG Yolakları                                                                                                | 53  |
| 2.15. MiRNA Arraylerin QRT-PCR Yöntemi ile Validasyonu                                                                                                       | 53  |
| 2.16. İstatistiksel Analizler                                                                                                                                | 56  |
| <b>3. BULGULAR</b>                                                                                                                                           | 57  |
| 3.1. Mikoplazma Kontrol Testi                                                                                                                                | 57  |
| 3.2. Ank-2 Virüsünün Üretilmesi ve Enfektivite Testi Sonuçları                                                                                               | 57  |
| 3.3. qRT-PCR İçin Linear Standardın Hazırlaması                                                                                                              | 59  |
| 3.4. Sitopatoloji ve IIFT Sonuçları                                                                                                                          | 60  |
| 3.5. Hücre İçi ve Dışı Viral Yük Sonuçları                                                                                                                   | 72  |
| 3.6. LDH Test Sonuçları                                                                                                                                      | 75  |
| 3.7. Apoptosis ve Nekrosis Sonuçları                                                                                                                         | 76  |
| 3.7.1. Akış Sitometrisi Sonuçları                                                                                                                            | 76  |
| 3.7.2. Annexin V-FITC Apoptosis Sonuçları                                                                                                                    | 77  |
| 3.8. MiRNA Array Sonuçları                                                                                                                                   | 79  |
| 3.9. Farklı Olarak İfade Edilen MiRNA'ların Öngörülen Hedeflerinin Gen Ontoloji ve Pathway Analizleri                                                        | 82  |
| 3.10. QRT-PCR ile miRNA Array Sonuçların Doğrulaması                                                                                                         | 92  |
| <b>4. TARTIŞMA</b>                                                                                                                                           | 94  |
| 4.1. Enfekte İnsan ve Sığır Hücrelerinde KKKAV Patogenezi                                                                                                    | 94  |
| 4.1.1. İmmunopatogenez: KKKAV ile Enfekte İnsan Hücresinde Doğal ve Humoral Bağışıklık Sistemi İndüklenirken Sığır Hücresinde Baskılanmaktadır               | 94  |
| 4.1.2. Enfekte İnsan Hücrelerinde Apoptoz ve Biyolojik Oksidasyon Yolakları Artan Yönde, Sığır Hücrelerinde Azalan Yönde Regüle Edilir                       | 98  |
| 4.1.3. KKKAV ile Enfekte İnsan ve Sığır Hücrelerinde Megakaryosit/ trombosit Gelişimi ve Vasküler Endotel Büyüme Faktörünün İndüksiyonu                      | 102 |
| 4.2. KKKAV'un Olgunlaşan Endozomlar Yoluyla Penetrasyonu/Viral Girişi ile İlgili Gen Ekspresyonu Enfekte İnsan ve Sığır Hücrelerinde Zıt Yönde Etki Gösterdi | 103 |
| 4.3. Hücresinden Hücreye Yayılma Yollarıyla İlgili Genlerin Enfekte İnsan ve Sığır Hücrelerinde Ters Ekspresyonu                                             | 105 |
| 4.4. DNA ve RNA Transkripsiyonu KKKAV ile Enfekte İnsan ve Sığır Hücrelerinde Ters Yolaklar Gösterdi                                                         | 107 |
| 4.5. KKKAV'un Enfekte İnsan Hücrelerinde Sirkadiyen Saat Sistemini Değiştirmesi                                                                              | 108 |
| 4.6. KKKAV ile Enfekte İnsan Hücresinde Nörolojik Hastalıklarla İlgili Yolaklar Yüksek Seviyede İfade Edildi                                                 | 109 |
| 4.7. KKKAV ile Enfekte İnsan Hücresinde NOTCH1-yolu Artan Yönde Regüle Edildi                                                                                | 110 |

|                                                                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>                                                                                       | 112 |
| <b>ÖZET</b>                                                                                                       | 114 |
| <b>SUMMARY</b>                                                                                                    | 115 |
| <b>KAYNAKLAR</b>                                                                                                  | 116 |
| <b>EKLER</b>                                                                                                      | 129 |
| Ek-1. 384 hedefli miRNA primeri ve kontrol genlerin primerlerinden oluşan insan ve sığır miRBase profiler plakası | 129 |
| Ek-2. IF, CPE ve moi puanlarının hesabında kullanılan veriler. N=tekrar sayısı                                    | 142 |
| Ek-3. Ek-3: Ekspresyonları önemli şekilde değişen miRNA'lar, kat regülasyonları ve p-değerleri                    | 145 |
| Ek-4. HMC hücresinde 0. günde artan yönde değişen yolaklar                                                        | 151 |
| Ek-5. HMC hücresinde 7. günde azalan yönde regüle edilen yolaklar                                                 | 152 |
| Ek-6. HMC hücresinde 7. günde artan yönde regüle olan yolaklar                                                    | 153 |
| Ek-7. Ek 7. PSH hücresinde 0. günde azalan yönde regüle edilen yolaklar                                           | 155 |
| Ek-8. PSH hücresinde 0. günde artan yönde regüle edilen yolaklar                                                  | 156 |
| Ek-9. PSH hücresinde 7. günde azalan yönde regüle edilen yolaklar                                                 | 157 |
| <b>ÖZGEÇMİŞ</b>                                                                                                   | 158 |

## ÖNSÖZ

Küçükken geleceğim ile ilgili en çok hayal ettiğim şeylerden biri kâşif olmaktı. Egzotik ormanlarda farklı dünyaları keşfetmek isterdim. Bu sebepten dolayı biyolog oldum ve yaptığım araştırmalar ile dünyaya katkı sunmak istiyorum. Hayalimdeki egzotik yerlerden birisi de benim için Türkiye oldu. Buraya geldiğimden bu yana sadece bilimsel anlamda değil, kültürel anlamda da çok şey keşfettim. Türkiye, beni harika yemekleri ve doğal güzellikleriyle çok etkiledi ve hatta yeni bir dil ve kültür kazanmama da sebep oldu. Ailemin bana olan güveni ve hayatla ilgili öğretileri sayesinde benim için büyük olan bu yolculuğa hiç korkmadan başladım. Onlardan uzak olmak hiç de kolay değildi. Uzak olunca, ister istemez burda kendi ortamımı bulmaya çalıştım. Üyesi olduğum Ankara Çok Sesli Korusu, bunun yanı sıra Ankara'daki minik Macar arkadaş grubum benim için çok önemliydi. Çalışma ortamım da hayatımdaki diğer önemli noktalardan birisiydi. Özellikle danışman hocam Aykut Özkul, benim için viroloji, araştırma ve iş ortamı ile ilgili en önemli yol gösteren kişi oldu. Bana olan güveni çalışmalarım için güç verdi. Lisansüstü kariyerimi tamamlayabilmem için bana burs veren Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığına da teşekkürlerimi sunuyorum. Bu süreçte hayatıma anlam katan çok insan oldu. Özellikle aileme, çalışma arkadaşlarıma, Aykut Hocaya ve eğitimimi aldığım Viroloji Anabilim Dalının değerli öğretim üyeleri, öğretim görevlilerine ve son olarak hayatıma sevgi katan hayat arkadaşına çok teşekkür ediyorum.

## SİMGELER VE KISALTMALAR

|                |                                                                |
|----------------|----------------------------------------------------------------|
| AGO            | Argonat protein                                                |
| AP-1           | Aktivatör protein-1                                            |
| ANP32A         | Asidik nükleer fosfoprotein 32 aile üyesi A                    |
| BEK            | Sığır embriyonik böbrek hücre kültürü                          |
| BSL3+          | Biyogüvenlik seviye 3+                                         |
| BVDV           | Sığır viral diyare virusu                                      |
| CCF            | Hücreden hücreye yayılma                                       |
| CPE            | Sitopatik etki                                                 |
| cRNA           | Tamamlayıcı RNA                                                |
| C <sub>T</sub> | Eşik döngü değerleri                                           |
| CYP3A5         | P450 enzim                                                     |
| DENV           | Dang virusu                                                    |
| DGCR8          | DiGeorge sendromu kritik bölge 8                               |
| Dpi            | Enfeksiyon sonrası gün                                         |
| DPY30          | Dpy-30 Histon Metiltransferaz Kompleksi Düzenleyici Alt Birimi |
| DUB            | Deubikitinasyon                                                |
| EBOV           | Ebola virusu                                                   |
| EH             | Endotel hücre                                                  |
| ER             | Endoplazmik retikulum                                          |
| FASLG          | Hücre ölümü genleri                                            |
| FMDV           | Şap hastalığı virusu                                           |

|           |                                                              |
|-----------|--------------------------------------------------------------|
| GALNT3    | Polipeptid N-Asetilgalaktozaminiltransferaz 3                |
| G6Pase-a  | Glikoz-6-fosfataz- $\alpha$                                  |
| G6PT      | Glikoz-6-fosfat translokaz                                   |
| GO        | Gen ontoloji                                                 |
| GPCR      | G-protein bağlı reseptör                                     |
| HAZV      | Hazara virusu                                                |
| HCV       | Hepatitis C virusu                                           |
| HEK-293   | İnsan embriyo böbrek hücre kültürü                           |
| HMC       | Primer mesangial hücre kültürü                               |
| HRS       | Tirozin kinaz substrat                                       |
| HSV       | Herpes simplex virusu                                        |
| IAV       | İnfluenza A virusu                                           |
| IFN       | İnterferon                                                   |
| IKB kinaz | Nükleer Faktör İnhibitörü Kappa-B Kinaz Alt Birimi Epsilon'u |
| IL-6      | İnterleukin-6                                                |
| INO80D    | INO80 Kompleks Alt Birim D                                   |
| INOH      | Hiyerarşiler yolak veri tabanı ile tümleştirme Ağ Nesneleri  |
| IRF-3     | İnterferon düzenleyici faktör-3                              |
| JNK       | Jun N-terminal kinase                                        |
| KCJ15     | ATP'ye duyarlı içe doğru doğrultucu potasyum kanalı 15       |
| KCNC2     | Potasyum voltaj kapılı kanal alt ailesi C üyesi 2            |
| KEGG      | Kyoto Genler ve Genom Ansiklopedisi                          |
| KKKAV     | Kırım-Kongo Kanamalı Ateş virusu                             |

|           |                                                                                |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------|
| LDH       | Laktat dehidrojenaz enzimi                                                     |
| LLC-MK2   | Rhesus makak böbrek hücre hattı                                                |
| MDA-5     | Melanom farklılaşmasıyla ilişkili gen 5                                        |
| MDBK      | Madin-Darby sığır böbrek hücre kültürü                                         |
| MHC       | Majör histo-compatibility kompleks                                             |
| miRNA     | MicroRNA                                                                       |
| mRNA      | Messenger RNA                                                                  |
| NF-kB     | Aktive edilmiş B hücrelerinin nükleer faktör kappa-hafif zincir-güçlendiricisi |
| NGF       | Nöronal büyüme faktörü                                                         |
| NP        | Nükleoprotein                                                                  |
| OTU       | Yumurtalık tümörü sistein proteaz                                              |
| PANTHER   | Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships                            |
| preGn     | Gn glikoprotein öncüsü                                                         |
| preGc     | Gc glikoprotein öncüsü                                                         |
| pre-miRNA | MicroRNA öncüsü                                                                |
| PRR       | Patojen tanıma reseptör                                                        |
| RCF1      | Replikasyon faktörü C1                                                         |
| RdRp      | RNA'ya bağlı RNA polimeraz                                                     |
| RIG-I     | Retinoik asitle indüklenebilir gen I                                           |
| RNAi      | RNA interferans                                                                |
| RNP       | Ribonükleoprotein kompleks                                                     |
| ROS       | Reaktif Oksijen Türleri                                                        |
| RUNX1     | RUNX Ailesi Transkripsiyon Faktörü 1                                           |

|               |                                                     |
|---------------|-----------------------------------------------------|
| S, M, L       | Küçük, Orta, Büyük segment                          |
| SRSF3         | Serin/arginin zengin splicing faktörü 3             |
| SW-13         | İnsan böbrek üstü bezi / korteks hücre kültürü      |
| TCF           | T hücre faktör                                      |
| TH1           | T yardımcı 1 hücre                                  |
| TJ            | Sıkı bağlantı                                       |
| TLR           | Toll-benzeri reseptör                               |
| TNF- $\alpha$ | Tümör nekroz faktörü $\alpha$                       |
| TNFRSF        | TNF reseptör süper ailesi                           |
| TOP1          | Nükleik asit bağlayıcı protein geni                 |
| UTR           | Çevrilmemiş bölge                                   |
| V, D, J       | Değişken (V), Çeşitlilik (D) ve Birleştirme (J) gen |
| VEGF          | Vasküler endotelyal büyüme faktörü                  |
| VE-kadherin   | Vasküler endotelyal kadherin                        |
| Vero E6       | Afrika yeşil maymun böbrek hücre kültürü E6 serisi  |
| vRNA          | Viral RNA                                           |
| VSV           | Vesiküler Stomatitis Virusu                         |
| WNT           | Kanatsız/entegre yolu                               |
| WNV           | Batı Nil Virusu                                     |
| YOM           | Yapısal olmayan M proteini                          |

## ŞEKİLLER

|                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 1.1.</b> KKKAV'un dünya coğrafi dağılımı ve Türkiye'deki insidans haritası                                                  | 3  |
| <b>Şekil 1.2.</b> KKKAV'un bulaşma yolları ve müdahale önlemleri                                                                     | 6  |
| <b>Şekil 1.3.</b> KKKA virionu ve replikasyonunun şematik gösterimi                                                                  | 8  |
| <b>Şekil 1.4.</b> Üç KKKAV genom segmentinin protein ürünlerinin işlenmesi                                                           | 11 |
| <b>Şekil 1.5.</b> KKKAV'un insanlardaki patogenezi                                                                                   | 14 |
| <b>Şekil 1.6.</b> MiRNA'ların biogenezi                                                                                              | 22 |
| <b>Şekil 1.7.</b> MiRISC aracılı gen susturma                                                                                        | 23 |
| <b>Şekil 1.8.</b> Virusların konakçı miRNA biyogeneze etkisi                                                                         | 28 |
| <b>Şekil 1.9.</b> MiRNA hedeflerinin seçim adımları                                                                                  | 30 |
| <b>Şekil 1.10.</b> Virusların hücre-hücre temasıyla yayılma yöntemleri                                                               | 37 |
| <b>Şekil 3.1</b> EZ-PCR Mikoplazma Test Kiti ile hücrelerin kontrol edilmesi                                                         | 58 |
| <b>Şekil 3.2.</b> KKKAV Ank-2 suşunun izolasyonu                                                                                     | 59 |
| <b>Şekil 3.3.</b> Reed Muench's metodu ile KKKAV Ank-2 suşunun titresinin belirlenmesi                                               | 59 |
| <b>Şekil 3.4.</b> KKKAV ile enfekte olan insan ve sığır böbrek hücrelerinde CPE'ler                                                  | 61 |
| <b>Şekil 3.5.</b> KKKAV ile enfekte insan ve sığır böbrek hücrelerinin 1, 2, 3, 5 ve 7 dpi günlerinde moi, CPE ve IF boyama skorları | 64 |
| <b>Şekil 3.6.</b> CellCounter hücre sayım programı ile boyanmış hücre sayıları                                                       | 65 |
| <b>Şekil 3.7.</b> 1, 2, 3, 5 ve 7 dpi'de KKKAV ile enfekte olan primer ve devamlı insan ve sığır böbrek hücrelerinde IIFA.           | 66 |

|                                                                                                                                                               |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Şekil 3.8.</b> Gerçek zamanlı PCR’den bir örnek amplifikasyon.                                                                                             | 73  |
| <b>Şekil 3.9.</b> 0, 1, 2, 3, 5 ve 7 dpi’de hücre içi ve hücre dışı gRNA kopyaları ile tanımlanan KKKAV’a karşı insan ve sığır böbrek hücre hattı duyarlılığı | 73  |
| <b>Şekil 3.10.</b> Devamlı ve primer, insan ve sığır böbrek hücrelerinde üç seri pasaj sonunda KKKAV’un viral yükü                                            | 74  |
| <b>Şekil 3.11.</b> KKKAV ile enfekte insan ve sığır böbrek hücrelerinde farklı zaman dilimlerinde LDH testi ile ölçülen hücre sitotoksitesi                   | 75  |
| <b>Şekil 3.12.</b> KKKKAV ile enfekte primer ve devamlı insan ve sığır böbrek hücrelerde 2 dpi’de Caspase-3/7 bağlı apoptosis ve nekrozis                     | 77  |
| <b>Şekil 3.13.</b> KKKAV enfeksiyonunun ikinci gününde hücrelerdeki apoptosis ve nekrosis gelişimi                                                            | 78  |
| <b>Şekil 3.14.</b> İnsan ve sığır primer böbrek hücrelerinde 0. ve 7 gün enfeksiyonun farklı eksprese edilmiş miRNA’ların volcano plotu.                      | 80  |
| <b>Şekil 3.15.</b> Kullanılan online programların has-miR-382-5p üzerindeki sonuç listesi ve miRvea algoritmanın bta-miR-17-3p üzerindeki sonucu              | 84  |
| <b>Şekil 3.16.</b> 0 günde yukarı ve aşağı regüle edilen varsayılan miRNA hedef genleri için Gen Ontoloji zenginleştirme terimleri.                           | 90  |
| <b>Şekil 3.17.</b> 7 günde yukarı regüle edilen varsayılan miRNA’ların hedefleyen genleri için Gen Ontoloji zenginleştirme terimleri                          | 91  |
| <b>Şekil 3.18.</b> 7 günde aşağı regüle edilen varsayılan miRNA hedefleri için Gen Ontoloji zenginleştirme terimleri.                                         | 92  |
| <b>Şekil 3.19.</b> Farklı eksprese edilmiş miRNA’ların qRT-PCR validasyonu.                                                                                   | 93  |
| <b>Şekil 4.1.</b> Arbovirus enfeksiyonu sırasında apoptoz sinyali                                                                                             | 100 |

## ÇİZELGELER

|                                                                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Çizelge 1.1.</b> Yolak veri tabanlarının karşılaştırılması                                                                                                        | 32 |
| <b>Çizelge 1.2.</b> Rezervuarda ve insanda ortaya çıkan zoonotik virusların özellikleri                                                                              | 35 |
| <b>Çizelge 1.3.</b> Memelilerin immünoglobulin gen segmentleri                                                                                                       | 38 |
| <b>Çizelge 2.1.</b> Ters transkripsiyon master mix bileşenleri ve hacimleri                                                                                          | 50 |
| <b>Çizelge 2.2.</b> Syber Green real-time PCR array bileşenleri ve hacimleri                                                                                         | 51 |
| <b>Çizelge 2.3.</b> Real-time PCR protokolü                                                                                                                          | 52 |
| <b>Çizelge 2.4.</b> miRNA stem-loop, forward ve reverse primer sekansları                                                                                            | 53 |
| <b>Çizelge 2.5.</b> Reverse transcriptase PCR bileşenleri ve hacimleri                                                                                               | 55 |
| <b>Çizelge 2.6.</b> RT PCR protokolü                                                                                                                                 | 55 |
| <b>Çizelge 2.7.</b> FastStart Syber Green qRT-PCR bileşenleri ve hacimleri                                                                                           | 55 |
| <b>Çizelge 2.8.</b> FastStart Syber Green qRT-PCR array protokolü                                                                                                    | 56 |
| <b>Çizelge 3.1.</b> Apoptotik, canlı ve nekrotik hücrelerin KKKAV inokulasyondan sonraki 2. gündeki yüzde değişimi.                                                  | 75 |
| <b>Çizelge 3.2.</b> KKKAV enfeksiyonu sırasında önemli ölçüde farklı ifade edilen miRNA'lar.                                                                         | 81 |
| <b>Çizelge 3.3.</b> Farklı olarak ifade edilen miRNA'ların, yolaklarında etkin olabilecekleri hedef genlerin listesi.                                                | 81 |
| <b>Çizelge 3.4.</b> KKKAV ile enfekte primer insan ve sığır hücrelerinde 0. ve 7. günlerde azalan (↓) ve artan (↑) şekilde regüle edilen yolakların ana kategorileri | 84 |

# 1. GİRİŞ

Kırım-Kongo Kanamalı Ateş Virus (KKKAV), kene kaynaklı viral bir hastalığa neden olup doğu ve güney Avrupa, Asya, Orta Doğu ve Afrika gibi birçok endemik bölgede dağılım göstermektedir (Spengler ve ark., 2015). Letalite oranı %3-%80 arasında değişken olmasına rağmen, hastalıkla mücadele edebilecek lisanslı bir aşısı yoktur. Ayrıca, yüksek seviyeli tecrit laboratuvarlarının gerekliliği nedeniyle virus davranışı ve replikasyon özelliklerinin incelenmesi de zordur. Virusun yeni bölgelerde ortaya çıkma riski yüksektir ve Dünya çapında en önemli sağlık risklerinden biri haline gelmiştir (Elliott, 2014; Zivcec ve ark., 2015). KKKAV enfeksiyonu sırasında insan, sığır veya diğer hayvan hücrelerindeki konakçı yanıtları hakkında bilinenler yok denecek kadar azdır. KKKAV enfeksiyonun patogenezi insan ve diğer memeli konakçılar arasında büyük ölçüde değişir. Sığır gibi birçok hayvan türünün KKKAV'un doğal rezervuarı oldukları gösterilmesine rağmen insanlar doğal rezervuar olmayıp son konaklardır (Cobo, 2016; Haddock ve ark., 2018; Spengler ve ark., 2016). İnsan, sığır veya diğer hayvan hücrelerinin KKKAV enfeksiyonuna nasıl tepki verdiği ve çoğalma modellerinin hastalık sonucu ile nasıl ilişkili olduğu hakkında çok az şey bilinmektedir. İmmün sistemi baskılanmış, yenidoğan veya insanlaştırılmış fareler ve sinomolgus makakları dışında, yabani ve evcil hayvanlar genellikle kısa bir viremi dönemi sonrasında asemptomatikler (Bente ve ark., 2010; Bereczky ve ark., 2010; Haddock ve ark., 2018; Spengler ve ark., 2017). Buna karşın, insan KKKAV enfeksiyonları başlangıçta ateş, iştah kaybı ve ishal gibi spesifik olmayan semptomlara neden olur ve daha sonra peteşiyal kanamalar, miyalji, trombositopeni, kanama ve sonunda ölüme kadar giden şiddetli semptomlara yol açabilir (Bente ve ark., 2010; Dowall ve ark., 2017; Garrison ve ark., 2019; Lindquist ve ark., 2018). Bu farklılıkları sorgulamak için çalışmada, devamlı ve primer insan ve sığır hücre hatlarında in vitro KKKAV replikasyonun sitopatik etkileri, viral yükü, sitotoksisite, replikasyon verimi ve farklı olarak eksprese edilen microRNA'ların (miRNA'ların) karşılaştırmalı değerlendirmeleri yapıldı. Seçtiğimiz hayvan hücre modelinin köken aldığı tür olan-, sığırların-,

KKKAV'un zoonotik döngüsünde oldukça önemli bir rolü vardır (Spengler ve Estrada-Peña, 2018). İlk olarak, sığırların dahil olduğu tarımsal uygulamalar, insan kene temasını kolaylaştırmaktadır. İkincisi, kesimhaneler, enfekte hayvanların viremik kanıyla insanlara doğrudan temas etmesi için fırsat sağlamaktadır. Ayrıca, hayvan kurban etmeyi içeren dini uygulamaların da endemik bölgelerde insanların hastalığına maruz kalma risklerine katkıda bulunabileceği ileri sürülmüştür (Ozan ve Ozkul, 2020). Seçilen organ modeli böbreğin, insanlardaki KKKAV enfeksiyonu sırasında hastalıktan üst düzeyde etkilenecek hastalarda akut böbrek yetmezliğine yol açtığı kanıtlarla gösterilmiştir (Ardalan ve ark., 2006; Deveci ve ark., 2013). Ayrıca, böbrek yetmezliğinin insanlardaki KKKAV enfeksiyonlarında mortalite oranlarını yükseltmeye neden olduğu da bildirilmektedir (Khazaei ve ark., 2018). Uygun hayvan modellerinin kullanımındaki eksiklik ve/veya zorluklar, in vitro hücre hatlarını virus replikasyon süreçlerini karakterize etmek için daha ulaşılabilir bir model haline getirmektedir. İnsan ve primat kaynaklı böbrek ve böbreküstü bezi hücre hatları, örneğin insan böbrek üstü bezi / korteks hücre hattı (SW-13), insan embriyo böbrek hücre hattı (HEK-293), Afrika yeşil maymun böbrek hücre hattı (Vero E6) ve Rhesus makak böbrek hücre hattı (LLC- MK2) in vitro KKKAV deneyleri için sıklıkla kullanılmaktadır (Bakonyi ve ark., 2005; Bartolini ve ark., 2019; Bertolotti-Ciarlet ve ark., 2005; Burt ve ark., 1997). Primer sığır hücresindeki virus duyarlılığı bu çalışmada ilk defa incelenmiştir.

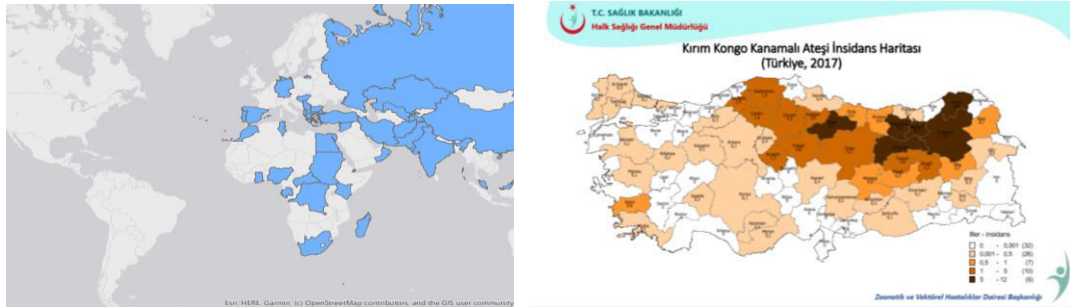
## **1.1. Kırım-Kongo Kanamalı Ateş Virus**

### **1.1.1. Tarihçe ve Coğrafi Yayılım**

KKKAV ilk olarak 1944'te eski Sovyetler Birliği'nin Kırım bölgesinde ve 1956'da Belçika Kongo'sunda (şu anki Kongo Demokratik Cumhuriyeti) tanımlandı (Spengler ve ark., 2019). Bu raporlar, söz konusu hastalıkların aynı virustan kaynaklandığını ortaya koymuş ve virusa şu anki ismi verilmiştir. 2000 yılından bu yana Türkiye, İran, Hindistan, Yunanistan, Gürcistan Cumhuriyeti ve bazı Balkan ülkelerinde hastalık artarak bugünkü prevalans değerleri ve coğrafi kapsam

alanlarına ulaşmıştır (Bente ve ark., 2013). Son zamanlarda Macaristan, Portekiz, İspanya, Hırvatistan ve İtalya'dan da serolojik veriler bildirilmiştir (Mancuso ve ark., 2019) (Şekil 1.1). KKKA'nın yayılımının nedenleri arasında tarımsal faaliyetlerdeki değişiklikler, habitat parçalanması, enfekte hayvanların ve kenelerin hareketliliği gibi antropojenik faktörler ve iklim değişikliği yer alır (Sorvillo ve ark., 2020). KKKA, koruyucu ilaç bulunmayan ve halk sağlığı için acil durum oluşturma potansiyeli yüksek olan Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) Mavi listesinde yer almış bir hastalıktır. Her yıl tahmini 10.000-15.000 insanda KKKA enfeksiyonu meydana gelmekte, ancak bunların çoğu subklinik seyrederek tanısı konulamamaktadır (Hawman ve Feldmann, 2018).

Türkiye’de KKKA virusu ilk olarak 2002’de izole edilmiştir. 2008-2009’da görülen yüksek vaka sayısı (yıllık ~1300) (T.C Sağlık Bakanlığı), 2010 yılından bu yana azalma eğilimi göstermektedir. Hastalık öncelikle kene ısırıkları veya hayvancılık ile ilişkilidir. Türkiye’de, kırsal alanlar KKKA enfeksiyon için önemli rol oynamaktadır. Bu bölgelerde hem vahşi hem evcil hayvanlar insan enfeksiyonları için kene rezervuarı olarak görev yapmakta ve bu hayvanlar geçici bir viremi geliştirerek viral enfeksiyonun devamlılığını sağlamaktadır (Spengler ve ark., 2019). Bazı dini uygulamalar (örneğin kurban bayramı) enfeksiyon yayılmasında rol oynayabilmektedir.



**Şekil 1.1.** 2019'da KKKA'nın dünya coğrafi dağılımı (European Food Safety, 2019) ve KKKA virusun Türkiye'de 2017 yılındaki insidans haritası (T.C. Sağlık Bakanlığı, 2017).

### 1.1.2. Sınıflandırma ve Filogenetik

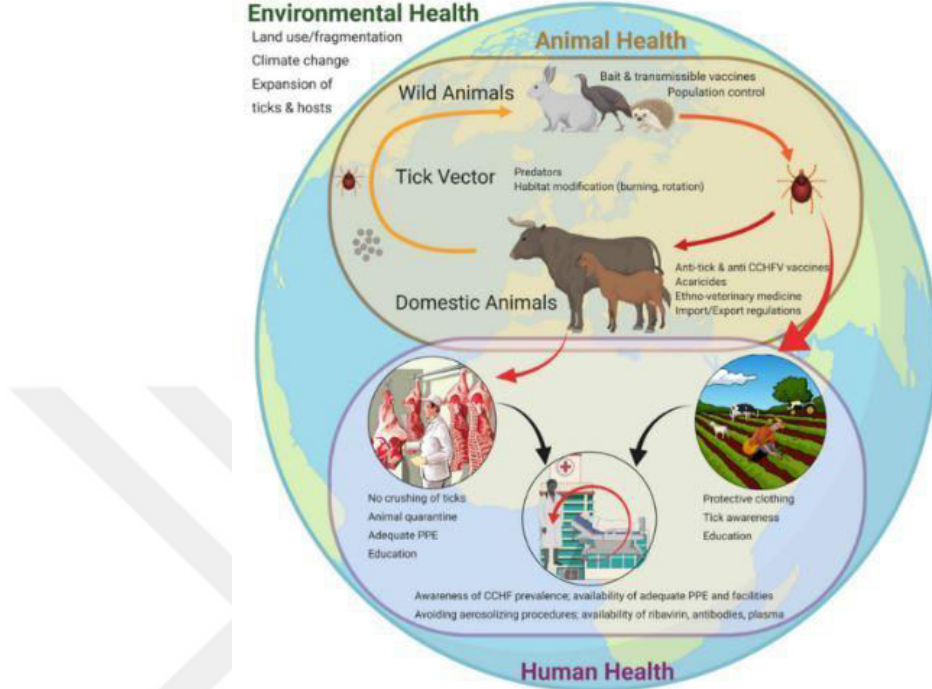
En büyük RNA virus takımı olan Bunyavirales takımın hayvanları, böcekleri ve bitkileri enfekte eden 530'dan fazla üyesi vardır. KKKAV Bunyavirales takımında, Nairoviridae ailesinde Orthonairovirus cinsi içinde Kırım-Kongo Kanamalı Ateş orthonairovirus olarak yer almaktadır (ICTV <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>). Nairoviridae ailesi Bunyavirales takımının diğer üyelerinden farklı olarak daha büyük L segmentine sahip olan ve kenelerle nakledilen insan ve hayvan patojenlerini içermektedir. Yedi serogruba ayrılan bu ailede KKKAV ve Hazara virus (HAZV) KKKA serogrubunu oluşturmaktadır. KKKA virusu negatif iplikçikli üç RNA genom segmentin (küçük [S], orta [M] ve büyük [L]) sahip olup, yüksek genetik çeşitlilik sergiler. Yapılan filogenetik değerlendirmeler, nükleotid seviyesinde en fazla korunan S segmentinin dizilerinin 6 soyda (genotip) dağıldığını göstermiştir (Ramírez de Arellano ve ark., 2017). Her genetik soy Afrika, Orta Doğu, Asya ve Avrupa'daki Hyalomma spp. kenelerinin dağılım gösterdiği bölgelerle ilişkilendirilmiştir. Genotip I, II ve III Afrika'da, genotip IV Asya'da; genotip V ve VI Avrupa'da tanımlanmıştır. Virusların coğrafi bölgeler arasında yayılımı söz konusudur; göç eden kuşlar, düzenlenmemiş yaban hayatı ticareti, hayvan ithalat ve ihracatı ve küresel insan hareketleri, virusu veya KKKAV ile enfekte olmuş keneleri dağıtabilmektedir (Ramírez de Arellano ve ark., 2017). Her genomik segmentin kökeni yaklaşık 1.000-5.000 yıl öncesine kadar izlenmiş ve kökenin Afrika'ya kadar uzandığı gösterilmiştir. Virus ilk olarak Orta Çağ döneminde Güney ve Orta Asya'da tanımlanmış ve daha sonra Çin, Hindistan ve Rusya'ya yayılmıştır. Zaman içinde Asya'dan Afrika'ya genomik segmentlerin ters transferleri de gözlenmiştir. Avrupa'ya ait olan KKKAV genotip V, Avrupa'ya 280-400 yıl önce Güney Rusya'daki Astrahan bölgesinden ulaşmış ve daha sonra tekrar Rusya'ya, Türkiye ve Balkanlara yayılmıştır (Lukashev ve ark., 2016). S ve L genomik segmentlerinde sadece birkaç rekombinasyon olayı gözlenirken, segment reassortment çok daha yaygın tespit edilmiştir (Anagnostou ve Papa, 2009). M segmenti, oldukça değişken, müsin benzeri bir bölge ve korunmuş bir bölgeden oluşur. Filogenetik ağaç topolojileri oldukça benzer olduğundan, KKKA viral suşlarının S ve L segmentlerinin birlikte evrime uğradığı öne sürülmüştür.

(Anagnostou ve Papa, 2009). KKKAV'un geniş coğrafi dağılımı ile ilişkili olarak, farklı izolatlar arasında önemli genetik çeşitliliğin var olduğu; amino asit düzeyinde yapılan değerlendirmelerde, izolatlar arasında nükleoprotein ve L proteininde %5 ve glikoprotein prekursorunda ise %25'e kadar farklılıkların varlığı bildirilmiştir (Hawman ve Feldmann, 2018).

### 1.1.3. Zoonotik Siklus

KKKAV'un ana vektörü ve rezervuarı, esas olarak *Hyalomma* cinsinin sert gövdeli keneleridir. Ancak *Rhipicephalus* ve *Dermacentor* türleri gibi diğer kene türlerinin vektör olabileceğine dair sınırlı kanıtlar da bulunmaktadır (Gargili ve ark., 2017). Erişkin olmayan *Hyalommalar* bazı küçük omurgalılarda toplanırken, erişkin keneler büyük toynaklıları istila etmektedir (Spengler ve Estrada-Peña, 2018). Terk edilmiş tarım alanları, kemirgenler, kuşlar, yabani domuzlar ve yabani toynaklı hayvanlar için barınak özelliği sağlarken, bu yapı *Hyalomma* türlerinin bu alanlarda artmasına, dolayısıyla KKKAV prevalansının yükselmesine neden olmaktadır (Spengler ve Estrada-Peña, 2018). Daha fazla kene enfekte oldukça, virusun rezervuarlara, değişik gelişme dönemlerindeki kenelere ve insanlara bulaşma olasılığı da artar. Olgunlaşmamış *Hyalomma* keneleri, bu konakçılarda viremi geçici olsa bile, üzerinde yoğun bir şekilde toplanarak KKKAV iletiminde önemli görev üstlenirler. İnsan dışındaki omurgalı konakçılarda klinik hastalık gelişmediğinden, virusun doğadaki varlığı büyük ölçüde belirtisiz olarak seyreder (Spengler ve ark., 2016). Keneler, KKKAV için hem vektör hem de rezervuarlardır; omurgalılar, virusu yeni nesil kenelere aktaran bir köprü görevi görür. Enfekte omurgalılar kısa bir viremi geliştirir ve virus, viremik konakçılarla beslenen kenelere veya aynı konak üzerinde beslenen enfekte ve enfekte olmayan kenelere bulaşır (Spengler ve Estrada-Peña, 2018) (Şekil 1.2). İnsanlara zoonotik yayılma potansiyeli, virusun geniş coğrafi yayılımı ve doğadaki sürekli dolaşımı nedeniyle yüksektir. Son senelerde Tek Sağlık kavramı, insan, hayvan ve çevre sağlığının birbiriyle bağlantılı olduğunu kabul eden önemli bir konseptmiştir. Bu bağlamda insan sağlığını daha geniş bir şekilde ele

almaya, değişiklik yapmaya ve disiplinler arası bir şekilde müdahale etmeye çalışan bir hastalık önleme yaklaşımı farkındalığı oluşmuştur (Sorvillo ve ark., 2020).



**Şekil 1.2.** Kırım-Kongo kanamalı ateş virusu bulaşma yolları ve Tek Sağlığın üç alanı içindeki ilgili müdahale önlemleri (Sorvillo ve ark., 2020).

#### 1.1.4. Aşılama

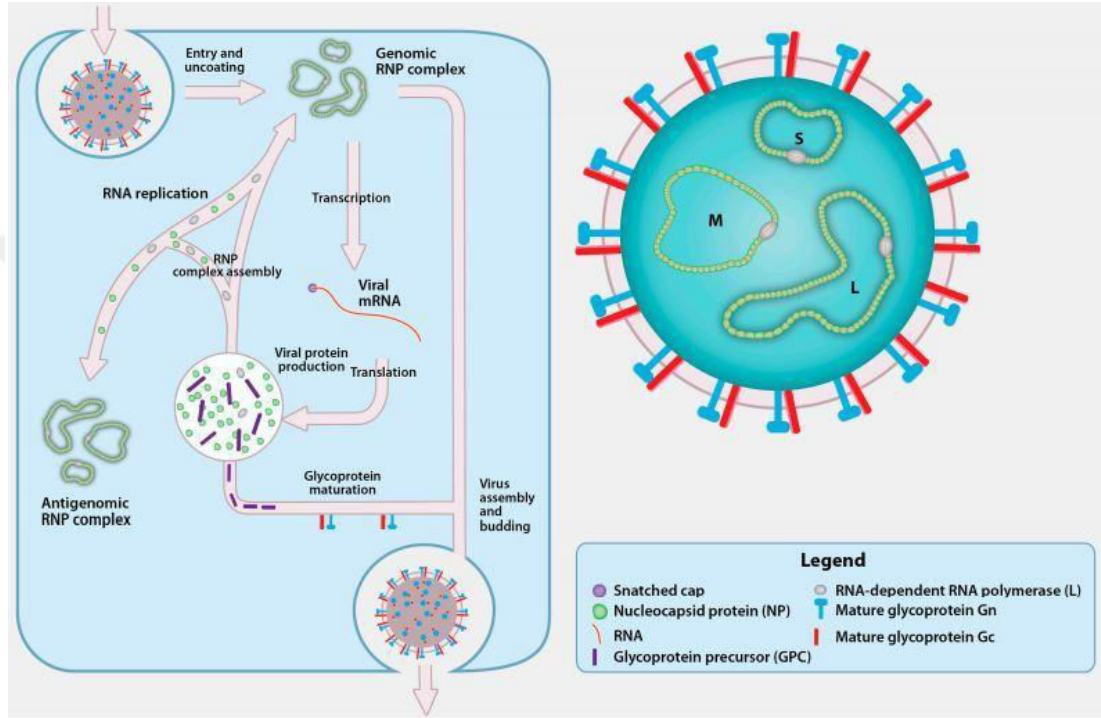
DSÖ, Salgınları Önlemek için Araştırma ve Geliştirme Planı çalışma grubu, KKKA için bir taslak yol haritası analizi oluşturarak, bir insan aşısı için hem kıyaslamalar hem de uygulama hedefleri koyan bir zaman çizelgesi önermiştir. Söz konusu planlama ile 2019 yılına kadar seçilen aşı adaylarının 2023 yılına kadar klinik güvenlik ve erken immünojenite deneme testlerinin tamamlanması yönünde araştırma grupları teşvik edilmiştir (Sorvillo ve ark., 2020). Bugüne kadar farklı antijenik varyasyonlara (suş ve/veya gen kombinasyonları) sahip birkaç KKKAV aşı adayının geliştirildiği bildirilmiştir (Aligholipour ve ark., 2019a; Aligholipour ve ark., 2019b; Aligholipour ve ark., 2019c; Tipih ve Burt, 2020). Aşı değerlendirmesi, çeşitli adjuvanlar, aşılama yolları ve prime/boosts stratejilerini içeren farklı dozlama şemaları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hayvan modellerinde, aşılamının humoral

başıklık oluşturduğu ve platforma ve aşılama yaklaşımına bağlı olarak %100'e kadar koruyucu etkinlik oluşturabildiği gösterilmiştir (Aligholipour ve ark., 2019b). KKKAV aşıları için en etkili antijen bileşenleri ve korumayla ilgili bağıntılar henüz net değildir. DeneySEL aşılarda kullanıldığında, nükleoprotein, daha çok T hücresi bazlı bir yanıt üretirken, glikoprotein öncülünün tamamı veya bir kısmının immunojen olarak kullanıldığı platformlarda güçlü immünoglobulin yanıtı oluşturabilmiştir (Dowall ve ark., 2017; Garrison ve ark., 2019). Glikoprotein öncüsünün yapısal olmayan elemanlarına spesifik serolojik yanıtla birlikte değerlendirildiğinde, hem nkleoproteinlere hem de glikoproteinlere karşı güçlü T-hücre yanıtı doğrudan deneySEL aşıların klinik deneylerde ilerlemek için ideal adaylar olduğunu göstermektedir (Sorvillo ve ark., 2020). Yaban hayatı aşılması ile bu ortamlardaki enfeksiyon çıkışlarının kontrol edilmesi de önemli bir strateji olabilir.

#### **1.1.5. KKKAV'un Virionu, Genomu ve Moleküler Biyolojisi**

Elektronmikroskopi alışmalarında, KKKAV yüzeyinde kk (<10 nm) başak benzeri çıkıntılar ile ~ 90-100 nm çapında küresel parçacıklar olarak tanımlanmaktadır (şekil 1.3) (Bente ve ark., 2013). KKKAV virionu, nükleoprotein (NP) ve RNA bağımlı RNA polimeraz (RdRp; L proteini) ile paketlenmiş  segmentli, negatif iplikçikli, tek zincirli bir viral RNA (vRNA) genomu içerir (Jeeva ve ark., 2017). Viral RNA (vRNA), NP ve RdRp birlikte, olgun glikoproteinler Gn ve Gc ile kaplanmış hücreSEL membrandan türetilmiş bir zarfın içindeki genomik ribonükleoprotein komplekslerini (RNP) oluşturur. KKKAV, hücrelere klatrin bağımlı bir şekilde girer (Simon ve ark., 2009). Hücre zarı ile füzyondan sonra, viral genomik segmentlerden L proteini tarafından kep aşırma yoluyla konakçı hücre RNA'sından 5'cap bölgesini alarak (capping) viral mRNA'lar üretilir (Simon ve ark., 2009). Viral mRNA'lar sitoplazmik ribozomlar tarafından NP ve L proteinlerine çevrilirken, glikoprotein öncüsü endoplazmik retikulum (ER) ile ilişkili ribozomlar tarafından çevrilmiş gibi görünmektedir (Zivcec ve ark., 2016). Yeni sentezlenen NP ve L proteininin bir kısmı, bir RNP içeren antijenomik RNA kopyası oluşturarak

genomik RNA'yı çoğaltmak için kullanılır. Glikoprotein öncüsü ise Gn ve Gc'yi oluşturmak üzere ER ve Golgi'de işleme ve olgunlaşmaya tabi tutulur. Olgunlaşan glikoproteinlerin ve genomik RNP'lerin birikmesi üzerine, Golgi'de yeni KKKAV virionları şekillenir ve ardından Golgi'den köken alan veziküller içinde plazma membranına göçerek hücre dışına salınmaktadır (Zivcec ve ark., 2016).



#### 1.1.5.1. Hücreye Giriş

KKKAV'un hücre yüzeyine ilk bağlanmasına Gn ve/veya Gc glikoproteinleri aracılık eder. Gc'nin hücresel reseptörlere bağlanmadan sorumlu olduğu (Zivcec ve ark., 2016) ve hemen sonrasında ise füzyona aracılık ettiği düşünülmektedir. Ayrıca bazı hücrelerin yüzeyinde tanımlanan nükleolin benzeri yapı KKKAV giriş faktörü olarak tanımlanmıştır (Xiao ve ark., 2011). KKKAV'nin hücreye giriş mekanizması, klatrin aracılı bir endositoz olarak tanımlanmaktadır (Şekil 1.3). Girişi aynı zamanda kolesterol ve düşük pH'ya da bağlıdır (Simon ve ark., 2009). Endositozu takiben

KKKAV partikülleri, Rab5'e bağlı bir işlemi takiben erken endozomlara ve daha sonra multiveziküler gövdelere taşınmaktadır (Simon ve ark., 2009).

#### **1.1.5.2. Transkripsiyon ve Genom Replikasyonu**

Hücreye girişi takiben, genomik RNP'ler sitozole salınır ve kapsüllenmiş vRNA, viral mRNA'yı sentezlemek için L proteini için bir şablon görevi görür. Genomik RNP'lerin replikasyonu, başlıksız, negatif iplikçikli vRNA ve pozitif iplikçikli tamamlayıcı RNA'nın replikasyonunu ve kapsüllenmesini gerektiren bir süreçtir (Bergeron ve ark., 2010). Komplementer RNA ve vRNA'nın kapsüllenmiş formları sırasıyla antijenomik ve genomik RNP'ler olarak tanımlanır (Şekil 1.4). KKKAV bir negatif iplikçikli RNA virusu olduğundan, genomik RNP'ler, cap takılmış mRNA'yı sentezlemek ve antijenomik RNP'ler üretmek için şablon olarak kullanılır. Genomik RNP'lerin replikasyonu sırasında, bir tamamlayıcı RNA, L proteini tarafından sentezlenir ve NP alt birimleri, antijenomik RNP'leri elde etmek için uzayan şeritlere eklenir ve karşılığında antijenomik RNP'lerin tamamlayıcı RNA'sı, genomik RNP'leri elde etmek için bir şablon olarak kullanılır (Zivcec ve ark., 2016).

#### **1.1.5.3. Glikoprotein Olgunlaşması, Viral Birleşme ve Çıkış**

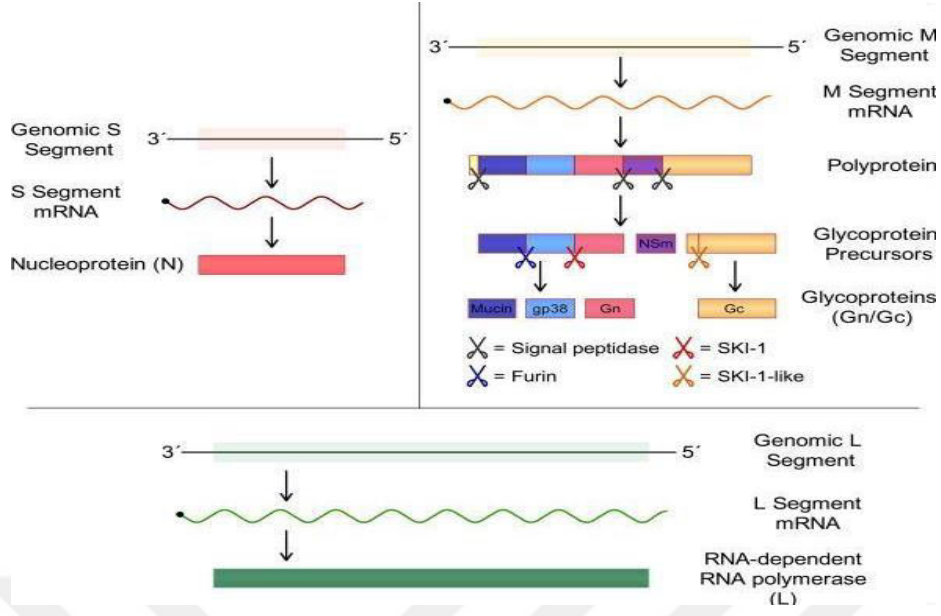
RNP replikasyonundan sonra viral protein işlemesi ve olgunlaşması gerçekleşir. Glikoprotein prekürsor (GPC) olgunlaşması yapısal glikoproteinleri (Gn ve Gc); salgılanan yapısal olmayan proteinleri (GP160, GP85 ve GP38) ve yapısal olmayan M proteini (YOM) verir (Sanchez ve ark., 2002). Komple glikoprotein setini elde etmek için, GPC, yoğun bir şekilde glikozile edilir ve ardından serin proteaz ailesi olan proprotein konvertaz dahil olmak üzere konakçı proteazlar tarafından kesim işlemine tabi tutulur (Sanchez ve ark., 2006). GPC, sentezini sekretorik yola yönlendiren bir N-terminal sinyal peptidi içerir (Sanchez ve ark., 2002). GPC tamamen çevrilmeden önce, Gn glikoprotein öncüsüne (PreGn), Gc glikoprotein öncüsüne (PreGc) ve YOM'e bölünür. ER'deki olgunlaşmayı, PreGn ve

PreGc'nin Golgi kompleksine taşınması izler, burada PreGn müsin benzeri alan çok sayıda O-bağlantılı glikan alır (Sanchez ve ark., 2006). Diğer bunyaviruslar gibi, KKKAV RNP'leri de büyük olasılıkla sitoplazmada bulunur ve NP Golgi kompleksine yakın perinükleer bölgede lokalizedir (Andersson ve ark., 2004). Montajı takiben, KKKAV partikülleri ekzositozla salınır. Hücreden çıkış polarize epitel hücrelerinde bazolateral membrandan meydana gelir (Connolly-Andersen ve ark., 2007).

#### **1.1.5.4. Viral Proteinlerin Fonksiyonu**

##### **S Segment: NP ve NSS**

Nükleoprotein (NP) 'nin birincil işlevi, RNP'leri oluşturmak için vRNA ve tamamlayıcı RNA (cRNA)'yı paketlemektir (Şekil 1.4). KKKAV ile enfekte hücrelerde, NP, aktin filamanına bağlı bir şekilde perinükleer bölgede lokalize olur (Connolly-Andersen ve ark., 2007). NP'nin viral tomurcuklanmada olası bir rolü aldığı düşünülmektedir. NP'nin küresel bir baş bölgesi ve esnek bir kol bölgesi olmak üzere iki ana domaini vardır. NP, viral aracılı bağışıklıktan kaçmaya da katkıda bulunmaktadır. Memelilerdeki antiviral yanıt ağırlıklı olarak KKKAV replikasyonunu inhibe eden interferon (IFN) ile uyarılan antiviral MxA proteini üzerinden NP'yi hedef almaktadır (Andersson ve ark., 2004). Ayrıca, NP oldukça immünojeniktir ve memelilerde hem B hem de T hücrelerinin ana hedefidir (Burt ve ark., 1993).



Şekil 1.4. Üç KKKAV genom segmentinin protein ürünlerinin işlenmesi (Bente ve ark., 2013).

#### M Segment: Glikoproteinler

Genel olarak, KKKAV glikoproteinlerinin giriş, virion oluşumu ve bağışıklıktan kaçmada rol oynadığı görülmektedir. Gn'nin sitoplazmik kuyruğu, RNA'yı in vitro olarak bağlayan bir çinko parmak (Zinc finger) alanı içerir, bu da Gn'nin RNA ile etkileşime girebileceğini ve matriks protein benzeri işlevler gerçekleştirebileceğini düşündürür (Estrada ve De Guzman, 2011). PreGn ve PreGc normalde Golgi kompleksinde lokalize olur, bu da bu proteinlerin doğru işlenmesinin enfeksiyöz KKKAV partiküllerinin üretimini düzenlediğini gösterir (Sanchez ve ark., 2002).

#### L Segment: Ovarian Tumor Proteaz, Nükleaz, ve RdRp

Nairoviruslar, Bunyaviridae ailesinin diğer üyelerine (~ 2500 amino asit) kıyasla çok daha büyük bir L proteinine (~ 4000 amino asit) sahiptir. Bu bulgu, 1-609 amino asitlerinin, yumurtalık tümörü (OTU) sistein proteaz gibi klasik olmayan L fonksiyonu olan alanlar içerebileceğini göstermektedir (Honig ve ark., 2004). OTU alanı ve RdRp korunmuş motifler arasında yer alan diziler, potansiyel bir lösün fermuarını ve NP'yi L proteininin N-terminal bölgesini bağlamak için önemli olan bir C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> çinko parmak motifi içerir (Honig ve ark., 2004). Viral genomun mRNA

transkripsiyonu ve replikasyonunda yer alan L protein bölgeleri, endonükleaz alanı ile başlar ve çeşitli korunmuş RdRp motiflerini içerir (Honig ve ark., 2004). KKKAV vRNA'nın 5' terminali, daha yaygın trifosfat grubunu (5' -pppRNA) kullanan diğer birçok RNA virusunun aksine, monofosforile edilmiştir (Habjan ve ark., 2008). KKKAV genom 51 terminalinin bir monofosfat grubuna (51 -p) işlenmesi, tercihli olarak 51 -pppRNA tarafından aktive edilen retinoik asitle indüklenebilir gen I'in (RIG-I) aktivasyonunu körelterek doğuştan gelen bağışıklık tepkisinden kaçınmak için olası bir stratejidir (Habjan ve ark., 2008).

### **1.1.6. İnsan ve Rezervuar Konakçılarında KKKAV'un Patogenezi ve İmmünolojisi**

#### **1.1.6.1. İnsanlarda KKKA Patogenezi**

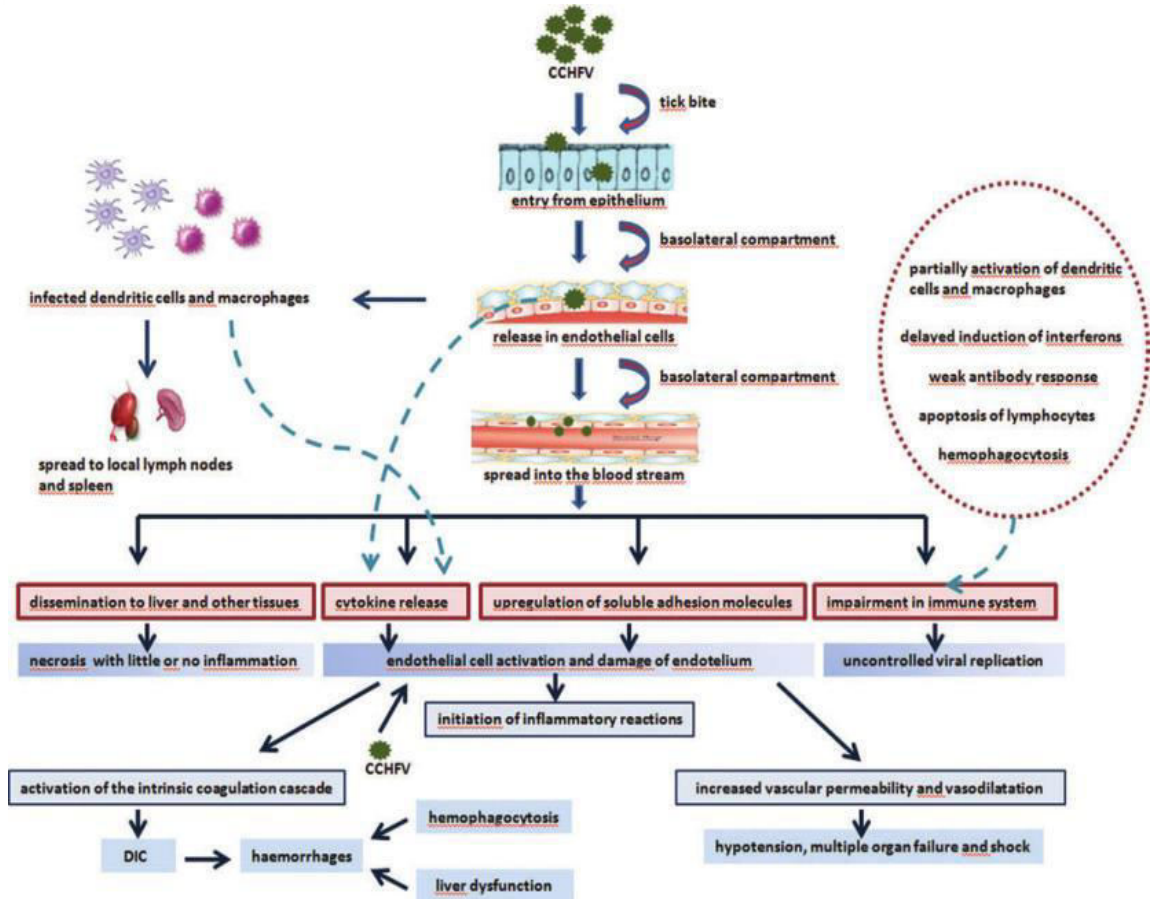
Kısa bir inkübasyon süresinin ardından (genellikle <7 gün), KKKAV enfeksiyonu başlangıçta yüksek ateş, yorgunluk ve miyalji gibi spesifik olmayan semptomlara neden olur ve buna sık sık kusma ve ishal eşlik eder. Şiddetli hastalığının ilerlemesi, trombositopeni, dolaşımdaki yüksek karaciğer enzimleri ve hemorajiler (peteşi, ekimoz ve epistaksis ile dişeti, gastrointestinal ve serebral kanamalar) ile karakterizedir (Zivcec ve ark., 2016). İyileşme dönemi, hastalığın başlangıcından ortalama olarak 15-20 gün sonra başlar ve halsizlik, letarji, saç kaybı, baş dönmesi, değişken nabız, işitme kaybı ve amnezi ile karakterizedir. Tüm bu semptomlar geri dönüşümlüdür ancak bir yıldan uzun süre devam edebilir (Akinci ve ark., 2013). KKKAV'un şiddeti, artan viral yük ve dokularda yayılım, düşük antikor titreleri, trombositopeninin seviyesi, artmış pıhtılaşma süresi, kanama, yüksek proinflatuar sitokin seviyeleri (örn., Tümör nekroz faktörü  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interlökin 6 (IL-6)) ve yükselmiş aspartat aminotransferaz ve alanin aminotransferaz ile ilişkilidir. Ölümcül sonuç tipik olarak yaygın intravasküler koagülopati, şok ve/veya çoklu organ yetmezliğinin sonunda oluşur. Hastalığın seyri sırasında, KKKAV vücuda geniş bir şekilde dağılır ve ölümcül insan vakalarında dalak, akciğer, kalp ve bağırsak dokularında tespit edilir. Enfeksiyonun ana hücrel hedefleri, mononükleer

fagositler, endotelyal hücreler ve hepatositlerdir. Monosit türevli makrofajların, endotel hücrelerinin ve dendritik hücrelerin enfeksiyonu in vitro olarak doğrulanmıştır (Zivcec ve ark., 2016).

Virus ve konakçı hücreler arasındaki etkileşim, büyük olasılıkla KKKAV'un patogenezesinden sorumludur. En çok katkıda bulunanlar, endotel hücreleri (EH'leri) ve bağışıklık hücreleridir (Şekil 1.5) (Akinci ve ark., 2013). Virusa karşı ilk engel epiteldir ve virus kene ısırması yoluyla vücuda girer. Viral bağlanma proteinleri, hücrenin bazolateral membranında lokalizedir. EH'lerde viral giriş ve yayılım büyük olasılıkla bazolateral bölümde gerçekleşir. Bazolateral membrandan kan dolaşımına viral salınım, sistemik yayılmaya neden olur (Connolly-Andersen ve ark., 2011). Virusun dokuda yerleşik makrofajlarda ve dendritik hücrelerde (DH) amplifikasyonu, virusun lokal lenf düğümlerine, dalağa ve son olarak da konağın sistemik dolaşımına geçişini kolaylaştırabilir (Akinci ve ark., 2013). Virusun başlangıçta kan, karaciğer ve dalakta kopyalandığı ve daha sonra sistemik olarak akciğer, böbrek ve beyne yayıldığı gösterilmiştir (Bente ve ark., 2010). Beynin katılımı enfeksiyonun sonraki aşamasındadır (Spengler ve ark., 2017). KKKAV'nın kanama ve artmış vasküler geçirgenlik ve EH'lerde viral antijenlerin varlığı gibi temel klinik özellikleri, endotelyumun KKKAV'nın ana hedefi olduğunu göstermektedir (Connolly-Andersen ve ark., 2011). KKKAV hastalığının gelişiminde öncelikle proinflamatuvar sitokinler olan interlökin IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 ve TNF- $\alpha$  katkıda bulunur (Ergönül ve ark., 2017). Birkaç çalışmada, bu proinflamatuvar sitokinlerin yüksek serum seviyeleri, KKKAV hastalarında hastalık şiddetini gösteren prognostik faktörler olarak gösterilmiştir (Bente ve ark., 2010; Saksida ve ark., 2010). Ciddi vakalarda, sitokinlerin aşırı salınması (sitokin fırtınası), endotel üzerinde toksik etkilere yol açarak vasküler geçirgenliğin artmasına, vazodilatasyona, çoklu organ yetmezliğine ve şoka neden olur (Akinci ve ark., 2013).

Sitopatik etkilerin (CPE), KKKAV'un patojenitesinin in vitro bir belirteci olabileceği gösterilmiştir (Lindquist ve ark., 2018). Bu sebeple, 1967'deki virusun yeni doğan farelerde intraserebral inokulasyonu ile pasajlandığı ilk çalışmalardan bu

yana, KKKAV'un kültivasyonu amacıyla in vitro hücre hatlarının kullanımı ilerlemiş ve tercih edilmiştir (Bente ve ark., 2013). Virusun CPE'si, 3 günden başlayan, belirgin hücre ölümü ve ayrılmaya sebep olurken, bazı çalışmalarda hiçbir sitopatojenite göstermediği belirtilmiştir (Lindquist ve ark., 2018; Mourya ve ark., 2012; Paragas ve ark., 2004; Rodrigues ve ark., 2012). İnsan adrenal bezi / korteks (SW-13), insan embriyo böbreği (HEK-293), Afrika yeşil maymun böbreği (Vero E6) ve Rhesus makak böbrek hücre hatları (LLC- MK2) gibi insan ve primatlardan kaynaklanan böbrek ve böbrek üstü bezi hücre hatları sıklıkla in vitro KKKAV deneylerinde kullanılmaktadır (Bartolini ve ark., 2019; Bertolotti-Ciarlet ve ark., 2005; Burt ve ark., 1997).



Şekil 1.5. KKKAV'un insanlardaki patogenezi (Akinci ve ark., 2013).

Viral yük, laktat dehidrojenaz, sıkı bağlantılar (tight junctions – TJ), kadherin ve apoptoz, KKKAV patogenezinde önemli rol oynamaktadır. Yüksek viral yük ile KKKAV enfeksiyonunun şiddeti arasında pozitif bir korelasyon olduğu gösterilmiştir (Cevik ve ark., 2008; Duh ve ark., 2007; Saksida ve ark., 2010). Ölümlü hastaların

$\sim 1 \times 10^9$  RNA kopya / mL viral yükü olduğu gösterilmiştir (Cevik ve ark., 2008). Ölümcül olgularda viral titreler zamanla artarken, hayatta kalan hastalarda azalma gözlenmiştir (Saksida ve ark., 2010). Birkaç çalışma, oksidatif stresin katkı sağlayabileceği laktat dehidrojenazın (LDH) artan seviyesinden bahsetmektedir (Elevli ve ark., 2010; Tezer ve ark., 2010). Sıkı bağlantılar (TJ), epitel hücrelerinin plazma zarını yer yer ayırarak hücrel geçirgenliği ayarlamaktadır. Bağlantı komplekslerinin bozulması artan geçirgenliğe ve sızıntılara sebep olur. TJ proteinleri ile viral proteinlerin etkileşiminin KKKAV'de tespit edilen artmış vasküler geçirgenliğin sebebi olabileceği bildirilmiştir (Connolly-Andersen ve ark., 2007). Vasküler endotelial kadherin (VE-kadherin), hücrel yapışan (adherens) bağlantılarının önemli bir bileşenidir. VE-kadherin lokalizasyonunu analiz eden bir çalışmada, KKKAV ile enfekte olmuş hücrelerin bazıları arasında VE-kadherin yoğunluğu veya dağılımında değişiklikler gözlenmiştir (Connolly-Andersen ve ark., 2011).

Apoptozis, programlanmış hücre ölümüdür ve bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Apoptotik hücre ölümünün modülasyonu, bazı viral hastalıkların patogeneğinde önemlidir. Virus aracılı apoptozun bir sonucu olarak, virus doğal bağışıklık tepkisinden kaçarak çoğalabilir veya virus replikasyonunu azaltmak için konakçı tarafından apoptotik modülasyonlar yapılabilir (Engin ve ark., 2019). Viral enfeksiyon sırasında apoptozun baskılanması veya indüksiyonu, viral latentlik veya saçılmanın sürdürülmesi için çok önemlidir (Barnwal ve ark., 2016). Bazı viral proteinler, mitokondriyal membran potansiyelini doğrudan veya dolaylı olarak değiştirerek hücre ölümünü düzenlemektedir (Irusta ve ark., 2003). Mitokondriyal membran potansiyelinin kaybı, mitokondrinin zarlar-arası boşluğunda bulunan proteinlerin salınmasına neden olur. Proteaz kaspazları da apoptozda önemli rol oynamaktadır. Bunların aktivasyonu, apoptozun uygulayıcıları olarak görev alan kaspaz-3 ve -7'nin aktivasyonu ile sonuçlanan katabolik reaksiyona yol açmaktadır (Barnwal ve ark., 2016). Son zamanlarda, KKKAV'un kaspaz-3'e bağlı apoptozu indüklediği ve hepatosit hücrelerinde apoptozun hem iç hem de dış yollarını düzenlediği bildirilmiştir (Barnwal ve ark., 2016; Engin ve ark., 2019; Karlberg ve ark., 2011, 2015). Apoptotik sinyal yollarının, KKKAV replikasyon

döngüsü sırasında erken dönemlerde bastırıldığı, ancak enfeksiyon sonrası geç dönemde apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Karlberg ve ark., 2011). KKKAV nükleoproteininin mitokondriyal geçirgenliği bastırma işlevine sahip olduğu gösterilmiştir. Bu durum, KKKAV replikasyonunun erken dönemlerinde indüklenen kaspaz aktivasyonunun geciktirilmesine veya bastırılmasına neden olmaktadır. Sonuçta meydana gelen bu değişiklik, virusun enfeksiyon oluşturmaya katkı sağlar. Enfeksiyondan sonraki geç evrelerde, KKKAV'un büyük olasılıkla proinflamatuvar faktörlerin indüksiyonu yoluyla apoptozu indüklediğini ve bunun da ekstrinsik apoptotik yolu aktive ettiği değerlendirilmektedir (Barnwal ve ark., 2016; Karlberg ve ark., 2015). Böylece KKKAV ile indüklenen CPE'nin, apoptozun bir sonucu olabileceği düşünülmektedir (Rodrigues ve ark., 2012).

#### **1.1.6.2. İnsanlarda KKKA immünolojisi**

KKKAV'un vahşi tip farelerde olmasa da, tip I interferon sistemi baskılanmış farelerde ciddi veya ölümcül hastalığa neden olma yeteneği, omurgalı konakçılarda doğuştan gelen bağışıklık yanıtlarının virusun patogenezi sınırlamada önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Bente ve ark., 2010; Zivcec ve ark., 2013). In vitro çalışmalarda, RIG-I KKKAV 'un doğal bir bağışıklık sensörü olduğu kanıtlanmıştır (Habjan ve ark., 2008). Toll benzeri reseptörlerdeki (TLR'ler) polimorfizmler ile hastalığın şiddeti arasında bir korelasyon olduğu bildirilmiştir. Bu da TLR'lerin KKKAV'un kontrolünde önemli bir bağışıklık algılama yolu olabileceğini göstermektedir (Engin ve ark., 2010). Nükleer faktör-kappa B'deki polimorfizmlerin de KKKA riskinde artış ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Arslan ve Engin, 2012). Ayrıca, KKKAV'un L segmenti, doğuştan gelen bağışıklık sinyal yollarında yer alan proteinlerin deubikitinasyonu yoluyla bastırdığı gösterilen bir OTU alanını kodlamaktadır (Hawman ve Feldmann, 2018). İnsanlardaki patogenezi KKKAV'a karşı adaptif immün yanıtların rolü daha az bilinmektedir. Düşük ya da hiç olmayan anti-KKKAV antikor yanıtlarının şiddetli hastalık ve ölüm ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Saksida ve ark., 2010; Shepherd ve ark., 1989). Bununla birlikte, antikor yanıtlarının KKKAV enfeksiyonunun kontrolüne katkıda bulunup

bulunmadığı tam olarak bilinmemektedir. Enfeksiyonu geçirenlerde bile nötralize edici antikor düzeyleri tipik olarak düşüktür (Akinci ve ark., 2013). Örneğin, bir cynomolgus makak modelinde KKKAV enfeksiyonu sonrasında ne antikor titresini ne de antikorların nötralize edici aktivitesi tespit edilebilmiştir (Haddock ve ark., 2018). Aşı çalışmaları, KKKAV'a karşı koruma için hem hücresel hem de humoral yanıt gerektiğini göstermiştir (Dowall ve ark., 2016). T hücrelerinin KKKAV enfeksiyonunun kontrol edilmesindeki rolü net değildir. Periferik kanda dolaşan CD3<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T hücrelerinin seviyelerinin ölümcül seyir ile pozitif korelasyonlu olduğu ve enfeksiyondan sonra hayatta kalanların virusa karşı uzun ömürlü CD8<sup>+</sup> T hücresi yanıtlarına sahip oldukları gösterilmiştir (Hawman ve Feldmann, 2018). Ayrıca, insan lökosit antijen allellerinin, KKKAV'a karşı hem koruma hem duyarlılıkla ilişkili olduğu bulunmuştur.

Doğuştan gelen bağışıklık tepkisi, viruslara karşı savunmanın ilk adımıdır. Çalışmalar, KKKAV'un doğuştan gelen bağışıklık sistemini bozabileceğini ve virusun temizlenmesi için kritik olan adaptif immün yanıtı geciktirebileceğini göstermektedir (Bente ve ark., 2010; Saksida ve ark., 2010; Weber ve Mirazimi, 2008). Virus, kontrolsüz viral replikasyona ve virusun vücuda sistemik yayılmasına yol açan bağışıklık tepkisini bloke eden birçok farklı yola sahiptir. Makrofajlar ve dendritik hücreler, KKKAV enfeksiyonunun çok erken aşamalarında önemli roller üstlenirler (Peyrefitte ve ark., 2010). Proinflamatuvar sitokinleri ve kemokinleri salgılayarak adaptif bağışıklık sisteminin başlatılmasında ve kontrolünde etkili bir role sahiptirler (Connolly-Andersen ve ark., 2009; Peyrefitte ve ark., 2010). İn vitro ve in vivo çalışmalarda, bu hücre tiplerinin kısmen olgunlaştığı gösterilmiştir ve bu, naif T hücrelerinin hazırlanması için önemli bir protein olan majör doku-uyumluluk kompleksi II'nin (MHC II) yukarı regülasyonunun (up-regülasyon) engellemesine yol açmıştır (Bente ve ark., 2010; Peyrefitte ve ark., 2010). KKKAV, IFN'a duyarlı viruslardan biridir (Andersson ve ark., 2008; Bereczky ve ark., 2010; Weber ve Mirazimi, 2008). Bununla birlikte, enfekte olmuş hücrelerde IFN üretimini geciktirir ve bu moleküllerin antiviral etkisini önler. Bu konuda yapılan bir çalışma, IFN'ların KKKAV enfeksiyonunda viral replikasyonu kontrol etmede yetersiz olduğunu göstermiştir (Andersson ve ark., 2008). Diğer taraftan interferon kaynaklı MxA

proteinlerinin KKKAV nükleokapsid proteini ile etkileşime girerek virus replikasyonunun inhibisyonuna neden olduğu gösterilmiştir (Andersson ve ark., 2008; Weber ve Mirazimi, 2008). Bununla birlikte, MxA proteininin, KKKA ile enfekte bireylerde hastalığın ilerlemesini önlemek amacıyla indüklenmesinin çok geç dönemlerde meydana geldiği, dolayısıyla yetersiz kaldığı bildirilmiştir (Andersson ve ark., 2008). KKKAV'un, interferon düzenleyici faktör-3 (IRF-3) 'ün aktivasyon yoluna müdahale ederek IFN yanıtında gecikmeye neden olduğu da ileri sürülmüştür (Andersson ve ark., 2008). Genel olarak, KKKAV ile enfekte olmuş hücreler tarafından IFN indüksiyonu zayıftır ve insanlarda nispeten geçir. Bununla birlikte, etkili IFN yanıtı olan hayvanlarda, KKKA enfeksiyonu zayıflamakta ve hastalık oluşmamaktadır (Bente ve ark., 2010).

#### **1.1.6.3. Hayvanlarda enfeksiyonun patogenezi**

Yapılan serolojik çalışmalar sonunda, KKKAV'un hem vahşi hem de evcil omurgalı hayvanları etkin bir şekilde enfekte edebileceği ortaya konulmasına rağmen, insanlardakine benzer bir klinik hastalık tablosu bildirilmemektedir (Spengler ve ark., 2016). Omurgalı konakçılarda doğuştan gelen immün yanıt bileşenlerinin virusun patogenezi sınırlamada önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Bereczky ve ark., 2010; Zivcec ve ark., 2013). KKKAV ile enfekte olan yabani ve evcil hayvanlar hastalık belirtileri göstermediğinden, virusa maruz kalan türleri belirlemek için temel bilgi kaynağı serolojik araştırmalar olmuştur. Bununla birlikte, omurgalılarından toplanan serumlar üzerinde yapılan testler, enfeksiyonun özellikleri ve kinetiği hakkında yeterli veri sağlamamaktadır (Hawman ve Feldmann, 2018). Bu nedenle, çeşitli vahşi ve evcil hayvanlarda, enfeksiyona duyarlılığı, viremi süresini, antikor tepkisini, klinik hastalığın yokluğunu veya varlığını değerlendirmek için deneysel enfeksiyon çalışmaları yapılmıştır (Spengler ve ark., 2016). Genel olarak, virus küçük memelilerde 2-15 gün replike olmakta ve kısa bir viremi dönemi oluşturduktan sonra anti-KKKAV antikorları gelişmektedir. Bu nedenle, küçük memelilerin uzun vadeli virus rezervuar olarak düşünülmesi olası görülmemektedir. Bununla birlikte, söz konusu hayvanlar virusun ekolojisinde önemli bir rol

oynamakta ve bu hayvanların sayılarındaki artışlar KKKAV hastalık salgınları ile ilişkilendirilmektedir (Spengler ve ark., 2016). KKKAV ekolojisinde rol oynayan küçük memelilere yabani tavşan (*Lepus europaeus*), çalı tavşanı (*Lepus saxatilis*), Cape tarla sincapları (*Xerus inauris*), kirpi (*Hemiechinus auritus*), beyaz kuyruklu sıçanlar (*Mystromys albicaudatus*), kırmızı dağ sıçanları (*Aethomys chryveldatus*), gerbiller (*Gerbilliscus leucogaster*) ve dört şeritli çim fareleri (*Rhabdomys pumilio*) (Spengler ve ark., 2016) örnek olarak verilmektedir. Büyük evcil hayvanların yüksek kene yükünü desteklediği ve keneleri çiftçilere yaklaştırdığı bilinmektedir. Aynı zamanda, kesim sırasında hayvanların üzerinde tutunmuş olan keneler enfekte kan yoluyla veya ezilmesiyle insanları KKKAV'a doğrudan maruz bırakabilmektedir (Leblebicioglu ve ark., 2015). Seroepidemiyolojik araştırmalar, çeşitli evcil türlerin KKKAV'a maruz kaldığını göstermiştir. Küçük memelilere benzer şekilde, çiftlik hayvanları da enfeksiyonundan yaklaşık 1 hafta sonra klinik belirti olmadan, geçici bir viremi ve anti-KKKAV antikorları oluşumuyla enfeksiyon sürecini tamamlamaktadırlar (Spengler ve ark., 2016). Ayrıca, koyunlarda anti-KKKAV antikorlarının kolostral transferi de gösterilmiştir. Sığırlarda, çeşitli çalışmalara göre hayvanlar genellikle klinik bulgu göstermezken (Shepherd ve ark., 1991), yapılan bir çalışmada halsizlik ve iştah azalması ile karakterize hafif bir hastalık geliştirdiği bildirilmiştir (Causey ve ark., 1970). Hayvanlarda meydana gelen enfeksiyonlardan sonra genel olarak 2-7 gün arasında süren bir viremi gözlenmekte ve anti-KKKAV antikorları 13-17. günlerde arasında tespit edilebilir düzeye erişmektedir (Spengler ve ark., 2016).

## 1.2. MikroRNA (miRNA)

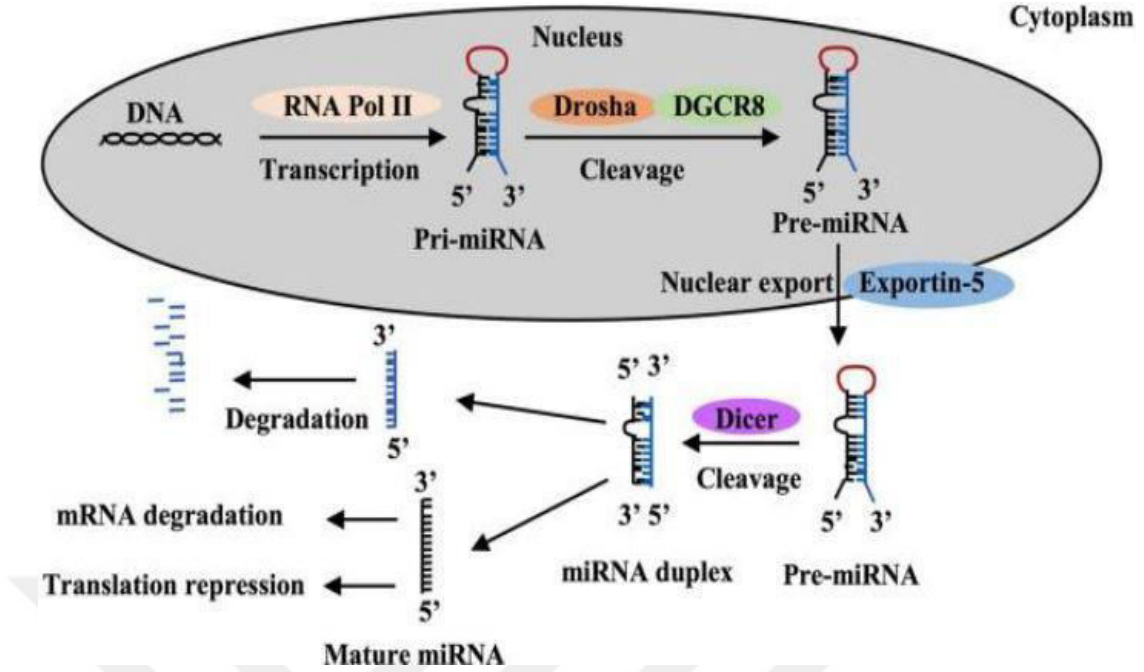
1993 yılında, *Caenorhabditis elegans*ta bulunan lin-14 messenger RNA (mRNA) ailesinin 3'-çevrilmeyen bölgesine (UTR) tamamlayıcı (complementary) olan küçük bir RNA keşfedildi (Lee ve ark., 1993). MiRNA'lar, protein sentezini baskılamak veya eksprese edilmiş transkriptlerin bozumasını hızlandırmak için hedef mRNA'ların 3'UTR'sine bağlanan, herhangi bir bilgi kodlamayan, 19-24 nt uzunluğunda ve mRNA transkriptlerinin %60'ını etkileyen bir RNA sınıfıdır

(Nguyen ve ark., 2018). Birden fazla miRNA, bağlanma bölgelerindeki üst üste gelme ihtimalinden dolayı aynı proteini hedefleyebilmektedir. Bu tür miRNA'lar çoğunlukla aynı miRNA ailesine aittir ve sıklıkla spesifik hücresel sinyal yollarının düzenlenmesi amacıyla bir araya gelirler (Swaminathan ve ark., 2013). Keşiflerinden bu yana miRNA çalışmaları, biyolojik bilimlerdeki birçok alanda devrim yaratmıştır. Örneğin, miRNA'lar üzerine yapılan çalışmalar bize in vitro ve in vivo sistemleri manipüle etmek için değerli moleküler araçlar sağlamıştır; miRNA'lar, çeşitli hastalıklar için güvenilir biyolojik belirteçler olarak ortaya çıkmaktadır ve son zamanlarda miRNA inhibitörlerinin geliştirilmesi veya miRNA'ların aşırı ekspresyonu, bulaşıcı hastalıkları ve kanseri tedavi etmek için yeni bir ilaç sınıfının yolunu açmıştır (Swaminathan ve ark., 2013). MikroRNA'ların, mikroorganizmaların konak transkriptomunu ve proteomunu çeşitli yollarla değiştirdiği bilinmektedir. Örneğin, herpesviruslar ve Hepatit C virusu tarafından uyarılan miRNA'lar, konakçının bağışıklık sistemini baskılayarak bu viruslar için bir kaçış mekanizması olarak etki etmelerini ve bu miRNA'ların tedavi hedefleri olarak seçilmelerini sağlamıştır (Janssen ve ark., 2013). MiRNA'nın yukarı yönlü gen regülasyonu çoğunlukla immün yanıtı zayıflatacak organizasyonlara neden olsa da, bunun bir patojen kaçış mekanizması olarak mı yoksa immünopatolojiden kaçınmak için konakçı tarafında bir hayatta kalma mekanizması olarak anlaşılıp anlaşılmayacağı henüz açık değildir (Lewandowska-Sabat ve ark., 2018).

### **1.2.1. MikroRNA'ların biyogenezi**

MikroRNA'lar memeli genomundan ya bağımsız olarak ya da protein kodlayan genlerin intronlarına özgü birçok bölgesi içinde kodlanırlar (Swaminathan ve ark., 2013). Tipik bir miRNA biyogenezi, çekirdekte spesifik bir transkripsiyon faktörünün bağlanmasıyla başlar ve bu ilk süreç, protein kodlayan bir konakçı mRNA transkripsiyonuna çok benzer. RNA polimeraz II'nin (veya nadiren RNA polimeraz III) aracılığı ile, uzun sap-halka benzeri yapılar içeren birincil miRNA transkriptleri (pri-miRNA'lar) üretilir (Şekil 1.6) (Lee ve ark., 2004). Bundan sonra 5'-cap yapı oluşturup intronları çıkarılır ve normal konak mRNA transkriptlerine

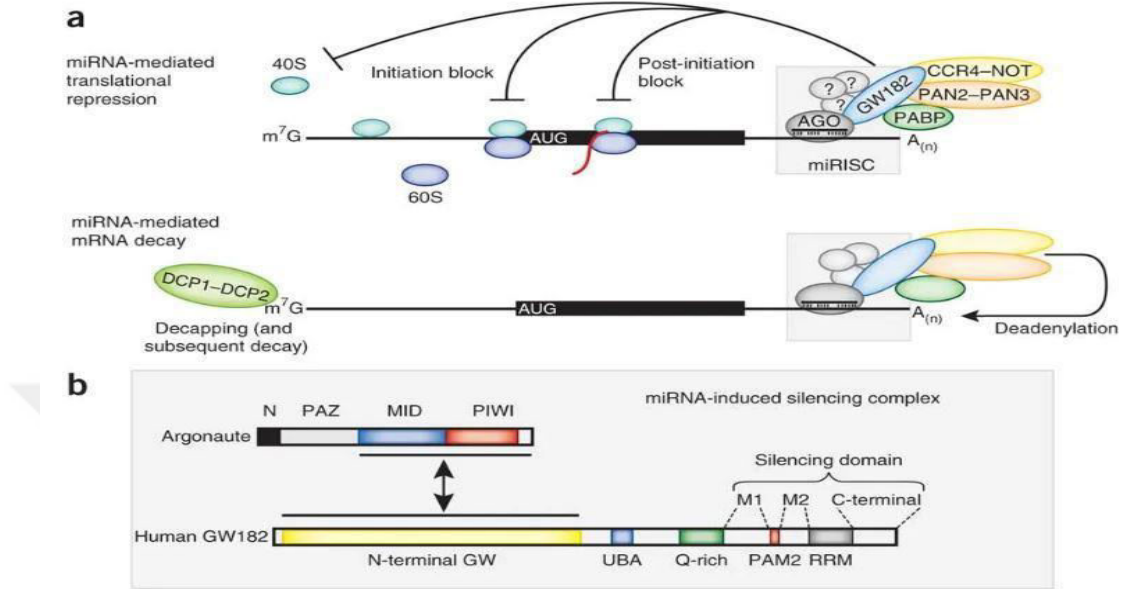
benzer bir 3'-poli A kuyruğu eklenir (Chen ve Rajewsky, 2007). Yaklaşık 1–2 Kb uzunluğunda olan pri-miRNA transkriptlerinin nükleer işlenmesi, Drosha adı verilen RNase III nükleaz süper ailesinin bir üyesinden ve DGCR8 (DiGeorge sendromu kritik bölge 8) adı verilen çift sarmallı RNA-bağlayıcı proteinden oluşan bir protein mikroişlemci kompleksi tarafından gerçekleştirilir (Swaminathan ve ark., 2013). Drosha/DGCR8 aracılı kesim işlemi, bir dinükleotid 3p-UTR çıkıntısına sahip miRNA transkriptlerine neden olur ve bu bölünmüş ürün, öncü miRNA (pre-miRNA) olarak adlandırılır. Bu 3p-UTR dinükleotid çıkıntısı, nükleer eksport proteini olan exportin-5 için bir tanıma sekansı olarak hizmet eder. Exportin-5, çekirdekteki pre-miRNA'ya bağlanır ve pre-miRNA'yı sitoplazmaya aktarır (Leisegang ve ark., 2012). Sitoplazmaya geçildikten sonra, Dicer adı verilen başka bir RNase III proteininden ve çok alanlı bir insan TAR elementi bağlayıcı proteinden oluşan bir kompleks, miRNA'yı ve onun ters tamamlayıcısını (miRNA\*) içeren bir 20-25 baz çiftli dupleksi oluşturmak için pre-miRNA'lara etki eder (Koscianska ve ark., 2011). Diğer taraftan fonksiyonel düzenleyici RNA'ları üretebilen kanonik olmayan miRNA biyogenez yollarının varlığı da bildirilmiştir. Örneğin, "mirtronlar" Drosha ve DGCR8 yerine spliceozomla kesilen miRNA'lardır (Swaminathan ve ark., 2013). Kanonik olarak miRNA'lar, tohum dizisi olarak adlandırılan miRNA 5' ucunun 2–7 nükleotitleri ile baz eşleşmesi yoluyla mRNA'ların 3' çevrilmemiş bölgesini (UTR) veya kodlama sekansını hedefler. MiRNA bağlanma aktivitesinin yaklaşık %60'ı kanonik değildir ve miRNA dizilerinin tohumun dışında yer alan ve/veya uyumsuzluklar dahil olmak üzere tohum benzeri motifleri içerir (Bruscella ve ark., 2017).



Şekil 1.6. MiRNA'ların biogenezisi (Nguyen ve ark., 2018).

MiRNA aracılı transkripsiyon inhibisyonunun veya mRNA bozulmasının çeşitli yolları vardır. MiRISC, eIF4E cap tanıma ve 40S küçük ribozomal alt birim alımına müdahale ederek veya 60S alt biriminin birleşmesini antagonize ederek ve 80S ribozomal kompleks oluşumunu önleyerek transkripsiyonun başlamasını inhibe eder (Şekil 1.7a) (Fabian ve Sonenberg, 2012). MiRISC, ribozom uzamasını inhibe ederek de transkripsiyonunu inhibe edebilir. mRNA bozulması ise, deadenilasyon yolu ile gerçekleştirilir (Şekil 1.7a). MiRISC, poli(A) kuyruğunun deadenilasyonunu kolaylaştırmak için CCR4 – NOT ve PAN2 – PAN3 deadenilaz kompleksleri ile etkileşime girer. Deadenilasyonun ardından, 5-terminal başlığı (m7G) DCP– DCP2 kompleksinin kapaklarının açılmasıyla çıkarılır ve mRNA bozulması bir ekzonükleaz tarafından gerçekleştirilir (Fabian ve Sonenberg, 2012). MiRNA'lar, hedef mRNA'ları susturan miRISC'in nükleik asit çekirdeği olarak görev görürler. Bu nedenle miRNA dizisi, belirli bir transkriptom içinde hangi mRNA'larla potansiyel olarak etkileşime gireceğini belirlerken, hedef mRNA'ların susturulmasını miRISC'nin protein bileşenleri yürütür. Memeli miRISC'nin temel bileşenleri, dört Argonaute proteininden (AGO1–4) ve Argonaute'ya bağlı GW182'den oluşur. 'Susturma alanı' olarak adlandırılan GW182 C-terminal bölgesi güçlü etkilidir (Şekil 1.7b) (Fabian ve Sonenberg, 2012). Ek bir C-terminal alfa sarmalının varlığı nedeniyle

RNA'yı bağlamaması beklenen bir RNA tanıma motifini çevreleyen orta ve C-terminal alt alanlarına bölünmüştür (Şekil 1.7b) (Fabian ve Sonenberg, 2012).



**Şekil 1.7.** MiRISC aracılı gen susturma. (a) miRNA aracılı translasyonel baskılama ve mRNA bozunmasının şematik gösterimi. (b) miRISC bileşenleri Argonaute ve GW182'nin yapısal organizasyonu (Fabian ve Sonenberg, 2012).

AGO proteinleri ile doğrudan etkileşime ek olarak, GW182 proteinleri, çok sayıda susturma efektörlerini bağlayan moleküler platformu olarak da hizmet eder. Poli-A bağlayıcı proteine (PABP) bağlanması, PABP-eIF4G birleşmesine ve mRNA döngüsellemesine müdahale ederek mRNA çevirisini inhibe eder. Ek olarak, GW182-PABP etkileşimi miRNA aracılı deadenilasyonu arttırabilir (Fabian ve Sonenberg, 2012). Özetle, çeşitli çalışmalardan elde edilen veriler, miRNA'ların iki aşamalı bir bastırma modu yoluyla hareket edebildiğini, ilk önce translasyonu deadenilasyondan bağımsız bir şekilde engellediğini ve ardından hedeflenen mRNA'ların deadenilasyonuna, kapaklarının kesilmesine ve istikrarsızlığına neden olabileceğini göstermektedir.

### 1.2.2. Sığırlarda miRNA yapısı

Sığır dokularında miRNA varlığını gösteren ilk çalışma 2007'de gerçekleştirilmiştir (Gu ve ark., 2007). 2019'daki bir araştırmaya göre toplam 2300 gerçek insan olgun miRNA'sını tahmin edilir ve bunlardan 1115'i o anda miRBase V22'de açıklanırken (Alles ve ark., 2019), sığır (*Bos Taurus*) genomunda ise 30 kromozom üzerinde kodlanmış 793'ten fazla olgun miRNA bildirilmiştir (Lawless ve ark., 2014). Bununla birlikte, farklı sığır dokularındaki miRNA ekspresyon profillerine ilişkin bilgiler hala sınırlıdır. İnsanlarda bağışıklık ile ilgili en yaygın çalışılan miRNA'ların sığırlarda da evrimsel ve işlevsel korunma altında oldukları gösterilmiştir. Örneğin, insan hsa-miR-155 sığır bta-miR-155 ile mükemmel bir homoloji sergilemektedir (Ceppi ve ark., 2009). Bu miRNA insanlarda anti-inflamatuar yolunu hedefleyerek görev yapmaktadır. Türler arasında miRNA'lar genellikle benzerlik göstermelerine rağmen, farklı fonksiyonel sonuçları olabilen önemli farklılıkları da taşıyabilirler. Üstelik miRNA'lar tipik olarak dokuya özgüdür ve türler arasında yüksek oranda korunurken, hedefleri her zaman korunmaz. Bu nedenle türe özgü haritalama miRNA düzenlemesini anlamak için önemlidir (Scheel ve ark., 2017). Sığır genomunda da tür-spesifik birçok miRNA ailesi bulunmaktadır. Örneğin, Bta-miR-2284 ve bta-miR-2285 aileleri, sığır genomu içinde 100'den fazla olgun miRNA'yi kodlamasına karşın ne insanda ne farede buna homolog miRNA'lar bildirilmemiştir (Lawless ve ark., 2014). Sığırlardaki viral enfeksiyonların miRNA ile ilişkili bağlantıları hakkında bilinenler oldukça sınırlıdır. Viral enfeksiyonlarda bağışıklık ile ilgili dokularda sığır miRNA ekspresyonu hakkında da yeterli bilgi bulunmamaktadır (Coutinho ve ark., 2007). Örneğin, Madin-Darby sığır böbrek (MDBK) hücreleri, sığır viral diyare virusu (BVDV) ile enfekte edildikten sonra, bta-miR-29b'nin önemli ölçüde artan ifadesi bildirilmiştir. Bta-miR-29b'nin aşırı ekspresyonu, BVDV enfeksiyonu ile ilişkili otofajinin zayıflamasına ve otofajiyle ilişkili iki anahtar proteinin (ATG14 ve ATG9A) ifadesinde azalmalara neden olmuştur (Fu ve ark., 2015). Başka bir miRNA, bta-miR-375, sığır kümülüs hücrelerinin proliferasyon yeteneğini zayıflatıp, apoptoz oranını arttırmıştır (Li ve ark., 2018). Kanonik miR-17 ve let-7 bağlanma bölgeleri BVDV genomunun 3'UTR'sinde gösterilmiştir (Bernier ve Sagan, 2018). Enfekte olmamış kontrollerle

karşılaştırılan şap virusu (FMDV) ile akut enfekte sığırlardan toplanan kan serumlarında 7 sığır miRNA'sının (bta-miR-17-5p, bta-miR-146a, bta-miR-144, bta-miR-34a, bta-miR-369-3p, bta-miR-497 ve bta-miR-22-5p) artan oranda ifade edildiği gösterilmiştir (Stenfeldt ve ark., 2017).

### 1.2.3. miRNA dayalı antiviraller

RNA interferans (RNAi) aracılı gen manipülasyonu, viral enfeksiyonlar dahil olmak üzere birçok hastalık için terapötik bir strateji olarak kullanılmaktadır (Angaji ve ark., 2010; Aparicio ve ark., 2010). Bir miRNA'nın, aynı veya farklı hücresel yollara veya işlemlere katılabilen çok sayıda hedef proteini modüle edebilmesi nedeniyle miRNA'ları manipüle etmek, gen terapisi için uygun bir stratejidir. En çok bilinen miRNA'ya dayalı antiviraller: 3-kolesterol-konjuge olan, miRNA fonksiyonunu inhibe eden 2'-O-metil-modifiye antisens oligonükleotid olan 'Antagomir'; miRNA fonksiyonunu inhibe eden kimyasal olarak modifiye edilmiş, tek sarmallı antisens oligonükleotidler olan 'antimiR'; 'miRNA mimikler', endojen miRNA'nın işlevini taklit eden küçük, kimyasal olarak değiştirilmiş çift sarmallı RNA'lar olarak verilebilir (Bruscella ve ark., 2017). MiRNA değiştirme tedavisi adı verilen yöntemle, hastalıklı dokuya sentetik bir miRNA eklenerek kayıp veya azalan şekilde regüle edilmiş bir miRNA'nın işlevinin geri getirilmesi suretiyle terapötik yaklaşım sergilenebilmektedir. Farklı bir yaklaşımda ise virus replikasyonunu spesifik hücre tipleriyle sınırlamak ve/veya virus tropizmini modüle etmek için miRNA hedef bölgeleri viral genomlara klonlanabilmekte veya konakçı hücre işlevlerini değiştirebilmek için virislara spesifik miRNA'lar düzenlenebilmektedir (Swaminathan ve ark., 2013). Antiviral terapi alanındaki son gelişmelerde, viral yaşam döngüsünü bloke etmek için bir viral bileşeni spesifik olarak inhibe etmek ve böylece viral üretimi durdurmak hedeflenmektedir. Böyle bir yaklaşım Hepatitis C virusunda (HCV) uygulanmıştır. MiR-122 (miravirsen) spesifik bir HCV inhibitörü olarak insanlarda klinik denemelere alınmıştır (Janssen ve ark., 2013). Yakın tarihli bir çalışmada, miR-122'yi antagonize eden ve hepatosit hedefli N-asetilgalaktozamin ile konjuge bir oligonükleotid olan RG-101'in tek bir uygulamadan sonra hastalarda

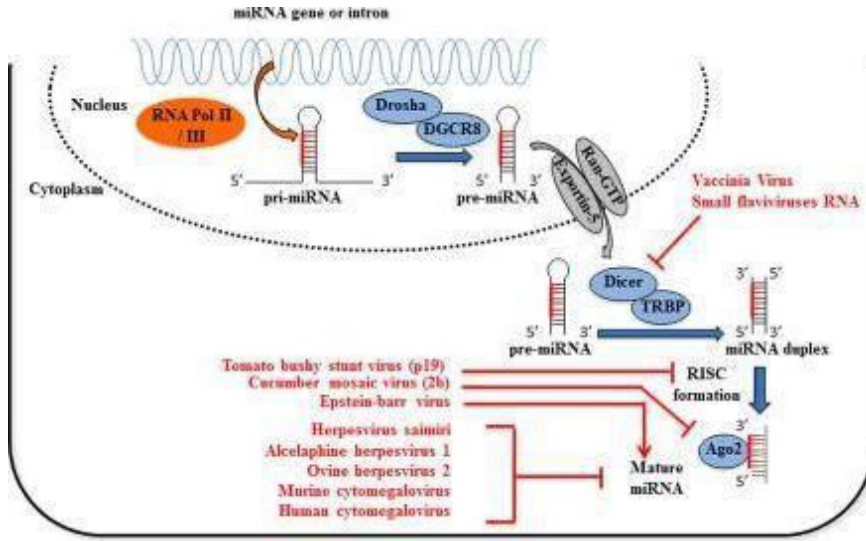
HCV replikasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (van der Ree ve ark., 2017). MiRNA'ya dayalı tedavilerin uygulanmasında bazı sorunlar da vardır. Bunların başında enfekte bölgelere toksik olmadan ve yeterli miktarda verilmeleri gelmektedir. Dahası, konakçı miRNA'ların uzun vadeli baskılanması / aşırı ekspresyonu ile ilişkili yan etkiler, bu tür stratejilerin klinik kullanımını sınırlayabilmektedir (Bruscella ve ark., 2017).

#### **1.2.4. MiRNA'lar ve Virusların Etkileşimi**

MikroRNA'ların, hücrel antiviral yanıtlar da dahil olmak üzere virusların replikasyonunda ve yayılmasında ve/veya düzenleyici yollarla viral enfeksiyonların desteklenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir. Viral genomlar tarafından kodlanan miRNA'ların konakçı hücrelerde eksprese edilebildiği ve yaşam döngüsüne ve enfeksiyonun hücrel sonuçlarına katılabileceği de gösterilmiştir (Swaminathan ve ark., 2013). RNA viruslarının, verimli replikasyon için spesifik miRNA'ların ekspresyonunu düzenleyebilmesi önemli bir stratejidir. Konakçıya ait miRNA'lar, antiviral yanıtları indükleyerek, hücrel tropizmi modüle ederek veya viral yaşam döngülerinin çeşitli aşamalarında kolaylaştırıcı bir rol oynayarak viral enfeksiyonları etkilerler. Bununla birlikte, hücrel miRNA'lar birden fazla işlemi kontrol ettiğinden, virusar tarafından ele geçirilmeleri çeşitli hücrel mRNA'ların azalmasına yol açarak anormal konakçı protein sentezine neden olurlar (Li ve ark., 2014).

Viral enfeksiyonlar, antiviral yanıtta dahil olan konak miRNA'larının transkripsiyonunu indükleyebilir. Örneğin, patojen tanıma reseptörlerinin (PRR'ler) virusa bağımlı aktivasyonu, doğuştan gelen bağışıklığı geliştirebilen miRNA'ların ekspresyonunu indükleyebilir. Vesiküler stomatit virusu (VSV) enfeksiyonu sırasında miR-155 ve miR-223 ekspresyonu, makrofajlarda RIG-I/Jun N-terminal kinase (JNK) / aktif B hücrelerinin nükleer faktör kappa-hafif zincir-güçlendiricisi (NF-KB)'ye bağı bir yol indüklenir (Bruscella ve ark., 2017). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, KKKK virus miR-3940-5p indüklenip T-hücre aktivitesi

artırarak sitokin reseptörü IL- 2RG'yi hedefleyen önemli bir düzenleyici mekanizmada dahil olmaktadır. Aynı çalışmada Hepatosit büyüme faktörü ile düzenlenen tirozin kinaz substratını (HRS), Nükleer Faktör İnhibitörü Kappa-B Kinaz Alt Birimi Epsilon'u (IKB kinaz) ve Temd9'u hedefleyen miR-296 da artış olduğu gösterilmiştir (Arslan ve ark., 2019a). Başka bir çalışmada ise KKKAV ile enfekte olan bireylerde, immün hücre aktivasyonu, hücrel adhezyon ve sinyal transdüksiyon fonksiyonları ile ilişkili hsa-miR-144, hsa-miR-451, hsa-miR-486-5p, hsa-miR-608, hsa-miR-363, hsa-miR-31, hsa-miR-32, hsa-miR-575, hsa-miR-632 ve hsa-miR-541'nin yukarı regülasyonu gösterilmiştir (Demir ve ark., 2017). Viral enfeksiyonlar, antiviral yanıtta dahil olan konak miRNA'larının olgunlaşmasını da engelleyebilir. Örneğin, RNA susturmanın viral baskılayıcıları olarak adlandırılan spesifik virülans faktörlerine sahip viruslar küçük RNA işleme, stabilite ve AGO aracılı aktiviteleri dahil olmak üzere konak susturma mekanizmasının çeşitli bileşenlerini hedefleyebilirler (Bruscella ve ark., 2017). Batı Nil virusu (WNV), Sarı humma virusu ve Dang virusu (DENV) dahil olmak üzere, flaviviruslar, dsRNA bağlayıcı proteini olan Dicer ve AGO2'nin ayrılmasını indükleyen kodlayıcı olmayan subgenomik flavivirus RNA'nın birikimi yoluyla miRNA işleme mekanizmasına müdahale eder (Şekil 1.8) (Bruscella ve ark., 2017). Kesin mekanizma bilinmemekte birlikte, KKKAV birçok konakçı miRNA'yı da azalan yönde regüle etmektedir. Örneğin, miR-144-3p, inflamatuvar yanıtın en önemli yollarından biri olan Toll benzeri reseptör yolunda ve miR-148a, I $\kappa$ B- $\beta$ , nükleer faktör- $\kappa$ B, interlökin 6 ve Tümör nekroz faktörü  $\alpha$  ifadesinde önemli bir rol oynar. Bu iki miRNA'nın KKKAV enfeksiyonun sırasında aşağı doğru regüle olduğu gösterilmiştir (Arslan ve ark., 2019b). Dahası, hsa-miR-146a'nın IL-8 ve IRAK1 gibi inflamatuvar faktörlerin ekspresyonunu düzenlediği tahmin edilmektedir; bu miRNA'nın bir KKKAV ile ilgili çalışmada gözlenen aşağı regülasyonu, bu inflamatuvar faktörlerin üretimini artırma eğilimindedir (Demir ve ark., 2017). Ek olarak, antiinflamatuvar bir unsur olarak işlev gören hsa-miR-493'ün azalmış seviyeleri, KKKAV'da gözlenen inflamasyona ve endotelial hastalığa yol açan sitokin profili ile ilişkilendirilebilmektedir (Demir ve ark., 2017).



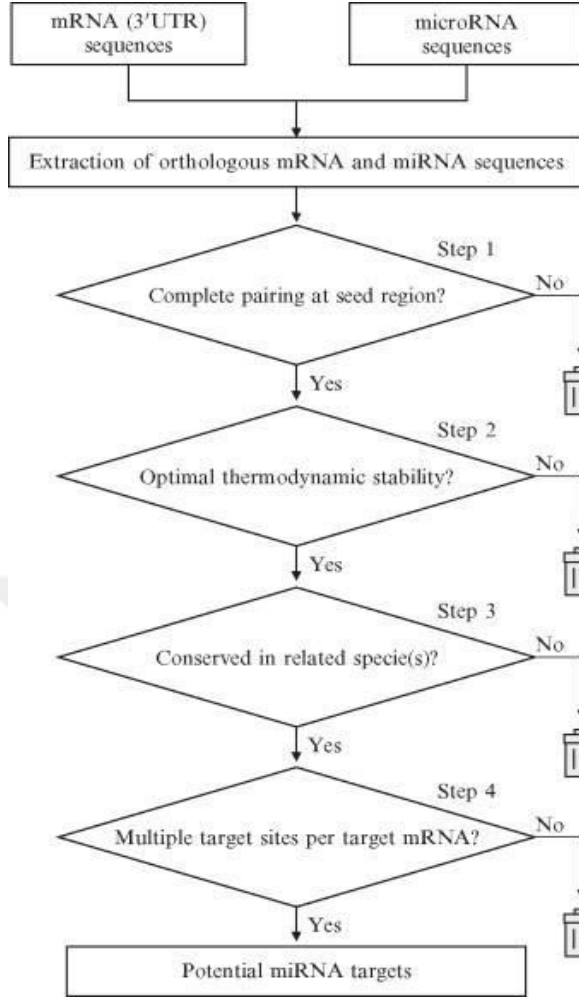
Şekil 1.8. Viruslar konakçı miRNA biyogenezine müdahale ederler (Bruscella ve ark., 2017).

Konak miRNA'lar bazı viral RNA'ların üretimini kontrol edebilmektedir. Konakçı miRNA'ların viral yaşam döngüsünü desteklemek veya inhibe etmek için viral RNA'ları doğrudan hedeflediği bildirilmiştir. Örneğin, DENV-2 ile enfekte insan EAhy926 hücrelerinde miR-223, mikrotübül destabilize edici protein stathmin 1'i aşağı regüle eder, böylece viral replikasyonu inhibe eder (Wu ve ark., 2014).

### 1.2.5. Hedef Gen Tahmini

MiRNA hedeflerini belirlemek için, varsayılan miRNA-mRNA dupleksin sekans tamamlayıcılığına ve/veya yapısal stabilitesine dayanan birçok yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemler, potansiyel hedef genlerin bir listesini oluşturabilmesine rağmen, sonuçlar yüksek oranda yanlış pozitif ve yanlış negatifler içerebilmektedir (Rajewsky, 2006). Dahası, farklı yöntemler kullanılarak tahmin edilen sonuçlar genellikle tutarsızdır (Rajewsky, 2006). Bunun en önemli nedeni, miRNA bağlanma alanlarının küçük olması ve bu nedenle istatistiksel olarak anlamlı tahminleri desteklememesidir. Dolayısıyla da algoritmalarındaki küçük farklar sonuçlarda büyük bir sapmaya yol açabilmektedir (Rajewsky, 2006). Ayrıca, biyoenformatik tahminler statiktir ve belirli bir miRNA'nın tahmin edilen hedefleri bazı durumlarda hiç ifade edilmeyebilir. Kullanılan tüm yöntemlerin genel prensibi; eğer bir gen bir miRNA tarafından düzenleniyorsa, genin ekspresyon seviyeleri ile

miRNA arasında bir korelasyon olması gerektiğidir (Le ve ark., 2015). Modeli oluştururken her yöntemin genellikle veriler üzerinde bir çeşit varsayımı vardır. Bu varsayımlar bazı veri kümeleri için uygun olsada diğerklerinde geçerli olmayabilir. Örneğın, korelasyona dayalı yöntemler, değışkenler arasında doğrusal ilişkiler olduğunu varsayar. Ancak gerçekte, birçok ilişki doğrusal değildir ve hatta doğrusal ilişkiler kullanılarak tahmin edilemez. Bu nedenle, temel ilişkiler doğrusal olmadığında bu yöntemler iyi performans göstermeyebilir (Le ve ark., 2015). Birden fazla program tarafından tahmin edilen bir hedefin, diğerk hedeflere göre doğru olma olasılığının daha yüksek olduğu sonucuna varılabilir (Witkos ve ark., 2011). MiRNA hedef genlerini tanımlayan hesaplama algoritmaları geliştirmek için, deneysel kanıtlar da önemlidir. Örneğın, miRNA'lar ve hedefleri arasındaki baz eşleşmesi miRNA'nın 5' ucunda kararlı bağlanma gibi özellikler açısından analiz edilebilir ve kontrol edilebilir. Hedef gen tahmini sırasında miRNA-mRNA duplekslerinin termodinamik analizi, dupleks oluşumunun serbest enerjisinin hesaplanması ve bağlanmanın termodinamiğinin değıerlendirilmesi sorgulanmaktadır (Watanabe ve ark., 2007). Türler arası dizi karşılaştırması ile hedef dizinin ilgili türler arasında evrimsel olarak korunup korunmadığını da değıerlendirilmektedir. Son olarak, miRNA için hedef alan sayısı sayılır (Şekil 1.9) (Watanabe ve ark., 2007). Hedef gen bölgesi tahmini için kullanılan başlıca dört algoritma vardır:



Şekil 1.9. MiRNA hedeflerinin seçim adımları (Watanabe ve ark., 2007).

#### 1.2.5.1. TargetScan (Hedef Tarama)

TargetScan, hem sığır hem de insan hedef tahmini yapabilen bir online algoritmadır. Hedef arama, 6-nt uzunluğunda miRNA tohum bölgesini tamamlayan bölgelerde gerçekleşir (Witkos ve ark., 2011). Tohum bölgesi ile eşleme türü, tohum bölgesi dışındaki eşleştirmeler, hedef bölgenin 30 nt yukarı ve aşağı AU içeriği ve hedef genin UTR'sinin en yakın ucuna olan mesafesi gibi çeşitli parametreler sonuç skoruna etki etmektedir (Grimson ve ark., 2007). MiRNA bağlanma bölgelerindeki ortolog 3'UTR'ler arasında tohum bölgelerinin korunması da sonuç skorunu önemli derecede değiştirebilmektedir (Witkos ve ark., 2011).

#### **1.2.5.2. DIANA-microT**

Bu algoritma, 3'UTR boyunca 38 nt uzunlukta bir çerçeveyi taramaktadır. Uyumsuzluklara izin veren potansiyel miRNA bağlanmasının minimum enerjisi ölçülmekte ve 3'UTR bölgesine bağlanan %100 tamamlayıcı dizinin enerjisi ile karşılaştırılmaktadır (Witkos ve ark., 2011). MiRNA'nın 5' bölgesinde 7, 8 veya 9 nt uzunluğunda tamamlayıcılık gerektirir. Puanlama için korunmuş hizalama kullanır, ancak korunmamış bölgeleri de dikkate alır. Ayrıca kullanıcılara, eşleştirme ve koruma profiline bağlı olarak her bir sonuç için bir yüzde olasılık verir (Witkos ve ark., 2011).

#### **1.2.5.3. MirTarget miRDB**

MirTarget, her aday hedef bölge için bir olasılık puanı oluşturur. Bu puan, tahmin sonuçlarının istatistiksel güvenilirliğini yansıtır. MirTarget, tek bir tahmin modelinde birden çok miRNA tohum bölgelerin analizini ve tohum bağlama alanlarının türler arası korumasının değerlendirmesini yapar. MiRDB'nin güncel versiyonunda 3,5 milyon gen hedefinin, beş türde 7000 miRNA tarafından düzenlendiği gösterilmiştir (Chen ve Wang, 2019).

#### **1.2.5.4. miRanda**

MiRanda algoritması, miRNA'ların tamamlayıcılığının 3'UTR bölgeleri ile karşılaştırılmasına dayanır. Doubleks yapının bağlanma enerjisi, tüm hedef bölgenin evrimsel korunması ve 3'UTR içindeki pozisyonu hesaplanır ve baz çiftleri ve boşluk cezaları için ağırlıklı eşleşme ve uyumsuzluk puanlarının toplamı olan nihai bir sonucu hesaba katar. 3'UTR içinde çoklu bağlanma sitelerine sahip miRNA'lar yüksek puan alırlar (Witkos ve ark., 2011).

### 1.2.6. Gen Ontolojisi ve Pathway Analizi

Çeşitli model organizmalardan tüm genom dizilerinin mevcudiyeti ve artan deneysel veriler biyolojik araştırmalarda bir sistematik yaklaşıma ihtiyaç duymuştur. Böyle bir yaklaşım, tek tek genlerin ötesine geçmemize ve karmaşık bir biyolojik sistemde birden çok proteinin birlikte nasıl çalıştığını, bir hücre içinde nasıl iletişim kurduklarını incelememizi sağlamaktadır. Biyolojik yol ağlarını incelemek için hesaplama araçlarının ve algoritmaların geliştirilmesi, araştırma verilerinin analiz edilmesine yardımcı olmada büyük ilerleme göstermiştir (Consortium, 2006). Bir ontoloji, her biri dört ana unsurla tanımlanan devamlılıklardan (varlıklar veya var olan şeyler) ve olaylardan (olaylar, süreçler veya faaliyetler) oluşur: bireyler, sınıflar, nitelikler ve ilişkiler olarak sınıflandırılır (Consortium, 2006). Gen Ontoloji (GO) biyolojik bilginin resmi bir temsili olarak tasarlanmış ilk ontoloji olarak kabul edilir (Ashburner ve ark., 2000). Moleküler işlev, biyolojik süreç ve hücresel bileşen olarak üç bilgi alanından oluşur. Geçtiğimiz on yıl içinde, 240'tan fazla yolak veritabanı geliştirilmiştir (<http://www.pathguide.org/>). Yolak verileri genellikle üç ana sınıfı içerir. Birinci sınıf, yolaklarda yer alan molekülleri içerir. İkinci sınıf, bu moleküllerin dahil olduğu kimyasal reaksiyonları içerir. Üçüncü sınıf, reaksiyonların yerini tanımlar. Bir yol ontolojisi yalnızca bu üç veri sınıfını temsil etmemeli, aynı zamanda bunlar arasındaki karmaşık ilişkileri de göstermelidir. Yol veri tabanlarının karşılaştırılması (Çizelge 1.1.), BioCyc ve Kyoto Genler ve Genom Ansiklopedisi (KEGG) veri tabanının metabolik yollara daha çok odaklandığını gösterirken, Hiyerarşiler yolak veri tabanı ile tümleştirme Ağ Nesneleri (INOH) ve Sinyal İletimi Bilgi Ortamı yalnızca sinyal yollarına odaklanır (Mi ve Thomas, 2009).

**Çizelge 1.1.** Yolak veri tabanlarının karşılaştırılması (Mi ve Thomas, 2009).

|                               | BioCarta          | BioCyc                            | Ingenuity   | INOH                                                                       | KEGG                                  | PANTHER                         | PID               | Reactome                                | STKE                       |
|-------------------------------|-------------------|-----------------------------------|-------------|----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|-------------------|-----------------------------------------|----------------------------|
| Pathway Type                  | M, S              | M                                 | M, S        | S                                                                          | M                                     | M, S                            | M, S              | M, S                                    | S                          |
| Data Type                     | Relational        | Reaction                          | Relational  | Relational and Reaction                                                    | Relational                            | Reaction                        | Reaction          | Reaction                                | Relational                 |
| Standard Format               | Bio PAX           | Bio PAX, SBML                     | N/A         | SBML                                                                       | Bio PAX                               | SBML                            | Bio PAX           | BIO PAX, SBML                           | Bio PAX                    |
| Link to protein sequences     | Yes               | Yes                               | Yes         | Yes                                                                        | Yes                                   | Yes                             | Yes               | Yes                                     | No                         |
| Link to evolution Information | No                | No                                | No          | No                                                                         | No                                    | Yes                             | No                | No                                      | No                         |
| Literature Evidence           | N/A               | Link to reaction                  |             | Link to sequence and reaction                                              | N/A                                   | Link to sequence and reaction   |                   | Link to reaction                        | Link to reaction           |
| Community Curation tools      | No                | Yes                               | No          | No                                                                         | No                                    | Yes                             | No                | No                                      | No                         |
| Analysis tools                | No                |                                   | Yes         | No                                                                         | No                                    | Yes                             | No                | No                                      | No                         |
| Availability                  | Free to all users | Free to Academic users            | Free to use | Free to all users                                                          | Free to all users                     | Free to all users               | Free to all users | Free to all users                       | Free to Academic users     |
| References                    | N/A               | <a href="#">Karp et al., 2005</a> | N/A         | <a href="#">Fukuda et al., 2004</a> ; <a href="#">Kushida et al., 2006</a> | <a href="#">Kanehisa et al., 2006</a> | <a href="#">Mi et al., 2007</a> | N/A               | <a href="#">Joshi-Tope et al., 2005</a> | <a href="#">Gough 2002</a> |

Abbreviations

M: metabolic pathway

S: signaling pathway

### 1.2.6.1. PANTHER

Evrimsel İlişkiler Üzerinden Protein Analizi (PANTHER), protein dizisi evrimini spesifik protein fonksiyonlarının ve biyolojik rollerin evrimiyle ilişkilendirmek için ücretsiz olarak elde edilebilen kapsamlı bir yazılım sistemidir (Mi ve ark., 2007). Sistemin özü, bilişimsel algoritmalar tarafından oluşturulan ve ontoloji terimlerini ilişkilendirmek için filogenetik olarak tanımlanmış protein aileleri ve alt ailelerinden oluşan geniş bir koleksiyondur. PANTHER Pathway, PANTHER içindeki modüllerden biridir (Mi ve ark., 2007). PANTHER Pathway ontolojisi, yolları, bileşenlerini ve aralarındaki ilişkileri tanımlamak için kontrollü kelime dağarcığı kullanır. PANTHER Pathway ontolojisinin dört anahtar sınıfı vardır. Pathway sınıfı, her yolun kavramını ve kapsamını temsil eden bir olaydır. Genellikle metabolik yollarda çok iyi tanımlanır. Molekül sınıfı, bir yolda aynı mekanik rolü oynayan belirli bir molekül sınıfını temsil eden bir devamlılıktır. Beş molekül alt sınıfı vardır: proteinler, genler/DNA, RNA, basit moleküller (küçük organik, inorganik veya sentetik molekül) ve iyonlar. Reaksiyon sınıfı, çeşitli molekül sınıfları arasındaki biyokimyasal ilişkileri temsil eden bir durumdur. Tipik örnekler arasında geçiş, taşıma, kompleks oluşumu/ayırışma, kataliz, modülasyon, uyarım transkripsiyonel aktivasyonu/inhibisyonu ve benzeri yer alır. Hücre tipi veya

hücre altı bölme sınıfı, reaksiyonun meydana geldiği yeri / yerleri temsil eden bir devamlılıktır (Mi ve Thomas, 2009).

### **1.2.6.2. Reactome**

Reactome, bir 'reaksiyonu', biyolojik bir molekülün durumunu değiştiren biyolojideki herhangi bir olay olarak tanımlar. Bir katalizörü içeren bağlanma, aktivasyon, translokasyon, bozunma ve klasik biyokimyasal olayların tümü reaksiyonlardır. Reactome içeriği sıklıkla diğer kaynaklara çapraz referans verir; NCBI, Ensembl, UniProt, KEGG (Gene ve Compound), ChEBI, PubMed ve GO. Yollar, SBGN benzeri bir formatı izleyen basit diyagramlarla temsil edilir. Her sonuç için gösterilen olasılığı hesaplamak için bir binom testi kullanılır ve p değerleri, sunulan tanımlayıcı listesinin her yola göre değerlendirilmesinden doğan çoklu test (Benjamini-Hochberg prosedürü) için düzeltilir (Fabregat ve ark., 2016).

### **1.3. İnsan ve Rezervuar Hayvanların Zoonotik Virüslere Karşı Biyolojik Tepkilerinin Karşılaştırılması**

Zoonotik virus ile ilgili insan ve rezervuar konakçının immünolojik süreçleri arasındaki farklılıklar hakkında çok az bilgi vardır ve bu konu çalışmalarda nadiren sorgulanmaktadır (Çizelge 1.2.) (Mandl ve ark., 2015). Rezervuarların hastalık süreçleri, enfeksiyonla ilişkili patolojinin sınırlandırılması ile organizmadan virusunun temizlenmesi arasındaki dengenin ve bulaşma olasılığının belirlenmesinde nihai olarak kritiktir. Türler arası bulaşma zamanında, viruslar yeni, doğal olmayan konakçılarda ciddi veya ölümcül hastalığa neden olabilirken, aynı viruslar genellikle rezervuar konakçılarındaki sadece hafif enfeksiyonlara neden olurlar. Zoonotik virusların, doğal rezervuar popülasyonlarında patoloji belirtisi olmaksızın belli süreler boyunca kalabildikleri gösterilmiştir (Luis ve ark., 2013). Yeni zoonotik viruslarla enfekte insanlarda ortaya çıkan hastalık tablolarının altında yatan patojenik mekanizmalarla ilgili yeterince bilgiye sahip değiliz. Enfeksiyon sonuçları, yalnızca

hafif semptomları (örn. Simian foamy virusu) değil, KKKAV gibi şiddetli hastalık tablolarına da neden olabilmektedir. Hemorajik ateşe neden olan yeni ortaya çıkan viruslar, konakçı yanıtının düzensizliğine, enflamatuvar sistemin indüksiyonuna, konak dokulardaki doğrudan viral hasara ve adaptif bağışıklığın engellemesine neden olmaktadır (Geisbert ve Jahrling, 2004). Koruyucu ve patojenik immün yanıtlar arasındaki denge kritiktir (Rouse ve Sehrawat, 2010). Bu dengede, kalıp tanıma reseptörleri ile viral ürünlerin varlığını tespit eden ve böylece konak cevabını başlatan doğuştan gelen bağışıklık efektörleri önemli rol oynamaktadır (Iwasaki, 2012). Öncelikle bağışıklık aktivasyonuna yanıt olarak üretilen spesifik sitokinler, kemokinler ve lipidler önemlidir. İnsanlarda hastalığa neden olan birçok virus, rezervuar konakçısında ciddi klinik veya davranışsal enfeksiyon belirtileri göstermediğine dair birçok hipotez vardır (Mandl ve ark., 2015). Bunlar:

1. Virus sadece doğal olmayan konakta sitopatiktir. 2. Viral tropizm, doğal ve doğal olmayan konakçılar arasında farklılık gösterir. 3. Viral genom veya viral gen ürünleri ile konakçı direnç mekanizmaları arasındaki etkileşimdeki farklılıklar, doğal ve doğal olmayan konakçılar arasındaki enfeksiyon sonucunu değiştirir. 4. Virus, rezervuar konakçıya insanlara sunulmayan bir fayda sağlar. 5. Virus ve mikrobiyomun diğer elementleri arasındaki etkileşimler zoonotik konakçı içindeki enfeksiyonun patogenezi insanlara uygulanmayacak şekilde değiştirir. 6. Rezervuar konakçı tepkileri viral replikasyonu daha etkili bir şekilde kontrol eder. 7. Viral enfeksiyon, viral yükler yüksek olduğunda bile rezervuar konakçılar tarafından daha iyi tolere edilir.

**Çizelge 1.2.** Rezervuarda ve insanda ortaya çıkan zoonotik virusların özellikleri (Mandl ve ark., 2015).

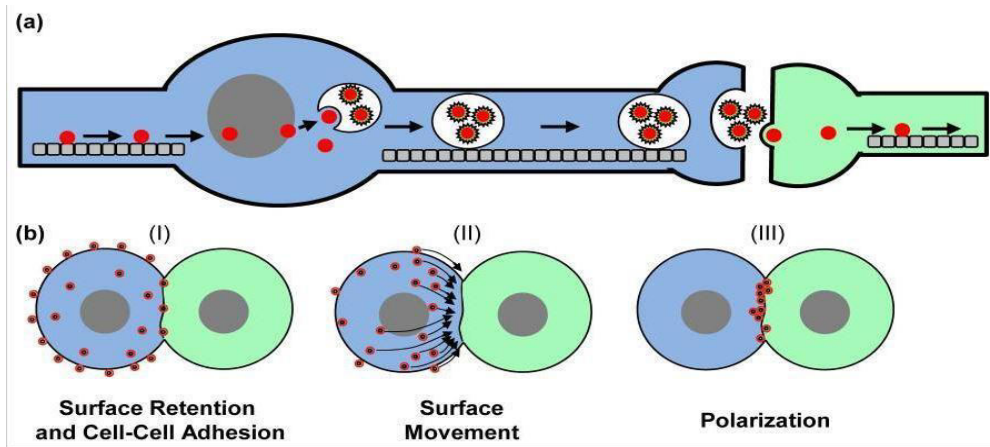
| Virus <sup>a</sup> (Family)                             | Genome | Pathogenesis in Humans                                              | Natural Host              | Features of Infection and Immune Response in Natural Host |                               |                  |        |      |
|---------------------------------------------------------|--------|---------------------------------------------------------------------|---------------------------|-----------------------------------------------------------|-------------------------------|------------------|--------|------|
|                                                         |        |                                                                     |                           | Virus Replication                                         | Innate Response               | Ab/B Cell        | T Cell | Treg |
| Bas-Congo ( <i>Rhabdoviridae</i> )                      | –ssRNA | acute hemorrhagic fever                                             | ?                         | ?                                                         | ?                             | ?                | ?      | ?    |
| MERS Coronavirus ( <i>Coronaviridae</i> )               | +ssRNA | acute pneumonia, renal failure                                      | bats, camels              | ?                                                         | ?                             | ?                | ?      | ?    |
| Chikungunya ( <i>Togaviridae</i> )                      | +ssRNA | high fever, skin rash, arthralgia                                   | African primates          | ?                                                         | ?                             | ?                | ?      | ?    |
| Crimean-Congo hemorrhagic fever ( <i>Bunyaviridae</i> ) | –ssRNA | hemorrhagic fever                                                   | hares, large herbivores?  | ?                                                         | ?                             | +                | ?      | ?    |
| Ebola ( <i>Filoviridae</i> )                            | –ssRNA | hemorrhagic fever                                                   | fruit bats                | ?                                                         | ?                             | +                | ?      | ?    |
| Hanta ( <i>Bunyaviridae</i> )                           | –ssRNA | hemorrhagic fever with renal syndrome, cardiopulmonary syndrome     | rodents, shrews, and bats | P                                                         | anti-inflammatory             | +                | (+)    | +    |
| Hendra and Nipah ( <i>Paramyxoviridae</i> )             | –ssRNA | severe acute encephalitis, respiratory disease, systemic vasculitis | fruit bats                | ?                                                         | ?                             | + T/P            | ?      | ?    |
| Hepatitis E ( <i>Hepeviridae</i> )                      | +ssRNA | hepatitis                                                           | pigs                      | ?                                                         | ?                             | ?                | ?      | ?    |
| HIV ( <i>Retroviridae</i> )                             | –ssRNA | AIDS                                                                | African primates          | P (high)                                                  | diminished chronic type I IFN | (+) (low titres) | (+)    | +    |

Rezervuar konakçılarda zoonotik virusların doğuştan gelen bağışıklık tanınmasının araştırılması, patojene özgü hastalık toleransının nasıl elde edildiğine dair önemli bilgiler sağlayacaktır. Rezervuar konakçılarda, doğuştan gelen bağışıklık tanımada, doğuştan gelen sinyal yollarında, adaptif bağışıklık sistemiyle iletişimi veya B ve T hücrelerinin üretimi ve farklılaşmasındaki spesifik değişiklikler, barındırdıkları virüslere karşı oluşan hastalık toleransında anahtar rol oynayabilir (Mandl ve ark., 2015). Hangi reseptörlerin, modüle edici faktörlerin rol oynadığını anlamak, bunları insanlarda enfeksiyon sonucunu değiştirmek için hedeflememize izin verecektir. Örneğin, patojenik KKKAV veya ebolavirus enfeksiyonu sırasında spesifik miRNA yolaklarının bloke edilmesi, insanlarda doku hasarını azaltabilecek bir yaklaşım olabilecektir.

### 1.3.1. Hücreden Hücreye Temas Yoluyla Virus Yayılımı

Zarflı viruslar hücresiz sıvı ortamda veya hücreden hücreye temas yoluyla olmak üzere iki farklı yoldan yayılabilir (Mothes ve ark., 2010; Zhong ve ark., 2013). Hücresiz yayılma, çok sayıda viral partikülün salınmasını ve difüzyon ile uzak alanlara ulaşmasını gerektirir. Herhangi bir virus hücresiz bir ortamda verimli bir

şekilde yayılabilir eğer: 1) viral gen ekspresyonu yeterince yüksekse 2) viral birleşme ve çıkış için gerekli hücrel faktörler yeterli seviyelerde ise 3) viruslar hücre dışı boşluğa verimli bir şekilde salınırsa 4) hücre dışı ortamda viruslar yeterince stabil ise ve 5) viruslar hedef hücelere verimli bir şekilde bağlanıp girebiliyorsa (Zhong ve ark., 2013). Bu kriterler gerçekleşmezse, hücreler arası yayılma meydana gelemez. Hücreden hücreye temasın aktarım hızı daha yüksektir, çünkü serbest bırakma, iletim ve girişin çoğaltma döngüsü daha hızlı bir şekilde ilerleyebilir (López-Montero ve Risco, 2011). Hücreden hücreye temasın bir başka avantajı, hücre dışı boşluktaki sınırlı maruz kalma ve nötralize edici antikorlarla etkileşimi önleyerek bağışıklık sisteminden kaçıştır. Viruslar, nörolojik veya immünolojik sinapslar gibi mevcut hücre-hücre etkileşimlerini kullanabilirler. Alternatif olarak, genellikle uzun süreli temas oluşturmamayan hücreler arasında kasıtlı olarak hücre-hücre teması kurabilirler (Şekil 1.10). Yapışma (adezyon) genellikle, enfekte olmamış komşu hedef hücreler üzerindeki reseptörleri bağlayan viral adezyon moleküllerinin ekspresyonu ile elde edilir (Zhong ve ark., 2013). Yapışma oluşumu, enfekte hücrelerin viral birleşmeyi polarize etmeye ve/veya hücre-hücre temas bölgelerine viral salma yeteneğine neden olur. Hücre-hücre yapışması, hücrel polaritenin kurulmasına yol açar, bu da mikrotübül düzenleme merkezinin yeniden konumlandırılmasına ve vezikül trafiğinin yeniden yönlendirilmesine yol açar. Viruslar, hedef hücreye filopodia yoluyla da girebilirler (Chang ve ark., 2016).



**Şekil 1.10.** Virusların hücre-hücre temasıyla yayılma yöntemleri. (a) Nörotropik viruslar, bir nörondan diğerine yayılmak için nöronlarda çift yönlü mikrotübülleri kullanmaktadır. (b) Viruslar ayrıca tipik olarak T lenfositleri gibi uzun süreli temaslara girmeyen hücreler arasında uzun ömürlü hücre-hücre temasını teşvik edebilir (Zhong ve ark., 2013).

Zoonotik virusların insanda ve rezervuar konakçıya/vektöre yayılma yolu, immünolojik geçmişlerine bağlı olarak farklılık gösterebilir. Örneğin, Bunyamwera virusu, vektörü olan sivrisinek hücrelerinde enfeksiyonun erken aşamasında uzun projeksiyonlar geliştirir ve hücre organellerinin ve viral proteinlerin tespit edildiği yeni hücreler arası bağlantılar oluşturur (López-Montero ve Risco, 2011). Nükleokapsid ve RNA polimeraz viral proteinleri büyük sitoplazmik kümeler halinde geldikten sonra bulaşıcı virionların salınımında önemli bir düşüş olur. Bu birleşme mekanizması, insan enfeksiyonlarına kıyasla daha az sitotoksik ve daha az üretken bir enfeksiyonla sonuçlanır (López-Montero ve Risco, 2011). DENV2 hücreden hücreye aktarımı, sadece kendi vektöründe, C6/36 sivrisinek hücrelerinde progeni virionlarının yayılması için alternatif bir yol olarak gösterilmiştir (Cheng ve ark., 2020). Virionlar dışındaki viral bileşenler, proteinler ve genomik materyal de dahil olmak üzere, hücreden hücreye geçiş yoluyla enfekte olmuş hücrelerden enfekte olmamış hücelere aktarılabilir (Cheng ve ark., 2020). Bu süreç, hedeflenen her hücre için, enfekte komşu hücrelerden yararlı RNA'lar almak için eşit bir fırsat sağlar. Virusun, RNA'sının hücreden hücreye aktarımı sırasında progeni popülasyonlarında sağlam genomu koruyarak, evrim sırasında viral adaptasyonu hızlandırabilir (Cheng ve ark., 2020). Arboviruslar söz konusu olduğunda, insan hücrelerinin ölümüne ve böcek/rezervuar hücrelerinde kalıcılığa ve hayatta kalmaya yol açan etkileşimlerin belirlenmesi, yalnızca arbovirus sitopatojenisitesinin temellerini anlamak için değil, aynı zamanda hücre hasarına müdahale etmenin yeni yollarını belirlemek için de son derece önemlidir.

### **1.3.2. Kombinasyonel Çeşitlilikteki Farklılıklar**

Viruslar, rezervuar konakçıda genetik ve biyokimyasal olarak ya kalıcı enfeksiyona sebep olur ya da çoğalıp popülasyonda önemli bir hastalığa neden olmadan yayılacak şekilde adapte edilmişlerdir. Patojenik virusların insanlara veya diğer rezervuar olmayan türlere yayılması meydana geldiğinde, yeni konak hücreler için biyokimyasal olarak optimize olmadıklarından dolayı hastalığa, ölüme veya immün temizliğe neden olmaktadır (Schountz ve ark., 2017). Yeni ortamdaki

optimizasyonun önemli bir yolu, germ hattı (germline) immüoglobulinlerdir. Memelilerin germ hattı immüoglobulin lokusları, tandem değişken (V), çeşitlilik (D) ve birleştirme (J) gen segmentlerini içerip kemik iliğinde B hücresi gelişimi sırasında immüoglobulin ağır zincir lokusunda VDJ, hafif zincir lokusunda ise VJ yeniden düzenlemeleri oluşturmaktadır (Schountz ve ark., 2017). Segment sayısı türlere göre değişir ve tüm segmentler işlevsel değildir (Çizelge 1.3). Örneğin, insanlar 87 immüoglobulin ağır zincir V segmentine sahiptir, ancak bunların yaklaşık 40'ı işlevseldir. V (D) J rekombinasyonu, insanlarda tipik olarak, IgM ağır zincirine sahip 2 milyon benzersiz immüoglobulin spesifikliğine sahip olan B hücresi immüoglobulin repertuarını oluşturur (Jackson ve ark., 2013). Kombinasyonel çeşitlilik olarak adlandırılan bu durum, bağışıklık tepkisinin bir antijen uyarımından önce ve ondan bağımsız olarak gerçekleşmesidir. İnsandan farklı olarak, sığırlar, birkaç V hafif bölgesine ve dolayısıyla az germ hattı kombinasyon çeşitliliğine sahip olmaktadır (Çizelge 1.3), ancak bunların antikorları, somatik hipermutasyon yoluyla üretilen önemli çeşitlilik ile uzun CDR H3 bölgeleri içerir (Stanfield ve ark., 2018). Yetmiş amino aside ulaşabilen, ultra uzun CDR H3'lere sahip antikorları, yapısal olarak çıkıntı yapan bir  $\beta$ -şerit "sapı (stalk)" ve disülfür bağlı "topuz (knob)" oluşturur. Bu uzun CDR H3'ler, ineklerin viral antijenlerle bağışık hale getirildiğinde güçlü bir bağışıklık tepkisi oluşturmaya izin verir (Stanfield ve ark., 2018). Sonuç olarak, türler arasındaki bu farklılıklar viral enfeksiyonun sonucunu önemli derecede etkileyebilir.

**Çizelge 1.3.** Memelilerin immüoglobulin gen segmentleri (Schountz ve ark., 2017).

| Species          | <sup>a</sup><br>V <sub>H</sub> (F) | D <sub>H</sub> | J <sub>H</sub> | V <sub>L</sub> (F) | J <sub>L</sub> | C <sub>L</sub> <sup>b</sup> | V <sub>K</sub> (F) | J <sub>K</sub> | C <sub>K</sub> | <sup>c</sup><br>k:l |
|------------------|------------------------------------|----------------|----------------|--------------------|----------------|-----------------------------|--------------------|----------------|----------------|---------------------|
| Little brown bat | >250 (5)                           | ?              | 13             | ?                  | ?              | ?                           | ?                  | ?              | ?              | ?:?                 |
| Human            | 87 (7)                             | 30             | 9              | 70 (7)             | 7              | 7                           | 66 (7)             | 5              | 1              | 60:40               |
| Mouse            | >100 (14)                          | 11             | 4              | 3 (3)              | 4              | 4                           | 140 (4)            | 4              | 1              | 95:5                |
| Rabbit           | >100 (1)                           | 11             | 6              | ?                  | 2              | 2                           | >36 (?)            | 8              | 2 <sup>d</sup> | 95:5                |
| Horse            | >10 (2)                            | >7             | >5             | 25 (3)             | 4              | 4                           | >20 (?)            | 5              | 5              | 5:95                |
| Cattle           | >15 (2)                            | 3              | 5              | 83 (8)             | >2             | 4                           | ?                  | ?              | 1              | 5:95                |
| Swine            | >20 (1)                            | 2 <sup>e</sup> | 1 <sup>e</sup> | 22 (>2)            | >4             | 4                           | 14–60 (5)          | 5              | 1              | 50:50               |

<sup>a</sup>Number of families (F) of variable region genes.

<sup>b</sup>J<sub>H</sub>–C<sub>H</sub> duplicons are the common motif in most mammals.

<sup>c</sup>Ratio of expressed light chain in adults expressed as percent.

<sup>d</sup>Rabbits have a duplicate of the entire kappa locus.

<sup>e</sup>Functional D<sub>H</sub> and J<sub>H</sub> genes.

?, number is unknown.

### 1.3.3. Sitopatogenez

Konakçı rezervuarlarında ve insanlarda KKKAV'un patogenezi büyük farklılık gösterir (Spengler ve ark., 2016). İnsanda virus replikasyonu, normal konakçı hücre fonksiyonuna zararlı veya patolojik yollarla müdahale eder. Genel olarak, ortaya çıkan arboviruslar insanlarda hücre yuvarlaklaşması, hücre lizisi, sinsiya oluşturmak için hücre füzyonu veya hücre şeklinde daha ince değişiklikler içerebilen morfolojik değişikliklere neden olurlar. Ancak rezervuarlarda tanımlanan bu morfolojik değişikliklere neden olmazlar (Lyles, 2000). Bu tür morfolojik değişiklikler genellikle sitopatik etki (CPE) olarak adlandırılır. Hücresel düzeydeki "sitopatogenez" terimi, CPE'den daha geniş anlamındadır ve mikroskopik düzeyde görülebilen değişikliklere ek olarak viral patogeneze katkıda bulunan diğer hücresel değişiklikleri de içerir. RNA virus enfeksiyonu sırasında, substratlarına yapışan hücreler, hücre yuvarlaklaşmasına yol açan belirgin morfolojik değişikliklere sık sık uğrar. Viral gen ürünlerinin, hücre yuvarlaklaşmasını indüklemek için konakçı hücre iskeleti bileşenlerini doğrudan etkileyip etkilemediği veya alternatif olarak, hücre yuvarlaklaşmasının konakçı hücrelerde apoptoz indüksiyonundan kaynaklanıp kaynaklanmadığı önemli sorulardır. Apoptoz geçiren yapışık hücrelerdeki en erken morfolojik değişikliklerden biri hücre yuvarlaklaşmasıdır. Bu nedenle, normalde CPE olarak tanımlanacak olan hücre yuvarlaklaşması, birçok durumda apoptozun indüksiyonunu yansıtır ve bu öncelikle doğal rezervuar olmayan hücrelerde gerçekleşmektedir (Lyles, 2000).

### 1.3.4. Transkripsiyon Faktörleri

Zoonotik hayvan virusları, insan hücrelerinde kendini kopyalamak için yüzlerce konakçı proteini ile (örneğin transkripsiyon faktörleri) başarılı bir şekilde etkileşime girmeli ve/veya onları kullanmalıdır. Bu insan faktörleri, proteinin insan ve hayvan versiyonu arasındaki sekans farklılıklar nedeniyle bir hayvan virusu tarafından kullanılmazsa, viral replikasyon engellenebilir. Muhtemelen bu, hayvan viruslarına karşı bağışıklığın, insan viruslarına karşı bağışıklıktan farklı olmasının

temel yoludur (Warren ve Sawyer, 2019). Transkripsiyon faktörleri, virus enfeksiyonundan sonra insan hücrelerinde en farklı ifade edilen genlerden birisidir (Hölzer ve ark., 2016). Enfeksiyona bir yanıt olarak, konakçılar belirli hücresel yolları aşırı veya yetersiz ifade ederek ve belirli antiviral önlemler uygulayarak telafi eder. Bu değişiklikler, enfekte organizmalar tarafından sergilenen semptomların tipini, gücünü ve enfeksiyonun virülansını belirler. Transkripsiyonel değişikliklerine bakarak, yeni konakçı hücrelerin enfeksiyon sırasında transkriptomlarının önemli bir yeniden programlanmasından geçtiği doğrulanmış ve bunun muhtemelen konakçı savunmalarının desteği için gerekli olduğu gösterilmiştir (Carrera ve Elena, 2012). RIG-I, melanom farklılaşmasıyla ilişkili gen 5 (MDA-5) ve TLR'ler gibi patojen tanıma reseptörleri (PRR) aracılığıyla virusun tanınması, transkripsiyon faktörlerinin nükleusa aktivasyonunu ve translokasyonunu indükler (Jiang ve ark., 2013). Alfa/beta interferon gibi çeşitli sitokinlerin transkripsiyonunu indüklemek için iş birliği yapan *aktivatör protein-1 (AP-1)*, *IRF-3* ve *NF- $\kappa$ B* dahil, bulaşıcı patojenlerin temizlenmesine yol açar (Jiang, Yu ve Kapczynski, 2013). Örneğin, konakçı transkripsiyonel aktivatör *asidik nükleer fosfoprotein 32 aile üyesi A (ANP32A)*, influenza virusu replikasyonu için gerekli olan anahtar bir kofaktördür. Avian influenza virusları, kuş virusu polimeraz kompleksini ANP32A'nın insan versiyonu ile uyumlu hale getirmek için PB2 polimeraz alt birim proteinlerinde bir mutasyona ihtiyaç duyar (Long ve ark., 2016).

#### 1.4. Amaç

Kırım-Kongo Kanamalı Ateş virusunun patogenezi, insan ve diğer memeli konakçılarda büyük farklılık gösterir. Vahşi ve evcil hayvanlar kısa bir viremi dönemi dışında klinik belirti göstermezken, klinik enfekte insanlar ateş, iştahsızlık ve diyare gibi spesifik olmayan semptomları, ya da peteşi, miyalji, trombositopeni, kanama ve ölüm ile sonuçlanan spesifik klinik belirtileri gösterirler. Sığırlar Kırım-Kongo Kanamalı Ateş virusunun doğal rezervuarlarıdır. Bu hayvanlar keneleri insana yakın mesafede tutması ve kesim sırasında viremik kanla direk temas yoluyla virusun zoonotik yönlerinde önemli bir rol oynarlar. İnsan ve sığır ya da diğer

hayvan hücrelerinin KKKA virusuna nasıl tepki gösterdiği ve klinik süreçlerinin neden bu kadar farklı olduğu hakkında doğrulanmış bilgilere ihtiyaç vardır. KKKA virus enfeksiyonunun incelenmesi için uygun in vivo model olmadığından, in vitro çalışmalar sıklıkla kullanılmaktadır. Bu çalışmada, insan ve sığır orijinalı hücre kültürlerinin KKKA'a karşı duyarlılığını, farklı günlerdeki ve pasajlardaki viral yükü ve virusun hücre sitotoksikite düzenleri ve apoptosisi arasındaki farklılıkların tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaca yönelik olarak enfekte primer hücrelerdeki mikroRNA yollarıyla ilgili anahtar olabilecek protein ekspresyonlarının tespit edilmesine yönelik olarak deneysel planlama yapılmıştır. Farklı olarak ifade edilen miRNA'ların öngörülen hedeflerinin gen ontoloji ve pathway analizi gerçekleştirilmiştir.

## **2. GEREÇ VE YÖNTEM**

### **2.1. Etik Açıklama**

Hücre kültürü sistemlerindeki bulaşıcı virus manipülasyonu dahil tüm in vitro biyolojik deneyler Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Ana Bilim Dalı'nın Biyogüvenlik Seviye 3 üzeri (BSL3+) laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

### **2.2. Hücreler ve Kültür Koşulları**

Bu çalışmada kullanılan üç insan hücre kültürü, insan adrenal bezi / korteks Scott ve White No. 13 (SW-13), insan embriyonik böbrek (HEK-293) ve insan primer mesangial hücresi (HMC) içermektedir. Araştırma kapsamında kullanılan sığır hücreleri ise Madin-Darby Sığır Böbrek (MDBK), sığır embriyonik böbrek (BEK) ve primer sığır böbrek korteks hücresi (PSH) idi. Primer sığır böbrek hücre hattını hazırlamak için 5 aylık bir boğa böbreği, yerel bir özel mezbahada (Çubuk Girişim Entegre Et ve Gıda Endüstrisi, Ankara, Türkiye) kesildikten hemen sonra vücuttan aseptik olarak çıkarıldı ve laboratuvara soğutulmuş koşullar altında transfer edildi. Kapsül ve medulla kortikal dokudan ayrıldı ve örnekler parçalanıp küçük bileşenler haline kesildi. Daha sonra, doku örnekleri üç kez 1x fosfat tamponlu tuzlu su (PBS; Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) kullanılarak yıkandı ve 45 dakika süreyle 37 ° C'de papain enzim çözeltisi (1 mg L-sistein, 1 mg BSA, 25 mg Glikoz, 5 mL 1x PBS içinde 0,5 mg papain ve 10 ug DNaz I) içinde hafifçe karıştırılarak inkübe edildi. 300X g'de 10 dakika süreyle santrifüjlendikten sonra, hücresel kalıntı kültür ortamında yeniden süspanse edildi ve hücreler kollajen kaplı T25 şişelerinde kültürlendi. Birincil sığır hücreleri KKKA virusu ile enfekte edilmeden önce 3 kez pasajlandı. MDBK, BEK ve HEK-293 hücreler Ana Bilim Dalı hücre kültür koleksiyonundan elde edildi. SW-13 hücre hattı Macaristan'ın Ulusal Halk Sağlığı ve Tıbbi Memurlar Servis Enstitüsünden Dr. Bernadett Pályi ve HMC hücresi ise Hacettepe Üniversitesin'den Prof. Seza Özen'den sağlandı. Sığır

hücre hatları ve HMC, Eagle'ın Minimum Essential Medium'da (EMEM; Sigma, St. Louis, MO, ABD) kültürlendi. HEK-293 ve SW-13 hücreleri sırasıyla Minimum Essential Medium alfa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) ve Leibovitz'in L-15 ortamında (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) tutuldu. Tüm vasatlara %10 fetal sığır serumu (FBS; Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, İsrail), 2 mM L-glutamin (Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, İsrail), 100 U penisilin ve 0,1 mg/mL streptomisin (Thermo Fisher Scientific) ilave edildi. Tüm hücreler, EZ-PCR Mycoplasma Test Kiti (Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, İsrail) ile mycoplasma kontaminasyonu açısından test edildi ve haftada iki kez 1:2 ila 1:4 oranında alt kültürleri yapıldı. Hücre hatlarında var olan mycoplasma kontaminasyonları BIOMYC-1 ve BIOMYC-2 ticari isimli antibiyotik solüsyonları (Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, İsrail) ile üreticinin talimatları doğrultusunda kullanılarak giderildi.

### **2.3. Araştırmada Kullanılan Virus**

Çalışmada farklı insan ve sığır böbrek hücre hatlarında viral yük ve replikasyon kalıplarını araştırmak için daha önce Ana bilim dalımızda izole edilen lokal KKKAV Ank-2 izolatu (GenBank Erişim numarası: MK309333) kullanıldı. Virus, SW-13 hücrelerinde çoğaltıldı ve iki tur virus pasajlanmasından sonra virus replikasyonu, S segmentini hedefleyen konvansiyonel RT-PCR ve RT- gerçek zamanlı PCR ve sekanslama ile doğrulandı. DKID<sub>50</sub> test ile titre edilen bu virus, daha sonra stok olarak kullanılmak üzere -80°C'de saklandı (Reed ve Muench, 1934). Enfektivite tayini Vero E6 hücreleri kullanılarak mikrotitrasyon yöntemi ile gerçekleştirildi. KKKAV'un 10 katlı sulandırılmaları ( $10^{-1}$  -  $10^{-6}$ ) Vero E6 hücre kültürüne inokule edilerek 6 gün süre ile 37 °C'de % 5 CO<sub>2</sub>'ta inkübe edildi. Test virus kontrol gözlerinde %100 cpe gözleendiği anda sonlandırıldı. Tüm kinetik deneyler için, 0,1 çoklu enfeksiyonda (moi) KKKA Ank-2 virusu kullanıldı.

#### 2.4. Hücre Hatlarında KKKA Virus Çoğalma Kinetiğinin Analizi

Viral RNA yükünü ölçmek için, 24 gözlü hücre kültürü tabletlerinde üretilen hücrelere, üç tekrar olacak şekilde (triplicate) Ank-2 virusu inoküle edildi. Bir saat süreli adsorpsiyondan sonra, bağlı olmayan viruslar PBS ile yıkandı ve enfekte olmuş hücreler 7 güne kadar takip edildi. Enfekte hücrelerden ve süpernatanttan total RNA ekstraksiyonu, enfeksiyondan 0, 1, 2, 3, 5 ve 7 gün sonra (dpi) gerçekleştirildi. 0. gün örneklerden RNA izolasyonu, 1 saatlik virus adsorpsiyonu ve yıkama aşamalarından hemen sonra gerçekleştirildi. Hücre içi S segment analizleri için, enfekte olmuş hücrelerden toplam RNA ekstraksiyonu EZ-RNA Total RNA İzolasyon Kiti (Biological Industries, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi ve hücre dışı (cell-free) viruslarla ilgili analizler için viral genomik RNA kültür süpernatantlarından, QIAamp Viral RNA Mini Kiti (QIAGEN, Germantown, MD, USA) üreticisinin talimatlarına göre ekstrakte edildi. Sitopatik etkilerin varlığı ve ilerlemesi, inokülasyondan sonraki 1, 2, 3, 5 ve 7. günlerde invert ışık mikroskobu (Nikon, Eclipse TS-100, Japonya) kullanılarak incelendi. Hücresel patoloji skorlarını tahmin etmek için enfekte hücrelerin ortalama yüzdesi kullanıldı ve 0-4 arasında puanlama yapıldı. Ank-2 virusunun sitopatik etkisi, hücre deformasyonu, hücre ayrılmasına yol açan hücre granülasyonu ve son aşamada hücre ölümünü şeklinde tespit edildi. Buna göreskorlamada: 0'ın görünür bir değişiklik göstermediği, 1'in hücrelerin %25'ine kadar (%1-25), 2'nin hücrelerin %50'sine kadar (%26-50), 3'ün hücrelerin %75'ine kadar (%51-75) ve 4'ün ise hücrelerin hepsinde (%76-100) CPE gösterdiği şeklinde değerlendirildi. İnoküle edilmemiş hücreler ise negatif kontroller olarak kullanıldı.

Virus replikasyon verimliliği, yukarıda bahsedilen tüm hücre hatlarında üç seri pasaj ile paralel olarak test edildi. Bu amaçla, her hücre hattı sitopatik etki yaklaşık %80'a ulaşınca kadar 12 güne kadar üç kez T25 şişelerine pasajlandı. Üç tur yapılan donma-çözülme işleminden sonra, hücresel kalıntılar 4°C'de 10 dakika boyunca 3000 rpm'de santrifüj edilerek uzaklaştırıldı ve süpernatant toplandı. Bu prosedür iki kez daha tekrarlandı. Virus, SW-13 hücrelerinde standart bir TCID<sub>50</sub> deneyi kullanılarak her pasaj sonrasında titre edildi. Virusla enfekte olmuş hücre

kültürlerinin vasatından RNA ekstraksiyonu, üreticinin talimatlarına göre QIAamp Viral RNA Mini Kiti (QIAGEN, Germantown, MD, ABD) ile gerçekleştirildi. Ekstrakte edilen RNA'lar kullanılıncaya kadar -80 °C'de saklandı.

## **2.5. Konvansiyonel RT-PCR**

Enfekte hücrelerden total RNA ekstraksiyonu için ticari QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) üretici tavsiyeleri doğrultusunda kullanıldı. RNA'nın bütünlüğünün ve kalitesinin spektrofotometrik saptanması NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Tewksbury, MA) ile gerçekleştirildi ve viral yükün tespiti amacıyla reaksiyon başına toplam 50 ng örnek RNA'sı kullanıldı. Komplementer DNA sentezi için Thermo Scientific™ RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit daha sonraki PCR reaksiyon için Thermo Scientific™ Taq DNA Polymerase, recombinant (5 U/μL) kullanıldı. Reaksiyon protokolleri üretici tavsiyelerine göre hazırlandı. Toplam 1500 bp uzunlukta ürün almak için kullanılan primerler aşağıda sunuldu:

NCF- 5'-ATGGAAAACAAGATCGAGG-3'

NCR- 5'-AGGAGGAGAAAAGCTGAA-3'

## **2.6. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)**

KKKA virus enfeksiyonunu izleyen zaman noktalarında elde edilen hücre içi ve dışı viral genomik RNA (gRNA) miktarını ölçmek için RT-qPCR tekniğinden yararlanıldı. Bu amaçla reaksiyon karışımı olarak QuantiNova® Patojen + IC Kiti (QIAGEN, Germantown, MD, ABD) kullanıldı. Kısaca, 15 μl'lik ana karışım 5 μl 4 × Reaksiyon Karışımı, 6.3 μl RNaz içermeyen su, forward ve reverse primerlerin her birinin 1.6 μl'i (0.8 μM final konsantrasyon) ve 0.5 μl prob (0.25 μM final konsantrasyon) olacak şekilde hazırlandı. Ana karışımı 20 ul'ye tamamlamak için 5μL RNA (500 ng) ilave edildi. Döngü koşulları şöyleydi: 10 dakika boyunca 50°C'de cDNA sentezi, 2 dakika boyunca 95°C'de ilk denatürasyon ve 5 saniye boyunca 95°C'de 40 denatürasyon döngüsü ve 30 saniye boyunca 60°C'de

bağlanma/uzama aşamalarıdır. Primerler ve prob nükleoprotein genini (S segment) hedefliyordu;

qPCR-F 5'-GGACATAGGTTTCCGTGTCA-3',

qPCR-R 5'-TCCTTCTAATCATGTCTGACAGC-3' ve

qPCR-prob 5'-FAM-AGAACAACCTTGCCAATTACCAACAGGC-BHQ1-3'.

Standart linear plazmidler, şablon olarak pCD-N1 kullanılarak  $2 \times 10^3$  -  $2 \times 10^8$  kopya/reaksiyon karışımına eşdeğer 10 kat sulandırma ile hazırlandı. Plazmidin linearize edilmesi için Hind III kesim enzimi ve NEBuffer™ 2.1 (New England Biolabs Inc, Canada) kullanıldı. Kısaca, 48 µL NEBuffer 2.1, 1 µg λ DNA ve 1 µL HindIII içeren reaksiyon 37 ° C'de 1 saat inkübe edildi. Plazmid kopya sayısının hesaplanması için URIGenomics and Sequencing center sayfası kullanıldı (<https://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>). Reaksiyonlar bir aşamada bir Rotor-Gene 5-plex cihazı (QIAGEN, Germantown, MD, ABD) ile gerçekleştirildi ve daha sonra tüm hesaplamalar log temelli viral yüklere (kopya / mL) dönüştürüldü.

## 2.7. İndirekt İmmüno Floresan Testi (IIFT)

Hücreler, 24 gözlü tabletlere üç tekrarlama halinde yerleştirildi ve 1 gün boyunca 37°C'lik bir inkübatörde inkübe edildi. İnokulasyon için 0.1 moi virus kullanıldı. Daha sonra, enfekte olmuş hücreler 1, 2, 3, 5 ve 7. günlerde %3,7 formaldehit (Merck KGaA, Darmstadt, Almanya) ile fikse edildi ve %1 Triton-X-100 (Sigma, St. Louis, MO, ABD) ile geçirgenleştirildi. Oda sıcaklığında (RT) 1 saat boyunca %5 yağsız süt (Cell Signaling Technologies, Inc, ABD) ile bloke edildikten sonra, birincil antikor olarak 1: 250 sulandırmada poliklonal insan antiserumu kullanıldı. Oda sıcaklığında 1 saat 30 dakika süreyle hafifçe çalkalanarak inkübasyondan sonra, florokrom ile konjuge edilmiş ikincil antikor (Protein G, Alexa Fluor™ 488 konjugatı, Invitrogen™), sabit hücrelere 1: 1000 oranında seyreltilerek ilave edildi ve oda sıcaklığında 1 saat süreyle inkübe edildi. Hücreler Axio Vert A1 Mikroskobu (Zeiss, Oberkochen, Almanya) ile görüntülendi. İmmüno Floresan puanları hesaplamak için üç adet 24 gözlü tabletteki yeşil floresan emisyonu olan

hücrelerin ortalama yüzdesi kullanıldı. Puanlama, 1 ile 4 arasında olacak şekilde, %25'e (%1-25) kadar floresan boyanma gösteren hücreler için 1, %50'ye (%26-50) kadar boyanan hücreler için 2, %75'e (%51-75) kadar boyanan hücrelere 3, ve son olarak tamamen yakın boyanan hücreler (%76-100) için 4 verilecek şekilde yapıldı (Bhattacharjee ve ark., 1994; Rizzardi ve ark., 2012). İnoküle edilmemiş hücreler negatif kontrol olarak kullanıldı. Virusun moi değerini hesaplamak için aşağıda verilen formül kullanıldı. Her hücre hattı için 24 gözlü tabletlerde canlı hücre sayılarını Beckman Vi-Cell Cell Viability Analyzer ile belirlendi. Daha sonra Cellcounter ile üç tane 24'lük gözüün immünofloresan boyalı hücre sayısının ortalaması sayıldı (<https://bitbucket.org/linora/cellcounter/src/master/>) (Li ve ark., 2014). İmmünofloresan boyalı hücre sayımı için kullanılan resimler 20X büyütmede çekildi. Moi aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\text{moi} = \frac{\text{Ortalama floresan ile boyanmış hücre sayısı} / \text{alan} \times 20 \text{ alan/göz} \times \text{seyreltme}}{\text{Toplam hücre sayısı/göz}}$$

## 2.8. LDH Deneyi

Enfeksiyonun ilk 3 gününde hücrelerdeki laktat dehidrojenaz (LDH) düzeylerini ölçmek için, Pierce™ LDH Cytotoxicity Assay Kit (Thermo Scientific™, ABD) kullanıldı. Test üreticinin önerdiği şekilde yapıldı. Kısaca, hücreler, 96 gözlü hücre kültürü tabltlerine, spesifik vasat içinde 100 uL hacimde olacak şekilde üç kopya halinde yerleştirildi. Plakanın gözlerine ayrıca Spontan LDH Aktivite Kontrolleri olarak su kontrolü ve Lizis Tampon kontrolü (Maksimum LDH Aktivite Kontrolleri) yerleştirildi. Hücrelerin yerleştirilmesinden sonraki gün, 10 µL hacim'de seyreltilmiş 0.1 moi virus ilave edildi. Daha sonra hücreler 1, 2 veya 3 gün inkübe edildi. Analiz gününde, Maksimum LDH Aktivite Kontrol gözlerine 10 µL Lizis Tamponu ilave edildi. İnkübasyon aşamasından sonra ve her numune vasatından 50 µL'nin yeni bir 96 göze aktarılmasından sonra, her bir göze, Deney Tamponu ve Substrat Karışımı içeren 50 µL reaksiyon karışımı ilave edildi, ardından bir başka inkübasyon uygulandı ve son olarak tüm gözlerle 50 µL stop solüsyonu ilave edildi. Absorbans, bir ELISA okuyucusunda (Titertek Multiskan PLUS MK II Mikroplaka Okuyucu,

Midland, ON, Kanada) 490 nm ve 680 nm'de ölçüldü. Sitotoksosite oranını hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\% \text{ Sitotoksosite} = \frac{\text{Viruslu hücre LDH aktivitesi} - \text{Spontan LDH aktivitesi}}{\text{Maksimum LDH aktivitesi} - \text{Spontan LDH aktivitesi}} \times 100$$

## **2.9. Apoptosis ve Nekrosis Saptanması**

### **2.9.1. Akış Sitometri Protokolü**

Çalışmada kullanılan kit, CellEvent™ Caspase-3/7 Green Flow Cytometry Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Invitrogen) apoptotik hücrelerde aktif kaspaz-3 ve kaspaz-7'nin akış sitometrisi ile algılanmasını sağlamaktadır. AADvanced Dead Cell Stain ile birlikte kullanıldığında apoptotik hücreler canlı ve nekrotik hücrelerden ayırt edilebilmektedir. Akış sitometre cihazında 530/30 BP filtresi ve SYTOX® için 690/50BP filtre kullanılarak ölçüm yapıldı. Çalışma kapsamında kullanılan her 6 hücre hattına 0,1 moi KKKA virusu inokule ederek apoptoz indüklendi. Çalışmada virus olmayan negatif kontroller de hazırlandı. Test inokulasyondan sonraki 2. günde yapıldı. Hücreler EDTA çözeltisi ile (2.9 mM EDTA, pH 6.14) toplandıktan sonra 1 mL sığır serumu içeren vasat içine  $1 \times 10^6$  cells/mL şeklinde akış sitometrisi tüpleri içinde aktarıldı. Kompenzasyon kontrolleri olarak her hücreden her boyadan tek boyalı kontrol hücreler, otofloresans kontrolü olarak boyasız hücreler kullanıldı. Bir mL hücre süspansiyonuna 1 µL CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent ekledikten ve yavaşça karıştırıldıktan sonra örnekler 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Son 5 dakikalık inkübasyon sırasında, 1 mM SYTOX™ AADvanced™ 'in 1 µL'sini eklendi ve yavaşça karıştırıldı. Hücrelerin analizi CytoFLEX Flow Cytometer (Beckman Coulter)'de yapıldı. Ham verilerin analizi için ise FCS Express 7 software kullanıldı.

### 2.9.2. Annexin V-FITC Apoptosis Kit

Hücrelerdeki apoptosis ve nekrosis gelişimi, Annexin V-FITC Apoptosis Kit (FineTest) ile enfeksiyonu izleyen ikinci günde floresan mikroskobu ile incelendi. Kısaca, KKKAV inokulasyonu ile apoptozu indüklendikten 48 saat sonra hücreler tripsinize edildi ve  $1-5 \times 10^5$  hücreler santrifüj ile toplandı. Daha sonra, hücreler 195  $\mu$ L 1X Bağlama Tamponu içinde süspanse edildi. Karışıma 5  $\mu$ l Annexin V-FITC ve 10  $\mu$ L propidyum iyodür eklenip yavaşça karıştırıldı. Oda sıcaklığında (20-25 °C), karanlıkta 10 dakika inkübe edildikten sonra buza konuldu. Floresan mikroskopi öncesinde hücreler %2 formaldehit içinde sabitlendi. Değerlendirmeler Axio Vert A1 Mikroskobu (Zeiss, Oberkochen, Almanya) ile yapıldı.

### 2.10. MiRNA İzolasyonu

MiRNA izolasyonu, insan ve sığır primer hücrelerinden, 0.1 moi KKKAV inokulasyonunu izleyen 0. ve 7. günlerde, ticari miRNA ekstraksiyonu kiti kullanılarak (miRNeasy Mini Kit'ti Qiagen, Germantown, MD, USA) yapıldı (Arslan ve ark., 2019a). Kısaca, hücreler tripsinize edildikten sonra  $3-4 \times 10^6$  hücre, serumlu vasat içerisinde 5 dakika boyunca 300 x g'de santrifüj edildi. Süpernatantı aspire ettikten sonra 700  $\mu$ l QIAzol Lysis Reagent eklendi ve 1 dakika vorteksleyerek hücreler homojenize edildi. Homojenat 5 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletildikten sonra 140  $\mu$ l, üzerine kloroform eklendi. Vorteks ve bekleme işleminden sonra 4°C'de 12.000 x g'de 15 dakika santrifüj edildi. Üst sulu fazı yeni bir Eppendorf tüpüne aktardıktan sonra 1.5 hacime kadar %100 etanol eklendi ve karıştırıldı. Elde edilen karışım bir RNeasy Mini kolonuna pipetlendi. Oda sıcaklığında 15 saniye boyunca 8000 x g'de santrifüj edildi ve altsıvı boşaltıldıktan sonra bu basamak tekrarlandı. Daha sonra RNeasy Mini döndürme kolonuna 500  $\mu$ l Buffer RPE eklendi ve 8000 x g'de 15 s santrifüj edildi. Altsıvı atıldıktan sonra kolonuna yeniden 500  $\mu$ l Buffer RPE eklendi ve 8000 x g'de 2 dakika santrifüj edildi. RNeasy kolonu yeni bir 1.5 ml toplama tüpüne yerleştirildikten sonra membran

üzerine 30 µL RNaz'sız su eklendi. RNA'yı elde edebilmek için 8000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi ve bu basamak aynı toplama tüpünde tekrarlandı.

### 2.11. MiRNA'dan cDNA Elde Edilmesi

RNA, miScript II RT enzimi (Qiagen, Germantown, MD, USA) kullanılarak ters kopyalanmıştır (reverz transkripsiyon). Komplementer DNA'yı elde etmek amacıyla her örnekten 500 ng RNA kullanıldı. Ters transkripsiyon reaksiyonu karışımı Çizelge 2.1'e uygun olarak buz üzerinde hazırlandı. Reaksiyonu karışımı 37 °C'de 60 dakika inkübe ettikten sonra 95°C'de 5 dakika bekletildi. Daha sonra, cDNA nükleaz içermeyen suda (nihai hacim, 110 µL) seyreltildi ve -20 ° C'de saklandı.

**Çizelge 2.1.** Ters transkripsiyon reaksiyonu için kullanılan master miks bileşenleri ve hacimleri.

| Bileşen                             | Hacmi / reaksiyonu |
|-------------------------------------|--------------------|
| 5x miScript HiSpec Tampon           | 4 µL               |
| 10x miScript Nucleics Mix           | 2 µL               |
| RNaz içermeyen su                   | Değişken           |
| miScript Ters Transkriptaz Karışımı | 2 µL               |
| Template RNA                        | Değişken           |
| Toplam hacim                        | 20 µL              |

### 2.12. SyberGreen Real-time MiRNA PCR Array

Araştırmada miScript miRNA PCR Array Human miRBase Profiler HC Plate 1 (331223-MIHS-3401ZG-12) ve miScript miRNA PCR Array Cow miRBase Profiler HC Plate 1 (331223-MIBT-3651ZG-12) (Ek 1.) (Qiagen, Germantown, MD, USA) için Çizelge 2.2'ye göre hazırlanan real-time Syber Green PCR karışımları (Qiagen, Germantown, MD, USA) ile Çizelge 2.3'e göre ayarlanan Roche

LightCycler 480 (Roche Molecular Systems, Inc, Pleasanton, California, USA) platformu kullanıldı.

**Çizelge 2.2.** Syber Green real-time PCR array bileşenleri ve hacimleri.

| <b>Adım</b>             | <b>Zaman</b> | <b>Sıcaklık</b> |
|-------------------------|--------------|-----------------|
| İlk aktivasyon aşaması  | 15 dak       | 95°C            |
| 3 kademeli siklus:      |              |                 |
| 1. Denatürasyon         | 15 s         | 94°C            |
| 2. Bağlanma             | 30 s         | 55°C            |
| 3. Uzama                | 30 s         | 70°C            |
| Döngü sayısı: 45 siklus |              |                 |

**Çizelge 2.3.** Syber Green real-time PCR protokolü.

| <b>Bileşenler</b>                       | <b>Hacmi / reaksiyonu</b> |
|-----------------------------------------|---------------------------|
| 2x QuantiTect SYBR Yeşil PCR Master Mix | 2050 µL                   |
| 10x miScript Universal Primer           | 410 µL                    |
| RNazsız su                              | 1540 µL                   |
| Template cDNA                           | 100 µL                    |
| Toplam hacim                            | 4100 µL                   |

Microarray ([www.miRBase.org](http://www.miRBase.org)), en güncel miRNA genomundan toplam 372 insan ve sığır olgun miRNA'sını tanımlamak için spesifik primerlerden oluşuyordu. Dahil edilen insan kontrolleri; cel-miR-39-3p, SNORD61, SNORD68, SNORD72, SNORD95, SNORD96A, RNU6-2, miRTC ve PPC'dır. Sığır kontrolleri ise cel-miR-39-3p, SNORD42B, SNORD69, SNORD61, SNORD68, SNORD96A, RNU6-2, miRTC ve PPC idi. Arrayleri optik yapışkan filmlerle kapattıktan sonra oda sıcaklığında 1000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Uzatma adımıdaki termal yükseliş hızı, 1°C/s olarak ayarlandı. Taban çizgisi ve threshold, tüm gerçek zamanlı

PCR çalışmaları için otomatik olarak ayarlandı. Floresans verileri, reaksiyonun uzama aşamasında toplandı. Özgünlük ve özdeşlik, erime eğrisi analizleri ile doğrulandı. Eşik döngü değerleri ( $C_T$ ), analizler için bir Excel dosyası olarak dışa aktarıldı. Ham  $C_T$  veri analiz merkezine (<http://www.qiagen.com>) yüklendi. Amplifikasyon tekrarlanabilirliği ve ters transkripsiyon verimliliğini değerlendirmek ve amplifiye edilmiş numunelerdeki diğer kontaminasyonları tespit etmek için veri kalite kontrolü incelendi. Eksprese edilmiş miRNA'ların global  $C_T$  ortalaması, hedef dolaşan miRNA'ları normalleştirmek için seçildi. Her iki gruptaki  $C_T$  değerlerinin dağılımı ve ham veri ortalaması gözden geçirildi. Web tabanlı programda ortalama  $\Delta C_T$ ,  $2^{-\Delta C_T}$ , kat değişimi, P değeri ve kat düzenlemesi hesaplandı ve sonraki grafik analizlere P değerleri dahil edildi. Ortalama  $C_T$  değerleri doğrusal  $2^{-\Delta C_T}$  değerlerine dönüştürüldü ve P değerleri Student t-testi ile hesaplandı (Kasimanickam ve Kastelic, 2016). Ekspresyon  $\log_2 \geq 2$  ve p değeri  $<0,05$ 'te kat değişimi olan miRNA'ların anlamlı derecede yukarı veya aşağı doğru regüle olduğu değerlendirildi.

### 2.13. Diferansiyel Olarak İfade Edilen MiRNA'ların Hedef Genleri

Anlamlı şekilde farklı olarak ifade edilen insan miRNA'larının potansiyel hedefleri üç miRNA hedef tahmin algoritması ile tahmin edildi: TargetScan ([http://www.targetscan.org/vert\\_72/](http://www.targetscan.org/vert_72/)), mirDB (<http://mirdb.org/miRDB/>) ve DIANA ([http://diana.imis.athenainnovation.gr/DianaTools/index.php?r=microT\\_CDS/index](http://diana.imis.athenainnovation.gr/DianaTools/index.php?r=microT_CDS/index)). Farklı olarak ifade edilen sığır miRNA'larının potansiyel hedefleri ise iki miRNA hedef tahmin algoritması ile tahmin edildi: TargetScan ([http://www.targetscan.org/vert\\_72/](http://www.targetscan.org/vert_72/)) ve Miranda 3.3a (<http://www.microrna.org/microrna>). Parametreler online programlar için ilk 200 gen ve hedef puan skor  $\geq 80$  olarak ayarlandı. Miranda algoritması ile potansiyel hedef bölgeler, aşağıdaki değerleri kullanılarak tanımlandı:

Gap Open Penalty:-9.000000, Gap Extend Penalty:-4.000000, Score Threshold: 140.000000, Energy Threshold: 1.000000 kcal/mol, Scaling Parameter: 4.000000

Bu algoritmada eşleştirme puanı  $> 150$  ve enerji puanı  $< -20$  olan sonuçlar kabul edildi (Betel ve ark., 2010). Hedef tahmin programlarının ilk ortak genleri ilerdeki analizler için kullanıldı.

#### **2.14. Gen Ontolojisi Zenginleştirme Analizi ve KEGG Yolakları**

PANTHER Sınıflandırma Sistemi (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) sınıflandırma sistemi sürüm 15.0, ve Reactome Pathway Database (www.reactome.org) en üst sıralarda tahmin edilen genleri ve proteinleri sınıflandırmak için kullanıldı (Li ve ark., 2018).

#### **2.15. MiRNA Arraylerin qPCR Yöntemi ile Validasyonu**

Kramer yöntemiyle stem-loop RT primerler, (5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC -3 ') 44 nükleotitten (nt) ve olgun miRNA sekansının 3' ucunun altı tane komplement nt'larından oluşturuldu (Çizelge 2.4) (Kramer, 2011). Forward qPCR primeri olgun miRNA'nın 5' ucunun ilk 12-17 nt'ini ve Tm'yi 60°C'ye getirmek için seçilen 3-7 ek nt kullanıldı (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>). Tüm RT primerleri için aynı 44 nt kök döngü dizisini kullanarak, evrensel bir reverse primer, kök döngü içindeki dizilerden türetilir. Ters qPCR primeri olarak 5'-CCA GTG CAG GGT CCG AGG TA-3 kullanıldı (Kramer, 2011). Analiz için hsa-miR-382, hsa-miR-455, hsa-miR-197, bta-miR-370, bta-miR-1249, bta-miR-345 dahil olmak üzere altı farklı ifade edilmiş miRNA seçildi.

**Çizelge 2.4.** miRNA stem-loop, forward, reverz ve kontrol primer sekansları.

| miRNA        | Primer                 | Sekans                                                                         |
|--------------|------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
|              | Evrensel reverz primer | 5'-CCA GTG CAG GGT CCG AGG TA-3'                                               |
| hsa-miR-382  | Stem-loop              | 5'- GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC<br>GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC<br>CGAATC-3' |
|              | Forward primer         | 5'-GCC GCC GAA GTT GTT CGT-3'                                                  |
| hsa-miR-455  | Stem-loop              | 5'- GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC<br>GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC<br>CGATGT-3' |
|              | Forward primer         | 5'- GCC GCA TAT GTG CCT TTG GAC-<br>3'                                         |
| hsa-miR-197  | Stem-loop              | 5'- GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC<br>GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC<br>GCTGGG-3' |
|              | Forward primer         | 5'-GCC GCC TTC ACC ACC TTC-3'                                                  |
| bta-miR-370  | Stem-loop              | 5'- GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC<br>GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC<br>ACCAGG-3' |
|              | Forward primer         | 5'-GTA GCA GCC TGC TGG GGT-3'                                                  |
| bta-miR-1249 | Stem-loop              | 5'- GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC<br>GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC<br>TGAAGA-3' |
|              | Forward primer         | 5'-GTT GCA ACG CCC TTC CCC-3'                                                  |
| bta-miR-345  | Stem-loop              | 5'- GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC<br>GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC<br>AGCACT-3' |
|              | Forward primer         | 5'-GCC GCC GCT GAC TCC TAG-3'                                                  |
| Hu-SNORD95   | Forward primer         | 5'GCGGTGATGACCCCAACAT-3'                                                       |
|              | Reverz primer          | 5'GCTCAGAAACAGCCTCTGGATT-3'                                                    |
| Bt- SNORD69  | Forward primer         | 5'GCAAATGATGATAAACTGGATCTGA-<br>3'                                             |
|              | Reverz primer          | 5'CACGAAGCTCAGGGTTGGAT-3'                                                      |

İzole edilen miRNA (0,5 mikrogram), RevertAid First Strand cDNA Sentez Kiti (Thermo Scientific Fermentas, Beijing, Çin) ve random primer veya stem-loop reverse transkripsiyon (RT) primerleri kullanılarak cDNA'ya tersine kopyalandı

(Çizelge 2.5 ve 2.6). Karışım 42°C'de 60 dakika ve daha sonra 70°C'de 10 dakika inkübe edildi. Kantitatif gerçek zamanlı PCR, 2 µL cDNA, 12.5 µL FastStart SYBR Green Master (Roche), 0.5 µL spesifik forward primer (20 µM), 0,5 µl reverse primer (20 µM) ve 9,5 µL su 25 µL reaksiyon hacminde bir gerçek zamanlı PCR döngüsünde (QIAGEN Rotor Gene Q) gerçekleştirildi (Çizelge 2.7). Reaksiyon 95 °C'de 10 dakika, ardından 40 döngü 95 °C 15 saniye, 62 °C 30 saniye ve 72 °C de 30 saniyede gerçekleştirildi (Çizelge 2.8). Tüm reaksiyonlar üç kez tekrarlandı. Threshold döngüsü (Ct) varsayılan eşik ayarları kullanılarak belirlendi ve veriler 2- $\Delta\Delta C_t$  değerlere göre analiz edildi (Zhang ve ark., 2014).

**Çizelge 2.5.** Reverse transcriptase PCR bileşenleri ve hacimleri.

| Bileşen                                        | Hacmi / reaksiyonu |
|------------------------------------------------|--------------------|
| Random hexamer/stem-loop RT primer             | 1 µL               |
| RNase içermeyen su                             | Değişken           |
| Template RNA                                   | Değişken           |
| 5X Reaction Buffer                             | 4 µL               |
| Thermo Scientific™ RiboLock<br>RNase Inhibitor | 1 µL               |
| dNTP Mix, 10 mM each                           | 2 µL               |
| RevertAid Reverse Transcriptase                | 1 µL               |
| Toplam hacim                                   | 20 µL              |

**Çizelge 2.6.** RT PCR protokolü.

| Adım                                    | Zaman  | Sıcaklık |
|-----------------------------------------|--------|----------|
| Random hexamer primer için sadece       | 10 dak | 25°C     |
| Hem random hexamer hem stem-loop primer | 60 dak | 42°C     |
| Reaksiyon terminasyonu                  | 10 dak | 70       |

**Çizelge 2.7.** FastStart Syber Green qPCR bileşenleri ve hacimleri.

| Bileşen                       | Hacmi / reaksiyonu |
|-------------------------------|--------------------|
| FastStart™ SYBR® Green Master | 12,5 µL            |
| Forward primer                | 0,5 µL             |
| Reverse primer                | 0,5 µL             |
| Su                            | 9,5 µL             |
| Template cDNA                 | 2 µL               |
| Toplam hacim                  | 25 µL              |

**Çizelge 2.8.** FastStart Syber Green qPCR array protokolü

| Adım                    | Zaman  | Sıcaklık |
|-------------------------|--------|----------|
| İlk aktivasyon aşaması  | 10 dak | 95°C     |
| 3 kademeli siklus:      |        |          |
| 1. Denatürasyon         | 15 s   | 95°C     |
| 2. Bağlanma             | 30 s   | 62°C     |
| 3. Uzama                | 30 s   | 72°C     |
| Döngü sayısı: 40 siklus |        |          |

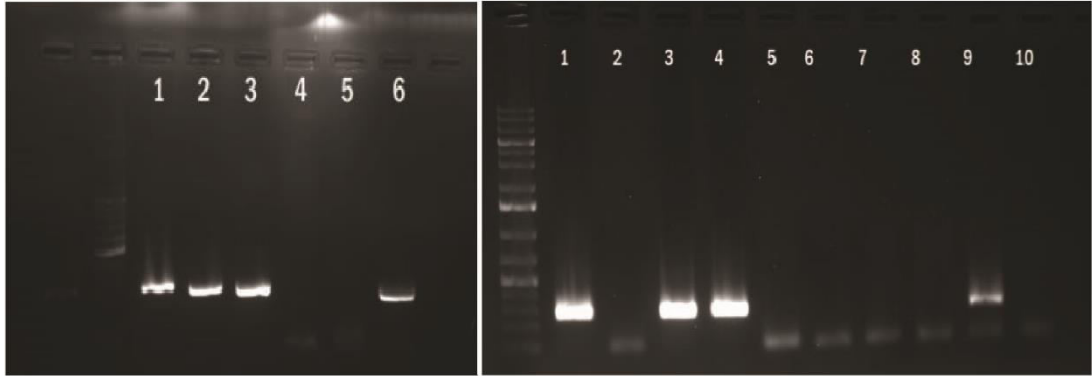
## 2.16. İstatistiksel Analizler

1, 2, 3, 5 ve 7 dpi'deki farklı hücre hatlarındaki ortalama viral yükleri 0 dpi'deki ortalama viral yük ile karşılaştırmak için iki yönlü ANOVA testi (Dunnette'in çoklu karşılaştırması) ve tüm hücredeki ortalama hücre içi ve hücre dışı gRNA yükünün karşılaştırması Sidaks'ın çoklu karşılaştırma testi GraphPad Prism version 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, ABD) ile yapıldı. Tüm grafikler bu yazılım tarafından oluşturuldu. Hücre içi ve dışı genom yük hesaplamaları log transforme edildi (kopya/mL). Doğrusal  $2^{-\Delta C_T}$  değerlerin p-değerleri Student t-testi ile  $C_T$  veri analiz merkezinde (<http://www.qiagen.com>) hesaplandı.  $p < 0,05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Standard sapma (SD) ve ortalama, üçlü ölçümlere dayanıyordu.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Mikoplazma Kontrol Testi

Hücre kültürlerinin mikoplazma kontaminasyonu EZ-PCR Mikoplazma Test Kiti (Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, İsrail) (Şekil 3.1) ile tespit edildikten sonra kontamine olan hücreler (MDBK, HMC, BEK ve HEK-293) BIOMYC-1 ve BIOMYC-2 antibiyotik çözeltileri (Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, İsrail) ile tedavi edildi. Bu amaçla MDBK, HMC ve BEK hücre üç hafta, HEK-293 hücre ise 5 hafta boyunca tedavi gördü. Tedaviden sonra hücreler çalışma sonuna kadar her hafta mikoplazma kontaminasyonu yönünden kontrol edildi.

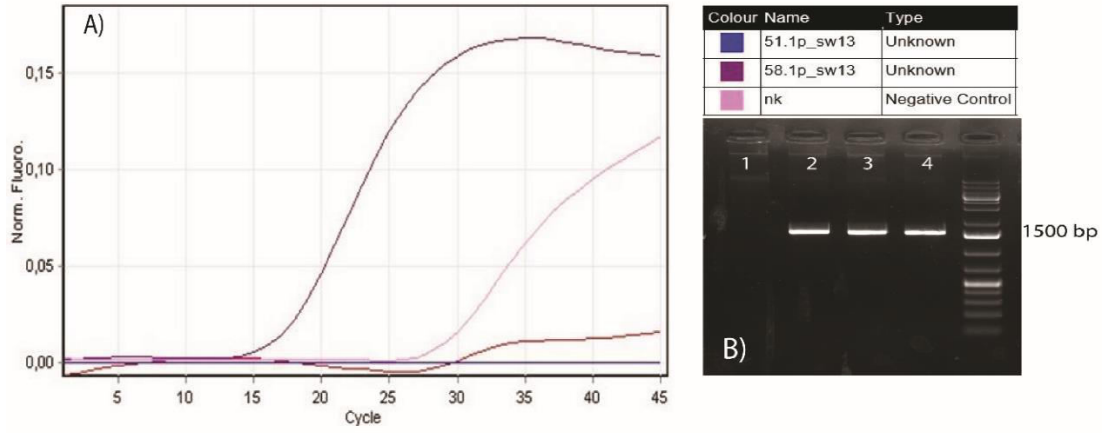


**Şekil 3.1.** A) EZ-PCR Mikoplazma Test Kiti ile hücrelerin ilk kontrol edilmesi. Hücreler sırasıyla: 1: MDBK, 2: HMC, 3: BEK, 4: SW-13, 5: PSH, 6: HEK-293. Hücrelere 3 hafta boyunca BYOMIC-1 ve 2 solusyon uyguladıktan sonra kontaminasyon tekrar kontrol edildi. B) Hücreler sırasıyla: 1: pozitif kontrol A, 2: negatif kontrol B, 3: pozitif kontrol B, 4: pozitif kontrol C, 5: PSH, 6: SW-13, 7: MDBK, 8: BEK, 9: HEK-293, 10: HMC. PCR sonucunun jel elektroforez görüntülemesiye göre sadece HEK-293 hücre hattı kontamine kaldı. Bu hücreye iki hafta daha tedavi yapıldı ve kontaminasyon bu hücrede de kalmadı.

#### 3.2. Ank-2 Virusunun Üretilmesi ve Enfektivite Testi Sonuçları

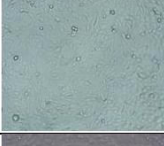
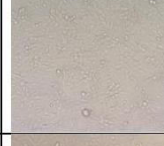
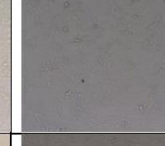
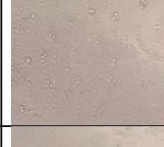
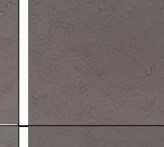
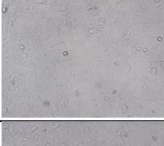
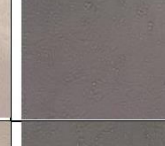
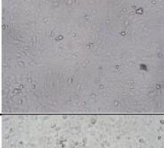
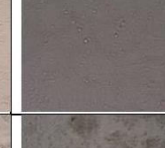
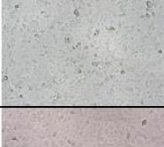
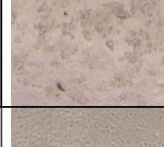
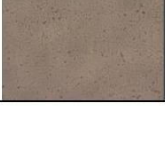
KKKAV Ank-2 virusu, SW-13 hücrelerinde 4. günden itibaren cpe göstermeye başladı. Virus enfeksiyonu hücrelerde yaklaşık %90 düzeyine ulaştığında 2 kez dondurulup çözölen hücrelerdeki virus identifikasyonu, S segmentini hedefleyen PCR ve gerçek zamanlı PCR ile doğrulandı (Şekil 3.2).

#### Quantitation data for Cycling A.Green



**Şekil 3.2.** A) KKKAV'un Ank-2 virusun (58 numara) SW-13 hücrede hattında ilk pasajının qRT-PCR sonucu. B) Geleneksel PCR yöntemi ile Ank-2 virusunun farklı hücre hatlarda tüm S segmentin elde edilmesi: 1: negatif kontrol, 2: HEK-293, 3: MDBK, 4: BEK hücresi.

Ank-2 virusun titresi SW-13 hücrede Reed Muench's metodu ile hesaplandı (Şekil 3.3).

|           | 1. gün                                                                              | 2. gün                                                                              | 3.gün                                                                               | 4.gün                                                                                | 5.gün                                                                                 |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| $10^{-1}$ |    |    |    |    |    |
| $10^{-2}$ |    |    |    |    |    |
| $10^{-3}$ |    |    |    |    |    |
| $10^{-4}$ |    |    |    |    |    |
| $10^{-5}$ |   |   |   |   |   |
| $10^{-6}$ |  |  |  |  |  |
| VK        |  |  |  |  |  |
| HK        |  |  |  |  |  |

**Şekil 3.3.** SW-13 hücre hattında KKKAV Ank-2 suşunun mikrotitrasyon görüntüleri.

Yapılan değerlendirme sonrasında virus titresi Reed Muench's metodu ile  $1.88 \times 10^{-3}$  olarak sonuçlandı.

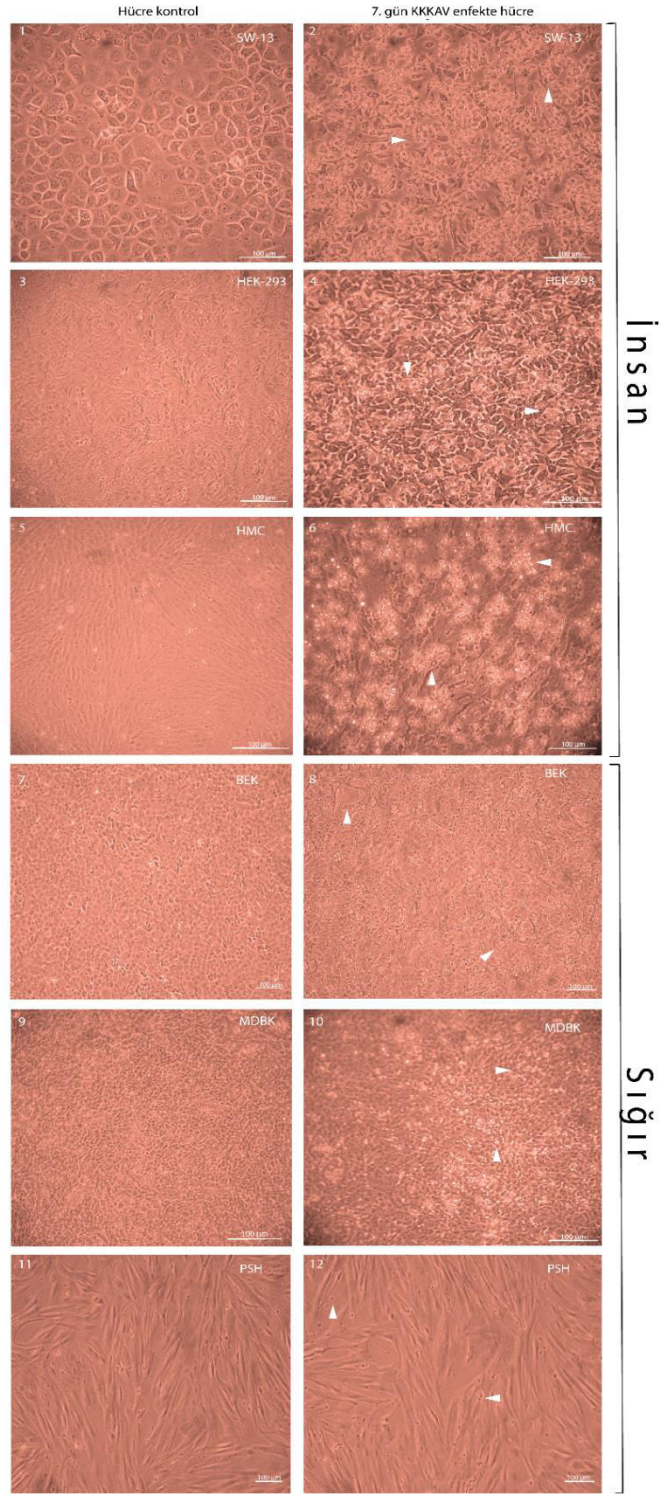
### 3.3. qRT-PCR İçin Linear Standardın Hazırlaması

Yapılan değerlendirme sonrasında HindIII enzimi ile kesilerek lineer hale getirilen S geni içeren pCDNA3.1myc/HisA vektörünün (Farzani ve ark., 2019)

$2 \times 10^8$  kopya/mL konsantrasyonda olduğu saptandı. Kantitasyon testlerinde bu plazminin Log10 sulandırmaları yapıldı ve her teste en az 3 sulandırmaya yer verilerek kantitasyonların güvenilir olarak yapılması sağlandı.

### 3.4. Sitopatoloji ve IIFT Sonuçları

KKKA virus ile ilişkili çeşitli CPE'ler, analiz edilen bütün hücre hatlarında gözlemlendi (Şekil 3.4, Şekil 3.5, Ek 2). Primer insan mezanşiyal hücre (HMC), 7 enfeksiyon sonrası günün (dpi) sonunda tek tabakanın çoğunu etkileyen ve ayrılmış hücre kümelerinin yüzmesi şeklinde tanımlanan patoloji gösterdi (Şekil 3.4 ve Şekil 3.5.A). SW-13 hücreleri, inokulasyonu izleyen ilk günde hücre yuvarlaklaşması ile başlayan en belirgin CPE'yi gösterdi, hücre patolojisi enfeksiyondan sonraki 3. günde hücrelerin  $> 51-75\%$ 'ine ulaşan ve 5 dpi ile hücrelerin tamamında gözlenen hücre yuvarlaklaşması ve dökülmesi belirtileri gösterdi (Şekil 3.4 ve Şekil 3.5.B). HEK-293 hücrelerindeki virus kaynaklı CPE, 2. günde başladı ve hücrelerin yuvarlaklaşmasıyla genel dejenerasyon ile karakterizedydi. HEK-293 hücrelerinin çoğu 7. günde virustan tamamen etkilendi (Şekil 3.4. ve Şekil 3.5.C). İnsan hücrelerine kıyasla, sığır hücrelerinin CPE başlangıcı gecikmiş ve sınırlı patojenik etki ile karakterizedydi. Tüm sığır böbrek hücrelerinde (MDBK, BEK ve PSH), CPE 3. günde gelişmeye başladı ve hücrelerin çoğu 7. gün sonuna kadar tek tabakada (monolayer halde) kaldı. Araştırma geneli itibarıyla KKKAV Ank2 izolatu sığır hücrelerinde  $\%50$ 'den daha az oranda CPE oluşturdu. Ölümsüzleştirilmiş MDBK ve BEK sığır böbrek hücreleri lokalize hücre dejenerasyon alanları gösterdi. Primer sığır hücrelerinde (PSH), hücrelerin uzun morfolojisi daha belirgin hale geldi ve hücreler bariyer bütünlüğünü kaybetti (Şekil 3.4 ve Şekil 3.5.D-F). Üç insan ve üç sığır hücre CPE skorlarının ortalaması karşılaştırıldığında, inokulasyonu izleyen 2. gün ve sonrası arasında anlamlı fark görüldü ( $p$  değeri  $< 0,0001$ ) (Şekil 3.5.G).



**Şekil 3.4.** KKKAV ile enfekte olan insan ve sığır böbrek hücrelerinde 7. günde gözlenen sitopatik etkiler. Primer ve ölümsüzleştirilmiş böbrek hücreleri üzerindeki CPE, Nikon Eclipse TS-100 ters ışık mikroskobu ile 1, 2, 3, 5 ve 7. günlük enfeksiyondan sonra (gösterilen 7. gün) görsel olarak skorlandı. Hücre kontrolü olarak enfekte olmamış hücreler kullanıldı. Sığır kökenli hücreler lokalize dejenerasyon ve hücre deformasyonu gösterirken, insan hücreleri genel hücre ayrılması ve hücre yuvarlaklaşması gösterdi. Büyütme x 10 (Ölçek çubuğu: 100 µm). (1) enfekte olmamış SW-13 (2) enfekte SW-13 (3) enfekte olmamış HEK-293 (4) enfekte HEK-293 (5) enfekte olmamış HMC (6) enfekte HMC (7) enfekte olmamış BEK (8) enfekte BEK (9) enfekte olmamış MDBK (10) enfekte olmuş MDBK (11) enfekte olmamış PSH (12) enfekte olmuş PSH. Görüntülerdeki ok başları, ilgili hücre hatlarında gözlenen patolojik değişiklikleri gösterir.

Viral proteinler, virus inokulasyondan sonraki ilk günden itibaren enfekte olan tüm hücre hatlarında IIFT ile saptandı (Şekil 3.5, Şekil 3.7, Ek 2). Bununla birlikte, insan ve sığır hücreleri, enfeksiyon ilerledikçe floresan ışıltıya veren hücre sayısında ve enfeksiyonun yayılımında büyük bir fark gösterdi. HMC primer insan hücrenin enfeksiyon oranı 7. günde  $> \% 76-100$ 'e yükseldi (Şekil 3.5.A ve Şekil 3.7.A). SW-13 hücrelerinde, enfeksiyon 5. günde  $> \% 76-100$ 'e ilerledi (Şekil 3.5.B ve Şekil 3.7.B). İnokulasyonu izleyen 3. günde, lokal floresan plaklarda (odaklar) kalmak yerine, viral proteinler HEK-293 hücrelerinin  $\%75$ 'ine kadar yayıldı (Şekil 3.5.C ve Şekil 3.7.C). Tüm insan böbrek hücrelerinde 3. gün ve sonrasında, genel olarak enfeksiyonun yayılması ile karakterize edilen bir enfeksiyon kalıbı gözlemlendi. Buna karşılık, sığır böbrek hücrelerindeki virus replikasyonu, spesifik lokalize alanlarda sınırlı kaldı ve 7. gün sonunda hücre kültürünün  $\% 50$ 'sinden daha azını enfekte etti (Şekil 3.5.D-F ve Şekil 3.7.D-F). Primer sığır hücre kültüründe (PSH), birbirleriyle temas halinde enfekte olmuş küçük hücre grupları görüldü (Şekil 3.7.D). İmmortal MDBK ve BEK sığır hücre hatlarındaki enfeksiyon şekli ise, 5. günden itibaren büyük adacık benzeri oluşumları gösterdi ve viral partiküller 7. gün sonunda sadece bu adacıklarda tespit edilebildi (Şekil 3.7.E, F). Üç insan ve üç sığır hattının IIFT skorlarının ortalaması karşılaştırıldığında, 3. günden itibaren anlamlı fark olduğu gözlemlendi (p-değerleri  $< 0,0001$ ) (Şekil 3.5.H). Genel olarak, CPE ve IIFT puanları birbiriyle benzer enfeksiyon kalıbı gösterdi.

Çalışma kapsamında ayrıca 24 gözlü hücre tabletlerde floresan hücreleri ve ortalama toplam canlı hücre sayısı üç tekrarlı olarak sayılarak her bir hücre hattındaki enfeksiyonun çokluğu (moi) da analiz edildi (Şekil 3.5). Primer ve ölümsüzleştirilmiş (devamlı) hücre hatlarının farklı morfolojisi nedeniyle (sırasıyla fibroblastik ve epitelyal), toplam hücre sayıları hücre tipine bağlı olarak değişim sergiledi. Buna göre ortalamalar; 16000 HMC hücre/göz, 10.000 PSH hücre/göz, 35.000 SW-13 hücre/göz, 30.000 HEK-293 hücre/göz ve 150.000 BEK ve MDBK hücresi/ göz olarak sayıldı. Cellcounter tarafından floresan boyanmış hücreleri saydıktan sonra (Şekil 3.6), insan ve sığır hücrelerinde belirgin şekilde farklı moi'ler elde edildi (Şekil 3.5, Ek 2). İnsan hücrelerinde moi, hem SW-13 hem de HMC'de

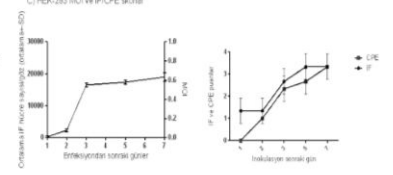
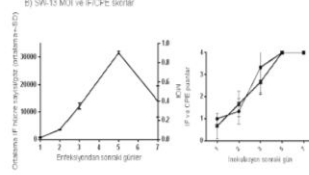
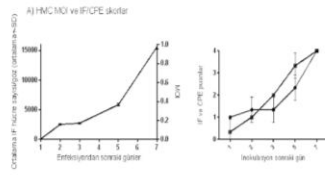
yaklaşık 1 idi (SW-13, 5. günde 0,90; HMC, 7. günde 0,97; Şekil 3.5.A, B). SW-13 hücrelerinde 5. günde yaygın enfeksiyon başladığından floresan hücre sayısı 7. günde bir azalma gösterdi. IIFT prosedürü sırasında ayrılmış ölü hücrelerin uzaklaştırılması sebebiyle bu zaman noktasında daha az sayıda boyanmış hücre oluştu (Şekil 3.5.B). HEK-293 hücre ortalama 0,63 moi'ye kadar ulaştı (Şekil 3.5.C). Buna karşılık, sığır hücrelerinde çok daha düşük bir moi tespit edildi, PSH, MDBK ve BEK hücrelerinde 7. günde sırasıyla 0,14, 0,18 ve 0,34 moi saptandı (Şekil 3.5.D-F). Üç insan ve üç sığır moi'sinin ortalaması karşılaştırıldığında, 5 günden itibaren anlamlı fark gösterdiği tespit edildi (5. ve 7. gün p değerleri sırasıyla 0,0011 ve <0,0001) (Şekil 3.5.I). Bu hesaplamaların yapıldığı ham veriler Ek-2' de sunuldu.



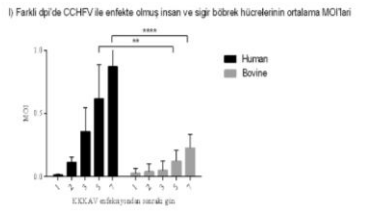
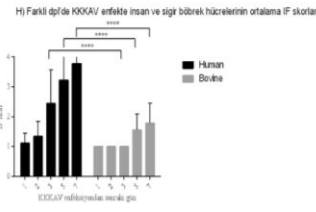
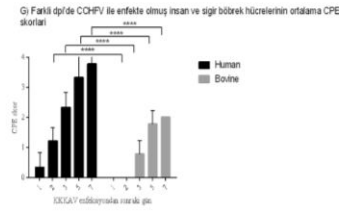
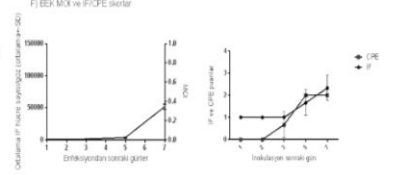
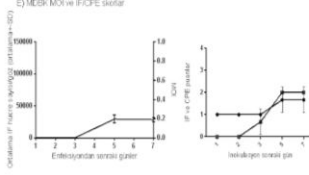
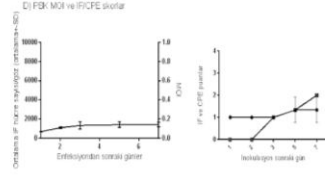
## Primer

## Ölümsüzleştirilmiş

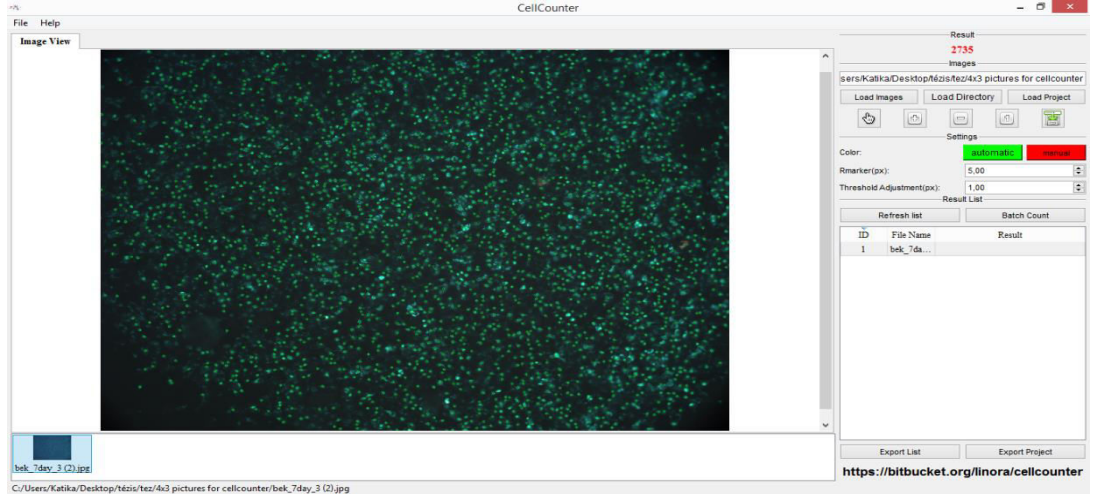
### İnsan



### Sığır



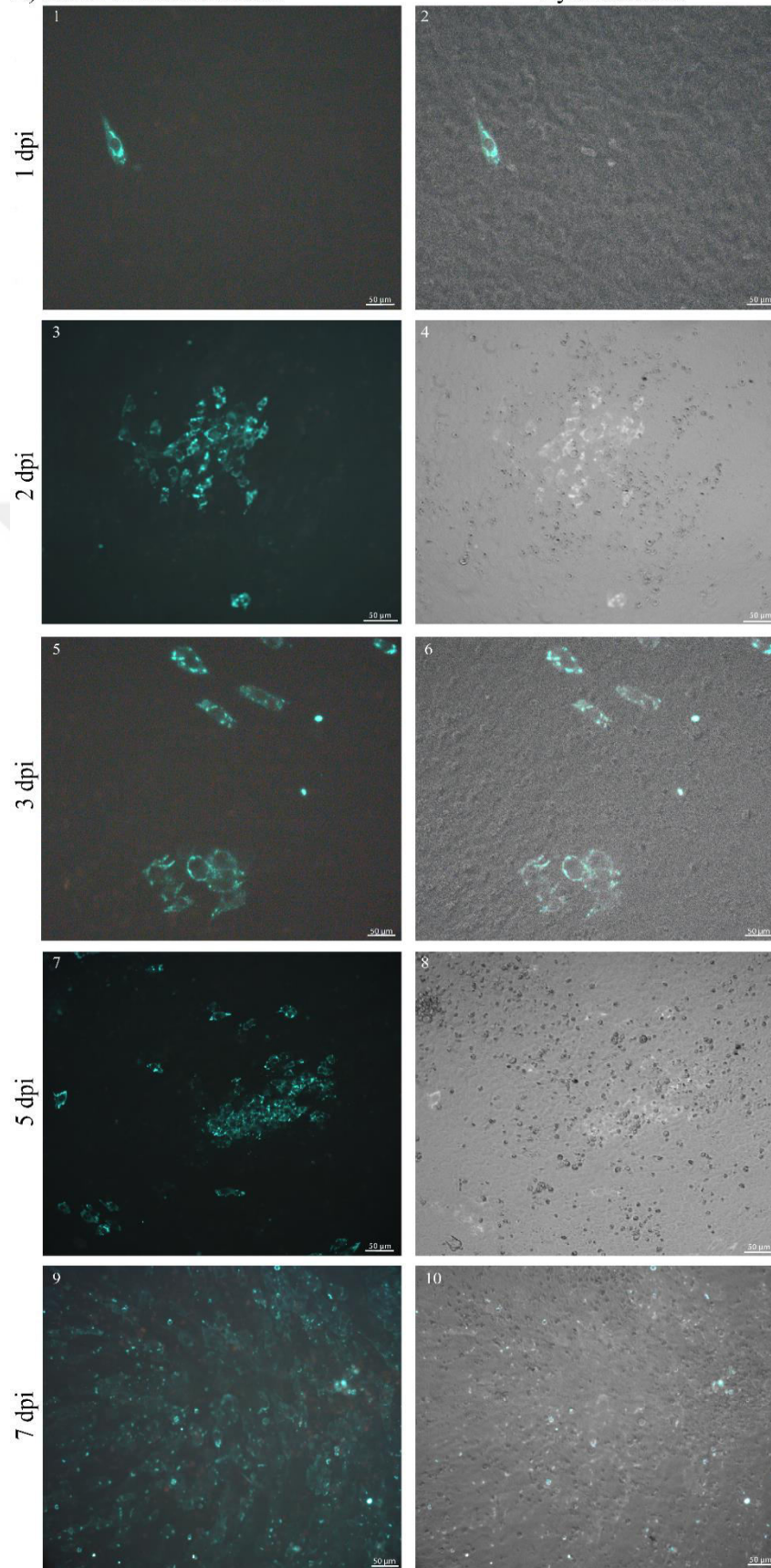
**Şekil 3.5.** KKKAV ile enfekte insan ve sığır böbrek hücrelerinin 1, 2, 3, 5 ve 7. günlerinde moi, CPE ve IF boyama puanları. CPE puanlama sistemi, çeşitli CPE seviyelerini tanımlayan numaralarla (0'dan 4'e kadar) yapıldı: Bu sistemde; 0, hücrelerde görünür bir değişiklik olmadığını, 1 %1-25 arasında, 2 %26-50 arasında, 3 %51-75 arasında ve 4'in ila tüm hücrelere yayılan (%76-100) CPE'ye sahip olduğunu ifade etti. İnoküle edilmemiş hücreler negatif kontrol olarak kullanıldı. 24 gözlü plakaların yeşil flüoresans emisyonlu pozitif hücrelerin üç tekrarlamasının ortalama yüzdesi immünofloresan skorlarını hesaplamak için kullanıldı. Puanlama yine 1 ila 4 arasında olacak şekilde yapıldı. Buna göre; 1 hücrelerin dörtte birinin (%1-25), 2 hücrelerin yarıya kadar (%26-50), 3 hücrelerin dörtte üçüne kadar (%51-75) ve 4'e hemen hemen tüm hücrelerin (%76-100) floresan ışığı yaydığını ifade etti. İnoküle edilmemiş hücreler negatif kontrol olarak kullanıldı. Toplam hücre sayısı Cellcounter ile sayıldı. moi saymak için kullanılan formül; ortalama floresan hücre/alan X 20 alan/göz X dilüsyonu bölü hücre sayısı/göz. Ortalama ve SD üç tekrar yaparak ölçüldü. moi ve CPE-IF skorlar, insan ve sığır hücreleri arasında büyük fark gösterip belirtilen tüm faktörlerde insan hücrelerinde daha yüksek skorlara ve seviyelere sahiptir. A) HMC moi, CPE ve IF puanları B) SW-13 moi, CPE ve IF puanları C) HEK-293 moi, CPE ve IF puanları D) PSB moi, CPE ve IF puanları E) MDBK moi, CPE ve IF puanları F) BEK moi, CPE ve IF puanları. moi, CPE ve IF skorlarının üç insan ve üç sığır böbrek hücrelerinin ortalaması arasındaki farklar. G) Ortalama insan ve sığır böbrek hücrelerinin CPE puanları H) Ortalama insan ve sığır böbrek hücrelerinin IF puanları I) Ortalama insan ve sığır böbrek hücrelerinin moi puanları. Ortalama ve SD üçlü ölçümlere dayanmaktadır. \*\* p-değeri  $\leq 0,01$ , \*\*\* p-değeri  $\leq 0,0001$ .



Şekil 3.6. CellCounter hücre sayım programı ile boyanmış hücreler sayıldı. Her zaman noktasında üç tane resim sayıldı, ortalama ve SD bu üç tekrarlamamanın sonucu olarak sonuçlandı.

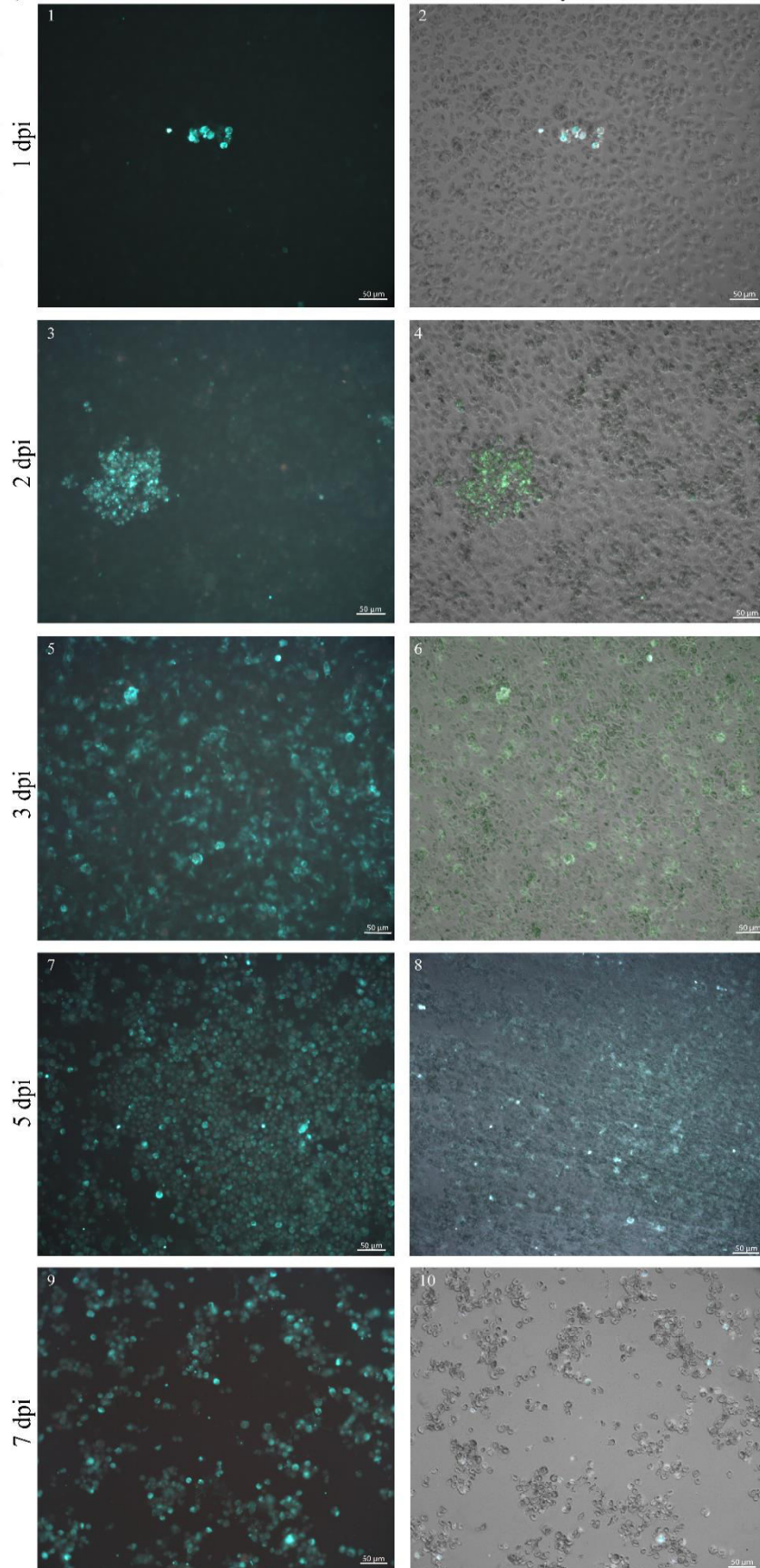
A) HMC İmmunofloresan

Aydınlık saha



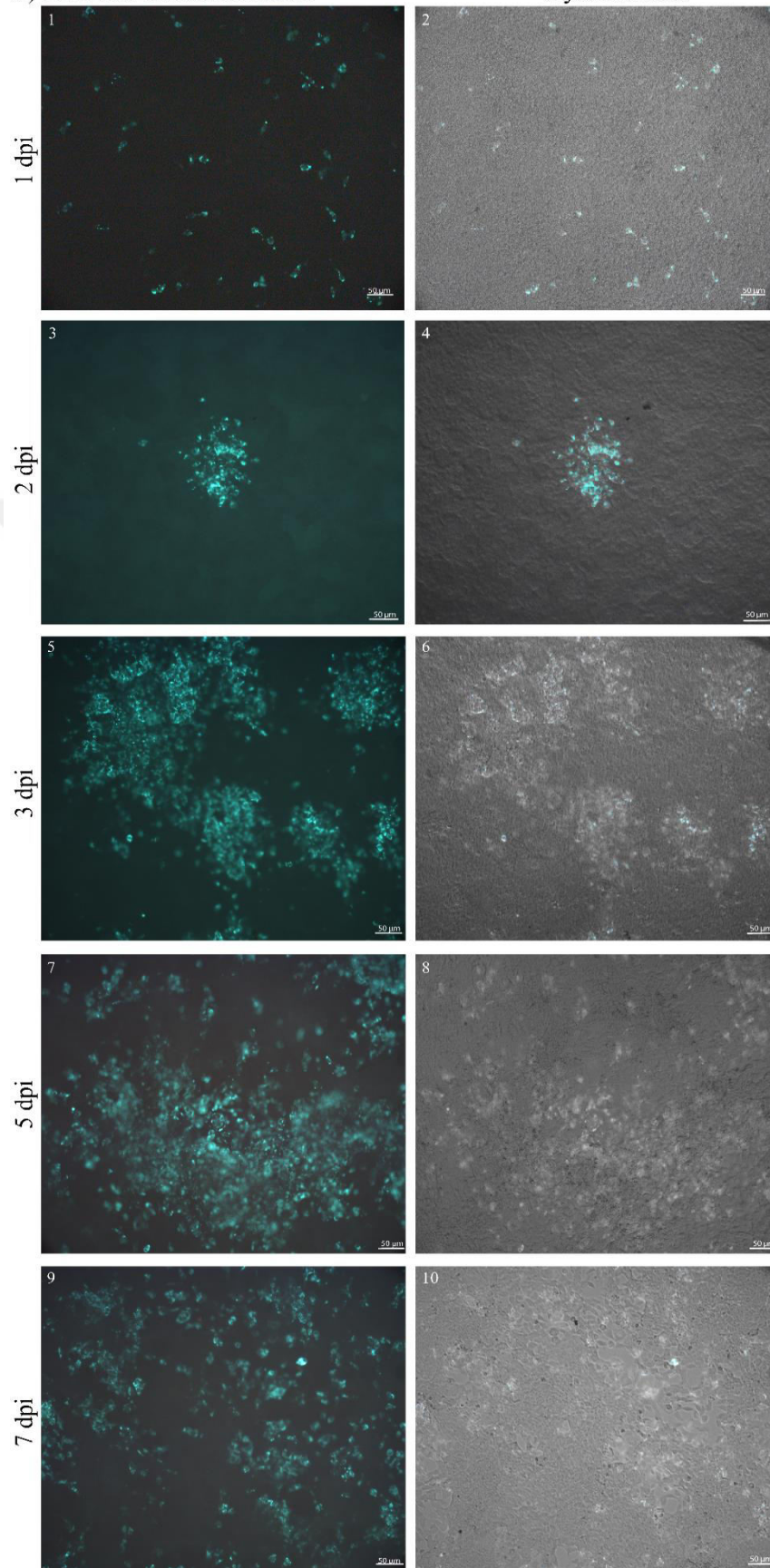
B) SW-13 İmmunofloresan

Aydınlık saha



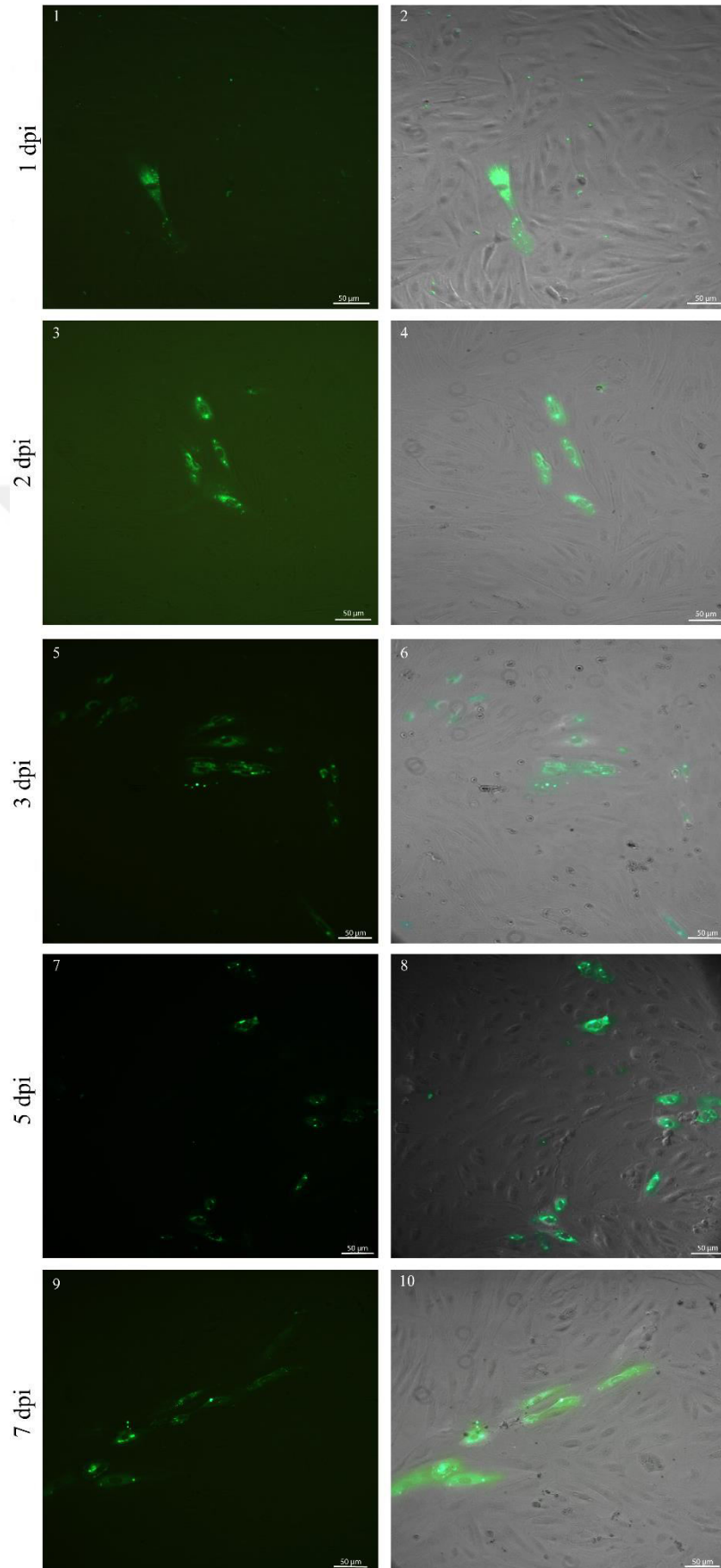
C) HEK-293 İmmunofloresan

Aydınlık saha



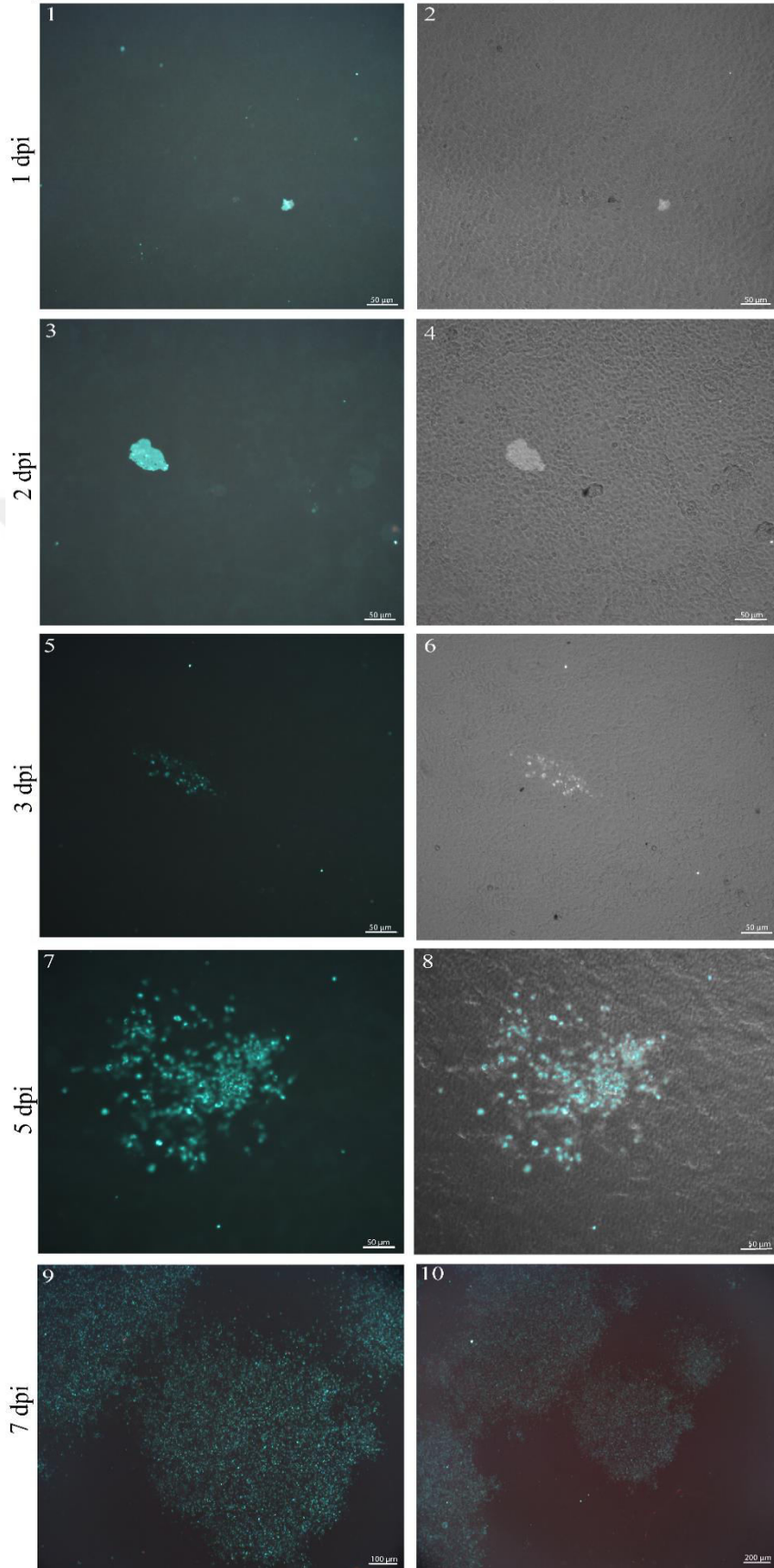
D) PSH Immunofloresan

Aydınlık saha



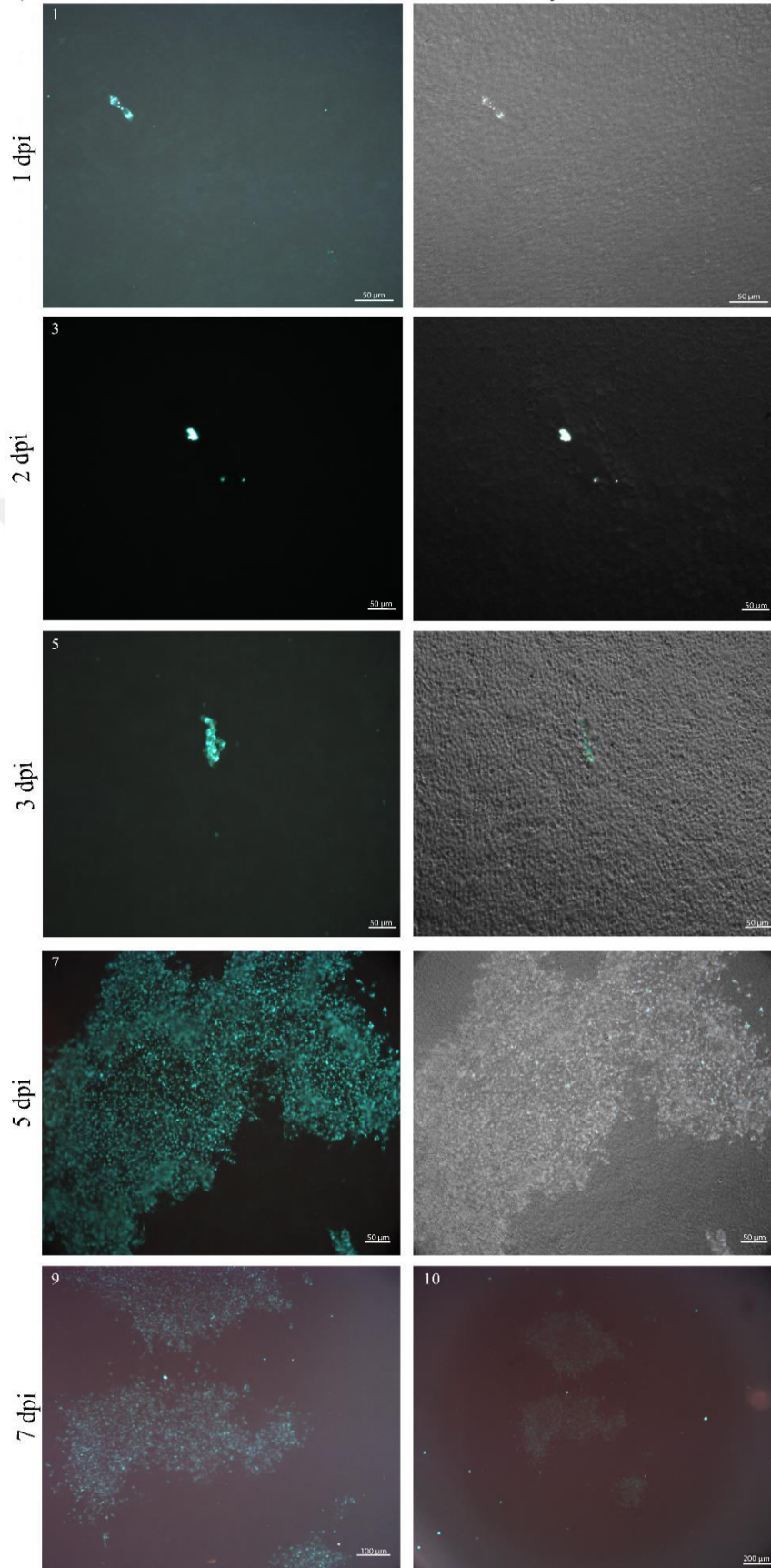
E) BEK İmmunofloresan

Aydınlık saha



F) MDBK İmmunofloresan

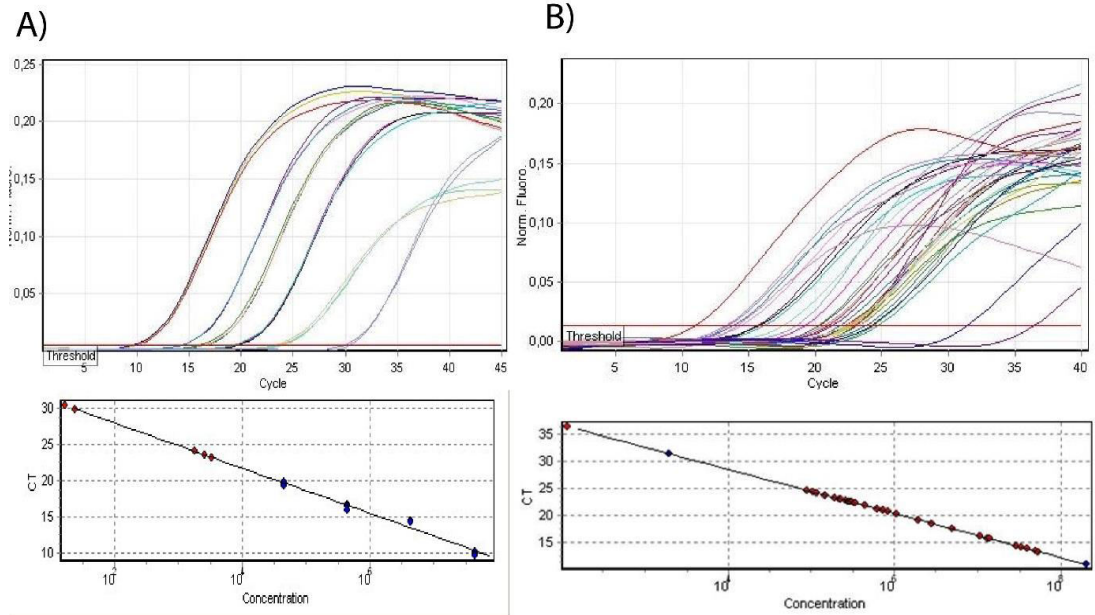
Aydınlık saha



**Şekil 3.7.** 1, 2, 3, 5 ve 7. günde KKKAV ile enfekte olan primer ve ölümsüzleştirilmiş insan ve sığır böbrek hücrelerinde IIFA. Ölçümler üç kez tekrar üzerinden hesaplandı. İnoküle edilmemiş hücreler kontrol olarak kullanıldı. İnsan böbrek hücreler 3 günden itibaren birbirlerinden geniş mesafede enfeksiyonu gösterdi. Büyütme 20X (ölçek çubuğu: 50 µm). (A) (1, 2) 1. günde HMC (3, 4) 2. günde HMC (5, 6) 3. günde HMC (7, 8) 5. günde HMC (8, 10) 7. günde HMC. (B) (1, 2) 1. günde SW-13 (3, 4) 2. günde SW-13 (5, 6) 3. günde (7, 8) 5. günde SW-13 (9, 10) 7. gün'de SW-13 (C) (1, 2) 1. günde HEK-293 (3, 4) 2. günde HEK-293 (5, 6) 3. günde HEK-293 (7, 8) 5. günde HEK -293 ve (9, 10) 7. günde HEK-293. Enfekte sığır böbrek hücreler, tüm enfeksiyon döngüsü boyunca sınırlı kaldı ve ölümsüzleştirilmiş sığır hücrelerinde 5. günden itibaren büyük adacık benzeri oluşumlar görüldü. Adacık benzeri oluşumlara daha iyi bir görünüm için üç farklı büyütme kullanıldı: 5X (ölçek çubuğu: 200 µm), 10X (ölçek çubuğu: 100 µm) ve 20X (ölçek çubuğu: 50 µm). (D) (1, 2) 1 günde PSH (3, 4) 2 günde PSH (5, 6) 3 günde PSH (7, 8) 5 günde PSH ve (9, 10) 7 günde PSH (E) (1, 2) 1. günde BEK (3, 4) 2. günde BEK (5, 6) 3. günde BEK (7, 8) 5. günde BEK ve (9, 10) 7. günde BEK (F) (1, 2) 1. günde MDBK (3, 4) 2. gün'de MDBK (5, 6) 3. günde MDBK (7, 8) 5. günde MDBK ve (9, 10) 7. günde MDBK.

### 3.5. Hücre İçi ve Dışı Viral Yük Sonuçları

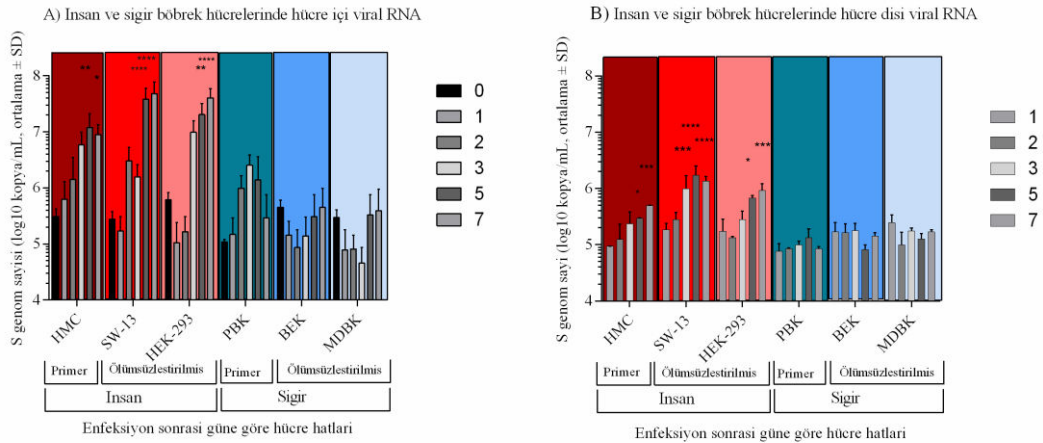
Bahsedilen enfekte hücrelerden ve süpernatantlardan toplam RNA ekstraksiyonundan sonra hem hücre içi hem hücre dışı gRNA'nın kantitatif gerçek zamanlı PCR'i üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi (Şekil 3.8.). Viral RNA'nın miktarı nükleoprotein genini hedefleyerek belirlendi.



**Şekil 3.8.** Gerçek zamanlı PCR'dan bir örnek amplifikasyon. A) Hazırlanmış standard ve B) örnekler ile standard CT değerleri.

İnsan hücre hatlarındaki hücre içi viral RNA, 0. güne kıyasla enfeksiyon döngüsü sırasındaki 5. günde (sırasıyla HEK- 293, SW-13 ve HMC'de  $p = 0,0087$ ,  $<0,0001$ ,

0,0012) ve 7. günde (sırasıyla HEK-293, SW-13 ve HMC'de  $p < 0,0001$ ,  $< 0,0001$  ve  $0,0180$ ) ortalama 2 log artış gösterdi (Şekil 3.9.A). Viral yük, ortalama 7 log kopya/mL ile 5-7 gün arasında zirveye ulaştı (sırasıyla SW-13, HEK-293 ve HMC'de ortalama  $4,8 \times 10^7$ ,  $4,0 \times 10^7$ ,  $8,5 \times 10^6$  kopya/mL). Her bir zaman noktasında, hücre dışı viral RNA, hücre içi viral RNA'dan daha düşüktü, ancak zaman içinde hem primer hem de ölümsüzleştirilmiş insan hücrelerinde benzer artış sergilendi (Şekil 3.9.B). 0. gün ile karşılaştırıldığında, HEK-293, 5. günde (p-değeri 0,01 ve ortalama  $6,7 \times 10^5$  kopya/mL) ve 7. günde (p-değeri 0,0005 ve ortalama  $9,1 \times 10^5$  kopya/mL) istatistiksel olarak anlamlı fark gösterdi. SW-13 hücre hattı, inokulasyondan sonraki 3. günde hücre dışı genom yükünde anlamlı bir artış gösterdi (p-değerleri sırasıyla 3, 5 ve 7 dpi'de 0,0002,  $< 0,0001$ ,  $< 0,0001$  ve ortalama  $1,9 \times 10^6$ ,  $1,7 \times 10^6$  ve  $1,3 \times 10^6$  kopya/mL) (Şekil 3.9.B). HMC hücresi ayrıca 5. gün (p-değeri 0,0258 ve ortalama  $5,9 \times 10^5$  kopya / mL) ve 7 dpi'de (p-değeri  $< 0,0004$  ve  $4,9 \times 10^5$  kopya/mL) önemli bir artış gösterdi (Şekil 3.9.B).

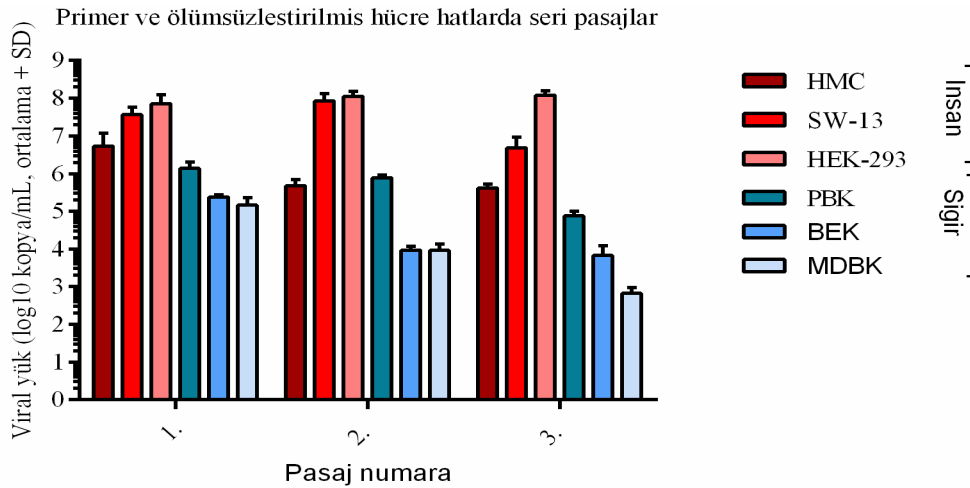


**Şekil 3.9.** 0, 1, 2, 3, 5 ve 7. günde hücre içi ve hücre dışı gRNA kopyaları ile tanımlanan KKKAV'a karşı insan ve sığır böbrek hücre hattı duyarlılığı. Ölçümler üç kopya halinde alınmıştır. Sonuçlar hem hücre içi hem de hücre dışı viral RNA miktarını sunmaktadır. 1, 2, 3, 5 ve 7. günde ortalama viral yükler, 0. günde (KKKAV inokulasyondan 1 saat sonra) ortalama viral yük ile karşılaştırıldı. Viral yükte önemli artış sadece insan hücre hatlarında ölçüldü. A) Ölümsüzleştirilmiş ve primer hücre hatlarında hücre içi RNA miktarı. B) Ölümsüzleştirilmiş ve primer hücre hatlarında hücre dışı RNA miktarı. Tüm hesaplamalar log dönüştürülmüş viral yükler (kopya/mL) dayalıdır. \* p-değeri  $\leq 0,05$ , \*\* p-değeri  $\leq 0,01$ , \*\*\* p-değeri  $\leq 0,001$ , \*\*\*\* p-değeri  $\leq 0,0001$ .

Sığır böbrek hücrelerinin hiçbirisi, deney sırasında viral yükte istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermedi (Şekil 3.9.). İnsan hücrelerine benzer şekilde sığır hücrelerinde, hücre içi viral yükler hücre dışı olanlardan daha yüksekti, ancak

farklılıklar anlamlı bulunmadı (Şekil 3.9.A). Hücre içi viral RNA yükü zamanla artarken (ve PSH'da azalırken), hücre dışı viral RNA aynı seviyede kaldı. Sığır böbrek hücreleri arasında PSH, 3. günde (ortalama  $2,5 \times 10^6$  kopya / mL) bir tepe noktasıyla en yüksek hücre içi viral yükü gösterdi ve daha sonra 7. günde ( $2,9 \times 10^5$  kopya / mL) azaldı. MDBK hücresinde 7. gün sonunda ortalama  $3,9 \times 10^5$  ve BEK'te ise  $4,5 \times 10^5$  kopya/mL viral RNA yükü saptandı. Hücre dışı RNA'nın MDBK ve BEK'te 1. gün ve 3. günde sırasıyla  $2,4 \times 10^5$  kopya/mL ve  $1,7 \times 10^5$  kopya/ mL olmak üzere maksimuma ulaştığı gözlemlendi (Şekil 3.9.B). PSH, 5. gün hariç ortalama 4 log viral yük göstermiştir.

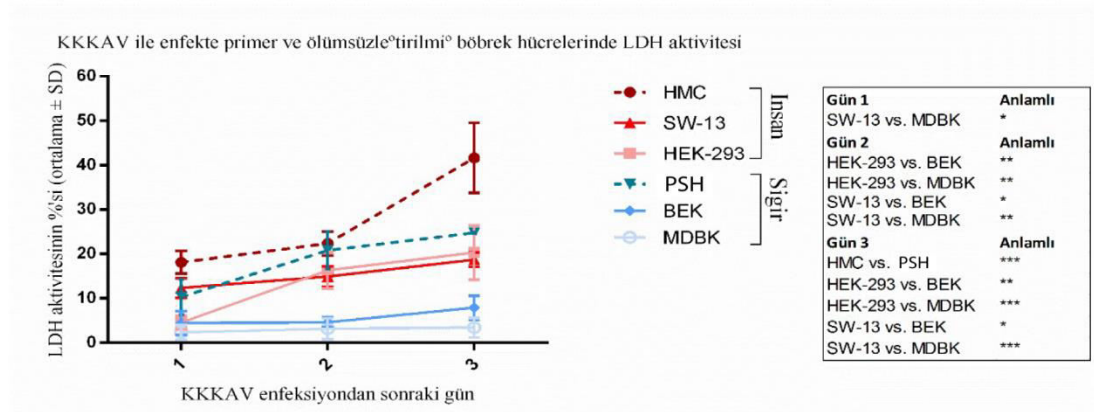
Seri pasajlar sırasında, birinci çoğalma döngüsünün sonunda ölçülen ortalama viral yük HEK-293'te, üçüncü pasaj sonunda  $7,1 \times 10^7$  kopya/mL'den  $1,2 \times 10^8$  kopya/mL'ye yükseldi (Şekil 3.10). SW-13 üçüncü pasaj sonuna ortalama  $3,6 \times 10^7$  kopya/mL'den ortalama  $4,8 \times 10^6$  kopya/mL'ye ve HMC ise ortalama  $5,1 \times 10^6$  kopya/mL'den ortalama  $4,0 \times 10^5$  kopya/mL'ye değişti. Üç seri pasaj sırasında, tüm sığır hücre hatlarında viral yük en az iki log kopya/mL azaldı. Üçüncü pasajda, MDBK ortalama  $1,7 \times 10^3$  kopya/mL, BEK ortalama  $6,7 \times 10^3$  kopya/mL ve PSH ortalama  $7,5 \times 10^4$  kopya/mL KKKAV gRNA'ya sahipti.



**Şekil 3.10.** Ölümsüzleştirilmiş ve primer, insan ve sığır böbrek hücrelerinde üç seri pasaj yoluyla KKKAV'un viral yükü. Her hücre hattı, sitopatik etki yaklaşık %80'e ulaşınca kadar (oniki güne kadar) üç kez T25 şişelerinde pasajlandı. Üç tur donma-çözülme işleminden sonra, hücresel kalıntılar 4°C'de 10 dakika boyunca 3000 rpm'de santrifüj edilerek uzaklaştırıldı ve üst sıvı toplandı. Bu prosedür iki kez daha tekrarlandı. Virus, SW-13 hücrelerinde standart bir DKID<sub>50</sub> deneyi kullanılarak her bir pasaj arasında titre edildi. Genomik viral yük, insan hücrelerinde sadece 1 log dalgalanırken sığır hücrelerinde 2 log'dan daha fazla azaldı. Tüm hesaplamalar log-dönüştürülmüş edilmiş viral yüklere (kopya / mL) dayanmaktadır. Ortalama ve SD üç kez ölçülerek hesaplandı.

### 3.6. LDH Test Sonuçları

LDH tespit amacıyla, hücrelere 0,1 moi'de virus inokule edildi ve sonraki üç gün içinde sitotoksisite seviyeleri ölçüldü. İnsan ve sığır böbrek hücrelerinde sitotoksisite zamanla artmasına rağmen, sığır hücrelerine kıyasla hem devamlı hem de primer insan hücrelerinde daha yüksek LDH aktivitesi değerleri tespit edildi (Şekil 3.11). Devamlı insan hücre hatlarında sitotoksisite düzeyi inokulasyonun üçüncü gününde, HEK-293 ve SW-13'te sırasıyla ortalama %20,31 ve %18,72'ye ulaşırken, devamlı sığır hücre hatlarında, MDBK'da ortalama %3,4 ve BEK'te %7,9'a ulaştı. Ortalama LDH seviyesi, primer insan HMC hücrelerinde %41,62, primer sığır PSH hücrelerinde ise %24,80 olarak hesaplandı. Hem insan hem de sığır primer böbrek hücreleri, ölümsüzleştirilmiş hücrelerden daha yüksek sitotoksisite oranı sergiledi. Tukey'in çoklu karşılaştırma testini kullanarak, 1. günde SW-13 ile MDBK (p-değeri=0,0224), 2. günde HEK-293 ile BEK (p-değeri=0,0061) ve HEK-293 ile MDBK (p-değeri=0,0019), SW-13 ile BEK (p-değeri=0,0183), SW-13 ile MDBK (p-değeri=0,0059) karşılaştırıldığında anlamlı farklar bulundu. İnokulasyonun 3. gününde, HMC ile PSH (p-değeri=0,0001), HEK-293 ile BEK (p-değeri = 0,0035), HEK ile MDBK (p-değeri=0,0001) ve SW-13 ile BEK (p-değeri=0,0122) ve SW-13 ile MDBK (p-değeri=0,0004) karşılaştırıldığında anlamlı farklar olduğu görüldü (Şekil 3.11.).



**Şekil 3.11.** KKKAV ile enfekte ölümsüzleştirilmiş ve primer insan ve sığır böbrek hücrelerinde farklı zaman noktalarında LDH testi ile ölçülen hücre sitotoksisitesi. Ölçümler üç tekrarlı ile yapıldı. Ölümsüzleştirilen ve primer böbrek hücrelerde KKKAV enfeksiyonundan 1, 2 ve 3 gün sonra 0.1 moi virus enfeksiyonunda görülen ortalama sitotoksisite yüzdesi.

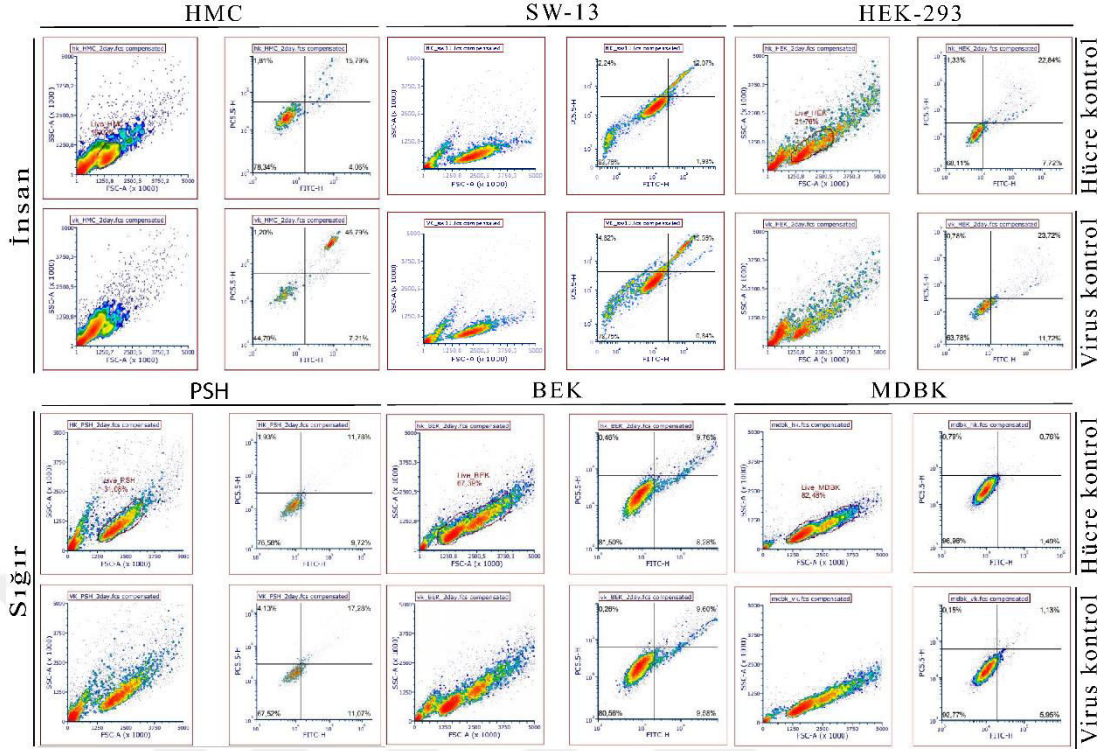
### 3.7. Apoptosis ve Nekrosis Sonuçları

#### 3.7.1. Akış Sitometrisi Sonuçları

Belirgin CPE ve hücre ölümü 72-120 saat arasında gözlemlendiği için inokulasyon sonrası 2. gün tüm apoptosis deneyleri için kinetiklerin maksimum zaman noktası olarak tanımlandı. Hücre kontrollere göre BEK hariç virus enfekte hücre hatlarında nekrotik hücrelerin sayısı daha fazla bulundu (Çizelge 3.1., Şekil 3.12.). Sayısal olarak insan primer hücreler diğer bütün hücrelerden çok daha fazla nekrotik değişimi gösterdi (%15,79'den %46,79'a arttı). Sığır hücreleri arasında en büyük farkı primer sığır hücresi gösterdi (%11,78- %17,28). Elde edilen bu sonuçlar LDH test ile uyumlu bulundu. Çalışmada en yüksek LDH sitotoksitesi primer insan hücresinde (HMC) tespit edilirken, sığır hücreleri arasında ise en çok etkilenen hücre primer sığır hücresi (PSH) oldu. Canlı hücrelerin sayısı KKKA virus ile enfekte bütün hücrelerde azaldı ancak en büyük kaybı HMC gösterdi. Apoptotik hücrelerin sayısı SW-13 hücresi hariç virus ile enfekte diğer tüm hücrelerde yükseldi.

**Çizelge 3.1.** Apoptotik, canlı ve nekrotik hücrelerin KKKA inokulasyondan sonraki 2. gündeki yüzde oranı. HK: hücre kontrol, VK: virus kontrol.

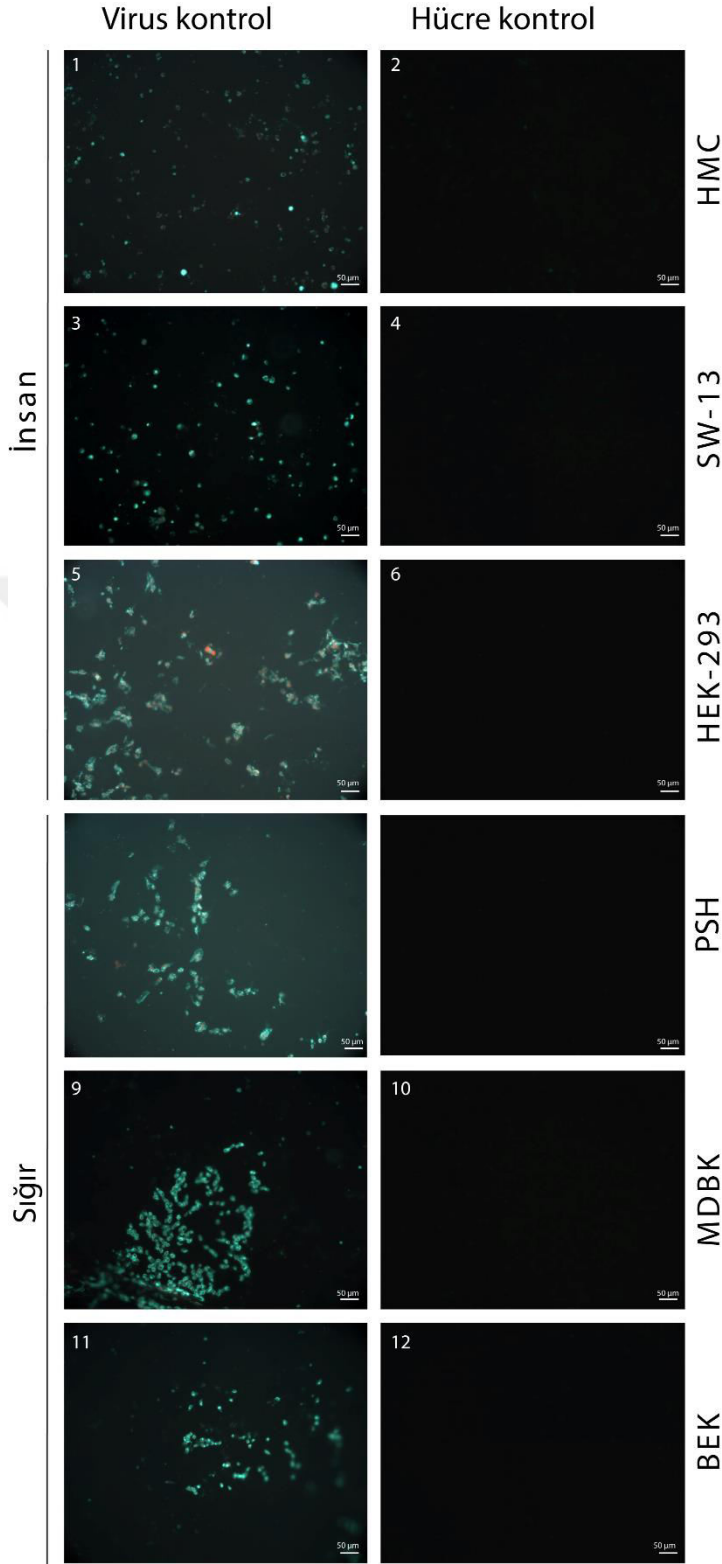
|                           | PSH   |       | MDBK  |       | BEK  |       | SW13  |       | HEK   |       | HMC   |       |
|---------------------------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                           | HK    | VK    | HK    | VK    | HK   | VK    | HK    | VK    | HK    | VK    | HK    | VK    |
| <b>Nekrotik hücreler</b>  | 11,78 | 17,28 | 0,76  | 1,13  | 9,76 | 9,6   | 12,07 | 15,59 | 22,84 | 23,72 | 15,79 | 46,79 |
| <b>Canlı hücreler</b>     | 76,58 | 67,52 | 96,96 | 92,77 | 81,5 | 80,56 | 83,76 | 78,75 | 68,11 | 63,78 | 78,34 | 44,79 |
| <b>Apoptotik hücreler</b> | 9,72  | 11,07 | 1,49  | 5,95  | 8,28 | 9,58  | 1,93  | 0,84  | 7,72  | 11,72 | 4,06  | 7,21  |



**Şekil 3.12.** KKKAV ile enfekte primer ve ölümsüzleştirilmiş insan ve sığır böbrek hücrelerde 2 günde Caspase-3/7 bağlı apoptosis ve nekrosis sonuçları. Ölçümler ile CytoFLEX Flow Cytometer (Beckman Coulter) yapıldı. Kompanzasyon kontrol olarak tek boyalı (hem Caspase 3/7 hem AADvanced Dead Cell Stain), otofloresans kontrol olarak boyasız hücreler kullanıldı. Akış sitometre cihazında 530/30 BP filtresi ve 690/50 BP filtre kullanılarak ölçüm yapıldı.

### 3.7.2. Annexin V-FITC Apoptosis Sonuçları

Hücrelerdeki apoptosis ve nekrosis gelişimi akış sitometrisinin yanı sıra, floresan mikroskopu kullanarak da Annexin V-FITC Apoptosis Kit (FineTest) ile enfeksiyonu izleyen ikinci günde incelendi. Hücrelerde virus üremesine bağlı CPE oluşumundan önce apoptosis ve nekroz tespit edildi. Sığır kökenli hücrelerdeki IIF testi bulgularına benzer şekilde, apoptosisin ve nekrozun, virus plak alanlarında sınırlı olarak kaldığı izlendi (Şekil 3.13.).



**Şekil 3.13.** Hücrelerdeki apoptosis ve nekrosis gelişimi KKKAV enfeksiyonunun ikinci gününde Annexin V-FITC Apoptosis Kit (FineTest) ile test edildi. 1) HMC virus kontrol 2) HMC hücre kontrol 3) SW-13 hücre kontrol 4) SW-13 hücre kontrol 5) HEK-293 virus kontrol 6) HEK-293 hücre kontrol 7) PSH virus kontrol 8) PSH hücre kontrol 9) MDBK virus kontrol 10) MDBK hücre kontrol 11) BEK virus kontrol 12) BEK hücre kontrol.

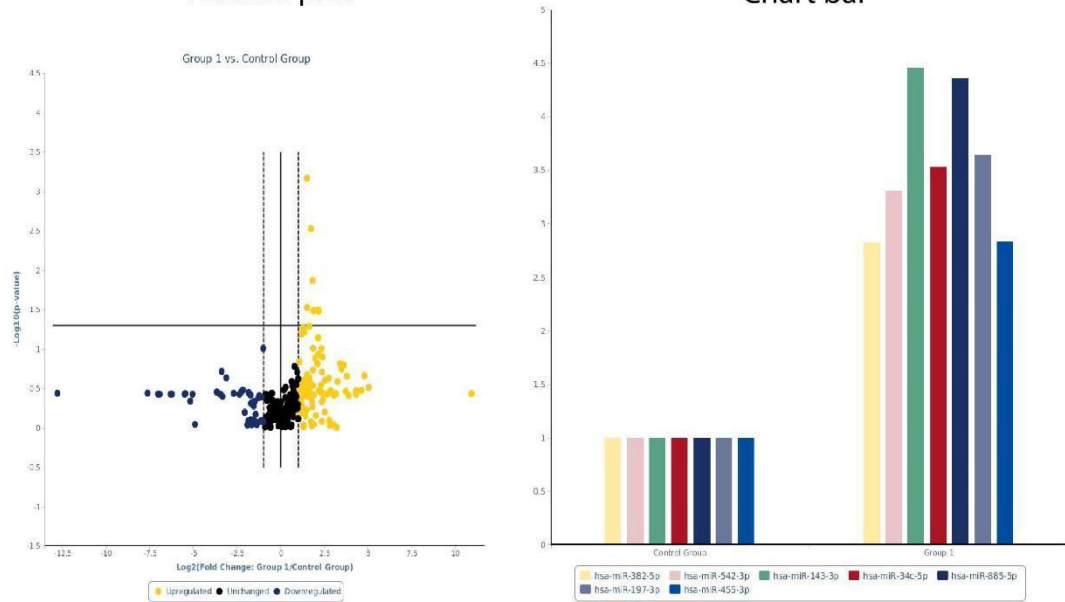
### 3.8. MiRNA Array Sonuçları

Araştırma örneklerinden elde edilen miRNA'ların miktarı 0,5-1,5 µg/µl arasında saptandı. Miktarının belirlenmesi için yapılan testte öncü miRNA'dan, kit kapsamında önerildiği üzere, 500 ng kullanıldı. Array analizin erime (melting) eğrisi ve amplifikasyon eğrisi beklendiği şekilde çıktı.

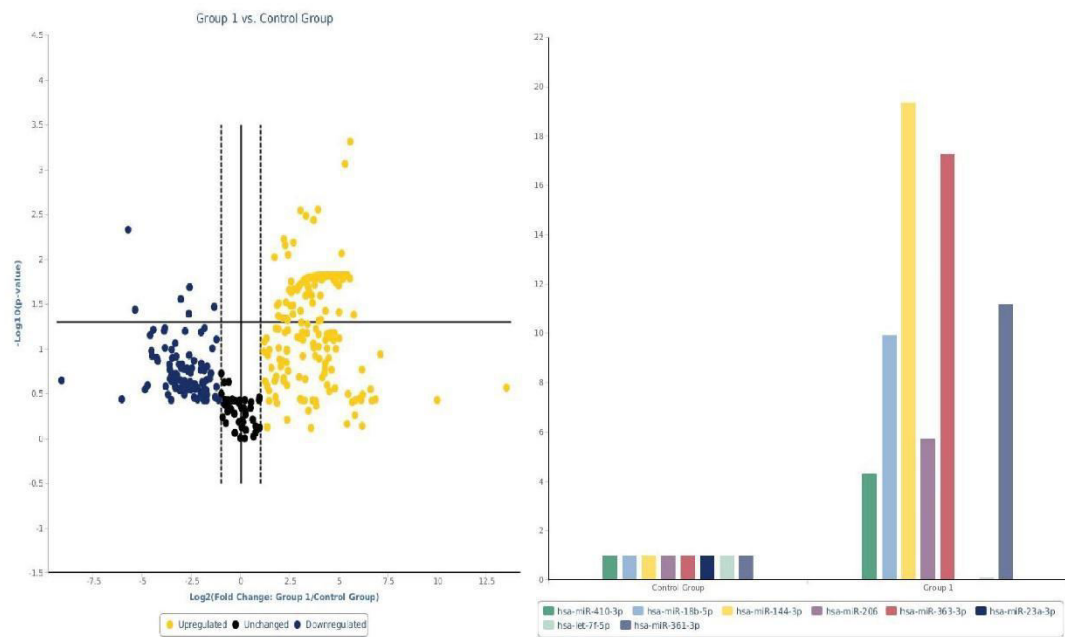
Gen ekspresyon profilleri enfeksiyon süresi boyunca farklılık gösterdi, 0. günde her iki hücre hattında sadece ılımlı, 7. günde daha belirgin değişiklikler gözlemlendi (Çizelge 3.4). Ek olarak, insan hücre hattındaki enfeksiyon, enfekte olmamış kontrollere kıyasla, yukarı doğru (artan) regülasyon gösteren gen sayısı daha fazla saptandı. Sığır hücrelerinde bunun tersi, daha fazla aşağı doğru regülasyona neden oldu. Enfeksiyonla çıkışarak en az 2 kat artan genlerin alt kümesi, spesifik değişiklikleri gösteren ileri analizin odak noktasıydı (Çizelge 3.4.).

KKKAV enfeksiyonunu takiben  $p < 0,05$  ve değişimin en az 2 kat olması kriterleri kullanılarak inceleme yapıldığında, HMC hücresinde 0. günde 7 farklı oranda eksprese edilmiş miRNA elde edildi. Bu miRNA'ların tümünün yukarı doğru (artan) regüle olduğu gözlemlendi. Aynı hücrede 7. Günde ise yapılan değerlendirmede 149 miRNA'nın farklı olarak ifade edildiği, bunlardan 6 miRNA'nın aşağı doğru (azalan) regüle ve 143 miRNA'nın yukarı doğru (artan) regüle edildiği saptandı. Aksine, PSH'de KKKAV ile enfeksiyonu takiben, 0. günde 3 miRNA aşağı doğru (azalan) regüle olurken 8 miRNA'nın yukarı doğru (artan) regüle olduğu gözlemlendi. Aynı hücrede 7. günde 7 miRNA'nın farklı şekilde eksprese edildiği ve hepsinin aşağı doğru (azalan) regüle olduğu kaydedildi (Şekil 3.14., Ek 3).

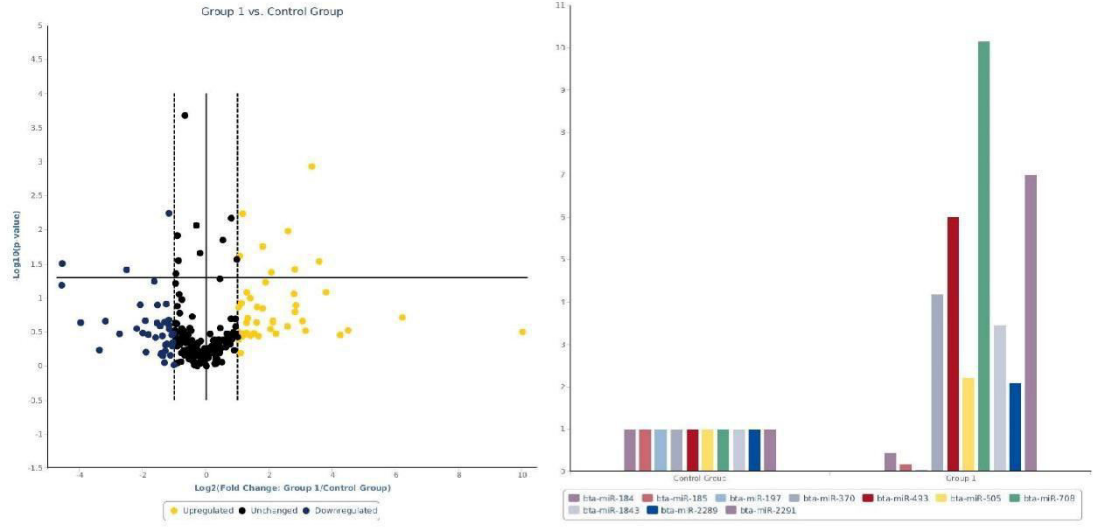
A) KKKKAV enfekte HMC 0. gün vs hücre kontrol  
Vulcano plot Chart bar



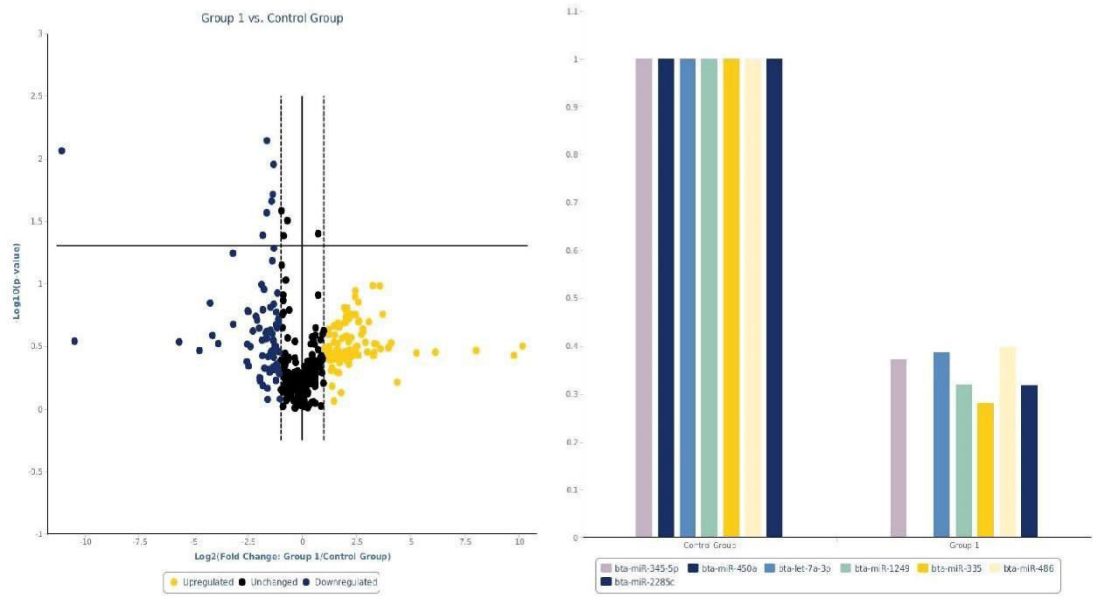
B) KKKAV enfekte HMC 7. gün vs hücre kontrol



C) KKKAV enfekte PSH 0. gün vs hücre kontrol



D) KKKAV enfekte PSH 7. gün vs hücre kontrol



**Şekil 3.14.** İnsan (A) ve sığır (B) primer böbrek hücrelerinde 0. ve 7. gün enfeksiyonun farklı eksprese edilmiş miRNA'ların volcano plotu ve seçilen örnek miRNA'ların bar grafiği. A) 0 gün HMC, B) 7 gün HMC, C) 0 gün PSH, D) 7 gün PSH. Sınır = 1.5;  $p < 0,05$ ; Belirsiz miRNA'lar analizden çıkarıldı.

Yapılan değerlendirmeler sonucunda primer insan ve sığır hücrelerinde enfeksiyonun başladığı an ve enfeksiyonun 7. günde tespit edilen miRNA ifade değişiklikleri Çizelge 3.2'de özetlendi.

**Çizelge 3.2.** KKKAV enfeksiyonu sırasında önemli ölçüde farklı şekilde ifade edilen miRNA'lar.

| Karşılaştırma | Bilinen farklı şekilde ifade edilen miRNA'lar |       |        | Yeni, farklı şekilde ifade edilen miRNA'lar |       |        |
|---------------|-----------------------------------------------|-------|--------|---------------------------------------------|-------|--------|
|               | Toplam                                        | Artan | Azalan | Toplam                                      | Artan | Azalan |
| HMC 0. gün    | -                                             | -     | -      | 7                                           | 7     | 0      |
| HMC 7. gün    | 15                                            | 13    | 2      | 134                                         | 130   | 4      |
| PSH 0. gün    | -                                             | -     | -      | 11                                          | 8     | 3      |
| PSH 7. gün    | -                                             | -     | -      | 7                                           | 0     | 7      |

### 3.9. Farklı Olarak İfade Edilen MiRNA'ların Öngörülen Hedeflerinin Gen Ontoloji ve Pathway Analizleri

Potansiyel gen ekspresyon ağlarını belirlemek amacıyla, KKKAV enfeksiyonunu takiben HMC ve PSH hücrelerindeki transkripsiyonel yanıt araştırıldı. In Silico analizinde, Reactome Pathway Database ([www.reactome.org](http://www.reactome.org)) ve PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>) kullanılarak viral enfeksiyonu takiben belirli hücresel yollaklarda zenginleştirilmiş farklı şekilde eksprese edilen genler belirlendi (Çizelge 3.3.). KKKAV enfeksiyonuna yanıt olarak farklı şekilde eksprese edilen miRNA'ların olası rollerini açıklamak için, bu miRNA'ların potansiyel hedefleri, HMC hücrede TargetScan, miRDB ve DIANA programları ile, PSH'da TargetScan ve MiRanda ile tahmin edildi. Her miRNA için yalnızca bahsedilen programlar tarafından tanımlanan ve ilk çıkan hedef genler dikkate alındı (Çizelge 3.3., Şekil 3.15.).

**Çizelge 3.3.** Farklı olarak ifade edilen miRNA'ların, yollarında etkin olabilecekleri hedef genlerin listesi.

| Karşılaştırma | Artan yönde regüle olanlar                                                                                                                                                                                         | Azalan yönde regüle olanlar                     |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| HMC 0. gün    | TOP1, TMEM65, ABL2, FAM76A, IFNA4<br>GALNT3, SLC35F1                                                                                                                                                               | -                                               |
| HMC 7. gün    | FBXW7, KCNJ15, BRWD1, MACC1<br>SLC37A3, GIPC3, TCF4, TOP1, CLOCK,<br>TMEM68, TLX1, CRK, TRPC1, ADM,<br>LIN28B, DLX1, EIF4G2, TPTE, KCNC2,<br>ICOS, UBE2D1, ZNF213, ELOVL6, RORA<br>SLC50A1, NIPAL1, MROH2A, KLF15, | CCDC58, ZNF225, LIN28B,<br>ZNF367, RAB4A, HSPB8 |

|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                   |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
|            | <p>IGLL1, UBE2D1, KLHDC1, CD69, NGLY1, MSR1, ZNF138, CCDC148, YARS2, TMED2, NPAS3</p> <p>HORMAD1, ZNF225, TMED7-TICAM2, HOXA1, MDGA2, KANSL1L, HBP1, SLC44A1, CD69</p> <p>NFATC1, RALA, DHX15, SH3BGR, TMEM33, CCDC18, MAPK9, INSIG2, TNKS2, PTRHD1, LATS2, TLX3, HDGF, KAT6B, TIMM9, ZEB1, STC1, GALNTL6, FAF1, TAF1D, NDUFA5, ZNF827, FBXO3, HAVCR1, CPNE2, API5, LHFP, ARID3B, MXI1, MDM4, EBF2, CD9, CASP7, SYT2, GJA1, TOMM40, CCNL1, LIN7A, AGO3, REG1A, TRIM44, RMND5A, MGA, GNG13, RORA, AFF4, PDPN, FASLG, RORA, SYT2, KCTD9, ZBTB18, CDC14B, MAPRE1, SNX18, XRCC4, ZIC3, TMEM212, FBXO3, CROT, RBM41, CDK8, BICC1, CEBPB, NEUROD1, RFC1, DSCAM, SLITRK2, CAMK2B, TIMM17A, FGL2, GIPC3, STC1, WDFY3, FBXO34, GALNTL6, GPR137C, TBC1D15, FLRT2, CROT, TGIF2, CROT, ARPP19, ZDHHC21, TNFSF14, SLAIN1, FGF7, TGFB2, SMC3, PLEKHO2, ARID4B, RNF112, NPTX1, MAML1, CLEC1A, MCTP1, TBC1D19, SNX8, PIGA, SLC14A1, SMC3</p> |                                                   |
| PSH 0. gün | MET, MUC19, DPY30, CD97, SLC37A4, AP003774.4, ZMYND15, ZNF331                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | SLC25A22, IKZF4, CYP3A5                           |
| PSH 7. gün | -                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | UTP14C, LITAF, INO80D, NRARP, PRSS46, SRSF3, MCF2 |

```

Current Settings:
=====
Query Filename:      54mirna.fasta
Reference Filename:   54gene.fa
Gap Open Penalty:    -9.000000
Gap Extend Penalty:  -4.000000
Score Threshold:     140.000000
Energy Threshold:    1.000000 kcal/mol
Scaling Parameter:   4.000000
=====
Read Sequence:bta-mir-17-3p|MIMAT0003816 (20 nt)
Read Sequence:4 dna:primary_assembly primary_assembly:ARS-UCD1.2:4:51621740:51736252:-1
(114513 nt)
=====
Performing Scan: bta-mir-17-3p|MIMAT0003816 vs 4
=====

Forward:      Score: 160.000000  Q:2 to 13  R:31376 to 31395 Align Len (11) (100.00%) (100.00%)

Query:      3' uguucacgGAAGUGACGUCa 5'
            |||||
Ref:        5' cttcctaaCTTCACTGCAGa 3'

Energy:     -20.629999 kcal/Mol

Scores for this hit:
>bta-mir-17-3p|MIMAT0003816      4      160.00 -20.63 2 13      31376 31395      11      100.00% 100.00%

```

**Şekil 3.15.** Kullanılan miRanda algoritmasının örnek olarak seçtiğimiz bta-miR-17-3p ile GO sonucu.

Enfeksiyondan sonra değişen biyolojik süreçler PANTHER programa göre Şekil 3.17-3.19'ta, Reactome programa göre Ek 4-9.'da gösterildi. Genel olarak ifade profilleri, antiviral yanıtın indüksiyonunu gösterdi. İlginç bir şekilde, gen ekspresyon profillerinin her iki hücre hattında da benzer olduğu, her iki zaman noktasında ortak yollara sahip oldukları ancak zıt yönde regülasyon gösterdikleri tespit edildi.

GO analizi biyolojik işlem, protein sınıfı ve yolak kategorileri ile de karşılaştırıldı. Sonuçlar, KKKAV enfeksiyonu sırasında HMC ve PSH'daki miRNA'larından bu kategorilere göre kapsamlı bilgi sağladı. Araştırmada kullanılan iki analiz yazılımının (Reactome ve PANTHER) birbirleriyle benzer sonuç verdiği gözlemlendi. Elde edilen sonuçlar ana kategorilerine göre sınıflandırıldığında; söz konusu proteinlerin patogeneze ile ilgili yollar (immünoloji, apoptozis ve biyolojik oksidasyon, trombosit), olgunlaşan endozomlar yoluyla penetrasyonu/viral girişi, hücreden hücreye etkileşimi, DNA/RNA replikasyonu, moleküler saat, nörolojik hastalıklar ve NOTCH1-yolu gibi süreçlerde görev aldıkları tespit edildi (Çizelge 3.4.).

**Çizelge 3.4.** KKKAV ile enfekte primer insan ve sıgır hücrelerinde 0. ve 7. günlerde azalan (↓) ve artan (↑) şekilde regüle edilen yolların ana kategorileri.

| Kategori                  | İnsan (HMC)    |           |      |                 |                |      | Sığır (PSH) |           |      |                |           |      |
|---------------------------|----------------|-----------|------|-----------------|----------------|------|-------------|-----------|------|----------------|-----------|------|
|                           | 0 dpi          |           |      | 7 dpi           |                |      | 0 dpi       |           |      | 7 dpi          |           |      |
|                           | miRNA          | hedef gen | etki | miRNA           | hedef gen      | etki | miRNA       | hedef gen | etki | miRNA          | hedef gen | etki |
| Patogenez                 | hsa-miR-197-3p | IFNA4     |      | hsa-miR-619-3p  | MAPK9          |      | hsa-miR-708 | SLC37A4   |      |                |           |      |
|                           |                |           |      | hsa-miR-124-3p  | NEFATC1        |      |             |           |      |                |           |      |
|                           |                |           |      | hsa-miR-361-3p  | CAMK2B         |      |             |           |      |                |           |      |
|                           |                |           |      | hsa-miR-454-3p  | MDM4           |      |             |           |      |                |           |      |
|                           |                |           |      | hsa-miR-651-5p  | TPT1           |      |             |           |      |                |           |      |
|                           |                |           |      | hsa-miR-373-3p  | TGFB2          |      |             |           |      |                |           |      |
|                           |                |           |      | hsa-miR-129-5p  | VENTX1/le AGO3 |      | hsa-miR-185 | IKZF4     |      | hsa-let-7a-3p  | INO80D    |      |
|                           | hsa-miR-34c-5p | MDM4      |      | hsa-miR-369-3p  | CEBPB          |      | bta-miR-197 | CYP3A5    |      |                |           |      |
|                           |                |           |      | hsa-miR-299-3p  | TCF4           |      |             |           |      |                |           |      |
|                           |                |           |      | hsa-miR-548d-3p | UBE2D1         |      |             |           |      |                |           |      |
|                           |                |           |      | hsa-miR-590-5p  | FASLG          |      |             |           |      |                |           |      |
|                           |                |           |      | hsa-miR-335-5p  | CASP7          |      |             |           |      |                |           |      |
|                           |                |           |      | hsa-miR-619-3   | MAPK9          |      |             |           |      |                |           |      |
| Apoptoz, oksidatif stres  |                |           | ↑    |                 |                | ↑    |             |           | ↓    |                |           | ↓    |
|                           |                |           |      | hsa-miR-126-5p  | ITSP18         | ↓    | hsa-miR-493 | DPY30     | ↑    |                |           |      |
|                           | hsa-miR-197-3p | IFNA4     | ↓    | hsa-miR-618     | KCNK2          | ↑    | bta-miR-370 | MUC19     | ↓    |                |           |      |
|                           | hsa-miR-885-5p | GALNT3    | ↑    | hsa-miR-299-3p  | TCF4/TCF7L1    | ↓    | bta-miR-505 | CD97      | ↑    |                |           |      |
| Hücreden hücre etkileşimi |                |           |      | hsa-miR-382-5p  | TOP1           |      |             |           |      | hba-miR-345-5p | UTP14C    |      |
|                           | hsa-miR-382-5p | TOP1      | ↑    | hsa-miR-345-5p  | RFC1           | ↑    |             |           |      | hba-miR-486    | SRSF3     | ↓    |
| DNA/RNA replikasyon       |                |           |      | hsa-miR-515-3p  | CLOCK          |      |             |           |      |                |           |      |
|                           |                |           |      | hsa-miR-376a-3p | KLF15          | ↑    |             |           |      |                |           |      |
|                           |                |           |      | hsa-miR-548a-5p | RORA           |      |             |           |      |                |           |      |
|                           |                |           |      | hsa-miR-619-3p  | MAPK9          |      |             |           |      |                |           |      |
|                           |                |           |      | hsa-miR-23a-3p  | ZNF225         | ↑    |             |           |      |                |           |      |
| Neurolojik hastalıklar    |                |           |      | hsa-miR-223-3p  | FBXW7          |      |             |           |      |                |           |      |
|                           |                |           |      | hsa-miR-567     | CDK8           |      |             |           |      |                |           |      |
|                           |                |           |      | hsa-miR-133a-3p | MAML1          | ↑    |             |           |      |                |           |      |
| NOTCH1-yolu               |                |           |      |                 |                |      |             |           |      |                |           |      |

Detaylar incelendiğinde, KKKAV ile in vitro şartlarda yapılan enfeksiyon sonrasında **İmmünolojik yolaklarda**, önemli değişiklikler kaydedildi. Pro-inflamasyon yolunu etkileyen yolların primer insan hücresinde öncelikle yukarı doğru, sıgır hücrelerinde ise aşağı doğru regüle olduğu izlendi. Reactome analiz program sonuçlara göre, insan mesangial hücresinde 0. günde (Ek 4.) insan TRAF6 aracılı IRF7 aktivasyonu ve DDX58 (RIG-I) / IFIH1 (MDA-5) aracılı interferon-alfa/beta indüksiyonu (hsa-miR-197-3p), MAPK9 ile indüklenen Toll-reseptör sinyal yolunun ise (hsa-miR-619-3p) 7. günde (Ek 6.) yukarı yönde (artan) regüle edildiği görüldü. Ayrıca, enfeksiyonun geç döneminde B hücresi aktivasyonu, T hücresi aktivasyonu, inflamasyon ve interferon gama yollarının yukarı yönde regüle olduğu gözlemlendi (Ek 6.). PANTHER ara yüzünden elde edilen sonuçlar, Reactome analizine benzer şekilde, ‘B hücre aktivasyonu’ (hsa-miR-619-3p ,hsa-miR-124-3p) (P00010), ‘kemokin ve sitokin sinyal yolunun aracılık ettiği inflamasyon’ (hsa-miR-361-3p, hsa-miR-124-3p) (P00031), ‘insülin/IGF yolu-protein kinaz B sinyalleme kaskadı’ (hsa-miR-454-3p, hsa-miR-651-5p) (P00033), ‘İnterferon-gama sinyal yolu’ (hsa-miR-619-3p) (P00035), ‘Toll reseptör sinyal yolu’ (hsa-miR-619-3p) (P00054), ‘T hücresi aktivasyonu’ (hsa-miR-124-3p, hsa-miR-619-3p) (P00053) ve ‘TGF-beta sinyal yolu’ (hsa-miR-373-3p) (P00052)) üzerinde etkili olarak bulundu (Şekil 3.17). **Apoptoza** bağlı olarak, MDM4 geniyle (hsa-miR-34c-5p) ilgili TP53 ekspresyonunun ve degradasyonunun regülasyonu, p53’ün stabilizasyonu, p53’e bağlı G1 DNA Hasar Yanıtı ve p53’e bağlı G1/S DNA hasar kontrol noktası yollarının, insan hücrelerinde 0. günde artan şekilde değiştiği gözlemlendi (Ek 4.). PANTHER analizi de benzer şekilde, ‘apoptoz sinyal yolu’ (P00006), ‘oksidatif stres tepkisi’ (P00046), ‘p53 yolu geri bildirim döngüleri 1’ (P04392), ‘p53 yolu geri bildirim döngüleri 2’ (P04398), ‘p53 yolu’ (P00059), ve ‘Ras yolu’nun artan şekilde regüle edildiğini gösterdi (Şekil 3.16). Ayrıca, TP53’ten bağımsız şekilde apoptozu indükleyen VENTX ile AGO3, CEBPB, TCF4, UBE2D1 genleri (sırasıyla hsa-miR-129-5p, hsa-miR-369-3p, hsa-miR-299-3p, hsa-miR-548d-3p) ile ilgili transkripsiyonel düzenlemelerin 7. günde yukarı doğru regüle olduğu saptandı (Ek 6.). İnokulasyonu izleyen 7. günde insan hücrelerinde, hücre ölümü genlerinin (FASLG (hsa-miR-590-5p)) FOXO aracılı transkripsiyonu, CASP7 (hsa-miR-335-5p) ve MAPK9 (hsa-miR-619-3p) indüklü apoptoz ve oksidatif stres yanıt yolları ve

oksidatif stresin indüklediği hücrel yaşlanma yolunun yukarı doğru regüle edildiği tespit edildi (Ek 6.). Patogeneze ek olarak rol oynayabilen **vasküler endotelial büyüme faktörü** (VEGF veya VEGF-A) reseptörü ile birlikte VEGFR2 (HSPB8 gen ve hsa-miR-126-5p), insan hücrelerinde enfeksiyon sonrası 7. günde azalan yönde değişim gösterdi (Ek 5.). Ayrıca, KKKAV patolojisinde rol oynayan trombosit yolları ile ilgili genlerde de büyük ölçüde değişiklikler izlendi. IFNA4 gene (hsa-miR-197-3p) bağlı **megakaryosit gelişimi** ve **trombosit** üretimi ve hemostaz yollarının HMC'de 0. günde yukarı doğru regüle olduğu görüldü (Ek 4.).

Primer sığır böbrek hücrelerinde KKKAV enfeksiyonuna karşı doğuştan gelen **bağışıklık yanıtı**, SLC37A4 (bta-miR-708), nötrofil homeostazında rol oynayan geni ilişkili hastalık yollarının yukarı yönde regüle olduğu tespit edildi (Ek 8.). Nötrofiller, hücrel bileşenler üzerinde oksidatif hasarı tetikleyen ve hücre ölümüne neden olan hücrelerdir. Bu aşamada, nötrofiller, iltihaplı bölgeleri temizledikten sonra makrofajlar tarafından apoptoz ve sindirime uğrar. Sığır hücrelerinde 0. günde IKZF4 (bta-miR-185) geni ile P450 enzimi (CYP3A5 geni (bta-miR-197)) aracılığıyla **biyolojik oksidasyonun** ve çok uzun zincirli yağ asitlerinin Beta oksidasyonunun azalan yönde değiştiği tespit edildi (Ek 7.). Ek olarak, INO80D'ye bağlı (bta-let-7a-3p) GG-NER'de DNA Hasar Tanıma, Global Genom Nükleotid Eksizyon Onarımı ve Deubiquitination, ve MCF2 gene bağlı NRAGE, NRIF ve NADE aracılığıyla hücre ölümü sinyalleme; p75 NTR reseptör aracılı sinyalleşme; Rho GTPaz döngüsü ve Ölüm Reseptör Sinyal yolları sığır hücresinde 7. günde azalan yönde değiştiler (Çizelge 3.13). Enfeksiyon sonrası 0. günde sığır kökenli primer hücre kültürlerinde, DPY30 gene (bta-miR-493) bağlı RUNX1 **megakaryosit farklılaşmasında** ve **trombosit** fonksiyon yolunda rol oynayan genler, insan hücrelerinde gördüğümüzün tersi olarak, yukarı doğru regüle edildi (Ek 8.).

KKKAV **olgunlaşan endozomlar yoluyla penetrasyonu** insan ve sığır hücrelerinde birbirine ters regülasyon gösterdi. Çalışmamızda, KKKAV'un insan mezangial hücrelerinde miRNA mekanizması aracılığıyla 0. günde Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase 3'ün (GALNT3 (hsa-miR-885-5p)) ekspresyonunu

yukarı doğru düzenlediği görüldü (Ek 4.). GALNT3 virionların hücre yüzeyine adsorpsiyonu için kritik olduğu bilinmektedir. Dahası, 7. günde potasyum kanalları insan hücresinde ATP'ye duyarlı içe doğru doğrultucu potasyum kanalı 15 (KCJ15 gen) ve potasyum voltaj kapılı kanal alt ailesi C üyesi 2 (KCNC2 gen (hsa-miR-618)) ile yukarı doğru regüle edildi (Ek 4.). PANTHER software ile ‘membran trafik proteini’ (PC00150), ‘transmembran sinyal reseptörü’ (PC00197) ve ‘taşıyıcı’ (PC00227)) yollar 7. günde yukarı doğru regüle oldu (Şekil 3.18). Bunun tersine, enfeksiyonun 0. gününde sığır hücrelerinde, MUC19 (bta-miR-370) ile ilişkili GALNT3 kusur/mutant yolları ve O-glikan biyosentezinin sonlandırılması, ters bir yol mekanizması olduğunu göstermektedir (Ek 8.).

CD97 (bta-miR-505) transmembran sinyal reseptörü, enfeksiyon sonrası 0. günde PSH'de yukarı doğru regüle edildi (Ek 8.). Bunun aksine, T hücre faktöre (TCF4/TCF7L1 (hsa-miR-299-3p))’e bağlı Kanatsız/entegre (WNT) yolu inhibe edici yol, enfeksiyon sonrası 7. günde insan hücrelerinde yukarı doğru regüle oldu (Ek 6.) (PANTHER’de ‘WNT sinyal yolu’ (P00057) (Şekil 3.17.)).

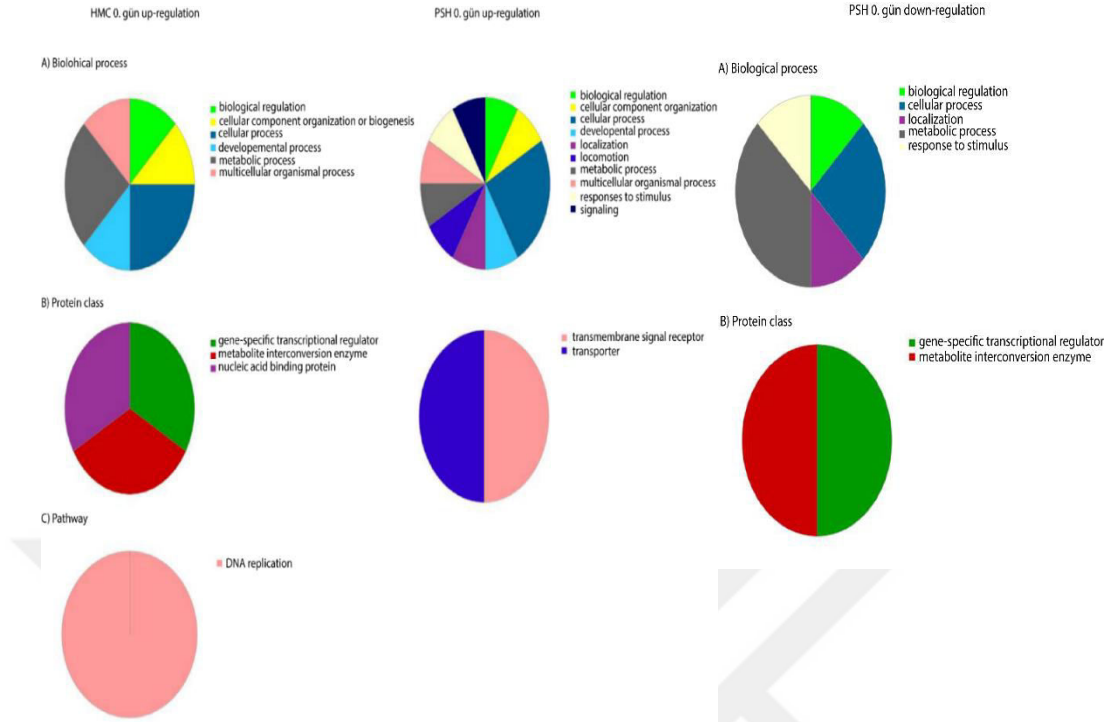
**DNA replikasyonu** ve nükleik asit bağlayıcı protein geni (TOP1 (hsa-miR-382-5p)) hem 0. hem de 7. günde, Replikasyon faktörü C1 (RFC1 (hsa-miR-345-5p)) geni ise 7. günde HMC'de yukarı regüle edildi (Ek 4 ve 6). PANTHER’de HMC’ 0. günde ‘gene özgü transkripsiyonel düzenleyici’ (PC00264), ve ‘nükleik asit bağlayıcı protein’ (PC00171), ‘DNA replikasyon yolu (P00017), HMC 7. günde ise transkripsiyon ile ilişkili proteinleri ‘gene özgü transkripsiyonel düzenleyici’ (PC00264), ‘nükleik asit bağlayıcı protein’ (PC00171), ‘translasyon protein’ (PC00263) yukarı doğru regüle olduğu izlendi (Şekil 3.17.). Buna karşılık, PSH hücresinde 7. günde, çekirdekte ve sitozolde UTP14C (bta-miR-345-5p) ile ilişkili rRNA modifikasyonu, nükleolusta ve sitozolde rRNA işlemenin ana yolu, çekirdekte ve sitozolde rRNA işleme ve rRNA işleme yolları azalan yönde regüle oldu (Çizelge 3.13.). Ayrıca, Kapaklı İntron İçeren Pre-mRNA, mRNA Ekleme, RNA Polimeraz II Transkripsiyon Sonlandırması, İntron İçeren Transkriptten türetilen Olgun mRNA'nın Taşınması, Olgun Transkriptin Sitoplazmaya Taşınması, RNA Metabolizması ve mRNA Eklemesinin SRSF3 (bta-miR-486) ile ilgili İşlemesi-

Başlıca Yollar 7 günde azalan yönde regüle edildi (Ek 9.). PANTHER’de gene özgü transkripsiyonel düzenleyici (PC00264) ve ‘nükleik asit bağlayıcı protein’ (PC00171) 7. günde yine azalan yönde regüle edildi (Şekil 3.18). İnsan böbrek hücrelerinde hücrel faktörler, KKKAV genomunun transkripsiyonuna ve replikasyonuna katkıda bulunurken, sığır böbrek hücrelerinde hücrel rRNA işleme ve mRNA splicing mekanizmaların, viral replikasyonu kısıtlayabilecek şekilde azalan yönde regüle olduğu gözlemlendi.

Elde edilen sonuçlara göre, sirkadiyen saatle ilgili üç adet gen, CLOCK, KLF15 ve RORA (hsa-miR-515-3p, hsa-miR-376a-3p, hsa-miR-548a-5p) HMC’de 7. günde yukarı doğru regüle edildi (Ek 6., Şekil 3.17.). Böylece bu veri, insan hücrelerindeki KKKAV’un replikatif döngüsünü insanın **moleküler saat** işleyişine bağlayabileceğini/değiştirebilmesini gösteren ilk veri olarak sonuldu.

İnsan primer mesangial hücrelerinde enfeksiyon sonrası 7. günde, **Parkinson, Alzheimer ve Huntington hastalığı** gibi MAPK9 (hsa-miR-619-3p) ile ilgili nörolojik hastalık geni yukarı yönde regüle olurken ve ZNF225 gene (hsa-miR-23a-3p) bağlı nöronal büyüme faktörü (NGF) ile uyarılan transkripsiyon aşağı doğru regüle oldu (Ek 6., Şekil 3.17.).

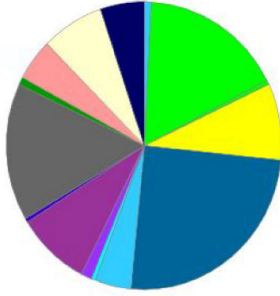
Kanserde **NOTCH1** ile Sinyalleşme, NOTCH1 ile Sinyalleşme, Kanserde FBXW7 Fonksiyon Kaybı ve Kanserde NOTCH1 Sinyali, Kanserde FBXW7 Mutantları ve NOTCH1, NOTCH1 Hücre İçi Alan Transkripsiyonu, NOTCH1 PEST Alan Mutantları ile Yapısal Sinyallemeyi ve NOTCH1 HD + PEST Domain Yapıcı Sinyallemeyi Mutantlar, FBXW7, CDK8 ve MAML1 (hsa-miR-223-3p, hsa-miR-567, hsa-miR-133a-3p) genleri aracılığıyla HMC’de 7. günde artan yönde değiştiği tespit edildi (Ek 6. ve Şekil 3.17.).



**Şekil 3.16.** 0. günde artan ve azalan yönde regüle edildiği gösterilen miRNA hedef genleri için Gen Ontoloji zenginleştirme terimleri. Zenginleştirilmiş biyolojik işlemler (A), üretilen protein sınıfı (B) ve farklı şekilde eksprese edilen miRNA'ların varsayılan hedeflerinden KEGG yolak analizi (C) pie chart'ları.

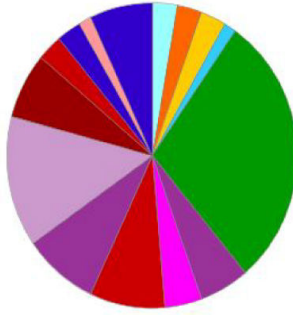
# HMC 7. gün up-regulation

## A) Biological process



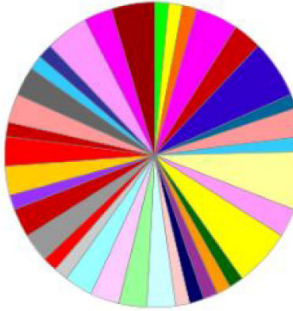
- biological adhesion
- biological regulation
- cell population proliferation
- cellular component organization or biogenesis
- cellular process
- developmental process
- growth
- immune system process
- localization
- locomotion
- metabolic process
- multi-organism process
- multicellular organismal process
- response to stimulus
- signaling

## B) Protein class



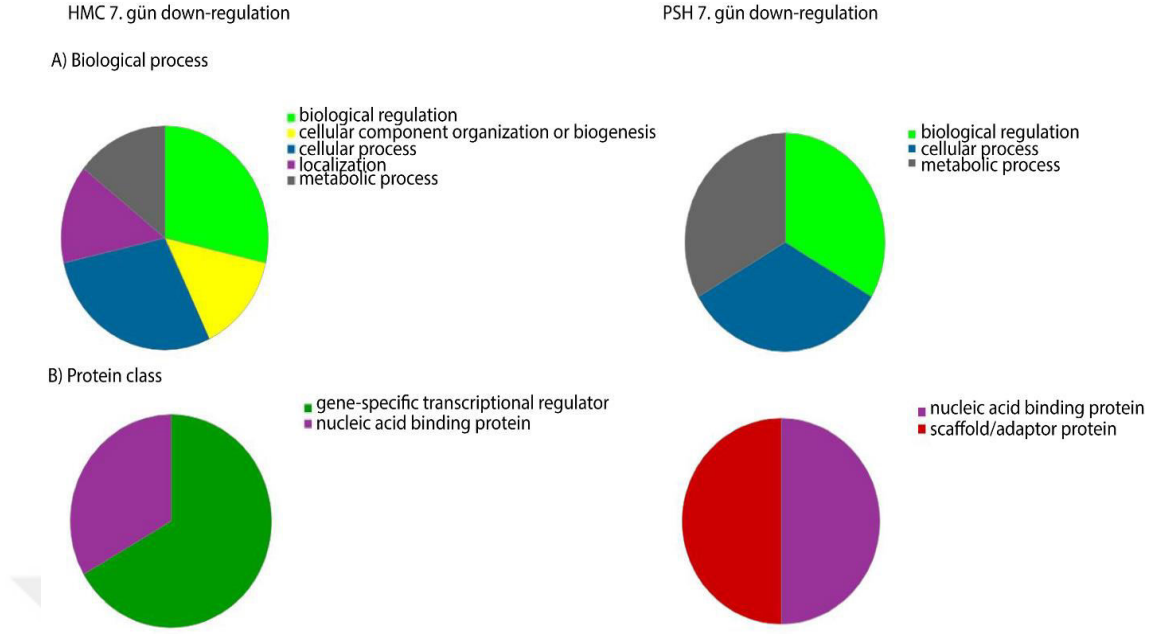
- cell junction protein
- chromatin/chromatin-binding, or-regulatory protein
- cytoskeletal protein
- defense/immunity protein
- gene-specific transcriptional regulator
- intercellular signal molecule
- membrane traffic protein
- metabolite interconversion enzyme
- nucleic acid binding protein
- protein modifying enzyme
- protein-binding activity modulator
- scaffold/adaptor protein
- translational protein
- transmembrane signal receptor
- transporter

## C) Pathway



- Alzheimer disease-amyloid secretase pathway
- Alzheimer disease-presenilin pathway
- Angiogenesis
- Apoptosis signaling pathway
- B cell activation
- CCKR signaling map
- Circadian clock system
- DNA replication
- EGF receptor signaling pathway
- FAS signaling pathway
- FGF signaling pathway
- Gonadotropin-releasing hormone receptor pathway
- Hedgehog signaling pathway
- Heterotrimeric G-protein signaling, pathway-Gi alpha and Gs alpha mediated pathway
- Heterotrimeric G-protein signaling, pathway-Gq alpha and Go alpha mediated pathway
- Heterotrimeric G-protein signaling, pathway-rod outer segment phototransduction
- Huntington disease
- Hypoxia response via HIF activation
- Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling
- Insulin/IGF pathway-protein kinase B signaling cascade
- Integrin signaling pathway
- Interferon-gamma signaling pathway
- Ionotropic glutamate receptor pathway
- Notch signaling pathway
- Oxidative stress response
- p53 pathway feedback loops 1
- Parkinson disease
- Ras Pathway
- Synaptic vesicle trafficking
- T cell activation
- TGF-beta signaling pathway
- Toll receptor signaling pathway
- Ubiquitin proteasome pathway
- Wnt signaling pathway
- p53 pathway feedback loops 2
- p53 pathway

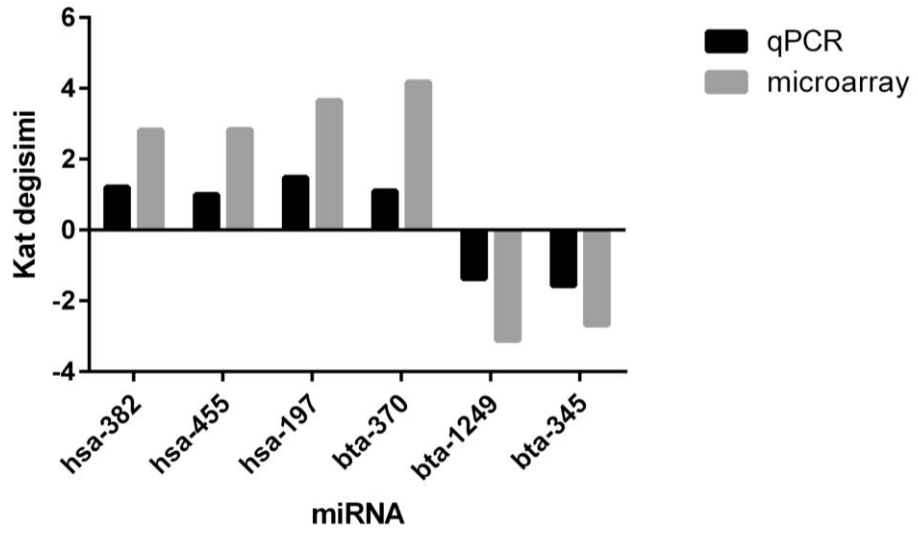
**Şekil 3.17.** 7. günde artan yönde regüle olduğu gözlenen miRNA'ların hedefleyen genleri için Gen Ontoloji zenginleştirme terimleri. Zenginleştirilmiş biyolojik işlemlerin (A), Protein sınıflarının (B) ve Yolakların (C) dağılımı.



**Şekil 3.18.** 7. günde azalan yönde ifade edilen varsayılan miRNA hedefleri için Gen Ontoloji zenginleştirme terimleri. Zenginleştirilmiş biyolojik süreçlerin (A), ve farklı sınıftaki miRNA'ların varsayılan hedeflerinden üretilen protein sınıfı (B) 'nın dağılımı.

### 3.10. QPCR ile miRNA Array Sonuçların Doğrulaması

Microarray verilerimizi doğrulamak amacıyla hsa-miR-382, hsa-miR-455, hsa-miR-197, bta-miR-370, bta-miR-1249, bta-miR-345 dahil olmak üzere altı farklı ifade edilmiş miRNA qRT-PCR analizi için seçildi. Farklı teknolojilerin kullanımı nedeniyle sonuçlarda bazı farklılıklar olmasına karşın genel olarak qRT-PCR ve microarray sonuçları arasında genel bir tutarlılık gözlemlendi (Şekil 1.19.).



**Şekil 3.19.** Farklı eksprese edilmiş miRNA'ların qRT-PCR validasyonu. MiRNA array ve qRT-PCR'den elde edilen diferansiyel olarak eksprese edilen miRNA'ların karşılaştırılması, iki platformun iyi bir korelasyon sergilediğini gösterdi. Veriler, üç biyolojik kopyadan alınan ortalamalardır.

## 4. TARTIŞMA

Bu çalışmada, KKKAV enfeksiyonunun erken ve geç dönemlerdeki hücresel ilişkileri araştırmak için miRNA analizi ile bunların görev aldığı hücresel genlere ilişkin yollar yorumlandı ve insan ve sığır primer böbrek/mesangial hücrelerinde miRNA ilişkili birçok yolda önemli değişiklikler olduğu tespit edildi.

### 4.1. KKKAV Enfekte İnsan ve Sığır Hücrelerin Patogenezi

KKKAV'un insan ve diğer memeli konakçı hücrelerindeki patogenezi büyük ölçüde farklıdır. Sonuçlarımıza göre, bu farklılığa en çok katkıda bulunan faktörler, bağışıklık ve apoptotik/oksidatif stresi etkileyen genlerdir.

#### 4.1.1. İmmunopatogenezi: KKKAV ile Enfekte İnsan Hücresinde Doğal ve Humoral Bağışıklık Sistemi İndüklenirken Sığır Hücresinde Baskılanmaktadır

Hem doğuştan gelen hem de adaptif immün yanıtlar, KKKAV'a karşı korumada önemli rol oynamaktadır: KKKAV için bugüne kadar ölümcül tek hayvan modeli, fonksiyonel doğal immün yanıtları olmayan (immünolojik olarak baskılanmış) hayvanlardır (Bereczky ve ark., 2010). İnsan modelinde, KKKAV'un şiddeti, artan viral yük ve yayılma, düşük antikor titreleri, kanama, yüksek proinflatuar sitokin seviyeleri (örn., Tümör nekroz faktörü  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interlekin 6 (IL-6)) ile ilişkilidir. Yapılan birkaç çalışmada, bu proinflatuar sitokinlerin yüksek serum seviyeleri, KKKA hastalarında hastalık şiddetini gösteren prognostik faktörler olarak tanımlanmıştır (Bente ve ark., 2010; Saksida ve ark. 2010). Ciddi vakalarda, sitokinlerin aşırı salınması, endotel üzerinde toksik etkilere yol açarak vasküler geçirgenliğin artmasına, vazodilatasyona, çoklu organ yetmezliğine ve şoka neden olur (Akinci ve ark., 2013). Doğuştan gelen bağışıklık yanıtının aktivasyonu, örn. Toll benzeri reseptörler (TLR'ler), retinoik asitle indüklenebilir gen I (RIG-I; ayrıca

DDX58 olarak bilinir) ya da melanom farklılaşması ile ilişkili gen 5 (MDA-5; IFIH1 olarak da bilinir), iltihaplanma ve adaptif bağışıklığın indüksiyonunda rol oynayan hücreleri toplayan ve aktive eden sinyallerin yanı sıra, pro-inflamatuar sitokinlerin ve interferonların üretimine neden olur. İnterferonlar (IFN), birkaç farklı mekanizma yoluyla inflamasyonun aktivasyonuna katkıda bulunabilir (Bolívar ve ark., 2018; Kopitar-Jerala, 2017). Monositler veya nötrofiller gibi immün hücre alımı, inflamasyonla ilişkili patolojilerin ilerlemesinde önemli bir adımdır. Sonuçlarımıza göre, insan mezangial hücrelerinde 0. günde insan TRAF6 aracılı IRF7 aktivasyonu ve DDX58 (RIG-I) / IFIH1 (MDA-5) aracılı interferon-alfa/beta indüksiyonu artan yönde regüle edilmektedir (Ek 4.). İnterferon düzenleyici faktör 7 (IRF7), IRF3 ile birlikte tip I IFN (IFN $\alpha/\beta$ ) yanıtlarının anahtar düzenleyicileridir (Ning ve ark., 2011). IRF-7'nin ifadesi ve aktivasyonu, birkaç IFN-a alt tipinin sentezini başlatan bir pozitif geribildirim döngüsüne yol açar. Ek olarak, transkripsiyon faktörleri NF –  $\kappa$ B (RIG-I, MDA-5 ve dsRNA'ya bağımlı kinaz PKR tarafından aktive edilenler) IFN gen ekspresyonunu arttırmak için tetiklenir (Weber ve Mirazimi, 2008). IFN-I yetersiz farelerin Ddx58 / RIG-I, MYD88 ve Ifih1 / MDA-5 gibi çeşitli IFN-I yanıt faktörlerinin transkriptlerinde önemli artışlar ifade etmesi bizim çalışma sonuçlarımıza benzerlik göstermektedir (Garrison ve ark., 2019; Habjan ve ark., 2008). Dahası, çalışmalar, TLR8 ve TLR7'nin KKKK hastalığının klinik sonuçlarında önemli bir rol oynadığı da göstermiştir (Arslan ve ark., 2015; Engin ve ark., 2010). Bu tez çalışmasında, MAPK9 ile indüklenen Toll-reseptör sinyal yolu, 7. günde insan hücrelerinde artan yönde regüle olmuştur (Ek 6., Şekil 3.17). Sonuç olarak, gözlediğimiz antiviral yanıt insan hücrelerinde, proinflamatuar sitokinlerin ve kemokinlerin artmış seviyeleri, patolojik hastalarda gözlenen inflamasyona, endotelial hastalığa ve immunopatolojisine yol açtığını ileri sürülebilmektedir. Buna karşın, sıgır böbrek hücrelerinde KKKAV enfeksiyonuna karşı erken doğuştan gelen bağışıklık yanıtı olarak, SLC37A4 geniyle ilişkili hastalık yolları yukarı doğru regüle edilmiştir (Ek 8.). Glikoz-6-fosfat translokaz (G6PT) olarak da bilinen SLC37A4, nötrofil homeostazında rol oynamaktadır (Jun ve ark 2010). Enflamatuar bir uyarıya yanıt olarak nötrofiller, hızlı bir şekilde aktive olurlar ve enfeksiyon/yaralanma/iltihap bölgesine göç ederler. Sitokin ve kemokinlerin salınmasıyla nötrofiller, enflamatuar kademeyi güçlendirir ve bağışıklığın diğer

hücrelerini bölgeye çekerler. Fagosit edilen patojenleri öldürmek için reaktif oksijen türleri (ROS) üretilir ve fagozoma salınır (De Bondt ve ark., 2020). Nötrofiller, sitokinler ve ROS aracılığıyla hem iltihap hem apoptoz yoluyla doku hasarına neden olurlar. SLC37A4 geniyle ilişkili hastalık yollarının yukarı doğru regülasyonu, sığırlarda daha az nötrofil işlevi ile daha az immünopatolojik bir ortama katkıda bulunabilmektedir. Bu çalışma, KKKAV enfeksiyonunun sığır hücrelerinde SLC37A4 ekspresyonunu etkilediğini gösteren ilk rapordur.

Uyarlanabilir bağışıklık efektör hücreleri de doku hasarına katkıda bulunabilir (Rouse ve Sehrawat, 2010). Örneğin, T hücreleri, virus enfekte hücreleri doğrudan yok edebilirler veya hücrelere zarar veren TNF gibi sitokinleri salgılayabilirler. Viruslara karşı antikor tepkileri de doku hasarına katkıda bulunabilir. Bu noktada, antikor enfekte bir hücreye bağlandığında, komplement sistemi aktive edilir ve bir enflamatuar reaksiyon meydana gelir (Rouse ve Sehrawat, 2010). Virus enfeksiyonunu takiben aşırı doku hasarına karşı koruyucu mekanizma, diğer hücre tiplerinin işlevini inhibe edebilen çeşitli regülör T (TReg) hücre tiplerinin indüksiyonu ve aktivasyonudur (Lei ve ark., 2015). TReg hücrelerinin doku koruyucu etkileri, retrovirus modelinde, Respiratory syncytial virus ve WNV virusunun fare modellerinde gösterilmiştir (Rouse ve Sehrawat, 2010). Elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda, insan hücrelerinde geç dönem enfeksiyonda, B hücresi aktivasyonu, T hücresi aktivasyonu, inflamasyon ve interferon gama yollarının artan regülasyonu göstermiştir (Ek 6., Şekil 3.17.). Önceki çalışmalar, CD8+T hücreleri ile birlikte B hücre seviyesinin geç evre KKKAV enfeksiyonu sırasında yükseldiğini göstermiştir (Welch ve ark. 2019). Dahası, ölümcül vakalarda önemli ölçüde daha yüksek CD3+ CD8+T hücreleri gösterilmiş, bu da sitotoksik immün yanıtların KKKAV'da aktive olduğunu ortaya koymuştur (Akıncı ve ark., 2009). KKKAV hastalığının geç evresinde IFN- $\gamma$ -yolunun seviyeleri de artmıştır (Welch ve ark., 2019). Bu bulgular ışığında, adaptif bağışıklığa ait efektör hücrelerin KKKAV ile enfekte insanlarda doku hasarına katkıda bulunduğu ileri sürülmektedir. Sığır hücrelerinde IKZF4'ün aşağı yönlü regülasyonu, insan bulgularının tam tersidir (Ek 7.). EOS çinko parmak proteinini kodlayan IKZF4 geni, Treg'lerin, proinflamatuvar sitokinleri salgılayabilen T yardımcı benzeri hücrelere dönüşümünü indüklemektedir

(Naito ve ark., 2019; Powell ve ark., 2019). Bu bulgular, KKKAV ile enfekte sığır hücrelerindeki EOS'un aşağı regülasyonunu, bu hücrelerde koruyucu bir durumu işleyen Treg'lerin yüksek miktarda kalmasına katkıda bulunduğunu ortaya koymuştur. KKKAV enfeksiyonunu takiben aşırı doku hasarına karşı bir mekanizma olarak, sığırlarda TReg'lerin T yardımcı hücelere dönüşü engellenmektedir. Bu rapor, KKKAV enfeksiyonunun sığır hücrelerinde EOS ekspresyonunu etkilediğini gösteren ilk rapordur. Özet olarak, bu çalışmada insanlarda, humoral bağışık sistemin artmış seviyeleri yolu ile KKKA'da gözlenen patogeneze yol açtığını saptanırken, sığırlarda ise TReg yoluyla koruyucu bir etki izlenmiştir.

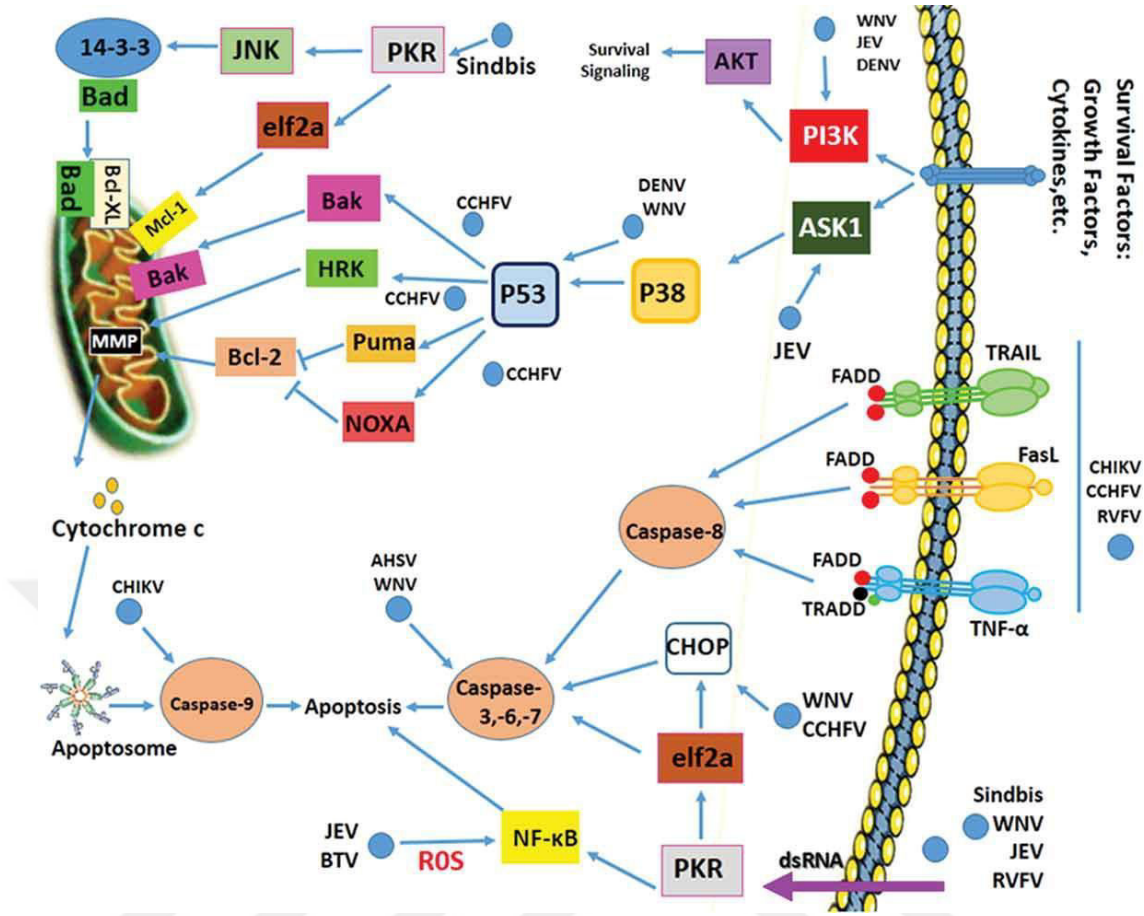
İn vitro test sonuçları da miRNA mikroarray sistemi ile uyumlu sonuçlar göstermiştir. KKKAV enfeksiyonu sırasında viral yük ile sitokinler arasında pozitif yönde doğrusal bir uyum bildirilmiştir (Saksida ve ark., 2010). Aynı zamanda, yüksek viral yük ile KKKA enfeksiyonunun şiddeti arasında da pozitif bir korelasyon olduğu bildirilmiştir (Cevik ve ark., 2008; Duh ve ark., 2007; Saksida ve ark., 2010). Çalışmada elde ettiğimiz bulgularda gördüğümüz insan hücrelerindeki yüksek ve sığır hücrelerdeki düşük viral yük, sitokinleri ve onunla birlikte doku hasarının seviyesini etkileyebilmektedir (Şekil 3.9). KKKAV'un bulaşmasında nazokomiyal, enfekte kan ile maruziyet, yaralanma ve aerosol maruziyet yolları bildirilmiştir (Leblebicioglu ve ark., 2017; Yadav ve ark., 2016). Çalışmamızda, virusun nasıl duyarlık sağlayabildiğini görebilmek için, farklı hücre hatlarında üç seri pasaj yapıldı. Pasajlar sırasında, enfekte insan böbrek hücrelerindeki viral yük maksimum bir log aralığında dalgalanırken, sığır hücrelerindeki ortalama viral yük en az iki log kopya/mL azalmıştır (Şekil 3.10). HEK-293 hücre hattında genomik RNA miktarında sürekli bir artış kaydedildi (ortalama viral yük  $7.1 \times 10^7$ 'den  $1.1 \times 10^8$ 'e ve ardından  $1.2 \times 10^8$  kopya/mL'ye değişti). İnsan hücrelerine kıyasla sığır hücrelerindeki viral yük azalması, virusun sığır hücrelerine daha az adaptif veya hücrenin virusa daha az duyarlı olabileceği hipotezimizi desteklemektedir. Duyarlılığın, immün sistemdeki farklılıklardan kaynaklı olduğu düşünülmektedir. İnsan ve sığır immün sistemlerinde birçok belirgin farklılık olduğundan (Bailey ve ark., 2013), konakçı direnç mekanizmalarındaki bu farklılıklar virus ve konakçı etkileşimleri arasındaki farklı sonuçlarda önemli bir rol oynamaktadır.

#### **4.1.2. KKKAV ile Enfekte İnsan Hücrelerinde Apoptoz ve Biyolojik Oksidasyon Yolakları Artan, Sığır Hücrelerinde Azalan Yönde Regüle Edilir**

Apoptoz, programlanmış hücre ölümüdür ve bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Apoptotik hücre ölümünün modülasyonu, bazı viral hastalıkların patogeneğinde önemlidir. Örneğin, KKKAV'un kaspaz-3'e bağlı apoptozu indüklediği ve hepatosit hücrelerinde apoptozun hem iç hem de dış yollarını modüle ettiği bildirilmiştir (Barnwal ve ark., 2016; Engin ve ark., 2019; Karlberg ve ark., 2011, 2015). KKKAV N'nin mitokondriyal geçirgenliği bastırma işlevine sahip olduğu gösterilmiştir. Bu durum, KKKAV replikasyon döngüsünün erken fazı sırasında indüklenen kaspaz aktivasyonunu geciktirdiği veya bastırdığını göstermektedir. Bu süreç virusun enfeksiyon oluşturmaya yardım eder veya izin verir. Sonuç olarak, enfeksiyondan sonraki geç evrelerde, KKKAV'un büyük olasılıkla proinflatuar faktörlerin indüksiyonu yoluyla apoptozu indüklediği ve bunun da ekstrinsik apoptotik yolu aktive ettiği gösterilmektedir (Barnwal ve ark., 2016; Karlberg ve ark., 2015). KKKAV ile indüklenen CPE'nin, apoptozun bir sonucu olabileceği bildirilmiştir (Rodrigues ve ark., 2012).

Araştırmamızda, MDM4 geniyle ilgili TP53 ekspresyonunun ve degradasyonunun regülasyonu, p53'e bağlı G1 DNA Hasar Yanıtı insan hücrelerinde 0. günde yukarı doğru regüle edilmiştir (Ek 7.). Ayrıca, VENTX ile TP53'ten bağımsız apoptozun indüklendiği de gösterilmiştir (Ek 6.). MDM4 (MDMX), p53 aracılı DNA hasarına bağlı intrinsik-apoptotik yolu indüklemektedir (Mancini ve ark., 2009). Bulgularımıza benzer şekilde, P53 biyolojik aktivitelerinin proapoptotik genlerin yukarı doğru regülasyonu, KKKAV ile enfekte olmuş bir hepatosit hücre hattında gösterilmiştir (Rodrigues ve ark., 2012). KKKAV ile enfekte insan hücrelerinde enfeksiyon sonrası 7. günde, FASLG FOXO aracılı transkripsiyonun yukarı doğru regüle olduğu tespit edilmiştir (Ek 6.). Bu ise dışsal apoptotik yolun bir parçasıdır. Çekirdek içinde FOXO, FasL geni gibi ölüm genlerinin ekspresyonunu indükleyerek apoptozu tetikler (Fu ve Tindall, 2008). Yapılan bu çalışma ile FOXO

aracılı hücre ölümü/apoptozunun KKKAV ile enfekte olmuş bir insan hücresinde rol oynadığı ilk defa gösterilmiştir. Çalışmamızdan elde edilen bulgulara göre, KKKAV hem içsel hem de dışsal yollarla apoptozu indüklemekte ve bu yolla insanlarda immünolojik yanıtların yanı sıra, hastaların patolojisine de katkıda bulunmaktadır (Barnwal ve ark., 2016). CASP7 ve MAPK9 (JNK2) indüklü apoptoz ve oksidatif stres yanıt yolları ve oksidatif stresin indüklediği hücresel yaşlanma yolunun da HMC'de 7. günde artan yönde regüle edildiği gözlenmiştir (Ek 6.). MAPK'lar, birçok proteinde serin ve treonini fosforile etmekten sorumlu heterojen bir enzim grubudur. MAPK9/JNK2, c-Jun/AP-1'in modülasyonu ve büyüme faktörü- $\beta$ 'nin dönüştürülmesi yoluyla apoptozun düzenlenmesinde rol oynar (Şekil 4.1). Ayrıca, Sitokrom C aracılı hücre ölümü yolağı ile ilişkili olduğu da düşünülmüştür (Shi ve ark., 2013). KKKAV hastalarında artmış oksidatif stresin, doku hasarına ve hücresel yaşlanmaya katkıda bulunduğu daha önceden gösterilmiş olsa da (Aydın ve ark, 2013; Büyüktuna ve ark., 2018), MAPK9'a bağlı olduğu ilk defa bu çalışma ile ortaya konulmuştur. Proteaz kaspazları apoptozda önemli bir rol oynar ve bunların aktivasyonu, apoptozun uygulayıcıları olarak görev yapan kaspaz-3 ve -7'nin aktivasyonu ile sonuçlanan bir katabolik reaksiyona yol açabilir. Sonuçlarımıza benzer şekilde, KKKAV'un kaspaz-3/7'ye bağlı apoptozu indüklediği ve hepatosit hücrelerinde apoptozun hem intrinsik hem de ekstrinsik yollarını modüle ettiği bildirilmiştir (Barnwal ve ark., 2016). Özetle, KKKAV, enfekte ettiği insan kökenli hücrelerde hem içsel hem dışsal apoptoz yollar, hem de oksidatif stres yolları indükleyerek hücre hasarına neden olmaktadır.



Şekil 4.1. Arbovirus Enfeksiyonları Sırasında Apoptoz Sinyali (Mehrbood ve ark., 2019).

Buna karşılık, sığır hücresinde 0. günde CYP3A5 geni aracılığıyla biyolojik oksidasyonun ve çok uzun zincirli yağ asitlerinin Beta oksidasyonunun azalan yönde regülasyonu kaydedilmiştir (Ek 7.). CYP'ler birçok ilacın, çevresel kimyasalların ve endojen substratın oksidasyonundan sorumludur (Emoto ve Iwasaki, 2006). Sitokrom P450 (CYP) enzimleri, hücrel reaktif oksijen türlerine (ROS) de katkıda bulunur. ROS'un, hücre hasarına ve ölümüne yol açabilen ve hastalık gelişimine katkıda bulunan lipidler, proteinler ve nükleik asitler dahil olmak üzere endojen molekülleri modifiye ettiği bilinmektedir (Veith ve Moorthy, 2018). KKKAV enfekte sığır kökenli hücrelerde biyolojik oksidasyonun düşük seviyesi, daha az hücre hasarına neden olabilmektedir. **Bu çalışma, CYP3A5 geninin aşağı regülasyonun sığır hücresinde daha az patolojik bir süreçte katkıda bulunabileceğini gösteren ilk rapordur.** Ek olarak, INO80D'ye bağlı GG-NER'de DNA Hasar Tanıma, Global Genom Nükleotid Eksizyon Onarımı ve Deubiquitination, sığır hücresinde 7. günde

aşağı doğru regüle olmuştur (Ek 9.). INO80D, transkripsiyona bağlı nükleotid onarımında ve DNA çift iplikli kırılma (DSB) onarım yollarında rol oynamaktadır (Kashiwaba ve ark., 2010). DSB tanıma apoptoz, nekroz veya mitotik ölümle hücre ölümünü indükler (Kaina, 2003; Lips ve Kaina, 2001). Ubikvitinasyonun da hücrenin hayatta kalması ile hücre ölümü süreçlerinde kritik rol üstlendiği bilinmektedir (Ramakrishna ve ark., 2011). Bu bulgular ışığında sığır hücrelerinde apoptoz, nekroz veya mitotik ölümle ilgili yolların aşağı doğru regülasyonunun, bu hücrelerdeki hasarın azalmasına katkı sağlayabileceği sonucuna varılmıştır. Özellikle INO80D genine bağlı DSB tanınmasının, hücre ölümünü, nekrozu veya mitotik ölümünü indüklediği yolların KKKAV ile enfekte sığır hücresinde azalan yönde değiştiği ilk defa bu çalışma sonunda gösterilmiştir. MCF2 gene bağlı NRAGE, NRIF ve NADE aracılığıyla hücre ölümü sinyallesmesi; Rho GTPaz döngüsü ve Ölüm Reseptör Sinyal yollarının da sığır hücresinde 7. günde ifadesi azalmıştır (Ek 9.). MCF2 geni pro-apoptotik genlerin transkripsiyonunu indüklemekte ve hücre ölüm mekanizmasını doğrudan aktive etmektedir. Ölüm reseptörlerinden ligand bağlanmalarına yanıt olarak iletilen ana sinyaller, hücre içi sistein proteazlarının (kaspazlar) doğrudan aktivasyonu ile karakterize edilen apoptotik bir sinyal yolağı ile sonuçlanır. Rho GTPaz hücre döngüsünün ise apoptozda aktif bir role sahip olduğu bildirilmiştir (Haga ve Ridley, 2016). Sonuç olarak, sığır hücrelerinde MCF2 geninin yer aldığı yollarda apoptozisin azaldığı bulgularından hareketle, KKKAV enfekte sığır böbrek hücrelerinde MCF2 azalan ifadesi ile hücre ölüm azalmasının bildirildiği ilk çalışmadır.

Microarray sonuçlarını doğrulamak amacıyla gerçekleştirdiğimiz apoptoz çalışması da benzer sonuçlar verdiğinden, KKKAV'un hem insan hem de sığır hücrelerinde Kaspaz-3/7 aracılı apoptozu indüklediği ortaya konulmuştur (Çizelge 3.1, Şekil 3.9). Microarray'e benzer şekilde, nekroz, primer insan hücre hattında da en yüksek yüzdeye sahip olarak bulunmuştur. Oysaki farklı olarak apoptoz insan ve sığır hücreleri arasında farklılık göstermedi. Bunun sebebi olarak apoptotik sinyal yollarının KKKAV replikasyon döngüsü sırasında erken dönemde bastırıldığı, ancak enfeksiyonun geç döneminde apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Karlberg ve ark., 2015). Ayrıca, sığır hücrelerinde daha az CPE ve daha az LDH seviyesi (Şekil 3.4 ve

3.11) ile daha düşük sitotoksosite tespit edilmiştir. KKKAV Ank-2 virusunun sitotoksitesinin, primer insan böbrek hücrelerinde, primer sığır böbrek hücrelerine göre neredeyse iki katı (%24,8'e karşı %41,62) olduğu ortaya konulmuştur. Bu veriler, insan ve sığır kaynaklı tüm ölümsüzleştirilmiş hücre hatlarda ayrıca doğrulanmıştır.

#### **4.1.3. KKKAV ile Enfekte İnsan ve Sığır Hücrelerinde Megakaryosit/ trombosit Gelişimi ve Vasküler Endotel Büyüme Faktörünün İndüksiyonu**

IFNA4 genine bağlı megakaryosit gelişimi ve trombosit üretimi ile hemostaz ilgili yolların, HMC'de 0. günde artan yönde regüle edildiği gözlemlendi (Ek 4.). Alfa-IFN'lar antiviral, immünomodülatör ve antiproliferatif özelliklerine rağmen, aynı zamanda trombosit sayısını da azaltırlar (Wadenvik ve ark., 1991). Trombosit sayısını önemli ölçüde azalttığı için trombositemi tedavisinde de kullanılmaktadırlar (Catani ve ark., 1991; Li ve ark., 2010). Trombositopeni, KKKAV hastalığının hematolojik olarak ayırt edici bir özelliğidir ve trombosit sayılarının, sağlıklı kontrollere kıyasla KKKAV hastalarında anlamlı düzeyde düşük olduğu bildirilmiştir (Ekiz ve ark., 2013; Kavak ve Gürbüz, 2019; Kozak ve ark., 2020). Trombositleri etkileyen herhangi bir patolojik durum sadece hemostazı etkilemeyecek, aynı zamanda enfeksiyona karşı bağışıklık tepkisini de değiştirecektir. Bunun nedeni, trombositlerin enfeksiyon veya enflamasyon bölgelerinde lökosit trafiğini teşvik ederek ve adaptif bağışıklığı artıracak sitokinler, kemokinler ve diğer inflamatuvar araçları üreterek immün yanıtları modüle etmeleridir (Zapata ve ark., 2014). Tamamlanan bu araştırma sonuçları ile ilk defa KKKAV enfekte insan hücresinde, hem hemostazı hem de immünolojik yolları etkileyen trombosit üretimini azaltan IFNA4 geninin artan yönde regüle olduğu gösterilmiştir.

Buna karşılık, enfeksiyon sonrası 0. günde primer sığır böbrek hücresinde, Dpy-30 Histone Methyltransferase Complex Regulatory Subunit (DPY30) genine bağlı RUNX1 megakaryosit farklılaşmasında ve trombosit fonksiyon yolunda rol

oynayan genlerin yukarı doğru regüle olduğu gösterildi (Ek 8.). Dpy-30 Histone Methyltransferase Complex Regulatory Subunit (DPY30), RUNX Family Transcription Factor 1 (RUNX1) kompleksinin bir parçasıdır (Schlegelberger ve Heller, 2017). RUNX1 ise hematopoez oluşumu için çok önemli olan bir ana hematopoietik transkripsiyon faktörüdür. Bu çalışma, KKKAV ile enfekte sığır hücrelerinde, insan hücrelerindeki sürecin tam aksine megakaryosit gelişimi ve trombosit oluşumunda rol oynayan RUNX1 yolaklarının artan yönde düzenlendiğini ilk kez ortaya koymuştur.

VEGF veya VEGF-A reseptörü ile birlikte VEGFR2 genlerinin ifadesi insan hücrelerinde enfeksiyon sonrası 7. günde aşağı yönde regüle olmuştur (Ek 9.). Bu yapılar, endotelial spesifik, heparin bağlayıcı, anjiyojenik büyüme faktörleri, vasküler ve lenfatik sistemlerin normal gelişimi ve sağlıklı devamlılıkları açısından çok önemlidir (Maniscalco ve D'Angio, 2006; Storkebaum ve Carmeliet, 2004). Aynı zamanda, endotel hücrelerin hayatta kalma faktörü olarak da işlev görürler (Maniscalco ve D'Angio, 2006; Storkebaum ve Carmeliet, 2004). KKKAV ve Dang hemorajik ateşinde, VEGF seviyesinin ciddi ve ölümcül vakalarda anlamlı olarak daha düşük olduğu daha önce gösterilmiştir (Bodur ve ark., 2010). Hem vaskülogenez hem de anjiyogenez sırasında yeni kan damarlarının oluşumundaki eksikliği/bozukluğun KKKAV vakalarında ölümcül sonuçları olduğu bildirilmektedir. Çalışmamızın bu sonuçları, klinik olgulardan üretilen bilgileri doğrulayan şekilde KKKAV ile enfekte insan hücrelerinde VEGF azalan ifadesini net bir şekilde ortaya koymuştur.

Özet olarak, KKKAV'ün enfekte ettiği bireylerde trombosit üretimine ilgili genlerin ifadesinin insanlarda azaldığı, sığırlarda ise yükseldiği tespit edilirken insan hücrelerinde anjiyojenik büyüme faktörü olan ve endotel hücrelerin hayatta kalmasında rol oynayan VEGF'in ifadesinde rol oynayan genlerin azaldığı ortaya konulmuştur.

#### **4.2. Olgunlaşan Endozomlar Yoluyla Penetrasyonu/Viral Girişi ile İlgili Gen Ekspresyonu Enfekte İnsan ve Sığır Hücrelerinde Gösterdiği Ters Etki**

Tamamlanan çalışmamızda, KKKAV'un insan mesangial hücrelerinde miRNA mekanizması aracılığıyla 0. günde GALNT3'ün ekspresyonunu yukarı yönde düzenlediği gösterildi (Ek 4.). Bu rapor, KKKAV enfeksiyonunun müsin tipi O-glikolizasyonun ilk adımından sorumlu olan GalNAc transferaz ekspresyonunu etkilediğini gösteren ilk rapordur. Müsin üretimindeki değişimin ve/veya hücrel reseptörlerin O-glikolizasyonunun, virionların hücre yüzeyine adsorpsiyonu için kritik olduğu bilinmektedir. Birçok çalışmada glikolizasyonun, hücrel reseptörlerin veya viral zarf glikoproteinlerinin modifikasyonu yoluyla viral bağlanma veya penetrasyon aşamalarını etkilediği gösterilmiştir (Nakamura ve ark., 2016). Örneğin, mikroRNA'lar aracılığıyla GALNT3'ün IAV bağlı ekspresyonunun gelişmiş viral replikasyon için gerekli olduğu ve IAV replikasyonuna bağımlı bir şekilde erken aşama enfeksiyonda yukarı doğru regüle edildiği gösterilmiştir (Nakamura ve ark., 2016). Ayrıca, sonucumuza göre, potasyum kanalları insan hücresinde ATP'ye duyarlı içe doğru doğrultucu potasyum kanalı 15 (KCJ15 gen) ve potasyum voltaj kapılı kanal alt ailesi C üyesi 2 (KCNC2 gen) ile yukarı doğru regüle edildi (Ek 4.). Bunyavirus enfeksiyonlarında, olgunlaşan endozomlar yoluyla viral geçiş sırasında karşılaşılan hücrel K<sup>+</sup> kanalları tarafından kontrol edilen yüksek potasyum iyon konsantrasyonlarına ihtiyaç olduğu bildirilmiştir. Endozomlarda gerekli [K<sup>+</sup>] yokluğunda, virionların lizozomlara taşındıkları ve burada düşük pH ile inaktive oldukları ileri sürülmüştür (Hover ve ark., 2018; Punch ve ark., 2018). Daha da önemlisi, K<sup>+</sup> kanalın gerekliliği Schmallerberg virusu ve Hazara virusu dahil olmak üzere diğer bunyaviruslarda da gösterilmiştir (Hover ve ark., 2016, 2017). Bu rapor, KKKAV'un insan hücrelerinde olgunlaşan endozomlar yoluyla penetrasyonun/viral geçişin hem potasyum kanalları hem de GALNT3 ile kolaylaştırılmasını gösteren ilk rapordur. Bu genlerin ekspresyonunun yükselmesinin, KKKAV'nün insan hücrelerine girişi/penetrasyonunu kolaylaştırabileceği sonucuna varılmıştır.

Bunun tersine, sığır hücrelerinde 0. günde GALNT3'e bağlı olarak, O-glikan biyosentezinin sonlandırılmasının artan yönde regüle olduğu gözlenmiştir (Ek 8.). Çalışmamız, GALNT3'e bağlı olarak, KKKAV penetrasyonun sığır hücrelerinde daha az verimli olduğunu gösteren ilk rapordur.

#### **4.3. Hücreden Hücreye Yayılma Yollarına İlgili Genlerin Enfekte İnsan ve Sığır Hücrelerinde Ters Ekspresyonu**

CD97 transmembran sinyal reseptörü, enfeksiyon sonrası 0. günde PSH'de yukarı doğru regüle edildi (Ek 8.). CD97, adhezyon G-proteinine bağlı reseptörlerin epidermal büyüme faktörü 7 ağırlıklı transmembran ailesinin bir üyesidir (Becker ve ark., 2010). E-kaderin bazlı adherens bağlantılarında bulunur ve hücre yapışması, göçü ve hücreler arası bağlantıların düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Becker ve ark., 2010). KKKAV ile yapılan in vitro enfeksiyon uygulamalarındaki CPE analizi ve IIFA sonuçlarının değerlendirilmesi neticesinde (Şekil 3.4 ve 3.7), enfekte sığır hücrelerinde kültür sisteminde birbirleriyle yakın temas halinde sınırlı, adacık benzeri oluşumlar gözlenmiştir. Sivrisinek hücrelerinde Bunyamwera orthobunyavirus ile yapılan enfeksiyonlarda, virusların hücre dışı boşluğa çıkmak yerine, hücreler arasında filopodia benzeri yapılarda yerleştiği tespit edilmiştir (Szemiel ve ark., 2012). Ayrıca, bir başka arbovirus olan Dang virusunun, virion ve viral RNA'yı komşu hücrelere aktarmak amacıyla özel vakuoller (C189-VC'ler) oluşturduğu gösterilmiştir (Cheng ve ark., 2020). **Araştırmamızda, CD97 geninin yukarı doğru regüle edilmesi ve elde edilen in vitro sonuçlar, sığır hücrelerinde virusun hücre dışı yayılma yerine hücreden hücreye yayılma (cell-to-cell spread; CCS) yolunu tercih ettiğini göstermektedir.** CCS, endotel membranının hücrelere daha az zarar verici bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (López-Montero ve Risco, 2011; Sigal ve ark., 2011). Bunu destekler şekilde, çalışmamızda sığır hücrelerinde daha düşük LDH, daha az CPE, daha düşük moi ve daha az nekroz (Çizelge 3.1, Şekil 3.5 ve 3.11) bulgularına erişilmiştir. Bu veriler, insan ve sığır kökenli tüm ölümsüzleştirilmiş hücre hatlarında doğrulanmıştır. Önerilen bu mekanizmanın enfeksiyonun farklı hücrelerdeki değişen sonuçlarında rol oynadığını

doğrulamak için, S segmenti hedefli olarak viral genom ölçülerek hem hücre içi hem de hücre dışı virus yükünün nicel bir analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.9). İnsan hücrelerinde hem hücre içi hem de hücre dışı viral yük seviyesi zamana bağlı olarak artış sergilenmiştir. Bununla birlikte, sığır hücrelerinde sadece hücre içi viral yükün arttığı tespit edildi. Diğer taraftan, yapılan moi değerlendirmeleri neticesinde virusun, sığır böbrek hücrelerinin %34'ünden daha azını enfekte edebildiği saptanmıştır. Daha az zarar verici ve daha az verimli bir viral replikasyonun, sığırların bağışıklık sisteminde daha tolere edilebilir bir enfeksiyona neden olduğu sonucuna varılmıştır. Viral partiküllerin hücreden serbest kalarak yayılması, uzakta yer alan hücrelerin enfeksiyonuna izin verirken, hücreden hücreye geçiş lokal yayılmaya yol açmaktadır. Bu nedenle CCS daha yavaş bir KKKAV enfeksiyonuna yol açmaktadır (Zhong ve ark., 2013). CPE'nin erken başlangıcı ve insan hücrelerinde yüksek IIFA skorları bu hipotezi güçlü bir şekilde desteklemektedir (Şekil 3.5). İnsan kaynaklı HuH7 hücrelerinde yarasa kökenli R06E-J hücrelerine göre daha hızlı replike olan EBOV ve Marburg virusları için de benzer gözlemler bildirilmiştir (Hölzer ve ark., 2016). Farklı hücre tipleri, virusların hücreden hücreye yayılımında farklı affinite gösterebilirler. Örneğin, nöronlar boyunca yayılma, nörotropik viruslar tarafından kullanılan iyi bilinen bir stratejidir (Mothes ve ark., 2010; Zhong ve ark., 2013). KKKAV nörotropik bir virus olduğundan (Garrison ve ark., 2019; Spengler ve ark., 2017), CCS beyindeki ve diğer organlardaki replikasyonda da rol oynayabilir. Özet olarak, KKKAV'un sığır böbrek hücresinde CD97 tarafından düzenlenen hücreden hücreye etkileşimi, bu genin yukarı yönde regüle edildiği ilk kez bu çalışmada gösterilmiş ve bu bulgu in vitro deneylerimiz ile desteklenmiştir.

Diğer taraftan, TCF4/TCF7L1'e bağlı WNT inhibe edici yol, enfeksiyon sonrası 7. günde insan hücrelerinde yukarı doğru regüle edilmiştir (Ek 6. ve Şekil 3.17). WNT sinyal yolu, embriyonik gelişim sırasında ve yetişkin dokularda hücre spesifikasyonunu kontrol eden, evrimsel olarak korunmuş temel bir sinyal mekanizmasıdır. Ana efektörü  $\beta$ -katenin olan kanonik WNT yolu, yapışık bağlantılar (adherens junction) yapısal bir işleve sahiptir (Hrckulak ve ark., 2018). TCF'nin, kanonik WNT transkripsiyonunun bir baskılayıcısı olduğu daha önce gösterilmiştir

(Kimelman ve Xu, 2006). Bu bulguya anlam veren, yapışık bağlantılarının önemli bir bileşeni olan VE-kadherin lokalizasyonunu analiz eden bir çalışmada, KKKAV enfekte olmuş hücrelerin bazıları arasında VE-kadherin yoğunluğunda ve dağılımında değişiklikler gözlemlendi (Connolly-Andersen ve ark., 2011). KKKAV ve diğer Bunyaviridae viruslarının TCF7L1 gene bağlı WNT inhibitör yollarını yukarı doğru regüle ettiği gösterilmiştir (Papp ve ark., 2020). Dahası, WNT sinyal yollarının KKKAV hastalığı patogenezinde varsayılan olarak rol oynadığı da gösterilmiştir (Papp ve ark., 2020). Ayrıca, NFATC1 geni ile ilgili WNT-yolu da HMC'de enfeksiyon sonrası 7. günde yukarı doğru regüle edilmiştir (Ek 6.). Kanonik olmayan WNT sinyali yoluyla NFAT (Aktive T hücresinin Nükleer Faktörü) yolağının hücre yapışmasını azalttığını gösterilmiştir (Pan ve ark., 2013). NFATC1 ayrıca inflamasyona da katkıda bulunmaktadır. Bu çalışma sonuçlarına dayanarak, KKKAV'un, TCF4 ve NFATC1 genlerinin yukarı doğru regülasyonu ile enfekte insan hücresinde yapışan bağlantıları WNT-yolu üzerinden inhibe ettiği değerlendirilmektedir. NFATC1 geni ile kanonik olmayan WNT yolunun KKKAV enfeksiyonunda rol oynadığı sonucuna varılmıştır.

#### **4.4. DNA ve RNA Transkripsiyonu KKKAV ile Enfekte İnsan ve Sığır Hücrelerinde Ters Yolaklar Gösterdi**

Zoonotik hayvan virusları, insan hücrelerinde kendini çoğaltmak için yüzlerce konakçı protein (örneğin transkripsiyon faktörleri) başarılı bir şekilde etkileşime girmeli ve onları kullanabilmelidir. Bu durum, hayvan viruslarına karşı bağışıklığın, insan viruslarına karşı olan bağışıklıktan farklı olmasının ana nedenlerinden birisidir (Warren ve Sawyer, 2019). Transkripsiyon faktörleri, virus enfeksiyonundan sonra insan hücrelerinde en farklı ifade edilen genler arasındadır (Hölzer ve ark., 2016).

DNA replikasyonu ile ilgili yolaklar ve DNA transkripsiyonu için gerekli TOP1 hem 0. hem de 7 günde, DNA replikasyonu için gerekli olan RCF1 geni ise 7. günde HMC'de artan yönde değişim göstermiştir (Ek 4 ve 6). KKKAV

transkripsiyonu ve replikasyonu için gerekli konakçı faktörleri büyük ölçüde bilinmemektedir. Topoizomeraz 1 (TOP1), çift sarmallı DNA'nın sarmal yapılarına bağlanarak sarmalları transkripsiyon ve çoğaltma için gevşeten nükleer bir proteindir. Ayrıca, TOP1, kök-döngü RNA yapılarını tanır ve endoribonükleaz aktivitesi yoluyla RNA'nın işlenmesini gerçekleştirir (Takahashi ve ark., 2013). RCF1 ise ökaryotik DNA replikasyonu ve onarımı için gerekli olan DNA'ya bağlı bir ATPazdır. İlginç bir şekilde, TOP1 hücre faktörünün, bir başka kanamalı ateş hastalığı etkeni olan EBOV genomunun transkripsiyonuna ve replikasyonuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Takahashi ve ark., 2013). Araştırmamızdan elde edilen veriler ışığında, TOP1 veya RCF1 gibi hücre faktörlerine ilgili genlerin, insan böbrek hücrelerinde KKKAV genomunun transkripsiyonuna ve replikasyonuna katkıda bulunabileceğini ilk defa ileri sürülebilmektedir.

Buna karşılık, PSH hücresinde virus inokulasyonu izleyen 7. günde, çekirdekte ve sitozolde UTP14C ile ilişkili rRNA modifikasyonu, nükleolusta ve sitozolde rRNA işlemenin ana yolu, çekirdekte ve sitozolde rRNA işleme ve rRNA işleme yolları azalan yönde regüle edilmiştir (Ek 9.). Ayrıca, rRNA işleme ve mRNA ile ilgili süreçlerde görev alan (kapaklı İntron İçeren Pre-mRNA, mRNA Ekleme, RNA Polimeraz II Transkripsiyon Sonlandırması, İntron İçeren Transkriptten türetilen Olgun mRNA'nın Taşınması, Olgun Transkriptin Sitoplazmaya Taşınması, RNA Metabolizması ve mRNA Ekleme) SRSF3 gen ile ilgili İşlemesi vb) süreçlerde görev alan genler inokulasyon sonrası 7. günde azalan yönde regüle edilmiştir (Ek 9.). Riboproteinlerin virusların yaşam döngüsünde kritik roller oynadığı bilinmektedir (S. Li 2019). Ayrıca, mRNA olgunlaşması hem konak, hem de virusların replikasyonu için önemlidir. Serin/arginin zengin splicing faktörü 3 (SRSF3) kendi mRNA'sı dahil olmak üzere çok sayıda hücre transkriptlerinin birleştirilmesini düzenler (Majerciak ve ark., 2014). Mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, bu araştırmadan elde edilen bulgularla, insan hücresinde hücre faktörleri, KKKAV genomunun transkripsiyonuna ve replikasyonuna katkıda bulunurken, sığır böbrek hücrelerinde hücre rRNA işleme ve mRNA splicing'a neden olan genlerin azalan yönde regülasyonunun, viral replikasyonu kısıtlayabileceği sonucuna ilk defa bu çalışma ile varılmıştır.

#### 4.5. KKKAV'un Enfekte İnsan Hücrelerinde Sirkadiyen Saat Sistemini Değiştirmesi

Dünyanın kendi eksenini etrafında dönmesi, yaklaşık 24 saatlik (sirkadiyen) bir periyotla ritmik gündüz/gece dönüşümleri oluşturur (Mazzocchi ve ark., 2020). Biyolojik saat, hücreler işleyişi kontrol eden gen ve protein ekspresyonunda salınımlar üreten ve bir arada bulunamayan veya olmaması gereken biyolojik süreçlerin zamanında ayrılmasına izin veren moleküler bir ağıdır (Mazzocchi ve ark., 2020). Aktivatörler (CLOCK, ROR $\alpha$ ) ve baskılayıcılar, kinazlar ve fosfatazlar dahil olmak üzere birçok çekirdek saat mRNA ve protein tarafından hareket ettirilir (Mazzocchi ve ark., 2020). Virus enfeksiyonları, replikasyonu ve yayılmayı kolaylaştırmak için enfekte hücrelerin biyolojik süreçlerini yeniden işler. Böylece biyolojik saat, bağışıklık sistemi ve virus enfeksiyonu arasındaki moleküler etkileşim hastalık sonuçlarını etkileyebilir (Mazzocchi ve ark., 2020). Bağışıklık sisteminin doğuştan gelen ve adaptif bileşenlerinin immün hücreleri, lenf düğümlerinden lenfosit göçü gibi, 24 saatlik bir zaman ölçeğinde ritmik süreçlerini yöneten moleküler saat mekanizmalarına sahiptir (Labrecque ve Cermakian, 2015). Viral proteinler, virusun replikatif döngüsünü konak moleküler saatine bağlayabilen CLOCK genini enzimatik olarak aktive edebilirler (Kalamvoki ve Roizman, 2011). Örneğin, Dang virusu enfeksiyonunun sivrisinekte ritmik lokomotor aktivitenin genliğini arttırdığı bildirilmiş ve bunun vektörün virusu yayma kapasitesini de artıracak ileri sürülmüştür (Zhuang ve ark., 2017). **Araştırma sonuçlarımıza göre, sirkadiyen saatle ilgili üç gen, CLOCK, KLF15 ve RORA, HMC'de 7. günde yukarı doğru regüle edilmiştir (Çizelge 3.7.). Bu nedenle insan hücrelerindeki KKKAV'un replikatif döngüsünü insanın moleküler saat işleyişine bağlayabileceği/değiştirebileceği sonucuna ilk defa varılmıştır.** Tam mekanizma bilinmekle birlikte, KKKAV insan genlerin %10'u etkileyen sirkadiyen saatine bağlı olan bazı mekanizmaları etkileyebilmektedir. Örneğin, İnsan İmmün Yetmezlik Virus (HIV) enfeksiyonu, gündüzden geceye kan basıncında düşmeye bağlı olmak üzere, sirkadiyen tarafından düzenlenen fizyolojik süreçlerin bozulmasıyla ilişkilendirilmiştir (Zhuang ve ark., 2017). Simian İmmün Yetmezlik Virus (SIV)

ile yapılan çalışmalar, vücut ısısının ve aktivite parametrelerinin çeşitli sirkadiyen mekanizmaları ile bozulduğunu bildirmiştir (Zhuang ve ark., 2017).

#### **4.6. KKKAV ile Enfekte İnsan Hücresinde Nörolojik Hastalıklar ile İlgili Yolakların Yüksek Seviyede İfade Edilmesi**

İnsan primer mesangial hücresinde enfeksiyon sonrası 7. günde, Parkinson, Alzheimer ve Huntington hastalığı gibi MAPK9 ile ilişkili nörolojik hastalık yolakları artan şekilde ifade edilirken, ZNF225 genine bağlı nöronal büyüme faktörü (NGF) ile uyarılan transkripsiyon azalan yönde regüle edildi (Ek 5. ve 6. ve Şekil 3.17.). MAPK9 (JNK ailesine ait JNK2 olarak da adlandırılan) aracılı sinyal yolakları gen ekspresyonunu, nöronal plastisiteyi, rejenerasyonu, apoptozu veya hücrel yaşlanmayı etkiler (Bohush ve ark., 2018). JNK'ler Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı ve Huntington hastalığı gibi nörodejeneratif bozukluklarda rol oynamaktadır (Bohush ve ark., 2018; Wang ve Wang, 2020; Yu ve ark., 2017). JNK sinyalleşmesi ayrıca nöronlardaki apoptozla da bağlantılıdır (Bohush ve ark., 2018). NGF'in olmaması nöronlarda apoptozu sebep olur ve JNK'lerin aktivasyonu ile ilişkilidir (Bohush ve ark., 2018). İn vivo olarak, KKKAV, replikasyonun geç aşamasında insan beynini enfekte edebilir (Spengler ve ark., 2017). Vakalarda serebral, meningeal ve hafif psikolojik ve nörolojik semptomlar, anormal davranış, hipotalamustan virus izolasyonu, serebrumda enflamatuvar infiltratlar tanımlanmıştır (Spengler ve ark., 2017). Bu değerlendirmeler ışığında, KKKAV ile enfekte insanlarda NGF yoksunluğuna neden olan JNK2 kaynaklı apoptozunun nörolojik hastalıklara neden olabileceği sonucuna ilk defa varılmıştır.

#### **4.7. KKKAV ile Enfekte İnsan Hücresinde NOTCH1-yolu Artan Yönde Regüle Edildi**

Notch1 sinyal yolu, hematopoez, somitogenez, vaskülojenez ve nörojenez dahil olmak üzere organ sistemlerindeki gelişim, sürecin merkezidir (Bray, 2006).

Bu süreçler, kök hücrenin kendini yenilemesinin, çoğalmasının, hücre kaderinin veya farklılaşmasının spesifikasyonunun ve apoptozun sürdürülmesini içerir (Lasky ve Wu, 2005). Notch1 sinyal yolunun, T hücre aracılı immün yanıtların önemli bir modülatörü olduğunu da gösterilmiştir (Ito ve ark., 2011). Viruslar, enfekte olmuş hücrelerin farklılaşma durumunu hem kullanır hem de manipüle ederler. Aynı zamanda hücre döngüsünü teşvik veya bloke eder ve doğuştan gelen hücresel antiviral yanıtlardan kaçınmak ve hücrenin hayatta kalmasını teşvik etmek için çeşitli mekanizmalar kullanırlar (Hayward, 2004). Örneğin, Adenovirus, SV40, insan papilloma virusu, Epstein-Barr virusu ve Kaposi sarkomu ile ilişkili herpesvirusu için Notch1 yolu etkileşimleri tanımlanmıştır (Hayward, 2004). Araştırmamızdan elde edilen bulgulara göre, KKKAV, HMC hücrelerinde Notch sinyal yolu ve bu şekilde hücre kaderi/farklılaşmasını etkilemektedir. Bu nedenle insan kökenli hücrelerde viral yayılımın daha fazla olduğu sonucuna varılmıştır.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Patojen virusların insanlara veya diğer rezervuar olmayan türlere yayılması söz konusu olduğunda, yeni konak hücreler için biyokimyasal olarak optimize olmadıklarından dolayı hastalığa, ölüme veya immün temizliğe yol açabilmeleri söz konusudur (Schountz ve ark., 2017). Araştırma sonuçlarına; göre KKKAV ile enfekte insan ve sığır hücreleri arasında viral tropizm açısından büyük ölçüde farklılık görülmektedir.

Viral enfeksiyonun patogenezi, araştırma kapsamında incelenen iki türde oldukça farklıdır. Rezervuar konakçı tepkileri viral replikasyonu daha etkili bir şekilde kontrol etmektedir. Bunun ana yolları: immünolojik, apoptotik ve trombosit ile ilgili yollar olarak belirlenmiştir. İnsan bağışıklık sistemi her seviyede tetiklenmekte ve bunun sonucunda aktive olan sitokin ve kemokinler ve immün hücreler tarafından doku hasarı oluşturulabilmektedir. Sığır immün sistemi Treg gibi koruyucu ya da hasar veren (örn. Nötrofiller) hücrelerin azalması yolu ile dokuları antiviral yanıtların zararından korumaktadır. İnsan hücrelerinde in vitro olarak gözlediğimiz yüksek viral yük de sitokinlerle ve hastalığın şiddetiyle ilişkilidir (Saksida ve ark., 2010). Çalışmamıza göre, KKKAV insan hücresinde hem içsel hem de dışsal yollarla apoptozu indüklemekte ve bu immünolojik yanıtların yanı sıra, hastalığın patolojisine olumsuz yönde katkıda bulunmaktadır. Ek olarak, KKKAV enfekte insan hücrelerinde oksidatif stres yollarının artması da doku hasarına katkıda bulunabilmektedir. Sığır hücrelerinde apoptoz, nekroz veya mitotik hücre ölümü ile ilgili gen ekspresyonunun azalması izlenmiştir. Hücre hasarında etkin olan immünolojik ve apoptotik yollar yanında, hemostazı etkileyen genlerde de ifade farklılıkları gözlenmiştir. KKKAV ile enfekte insanlarda hastalığın olumsuz prognozunu etkileyen rol oynayan trombosit üretimine ilişkin parametrelerin, insan hücresinde azalması, sığır hücresinde ise yükselmesi tespit edilirken, insan hücresinde anjiyojenik büyüme faktörü olan ve endotel hücrelerin hayatta kalmasında rol oynayan VEGF gen ifadesinin azalması gözlenmiştir. Ek olarak, KKKAV enfekte insan hücrelerinde, NGF yoksunluğuna neden olan JNK2 kaynaklı apoptozunun nörolojik hastalıklara da neden olabileceği göstermektedir. Bütün bu

yolaklar, insan vakalarında izlediğimiz semptomlara neden olmakta iken sığır hücresinde ters mekanizmalar görülmektedir.

Viral replikasyonun indüklendiği yolaklar da insan ve sığır hücrelerinde farklılık arz etmektedir. Çalışma sonunda hem hücreye giriş yolaklar hem de hücreden hücreye yayılmayı etkileyen yolaklarda farklılıklar bulunmuştur. İnsan hücresinde KKKAV'un olgunlaşan endozomlar yoluyla penetrasyonun, potasyum kanalları ve GalNAc transferaz ile kolaylaştırılması söz konusu iken bunun tersine, sığır hücrelerinde aynı GALNT3 geninin kodladığı GalNAc transferazın engellendiği tespit edilmiştir. KKKAV'un enfekte sığır böbrek hücresinde yapışkan bağlantıları (TJ) etkileyen gen üzerinden hücreden hücreye etkileşimi artan yönde regüle ettiği, oysaki insan hücresinde yapışkan bağlantıların inhibisyonunu gözlemledik. Sığır hücrelerinde virusun hücreden hücreye geçişi ile, hücre dışı boşluktaki sınırlı maruz kalmasıyla bağışıklık sistemindeki antiviral yanıtları da daha az uyardığı sonucuna varılmıştır.

Virusun insan ve sığır konakçı transkripsiyon faktörlerini kullanması da farklıdır. İnsan hücresinde TOP1 veya RCF1 gibi hücresel faktörlerin, KKKAV genomunun transkripsiyonuna ve replikasyonuna katkıda bulunurken, sığır böbrek hücrelerinde hücresel rRNA işleme ve mRNA'nın splicingine neden olan genlerin aşağı doğru regülasyonu, viral replikasyonu da kısıtlayabilmektedir. Dahası, insan hücrelerindeki KKKAV'un replikatif döngüsünü, CLOCK, KLF15 ve RORA geni ile insanın moleküler saat sistemine bağlı olan bazı mekanizmaları etkileyebileceği de gösterilmiştir. İnsanlarda ve hayvanlarda enfeksiyon sonucunu değiştirmek için hastalığın patojenisinde hangi modüle edici faktörlerin rol oynadığını anlamak çok önemlidir. Örneğin, spesifik miRNA yolaklarının bloke edilmesi, bu yolla enfeksiyondan sonra insanlarda doku hasarını azaltarak enfeksiyonun/hastalığın seyrini değiştirebilecek potansiyele sahip olduğu görülmektedir.

## ÖZET

### **Kırım Kongo Kanamalı Ateş Virusunun İnsan ve Hayvan Kaynaklı Hücre Kültürlerinde mikroRNA Yolaklarıyla İlgili Anahtar Protein Ekspresyonu**

Kırım-Kongo Hemorajik Ateş Virus (KKKAV), insanlarda ciddi klinik tezahürü olan ölümcül kene kaynaklı bir zoonotik hastalığa neden olur. Ancak vahşi veya evcil hayvanlarda semptomatik hastalık üretmez. Türler arasındaki enfeksiyonun farklı sonuçlanmasına katkıda bulunan faktörler henüz bilinmemektedir. KKKAV'un böbrek dokusuna duyarlı olduğu ve sığırların KKKAV doğal siklusunda konakçı olarak önemli bir rol oynadığı bilindiğinden, bu çalışmada insan ve sığırların ölümsüz ve primer böbrek ve adrenal bezi hücre hatlarında KKKAV enfeksiyonunu karşılaştırmalı olarak değerlendirdik. Sonuç olarak, insan ve sığır hücrelerinde hem in vitro hem microarray benzer sonuç verdi. Buna göre, viral enfeksiyonun antiviral immün yanıtın, apoptotik yollardan, trombositik ve nörolojik yollardan kaynaklanan önemli farklılıklar olduğu gözlemlendi. Viral replikasyonun indüklendiği yollar da insan ve sığır hücrelerinde farklı olarak bulundu. Hem hücreye giriş/geçiş yolları ve hem de hücreden hücreye yayılmayı etkileyen yolların farklı olduğu gözlemlendi. Virusun insan ve sığır konakçı transkripsiyon faktörlerinin işe alması da farklıdır. Bütün bu yolların, insan hücresinde hücre hasarına neden olup, virusun girişini/geçişini kolaylaştıracak ve konakçı faktörleri ile kendi replikasyonunu, konakçı hücre farklılaşmasıyla sinkrone edecek şekilde değiştirdiği saptandı. Tersine, sığır hücresinde hücreye zarar veren apoptotik ya da oksidatif stresle ilgili yolların azalması, Treg hücrelerin hücre korunmasını, virusun daha zor hücreye girişi, replikasyonu da öncelikle hücreden hücreye yolu ile gerçekleşebilen ve konakçı faktörlerini kullanılamaması durumu gözlemlendi. Bu çalışma, sığır hücrelerinde KKKAV duyarlılığı ve replikasyon paternlerine ilgili olarak yapılan ilk araştırma olması yanında insan ve hayvan hücre duyarlılığının karşılaştırmasının microarray teknolojisi ile sorgulandığı ilk rapordur. Elde ettiğimiz aday miRNA'lar hem virusun konak sistemler üzerindeki etkisini anlamaya yardımcı oldular hem de ileri araştırmalar için potansiyel hedefler olarak belirlendiler.

**Anahtar Sözcükler:** in vitro karakterizasyon, Kırım-Kongo Kanamalı Ateş Virus, miRNA, microarray, yolk analizi.

## SUMMARY

### **MicroRNA pathways related key protein expressions of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus infected human and animal cell cultures**

Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus (CCHFV) is a tick related deadly zoonotic disease with severe clinical manifestation in human, but does not produce symptomatic disease in wild or domestic animals. The factors responsible for the different consequences are not yet known. Since it is known that CCHFV is susceptible to the kidney tissue and cattle plays an important role as host in the natural cycle of the virus, we evaluated our tests in human and bovine immortal and primary kidney and adrenal gland lines. In vitro and microarray tests showed similar results in human and bovine cells; viral pathogenesis of viral infection has different affect in human and bovine by antiviral immune response, apoptotic pathways, platelet and neurological pathways. Viral replication related pathways are also different in human and bovine cells; Both entry / transition pathways and pathways that affect cell-to-cell spread are different. Human and bovine host transcription related factors induced differently in virus infected cells as well. All these pathways cause cell damage in the human cell, facilitate the entry / passage of the virus, and during their replication the virus synchronizes with the host cell differentiation. Conversely, we concluded the decrease in cell-damaging apoptotic or oxidative stress-related pathways in the bovine cell, furthermore the cell is protected by Treg cells. Moreover, the virus entry is more difficult, and the virus spread through cell to cell and the virus is not recruiting host factors. This is the first report of CCHFV susceptibility and replication patterns in bovine cells and the first microarray report to compare human and animal viral susceptibility. The candidate miRNAs we have obtained have helped to understand more both the virus-host interaction and can be used in further research.

**Keywords:** Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus, in vitro characterization, miRNA, microarray, pathway analysis.

## KAYNAKLAR

- AKİNCİ E, BODUR H, LEBLEBİCİOĞLU H (2013). Pathogenesis of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)* **13**(7): 429–37.
- AKINCI E, YILMAZ M, BODUR H, ONGÜRÜ P, BAYAZİT FN, ERBAY A, OZET G. (2009). Analysis of lymphocyte subgroups in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *International Journal of Infectious Diseases* **13**(5): 560–63.
- ALİGHOLİPOUR FT, FÖLDES K, HANİFEHNEZHAD A, YENER İLCE B, BİLGE DAGALP S, AMİRZADEH KHİABANİ N, ERGÜNAY K, ALKAN F, KARAOĞLU T, BODUR H, OZKUL A: (2019a). Bovine Herpesvirus Type 4 (BoHV-4) Vector Delivering Nucleocapsid Protein of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Induces Comparable Protective Immunity against Lethal Challenge in IFN $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ R $^{-/-}$  Mice Models. *Viruses* **11**(3).
- ALİGHOLİPOUR FARZANİ T, HANİFEHNEZHAD A, FÖLDES K; ERGÜNAY K; YILMAZ E; HASHİM MOHAMED ALİ H; OZKUL A (2019b). Co-Delivery Effect of CD24 on the Immunogenicity and Lethal Challenge Protection of a DNA Vector Expressing Nucleocapsid Protein of Crimean Congo Hemorrhagic Fever Virus. *Viruses* **11**(1).
- ALİGHOLİPOUR FARZANİ T, FÖLDES K, ERGÜNAY K, GURDAL H, BASTUĞ A, OZKUL A. (2019c). Immunological Analysis of a CCHFV MRNA Vaccine Candidate in Mouse Models. *Vaccines* **7**(3): 115.
- ALLES J.; FEHLMANN T, FİSCHER U, BACKES C, GALATA V, MİNET M, HART M, ABU-HALİMA M, GRÄSSER FA, LENHOF HP (2019). An estimate of the total number of true human miRNAs. *Nucleic Acids Research* **47**(7): 3353–64.
- ANAGNOSTOU V, PAPA A (2009). Evolution of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever virus. *Infection, Genetics and Evolution* **9**(5): 948–54..
- ANDERSSON I, BLADH L, MOUSAVİ-JAZİ M, MAGNUSSON KE, LUNDKVİST A, HALLER O, MİRİZİMİ A (2004). Human MxA Protein Inhibits the Replication of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. *Journal of virology* **78**(8): 4323–29.
- ANDERSSON, İDA, MELİNDA SİMON, LUNDKVİST Å, NİLSSON M, HOLMSTRÖM A, ELGH F, MİRİZİMİ A (2004). Role of actin filaments in targeting of Crimean Congo hemorrhagic fever virus nucleocapsid protein to perinuclear regions of mammalian cells. *Journal of Medical Virology* **72**(1): 83–93.
- ANDERSSON İ, KARLBERG H, MOUSAVİ-JAZİ M, MARTÍNEZ-SOBRİDO L, WEBER F, MİRİZİMİ A (2008). Crimean-Congo hemorrhagic fever virus delays activation of the innate immune response. *Journal of Medical Virology* **80**(8): 1397–1404.
- ANGAJİ SA HEDAYATİ SS, POOR RH, MADANİ S, POOR SS, PANAHI S (2010). Application of RNA Interference in Treating Human Diseases. *Journal of genetics* **89**(4): 527–37.
- APARİCİO O, CARNERO E, ABAD X, RAZQUİN N, GURUCEAGA E, SEGURA V, FORTES P, ADENOVİRUS VA (2010). Adenovirus VA RNA-Derived MiRNAs Target Cellular Genes Involved in Cell Growth, Gene Expression and DNA Repair”. *Nucleic acids research* **38**(3): 750–63.
- ARDALAN MR, R SHANE T, SADEGH C, MOHAMMADALI MS (2006). Crimean–Congo haemorrhagic fever presenting as thrombotic microangiopathy and acute renal failure. *Nephrology Dialysis Transplantation* **21**(8): 2304–7.
- ARSLAN S, AYNUR E (2012). Relationship between NF- $\kappa$ B1 and NF- $\kappa$ BIA genetic polymorphisms and Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* **44**(2): 138–43

- ARSLAN S, ENGİN A, AYDEMİR EI, SAHİN NO, BAYYURT B, SARİ I, COSGUN Y, BAKİR M (2019b). Identification of potential microRNA markers related to Crimean-Congo hemorrhagic fever disease. *Journal of Cellular Biochemistry* **120**(9): 15506–17.
- ARSLAN S, ENGİN A, AYDEMİR EI, SAHİN NO, BAYYURT B, SARİ I, COSGUN Y, BAKİR M (2019b). Identification of potential microRNA markers related to Crimean-Congo hemorrhagic fever disease. *Journal of Cellular Biochemistry* **120**(9): 15506–17.
- ARSLAN S, AYNUR E, NİL Ö, MEHMET B (2015). Toll-like receptor 7 Gln11Leu, c.4-151A/G, and +1817G/T polymorphisms in Crimean Congo hemorrhagic fever. *Journal of Medical Virology* **87**(7): 1090–95.
- ASHBURNER M, BALL CA, BLAKE JA, BOTSTEIN D, BUTLER H, CHERRY JM, DAVIS AP, DOLINSKI K, DWIGHT SS, EPPIG JT (2000). Gene Ontology: Tool for the Unification of Biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature genetics* **25**(1): 25–29.
- AYDİN H, GUVEN FMK, YILMAZ A, ENGİN A, SARİ I, BAKİR D (2013). Oxidative stress in the adult and pediatric patients with Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Journal of Vector Borne Diseases* **50**(4): 297–301.
- BAILEY M, CHRISTOFORIDOU Z, LEWIS MC (2013). The evolutionary basis for differences between the immune systems of man, mouse, pig and ruminants. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **152**(1–2): 13–19.
- BAKONYI T, LUSSY H, WEISSENBOCK H, HORNYÁK A, NOWOTNY N (2005). In vitro host-cell susceptibility to Usutu virus. *Emerging infectious diseases* **11**(2): 298–301.
- BARNWAL B, KARLBERG H, MİRAZİMİ A, TAN YJ (2016). The Non-Structural Protein of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Disrupts the Mitochondrial Membrane Potential and Induces Apoptosis. *The Journal of biological chemistry* **291**(2): 582–92.
- BARTOLINI B, GRUBER CE, KOOPMANS M, AVŠIČ T, BİNO S, CHRISTOVA I, GRUNOW R, HEWSON R, KORUKLUOĞLU G, LEMOS CM (2019). Laboratory Management of Crimean-Congo Haemorrhagic Fever Virus Infections: Perspectives from Two European Networks. *Euro surveillance: bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* **24**(5): 1800093.
- BECKER S, WANDEL E, WOBUS M, SCHNEIDER R, AMASHEH S, SITTIG D, KERNER C, NAUMANN R, HAMANN J, AUST G (2010). Overexpression of CD97 in intestinal epithelial cells of transgenic mice attenuates colitis by strengthening adherens junctions. *PLoS ONE* **5**(1).
- BENTE DA, ALIMONTI JB, SHIEH WJ, CAMUS G, STRÖHER U, ZAKI S, JONES SM (2010). “Pathogenesis and immune response of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in a STAT-1 knockout mouse model”. *Journal of virology* **84**(21): 11089–100.
- BENTE DA, FORRESTER NL, WATTS DM, MCAULEY AJ, WHITEHOUSE CA, BRAY M (2013). Crimean-Congo hemorrhagic fever: History, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity. *Antiviral Research* **100**(1): 159–89.
- BERECZKY S, LINDEGREN G, KARLBERG H, ÅKERSTROM S, KLINGSTROM J, MİRAZİMİ A (2010). Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Infection Is Lethal for Adult Type I Interferon Receptor-Knockout Mice. *The Journal of general virology* **91**(Pt 6): 1473–77.
- BERGERON E, ALBARIÑO CG, KHRISTOVA ML, NICHOL ST (2010). Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus-Encoded Ovarian Tumor Protease Activity Is Dispensable for Virus RNA Polymerase Function. *Journal of virology* **84**(1): 216–26.
- BERNIER A, SAGAN SM (2018). The Diverse Roles of MicroRNAs at the Host-Virus Interface. *Viruses* **10**(8): 440.
- BERTOLOTI-CIARLET A, SMITH J, STRECKER K, PARAGAS J, ALTAMURA LA, MCFALLS JM, FRÍAS-STÄHELİ N, GARCÍA-SASTRE A, SCHMALJOHN CS, DOMS RW

- (2005). Cellular Localization and Antigenic Characterization of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Glycoproteins. *Journal of virology* **79**(10): 6152–61.
- BHATTACHARJEE PS, NAYLOR CJ, JONES RC (1994). A simple method for immunofluorescence staining of tracheal organ cultures for the rapid identification of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* **23**:471–480.
- BODUR H, AKINCI E, ÖNGÜRÜ P, UYAR Y, BAŞTÜRK B, GÖZEL MG, KAYAASLAN BÜ. (2010). Evidence of vascular endothelial damage in Crimean-Congo hemorrhagic fever”. *International Journal of Infectious Diseases* **14**(8): e704–7.
- BOHUSH A, NIEWIADOMSKA G, FİLİPEK A (2018). Role of Mitogen Activated Protein Kinase Signaling in Parkinson’s Disease. *International journal of molecular sciences* **19**(10): 2973.
- BOLÍVAR S, ANFOSSI R, HUMERES C, VIVAR R, BOZA P, MUÑOZ C, PARDO-JIMENEZ V, OLÍVARES-SILVA F, DÍAZ-ARAYA G (2018). IFN- $\beta$  Plays Both Pro- and Anti-inflammatory Roles in the Rat Cardiac Fibroblast Through Differential STAT Protein Activation. *Frontiers in Pharmacology* **9**: 1368.
- DE BONDT M, HELLINGS N, OPDENAKKER G, STRUYF S (2020). Neutrophils: Underestimated Players in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis (MS). *International journal of molecular sciences* **21**(12): 4558.
- BRAY SJ (2006). Notch signalling: A simple pathway becomes complex. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**(9): 678–89.
- BRUSCELLA P, BOTTINÌ S, BAUDESSON C, PAWLITSKY JM, FERAY C, TRABUCCHI M (2017). Viruses and MiRNAs: More Friends than Foes. *Frontiers in microbiology* **8**: 824.
- BURT FJ, SWANEPOEL R, SHIEH WJ, SMITH JF, LEMAN PA, GREER PW, COFFIELD LM, ROLLIN PE, KSIĄZEK TG, PETERS CJ (1997). Immunohistochemical and in Situ Localization of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever (CCHF) Virus in Human Tissues and Implications for CCHF Pathogenesis. *Archives of pathology & laboratory medicine* **121**(8): 839–46.
- BURT FJ, SWANEPOEL R, BRAACK LE (1993). Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for the Detection of Antibody to Crimean-Congo Haemorrhagic Fever Virus in the Sera of Livestock and Wild Vertebrates. *Epidemiology and infection* **111**(3): 547–57.
- BÜYÜKTUNA SA, DOĞAN HO, BAKİR M, ELALDI N, GÖZEL MG, ENGİN A (2018). The protective effect and diagnostic performance of nox-5 in Crimean–Congo haemorrhagic fever patients. *Journal of Medical Microbiology* **67**(4): 543–48.
- CARRERA J, SANTIAGO FE (2012). Computational design of host transcription-factors sets whose misregulation mimics the transcriptomic effect of viral infections. *Scientific Reports* **2**(1): 1006.
- CATANÌ L, GUGLIOTTA L, CASCIONE ML, BELMONTE MM VIANELLI N, BELARDINELLI AR, TURA S (1991). Platelet function and interferon alpha-2a treatment in essential thrombocythaemia. *European Journal of Haematology* **46**(3): 158–62.
- CAUSEY OR, KEMP GE, MADBOULY MH, DAVID-WEST TS (1970). Congo Virus from Domestic Livestock, African Hedgehog, and Arthropods in Nigeria. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **19**(5): 846–50.
- CEPPI M, PEREIRA PM, DUNAND-SAUTHIER I, BARRAS E, REITH W, SANTOS MA, PIERRE P (2009). MicroRNA-155 Modulates the Interleukin-1 Signaling Pathway in Activated Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**(8): 2735–40.
- CEVİK MA, ERBAY A, BODUR H, GULDEREN E, BASTUG A, KUBAR A, AKINCI E (2008). Clinical and Laboratory Features of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever: Predictors of Fatality. *International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International*

*Society for Infectious Diseases* **12**(4): 374–79.

- CHANG K, BAGIŃSKI J, HASSAN SF, VOLIN M, SHUKLA D, TIWARI, V (2016). Filopodia and Viruses: An Analysis of Membrane Processes in Entry Mechanisms. *Frontiers in microbiology* **7**: 300.
- CHEN K, RAJEWSKY N (2007). The Evolution of Gene Regulation by Transcription Factors and MicroRNAs. *Nature reviews. Genetics* **8**(2): 93–103.
- CHEN Y, XIAOWEI W (2019). miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Research* **48**(D1): D127–31.
- CHENG CC, YANG CF, LO YP, CHIANG YH, SOFIYATUN E, WANG LC, CHEN WJ (2020). Cell-to-Cell Spread of Dengue Viral RNA in Mosquito Cells ed. Himanshu Garg. *BioMed Research International* 2020: 2452409.
- COBO F (2016). Viruses Causing Hemorrhagic Fever. Safety Laboratory Procedures. *The open virology journal* **10**: 1–9.
- CONNOLLY-ANDERSEN AM, MOLL G, ANDERSSON C, AKERSTRÖM S, KARLBERG H, DOUAGI I, MIRAZIMI A (2011). Crimean-Congo hemorrhagic fever virus activates endothelial cells. *Journal of virology* **85**(15): 7766–74.
- CONNOLLY ANDERSEN AM, IYADH D, ANNETTE AK, MIRAZIMI A (2009). Crimean Congo Hemorrhagic Fever Virus Infects Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Virology* **390**(2): 157–62.
- CONNOLLY-ANDERSEN AM, MAGNUSSON KE, MIRAZIMI A (2007). Basolateral entry and release of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in polarized MDCK-1 cells. *Journal of virology* **81**(5): 2158–64.
- CONSORTIUM GENE ONTOLOGY (2006). The Gene Ontology (GO) Project in 2006. *Nucleic acids research* 34(Database issue): D322–26.
- COUTINHO LL, MATUKUMALLI LK, SONSTEGARD TS, VAN TASSELL CP, GASBARRE LC, CAPUCO AV, SMITH TP (2007). Discovery and Profiling of Bovine MicroRNAs from Immune-Related and Embryonic Tissues. *Physiological genomics* **29**(1): 35–43.
- DEMİR ZC, BASTUG A, BODUR H, ERGUNAY K, OZKUL A (2017). MicroRNA expression profiles in patients with acute Crimean Congo hemorrhagic fever reveal possible adjustments to cellular pathways. *Journal of Medical Virology* **89**(3): 417–22.
- DEVECİ K, UYSAL EB, KAYA A, SANCAKDAR E, ALKAN F (2013). Evaluation of Renal Involvement in Children with Crimean-Congo Hemorrhagic Fever. *Japanese Journal of Infectious Diseases* **66**(6): 493–96.
- DOWALL SD, GRAHAM VA, RAYNER E, HUNTER L, WATSON R, TAYLOR I, RULE A, CARROLL MW, HEWSON R, (2016). Protective effects of a Modified Vaccinia Ankara-based vaccine candidate against Crimean-Congo Haemorrhagic Fever virus require both cellular and humoral responses. *PLOS ONE* **11**(6): e0156637.
- DOWALL SD, CARROLL MW, HEWSON R (2017). Development of Vaccines against Crimean-Congo Haemorrhagic Fever Virus. *Vaccine* **35**(44): 6015–23.
- DUH D, SAKSIDA A, PETROVEC M, AHMETI S, DEDUSHAJ I, PANNING M, DROSTEN C, AVSIC-ZUPANC T (2007). Viral load as predictor of Crimean-Congo hemorrhagic fever outcome. *Emerging infectious diseases* **13**(11): 1769–72.
- EKİZ F, GÜRBÜZ Y, BAŞAR Ö, AYTEKİN G, EKİZ Ö, ŞENTÜRK GÇ, AKTAŞ B, YILMAZ B, ALTINBAŞ A, ÇOBAN S, (2013). Mean platelet volume in the diagnosis and prognosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* **19**(4): 441–44.

- ELLIOTT RM (2014). Orthobunyaviruses: recent genetic and structural insights. *Nature Reviews Microbiology* **12**: 673.
- EMOTO C, IWASAKI K (2006). Enzymatic characteristics of CYP3A5 and CYP3A4: A comparison of in vitro kinetic and drug-drug interaction patterns. *Xenobiotica* **36**(2–3): 219–33.
- Engin A Arslan S Kizildag S Oztürk H Elaldi N Dökmetas I Bakir M (2010). Toll-like receptor 8 and 9 polymorphisms in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Microbes and Infection* **12**(12): 1071–78.
- ENGİN A, AYDİN H, CİNAR Z, BUYUKTUNA SA, BAKİR M (2019). Apoptosis and its relation with clinical course in patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Journal of Medical Virology* **91**(8): 1385–93.
- RGÖNÜL Ö, ŞEREF C, EREN Ş, ÇELİKBAŞ A, BAYKAM N, DOKUZOĞUZ B, GÖNEN M, CAN F (2017). Cytokine response in crimean-congo hemorrhagic fever virus infection. *Journal of Medical Virology* **89**(10): 1707–13.
- ERGONUL O, BATTAL I (2014). Potential Sexual Transmission of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Infection. *Japanese Journal of Infectious Diseases* **67**(2): 137–38.
- ESTRADA DF, DE GUZMAN RN (2011). Structural Characterization of the Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Gn Tail Provides Insight into Virus Assembly. *The Journal of biological chemistry* **286**(24): 21678–86.
- FABIÁN MR, SONENBERG N (2012). The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nature Structural & Molecular Biology* **19**(6): 586–93.
- FABREGAT A, SIDIROPOULOS K, GARAPATİ P, GILLESPIE M, HAUSMANN K, HAW R, JASSAL B, JUPE S, KORNİNGER F, MCKAY S (2016). The Reactome Pathway Knowledgebase. *Nucleic acids research* **44**(D1): D481–7.
- FU Q, SHİ H, Nİ W, SHİ M, MENG L, ZHANG H, REN Y, GUO F, WANG P, QİAO J (2015). Lentivirus-mediated Bos taurus bta-miR-29b overexpression interferes with bovine viral diarrhoea virus replication and viral infection-related autophagy by directly targeting ATG14 and ATG9A in Madin – Darby bovine kidney cells. *J Gen Virol* **96**: 85–94.
- FU Z, TİNDALL DJ (2008). FOXOs, Cancer and Regulation of Apoptosis. *Oncogene* **27**(16): 2312–19.
- GARGİLİ A, ESTRADA-PEÑA A, SPENGLER JR, LUKASHEV A, NUTTALL PA, BENTE DA (2017). The Role of Ticks in the Maintenance and Transmission of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus: A Review of Published Field and Laboratory Studies. *Antiviral research* **144**: 93–119.
- GARRISON RA, SMİTH RD, GOLDEN WJ (2019). Animal Models for Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Human Disease. *Viruses* **11**(7).
- GEİSBERT TW, JAHRLİNG PB (2004). Exotic Emerging Viral Diseases: Progress and Challenges. *Nature medicine* **10**(12 Suppl): S110–21.
- GRİMSON A, FARH KKH, JOHNSTON WK, GARRETT-ENGELE P, LİM LP, BARTEL DP (2007). MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing. *Molecular cell* **27**(1): 91–105.
- ZHİLİANG GU, ELESWARAPU S, JİANG H (2007). Identification and characterization of microRNAs from the bovine adipose tissue and mammary gland. *FEBS Letters* **581**(5): 981–88.
- HABJAN M, ANDERSSON I, KLİNGSTRÖM J, SCHÜMANN M, MARTİN A, ZİMMERMANN P, WAGNER V, PİCHLMAİR A, SCHNEİDER U, MÜHLBERGER E (2008). Processing of Genome 5' Termini as a Strategy of Negative-Strand RNA Viruses to Avoid RIG-I-Dependent Interferon Induction. *PloS one* **3**(4): e2032–e2032.

- HADDOCK E, FELDMANN F, HAWMAN DW, ŽIVCEC M, HANLEY PW, SATURDAY G, SCOTT DP, THOMAS T, KORVA M, AVŠIČ -ŽUPANC T (2018). A cynomolgus macaque model for Crimean–Congo haemorrhagic fever. *Nature Microbiology* **3**(5): 556–62.
- HAGA RB, RIDLEY AJ (2016). Rho GTPases: Regulation and Roles in Cancer Cell Biology. *Small GTPases* **7**(4): 207–21.
- HAWMAN DW, FELDMANN H (2018). Recent Advances in Understanding Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. *F1000Research* **7**: F1000 Faculty Rev-1715.
- HAYWARD SD (2004). Viral interactions with the Notch pathway. *Seminars in Cancer Biology* **14**(5): 387–96.
- HÖLZER M, KRÄHLING V, AMMAN F, BARTH E, BERNHART SH, CARMELO VAO, COLLATZ M, DOOSE G, EGGENHOFER F, EWALD J (2016). Differential transcriptional responses to Ebola and Marburg virus infection in bat and human cells. *Scientific reports* **6**: 34589.
- HONIG JE, OSBORNE JC, NICHOL ST (2004). Crimean–Congo hemorrhagic fever virus genome L RNA segment and encoded protein. *Virology* **321**(1): 29–35.
- HOVER S, KING B, HALL B, LOUNDRAS EA, TAQI H, DALY J, DALLAS M, PEERS C, SCHNETTLER E, MCKIMMIE C (2016). Modulation of Potassium Channels Inhibits Bunyavirus Infection. *The Journal of biological chemistry* **291**(7): 3411–22.
- HOVER S, FOSTER B, FONTANA J, KOHL A, GOLDSTEIN SAN (2018). Bunyavirus requirement for endosomal K<sup>+</sup> reveals new roles of cellular ion channels during infection. *PLOS Pathogens* **14**(1): e1006845.
- HOVER S, FOSTER B, BARR JN, MANKOURI J (2017). Viral dependence on cellular ion channels – an emerging antiviral target? *Journal of General Virology* **98**(3): 345–51.
- HRCKULAK D, JANECKOVA L, LANIKOVA L, KRIZ V, HORAZNA M, BABOSOVA O, VOJTECHOVA M, GALUSKOVA K, SLONCOVA E, KORINEK V (2018). Wnt Effector TCF4 Is Dispensable for Wnt Signaling in Human Cancer Cells. *Genes* **9**(9): 439.
- IRUSTA PM, CHEN YB, HARDWICK JM (2003). Viral Modulators of Cell Death Provide New Links to Old Pathways. *Current opinion in cell biology* **15**(6): 700–705.
- ITO T, ALLEN RM, CARSON WF 4TH, SCHALLER M, CAVASSANI KA, HOGABOAM CM, LUKACS NW, MATSUKAWA A, KUNKEL SL (2011). The Critical Role of Notch Ligand Delta-like 1 in the Pathogenesis of Influenza A Virus (H1N1) Infection. *PLoS pathogens* **7**(11): e1002341–e1002341.
- IWASAKI A (2012). A Virological View of Innate Immune Recognition. *Annual review of microbiology* **66**: 177–96.
- JACKSON KJL, KIDD MJ, WANG Y, COLLINS AM (2013). The Shape of the Lymphocyte Receptor Repertoire: Lessons from the B Cell Receptor. *Frontiers in immunology* **4**: 263.
- JANSSE HLA, REESINK HW, LAWITZ EJ, ZEUZEM S, RODRIGUEZ-TORRES M, PATEL K, VAN DER MEER AJ, PATICK AK, CHEN A, ZHOU Y (2013). Treatment of HCV Infection by Targeting MicroRNA. *The New England journal of medicine* **368**(18): 1685–94.
- JEEVA S, CHENG E, GANAIE SS, A MIR M (2017). Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Nucleocapsid Protein Augments MRNA Translation. *Journal of virology* **91**(15): e00636-17.
- JIANG H, KANGZHEN YU, KAPCZYNSKI DR (2013). Transcription factor regulation and cytokine expression following in vitro infection of primary chicken cell culture with low pathogenic avian influenza virus. *Virology Journal* **10**(1): 342.
- JUN HS, LEE YM, CHEUNG YY, MCDERMOTT DH, MURPHY PM, DE RA,VIN SS, MANSFIELD BC, CHOU JY (2010). Lack of Glucose Recycling between Endoplasmic

- Reticulum and Cytoplasm Underlies Cellular Dysfunction in Glucose-6-Phosphatase-Beta-Deficient Neutrophils in a Congenital Neutropenia Syndrome. *Blood* **116**(15): 2783–92.
- KAIŃA B (2003). DNA damage-triggered apoptosis: critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signaling. *Biochemical Pharmacology* **66**(8): 1547–54.
- KALAMVOKI M, ROIZMAN B (2011). The Histone Acetyltransferase CLOCK Is an Essential Component of the Herpes Simplex Virus 1 Transcriptome That Includes TFIID, ICP4, ICP27, and ICP22. *Journal of virology* **85**(18): 9472–77.
- KARLBERG H, TAN YJ, MİRAZİMİ A (2011). Induction of Caspase Activation and Cleavage of the Viral Nucleocapsid Protein in Different Cell Types during Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Infection. *The Journal of biological chemistry* **286**(5): 3227–34.
- KARLBERG H, TAN YJ, MİRAZİMİ A (2015). Crimean–Congo haemorrhagic fever replication interplays with regulation mechanisms of apoptosis. *Journal of General Virology* **96**(3): 538–46.
- KASHIWABA S, KİTAHASHİ K, WATANABE T, ONODA F, OHTSU M, MURAKAMI Y (2010). The mammalian INO80 complex is recruited to DNA damage sites in an ARP8 dependent manner. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **402**(4): 619–25.
- KASİMANİCKAM V, KASTELIĆ J (2016). Circulating Cell-Free Mature MicroRNAs and Their Target Gene Prediction in Bovine Metritis. *Scientific reports* **6**: 29509.
- KAVAK N, GÜRBÜZ Y (2019). Factors affecting mortality in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Journal of Surgery and Medicine* **3**(6): 428–32.
- KHAZAEİ Z, DARVİSHİ I, AMİRİ M, SOHRABİVAFA M, KAMRAN S (2018). Crimean Congo hemorrhagic fever: a brief report regarding kidney involvement. *Journal of Renal Injury Prevention* **7**(3): 129–31.
- KİMELMAN D, XU W (2006).  $\beta$ -Catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene* **25**(57): 7482–91.
- KOPİTAR-JERALA N (2017). The role of interferons in inflammation and inflammasome activation. *Frontiers in Immunology* **8**(JUL).
- KOŚCIĄNSKA E, STAREGA-ROSLAN J, KRZYZOSIAK WJ (2011). The Role of Dicer Protein Partners in the Processing of MicroRNA Precursors. *PloS one* **6**(12): e28548.
- KOZAK RA, FRASER RS, BİONDİ MJ, MAJER A, MEDİNA SJ, GRIFFİN BD, KOBASA D, STAPLETON PJ, URFANO C, BABUADZE G (2020). Dual RNA-Seq Characterization of Host and Pathogen Gene Expression in Liver Cells Infected with Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. *PLoS neglected tropical diseases* **14**(4): e0008105–e0008105.
- KRAMER MF (2011). Stem-loop RT-qPCR for miRNAs. *Current Protocols in Molecular Biology* (SUPPL. **95**): 1–22.
- KRIŁ I, HAVRYLYUK A, POTOMKIŃA H, CHOPYAK V (2020). Apoptosis and secondary necrosis of neutrophils and monocytes in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis: a cohort study. *Rheumatology International* **40**(9): 1449–54.
- LABRECQUE N, CERMAKIAN N (2015). Circadian Clocks in the Immune System. *Journal of biological rhythms* **30**(4): 277–90.
- LASKY JL, WU H (2005). Notch Signaling, Brain Development, and Human Disease. *Pediatric Research* **57**(5): 104R-109R.
- LAWLESS N, VEGH P, O'FARRELLY C, LYNN DJ (2014). The Role of microRNAs in Bovine Infection and Immunity. *Frontiers in Immunology* **5**: 611.
- DUY LT, ZHANG J, LIU L, LI J (2015). Ensemble Methods for MiRNA Target Prediction from

Expression Data. *PLOS ONE* **10**(6): e0131627.

- LEBLEBİCİOĞLU H, SUNBUL M, MEMİŞ Z, AL-TAWFİQ JA, BODUR H, OZKUL A, GUCUKOĞLU A, CHİNIKAR S, HASAN Z (2015). Consensus Report: Preventive Measures for Crimean-Congo Hemorrhagic Fever during Eid-Al-Adha Festival. *International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases* **38**: 9–15.
- LEBLEBİCİOĞLU H, OZARAS R, SUNBUL M (2017). Crimean-Congo hemorrhagic fever: A neglected infectious disease with potential nosocomial infection threat. *American Journal of Infection Control* **45**(7): 815–16.
- LEE RC, FEINBAUM RL, AMBROS V (1993). The C. Elegans Heterochronic Gene Lin-4 Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to Lin-14. *Cell* **75**(5): 843–54.
- LEE Y, KİM M, HAN J, YEOM KH, LEE S, BAEK SH, KİM VN (2004). MicroRNA Genes Are Transcribed by RNA Polymerase II. *The EMBO journal* **23**(20): 4051–60.
- LEI H, SCHMİDT-BLEEK K, DIENELT A, REİNKE P, VOLK HD (2015). Regulatory T Cell-Mediated Anti-Inflammatory Effects Promote Successful Tissue Repair in Both Indirect and Direct Manners. *Frontiers in pharmacology* **6**: 184.
- LEİSEGANG MS, MARTİN R, RAMÍREZ AS, BOHNSACK MT (2012). Exportin t and Exportin 5: TRNA and MiRNA Biogenesis - and Beyond. *Biological chemistry* **393**(7): 599–604.
- LEWANDOWSKA-SABAT AM, HANSEN SF, SOLBERG TR, ØSTERÅS O, HERİNGSTAD B, BOYSEN P, OLSAKER I (2018). MicroRNA expression profiles of bovine monocyte-derived macrophages infected in vitro with two strains of *Streptococcus agalactiae*. *BMC Genomics* **19**(1): 1–15.
- Lİ C, HU J, HAO J, ZHAO B, WU B, SUN L, PENG S, GAO GF, MENG S (2014). Competitive Virus and Host RNAs: The Interplay of a Hidden Virus and Host Interaction. *Protein & cell* **5**(5): 348–56.
- Lİ J, MAO L, Lİ W, HAO F, ZHONG C, ZHU X, Jİ X, YANG L, ZHANG W, LİU M (2018). Analysis of microRNAs Expression Profiles in Madin-Darby Bovine Kidney Cells Infected With Caprine Parainfluenza Virus Type 3. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **8**: 93.
- Lİ L, HAN DK, LU J (2010). Interferon-Alpha Induced Severe Thrombocytopenia: A Case Report and Review of the Literature. *World journal of gastroenterology* **16**(11): 1414–17.
- Lİ S (2019). Regulation of Ribosomal Proteins on Viral Infection. *Cells* **8**(5): 508.
- LİNDQUİST ME, ZENG X, ALTAMURA LA, DAYE SP, DELP KL, BLANCETT C, COFFİN KM, KOEHLER JW, COYNE S, SHOEMAKER CJ (2018). Exploring Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus-Induced Hepatic Injury Using Antibody-Mediated Type I Interferon Blockade in Mice. *Journal of virology* **92**(21): e01083-18.
- LİPS J, KAIŇA B (2001). DNA double-strand breaks trigger apoptosis in p53-deficient fibroblasts. *Carcinogenesis* **22**(4): 579–85.
- Lİ X., YANG H., HUANG H., ZHU T (2014). CELLCOUNTER: Novel Open-Source Software for Counting Cell Migration and Invasion In Vitro. *Biomed. Res. Int.* 2014:863564.
- LONG JS, GİOTİS ES, MONCORGÉ O, FRİSE R, MİSTRY B, JAMES J, MORİSSON M, IQBAL M, VİGNAL A, SKİNNER MA (2016). Species Difference in ANP32A Underlies Influenza A Virus Polymerase Host Restriction. *Nature* **529**(7584): 101–4.
- LÓPEZ-MONTERO N, CRİSTİNA R (2011). Self-protection and survival of arbovirus-infected mosquito cells. *Cellular Microbiology* **13**(2): 300–315.
- LUİS AD, HAYMAN DTS, O'SHEA TJ, CRYAN PM, GİLBERT AT, PULLİAM JRC, MİLLS JN,

- TIMONIN ME, WILLIS CKR (2013). A Comparison of Bats and Rodents as Reservoirs of Zoonotic Viruses: Are Bats Special? *Proceedings. Biological sciences* **280**(1756): 20122753.
- LUKASHEV AN, KLIMENTOV AS, SMIRNOVA SE, DZAGUROVA TK, DREXLER JF, GMYL AP (2016). Phylogeography of Crimean Congo Hemorrhagic Fever Virus. *PLOS ONE* **11**(11): e0166744.
- LYLES DS (2000). Cytopathogenesis and Inhibition of Host Gene Expression by RNA Viruses. *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR* **64**(4): 709–24.
- MAJERCIAK V, LU M, LI X, ZHENG ZM (2014). Attenuation of the Suppressive Activity of Cellular Splicing Factor SRSF3 by Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus ORF57 Protein Is Required for RNA Splicing. *RNA (New York, N.Y.)* **20**(11): 1747–58.
- MANCINI F, DI CONZA G, PELLEGRINO M, RINALDO C, PRODOSMO A, GIGLIO S, D'AGNANO I, FLORENZANO F, FELICIONI L, BUTTITA F (2009). MDM4 (MDMX) Localizes at the Mitochondria and Facilitates the P53-Mediated Intrinsic-Apoptotic Pathway. *The EMBO journal* **28**(13): 1926–39.
- MANCUSO E, TOMA L, POLCI A, D'ALESSIO SG, DI LUCA M, ORSINI M, DI DOMENICO M, MARCACCÌ M, MANCINI G, SPINA F (2019). Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Genome in Tick from Migratory Bird, Italy. *Emerging infectious diseases* **25**(7): 1418–20.
- MANDL JN, AHMED R, BARREIRO LB, DASZAK P, EPSTEIN JH, VIRGIN HW, FEINBERG MB (2015). Reservoir host immune responses to emerging zoonotic viruses. *Cell* **160**(1–2): 20–35.
- MANISCALCO WM, D'ANGIO CT (2006). VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR. Geoffrey J Laurent ve Steven D B T - Encyclopedia of Respiratory Medicine Shapiro. Oxford: Academic Press, 413–18.
- MAZZOCCOLI G, VINCIGUERRA M, CARBONE A, RELÓGIO A (2020). The Circadian Clock, the Immune System, and Viral Infections: The Intricate Relationship Between Biological Time and Host-Virus Interaction. *Pathogens (Basel, Switzerland)* **9**(2): 83.
- MEHRBOD P, ANDE SR, ALIZADEH J, RAHIMIZADEH S, SHARIATI A, MALEK H, HASHEMI M, GLOVER KKM, SHER AA, COOMBS KM (2019). The roles of apoptosis, autophagy and unfolded protein response in arbovirus, influenza virus, and HIV infections. *Virulence* **10**(1): 376–413.
- MÍ H, GUO N, KEJARIWAL A, THOMAS PD (20079). PANTHER Version 6: Protein Sequence and Function Evolution Data with Expanded Representation of Biological Pathways. *Nucleic acids research* **35**(Database issue): D247-52.
- MÍ H, THOMAS P (2009). PANTHER Pathway: An Ontology-Based Pathway Database Coupled with Data Analysis Tools. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **563**: 123–40.
- MOTHES W, SHERER NM, JIN J, ZHONG P (2010). Virus Cell-to-Cell Transmission. *Journal of virology* **84**(17): 8360–68.
- MOURYA DT, YADAV PD, SHETE AM, GURAV YK, RAUT CG, JADI RS, PAWAR SD, NICHOL ST, MISHRA AC (2012). Detection, Isolation and Confirmation of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Human, Ticks and Animals in Ahmadabad, India, 2010–2011. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **6**(5): e1653.
- NAITO T, USHIROGAWA H, FUKUSHIMA T, TANAKA Y, SAITO M (2019). EOS, an Ikaros family zinc finger transcription factor, interacts with the HTLV-1 oncoprotein Tax and is downregulated in peripheral blood mononuclear cells of HTLV-1-infected individuals, irrespective of clinical statuses. *Virology Journal* **16**(1): 160.
- NAKAMURA S, HORIE M, DAIDOJI T, HONDA T, YASUGI M, KUNO A, KOMORI T, OKUZAKI D, NARIMATSU H, NAKAYA T (2016). Influenza A Virus-Induced Expression of

- a GalNAc Transferase, GALNT3, via MicroRNAs Is Required for Enhanced Viral Replication ed. T S Dermody. *Journal of Virology* **90**(4): 1788 LP – 1801.
- NGUYEN TH, LIU X, SU ZZ, HSU ACY, FOSTER PS, YANG M (2018). Potential Role of MicroRNAs in the Regulation of Antiviral Responses to Influenza Infection. *Frontiers in immunology* **9**: 1541.
- NİNG S, PAGANO JS, BARBER GN (2011). IRF7: Activation, regulation, modification and function. *Genes and Immunity* **12**(6): 399–414.
- OZAN E, OZKUL A (2020). Investigation of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in ruminant species slaughtered in several endemic provinces in Turkey. *Arch Virol* **165**: 1759–1767.
- PAN MG, XIONG Y, CHEN F (2013). NFAT Gene Family in Inflammation and Cancer. *Current molecular medicine* **13**(4): 543–54.
- PAPP H, ZEGHBİB S, FÖLDES F, BANFAI K, MADAI M, KEMENESI G, URBÁN P, KVELL K, JAKAB F (2020). Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infection triggers the upregulation of the Wnt signaling pathway inhibitor genes. *Virus Genes*.
- PARAGAS J, WHITEHOUSE CA, ENDY TP, BRAY M (2004). A simple assay for determining antiviral activity against Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Antiviral Research* **62**(1): 21–25.
- Peyrefitte CN, Perret M, Garcia, S, Rodrigues R, Bagnaud A, Lacote S, Crance JM, Vernet G, Garin D, Bouloy M, Paranhos-Baccalà G (2010). Differential activation profiles of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus- and Dugbe virus-infected antigen-presenting cells. *Journal of General Virology* **91**(1): 189–98.
- POWELL MD, READ KA, SREEKUMAR BK, OESTREICH KJ (2019). Ikaros zinc finger transcription factors: Regulators of cytokine signaling pathways and CD4+ T helper cell differentiation. *Frontiers in Immunology* **10**(JUN): 5–7.
- PSHENICHNAYA NY, SYDENKO IS, KLİNOVAYA EP, ROMANOVA EB, ZHURAVLEV AS (2016). Possible sexual transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *International Journal of Infectious Diseases* **45**: 109–11.
- PUNCH EK, HOVER S, BLEST HTW, FULLER J, HEWSON R, FONTANA J, MANKOURI J, BARR JN (2018). Potassium is a trigger for conformational change in the fusion spike of an enveloped RNA virus. *Journal of Biological Chemistry* **293**(26): 9937–44.
- RAJEWSKY N (2006). MicroRNA Target Predictions in Animals. *Nature genetics* **38** Suppl: S8-13.
- RAMAKRISHNA S, SURESH B, BAEK KH (2011). The role of deubiquitinating enzymes in apoptosis. *Cellular and Molecular Life Sciences* **68**(1): 15–26.
- RAMÍREZ DE ARELLANO E, HERNÁNDEZ L, GOYANES MJ, ARSUAGA M, CRUZ AF, NEGREDO A, SÁNCHEZ-SECO MP (2017). Phylogenetic Characterization of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus, Spain. *Emerging infectious diseases* **23**(12): 2078–80.
- VAN DER REE MH, DE VREE JM, STELMA F, WILLEMSE S, VAN DER VALK M, RIETDIJK S, MOLENKAMP R., SCHINKEL J, VAN NUENEN AC, BEUERS U, HADI S, HARBERS M, VAN DER VEER E, LIU K, GRUNDY J, PATICK A.K, PAVLÍČEK A, BLEM J, HUANG M, GRİNT P, NEBEN S, GIBSON NW, KOOTSTRA NA, REESINK HW (2017). Safety, Tolerability, and Antiviral Effect of RG-101 in Patients with Chronic Hepatitis C: A Phase 1B, Double-Blind, Randomised Controlled Trial. *Lancet (London, England)* **389**(10070): 709–17.
- RIZZARDI AE, JOHNSON AT, VOGEL RI, PAMBUCCIAN SE, HENRIKSEN J, SKUBITZ AP, METZGER GJ, SCHMECHEL SC (2012). Quantitative comparison of immunohistochemical staining measured by digital image analysis versus pathologist visual scoring. *Diagn. Pathol.* **7**:42.
- RODRIGUES R, PARANHOS-BACCALÀ G, VERNET G, PEYREFITTE CN (2012). Crimean-

Congo Hemorrhagic Fever Virus-Infected Hepatocytes Induce ER-Stress and Apoptosis Crosstalk. *PLOS ONE* **7**(1): e29712.

- ROUSE BT, SEHRAWAT S (2010). Immunity and Immunopathology to Viruses: What Decides the Outcome? *Nature reviews. Immunology* **10**(7): 514–26.
- SAKSIDA A, DUH D, WRABER B, DEDUSHAJ I, AHMETI S, AVSIC-ZUPANC T (2010). Interacting roles of immune mechanisms and viral load in the pathogenesis of crimean-congo hemorrhagic fever. *Clinical and vaccine immunology : CVI* **17**(7): 1086–93.
- SANCHEZ AJ, VINCENT MJ, ERICKSON BR, NICHOL ST (2006). Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Glycoprotein Precursor Is Cleaved by Furin-like and SKI-1 Proteases to Generate a Novel 38-Kilodalton Glycoprotein. *Journal of virology* **80**(1): 514–25.
- SANCHEZ AJ, VINCENT MJ, NICHOL ST (2002). Characterization of the Glycoproteins of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. *Journal of virology* **76**(14): 7263–75.
- SCHEEL TKH, MOORE MJ, LUNA JM, NISHIUCHI E, FAK J, DARNELL RB, RICE CM (2017). Global mapping of miRNA-target interactions in cattle (*Bos taurus*). *Scientific Reports* **7**(1): 8190.
- SCHLEGELBERGER B, HELLER PG (2017). RUNX1 deficiency (familial platelet disorder with predisposition to myeloid leukemia, FPDMM). *Seminars in Hematology* **54**(2): 75–80.
- SCHOUNTZ T, BAKER ML, BUTLER J, MUNSTER V (2017). Immunological Control of Viral Infections in Bats and the Emergence of Viruses Highly Pathogenic to Humans. *Frontiers in immunology* **8**: 1098.
- SHEPHERD AJ, SWANEPOEL R, LEMAN PA (1989). Antibody Response in Crimean-Congo Hemorrhagic Fever. *Reviews of Infectious Diseases* **11**(Supplement\_4): S801–6.
- SHEPHERD AJ, SWANEPOEL R, SHEPHERD SP, LEMAN PA, MATHEE O (1991). Viraemic transmission of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus to ticks. *Epidemiol Infect.* 106(2).
- SHI W, HOU X, LI X, PENG H, SHI M, JIANG Q, LIU X, JI Y, YAO Y, HE C, LEI X (2013). Differential gene expressions of the MAPK signaling pathway in enterovirus 71-infected rhabdomyosarcoma cells. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* **17**(4): 410–17.
- SIGAL A, KIM JT, BALAZS AB, DEKEL E, MAYO A, MILO R, BALTIMORE D (2011). Cell-to-cell spread of HIV permits ongoing replication despite antiretroviral therapy. *Nature* **477**: 95.
- SIMON M, JOHANSSON C, MIRAZIMI A (2009). Crimean-Congo hemorrhagic fever virus entry and replication is clathrin-, pH- and cholesterol-dependent. *Journal of General Virology* **90**(1): 210–15.
- SORVILLO TE, RODRIGUEZ SE, HUDSON P, CAREY M, RODRIGUEZ LL, SPIROPOULOU CF, BIRD BH, SPENGLER JR, BENTE DA (2020). Towards a Sustainable One Health Approach to Crimean–Congo Hemorrhagic Fever Prevention: Focus Areas and Gaps in Knowledge. *Tropical Medicine and Infectious Disease* **5**(3).
- SPENGLER JR, PATEL JR, CHAKRABARTI AK, ZIVCEC M, GARCÍA-SASTRE A, SPIROPOULOU CF, BERGERON É (2015). RIG-I Mediates an Antiviral Response to Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. *Journal of virology* **89**(20): 10219–29.
- SPENGLER JR, ESTRADA-PENÑA A, GARRISON AR, SCHMALJOHN C, SPIROPOULOU CF, BERGERON É, BENTE DA (2016). A Chronological Review of Experimental Infection Studies of the Role of Wild Animals and Livestock in the Maintenance and Transmission of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. *Antiviral research* **135**: 31–47.
- SPENGLER JR, KEATING MK, MCELROY AK, ZIVCEC M, COLEMAN-MCCRAY JD, HARMON JR, BOLLWEG BC, GOLDSMITH CS, BERGERON É, KECK JG, ZAKI SR, NICHOL ST, SPIROPOULOU CF (2017). Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Humanized Mice Reveals Glial Cells as Primary Targets of Neurological Infection. *The Journal of*

- Infectious Diseases* **216**(11): 1386–97.
- SPENGLER JR, BERGERON É, ROLLÍN PE (2016). Seroepidemiological Studies of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Domestic and Wild Animals. *PLoS neglected tropical diseases* **10**(1): e0004210–e0004210.
- SPENGLER JR, BERGERON É, SPIROPOULOU CF (2019). Crimean-Congo Hemorrhagic Fever and Expansion from Endemic Regions. *Current opinion in virology* **34**: 70–78.
- SPENGLER JR, ESTRADA-PENÑA A (2018). Host preferences support the prominent role of Hyalomma ticks in the ecology of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **12**(2): e0006248.
- STANFIELD RL, HAAKENSEN J, DEISS TC, CRISCITIELLO MF, WILSON IA, SMIDER VV (2018). The Unusual Genetics and Biochemistry of Bovine Immunoglobulins. *Advances in immunology* **137**: 135–64.
- STENFELDT C, ARZT J, SMOLIGA G, LAROCCO M, GUTKOSKA J, LAWRENCE P (2017). Proof-of-concept study: Profile of circulating microRNAs in Bovine serum harvested during acute and persistent FMDV infection. *Virology Journal* **14**(1): 1–18.
- STORKEBAUM E, CARMELIET P, (2004). VEGF: A Critical Player in Neurodegeneration. *The Journal of clinical investigation* **113**(1): 14–18.
- SWAMINATHAN G, MARTÍN-GARCÍA J, NAVAS-MARTÍN S (2013). RNA Viruses and MicroRNAs: Challenging Discoveries for the 21st Century. *Physiological genomics* **45**(22): 1035–48.
- SZEMIŁ AM, FAÏLLOUX AB, ELLIOTT RM (2012). Role of Bunyamwera Orthobunyavirus NSs Protein in Infection of Mosquito Cells. *PLoS neglected tropical diseases* **6**(9): e1823–e1823.
- TAKAHASHI K, HALFMANN P, OYAMA M, KOZUKA-HATA H, NODA T, KAWAOKA Y (2013). DNA Topoisomerase 1 Facilitates the Transcription and Replication of the Ebola Virus Genome. *Journal of virology* **87**(16): 8862–69.
- TİPIH T, BURT FJ (2020). Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus: Advances in Vaccine Development. *BioResearch open access* **9**(1): 137–50.
- VEİTH A, MOORTHY B (2018). ROLE OF CYTOCHROME P450S IN THE GENERATION AND METABOLISM OF REACTIVE OXYGEN SPECIES. *Current opinion in toxicology* **7**: 44–51.
- WANG Y, WANG Z (2020). Identification of dysregulated genes and pathways of different brain regions in Alzheimer's disease. *International Journal of Neuroscience* **130**(11): 1082–94.
- WARREN CJ, SAWYER SL (2019). How Host Genetics Dictates Successful Viral Zoonosis. *PLoS biology* **17**(4): e3000217–e3000217.
- WATANABE Y, TOMITA M, AKIO B T (2007). Computational Methods for MicroRNA Target Prediction. *MicroRNA Methods*, Academic Press, 65–86.
- WEBER F, MİRAZİMİ A (2008). Interferon and Cytokine Responses to Crimean Congo Hemorrhagic Fever Virus; an Emerging and Neglected Viral Zoonosis. *Cytokine & growth factor reviews* **19**(5–6): 395–404.
- WELCH SR, RITTER JM, MCELROY AK, HARMON JR, COLEMAN-MCCRAY JD, SCHOLTE FEM, KOBINGER GP, BERGERON É, ZAKI SR, NICHOL ST, SPENGLER JR, SPIROPOULOU CF (2019). Fluorescent Crimean-Congo hemorrhagic fever virus illuminates tissue tropism patterns and identifies early mononuclear phagocytic cell targets in IFNAR-/- mice. *PLOS Pathogens* **15**(12): e1008183.
- WITKOS TM, KOSCIANSKA E, KRZYŻOSIAK WJ (2011). Practical Aspects of MicroRNA Target Prediction. *Current molecular medicine* **11**(2): 93–109.

- WU N, GAO N, FAN D, WEI J, ZHANG J, AN J (2014). MiR-223 Inhibits Dengue Virus Replication by Negatively Regulating the Microtubule-Destabilizing Protein STMN1 in EAhy926 Cells. *Microbes and infection* **16**(11): 911–22.
- XIAO X, FENG Y, ZHU Z, DIMITROV DS (2011). Identification of a putative Crimean-Congo hemorrhagic fever virus entry factor. *Biochemical and biophysical research communications* **411**(2): 253–58.
- YADAV PD, PATIL DY, SHETE AM, KOKATE P, GOYAL P, JADHAV S, SINHA S, ZAWAR D, SHARMA SK, KAPIL A, SHARMA DK, UPADHYAY KJ, MOURYA DT (2016). Nosocomial Infection of CCHF among Health Care Workers in Rajasthan, India. *BMC infectious diseases* **16**(1): 624.
- YU M, FU Y, LIANG Y, SONG H, YAO Y, WU P, YAO YUWEI PAN Y, WEN X, MA L, HEXIGE S, DING Y, LUO S, LU B (2017). Suppression of MAPK11 or HIPK3 reduces mutant Huntingtin levels in Huntington's disease models. *Cell Research* **27**(12): 1441–65.
- ZAPATA JC, COX D, SALVATO MS (2014). The Role of Platelets in the Pathogenesis of Viral Hemorrhagic Fevers. *PLoS neglected tropical diseases* **8**(6): e2858–e2858.
- ZHANG BC, ZHANG J, SUN L (2014). In-Depth Profiling and Analysis of Host and Viral MicroRNAs in Japanese Flounder (Paralichthys Olivaceus) Infected with Megalocytivirus Reveal Involvement of MicroRNAs in Host-Virus Interaction in Teleost Fish. *BMC genomics* **15**: 878.
- ZHONG P, AGOSTO LM, MUNRO JB, MOTHES W (2013). Cell-to-Cell Transmission of Viruses. *Current opinion in virology* **3**(1): 44–50.
- ZHUANG X, RAMBHATLA SB, LAI AG, MCKEATING JA (2017). Interplay between Circadian Clock and Viral Infection. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* **95**(12): 1283–89.
- ZIVCEC M, SAFRONETZ D, SCOTT D, ROBERTSON S, EBIHARA H, FELDMANN H (2013). Lethal Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Infection in Interferon  $\alpha/\beta$  Receptor Knockout Mice Is Associated With High Viral Loads, Proinflammatory Responses, and Coagulopathy. *The Journal of Infectious Diseases* **207**(12): 1909–21.
- ZIVCEC M, METCALFE MG, ALBARIÑO CG, GUERRERO LW, PEGAN SD, SPIROPOULOU CF, BERGERON É (2015). Assessment of Inhibitors of Pathogenic Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Strains Using Virus-Like Particles. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **9**(12): e0004259.
- ZIVCEC M, SCHOLTE FE, SPIROPOULOU CF, SPENGLER JR, BERGERON É (2016). Molecular Insights into Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. *Viruses* **8**(4): 106.

## EKLER

**Ek-1** 384 hedefli miRNA primeri ve kontrol genlerin primerlerinden oluşan insan ve sığır miRBase profiller plakası.

| Pozisyon | Olgun insan miRNA ID | Olgun sığır miRNA ID |
|----------|----------------------|----------------------|
| A01      | hsa-miR-346          | bta-let-7f           |
| A02      | hsa-miR-196b-5p      | bta-miR-101          |
| A03      | hsa-miR-214-3p       | bta-miR-103          |
| A04      | hsa-miR-223-3p       | bta-miR-125a         |
| A05      | hsa-miR-643          | bta-miR-125b         |
| A06      | hsa-miR-608          | bta-miR-126-3p       |
| A07      | hsa-miR-376b-3p      | bta-miR-128          |
| A08      | hsa-miR-944          | bta-miR-145          |
| A09      | hsa-miR-211-5p       | bta-miR-148a         |
| A10      | hsa-miR-612          | bta-miR-151-3p       |
| A11      | hsa-miR-194-5p       | bta-miR-151-5p       |
| A12      | hsa-miR-411-5p       | bta-miR-16b          |
| A13      | hsa-miR-548c-3p      | bta-miR-181a         |
| A14      | hsa-miR-299-3p       | bta-miR-18a          |
| A15      | hsa-miR-523-3p       | bta-miR-18b          |
| A16      | hsa-miR-382-5p       | bta-miR-199a-5p      |
| A17      | hsa-miR-515-3p       | bta-miR-205          |
| A18      | hsa-miR-375          | bta-miR-20a          |
| A19      | hsa-miR-196a-5p      | bta-miR-21-5p        |
| A20      | hsa-miR-658          | bta-miR-221          |
| A21      | hsa-miR-106b-5p      | bta-miR-222          |
| A22      | hsa-miR-210-3p       | bta-miR-26a          |
| A23      | hsa-miR-511-5p       | bta-miR-26b          |
| A24      | hsa-miR-514a-3p      | bta-miR-27a-3p       |
| B01      | hsa-miR-659-3p       | bta-miR-27b          |

|     |                 |                |
|-----|-----------------|----------------|
| B02 | hsa-miR-597-5p  | bta-miR-29a    |
| B03 | hsa-miR-130a-3p | bta-miR-30b-5p |
| B04 | hsa-miR-652-3p  | bta-miR-30d    |
| B05 | hsa-miR-183-5p  | bta-miR-31     |
| B06 | hsa-miR-192-5p  | bta-miR-320a   |
| B07 | hsa-miR-30c-5p  | bta-miR-34b    |
| B08 | hsa-miR-421     | bta-miR-484    |
| B09 | hsa-miR-512-5p  | bta-miR-499    |
| B10 | hsa-miR-29c-3p  | bta-miR-99a-5p |
| B11 | hsa-miR-410-3p  | bta-let-7a-5p  |
| B12 | hsa-miR-938     | bta-let-7d     |
| B13 | hsa-miR-641     | bta-let-7g     |
| B14 | hsa-let-7i-5p   | bta-let-7i     |
| B15 | hsa-miR-628-3p  | bta-miR-17-5p  |
| B16 | hsa-miR-188-5p  | bta-miR-107    |
| B17 | hsa-miR-92a-3p  | bta-miR-10a    |
| B18 | hsa-miR-126-3p  | bta-miR-10b    |
| B19 | hsa-miR-181c-5p | bta-miR-122    |
| B20 | hsa-miR-30b-5p  | bta-miR-124b   |
| B21 | hsa-miR-370-3p  | bta-miR-127    |
| B22 | hsa-miR-301b-3p | bta-miR-132    |
| B23 | hsa-miR-340-5p  | bta-miR-138    |
| B24 | hsa-miR-15b-5p  | bta-miR-139    |
| C01 | hsa-miR-330-3p  | bta-miR-140    |
| C02 | hsa-miR-372-3p  | bta-miR-142-3p |
| C03 | hsa-miR-379-5p  | bta-miR-142-5p |
| C04 | hsa-miR-93-5p   | bta-miR-148b   |
| C05 | hsa-miR-10a-5p  | bta-miR-150    |
| C06 | hsa-miR-193b-3p | bta-miR-15b    |
| C07 | hsa-miR-651-5p  | bta-miR-17-3p  |
| C08 | hsa-miR-618     | bta-miR-17-5p  |
| C09 | hsa-miR-518a-3p | bta-miR-181b   |

|     |                 |                 |
|-----|-----------------|-----------------|
| C10 | hsa-miR-647     | bta-miR-181c    |
| C11 | hsa-miR-15a-5p  | bta-miR-186     |
| C12 | hsa-miR-564     | bta-miR-191     |
| C13 | hsa-miR-548d-3p | bta-miR-192     |
| C14 | hsa-miR-371a-3p | bta-miR-193a-3p |
| C15 | hsa-miR-190a-5p | bta-miR-193a-5p |
| C16 | hsa-miR-33a-5p  | bta-miR-199a-3p |
| C17 | hsa-miR-504-5p  | bta-miR-199b    |
| C18 | hsa-miR-18b-5p  | bta-miR-200a    |
| C19 | hsa-miR-506-3p  | bta-miR-200b    |
| C20 | hsa-miR-324-5p  | bta-miR-200c    |
| C21 | hsa-miR-215-5p  | bta-miR-20b     |
| C22 | hsa-miR-200c-3p | bta-miR-210     |
| C23 | hsa-miR-95-3p   | bta-miR-21-3p   |
| C24 | hsa-miR-376a-3p | bta-miR-214     |
| D01 | hsa-miR-29a-3p  | bta-miR-215     |
| D02 | hsa-miR-26b-5p  | bta-miR-218     |
| D03 | hsa-let-7a-5p   | bta-miR-22-5p   |
| D04 | hsa-miR-770-5p  | bta-miR-23a     |
| D05 | hsa-let-7g-5p   | bta-miR-23b-3p  |
| D06 | hsa-miR-25-3p   | bta-miR-24-3p   |
| D07 | hsa-miR-532-5p  | bta-miR-25      |
| D08 | hsa-miR-563     | bta-miR-29b     |
| D09 | hsa-miR-433-3p  | bta-miR-29c     |
| D10 | hsa-miR-144-3p  | bta-miR-30a-5p  |
| D11 | hsa-miR-501-5p  | bta-miR-30c     |
| D12 | hsa-miR-425-5p  | bta-miR-30e-5p  |
| D13 | hsa-miR-32-5p   | bta-miR-342     |
| D14 | hsa-miR-621     | bta-miR-345-5p  |
| D15 | hsa-miR-505-3p  | bta-miR-34c     |
| D16 | hsa-miR-633     | bta-miR-361     |
| D17 | hsa-miR-744-5p  | bta-miR-363     |

|     |                 |                |
|-----|-----------------|----------------|
| D18 | hsa-miR-26a-5p  | bta-miR-369-3p |
| D19 | hsa-miR-28-5p   | bta-miR-369-5p |
| D20 | hsa-miR-581     | bta-miR-380-3p |
| D21 | hsa-miR-10b-5p  | bta-miR-380-5p |
| D22 | hsa-miR-576-5p  | bta-miR-423-3p |
| D23 | hsa-miR-555     | bta-miR-425-3p |
| D24 | hsa-miR-605-5p  | bta-miR-425-5p |
| E01 | hsa-miR-520d-3p | bta-miR-450a   |
| E02 | hsa-miR-455-5p  | bta-miR-455-3p |
| E03 | hsa-miR-497-5p  | bta-miR-455-5p |
| E04 | hsa-miR-646     | bta-miR-487a   |
| E05 | hsa-miR-548b-3p | bta-miR-487b   |
| E06 | hsa-miR-24-3p   | bta-miR-532    |
| E07 | hsa-miR-522-3p  | bta-miR-545-3p |
| E08 | hsa-miR-575     | bta-miR-545-5p |
| E09 | hsa-miR-187-3p  | bta-miR-7      |
| E10 | hsa-miR-615-3p  | bta-miR-93     |
| E11 | hsa-miR-18a-5p  | bta-miR-98     |
| E12 | hsa-miR-222-3p  | bta-let-7a-3p  |
| E13 | hsa-miR-9-5p    | bta-let-7b     |
| E14 | hsa-miR-125b-5p | bta-let-7c     |
| E15 | hsa-miR-365b-3p | bta-let-7e     |
| E16 | hsa-miR-325     | bta-miR-126-5p |
| E17 | hsa-miR-184     | bta-miR-15a    |
| E18 | hsa-miR-660-5p  | bta-miR-195    |
| E19 | hsa-miR-148b-3p | bta-miR-19a    |
| E20 | hsa-let-7c-5p   | bta-miR-19b    |
| E21 | hsa-miR-542-3p  | bta-miR-204    |
| E22 | hsa-miR-558     | bta-miR-331-3p |
| E23 | hsa-miR-579-3p  | bta-miR-34a    |
| E24 | hsa-miR-595     | bta-miR-365-3p |
| F01 | hsa-miR-185-5p  | bta-miR-374a   |

|     |                 |                 |
|-----|-----------------|-----------------|
| F02 | hsa-miR-362-5p  | bta-miR-497     |
| F03 | hsa-miR-376c-3p | bta-miR-660     |
| F04 | hsa-miR-542-5p  | bta-miR-99b     |
| F05 | hsa-miR-155-5p  | bta-miR-1       |
| F06 | hsa-miR-200a-5p | bta-miR-100     |
| F07 | hsa-miR-648     | bta-miR-105a    |
| F08 | hsa-miR-206     | bta-miR-105b    |
| F09 | hsa-miR-363-3p  | bta-miR-106b    |
| F10 | hsa-miR-124-3p  | bta-miR-1179    |
| F11 | hsa-miR-148a-3p | bta-miR-1185    |
| F12 | hsa-miR-650     | bta-miR-1193    |
| F13 | hsa-miR-132-3p  | bta-miR-1197    |
| F14 | hsa-miR-559     | bta-miR-1224    |
| F15 | hsa-miR-369-5p  | bta-miR-1225-3p |
| F16 | hsa-miR-484     | bta-miR-1248    |
| F17 | hsa-miR-524-3p  | bta-miR-1249    |
| F18 | hsa-miR-616-5p  | bta-miR-1256    |
| F19 | hsa-miR-423-3p  | bta-miR-1271    |
| F20 | hsa-miR-556-5p  | bta-miR-1281    |
| F21 | hsa-miR-619-3p  | bta-miR-1282    |
| F22 | hsa-miR-424-5p  | bta-miR-1287    |
| F23 | hsa-miR-622     | bta-miR-129-5p  |
| F24 | hsa-miR-582-5p  | bta-miR-1291    |
| G01 | hsa-miR-549a    | bta-miR-129-3p  |
| G02 | hsa-miR-486-5p  | bta-miR-1296    |
| G03 | hsa-miR-302c-3p | bta-miR-1298    |
| G04 | hsa-miR-125a-5p | bta-miR-1301    |
| G05 | hsa-miR-20b-5p  | bta-miR-1306    |
| G06 | hsa-miR-630     | bta-miR-1307    |
| G07 | hsa-miR-525-3p  | bta-miR-130a    |
| G08 | hsa-miR-512-3p  | bta-miR-130b    |
| G09 | hsa-miR-384     | bta-miR-133b    |

|     |                 |              |
|-----|-----------------|--------------|
| G10 | hsa-miR-186-5p  | bta-miR-133b |
| G11 | hsa-miR-149-5p  | bta-miR-134  |
| G12 | hsa-miR-146b-5p | bta-miR-135a |
| G13 | hsa-miR-141-3p  | bta-miR-135b |
| G14 | hsa-miR-23b-3p  | bta-miR-136  |
| G15 | hsa-miR-487b-3p | bta-miR-137  |
| G16 | hsa-miR-422a    | bta-miR-141  |
| G17 | hsa-miR-635     | bta-miR-143  |
| G18 | hsa-miR-296-5p  | bta-miR-144  |
| G19 | hsa-miR-152-3p  | bta-miR-146a |
| G20 | hsa-miR-22-3p   | bta-miR-146b |
| G21 | hsa-miR-450a-5p | bta-miR-147  |
| G22 | hsa-miR-212-3p  | bta-miR-152  |
| G23 | hsa-miR-361-5p  | bta-miR-153  |
| G24 | hsa-miR-429     | bta-miR-154a |
| H01 | hsa-miR-23a-3p  | bta-miR-155  |
| H02 | hsa-miR-208a-3p | bta-miR-16a  |
| H03 | hsa-miR-485-3p  | bta-miR-181d |
| H04 | hsa-miR-487a-3p | bta-miR-182  |
| H05 | hsa-miR-19b-3p  | bta-miR-183  |
| H06 | hsa-miR-488-3p  | bta-miR-1835 |
| H07 | hsa-miR-449a    | bta-miR-1839 |
| H08 | hsa-miR-103a-3p | bta-miR-184  |
| H09 | hsa-miR-649     | bta-miR-185  |
| H10 | hsa-miR-96-5p   | bta-miR-187  |
| H11 | hsa-miR-203a-3p | bta-miR-188  |
| H12 | hsa-miR-142-3p  | bta-miR-190a |
| H13 | hsa-miR-639     | bta-miR-190b |
| H14 | hsa-miR-551a    | bta-miR-193b |
| H15 | hsa-miR-769-5p  | bta-miR-194  |
| H16 | hsa-miR-562     | bta-miR-196a |
| H17 | hsa-miR-657     | bta-miR-196b |

|     |                 |                |
|-----|-----------------|----------------|
| H18 | hsa-miR-624-5p  | bta-miR-197    |
| H19 | hsa-miR-610     | bta-miR-202    |
| H20 | hsa-miR-127-3p  | bta-miR-206    |
| H21 | hsa-miR-134-5p  | bta-miR-208a   |
| H22 | hsa-miR-412-3p  | bta-miR-208b   |
| H23 | hsa-let-7f-5p   | bta-miR-211    |
| H24 | hsa-miR-566     | bta-miR-212    |
| I01 | hsa-miR-492     | bta-miR-216a   |
| I02 | hsa-miR-122-5p  | bta-miR-216b   |
| I03 | hsa-miR-518b    | bta-miR-217    |
| I04 | hsa-miR-585-3p  | bta-miR-219-5p |
| I05 | hsa-miR-34a-5p  | bta-miR-223    |
| I06 | hsa-miR-502-5p  | bta-miR-224    |
| I07 | hsa-miR-452-5p  | bta-miR-24     |
| I08 | hsa-miR-508-3p  | bta-miR-28     |
| I09 | hsa-miR-607     | bta-miR-296-3p |
| I10 | hsa-miR-133b    | bta-miR-299    |
| I11 | hsa-miR-143-3p  | bta-miR-29d-3p |
| I12 | hsa-miR-766-3p  | bta-miR-29e    |
| I13 | hsa-miR-600     | bta-miR-301a   |
| I14 | hsa-miR-142-5p  | bta-miR-301b   |
| I15 | hsa-miR-202-3p  | bta-miR-302a   |
| I16 | hsa-miR-19a-3p  | bta-miR-302b   |
| I17 | hsa-miR-583     | bta-miR-302c   |
| I18 | hsa-miR-448     | bta-miR-302d   |
| I19 | hsa-miR-130b-3p | bta-miR-30f    |
| I20 | hsa-miR-128-3p  | bta-miR-32     |
| I21 | hsa-miR-454-3p  | bta-miR-323    |
| I22 | hsa-miR-524-5p  | bta-miR-324    |
| I23 | hsa-miR-182-5p  | bta-miR-326    |
| I24 | hsa-miR-495-3p  | bta-miR-328    |
| J01 | hsa-miR-335-5p  | bta-miR-329a   |

|     |                 |                |
|-----|-----------------|----------------|
| J02 | hsa-miR-135b-5p | bta-miR-329b   |
| J03 | hsa-miR-34c-5p  | bta-miR-330    |
| J04 | hsa-miR-1-3p    | bta-miR-335    |
| J05 | hsa-miR-662     | bta-miR-338    |
| J06 | hsa-miR-27a-3p  | bta-miR-339a   |
| J07 | hsa-miR-320a    | bta-miR-33a    |
| J08 | hsa-miR-942-5p  | bta-miR-33b    |
| J09 | hsa-miR-591     | bta-miR-340    |
| J10 | hsa-miR-16-5p   | bta-miR-346    |
| J11 | hsa-miR-100-5p  | bta-miR-362-5p |
| J12 | hsa-miR-626     | bta-miR-367    |
| J13 | hsa-miR-758-3p  | bta-miR-370    |
| J14 | hsa-let-7e-5p   | bta-miR-371    |
| J15 | hsa-miR-493-3p  | bta-miR-374b   |
| J16 | hsa-miR-374a-5p | bta-miR-375    |
| J17 | hsa-miR-129-5p  | bta-miR-376a   |
| J18 | hsa-miR-589-5p  | bta-miR-376b   |
| J19 | hsa-miR-518d-3p | bta-miR-376c   |
| J20 | hsa-miR-571     | bta-miR-376d   |
| J21 | hsa-miR-623     | bta-miR-377    |
| J22 | hsa-miR-338-3p  | bta-miR-378    |
| J23 | hsa-miR-138-5p  | bta-miR-379    |
| J24 | hsa-miR-27b-3p  | bta-miR-381    |
| K01 | hsa-miR-637     | bta-miR-382    |
| K02 | hsa-miR-383-5p  | bta-miR-383    |
| K03 | hsa-miR-195-5p  | bta-miR-409a   |
| K04 | hsa-miR-513a-5p | bta-miR-410    |
| K05 | hsa-miR-548a-5p | bta-miR-411a   |
| K06 | hsa-miR-519e-5p | bta-miR-412    |
| K07 | hsa-miR-362-3p  | bta-miR-421    |
| K08 | hsa-miR-342-3p  | bta-miR-429    |
| K09 | hsa-miR-587     | bta-miR-431    |

|     |                 |              |
|-----|-----------------|--------------|
| K10 | hsa-miR-331-3p  | bta-miR-432  |
| K11 | hsa-miR-877-5p  | bta-miR-433  |
| K12 | hsa-miR-329-3p  | bta-miR-448  |
| K13 | hsa-miR-140-3p  | bta-miR-449a |
| K14 | hsa-miR-590-5p  | bta-miR-449b |
| K15 | hsa-miR-548o-5p | bta-miR-449c |
| K16 | hsa-miR-135a-5p | bta-miR-451  |
| K17 | hsa-miR-501-3p  | bta-miR-452  |
| K18 | hsa-miR-219a-5p | bta-miR-453  |
| K19 | hsa-miR-378a-3p | bta-miR-454  |
| K20 | hsa-miR-139-5p  | bta-miR-483  |
| K21 | hsa-miR-935     | bta-miR-485  |
| K22 | hsa-miR-515-5p  | bta-miR-486  |
| K23 | hsa-miR-331-5p  | bta-miR-488  |
| K24 | hsa-miR-496     | bta-miR-489  |
| L01 | hsa-miR-885-5p  | bta-miR-490  |
| L02 | hsa-miR-629-5p  | bta-miR-491  |
| L03 | hsa-miR-502-3p  | bta-miR-493  |
| L04 | hsa-miR-99a-5p  | bta-miR-494  |
| L05 | hsa-miR-767-5p  | bta-miR-495  |
| L06 | hsa-miR-380-3p  | bta-miR-496  |
| L07 | hsa-miR-197-3p  | bta-miR-500  |
| L08 | hsa-miR-578     | bta-miR-502b |
| L09 | hsa-let-7b-5p   | bta-miR-504  |
| L10 | hsa-miR-518c-3p | bta-miR-505  |
| L11 | hsa-miR-181b-5p | bta-miR-539  |
| L12 | hsa-miR-937-3p  | bta-miR-541  |
| L13 | hsa-miR-432-5p  | bta-miR-543  |
| L14 | hsa-miR-7-5p    | bta-miR-544a |
| L15 | hsa-miR-302b-3p | bta-miR-544b |
| L16 | hsa-miR-489-3p  | bta-miR-551a |
| L17 | hsa-miR-20a-5p  | bta-miR-551b |

|     |                   |                |
|-----|-------------------|----------------|
| L18 | hsa-miR-337-3p    | bta-miR-562    |
| L19 | hsa-miR-567       | bta-miR-568    |
| L20 | hsa-miR-218-5p    | bta-miR-582    |
| L21 | hsa-miR-101-3p    | bta-miR-584    |
| L22 | hsa-miR-205-5p    | bta-miR-592    |
| L23 | hsa-miR-613       | bta-miR-599    |
| L24 | hsa-miR-98-5p     | bta-miR-615    |
| M01 | hsa-miR-369-3p    | bta-miR-628    |
| M02 | hsa-miR-190b      | bta-miR-631    |
| M03 | hsa-miR-345-5p    | bta-miR-653    |
| M04 | hsa-miR-219a-2-3p | bta-miR-654    |
| M05 | hsa-miR-21-5p     | bta-miR-655    |
| M06 | hsa-miR-554       | bta-miR-656    |
| M07 | hsa-miR-361-3p    | bta-miR-658    |
| M08 | hsa-miR-193a-5p   | bta-miR-665    |
| M09 | hsa-miR-548d-5p   | bta-miR-670    |
| M10 | hsa-miR-498       | bta-miR-671    |
| M11 | hsa-miR-576-3p    | bta-miR-708    |
| M12 | hsa-miR-518f-5p   | bta-miR-744    |
| M13 | hsa-miR-208b-3p   | bta-miR-758    |
| M14 | hsa-miR-191-5p    | bta-miR-759    |
| M15 | hsa-miR-532-3p    | bta-miR-760-5p |
| M16 | hsa-miR-544a      | bta-miR-761    |
| M17 | hsa-miR-188-3p    | bta-miR-763    |
| M18 | hsa-miR-431-5p    | bta-miR-764    |
| M19 | hsa-miR-543       | bta-miR-767    |
| M20 | hsa-miR-30d-5p    | bta-miR-769    |
| M21 | hsa-miR-129-2-3p  | bta-miR-873    |
| M22 | hsa-miR-30a-5p    | bta-miR-874    |
| M23 | hsa-miR-140-5p    | bta-miR-875    |
| M24 | hsa-miR-151a-3p   | bta-miR-876    |
| N01 | hsa-miR-551b-3p   | bta-miR-877    |

|     |                 |                  |
|-----|-----------------|------------------|
| N02 | hsa-miR-181d-5p | bta-miR-885      |
| N03 | hsa-miR-588     | bta-miR-92a      |
| N04 | hsa-miR-520g-3p | bta-miR-92b      |
| N05 | hsa-miR-105-5p  | bta-miR-935      |
| N06 | hsa-miR-520e    | bta-miR-95       |
| N07 | hsa-miR-545-3p  | bta-miR-9-5p     |
| N08 | hsa-miR-302a-3p | bta-miR-96       |
| N09 | hsa-miR-29b-3p  | bta-miR-1343-3p  |
| N10 | hsa-miR-632     | bta-miR-1434-3p  |
| N11 | hsa-miR-802     | bta-miR-1434-5p  |
| N12 | hsa-miR-590-3p  | bta-miR-1584-3p  |
| N13 | hsa-let-7d-5p   | bta-miR-1584-5p  |
| N14 | hsa-miR-147a    | bta-miR-1603     |
| N15 | hsa-miR-519c-3p | bta-miR-1721     |
| N16 | hsa-miR-580-3p  | bta-miR-1814a    |
| N17 | hsa-miR-373-3p  | bta-miR-1814b    |
| N18 | hsa-miR-181a-5p | bta-miR-2310     |
| N19 | hsa-miR-301a-3p | bta-miR-1843     |
| N20 | hsa-miR-28-3p   | bta-miR-1940     |
| N21 | hsa-miR-137     | bta-miR-219-3p   |
| N22 | hsa-miR-875-3p  | bta-miR-22-3p    |
| N23 | hsa-miR-127-5p  | bta-miR-2284a    |
| N24 | hsa-miR-339-5p  | bta-miR-2284b    |
| O01 | hsa-miR-873-5p  | bta-miR-2284c    |
| O02 | hsa-miR-146a-5p | bta-miR-2284d    |
| O03 | hsa-miR-150-5p  | bta-miR-2284e    |
| O04 | hsa-miR-298     | bta-miR-2284f    |
| O05 | hsa-miR-17-3p   | bta-miR-2284g    |
| O06 | hsa-miR-455-3p  | bta-miR-2284h-3p |
| O07 | hsa-miR-30e-5p  | bta-miR-2284y    |
| O08 | hsa-miR-151a-5p | bta-miR-2284i    |
| O09 | hsa-let-7a-3p   | bta-miR-2284j    |

|     |                   |                  |
|-----|-------------------|------------------|
| O10 | hsa-let-7b-3p     | bta-miR-2284k    |
| O11 | hsa-let-7d-3p     | bta-miR-2284l    |
| O12 | hsa-let-7f-1-3p   | bta-miR-2284m    |
| O13 | hsa-let-7f-2-3p   | bta-miR-2284n    |
| O14 | hsa-let-7g-3p     | bta-miR-2284o    |
| O15 | hsa-let-7i-3p     | bta-miR-2284p    |
| O16 | hsa-miR-103b      | bta-miR-2284q    |
| O17 | hsa-miR-106b-3p   | bta-miR-2284r    |
| O18 | hsa-miR-10b-3p    | bta-miR-2284s    |
| O19 | hsa-miR-125b-1-3p | bta-miR-2284t-3p |
| O20 | hsa-miR-125b-2-3p | bta-miR-2284t-5p |
| O21 | hsa-miR-126-5p    | bta-miR-2284u    |
| O22 | hsa-miR-130b-5p   | bta-miR-2284v    |
| O23 | hsa-miR-133a-3p   | bta-miR-2285a    |
| O24 | hsa-miR-138-1-3p  | bta-miR-2285b    |
| P01 | hsa-miR-138-2-3p  | bta-miR-2285c    |
| P02 | hsa-miR-141-5p    | bta-miR-2285d    |
| P03 | hsa-miR-145-5p    | bta-miR-2286     |
| P04 | hsa-miR-153-3p    | bta-miR-2287     |
| P05 | hsa-miR-15b-3p    | bta-miR-2288     |
| P06 | hsa-miR-181a-3p   | bta-miR-2289     |
| P07 | hsa-miR-18a-3p    | bta-miR-2290     |
| P08 | hsa-miR-193a-3p   | bta-miR-2291     |
| P09 | hsa-miR-193b-5p   | bta-miR-2292     |
| P10 | hsa-miR-199a-5p   | bta-miR-2293     |
| P11 | hsa-miR-1304-5p   | bta-miR-2294     |
| P12 | hsa-miR-19a-5p    | bta-miR-2295     |
| P13 | cel-miR-39-3p     | cel-miR-39-3p    |
| P14 | cel-miR-39-3p     | cel-miR-39-3p    |
| P15 | SNORD61           | SNORD42B         |
| P16 | SNORD68           | SNORD69          |
| P17 | SNORD72           | SNORD61          |

|     |          |          |
|-----|----------|----------|
| P18 | SNORD95  | SNORD68  |
| P19 | SNORD96A | SNORD96A |
| P20 | RNU6-6P  | RNU6-6P  |
| P21 | miRTC    | miRTC    |
| P22 | miRTC    | miRTC    |
| P23 | PPC      | PPC      |
| P24 | PPC      | PPC      |



**Ek- 2.** IF, CPE ve moi puanlarının hesabında kullanılan veriler. N=tekrar sayısı

| HMC | IF skor  |       |   | CPE skor |       |   |
|-----|----------|-------|---|----------|-------|---|
| Dpi | Ortalama | SD    | N | Ortalama | SD    | N |
| 1   | 1        | 0     | 3 | 0,333    | 0,577 | 3 |
| 2   | 1,333    | 0,577 | 3 | 1        | 0     | 3 |
| 3   | 1,333    | 0,577 | 3 | 2        | 0     | 3 |
| 5   | 2,333    | 0,577 | 3 | 3,333    | 0,577 | 3 |
| 7   | 4        | 0     | 3 | 4        | 0     | 3 |

| SW-13 | IF skor  |       |   | CPE skor |       |   |
|-------|----------|-------|---|----------|-------|---|
| Dpi   | Ortalama | SD    | N | Ortalama | SD    | N |
| 1     | 1        | 0     | 3 | 0,666    | 0,577 | 3 |
| 2     | 1,333    | 0,577 | 3 | 1,667    | 0,577 | 3 |
| 3     | 3,333    | 1,154 | 3 | 2,667    | 0,577 | 3 |
| 5     | 4        | 0     | 3 | 4        | 0     | 3 |
| 7     | 4        | 0     | 3 | 4        | 0     | 3 |

| HEK-293 | IF skor  |       |   | CPE skor |       |   |
|---------|----------|-------|---|----------|-------|---|
| Dpi     | Ortalama | SD    | N | Ortalama | SD    | N |
| 1       | 1,333    | 0,577 | 3 | 0        | 0     | 3 |
| 2       | 1,333    | 0,577 | 3 | 1        | 0     | 3 |
| 3       | 2,667    | 0,577 | 3 | 2,333    | 0,577 | 3 |
| 5       | 3,333    | 0,577 | 3 | 2,667    | 0,577 | 3 |
| 7       | 3,333    | 0,577 | 3 | 3,333    | 0,577 | 3 |

| PSH | IF skor  |       |   | CPE skor |       |   |
|-----|----------|-------|---|----------|-------|---|
| Dpi | Ortalama | SD    | N | Ortalama | SD    | N |
| 1   | 1        | 0     | 3 | 0        | 0     | 3 |
| 2   | 1        | 0     | 3 | 0        | 0     | 3 |
| 3   | 1        | 0     | 3 | 1        | 0     | 3 |
| 5   | 1,333    | 0,577 | 3 | 1,333    | 0,577 | 3 |

|   |       |       |   |   |   |   |
|---|-------|-------|---|---|---|---|
| 7 | 1,333 | 0,577 | 3 | 2 | 0 | 3 |
|---|-------|-------|---|---|---|---|

| BEK | IF skor  |       |   | CPE skor |       |   |
|-----|----------|-------|---|----------|-------|---|
| Dpi | Ortalama | SD    | N | Ortalama | SD    | N |
| 1   | 1        | 0     | 3 | 0        | 0     | 3 |
| 2   | 1        | 0     | 3 | 0        | 0     | 3 |
| 3   | 1        | 0     | 3 | 0,667    | 0,577 | 3 |
| 5   | 1,667    | 0,577 | 3 | 2        | 0     | 3 |
| 7   | 2,333    | 0,577 | 3 | 2        | 0     | 3 |

| MDBK | IF skor  |       |   | CPE skor |       |   |
|------|----------|-------|---|----------|-------|---|
| Dpi  | Ortalama | SD    | N | Ortalama | SD    | N |
| 1    | 1        | 0     | 3 | 0        | 0     | 3 |
| 2    | 1        | 0     | 3 | 0        | 0     | 3 |
| 3    | 1        | 0     | 3 | 0,667    | 0,577 | 3 |
| 5    | 1,667    | 0,577 | 3 | 2        | 0     | 3 |
| 7    | 1,667    | 0,577 | 3 | 2        | 0     | 3 |

| HMC | IF boyanmış hücre sayısı/göz |         |   |
|-----|------------------------------|---------|---|
| Dpi | Ortalama                     | SD      | N |
| 1   | 95                           | 7,071   | 3 |
| 2   | 2530                         | 98,994  | 3 |
| 3   | 2735                         | 91,923  | 3 |
| 5   | 5860                         | 197,989 | 3 |
| 7   | 15675                        | 459,619 | 3 |

| PSH | IF boyanmış hücre sayısı/göz |         |   |
|-----|------------------------------|---------|---|
| Dpi | Ortalama                     | SD      | N |
| 1   | 700                          | 28,284  | 3 |
| 2   | 1100                         | 84,852  | 3 |
| 3   | 1340                         | 367,695 | 3 |
| 5   | 1420                         | 311,127 | 3 |
| 7   | 1440                         | 226,274 | 3 |

| SW-13 | IF boyanmış hücre sayısı/göz |          |   |
|-------|------------------------------|----------|---|
| Dpi   | Ortalama                     | SD       | N |
| 1     | 720                          | 141,421  | 3 |
| 2     | 3580                         | 113,137  | 3 |
| 3     | 12200                        | 1131,371 | 3 |
| 5     | 31610                        | 551,543  | 3 |

| BEK | IF boyanmış hücre sayısı/göz |          |   |
|-----|------------------------------|----------|---|
| Dpi | Ortalama                     | SD       | N |
| 1   | 380                          | 113,137  | 3 |
| 2   | 310                          | 226,274  | 3 |
| 3   | 1090                         | 268,7    | 3 |
| 5   | 3740                         | 1046,518 | 3 |

|   |       |          |   |
|---|-------|----------|---|
| 7 | 13900 | 5656,855 | 3 |
|---|-------|----------|---|

|   |       |          |   |
|---|-------|----------|---|
| 7 | 51900 | 4101,219 | 3 |
|---|-------|----------|---|

| HEK-293 | IF boyanmış hücre sayısı/göz |          |   |
|---------|------------------------------|----------|---|
| Dpi     | Ortalama                     | SD       | N |
| 1       | 250                          | 282,842  | 3 |
| 2       | 2320                         | 452,548  | 3 |
| 3       | 16500                        | 707,106  | 3 |
| 5       | 17420                        | 593,969  | 3 |
| 7       | 19000                        | 1414,214 | 3 |

| MDBK | IF boyanmış hücre sayısı/göz |          |   |
|------|------------------------------|----------|---|
| Dpi  | Ortalama                     | SD       | N |
| 1    | 250                          | 70,71    | 3 |
| 2    | 200                          | 141,421  | 3 |
| 3    | 415                          | 304,055  | 3 |
| 5    | 29450                        | 6293,251 | 3 |
| 7    | 28440                        | 3450,681 | 3 |



**Ek-3:** Ekspresyonları önemli şekilde değişen miRNA'lar, kat regülasyonları ve p-değerleri

| HMC 0 dpi      |                |                |          | HMC 7 dpi      |                 |                |          |
|----------------|----------------|----------------|----------|----------------|-----------------|----------------|----------|
| Olgun miRNA ID |                | Kat regülasyon | p-değeri | Olgun miRNA ID |                 | Kat regülasyon | p-değeri |
| 1.             | hsa-miR-382-5p | 2,8253         | 0,000683 | 1.             | hsa-miR-10b-3p  | -2,5646        | 0,034242 |
| 2.             | hsa-miR-455-3p | 2,8383         | 0,02995  | 2.             | hsa-miR-126-5p  | -6,0855        | 0,020622 |
| 3.             | hsa-miR-542-3p | 3,3136         | 0,002977 | 3.             | hsa-miR-361-5p  | -6,2566        | 0,040797 |
| 4.             | hsa-miR-34c-5p | 3,535          | 0,013542 | 4.             | hsa-let-7f-5p   | -8,3516        | 0,027975 |
| 5.             | hsa-miR-197-3p | 3,6512         | 0,032735 | 5.             | hsa-miR-23a-3p  | -41,7985       | 0,036682 |
| 6.             | hsa-miR-885-5p | 4,3622         | 0,032122 | 6.             | hsa-miR-21-5p   | -53,398        | 0,00472  |
| 7.             | hsa-miR-143-3p | 4,4641         | 0,033221 | 7.             | hsa-miR-662     | 3,2745         | 0,009561 |
|                |                |                |          | 8.             | hsa-miR-147a    | 3,5999         | 0,032784 |
|                |                |                |          | 9.             | hsa-miR-622     | 3,7701         | 0,0312   |
|                |                |                |          | 10.            | hsa-let-7b-3p   | 3,7268         | 0,043207 |
|                |                |                |          | 11.            | hsa-miR-410-3p  | 4,3108         | 0,045566 |
|                |                |                |          | 12.            | hsa-miR-197-3p  | 4,5356         | 0,006    |
|                |                |                |          | 13.            | hsa-miR-298     | 4,7721         | 0,007045 |
|                |                |                |          | 14.            | hsa-miR-202-3p  | 4,8949         | 0,030471 |
|                |                |                |          | 15.            | hsa-miR-138-5p  | 4,9404         | 0,045803 |
|                |                |                |          | 16.            | hsa-miR-623     | 5,1621         | 0,047985 |
|                |                |                |          | 17.            | hsa-miR-129-5p  | 5,295          | 0,008958 |
|                |                |                |          | 18.            | hsa-miR-548b-3p | 5,4817         | 0,022185 |
|                |                |                |          | 19.            | hsa-miR-206     | 5,7145         | 0,033064 |
|                |                |                |          | 20.            | hsa-miR-337-3p  | 5,848          | 0,01785  |
|                |                |                |          | 21.            | hsa-miR-554     | 5,9023         | 0,023576 |
|                |                |                |          | 22.            | hsa-miR-621     | 6,2389         | 0,041235 |
|                |                |                |          | 23.            | hsa-miR-582-5p  | 6,2823         | 0,032867 |
|                |                |                |          | 24.            | hsa-miR-520e    | 6,37           | 0,006532 |
|                |                |                |          | 25.            | hsa-miR-379-5p  | 6,5038         | 0,021793 |
|                |                |                |          | 26.            | hsa-miR-212-3p  | 7,0353         | 0,021399 |
|                |                |                |          | 27.            | hsa-miR-455-5p  | 7,3172         | 0,022121 |
|                |                |                |          | 28.            | hsa-miR-135a-5p | 7,8787         | 0,019809 |
|                |                |                |          | 29.            | hsa-miR-205-5p  | 8,1565         | 0,019044 |
|                |                |                |          | 30.            | hsa-miR-647     | 8,1754         | 0,002876 |

|     |                   |         |          |
|-----|-------------------|---------|----------|
| 31. | hsa-miR-135b-5p   | 9,1343  | 0,0174   |
| 32. | hsa-miR-495-3p    | 9,3694  | 0,017154 |
| 33. | hsa-miR-501-5p    | 9,4128  | 0,01786  |
| 34. | hsa-miR-581       | 9,7898  | 0,025639 |
| 35. | hsa-miR-18b-5p    | 9,9265  | 0,003306 |
| 36. | hsa-miR-219a-5p   | 9,9725  | 0,016674 |
| 37. | hsa-miR-619-3p    | 9,9956  | 0,017377 |
| 38. | hsa-miR-302a-3p   | 10,6882 | 0,020393 |
| 39. | hsa-miR-518f-5p   | 10,7378 | 0,024374 |
| 40. | hsa-miR-208b-3p   | 10,8374 | 0,016231 |
| 41. | hsa-miR-208a-3p   | 11,0396 | 0,022751 |
| 42. | hsa-miR-361-3p    | 11,1937 | 0,016246 |
| 43. | hsa-miR-504-5p    | 11,2716 | 0,016076 |
| 44. | hsa-miR-32-5p     | 11,4289 | 0,016028 |
| 45. | hsa-miR-122-5p    | 11,6691 | 0,015962 |
| 46. | hsa-miR-544a      | 12,0806 | 0,025383 |
| 47. | hsa-miR-382-5p    | 12,4778 | 0,030899 |
| 48. | hsa-miR-487b-3p   | 13,0076 | 0,003679 |
| 49. | hsa-miR-618       | 13,281  | 0,015662 |
| 50. | hsa-miR-383-5p    | 13,3117 | 0,016916 |
| 51. | hsa-miR-597-5p    | 13,4663 | 0,019552 |
| 52. | hsa-miR-412-3p    | 13,4663 | 0,016711 |
| 53. | hsa-miR-302c-3p   | 13,7176 | 0,015928 |
| 54. | hsa-miR-648       | 14,0707 | 0,016476 |
| 55. | hsa-miR-130b-5p   | 14,2671 | 0,015555 |
| 56. | hsa-miR-215-5p    | 14,7361 | 0,015516 |
| 57. | hsa-miR-190b      | 14,7361 | 0,015516 |
| 58. | hsa-miR-551a      | 14,8044 | 0,015511 |
| 59. | hsa-miR-141-5p    | 14,9764 | 0,015498 |
| 60. | hsa-miR-543       | 15,1155 | 0,002812 |
| 61. | hsa-miR-548o-5p   | 15,5764 | 0,048664 |
| 62. | hsa-miR-219a-2-3p | 16,4265 | 0,025565 |
| 63. | hsa-miR-95-3p     | 16,5026 | 0,015412 |

|     |                 |         |          |
|-----|-----------------|---------|----------|
| 64. | hsa-miR-325     | 16,579  | 0,015409 |
| 65. | hsa-miR-124-3p  | 16,6558 | 0,047388 |
| 66. | hsa-miR-555     | 17,1637 | 0,016991 |
| 67. | hsa-miR-363-3p  | 17,2831 | 0,015909 |
| 68. | hsa-miR-369-5p  | 17,687  | 0,015368 |
| 69. | hsa-miR-583     | 17,8925 | 0,015361 |
| 70. | hsa-miR-330-3p  | 18,0587 | 0,016235 |
| 71. | hsa-miR-133a-3p | 18,2263 | 0,015352 |
| 72. | hsa-miR-513a-5p | 18,7388 | 0,015338 |
| 73. | hsa-miR-501-3p  | 18,8255 | 0,015336 |
| 74. | hsa-miR-571     | 18,9127 | 0,015334 |
| 75. | hsa-miR-524-5p  | 18,9565 | 0,015333 |
| 76. | hsa-miR-591     | 19,0883 | 0,01533  |
| 77. | hsa-miR-588     | 19,1325 | 0,015329 |
| 78. | hsa-miR-641     | 19,1768 | 0,01538  |
| 79. | hsa-miR-144-3p  | 19,3548 | 0,015324 |
| 80. | hsa-miR-935     | 19,5797 | 0,015319 |
| 81. | hsa-miR-877-5p  | 19,7159 | 0,037865 |
| 82. | hsa-miR-133b    | 19,8989 | 0,015451 |
| 83. | hsa-miR-567     | 19,8989 | 0,015313 |
| 84. | hsa-miR-506-3p  | 20,1767 | 0,015308 |
| 85. | hsa-miR-549a    | 20,2234 | 0,015307 |
| 86. | hsa-miR-522-3p  | 20,3641 | 0,015305 |
| 87. | hsa-miR-1-3p    | 20,3641 | 0,015305 |
| 88. | hsa-miR-629-5p  | 20,6961 | 0,015299 |
| 89. | hsa-miR-758-3p  | 20,792  | 0,015298 |
| 90. | hsa-miR-590-5p  | 20,985  | 0,015295 |
| 91. | hsa-miR-524-3p  | 21,0822 | 0,015293 |
| 92. | hsa-miR-373-3p  | 22,0793 | 0,01528  |
| 93. | hsa-miR-512-5p  | 22,5953 | 0,015275 |
| 94. | hsa-miR-380-3p  | 22,7    | 0,015273 |
| 95. | hsa-miR-563     | 23,0701 | 0,01527  |
| 96. | hsa-miR-525-3p  | 23,9943 | 0,015261 |

|      |                  |                  |
|------|------------------|------------------|
| 97.  | hsa-miR-508-3p   | 25,0132 0,015253 |
| 98.  | hsa-miR-515-5p   | 25,5388 0,01525  |
| 99.  | hsa-miR-369-3p   | 25,6571 0,015249 |
| 100. | hsa-miR-578      | 25,9552 0,015247 |
| 101. | hsa-miR-335-5p   | 26,1962 0,01657  |
| 102. | hsa-miR-376a-3p  | 26,8705 0,017283 |
| 103. | hsa-miR-556-5p   | 27,626 0,015622  |
| 104. | hsa-miR-520g-3p  | 27,6899 0,015238 |
| 105. | hsa-miR-518b     | 28,4026 0,015235 |
| 106. | hsa-miR-548d-3p  | 28,5342 0,015235 |
| 107. | hsa-miR-562      | 28,9325 0,01853  |
| 108. | hsa-miR-384      | 29,2687 0,015232 |
| 109. | hsa-miR-105-5p   | 31,0808 0,015226 |
| 110. | hsa-miR-376c-3p  | 31,297 0,015226  |
| 111. | hsa-miR-103b     | 31,442 0,019751  |
| 112. | hsa-miR-299-3p   | 31,7339 0,019466 |
| 113. | hsa-miR-153-3p   | 31,9546 0,039206 |
| 114. | hsa-miR-579-3p   | 32,1769 0,015223 |
| 115. | hsa-miR-585-3p   | 34,9678 0,008644 |
| 116. | hsa-miR-492      | 35,5379 0,015217 |
| 117. | hsa-miR-519e-5p  | 35,9508 0,015216 |
| 118. | hsa-miR-138-1-3p | 36,3686 0,016648 |
| 119. | hsa-miR-616-5p   | 38,265 0,015213  |
| 120. | hsa-miR-545-3p   | 38,265 0,015213  |
| 121. | hsa-miR-576-5p   | 38,5311 0,015213 |
| 122. | hsa-miR-193a-3p  | 39,25 0,000868   |
| 123. | hsa-miR-559      | 39,523 0,015211  |
| 124. | hsa-miR-558      | 40,8223 0,01521  |
| 125. | hsa-miR-551b-3p  | 40,7281 0,01521  |
| 126. | hsa-miR-515-3p   | 42,2619 0,015209 |
| 127. | hsa-miR-514a-3p  | 42,2619 0,015209 |
| 128. | hsa-miR-938      | 42,2619 0,015209 |
| 129. | hsa-miR-651-5p   | 42,2619 0,015209 |

|                      |                  |
|----------------------|------------------|
| 130. hsa-miR-371a-3p | 42,2619 0,015209 |
| 131. hsa-miR-633     | 42,2619 0,015209 |
| 132. hsa-miR-660-5p  | 42,2619 0,015209 |
| 133. hsa-miR-429     | 42,2619 0,015209 |
| 134. hsa-miR-607     | 42,2619 0,015209 |
| 135. hsa-miR-454-3p  | 42,2619 0,015209 |
| 136. hsa-miR-548a-5p | 42,2619 0,015209 |
| 137. hsa-miR-518c-3p | 42,2619 0,015209 |
| 138. hsa-miR-302b-3p | 42,2619 0,015209 |
| 139. hsa-miR-498     | 42,2619 0,015209 |
| 140. hsa-miR-576-3p  | 42,2619 0,015209 |
| 141. hsa-miR-519c-3p | 42,2619 0,015209 |
| 142. hsa-miR-580-3p  | 42,2619 0,015209 |
| 143. hsa-miR-802     | 42,2619 0,015209 |
| 144. hsa-miR-590-3p  | 42,2619 0,015209 |
| 145. hsa-miR-127-5p  | 42,2619 0,015209 |
| 146. hsa-miR-18a-3p  | 42,2619 0,015209 |
| 147. hsa-miR-193b-5p | 42,2619 0,015209 |
| 148. hsa-miR-19a-5p  | 46,4612 0,016452 |
| 149. hsa-miR-345-5p  | 47,1097 0,00049  |

| PSH 0 dpi       |          |                     | PSH 7 dpi         |         |                     |
|-----------------|----------|---------------------|-------------------|---------|---------------------|
| Olgun miRNA ID  | Kat      | regülasyon p-değeri | Olgun miRNA ID    | Kat     | regülasyon p-değeri |
| 1. bta-miR-184  | -2,2702  | 0,00574             | 1. bta-miR-486    | -2,5056 | 0,011164            |
| 2. bta-miR-185  | -5,7339  | 0,03891             | 2. bta-let-7a-3p  | -2,5731 | 0,019368            |
| 3. bta-miR-197  | -23,5531 | 0,03136             | 3. bta-miR-345-5p | -2,6793 | 0,02199             |
| 4. bta-miR-2289 | 2,0953   | 0,02428             | 4. bta-miR-1249   | -3,1134 | 0,007181            |
| 5. bta-miR-505  | 2,2225   | 0,005825            | . bta-miR-2285c   | -3,1351 | 0,027204            |
| 6. bta-miR-1843 | 3,4553   | 0,0177              | 6. bta-miR-335    | -3,5517 | 0,041157            |
| 7. bta-miR-370  | 4,1761   | 0,0422              | 7. bta-miR-450a   | -2177,5 | 0,008702            |
| 8. bta-miR-493  | 6,0091   | 0,01051             |                   |         |                     |
| 9. bta-miR-2291 | 6,999    | 0,03829             |                   |         |                     |

|                  |         |         |
|------------------|---------|---------|
| 10. bta-miR-708  | 10,1412 | 0,00119 |
| 11. bta-miR-17-3 | 11,949  | 0,02913 |



**Ek 4.** HMC hücresinde 0. günde artan yönde değişen yollar.

The following table shows the 25 most relevant pathways sorted by p-value.

| Pathway name                                                                 | Entities |          |          |          | Reactions |          |
|------------------------------------------------------------------------------|----------|----------|----------|----------|-----------|----------|
|                                                                              | found    | ratio    | p-value  | FDR*     | found     | ratio    |
| TRAF6 mediated IRF7 activation                                               | 3 / 43   | 0.003    | 5.43e-06 | 3.09e-04 | 2 / 11    | 8.49e-04 |
| DDX58/IFIH1-mediated induction of interferon-alpha/beta                      | 3 / 96   | 0.007    | 5.89e-05 | 0.002    | 2 / 46    | 0.004    |
| POU5F1 (OCT4), SOX2, NANOG activate genes related to proliferation           | 2 / 21   | 0.001    | 1.34e-04 | 0.003    | 2 / 16    | 0.001    |
| Regulation of IFNA signaling                                                 | 2 / 28   | 0.002    | 2.37e-04 | 0.003    | 4 / 5     | 3.86e-04 |
| Factors involved in megakaryocyte development and platelet production        | 3 / 194  | 0.013    | 4.65e-04 | 0.005    | 3 / 43    | 0.003    |
| Transcriptional regulation of pluripotent stem cells                         | 2 / 45   | 0.003    | 6.08e-04 | 0.005    | 3 / 35    | 0.003    |
| Role of ABL in ROBO-SLIT signaling                                           | 1 / 10   | 6.82e-04 | 0.008    | 0.065    | 4 / 4     | 3.09e-04 |
| Interferon alpha/beta signaling                                              | 2 / 186  | 0.013    | 0.01     | 0.068    | 13 / 20   | 0.002    |
| FGFR3c ligand binding and activation                                         | 1 / 18   | 0.001    | 0.015    | 0.075    | 1 / 4     | 3.09e-04 |
| FGFR3 ligand binding and activation                                          | 1 / 19   | 0.001    | 0.015    | 0.075    | 1 / 6     | 4.63e-04 |
| Defective GALNT3 causes familial hyperphosphatemic tumoral calcinosis (HFTC) | 1 / 20   | 0.001    | 0.016    | 0.075    | 1 / 1     | 7.71e-05 |
| Regulation of TP53 Activity through Methylation                              | 1 / 23   | 0.002    | 0.019    | 0.075    | 1 / 12    | 9.26e-04 |
| Hemostasis                                                                   | 3 / 824  | 0.056    | 0.027    | 0.088    | 3 / 332   | 0.026    |
| Oncogene Induced Senescence                                                  | 1 / 42   | 0.003    | 0.034    | 0.088    | 3 / 19    | 0.001    |
| Regulation of TP53 Degradation                                               | 1 / 43   | 0.003    | 0.035    | 0.088    | 12 / 30   | 0.002    |
| Regulation of TP53 Expression and Degradation                                | 1 / 46   | 0.003    | 0.037    | 0.088    | 12 / 35   | 0.003    |
| SUMOylation of DNA replication proteins                                      | 1 / 50   | 0.003    | 0.04     | 0.088    | 1 / 8     | 6.17e-04 |
| Interferon Signaling                                                         | 2 / 396  | 0.027    | 0.04     | 0.088    | 13 / 66   | 0.005    |
| Signaling by FGFR3                                                           | 1 / 53   | 0.004    | 0.042    | 0.088    | 1 / 43    | 0.003    |
| Stabilization of p53                                                         | 1 / 59   | 0.004    | 0.047    | 0.088    | 6 / 15    | 0.001    |
| p53-Dependent G1 DNA Damage Response                                         | 1 / 70   | 0.005    | 0.056    | 0.088    | 6 / 22    | 0.002    |
| p53-Dependent G1/S DNA damage checkpoint                                     | 1 / 70   | 0.005    | 0.056    | 0.088    | 6 / 22    | 0.002    |
| G1/S DNA Damage Checkpoints                                                  | 1 / 72   | 0.005    | 0.057    | 0.088    | 6 / 26    | 0.002    |
| O-linked glycosylation of mucins                                             | 1 / 73   | 0.005    | 0.058    | 0.088    | 1 / 17    | 0.001    |

**Ek 5. HMC hücresinde 7. günde azalan yönde regüle edilen yollar.**

The following table shows the 25 most relevant pathways sorted by p-value.

| Pathway name                                                        | Entities |          |          |       | Reactions |          |
|---------------------------------------------------------------------|----------|----------|----------|-------|-----------|----------|
|                                                                     | found    | ratio    | p-value  | FDR*  | found     | ratio    |
| Signaling by Receptor Tyrosine Kinases                              | 4 / 622  | 0.042    | 3.43e-04 | 0.012 | 25 / 701  | 0.054    |
| NGF-stimulated transcription                                        | 2 / 56   | 0.004    | 5.15e-04 | 0.012 | 23 / 36   | 0.003    |
| Nuclear Events (kinase and transcription factor activation)         | 2 / 80   | 0.005    | 0.001    | 0.016 | 23 / 47   | 0.004    |
| Signaling by NTRK1 (TRKA)                                           | 2 / 143  | 0.01     | 0.003    | 0.036 | 23 / 101  | 0.008    |
| Signaling by NTRKs                                                  | 2 / 166  | 0.011    | 0.004    | 0.038 | 23 / 163  | 0.013    |
| Interferon alpha/beta signaling                                     | 2 / 186  | 0.013    | 0.005    | 0.038 | 2 / 20    | 0.002    |
| MET receptor recycling                                              | 1 / 11   | 7.50e-04 | 0.007    | 0.04  | 1 / 2     | 1.54e-04 |
| Interferon Signaling                                                | 2 / 396  | 0.027    | 0.023    | 0.081 | 2 / 66    | 0.005    |
| TBC/RABGAPs                                                         | 1 / 49   | 0.003    | 0.03     | 0.081 | 1 / 14    | 0.001    |
| AUF1 (hnRNP D0) binds and destabilizes mRNA                         | 1 / 56   | 0.004    | 0.034    | 0.081 | 2 / 4     | 3.09e-04 |
| HSF1-dependent transactivation                                      | 1 / 59   | 0.004    | 0.036    | 0.081 | 1 / 8     | 6.17e-04 |
| RAB geranylgeranylation                                             | 1 / 68   | 0.005    | 0.041    | 0.081 | 2 / 5     | 3.86e-04 |
| Synthesis of PIPs at the plasma membrane                            | 1 / 69   | 0.005    | 0.042    | 0.081 | 1 / 33    | 0.003    |
| Regulation of PTEN gene transcription                               | 1 / 70   | 0.005    | 0.042    | 0.081 | 2 / 15    | 0.001    |
| Translocation of SLC2A4 (GLUT4) to the plasma membrane              | 1 / 79   | 0.005    | 0.047    | 0.081 | 1 / 15    | 0.001    |
| Signaling by MET                                                    | 1 / 88   | 0.006    | 0.053    | 0.081 | 1 / 49    | 0.004    |
| Regulation of mRNA stability by proteins that bind AU-rich elements | 1 / 93   | 0.006    | 0.056    | 0.081 | 2 / 26    | 0.002    |
| MAPK6/MAPK4 signaling                                               | 1 / 106  | 0.007    | 0.063    | 0.081 | 1 / 40    | 0.003    |
| Extra-nuclear estrogen signaling                                    | 1 / 110  | 0.007    | 0.065    | 0.081 | 1 / 38    | 0.003    |
| PI Metabolism                                                       | 1 / 112  | 0.008    | 0.067    | 0.081 | 1 / 89    | 0.007    |
| VEGFA-VEGFR2 Pathway                                                | 1 / 126  | 0.009    | 0.075    | 0.081 | 1 / 77    | 0.006    |
| Rab regulation of trafficking                                       | 1 / 129  | 0.009    | 0.076    | 0.081 | 1 / 35    | 0.003    |
| Cellular response to heat stress                                    | 1 / 135  | 0.009    | 0.08     | 0.081 | 1 / 29    | 0.002    |
| Signaling by VEGF                                                   | 1 / 137  | 0.009    | 0.081    | 0.081 | 1 / 84    | 0.006    |
| PTEN Regulation                                                     | 1 / 171  | 0.012    | 0.1      | 0.1   | 2 / 56    | 0.004    |

\* False Discovery Rate

**Ek 6. HMC hücresinde 7. günde artan yönde regüle olan yollar**

The following table shows the 25 most relevant pathways sorted by p-value.

| Pathway name                                                                     | Entities |          |         |       | Reactions |          |
|----------------------------------------------------------------------------------|----------|----------|---------|-------|-----------|----------|
|                                                                                  | found    | ratio    | p-value | FDR*  | found     | ratio    |
| Circadian Clock                                                                  | 6 / 104  | 0.007    | 0.001   | 0.393 | 45 / 59   | 0.005    |
| Loss of Function of FBXW7 in Cancer and NOTCH1 Signaling                         | 2 / 6    | 4.09e-04 | 0.002   | 0.393 | 1 / 1     | 7.71e-05 |
| FBXW7 Mutants and NOTCH1 in Cancer                                               | 2 / 6    | 4.09e-04 | 0.002   | 0.393 | 1 / 1     | 7.71e-05 |
| Transcriptional Regulation by VENTX                                              | 4 / 48   | 0.003    | 0.002   | 0.393 | 6 / 13    | 0.001    |
| NOTCH1 Intracellular Domain Regulates Transcription                              | 4 / 57   | 0.004    | 0.005   | 0.393 | 13 / 18   | 0.001    |
| Regulation of gene expression in endocrine-committed (NEUROG3+) progenitor cells | 2 / 9    | 6.13e-04 | 0.005   | 0.393 | 1 / 4     | 3.09e-04 |
| Constitutive Signaling by NOTCH1 PEST Domain Mutants                             | 4 / 68   | 0.005    | 0.008   | 0.393 | 12 / 21   | 0.002    |
| Constitutive Signaling by NOTCH1 HD+PEST Domain Mutants                          | 4 / 68   | 0.005    | 0.008   | 0.393 | 12 / 21   | 0.002    |
| Signaling by NOTCH1 PEST Domain Mutants in Cancer                                | 4 / 68   | 0.005    | 0.008   | 0.393 | 12 / 21   | 0.002    |
| Signaling by NOTCH1 HD+PEST Domain Mutants in Cancer                             | 4 / 68   | 0.005    | 0.008   | 0.393 | 12 / 21   | 0.002    |
| Signaling by NOTCH1 in Cancer                                                    | 4 / 68   | 0.005    | 0.008   | 0.393 | 13 / 39   | 0.003    |
| BMAL1:CLOCK,NPAS2 activates circadian gene expression                            | 3 / 42   | 0.003    | 0.013   | 0.393 | 20 / 20   | 0.002    |
| Ca2+ pathway                                                                     | 4 / 81   | 0.006    | 0.015   | 0.393 | 12 / 27   | 0.002    |
| Signaling by NOTCH1                                                              | 4 / 84   | 0.006    | 0.017   | 0.393 | 13 / 39   | 0.003    |
| Signaling by TGF-beta Receptor Complex                                           | 4 / 85   | 0.006    | 0.018   | 0.393 | 28 / 82   | 0.006    |
| TGFBR2 MSI Frameshift Mutants in Cancer                                          | 1 / 2    | 1.36e-04 | 0.023   | 0.393 | 1 / 1     | 7.71e-05 |
| POU5F1 (OCT4), SOX2, NANOG activate genes related to proliferation               | 2 / 21   | 0.001    | 0.025   | 0.393 | 2 / 16    | 0.001    |
| Transcriptional activity of SMAD2/SMAD3:SMAD4 heterotrimer                       | 3 / 55   | 0.004    | 0.027   | 0.393 | 4 / 38    | 0.003    |
| FOXO-mediated transcription of cell death genes                                  | 2 / 23   | 0.002    | 0.03    | 0.393 | 2 / 15    | 0.001    |
| Cellular Senescence                                                              | 6 / 200  | 0.014    | 0.03    | 0.393 | 23 / 90   | 0.007    |
| TCF7L2 mutants don't bind CTBP                                                   | 1 / 3    | 2.04e-04 | 0.034   | 0.393 | 1 / 1     | 7.71e-05 |

|                                                       |         |          |       |       |        |          |
|-------------------------------------------------------|---------|----------|-------|-------|--------|----------|
| XAV939 inhibits tankyrase,<br>stabilizing AXIN        | 1 / 3   | 2.04e-04 | 0.034 | 0.393 | 1 / 1  | 7.71e-05 |
| Transport of connexins along the<br>secretory pathway | 1 / 3   | 2.04e-04 | 0.034 | 0.393 | 1 / 2  | 1.54e-04 |
| Oligomerization of connexins into<br>connexons        | 1 / 3   | 2.04e-04 | 0.034 | 0.393 | 1 / 3  | 2.31e-04 |
| Potassium Channels                                    | 4 / 107 | 0.007    | 0.037 | 0.393 | 4 / 19 | 0.001    |

\* False Discovery Rate



**Ek 7.** PSH hücresinde 0. günde azalan yönde regüle edilen yollar

The following table shows the 17 most relevant pathways sorted by p-value.

| Pathway name                                                        | Entities  |          |          |          | Reactions |          |
|---------------------------------------------------------------------|-----------|----------|----------|----------|-----------|----------|
|                                                                     | found     | ratio    | p-value  | FDR*     | found     | ratio    |
| Xenobiotics                                                         | 2 / 24    | 0.002    | 4.40e-05 | 7.48e-04 | 3 / 22    | 0.002    |
| Cytochrome P450 - arranged by substrate type                        | 2 / 65    | 0.006    | 3.20e-04 | 0.003    | 4 / 61    | 0.005    |
| Phase I - Functionalization of compounds                            | 2 / 105   | 0.009    | 8.30e-04 | 0.004    | 4 / 98    | 0.008    |
| Biological oxidations                                               | 2 / 222   | 0.019    | 0.004    | 0.01     | 6 / 188   | 0.015    |
| Organic anion transporters                                          | 1 / 10    | 8.76e-04 | 0.004    | 0.01     | 1 / 9     | 6.94e-04 |
| Beta-oxidation of very long chain fatty acids                       | 1 / 11    | 9.63e-04 | 0.005    | 0.01     | 2 / 12    | 9.26e-04 |
| Miscellaneous substrates                                            | 1 / 12    | 0.001    | 0.005    | 0.01     | 1 / 5     | 3.86e-04 |
| Aflatoxin activation and detoxification                             | 1 / 20    | 0.002    | 0.009    | 0.013    | 2 / 18    | 0.001    |
| Peroxisomal lipid metabolism                                        | 1 / 29    | 0.003    | 0.013    | 0.013    | 2 / 35    | 0.003    |
| Peroxisomal protein import                                          | 1 / 64    | 0.006    | 0.028    | 0.028    | 3 / 26    | 0.002    |
| Transport of inorganic cations/anions and amino acids/oligopeptides | 1 / 107   | 0.009    | 0.046    | 0.046    | 1 / 75    | 0.006    |
| Metabolism                                                          | 3 / 2,142 | 0.188    | 0.049    | 0.049    | 8 / 2,241 | 0.173    |
| Protein localization                                                | 1 / 166   | 0.015    | 0.071    | 0.071    | 3 / 53    | 0.004    |
| Fatty acid metabolism                                               | 1 / 179   | 0.016    | 0.076    | 0.076    | 2 / 217   | 0.017    |
| SLC-mediated transmembrane transport                                | 1 / 251   | 0.022    | 0.105    | 0.105    | 1 / 191   | 0.015    |
| Transport of small molecules                                        | 1 / 731   | 0.064    | 0.282    | 0.282    | 1 / 438   | 0.034    |
| Metabolism of lipids                                                | 1 / 748   | 0.065    | 0.287    | 0.287    | 2 / 943   | 0.073    |

\* False Discovery Rate

**Ek 8.** PSH hücresinde 0. günde artan yönde regüle edilen yollar

The following table shows the 25 most relevant pathways sorted by p-value.

| Pathway name                                                                          | Entities  |          |          |       | Reactions |          |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------|----------|----------|-------|-----------|----------|
|                                                                                       | found     | ratio    | p-value  | FDR*  | found     | ratio    |
| Glycogen storage disease type Ib (SLC37A4)                                            | 1 / 1     | 8.76e-05 | 7.00e-04 | 0.025 | 1 / 1     | 7.71e-05 |
| Glycogen storage diseases                                                             | 1 / 16    | 0.001    | 0.011    | 0.084 | 1 / 10    | 7.71e-04 |
| Diseases of metabolism                                                                | 2 / 249   | 0.022    | 0.012    | 0.084 | 4 / 191   | 0.015    |
| Defective GALNT3 causes familial hyperphosphatemic tumoral calcinosis (HFTC)          | 1 / 19    | 0.002    | 0.013    | 0.084 | 1 / 1     | 7.71e-05 |
| Defective GALNT12 causes colorectal cancer 1 (CRCS1)                                  | 1 / 19    | 0.002    | 0.013    | 0.084 | 1 / 1     | 7.71e-05 |
| Defective C1GALT1C1 causes Tn polyagglutination syndrome (TNPS)                       | 1 / 20    | 0.002    | 0.014    | 0.084 | 1 / 1     | 7.71e-05 |
| Termination of O-glycan biosynthesis                                                  | 1 / 26    | 0.002    | 0.018    | 0.09  | 5 / 5     | 3.86e-04 |
| Gluconeogenesis                                                                       | 1 / 34    | 0.003    | 0.024    | 0.091 | 1 / 26    | 0.002    |
| Diseases of carbohydrate metabolism                                                   | 1 / 34    | 0.003    | 0.024    | 0.091 | 1 / 44    | 0.003    |
| PKMTs methylate histone lysines                                                       | 1 / 47    | 0.004    | 0.032    | 0.091 | 3 / 22    | 0.002    |
| Dectin-2 family                                                                       | 1 / 61    | 0.005    | 0.042    | 0.091 | 1 / 12    | 9.26e-04 |
| O-linked glycosylation of mucins                                                      | 1 / 65    | 0.006    | 0.045    | 0.091 | 17 / 17   | 0.001    |
| RUNX1 regulates genes involved in megakaryocyte differentiation and platelet function | 1 / 66    | 0.006    | 0.045    | 0.091 | 12 / 33   | 0.003    |
| Diseases associated with O-glycosylation of proteins                                  | 1 / 71    | 0.006    | 0.049    | 0.097 | 3 / 9     | 6.94e-04 |
| Class B/2 (Secretin family receptors)                                                 | 1 / 97    | 0.008    | 0.066    | 0.116 | 2 / 20    | 0.002    |
| Glucose metabolism                                                                    | 1 / 98    | 0.009    | 0.067    | 0.116 | 1 / 50    | 0.004    |
| O-linked glycosylation                                                                | 1 / 114   | 0.01     | 0.077    | 0.116 | 17 / 28   | 0.002    |
| Diseases of glycosylation                                                             | 1 / 146   | 0.013    | 0.098    | 0.116 | 3 / 77    | 0.006    |
| C-type lectin receptors (CLRs)                                                        | 1 / 174   | 0.015    | 0.116    | 0.116 | 1 / 68    | 0.005    |
| Transcriptional regulation by RUNX1                                                   | 1 / 208   | 0.018    | 0.137    | 0.137 | 12 / 132  | 0.01     |
| Chromatin modifying enzymes                                                           | 1 / 240   | 0.021    | 0.156    | 0.156 | 3 / 84    | 0.006    |
| Chromatin organization                                                                | 1 / 240   | 0.021    | 0.156    | 0.156 | 3 / 84    | 0.006    |
| Metabolism of carbohydrates                                                           | 1 / 300   | 0.026    | 0.192    | 0.192 | 1 / 243   | 0.019    |
| Innate Immune System                                                                  | 2 / 1,187 | 0.104    | 0.199    | 0.199 | 2 / 697   | 0.054    |
| Generic Transcription Pathway                                                         | 2 / 1,258 | 0.11     | 0.218    | 0.218 | 13 / 824  | 0.064    |

\* False Discovery Rate

**Ek 9.** PSH hücresinde 7. günde azalan yönde regüle edilen yollar

The following table shows the 25 most relevant pathways sorted by p-value.

| Pathway name                                                          | Entities |          |         |       | Reactions |          |
|-----------------------------------------------------------------------|----------|----------|---------|-------|-----------|----------|
|                                                                       | found    | ratio    | p-value | FDR*  | found     | ratio    |
| Axonal growth inhibition (RHOA activation)                            | 1 / 9    | 7.88e-04 | 0.006   | 0.087 | 1 / 6     | 4.63e-04 |
| p75NTR regulates axonogenesis                                         | 1 / 10   | 8.76e-04 | 0.006   | 0.087 | 1 / 8     | 6.17e-04 |
| DNA Damage Recognition in GG-NER                                      | 1 / 38   | 0.003    | 0.023   | 0.087 | 1 / 5     | 3.86e-04 |
| mRNA 3'-end processing                                                | 1 / 57   | 0.005    | 0.034   | 0.087 | 3 / 3     | 2.31e-04 |
| NRAGE signals death through JNK                                       | 1 / 59   | 0.005    | 0.036   | 0.087 | 1 / 7     | 5.40e-04 |
| rRNA modification in the nucleus and cytosol                          | 1 / 60   | 0.005    | 0.036   | 0.087 | 1 / 8     | 6.17e-04 |
| RNA Polymerase II Transcription Termination                           | 1 / 66   | 0.006    | 0.04    | 0.087 | 1 / 4     | 3.09e-04 |
| Cell death signalling via NRAGE, NRIF and NADE                        | 1 / 76   | 0.007    | 0.046   | 0.087 | 1 / 17    | 0.001    |
| Transport of Mature mRNA derived from an Intron-Containing Transcript | 1 / 78   | 0.007    | 0.047   | 0.087 | 2 / 4     | 3.09e-04 |
| G alpha (12/13) signalling events                                     | 1 / 80   | 0.007    | 0.048   | 0.087 | 1 / 14    | 0.001    |
| Global Genome Nucleotide Excision Repair (GG-NER)                     | 1 / 84   | 0.007    | 0.05    | 0.087 | 1 / 20    | 0.002    |
| Transport of Mature Transcript to Cytoplasm                           | 1 / 87   | 0.008    | 0.052   | 0.087 | 2 / 13    | 0.001    |
| UCH proteinases                                                       | 1 / 96   | 0.008    | 0.057   | 0.087 | 1 / 11    | 8.49e-04 |
| p75 NTR receptor-mediated signalling                                  | 1 / 99   | 0.009    | 0.059   | 0.087 | 2 / 50    | 0.004    |
| Metabolism of RNA                                                     | 2 / 675  | 0.059    | 0.06    | 0.087 | 18 / 187  | 0.014    |
| Nucleotide Excision Repair                                            | 1 / 110  | 0.01     | 0.066   | 0.087 | 1 / 37    | 0.003    |
| Rho GTPase cycle                                                      | 1 / 141  | 0.012    | 0.083   | 0.087 | 1 / 5     | 3.86e-04 |
| Death Receptor Signalling                                             | 1 / 147  | 0.013    | 0.087   | 0.087 | 2 / 90    | 0.007    |
| mRNA Splicing - Major Pathway                                         | 1 / 180  | 0.016    | 0.105   | 0.105 | 8 / 9     | 6.94e-04 |
| Major pathway of rRNA processing in the nucleolus and cytosol         | 1 / 183  | 0.016    | 0.107   | 0.107 | 4 / 7     | 5.40e-04 |
| mRNA Splicing                                                         | 1 / 188  | 0.016    | 0.11    | 0.11  | 8 / 14    | 0.001    |
| rRNA processing in the nucleus and cytosol                            | 1 / 193  | 0.017    | 0.112   | 0.112 | 5 / 15    | 0.001    |
| rRNA processing                                                       | 1 / 203  | 0.018    | 0.118   | 0.118 | 5 / 21    | 0.002    |
| Processing of Capped Intron-Containing Pre-mRNA                       | 1 / 245  | 0.021    | 0.141   | 0.141 | 13 / 32   | 0.002    |
| Deubiquitination                                                      | 1 / 282  | 0.025    | 0.161   | 0.161 | 1 / 77    | 0.006    |

\* False Discovery Rate

## ÖZGEÇMİŞ

### I- Bireysel Bilgiler

|                             |                |
|-----------------------------|----------------|
| <b>Adı Soyadı</b>           | Katalin FÖLDES |
| <b>Doğum yeri ve tarihi</b> |                |
| <b>Uyruğu</b>               | Macar          |
| <b>Medeni durumu</b>        |                |
| <b>Telefon numarası</b>     |                |
| <b>E-posta adresi</b>       |                |

### II- Eğitimi

| Yıl        | Bölüm               | Kurum                                                     | Açıklama                                  |
|------------|---------------------|-----------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| 2019       | Viroloji            | Institute Pasteur, Paris, Fransa                          | Yeni Nesil Dizileme (NGS) veri analizi    |
| 2018       | Enfeksiöz Biyoloji  | Liverpool University; Liverpool, İngiltere                | Gelişmiş Oxford Nanopore eğitimi          |
| 2016       | Viroloji            | Ankara University, Ankara                                 | Laboratuvar Hayvanı Kullanım Sertifikası  |
| 2015-      | Viroloji            | Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi                   | Doktora                                   |
| 2011-2013  | Biyoloji            | Szent István Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Budapeşte | Yüksek Lisans                             |
| 2010-2011  | Academic English    | Tti School of English, London, İngiltere                  | İngilizce dil kursu, IELTS hazırlık kursu |
| 2007-2010  | Biyoloji            | Szent István Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Budapeşte | Lisans                                    |
| <b>Yıl</b> | <b>Yabancı dili</b> | <b>Seviye</b>                                             |                                           |

|      |           |    |
|------|-----------|----|
| 2014 | Türkçe    | C1 |
| 2011 | İngilizce | C1 |
| 2006 | Latince   | B2 |

### III- Ünvanları

| Yıl   | Ünvan     |
|-------|-----------|
| 2010  | BsC       |
| 2013  | MsC       |
| 2017- | PhD adayı |

### IV- Mesleki Deneyimi

| Mesleki Deneyimi                                                                                                                                                                                                                                     | Tarih Aralığı |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Manyetik rezonans görüntüleme ile köpek beyinciklerinin hacimsel değerlendirilmesi. Kaposvár Üniversitesi, Tanısal Görüntüleme ve Radyasyon Onkolojisi Enstitüsü, Macaristan                                                                         | 2007-2010     |
| Simian adenoviruslarının moleküler temelli karşılaştırması (Sad). Proje: Yeni klinik tedaviler olarak adenoviruslar, İLERİ, Marie-Curie eylemi: Başlangıç Eğitim Ağları. Macaristan Bilim Akademisi, Veteriner Tıbbi Araştırma Enstitüsü, Macaristan | 2011-2013     |
| Ganciclovir direncinde Sitomegalovirus (CMV) izolatların fenotipik analizi. Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Türkiye                                                                                                | 2018          |
| Kırım-Kongo Kanamalı Ateş Virusun (KKKAV) Illumina HiSeq ve Oxford Nanopore Minion dizilimi. Liverpool Üniversitesi, Bulaşıcı Biyoloji Bölümü, İngiltere                                                                                             | 2018          |
| Tübitak Araştırma ve geliştirme 1003 Projesi, Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığına Karşı Profilaktik ve İmmunoterapötik Biyolojik Madde Üretimi Proje numarası: 115S074                                                                            | 2016-2019     |
| Kırım-Kongo Kanamalı Ateş Virusuna (KKKAV) karşı önleyici ve/veya viral genom hedefli terapötik stratejilerin geliştirilmesi. Proje: TÜBİTAK no.: 119S440. Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Türkiye                 | 2020-         |

### V- Bilimsel İlgi Alanları

| Yayınlar                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Tarih Aralığı |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Földes K, Aligholipour Farzani T, Ergünay K, Ozkul A. <b>Differential Growth Characteristics of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Kidney Cells of Human and Bovine Origin.</b> Viruses. 2020 Jun 25;12(6):685. doi: 10.3390/v12060685. PMID: 32630501; PMCID: PMC7354505.                                                                                                                                                                                                                                | 2020          |
| Touraj Aligholipour Farzani, Katalin Földes, Koray Ergünay, Hakan Gurdal, Aliye Bastug, Aykut Ozkul: <b>Immunological Analysis of a CCHFV mRNA Vaccine Candidate in Mouse Models.</b> Vaccines 2019 Sep; 7(3): 115                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 2019          |
| Katalin Földes, Touraj Aligholipour Farzani, Alireza Hanifehnezhad, Aykut Özkul: <b>Differential Susceptibility Of Human And Bovine Cell Lines To Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus.</b> April 2019 Poster section of European Congress of Virology, Rotterdam, Netherlands DOI: 10.13140/RG.2.2.30333.20967                                                                                                                                                                                                | 2019          |
| Touraj Aligholipour Farzani, Katalin Földes, Alireza Hanifehnezhad, Burcu Yener Ilce, Seval Bilge Dagalp, Neda Amirzadeh Khiabani, Koray Ergünay, Feray Alkan, Taner Karaoglu, Hurrem Bodur, Aykut Ozkul: <b>Bovine Herpesvirus Type 4 (BoHV-4) Vector Delivering Nucleocapsid Protein of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Induces Comparable Protective Immunity against Lethal Challenge in IFN<math>\alpha</math>/<math>\beta</math>/<math>\gamma</math>R-/- Mice Models.</b> Viruses 2019, 11(3), 237. | 2019          |
| Touraj Aligholipour Farzani, Alireza Hanifehnezhad, Katalin Földes, Koray Ergünay, Erkan Yilmaz, Hiba Hashim Mohamed Ali, Aykut Ozkul: <b>Co-Delivery Effect of CD24 on the Immunogenicity and Lethal Challenge Protection of a DNA Vector Expressing Nucleocapsid Protein of Crimean Congo Hemorrhagic Fever Virus.</b> Viruses 2019, 11, 75; doi:10.3390/v11010075                                                                                                                                            | 2019          |
| Iva I. Podgorski, Laura Pantó, Katalin Földes, Iris de Winter, Máté Jánoska, Endre Sós, Baptiste Chenet, Balázs Harrach, Mária Benkő: <b>Adenoviruses of the most ancient primate lineages support the theory on virus-host co- evolution.</b> Acta Veterinaria Hungarica 66 (3), pp. 474–487 (2018)                                                                                                                                                                                                            | 2018          |
| Annika Brinkmann, Ender Dinçer, Ceylan Polat, Olcay Hekimoğlu, Sabri Hacıoğlu, Katalin Földes, Aykut Özkul, İbrahim Mehmet Ali Öktem, Andreas Nitsche, Koray Ergünay: <b>A metagenomic survey identifies Tamdy orthonairovirus as well as divergent phlebo-, rhabdo-, chu- and flavi- likeviruses in Anatolia, Turkey.</b> Ticks and Tick-borne Diseases Volume 9, Issue 5, July 2018, Pages 1173-1183                                                                                                          | 2018          |
| Can Sarınoğlu, Dilek Çolak, Osman Alphan Küpesiz, Mert Ahmet Kuşkucu, Koray Yalçın, İmran Sağlık, Derya Mutlu, Kenan Midilli,                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 2018          |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |      |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Olçay Peker, Betil Özhak Baysan, Katalin Földes, Aykut Özkul: <b>Genotypic and phenotypic research in Ganciclovir (GCV) resistance Cytomegalovirus (CMV) isolates.</b> 2. National Virology Days, Izmir, 22-24, March of 2018 presentation.                                                                                                                                                                                                         |      |
| Ender Dinçer, Annika Brinkmann, Olçay Hekimoğlu, Sabri Hacıoğlu, Katalin Földes, Zeynep Karapınar, Pelin Fatoş Polat, Bekir Oğuz, Özlem Orunç Kılınç, Peter Hagedorn, Nurdan Özer, Aykut Özkul, Andreas Nitsche and Koray Ergünay: <b>Generic amplification and next generation sequencing reveal Crimean-Congo hemorrhagic fever virus AP92-like strain and distinct tick phleboviruses in Anatolia, Turkey.</b> Parasites & Vectors (2017) 10:335 | 2017 |
| Földes Katalin, Lőrincz Borbála, Garamvölgyi Rita, Bajzik Gábor, Tokai Richárd, Lelovics Zsuzsanna, Repa Imre: <b>The volumetric evaluation of the canine cerebellum by using magnetic resonance imaging.</b> Hungarian Veterinary Journal, 2013/11 135. Vol. 675-684.                                                                                                                                                                              | 2013 |

## VII- Bilimsel Etkinlikleri

| Ödüller, burslar                                                                                | Tarih     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Türkiye Bursları                                                                                | 2015-2020 |
| Macaristan Cumhuriyeti Bursu                                                                    | 2012-2013 |
| Szent István Üniversitesi Veteriner Fakültesi Bilimsel Öğrenciler Derneği yarışmasında 5. oldu. | 2009      |

## VIII- Diğer Bilgiler

|                        | Tarih |
|------------------------|-------|
| Ankara Çoksesli Korosu | 2015- |